

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591366

研究課題名(和文)骨粗鬆症治療のための再生医療に向けた副甲状腺細胞分化誘導法の開発

研究課題名(英文)Clarification of parathyroid cell differentiation, oriented for the cell therapy of osteoporosis

研究代表者

岩崎 泰正(Iwasaki, Yasumasa)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：30303613

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)：1. PTH遺伝子転写はSp1により維持され、血清Ca上昇時にCaSR刺激と細胞内Ca上昇、NFAT活性化で転写因子Sp6の発現が誘導され、Sp1と競合してPTH遺伝子転写を抑制する機序の存在が示唆された。2. 副甲状腺機能低下症を来すHDR症候原でGATA3の新規変異(R299Q)を同定し、その機能喪失が副甲状腺特異的転写因子GCM2の発現低下を介して細胞分化とPTH発現の障害を引き起こす可能性が示された。3. 研究協力施設で先天性副甲状腺機能低下症の新たなGCM2遺伝子変異が見出された。
以上、副甲状腺の分化機能維持における転写因子GATA3, GCM2, Sp1/Sp6の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1. Parathyroid hormone (PTH) gene expression is inhibited by hypercalcemia, involving CaSR, NFAT, and Sp1/Sp6. 2. hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome is caused by GATA3 haploinsufficiency, and novel GATA3 mutation (R299Q) was identified. Decreased GATA3 activity causes decrease in GCM2 expression, with resultant defect in parathyroid development and PTH deficiency. 3. A variety of GCM2 gene mutation also causes congenital hypoparathyroidism. Altogether, transcription factors GATA3, GCM2, and Sp1/Sp6 are supposed to be critical for the development and normal regulation of parathyroid gland, including PTH gene expression.

研究分野：内分泌・代謝病学

キーワード：副甲状腺ホルモン カルシウム代謝 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺ホルモン (PTH) は、生物が陸上に進出してから進化したカルシウム代謝を担うペプチドホルモンである。主に消化管からの吸収促進、骨からの動員、腎臓における再吸収促進という3つの機序を介して、血清カルシウム値を維持する。しかし副甲状腺腺腫や過形成 (先天性、慢性腎不全に伴う二次性のものを含む) で PTH 分泌が持続的に上昇すると、重症の骨粗鬆症 (線維性骨炎) が招来される。

一方で、PTH の間欠的な作用は骨形成を促進することが近年明らかにされた、この知見に基づき、PTH 製剤 (テリパラチド) が開発され、既に治療薬として臨床の現場で用いられている。しかしペプチドホルモンのため連日の自己注射という手技的な煩雑さを伴う。

iPS 細胞に代表される近年の再生医療研究の進歩により、幹細胞を目的の器官に分化誘導する技術が開発され、既に一部の臓器に応用が開始された。副甲状腺は、上位となる内分泌臓器が存在しないため、他の調節ホルモンに支配されることなく、体内のいずれの場所においても血清カルシウム値に応じて PTH を分泌する。その意味で、再生医療の手法を用いた副甲状腺細胞の作製が可能となれば、甲状腺癌などで副甲状腺を全摘した症例や、特発性副甲状腺機能低下症の症例に対する細胞移植治療の好適な対象となる可能性がある。

また PTH 遺伝子の発現を人為的に操作することで、移植した細胞からの PTH 分泌を間欠的な分泌に調節し、テリパラチド治療と同等の効果、すなわち骨粗鬆症治療への応用が可能となることも期待される。

しかし本研究の開始時点では、副甲状腺細胞の分化誘導法に関する転写因子、また PTH 遺伝子の短期的な転写調節に関する転写因子の全貌は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、題目「骨粗鬆症治療のための再生医療に向けた副甲状腺細胞分化誘導法の開発」が示す如く、まず第一の目的として、副甲状腺細胞の分化誘導に必要な転写因子カスケードを同定することである。また第二の目的として、PTH 遺伝子発現の短期的

調節に関する転写因子群を同定し、特に血清カルシウム上昇時の PTH 遺伝子発現抑制の分子メカニズムを明らかにすることである。

上記の2点を解明することにより、将来的に、1) Ex vivo で作成した副甲状腺細胞を用いて骨粗鬆症治療や予防を行う細胞治療のための分化誘導法を開発すること、および 2) 短期的に PTH 遺伝子発現を調節する転写因子を利用して PTH 遺伝子の発現・分泌の ON/OFF を人為的に調節し、PTH 分泌の間欠的な分泌調節を可能とする手技を開発すること、以上の2点に向けた基礎的知見の集積が期待された。

3. 研究の方法

(1) 本研究の主体となる部分は、Sakaguchi らによりラット副甲状腺から樹立された細胞株 PTr (Sakaguchi K, Santora A, Zimering M, Curcio F, Aurbach GD, Brandi ML Functional epithelial cell line cloned from rat parathyroid glands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:3269-3273) をホスト細胞とした in vitro の実験系を用いて行った。本細胞に、ヒト PTH 遺伝子の野生型ないし変異を導入した各種 5' プロモーター、ないしヒト GCMB 遺伝子 5' プロモーター (それぞれ最長約 2 kb) と luciferase レポーター遺伝子の融合プラズミドを、リポフェクション法 (FuGene 6, Roche) を用いて一過性に導入した。同時に、各種転写因子 (野生型ないし変異ヒト GATA3、恒常活性化型 NFAT、Sp1、Sp6、GCMB (GCM2) の発現ベクターを共発現させることにより、各々の転写因子が標的遺伝子の転写活性に及ぼす効果を、luciferase 活性を指標として解析した。各種発現ベクターは、ヒト cDNA をテンプレートとして PCR 法でクローニングした cDNA を用いて作成したもの、あるいは他施設より供与されたものを用いた。

(2) ヒト hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome 一家系における GATA3 遺伝子の変異の同定は、発端者の末梢血より抽出したヒトゲノムをテンプレートとして、通常の PCR 法およびシーケンシング法により解析した。

(3) 共同研究者により行われた先天性副甲状腺機能低下症の家系における GCMB (GCM2)

遺伝子の変異解析は、次世代シーケンサーを用いて行われた。その手法の詳細は、出版された論文 (Mitsui T, Narumi S, Inokuchi M, Nagasaki K, Nakazawa M, Sasaki G, Hasegawa T. Comprehensive next-generation sequencing analyses of hypoparathyroidism: identification of novel GCM2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2421-E2428) に記載されている。

4. 研究成果

(1) PTH 遺伝子発現の組織特異性を規定する転写因子として、私どもは Glial Cell Missing B (GCMB、または GCM2) を同定した Kawahara, Iwasaki et al. *Bone* 2010 ; 47:534-41)。実際、本転写因子の機能欠損型変異により、先天性の副甲状腺低形成ならびに副甲状腺機能低下症を来すことが明らかにされている (共同研究者による研究成果 (4) を参照)。

一方、PTH 遺伝子の転写開始点近傍には GC rich な領域が複数存在することから、本遺伝子の基礎転写活性が GCbox に結合する housekeeping 型転写因子 Sp1 により維持されていることが予想された。このため PTH 遺伝子の転写活性に対する Sp1 の共発現の効果を PT-r 細胞で検討した。その結果、Sp1 は用量依存性に強力に PTH 遺伝子の転写活性を促進することを明らかにした。一方、同じファミリーに属する転写因子 Sp3 は目立った効果を示さなかったことから、上記の結果は Sp1 に特異的な効果と考えられた。

(2) Sp1 が PTH 遺伝子の恒常的な転写活性を維持していると考えられるのに対し、転写の短期的な ON/OFF 調節は、血清カルシウムの変動や活性型ビタミン D3 に応答する別の制御機構により調節を受けていることが推察された。しかし細胞外カルシウム濃度が Calcium Sensing Receptor (CaSR) を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させたのち、いかなる機序で PTH 遺伝子発現を制御するかは不明であった。私どもは細胞内カルシウム上昇が Calmodulin/calcineurin を介して転写因子 NFAT を脱リン酸化・活性化することから、その標的遺伝子を探索した結果、転写因子 Sp6 を候補遺伝子として見出した。Sp6 は Sp1 と DNA 結合レベルで競合するが、転写活性に乏しいため結果的に PTH 遺伝子発現を抑

制する。そこで、Sp1 と Sp6 の共発現実験を施行したところ、実際、Sp1 による PTH 遺伝子の転写は Sp6 の共発現により用量依存性に抑制された。

(3) 共同研究者の解析により、HDR 症候群の一家系に GATA3 の新規変異 (R299Q) を同定した。その機序を私どもが *in vitro* で解析したところ、GATA3 の機能喪失変異は、少なくとも一部は GCM2 の発現低下を介して、副甲状腺細胞の分化障害と PTH 発現障害を引き起こす可能性を示唆する結果を得た (現在発表準備中)。

(4) 研究協力施設における解析により、先天性副甲状腺機能低下症において新たに複数の GCM2 遺伝子変異が見出された (方法欄の文献を参照)。

以上の結果より、今回の研究から私どもは、副甲状腺の分化、臓器の機能維持、および PTH 遺伝子発現には、複数の転写因子がカスケードを形成して関与している可能性を示唆する知見を得た。

まず副甲状腺組織の発生、分化には転写因子 GCM2 (GCMB) が重要であることが、私どもの *in vitro* の成績、および家族性副甲状腺低形成・副甲状腺機能低下症の家系における遺伝子変異解析の結果から裏付けられた。

また、GCM2 遺伝子発現の上流には転写因子 GATA3 が存在し、その機能喪失変異は副甲状腺のみならず他の臓器の機能障害も招来して HDR 症候群を発症する機序の存在が示唆された。

血清カルシウム濃度の変動による PTH 遺伝子発現の短期的な変動は、CaSR を介した細胞内カルシウム濃度の上昇が関与するが、その仲介因子として calmodulin/calcineurin/NFAT 系が存在する可能性を支持する結果を得た。すなわち、活性化された NFAT が転写因子 Sp6 を誘導し、本転写因子が PTH 遺伝子の基礎転写活性を担う転写因子 Sp1 と PTH 遺伝子のプロモーターレベルで競合することにより、結果的に PTH 遺伝子発現を抑制する機序の存在が推察された。

将来的には、これらの転写因子の活性に影響をおよぼす薬剤や、活性を調節する細胞を開発することにより、PTH 分泌の人為的な制御を介した、骨粗鬆症に対する細胞治療法の開発が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kawahara M, Iwasaki Y, et al.
Involvement of GCMB in the
transcriptional regulation of the human
parathyroid hormone gene in a
parathyroid-derived cell line PT-r: effects of
calcium and 1,25(OH)2D3. Bone 2010; 47:
534-541. (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

岩崎泰正、中村卓史。骨バイオサイエンス
研究会、2014年6月28日、おかやま MUSCAT
CUBE、MUSCAT Hall (岡山県)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩崎 泰正 (IWASAKI, Yasumasa)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 30303613

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし