

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07296

研究課題名(和文) TRPV6変異による骨形成不全を伴う新生児副甲状腺機能亢進症の発症メカニズム解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of transient neonatal hyperparathyroidism caused by TRPV6 variants

研究代表者

鈴木 喜郎 (Suzuki, Yoshiro)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40348503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新生児期副甲状腺機能亢進症の遺伝的因子として同定された新規TRPV6変異を解析することによって発症メカニズムを推定することができた。具体的には変異体がゴルジ体へ進めず小胞体に留まっていることを細胞レベルで明らかにした。このことからTRPV6遺伝子変異によって小胞体ストレスが生じ、同疾患を発症することが示唆された。また環境因子の1つである母体ビタミンD3欠乏が本疾患発症の危険因子であるという状況証拠を得ることができた。さらに当該変異に相当する変異を導入したノックインマウスを作成した。今後、上記の仮説を組織・個体レベルで証明し発症メカニズムの全貌を解明したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってカルシウム関連疾患の発症機序の一端が明らかになった。このことは同疾患の根治のための足がかりとなるとともに、疾患の迅速な診断および治療方針の決定に貢献する。また、将来的には母体ビタミンD3補充等によって同疾患の予防にもつながることが期待できる。さらに骨粗鬆症など他のカルシウム関連疾患や、カルシウム輸送障害が原因と思われるいなかった他の疾患の原因解明にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Calcium (Ca²⁺) has numerous physiological functions. Therefore, its level of extracellular fluid is maintained within a narrow range. In fetus, moreover, large amount of Ca²⁺ is needed because fetal bone has to be mineralized during development. Mutation of the gene encoding a Ca²⁺ channel TRPV6 have been found from patients with transient neonatal hyperparathyroidism. However, its molecular mechanism of disease has not been understood. In this project, by using immunocytochemistry and Western blotting, I showed that several TRPV6 variants did not go into the Golgi but stay at the ER. This suggests that TRPV6 mutants induce an ER stress which might cause tissue damage resulting in an impaired Ca²⁺ transport.

研究分野：生理学

キーワード：TRPチャネル カルシウム恒常性 胎盤 新生児副甲状腺機能亢進症

1. 研究開始当初の背景

カルシウム(Ca^{2+})は生体内の多くの生理機能に重要であり、その血中濃度は厳密に保たれている。妊娠終期の胎児においては、それに加えて骨の石灰化が行われることから、胎盤において母親から胎児へ濃度勾配に逆らった能動的な Ca^{2+} 輸送が行われる。その母子間 Ca^{2+} 輸送の分子メカニズムが明らかでないため、その破綻により発症すると考えられていた骨形成不全を伴う新生児副甲状腺機能亢進症への治療戦略は対症療法にとどまっていた。日本の新生児の 22% において骨軟化・ビタミン D 低値、そのうち 6.9% (全新生児の 1.5%) において二次性副甲状腺機能亢進症が認められているため潜在的な患者数は多いと考えられる。

研究代表者は米国・スイスでの研究留学中に上皮 Ca^{2+} 輸送を担うイオンチャネルである TRPV6 のノックアウトマウスを解析した。その際、胎児期・新生仔期に一過的に骨形成不全に陥るといふ奇妙な現象を発見した¹。その表現型の極端さから、ヒトにおいても実は上皮 Ca^{2+} 輸送障害による骨疾患が広く存在することを確信した。では、上皮 Ca^{2+} 輸送障害に起因した疾患はどのようなメカニズムで発症するのだろうか？この問いに対し、イオンチャネルの TRPV6 機能喪失による骨形成不全症を解析すれば、上皮 Ca^{2+} 輸送障害に起因した疾患メカニズムの全容に迫ることができると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は骨形成不全を伴う新生児副甲状腺機能亢進症患者における遺伝子解析の結果、上皮型 Ca^{2+} チャネルである TRPV6 に変異を見出した²。これは今まで原因とは考えられてこなかった上皮 Ca^{2+} 輸送障害による骨関連疾患発症の可能性を示唆しており、他の研究では疾患との関係を示した報告はない。本研究では前述の目標を実現するため、まず TRPV6 遺伝子変異による新生児副甲状腺機能亢進症発症の分子メカニズムを明らかにすることを目標とした。特に、最も頻度が高く変異の hotspot を形成している膜貫通領域(S1-S3)細胞外側の変異による trafficking 異常について、その原因を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

TRPV6 膜貫通領域の細胞外側に見出された Trafficking 障害の変異について、myc-TRPV6 変異体をリポフェクション法によって HEK293 細胞に一過的に導入し、変異体がどの膜系に行っているかを細胞内小器官のマーカーを用いた細胞免疫化学法で解析した。その際、小胞体のマーカーとして抗 PDI 抗体を、ゴルジ体のマーカーとして RCAS1 抗体を用いた。観察には岩手医科大学・生命科学研究支援センターの BZ-9000(キーエンス)を使用した。また各変異体の糖鎖の性質を Endo H による消化を用いて解析し、ゴルジ体経由の有無を検討した。ゴルジ体を經由したチャネルはその糖鎖に修飾を受けるため Endo H では消化されなくなる、つまりバンドのシフトが見られなくなるが、ゴルジ体に達していないものは消化されることが予想された。さらに細胞分画法によってゴルジ体を単離し、変異体の有無を直接検討した。

また TRPV6 変異の *in vivo* における役割を明らかにするため、各変異を導入したノックインマウスを作製した。具体的には、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こす G450E 変異(ヒト G451E に相当)、および細胞膜上に移行できない R424Q 変異(ヒト R425Q に相当)に着目し、ゲノム編集マウス作成用 ssODNs およびガイド RNA の設計を行い、CRISPR/Cas9 法によるノックインマウスの作成を行った。作製には生理学研究所・遺伝子改変動物作製室の支援を仰いだ。

4. 研究成果

(1) trafficking 変異体の細胞内局在

免疫細胞化学法の結果、野生型(WT)や細胞内変異体 I223T は RCAS1 との共局在が認められ、ゴルジ体へ到達していることが示唆されたが、trafficking 変異体の 1 つである R425Q は RCAS1 とは共局在せず、小胞体マーカーである PDI と共局在していた。また WT や I223T は Endo H 処理によるバンドのシフトは見られなかったが、R425Q や他の trafficking 変異体ではシフトが認められた。さらに細胞分画法によってゴルジ体を単離した結果、WT および I223T は検出されたが R425Q は検出されなかった。

これらのことから野生型や細胞内変異体はゴルジ体まで進む一方、Trafficking 変異体はゴルジ体へは進めずに小胞体に留まっていることが明らかになった。このことは細胞膜上のチャネル活性や Ca^{2+} 透過性が認められないという結果を支持するが、興味深いことに、細胞膜上のチャネル活性が認められないにもかかわらず、trafficking 変異体を発現させた細胞では上皮細胞としての integrity が著しく損なわれていた。共通変異体が小胞体に留まることによって小胞体 Ca^{2+} 枯渇を起こし各種シャペロンおよび酵素の活性低下を起こす、いわゆる小胞体ストレスが起きていることが示唆された(図1)。

(2) TRPV6 変異体ノックインマウスの作製
 G450E および R424Q マウスについて生理学研究所・遺伝子改変動物作製室において F0 マウスの作製に成功した。その後、凍結受精卵を岩手医科大学・動物研究センターに輸送し、個体化を行った。現在、オフターゲット除去のためバッククロスを行っている。今後、これらのマウスを掛け合わせることによって上記の仮説を *in vivo* において証明することによって骨形成不全を伴う新生児副甲状腺機能亢進症の発症メカニズムを明らかにしたい。

(3) 母体ビタミン D₃ の影響
 骨形成不全を伴う新生児副甲状腺機能亢進症の国内症例において環境因子の 1 つである母体ビタミン D₃ 欠乏が本疾患発症の危険因子の 1 つであるという状況証拠を得ることができた。TRPV6 遺伝子変異に加えて環境因子も疾患発症に重要であることが示唆された³。今後、こちらにもノックインマウスを用いて証明することによって、多因子性疾患である骨形成不全の発症メカニズムを明らかにするとともに、人類における遺伝因子と環境因子の相互作用を詳細に解析するための足掛かりとしたい。

(4) その他
 研究代表者は 2019 年に生理学研究所から岩手医科大学へ移籍した。その際、旧講座の整理が手つかずであったため、1 講座分のラボの整理を行った(合計 2 研究室の引っ越しに相当)。その後、スペースを確保した上で生化学、分子生物学、細胞培養、Ca²⁺イメージング、マウス飼育のセットアップを順次行っていった。いくつかの予期せぬ困難に直面したが、生理学講座統合生理学分野のメンバーや事務局など、岩手医科大学の方々のご協力により無事に上記研究を遂行することができた。心より感謝申し上げたい。

5. 引用文献

1. Suzuki Y et al. Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport
J Bone Miner Res 23(8):1249-1256 (2008)
2. Suzuki Y et al. TRPV6 variants interfere with maternal-fetal calcium transport through the placenta and cause transient neonatal hyperparathyroidism.
Am J Hum Genet 102(6): 1104-1114 (2018)
3. Suzuki Y, et al. Novel TRPV6 mutations in the spectrum of transient neonatal hyperparathyroidism.
J Physiol Sci 70(1): 33 (2020)

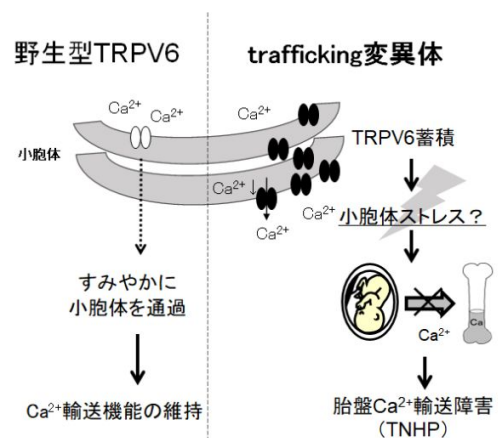


図 1. Trafficking 変異による疾患発症メカニズム(仮説)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Yoshiro, Sawada Hirotake, Tokumasu Tomoko, Suzuki Shigeru, Ninomiya Shinsuke, Shirai Masaru, Mukai Tokuo, Saito Claire T., Nishimura Gen, Tominaga Makoto	4. 巻 70(1)
2. 論文標題 Novel TRPV6 mutations in the spectrum of transient neonatal hyperparathyroidism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00761-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita S, Mizumoto H, Sawada H, Suzuki Y, Hata D	4. 巻 3 (3)
2. 論文標題 TRPV6 gene mutation in a dizygous twin with transient neonatal hyperparathyroidism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 602-606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2018-00374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 鈴木喜郎	4. 巻 270 (10)
2. 論文標題 TRPV5, TRPV6と上皮Ca ²⁺ 輸送	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 947-951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木喜郎
2. 発表標題 新生児一過性副甲状腺機能亢進症における新規TRPV6変異の同定
3. 学会等名 第52回東北生理談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下純英、澤田浩武、鈴木喜郎、水本洋、秦大資
2. 発表標題 胎盤カルシウムイオンチャネルTRPV6遺伝子異常による新生児一過性副甲状腺機能亢進症
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木喜郎、David Chitayat、澤田浩武、西村玄、富永真琴、中隋克己
2. 発表標題 TRPV6は胎盤における母子間Ca ²⁺ 輸送に関与する
3. 学会等名 第51回東北生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木喜郎
2. 発表標題 胎児の骨形成のための母子間ミネラル輸送
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤紘帆、鈴木喜郎、中隋克己
2. 発表標題 TRPV6トラフィックンク変異体の細胞内局在の解析
3. 学会等名 第53回東北生理談話会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	トロント大学			