

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：24591235

研究課題名(和文) 2次性副甲状腺機能亢進症における副甲状腺メガリンの病態生理学的役割の研究

研究課題名(英文) The role of megalin in secondary hyperparathyroidism of uremia

研究代表者

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

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)：メガリンは近位尿細管細胞で、ビタミンD結合蛋白の尿細管細胞への取込みを介して、ビタミンD活性化に寄与する。病的副甲状腺ではメガリン発現が低下しており、VDの副甲状腺細胞内への取込み低下が想定される。インフォームドコンセントを得た上で、副甲状腺腺腫を用いて初代培養を行った。メガリンのリガンドであるHis-RAPを培養液中に添加したところ、蛍光二重染色でメガリンは細胞膜に、His-RAPは細胞膜および細胞内にシグナルを認めた。副甲状腺細胞はメガリンを介し、His-RAPを細胞内に取込むことが示された。副甲状腺も尿細管と同様にメガリンを介してDBPを取込み、細胞内でVDを活性することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Megalyn is a multiligand endocytotic receptor involving in the reabsorption of calcitriol and vitamin D binding protein in renal proximal tubules. Parathyroid glands also express megalyn, however, little is known about its expressions and pathophysiological roles in hyperfunctioning parathyroid tumors. Its expression was observed in plasma membranes and cytoplasm in normal parathyroid glands. The expressions decreased in tumors with primary hyperparathyroidism and secondary hyperparathyroidism of uremia (SHPT) compared with strong expression in normal parathyroid glands. In SHPT, its expression was often particularly depressed in nodular areas, compared with adjacent diffuse hyperplasias. The reduced expression of both megalyn and VDR may enhance vitamin D resistance and hyper-secretion of PTH from these tumors.

研究分野：内分泌

キーワード：副甲状腺メガリン

1. 研究開始当初の背景

25 位水酸化ビタミン D (25OHD)は、血中でビタミン D 結合蛋白(vitamin D binding protein; DBP)と結合(KD=5 x 10⁻⁸M)し、腎臓へ運ばれる。そして、原尿と共に糸球体でろ過される。そして、近位尿細管細胞刷子縁に存在するエンドサイトーシス受容体メガリン(megalin)によって尿細管細胞内へ取り込まれる。

メガリンは Low Density Lipoprotein-Related Protein (LRP)ファミリーの一員で、近位尿細管細胞においてDBPを初めとして、ペプチド、アルブミン、ホルモン、アポリポ蛋白や、receptor-associated-protein (RAP)等の取り込みに関与する。

細胞内に取り込まれた 25OHD-DBP-メガリン複合体は、エンドソームで 25OHD を解離し、リソソームへ運ばれDBP は分解される。25OHD は、ミトコンドリアへ運ばれ、そこでビタミン D-1α 水酸化酵素(1αOHase)によって 1,25 位水酸化ビタミン D (1,25(OH)₂D)に変換され、基底膜側より流血中へと放出される。一方メガリンは、再利用(リクルート)され、再び刷子縁へ運ばれる(図1)。

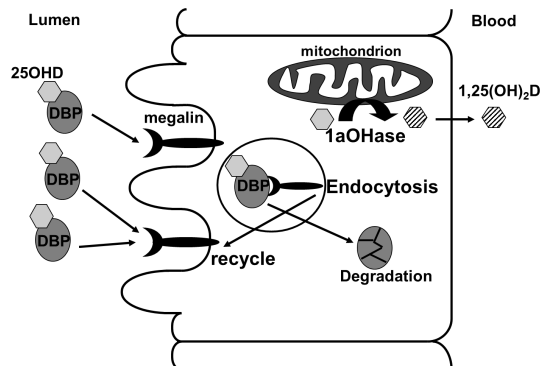


図1. 近位尿細管におけるメガリンの作用

2 次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)では、腎機能障害により生じる 1αOHase 活性の低下によって、25OHD から 1,25(OH)₂D への合成が障害される。さらに副甲状腺におけるビタミン D 受容体(VDR)の発現低下により、1,25(OH)₂D 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ことが知られている。

また、副甲状腺培養細胞に対するビタミン D アナログの添加実験等より、1,25(OH)₂Dこそが副甲状腺細胞に対する主要な生理活性物質であると考えられており、副甲状腺細胞に対する 25OHD の直接的な PTH 分泌抑制作用やその機序については未だ十分に検討されていない。

2. 研究の目的

副甲状腺においても、近位尿細管と同様、メガリンの発現が報告されている。副甲状腺細胞膜上のメガリンが、血中の 25OHD を取り込み、細胞内のミトコンドリアにおいて 1αOHase によって 1,25(OH)₂D に変換し、こ

の 1,25(OH)₂D が VDR と結合し、PTH の発現抑制に寄与していることが想定される(図2)。

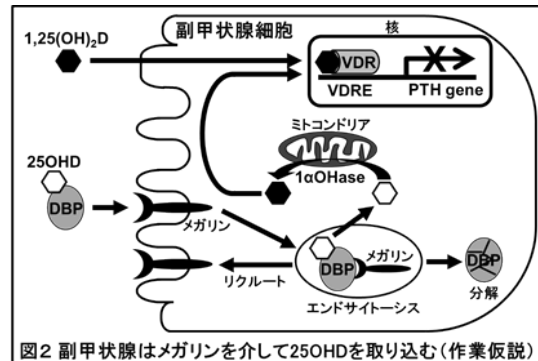


図2 副甲状腺はメガリンを介して25OHDを取り込む(作業仮説)

今回、副甲状腺メガリンの生理学的、病学的意義について検討するために、病的副甲状腺におけるメガリン発現、およびメガリンの PTH 遺伝子発現への関与について検討を行った。

3. 研究の方法

(1)原発性副甲状腺機能亢進症(PHPT)、2 次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)における副甲状腺メガリン発現の変化

インフォームドコンセントを得た上で、手術において摘出した PHPT、SHPT 患者の副甲状腺腫瘍におけるメガリン発現を、抗メガリン抗体を用いた免疫染色法にて染色した。さらに、ビタミン D 受容体(VDR)の発現も同様に免疫染色法にて染色し、画像処理の上、定量化した。

(2)メガリンの PTH 分泌調節機構への関与

インフォームドコンセントを得た上で、手術において摘出した PHPT、SHPT 患者の副甲状腺腫瘍を用いてヒト副甲状腺細胞初代培養を行い、メガリンと結合することによりメガリンを細胞内に取り込ませ、細胞膜上のメガリンを減少させることによりメガリンの機能を阻害する His-sRAP 投与によりメガリン機能を抑制し、PTH 遺伝子発現が亢進するか検討した。

4. 研究成果

(1)原発性副甲状腺機能亢進症(PHPT)、2 次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)における副甲状腺メガリン発現の変化

PHPT における副甲状腺アデノーマ(Adenoma)、および SHPT における副甲状腺びまん性過形成(Diffuse)は、正常副甲状腺(Normal)と比較しメガリンの発現が低下していた。SHPT における副甲状腺結節性過形成(Nodular)において、メガリンの発現はさらに低下していた(図3)。

また、メガリンの発現状態は、VDR 発現と相関を示した(図4)。

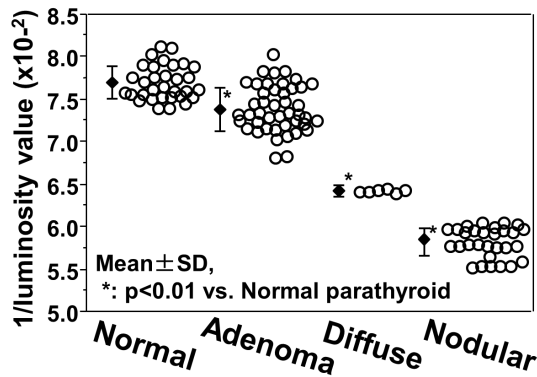


図3 . 病的副甲状腺におけるメガリン発現

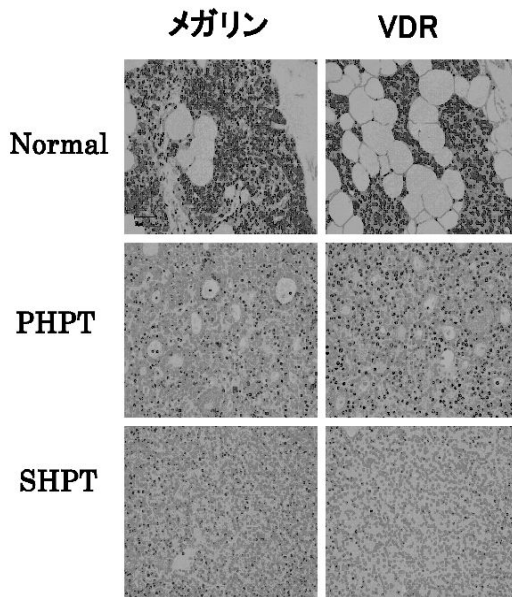


図4 病的副甲状腺におけるメガリンとVDR発現

以上より、病的副甲状腺においてはメガリンの発現が低下しており、副甲状腺細胞内において25OHDから1,25(OH)₂Dへの合成が障害されることが示唆された。

(2)メガリンのPTH分泌調節機構への関与
インフォームドコンセントを得たPHPT患者より副甲状腺腺腫を採取し、初代培養を行った。メガリンのリガンドであるHis-RAPを培養液中に添加し、His-RAPとメガリンの細胞内局在を検討した。

メガリンは細胞膜に、His-RAPは細胞膜および細胞内にシグナルを認めた。さらに蛍光二重染色で、細胞膜周囲に共局在を認めた(図5)。

副甲状腺細胞はメガリンを介し、His-RAPを細胞内に取込むことを示した。副甲状腺も尿管と同様にメガリンを介してDBPを取込み、細胞内でVDを活性化することが示唆された。

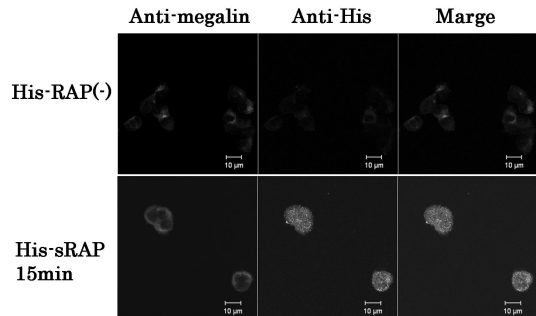


図5 . 培養副甲状腺細胞における蛍光二重染色

さらに副甲状腺細胞を初代培養し、25OHDを添加するとPTH遺伝子発現は低下した。この細胞に25OHDを添加し、さらにメガリンのリガンドであるHis-RAPを添加することにより、25OHDによるPTH遺伝子発現の低下は抑制された。

以上のことより、25OHDは、メガリンを介して副甲状腺細胞内に取り込まれ、さらに取り込まれた25OHDがPTHの遺伝子発現の抑制に作用することが示唆された。

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 1 件)

1. Yoda M, Imanishi Y, Nagata Y, Ohara M, Yoda K, Yamada S, Mori K, Inaba M: Teriparatide Therapy Reduces Serum Phosphate and Intima-Media Thickness at the Carotid Wall Artery in Patients with Osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 査読有、2015 in press

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Ohara M, Imanishi Y 他、Attenuated megalin expression may enhance hyperparathyroidism in hyper-functioning parathyroid tumors、8th International Congress on Uremia Research and Toxicity、2014/3/13、Okinawa Convention Center (沖縄県・那覇市)
2. 山形雅代、今西康雄他、副甲状腺ホルモン発現制御にメガリンが関与する、第32回日本骨代謝学会学術集会、2014/7/26、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
3. 今西康雄他、副甲状腺機能の調節と異常、第56回日本腎臓学会学術総会、2013/5/10、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
4. 今西康雄他、ビタミンD代謝における副甲状腺メガリンの機能、第58回日本透析医学会学術集会・総会、2013/6/23、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔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

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

(2)研究分担者

山形 雅代 (YAMAGATA, Masayo)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：50454583