

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 25 年度分担研究報告書

甲状腺クリーゼの診療ガイドライン作成

分担研究者 赤水 尚史 和歌山県立医科大学内科学第一講座 教授

研究要旨：甲状腺クリーゼは予後不良な疾患であり的確な早期診断と緊急治療を要する。従来の教科書的な治療法は理論的根拠に乏しく重症度や病態の視点を欠き、また実際の治療内容と乖離が生じていることから、本症の予後改善のためには新しい診療ガイドラインの作成が必要と考えられた。全国疫学調査の解析結果および文献を基に議論を行い、より具体的で実地診療においてすぐに活用できる診断と治療を包括しアルゴリズム化した診療ガイドラインを作成した。本ガイドラインによって早期かつ的確な診断・治療が可能となり、本邦における甲状腺クリーゼの予後が改善されることが望まれる。今後は本ガイドラインを基に多施設共同で前向きに予後調査を行い、さらにエビデンスを集積する予定である。

A．研究目的

甲状腺クリーゼは放置すれば生命の危機に瀕するような切迫した状況下であり、的確な早期診断と緊急治療が必要とされる。本研究班が行った全国疫学調査の解析から国際的に最高の医療水準を有する日本においても本症の死亡率は 10% を越えており、また、治療の実態が教科書的な治療法と必ずしも一致していない場合があることが認められた。このような状況を鑑みて本症の予後改善のためには、臨床現場で実際に活用できるようなわかりやすい診療ガイドラインの確立が必須と考えられた。

診断に関しては、すでに『甲状腺クリーゼの診断基準（第 2 版）』を作成し学会ホームページ等で公表した。次のステップとして昨年度から治療指針の作成に着手し、本年度はこれをさらに brush up し診断と治療を包括した診療ガイドラインを作成することを目的とした。

B．研究方法

日本内分泌学会（企画部会における臨床重要課

題）および日本甲状腺学会（臨床重要課題）との共同で行う。全国疫学調査の解析結果および海外を含む最新の知見をもとにして、研究協力者と議論を重ねることにより以下のような基本方針に沿って甲状腺クリーゼ診療ガイドラインを作成することとした。

診断と治療を包括

疾患の緊急性と多様性を考慮してアルゴリズム化

重症度や病態の視点を導入

実地診療に役立つような詳細で具体的な内容
全国疫学調査や文献例などのエビデンスを包含

諸外国の診療内容を参考に国際化

最新の医療技術や医薬品の導入も考慮

また、本ガイドラインでは、米国内科医師会が作成したガイドライン・グレーディング・システムを用いて、推奨の強さとエビデンスの質を評価した。

（倫理面への配慮）

疫学研究に関する倫理指針に従って研究を行い、全国疫学調査に関しては疫学班担当者の施設で申

請・承認されている。

C．研究結果

5つの章からなる診療ガイドラインを作成した。第1章には本研究の端緒となった「診断基準と全国疫学調査」について記載した。次いで、第2章で全国疫学調査の第二次調査で集積された甲状腺クリーゼ治療内容の解析を記載した。第3章は本ガイドラインの核であり、甲状腺中毒症、全身症状、各臓器症状、合併症に対する具体的な治療法を詳細に記載した。Intensive care unit (ICU) 入室基準や予後評価も記載し、最後には診療全体アルゴリズムとしてまとめた。第4章には諸外国の甲状腺クリーゼ診療内容を記載し、本ガイドラインとの比較が可能である。最後の第5章では、本診療ガイドラインの是非を検証すべく治療前向き調査に関する案を提示した。本ガイドラインは今後、学会ホームページ、学術誌等で公表する予定である。

第1章 甲状腺クリーゼの診断基準と全国疫学調査

第2章 全国疫学調査における甲状腺クリーゼ治療内容の解析

第3章 甲状腺クリーゼ治療ガイドライン

1．甲状腺クリーゼにおける甲状腺中毒症に対する治療

- 2．甲状腺中毒症に対する血漿交換療法の適応
- 3．中枢神経症状に対する治療
- 4．頻脈と心房細動に対する治療
- 5．心不全に対する治療
- 6．消化器症状と肝機能異常に対する治療
- 7．ICU入室基準と合併症に対する治療
- 8．甲状腺クリーゼの予後評価
- 9．甲状腺クリーゼ診療全体アルゴリズム

第4章 諸外国における甲状腺クリーゼの診断と治療

第5章 甲状腺クリーゼに関する臨床試験調査に向けて

D．考察

本ガイドラインでは、迅速に診療にあたるように診断と治療を包括してアルゴリズム化を行い、従来の治療法の記載では欠けていた重症度や病態の視点を取り入れ、より具体的な治療内容についても記載した。

本ガイドラインの問題点としてはエビデンスの質が十分ではないことが挙げられる。今後は全国疫学調査の症例をhistorical controlとして前向きに予後調査を行う予定であり、本ガイドラインを基にしてさらにエビデンスを集積し改訂してゆく必要があると考えられる。

E．結論

甲状腺クリーゼの診療ガイドラインを作成した。本ガイドラインが甲状腺クリーゼ診療に利用され、迅速かつ的確な診断・治療により本症の予後改善に寄与することが期待される。

F．健康危険情報 なし

G．研究発表

1．論文発表

Nabe T, Matsuya K, Akamizu T, Fujita M, Nakagawa T, Shioe M, Kida H, Takiguchi A, Wakamori H, Fujii M, Ishihara K, Akiba S, Mizutani N, Yoshino S, Chaplin DD: Roles of basophils and mast cells infiltrating the lung by multiple antigen challenges in asthmatic responses of mice. Br J Pharmacol 169(2):462-76, 2013

Inaba H, Moise L, Martin W, De Groot AS, Desrosiers J, Tassone R, Buchman G, Akamizu T, De Groot LJ: Epitope recognition in HLA-DR3 transgenic mice immunized to TSH-R protein or peptides. Endocrinology 154(6):2234-43, 2013

Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Koyama H, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T: Overexpression of intracisternal ghrelin enhances β -cell proliferation after streptozotocin-induced β -cell injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(1):E140-8, 2013

Karra E, O'Daly OG, Choudhury AI, Yousseif A, Millership S, Neary MT, Scott WR, Chandarana K, Manning S, Hess ME, Iwakura H, Akamizu T, Millet Q, Gelegen C, Drew ME, Rahman S, Emmanuel JJ, Williams SC, Rütther UU, Brüning JC, Withers DJ, Zelaya FO, Batterham RL: A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsiveness. *J Clin Invest* 123(8):3539-51, 2013

Inaba H, Hayakawa T, Miyamoto W, Takeshima K, Yamaoka H, Furukawa Y, Kawashima H, Ariyasu H, Wakasaki H, Furuta H, Nishi M, Nakao T, Sasaki H, Okada Y, Matsunaga K, Nakamura Y, Akamizu T: IgG4-related Ocular Adnexal Disease Mimicking Thyroid-associated Orbitopathy. *Intern Med* 52(22):2545-51, 2013

赤水尚史: 甲状腺機能亢進症(バセドウ病). 疾患・症例別今日の治療と看護 改訂第3版、総編集: 永井良三、大田 健、南江堂、東京 564-566, 2013

赤水尚史: B. 内分泌器官の構造と機能 3. 甲状腺とホルモン. 人体の構造と機能及び疾病の成り立ち各論 編集: 香川靖雄、近藤和雄、石田 均、門脇 孝 152-153, 2013

赤水尚史: C. 内分泌系の疾患 C-3. 甲状腺機能亢進症と機能低下症. 人体の構造と機能及び疾病の成り立ち各論 編集: 香川靖雄、近藤和雄、石田 均、門脇 孝 167-170, 2013

赤水尚史: 臨床編 -11 バセドウ病. 病態と治療戦略がみえる 免疫・アレルギー疾患 イラストレイテッド、田中良哉 編集、羊土社、東京 261-266, 2013

赤水尚史: 臨床症状 頭頸部・感覚器「甲状腺腫」. 改訂第8版 内科学書 Vol.1 内科学総論 臨床症状、総編集: 小川 聡、部門編集: 伴信太郎、山本和利、中山書店、東京 339-341, 2013

赤水尚史: バセドウ病の診断と治療. 日本医師会雑誌 vol.141 No.11:2431-2434, 2013

赤水尚史: グレリン創薬の臨床研究 - 変形性股関節症術期患者への投与例. 日本内科学会雑誌 vol.102 No.1: 174-178, 2013

赤水尚史: 甲状腺診療のポイントと最近の話題. 日本内科学会雑誌 vol.102 No.3:618-623, 2013

赤水尚史、有安宏之、寒川賢治: 特集「栄養代謝制御における消化管生理活性ペプチドの役割」グレリンの臨床応用の可能性. 臨床消化器内科 vol.28 No.6:675-680, 2013

赤水尚史: バセドウ病治療法選択の国際比較とその変遷. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 vol.30 No.2: 137-141, 2013

赤水尚史: 特集 内分泌疾患に強くなる 内分泌エマージェンシーの診断・治療「甲状腺クリーゼ

」. *medicina* vol.50, No.10: 1836-1838, 2013

赤水尚史: 各論編 第3章専門知識 5 甲状腺クリーゼ. 甲状腺疾患診療マニュアル 改訂第2版 編集: 田上哲也、西川光重、伊藤公一、成瀬光栄、診断と治療社、東京 107-108, 2014

赤水尚史: 甲状腺機能異常治療薬. *Pocket Drugs* 2014、監修: 福井次矢、編集: 小松康宏、渡邊裕司、医学書院、東京 487-491, 2014

有安宏之、赤水尚史: グレリンの臨床応用. 内分泌・糖尿病・代謝内科 vol.38 No.1:81-85, 2014

2. 学会発表
Akamizu T: Frequencies of thyroid in Japanese adults and children. The 2nd Asian Masterclass of the Thyroid Cancer May 31-June 1, 2013 Seoul, Korea

Koyama H, Iwakura H, Bando M, Hosoda H, Hosoda K, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K: Tryptophan stimulates ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 cells in vitro. ENDO 2013: The 95th Annual Meeting & Expo June 15-18, 2013 San Francisco, USA

Takeshima K, Inaba H, Furukawa Y, Yamaoka H, Nishi M, Akamizu T: Measurement of serum IgG4 concentrations in patients with Grave's disease; clinical characteristics of those with elevated IgG4 levels. 83rd Annual Meeting of the American Thyroid Association October 16-20, 2013 San Juan, Puerto Rico, USA

浦木進丞、竹島 健、太田敬之、古川安志、石橋達也、稲葉秀文、高木伴幸、若崎久生、古田浩人、西 理宏、中尾大成、佐々木秀行、赤水尚史: Hypocalcemic myopathy を伴った特発性副甲状腺機能低下症の1例 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013年4月25~27日 仙台市

太田敬之、玉川えり、松本侑子、竹島 健、稲葉秀文、石橋達也、山岡博之、古川安志、高木伴幸、古田浩人、佐々木秀行、赤水尚史、江川公浩、忍頂寺毅史、貝藤裕史、飯島一誠、中西浩一、吉川徳茂: 副腎クリーゼを契機に確認された塩類喪失性尿細管異常症(SLT)の一例. 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013年4月25~27日 仙台市

岩橋尚幸、石橋達也、稲葉秀文、竹島 健、古川安志、三長敬昌、松本侑子、浦木進丞、早川佳奈、太田敬之、高木伴幸、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、中尾大成、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史: 重症型成人成長ホルモン分泌不全症の経過中に肝障害と糖尿病の悪化を来し治療に難渋した一例. 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013年4月25~27日 仙台市

竹島 健、船橋友美、三長敬昌、浦木進丞、古川安志、石橋達也、太田敬之、稲葉秀文、高木伴幸、若崎久生、古田浩人、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史: チアマゾール治療中にぶどう膜炎を来した HTLV-1 陽性バセドウ病の1例. 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013年4月25~27日 仙台市

稲葉秀文、竹島 健、土井麻子、山岡博之、古川安志、三長敬昌、松本侑子、浦木進丞、早川佳奈、宮本和佳、太田敬之、石橋達也、高木伴幸、

川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、中尾大成、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：自己免疫性甲状腺疾患における血中 IgG4・サイトカインの解析 . 第 86 回日本内分泌学会学術総会 . 2013 年 4 月 25 ~ 27 日 仙台市

松谷紀彦、石橋達也、小池 諒、浦木進丞、栗栖清悟、竹島 健、宮田佳穂里、山岡博之、古川安志、太田敬之、稲葉秀文、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、西 理宏、中尾大成、古田浩人、赤水尚史：高ガストリン血症を認めた 2 症例 . 第 14 回日本内分泌学会近畿支部学術集会 . 2013 年 10 月 19 日 京都市

Hidefumi Inaba, Leslie J De Groot, Takashi Akamizu: 国際分子甲状腺学シンポジウム「Epitope analyses of the human thyrotropin receptor and therapeutic approaches in autoimmune thyroid disease」. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

竹島 健、稲葉秀文、山岡博之、宮本和佳、古川安志、有安宏之、西 理宏、廣川満良、赤水尚史：自己免疫性甲状腺疾患・Riedel 甲状腺炎 vs. IgG4 関連疾患 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

稲葉秀文、竹島 健、古川安志、山岡博之、宮本和佳、船橋友美、土井麻子、玉川えり、栗栖清悟、宮田佳穂里、太田敬之、石橋達也、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：高 IgG4 血症を呈するバセドウ病の臨床的特徴 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

竹島 健、稲葉秀文、土井麻子、山岡博之、古川安志、宮本和佳、船橋友美、浦木進丞、玉川えり、稲垣優子、石橋達也、太田敬之、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、中尾大成、西 理宏、赤水尚史：自己免疫性甲状腺疾患における血中 IgG4 値とサイトカイン・ケモカインの関連に関する検討 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

山岡博之、竹島 健、宮本和佳、古川安志、稲葉秀文、船橋友美、玉川えり、浦木進丞、小池 諒、石橋達也、太田敬之、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、中尾大成、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：自己免疫性甲状腺疾患・IgG4 関連疾患における甲状腺エラストグラフィーの臨床的意義 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

宮田佳穂里、古川安志、小池 諒、浦木進丞、竹島 健、栗栖清悟、早川隆洋、山岡博之、太田敬之、松谷紀彦、石橋達也、稲葉秀文、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西 理宏、中尾大成、赤水尚史：チアマゾール使用後に著名な血清 CK 値上昇を認めたバセドウ病の一例 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

古川安志、船橋友美、山岡博之、竹島 健、稲葉秀文、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西 理宏、佐々木秀行、赤水尚史：甲状腺血管腫の一例 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

船橋友美、稲葉秀文、早川隆洋、宮本和佳、竹

島 健、玉川えり、山岡博之、古川安志、稲垣優子、浦木進丞、宮田佳穂里、太田敬之、石橋達也、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西理宏、赤水尚史：甲状腺眼症との鑑別を要した IgG4 関連眼疾患の病因論的考察 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

有安宏之、石橋達也、松本侑子、竹島 健、稲葉秀文、山岡博之、玉川えり、吉岡和佳、古川安志、船橋友美、浦木進丞、宮田佳穂里、太田敬之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西 理宏、赤水尚史：分子標的治療薬使用中に甲状腺機能異常と低血糖症を認めた腎細胞癌の一例 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

石橋達也、松本侑子、船橋友美、浦木進丞、吉岡和佳、山岡博之、竹島 健、宮田佳穂里、古川安志、太田敬之、稲葉秀文、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、中尾大成、古田浩人、西 理宏、赤水尚史：褐色細胞腫術後に診断に至った副腎不全を伴うバセドウ病の 1 例 . 第 56 回日本甲状腺学会学術集会 . 2013 年 11 月 14 ~ 16 日 和歌山市

赤水尚史：グレリンの心血管系における臨床応用 . 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 . 2013 年 11 月 22 ~ 23 日 豊中市

赤水尚史：Update 1 甲状腺：甲状腺疾患の診断と治療の進歩「Keynote Lecture 甲状腺疾患の診断と治療の進歩 - overview -」. 第 23 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 1 月 24 25 日 名古屋市

竹島 健、稲葉秀文、浦木進丞、山岡博之、古川安志、太田敬之、石橋達也、松谷紀彦、土井麻子、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西 理宏、赤水尚史：バセドウ病における血清 IgG4 値の測定と臨床的考察 . 第 23 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 1 月 24 25 日 名古屋市

松谷紀彦、石橋達也、宮田佳穂里、船橋友美、竹島 健、古川安志、太田敬之、稲葉秀文、有安宏之、川嶋弘道、河島 明、西 理宏、中尾大成、古田浩人、赤水尚史：A 型胃炎における内分泌代謝異常 . 第 23 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 1 月 24 25 日 名古屋市

栗本千晶、栗栖清悟、稲葉秀文、竹島 健、古川安志、太田敬之、石橋達也、松谷紀彦、土井麻子、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、古田浩人、西 理宏、赤水尚史：原発性アルドステロン症に類似した Liddle 症候群の一例 . 第 23 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 1 月 24 25 日 名古屋市

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

研究協力者

佐藤 哲郎(群馬大学大学院医学系研究科病態
制御内科学)

磯崎 収(東京女子医科大学内分泌内科)

鈴木 敦詞(藤田保健衛生大学医学部内科学内
分泌代謝科)

脇野 修(慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝
内科)

坪井久美子(東邦大学医学部糖尿病・代謝・内
分泌)

大谷 肇(関西医科大学循環器内科)

手良向 聡(京都大学医学部附属病院探索医療
センター)

飯降 直男(天理よろず相談所病院内分泌内科)

金本巨哲(京都大学医学研究科内分泌代謝内科)

古川安志(和歌山県立医科大学内科学第一講座)

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 25 年度分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の診断基準作成に関する研究

分担研究者 村田善晴 名古屋大学環境医学研究所教授

研究要旨

レフェトフ症候群とも呼ばれる甲状腺ホルモン不応症(RTH)は、組織の甲状腺ホルモンに対する反応性が減弱する遺伝性の疾患の1つで、型甲状腺ホルモン受容体(TR)の機能異常を病因とする疾患と考えられている。TR機能異常をもたらす最も一般的な要因はTR遺伝子の変異であるため、TR遺伝子変異の同定が診断の鍵となる。そこで、本研究では、どのような症例に対しTR遺伝子解析を実施する正当性があるか、すなわち、TR遺伝子解析の適応とRTH診断のためのアルゴリズムを提示し、全国の医療施設にその適応と思われる症例の照会を呼びかけた。そして、患者（未成年者の場合は保護者）からの同意が得られた症例についてTR遺伝子解析を実施し、「TR遺伝子解析の適応とRTH診断のためのアルゴリズム」を検証した。平成25年度のTR遺伝子解析実施件数は14家系16症例で、5家系5症例において変異を同定し得た(1家系1例は解析中)。このうち、不適切TSH分泌症候群(SITSH)が親子で認められたがTR遺伝子変異を認めなかった家系について、フリーT4(FT4)を測定法を変えて再検したところ、SITSHでなかったことが判明した貴重な症例も経験した。これを基にアルゴリズムを検証し、新たなアルゴリズムを作成した。

A. 研究目的

本症診断の契機となるのは、血中の甲状腺ホルモンの指標となるフリーT4(FT4)、フリーT3(FT3)が高値であるにもかかわらず、血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)濃度は抑制されておらず、正常範囲内に留まるか、あるいは正常上限を越える、いわゆる不適切TSH分泌症候群(SITSH)と呼ばれる甲状腺機能状態を呈している患者に遭遇した場合である。このため、同じくSITSHを呈するTSH産生腫瘍などとの鑑別に難渋することが多い。この鑑別で最も強力な武器となるのが、TR遺伝子解析である。このため、TR遺伝子解析の適応とRTH診断のためのアルゴリズムを提示し、全国から照会のあった症例に対しTR遺伝子解析を実施することで、RTH診断におけるTR遺伝子解析の意義と限界、並びにアルゴリズムを検証し、RTH診断基準作成のための資料とすることを目的とした。

B. 研究方法

前項で述べたようにRTH診断の契機となるのは、SITSHと呼ばれる甲状腺機能検査所見を示す症例に遭遇した場合であるが、一過性にSITSH様の検査所見が得られることがある。また、FT4、FT3およびTSHの測定に自己抗体などが影響して、SITSH様の検査所見が得られることもある。このような偽性SITSHを真のSITSHと鑑別するにはどのような点に注意すべきであるか、すなわち、「確からしい

SITSH」と診断する基準を作成し、「確からしいSITSH」場合、次に何をすべきかを「RTH診断のためのアルゴリズム」として示した。その中で、「TR遺伝子解析の適応」を提示し、これを学会や「難病情報センター」のホームページ、ならびに一般医家向け医学雑誌を通して広報した。照会があった症例でTR遺伝子解析の適応と考えられ、インフォームドコンセントが書面で得られた症例に対し、TR遺伝子解析を実施した。TR遺伝子には10のエキソンが存在するが、このうちRTHの病因となる変異はこれまでのところエキソン4~10に限られる。そこで、末梢血より得られたDNAを用いてTRのエキソン4から10の塩基配列を決定し、変異の有無を解析した。

(倫理面への配慮)

TRの遺伝子解析については名古屋大学環境医学研究所倫理委員会より承認を受けている(通算番号282、遺伝子課題番号G-4)。対象となったすべての患者から書面によるインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

平成25年度では14家系16症例に対しTR遺伝子解析を実施し、5家系5症例において変異を同定し得た。このうち、不適切TSH分泌症候群(SITSH)が親子で

認められたが TR 遺伝子変異を認めなかった家系について、「真の SITSH」であったか否かを再度検証するため、FT4 を当初とは異なる測定法で再検したところ、FT4 が正常範囲内となり、SITSH でなかったことが判明した。したがって、第1度近親者に SITSH 様の検査所見を認めた場合でも、測定法を変えて再検する必要があることが示された。

D. 考察

Tajima ら (Pediatric Research 2009) は、北海道における新生児スクリーニングを実施した結果、TR 変異を伴う RTH の発症頻度は約 4 万人に 1 人であると報告している。この頻度を日本の人口に当てはめると、日本には TR 変異により発症する RTH 患者が約 3,000 人存在することになる。しかしながら、これまでに TR 遺伝子変異が同定された家系は 100 をわずかに越えただけに過ぎない。したがって、日本にはまだ診断されていない TR 変異を病因とする RTH 症例が多数存在するものと考えられる。「TR 遺伝子解析の適応」や「RTH 診断のためのアルゴリズム」を様々なメディアを通して広報してきたことにより TR 遺伝子解析の照会・依頼件数は、以前より倍増しており、同時に TR 変異の同定により RTH と診断し得た症例も倍増した。一般医家向けの学術誌や難病情報センターホームページ、ならびに学会講演を通しての広報活動が功を奏したものと考えられる。

E. 結論

「TR 遺伝子解析の適応」と RTH 診断のためのアルゴリズム」を提示し、これを様々なメディアを通じて広報した結果、TR 遺伝子解析を実施した件数は、広報以前の年度実績の倍近くに増加し、変異同定により診断し得た RTH 症例も同様にほぼ倍となった。このことから、様々なメディアを通じて TR 遺伝子解析の意義を訴えてゆくことの重要性が再認識された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Samuel Refetoff, J.H. Duncan Basset, Yoshiharu Murata (16 人中 11 番目) et al. Classification and proposed nomenclature for inherited defect of thyroid hormone action, cell transport, and metabolism. J.Clin.Endocrinol.Metab. 99 (3):768-770, 2014 (THYROID, Eur Thyroid J にも同時掲載)

2) Sai Xu, Yoshitaka Hayashi, Yoshiharu Murata(5 人中 5 番目) et al. Aristaless-related homeobox plays

a key role in hyperplasia of the pancreas islet-like cells in mice deficient in progluca-gon-derived peptides. PLoS ONE 8 (5) e64415, 2013

3) Daisuke Tamada, Toshiharu Onodera, Yoshiharu Murata (8 人中 6 番目) et al. Hyperthyroidism due to thyroid stimulating hormone secretion after surgery for Cushing's syndrome: a novel cause of the syndrome of inappropriate secretion of thyroid stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab 98 (7):2656- 2662, 2013

2. 学会発表

1) 村田善晴: 甲状腺ホルモン不応症診断の進め方. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013.

2) 鈴木一浩, 西井 裕, 櫻井晃洋, 林良敬, 村田善晴: 不適切 TSH 分泌症候群を呈し TR 遺伝子の新規変異を同定しえた甲状腺ホルモン不応症の 1 例. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013.

3) 三次有奈, 小梁川直秀, 村田善晴, 山本浩平, 野本博司, 亀田 啓, 永井聡, 近藤琢磨, 三好秀明, 秋川和聖, 清水 力, 渥美達也: 型 T3 受容体遺伝子解析により診断し得た甲状腺ホルモン不応症の 1 例. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013.

4) 福岡勇樹, 森井 宰, 安藤清香, 高嶋 悟, 三ヶ田敦史, 佐藤雄大, 菅沼由美, 細葉美穂子, 林 良敬, 村田善晴, 山田祐一郎: 家族性に不適切 TSH 分泌症候群(SITSH)に合致する検査所見を示したが、2 ステップ測定法で SITSH が共に否定された親子例. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013.

5) 溝口 暁, 吉岡修子, 杉山摩利子, 佐藤郁子, 林 良敬, 村田善晴: アミオダロン投与中の甲状腺機能検査異常所見より甲状腺ホルモン不応症と診断し得た 1 例. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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 25 年度分担研究報告書

バセドウ病眼症の病因・病態の解明と診断・治療法の開発に関する研究

分担研究者 廣松雄治 久留米大学医学部内科学講座内分泌代謝内科部門教授

研究要旨

- 1) 2011 年、日本甲状腺学会、日本内分泌学会のホームページ上に公表した「バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針(第 1 次案)」の問題点について検討を重ね、改訂を図った。
- 2) パルス療法に伴う肝障害について、私どもの施設で後ろ向きに検討した。137 例中、43 例(31%)に ALT40~100、18 例(13%)に ALT>100 の肝障害がみられた。ウイルス肝炎の既往、性、年齢、BMI、ステロイドの投与量などが肝障害のリスク要因として示唆された。
- 3) FCRL3 遺伝子多型も眼症の遺伝因子として関与が示唆された。

A. 研究目的

- 1) バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針の策定
- 2) ステロイド・パルス療法に伴う肝障害のリスク因子の解析と多施設共同前向き研究
- 3) 甲状腺眼症の遺伝因子の解明
- 4) 眼症のモデルマウスの作成

に応じた治療法の選択ができるよう配慮している。

2) メチルプレドニゾロン・パルス療法を受けた症例 137 例の 13%に ALT>100、31%に 40<ALT<100 の肝障害が認められた。

肝障害による死亡例はなかった。ウイルス肝炎、ステロイドの投与量、BMI がリスク要因として挙げられた。

3) FCRL3 遺伝子多型と外眼筋腫大との間に関連がみられた。

4) TSH 受容体 cDNA の免疫により 5% のマウスで眼球周囲に腫脹がみられ、マクロファージ様細胞の浸潤がみられた。

B. 研究方法

1) 2011 年、日本甲状腺学会、日本内分泌学会のホームページ上に公表した「バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針(第 1 次案)」の問題点について検討した。

2) 私どもの施設で過去 10 年間にパルス療法を施行した患者 137 例を対象に肝障害のリスク要因を解析した結果について検討した。また本年より開始予定の多施設共同の前向き研究デザインについて検討した。

3) 私どもの施設を受診した眼症患者を対象に眼症の遺伝素因として、今回は FCRL3 遺伝子多型について検討した。

4) TSH 受容体 cDNA の免疫による眼症のモデルマウスの作成を試みた。

(倫理面への配慮)

連結可能匿名下のもとに後ろ向き研究、前向き研究を行っており、個人情報漏れる心配はない。前向き研究、遺伝素因に関する研究も本学の倫理委員会の承認後、文書による説明・同意を得て行っている。

D. 考察

MRI の導入した「バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針(第 1 次案)」を示したことから、これを用いた症例報告や研究報告がみられるようになってきた。MRI が導入されていない欧米のガイドラインに比較して、より詳細な病態の把握が可能であり、個々の症例に応じた治療法の選択が可能となっているが、いくつかの問題点が指摘された。治療効果の判定に有用な指標をいれた 2 次案を公開予定である。

パルス療法に伴う副作用とくに肝障害の頻度とリスク要因を明らかにした。今後前向き研究により治療効果と副作用についてより詳細に検討し、日本人でのエビデンスを発信する予定である。

今回新たに眼症に関連する遺伝因子として、FCRL3 遺伝子多型を報告した。眼症のバイオマーカーの開発や新たな治療戦略の構築に有用と思われる。

現在のところ眼症の自然発症モデル動物はいない。動物モデルの確立は将来の治療法の開発に必要である。私どもの方

C. 研究結果

1) 2011 年に公表した「バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針(第 1 次案)」は、欧米の指針と異なり、MRI を診断や治療方針の決定に活用し、病態

法はまだ不十分であり改善が望まれる。

E 結論

MRI を導入した「バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針(第1次案)」を示し、内科医と眼科医が協力して眼症の診療にあたることを推奨した。後ろ向き研究によりパルス療法に伴う肝障害のリスク要因を明らかにした。肝炎の既往のある患者は特に慎重に治療する必要がある。今後、この指針が広く使用されることを期待するとともに、眼症の病因や病態の解明のための研究の進展を願ってやまない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiromatsu Y. et al.: Graves'Ophthalmopathy: Epidemiology and Natural History. Internal Medicine (in press)
- 2) Duntas LH, et al.: Centennial of the description of Hashimoto's thyroiditis: two thought-provoking events. Thyroid 23(6):643-5, 2013.
- 3) Hiromatsu Y, et al.: History and outlook of Hashimoto's thyroiditis. Hormones (Athens). 12(1):12-8, 2013.
- 4) 江口洋幸, 谷 淳一, 山田 研太郎, 廣松 雄治: 日本人甲状腺眼症における

遺伝子多型の検討. 日本体質医学会誌 (in press)

5) 廣松雄治: バセドウ病眼症の診断と治療. カレントセラピー. 31(1):44-49, 2013.

2. 学会発表

1) Eguchi et al.: Liver dysfunction associated with intravenous methylprednisolone pulse therapy for thyroid eye disease. a symposium on Graves' orbitopathy / Thyroid eye disease. Vancouver, Canada, June 28-29, 2013

2) 今村友裕, 他: C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療後に発症した Basedow 眼症の3例. 第56回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、11月、2013

3) 江口洋幸, 他: FCRL3 遺伝子多型と日本人バセドウ病患者における関連性の検討. 第56回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、11月、2013

H. 知的財産権の出願・取得状況 (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 25 年度分担研究報告書

粘液水腫性昏睡の診断基準と治療指針の作成に関する研究

分担研究者 田中 祐司 防衛医大 総合臨床部・内分泌代謝内科

研究要旨

診断基準（案）の作成を行い、日本甲状腺学会などで発表し、質疑応答を経て、学会のホームページにも掲載して、パブリックコメントを求めた。今年度より、甲状腺機能低下症が昏睡に至る病態生理をまとめ、その理解に立脚した治療法の検討を行っている。全般的治療指針は表に示した通り、1.全身管理、2.甲状腺ホルモン（T4/T3）投与、3.副腎皮質ホルモン投与、4.誘因の除去であり、発生後直ちに甲状腺ホルモンを投与することである。特に検討すべきなのは、投与ルートと投与量の決定である。経口製剤より静注製剤の方が理論的にも実地上も好ましいが、疾患頻度の低さと静注製剤の未発売という本邦特有の状況があり、これまで臨床成績も不十分で、基礎的検討も殆ど為されていなかった。いくつかの観点から基礎的検討を進めた結果、臨床現場で安全に使用可能な甲状腺ホルモン静注療法の普及を行うことが可能になってきた。

A: 研究目的

甲状腺ホルモン（点滴）静注療法の本邦での安定した普及による粘液水腫昏睡の治療成績の向上を目指す。この目的で、（１）静注製剤常備にまつわる問題点の克服、（２）安全～確実な静注製剤投与法の検討、を行う。

B: 研究方法

以下の2面から検討を進めている。
 （１）これまでの予備検討から、T4 原末は強アルカリでない溶解度が低く容易に保存容器壁面に吸着する事、一方で通常の保存容器は強アルカリには耐え得ない事、が判っていた。今回、耐アルカリ性の強い医療用樹脂製バイアルを選定&入手し、この容器内でのT4の安定した調製・保存法を確立する。
 （２）ウサギに甲状腺全摘手術を施して甲状腺ホルモン長期枯渇による粘液水腫モデルを作成し、留置した静脈カテーテルポートや胃瘻を経由し、種々の条件により補充療法を行いその効果、安全性を検証する。また、ホルモン枯渇にかけた時間・程度毎に甲状腺ホルモンの感受性が異なる事を検証し、そのマーカーと最適な治療モードの検討を行う。

C: 研究結果

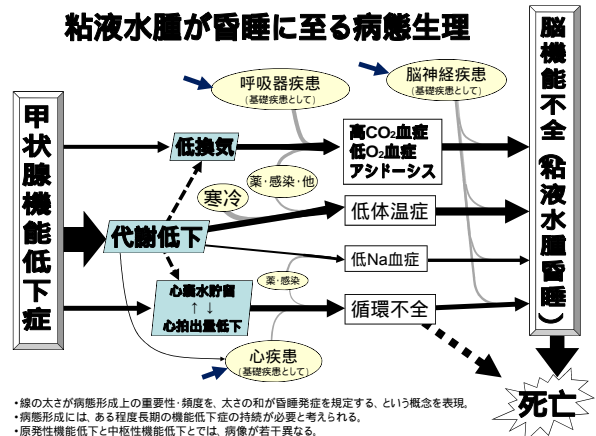
（１）強アルカリにも耐えうる医療用樹脂製バイアルを使用する事で、強アルカリ下でも薬剤の溶解度もバイアルも数ヶ月間安定して存在し得た。現在、更なる長期の安定性を検証中である。
 （２）ウサギの粘液水腫モデルは現在、甲状腺全摘と胃瘻造設を行い長期枯渇状態に入ったところである。近日中に粘液水腫モデルとして確立できると期待しており、それを確認した上で、実際の治療実験に入る。使用する薬剤・生理モニター類は全て揃っている。

D: 考察

粘液水腫性昏睡を甲状腺ホルモン静注投与で治療すべきである事は、理論的に考えても当然で、欧米では教科書にも記載された標準法である。また、昏睡には至っていない重症甲状腺機能低下症（昏睡の数倍以上の頻度で存在）でも静注製剤による安定的/確実な甲状腺ホルモン補充を望む声は多い。そこにも関わらず、これまで静注製剤の常備・普及は遅れ、本

邦では市販すらされていない。この背景には、（１）必要頻度が低いと考えられが

粘液水腫が昏睡に至る病態生理



・線の太さが病態形成上の重要性・頻度を、太さの和が昏睡発症を規定する、という概念を表現。
 ・病態形成には、ある程度長期の機能低下症の持続が必要と考えられる。
 ・原発性機能低下と中枢性機能低下とは、病像が若干異なる。

ちであった。（２）未承認薬の為、倫理委員会承認が必要である上、薬事法上、他施設への譲渡ができず、施設毎に対応するのは負担が大きい。（３）製剤の出自を問わず、下記の諸問題有り。（3A）輸入製剤は異常に高価。（3B）自家調製には手間がかかり、安定性データも種々雑多。（3C）その割に有効期限が短く、頻回の購入や調製が必要；（４）静注の優位性（経口に比べて）を示すデータすら収集されていない、等があり、製薬業界が市販化を躊躇してきた理由もここにあると思われる。今回の検討で、強アルカリにも耐えうる医療用樹脂製バイアルを使用する事で、甲状腺ホルモンの溶解度・安定性を十分保ちつつ保存～常備する事が容易になった。現在進めている、ウサギ粘液水腫昏睡モデルを用いて、静注療法の優位性とベストな静注療法（T4かT3かT4+T3併用か/少量か中等量か大量か/何を治療マーカーとすべきか、等）を検討する事により、更に詳細かつ実地的な静注製剤の使用法が明らかになると思われる。

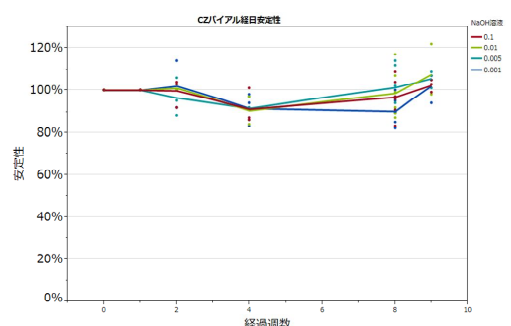
F: 研究発表

論文発表
 Triiodothyronine suppresses activin-induced differentiation of erythroleukemia K562 cells under hypoxia

粘液水腫昏睡の治療指針

1. 全身管理
 1. 呼吸状態の管理
 2. 循環状態の管理

医療用樹脂製バイアルでの経時安定性



Yoritsuna Yamamoto

to, Mieno Shiraishi, Masanori Fujita, Itaru Kojima, Yuji Tanaka, Shoichi Tachibana
Molecular and Cellular Biochemistry
March 2014
電 子 版 : (DOI)
10.1007/s11010-014-2005-7

厚生労働省難治性疾患研究から得られた日本の難病の現状 内分泌系4領域の研究成果 「ホルモン受容体機構異常：粘液水腫性昏睡の診断基準と治療方針」
白石美絵乃, 山本頼綱, 盛田 幸司, 田中祐司
最新医学 第67巻第9号(2013年)

学会発表
甲状腺ホルモン過剰が造血に与える影響 生理的低酸素環境下での in vitro 研究
山本 頼綱, 相良 優貴, 白石 美絵乃, 上野山 真紀, 藤田 真敬, 田中 祐司, 立花 正一
防衛衛生 (0006-5528)60 巻 別冊 Page30(2013.01)

甲状腺ホルモン注射薬の普及に向けた簡便で長期安定な院内調製/保存/投与方法開発への取り組み
白石 美絵乃, 山本 頼綱, 草薙 真澄, 栗原 鮎美, 濱野 邦久, 濱田 耕司, 内田 香介, 藤井 博子, 山崎 知子, 盛田 幸司, 田中 祐司
日本内分泌学会雑誌 (0029-0661)88 巻 2号 Page524(2012.09)

甲状腺ホルモン過剰が赤血球分化に与える影響 生理的低酸素環境下での in vitro 研究
山本 頼綱, 白石 美絵乃, 上野山 真紀, 藤田 真敬, 立花 正一, 田中 祐司
日本内分泌学会雑誌 (0029-0661)88 巻 2号 Page522(2012.09)

粘液水腫性昏睡の治療 静注製剤常備・普及への対策
田中 祐司
日本内分泌学会雑誌 (0029-0661)88 巻 2号 Page476(2012.09)

粘液水腫性昏睡 (MC) モデル動物を用いた最適治療法の検討
大野 洋介, 藤田真敬, 白石美絵乃, 山本頼綱, 立花 正一, 田中 祐司
日本内分泌学会雑誌 89(2):498 頁・

P2-053, 2013年

内分泌・代謝疾患における救急医療 ~ エンドクリンユニット 4~
第23回臨床内分泌代謝 Update 平成26年1月24日(金)於:名古屋国際会議場
田中祐司
日本内分泌学会雑誌 89(3):922 頁, 2013年

粘液水腫性昏睡
白石美絵乃・田中祐司
甲状腺疾患診療マニュアル改訂第2版(2014年1月)

健康寿命延長を目指した潜在性甲状腺機能低下症へのアプローチ法
大野洋介, 田中祐司
最新医学 69巻5号(2014年2月)

内分泌緊急症: 粘液水腫性昏睡
大野洋介, 白石美絵乃, 山本頼綱, 田中祐司
内分泌・糖尿病・代謝内科 平成26年1月号

G: 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
- その他

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 25 年度分担研究報告書

RTH ならびに TSH 受容体異常症の診断基準作成のための症例集積

研究協力者 谷山松雄 昭和大学藤が丘病院

研究要旨: TR 遺伝子変異を有する RTH 例と同変異を検出できない 2 例の SITSH において、T3 を負荷して作用を増幅しホルモン作用を評価し不応を検出できるか、この方法の有用性と限界について検討した。2 症例とも下垂体の抵抗性は軽度であった。末梢指標も多くは T3 に反応し不応を検出できなかった。RTH の程度が軽度な場合、T3 を負荷しても不応を検出できず、この方法の有用性には限界があった。また、TSH 受容体の germline 機能獲得型変異による甲状腺機能亢進症例は日本ではこれまで 8 家系報告されているが原因不明のびまん性甲状腺腫を有する産後の甲状腺中毒症例の中に TSH 受容体変異が診断されていない者が存在することが推測された。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症（RTH）の診断は SITSH+TR 遺伝子の変異で行われる。しかし TR 遺伝子変異のない例（non-TR）が 15-30% 存在し、これらの症例では甲状腺ホルモン作用を評価し、甲状腺ホルモン濃度に相応した作用が見られないことを明らかにすることが必要となる。甲状腺ホルモン作用を評価する場合、従来から行われている末梢作用の指標の基礎値での不応の検出は困難なことも多い。そこで T3 を負荷し作用を増幅して評価する方法が標準的な方法として提唱されている。今回 TR 遺伝子変異を有する RTH 例と同変異を検出できない 2 例の SITSH に

おいて T3 負荷時のホルモン作用を評価し、この方法の有用性と限界について検討した。

さらに、TSH 受容体抗体陰性のびまん性甲状腺機能亢進症における TSH 受容体の germline 機能獲得型変異の関与の実態を明らかにし、効率的な診断法の開発に繋げることを目的とした。

B. 研究方法

症例 1 : 37 歳、女。TR 遺伝子に R320H の変異あり。成長は正常。30 歳頃から頭痛、軽度的手指振戦を自覚。36 歳時に SITSH (FT₄ 2.08 ng/dl、FT₃ 4.3 pg/ml、TSH 0.72 μ IU/ml) を認め、MRI で下垂体

腫瘍を認めず。

症例 2 : 45 歳、男性。TR 遺伝子に変異なし。22 歳時に突然の脱力で某大学病院に救急搬送され、甲状腺機能亢進症と低カリウム血症の診断。以降カリウムの内服を行っていたがときどき脱力発作があった。35 歳時に某病院受診し SITSH (FT4 1.75 ng/dl、FT3 4.9 pg/ml、TSH 3.95 μ IU/ml) を認め、異好抗体などの検査上の問題は否定され、MRI で下垂体腫瘍は検出されず。TRH 負荷で TSH は反応。

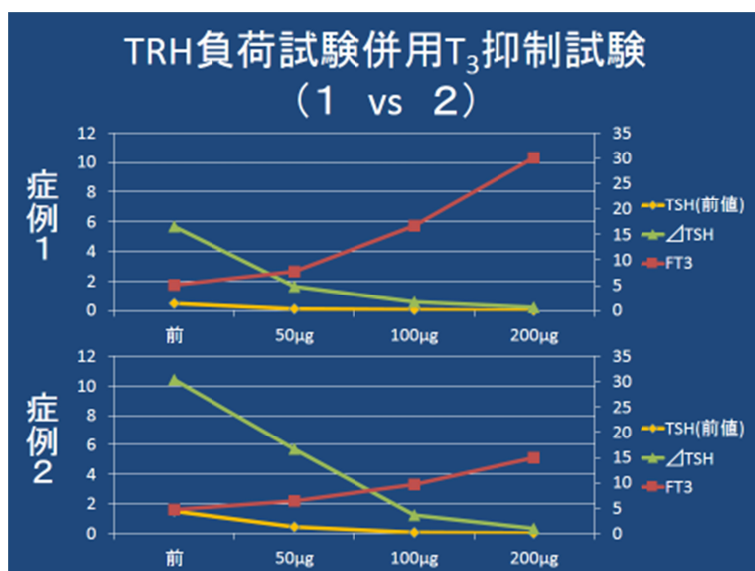
上記 2 症例に T3 製剤 (チロナミン) を 1 日量 50 μ g、100 μ g、200 μ g (分 2) をそれぞれ 3 日間連続して内服し、3 日間

連続内服した翌日に TRH 負荷試験を行うと同時に各種代謝パラメータを測定した。

妊娠一過性甲状腺機能亢進症は大量の HCG が TSH 受容体を刺激することにより起こり、妊娠の進行に伴い HCG が減少すると改善する一過性の病態だが、特殊な変異 TSH 受容体を有し正常 HCG 濃度にもかかわらず機能亢進が持続する母娘例が報告されている。まずこのような妊娠甲状腺中毒症が遷延する症例の TSH 遺伝子変異を検討した。つぎに非妊娠例で TSH 濃度が低値の症例についても検討した。

C. 研究結果

T3 投与前後の TRH に対する TSH の反応性



両例ともに T3 投与により TSH の基礎値は低下し、TRH に対する反応性も用量依存性に低下し、両例間で差は見られなかった。

甲状腺ホルモン基礎値の上昇も軽度で共に下垂体の抵抗性は軽度と考えられた。末梢指標の T3 に対する反応

T3 負荷後の代謝マーカーのまとめ

	NR	RTH	症例1 (TRβ遺伝子異常あり)	症例2 (TRβ遺伝子異常なし)
安静時心拍	↑↑	↑	一定の傾向なし	一定の傾向なし
安静時エネルギー消費量	↑↑	→ or ↑	↓	↑
体重	↓	→	↓	↓
T-cho	↓↓	↓	↓↓	↓↓
CK	↓	↑	一定の傾向なし	↓
フェリチン	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑
SHBG	↑↑	→	↑	一定の傾向なし

両例ともに T3 負荷に多くの指標が反応し、ホルモン不応はあっても軽度と考えられた。2 例間で反応する指標と一定傾向を示さない指標に違いを認めた。

妊娠後期まで甲状腺中毒症状が持続する 4 妊婦中 3 名に TSH 受容体遺伝子のいずれも異なる 1 塩基変異を検出した。現在これら変異受容体の機能解析中である。また、これらの症例では出産後甲状腺機能は正常化するが TSH 濃度は依然低値に留まっており、産後の TSH 低値の症例の中に TSH 受容体遺伝子異常が隠れている可能性を考え数例検討したが変異は検出されなかった。

D. 考察

TR 遺伝子変異を有する症例 1 でもホルモン作用の指標の多くで作用を発現し、不応が検出できなかった。不応が強い場

合は基礎値のみでも不応を検出可能であり、T3 投与は反応性を増幅するが不応を増幅するわけではないので不応の検出能の上昇は限定的であると考えられた。

本研究では甲状腺ホルモン不応の検出というテーマで、以前 preliminary に不応の検出の有用性が推定されたマーカーについて、基礎値のみで不応の検出、TSH 産生腫瘍との鑑別が可能かを検討する計画を立て、倫理委員会の承認を得て現在症例を収集中である。

TSH 受容体の germline 機能獲得型変異による甲状腺機能亢進症は日本ではこれまで 8 家系報告されているが原因不明のびまん性甲状腺腫を有する甲状腺機能亢進症の中に診断されていないものがあるか推測される。

E. 結論

T3 負荷による甲状腺ホルモン不応の検出も、不応が軽度の場合は十分に機能せず、患者の負担を考えるとあまり有用な検査とは言えない。基礎値で不応の検出が可能より鋭敏な指標が求められる。

妊娠甲状腺毒症を含め TSH 受容体の機能獲得型変異による甲状腺機能亢進症が存在する病態がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

第 56 回日本甲状腺学会にて発表

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 25 年度分担研究報告書

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)はその受容体(T3 receptor, TR)を介して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)している。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 TR 遺伝子の変異が同定されている(RTH)。しかし、TR ならびに、もう1つの機能的 TR である TR 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。未知の転写因子との相互作用の存在を考え、私達は前年度より T3 の標的遺伝子の転写伸長を担う因子に注目して検討を行い、TR は転写伸長に関わる因子の中で、cyclin-dependent kinases (CDK)9、hexamethylene bisacetamide-inducible protein 1 (HEXIM1)と複合体を形成していることを見出した。今年度は特に TR と CDK9 との相互作用を中心に検討を行い、TR のリガンド結合領域の C 末端と CDK9 の N 末端が結合に重要な領域であること、CDK9 のキナーゼ活性阻害薬の添加により T3/TR の標的遺伝子の正の転写制御が阻害されること、CDK9 を siRNA によって発現低下させると T3/TR の標的遺伝子の正の転写制御も阻害されること、が示された。これらは TR と CDK9 が直接結合することにより T3 による転写活性化を促進していることを示唆するデータである。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン(T3)は生体の成長、発達、分化、エネルギー代謝などに必須のホルモンであり、その作用は甲状腺ホルモン受容体(TR)を介して発揮される。TRは核内受容体スーパーファミリーの一員であり、T3依存性に標的遺伝子の転写を活性化(正)または抑制(負)する転写因子として働いている。T3により正に調節される遺伝子では、TRにT3が結合することによりコリプレッサー(NcoR, SMRT)の解離、コアクチベータ(p160, CBP/p300)の結合、ヒストンのアセチル化、メディエーター複合体の結合、基本転写因子およびRNA polymerase II (RNAPII)の呼び込み、が生じ転写が開始される。

このようなT3のシグナル伝達機構の異常として甲状腺ホルモン不応症(resistance to thyroid hormone, RTH)が知られている。甲状腺ホルモンに対する組織の反応性が阻害されている遺伝性疾患であり、高頻度に甲状腺腫大を認め、軽度の頻脈を生じることが多い。検査上は甲状腺ホルモン(T3, T4)が高値にもかかわらず、ネガティブフィードバックが障害されるため甲状腺刺激ホルモン(TSH)が抑制されず、不適切TSH分泌(SITSH)状態となるのが特徴である。日本における有病率は約2万人に1人と考えられている。原因としてTRの遺伝子異常が知られ(RTH)、これまで100種類以上の変異が報告されている。一方でTR変異が認められない症例(non-TR RTH)も相当数存在し、ヒストン修飾因子であるコアクチベータ、コリプレッサーなどの異常の検索が行われたが、そのような異常は認められず、原因は未解明である。また、RTHで特徴的に認められるSITSHが生じるメカニズムに関してもその詳細は不明で、これはT3/TRによる負の転写調節機構が未解明であることに通じている。我々はT3/TRによる負の発現調節を受けるTSH鎖遺伝子について検討を行い、TRがTSHの主要な転写活性化因子であるGATA2を標的としてプロモーター上に結合し、T3依存性にヒストンの脱アセチル化、メディエーター複合体の構成因子であるMED220を解離して転写を抑制するモデルを提唱した。しかしながら、T3/TRが、ある遺伝子では正、ある遺伝子では負、というように、転写調節をどのように切り替えているのか、またその切り替えの鍵となる因子は何か、という根本的なメカニズムに関する解答は得られていない。

このような背景から、我々はTRの転写制御に関わる未知の因子との相互作用の存在を考えた。

最近、多くの遺伝子発現の過程でRNAPIIは転写開始点から下流へ約25-50塩基ほど進行したところで一時停止(pausing)し、mRNA合成が休止することが明らかと

なっている。このRNAPII pausingにはDRB sensitivity inducing factor (DSIF), negative elongation factor (NELF)という2つの転写伸長阻害因子が関与しており、一方で転写伸長促進因子 positive transcription elongation factor b (P-TEFb)がpausing解除に働く。P-TEFbはcyclin dependent kinase (CDK)9とcyclin Tから構成される複合体であり、約半数は抑制因子であるHexamethylene bis-acetamide inducible protein 1 (HEXIM1)と結合して不活性状態となっている。HEXIM1から解離したP-TEFbがRNAPIIのサブユニットであるRpb1のC端に存在する7アミノ酸の繰り返し配列(C terminal repeat domain, CTD)の2番目のセリン(Ser2)をリン酸化すると、NELFがRNAPIIから解離し、さらにDSIFがリン酸化され転写伸長促進に働くように変化しmRNA合成が進行していく。このような転写伸長反応の制御はmRNA合成過程の律速段階となっており、転写調節の重要なステップであるが、甲状腺ホルモンによる転写調節と転写伸長反応との関係を検討した研究報告はなく、我々はここに新たな相互作用発見の可能性があると考えて検討を行った。

B. 研究方法

TRと転写伸長因子との結合を免疫共沈降法(Co-IP)で確認する。さらにGST-pull down法を用いて詳細な結合部位を同定する。

転写伸長反応の鍵となるP-TEFbの構成要素であるCDK9のキナーゼ活性阻害剤を投与してT3/TRの転写調節への影響を検討する。

RNAiを用いて転写伸長因子をノックダウンした場合のT3/TRの転写調節への影響を検討する。

(倫理面への配慮) In vitroの実験であり、動物やヒト由来の検体は使用していない。遺伝情報取り扱いなどの倫理面では問題がない。

C. 研究結果

TRと転写伸長因子の結合の確認
FLAG-TR 1発現プラスミドを293T細胞に遺伝子導入して核蛋白を抽出し、抗FLAG抗体(Sigma社)を用いてCo-IPを施行した。結合蛋白は各転写伸長因子特異的抗体を用いてイムノプロットで検出した。

P-TEFbの構成要素であるCDK9とTRとの結合が認められ、両者の結合はT3非依存性であった。また、P-TEFbの抑制因子であるHEXIM1もTRと結合することが判明した(図1a)。TRの機能的な3つのアイソフォームTRα1、1、2とCDK9の結合をCo-IPで確認したところ、すべてのTRアイソフォームがCDK9と結合可能である

ことが示された(図1b)。

続いてCDK9の各領域を欠失した変異体をGSTと結合させた融合蛋白(図2a)を作成し、GST-pull down法でTRとの結合部位の同定を行った。CDK9のN末端の欠失でTRとの結合が消失し、CDK9のN端82アミノ酸のみでTRとの結合が確認できた(図2b)。

次にTRの欠失変異(図2c)を作成し、GST-CDK9とのpull down assayを施行し結合部位を調べた。TR1のC末端を欠失すると結合が消失し、C端側の135アミノ酸のみで両者の結合が確認された(図2d)。

以上からTRのC末端とCDK9のN末端が結合部位であることが示された。

P-TEFbの阻害剤を用いた検討

CDK9のキナーゼ活性阻害剤である5,6-dichloro-1 β -D-ribofuranosyl benzimidazole(DRB)とflavopiridol(FP)を下垂体由来の細胞株L T2細胞に添加し、T3/TR標的遺伝子の発現に対する影響を定量的RT-PCRで検討した。T3により正に制御されるthyroid hormone responsive spot14(Thrsp, Spot14)および1型脱ヨード酵素(Dio1)の発現はDRB, FP添加により濃度依存性に抑制された(図3)。

次にP-TEFbの阻害因子であるHEXIM1の発現誘導物質Hexamethylene bis-acetamide(HMBA)を添加してT3/TR標的遺伝子の発現調節に及ぼす影響を検討した。T3で活性化されたThrsp, Dio1遺伝子の発現はHMBA濃度依存性に阻害された(図4)。

以上より、薬剤を添加してCDK9活性を阻害するとT3/TRによる転写活性化が障害されることが確認された。

CDK9のRNAiによるノックダウン

CDK9特異的なsiRNAを合成しリポフェクション法を用いてL T2細胞に導入し、T3/TRの転写制御への影響を定量的RT-PCRで確認した。

CDK9 siRNAの導入によるCDK9の遺伝子発現抑制率は約50%であり(図5d)この時T3/TR標的遺伝子であるThrsp, KLF9のT3依存性の転写活性化は約30%有意に抑制された(図5a,b)。一方、ハウスキーピング遺伝子である β -actinの発現はCDK9をノックダウンしても変化しなかった(図5c)。

この結果からCDK9がT3/TRの転写活性化に必要な因子であることが確認された。

D. 考察

我々はRNAPIIのmRNA合成反応を進行させる転写伸長因子P-TEFbの構成要素であるCDK9がTRと結合することを発見した。さらに、CDK9阻害剤の添加やCDK9のノックダウンによりT3/TR標的遺伝子の転写活性化が障害されたことから、TRと

P-TEFbとの相互作用を介した転写活性化機構が存在すると考えられた。

TRはT3存在下でRNAPIIを標的遺伝子上へ呼び込んで転写を開始するだけでなく、CDK9との相互作用を介してRNAPIIのCTD(Ser2)を速やかにリン酸化し、転写伸長反応を進めることでmRNA合成を活性化していることが予想される(図6)。

我々の知る限り、TRとCDK9との相互作用に関する報告は過去に認められない。興味深いことに、今回の検討でTRのリガンド結合領域のC末端がCDK9との結合に重要であることが判明しており、この領域は甲状腺ホルモン不応症患者で過去に報告されている変異部位と重なる。これまで不応症患者で報告されているTR遺伝子変異の中には、P-TEFbとの結合が減弱し、転写活性化能を喪失した変異体が混在しているのかもしれない。

またCDK9の変異によりTRの転写制御が障害されてホルモン不応となる機序も予想され、non TR RTHの病因となっている可能性がある。他の転写因子に影響せずTR特異的に機能を障害するような変異が存在するのか、さらに詳細な検討が必要と考えている。

E. 結論

(1)TRは転写伸長因子P-TEFbのサブユニットであるCDK9と複合体を形成している。

(2)阻害剤を用いたCDK9の作用抑制やRNAiによるCDK9の発現抑制を行うとT3/TRによる転写活性化が抑制された。このことからT3/TRの転写活性化機構にCDK9が必要であることが示された。

(3)TRはCDK9との相互作用を介して転写伸長反応を促進し、転写を活性化しているものと考えられた。

F. 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

「甲状腺ホルモン受容体と転写伸長因子P-TEFbの相互作用の検討」

松下明生、佐々木茂和、他3名
第56回日本甲状腺学会学術総会(2013年11月)

「甲状腺ホルモンとその受容体による転写制御機構と転写伸長反応との関わり」

松下明生、佐々木茂和、他3名
第86回日本内分泌学会学術総会(2013年4月)

「preproTRH遺伝子における転写因子GATA2ならびにT3受容体の作用」

佐々木茂和、松下明生、他4名
第86回日本内分泌学会学術総会(2013年4月)

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 25 年度分担研究報告書

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

分担研究者 山田正信 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科
共同研究者 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) 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 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 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。さらに、この変異を持つ患者において TR 遺伝子のスプライシング異常は認められず、新たな発症機序が予想された。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) 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 遺伝子に変異を認めず、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、TR 遺伝子に変異を認めない三世代にわたるRTH家系を経験したが、この家系において、TR 遺伝子のイントロン領域に症候と連鎖する可能性がある変異を発見した(図1)。イントロン領域の変異は遺伝子の転写やスプライシングに影響するため、今回、この変異によりTR のスプライシングに異常が生じるかを検討した。

B . 研究方法

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RNAを抽出し、TR 遺伝子の周辺領域の転写物をRNA-シーケンシング法(RNA-Seq)にて解析した。健常人から得られたRNA-Seqの結果を対照として、の結果を解析した。TR のスプライシングに変化があるか、RT-PCR法を用いる解析も併せて行った。

(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

TR 遺伝子に変異を認めずイントロン領域に症候と連鎖する可能性がある変異をもつRTH患者のRNA-Seq解析において、TR mRNAのスプライシングは健常者と同様であった。また、RT-PCR法を用いた検討においても、スプライシングに異常は認められなかった。

D . 考察

RTH家系の約15%に認められるTR 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 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 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。今回の検討で、本症例においてTR スプライシング異常は認められず、新たな発症機序であることが判明した。

E . 結論

TR 遺伝子に変異を認めずイントロン領域に症候と連鎖する可能性がある変異をもつRTH患者において、TR mRNAのスプライシングに異常は認められなかった。

F . 健康危険情報

該当なし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Miyake Y, Tanaka K, Nishikawa T, Naruse M, Takayanagi R, Sasano H, Takeda Y, Shibata H, Sone M, Satoh F, Yamada M, Ueshiba H, Katabami T, Iwasaki Y, Tanaka H, Tanahashi Y, Suzuki S, Hasegawa T, Katsumata N, Tajima T, Yanase T. Prognosis of primary aldosteronism in Japan: results from a nationwide epidemiological study. *Endocr J.* 2013 Sep 28. [Epub ahead of print]
2. Shimamura M, Nakahara M, Orim F, Kurashige T, Mitsutake N, Nakashima M, Kondo S, Yamada M, Taguchi R, Kimura S, Nagayama Y. Postnatal Expression of BRAFV600E Does Not Induce Thyroid Cancer in Mouse Models of Thyroid Papillary Carcinoma. *Endocrinology.* 2013 Aug 22. [Epub ahead of print]
3. Nakajima Y, Yamada M, Akuzawa M, Ishii S, Masamura Y, Satoh T, Hashimoto K, Negishi M, Shimomura Y, Kobayashi I, Andou Y, Mori M. Subclinical hypothyroidism and indices for metabolic syndrome in Japanese women: one-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 98:3280-3287.
4. Shibusawa N, Yamada M, Hashida T, Hashimoto K, Satoh T, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Mori M. Dilated cardiomyopathy as a presenting feature of Cushing's syndrome. *Intern Med.* 2013;52(10):1067-1071.
5. Katano-Toki A, Satoh T, Tomaru T, Yoshino S, Ishizuka T, Ishii S, Ozawa A, Shibusawa N, Tsuchiya T, Saito T, Shimizu H, Hashimoto K, Okada S, Yamada M, Mori M. THRAP3 interacts with HELZ2 and plays a novel role in adipocyte differentiation. *Mol Endocrinol.* 2013 27:769-780.

6. 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
7. Hashimoto K, Ishida E, Miura A, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Yamada M, Mori M. Human stearoyl-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 154:537-549.
8. Yamada M, Nakajima Y, Taguchi R, Okamura T, Ishii S, Tomaru T, Ozawa A, Shibusawa N, Yoshino S, Toki A, Ishida E, Hashimoto K, Satoh T, Mori M. KCNJ5 mutations in aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal adenomas. *Endocr. J.* 59:735-741, 2012.

2.学会発表

1. 佐藤 哲郎、片野 明子、登丸 琢也、吉野 聡、石塚 高広、石井 角保、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢士、山田 正信、森 昌朋：甲状腺ホルモン受容体 (TR) は T3 依存性転写活性化に共役した mRNA 前駆体の選択的スプライシング (AS) を制御する、第 86 回日本内分泌学会学術総会、仙台、2013 年 4 月 25 日-27 日
2. 石田 恵美、橋本 貢士、石井 角保、登丸 琢也、小澤 厚志、渋沢 信行、佐藤 哲郎、山田 正信、森 昌朋：Liver X 受容体は甲状腺機能低下症における Alzheimer 病関連遺伝子 Seladin-1 発現を代償する一ヒト及びマウスでの検討、第 86 回日本内分泌学会学術総会、仙台、2013 年 4 月 25 日-27 日
3. 渋沢 信行、田口 亮、Jennifer Garay Guerrero、中島 康代、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：TRH の転写因子 USF-1 を介する FGF21 遺伝子発現調節機構、第 86 回日本内分泌学会学術総会、仙台、2013 年 4 月 25 日-27 日
4. 渡邊 琢也、橋本 貢士、中島 康代、登丸 琢也、石井 角保、小澤 厚志、渋沢 信行、佐藤 哲郎、田中 知明、山田 正信、森 昌朋：甲状腺ホルモン不応症の遺伝子診断の時期について：下垂体腫瘍合併例からの考察、第 86 回日本内分泌学会学術総会、仙台、2013 年 4 月 25

日-27 日

5. 小澤 厚志、渡邊 琢也、岡村 孝志、田口 亮、土岐 明子、吉野 聡、中島 康代、登丸 琢也、石井 角保、渋沢 信行、橋本 貢士、森 昌朋、佐藤 哲郎、山田 正信：寒冷環境での非ふるえ熱産生における TRH の機能：TRH ノックアウトマウスの解析、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日
6. 渋沢 信行、中島 康代、登丸 琢也、石井 角保、小澤 厚志、佐藤 哲郎、森 昌朋、山田 正信：膵島細胞における甲状腺ホルモンによる Fibroblast growth factor 21 (FGF21) 遺伝子発現調節、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日
7. 橋本 貢士、松本 俊一、佐藤 哲郎、菅波 孝祥、森 昌朋、山田 正信、小川 佳宏：甲状腺ホルモンによる AMP-activated protein kinase (AMPK) 1 遺伝子の組織特異的発現機構の解析、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日
8. 松本 俊一、橋本 貢士、石田 恵美、佐藤 哲郎、森 昌朋、山田 正信、Fredric Wondisford：甲状腺ホルモンを介しない Rev-erb および NCoR による Tshb 遺伝子発現制御機構の解析、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日
9. 岡村 孝志、中島 康代、登丸 琢也、石井 角保、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢士、佐藤 哲郎、山田 正信：TRH の下垂体 NR4A1 (Nur77) を介する TSH 遺伝子制御機構、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日
10. 佐藤 哲郎、吉野 聡、土岐 明子、渡邊 琢也、中島 康代、登丸 琢也、石井 角保、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢士、森 昌朋、山田 正信：レボチロキシン補充療法中に心筋梗塞を発症した橋本病の 2 例、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日
11. 中島 康代、阿久澤 まさ子、石井 角保、正村 泰博、佐藤 哲郎、橋本 貢士、根岸 真由美、下村 洋之助、小林 功、安藤 義孝、山田 正信：潜在性甲状腺機能低下症は女性のメタボリックシンドロームの危険因子である：人間ドック 11498 名の解析から、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日

日

12. 土岐 明子、小澤 厚志、佐藤 哲郎、松井 綾子、錦戸 彩加、中島 康代、石井 角保、登丸 琢也、渋沢 信行、岡田 秀一、森 昌朋、山田 正信：チアマゾール減量と分割食導入により低血糖発作の発現頻度を減少しえたインスリン自己免疫症候群合併バセドウ病の一例、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日

13. 吉野 聡、佐藤 哲郎、小澤 厚志、土岐 明子、中島 康代、登丸 琢也、石井 角保、渋沢 信行、森 昌朋、山田 正信：出血性胃潰瘍が誘因となった未治療バセドウ病による甲状腺クリーゼの一例、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日

14. 渡邊 琢也、小澤 厚志、六反田 奈和、堀口 淳、竹吉 泉、樋口 徹也、三枝 里江、中島 邦枝、登丸 琢也、石井 角保、渋沢 信行、森 昌朋、佐藤 哲郎、山田 正信：集学的治療を行った甲状腺濾胞癌仙骨転移の一症例、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日

15. 登丸 琢也、小澤 厚志、中島 康代、石井 角保、渋沢 信行、佐藤 哲郎、山田 正信：無痛性甲状腺炎を併発したために副腎不全が健在化した ACTH 単独欠損症の 1 例、第 56 回日本甲状腺学会学術集会、和歌山、2013 年 11 月 14 日-16 日

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 25 年度分担研究報告書

くる病・骨軟化症の診療マニュアルの策定：血清カルシウム・リン制御機構に関する研究

分担研究者 大園恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教授
共同研究者 難波範行 大阪大学大学院医学系研究科小児科学講師
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、1 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 24 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患者。ビタミン D 欠乏性くる病の 24 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。副甲状腺ホルモン抵抗症として先端異骨症の 1 例に PPRAP1A 遺伝子の変異、ビタミン D 依存性くる病 II 型の 1 例に VDR 遺伝子の変異、乳児高カルシウム血症の 1 例に APS2 遺伝子の変異を有する症例を経験し、血清カルシウム・リン制御機構に関わる複雑なシグナル経路の 1 端が明らかにされた。

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。一昨年、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。

乳児期にはしばしば、血中・尿中カルシウム値の異常が認められるが、この原因について、新たな知見が得られている。家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (FHH) は、責任遺伝子の座位により 3 型 (FHH1~3) に分類される。FHH1 の原因はカルシウム感知受容体 (CaSR) の異常であり、FHH1 は FHH のうちの 65% 程度を占めると考えられている。FHH2、FHH3 の原因はこれまで不明であったが

、最近、それぞれ $G\alpha_{11}$ (*GNA11* 遺伝子)、 $AP2\sigma$ (*AP2S1* 遺伝子) の異常に基づくことが報告された (Nesbit MA, et al. *NEJM*, 2013; Nesbit MA et al. *Nat Genet*, 2013) (表 1)。CaSR は 7 回膜貫通型の受容体であり、 $G\alpha_{11}$ は CaSR と結合してそのシグナルを伝える G 蛋白質の 1 種である。AP2 σ subunit は CaSR の細胞質への取り込みに関与する分子であり、カルシウム感知に関わるシグナルとその異常症が解明されたことになる。一般的に FHH は軽症で、治療を必要としないが、重症例では治療を要する。治療選択としては、高カルシウム血症に対する対症療法のほか、CaSR 特異的に機能を変化させる薬剤の効果に関する報告もあり、今後は特異的治療法の開発が期待される (Nakamura A, et al. *JCEM*, 2013)。Fujisawa らの報告した *AP2S1* 変異を持つ乳児例では、高カルシウム血症は高度であり、低カルシウムミルクを用いたカルシウム摂取制限が有効であった (Fujisawa Y, et al. *JCEM*, 2013)。副甲状腺ホルモン (PTH) に対する抵抗性として、偽性副甲状腺機能低下症が知られているが、短指症を呈する症例 (先端異骨症) の中に PTH 抵抗性を示す症例があり、*PRKAR1A* 遺伝子の異常として確定されている (Linglart A, et al. *NEJM*, 2011)。一方、ホルモン抵抗性を伴わない先端異骨症の原因として *PDE4D* が報告されている (Michot C, et al. *AJHG*, 2012; Lee H, et al. *AJHG*, 2012)。細胞内 cAMP/protein kinase A (PKA) シグナル経路の異常により、これらの疾患が引き起こされるものと考えられる。*PRKAR1A* の変異においては、PKA の regulatory subunit の異常により、cAMP 依存性の酵素活性化に障害を来す。*PDE4D* は phosphodiesterase をコードし、変異により活性を失うものと考えられるが、ホルモン抵抗性の機序の解明が待たれる。

また、あらたな副甲状腺機能低下症の原因も同定されている。Kenny-Caffey 症候群の責任遺伝子として *FAM111A* が同定された (Unger S, et al. *AJHG*, 2013; Isojima T, et al. *JBMR*, 2013)。このような進展に伴って経験した当施設の症例を提示し、診断、治療の留意点を明らかにする。

B. 研究方法

「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」(案)は診断に必要な項目とくる病・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」の表からなる。「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。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 32 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 24 名 (男 11 名、女 13

名)で、年齢は 17 ± 7 か月 (平均 \pm SD) であった。身長は -1.3 ± 1.5 SD スコア (平均 \pm SD)、体重は -0.5 ± 1.3 SD スコアであった。主訴の内訳は、下肢変形が 75% ($n = 18$)、高 ALP 血症が 21% ($n = 5$)、痙攣が 4% ($n = 1$) であった。離乳食開始前の栄養は、母乳のみが 89% ($n = 21$)、母乳と人工乳の混合が 4% ($n = 1$)、不明が 8% ($n = 2$) 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、年齢は 21 ± 8 か月であった。身長は -1.9 ± 1.0 SD スコア、体重は -0.1 ± 0.8 SD スコアであった。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

「くる病・骨軟化症の診断マニュアル」と「くる病・骨軟化症の病因鑑別フローチャート」の有用性の検討：

ビタミン D 欠乏性くる病の 24 例中、12 例がくる病の診断基準を満たし、10 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。この 2 例の内、1 例は大項目の「高 ALP 血症」と小項目の「低リン血症または低カルシウム血症」を満たさず、くる病の治癒過程にあると考えられた。もう 1 例は「低リン血症または低カルシウム血症」と小項目「臨床症状」を認めず、高 ALP 血症によって偶然見つかった症例であった。また、疑い症例 10 例において、8 例は「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。2 例は「臨床症状」を認めず、検査所見によって偶然見つかった症例と痙攣が主訴の症例であった。

「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、低リン血症を認めない症例も血清 25 水酸化ビタミン D (25OHD) 値が 20 ng/ml 未満の場合、ビタミン D 欠乏性くる病の診断に至る。本症例では、ビタミン D 欠乏性くる病の全症例の血清 25 25OHD 値が 18 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。

「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おける血清 FGF23 値の有用性」の検討：

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 18 ng/ml 未満であったが (8.8 ± 4.0 ng/ml, $n = 22$)、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 (10.3 ± 2.8 pg/ml, n = 18)、遺伝性低リン血症性くる病において 58 pg/ml 以上 (70.8 ± 11.5 pg/ml, n = 4) と、両者の間に明瞭な違いが見られた。ビタミン D 欠乏性くる病の 72% (n = 13) の症例における血清 FGF23 値は 10 pg/ml 未満であった。

血清 FGF23 値、血清 25OHD 値以外の生化学的検討では、ビタミン D 欠乏性くる病における血清カルシウム値は遺伝性低リン血症性くる病に比べて、有意に低く、血清リン値、PTH 値、血清 1,25 水酸化ビタミン D (1,25(OH)₂D) 値、TmP/GFR は高かった。しかし、血清 FGF23 値とは異なり、ビタミン D 欠乏性くる病と遺伝性低リン血症性くる病におけるそれぞれの検査データの個々の値の分布には重なりが認められた。血清 ALP と尿中カルシウム/クレアチニン比はビタミン D 欠乏性くる病と遺伝性低リン血症性くる病の間において明らかな差を認めなかった。

ビタミン D 欠乏性くる病における栄養・生活指導、アルファカルシドール治療による生化学検査値の変化を検討した (n = 6)。介入前に比べて、介入 1~3 カ月後の血清 FGF23 値は増加した。血清リン値も増加し、ALP、PTH は低下した。血清カルシウム値、1,25(OH)₂D 値、TmP/GFR、尿中カルシウム/クレアチニン比は明らかな変化を示さなかった。

稀な遺伝子異常によるカルシウム代謝異常症の 3 例を経験した。

1 例目：ホルモン抵抗性を伴う先端異骨症の 1 例症例は 4 歳 2 か月の男児。生下時から高 TSH 血症を認め、freeT4 も低下したため LT4 の内服を開始したが、高 TSH 血症が持続し TSH 不応症が疑われた。2 歳 4 ヶ月時に当院を紹介受診し短指趾や顔面中央部低形成、低身長を認めたため 4 歳 2 ヶ月時に入院精査した。入院時身長は 94.8cm (-1.65SD)、体重は 14.7kg (肥満度 5.1%)、Arm span 86cm、顔面中央部低形成や内眼角贅皮、短指趾、猿線を認めた。発達遅滞はなかった。単純骨 X 線写真では中手骨や中足骨の短縮と円錐骨端を認めた。血液検査では血清カルシウム 9.9 mg/dl、血清リン 5.6 mg/dl、intact PTH 102.7 ng/ml、25(OH)D 34 ng/ml であった。EliSworth-Howard 試験では尿中 cAMP 反応は正常だが尿中リン酸反応は低かった。遺伝子検査にて PRKAR1A 遺伝子に既知の変異の R368X 変異を認め、ホルモン抵抗性を伴う先端異常骨症と診断した。

2 例目：ビタミン D 依存性くる病 II 型の 1 例症例は、2 歳 8 か月の女児。2 歳時に近医で施行された血液検査で ALP が 4000 U/L 以上で、血清カルシウム 7.7 mg/dl、リン 3.0 mg/dl、ALP 8891 U/L、intact PTH 576 pg/ml、1,25(OH)₂D 130 pg/ml だった。禿頭や著明な O 脚、レントゲンにてくる病変化確認めたため他大学にて VDR 遺伝子検査が施行され、R73X ホモ変異を認めた。活性型ビタミン D とカルシウムの経口投与が行なわれたが改善に乏しく加療目的で当院へ紹介入院した。入院時身長 74.8cm (-4.46SD)、体重 9.7kg (肥満度 6.9%) だった。血液検査は血清カルシウム 7.4mg/dl、リン 2.8mg/dl、ALP 7788U/L、intactPTH 792.3pg/ml、1,25(OH)₂D 1380 pg/ml で、単純骨 X 線写真でくる病変化を認めた。活性型ビタミン D

の内服を継続し経口カルシウムの投与量を 300mg/kg/day に増やしたところ、intact PTH 70.4 pg/ml、血清カルシウム 9.1 mg/dl へ改善した。3 才 2 か月時にビタミン D の内服を中止して経口カルシウム投与のみとしたが、3 歳 6 か月時には血清カルシウム値は正常値のみならず intactPTH 値も正常化した。

3 例目：家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症

症例は、生後 49 日の女児。生後 41 日に哺乳力低下と体重増加不良のため近医を受診し、血液検査で高カルシウム血症を認めたため、精査加治療目的で生後 49 日に他大学を受診した。入院時身長 50.9cm(-2.1SD)、体重 3.7kg(-2.0SD)だった。血液検査では血清カルシウム 13.2 mg/dl、リン 3.5 mg/dl、ALP 2276 U/L、intactPTH 27 pg/dl、PTHrP 感度以下、25(OH)D 14ng/ml で尿カルシウム/クレアチニン比 1.29 だった。低カルシウムミルクを与えることで高カルシウム血症が改善し、最終的には低カルシウムミルクとレギュラーミルクを混合してカルシウム摂取量を調整し日齢 175 に退院した。遺伝子検査を施行したところ、本人の AP2S1 遺伝子に既報の R15L 変異を認めた。以上から、低カルシウム尿症を認めなかったが本症例は FHH3 型と診断した。

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 24 例中、12 例がくる病の診断基準を満たし、10 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 18 ng/ml 未満であり、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、くる病の治癒過程の症例、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。

症例のまとめ：

ホルモン抵抗性や過剰分泌をきたす新規の遺伝子変異が知られるようになり、低カルシウム血症診断および高カルシウム血症診断、治療の手引きを更新する必要がある。

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ユ

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ので論文として報告した。

F. 研究発表

1. 国内

口頭発表 29 件
原著論文による発表 0 件
それ以外(レビュー等)の発表 21 件
そのうち主なもの

論文発表

- 1) 大幡泰久, 大園恵一: 小児科から, 平田結喜緒 編, 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル, 診断と治療社, p.30-31, 2013.
- 2) 大幡泰久, 大園恵一: 病型分類, 平田結喜緒 編, 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル, 診断と治療社, p.71-73, 2013.
- 3) 大幡泰久, 大園恵一: くる病の疫学・病態・診断, 平田結喜緒 編, 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル, 診断と治療社, p.152-155, 2013.
- 4) 山本景子, 大園恵一: 骨形成不全症, 宗園 聡 杉本 利嗣 編, ビスホスホネート エビデンスブック, 医薬ジャーナル社, p.197-200, 2013.
- 5) 大園恵一: 進化を続ける骨研究最新動向, 吉田 隆 編, 骨研究最前線 アンチ・エイジングシリーズ No.3 代謝・疾病のメカニズムから再生医療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開発まで, エヌ・ティー・エス, p.3-7, 2013.
- 6) 大園恵一: 骨系統疾患, 吉田 隆 編, 骨研究最前線 アンチ・エイジングシリーズ No.3 代謝・疾病のメカニズムから再生医療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開発まで, エヌ・ティー・エス, p.95-103, 2013.
- 7) 三善陽子, 大園恵一: 小児がん経験者の成長障害, 横谷 進 編, 成長障害のマネジメント 改訂3版, 医薬ジャーナル社, p.146-153, 2013.
- 8) 大園恵一: ビタミン D と小児の骨疾患, 岡野登志夫 編, ビタミン D と疾患 改訂版 -基礎の理解と臨床への応用-, 医薬ジャーナル社, p.140-147, 2014.
- 9) 窪田拓生, 大園恵一: Wnt シグナル, 内科, 111(4): 641-645, 2013.
- 10) 北岡太一, 大園恵一: 骨代謝関連検査, 小児科診療, 76 増刊号: 109-115, 2013.
- 11) 大園恵一, 北岡太一, 窪田拓生, 難波範行: 遺伝性骨粗鬆症, 最新の骨粗鬆症学-骨粗鬆症の最新知見-, 71 増刊号 2: 583-588, 2013.
- 12) 大園恵一: 1, 25 水酸化ビタミン D, 内分泌・糖尿病・代謝内科, 36(4): 382-389, 2013.
- 13) 藤原 誠, 大園恵一: 尿細管最大リン再吸収閾値, 小児内科, 45(5): 947-950, 2013.

- 14) 大園恵一: 骨細胞による骨形成の制御, THE BONE, 27(3): 59-64, 2013.
- 15) 藤原 誠, 大園恵一: 遺伝性低リン血症性くる病, 小児内科, 45(9): 1687-1690, 2013.
- 16) 三浦弘司, 大園恵一: 骨系統疾患の病態と治療, CLINICAL CALCIUM, 23(12): 97-102, 2013.
- 17) 大園恵一: 小児内分泌疾患および骨系統疾患における骨粗鬆症, 中村利孝, 松本俊夫 編, 骨粗鬆症診療ハンドブック 改訂5版, 医薬ジャーナル社, p. 91-103, 2012.
- 18) 窪田拓生, 大園恵一: ビタミン D と健康, Medical Practice, 29(11): 1929-1931, 2012.
- 19) 大園恵一: 骨の健康のために-小児科医の観点から, O.li.v.e.-骨代謝と生活習慣病の連関-, 2(4): 47-49, 2012.
- 20) 窪田拓生, 大園恵一: ビタミン D・カルシウム代謝マーカーに関する動向, THE BONE, 26(4): 75-79, 2012.
- 21) 窪田拓生, 大園恵一: 低リン血症性(ビタミン D 抵抗性)くる病, 小児内科 44 増刊号: 184-185, 2012.

学会発表

- 1) 大園恵一: 骨芽細胞・骨細胞の制御と疾患, 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第 22 回 国際リウマチシンポジウム: 13.04.18-20, 京都
- 2) 大園恵一: 低リン血症治療薬リン酸二水素ナトリウム水和物・無水リン酸水素二ナトリウム、ラジオ NIKKEI, 2013.05.09
- 3) 福田ひとみ, 山本景子, 北岡太一, 藤原 誠, 大幡泰久, 三浦弘司, 窪田拓生, 難波範行, 大園恵一: 大量カルシウム内服により PTH の改善を認めたビタミン D 依存性くる病 2 型の 1 例、第四十六回発育異常研究会: 13.05.25, 大阪
- 4) 上山 薫, 山本景子, 北岡太一, 藤原 誠, 大幡泰久, 三浦弘司, 窪田拓生, 難波範行, 大園恵一: 内分泌学的精査を施行した先端異骨症の一男児例、第四十六回発育異常研究会: 13.05.25, 大阪
- 5) Ozono K: Height determination by chondrocyte development. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research: 13.05.28-06.01, 神戸
- 6) Kawai M, Kinoshita S, Ohata Y, Yamazaki M, Ozono K, Michigami T: FGF23

suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble α -klotho. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research: 13.05.28-06.01, 神戸

7) Takeyari S, Yamamoto T, Michigami T, Hasegawa K, Tanaka H, Imanishi Y, Fukumoto S, Kitaoka T, Ozono K: A patient with hypophosphatemic osteomalacia complicated by the ossification of posterior longitudinal ligament. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research: 13.05.28-06.01, 神戸

8) 北岡太一, 難波範行, 大園恵一, 長谷川行洋, 皆川

真規, 内藤優己, 志村麻美: 家族性低リン血症性く

る病患者を対象とした経口リン酸製剤(ホスリボ

ン®配合顆粒)の治療的使用試験報告、第31回日本

骨代謝学会学術集会: 13.05.30, 神戸

9) 大園恵一: 血清カルシウム・リン値に異常のみられ

る疾患 Update、平成25年度第3回・日医生涯教育

講座: 13.09.26, 大阪

10) 田村麻由子, 磯島 豪, 吉田秀樹, 川嶋実苗, 山本

景子, 北岡太一, 難波範行, 大園恵一, 徳永勝士,

北中幸子: 12番染色体片親性ダイソミーによって発

症したビタミンD依存性くる病2型 -SNP アレイ解

析の有用性-、第47回日本小児内分泌学会学術集

会: 13.10.10-12, 東京

11) 中尾紀恵, 三善陽子, 小西暁子, 木村武司, 長谷川

泰浩, 橋 真紀子, 宮原由起, 近藤宏樹, 三木和典,

大園恵一: 小児期発症バセドウ病51例の臨床的検

討、第47回日本小児内分泌学会学術集会: 13.10.

10-12, 東京

12) 藤澤泰子, 山口理恵, 大高幸之助, 佐竹栄一郎, 松

下理恵, 大園恵一, 緒方 勤: 高Ca血症と高Ca尿

症を呈した乳児における AP2S1 遺伝子変異の同定と

低Caミルクの治療的効果、第47回日本小児内分泌

学会学術集会: 13.10.10-12, 東京

13) 上山 薫, 山本景子, 北岡太一, 藤原 誠, 大幡泰久,

三浦弘司, 窪田拓生, 難波範行, 大園恵一:

内分泌学的精査を施行した先端異骨症の一男児例、第47回日本小児内分泌学会学術集会: 13.10.10-12, 東京

14) 三善陽子, 難波範行, 松本直道, 大園恵一: 過成長の原因として EZH2 遺伝子変異が同定された Weaver 症候群の一例、第47回日本小児内分泌学会学術集会: 13.10.10-12, 東京

15) 梶田聡実, 武鏈真司, 山本威久, 杉辺英世, 木島衣里, 長谷川高誠, 北岡太一, 窪田拓生, 大園恵一, 下辻常介: XLH に ADPKD を合併した症例におけるリン代謝異常に関する研究、第47回日本小児内分泌学会学術集会: 13.10.10-12, 東京

16) 小野英利奈, 有賀賢典, 大島早希子, 早川美佳, 今井祐之, 落合幸勝, 宮田市郎, 難波範行, 大園恵一, 井田博幸: 新規遺伝子変異を認めた MCT8 異常症の2例における内分泌学的検討、第47回日本小児内分泌学会学術集会: 13.10.10-12, 東京

17) 窪田拓生, 藤原 誠, 三浦弘司, 北岡太一, 難波範行, 武鏈真司, 山本威久, 山藤陽子, 浅田 稔, 大園恵一: ビタミンD欠乏を合併した低リン血症性くる病の診断における血清 FGF23 値の有用性、第47回日本小児内分泌学会学術集会: 13.10.10-12, 東京

18) 武鏈真司, 北岡太一, 山本威久, 下辻常介, 窪田拓生, 大園恵一: 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: 12.04.19-21, 名古屋

19) 北岡太一, 大園恵一, 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患者を対象とした Z-521 の治療的使用試験報告、第46回日本小児内分泌学会学術集会: 12.09.27-29, 大阪

20) 武鏈真司, 山本威久, 中山尋文, 木島衣理, 金野 浩, 溝口好美, 山本勝輔, 下辻常介, 窪田拓生, 大園恵一: ビタミンD欠乏性くる病におけるO脚の程度と血中Cr値との関係: 骨変形と骨格筋量との関連性、第46回日本小児内分泌学会学術集会: 12.09.27-29, 大阪

21) 中山尋文, 山本威久, 武鏈真司, 木島衣理, 下辻常介, 山本勝輔, 北岡太一, 大園恵一, 長谷川高誠, 田中弘之: 多発性嚢胞腎を合併した低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病の1症例、第46回日本小児内分泌学会学術集会: 12.09.27-29, 大阪

22) 窪田拓生, 北岡太一, 三浦弘司, 大幡泰久, 三善陽子, 藤原 誠, 山本景子, 難波範行, 武鏈真司, 山本威久, 大園恵一: ビタミンD欠乏性くる病の診断における血清 FGF23 濃度の有用性、第22回臨床内分泌代謝 Update: 13.01.18-19, さいたま

23) 三浦弘司, 難波範行, 大園恵一, 道上敏美: ナトリウム利尿ペプチド受容体Bの機能獲得型変異に伴う高身長家系 -内分泌学的検討-、第84回日本内分泌学会学術総会: 11.04.21-23, 神戸

24) 大園恵一: 現代の栄養欠乏としての

ビタミンD欠乏、日本ビタミン学会第63回大会
: 11.06.04-05,
広島

25) 三浦弘司, (他5名), 大園恵一, (他4名): ナトリウム利尿ペプチド受容体Bの機能獲得型変異はヒトおよびマウスにおいて成長促進と低骨密度をもたらす、第29回日本骨代謝学会学術集会: 11.07.28-30, 大阪

26) 大幡泰久, (他4名), 大園恵一, 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: 11.07.28-30, 大阪

27) 大園恵一: 小児科医が知っておくべき骨系統疾患、第23回奈良小児内分泌研究会(特別講演): 11.10.27, 橿原

28) 大園恵一: 周産期のカルシウムリン代謝、第19回 Bone Research Joint Meeting: 11.11.08, 吹田

29) 宮川和晃, 大園恵一, (他6名): リン代謝における骨細胞の機能-Hypマウスを用いた解析、第29回小児代謝性骨疾患研究会: 11.12.03, 東京

2. 海外

口頭発表 13件

原著論文による発表 15件

それ以外(レビュー等)の発表 0件

そのうち主なもの

論文発表

1) Fujiwara M, (他7名), Ozono K. Detection and characterization of two novel mutations in the HNF4A gene in maturity-onset diabetes of the young type 1 in two Japanese families. *Horm Res Paediatr*, 79(4): 220-226, 2013.

2) Robinson JW, Dickey DM, Miura K, Michigami T, Ozono K, Potter LR. A human skeletal overgrowth mutation increases maximal velocity and blocks desensitization of guanylyl cyclase-B. *Bone*, 56(2): 375-382, 2013.

3) Tatton-Brown K, (他17名), Ozono K, Patton M, Rankin J, Shears D, Simon M, Splitt M, Strenger V, Stuurman K, Taylor C, Titheradge H, Van Maldergem L, Temple IK, Cole T, Seal S; Childhood Overgrowth Consortium, Rahman N. Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am J Med Genet A*, 161(12): 2972-2980, 2013.

4) Meguri K, (他5名), Ozono K. Therapeutic efficacy and safety of GH in Japanese children with down syndrome short stature accompanied by GH deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol*, 22(4): 65-72, 2013.

5) Fujisawa Y, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, Ogata T. Identification of AP2S1 mutation and effects of low calcium formula in an infant with hypercalcemia and hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(12): E2022-2027,

2013.

6) Kubota T, (他9名), Ozono K. Serum fibroblast growth factor 23 is a useful marker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. *Horm Res Paediatr*, Epub ahead of print, 2013.

7) 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.

8) Abe S, (他5名), Ozono K. Monocarboxylate transporter 10 functions as a thyroid hormone transporter in chondrocytes. *Endocrinology*, 153(8): 4049-4058, 2012.

9) Otomo T, Hossain MA, Ozono K, Sakai N. Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolidosis II skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 105(2): 266-269, 2012.

10) Ohata Y, (他10名), Ozono K. Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(6): E943-E947, 2011.

11) Miura K, (他10名), Ozono K. A male patient with humoral hypercalcemia of malignancy (HHM) with leukocytosis caused by cutaneous squamous cell carcinoma resulting from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Pediatr Endocrinol*, 20(3): 65-71, 2011.

12) Kitaoka T, (他7名), Ozono K. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab*, 29(5): 598-605, 2011.

13) Otomo T, (他3名), Ozono K. Elevated bone turnover in an infantile patient with mucopolidosis II: No association with hyperparathyroidism. *Clin Pediatr Endocrinol*, 20(1): 7-12, 2011.

14) Otomo T, Higaki K, Namba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 286(40): 35283-35290, 2011.

15) Hashimoto N, (他12名), Ozono K. SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome. *J Hum Genet*, 56(12): 846-851, 2011.

学会発表

1) Fujiwara M, Namba N, Kawai M, Yamamoto K, Miura K, Kitaoka T, Kubota T, Ozono K: Thyroid hormone transporter expression in the murine anterior pituitary lobe. 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology: 13.09.19-22, Milan, Italy

- 2) Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Ozono K, Michigami T: Fetal stage-specific mineral metabolism in Hyp mice is associated with effects of FGF23 on placenta. ASBMR 2013 Annual Meeting (2013 ASBMR Young Investigator Award): 13 . 10. 04-07, Baltimore, USA
- 3) Kubota T, Kitaoka T, Ohata Y, Fujiwara M, Miura K, Miyoshi Y, Namba N, Takeyari S, Yamamoto T, Ozono K: Usefulness of serum fibroblast growth factor 23 levels in the diagnosis and management of vitamin D-deficient rickets. ASBMR 2012 Annual Meeting: 12 . 10. 12-15, Minneapolis, USA
- 4) Miura K, (他 5 名), Ozono K: Three-generation dominant transmission of tall stature due to gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor B.PAS/ASPR 2011 (PEDIATRIC ACADEMIC SOCIETIES and ASIAN SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH): 11.04.30-05.03, Denver, USA
- 5) Miyoshi Y, (他 4 名), Ozono K: Serum triiodothyronine to thyroxine ratio in a child with T3-predominant graves disease. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo: 11.06.04-07, Boston, USA
- 6) Fujiwara M, (他 7 名), Ozono K: Two novel mutations of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha in maturity-onset diabetes of the young 1 in Japan. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo: 11.06.04-07, Boston, USA
- 7) Ozono K: Tall stature and macrodactyly due to a gain-of-function mutation of NPR-B. 2011 GeNeSIS Investigators Meeting: 11.06.24-26, Vienna, Austria
- 8) Ozono K: Osteoporosis and osteopetrosis in the young. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting held in conjunction with the ANZBMS Annual Scientific Meeting and JSBMR: 11. 09. 04-08, Gold Coast, Australia
- 9) Miura K, (他 9 名), Ozono K: A gain-of-function type mutation of the natriuretic peptide receptor B causes acceleration of skeletal growth and osteoporotic change in humans and mice. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting held in conjunction with the ANZBMS Annual

- Scientific Meeting and JSBMR: 11.09.04-08, Gold Coast, Australia
- 10) Ohata Y, (他 4 名), 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 held in conjunction with the ANZBMS Annual Scientific Meeting and JSBMR: 11.09.04-08, Gold Coast, Australia
- 11) Miyagawa K, Ozono K, (他 5 名): 1,25(OH)₂D and PTH Up-regulate Rankl while Down-regulate PheX and Dmpl in Primary Osteocytes Isolated from Mouse Bones. ASBMR 2011 Annual Meeting : 11.09.16-20, San Diego, USA
- 12) Ozono K: management of patients with achondroplasia/hypochondroplasia.(Invited lecture): 11.11.22, Seoul, Korea
- 13) Ozono K: Recent advances in research and clinical practice for rickets.the Research Center for Rare Disease (Invited lecture): 11. 11. 23, Seoul, Korea

G.知的所得権の取得状況

1. 特許の取得
特許なし
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 25 年度分担研究報告書

X連鎖性低リン血症性くる病(XLH)の治療指針の策定に関する研究

研究協力者 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

X連鎖性低リン血症性くる病(XLH)は *PHEX* 遺伝子の変異に基づき、骨芽細胞 / 骨細胞における FGF23 産生増加により低リン血症、ビタミン D 活性化障害が引き起こされることから、骨芽細胞 / 骨細胞の内在的な機能異常が XLH の病態形成に大きく関与することが示唆される。そこで、*Phex* 遺伝子に欠失を有する *Hyp* マウスを XLH のモデルとして用いて、骨芽細胞 / 骨細胞の機能異常について詳細に解析した。単離骨芽細胞 / 骨細胞を用いた検討から、*Hyp* マウスの骨芽細胞 / 骨細胞においては *Fgf23* に加えて *Dmp1* 及び *Fam20c* の発現が増加している事を明らかにした。さらに、*Hyp* の骨細胞においては、*Fgf1*、*Fgf2* 及び複数の FGF 受容体 (FGFR) の遺伝子発現が増加しており、FGF/FGFR シグナルの増強が示唆された。野生型マウスおよび *Hyp* マウスより単離した骨芽細胞、骨細胞に 1,25 位水酸化ビタミン D₃ を添加し、遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、*Hyp* 由来細胞においては 1,25 位水酸化ビタミン D₃ に対する応答性の低下が示唆された。また、マウス軟骨器官培養系を用いた検討から、XLH で認められる低身長には、FGF23 の軟骨に対する直接的な成長抑制作用が関与している可能性があることを見いだした。さらに、*Hyp* マウスの妊娠においては、母体の FGF23 が胎盤に直接作用し、ビタミン D の不活性化酵素である 24 位水酸化酵素の発現を誘導することにより胎仔のビタミン D 代謝に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの成績は高 FGF23 血症抑制が本疾患の治療薬となることを示唆している。

H. 研究目的

X連鎖性低リン血症性くる病(XLH)は、*PHEX* 遺伝子の機能喪失変異に基づき、骨での FGF23 産生増加により低リン血症及びビタミン D の活性化障害が引き起こされる代表的な FGF23 関連性くる病である。FGF23 の主たる産生細胞は骨細胞であり、また、XLH の責任分子である *PHEX* や *ARHR* の責任分子である *DMP1* も骨細胞に比較的特異的に発現しているところから、リン代謝における骨細胞の重要性が示唆されているが、これらの多彩な分子群の発現制御や機能的連関の詳細については不明な点が多い。XLH に対しては従来、リン酸塩と活性型ビタミン D の投与が行われてきたが、これらの治療は FGF23 産生をさらに増加させ、病態を増悪させる可能性がある。また、XLH の骨組織においては、骨細胞周囲に低石灰化領域が認められ、治療後にも残存するところから、骨芽細胞 / 骨細胞の機能異常が推定されてきた。こうした背景から、本研究においては、XLH のモデルである *Hyp* マウスを用いて骨芽細胞 / 骨細胞の機能異常を詳細に解析し、リン代謝関連分子の発現制御機構を明らかにすることにより、XLH の病態を明らかにし、効果的な治療プロトコールの確立に寄与することを目的とする。

I. 研究方法

(ア) マウス骨からの骨芽細胞 / 骨細胞の単離

Phex 遺伝子の 3'側に欠失を有し、XLH のモデルとして確立されている *Hyp* マウスを実験に用いた。雄性 *Hyp* (*Phex*^{*Hyp*}/*Y*) あるいは野生型 (WT) 成獣マウスより無菌的に長管骨を摘出、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、各ステップで遊離する細胞を回収することにより、骨芽細胞及び骨細胞を分化度に依りて段階的に 9 つの Fraction として単離した。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、Fraction 3-5 を骨芽細胞、Fraction 6-9 を骨細胞に富む細胞集団として実験に用いた。

(イ) 遺伝子発現解析

上記の方法で単離した初代骨芽細胞、骨細胞より RNA を抽出し、TaqMan® システムによる real-time PCR を用いて遺伝子発現を検討した。

(ウ) 野生型及び *Hyp* マウス由来骨芽細胞、骨細胞に対する活性型ビタミン D の作用

上記の方法で単離した初代骨芽細胞、骨細胞を I 型コラーゲンゲルに包埋培養し、10⁻⁸ M の 1,25 位水酸化ビタミン D₃ [1,25(OH)₂D₃] または vehicle を添加して 24 時間培養し、遺伝子発現を検討した。

(エ) マウス中足骨軟骨に対する FGF23 の作用

XLH の低身長に軟骨に対する FGF23 の直接作用が関連している可能性を明らかにするため、野生型マウスの胎仔より採取した中足骨の器官培養系に FGF23 及び可溶性 α -Klotho を添加し、軟骨細胞の増殖や分化に及ぼす影響を検討した。

(オ) 胎盤における FGF23 の作用についての検討

これまで、ヒト胎盤に FGF23 のシグナル伝達に必要な α -Klotho が発現していることを明らかにしていたことから、胎盤における FGF23 の作用についても *Hyp* マウスを用いて検討した。*Hyp* 雌性マウスを野生型雄性マウスと交配し、E18.5 時点の雄性の *Hyp* 胎仔及び同腹の野生型雄性胎仔を解析に用いた。また、対照として、野生型雌性マウスを野生型雄性マウスと交配して得られた胎仔も解析に用いた。これらの胎仔及び母体マウスの血中カルシウム、リン、FGF23 値や、胎盤における遺伝子発現を検討した。さらに、野生型マウス胎盤の器官培養系に *Hyp* 母体血漿や抗 FGF23 中和抗体の添加を行い、影響を検討した。また、野生型妊娠マウスを帝王切開し、胎盤へのリコンビナント FGF23 投与の影響についても検討した。

(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）の動物実験委員会の承認を得て行った。

J. 研究結果

(ア) *Hyp* マウス骨芽細胞 / 骨細胞における遺伝子発現変化

単離した *Hyp* 由来骨芽細胞、骨細胞については WT 細胞と比較して *Fgf23* 発現の増加を認めた。また、常染色体劣性低リン血症性くる病 (ARHR) の責任遺伝子である *Dmp1* の発現についても、*Hyp* 由来細胞では著明に増加していた。また、*Dmp1* をはじめ生物学的石灰化に関わる SIBLINGs ファミリーの蛋白質をリン酸化する分泌型キナーゼで、リン代謝への関与が示唆されている *Fam20c* の発現を検討したところ、*Hyp* 由来の細胞で発現の増加を認めた。さらに、E18.5 の雄性胎仔より摘出した骨の遺伝子発現を検討したところ、*Hyp* 胎仔の骨では野生型胎仔の骨と比較して *Fgf23*、*Dmp1* 及び *Fam20c* の発現がいずれも増加していた。

最近、マウスを用いた解析から、*Phex* や *Dmp1* が FGF 受容体 (FGFR) 経路を介して FGF23 の産

生を制御していることが推察されている。そこで、*Hyp* 及び WT マウスより単離した骨細胞において、複数の FGF リガンド及び受容体の発現を検討した。その結果、検討した *Fgf1*、*Fgf2*、*Fgfr1-3* の発現はいずれも *Hyp* 由来骨細胞において増加していた。さらに、FGF/FGFR シグナルの標的遺伝子であることが知られている *early growth response-1 (Egr-1)* の発現についても *Hyp* 骨細胞で増加が認められ、FGF/FGFR シグナルの増強が示唆された。

(イ) *Hyp* マウス及び WT マウス骨芽細胞 / 骨細胞の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 応答性の比較

Hyp 及び WT マウス長管骨より単離した骨芽細胞 (Fr.3-5)、骨細胞 (Fr.6-9) を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 を添加し、24 時間インキュベートして遺伝子発現を検討した。その結果、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は WT 骨芽細胞における *Fgf23* 発現を増加させたが、*Hyp* 骨芽細胞における *Fgf23* 発現は変化させなかった。骨細胞における *Fgf23* 発現は、WT、*Hyp* のいずれにおいても、24 時間の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処理により明らかな変化を来さなかった。WT 骨細胞における *Dmp1* の発現は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加により著明に抑制された。*Vitamin D receptor (Vdr)* の発現については、WT 及び *Hyp* の骨芽細胞で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加により有意に増加したが、骨細胞においては有意な増加を認めなかった。*Hyp* 骨芽細胞において $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加により *Fgf23* の発現が変化しなかったこと、*Vdr* の発現増加が WT と比べて小さかったことから、*Hyp* 細胞においては WT と比較して $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する応答性が低下していることが推察された。

(ウ) 軟骨における FGF23 の直接作用

野生型マウス胎仔より摘出した中足骨を器官培養に供し、FGF23 の添加実験を行った。その結果、可溶性 α -Klotho の存在下では FGF23 の添加により中足骨軟骨細胞の増殖が障害され、成長の抑制をきたすことが明らかとなった。

4) 胎盤における FGF23 の作用

マウスにおいても、ヒトの場合と同様に、胎盤の胎仔血と母体血との界面に相当する領域に α -Klotho と FGF 受容体の発現を確認した。*Hyp* 母体は野生型母体と比較して低リン血症を示し、FGF23 値が上昇していた。胎仔の血清カルシウム及びリン値については、*Hyp* 母体の *Hyp* 胎仔、同腹の野生型胎仔、野生型母体の胎仔の 3 群間で差を認めなかった。興味深いことに、*Hyp* 胎仔においては母体よりもさらに 20 倍も高い、著明な高 FGF23 血症を認めた。このことは、前述した *Hyp* 胎仔骨における *Fgf23* の発現増加と一致する結果であった。一方、同腹の野生型胎仔においては、野生型母体由来の胎仔と同様に、血中 FGF23 値は低い値を示した。次に胎盤

における遺伝子発現を検討したところ、*Hyp* 母体由来の胎仔の胎盤においては、胎仔の遺伝子型に関わらず、ビタミン D-24 位水酸化酵素遺伝子(*Cyp24a1*)の発現増加を認めた。また、*Hyp* 母体由来の胎仔においては、胎仔の遺伝子型に関わらず、24 位水酸化酵素の主たる基質である 25 位水酸化ビタミン D 値が野生型母体の胎仔と比較して有意に低下していた。*Hyp* 母体由来の胎仔の胎盤における *Cyp24a1* の発現増加が FGF23 の胎盤に対する直接作用であることを確認するため、野生型母体由来の胎仔の胎盤の器官培養系に *Hyp* 母体あるいは野生型母体由来の血漿を添加したところ、*Hyp* 母体由来の血漿を添加した胎盤では *Cyp24a1* の発現増加を認め、この発現増加は抗 FGF23 中和抗体の同時添加により解除された。また、野生型妊娠マウスを麻酔下にて帝王切開し、胎盤へのリコンビナント FGF23 の直接注入を行ったところ、*Cyp24a1* の発現増加を認めた。

K. 考察

単離骨芽細胞 / 骨細胞を用いた検討から、*Hyp* マウスにおける *Phex* の機能喪失は *Fgf23* に加えて *Dmp1* 及び *Fam20C* の骨芽細胞 / 骨細胞における発現増加をもたらすことが明らかとなった。*Dmp1* や *Fam20c* の機能喪失は FGF23 の産生増加をもたらすことが報告されており、今回、*Hyp* 骨細胞において *Fgf23* と *Dmp1*, *Fam20c* の発現が共に増加していたことは興味深い。また、*Hyp* 骨細胞においては *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgfr1-3* 及び *Egr-1* の発現がいずれも増加していたことから、FGF/FGFR シグナルが増強していることが推察され、この骨細胞における FGF/FGFR シグナルの増強が *Hyp* の病態形成に関与している可能性がある。

XLH においては現在、リン製剤と活性型ビタミン D の併用投与による治療が行われているが、身長予後についてはかならずしも満足できる治療効果が得られているとは言えない。マウス中足骨器官培養系を用いた今回の検討により、*Hyp* の血中に高濃度に存在する FGF23 が軟骨に直接作用し、軟骨細胞の増殖を抑制して成長障害を引き起こす事が示唆された。最近、XLH をはじめとする FGF23 関連性くる病に対する新規の治療法として、FGF23 に対する中和抗体が開発され、現在治験が行われている。今後、抗 FGF23 抗体の投与が身長予後に及ぼす影響についても検討する必要がある。

Hyp マウスにおいて、胎仔期より骨での *Fgf23* の発現が増加しており、また *Hyp* 胎仔の血中 FGF23 値が著明な高値を示したことから、出生後、胎盤を介する母体からのリン供給の途絶にともない、症状が出現することが予測される。また、*Hyp* 母体由来の野生型胎仔においては、野生型母

体由来の胎仔と同様に血中 FGF23 値が低い値を示したことから、母体の FGF23 は胎盤を通過しないか、あるいは、通過後速やかに分解されることが示唆される。従って、XLH 妊婦の管理においては、児の出生後、速やかに FGF23 測定を行い、児が XLH に罹患しているかどうかを診断し、早期に治療を開始することが身長予後の改善につながると考えられる。今回の検討で、*Hyp* 母体の胎仔においては、胎仔の遺伝子型に関わらず、胎盤における *Cyp24a1* の発現が増加しており、血中 25 位水酸化ビタミン D が低下していた。このことは、*Hyp* 母体の胎仔はビタミン D 欠乏のリスクが高いことを示唆し、この知見がヒトの XLH においても当てはまるかどうか、今後検討する必要がある。

L. 結論

XLH の病態形成においては、骨芽細胞 / 骨細胞における多彩なリン・ビタミン D 代謝関連分子群の機能的連関の破綻が関与していることが示唆された。また、XLH における低身長には FGF23 の軟骨に対する直接作用が影響していることが推察された。

XLH における FGF23 の過剰産生は出生前から存在していると推察され、XLH 妊婦の管理においては、児の出生後速やかに FGF23 測定を行うことが早期診断に有用である。また、FGF23 は胎盤に直接作用し、胎児のビタミン D 代謝に影響を及ぼす事が明らかとなった。これらの成績より、高 FGF23 血症抑制が本疾患の治療薬となることが示唆された。

M. 研究発表

3. 論文発表

- 1) Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. 2013. Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm dependent manner. *J Biol Chem*, 289:1457-1466.
- 2) Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Okano T, Ozono K, Michigami T. 2014. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of *Hyp* mice. *J Bone Miner Res*, Jan 28. E-pub.
- 3) Michigami T. 2013. Extracellular phosphate as a signaling molecule. *Contrib Nephrol*, 180:14-24.
- 4) Michigami T. 2013. Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 70:4213-

4221.

4. 学会発表

- 1) Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Ozono K, Michigami T. Fetal stage-specific mineral metabolism in *Hyp* mice is associated with effects of FGF23 on placenta. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.
- 2) Nishino J, Miyagawa K, Kawai M, Yamazaki M, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Signaling of extracellular inorganic phosphate induces the expression of *Dmp1* in osteoblast/osteocytes lineage cells via Na^+/Pi Co-transporter and MEK/ERK pathway. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.
- 3) Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. 2013. Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm dependent manner. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.

N. 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 25 年度分担研究報告書

常染色体優性低カルシウム血症の治療指針の策定に関する研究：
骨・ミネラル代謝調節機構およびその異常による疾患に関する研究

研究要旨：近年、数多くの副甲状腺ホルモン分泌不全による副甲状腺機能低下症の病因が明らかにされた。このうち、カルシウム (Ca) 感知受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) 遺伝子活性型変異による常染色体優性低 Ca 血症 (autosomal dominant hypocalcemia: ADH) は、活性型ビタミン D₃ 製剤治療により腎機能障害が惹起されやすいことから、他の病因と区別する必要がある。我々は CaSR 遺伝子変異を有する患者の病態の検討により、変異 CaSR の活性化の程度に応じ異なる臨床病型を呈することを明らかにした。今後これらの知見をより多数例で検証することにより、ADH を臨床的に鑑別する方法を確立することが望まれる。

A. 研究目的

副甲状腺機能低下症は、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone: PTH) 作用障害により低カルシウム (Ca) 血症や高リン血症を呈する疾患である。近年、数多くの PTH 分泌不全による副甲状腺機能低下症の病因が明らかにされた。このうち、Ca 感知受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) 遺伝子活性型変異による常染色体優性低 Ca 血症 (autosomal dominant hypocalcemia: ADH) では、活性型ビタミン D₃ 製剤治療により腎機能障害が惹起されやすいことが知られている。従って ADH を他の病因による副甲状腺機能低下症と鑑別することが必要である。しかし、臨床的にこれらの疾患を鑑別する方法は確立されていない。そこで本検討では、副甲状腺機能低下症患者の臨床病型と CaSR 遺伝子変異の関係を検討することにより、ADH 患者の臨床病型を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

21 名の PTH 分泌不全による副甲状腺機能亢進症患者を対象とし、臨床像と共に CaSR 遺伝子変異を PCR 産物の直接シーケンスで検討した。変異 CaSR を *in vitro* で発現させ、細胞外 Ca 濃度を变化させた場合の細胞内 Ca の変動を、ルシフェラーゼレポーターを用いて測定することにより、変異 CaSR の機能を評価した。(倫理面への配慮)
CaSR 遺伝子の検討にあたっては、当該施設の倫理委員会の承認のもと、患者の同意を得て行った。

C. 研究結果

21 例中 11 例に 6 種類の CaSR 遺伝子変異を認めた。*In vitro* の機能解析では、これら 6 種類の変異は、すべて活性型変異であることが確認できた。ADH 患者では、a. 低 Ca 血症、正 PTH 血症を示す例、b. 低 Ca 血症、低 PTH 血症、低マグネシウム (Mg) 血症を呈する例、および c. 低 Ca 血症、低 PTH 血症、低 Mg 血症に Bartter 症候群 5 型の病態を示す例が存在した。また a の症例では、低 Ca 血症に反応して PTH 分泌の亢進が認められた。さらに変異 CaSR の活性化の程度は、 $a < b < c$ の順に高かった。一方 CaSR 遺伝子変異を有さない例では、低 Mg 血症や Bartter 症候群 5 型の病態は認められず、低 Ca 血症に反応して血中 PTH 濃度が上昇する例も存在しなかった。

D. 考察

CaSR は、副甲状腺細胞において PTH 分泌を調節することに加え、腎尿細管にも発現している。腎臓での CaSR の活性化は、ヘンレ上行脚の管腔側に発現する renal outer medullary potassium channel (ROMK) の抑制などにより、Ca や Mg、さらにはナトリウムやカリウムの再吸収を抑制するものと考えられている。従って変異 CaSR の活性化の強い場合には、低 Mg 血症や Bartter 症候群の病態が合併するものと考えられる。一方、低 Mg 血症や Bartter 症候群を伴う ADH 患者の PTH は常に低値であり、低 Ca 血症によっても変化しなかったのに対し、低 Ca 血症のみを示す ADH 患者の PTH は血中 Ca 濃度の低下に反応して上昇した。このことも、副甲状腺における CaSR の活性化の程度による

ものと考えられる。今後より多数例での検討が必要であるが、低 Mg 血症や Bartter 症候群の合併、あるいは低 Ca 血症に応じて PTH 分泌が亢進する副甲状腺機能低下症では、特に CaSR 遺伝子活性化型変異を考慮する必要があるものと考えられる。

E. 結論

CaSR 遺伝子活性化変異は、変異受容体の活性化の程度に応じて異なる病態を惹起する。これらの特徴により、臨床的に ADH を他の PTH 不足性副甲状腺機能低下症から鑑別する方法を確立する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kinoshita Y, Hori M, Taguchi M, Watanabe S, Fukumoto S: Functional activities of mutant calcium-sensing receptors determine clinical presentations in patients with autosomal dominant hypocalcemia. **J Clin Endocrinol Metab** 99(2): E363-E368, 2014.

2) Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, Hirohama D, Majtan B, Shimizu Y, Yatomi Y, Fukumoto S, Fujita T, Shimosawa T: Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. **Kidney Int** in press

3) Okamoto T, Taguchi M, Osaki T, Fukumoto S, Fujita T: Phosphate enhances reactive oxygen species production and suppresses osteoblastic differentiation. **J Bone Miner Metab** in press

4) Nakamura T, Aizawa T, Hoshikawa T, Ozawa H, Ito N, Fukumoto S, Itoi E, Kokubun S: Tumor-induced osteomalacia caused by

phosphaturic mesenchymal tumor of the cervical spine. **J Orthop Sci** in press

2. 学会発表

1) Kinoshita Y, Hori M, Taguchi M, Watanabe S, Fukumoto S: Functional activity of calcium-sensing receptor determines clinical presentations in patients with autosomal dominant hypocalcemia. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (Kobe, Japan). **IBMS BoneKEy** 10: S15.

2) Takeyari S, Yamamoto T, Michigami T, Hasegawa K, Tanaka H, Imanishi Y, Fukumoto S, Kitaoka T, Ozono K: A patient with hypophosphatemic osteomalacia complicated by the ossification of posterior longitudinal ligament. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (Kobe, Japan). **IBMS BoneKEy** 10: S70.

3) Hori M, Shimizu Y, Kinoshita Y, Taguchi M, Fukumoto S: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhances fibroblast growth factor-23 expression by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (Kobe, Japan). **IBMS BoneKEy** 10: S100.

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

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 25 年度分担研究報告書

常染色体優性低カルシウム血症(ADH)治療指針の策定に関する研究

分担研究者 松本俊夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

分担研究者 福本誠二 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 講師

共同研究者 遠藤逸朗 徳島大学病院 内分泌代謝内科 講師

研究要旨:

我々はこれまでに Calcilytics による常染色体優性低 Ca 血症 (ADH) 治療の有効性について *in vitro* の系で示してきた。今回、我が国で報告されている Ca 感知受容体 (CaSR) 活性型変異 C129S および A843E をマウス CaSR ルーカスに導入し、calcilytics の添加が CaSR シグナルに及ぼす影響について解析した。これらのノックインマウスでは、ADH の表現型が確認できた。さらに Calcilytics は、用量依存的にノックインマウスの Ca パラメーターを改善させるとともに、腎石灰化を消失させた。以上の結果から、*in vivo* の系においても ADH に対して calcilytics が特効薬としての効果を示す可能性が示された。

A. 研究目的

カルシウム感知受容体(CaSR)活性型変異による常染色体優性低Ca血症(ADH)では、低Ca、高P血症といった副甲状腺機能低下症と同様の所見がみられる。ADHの治療においては、活性型ビタミンD₃投与は高Ca尿症をきたしやすく、腎石灰化、腎結石、腎不全のリスクとなることが知られている。また、PTH補充においても、腎結石や骨石灰化異常が出現することから、本症に対しては新たな治療法の確立が必要である。一方、calcilyticsはCaSR阻害作用を介してPTH分泌促進作用を有することから、ADH治療に利用できる可能性があると考えられる。われわれはこれまでに、HEK細胞に我が国で報告されている7種のヒトCaSR活性型変異を導入した系においてcalcilyticsが用量依存的なCaSR阻害作用を発揮すること、すなわちADHの病態を是正しうることを示している。今回はさらにin vivoの系においてcalcilyticsがADHの病態を是正し得るかどうかを検討した。

B. 研究方法

ADH活性型変異、C129S、A834EをマウスCaSRルーカスに導入したノックインマウスを作製し、このマウスを用いてcalcilyticsのCaパラメーターに対する効果を検討した。

C. 研究結果

ノックインマウスにおいては、血清Caの低下、血清Pの上昇、尿中Ca排泄の増加、尿中cAMPおよび腎CYP27b1 mRNA発現低下、血清1,25D濃度の低下、腎石灰化など、ADHの表現型を再現できていた。さらにヒトにおいてより重症の表現型を示すA843Eを導入したマウスでは、これらのパラメーターはC129Sマウスと比して重篤であった。Calcilytics投与により、ノックインマウスではPTHの分泌上昇を伴い、これらCaパラメーターの改善が用量依存的に認められた。また、C129Sノックインマウスにおいてcalcilyticsを12週間投与したところ、腎石灰化は消失した。

D. 考察

Calcilyticsは、ノックインマウスにおけるADH表現型を是正したことから、ADHの特効薬たり得る可能性が示された。今後は、至適投与量の決定、あるいは長期投与

における骨および腎の詳細な組織学的検討を活性型ビタミンD₃、PTH製剤投与との比較で行う予定である。

E. 結論

Calcilyticsはin vivoの系においてもADHの特効薬たり得る可能性が示された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

5. 論文発表

1. Kuriwaka-Kido R, Kido S, Miyatani Y, Ito Y, Kondo T, Omatsu T, Dong B, Endo I, Miyamoto K-I, Matsumoto T 2013 Parathyroid Hormone (1-34) Counteracts the Suppression of Interleukin-11 Expression by Glucocorticoid in Murine Osteoblasts: A Possible Mechanism for Stimulating Osteoblast Differentiation against Glucocorticoid Excess. **Endocrinology**, 154:1156-67
2. Hagino H, Takano T, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T, Matsumoto T 2013 Eldecalcitol reduces the risk of severe vertebral fractures and improves the health-related quality of life in patients with osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, 31:183-9
3. Hagino H, Shiraki M, Fukunaga M, Nakano T, Takaoka K, Ohashi Y, Nakamura T, Matsumoto T, 2013 [Number and severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral fractures in Japanese women with osteoporosis: results from the minodronate trial.](#) **J Bone Miner Metab**, 31:544-50
4. Tamaki J, Iki M, Kadowaki E, Sato Y, Chiba Y, Akiba T, Matsumoto T, Nishino H, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H. Biochemical markers for bone turnover

predict risk of vertebral fractures in postmenopausal women over 10 years: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. **Osteoporos Int** 2013;24:887-97.

5. Nakamura T, Takano T, Fukunaga M, Shiraki M, Matsumoto T. Eldecalcitol is more effective for the prevention of osteoporotic fractures than alfacalcidol. **J Bone Miner Metab** 2013;31:417-22.

6. Leblanc A, Matsumoto T, Jones J, Shapiro J, Lang T, Shackelford L, Smith SM, Evans H, Spector E, Ploutz-Snyder R, Sibonga J, Keyak J, Nakamura T, Kohri K, Ohshima H. Bisphosphonates as a supplement to exercise to protect bone during long-duration spaceflight. **Osteoporos Int** 2013;24:2105-14.

7. Kato S, Endo I, Fujimura M, Kuriwaka-Kido R, Fujinaka Y, Aihara K, Iwase T, Inoue D, Akaike M, Abe M, Matsumoto T. Serum carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as a surrogate marker for

vulnerable plaques in atherosclerotic patients: a pilot study. **Atherosclerosis** 2013;229:182-5.

6. 学会発表

1. 近藤 剛史, 尾松 卓, 董 冰子, 大西 幸代, 相澤 慎一, 遠藤 逸朗, 松本 俊夫 :
インターロイキン(IL)-11は骨形成促進に必要である。第86回日本内分泌学会学術集会, 2013年4月(仙台市: 仙台国際センター)

2. 近藤 剛史, 岩佐 昌実, 大黒 由加里, 倉橋 清衛, 黒田 暁生, 遠藤 逸朗, 粟飯原 賢一, 松久 宗英, 松本 俊夫 :
動が惹起した高カルシウム血症で頻回の意識障害を来した一例, 第13回日本内分泌学会四国支部学術集会, 2013年9月(高松市: サポート高松)

H. 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 25 年度分担研究報告書

ビタミン D 不足・欠乏症診療ガイドラインの改訂：
生活習慣病におけるビタミン D 代謝に関する研究

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 ビタミン D 欠乏・不足は種々の生活習慣病においても重要な骨折リスク因子であるとともに、心血管イベントや糖・脂質代謝異常そのもののリスクをも高める。現在のところビタミン不足の閾値は骨・カルシウム代謝異常を主なアウトカムとして規定されているが、生活習慣病におけるビタミン D の特異的な意義や役割については充分検討されていない。本研究では慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の男性患者におけるビタミン D 代謝について検討を行った。その結果、25D 値の平均値および分布は既報の他コホートと大きな差異はなかった。しかし、一般的に観察される 25D と PTH との負の相関関係は認められず、1,25D と PTH との間に正の相関がみられた。25D、PTH が共に低値の群では組織虚血の

マーカーである GDF-15 の血中濃度が上昇していた。したがって、ビタミン D の充足状態が PTH 分泌や骨代謝に与える影響は疾患特異的である可能性がある。

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す、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。

一方、ビタミン D 欠乏・不足は種々の生活習慣病における骨折リスク因子であるとともに、心血管イベントや糖・脂質代謝異常そのもののリスクをも高める。したがって生活習慣病におけるビタミン D 充足の意義や閾値には疾患特異性がある可能性が考えられる。昨年度の本研究では、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 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、ビタミン D の抗動脈硬化作用には血管や心臓局所で活性化を受けた 1,25D

とともに循環血中の 1,25D が脂質代謝の改善を介して独立に寄与している可能性があること、などを示した。

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 男性の続発性骨粗鬆症の原因として筆頭に上がる疾患であり、ビタミン D 不足は重症例により高頻度に合併し、COPD 合併骨粗鬆症のリスクとなることが知られている。しかしながら COPD に合併する骨折やビタミン D 代謝異常に関しては国内ではほとんど検討成績がない。そこで今回、COPD における骨粗鬆症およびビタミン D 不足の実態と意義について検討を行った。

B. 研究方法

帝京大学ちば総合医療センターおよび市原市鎗田病院で COPD と診断された 136 名において、胸腰椎 x 線検査、DXA 法による骨密度測定、呼吸機能検査、25D を含むカルシウム代謝関連指標を測定し、関連性を検討した。

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) COPD 男性 136 例(平均年齢 71.6±8.9 歳)において、極めて高率に椎体骨折 (79.4%) の合併がみられた。多変量解析において、椎体骨折の有無には一秒率が、椎体骨折数には標準一秒量が、各々独立の貢献因子として寄与していた。

2) 25D 濃度を測定し得た 43 名(平均年齢 70.5±5.1 歳)のサブ解析において、25D 濃度は 22.5±6.2 ng/ml であった。ヒストグラムにおける分布にも明らかな偏りはみられなかった。

3) 一般的に 25D は PTH と負に相関することが知られており、CHIBA study の cohort においても確認されている。COPD 患者においては 25D と PTH との間に相関関係は認められず、1,25D と PTH との間に有意な正相関がみられた。

4) 組織虚血や酸化ストレス関連する GDF-15 の濃度は既報の同年齢者よりも 1.5 倍程度上昇していた。

5) 25D、PTH の値の高低で 4 群に分けて検討すると、25D 低値かつ PTH 低値群においては、他群に比して血中 GDF-15 濃度が有意に上昇していた。

6) 25D は大腿骨頸部骨密度と正相関、肺活量と正相関がみられた。BMI は一般に 25D と負に相関することが知られているが、本検討では有意な正相関がみられた。

D. 考察

1) COPD 男性患者の 25D 濃度の平均値および分布は国内での他の報告や CHIBA study cohort とほぼ同等のレベルであり、特徴的な所見は見られなかった。

2) 25D が低値であるにもかかわらず PTH が上昇しない例が多い理由は不明であるが、COPD における低酸素状態や酸化ストレスが関与している可能性が示唆される。

3) COPD の進行とともに BMI が低下することが知られており、やせは COPD 患者における骨折の有意なリスク因子である。今回の結果から、本来みられるはずの BMI と 25D との負相関よりも COPD 重症度と 25D との関係の方が強いことが示唆された。

E. 結論

1) 冠動脈疾患患者や COPD 患者において 25D 濃度の平均値や分布に特徴的な変化はみられない。

2) COPD 患者においてビタミン D と PTH、BMI との関係は他疾患と異なるユニークなパターンを示すことが示された。ビタミン D 不足に伴う骨粗鬆症のリスクに対して、これらの変化がどのような影響を与えるのかを明らかにする必要がある。

F. 研究発表

7. 論文発表

8. なし

9. 学会発表

1) 第22回臨床内分泌Update
(1/18-19/2013、さいたま)
高Ca血症、多発関節炎、肝障害、IgG4高値を呈した若年性骨粗鬆症
渡部玲子、井上大輔、田井宣之、平野順子、岡崎亮

2) 第86回日本内分泌学会学術総会

(4/25-27/2013、仙台)

閉経後女性における残存エストロゲンとゴナドトロピンの意義：

動脈硬化危険因子、骨代謝、腎機能との関連
井上大輔、天木幹博、田井宣之、渡部玲子、平野順子、中村文隆、岡崎亮

3) 第86回日本内分泌学会学術総会

(4/25-27/2013、仙台)

尿細管性アシドーシスの治療前後における骨代謝マーカーの変化

田井宣之、渡部玲子、田中輝行、平野順子、井上大輔、岡崎亮

4) 第30回日本骨代謝学会学術集会 IBMS-JSBMR

Japan day (5/30/13、神戸)

慢性閉塞性肺疾患における椎体骨折の頻度および重症度に関する検討

渡部玲子、井上大輔、岡崎亮

5) 第15回日本骨粗鬆症学会

(10/11-13/2013、大阪)

閉経後女性において肺活量の低下は骨粗鬆症のリスク因子となる：長野コホートにおけるサブ解析
渡部玲子、井上大輔、白木正孝、岡崎亮

6) 第23回臨床内分泌代謝Update

(1/24-25/14、名古屋)

妊娠中に発症したビタミンD不足/欠乏症を伴う骨粗鬆症の1例

田井宣之、渡部玲子、平野順子、井上大輔、岡崎亮

7) 2nd Joint Meeting of IBMS and JSBMR

(Kobe, JAPAN, 5/28-6/1/13)

Role for circulating versus locally-activated 1,25-dihydroxyvitamin D in bone and lipid metabolism: a sub-analysis of CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia and Bone Association) study

Daisuke Inoue, Reiko Watanabe, Nobuyuki Tai, Junko Hirano, Toshihiro Amaki, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki

8) IOF Regionals 4th Asia-Pacific Osteoporosis Meeting

(Hong Kong, China 12/12-15/2013)

Prevalence and severity of vertebral fractures and bone loss in Japanese male patients with chronic

obstructive pulmonary disease.

Watanabe R, Inoue D, Tai N, Hirano J, Tanaka T, Aita

K, Hagiya M, Homma T, Okazaki R

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

4. 特許の取得

なし。

5. 実用新案登録

なし

6. 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 25 年度分担研究報告書

ビタミン D 不足・欠乏症診療ガイドラインの改訂：

ビタミン D 不足・欠乏における骨折リスク上昇に関わる因子に関する研究

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

共同研究者 山内美香 島根大学医学部内科学講座内科学第一 講師

研究要旨

これまでに閉経後女性において 25(OH)D 低値が脆弱性骨折のリスク因子であること、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報告した。そこでこの機序について検討を行った。Vitamin D(VD)不足にも関わらず PTH が上昇しない機序の検討のため、低 25(OH)D 高 PTH 群と低 25(OH)D 低 PTH 群で比較したが、PTH 分泌に関わるリン調節因子の FGF-23 や可溶性 Klotho に差は認めなかった。次に、低 25(OH)D 低 PTH 群のみで、PTH の骨形成促進作用に関わる Wnt- カテニンシグナルの阻害因子である sclerostin、Dkk-1、そして

FGF-23 や可溶性 Klotho を脆弱性骨折の有無で比較検討した。ロジスティック回帰分析にて、脆弱性骨折のリスク因子として sclerostin のみが選択された。以上のことから、VD 不足にも関わらず PTH が上昇しない機序に FGF-23、可溶性 Klotho は関与しないこと、VD 不足かつ PTH 分泌低下が骨脆弱性亢進に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)は骨・ミネラル代謝に必須のホルモンであり、その欠乏状態は低Ca血症や低P血症、くる病・骨軟化症の原因となる。また、VD不足程度であっても骨に影響をおよぼし、骨粗鬆症における骨脆弱性に関与する。つまりVDの充足状態を最も反映する25hydroxyvitamin D [25(OH)D]の低値は明らかな骨折リスク因子であることが海外の報告で示されている。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低値が日本人においても年齢、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。VD不足が骨脆弱性に関与する機序として、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関与するとされる。しかし我々は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。そこで、その機序を明らかにするため、VD不足にも関わらずPTHが上昇しない機序に、PTH分泌に関わるリン調節因子であるFibroblast Growth Factor-23 (FGF-23)や可溶性Klothoが関与するか、また、その群における骨脆弱性亢進の機序に、FGF23やKlotho、あるいはPTHの骨作用に重要なWnt-カテニンシグナル阻害因子であるDickkopf-1 (Dkk-1)と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。血液検査において25(OH)D(ng/mL)、Ca(mg/dL)、P(mg/dL)、Cr(mg/dL)、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(P1NP)(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)、FGF-23(pg/ml)、sclerostin(ng/ml)、Dkk-1(pmol/l)を測定した。また、既報(Yamazaki Y et al. BBRC. 398: 513-518. 2010)のELIZA法を用いた方法にて患者血清における可溶性Klotho(pg/mL)濃度を測定した。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。

(倫理面への配慮)

検討したすべての患者からinformed consentを取得しており、当施設の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

対象群の平均年齢は63.4 ± 7.5歳で、脆弱性骨折既往者数は66名であった。

【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群間で年齢、BMI、骨密度、空腹時血糖やHbA1c、Cr、eGFR(estimated glomerular filtration rate)(ml/min/1.73m²)などに差は認めなかった。また、FGF-23(33.4 ± 1.3, 33.4 ± 1.2, p=0.989)、および可溶性Klotho(550 ± 166, 624 ± 380, p=0.268)も2群間で差を認めなかった。

【低25(OH)D低PTH群における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)、sclerostin(1.48 ± 0.38, 1.16 ± 0.38, p<0.01)に2群間で差を認めた。FGF-23(35.1 ± 8.8, 31.7 ± 0.6.8, p=0.20)とDkk-1(6.0 ± 2.4, 5.8 ± 2.4, p=8.35)、可溶性Klotho(549 ± 157, 551 ± 180, p=0.971)は差を認めなかった。

ロジスティック回帰分析にて独立因子として年齢、BMI、Cr、CTX、大腿骨骨密度、FGF-23、Dkk1、可溶性Klotho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 4.8(1.3 – 18.5), p=0.022]。

一方、Cr、あるいは eGFR について sclerostin で補正した場合、Cr、eGFR は低 25(OH)D 低 PTH 群における脆弱性骨折の有意なリスク因子として選択されなくなった。

【低 25(OH)D 低 PTH 群以外の群における脆弱性骨折の有無での比較】

低 25(OH)D 低 PTH 群以外の低 25(OH)D 高 PTH 群、高 25(OH)D 低 PTH 群、高 25(OH)D 高 PTH 群で脆弱性骨折の有無で検討したところ、sclerostin は骨折の有無で差を認めなかった。

D. 考察

25(OH)D 低値、つまり VD 不足による有意な骨折リスク上昇の機序として、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折リスク上昇に関与するとされていた。しかし、これらを同時に検討した報告は少なく、詳細は明らかとなっていない。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。尿細管でのリン再吸収、1.25(OH)₂D の活性化に関与するリン調節因子である FGF-23 は PTH 産生にも関与する。また、

Klotho は膜 1 回貫通型蛋白で膜結合型 Klotho は FGF23 の coreceptor としてリン代謝に関与するが、膜貫通部位で切断され血中に分泌される可溶性 Klotho はリン代謝への関与とともに PTH 分泌との関係の可能性が報告されている(Imura A et al. Science 316:1615-18, 2007)。そこで、この VD 不足にも関わらず PTH が上昇しない機序への FGF-23、可溶性 Klotho の関与を考えたが、2 群間で差を認めなかった。この機序の解明につながる所見は今回得られなかった。

低 25(OH)D 低 PTH 群における骨脆弱性の機序に、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 sclerostin や Dkk-1 を抑制することで骨形成促進作用を発揮するとされる。また、FGF-23 は腎機能の低下とともに上昇するが、軽度の腎障害における骨折リスクに関する報告がある。可溶性 Klotho と骨折との関係は報告がない。低 25(OH)D 低 PTH 群における骨脆弱性の機序にこれらが関与しているか否かを検討したところ、sclerostin が選択された。近年、閉経後女性における sclerostin と骨折の関係についていくつかの研究が報告されているが、sclerostin 高値が骨折リスクとなるとの一致した結果である(Arasu A et al. J Clin Endocrinol Metab 97: 2027, 2012)。Dkk-1 や FGF-23、Klotho は関与しなかった。また、sclerostin が骨折リスクに関する結果は低 25(OH)D 低 PTH 群以外の群ではみられず、本群における骨脆弱性には PTH の骨形成促進作用の減弱が関与する可能性が考えられた。

VD 不足は骨以外にも糖尿病、高血圧、免疫疾患、癌など多くの疾患の発症や進展に関与するとされ、25(OH)D の測定による評価が一般診療で可能となるよう、進められている。しかし、日本人では多くが不足状態であり、その中でもよりリスクが高い例を抽出し介入を行う必要がある。本研究はこの点の解明の一助となりうる。

E. 結論

閉経後女性において、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機序を検討した。VD 不足にも関わらず PTH が上昇できない機序に FGF-23、可溶性 Klotho は関与しないことが明らかとなった。さらに、骨脆弱性が高まる機序について、FGF23、可溶性 Klotho、Dkk-1 は関与しないが、sclerostin が関与することを明らかにした。抗 sclerostin 抗体がこれらの治療薬になる可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

10. 論文発表

1. Yamamoto M, Yamauchi M, Sugimoto T. Elevated sclerostin levels are associated with vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 98(10):4030-7, 2013
2. 山内美香, 杉本利嗣. 臨床編:副甲状腺疾患;臨床知識;原発性副甲状腺機能亢進症 病態と診断. 監修:平田結喜緒. 編集:竹内靖博, 杉本利嗣, 成瀬光栄. 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル 48-51, 診断と治療社出版(東京) 2013.4.20
3. 山内美香, 杉本利嗣. 原発性副甲状腺機能亢進症. 宗圓聰、杉本利嗣編. ビスホスホネートエビデンスブック 179-184, 医薬ジャーナル社出版(大阪) 2013.10.15
4. 山内美香, 杉本利嗣. 原発性副甲状腺機能亢進症. 永井良三, 福井次矢, 木村健二郎, 上村直実, 桑島巖, 今井靖, 嶋田元編. 今日臨床サポート. エルゼビア・ジャパン, 2013(ウェブサイト: <http://clinicalsup.jp/jpoc/>)
5. 山内美香, 杉本利嗣. Wnt シグナルと骨: 血中スクレロstin濃度と代謝性骨疾患 Clinical Calcium 23(6):91-97, 2013
6. 山内美香, 杉本利嗣. 続発性骨粗鬆症~骨脆弱性をもたらす病態概念の拡がり~: 続発性骨粗鬆症の原因と病態 Clinical Calcium 23(9):1251-1257, 2013

7. 山内美香, 杉本利嗣. 続発性骨粗鬆症の病態と治療: 疾患関連性骨粗鬆症 Geriatric Medicine 51(10):1061-1065, 2013

11. 学会発表

1. Yamauchi M, Yamamoto M, Nawata K, Tanaka K, Ogawa N, Sugimoto T. Relationships between serum sclerostin levels and bone metabolism-related indices as well as bone fragility. the ANZBMS Annual Scientific Meeting. Melbourne, September, 2013
2. 山内美香, 山本昌弘, 名和田清子, 高岡伸, 杉本利嗣. 閉経後女性における血中 sclerostin 濃度と Ca・骨代謝の関係. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 仙台, 2013.4.
3. 山内美香, 山本昌弘, 名和田清子, 高岡伸, 杉本利嗣. 血中 sclerostin 濃度と骨代謝関連指標および骨脆弱性との関係. 第 31 回日本骨代謝学会学術集会, 神戸, 2013.5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

7. 特許の取得
なし。
8. 実用新案登録
なし
9. 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 25 年度分担研究報告書

低 Ca 血症の鑑別診断（偽性副甲状腺機能低下症診断含む）の改訂：

偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態の解析

研究協力者 皆川 真規 千葉県こども病院 内分泌科 部長

研究要旨

古典的なホルモン受容機構異常症である偽性副甲状腺機能低下症には 1a 型と 1b 型が存在する。それぞれ *GNAS* 遺伝子の genomic mutation と epigenetic mutation が原因となっている。臨床診断によるこの 2 型の区別は主に 1a 型に特徴的な骨格徴候である Albright hereditary osteodystrophy の有無を重視してきたが、診断の困難な例も存在することが分かってきた。また、生活様式の変化によりビタミン D 欠乏症（あるいは欠乏状態）がまれではなくなった現在、ビタミン D 欠乏症との鑑別診断も必ずしも容易ではなくなってきている。PHP-1b の鑑別診断にはエピ変異の解析が有用であるが、現在もちいられているメチル化特異的サザン解析、MS-PCR、MS-MLPA の 3 つの方法について比較した。いずれの結果も一致しており、この中では MS-MLPA が検査に要する時間、コストの面で優れていることが分かった。

A. 研究目的

これまでの研究により偽性副甲状腺機能低下症 1b 型 (PHP-1b) の臨床診断については以下のような問題が残っている。

1. ビタミン D 欠乏症との鑑別がむずかしいケースがあること。また、ビタミン D 欠乏が併存している場合の診断の確実性の問題。
2. 偽性副甲状腺機能低下症 1b 型の臨床像に多様性があることから 1a 型との鑑別が必ずしも容易でないこと。

これらの問題を解決するためには簡便で特異度の高い遺伝子解析（エピ変異の検出）をもちいて PHP-1b を診断することが必要である。

B. 研究方法

【対象】

日本人の PHP-1b 患者 23 例。診断は臨床的診断による。

【方法】

1. メチル化特異的制限酵素によるサザン解析
2. Methylation-specific PCR (MS-PCR)
3. MS-MLPA®

1 および 2 はこれまで我々の行ってきた研究報告と同じ方法で行った。MS-MLPA については、MRC Holland 社から販売されている Salsa® MLPA® kit をもちいた。

（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

検討したすべての PHP-1b で *GNAS* 遺伝子の A/B 領域のエピ変異検出は、メチル化特異的サザン解析、MS-PCR、MS-MLPA で一致した。

MS-MLPA 法では家族性 PHP-1b の原因である STX16 のコピー数異常を検出することができた。

D. 考察

PHP の診断に際しては以下の注意が必要である。

- 診断アルゴリズムのみに頼った診断をすべての症例に適用することはできない。
- 偽性副甲状腺機能低下症 1b 型の診断には *GNAS* のメチル化解析(エピ変異の検出)が有用であること。
- *GNAS* エピ変異の検出には検査に要する時間、コストの面で MS-MLPA® がすぐれている。

E. 結論

MS-MLPA は PHP-1b の診断に有用である。

H. 研究発表

12. 論文発表

- 1) 皆川真規. Ellsworth-Howard 試験(PTH 負荷試験). 小児内科 (2013) 45(5):854-856
- 2) 皆川真規. 先天性甲状腺機能低下症. 小児科 (2013)54(8):1113-1120

13. 学会発表

- 1) 皆川真規 低リン血症性くる病の診断と治療
第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 25 年 10 月 10 日

D. 知的所有権の取得状況

10. 特許の取得

なし

11. 実用新案登録

なし

12. 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 25 年度分担研究報告書

ビタミン D 代謝の研究と解析

分担研究者 竹内靖博 虎の門病院内分泌センター部長

研究要旨

生体でビタミンD作用を発揮する1,25水酸化ビタミンD (1,25D) 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ニバルピタールは、肝臓や腸管でSXRとの結合を介しCYP3A4の酵素誘導をもたらすことにより、ビタミンD代謝が亢進し、骨軟化症を誘発する。我々は先行研究で、薬剤添加物として用いられているアセチルトリブチルクエン酸(ATBC)がSXRとの結合により、腸管上皮細胞でCYP3A4遺伝子発現を誘導し、酵素活性を増加させることを報告した。本研究では、骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート製剤の影響を*in vivo*で明らかにするため、ラットを用いた実験を行った。ビスホスホネート製剤(ゾレドロン酸)投与により、腎特異的にCYP3A1 (ヒトCYP3A4相同)の発現促進が認められた。生化学的指標の詳細な検討から、腎でのCYP3A1発現はビタミンDの不活性化に関与することが示唆され、ラット血中25水酸化ビタミンD濃度の低下とCYP3A1発現との間に相関が認められた。以上の成績は、ビスホスホネート製剤による腎でのビタミンD代謝の促進は、腸粘膜からのカルシウム吸収の低下やビタミンD充足度の低下など、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

ホルモンとしての活性を有する 1,25 水酸化ビタミン D (1,25D) の分解・代謝は、腎では特異的な CYP24A1 が、肝・腸管では薬物代謝酵素である CYP3A4 が主に関与している。

肝臓や腸管でステロイド・ゼノバイオティク受容体 SXR への結合を介して CYP3A4 の酵素誘導をきたす薬剤である抗結核薬のリファンピシン(RFP)や抗てんかん薬のフェニバルピタール、フェニトイン等を連用すると、1,25D の代謝が亢進し、ビタミンD作用不全から骨軟化症を誘発する事が古くから知られている。SXR を介する同様の作用は薬剤添加物であるアセチルトリブチルクエン酸 (ATBC)などの環境化学物質でも認められるため、その骨代謝に及ぼす影響が懸念される。

現在標準的な骨粗鬆症治療薬として広く用いられているビスホスホネート製剤は、骨吸収を抑制することによりカルシウム・リン代謝にも大きな影響を及ぼすが、そのビタミンD代謝に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。ビタミンD作用は骨粗鬆症治療においては骨折予防にも重要な役割を果たすことから、骨吸収抑制薬とビタミンD代謝の関連は臨床的に重要な研究課題である。

以上の背景から本研究では、ビタミンD作用の制御機構をその代謝による不活性化の視点から明らかにすることにより、ホルモン作用不全としてのビタミンD作用障害の機構を明らかにすることを目的として、骨吸収抑制薬であるビスホスホ

ネート製剤がビタミンD代謝酵素の発現に与える影響の検討を行った。

B. 研究方法

- 1) 動物実験の研究計画に関して施設倫理委員会の承認を得た。
- 2) ラットへのゾレドロン酸投与 7週齢のオス Wistar ラットを用いて行った。コントロール群 (生食のみ)、ヒト通常使用量に相当するゾレドロン酸 67 µg/kg (regular dose: R 群) または 10 倍量の 670 µg/kg (high dose: H 群) を生食で 1ml になるように調製し腹腔内投与し、24hr または 72hr 後に屠殺して血液、腎臓、肝臓を採取した(コントロール、R24、R72、H24、H72 の計 5 群、各 n=3)。血漿のカルシウム、リン、intact PTH、1,25D、25 水酸化ビタミン D (25D)、FGF23 濃度を測定し、腎臓と肝臓はトータル RNA を抽出しリアルタイム PCR (SYBR Green) にて CYP27B(1 -hydroxylase)、CYP24、CYP3A1(ヒトの CYP3A4 に相当)、GAPDH の mRNA 発現を測定し、Ct 法で相対定量を行った。

C. 研究結果

- 1) ビスホスホネート製剤がビタミンD代謝酵素の発現に与える影響

ゾレドロン酸非投与群(control)の血漿カルシウムは $9.9 \pm 0.4SD$ (9.5-10.2) mg/dl であった。ゾレドロン酸投与群ではカルシウムは変化のないものから軽度低下を呈したもののまで様々で、 $9.4 \pm 0.6SD$ (8.2-10.1) mg/dl

であった。カルシウム最低値を呈したのは H72 群のラットで 8.2 mg/dl だったが、軽度の低下で、また同群には 10.1 mg/dl と変化のないものもありゾレドロン酸容量依存性の効果を得ることはできなかった。このため、全てのデータをプロットして解析した。

血漿カルシウムの低下に伴い血漿リンは低下し、正相関が認められた ($R=0.829$ 、 $p<0.0001$)。血漿カルシウムの低下に伴い intact PTH は増加し負の相関が認められた ($R=-0.825$ 、 $p<0.0001$)。intact PTH の増加に伴い 1 α -hydroxylase である CYP27B の mRNA 発現が増加し正相関が認められた ($R=0.708$ 、 $p=0.0002$)。CYP27B mRNA の増加に伴い 1,25D が増加し正相関が認められた ($R=0.887$ 、 $p<0.0001$)。以上より血中カルシウム濃度の低下を引き金に、速やかに 1,25D 合成が促進されることが考えられた。

一方、1,25D の増加に伴い基質である 25D は低下し負の相関が認められた ($R=-0.568$ 、 $p=0.0255$)。また intact PTH の増加に伴い 1,25D や 25D の分解酵素である CYP24 の mRNA 発現は低下し負の相関が認められ ($R=-0.772$ 、 $p=0.0004$)、1,25D および 25D の分解が防止される方向に働いた。PTH の増加に伴って 1,25D が上昇しても CYP24 は抑制されており、PTH が CYP24 発現を調節するうえで 1,25D よりも上位にありビタミン D の分解を防ぐ生体の合目的なメカニズムが考えられた。ところが、もうひとつの 25D と 1,25D の分解酵素である CYP3A1 mRNA の発現を調べると CYP24 発現とは異なり、腎臓では 1,25D の増加に伴って CYP3A1 mRNA が増加した ($R=0.911$ 、 $p<0.0001$)。肝臓では相関は認められなかった。

ステップワイズ法による重回帰分析で 25D を目的変数とすると腎 CYP3A1 mRNA が説明変数として残り、腎での CYP3A1 mRNA 発現増加に伴って血漿 25D が低下したと考えられた。以上から低カルシウムの状態でも腎でビタミン D 分解酵素の CYP3A1 が奇異性に増加し 25D の低下に働くことが考えられた。

D. 考察

1) 骨吸収抑制薬の使用により惹起される低カルシウム血症を引き金として PTH が上昇し、CYP27B が増加し体内の 25D は 1,25D に変換されてカルシウム上昇に働く。このとき PTH の増加により腎の CYP24 発現は抑制され 25D や 1,25D の分解を防ぐ方向に働く。ところが、1,25D 依存性に CYP3A1 (ヒトの CYP3A4) 発現は

腎で奇異性に増加することから PTH が高い状態ではビタミン D の代謝には腎の CYP24 よりも CYP3A4 が重要と考えられた。以前、我々はヒトの肝臓や消化管の cell line を用いて、1,25D が VDR を介して CYP3A4 発現を正に調節することを報告しており腎でも同様の機序が考えられた。

E. 結論

骨吸収抑制薬であるビスホスホネート製剤の投与により、間接的にビタミン D の活性化のみならず不活性化をもたらす代謝酵素が誘導されることが明らかとなり、本剤投与にあたってのビタミン D 補充の重要性が示唆された。

G. 研究発表

14. 論文発表

1) Takeshita A, Igarashi-Migitaka J, Koibuchi N, Takeuchi Y: Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. J Endocrinol 2013 Feb 15;216(3):297-305. doi: 10.1530/JOE-12-0297.

15. 学会発表

1) 竹下彰 鯉淵典之 竹内靖博
SXR と VDR のクロストークが薬剤性骨軟化症の成因に關与する
(第 85 回日本内分泌学会 2012 年 4 月 21 日)
日本内分泌学会雑誌 88 巻 第 1 号 367 頁
2012 年

2) 鈴木尚宜 野村浩介 清水祐一郎 宮川 めぐみ 竹下章 福本誠二 竹内靖博
含糖酸化鉄(フェジン®)の単回投与による fibroblast growth factor 23(FGF23)およびリン・ビタミン D 代謝への影響の検討
(第 85 回日本内分泌学会 2012 年 4 月 21 日)
日本内分泌学会雑誌 88 巻 第 1 号 273 頁
2012 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

13. 特許の取得

該当がある場合はご記入ください。

14. 実用新案登録

なし

15. 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 25 年度分担研究報告書

インスリン受容体異常症診断基準の改訂ならびに 治療指針の策定に向けた症例の集積

分担研究者 片桐秀樹 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

インスリンに関わるホルモン受容機構異常として、インスリン受容体自体の遺伝子変異による A 型とインスリン受容体に対する自己抗体による B 型およびそれ以外のインスリン抵抗症に分類されるが、特に B 型インスリン抵抗症については、その頻度や疫学的特徴も明らかではなく、確立した治療法もない。本研究分担者は、ヘリコバクター・ピロリの除菌を行ったところ、抗インスリン受容体自己抗体が陰性化し、高血糖の是正はもちろん、低血糖発作も消失した B 型インスリン抵抗症の症例を経験し、ヘリコバクター・ピロリの除菌が新たな治療法となりうる可能性を示した。全国調査研究を実施することで、本疾患の病態をさらに明らかとすることは、発症機序の解明や病態の把握のみならず、治療法の開発にもつながりうるものと期待され、その準備に向けての検討を進めている。

A．研究目的

インスリン受容体自体の遺伝子変異によるものとインスリン受容体に対する自己抗体によるものとに分類される。前者は A 型、後者は B 型インスリン抵抗症と呼ばれる。B 型インスリン抵抗症は、体内唯一の血糖降下システムであるインスリン受容体システムが働かないため、インスリン治療を含むすべての糖尿病治療の有効性の乏しい難治糖尿病となるのみならず、低血糖発作を伴う症例も認められ、QOL の悪い疾患として知られているが、これまでに治療法が確立されていない。全身性エリテマトーデスや Sjogren 症候群などの他の自己免疫疾患と高頻度で合併することも多い。B 型インスリン抵抗症は現在までに世界で 100 例以上の報告があり、わが国においても 30 例以上の報告がなされているが、正確な頻度は不明である。

我々は、B 型インスリン抵抗症患者にヘリコバクター・ピロリの除菌を行ったところ、抗インスリン受容体自己抗体が陰性化し、高血糖の是正はもちろん、低血糖発作も消失した症例を経験し、ヘリコバクター・ピロリの保菌が B 型インスリン抵抗症の発症に関与すること、および、その除菌が B 型インスリン抵抗症の根治療法につながる可能性を報告した（Lancet 2009）。そこで、本研究班においては、最終的には、B 型インスリン抵抗症の病態（頻度、好発年齢、性差・経過、他の自己免疫疾患の合併の有無やその疾患、ヘリコバクター・ピロリの保菌の有無やその除菌による治療効果など）を明らかとする調査・検討を行うことが

目的であり、現在、その調査研究を計画中である。本テーマによる本研究班への参画は最終年度である平成 25 年度 1 年間のみであるため、この期間中には、全国調査研究の前段階として、これまでの東北大学・岩手医科大学における症例について、追跡調査を計画した。

B．研究方法

まず、これまでの東北大学・岩手医科大学で経験された B 型インスリン抵抗症症例について、追跡調査を行った。

さらに、B 型インスリン抵抗症の病態に対する調査研究に向けて、これまでの症例報告を精査し、調査項目等の吟味を進める。

（倫理面への配慮）

並行して、倫理委員会の承認を受けるべく、調査方法や項目等の brush-up を進める。

C．研究結果

前述の症例は、高齢男性であり、自己免疫性血小板減少症（ITP）の合併が認められた。これらの疾患はレトロスペクティブに見て、ほぼ同時に発症したものと推定される。抗血小板抗体についても、本症例では、ヘリコバクター・ピロリの除菌とともに減少し、抗インスリン受容体抗体よりは遅れたものの、最終的には陰性化した。本年度も B 型インスリン抵抗症・ITP とともに、再発は認めておらず、これらの疾患は根治したものと考えられる。

岩手医科大学では、2 度の妊娠により、妊娠期間中のみインスリン受容体抗体が出現し低血糖発作を主徴とする糖代謝異常を発症する若年女性が認められた。本

症例の妊娠中の血清を、ヒトインスリン受容体を高発現させたチャイニーズハムスターオバリー(CHO)細胞に作用させることにより、CHO細胞のインスリン受容体のチロシン残基のリン酸化が亢進することが確認され、本症例の抗インスリン受容体自己抗体はインスリン受容体に作用しインスリン様作用を有することが確認され、本症例における低血糖のメカニズムが証明された。

D. 考察

これらの症例から得られた情報により、本疾患発症のメカニズムを考察する。まず、ヘリコバクター・ピロリの除菌により治癒した高齢男性については、除菌の治療効果から、ヘリコバクター・ピロリの保菌が本疾患の発症に大きく関与したことは確実である。また、ITPをほぼ同時期に発症したことから、自己免疫疾患としての全く異なる両疾患の発症機序を考える上で示唆に富む。一方で、本患者は高齢男性であり、ヘリコバクター・ピロリの感染自体がこの発症の時期に起こったことは極めて考えにくく、長期保菌者であったと考えることが妥当である。このことから、ヘリコバクター・ピロリの保菌に、何らかのきっかけが second hit となって発症につながったものと考えられる。これは、発症機序の解明に重要な情報であり、全国調査を行う際にも、重点的に調査項目として配慮する必要がある。一方で、そう考えた場合、最近の発症にとって直接のきっかけではないヘリコバクター・ピロリの保菌状態を除菌療法により取り除くことが根治療法となったということは、まさに、本症例にとってはヘリコバクター・ピロリの保菌は必要条件であったことを意味する。

次に、2度の妊娠中のみ抗インスリン受容体自己抗体を認め、低血糖を伴う糖尿病を発症した若年女性の症例も、妊娠という発症関与因子が持続している期間のみ本疾患を発症し、その原因が除去されると抗インスリン受容体自己抗体が消失されるという共通点を持つ。以上から、これまで確立した治療法がなく、血糖コントロールに難渋し、さらに突然の低血糖発作を伴うというQOLの悪い本疾患において、それぞれのきっかけや素因を見出し、それを除去することで、完治につながる可能性が考えられる。その素因の一つとして、ヘリコバクター・ピロリの保菌が考えられ、その除菌は、根治療法の極めて強い候補である。全国調査研究を実施することで、本疾患の病態をさらに明らかとすることは、発症機序の解明や病態の把握のみならず、治療法の開発にもつながりうるものと期待される。

E. 評価

1) 達成度について

本研究班最終年度1年間のみの参画ではあったが、その期間中に行なった成果として、上記のようにB型インスリン抵抗症の病態や発症機序に関する有力な仮説を提唱することができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

B型インスリン抵抗症は、まれな糖尿病ではあるが、血糖コントロール自体が非常に困難な糖尿病の1亜型である。低血糖を併発する症例はQOLが極めて悪い。血漿交換や免疫抑制剤の使用等により若干の効果を認めた報告があるが、確立した治療法がない。この点から、本研究成果は、医学的にも社会的にも意義深いものと考えられる。

3) 今後の展望について

上記の観点から、B型インスリン抵抗症についての全国調査を実施することは、病態の理解や発症機序の解明、他の自己免疫疾患との関係のみならず、ヘリコバクター・ピロリの除菌という簡便な治療を標準療法として、根治につながる可能性を包含したもので、大きな波及効果が来される。

4) 研究内容の効率性について

B型インスリン抵抗症は、日本糖尿病学会の分類では「B. 他の疾患、条件に伴う糖尿病」の中の、「免疫機序による稀な病態」に含まれる疾患であり、発症頻度自体が不明な疾患であるため、全国調査を行わない限り、その頻度はわからず、効率性を論じることできない。ただ、多くの糖尿病専門医は本疾患の患者の経験を持つことや、近い時期に東北大学都岩手医科大学で症例が経験されており、極稀疾患ではないと考えられる。本疾患自体に対する治療法、血糖コントロール法がともに確立されておらず、さらに、低血糖を生ずる症例では、極めてQOLが悪化することから、本疾患の詳細の解明や簡便な治療法の保険適応は、患者にとって大きな福音となることは間違いない。

F. 結論

インスリン受容体に対する自己抗体により発症する稀な糖尿病一亜型であるB型インスリン抵抗症について、その症例を解析し、多段階発症メカニズムが考えられること、および、その素因の一つを除去することが根治につながる可能性を提唱した。患者によっては、その根治療法の有力な候補としてヘリコバクター・ピロリの除菌が考えられる。さらなる調査を進めることで、その実態を明らかとし、除菌という簡便な治療により、QOLの悪い難治疾患の克服を目指す。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表 8 件
原著論文による発表 0 件
それ以外 (レビュー等の発表) 3 件
そのうち主なもの

論文発表

石垣泰、**片桐秀樹** 糖尿病と関連する内科疾患 肥満症, 日本内科学会雑誌, 102(4):895-901, 2013

片桐秀樹 血管内皮細胞 NF- B シグナルのメタボリックシンドロームや寿命に及ぼす影響, Therapeutic Research, 34(7):946-950, 2013

突田壮平、山田哲也、**片桐秀樹** 臓器連関, 糖尿病 56(7):427-429, 2013

学会発表

片桐秀樹 シンポジウム 臓器間神経ネットワークによる個体レベルでのエネルギー代謝制御機構, 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013 年 4 月 25-27 日 仙台

山田 哲也、突田 壮平、岡 芳知、**片桐秀樹** 肝からの臓器間ネットワークによるエネルギー代謝制御, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013 年 5 月 16-18 熊本

今井淳太、**片桐秀樹** 神経シグナルを介した膵 細胞量制御機構, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 16-18 日 熊本

児玉 慎二郎、山田 哲也、江見 充、工藤 宏仁、石井 美穂、佐藤 秀則、澤田 正二郎、今井 淳太、石垣 泰、岡 芳知、**片桐秀樹** 全ゲノム CNV 解析による若年発症 2 型糖尿病患者における複数領域の高頻度ゲノム欠失, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 16-18 日 熊本

片桐秀樹 Metabolic Information Highways ~ 臓器間神経ネットワークによる個体レベルでの代謝制御機構~, 第 21 回西日本肥満研究会, 2013 年 7 月 20-21 日 那覇

片桐秀樹 メタボリックインフォメーションハイウェイ, 第 11 回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2013 年 10 月 25-26 日 名古屋

片桐秀樹 Metabolic Information Highways ~ 個体レベルの糖エネルギー代謝調節機構~, 第 9 回分子内分泌代謝学セミナー, 2013 年 12 月 17 日 東京

片桐秀樹 臓器間ネットワークから血管病を紐解く, 第 14 回動脈硬化教育フォーラム「しなやかな血管で健やかな長寿」, 2014 年 2 月 2 日

2) 海外

口頭発表 0 件
原著論文による発表 2 件
それ以外 (レビュー等の発表) 2 件
そのうち主なもの
論文発表

Kondo K, Ishigaki Y, Gao J, Yamada T, Imai J, Sawada S, Muto A, Oka Y, Igarashi K, **Katagiri H.** Bach1 deficiency protects pancreatic β -cells from oxidative stress injury, Am J Physiol Endocrinol Metab, 305(5):E641-8, 2013

Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Nishi M, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Kubota M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Iizuka Y, Itaka K, Kataoka K, Shioda S, Niiijima A, Yamada T, **Katagiri H,** Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization, Nat Commun, 4:2316, 2013

学会発表

Hideki Katagiri. Special Session "Advances for Diabetes in Japan-Flying to Biomedical Engineering from Physiology-The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2013/7/3-7.

Hideki Katagiri. Neuronal information highways for systemic regulation of glucose and energy metabolism. The 36th Naito Conference. 2013/9/10-13

8 知的所有権の出願・取得状況 (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 25 年度分担研究報告書

インスリン受容体異常症診断基準の改訂ならびに 治療指針の策定に向けた症例の集積

分担研究者 小川 渉 神戸大学・大学院医学研究科准教授

研究要旨

インスリン抵抗症は、診断基準は以前に作成されているものの、有効な治療法に関しては一定の見解は無い。そこで、本研究ではインスリン抵抗症の治療実態の調査を通じ、IGF-1 製剤の適応、メトホルミン製剤の有効性、今後発売される SGLT2 阻害剤の有効性などを含めた治療ガイドラインを作成することを目的とする。本年に関しては、自験例で高用量メトホルミンが血著効することを確認し、今後の全国的調査のために有用な情報が得られた。

A. 研究目的

インスリン抵抗症はインスリン受容体遺伝子異常による A 型、インスリン受容体自己抗体による B 型及び、未同定の受容体以後のシグナル伝達障害による C 型に分類される。本事業の成果（平成 7 年度研究事業報告書）により本症各型の診断基準は作成されたが、患者数や治療実態については不明な点が多い。また本事業により IGF-1 製剤が本症に有効であることも明らかとなったが、その適応や他の薬物療法との優劣は不明である。また、最近我が国でも高用量のメトホルミンが使用可能となったが、インスリン抵抗症各型における高用量のメトホルミン有効性については未だ十分に明らかではない。近い将来、わが国でも SGLT2 阻害剤が使用可能となるが、本薬剤はインスリン抵抗症各型の有効な治療法となる可能性がある。そこで、本研究ではインスリン抵抗症の治療実態の調査を通じ、IGF-1 製剤の適応に加え、新規に使用可能となった他の糖尿病治療薬の有効性なども検討し、最終的には、薬物治療ガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

本研究テーマによる研究班への参画は平成 25 年度 1 年間であったため、研究期間中には、現在、神戸大学糖尿病内分泌内科で加療を行っているインスリン抵抗症 C 型症例の原因遺伝子候補の解析を進めるとともに、高用量のメトホルミンの有効性の検討を行った。また、インスリンの細胞内情報伝達障害とインスリン抵抗症の病態との関連性を検討するため、脂肪特異的 PDK1 欠損マウスの表現型も

解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析に当っては倫理面の配慮を行い、書面でインフォームドコンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

インスリン抵抗症 C 型症例についてインスリン受容体の下流の情報伝達分子である IRS、Akt、PDK1 等の遺伝子配列を解析したが、疾患の原因と考えられる遺伝子異常は同定し得なかった。また本症例については高用量メトホルミンの効果を検討したところ、2250 mg/日のメトホルミンを投与することで、インスリン使用量は 200 単位/日から 60 単位/日と著減し、良好な血糖コントロールが得られることが明らかとなった。また、正常血糖高インスリングルコースクランプ法により測定したインスリン抵抗性も高用量メトホルミンの投与により顕著に改善を認めた。また、脂肪特異的 PDK1 欠損マウスはインスリン抵抗症 A 型に類似した代謝障害を示し、PDK1 の機能障害の病態的意義が明らかとなった。

D. 考察

インスリン抵抗症 C 型自験例では高用量メトホルミンが顕著な効果を示したが、これが本疾患に普遍的な効果かどうかは明らかではない。インスリン抵抗症 C 型はインスリン受容体以後の様々な分子がその遺伝子異常の候補になり得るが、その詳細は不明な点が多い。メトホルミンの血糖降下作用の主な機序が肝糖産生の抑制であることを踏まえると、自験例では肝糖産生抑制に関わるインスリン受容体のシグナル伝達障害が生じている可能

性も示唆された。今後、Foxo1 など肝糖産生に関わるインスリン受容体のシグナル伝達分子も本疾患の原因遺伝子候補として検討する必要があると考えられた。

E 結論

インスリン抵抗症の中には、平成 22 年に初めてわが国で保険適応が認められたメトホルミン高用量療法が顕著な効果を示すことが見いだされた。既にインスリン抵抗症の治療に保険適応のある IGF-1 製剤に加え、高用量メトホルミンや SGLT2 阻害剤などの各種薬剤の治療効果やその優劣を比較し、薬物治療ガイドラインを作成することである。高用量メトホルミンの著効例を確認したことは、今後、全国的調査を通じて高用量メトホルミン療法に加え、SGLT2 阻害剤なども含めた新規な糖尿病治療薬の本症に対する治療効果を検討することに意義があることが明らかとなったといえる。今後他の薬剤との優劣の比較等を通じて、薬物治療ガイドラインを作成に繋げることが可能と考えられた。

F 健康危険情報

該当するものはない。

G 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第 18 回アディポサイエンスシンポジウム
細岡哲也他：脂肪細胞の機能不全は糖脂質代謝異常および NASH を惹起する

第 25 回分子糖尿病学シンポジウム
松木核他：脂肪細胞の機能不全はインスリン抵抗性・糖脂質代謝異常に加え NASH を惹起する
差

H 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)口

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他