

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790598

研究課題名(和文) 二次性副甲状腺機能亢進症の病態へのグリアルセルミッシング2の関与

研究課題名(英文) Calcium-sensing receptor expression is regulated by glial cells missing-2 in human parathyroid cells

研究代表者

溝渕 正英 (MIZOBUCHI MASAhide)

昭和大学医学部内科学講座腎臓内科学部門・助教

研究者番号：90465203

研究成果の概要(和文)：Glial cells missing-2 (Gcm2)は副甲状腺の発生過程において重要な役割を担う転写因子である。二次性副甲状腺機能亢進症における Gcm2 の機能の解明を目的に、二次性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺細胞の Gcm2 遺伝子をベクター法によりノックダウンした際の、Ca 感知受容体、ビタミン D 受容体、PTH、PCNA、ビタミン D1 α 水酸化酵素の各 mRNA の発現変化を検討した。ノックダウンにより Ca 感知受容体の発現が有意に低下した。ビタミン D 受容体、PTH、PCNA、ビタミン D1 α 水酸化酵素の mRNA 発現に変化はみられなかった。Gcm2 のノックダウンにより影響を受けた Ca 感知受容体は、プロモータ 2 により合成されるエクソン 1B を含む転写産物であることが判明した。以上の結果から、過形成副甲状腺細胞において、Gcm2 は Ca 感知受容体発現を制御し、その発現制御にはプロモータ 2 が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glial cells missing-2 (Gcm2) is the key regulating transcription factor for parathyroid gland development. The role of Gcm2 in parathyroid cell physiology, however, has not been fully studied. In this study, we examined the effects of Gcm2 silencing on cultured human parathyroid cells. Collagenase-dispersed human parathyroid cells from patients with chronic kidney disease were infected with lentivirus expressing shRNA for human Gcm2. Seventy-two hours after infection, mRNA was processed and analyzed for Gcm2, PTH, vitamin D receptor (VDR), calcium-sensing receptor (CaR), 25-hydroxyvitamin D3 1-a-hydroxylase (1-OHase), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by real-time PCR (qPCR). CaR mRNA and protein were significantly reduced by Gcm2 silencing, however, VDR, PTH, 1-OHase, and PCNA were not significantly affected. Further analysis of CaR mRNA indicated that transcripts containing exon 1B, derived by transcription from CaR promoter 2, were downregulated by Gcm2 silencing. These results indicate that one function of Gcm2 is to maintain high levels of CaR expression in parathyroid cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：二次性副甲状腺機能亢進症、Gcm2、副甲状腺細胞、Ca 感知受容体、ビタミン D 受容体

1. 研究開始当初の背景

Glial cells missing 2(Gcm2)はショウジョウバエの神経系の発生に關与する glial cells missing の同族体 (homolog) で、哺乳動物においては神経系の発生ではなく副甲状腺発生過程で必須な転写因子である。Gcm2 の homolog である Gcm1 は胎盤の発生に必須な因子であるが、Gcm2 同様、副甲状腺の発生、機能にも關与している可能性がある。Gcm2 遺伝子欠損マウスは副甲状腺が欠失しているにもかかわらず、血液中に測定可能な程度の副甲状腺ホルモン(PTH)が検出される。これは副甲状腺細胞以外の PTH 産生細胞が胸腺に存在し、その細胞は Gcm1 を発現しているためであり、マウスでは Gcm1 が Gcm2 の機能を補正していると想定されている。しかしながら、ヒトでは Gcm1 発現細胞が PTH を産生しているという報告はない。また、生後個体の副甲状腺にも Gcm2 が持続的に発現していることは確認されているが、副甲状腺の発生段階において Gcm2 がどのように機能しているのか、さらに副甲状腺の分化・成熟への Gcm2 の關与については十分解明されていない。

Gcm2 上流の因子が副甲状腺の発生段階で Gcm2 を調節するが、Gcm2 の発現を直接調節しているのかも不明である。一方原発性、および慢性腎臓病に起因する二次性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺において Gcm2 の発現異常が報告されているが、報告者間での一貫性はなく、過形成副甲状腺における Gcm2 の発現および機能は全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、二次性副甲状腺機能亢進症の病態進展段階における Gcm2 の關与の究明を通して、病態を詳細に解明するとともに、新たな治療法 (薬) の開発の糸口を見出すことである。

3. 研究の方法

(1)Gcm2 の RNA 干渉

過形成副甲状腺を細分化し、細胞をコラゲナーゼ処理することで分散させ、4%

newborn calf serum を含んだ培地を用いて、48-well plate に 4×10^4 cell/well ずつ細胞を播く。Gcm2 発現を RNA 干渉によりノックダウンすることにより、副甲状腺の機能維持に重要な遺伝子(ビタミン D 受容体：VDR, Ca 感知受容体：CaR, PTH, PCNA, ビタミン D1 α 位水酸化酵素：1 α OHase)の発現変化を realtime-PCR 法を用いて検討する。RNA 干渉は lentivirus vector を用いた、vector 法を採用する。Gcm2 遺伝子に特異的な short hairpin RNA (shRNA)が導入された lentivirus vector を、副甲状腺細胞に感染させ、72 時間後に total RNA およびタンパクを抽出した。Gcm2mRNA は約 75%発現が抑制されており(図 1)、タンパク発現も同様に低下していた(図 2)ことより、当手法が副甲状腺細胞の Gcm2 発現を効率よく抑制することを確認できた。

図1

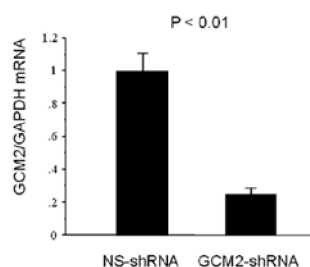
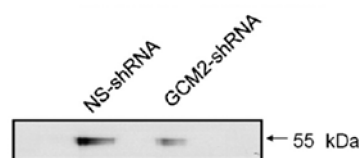


図2



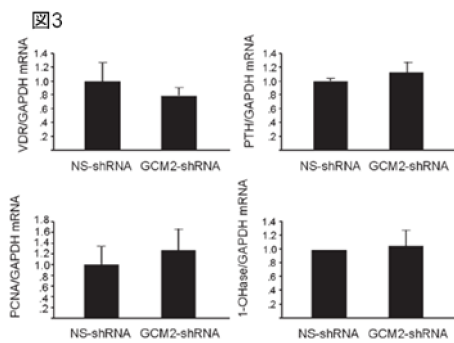
(2)副甲状腺関連因子(VDR, CaR, PTH, PCNA, 1 α OHase)の(1)による影響を検討す

るため、各因子の mRNA 発現変化をリアルタイム PCR 法により検討した。

(3)(2)から、Gcm2 のノックダウンにより CaR の発現低下が認められたことから、CaR 発現低下のメカニズムの検索のために、CaR 遺伝子プロモータ 1(または 2)からの転写産物に含まれるエクソン 1A(または 1B) の発現変化をリアルタイム PCR により検討した。

4. 研究成果

(1)Gcm2 のノックダウンにより、VDR, PTH, PCNA, 1 α OHase の mRNA 発現レベルに変化は見られなかった(図 3)。



(2)CaR の発現は、Gcm2 のノックダウンにより、mRNA レベル(図 4:47.8 \pm 21.1%低下)、蛋白レベル(図 5 : 48.1 \pm 4.3%低下)ともに有意に低下した。

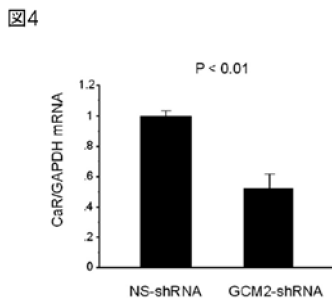
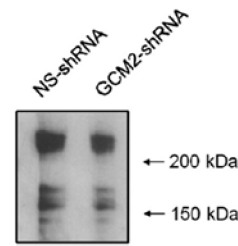
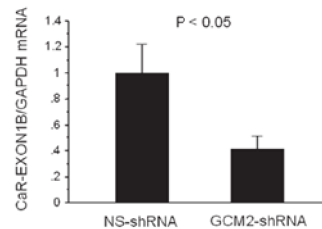


図5



(3)Gcm2 のノックダウンにより、CaRmRNA の中で、プロモータ 2 から転写される、エクソン 1B を含む転写産物の発現が有意に低下していた(図 6 : 58.8 \pm 19.3%低下)。

図6



以上の結果より、二次性副甲状腺機能亢進症患者の過形成副甲状腺細胞において Gcm2 は ①CaR 発現を維持する作用を有していること、②その維持には、プロモータ 2 からの CaR 転写機構への作用が関与していることが示唆された。

Gcm2 が副甲状腺機能制御の重要な因子である CaR の発現に関与していることから、Gcm2 の機能の詳細な解析により、二次性副甲状腺機能亢進症の病態解明や治療薬開発への発展が期待される。

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 1 件)

Mizobuchi M, Ritter CS, Kris I, Slatopolsky E, Sicard G, Brown AJ. Calcium-sensing receptor expression is regulated by glial cells missing-2 in human parathyroid cells. J Bone Miner Res 24:1173-1179, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

■溝渕正英、Regulation of calcium-sensing receptor by glial cells missing 2 in

hyperplastic parathyroid cells. 第29回
米国骨代謝学会義、2007年9月18日、ホノ
ルル

■溝渕正英、Regulation of calcium-sensing
receptor by glial cells missing 2 in
hyperplastic parathyroid cells. 第42回米
国腎臓学会、2007年11月3日、サンフラン
シスコ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号:

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: