

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ホルモン受容機構異常に関する調査研究
甲状腺ホルモン不応症の甲状腺ホルモン受容体に異常を認めない一家系の解析

研究分担者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科
研究協力者 山田正信、石井角保 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科

研究要旨 甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 例の多くは甲状腺ホルモン受容体 (TR) β 遺伝子のミスセンス変異が原因であるが、RTH 家系の約 15% には変異が認められず、その病態は不明である。今回我々は、TR β 遺伝子にミスセンス変異を認めない三世代にわたる RTH 家系を発見した。そこで、TR β 遺伝子のエクソン以外の領域の配列を解析したところ、イントロン領域に一塩基置換が認められた。この置換は健常人 50 人には認められず、遺伝子多型データベース上にも報告がないことから、遺伝子多型ではなく変異であると考えられた。また、この変異は、家系内において三世代の患者に認められ健常同胞者には認められなかったことから、疾患に連鎖している可能性が示唆された。RTH における非翻訳領域の変異はこれまで報告がなく、新たな病態の解明につながる可能性がある。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 例の多くは甲状腺ホルモン受容体 (TR) β 遺伝子にミスセンス変異を認める。しかし、RTH 家系の約 15% は TR β 遺伝子に変異を認めない。これらの症例は臨床的に変異を持つ症例と区別がつかず、その原因は不明であり、病態の解明が急務である。今回我々は、三世代にわたる RTH 家系を経験したが、患者の TR β 遺伝子にミスセンス変異を認めなかった。そこで、本患者における病態の解明を目的として、TR β 遺伝子のエクソン以外の領域の遺伝子配列を解析した。

B. 研究方法

①患者及び健常同胞者から同意を得た上で、末梢血細胞からゲノムDNAを抽出し、TR β 遺伝子のエクソン周辺領域の塩基配列を解析した。②健常人 50 人から同意を得た上で、同様に塩基配列を解析し、①で発見された置換が認められるかを解析した。③遺伝子多型のデータベースを用いて、発見された遺伝子置換が既報の遺伝子多型であるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究については群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認(受付番号 65)を得て行っている。

C. 研究結果

RTH 患者のゲノムDNA解析において、TR β 遺伝子のイントロン領域に一塩基置換を認めた。この一塩基置換は、健常人 50 人には認められなかった。また、HapMap、dbSNP、JSNP といった正常遺伝子多型のデータベースを検索したところ、同部位に多型の報告はなかった。以上のことから、この一塩基置換は正常多型ではなく変異であると考えられた。患者家系内において、この変異は三世代の患者に認められ、一方健常同胞者には認められなかった (図 1)。そのため、この変異が病気に連鎖している可能性が示唆された。

D. 考察

RTH 家系の約 15% に認められる TR β 遺伝子にミスセンス変異を持たない症例は、臨床症状や常染色体優性遺伝形式を取る点など、変異を持つ症例と区別がつかない。その病因や原因遺伝子は不明であり、病態の解明が急務となっている。今回、疾患に連鎖している可能性がある TR β 遺伝子のイントロン領域にある変異を発見した。これまで RTH においてイントロンなどの非翻訳領域の変異は報告がなく、初の症例となる可能性がある。また、本症例における病態が解明されれば、TR β 遺伝子にミスセンス変異を持たない RTH 症例に対する新規の治療法開発の端緒となる可能性が考えられる。

E. 結論

甲状腺ホルモン不応症にてTR β 遺伝子のコーディング領域に変異を認めない三世代にわたる家系を発見した。この家系において、非翻訳領域に症候と連鎖する可能性のある変異を発見した。

F. 健康危険情報 該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima Y, Yamada M, Taguchi R, Shibusawa N, Ozawa A, Tomaru T, Hashimoto K, Saito T, Tsuchiya T, Okada S, Satoh T, and Mori M. NR4A1 (Nur77) mediates thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of transcription of the thyrotropin β gene: analysis of TRH knockout mice. *PLoS One* 7:e40437, 2012.

2. Hashimoto K, Ishida E, Miura A, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Yamada M, Mori M. Human stearyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) gene expression is negatively regulated by thyroid hormone without direct binding of thyroid hormone receptor to the gene promoter. *Endocrinology*. 2013 Jan;154(1):537-49.

3. Ishida E, Hashimoto K, Okada S, Satoh T, Yamada M, Mori M. Crosstalk between Thyroid Hormone Receptor and Liver X Receptor in the Regulation of Selective Alzheimer's Disease Indicator-1 Gene Expression. *PLoS One*. 2013;8(1):e54901.

4. Ishida E, Hashimoto K, Okada S, Satoh T, Yamada M, Mori M. Thyroid hormone receptor and liver X receptor competitively up-regulate human selective Alzheimer's disease indicator-1 gene expression at the transcriptional levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 14.

2. 学会発表

1. 山田 正信, 中島 康代, 田口 亮, 森 昌朋: 下垂体の機能調節に関わる新規分子の解明 TRH ノックアウトマウスを用いた新たな生理活性経路の探索、第 8 9

回日本生理学会大会、松本、2012年3月29日-31日(シンポジウム)

2. 田口 亮, 山田 正信, 橋本 哲, 登丸 琢也, 石井 角保, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 三輪 秀樹, 柳川 右千夫, 森 昌朋: TRH ノックアウトマウスは新規環境に対する不安感受性が増強し協調性運動障害を示す、第 39 回日本神経内分泌学会、北九州市、2012年9月28日-29日

3. 渋沢 信行, 田口 亮, 登丸 琢也, 石井 角保, 小澤 厚志, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 山田 正信, 森 昌朋: 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによる膵島 FGF21 遺伝子発現調節機構、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012年11月29日-12月1日

4. 山田 正信, 中島 康代, 渋沢 信行, 田口 亮, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 森 昌朋: 下垂体 NR4A1(Nur77)を介する視床下部-下垂体-甲状腺系のエネルギー代謝調節機構、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012年11月29日-12月1日

5. 登丸 琢也, 須賀 孝慶, 岩崎 靖樹, 山崎 勇一, 渋沢 信行, 石井 角保, 小澤 厚志, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 山田 正信, 森 昌朋: 甲状腺転移を来した肺腺癌の 1 例、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012年11月29日-12月1日

6. 橋本 貢士, 西原 永潤, 石田 恵美, 登丸 琢也, 石井 角保, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 佐藤 哲郎, 宮内 昭, 山田 正信, 森 昌朋: バセドウ病再発(再燃)を予測するマーカー(Siglec1)の開発(第 2 報) 複数施設での検討、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012年11月29日-12月1日

7. 小澤 厚志, 山田 正信, 田口 亮, 吉野 聡, 登丸 琢也, 石井 角保, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 森 昌朋: 寒冷環境での非ふるえ熱産生における視床下部-下垂体-甲状腺系の役割 TRH ノックアウトマウスの解析、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012年11月29日-12月1日

8. 中島 康代, 山田 正信, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 阿久沢 まさ子, 正村 泰博, 安

藤 義孝, 森 昌朋: 本邦における年齢別 TSH 基準値の検討 潜在性甲状腺機能異常症のピットフォール、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日

9. 佐藤 哲郎: 核内ホルモン受容体転写共役因子 PDIP1 の pre-mRNA alternative splicing における機能解析 甲状腺ホルモン受容体による選択的スプライシングの調節、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日

10. 石井 角保: 甲状腺ホルモン受容体遺伝子に変異を認めない家族性甲状腺ホルモン不応症家系の解析、第 55 回日本甲状腺学会、福岡、2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日

11. 小澤 厚志, 山田 正信, 田口 亮, 吉野 聡, 登丸 琢也, 石井 角保, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 森 昌朋: 寒冷暴露での熱産生における TRH の役割 TRH ノックアウトマウスの解析、第 33 回日本肥満学会、京都、2012 年 10 月 11 日-12 日

12. 渋沢 信行, 田口 亮, 登丸 琢也, 石井 角保, 小澤 厚志, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 山田 正信, 森 昌朋: 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)による膵島 FGF21 遺伝子発現調節、第 33 回日本肥満学会、京都、2012 年 10 月 11 日-12 日

13. 中島 康代, 山田 正信, 正村 泰博, 阿久澤 まさ子, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 安藤 義孝, 森 昌朋: 潜在性甲状腺機能低下症は腹囲を規定する 人間ドック 7298 名の解析から、第 33 回日本肥満学会、京都、2012 年 10 月 11 日-12 日

14. 山田 正信, 渋沢 信行, 田口 亮, 中島 康代, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 森 昌朋: 下垂体 NR4A1(Nur77)を介する視床下部-下垂体-甲状腺系のエネルギー代謝調節機構、第 33 回日本肥満学会、京都、2012 年 10 月 11 日-12 日

15. 橋本 貢士, 石田 恵美, 田口 亮, 片野 明子, 吉野 聡, 中島 康代, 登丸 琢也, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 佐藤 哲郎, 岡田

秀一, 山田 正信, 森 昌朋: Poly[ADP-ribose]polymerase 1 は甲状腺ホルモンによる Stearoyl-CoA desaturase-1 遺伝子発現の負の調節に関与する、第 55 回日本糖尿病学会年次学術総会、横浜、2012 年 5 月 17 日-19 日

16. 片野 明子, 佐藤 哲郎, 岡村 孝志, 高橋 洋樹, 登丸 琢也, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 岡田 秀一, 山田 正信, 森 昌朋: 再発無痛性甲状腺炎とほぼ同時期に 1 型糖尿病を発症した多腺性自己免疫症候群(APSS)3 型の 1 例、第 55 回日本糖尿病学会年次学術総会、横浜、2012 年 5 月 17 日-19 日

17. 渋沢 信行, 田口 亮, Garay Jennifer, 小澤 厚志, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 山田 正信, 森 昌朋: 膵臓ランゲルハンス島における TRH による Fibroblast Growth Factor 21 遺伝子発現調節と機能、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋、2012 年 4 月 19 日-21 日

18. 田口 亮, 山田 正信, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 橋本 貢士, 佐藤 哲郎, 三輪 秀樹, 柳川 右千夫, 森 昌朋: TRH ノックアウトマウスは新規環境に対する不安感受性が亢進し協調性運動障害を示す、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋、2012 年 4 月 19 日-21 日

19. 山田 正信, 田口 亮, 堀口 和彦, 中島 康代, 佐藤 哲郎, 橋本 貢士, 山崎 勇一, 柿崎 暁, 登坂 雅彦, 好本 裕平, 山田 正三, 森 昌朋: 下垂体前葉疾患の研究の進歩 潜在性内分泌代謝病をリードする甲状腺機能異常の多様性、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋、2012 年 4 月 19 日-21 日

20. 橋本 貢士, 石田 恵美, 片野 明子, 田口 亮, 吉野 聡, 中島 康代, 登丸 琢也, 小澤 厚志, 渋沢 信行, 佐藤 哲郎, 岡田 秀一, 山田 正信, 森 昌朋: Siglec1 遺伝子発現はバセドウ病の再発(再燃)を予測する、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋、2012 年 4 月 19 日-21 日

21. 山田 正信: 核内受容体と生体機能 甲状腺ホルモン受容体異常と疾患、第 14

回環境ホルモン学会研究発表会、東京、
2011年12月1日-2日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

症例 34歳、女性

受診目的:SITSH精査

TSH 0.82
FT4 2.4 (-2.1)
FT3 7.3 (-4.5)
T-Chol 260 CK 137

身長 143.4 cm 体重 47.6 kg
脈拍 89/min、甲状腺腫 1度

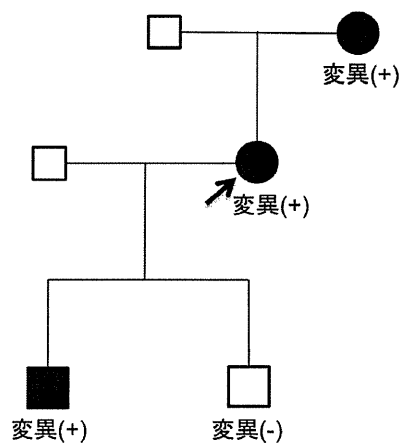


図1 TR β 遺伝子イントロン領域に変異を認めた三世代にわたる RTH 家系
SITSH: TSH 不適切分泌症候群

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 24 年度 研究報告書

TSHR 異常症ヘテロ接合体マウスの甲状腺機能低下症の発症機序

研究協力者 遠藤 登代志（山梨大学 医学工学総合研究部 准教授）

研究要旨

C.RF-Tshr^{hyt/hy} (hyt) マウスは TSHR の第 556 コドンであるプロリンがロイシンに変異しており、ホモでこの変異を有すると重症甲状腺機能低下症を発症し、ヒト TSHR 異常症とも類似する。今回、この変異をヘテロで有する C.RF-Tshr^{hyt/wild}（ヘテロマウス）の甲状腺機能の検討をおこなった。ヘテロマウスの血中 fT3, fT4 は C.RF-Tshr^{wild/wild}（ワイルドマウス）に比べ有意に低く、TSH は高値であった。また甲状腺は萎縮的で ¹²⁵I-uptake も著明に低下していた。この機序を解明すべくヘテロマウス甲状腺よりワイルド・ヘテロタイプの TSHR cDNA をクローニングしそれぞれ発現ベクターに挿入し HEK293 細胞に発現させた。その結果ワイルド・ミュータントレセプターをともに発現させた細胞の TSH による cAMP 産生はワイルドレセプターのみを発現させた細胞に比し著明に低下した。更に、ワイルドレセプター/eCFP とミュータントレセプター/eYFP を共に発現させた細胞にて FRET アッセイを行ったところ、TSH 存在下にて FRET が観察され、P556L 変異 TSHR はワイルドタイプレセプターに対しドミナントネガティブ効果を示すことにより甲状腺機能低下を惹起するものと考えられた。

A. 研究目的

ヒト TSHR 異常症では潜在性ないし顕性に甲状腺機能低下症が発症するが、これらの変異をヘテロで有する病態に関しては不明な点が多い。通常甲状腺機能は正常であるとの報告が多いが、変異の種類によっては軽度機能低下症を発症するとの報告もある。

C.RF-Tshr^{hyt/hyt} マウスは TSHR に遺伝子の第 556 コドンであるプロリンがロイシンに変化する変異を有し、そのホモ接合体は甲状腺機能低下症発症モデルとして古くより用いられており、ヘテロ接合体は外表上ワイルドと変化なく、正常甲状腺機能を有するとされて来た。今回、本マウスのヘテロ接合体が低体温傾向を示したため、甲状腺機能を再検討し、甲状腺機能低下症を発症している事を見いだした。この機序を解明する事により、ヒト TSHR 異常症、特にヘテロで変異を有する症例の病態の解明、適切な治療法の確立を目的とする。

B 研究方法

C.RF-Tshr^{hyt/+} マウスは Jackson laboratory より入手し、これらヘテロマウスの交配により Tshr^{hyt/wild}（ヘテロマウス）、Tshr^{wild/wild}（ワイルドマウス）を作成した。TSHR の genotype は tail DNA の PCR 産物の direct sequencing により決定した。fT3, fT4 の測定はロッシュダイアグノスティック社 ECLusis system により測定した。Tshr^{hyt/wild} 甲状腺よりの TSHR cDNA のクローニングは PCR により行い、wild ないし mutant TSHR を pcDNA-eCFP ないし、pcDNA-eYFP に挿入した。これらは、単独ないし混合して HEK293 細胞にエレクトロポレーション法にて導入した。FRET アッセイは FRET filter を備えた Olympus IX80 顕微鏡にて行った。解析は Metamorph soft にて行った。

C 研究結果

C.RF-Tshr^{hyt/+} マウスの甲状腺機能ワイルド、ヘテロマウスの甲状腺機能を表 1 に示す。ヘテロマウスの血中 fT3, fT4 は有意に低下、TSH は明らかに高値を示した。ま

た ^{125}I -uptake も低く甲状腺径（左葉・右葉平均最大径の平均）も小さく萎縮性甲状腺を呈した。

表1 Thyroid functions of C.RF-Tshr^{hwt/wild} mice

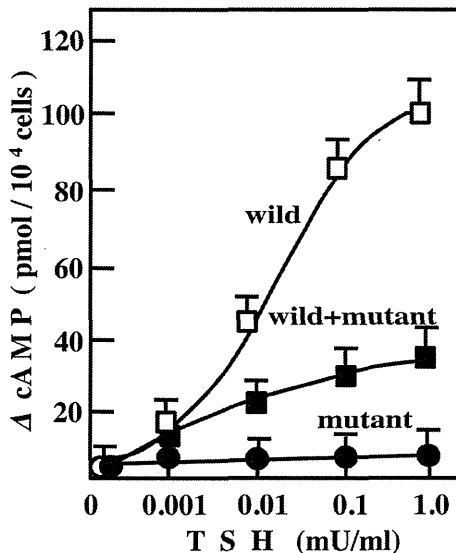
Mouse	ft3 (pg/ml)	ft4 (ng/ml)	TSH (ng/ml)	^{125}I -uptake ($\times 10^6$ cpm)	Diameter (mm)
wild(n=7)	2.24 \pm 0.07	1.88 \pm 1.2	2.4 \pm 0.4	3.80 \pm 0.4	3.65 \pm 0.07
hetero(n=6)	1.91 \pm 0.04**	1.24 \pm 0.09***	13.8 \pm 1.3***	2.60 \pm 0.2***	2.57 \pm 0.08***

** p<0.05, *** p<0.001

ワイルド、変異 TSHR を発現した HEK293 細胞の cAMP 産生、 ^{125}I -TSH 結合能

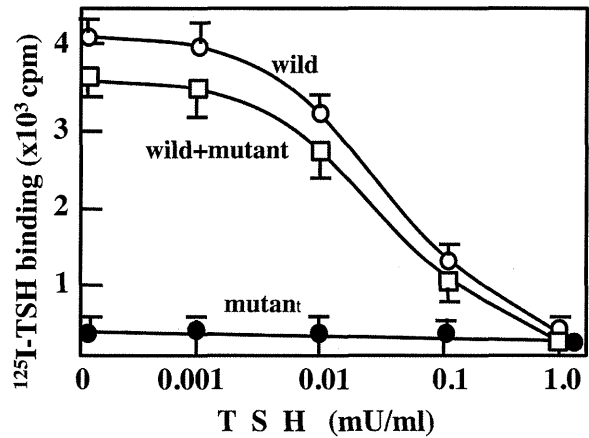
ワイルドタイプ TSHR を発現させた HEK293 細胞 (293-TSHR (W))、変異 TSHR を発現させた HEK293 細胞 (293-TSHR (M))、両者を共発現させた HEK293 細胞 (293-TSHR (W)/TSHR (M)) の TSH による cAMP 応答性、 ^{125}I -TSH 結合能を検討した (図 1)。

図 1a



その結果 293-w/mTSHR の TSH による cAMP 産生は著明に抑制されるが (図 1-a)、 ^{125}I -TSH 結合能は軽度抑制されるのみで (図 1-b) であることが判明した。これらの事実は変異 TSHR はワイルドタイプ TSHR に dominant negative effect を示すと考えられた。

図 1 b

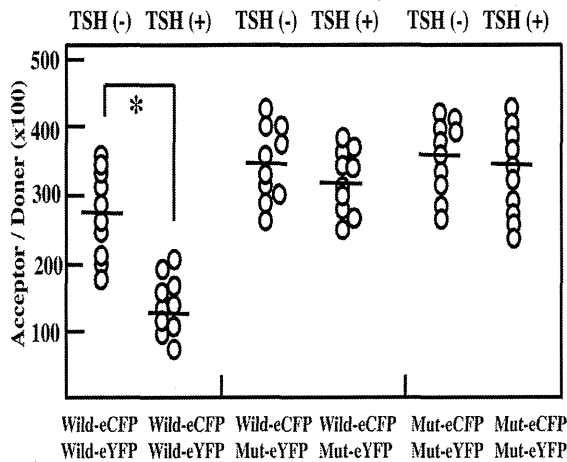


Fluorescence resonance energy transfer (FRET) アッセイ

eYFP 分子は eCFP 分子と近接すると後者より励起エネルギーを得て発光する。そこで TSHR(W)-eCFP と TSHR(W)-eYFP、TSHR(W)-eCFP と TSHR(M)-eYFP を HEK293 細胞に co-transfection し、TSH 存在下、非存在下にて FRET アッセイを行った (図 2)。その結果、TSHR(W)-eCFP と TSHR(W)-eYFP を発現した細胞では TSH 非存在下にて FRET が観察されたが、TSHR(W)-eCFP と TSHR(M)-eYFP を発現した細胞では TSH 存在・非存在に関わらず FRET が観察された。この事は、TSHR は TSH 非存在下では複数のレセプターが近接して存在しポリマーを形成しているが、TSH 添加によりこれらが解離し分離して存在する事 (モノマー化) を意味すると考えられる。

一方、TSHR(W)-eCFP と TSHR(M)-eYFP を共発現した HEK293 細胞では TSH 存在下にて FRET が観察された事は、モノマー化が惹起されなかったことを意味し、P556L 変異が TSHR のモノマー/ポリマー形成機能に異常を来したと考えられた。

図 2



D 考案

ヒト TSHR 異常症の多くはホモ接合体で甲状腺機能低下症が惹起されるとの報告が多い。これらのヘテロ接合体ではほぼ正常甲状腺機能の場合と、少数ながら軽度の TSH の上昇する例が報告されており、その詳細ならびに機序は不明であった。

今回、我々が解析した *hyt* マウス、ホモ接合体は重症甲状腺機能低下を、ヘテロ接合体では軽度の甲状腺機能低下症となり、一部のヒト TSHR 異常症の結果と一致する。

一方、Davies らが作成した TSHR KO マウスでは、ホモ接合体で重症甲状腺機能低下症を呈するものの、ヘテロ接合体では TSH 値を含め、甲状腺機能は全く正常であったり。従って、*hyt* マウス ヘテロ接合体での甲状腺機能低下症の発症は正常 TSHR の発現量の低下では説明できず、むしろ変異 TSHR が正常 TSHR の機能を阻害する、*dominant negative effect* を示すと考える事が合理的である。

本研究にて TSHR (M) と TSHR (W) を共発現させた場合、TSHR (W) 単独に比し TSH による cAMP 応答能が低下したが、この結果は TSHR (M) が *dominant negative effect* を有することを示すものである。さらにこの機序を C 末端に eCFP, eYFP を標識した TSHR を用いた FRET アッセイにて検討したところ P556L 変異 TSHR は TSH にて誘導されるモノマー化の障害である事が示唆された。この型の甲状腺機能低下症の存在は初めての報告であり、今後、ヒト TSHR 異常症でも同様の検討が必要になると考えられる。

E 結論

P556L 変異 TSHR はポリマー/モノマー解離障害のため *dominant negative effect* により正常 TSHR 機能が障害され、ヘテロ接合体にて甲状腺機能低下症が惹起される。

F 参考文献

1) Marians RC, Ng L, Blair HC, et al. Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15776-15781 (2002).

G 研究発表

1. 論文発表

- (1) Endo, T. & Kobayashi, T. Expression of functional TSH receptor in white adipose tissues of *hyt/hyt* mice induces lipolysis *in vivo*. *Am J Physiol. Endocrinol Metab*, 302:E1569-E1575 (2012)
- (2) Endo T. & Kobayashi T. Dominant negative effect of mutated thyroid stimulating hormone receptor (P556L) causes hypothyroidism in C.RF-Tshr(*hyt/wild*) mice. *PLoS One*.7:e42358 (2012)

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）

分担 研究報告書

甲状腺ホルモンとその受容体を介する転写調節における転写伸長反応の関わり

研究協力者 佐々木茂和 浜松医科大学第2内科 講師

研究要旨

甲状腺ホルモン(T3)はその標的遺伝子の転写を活性化（正の調節）または抑制（負の調節）する。このシグナル伝達系の異常として甲状腺ホルモン不応症（Resistance to thyroid hormone、RTH）が知られ、その多くに T3 受容体(T3 receptor、TR) β 遺伝子の変異が同定されている。しかし、TR β ならびに、もう1つの機能的TRであるTR α の遺伝子解析をしても遺伝子変異が見当たらないケース(non-TR RTH)が数割は存在する。従来ヒストン修飾にかかわるコアクチベーター、コリプレッサーが責任分子として推定されて来たが、未だに決定的な報告はない。今回私達は T3 の標的遺伝子の転写伸長を担う因子に注目し、T3 シグナルにおける機能について検討を行った。その結果、(i)TR は転写伸長に関わる因子の内、hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1 (HEXIM1)、cyclin-dependent kinases (CDK)9 と複合体を形成していること、(ii)RTH で同定された変異 TR もこれらと相互作用すること、(iii)gonadotroph 株である L β T2 細胞の検討により、T3 で正に調節される1型脱ヨード酵素(D1)と負に調節される甲状腺刺激ホルモン(TSH)の α 鎖 (α -glycoprotein subunit, α GSU) とでは転写開始点近傍での RNA ポリメラーゼ II (Pol-II) の占拠状態が異なり、負の調節において Pol-II pausing の現象が関与することが示唆された。

A. 研究目的

TR シグナル伝達の異常と考えられる甲状腺ホルモン不応症(RTH)においては、15年以上前から TR に遺伝子異常を認めないケース(non-TR RTH)が数割に昇る事が知られていた。TR は核受容体の一つである。1990年代後半にリ

ガンド結合した核受容体のコアクチベーターがヒストンアセチル化酵素(HAT)活性を有すること、一方リガンドが結合していない核受容体にコリプレッサーが会合してヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を呼び込むというモデルが確立している。これらコフ

ァクターの同定は恰も TR を介する転写調節機構の全貌が判明したかのような印象を与え、non-TR RTH においてもコファクターの障害（コファクター病）が推定されてきた。しかし、現実には以下の様な問題点がある。

(1) コファクターは複数同定されてきたが、実際に non-TR RTH の責任遺伝子であったという報告は未だにない。上記のヒストン修飾に関わる種々のコファクターの欠失マウスの結果も no-TR RTH を直接再現するものではない。

(2) 上述のコファクターは TR 以外の核受容体、例えばグルココルチコイド受容体 (GR) やエストロゲン受容体 (ER)、レチノイン酸受容体 (RAR)、アンドロゲン受容体 (AR)、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR)、ビタミン D 受容体 (VDR)、ミネラルコルチコイド受容体 (MR) にも共通する。しかし、non-TR RTH においてこれらのシグナル伝達系における障害は報告されていない。すなわち non-TR RTH においては T3/TR の経路に特化したシグナル伝達障害を起こす機序は依然、不明である。

(3) 通常、RTH は不適切な甲状腺刺激ホルモン (TSH) の過剰分泌 (SITSH) として発見され、その点では non-TR RTH も例外ではない。TSH は β 鎖 (TSH β)、 α 鎖 (α GSU) で構成されるヘテロ 2

量体であり、両者の発現は T3 によって負に調節される。私達は過去 15 年にわたり、T3 による TSH β 遺伝子の負の調節について検討し、それが T3 による正の調節とはメカニズムとして全く異なるものであることを報告している。そして、従来想定されて来た「負の T3 応答配列 (negative TRE、nTRE)」は必要なく、T3 結合した TR が TSH β 遺伝子発現に必須の転写因子である GATA2 の機能を阻害するというモデルを提唱している (Sasaki S et al. 2011 Negative regulation of the thyrotropin β gene by thyroid hormone. In: CONTEMPORARY ASPECTS OF ENDOCRINOLOGY, Evanthia Diamanti-Kandarakis ed. <http://www.intechopen.com/books/contemporary-aspects-of-endocrinology>, InTech (open access), Rijeka, Croatia, pp. 101-138)。ところで TSH β 遺伝子が T3 投与によって負に調節される直前には、そのプロモーターは GATA2 によって活性化状態にあるはずである。通常、活性化状態にある遺伝子のプロモーター近傍はヌクレオソーム密度が低いことが明らかになっている。前述のコアクチベーター、コリプレッサーは T3 による正の調節において同定されて来たものであるが、コアクチベーター、コリプレッサーの多くはヒストン修飾因子であって、効

果器 (エフェクター) として機能するという主張は見直す必要がある。

このように non-TR RTH の原因を究明する事は決して簡単ではない。しかし、その解析は以上の様な考察から疾患単位としての RTH の確立に資するばかりでなく、広く T3 シグナル伝達経路の解明にも貢献するものと考えられる。

ところで新核生物の mRNA は RNA ポリメラーゼ II (Pol-II) によって合成される。近年、ショウジョウバエや酵母菌に関する研究から、発生や炎症に関わる遺伝子の発現においては Pol-II はその C-terminal domain (CTD) の ser5 がリン酸化されており、転写開始点から数十塩基下流の領域でそれに見合う短い RNA を合成したまま停止していることが報告されている。これは Pol-II pausing と呼ばれる現象で negative elongation factor (NELF)、DRB Sensitivity Inducing Factor (DSIF) が関わる。この状態へ種々の刺激によって positive transcriptional elongation factor b (P-TEFb) が呼び込まれると CTD の Ser2 をリン酸化し、Pol-II による転写伸長が開始される。P-TEFb は cyclin T と Cyclin-dependent kinases (CDK) 9 の 2 量体であるが、核内の CDK 9 分子の約半数は hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1

(HEXIM1) と 7SK-RNA の複合体と結合することで不活性化されている。今回、私達は (1) TR と HEXIM 1、CDK 9 の相互作用、(2) クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、転写開始点近傍の Pol-II の占拠状態を評価した。

B. 研究方法

本研究は T3 による正ならびに負の調節における Pol-II のあり方や P-TEFb (CDK 9 と cyclin T の 2 量体)、HEXIM1、NELF、DSIF の挙動を検討するものである。私達は (a) 正と負の調節の両方の解析に用いられた腎由来 293T 細胞に TR、CDK 9、cyclin T、HEXIM1 を過剰発現し、それぞれに対する特異抗体で免疫沈降を試みた。また (b) *in vivo* の現象を解析するため、ChIP アッセイをもちいて正と負に調節される遺伝子におけるこれらの因子の関わりを検討する必要がある。その目的には同一の細胞、例えば TSH が産生されている細胞 (thyrotroph) において正と負に調節される遺伝子を解析する事が望ましい。thyrotroph 株として T α T1 細胞が樹立されているが、残念ながら TSH β 、 α 鎖遺伝子の転写に必須な GATA2 の発現は乏しい (Ohba K. et al. PLoS One. 2011 Apr 14;6(4):e18667)。そこで私達は下垂体前葉の分化の過程で thyrotroph と近縁関係にあるゴナドトロピン産生

細胞 (gonadotroph) に注目した。gonadotroph には転写因子 Pit1 は存在していないため、TSH β もまた産生していないが、どちらも α GSU と GATA2 は発現している。今回、L β T2 細胞ならびに T α T1 細胞を用いて GATA2 発現に対する T3 の効果を検討した。

(倫理面への配慮) In vitro の実験であり、倫理面では問題がない。

C. 研究結果

まず、293T 細胞に TR、CDK 9、cyclin T、HEXIM1 を過剰発現させ、特異抗体で免疫沈降を試みたところ、TR は CDK9 ならびに HEXIM1 と共に沈降されたが、cyclin T は検出し得なかった。この事は TR が Pol-II による転写伸長を制御している事を示唆した。これらの結合は T3 に非依存性であった。実際、甲状腺ホルモン不応症で同定した変異 TR β 1 (K443E、E449X) とともに相互作用が観察された。HEXIM1 と 7SK-RNA は複合体を形成して CDK9 と相互作用するが、RNAase で 7SK-RNA を消化しても TR と CDK9 の結合、ならびに TR と HEXIM1 の結合は維持され、CDK9 ならびに HEXIM1 は独立に TR と相互作用していると考えられた。TR の欠失変異体を用いたところ、TR のリガンド結合領域を欠失すると HEXIM1 との相互作用が消失した。一方、L β T2 に T3 を添加し、

RT-PCR で検討すると 1 型脱ヨード酵素 (D1) の mRNA は時間と共に増加し、正の調節を受けていると考えられた。一方、 α GSU の mRNA は予想通り時間と共に減衰した。興味深い事に ChIP アッセイで検討すると D1 の転写開始点の Pol-II は T3 投与後 0、1、4 時間で増加したのに対し、 α GSU の転写開始点の Pol-II は同じ時間間隔で減衰する事がなく、負の調節は正の調節の単なる鏡像ではないことを指示する所見であった。さらに T3 による負の調節において Pol-II pausing のメカニズムが関与している可能性が示唆された。

D. 考察

私達の知る限り、今まで正と負の調節における TR と HEXIM1、CDK 9 の相互作用についても報告はない。すでに HEXIM1 と GR、ER の直接相互作用が示されているが PPAR γ との相互作用はないとされ、何らかの受容体選択性が推定される。今回甲状腺ホルモン不応症で私達が同定した幾つかの変異 TR β 1 と HEXIM1、CDK 9 が相互作用したことは、このような変異 TR β 1 が正常 TR とこれらの因子の結合を阻害して、ドミナントネガティブ作用を発揮している可能性が示唆する。一方、CDK9 と GATA ファミリーとの相互作用が報告されている。現在、私達は

GST-pulldown 法によって、TR との結合が直接的なものかどうかを確認し、さらには結合部位の詳細な Mapping を予定している。また RNAi によるや HEXIM1、CDK 9 のノックダウン、CDK9 阻害剤による検討や ChIP アッセイを用いた詳細な解析を計画中である。L β T2 細胞を用いた ChIP アッセイの検討から、少なくとも α GSU(負の調節)と D1(正の調節)において Pol-II の挙動が異なっていた。このことから α GSU における負の調節に Pol-II pausing のメカニズムが関わっている可能性が示唆された。今後、ノーザンブロットや核の Run-On アッセイなどで、短い RNA の存在を確認する必要がある。さらに non-TR RTH との関連について、検討して行く必要がある。

E. 結論

(1)TR は転写伸長に関わる因子の内、HEXIM1、CDK 9 と複合体を形成している可能性がある。このような相互作用は RTH で同定された変異 TR β 1 にも認められ、正常 TR の機能に対し変異 TR β 1 がドミナントネガティブ作用を及ぼす可能性が示唆された。

(2)L β T2 細胞で調べた D1 遺伝子にお

ける正の調節と α GSU 遺伝子における負の調節においてプロモーター上での Pol-II の占拠状態が異なっており、正の調節と負の調節は単なる鏡像でない事、負の調節に Pol-II pausing の機序が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

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 24 年度分担研究報告書

非自己免疫性甲状腺機能亢進症と TSH 受容体遺伝子変異

昭和大学藤が丘病院内科 内分泌代謝科 谷山 松雄

研究要旨

A. 研究目的

びまん性甲状腺腫を有する甲状腺中毒症にはバセドウ病と無痛性甲状腺炎があり、治療・処置がまったく異なるので2つの鑑別は重要である。鑑別は TSH 受容体抗体と放射性ヨードまたはテクネシウムの摂取率で行っている。放射性同位元素のびまん性の取り込みの亢進がありながら TSH 受容体抗体が陰性の場合、通常バセドウ病として治療されていることが多い。近年このような中に TSH 受容体遺伝子変異による非自己免疫性の甲状腺機能亢進症の存在が明らかになりわが国でも報告されるようになった。この疾患は従来のバセドウ病の治療に抵抗性であり、バセドウ病と鑑別することは患者にとって重要である。本研究ではこの疾患がどのくらい存在するか頻度を推定し、どのような対象をスクリーニングしたらよいかを検討する。一方新たに検出された変異については機能解析を行い病態の解明と TSH 受容体の機能について検討する。

B. 研究方法

TSH 受容体抗体が陰性の持続する甲状腺

機能亢進症を対象とする。無痛性甲状腺炎の否定は必ずしも放射性ヨードまたはテクネシウムの摂取率検査を行わなくても経過から診断可能である。これらの患者に遺伝子検査について十分に説明し、文書で同意を得て TSH 受容体遺伝子の全エクソンのシークエンスを行い変異の有無を検討する。新規の変異が検出された場合発現実験を行い機能解析を実施する。

C. 研究結果

本年度は pilot study として妊娠時に発見された TSH 受容体抗体陰性の甲状腺機能亢進症を 4 例を対象とした。いずれも妊娠初期甲状腺中毒症を発症し妊娠一過性甲状腺中毒症 (GTT または GTH) と診断され、中毒症が強く機能亢進症の治療を行った。HCG が低下する妊娠中期以降になっても中毒症が抑まらず治療の継続を要したが、出産後は治療なしで機能正常～潜在性機能亢進症に復した。これらの患者の TSH 受容体遺伝子の全エクソンのシークエンスを行ったところ 4 例中 3 例に exon 10 にそれぞれ新規の変異

を検出した。現在 1 例で発現実験で機能解析中で 2 例では準備中である。

D. 考察

遷延する GTH の中に TSH 受容体遺伝子の変異が隠れている可能性が示唆された。TSH 受容体遺伝子の変異により HCG に過敏な受容体が作られ妊娠一過性甲状腺中毒症を呈した母娘例が報告されている。この例では変異は細胞外ドメインにあり HCG との結合の安定性が増すことにより機能亢進を呈することが示されている。今回の 3 例はいずれもこの変異ではなく、2 例は膜貫通ドメインであり GTH が遷延する機序は既存例と同じではない可能性もある。

今後 GTH 遷延例だけでなく、非 GTH の症例も検討してゆく。

E. 結論

TSH 受容体抗体が陰性の甲状腺機能亢進症では TSH 受容体遺伝子の変異を疑うことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 24 年度分担研究報告書

ビタミンD 不足・欠乏症ガイドラインにむけて

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 ビタミンD非充足が骨折のリスクとなることは国内外で確立している。これまでの検討において、血清 25(OH)D[25D]値 28ng/ml を日本人におけるビタミンD 不足を規定する閾値として提唱し、その妥当性を別コホート（CHIBA study）で検証した。また、25D 値 16 ng/ml 未満ではビスフォスフォネートに対する反応性が低下することを示した。現在、国際的には25D 値 20 ng/ml をビタミンD 欠乏、30 ng/ml をビタミンD 不足の閾値とするガイドラインが存在するが、日本人においては、これらの閾値の妥当性が十分に検討されていない。また、ビタミン非充足と心血管系イベントの増加との関連が疫学的には報告されているが、その機序については不明である。今回の研究では、CHIBA study コホートにおいて血中 1, 25(OH)2D[1, 25D]値が血中 HDL-C 濃度と、25D や PTH 濃度とは独立に関連することが見いだされ、ビタミンD の心血管保護作用が多面的に発現している可能性が示唆された。一方、リセドロネート国内第Ⅲ相試験を用いた多変量解析において、25D が 20 ng/ml 未満では骨密度増加反応が損なわれることが明らかになり、日本人においてもビタミンD 欠乏がビスホスホネート治療の障害となっていることが明らかになった。

A. 研究目的

体内のビタミンD貯蔵量は、血清 25D 濃度より評価できる。著しい低 25D 血症を呈するビタミンD欠乏症は、骨石灰化障害（くる病・骨軟化症）の原因となる。一方、骨石灰化障害をきたさなくとも、低 25D 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欠乏・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・欠乏を規定する血清 25D 濃度については未だ論議が続いている。

一般に、血清 25D 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 25D 値 20~44 ng/ml で PTH 値は底値に安定すると報告さ

れている。本研究においては、これまでにビタミンD₃負荷前後の血清 25D 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) 近年、諸外国では 25D 値 20 ng/ml をビタミンD 欠乏、30 ng/ml をビタミンD 不足の閾値とするガイドラインが受け入れられつつあるが、日本人におけるこの閾値の妥当性は不明である。
- 2) 25D と PTH との関係は副甲状腺局所における 1 α 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 25D と 1, 25D 作用の関係は不明である。
- 3) 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の一部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 代謝物および PTH と心血管関連指標 (冠動脈病変数、LVEF [左室駆出率]、血中 pro-BNP 濃度、PWV [脈波速度]) および脂質代謝 (血中 LDL-C および HDL-C) との関連を解析した。

2) リセドロネート (RIS) 国内第 III 相臨床試験における骨密度増加反応性を、ビタミン D 充足度を含む種々の説明因子との関連を、ロジスティック解析で検討した。

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) 既報の CHIBA study の cohort において、血中 25D、1, 25D および PTH は、冠動脈病変数および LDL-C とは関連しなかった。PTH は、血中 proBNP 濃度と正の相関 ($r = 0.211$, $p < 0.01$) を示したが、他の指標とは関連しなかった。25D は、LVEF と正の相関 ($r = 0.204$, $p < 0.01$) を示し、PWV と負の相関 ($r = -0.177$, $r = 0.05$) を示した。血中 1, 25D 濃度は HDL-C 正の相関 ($r = 0.29$, $p < 0.01$) を示し、この相関は他の因子で補正後も有意であった。

2) RIS 第 3 相試験で RIS を服用し、BMD が評価されている 465 症例を対象とした。対象をベースライン (投与開始前) から 48 週までの BMD 増加率が 0%未満の集団 (BMD Low 集団: N=47) と 0%以上の集団 (BMD High 集団: N=418) に分類し、骨代謝マーカーの経時変化を検討した。ベースライン及び 4 週の BAP 値は、BMD Low 集団で BMD High 集団よりも有意に低かったが (ベースライン 26.1 ± 9.1 U/L vs 31.1 ± 10.2 U/L, $P=0.0022$)、投与 12, 24, 36, 48 週では両集団間で有意な差はなかった (投与 48 週 18.2 ± 5.6 U/L vs 19.3 ± 6.0 U/L, $P=0.2773$)。BAP のベースラインに対する低下率は、投与 12, 24, 36, 48 週で、BMD Low 集団の方が BMD High 集団よりも有意に低かった (48 週時点 $-25.4 \pm 21.6\%$ vs

$-34.5 \pm 19.9\%$, $P=0.0106$)。CTX、NTX の数値、ベースラインに対する低下率も BAP と同様の傾向を示した。

BMD Low 集団を無効例、OBMD High 集団を有効例として、既存骨折の有無、糖尿病・高血圧・高血脂症の合併の有無、性別、年齢、アドヒアランス (服薬状況)、及びベースラインの BMI、25D、BAP、CTX、NTX、を説明変数としたロジスティック解析を実施した。その結果、既存骨折の有無、25D、BAP が有意に影響していた。そこで、既存骨折の有無、中央値でカテゴリ化したベースラインの血清 25D (20ng/mL 未満/以上)、BAP (28.6U/L 未満/以上) を説明変数として、ロジスティックモデル解析を行ったところ、既存骨折あり (推定オッズ比 2.441, $P=0.0387$)、BAP 高値 (推定オッズ比 2.458, $P=0.0070$ 推定)、25D 高値 (推定オッズ比 2.310, $P=0.0092$) となり、それぞれの要因がリセドロネート投与の有効率を 2 倍以上引き上げることが推定された。

D. 考察

1) ビタミン D 非充足状態が、心機能低下および動脈硬化の進展と関連していることが示唆された。また、1, 25D が、25D や PTH と独立に HDL-C と相関したことから、ビタミン D の心血管系防御機構には、血中 1, 25D が脂質代謝の改善を介して、独立に関与している可能性がある。

2) ビスフォスフォネート (RIS) に対する骨密度増加欠如例が、25D 値 20 ng/ml 未満で有意に増加することから、ビスフォスフォネート反応性が、ビタミン D 欠乏状態では損なわれることが日本人においても確認された。

E. 結論

1) ビタミン D の心血管系保護作用は、ビタミン D の intracrine および endocrine 作用の総和としてもたらされていると推定された。

2) ビタミン D 非充足が、日本人においてもビスフォスフォネートに対する骨密度増加反応を損なう大きな因子であることが多変量解析によって確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa T, Okinaga H, Takahashi S, Numakura M, Mashimo Y, Yoshimura N, Maeda T, Inoue D, Okazaki R, Kinoshita M, Jameson JL, Teramoto T. Serum from methimazole -treated patients induces activation of aryl hydrocarbon receptor, a transcription factor that binds to dioxin-response elements. *Thyroid* 22(8): 769-777, 2012

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* 23(6):1737-45,2012.

2. 学会発表

- 1) 第85回日本内分泌学会学術総会(4/19-21/2012、名古屋) 血中活性型ビタミンD濃度の臨床的意義: ビタミンD充足状態と独立したHDLコレステロールとの相関 井上大輔、天木幹博、田井宣之、田中輝行、渡部玲子、平野順子、中村文隆、岡崎 亮
- 2) 第14回日本骨粗鬆症学会(9/27-29/2012、新潟) 市中総合病院における骨粗鬆症治療薬処方の実態: 多施設医事会計データを用いた解析 井上大輔、岡崎亮
- 3) ASBMR 34th Annual Meeting (Minneapolis, MN, 10/12-15/2012) Exploration of Prognostic Factors on BMD Percent Change in Patients Administrated Risedronate -A Pooled Analysis of Clinical Trials in Japan. Shinichi Muraoka, 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 24 年度分担研究報告書

血清カルシウム・リン制御機構に関する研究

分担研究者 大藪恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教授

研究協力者 窪田拓生 大阪大学大学院医学系研究科小児科学助教

研究要旨

くる病・骨軟化症の診断の一助として、ホルモン受容機構異常に関する調査研究班において、「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)が、昨年作成された。そこで、ビタミン D 欠乏性くる病もしくは遺伝性低リン血症性くる病と既に診断された症例における「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)の有用性を検討し、また、両者の鑑別における線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23)の有用性も検討した。研究対象は、ビタミン D 欠乏性くる病及び遺伝性低リン血症性くる病と診断を受け、未治療であった 23 名のビタミン D 欠乏性くる病と 8 名の遺伝性低リン血症性くる病の患者。ビタミン D 欠乏性くる病の 23 例中、12 例がくる病の診断基準を満たし、9 例がくる病の疑いであった。軽症の 2 例はくる病の疑いに至らなかった。病因鑑別のフローチャートにおいては、ビタミン D 欠乏性くる病の全症例の血清 25 水酸化ビタミン D (25OHD) 値が 20 ng/ml 未満であり、低リン血症を認めない症例も、ビタミン D 欠乏の診断に至った。遺伝性低リン血症性くる病の 8 例中、7 例くる病の診断に至った。病因鑑別のフローチャートにおいては、全例、FGF23 関連低リン血症の診断に至った。血清 FGF23 値はビタミン D 欠乏性くる病において 18 pg/ml 以下、遺伝性低リン血症性くる病において 46 pg/ml 以上と、両者の間に明瞭な違いが見られ、血清 FGF23 値は両者の鑑別に有用であると考えられた。以上より、病因鑑別のフローチャートは非常に有用であるが、乳幼児のビタミン D 欠乏性くる病を完全に診断するためには、「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)の「診断指針」を改善する余地があると考えられた。

A. 研究目的

1. くる病・骨軟化症は骨石灰化障害を特徴とする疾患で、一般的には血清カルシウム値やリン値の低下、血清アルカリホスファターゼ (ALP) 値の増加を認め、病因にはビタミン D 欠乏や遺伝性低リン血症、腎尿細管異常などがある。ビタミン D 欠乏が日本を含め世界中で報告されており、ビタミン D 欠乏が遺伝性低リン血症性くる病に合併することもあるため、両者の診断が容易ではないことがあり、診断マニュアルや診断のための新たな指標が求められる。昨年、診断の一助として、ホル

モン受容機構異常に関する調査研究班において、
「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)が作成された。また、線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23)は新たに発見された骨組織由来のホルモンで、腎
においてリンの再吸収を抑制し、また、1, 25 水酸化ビタミン D (1, 25(OH)2D) の産生を低下させることが明らかになった。そこで、ビタミン D 欠乏性くる病もしくは遺伝性低リン血症性くる病と既に診断された症例における「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)の有用性を検討し、また、両者の鑑別における血清 FGF23 値の有用性も検討した。

B. 研究方法

「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)において、くる病の診断基準は、大項目として、骨レントゲン像でのくる病変化と高 ALP 血症を、小項目として、低リン血症または低カルシウム血症

と骨格異常などの臨床症状を設けている。くる病は大項目 2 つと小項目の 2 つを満たすもの、くる病の疑いは大項目 2 つと小項目の 1 つを満たすものとしている。また、骨軟化症の診断基準は、大項目として、低リン血症または低カルシウム血症と高骨型 ALP 血症を、小項目として、筋力低下または骨痛の臨床症状、低骨密度、骨シンチやレントゲンの画像異常を設けている。骨軟化症は大項目 2 つと小項目の 3 つを満たすもの、骨軟化症の疑いは大項目 2 つと小項目の 2 つを満たすものとしている。さらに、本診断マニュアル(案)には、くる病・骨軟化症の診断に関する解説、除外すべき疾患や鑑別を要する疾患、混同されやすい疾患、「くる病・骨軟化症の病因」の表、「くる病・骨軟化症の病因鑑別フローチャート」、「FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症の病因」の表、「くる病・骨軟化症の主な病因の生化学所見」の表も含まれている。「くる病・骨軟化症の病因鑑別フローチャート」は血清リン値を出発点として、低リン血症から、血清 FGF23 値、リンの摂取・吸収不足、腎尿細管異常、ビタミン D 欠乏の順になっている。血清リン値が基準値内であってもビタミン D 欠乏が含まれている。研究対象は、大阪大学医学部附属病院小児科及び箕面市立病院小児科においてビタミン D 欠乏性くる病及び遺伝性低リン血症性くる病と診断を受け、未治療であった 31 名で、両者の診断は臨床症状、検査所見、骨 Xp 所見、臨床経過によって行われ、くる病を呈する他の疾患は否定された症例である。ビタミン D 欠乏性くる病は 23 名(男 10 名、女 13 名)で、年齢の中央値が 18 カ月(95% CI: 15~21)であった。遺伝性低リン血症性くる病は 8 名(男 2 名、女 6 名)で、年齢の中央値は 21 カ月(95% CI: 15~28)であった。なお、倫理面への配慮として、

血清 FGF 値の測定に関して大阪大学医学部附属病院 臨床研究倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

ビタミン D 欠乏性くる病の 23 例中、12 例がくる病の診断基準を満たし、9 例がくる病の疑いであった。2 例はくる病の疑いにも至らなかった。また、10 例は小項目の「低リン血症または低カルシウム血症」の項目を満たさなかった。大項目の「高 ALP 血症」を満たさなかった 1 例は、くる病の治癒過程にあると考えられた。「臨床症状」を認めなかった 2 例は、検査所見によって偶然見つかった症例と痙攣が主訴で臨床上的骨格異常を認めなかった症例であった。「くる病・骨軟化症の病因鑑別のフローチャート」においては、ビタミン D 欠乏性くる病の全症例の血清 25 水酸化ビタミン D (25OHD) 値が 20 ng/ml 未満であり、低リン血症を認めない症例も、ビタミン D 欠乏の診断に至った。また、低リン血症を認めた症例は全例の血清 FGF23 値が 30 pg/ml 未満であり、ビタミン D 欠乏の診断に至った。

遺伝性低リン血症性くる病に関しては、8 例中、7 例はくる病の診断に至った。1 例は家族内検索で見つかり、臨床症状を認めなかった症例であった。「くる病・骨軟化症の病因鑑別のフローチャート」においては、全例の血清リン値が低下しており、さらに、血清 FGF23 値が 30 pg/ml 以上であり、FGF23 関連低リン血症の診断に至った。

ビタミン D 欠乏性くる病は遺伝性低リン血症性くる病に比べて頻度が高いため、遺伝性低リン血症性くる病にビタミン D 欠乏を合併し、血中副甲状腺ホルモン (PTH) 値や 1, 25(OH) 2D 値の増加や血清 25 水酸化ビタミン D (25OHD) 値の低下が見られた場合、診断に苦慮する。ビタミン D 欠乏性くる病と診断した症例の血清 25OHD 値は 17.1 ng/ml 以下であったが(中央値: 7.8 ng/ml (95% CI: 6.9~10.5)、n = 22)、

遺伝性低リン血症性くる病と診断した症例の少なくとも2例の血清25OHD値は15 ng/ml以下であり(8.2、14.1、25.2、n = 3)、これら2例は遺伝性低リン血症性くる病にビタミンD欠乏を合併していたと考えられた。血清FGF23値はビタミンD欠乏性くる病において18 pg/ml以下(中央値:9.0 pg/ml (95% CI: 5.8~10.6)、n = 18)、遺伝性低リン血症性くる病において46 pg/ml以上(中央値:70.5 pg/ml (95% CI: 52.4~89.1)、n = 4)と、両者の間に明瞭な違いが見られた。

D. 考察

ビタミンD欠乏性くる病に関して、乳幼児のビタミンD欠乏性くる病の23例中、12例がくる病の診断基準を満たし、9例がくる病の疑いであった。2例はくる病の疑いにも至らなかった。病因鑑別のフローチャートにおいては、全症例がビタミンD欠乏の診断に至った。「低P血症または低Ca血症」の項目を満たさなかった10例は、血清25OHD値の低下に加えて、くる病を来す他の疾患を除外することによって、ビタミンD欠乏性くる病の診断に至ると考えられた。ビタミンD欠乏性くる病と診断した症例の血清25OHD値は17.1 ng/ml以下であり、ビタミンD欠乏(血清25OHD値が20 ng/ml未満)を「くる病の診断指針」に含めることで、くる病の確定診断に至る症例が増えると考えられた。ただし、ビタミンD欠乏性くる病と診断するためには、遺伝性低リン血症性くる病などの他の疾患を除外する必要がある。また、検査所見によって偶然見つかった症例、くる病の治療過程の症例、痙攣が主訴の症例の診断が容易ではない可能性が示唆された。

遺伝性低リン血症性くる病に関して、8例中、家族内検索で見つかった1例を除いて、くる病の診断基準を満たした。病因鑑別のフローチャートにおいて

も、全症例がFGF23関連低リン血症性くる病の診断に至った。

E. 結論

病因鑑別のフローチャートは非常に有用であるが、乳幼児のビタミンD欠乏性くる病を完全に診断するためには、「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)の「診断指針」を改善する余地があると考えられた。遺伝性低リン血症性くる病の診断には本診断マニュアルは有用であった。また、血清FGF23値はビタミンD欠乏性くる病と遺伝性低リン血症性くる病の鑑別に有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narazaki R, Ihara K, Namba N, Matsuzaki H, Ozono K, Hara T: Linear nevus sebaceous syndrome with hypophosphatemic rickets with elevated FGF-23. *Pediatr Nephrol*, 27 (5): 861-863, 2012.
- 2) Abe S, Namba N, Abe M, Fujiwara M, Aikawa T, Kogo M, Ozono K: Monocarboxylate Transporter 10 Functions as a Thyroid Hormone Transporter in Chondrocytes. *Endocrinology*, 153 (8): 4049-4058, 2012.

2. 学会発表

- 1) 武鐘真司, 北岡太一, 山本威久, 下辻常介, 窪田拓生, 大藪恵一: ビタミンD欠乏あるいは不足について精査した小児における骨病変関連因子の検討、第85回日本内分泌学会学術総会、名古屋、12. 04. 19-21
- 2) 北岡太一, 大藪恵一, 長谷川行洋, 皆川真規, 安達昌功, 難波範行, 數川逸郎, 朝倉由美, 内藤優己, 志村麻美: 家族性低リン血症性くる病