

雌性 *Hyp* マウス(*Phex^{Hyp/+}*)あるいは WT マウスを雄性 WT マウスと交配し、E18.5 の時点で母体及び胎仔より血液や臓器を採取し、解析に供した。胎仔については *Sry* 遺伝子及び *Phex* 遺伝子の genomic PCR を行う事により性別および *Phex* genotype を決定し、雄性胎仔を解析に使用した。血中 FGF23 値の測定にはカイノス社の intact FGF23 ELISA kit を用いた。血清リン値の測定には Wako のキットを使用した。

4) 初代骨細胞の活性型ビタミン D 応答性

Hyp マウス及び WT マウスより単離した初代骨細胞を I 型コラーゲンゲルに包埋し、 10^{-8} M の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ または vehicle 存在下にて 48 時間培養した後に RNA を抽出し、real-time PCR により遺伝子発現を解析した。

(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) の動物実験委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) マウス骨からの初代骨芽細胞/骨細胞単離法の確立

WT マウス長管骨より単離した細胞について骨芽細胞マーカーである *keratocan*、骨細胞マーカーである *Sost* の発現を検討した結果から、前述の方法により段階的に回収した細胞集団のうち(Fraction 1-9)、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* マウス骨より単離した細胞においても同様に、Fraction 3-5 で骨芽細胞、Fraction 6-9 で骨細胞に富む細胞集団が回収されることを確認した。

2) *Hyp* 骨細胞における *Fgf23* 及び *Dmp1* の発現増加

20 週齢の雄性 *Hyp* 及び WT マウスより上述の方法により単離した新鮮な骨芽細胞、骨細胞より RNA を抽出し、リン代謝関連分子の発現を検討した。*Hyp* 由来細胞については WT 細胞と比較して *Fgf23* 発現の著明な増加を認めた。また、骨細胞のマーカーとして一般に用いられている *Dmp1* の発現についても *Hyp* 細胞では著明に増加しており、

骨芽細胞に相当する Fraction3-5 においても高い発現を認めた。FGF23 の糖鎖修飾に関わる UDP N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 をコードする *Galnt3* の発現については、*Hyp* と WT との間に差を認めなかった。一方、骨芽細胞や骨細胞のリン酸取り込みに関与する III 型 Na^+/Pi 共輸送担体 *Pit-1* の発現は *Hyp* 細胞で増加していた。

Hyp 骨細胞で認められた *Fgf23* や *Dmp1* の発現上昇の出現時期を明確にするため、E18.5 の胎仔より摘出した骨の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いた。一方、*Pit-1* の発現については、*Hyp* 胎仔と WT 胎仔との間に差を認めなかった。

3) *Hyp* マウスの周産期のミネラル代謝

周産期のミネラル代謝について解析を進めるため、雌性 *Hyp* または WT マウスを雄性 WT マウスと交配し、E18.5 の時点で母体及び胎仔より採血を行い、血中 FGF23 値及びリン値の測定を行った。*Hyp* 母体の血中 FGF23 値は WT 母体と比較して高値を示したが、*Hyp* 母体の WT 胎仔については WT 母体の胎仔と有意差なく FGF23 値が低値を示した。一方、*Hyp* 母体の *Hyp* 胎仔においては、血中 FGF23 値が母体よりも約 20 倍高い著明な高値を示した。胎仔の腎臓より RNA を抽出して遺伝子発現を検討したところ、*Hyp* 胎仔の腎臓でビタミン D-24 位水酸化酵素をコードする *Cyp24a1* 遺伝子の発現増加、IIa 型、IIc 型 Na^+/Pi 共輸送担体の発現低下を認めた。*Hyp* 母体の血清リン値は WT 母体と比較して低値であったが、*Hyp* 母体の胎仔については、*Hyp* 胎仔、同腹の WT 胎仔のいずれにおいても WT 母体の胎仔と有意差のないレベルまで高く維持されていた。

4) *Hyp* 及び WT マウス骨細胞の活性型ビタミン D 応答性

XLH 及び *Hyp* においては FGF23 の過剰産生によるビタミン D 活性化障害が存在し、ビタミン D 抵抗性くる病を引き起こす。そ

ここで、*Hyp* 及び WT マウスより単離した初代骨細胞(Fraction 6-9)を I 型コラーゲンゲルに包埋し、 10^8 M の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下、非存在下で 48 時間インキュベートし、遺伝子発現変化を指標にビタミン D 応答性を検討した。ビタミン D 受容体 (*Vdr*) の発現については、*Hyp* 骨細胞、WT 骨細胞のいずれにおいてもほぼ同等の発現を認めた。活性型ビタミン D の代表的な標的遺伝子である *Rankl* (*Tnfsf11*) の発現を検討したところ、*Hyp* 骨細胞、WT 骨細胞のいずれにおいても $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加により増加を認め、これらの骨細胞が活性型ビタミン D に対する応答性を有することが明らかとなった。*Dmp1* の発現は、いずれの骨細胞においても 48 時間の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 刺激で著明に抑制された。また、*Hyp* アレルにおいても残存している *Phex* 5' 端の mRNA 量についても検討したところ、*Dmp1* と同様に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 刺激で抑制された。*Hyp* 骨細胞においては WT 骨細胞と比較して *Phex* 5' 端の mRNA 量が低下しており、3' 端の欠失による *Phex* mRNA decay が推察された。*Fgf23* 発現については現在検討中である。

D. 考察

今回の検討から、*Hyp* マウスにおける *Phex* の機能喪失は *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。一方、*DMP1* の機能喪失型変異に基づく ARHR の患者や *Dmp1* ノックアウトマウスにおいては FGF23 の産生増加が報告されており、*Dmp1* は *Fgf23* の産生に対して抑制的に働くことが推察されるところから、*Hyp* 骨細胞において *Fgf23* と *Dmp1* の発現が共に増加していることは興味深い。慢性腎疾患(CKD) の患者においても、初期段階から骨における FGF23 と *DMP1* の発現が共に増加しているとの病理学的検討の報告があり(Pereira, et al. *Bone* 2009)、*Fgf23*、*Dmp1*、及び *Phex* の支配関係については更なる解析を要する。

今回、20 週齢の成獣より単離した *Hyp* 骨芽細胞/骨細胞においては WT 細胞と比較してナトリウム/リン酸共輸送担体 *Pit-1* の発現が増加していたが、血清リン値の低下していない胎仔期においては *Pit-1* の発現は *Hyp* 骨と WT 骨とで同程度であった。このことから、成獣 *Hyp* の細胞で認められた

Pit-1 の発現増加は出生後に出現する低リン血症に適応するための代償的增加であることが推察された。

周産期の解析において、*Hyp* 母体由来の WT 胎仔の血清 FGF23 値が、母体の高 FGF23 血症にもかかわらず低値を示したことから、母体血中の FGF23 は胎盤を通過しないか、通過後速やかに分解されることが推察される。また、*Hyp* 母体の低リン血症にも関わらず、その胎仔の血清リン値は *Hyp* 胎仔、同腹 WT 胎仔ともに WT 母体の胎仔と同レベルに維持されていたことから、*Hyp* の妊娠においてはリンの経胎盤輸送が亢進し、血清リン値の低下から保護されていると考えられる。しかしながら、*Hyp* 胎仔においてはすでに骨における *Fgf23* の過剰産生および腎臓におけるビタミン D 代謝酵素や Na^+/Pi 共輸送担体の発現変化を来しており、出生直後より血清リン値が低下する可能性がある。ヒトの XLH 患者の妊娠においても、子が XLH に罹患している場合に胎児期より高 FGF23 血症が存在しているのであれば、出生の時点で診断が可能であると考えられ、今後の検討が必要である。

従来、XLH に対する治療としてはリン酸塩と活性型ビタミン D の併用投与が行われ、比較的良好な結果が得られてきた。しかしながら近年、リン酸塩と活性型ビタミン D の投与は FGF23 の血中レベルを増加させることから、病態そのものを増悪させる可能性があり、治療プロトコールの見直しが急務である。今回、コラーゲンゲル包埋培養系を用いて活性型ビタミン D に対する骨細胞の応答性が確認されたことから、この系は骨細胞に対する種々の液性因子の作用を検討するのに有用であると考えられ、今後、FGF23 の発現制御を解析する予定である。

E. 結論

リン恒常性維持においては、骨細胞における *Phex*、*Dmp1*、*Fgf23* の機能的連関が重要な役割を担っており、骨細胞が活性型ビタミン D などの液性因子のシグナルを直接受容して遺伝子発現を変化させることによりリン代謝調節に関与することが示唆された。また、周産期のミネラル代謝に関する解析から、*Hyp* マウスの高 FGF23 血症は胎仔期より存在するが、母体からのリン経胎盤能動輸送の

亢進により血清リン値が WT マウスと同等まで維持されることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohata Y, Arabori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima YI, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating levels of soluble α -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 96:E943-947, 2011

Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, Ozono K, Michigami T. Vinculin functions as a regulator of chondrogenesis. *J Biol Chem*, 2012 Mar 13 [E-pub ahead of print]

2. 学会発表

道上敏美. 小児における骨系統疾患：その分子病態と遺伝子型—表現型相関. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.7.28-30: 大阪.

道上敏美. リン代謝調節細胞としての骨細胞の役割. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.7.28-30: 大阪.

大幡泰久, 三浦弘司, 山崎美和, 岡田知子, 川井正信, 大菌惠一, 道上敏美. 胎児期特異的ミネラル代謝調節機構における FGF23 の関与—*Hyp* マウスを用いた解析. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.7.28-30: 大阪.

宮川和晃, 大菌惠一, 大幡泰久, 川井正

信, 立川加奈子, 高垣裕子, 古郷幹彦, 道上敏美. *Hyp* マウスの骨においては胎児期より既に *Fgf23* 及び *Dmp1* の発現が増加している. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.7.28-30: 大阪.

Ohata Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Okada T, Kawai M, Ozono K, Michigami T. Analysis of the roles of FGF23 in fetus-specific mineral metabolism using *Hyp* mouse. IOF Regionals 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting. 2011.9.4-8: Gold Coast, Australia.

Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Kawai M, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Michigami T. 1,25(OH)₂D and PTH up-regulate *Rankl* while down-regulate *Phex* and *dmp1* in primary osteocytes isolated from mouse bones. 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2011.9.16-20: San Diego, U.S.A.

大幡泰久, 宮川和晃, 山崎美和, 岡田知子, 川井正信, 平井治彦, 大菌惠一, 道上敏美. XLH モデル *Hyp* マウスにおける胎児血中リン値維持機構の存在-FGF23 および胎盤の関与. 第 45 回日本小児内分泌学会学術集会. 2011.10.6-8: 埼玉.

大幡泰久, 道上敏美, 大菌惠一. 胎児特異的リン代謝：リン経胎盤輸送からみた新発見. 第 56 回日本未熟児新生児学会学術集会. 2011.11.13-15: 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 23 年度分担研究報告書

偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態解析

研究協力者 皆川 真規（千葉県こども病院 内分泌科 主任医長）

研究要旨

偽性副甲状腺機能低下症 1b 型 (PHP-1b) 患者由来のゲノム DNA では *GNAS* 遺伝子のメチル化可変領域 (DMR) に存在するエクソン A/B 領域の CpG メチル化消失がみとめられる。Methylation-specific PCR 法 (MSPCR 法) によってこれを検出する方法を確立した。Albright's hereditary osteodystrophy の6症状 (低身長、肥満、円形顔貌、中手足骨の短縮、皮下異所性石灰化、精神発達遅滞) のうち3症状以内にとどまる偽性副甲状腺機能低下症 20 例で MSPCR 法による解析結果はメチル化特異的制限酵素切断を用いたサザン解析結果と一致した。

A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) は副甲状腺ホルモン (PTH) に対する不応性により低カルシウム血症をきたす疾患である。PHP は臨床的に主に2つの病型 (1a 型と 1b 型) に分類されている。偽性副甲状腺機能低下症 1a 型 (PHP-1a) は、PTH 不応性に加え、特有の骨格徴候である Albright hereditary osteodystrophy (AHO) を有するものとされ、ときに精神発達遅滞を伴う。一方、1b 型 (PHP-1b) は、AHO や発達遅滞は伴わないものとされている。PHP-1b 患者由来のゲノム DNA では *GNAS* 遺伝子のメチル化可変領域 (DMR) に存在するエクソン A/B (1A とも呼ばれる) 領域の CpG メチル化消失がみとめられ、孤発例の大部分ではさらにほかの *GNAS* 遺伝子上流域の DMR におけるエピジェネティック変異が同定されている。これまで、こうしたエピジェネティック変異はメチル化感受性制限酵素によるサザン解析によってなされてきた。また、近年 MLPA 法 (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) による検討も行われている。

Methylation-specific PCR 法 (MSPCR 法) は、DNA を bisulfite 処理し非メチル化シトシンがウラシルに変換したのちにメチル化 DNA 特異的な非メチル化特異的な PCR プライマーで PCR

増幅することで、DNA の特定の領域にメチル化 DNA あるいは非メチル化 DNA が存在するかを検出する方法である。この方法では使用する DNA の量が少なくすむことと方法が簡便で特殊な機器を必要としない利点があり、可視化された解析結果の解釈が容易である点もすぐれている。

本研究では、MSPCR 法による PHP-1b の迅速診断法を確立した。また、PHP-1b には伴わないとされた AHO の症状が近年分子生物学的に PHP-1b と確認された症例でも軽度のみられたとする報告があり、臨床症状についても再検討を行った。

B. 研究方法

【対象】

日本人 PHP-1b 患者 20 例 (男性 10 例、女性 10 例)、健常者コントロール 20 例で検討を行った。PHP-1b の臨床診断は PTH 高値を伴う低カルシウム高リン血症でビタミン D 欠乏症が否定されたものとした。また、AHO の症状 (低身長、肥満、円形顔貌、中手足骨の短縮、皮下異所性石灰化、精神発達遅滞) のうち 4 症状以上を有するのは除外した。分子生物学的解析では、末梢血から抽出したゲノム DNA を用いた。

【方法】

PHP-1b患者でメチル化特異的サザン解析(メチル化感受性制限酵素は *AscI* ないし *NgoMIV* を使用した)によりエクソン A/B 領域の CpG メチル化の消失を確認した。

MSPCR 法では Zymo EZ DNA methylation Kit®により bisulfite 処理した DNA を PCR テンプレートとして用いた。PCR プライマーはインターネットを通して供用されている MethPrimer を用いて、*GNAS* エクソン A/B 内および周辺に多数のプライマー候補セット(メチル化アレル特異的プライマー (M)および非メチル化アレル特異的プライマー (U))を作成して PCR 増幅を試みたがうち2組のみで安定した PCR 増幅に成功した。

領域1の増幅に用いたプライマー配列は以下の通り。これらの増幅領域はエクソン A/B の上流でサザン解析でもちいた *AscI*(メチル化感受性制限酵素)で切断される2つの領域には含まれる領域である。

M-A/B-1F,

5'-CATAAAAAAAGCAAGCTTCTATGCT-3'

M-A/B-1R,

5'-GACGCTTACCCCTACTATACGC-3'

U-A/B-1F,

5'-CATAAAAAAACAACCTTCTATACT-3'

U-A/B-1R,

5'-ACAACACTTACCCCTACTATACACC-3'

領域2の増幅に用いたプライマー配列は以下の通り。これらの増幅領域はエクソン A/B 内と下流を含む領域である。

M-A/B-2F,

5'-GCAAAAAACAAAAACCAAAG-3'

M-A/B-2R,

5'-CCCGACGACTCTTACCTACG-3'

U-A/B-2F,

5'-CACAAAAAACAAAAACCAAAC-3'

U-A/B-2R,

5'-AACCCAACAACCTTACCTACACC-3'

(倫理面への配慮)

研究にあたっては、施設の倫理委員会の承認のもとで個人情報の保護と研究対象者の人権を最優先として、患者に対し十分に説明を行い書面による承諾を得ておこなった。

C. 研究結果

対象とした PHP-1b 患者でメチル化特異的サザン解析では制限酵素 *AscI*ないし *NgoMIV*にてゲノム DNA の完全切断が観察され、エクソン A/B 領域の CpG メチル化の消失を確認できた。

MSPCR 法において健常者コントロールでは領域1および2のプライマーセットによりMおよびUのいずれもPCR増幅をみとめた。一方、PHP-1bでは、領域2の増幅においてMの増幅はなく、Uの増幅のみをすべての症例でみとめたが、領域1では12例のみUのみの増幅がみられ、8例では健常者コントロールと同様のMとU両方で増幅がみられた。

臨床症状の検討では、潜在性甲状腺機能低下症(すべて甲状腺ホルモン補充療法は受けていない)が7例、低身長(成人身長で-2SD以下)は1例、肥満は6例、円形顔貌は6例にあった。また、中手骨の短縮が2例でみられたが、皮下異所性石灰化のある症例はなかった。1例で発達遅滞と感音性難聴を合併していた。

D. 考察

MSPCR 法によって CpG メチル化異常を検出する方法はすでに Prader-Willi 症候群、Angelman 症候群で一般臨床に利用されている(健康保険未収載)が、PHP-1bにおいても同様の方法を用いて分子生物学的に診断確定できることが示された。一方臨床診断的病型では PHP-1b と PHP-1a の分類が困難な症例も存在している。

E. 結論

MSPCR 法による PHP-1b の分子生物学的診断法を確立した。PHP-1a との病因論的分類に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takatani T, Minagawa M, Takatani R, Kinoshita K, Kohno Y. AMP-activated protein kinase attenuates Wnt/ β -catenin signaling in human osteoblastic Saos-2 cells. Mol Cell

Endocrinol (2011) 339(1-2):114-119

- 2) Sato H, Minagawa M, Sasaki N, Sugihara S, Kazukawa I, Minamitani K, Wataki K, Konda S, Inomata H, Sanayama K, Kohno Y. Comparison of methimazole and propylthiouracil in the management of children and adolescents with Graves' disease: efficacy and adverse reactions during initial treatment and long-term outcome. J Pediatr Endocrinol Metab (2011) 24(5-6):257-263
- 3) Kinoshita K, Minagawa M, Takatani T, Takatani R, Ohashi M, Kohno Y. Establishment of diagnosis by bisulfite-treated methylation-specific PCR method and analysis of clinical characteristics of pseudohypoparathyroidism type 1b. Endocr J (2011) 58(10):879-887

2. 学会発表

- 1) 石田真穂、數川逸郎、皆川真規 骨折治療中に高カルシウム血症をきたした骨形成不全症男児 第45回日本小児内分泌学会学術集会 平成23年10月8日
- 2) 高谷具純、皆川真規、高谷里依子、木下香、河野陽一 ヒト骨芽細胞様細胞におけるAMPキナーゼのWnt/ β -cateninシグナル阻害作用の検討 第45回日本小児内分泌学会学術集会 平成23年10月8日

G. 知的所有権の取得状況

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）
平成 23 年度分担研究報告書

Vitamin D insufficiency における
骨折リスク亢進機序に関する検討

分担研究者 杉本利嗣 島根大学医学部内科学講座内科学第一 教授
山内美香 島根大学医学部内科学講座内科学第一 助教

これまで健常閉経後女性の約 8 割に Vitamin D insufficiency (VD 不足)を認めること、25(OH)D 低値が年齢、PTH、骨代謝マーカーや骨密度とは独立した全脆弱性骨折のリスク因子であることを報告した。さらに、25(OH)D 低値にも関わらず、PTH が上昇していない群で最も骨折リスクが高まっていることを明らかにした。そしてこの 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を検討するため、低 25(OH)D 低 PTH 群のみで骨折の有無で検討を行ったところ、腎機能低下が骨脆弱性に関与する結果を得た。また、PTH の骨形成促進作用の重要なシグナル伝達経路として Wnt- β -カテニンシグナルがあるが、Wnt 作用を阻害し骨形成を抑制するとされる Sclerostin の関与を検討したところ、低 25(OH)D 低 PTH 群における全脆弱性骨折のリスク因子として Sclerostin が選択された。また、腎機能低下の関与は Sclerostin で補正すると有意差が消失するため、低 25(OH)D 低 PTH 群における腎機能低下による骨脆弱性亢進の機序の一部に Sclerostin が関与が示唆された。以上より、VD 不足に伴う骨脆弱性亢進には PTH 分泌低下が関与する場合があります、その機序の一部は Sclerostin を介することを明らかにした。

A. 研究目的

Vitamin D(VD)の充足状態を最も反映する 25hydroxyvitamin D [25(OH)D]が 20ng/ml 以下は、VD insufficiency (VD 不足)状態であるが、我々は健常閉経後女性の約 8 割に VD 不足を認めること、25(OH)D 低値が年齢、PTH、骨代謝マーカーや骨密度とは独立した脆弱性骨折のリスク因子であることを報告した。さらに、VD 不足は PTH の上昇をきたし、この続発性副甲状腺機能亢進状態が骨脆弱性に関与するとされるが、VD 不足にもかかわらず PTH が上昇していない群で骨折リスクが高まっていることを明らかにした。しかしその機序については明らかになっていない。そこで、VD 不足にも関わらず PTH が上昇しない群における骨脆弱性亢進の機序に、PTH の骨作用に重要な Wnt- β -カテニンシグナルに関与するとされる新規骨細胞分泌ホルモンの Sclerostin が関与するかについて検討する。

B. 研究方法

骨粗鬆症健診を受けた健常閉経後女性 190 名を対象とした。血液検査にて 25(OH)D(ng/ml)、Ca(mg/dl)、P(mg/dl)、Cr(mg/dl)、HbA1c(%)、intact PTH(pg/ml)、骨形成マーカーである I 型プロコラーゲン N-プロペプチド(PINP) (ng/ml)、オステオカルシン(OC) (ng/ml)、骨吸収マーカー

である I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (CTX) (ng/ml)、そして Sclerostin(ng/ml)を測定した。DXA 法で腰椎、大腿骨頸部骨密度を測定し、椎体骨折の有無を判定した。非椎体骨折の有無は医師による個別聴取により確認した。非外傷性の椎体骨折および非椎体骨折のいずれかを有する者を全脆弱性骨折有りと判定した。統計解析は SPSS-17.0 を用い、いずれの場合も危険率 5%未満をもって有意とした。

C. 研究結果

対象群の平均年齢は 63.4 \pm 7.5 歳で、全脆弱性骨折既往者は 66 名であった。

【25(OH)D および PTH レベルと骨折の関係】

25(OH)D と PTH で 4 分割した検討において、高 25(OH)D 高 PTH 群における骨折者の割合は 24.3%、高 25(OH)D 低 PTH 29.3%、低 25(OH)D 高 PTH 36.2%、低 25(OH)D 低 PTH 51.4%で、低 25(OH)D 低 PTH 群が最も高い骨折率を示した。ロジスティック回帰分析にて低 25(OH)D 低 PTH 群であることは年齢、BMI、Ca、P、Cr、CTX、大腿骨頸部骨密度で補正後も有意な骨折リスク因子であった[OR 2.39 (1.07 - 5.32), p=0.033]。

【低 25(OH)D 低 PTH 群と低 25(OH)D 高 PTH 群の比較】

VD 不足状態にもかかわらず、PTH が上昇しない原因を検討するため、低 25(OH)D 低 PTH 群

と低 25(OH)D 高 PTH 群で各々の因子を比較した。2 群で年齢、BMI、骨密度に差を認めなかったが、OC(20.5 ± 6.8 , 26.7 ± 11.3 , $p < 0.01$)は低 25(OH)D 低 PTH 群で有意に低値を示した。

空腹時血糖や HbA1c、Cr、eGFR (estimated glomerular filtration rate)($\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$)、CCr などに差は認めなかった。Sclerostin(1.33 ± 0.38 , 1.27 ± 0.42 , $p = 0.495$)も 2 群間で差を認めなかった。

【低 25(OH)D 低 PTH 群における全脆弱性骨折の有無での比較】

VD 不足状態にもかかわらず、PTH が上昇しない群で骨の脆弱性が高まっている原因を検討するため、低 25(OH)D 低 PTH 群のみで全脆弱性骨折の有無で比較検討を行った。骨折の有無で年齢、BMI、骨密度、骨代謝マーカーに差を認めなかったが、eGFR(74.9 ± 10.2 , 86.3 ± 19.3 , $p < 0.05$)、CCr(88.3 ± 13.7 , 104.0 ± 27.8 , $p < 0.05$)は骨折群で有意に低値を示した。ロジスティック回帰分析にて eGFR は BMI、25(OH)D、PTH、CTX、大腿骨頸部骨密度で補正後も有意な全脆弱性骨折のリスク因子として選択された[OR 3.22 (1.13 - 9.16), $p = 0.029$]。CCr についても 25(OH)D、PTH、CTX、大腿骨頸部骨密度で補正を行ったが、有意なリスク因子として選択された[OR 3.01 (1.12 - 8.08), $p = 0.029$]。

Sclerostin は低 25(OH)D 低 PTH 群のみでの全脆弱性骨折の有無での検討で、骨折有群 1.48 ± 0.38 、骨折無群 1.16 ± 0.38 と骨折群で有意に高値を示した($p < 0.01$)。

【低 25(OH)D 低 PTH 群における Sclerostin と腎機能の関係】

低 25(OH)D 低 PTH 群において Sclerostin は eGFR ($r = -0.424$, $p < 0.01$)および CCr ($r = -0.362$, $p < 0.05$)と有意な負の相関を認めた。

【低 25(OH)D 低 PTH 群における全脆弱性骨折の有無における Sclerostin の関与】

ロジスティック回帰分析にて低 25(OH)D 低 PTH 群における全脆弱性骨折のリスク因子として Sclerostin が選択された。Sclerostin が腎機能指標と相関を示したため、独立因子として BMI、25(OH)D、PTH、CTX、大腿骨骨密度に加え、eGFR で補正し検討したが、Sclerostin がそれらとは独立した有意なリスク因子として選択された[OR 4.2 (1.0 - 16.9), $p = 0.04$]。同様に CCr、25(OH)D、PTH、CTX、大腿骨骨密度で補正後も有意であった[OR 3.5 (1.1 - 11.6), $p = 0.04$]。

一方、eGFR について BMI、25(OH)D、PTH、

CTX、大腿骨骨密度に加え、Sclerostin で補正した場合、eGFR は有意な因子として選択されなくなった。CCr も同様の結果であった。

D. 考察

25(OH)D 低値、つまり VD 不足は有意な骨折リスク因子であること、そして、日本人閉経後女性の約 8 割に VD 不足状態を認めることを報告してきた。25(OH)D 低値により PTH 上昇をきたし、この続発性副甲状腺機能亢進状態が骨脆弱性に関与するとされていたが、我々の検討では、低 25(OH)D 高 PTH 群よりもむしろ低 25(OH)D 低 PTH 群で骨折リスクが高いことを明らかにした。25(OH)D 低値にもかかわらず PTH 高値とならない原因を明らかにするために、低 25(OH)D 低 PTH 群と低 25(OH)D 高 PTH 群を比較検討した。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 群と低 25(OH)D 高 PTH 群で空腹時血糖、HbA1c に差を認めなかった。その他 PTH 上昇をきたさない原因を示唆する所見はみられなかった。

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、腎機能低下が骨脆弱性に関与する結果を得た。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(Kaji H et al. J Clin Endocrinol Metab 95: 4635, 2010)。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(Hou FF et al. J Am Soc Nephrol 15: 1889, 2004)、ホモシステインの上昇を認めることが報告されており(LeBoff MS et al. J Clin Endocrinol Metab 94:1207, 2009)、これが骨折リスクの増大に関与する可能性がある。

また、低 25(OH)D 低 PTH 群と低 25(OH)D 高 PTH 群では骨形成マーカーの低値傾向を認めため、低 25(OH)D 低 PTH 群の骨脆弱性に PTH の骨形成促進作用(bone anabolic action)の低下が関与している可能性が推察された。PTH の骨形成促進作用の重要なシグナル伝達経路として Wnt- β -カテニンシグナルがある。PTH はこのシグナル伝達系の抑制因子である sFRP-1 (secreted frizzled related protein) や Dkk-1 (Dickkopf)、そして Sclerostin を抑制することでそ

の作用を発揮するとされる。Sclerostin は骨細胞の SOST 遺伝子が産生する蛋白質であり、骨細胞のみから恒常的に発現している。Sclerostin は、LRP(low density lipoprotein receptor-related protein)5/6と Wnt の結合を阻害することで、Wnt 作用を阻害し、骨形成を抑制するとされる。今回の検討で、低 25(OH)D 低 PTH 群における全脆弱性骨折のリスク因子として Sclerostin が選択された。Sclerostin 高値が骨折リスクとなるとの報告があるが(Arasu A et al, Abstract LB03, 3rd joint meeting ECTS-IBMS, 2011)、その詳細は明らかとなっていない。正常者において PTH と Sclerostin は相関しないとのされるが(Ardawi, M. S. et al J Bone Miner Res 26: 2812, 2011)、副甲状腺機能低下症患者では Sclerostin が高値を示すことが報告されており(Costa AG et al. J Clin Endocrinol Metab 96: 3804, 2011)、持続的 PTH 低値状態は Sclerostin 分泌に関与する可能性がある。

また、低 25(OH)D 低 PTH 群の骨脆弱性に腎機能低下が関与するが、これは Sclerostin で補正すると有意差が消失するため、腎機能低下による骨脆弱性亢進の機序の一部に Sclerostin が関与する可能性が示唆された。

以上より、VD 不足に伴う骨脆弱性亢進には PTH 分泌低下が関与する場合があります、その機序の一部は Sclerostin を介することを明らかにした。

E. 結論

これまでに、25(OH)D 低値が閉経後女性において、有意な脆弱性骨折リスク因子であること、そして、25(OH)D 低値にも関わらず、PTH が上昇していない群で最も骨折リスクが高まっていることを報告した。今回、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、腎機能低下と Sclerostin が関与していることを明らかにした。そして、腎機能の低下の関与は一部 Sclerostin を介する可能性が考えられた。VD 不足に伴う骨脆弱性亢進には PTH 分泌低下が関与する場合があります、その機序の一部は Sclerostin を介することを明らかにした。

F. 健康危険情報

(分担研究報告には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, 88:362-9.
2. Yamaguchi T, Kanazawa I, Takaoka S, Sugimoto T. Serum calcium is positively correlated with fasting plasma glucose and insulin resistance, independent of parathyroid hormone, in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2011, 60:1334-9.
3. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Acute-onset hypomagnesemia-induced hypocalcemia caused by the refractoriness of bones and renal tubules to parathyroid hormone. *J Bone Miner Metab.* 2011, 29:752-5.
4. Yamamoto M, Yamaguchi T, Nawata K, Yamauchi M, Sugimoto T. Decreased PTH Levels Accompanied by Low Bone Formation Are Associated with Vertebral Fractures in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]
5. 杉本利嗣. 新時代の骨粗鬆症治療. *Osteoporosis Japan*, 2011, 19:263-266
6. 杉本利嗣. 骨粗鬆症-骨粗鬆症研究の進歩:骨粗鬆症臨床医学の現状と展望. *日本臨床*, 2011, 69:1181-1187
7. 山内美香, 杉本利嗣. ビタミン D-基礎と臨床-VI:臨床 骨質とビタミン D. *THE BONE.* 2011, 25:277-283
8. 山内美香, 杉本利嗣. カルシウム・リン・ビタミン D の再評価:高カルシウム血症・低カルシウム血症. *臨床検査* 2011, 55:979-985
9. 杉本利嗣. 骨粗鬆症診療の進歩:骨形成促進薬としての副甲状腺ホルモンの骨粗鬆症治療への応用. *腎と骨代謝* 2011, 24:289-295
10. 山内美香, 杉本利嗣. ビタミンDの新たな展開:活性型ビタミン D₃と骨粗鬆症. *Clinical Calcium* 2011, 21:1601-1608

2. 学会発表

1. Yamauchi M, Nawata K, Kaji H, Takaoka S, Yamaguchi T, Sugimoto T. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D levels and prevalent fracture risk in postmenopausal

women. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis Meeting. Gold Coast, Australia, 2011.9.4-8

2. 山本昌弘, 山口徹, 名和田清子, 山内美香, 杉本利嗣. PTH 分泌低下に伴う低骨代謝回転は、骨密度とは独立した閉経後2型糖尿病女性の椎体骨折の危険因子である. 第84回日本内分泌学会学術集会(神戸) 2011年4月21-23日. 日本内分泌学会雑誌. 87: 266, 2011

H. 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） 平成 23 年度分担研究報告書

ビタミン D 充足の臨床的意義と血中活性型ビタミン D の特異的役割

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 不足も骨粗鬆症性骨折のリスクとなる。従来の検討において、血清 25(OH)D [25D] 値 28ng/ml が日本人におけるビタミン D 不足を規定する閾値として妥当であることを提唱してきた。今回の研究では、別のコホートにおいて PTH, 25(OH)D, 1, 25(OH)2D の相互の関係や様々な代謝パラメーターとの関連を調べると共に、骨粗鬆症治療に対する反応性への影響を解析した。その結果、心・血管疾患と種々の骨・カルシウム・糖・脂質代謝との関連を解析するために進めている CHIBA study のコホートにおいても、25D は PTH と負の相関を示し、28ng/ml 前後で PTH がほぼプラトーとなるという関係が再現された。血清 25D が 20ng/ml 未満の例のうち PTH は 40 pg/ml 未満の例では、それ以上の群と比較して骨代謝マーカー低値、血清 P 高値および 1, 25(OH)2D 低値などが見られた。これらはいずれも PTH 作用低下を反映すると考えられたが、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。一方、リセドロネート国内第Ⅲ相試験を用いた posthoc 解析において、25(OH)D が 15ng/ml 未満の群ではそれ以上の群に比して骨密度の増加効果が弱かった。以上の検討より、25(OH)D 濃度でみたビタミン D 充足状態は、定常状態の骨代謝回転や PTH 分泌、及び骨吸収抑制治療に対する反応性を規定していることが明らかとなった。

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評価が可能である。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し、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 不足の閾値決定法として 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。

本研究においては、これまでにビタミン D 3 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 28ng/ml と提唱してきた。さらにその妥当性につ

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てきた。

しかしながら、血中ビタミン D 濃度の臨床的意義に関しては不明な点が残されている：

- 1) 前述のように 25(OH)D が低値であっても PTH 上昇が認められない例が存在する。
- 2) ビタミン D 受容体に作用する 1, 25(OH)2D の血中濃度は 25(OH)D と PTH とも相関しない。
- 3) 25(OH)D と PTH との関係は副甲状腺局所における 1α 水酸化酵素によるビタミン D 活性化で説明されているが、骨を含む他の臓器における 25(OH)D と 1, 25(OH)2D 作用の関係は不明である。
- 4) これらのビタミン D 代謝物の濃度の骨粗鬆症治療に対する反応性や動脈硬化性疾患の発症に対する影響は明らかでない。

そこでこれらの問題点を明らかにする目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

1) 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 CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) study のコホートにおける腎機能正常 (eGFR>60ml/min) 男性 168 名のサブ解析において、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の関連を調べた。

2) リセドロネート国内第Ⅲ相臨床試験の posthoc 解析として、ビタミン D 充足状態と治療反応性との関係を調べた。

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) Chiba study の cohort における血清 25D 濃度は、平均 19.5ng/ml であり、28 ng/ml 以上を呈したのは 10%未満に過ぎず、全対象の 90%以上がビタミン D 不足に分類された。
- 2) 明らかなビタミン D 不足例 (25D 20 ng/ml 未満例 163 例) を PTH40 pg/ml 未満 (53 例) と以上群 (110 例) に分けると、40 以上の群では 40 未満の群に比して、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。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) PTH と同様、osteocalcin などの骨代謝マーカーは 25(OH)D と相関したが、1, 25(OH)2D とは関連しなかった。
- 6) 25(OH)D よりも 1, 25(OH)2D と良く相関した因子としては、既報の FGF23 (負相関) を除くと HDL および leptin (いずれも正相関) のみであった。
- 7) 766 例のリセドロネート国内第Ⅲ相試験において、25(OH)D 濃度が 15ng/ml 未満の群ではそれ以上の群に比べて骨密度増加効果が有意に低かった。
- 8) 上記両群間の比較では骨代謝マーカーに有意差は認められなかったが、25(OH)D 値の 4 分位解析では top quartile (24ng/ml 以上) で BAP が有意に低かった。

D. 考察

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。25(OH)D 低値例における PTH 分泌の既定因子については不明であり、さらなる検討が必要である。

また HDL など限られた因子は 1, 25(OH)2D 濃度の影響を強く受けていることから、肝臓など一部の臓器では 25(OH)D の局所的活性化が起こらないか、もしくは弱い可能性が示唆された。

一方、ビスフォスフォネート (リセドロネート) に対する治療反応性は、治療開始時のビタミン D 充足状態にある程度依存していることが明らかになった。

E. 結論

- 1) ビタミン D 不足による PTH 分泌増加反応は、血清 Ca、P、Mg、FGF23 など既存の因子によっては規

定されず、その制御機構は不明である。

- 2) PTH および骨代謝マーカーが 25(OH)D と相関を示す一方、HDL などの因子は血中 1, 25(OH)2D 濃度の影響を強く受けることから、intracrine 機序によるビタミン D 作用の臓器特異性が示唆される。

- 3) ビタミン D 充足度はビスフォスフォネートによる治療効果を規定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, and Toshio Matsumoto. *J Bone Miner Metab* 29(1): 103-110, 2011.

- 2) Efficacy and safety of monthly oral minodronate in patients with involutional osteoporosis.

Okazaki R, Hagino H, Ito M, Sone T, Nakamura T, Mizunuma H, Fukunaga M, Shiraki M, Nishizawa Y, Ohashi Y, Matsumoto T. *Osteoporos Int* 2011 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 第 13 回日本骨粗鬆症学会学術集会 (11/3-5/2011、神戸) リセドロネート治療開始時における血漿中 25-hydroxyvitamin D 値の重要性-日本国内第Ⅲ相試験データを利用したサブ解析- 岡崎亮
- 2) ASBMR 33th Annual Meeting (San Diego, CA, 9/16-20/2011) Relationship Between Baseline Serum 25-Hydroxyvitamin D and Response to Risedronate in Postmenopausal Osteoporosis Patients: A Pooled Analysis of Clinical Trials in Japan
Ryo Okazaki

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）
平成 23 年度分担研究報告書

環境化学物質が骨代謝障害を惹起する可能性の検討（III）

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。オーファン核内受容体であるステロイド・ゼノバイオティク受容体（SXR）は、肝臓や腸管に発現しCYP3A4の転写調節をおこなっている。CYP3A4の酵素誘導をおこす抗結核薬のリファンピシンやフェニトイン等の抗痙攣薬はSXRにリガンドとして結合し、CYP3A4の転写を活性化するが、これら薬剤の長期連用は慢性的に1, 25-vitD₃代謝を亢進し、薬剤性骨軟化症を誘発する。我々はこれまでビスフェノールA（樹脂）やフタル酸化合物（可塑剤）といった環境化学物質がSXRのリガンドとして作用する事を報告したが、薬剤添加物として認可されている可塑剤があり、長期間・相当量が生体に暴露されうる。しかしながらビタミンD代謝や骨代謝への影響は不明である。

薬剤添加物として用いられる8種の可塑剤について、CYP3A4遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイで検討したところ、4種の添加物、特にacetyl tributyl citrate (ATBC)に最も強いSXRの転写活性を認めた。ATBCは薬剤添加物のほか食品ラップ、玩具、食品添加物などフタル酸化合物の代用として最も汎用される可塑剤である。ヒト腸管由来の培養細胞にATBCを加え培養すると1, 25-vitD₃と相加〜相乗的にCYP3A4遺伝子発現および酵素活性が増加し、ビタミンD受容体との相互作用が考えられた。siRNAを用いてSXRまたはVDRをノックダウンするとそれぞれの作用は減弱した。興味ある事に、ATBCによるCYP3A4の酵素誘導はヒト培養肝細胞では欠如しており腸管特異的な作用が考えられた。ラットに腹腔内または経口でATBCを投与したところ、いずれの投与経路でもvitroでの検討と同様、腸管特異的にCYP3A1 mRNAの発現が増加した。

以上から、ATBCはSXRを介して腸管特異的にCYP3A4の酵素誘導をきたす。腸上皮細胞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

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。オーファン核内受容体のステロイド・ゼノバイオティク受容体（SXR）は、肝臓や腸管に発現し、CYP3A4の転写調節をおこなっている。リファンピシン(RFP)やフェニトインはSXRにリガンドとして結合し、CYP3A4の転写を活性化してCYP3A4の酵素誘導を引き起こし、薬物相互作用の原因となる。このCYP3A4の酵素誘導は内因性のステロイド代謝にも影響を与える。例えば上記薬剤の長期連用は慢性的に活性型ビタミンD₃代謝が亢進し薬剤性骨軟化症を誘発する事が知られている。我々はこれまでビスフェノールA（樹脂）やフタル酸化合物（可塑剤）といった環境化学物質がSXRのリガンドとして作用する事を報告したが、薬剤添加物として利用されている可塑剤があり、長期間・相当量が生体に暴露されうる。しかしながらこれら

添加物のSXRのリガンド活性、さらにビタミンD代謝や骨代謝への影響は不明である。本研究では薬剤添加物として用いられる可塑剤のSXRのリガンド活性と、ビタミンD代謝酵素であるCYP3A4発現への影響について検討した。

B. 研究方法

1. 培養細胞を用いたトランスフェクションによるレポーターアッセイ

CV1 細胞にヒト SXR 発現プラスミドとCYP3A4 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後、細胞を種々の添加物の存在下で24時間培養しルシフェラーゼ活性を測定した。ヒト、ラット、マウス、ウサギ、イヌのSXRのリガンド結合領域とGAL4の融合発現プラスミドであるGAL4-SXRを5xUAS-TK-LUCレポータープラスミドと共にトランスフェクトし、細胞をRFP、pregnenolone-16α-carbonitrile (PCN)、ATBCの存在下24時間

培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果は±S.D. (n=3) で表示した。

2. リアルタイム PCR

ヒト腸管由来細胞株の LS174T 細胞、ヒト肝臓癌由来細胞株の HepaRG、FLC5、FLC7 を培養し種々の濃度の RFP または ATBC 存在下に 24hr 培養後、cDNA を調製した。CYP3A4 発現を SYBR Green によるリアルタイム PCR にて測定し $\Delta\Delta Ct$ 法で相対定量を行った。

3. siRNA によるノックダウン

SXR またはビタミン D 受容体 (VDR) の siRNA を LS174T 細胞に導入し、24 時間後に添加物の入った培地と交換、さらに 24 時間後に回収し CYP3A4 発現を SYBR Green によるリアルタイム PCR にて測定し $\Delta\Delta Ct$ 法で相対定量を行った。

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、添加物を加え 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 ラットの腹腔内にコントロール (DMSO のみ)、PCN (50 mg/kg)、ATBC (5 と 50 mg/kg) を 3 日間投与、或いは経口的にコントロール (corn oil のみ)、PCN (50 mg/kg)、ATBC (50 mg/kg) を 2 日間投与し 24 時間後に腸管 (十二指腸、空腸、回腸) 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 CYP3A1 発現 (ヒトの CYP3A4 に相当する) を検討した。

C. 研究結果

薬剤添加物として用いられる 8 種の可塑剤を用いてヒト SXR のリガンド転写活性を検討したところ、4 種の可塑剤で CYP3A4 遺伝子のプロモーター転写活性が増加した。アセチルトリブチルクエン酸 (ATBC) に最も強い転写活性を認めた。また齧歯類の SXR でも ATBC によるリガンド転写活性が認められた。降圧剤のジルチアゼム徐放剤 (Cardizem CD) 中に 200 mg あたり 12.6 mg の ATBC を検出した。最大投与量を内服すると一日あたり約 20 mg の ATBC が毎日暴露される。

ヒト腸管由来の LS174T 細胞を培養し ATBC を添加し 24hr 後に細胞を回収しリアルタイム PCR にて CYP3A4 mRNA 発現を検討した。ATBC 添加により濃度依存性に CYP3A4 mRNA 発現が上昇した。さらに ATBC は 1, 25-vitD₃ と相乗的に CYP3A4 遺伝子発現を増強し VDR との相互作用が考えられた。こ

の ATBC の効果は SXR の siRNA によるノックダウンで、また 1, 25-vitD₃ の効果は VDR の siRNA によるノックダウンで、それぞれ減弱した事から、それぞれの受容体を介した作用が考えられた。また LS174T 細胞で ATBC により 1, 25-vitD₃ と相加的に CYP3A4 の酵素活性が増加した。

次に、ヒト凍結肝細胞と 3 種類のヒト肝臓由来の細胞株 (HepaRG, FLC5, FLC7) を用いて CYP3A4 mRNA 発現を検討した。いずれの細胞でも RFP では濃度依存性に CYP3A4 mRNA が増加したが、ATBC を高濃度添加してもほとんど CYP3A4 mRNA の変化は認められなかった。

これら *vitro* での結果から、*vivo* での解析としてラットに腹腔内、或いは経口的に ATBC またはラット SXR のリガンドである PCN を投与後、腸管と肝臓を摘出して CYP3A1 発現をリアルタイム PCR で検討した。PCN 刺激により、いずれの臓器でも CYP3A1 発現が増加したのに対し、ATBC の投与では腸管で CYP3A1 mRNA が増加したが、肝臓では変化を認めなかった。以上、*vitro* と *vivo* 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。

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ン D 代謝を亢進させる事が主な原因と考えられている。健康人が 2 週間 RFP を内服すると血中 1, 25-vitD₃ 濃度が低下する事から、特に低栄養や紫外線照射の少ない病人や老人が CYP3A4 の酵素誘導を引き起こす薬物を長期摂取すると骨に影響を受けやすいと考えられる。

今回、薬剤添加物として使用される ATBC に SXR の強いリガンド活性を認めた。ATBC は薬剤添加物のほか食品ラップ、玩具、食品添加物などにもフタル酸化合物の代用として最も汎用される可塑剤である。ATBC の作用は腸管特異的で、肝臓では CYP3A4 発現の誘導を認めなかった。これまで CYP3A4 による代謝系は主に肝臓において議論されてきたが、最近、肝臓や腸管の部位特異的な CYP3A1 (ヒトの CYP3A4 に相当する) のノックアウトマウスによる検討で、肝臓のみならず腸管における CYP3A4 も薬物の吸収・代謝に重要

な役割を持つ事が明らかとなっている。ATBC が腸管特異的に作用する理由は不明であるが、例えば SXR のコアクティベーターやコリプレッサーの発現様式が肝臓と腸管粘膜において異なる可能性や、SXR には若干リガンド作用が異なるスプライシングバリエーションが知られており、組織におけるバリエーションの発現様式が異なる可能性などが原因としてあげられる。

1, 25-vitD₃ により腸管細胞において CYP3A4 発現が誘導されるという現象は、能動的なカルシウム吸収を担っている腸管細胞におけるビタミン D 作用に関して負の調節機構が腸管局所に存在することを示唆するものである。しかしながら、このようなビタミン D 作用とは独立して ATBC が SXR を介して CYP3A4 を誘導することは、局所におけるビタミン D 作用の程度や生体のカルシウム充足度とは関係なく、ATBC が 1, 25-vitD₃ の不活性化を促進する可能性を示すものであり、ヒトのカルシウム代謝に対して何らかの影響をもたらすことが懸念される。

我々の検討では ATBC を含むある薬剤の最大投与量を内服すると約 20 mg の ATBC が毎日摂取される事を示した。レポーターアッセイでは ATBC が 1 μM 以上の濃度で明らかな転写活性の増加が認められたが、経口的に摂取された場合には、腸粘膜局所では高濃度の ATBC が作用する可能性もある。即ち、腸上皮細胞における活性型ビタミン D₃ 代謝の亢進は、腸粘膜における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懸念される。今後は長期にわたるラットへの ATBC 投与により、腸粘膜において 1, 25-vitD₃ 代謝が亢進し、骨量の減少をきたすかどうかを明らかにする研究を進めていくことが課題である。

E. 結論

薬剤添加物のひとつである ATBC は SXR を介して腸管特異的に CYP3A4 の酵素誘導をきたす。腸上皮細胞における活性型ビタミン D₃ 代謝の亢進は、ビタミン D の腸上皮細胞での作用を抑制することにより、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeshita A, Igarashi-Migitaka J, Nishiyama K, Takahashi H, Takeuchi Y, Koibuchi N: Acetyl tributyl citrate, the most widely used phthalate substitute plasticizer, induces cytochrome p450 3A through steroid and xenobiotic receptor. *Toxico Sci* 123(2):460-470, 2011

2) Yamada S, Fukuhara N, Nishioka H, Takeshita A, Inoshita N, Ito J, Takeuchi Y.: Surgical management and outcomes in patients with Cushing disease with negative pituitary magnetic resonance imaging. *World Neurosurg.* 2011 Nov 7. [Epub ahead of print]

3) Yamada S, Fukuhara N, Nishioka H, Takeshita A, Suzuki H, Miyakawa M, Takeuchi Y.: GH deficiency in patients after cure of acromegaly by surgery alone. *Eur J Endocrinol* 165(6):873-879, 2011

4) Tamiya H, Fukuhara N, Yoshida N, Suzuki H, Takeshita A, Inoshita N, Nishioka H, Takeuchi Y, Sano T, Yamada S.: A silent follicle-stimulating hormone-producing pituitary adenoma in a teenage male. *Endocr Pathol* 22(4):212-217, 2011

2. 学会発表

竹下彰 五十嵐潤子 西山和沙 高橋秀依 鯉淵典之 竹内靖博. 薬剤添加物によるステロイドゼノバイオティック受容体 SXR を介した腸管特異的な CYP3A4 の酵素誘導 (第 84 回日本内分泌学会 2011 年 4 月 21 日)

日本内分泌学会雑誌 87 巻 第 1 号 307 頁

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

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）
平成 23 年度分担研究報告書

ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明

研究分担者 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 の生理作用はビタミン D 受容体 (VDR) を介した標的遺伝子の転写制御によって発揮されるが、その分子機構や 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い。本研究では、これまでに VDR を介した転写抑制機構において重要な役割を持つ因子として我々が同定した DNA メチル化制御因子 MBD4 の遺伝子欠損 (MBD4KO) マウスの骨組織の解析により、DNA メチル化制御因子の機能欠損がカルシウム代謝および骨代謝におよぼす影響を検討した。MBD4KO マウスは野生型と比較し骨量・骨密度が有意に減少するが、この骨量減少のメカニズムを明らかにするため、骨形態計測の系を立ち上げた。本実験系の確立により、骨構造、骨形成、骨吸収パラメーターの各項目について数値化することで、骨量・骨密度減少の表現型をより詳細に、細胞レベルで評価することが可能となった。しかしながら MBD4KO マウスの骨形態計測をおこなったところ、MBD4KO マウスと野生型では骨形成および骨吸収いずれのパラメーターについても差異は認められず、MBD4KO マウスの骨量減少メカニズムを明らかにすることはできなかった。

A. 研究目的

ビタミン D の生理作用はビタミン D 受容体 (VDR) を介した標的遺伝子の転写制御によって発揮されるが、その分子機構や 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い。我々はこれまで VDR を介したビタミン D₃1 α 水酸化酵素遺伝子発現制御機構の解析をおこなってきた。その結果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 転写抑制機構において、可逆的な DNA メチル化制御が重要な役割を担うことを明らかにした。そこで本研究では DNA メチル化制御因子の機能欠損がカルシウム代謝および骨代謝におよぼす影響を検討し、生体内カルシウム代謝に関わるビタミン D 依存的転写制御の分子機構の解明をめざす。

B. 研究方法

本研究では、これまでに VDR を介した転写抑制機構において重要な役割を持つ因子として我々が同定した DNA メチル化制御因子 MBD4 の遺伝子欠損

(MBD4KO) マウスの骨組織の解析により、DNA メチル化制御因子の機能欠損がカルシウム代謝および骨代謝におよぼす影響を検討した。MBD4KO マウスは野生型と比較し骨量・骨密度が有意に減少するが、この骨量減少のメカニズムを明らかにするため、骨形態計測の系を立ち上げ、骨構造、骨形成、骨吸収パラメーターの各項目について数値化することで、MBD4KO マウスの骨量・骨密度減少の表現型をより詳細に、細胞レベルで評価することを試みた。

(倫理面への配慮) 遺伝子組み換え動物実験の実施にあたっては、関係する法律および施設における規則を遵守し、動物の屠殺にあたっては適切な麻酔法等を十分考慮し苦痛を最小限に留めるよう配慮する。

C. 研究成果

骨形態計測の系を確立するために、まず解析に用いるマウスの骨組織の固定の条件検討を行い、非脱灰切片作製のための MMA 樹脂包埋ブロック作製をおこなった。次に MMA 樹脂包埋ブロックをミ

クロトームにより薄切し、切片作製後、各種染色をおこない、骨形態計測で必須となる骨組織中の骨芽細胞および破骨細胞を同定する技術を確立した。さらに、作製した標本をオステオメジャーを用いて形態計測することにより、骨構造、骨形成、骨吸収パラメーターの各項目について数値化することが可能となった。そこで MBD4KO マウスの骨形態計測をおこなったところ、MBD4KO マウスと野生型では骨形成および骨吸収いずれのパラメーターについても差異は認められなかった。

D. 考察

本研究において骨形態計測の系を樹立したことにより、MBD4KO マウスの骨量・骨密度減少の表現型をより詳細に、細胞レベルで評価することが可能となったが、MBD4KO マウスと野生型では骨形成および骨吸収いずれのパラメーターについても差異は認められず、骨形態計測によっては MBD4KO マウスの骨量減少メカニズムを明らかにすることはできなかった。そこで MBD4KO マウスの骨量減少メカニズムの検討は一旦終了し、今後は今回確立した骨形態計測の系を生かし、骨組織特異的な各種 VDRKO マウスの骨形態計測を精力的に行っていくことにより、ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明を目指すべきであると考えた。

E. 結論

本研究では、これまでに VDR を介した転写抑制機構において重要な役割を持つ因子として我々が同定した DNA メチル化制御因子 MBD4 の遺伝子欠損 (MBD4KO) マウスの骨組織の解析により、DNA メチル化制御因子の機能欠損がカルシウム代謝および骨代謝におよぼす影響を検討した。MBD4KO マウスは野生型と比較し骨量・骨密度が有意に減少するが、骨形態計測によっては MBD4KO マウスの骨量・骨密度の減少メカニズムの解明には至らなかった。そこで MBD4KO マウスの骨量減少メカニズムの検討は一旦終了し、今後は今回確立した骨形態計測の系を生かし、骨組織特異

的な各種 VDRKO マウス等の骨形態計測を精力的に行っていくことにより、ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明を目指したいと考える。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H.H., Igarashi, K., Kanno, J., Ohtake, F., Kitagawa, H., Roeder, R.G., Brown, M., Kato, S.: GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. **Nature** 2011; 480:557-560.

Yokoyama, A., Katsura, S., Ito, R., Hashiba, W., Sekine, H., Fujiki, R., Kato, S.: Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4 α . **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2011; 410:749-753.

Kato, S., Yokoyama, A., Fujiki, R.: Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. **Trends Biochem. Sci.** 2011; 36:272-281.

Baba, A., Ohtake, F., Okuno, Y., Yokota, K., Okada, M., Imai, Y., Ni, M., Meyer, C.A., Igarashi, K., Kanno, J., Brown, M., Kato, S.: PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. **Nat. Cell Biol.** 2011; 13:668-675.

Takeyama, K., Kato, S.: The vitamin D3 1 α -hydroxylase gene and its regulation by active vitamin D3. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2011; 75:208-213.

Kato, S., Fujiki, R.: Transcriptional controls by nuclear fat-soluble vitamin receptors through chromatin reorganization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2011; 75:410-413.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiroshi Iwakura, Hiroyuki Ariyasu, Hiroshi Hosoda, Go Yamada, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao, Kenji Kangawa, <u>Takashi Akamizu</u>	Oxytocin and Dopamine Stimulate Ghrelin Secretion by the Ghrelin-Producing Cell Line, MGN3-1 in Vitro	Endocrinology	152(7)	2619-2625	2011
Tomizawa R, Watanabe M, nInoue N, Takemura K, Hidaka Y, <u>Akamizu T</u> , Hayakawa K, Iwatani Y	Association of functional GTR gene polymorphisms related to expression of glucocorticoid- induced tumour necrosis factor-receptor (GTR) molecules with prognosis of autoimmune thyroid disease	Clin Exp Immunol	65(2)	141-147	2011
<u>Takashi Akamizu</u> , Kenji Kangawa	Therapeutic applications of ghrelin to cachexia utilizing its appetite- stimulating effect	Peptides	32(11)	2295-2300	2011
Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, <u>Akamizu T</u> , Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, Shirasawa S	Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population	J Hum Genet	56(11)	772-778	2011
<u>Takashi Akamizu</u> , Nobuo Sakura, Yosuke Shigematsu, Go Tajima, Akira Ohtake, Hiroshi Hosoda, Hiroshi Iwakura, Hiroyuki Ariyasu and Kenji Kangawa	Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II	Eur J Endocrinol	166(2)	235-240	2012
Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, <u>Akamizu T</u>	Transgenic overexpression of intraislet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo	Am J Physiol Endocrinol Metab	302(4)	403-408	2012