

パセドウ病など自己免疫疾患を合併した症例も存在する。このうち 11 例については CaSR の遺伝子変異の検討を行い、遺伝子多型と考える変異以外は異常を認めなかった。いずれの症例にも Western blotting 法により明らかな抗体を示す所見は認めなかった。本邦において Ca 代謝異常症における抗 CaSR 抗体の関与はまれと考えられた。

FHH の 1/3 の症例には CaSR に変異を認めず、CaSR 以外の Ca 代謝調節に関わる因子が存在するとされ、FHH 症例における遺伝子解析により、第 19 染色体の長腕と短腕に原因遺伝子が存在する可能性が考えられている。近年、ビタミン D の合成制御に関わる α Klotho が PTH の分泌制御にも関わることが報告されている。また、IHP を合併する APS I 型における副甲状腺の抗原として NACHT leucine-rich-repeat protein5 (NALP5) が同定され、弧発例の IHP においても抗原となりうる可能性が考えられる。今後、CaSR 以外に α Klotho や NALP5 の関与についても検討を要する。

【VD 不足による骨脆弱性の機序の検討】

25(OH)D は VD の充足状況を反映する最も有用な指標であるが、現在のところその測定は保険収載されていない。この測定が臨床的に有用なものであるか否かについて検討を行った。

25(OH)D 低値が大腿骨近位部骨折のリスク因子であることは報告されていたが、日本人においても 25(OH)D 低値が骨折のリスクとなるかは不明であった。今回 25(OH)D 低値が年齢や PTH、骨代謝マーカー、BMD とは独立した全脆弱性骨折のリスク因子であることを明らかにした。

25(OH)D は PTH と有意な負相関を示し、BMD と有意な正相関を示すことから、VD 不足に伴う骨脆弱性の機序には続発性副甲状腺機能亢進が関わるとされる。しかし、25(OH)D 濃度と PTH、および骨折の有無との関連性について同時に検討した報告はなく、VD における骨脆弱性の機序の詳細は明らかとなっていない。25(OH)D と PTH で 4 分割した解析において、最も高い骨折率を示したのは低 25(OH)D 低 PTH 群との結果であり、VD 欠乏における骨脆弱性亢進に副甲状腺機能亢進状態は必ずしも関与せず、むしろ VD 不足にも関わらず PTH が上昇していないことが、骨折リスクの増大に関わる可能性を初めて明らかにした。25(OH)D 低値は筋力の低下やバランス機能の低下と関連し、転倒頻度が高まることで骨折リ

スクが高まるとされるが、本検討では筋力やバランス機能とは独立したリスク因子であるとの結果であった。

25(OH)D 低値にも関わらず PTH が上昇しない原因として、糖代謝異常があげられる。糖尿病患者では PTH が低値を示すことが知られており、我々も同様の結果を得ている。しかし、本検討では糖尿病患者は含まれておらず、低 25(OH)D 低 PTH 群で HbA1c が有意に高値を示すこともなかった。従って、耐糖能障害の関与は否定された。また、我々は糖尿病群で PTH 低値かつ OC 低値が骨折のリスク因子であるとの結果を得ている。本群でも検討したが、低骨代謝回転の関与は認められなかった。

低 25(OH)D 低 PTH 群における骨脆弱性の機序を明らかにするため、この群のみで骨折の有無の検討を行ったところ、Cr や eGFR に有意差を認めた。我々はこれまでに CKD (chronic kidney disease) ステージ 2 程度の軽度腎障害であっても CCr が骨折リスク因子であることを報告している。CKD ステージ 2 程度から、糖化終末産物 (AGEs) の上昇を認めることや、ホモシステインの上昇を認めることが報告されており、これが骨折リスクの増大に関与する可能性がある。低 25(OH)D にもかかわらず PTH が上昇せず骨脆弱性が高まる機序の一部に腎機能低下が関与する可能性を初めて明らかにした。

25(OH)D と PTH は有意な負相関を有するが、25(OH)D 低値にも関わらず PTH が上昇できない群が存在する。VD を補充する場合は上昇した PTH を低減させることを指標とするとされてきたが、この概念を再考する必要があり、25(OH)D 自体の測定を要する。また、25(OH)D と PTH の相関の機序の詳細は明らかとなっておらず、今後これらの群の更なる検討は PTH 分泌調節機構の解明の一助となりうると思う。

E. 結論

PTH の相対的高値を伴う高 Ca 血症の弧発例 2 症例において、患者血清中に CaSR 抗体は認められず、本 2 症例の病因として CaSR 抗体以外の未知の PTH 分泌に関わる因子の関与の可能性が示唆された。検討した範囲では IHP18 症例において CaSR 抗体は認められなかった。本邦において CaSR 抗体が病因となる Ca 代謝異常症はまれである可能性が考えられた。

閉経後女性において、VD 不足は約 8 割に存在し、日本人においても 25(OH)D 低値は BMD や PTH と

は独立した骨脆弱性のリスク因子であるといえる。全脆弱性骨折の有無から算出した 25(OH)D のカットオフ値は 16ng/ml であった。VD 不足における骨脆弱性亢進に副甲状腺機能亢進状態は必ずしも関与せず、むしろ VD 不足にも関わらず PTH が上昇していないことが、骨折リスクの増大に関わる。PTH 分泌不全を伴う VD 不足による骨の脆弱性に関わる因子として、腎機能低下の関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaji H, Yamauchi M, Nomura R and Sugimoto T. Two-year longitudinal changes of cortical bone geometry in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism without parathyroidectomy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009, 117: 633-636.
- 2) Kanazawa I, Yamauchi M, Yano S, Imanishi Y, Kitazawa R, Nariai Y, Araki A, Kobayashi K, Inaba M, Maruyama R, Yamaguchi T and Sugimoto T. Osteosarcoma in a pregnant patients with McCune-Albright syndrome. *Bone* 2009, 45:603-608.
- 3) Inoue Y, Canaff L, Geoffrey H, Hisa I, Sugimoto T, Chihara K and Kaji H. Role of smad3, acting independently of transforming growth factor- β in the early induction of Wnt- β -signaling by parathyroid hormone in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 2009, 108:285-294.
- 4) Takase H, Yano S, Yamaguchi T, Kanazawa I, Hayashi K, Yamauchi M, Yamamoto M and Sugimoto T. Parathyroid hormone up-regulates BMP-2 mRNA expression mediated through mevalonate kinase inhibition in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Horm Metab Res* 2009, 41:861-865.
- 5) Shimizu Y, Tada Y, Yamauchi M, Okamoto T, Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Sugimoto T and Fujita T. Hypophosphatemia induced by intravenous administration of saccharated ferric oxide-Another firm of FGF23-related hypophosphatemia. *Bone* 2009, 45:814-816.
- 6) Bergwitz C, Banerjee S, Abu-Zahra H, Kaji H, Miyauchi A, Sugimoto T and Jueppner H.

Defective O-glycosylation due to a novel homozygous S129P mutation is associated with lack of fibroblast growth factor 23 secretion and tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94:4267-4274. Yano S, Brown EM, Takase H, Wada A, Suzuki K, Kobayashi A and Sugimoto T. A new parameter for quantifying parathyroid function in patients undergoing hemodialysis. *Nephron Clin Pract.* 2010, 115:C51-C58

- 7) Miyauchi A, Matsumoto T, Sugimoto T, Tsujimoto M, Warner MR and Nakamura T. Effect of teriparatide on bone mineral density and bone turnover markers in Japanese subjects with osteoporosis at high risk of fracture: a 12-month, randomized placebo-controlled, double-blind study with a 6-month open-label extension. *Bone* 2010, 47:493-502
- 8) Takaoka S, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M and Sugimoto T. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. *Horm Metab Res.* 2010, 42:627-631, 2010
- 9) Yamauchi M, Kaji H, Nawata K, Takaoka S, Yamaguchi T, Sugimoto T. Role of Parathyroid Hormone in Bone Fragility of Postmenopausal Women with Vitamin D Insufficiency. *Calcif Tissue Int.* 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]
- 10) 飛松崇子、梶博史、井上喜文、内藤純子、余美慧、山内美香、鹿股直樹、宮内章光、今西康雄、杉本利嗣、千原和夫. 活性型ビタミン D 高値が遷延した副鼻腔腫瘍による腫瘍性低リン血症性骨軟化症の一例. *ホルモンと臨床.* 56:172-177, 2008
- 11) 多田裕子、山内美香、小川典子、山本昌弘、矢野彰三、山口徹、福本誠二、杉本利嗣. 含糖酸化鉄の静脈内投与にて低 P 血症性骨軟化症をきたした 1 例. *日本内分泌学会雑誌* 84 Suppl:54-56, 2008
- 12) 杉本利嗣. 臨床内分泌代謝・最近の進歩: 骨・カルシウム. *日本内分泌学会雑誌* 84 Suppl:17-19, 2008
- 13) 山内美香、杉本利嗣. 新版 処方計画法: 副甲状腺機能低下症. *総合臨床* 57: 1200-1202, 2008

- 14) 矢野彰三, 杉本利嗣. 私の処方: 維持血液透析中の二次性副甲状腺機能亢進症に対する内科的治療. *Modern Physician*. 2009, 29:534-535
- 15) 矢野彰三, 杉本利嗣. リン代謝の臨床: 生体におけるリンの分布と生理的意義; 存在様式、分布、生理機能. *Clinical Calcium*. 2009, 19:771-776
- 16) 比佐伊都子, 井上喜文, 河原啓, 片桐岳信, 杉本利嗣, 清野進, 梶博史. 血清中に BMP 作用阻害因子の存在が示唆された FOP 患者の一例. *日本内分泌学会雑誌*. 2009, 85 Suppl:98-100
- 17) 山内美香, 杉本利嗣. 電解質異常を手がかりとした内分泌疾患の診断と治療: 低カルシウム血症. *内分泌・糖尿病科* 2009, 29:413-419.
- 18) 杉本利嗣. 低リン血症. *今日の診断指針第6版*, 2010, 100-101
- 19) 杉本利嗣. 副甲状腺機能低下症. *今日の診断指針第6版*, 2010, 1148-1151
- 20) 杉本利嗣. 内科疾患の診断基準・病型分類・重症度; 副甲状腺機能亢進症. *内科増大号* 2010, 105:1529-1532
- 21) 杉本利嗣. 内科疾患の診断基準・病型分類・重症度; 高 Ca 血症性クリーゼ. *内科増大号*. 2010, 105:1571
- 22) 杉本利嗣. 内分泌疾患における Evidence に基づいた治療とは? 無症候性と正カルシウム血症性原発性副甲状腺機能亢進症の治療方針. *内分泌・糖尿病・代謝内科*. 2010, 30:428-435
- 23) 梶博史, 杉本利嗣. サイトカインと骨疾患: PTH の骨アナボリック作用とサイトカイン. *Clinical Calcium*. 2010, 20:1555-1561
- 24) 杉本利嗣. 骨粗鬆症 Update; 骨形成促進薬の現状と展望. *BIO Clinica*. 2010, 25:1238-1243
2. 学会発表
- 1) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Nawata K and Sugimoto T. Decreased PTH secretion is associated with low bone formation and vertebral fracture risk in postmenopausal women with type 2 diabetes. The American Society for Bone Mineral Research 32th annual meeting, (Toronto), 2010. 10.15-19, ASBMR 2010 Annual Meeting Abstracts, S84, 2010
- 2) Matsumoto T, Sugimoto T, Sowa H, Tsujimoto M, Hatano M, Awa T, Iikuni N, Miyauchi A, Warner MR and Nakamura T. Teriparatide treatment in Japanese subjects with osteoporosis at high risk of fracture: Effect on bone mineral density and bone turnover markers during 12 month, randomized, placebo-controlled, double-blind and 12-month open-label study periods. The American Society for Bone Mineral Research 32th annual meeting, (Toronto), 2010. 10.15-19, ASBMR 2010 Annual Meeting Abstracts, S204, 2010
- 3) 山内美香, 山口徹, 名和田清子, 高岡伸, 杉本利嗣. 閉経後女性の骨脆弱性と血清 25(OH)D ならびに PTH との関係. 第 83 回日本内分泌学会学術総会(京都) 2010 年 3 月 25-28 日
- 4) 山内美香, 杉本利嗣. Vitamin D insufficiency と骨代謝. Vitamin D insufficiency と骨脆弱性. 第 28 回日本骨代謝学会(東京) 2010 年 7 月 21-23 日. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. p116. 2010
- 5) 杉本利嗣. PTH(anabolic agent)の基礎と臨床. 骨形成促進剤としての PTH の臨床応用への展開. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会(東京) 2010 年 7 月 21-23 日. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. p127. 2010
- 6) 高岡伸, 山口徹, 矢野彰三, 山内美香, 山本昌弘, 杉本利嗣. ストロンチウムの骨芽細胞活性化、骨形成促進作用におけるカルシウム感受容体の関与. 第 28 回日本骨代謝学会(東京) 2010 年 7 月 21-23 日. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. p242, 2010
- 7) 山本昌弘, 名和田清子, 山内美香, 山口徹, 杉本利嗣. 閉経後 2 型糖尿病女性の低 PTH 分泌に伴う低骨形成状態は、骨密度とは独立した椎体骨折の危険因子である. 第 12 回日本骨粗鬆症学会(大阪) 2010 年 10 月 21-23 日. *Osteoporosis Japan* 18, Suppl.1:209, 2010
- 8) 山内美香, 山口徹, 名和田清子, 高岡伸, 杉本利嗣. 閉経後女性における脆弱性骨折リスクと血清 25(OH)D の関係: PTH の関与の検討. 第 12 回日本骨粗鬆症学会(大阪) 2010 年 10 月 21-23 日. *Osteoporosis Japan* 18, Suppl.1:230, 2010

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

ビタミンD充足度とPTH反応性に関する研究

分担研究者 岡崎 亮（帝京大学ちば総合医療センター第三内科 教授）

研究概要 骨軟化症を来さない程度のビタミンD不足は骨粗鬆症性骨折のリスクとなる。しかし日本人において、ビタミンD不足規定する血清 25(OH)D 濃度の域値は不明である。本研究では、ビタミンD代謝異常のない日本人成人男女にビタミンD3を経口負荷し、ビタミンD不足の閾値を検討した。その結果、血清 25(OH)D は PTH と負の相関を示し、25(OH)D 濃度 28 ng/ml 以上では 25D-PTH 近似曲線がほぼプラトー(PTH=40 pg/ml)に達した。負荷前後の PTH 変化量も負荷前の 25D と負に相関し、25D 前値が 28ng/ml 以上では PTH 上昇がみられなかった。一方、別のコホート(CHIBA study)においても 25D と PTH との関係はほぼ同様であり、血清 25D が 28ng/ml 未満の群では 28ng/ml 以上の群に比して有意に PTH および骨代謝マーカーが上昇していた。したがって、日本人成人のビタミンD不足の閾値として、血清 25(OH)D 濃度 28 ng/ml を提唱したい。一方、CHIBA study コホートにおいて 25D 20 ng/ml 未満と明らかなビタミンD不足の存在する集団において、PTH 亢進に関連する因子を解析した。その結果、163 例中 53 例において、PTH は 40 pg/ml 未満で、分泌亢進が認められなかった。この PTH 分泌非亢進群においては、亢進群と比較して、骨代謝マーカー低値傾向、血清 P 高値および 1,25(OH)₂D 低値など、PTH 作用低下を反映すると推定される差異が認められた。しかし、血清 FGF23 値を含めて、PTH 分泌に影響を及ぼすと考えられる諸指標に差異はなかった。したがって、ビタミンD不足における PTH 分泌既定因子に関しては、更なる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

体内のビタミンD貯蔵量は、血清 25(OH)D 濃度を測定することにより可能である。著しい低 25(OH)D 血症を呈するビタミンD欠乏症は、くる病・骨軟化症の原因となり、速やかな治療を要する。一方、欠乏症に至らない程度の低 25(OH)D 血症が PTH 分泌上昇を介した骨代謝回転の亢進や、筋力低下と関連した転倒頻度の増大をもたらす、骨粗鬆症性骨折のリスクとなっていることが、諸外国の検討から明らかにされ、このような状態は一般にビタミンD不足と呼ばれている。さらに、近年ではビタミンD不足が、糖尿病などの代謝疾患、心筋梗塞・高血圧などの心血管系疾患、感染症、自己免疫疾患などのリスクになっているとの報告もある。しかし、ビタミンD不足を規定する血清 25(OH)D 濃度については未だ一定の見解がない。

一般に、血清 25(OH)D 濃度と PTH 濃度は負の相関関係を示すことから、ビタミンD不足の域値決定法

として PTH を用いることが最も多い。横断的に両者を検討した過去の欧米での結果からは、血清 25(OH)D 値 20~44 ng/ml で PTH 値は底値に安定すると報告されている。しかし、ビタミンD充足時の PTH 値は個人により異なると考えられ、事実、明らかにビタミンD不足・欠乏と考えられても、PTH が基準値内に収まる例も多い。また、現行の PTH 基準値はビタミンD不足者を多く含む一般人口から設定されているため、横断的検討から PTH の分泌過剰の有無を判断するのは困難である。

そこで本研究においては、ビタミンD3 負荷前後の血清 25(OH)D と PTH 値を測定し、PTH の変化からビタミンD不足と充足の境界域値を決定することを第一の目的とした。

さらに、この様な方法で策定した 25D 閾値について多角的な統計的検討を加えるとともに、他のコホートにおいてその妥当性を検証した。一方、従来から

ビタミン D 不足であっても、PTH 分泌が亢進する群と亢進しない群があることが指摘されている。そこで、コーホートにおいて、PTH 分泌亢進の有無と種々の因子の関係を解析し、その意義および原因の解析を試みた。

B. 研究方法

- 1) ビタミンD代謝異常がないと考えられる成人 107 名にビタミンD₃(800-1200 国際単位/日)を 4-8 週間経口負荷した。その前後に、採血を行い、血清 25(OH)D、PTH、Ca、P、Mg を測定した。また、食餌からの Ca 摂取量をアンケート法で調査した(ビタミン D 負荷試験)
- 2) 帝京大学ちば総合医療センターで冠動脈造影検査を受けた腎機能正常 (eGFR>60ml/min) 男性 168 名においてビタミン D 代謝産物および諸種の骨・Ca 関連指標の血中濃度を測定した CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) study。
- 3) 倫理面への配慮:本研究のプロトコールは倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

(1) ビタミン D₃ 経口負荷試験

- 1) 血清 25(OH)D と PTH 濃度の間には負の相関関係が認められた ($r=-0.24$, $P < 0.001$)。
- 2) 上記の 25D-PTH 散布図においてビタミン D 負荷前後の 3 次近似曲線はほぼ連続的であり、両者を合わせた曲線ではビタミン D が 30ng/ml 前後から PTH は 40 pg/ml のプラトーに達した。
- 3) 漸近線を有するモデルとして単純な $y=C1+C2\exp(-\lambda x)$ をあてはめると、25D $\rightarrow\infty$ の時 PTH=28 に収束した。
- 4) ビタミン D 負荷前後の PTH の変化 (Δ PTH) は、負荷前の血清 25(OH)D 濃度と正の相関 ($r = 0.21$, $P < 0.05$) を示した。回帰直線の X 切片は、25(OH)D 濃度 28 ng/ml であり、25(OH)D 前値が 28 ng/ml 未満の場合にビタミン D 負荷後の PTH 低下が生ずると考えられた。多変量解析で血中 PTH の規定因子を解析したところ、25(OH)D 濃度以外に年齢が正の因子として抽出された。なお、血清 Mg 濃度や食餌からの Ca 摂取量は PTH 濃度に影響を及ぼしていなかった。

(2) CHIBA study

- 1) 血清 25D 濃度は 168 名で 40ng/ml 未満であり、平均 19.5ng/ml であった。これは前述の試験および他の国内の報告とほぼ comparable な値と考えられた。
- 2) 25D-PTH 間には有意な負相関がみられ、3 次近似曲線では前述のビタミン D 負荷試験の場合とほぼ同様に、25D が 28 ng/ml 前後からほぼ水平になり PTH=35-40pg/ml のプラトーに達した。
- 3) 25D=28ng/ml で 2 群に分けると、28 未満の群では 28 以上の群に比して、PTH 及び骨代謝マーカー (β CTX, I-CTP, N-mid osteocalcin) が有意に高値であった。したがって、25D が 28 未満では骨代謝の亢進が起こり骨粗鬆症のリスクが増大する可能性が示唆された。
- 4) このコーホートにおいて 25D 20 ng/ml 未満と明らかなビタミン D 不足が存在するサブグループにおいて、2/3 は PTH 40 pg/ml 以上と PTH 分泌の相対的亢進が認められたが、残りの 1/3 は PTH 40 pg/ml と分泌亢進が認められなかった。PTH 分泌亢進群では、N-mid osteocalcin が有意に高値であり、その他の骨代謝マーカーも有意ではないが高値傾向を示したことから、骨代謝の亢進が起こり骨粗鬆症のリスクが増大する可能性が示唆された。一方、PTH 高値群は P が有意に低値で、1,25(OH)₂D が高値であったが、これらは PTH 作用亢進の結果と考えられた。FGF23 を含め、その他の指標については、PTH 高値群と低値群の間に有意な差異は認められなかった。

D. 考察

以上の検討により、血清 25(OH)D 濃度が 28 ng/ml をビタミン D 不足の域値とすることは妥当と判断した。またビタミン D 充足状態における PTH は約 40 pg/ml と考えられた。しかしながら、ビタミン D 不足は本邦においても高頻度であり大部分が 25D<28ng/ml となってしまうことから、本検討においてもこれ以上の高値域について十分な解析が不可能であった。したがってビタミン D 不足の閾値は 28ng/ml 以上の高値である可能性があることに留意すべきであり、さらなる検討を要する。

一方、以上の検討により、血清 25(OH)D 濃度が 20 ng/ml で、明らかなビタミン D 不足であっても PTH 40 pg/ml 未満と PTH 分泌の亢進が認められない例が多

く存在することが確認された。

PTH 高値例と低値例間には、骨代謝マーカー、血清 P 濃度など、差異が認められたが、これらは PTH 作用の結果と考えられた。FGF23 値を含め、PTH 分泌に影響を及ぼすとかがえられる指標には差異がなく、PTH 反応性の既定因子についてはさらに検討が必要と考えられた。

E. 結論

日本人成人のビタミン D 不足の閾値として、血清 25(OH)D 濃度 28 ng/ml を提唱する。

ビタミン D 不足は、PTH 高値、骨代謝マーカー高値など、骨粗鬆症増悪因子となる。しかし、ビタミン D 不足であっても、PTH 分泌亢進が認められない集団が 1/3 程度存在する。このような、ビタミン D 不足における PTH 反応性は、血清 Ca、P、Mg、FGF23 など既知の因子によっては規定されていなく、更なる検討を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia and Bone Association) Study: CAG 施行例における冠動脈疾患と骨代謝との関連についての検討 井上 大輔、天木 幹博、中津 裕介、綾部 健吾、大橋 潤一、檜垣 忠直、中村 文隆、岡崎 亮 Osteoporosis Japan 17(2):238-240, 2009.
- 2) Vitamin D Insufficiency Defined by Serum 25-Hydroxyvitamin D and Parathyroid Hormone Before and After Oral Vitamin D₃ Load in Japanese Subjects. Ryo Okazaki, Toshitsugu Sugimoto, Hiroshi Kaji, Yoshio Fujii, Masataka Shiraki, Daisuke Inoue, Itsuro Endo, Toshio Okano, Takako Hirota, Issei Kurahashi, Toshio Matsumoto JBMM 29(1): 103-110, 2011.

2. 学会発表

- 1) 第 50 回日本老年医学会学術集会・総会 (6/19-21/2008、千葉)シンポジウム「骨粗鬆症と変形性関節症:研究と診療の最前線」カルシウム代謝調節ホルモンから観た高齢者の骨粗鬆症. 岡崎 亮

- 2) 第 10 回日本骨粗鬆症学会 (10/31-11/2/2008、大阪) CHIBA (Coronary Heart Diseases of Ischemia and Bone Association) Study: CAG 施行例における冠動脈疾患と骨代謝との関連についての検討
井上大輔、天木幹博、中津祐介、綾部健吾、大橋潤一、檜垣忠直、中村文隆、岡崎亮
- 3) 第 82 回日本内分泌学会学術総会 (4/23-25/2009、前橋):
Coronary Heart Disease of Ischemia and Bone Association (CHIBA) study:
CAG 施行例における心機能と骨代謝との関連
井上大輔、天木幹博、中津裕介、綾部健吾、大橋潤一、檜垣忠直、中村文隆、岡崎亮
- 4) 第 27 回日本骨代謝学会学術総会 (7/23-25/2009、大阪)
日本人のビタミン D 不足を規定する血清 25 水酸化ビタミン D 濃度の検討
岡崎亮、杉本利嗣、梶博史、藤井芳夫、白木正孝、井上大輔、遠藤逸朗、岡野登志夫、廣田孝子、松本俊夫
- 5) 第 11 回日本骨粗鬆症学会 (10/14-16/2009、名古屋)(English Session)
Association between Bone Metabolic Markers and Cardiac Function
-CHIBA(Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) Study-
Daisuke Inoue, Toshihiro Amaki, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki
- 6) ASBMR 31th Annual Meeting (Denver, Colorado, USA 9/11-15/09)
ICTP Is the Best Predictor of Cardiac Damage And Dysfunction Among Bone Metabolic Markers And Hormones in Men: CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) Study
Daisuke Inoue, Mikihiro Amaki, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki
- 7) 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/27-29/10、岡山)腎機能正常なCAG施行男

性例においてHbA1c及び骨吸収(コラーゲン代謝)マーカーは冠動脈狭窄病変枝数や心機能障害の予測因子となる 井上大輔、天木幹博、中津裕介、綾部健吾、大橋潤一、檜垣忠直、田井宣之、中村文隆、岡崎亮

- 8) 第28回日本骨代謝学会学術集会(7/21-23/10、東京) 骨代謝回転は1,25ビタミンDと独立な血清FGF23濃度の規定因子である。井上大輔、天木幹博、福本誠二、清水祐一郎、田井宣之、中村文隆、岡崎亮
- 9) 第12回日本骨粗鬆症学会(10/22-24、大阪)低カルボキシル化オステオカルシン/総オステオカルシン比は高骨代謝回転で増加し、高血糖で低下する。井上大輔、天木幹博、田井宣之、中村文隆、岡崎亮
- 10) 第12回日本骨粗鬆症学会(10/22-24、大阪)糖尿病、高血圧及び脂質代謝異常合併骨粗鬆症患者に対するリセドロネート(RIS)の有効性と安全性—日本国内Phase3データを利用したサブ解析— 岡崎亮、西澤良記、井上大輔、杉本利嗣
- 11) 14th International Congress of Endocrinology (Kyoto, Japan, 3/26-30/10) MMP-dependent collagen breakdown is a major contributor to the increased bone markers in cardiovascular diseases: CHIBA (Coronary Heart Diseases of Ischemia And Bone Association) Study. Daisuke Inoue, Mikihiro Amaki, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki
- 12) IOF WCO-ECCEO10 (Florence, Italy, 5/4-8/2010) ICTP Is the Best Predictor of Cardiac Damage And Dysfunction Among Bone Metabolic Markers And Hormones in Men: CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) Study. Daisuke Inoue, Toshihiro Amaki, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki
- 13) ASBMR 32th Annual Meeting (Toronto, ON, Canada 10/15-19/10) (Plenary Poster) Bone turnover and 1,25-dihydroxyvitamin D are

independent determinants of circulating FGF23: a sub-analysis of CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia and Bone Association) study. Daisuke Inoue, Toshihiro Amaki, Yuichiro Shimizu, Seiji Fukumoto, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki

- 14) ASBMR 32th Annual Meeting (Toronto, ON, Canada 10/15-19/10) Safety and efficacy of Risedronate in osteoporosis patients with diabetes mellitus, hypertension or dyslipidemia—A pooled analysis of three clinical trials in Japan— Ryo Okazaki, Daisuke Inoue, Yoshiki Nishizawa, Ryoichi Muraoka, Toshitsugu Sugimoto

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許の取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明

分担研究者 加藤茂明（東京大学分子細胞生物学研究所 教授）

研究要旨 ビタミン D 受容体 (VDR) を介するリガンド依存的な転写抑制機構に関しては、リガンド依存的転写活性化機構と比較し、依然として不明な点が多い。特に転写抑制に関係する因子群の実態は未知である。現在までに、ビタミン D₃1 α 水酸化酵素 [1 α (OH)ase] 遺伝子プロモーター領域の VDR 転写抑制エレメント (nVDRE) に結合する転写因子 VDIR および制御因子 DNA メチル化酵素、更に VDIR 機能を制御する因子として新規に脱メチル化酵素 MBD4 を見出し、生体内カルシウム代謝制御におけるビタミン D および PTH 依存性 VDR 転写制御機構において、可逆的な DNA メチル化制御が重要な役割を担う可能性が示唆された。また MBD4 ノックアウトマウスを用いた解析により、生体内においても MBD4 が 1 α (OH)ase 遺伝子の脱メチル化に必須の因子であることを明らかにした。更に、MBD4 ノックアウトマウスでは皮質骨の骨量が減少することを明らかにし、MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇する標的遺伝子候補を数種類同定した。これら一連の研究はホルモン依存的な DNA メチル化/脱メチル化の可逆的な転写制御機構が生体内においても重要な位置づけを占めていることを示唆するものであり、ビタミン D 代謝、カルシウム代謝、骨代謝を考える上で新しい知見となり得ると考えられる。

A. 研究目的

ビタミン D は、カルシウム代謝の主要制御ホルモンである。その生理的重要性については広く認められており、更にビタミン D 剤は臨床的にも汎用されている。ビタミン D の作用はその核内レセプター (VDR) を介して発揮されると考えられているが、VDR を介する転写制御の分子機構や VDR 発現組織での特異的高次機能に関しては未だ不明な点が多く、特に VDR を介するリガンド依存的な転写抑制機構に関しては未知である。我々はこれまでビタミン D₃1 α -水酸化酵素 [1 α (OH)ase] 遺伝子プロモーター領域の VDR 転写抑制エレメント (nVDRE) に結合する転写因子 VDIR を同定した。しかしながら、VDIR および E-box 型 nVDRE を介するリガンド依存的 VDR 転写抑制の分子機構については不明であった。そこで本研究では、まず生化学的な手法を用いて VDIR と相互作用する複合体タンパク質群の単離・同定を試み、さらに同定された因子の生体内高次機能の解析を試みた。

B. 研究方法

- 1) VDIR による VDR 転写抑制の分子機構を明らかにする目的で、以下の実験を行った。
 - i) FLAG タグを含む VDIR 発現ベクターを細胞内で強制発現させ、大量培養を行った。細胞株にはマウス腎臓近位尿細管由来である MCT 細胞を用いた。
 - ii) 抗 FLAG 抗体アガロースビーズを用いて細胞核タンパク質から VDIR 相互作用因子群を単離し、SDS-PAGE 後質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて単離したタンパク質群の同定を行った。
 - iii) 同定タンパク質のビタミン D 依存的な 1 α (OH)ase 遺伝子 mRNA 発現制御への効果を、ChIP アッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、免疫沈降法にて検討を行った。
 - iv) 同定タンパク質の DNA メチル化、脱メチル化への影響を *in vitro* アッセイで検討した。
- 2) *in vitro* で同定した脱メチル化制御因子である

MBD4 の重要性を個体レベルで評価するため、MBD4 ノックアウトマウスの解析をおこなった。

- i) MBD4 ノックアウトマウス及び野生型マウスにビタミン D 及び PTH を投与し、腎臓より RNA およびゲノム DNA を調製し、それぞれ 1α (OH)ase 遺伝子発現および 1α (OH)ase 遺伝子プロモーター領域のメチル化について検討した。
- ii) MBD4 ノックアウトマウスにおけるカルシウム代謝に関わる血中生化学データについて検討した。
- iii) MBD4 ノックアウトマウスの骨の表現型について軟 X 線撮影および骨密度測定により検討した。
- iv) マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR 法により MBD4 による脱メチル化を介し制御される標的遺伝子の同定を試みた。

C. 研究結果および考察

1)では FLAG タグ付 VDIR 発現ベクターを MCT 細胞内に強制発現させる事に成功した。更にこれら細胞を大量培養後、抗 FLAG 抗体アガロースビーズを用いて FLAG-VDIR 相互作用因子群の精製を行った。その結果、DNA メチル化酵素 Dnmt3b を同定した。 1α (OH)ase 遺伝子プロモーター上のメチル化 DNA 分布を検討した結果、ビタミン D 依存的なメチル化 DNA の上昇が観察された。

さらに、精製の結果、DNA glycosylase 活性を有する MBD4 を同定した。本因子の転写制御における機能は未知である。免疫沈降法にて検討を行った所、MBD4 と VDIR、VDR の相互作用を確認した。また、MBD4 の RNAi によって、PTH 依存的な 1α (OH)ase 遺伝子 mRNA 発現誘導の解除が観察された。更に 1α (OH)ase 遺伝子プロモーター上のメチル化 DNA 分布を検討した結果、PTH 処理後迅速にメチル化が解除される事を見出し、ビタミン D 依存的な DNA の脱メチル化を初めて見出す事が出来た。さらにノックダウンの結果、MBD4 は PTH 依存的な DNA 脱メチル化に必須であった。

2)では野生型(WT)マウスにカルシトリオール(VD3)の投与実験をおこなったところ $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の量で 3 日間経口投与した場合に腎臓における 1α (OH)ase 遺伝子の発現が最も低下することが明らかになった。更に、この条件で VD3 を 3 日間投与後、

翌日 PTH を $320\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与すると、 1α (OH)ase 遺伝子の発現量は無投薬群と同程度まで回復することが明らかになった。そこでこの系を用いて、WT と KO マウスの比較を行った。VD3 を投与した群における 1α (OH)ase 遺伝子の発現は、WT、KO のいずれにおいても効果的に抑制された。次に VD3 を投与後、PTH で刺激した群における 1α (OH)ase 遺伝子の発現量は前述の通り、WT では無投薬群と同程度まで回復したが、KO では回復せずに抑制されたままであった。また血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度および腎臓での 1α (OH)ase mRNA を検出する *in situ* hybridization 法でも同様の結果となった。

次に、無投与、VD3 投与、VD3 投与後 PTH 刺激の 3 つの群の WT、KO マウスの腎臓からゲノム DNA を調製し、 1α (OH)ase 遺伝子のプロモーターのメチル化状態を Bisulfite sequencing 法を用いて検討した。WT、KO ともに、VD3 投与により無投与群と比較し劇的に 1α (OH)ase 遺伝子のプロモーター上のメチル化 CpG が増加した。また、WT では、PTH 刺激群においてメチル化 CpG が減少したが、KO では PTH 刺激群においてもメチル化 CpG は増加したままであった。よって *in vivo* においても、VD3 による 1α (OH)ase 遺伝子プロモーターのメチル化、PTH による脱メチル化制御がみられ、この脱メチル化は MBD4 を介していることが明らかになった。

次に MBD4 ノックアウトマウスのカルシウム代謝に関わる血中生化学データについて検討した結果、MBD4 ノックアウトマウスでは血中カルシウム、リン、PTH、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度はいずれも野生型と比較し有意な差は認められなかった。しかしながら MBD4 ノックアウトマウスの骨の表現型について軟 X 線撮影および骨密度測定により検討した結果、MBD4 ノックアウトマウスは野生型と比較し皮質骨の骨量および骨密度が有意に減少していることが明らかになった。

次に MBD4 ノックアウトマウスの骨密度減少の原因を明らかにする目的で、マイクロアレイ解析により MBD4 による脱メチル化を介し制御される標的遺伝子の同定を試みた。その結果、野生型と比較し MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇する標的遺伝子候補が数種類同定された。このうち MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein) について、リアルタイム PCR により追試を行った結果、マイクロアレイの結果と同様、MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇することが明らかに

なった。

これらの結果から MBD4 はビタミン D 代謝異常に対しては 1α (OH)ase 遺伝子発現制御を介して、正常化しよう働くが、ビタミン D 代謝が正常な場合においても MBD4 は作用をもち、骨代謝を正に制御する因子であることが示唆された。

またマイクロアレイ解析の結果、野生型と比較し MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇する標的遺伝子候補の一つとして MEPE が同定された。MEPE は Phex (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)の基質として同定された糖タンパクで骨細胞に発現しており、C 末にある ASARM モチーフがハイドロキシアパタイトと結合し石灰化障害をきたすことが報告されている。よって MBD4 ノックアウトマウスで観察された骨量減少は、MBD4 による MEPE 遺伝子の発現抑制の解除により生じた可能性が示唆された。

D. 結論

本研究において、in vitro の実験系により、VDIR の相互作用因子として DNA メチル化酵素を同定した。更に VDIR 機能を制御する因子として新規に脱メチル化酵素 MBD4 を見出した。これらの結果より、生体内カルシウム代謝制御におけるビタミン D および PTH 依存性 VDR 転写制御機構において、可逆的な DNA メチル化制御が重要な役割を担う可能性が示唆された。さらに MBD4 のノックアウトマウスの解析により、MBD4 はビタミン D 代謝異常に対しては 1α (OH)ase 遺伝子発現制御を介して、正常化しよう働くが、ビタミン D 代謝が正常な場合においても MBD4 は作用をもち、骨代謝を正に制御する因子であることが示唆された。これら一連の研究はホルモン依存的な DNA メチル化/脱メチル化の可逆的な転写制御機構が生体内においても重要な位置づけを占めていることを示唆するものであり、ビタミン D 代謝、カルシウム代謝、骨代謝を考える上で新しい知見となり得ると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi, S., Watanabe, T., Okada, M., Inoue, K., Ueda, T., Takada, I., Watabe, T., Yamamoto, Y., Fukuda, T., Nakamura, T., Akimoto, C.,

Fujimura, T., Hoshino, M., Imai, Y., Metzger, D., Miyazono, K., Minami, Y., Chambon, C., Kitamura, T., Matsumoto, T., and Kato, S.: Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011 (in press).

- 2) Baba, A., Ohtake, F., Okuno, Y., Yokota, K., Okada, M., Imai, Y., Ni, M., Meyer, A. C., Igarashi, K., Kanno, J., Brown, M. and Kato, S.: Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex. *Nat. Cell Biol.* 2011 (in press).
- 3) Akimoto, C., Ueda, T., Inoue, K., Yamaoka, I., Sakari, M., Obara, W., Fujioka, T., Nagahara, A., Nonomura, N., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Miki, T., Matsumoto, T., Kitagawa, H. and Kato, S.: Testis-specific protein on Y chromosome (TSPY) represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ-cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19891-19896, 2010.
- 4) Youn, M. Y., Takada, I., Imai, Y., Yasuda, H. and Kato, S.: Transcriptionally active nuclei are selective in mature multinucleated osteoclasts. *Genes to Cells* 15, 1025-1035, 2010.
- 5) Yokoyama, A., Okuno, Y., Chikanishi, T., Hashiba, W., Sekine, H., Fujiki, R. and Kato, S.: KIAA1718 is a histone demethylase that erases repressive histone methyl marks. *Genes to Cells* 15, 867-873, 2010.
- 6) Matsuyama, R., Takada, I., Yokoyama, A., Fujiyama-Nakamura, S., Tsuji, N., Kitagawa, H., Fujiki, R., Kim, M., Kouzu-Fujita, M., Yano, T. and Kato, S.: Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1. *J. Biol. Chem.* 285, 18166-18176, 2010.
- 7) Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S.: Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 24, 877-885, 2010.

- 8) Chikanishi, T., Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A. and Kato, S.: Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 865-870, 2010.
- 9) Takada, I., Tsuji, N., Youn, M. Y., Fujiyama, S., Okada, M., Imai, Y., Kondo, S., Kitakawa, H., Yasuda, H. and Kato, S.: Purification and identification of estrogen receptor alpha co-regulators in osteoclasts. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1192, 201-207, 2010.
- 10) Takada, I., Kouzmenko, A. P., Kato, S.: PPAR-gamma signaling crosstalk in mesenchymalstem cells. *PPAR Research* 2010, Article 341671, 6 pages.
- 11) Youn, M. Y., Fujiyama-Nakamura, S., Takada, I., Imai, Y. and Kato, S.: Identification of osteoclastic factors in the nuclear envelope of mature, multinucleated osteoclasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1956-1959, 2010.
- 12) Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Umetsu, D., Ito, T., Takeyama, K. and Kato, S.: A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.* 24, 159-170, 2010.
- 13) Ochiai, E., Kitagawa, H., Takada, I., Fujiyama, S., Sawatsubashi, S., Kim, M. S., Mezaki, Y., Tsushima, Y., Takagi, K., Azuma, Y., Takeyama, K., Yamaoka, K., Kato, S. and Kamimura, T.: CDP/cut is an osteoblastic coactivator of the vitamin D receptor (VDR). *J. Bone Miner. Res.* 25, 1157-1166, 2010.
- 14) Oya, H., Yokoyama, A., Yamaoka, I., Fujiki, R., Yonezawa, M., Youn, M.-Y., Takada, I., Kato, S. and Kitagawa, H.: Phosphorylation of WSTF by MAPK induces a switching between two distinct chromatin remodeling complexes. *J. Biol. Chem.* 284, 32472-32482, 2010.
- 15) Chambon, C., Duteil, D., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Malivindi, R., Kato, S., Chambon, P. and Metzger, D.: Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14327-14332, 2010.
- 16) Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F. and Kato, S.: DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. *Nature* 461, 1007-1012, 2009.
- 17) Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H. and Kato, S.: GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* 459, 455-459, 2009.
- 18) Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B. W. and Kato, S.: Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol. Cell* 36, 340-347, 2009.
- 19) Zhao, Y., Takeyama, K., Sawatsubashi, S., Ito, S., Suzuki, E., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Shirode, Y., Kouzmenko, A. P., Li, F., Tabata, T. and Kato, S.: Corepressive action of CBP on androgen receptor transactivation in pericentric heterochromatin in a Drosophila experimental model system. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1017-1034, 2009.
- 20) Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Mtsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S.: Co-activation of ERb by a gonadotropin-induced cofactor. *Mol. Cell. Biol.* 29, 83-92, 2009.
- 21) Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S.: Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 310, 3-10, 2009.
- 22) Yoshimura, K., Kitagawa, H., Fujiki, R., Tanabe, M., Takezawa, S., Takada, I., Yamaoka, I., Yonezawa, M., Kondo, T., Furutani, Y., Yagi, H., Yoshinaga, S., Masuda, T., Fukuda, T., Yamamoto, Y., Ebihara, K., Li, D. Y., Matsuoka, R., Takeuchi, J. K., Matsumoto, T. and Kato, S.:

- Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 9280–9285, 2009.
- 23) Suzuki, E., Zhao, Y., Ito, S., Sawatsubashi, S., Murata, T., Furutani, T., Shirode, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Fujiyama, S., Lim, J., Matsukawa, H., Kouzmenko, A. P., Aigaki, T., Tabata, T., Takeyama, K. and Kato, S.: Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3818–3822, 2009.
- 24) Imai, Y., Nakamura, T., Matsumoto, T., Takaoka, K. and Kato, S.: Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J. Bone Miner. Metab.* 27, 127–130, 2009.
- 25) Fujiyama–Nakamura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Yamauchi, Y., Suzuki, E., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Isobe, T., Takeyama, K. and Kato, S.: BTB protein, dKLHL18/CG3571, serves as an adaptor subunit for a dCul3 ubiquitin ligase complex. *Genes to Cells* 14, 965–973, 2009.
- 26) Ohtake, F., Fujii–Kuriyama, Y. and Kato, S.: AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem. Pharmacol.* 77, 474–484, 2009.
- 27) Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S.: Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442–447, 2009.
- 28) Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S.: Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin. Ther. Targets.* 13, 593–603, 2009.
- 29) Tanabe, M., Kouzmenko, A., Ito, S., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Fujiyama, S., Yamagata, K., Zhao, Y., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K. and Kato, S.: Activation of facultatively silenced *Drosophila* loci associates with increased acetylation of histone H2AvD. *Genes to Cells* 13, 1279–1288, 2008.
- 30) Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H. G., Krasnov, A., Georgieva, S. G., Schüle, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L. and Devys, D.: A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol. Cell* 29, 92–101, 2008.
- 31) Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H. and Kato, S.: Switching of chromatin–remodelling complexes for oestrogen receptor– α . *EMBO Rep.* 9, 563–568, 2008.
- 32) Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H. and Kato, S.: Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3995–4003, 2008.
- 33) Kimura, S., Sawatsubashi, S., Ito, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Yaegashi, N. and Kato, S.: *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 889–893, 2008.
- 34) Ohtake, F., Baba, A., Fujii–Kuriyama, Y. and Kato, S.: Intrinsic AhR function underlies cross–talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 541–546, 2008.
- 35) Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T. and Kato, S.: Ligand–dependent interaction between estrogen receptor α and adenomatous polyposis coli. *Genes to Cells* 13, 723–730, 2008.
- 36) Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T. and Kato, S.: Spermatogenesis–specific association of SMCY and MSH5. *Genes to Cells* 13, 623–633, 2008.
- 37) Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T. and Kato, S.: Truncation mutations abolish chromatin–associated activities of adenomatous polyposis coli. *Oncogene* 27, 4888–4899, 2008.

- 38) Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T. and Kato, S.: Androgen receptor functions in male and female physiology. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 109, 236-241, 2008.
- 39) Murata, T., Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., Matsukawa, H., Kouzmenko, AP., Furutani, T., Takeyama, K. and Kato, S.: RNA-binding protein hoip accelerates polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72, 2255-2261, 2008.
- 40) Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P. and Takayanagi, H.: Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. **Science** 319, 624-627, 2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

リン代謝における骨細胞の機能

協力研究者 道上敏美（大阪府立母子保健総合医療センター研究所 環境影響部長）

研究要旨 Fibroblast growth factor 23 (FGF23)はリン恒常性維持機構において中心的な役割を担うリン酸利尿因子であるが、血清リン値とFGF23値との相関は必ずしも明確ではない。今回、軟骨細胞株や腎臓由来細胞株を用いて細胞外無機リン酸濃度の変化が細胞に及ぼす影響を検討し、これらの細胞株において細胞外無機リン酸濃度の上昇が細胞内へのシグナル伝達を惹起して遺伝子発現変化をもたらすこと、このシグナル伝達にはIII型ナトリウム/リン酸共輸送担体であるPIT-1やRaf/MEK/ERK経路が関与することを見いだした。また、近年、リン酸利尿因子であるFGF23をはじめとして、PHEXやDMP1など、複数の遺伝性低リン血症責任分子が骨細胞に発現していることが示され、リン代謝における骨細胞の重要性が示唆されているところから、リン代謝における骨細胞の機能について解析を行った。X染色体優性遺伝性低リン血症性くる病/骨軟化症(XLH)のマウスホモログである*Hyp*マウス又は野性型(WT)マウスから長管骨を摘出し、骨芽細胞および骨細胞を分化度に応じて段階的に単離し、遺伝子発現をreal time PCRにより解析した。骨細胞マーカーである*Sost*の発現については、*Hyp*、WT共に骨細胞に相当する分画で強い発現を認めた。*Hyp*マウス由来細胞における*Fgf23*の発現はWT細胞と比較して著明に増加していた。興味深いことに、常染色体劣性遺伝性低リン血症の責任遺伝子で、骨細胞のマーカーとされる*Dmp1*についても*Hyp*由来細胞で発現の増加が認められ、骨細胞のみならず骨芽細胞においても発現の増強を認めた。これらの結果から、*Phex*の機能喪失は*Fgf23*のみならず*Dmp1*の発現増加をもたらすことが推察され、骨芽細胞/骨細胞におけるこれらの分子群の密接な機能的連関が示されるとともに、XLHの病態に*Dmp1*の発現増強も関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、常染色体優性遺伝性低リン血症性くる病(ADHR)や腫瘍随伴性低リン血症性骨軟化症(TIO)の責任分子であるFGF23に加えて、X染色体優性遺伝性低リン血症性くる病(XLH)の責任分子であるPHEXや、常染色体劣性遺伝性低リン血症性くる病(ARHR)の責任分子であるdentin matrix protein 1(DMP1)が同定され、リンの代謝調節には多くの分子群が関与することが明らかとなった。しかしながら、これらの分子の産生調節や相互の機能的連関については十分な検討はなされていない。リン恒常性を維持するためには体内のリンの過不足を感知するシステムが必要であると推察されるが、現在のところ、脊椎動物におけるリン濃度感知機構については不明で

ある。こうした背景から、当該研究においては、まず、細胞レベルにおける細胞外無機リン酸濃度変化に対する応答性とその分子機序について解析することを目的とした。また、FGF23、PHEX、DMP1はいずれも主として骨細胞に発現しているところから、骨細胞におけるこれらの分子群の機能的連関についても解析を試みた。

B. 研究方法

1) 細胞の無機リン酸応答性分子機序の解析

軟骨細胞株 ATDC5 と腎臓由来細胞株 HEK293を実験に用いた。ATDC5及びHEK293細胞を種々の濃度のリン酸を含む培地にて処理し、細胞外無機リン酸刺激が遺伝子発現や細

胞内シグナル伝達分子のリン酸化状態に及ぼす影響を検討した。また、細胞外無機リン酸濃度変化による作用の発現にナトリウム/リン酸共輸送担体が関与する可能性について、阻害剤である phosphonoformic acid (PFA)や siRNA を用いたノックダウン実験により検討した。

2) リン代謝における骨細胞の機能に関する解析

骨細胞については適切なモデル細胞株が存在しないため、まず、マウス長管骨からの初代骨細胞の単離法を確立した。無菌的に摘出した長管骨を微細化し、collagenase 処理による基質の消化と EGTA 処理による脱灰を反復し、各ステップで遊離した細胞をそれぞれ回収することにより、骨芽細胞及び骨細胞を分化度に応じて段階的に単離した。単離された細胞の性状は骨芽細胞、骨細胞マーカー遺伝子の発現により確認した。XLH のモデルで、*Phex* 遺伝子の 3' 側に欠失を有する *Hyp* マウスの長管骨から骨芽細胞、骨細胞を単離し、野性型マウス由来の細胞と遺伝子発現を比較検討した。また、野性型マウス由来の骨細胞を用いて、細胞外無機リン酸濃度の変化がリン代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は、当該施設(大阪府立母子保健総合医療センター研究所)の DNA 組換え実験安全委員会及び動物実験委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) 細胞の無機リン酸応答性分子機序の解析

まず、軟骨細胞株である ATDC5 細胞を用いて、細胞外無機リン酸濃度の変化が遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、細胞外リン酸濃度の上昇は細胞周期に関連する *cyclin D1* の発現を増強し、脱リン酸化酵素である *alkaline phosphatase (ALP)* の発現を減弱させた。また、細胞外無機リン酸濃度の上昇は、Raf/MEK/ERK 経路の活性化をもたらすことが明らかとなり、リン酸刺激による *cyclin D1* や *ALP* の発現変化は Raf/MEK/ERK 経路を介していることが示された。ナトリウム/リン酸共輸送担体阻害剤である PFA の添加により細胞の無機リン

酸応答性の減弱が認められたことから、ATDC5 において優位な発現を認めた III 型ナトリウム/リン酸共輸送担体 Pit-1 の発現のノックダウンを行った。その結果、細胞外無機リン酸濃度の上昇により誘導される Raf/MEK/ERK 経路の活性化の減弱が認められた。

ATDC5 で認められた細胞外無機リン酸応答性が他の細胞種においても保持されているかどうか明らかにするために、ヒト胎児腎臓由来細胞株である HEK293 を用いて同様の検討を行った。HEK293 においても、細胞外無機リン酸濃度の上昇は c-Raf や ERK1/2 のリン酸化を誘導し、Raf/MEK/ERK 経路の活性化が示唆された。一方、p38MAPK や JNK、AKT については細胞外無機リン酸濃度を上昇させてもリン酸化の誘導は認められず、細胞外無機リン酸刺激による Raf/MEK/ERK の活性化には比較的特異性が存在することが示唆された。HEK293 細胞は FGF23 シグナルの伝達において共役因子として機能する Klotho を低レベルながら発現しており、FGF23 の機能獲得型変異体である FGF23[R179Q]の HEK293 への添加は ERK1/2 のリン酸化とともに下流の *early growth response-1 (Egr-1)* 遺伝子の発現を誘導したところから、HEK293 へのリン酸添加が *Egr-1* の発現に及ぼす影響を検討したところ、細胞外無機リン酸刺激は Raf/MEK/ERK 経路依存性に *Egr-1* の発現を誘導することが示された。FGF23 シグナルと細胞外無機リン酸濃度変化により惹起されるシグナルとの間に共通性が存在する可能性が示唆されたことから、細胞外無機リン酸濃度変化に対する応答性の分子機序について解析を進めた結果、Pit1 に加えて、FGF 受容体 (FGFR) も関与することを見いだした。また、細胞の FGF23 応答性に対する細胞外無機リン酸濃度の影響を検討したところ、リン酸濃度の違いにより FGF23 に対する応答性が変化することが示唆された。

2) リン代謝における骨細胞の機能に関する解析

野性型マウス長管骨より単離した前述の方法により段階的に回収した初代細胞について骨芽細胞マーカー、骨細胞マーカー遺伝子の発現を検討した結果から、回収された Fraction 1-9

のうち、Fraction 3-5 が骨芽細胞に相当し、EGTA による脱灰を開始した後に回収された Fraction 6-9 が骨細胞に相当することが示唆された。

Hyp マウス骨由来細胞の遺伝子発現を野性型マウス由来細胞と比較検討したところ、骨細胞マーカーである *Sost* の発現については、いずれのマウスにおいても Fraction 6 以降で高く発現しており、各 Fraction における発現レベルは野性型細胞と *Hyp* 細胞の間ではほぼ同等であった。一方、*Fgf23* については、*Hyp* 由来の細胞において発現の増強が認められた。さらに興味深いことに、*Dmp1* の発現については、野性型細胞では骨細胞に相当する Fraction 6 以降で高い発現を認めたが、*Hyp* 由来細胞では野性型細胞に比し著明な発現の増強が認められ、骨細胞のみならず、骨芽細胞に相当する Fraction 3-5 においても高い発現を認めた。III 型ナトリウム/リン酸共輸送担体である *Pit-1* の発現についても検討したところ、*Hyp* 細胞においては野性型細胞に比較して約2倍に発現が増加していた。

Hyp マウス由来の骨芽細胞/骨細胞で認められた *Fgf23* や *Dmp1* の発現増加の出現時期を明らかにするため、胎齢 E18.5 の胎仔骨より RNA を抽出し、遺伝子発現を検討した。Genotyping により *Hyp* であることが確認された胎仔の骨においては、野性型胎仔の骨と比較して、*Fgf23*、*Dmp1* の発現が共に増加しており、これらの遺伝子発現の異常が出生前から存在することが明らかになった。

さらに、野性型マウス由来の骨細胞を用いて、細胞外無機リン酸濃度変化が *Fgf23* や *Dmp1*、*Pit-1* の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、12時間までの短期的な細胞外無機リン酸刺激は、これらの遺伝子の発現に変化を及ぼさないことが示された。

D. 考察

今回の検討から、軟骨細胞や腎臓由来細胞等、複数の細胞種において、細胞外無機リン酸濃度の変化がシグナルとして細胞内に伝達され、Raf/MEK/ERK 経路の活性化や遺伝子発現の変化をもたらすことが明らかとなった。この細胞外無機リン酸応答性には、

ナトリウム/リン酸共輸送担体 *Pit-1* が関与することが示唆された。骨細胞にも *Pit-1* が発現していることから、細胞外無機リン酸濃度の変化は骨細胞においてもシグナルを惹起し、何らかの遺伝子の発現変化をもたらす可能性が示唆される。しかしながら、野性型マウスより単離した初代骨細胞において、短期的な細胞外無機リン酸刺激は *Fgf23* や *Dmp1*、*Pit-1* の発現を変化させなかったことから、個体レベルにおけるリンの過不足に対するこれらの遺伝子の応答にはより時間を要すると考えられ、骨と骨外臓器との機能的な連関が関与する可能性が示唆される。

また、XLH のモデルである *Hyp* マウスより単離した初代骨細胞を用いた検討から、*Hyp* マウスにおける *Phex* の機能の喪失は、*Fgf23* に加えて *Dmp1* の発現増強をもたらすことが明らかとなった。骨細胞マーカーである *Sost* の発現については genotype 間で明確な差が認められなかったことから、*Hyp* 細胞における *Fgf23*、*Dmp1* の発現増加は、単なる骨芽細胞分化の異常ではなく、分子特異的な機序が存在することが推察される。XLH の患者においては、治療によるリン製剤や活性型ビタミンDの投与が血中 FGF23 値の上昇に寄与すると考えられているが、*Hyp* マウスにおいては胎仔期よりすでに *Fgf23*、*Dmp1* の発現増加が生じていたことから、*Phex* そのものが、骨局所においてこれらの遺伝子の発現制御に関わることを示唆された。胎生期の *Fgf23*、*Dmp1* の発現増強の病態への関与の有無については、今後検討する必要がある、XLH 妊婦の管理において有用な情報を提供することが期待される。

E. 結論

細胞外無機リン酸濃度の変化はナトリウム/リン酸共輸送担体や Raf/MEK/ERK 経路を介して細胞内にシグナルを惹起し、遺伝子発現を制御することが明らかとなった。また、骨細胞において *Phex* や *DMP1*、FGF23 などのリン代謝関連分子群が機能的に密接に連関していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki A, Ozono K, Kubota T, Kondou H, Tachikawa K, Michigami T. PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3b in

- osteoblastic Saos-2 cells. *J Cell Biochem*, 104(1):314-317, 2008
- 2) Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Namba N, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K. An Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res* 23(10):1661-1671, 2008
 - 3) Miyauchi Y, Sakaguchi N, Okada T, Makishima M, Ozono K, Michigami T. Oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function. *J Cell Biochem* 106(6):1090-1101, 2009
 - 4) Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, Michigami T. Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. *J Cell Biochem*, 111(5):1210-1221, 2010
 - 5) Kimata M, Michigami T, Tachikawa K, Okada T, Koshimizu T, Yamazaki M, Kogo M, Ozono K. Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na⁺/Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. *Bone*, 47(5):938-947, 2010
 - 6) Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem*, 286(4):3094-3103, 2011
 - 7) Ohata Y, Arabori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y-I, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating levels of soluble α -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, Mar 16 [E-pub ahead of print].
2. 学会発表
- 1) Yamazaki M, Kimata M, Tachikawa K, Okada T, Kubota T, Ozono K, Michigami T. Effects of extracellular inorganic phosphate on FGF23 signaling in renal tubule cells. Calcified Tissue International 2008, 82(Suppl 1) pp.S159. 35th European Symposium on Calcified Tissue. 2008.5.24-28: Barcelona, Spain
 - 2) Yamazaki M, Okada T, Tachikawa K, Ozono K, Michigami T. Signaling of extracellular inorganic phosphate mediated via sodium-phosphate co-transporters influences FGF23 signaling in renal tubular cells. *J Bone Miner Res* 2008, 23(Suppl 1) pp.S283. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008.9.12-16: Montreal, Canada
 - 3) Ohata Y, Yamazaki M, Okada T, Ozono K, Michigami T. Soluble form of Klotho functions as a humoral modulator in FGF23-and canonical Wnt-induced signaling. *J Bone Miner Res* 2009, 24(Suppl1). 31th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2009.9.11-15: Denver, U.S.A.
 - 4) Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Michigami T. Signaling of osteocytes as a regulator of phosphate metabolism. *J Bone Miner Res* 2009, 24(Suppl1). 31th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2009.9.11-15: Denver, U.S.A.
 - 5) Ohata Y, Yamazaki M, Okada T, Arahori H, Fujiwara M, Miura K, Kitaoka T, Namba N, Hirai H, Nakayama M, Ozono K, Michigami T. Klotho is expressed in placenta and its soluble form modulates canonical Wnt signaling in bone. 14th International Congress of Endocrinology. 2010.3.26-30: Kyoto, Japan
 - 6) Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Ohata Y, Tachikawa K, Kondou H, Michigami T. Signal transduction triggered by extracellular inorganic phosphate involves FGF receptor and influences the FGF23 signaling. 14th International Congress of Endocrinology. 2010.3.26-30 : Kyoto, Japan
 - 7) Ohata Y, Yamazaki M, Okada T, Nakayama M, Ozono K, Michigami T. Placenta expresses klotho and FGFR1 in syncytiotrophoblast and might be a target organ of FGF23. *J Bone Miner*

Res 2010, 25(Supple1) pp.S93. 32th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010.10.15-19 : Toronto, Canada

- 8) Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Michigami T. Differential gene expression in osteoblast / osteocyte lineage cells between *Hyp* mouse and wild-type mouse. J Bone Miner Res 2010, 25(Suppl 1) pp.S157. 32th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010.10.15-19:Toronto, Canada

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許の取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

環境化学物質が骨代謝障害を惹起する可能性の検討

研究分担者 竹内靖博（虎の門病院 内分泌センター部長）

研究要旨 活性型ビタミンD₃の分解・代謝は、腎ではCYP24A1が、肝・腸管ではCYP3A4等の薬物代謝酵素が主に関与している。ステロイド・ゼノバイオティク受容体SXRは、オーファン核内受容体に属するリガンド依存性の転写因子で、肝臓や腸管に発現しCYP3A4の遺伝子発現を調節している。抗結核薬のリファンピシンや抗てんかん薬のフェノバルビタールの連用は、それら薬剤が肝臓や腸管でSXRの結合を介しCYP3A4の酵素誘導をきたす。その結果、活性型ビタミンD₃代謝が亢進し、骨軟化症を誘発する事が知られている。我々は薬剤添加物として用いられているアセチルトリプチルクエン酸(ATBC)にSXRのリガンド活性があることを見出し、ヒト肝臓と腸管由来の培養細胞を用いた検討から、腸管由来の細胞でのみ、ATBCがSXRを介しCYP3A4遺伝子発現を誘導し、酵素活性を増加させることを見出した。ラットにATBCを腹腔内投与することにより、十二指腸に特異的に酵素遺伝子の発現誘導が生じることも明らかとなった。さらに、活性型ビタミンD₃自身がビタミンD受容体を介してCYP3A4発現を促進すること、その作用はATBC-SXR作用と相加的であることを明らかにした。以上の成績は、薬剤添加物に使用されるATBCはビタミンD作用と協同して、腸管特異的にCYP3A4の酵素誘導をきたすことを示すものである。腸上皮における活性型ビタミンD₃代謝の亢進は、腸粘膜からのカルシウム吸収の低下など、骨代謝に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。

A. 研究目的

ビタミンD作用を発揮する活性型の1,25水酸化ビタミンDの分解・代謝は、腎でCYP24A1が、肝・腸管ではCYP3A4等の薬物代謝酵素が主に関与している。ステロイド・ゼノバイオティク受容体SXRは、オーファン核内受容体に属するリガンド依存性の転写因子で、肝臓や腸管に発現しCYP3A4やMDR1等の薬物代謝酵素や薬物輸送体の遺伝子発現を調節している。

抗結核薬のリファンピシン(RFP)や抗てんかん薬のフェノバルビタール、フェニトイン等の薬剤は、肝臓や腸管でSXRへの結合を介してCYP3A4の酵素誘導をもたらす。即ち、これらの薬剤を連用すると、1,25水酸化ビタミンDの代謝が亢進し、ビタミンD作用の低下をもたらすことから、骨軟化症の誘因となることが古くから知られている。

したがって、SXRのリガンド活性物質への長期暴露は、1,25水酸化ビタミンD作用の低下をきたし骨代謝に影響する可能性がある。環境化学物質の中には

SXRのリガンドとして作用するものがあるが、そのビタミンD代謝や骨代謝への影響は不明である。我々は、多数の薬剤添加物をスクリーニングし、リガンドとしてSXRを活性化するものを探索すると共に、そのような物質が肝臓や腸管細胞でCYP3A4の発現を誘導する可能性について明らかにすることを目的として研究を行った。さらに、1,25水酸化ビタミンD₃のCYP3A4発現に対する影響と、そのSXRリガンド活性をもつ薬剤添加物との相互作用についても併せて検討した。

B. 研究方法

1. CV1細胞にヒトSXR発現プラスミドとCYP3A4またはMDR1遺伝子プロモーター領域のレポータープラスミドをトランスフェクトしルシフェーゼレポーターアッセイを行った。
2. ラット肝臓と腸管におけるp160コアクティベーターSRC1,2,3の免疫染色を行い、SXRと肝臓や腸管に発現するコアクティベーターとの結合を薬剤添

加物がリクルートするかどうか哺乳細胞2ハイブリッドアッセイで評価した。

3. リアルタイムPCR ヒト腸管由来細胞株:LS174T細胞、ヒト肝臓癌由来細胞株:HepaRG、FLC5、FLC7を培養し種々の濃度のRFPまたはATBC存在下に24 hr培養後、Cell-to-Ctキット(Applied Biosystems)を用いてcDNAを調製した。CYP3A4とGAPDH発現をSYBR GreenによるリアルタイムPCRにて測定し Δ Ct法でGAPDH mRNAを用いてCYP3A4 mRNA量を補正した。リガンドを加えない状態でのCYP3A4 mRNA量を1倍として表した。
4. LS174T細胞におけるCYP3A4の酵素活性の測定 LS174T細胞を96穴プレートで培養し、ATBCを添加、48 hr時間後にP450-Glo (Luciferin-IPA) (Promega)を用いて、CYP3A4の酵素活性を測定した。
5. ラットへのATBC投与 7週齢のオスWistarラットの腹腔内にDMSOビークル、ラットSXRリガンドのpregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) (50 mg/kg)、ATBC (5と50 mg/kg)を3日間投与後、十二指腸と肝臓を摘出、トータルRNAを調整しリアルタイムPCR法(SYBR Green)でCYP3A11発現(ヒトのCYP3A4に相当する)を検討した。
6. siRNAによるビタミンD受容体 (VDR) およびSXR抑制 LS174T細胞にVDRあるいはSXRの遺伝子に対応するsiRNAを導入し、それぞれの発現を抑制した。それらの細胞に、ATBCあるいは1,25水酸化ビタミンD₃を添加し、CYP3A4のmRNA発現について検討した。

C. 研究結果

様々な薬剤添加物を用いてヒトSXRのリガンド転写活性を検討したところ、いくつかの添加物でCYP3A4遺伝子やMDR1遺伝子のプロモーター転写活性が上昇した。最も転写活性化能が強かった添加物はアセチルトリプチルクエン酸 (ATBC)であった。ATBCはヒト以外にも齧歯類のSXRでリガンド転写活性化能を認めた。

核内受容体のコアクティベーターであるSRC1ファミリーの免疫組織学的検討で、ラット腸管上皮ではSRC1が、肝臓でSRC2が主に発現していた。2ハイブリッドアッセイでは、SXRのリガンド結合領域は、ATBC濃度依存性に、これらのコアクティベーターと結合し

た。

ヒト腸管由来のLS174T細胞を培養しRFPやATBCを培養液に添加して24 hr後、リアルタイムPCRにてCYP3A4 mRNA発現を検討したところ、RFPおよびATBC添加により濃度依存性にCYP3A4 mRNA発現が上昇した。またLS174T細胞におけるCYP3A4酵素活性もATBC添加により上昇した。

次に、ヒト凍結肝細胞と3種類のヒト肝臓由来の細胞株を用いてCYP3A4 mRNA発現を検討した。いずれの細胞でもRFP濃度依存性にCYP3A4 mRNAが増加したが、ATBCを高濃度添加しても変化は認められなかった。

ラット腹腔内にATBCまたはポジティブコントロールとしてラットSXRのリガンドであるPCNを3日間投与後に十二指腸と肝臓を摘出、CYP3A11発現をリアルタイムPCRで検討し*vivo*での解析をおこなった。ATBC投与により十二指腸でCYP3A11 mRNAが増加したが、肝臓では変化を認めなかった。ヒト培養細胞とラットの結果からATBCはSXRを介して腸管特異的にCYP3A4の酵素誘導を来すことが考えられた。

ヒト腸管由来のLS174T細胞を培養し1,25水酸化ビタミンD₃やATBCを培養液に添加して24 hr後、リアルタイムPCRにてCYP3A4 mRNA発現を検討した。1,25水酸化ビタミンD₃は0.1~10 nMの範囲で濃度依存性にLS174T細胞におけるCYP3A4の発現を増加させた。この効果は、ATBCのCYP3A4 mRNA発現増加効果と相加的であった。

VDRに対するsiRNAをLS174T細胞に導入すると、1,25水酸化ビタミンD₃によるCYP3A4発現増加効果はほぼ完全に抑制されるものの、ATBCによる効果には影響しなかった。一方、SXRに対するsiRNAを導入すると、ATBCによるCYP3A4発現増加効果はほぼ完全に抑制されるものの、1,25水酸化ビタミンD₃による効果には影響が認められなかった。

D. 考察

骨軟化症は、カルシウムやリンなどミネラルの骨沈着が減少し、石灰化の不十分な骨組織(類骨)の割合が多くなり、骨変形・骨折・疼痛をきたす病態である。RFP やフェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピン等の抗痙攣薬の連用はビタミンD作用不全を引き起こし、薬剤性骨軟化症の原因となることが知られている。これは、これらの薬剤がSXRのリガンドとして作用し、肝臓や腸管でのCYP3A4発現を促進しビタミ