

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591353

研究課題名(和文) ビタミンDシグナルによる副甲状腺腫瘍化抑制機構の検討

研究課題名(英文) Vitamin D signal in parathyroid tumorigenesis

研究代表者

稲葉 雅章 (Inaba, Masaaki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00176405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺増殖におけるVDRの発現低下の意義を明らかにするために、副甲状腺特異的にCreを発現するマウス(PTH-Cre+/-)とVDR floxマウス(VDRflox/flox)とを交配し、副甲状腺特異的にVDRを欠損するマウスの作成を試みた。遺伝子の検索では、副甲状腺のDNAを用いてPCRを行ったところ、VDR遺伝子の欠失を認めた。しかし、生化学的には副甲状腺機能亢進症は認めなかった。免疫染色、ウエスタンブロット法では、副甲状腺におけるVDRの存在を確認した。タンパクレベルでは欠失率は低く、VDRの欠失が不十分であるため、副甲状腺機能亢進症の発症に至らなかったことが想定される。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of vitamin D receptor (VDR) in parathyroid cell proliferation, parathyroid tissue specific knockout of VDR was performed using Cre-lox P system in mice. The penetration of VDR knockout in parathyroid was not enough, so that hyperparathyroidism was not developed in these mice.

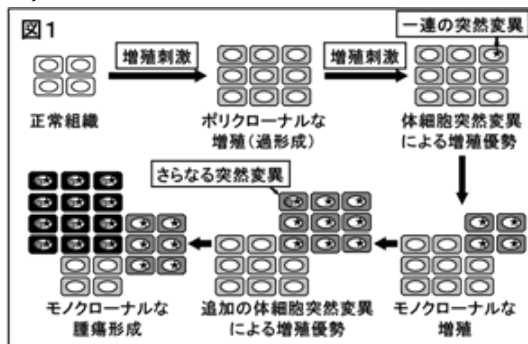
研究分野：内分泌学、腎臓病学

キーワード：副甲状腺ビタミンD受容体

1. 研究開始当初の背景

活性型ビタミンDやその誘導体は、副甲状腺細胞に直接作用し、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌と共に副甲状腺細胞の増殖を抑制する。慢性腎臓病(CKD)においては、ビタミンD活性化障害、高リン血症等により、PTH合成・分泌の亢進や、副甲状腺過形成を呈し、2次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)を発症する。このような副甲状腺細胞においては、ビタミンD受容体(VDR)の発現低下が認められるため、活性型ビタミンDやその誘導体による治療効果は限定的である。

高度なSHPTのために副甲状腺摘出術(PTX)に至る症例では、摘出副甲状腺腫瘍に体細胞突然変異による種々の染色体異常を認める。まず、腎不全という病態により副甲状腺の増殖が刺激され、ポリクローナルな過形成を形成する。そこに体細胞突然変異による増殖優勢が加わり、モノクローナルな腫瘍を形成するに至る。その結果、染色体異常を呈する(図1)。



原発性副甲状腺機能亢進症(PHPT)で認められる副甲状腺腺腫においても、体細胞突然変異による染色体異常を認め、モノクローナリティーが示されている。

副甲状腺でのVDR発現低下により、副甲状腺細胞内へのビタミンDシグナルが減弱する。そのため副甲状腺の増殖能が亢進し、体細胞突然変異が加速され、副甲状腺腫瘍が形成されると想定される。しかし、副甲状腺組織特異的なVDRの欠失では、副甲状腺は腫瘍化せず、増殖能も上昇しない。この報告により、特に副甲状腺に増殖刺激が加わっていない状態では、ビタミンDシグナルは増殖能の調節に不必要であることが示唆された。しかし、PHPT、SHPTといった病理的条件下では検討されておらず、副甲状腺に増殖刺激を与えた状態での検討が必要である。

本研究では、副甲状腺増殖刺激下でのビタミンDシグナルの重要性を評価するために、副甲状腺機能亢進症モデルマウス(PCマウス; D1^{+/-})を使用する。PCマウスは、副甲状腺組織特異的にヒトサイクリンD1遺伝子が発現することで、副甲状腺細胞は増殖し、過形成を呈する。さらにPTH分泌も亢進し、副甲状腺機能亢進症を呈する。PCマウスは長期生存可能であり、高年齢では増殖能の亢進した副甲状腺腫瘍を呈する。

2. 研究の目的

原発性及び2次性副甲状腺機能亢進症では、副甲状腺におけるビタミンD受容体(VDR)の発現が低下し、活性型ビタミンDによる副甲状腺ホルモン(PTH)分泌抑制作用、副甲状腺細胞増殖抑制作用が減弱する。副甲状腺腫瘍には多くの体細胞突然変異が認められ、腫瘍化の原因となっている。副甲状腺におけるVDRの発現低下は、副甲状腺細胞の増殖能を亢進させることで体細胞突然変異を加速し、腫瘍化に寄与している可能性がある。本研究は、副甲状腺機能亢進症モデルマウスに対し、副甲状腺特異的にVDRをノックアウトすることで、その腫瘍化が加速されるか検討する。本研究、ビタミンDシグナルによる副甲状腺腫瘍化抑制機構の存在を明らかにすることを目的としている。

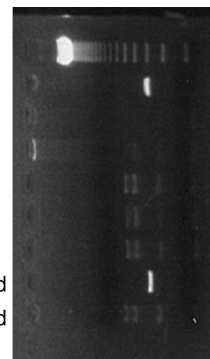
3. 研究の方法

副甲状腺組織特異的にVDRをノックアウトするために、副甲状腺特異的にCreを発現するマウス(PTH-Cre^{+/-})とVDR flox マウス(VDR^{flox/flox})とを交配し、副甲状腺組織特異的VDRノックアウトマウス(PTH-Cre^{+/-}; VDR^{flox/flox})を得る。そのマウスにおいて、VDRが副甲状腺特異的に欠失したことを確認するために、副甲状腺染色体を用いたPCR法、および免疫染色法で確認する。さらに、本マウスにおいて、副甲状腺機能亢進症が発症下かを確認するために、血清学的、組織学的に検索を行う。

4. 研究成果

VDR遺伝子が副甲状腺組織特異的に欠失していることを確認するために、VDR exon 2部を特異的に増幅するprimerを用いて検討を行った(下図)。全身のVDR遺伝子が欠失しているconventional VDR KOマウスにおいては、VDR exon 2の欠失を示すバンドが検出された。一方、正常コントロールであるWTマウス副甲状腺においては、本バンドは検出されなかった。

DNA ladder
 Conventional VDRKO
 WT
 Conditional VDRKO
 Intestine
 Liver
 Kidney
 Thyroid
 Parathyroid
 WT
 Parathyroid



次に、副甲状腺組織特異的VDRノックアウトマウス(PTH-Cre^{+/-}; VDR^{flox/flox})より、小腸、肝、腎、甲状腺、および副甲状腺を摘出し、同様の検討を行ったところ、副甲状腺でのみ本バンドが検出された。以上より、PTH-Cre^{+/-}は、副甲状腺組織特異的に発現し、VDR^{flox/flox}に作用することによりVDRを欠失させたこと

が明らかとなった。

血清学的検査を行ったところ、conventional VDR KO マウスは、WT マウスと比較し、著明な2次性副甲状腺機能亢進症をていしたが、副甲状腺組織特異的 VDR ノックアウトマウス(PTH-Cre^{+/-}, VDR^{fllox/fllox})は、全く副甲状腺機能亢進症を呈さなかった。

副甲状腺の組織学的検索を行ったところ、副甲状腺組織特異的 VDR ノックアウトマウス(PTH-Cre^{+/-}, VDR^{fllox/fllox})副甲状腺は、conventional VDR KO マウスと比較し全く腫大しておらず、その大きさは WT マウスと同等であった。また、抗 VDR 抗体を用いた免疫組織学的検索においては、conventional VDR KO マウス副甲状腺ではその発現が著明に低下していたにもかかわらず、副甲状腺組織特異的 VDR ノックアウトマウス(PTH-Cre^{+/-}, VDR^{fllox/fllox})副甲状腺での VDR 発現は、WT マウスと同等であった。

次に、副甲状腺 VDR タンパク量を、ウエストンプロット法を用いて検討した。conventional VDR KO マウス副甲状腺では VDR タンパク発現が著明に低下していたにもかかわらず、副甲状腺組織特異的 VDR ノックアウトマウス(PTH-Cre^{+/-}, VDR^{fllox/fllox})副甲状腺での VDR タンパク発現は、WT マウスと比較し程度の低下を認めるのみであった。

以上より、PTH-Cre^{+/-}は、副甲状腺組織特異的に発現し、VDR^{fllox/fllox}に作用することにより VDR を欠失させるが、その欠失率は低く、タンパクレベルに対する影響は少ないことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Nagata Y, Inaba M, Imanishi Y, Okazaki H, Yamada S, Mori K, Shoji S, Koyama H, Okuno S (2015) Increased undercarboxylated osteocalcin/intact osteocalcin ratio in patients undergoing hemodialysis. Osteoporos Int 26:1053-1061、査読あり
2. Mishima T, Motoyama K, Imanishi Y, Hamamoto K, Nagata Y, Yamada S, Kuriyama N, Watanabe Y, Emoto M, Inaba M (2015) Decreased cortical thickness, as estimated by a newly developed ultrasound device, as a risk for vertebral fracture in type 2 diabetes mellitus patients with eGFR of less than 60 mL/min/1.73 m(2.). Osteoporos Int 26:229-236、査読あり
3. Yoda K, Inaba M, Hamamoto K, Yoda M, Tsuda A, Mori K, Yamada S, Emoto M, Koyama H, Imanishi Y (2014) Association between glycemic control and morning blood pressure surge with vascular

endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 37:644-650、査読あり

4. Ochi A, Mori K, Emoto M, Nakatani S, Morioka T, Motoyama K, Fukumoto S, Imanishi Y, Koyama H, Ishimura E, Inaba M (2014) Direct inhibitory effects of pioglitazone on hepatic fetuin-A expression. PLoS One 9:e88704、査読あり
5. Noda S, Onoda N, Kashiwagi S, Kawajiri H, Takashima T, Ishikawa T, Yoshida A, Higashiyama S, Kawabe J, Imanishi Y, Tahara H, Inaba M, Osawa M, Hirakawa K (2014) Strategy of operative treatment of hyperparathyroidism using US scan and (99m)Tc-MIBI SPECT/CT. Endocr J 61:225-230、査読あり
6. Inaba M, Okuno S, Nagayama H, Yamada S, Ishimura E, Imanishi Y, Shoji S (2015) Restoration of parathyroid function after change of phosphate binder from calcium carbonate to lanthanum carbonate in hemodialysis patients with suppressed serum parathyroid hormone. J Ren Nutr 25:242-246、査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. Akinobu Ochi, Katsuhito Mori, Shinya Nakatani, Masanori Emoto, Koka Motoyama, Tomoaki Morita, Shinya Fukumoto, Yasuo Imanishi, Tetsuo Shoji, Eiji Ishimura, Masaaki Inaba Indoxyl sulfate suppresses hepatic fetuin-A expression through aryl hydrocarbon receptor. Kidney Week 2014, 2014, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, アメリカ合衆国)
2. Ohara M, Imanishi Y 他、Attenuated megalin expression may enhance hyperparathyroidism in hyper-functioning parathyroid tumors、8th International Congress on Uremia Research and Toxicity、2014、Okinawa Convention Center (沖縄県・那覇市)

[図書](計 1 件)

1. Imanishi Y, Nishizawa Y, Inaba M、Chapter 5 Pathogenesis and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. Suzuki H (編) Hemodialysis. InTech, Rijeka, Croatia, pp 81-100, 2013

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/interm2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 雅章 (INABA, Masaaki)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)
・教授
研究者番号: 00176405

(2) 研究分担者

今西 康雄 (IMANISHI, Yasuo)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)
・講師
研究者番号: 50326253