

学位論文題名

Molecular Genetics Analyses of the Cause of Hypocalcemia and Hypercalcemia

(カルシウム異常をきたす疾患の分子遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

第1章

Molecular analysis of the GATA3 gene in five Japanese patients with HDR syndrome.
(日本人5人のHDR症候群におけるGATA3遺伝子の分子遺伝学的解析)

【背景と目的】HDR症候群は、副甲状腺機能低下症(Hypoparathyroidism)、感音性難聴(sensorineural Deafness)、腎奇形(Renal dysplasia)を三主徴とする常染色体優性遺伝形式を示す疾患で、その責任遺伝子はGATA3である。この三主徴が揃う症例は約6割で、同一家系でも表現型—遺伝型が一致しないことがある。HDR症候群の患者で同定したGATA3遺伝子変異の機能を検討し、変異と臨床症状を比較した。

【対象と方法】HDR症候群の患者とその家族に対し、GATA3遺伝子解析を行い、同定した変異の転写活性や細胞内局在について解析した。

【結果】HDR症候群の5名と低カルシウム血症を有する家族3名で、新規変異(c.1063delC、R262G、C318S)、既報の変異(c.432insG、c.1051-1G>T)を同定した。全例で副甲状腺機能低下症と感音性難聴を認めたが、腎奇形は3/8名であった。同一変異を有する家族例で、発端者は副甲状腺機能低下と感音性難聴のみであったが、父はその他に水腎症を、姉は多嚢胞腎、尿管異所開口、膈閉鎖の合併を認めた。しかし姉の血清カルシウムは正常下限で、発端者に比べ副甲状腺機能低下症に関しては軽症であった。稀な合併症として重複子宮と膈閉鎖を合併する症例が2例存在した。機能解析で変異体は野生型に比べ転写活性低下を認めた。細胞内局在はc.432insGのみ細胞質内に、その他は核内に存在した。

【考察】同定されたGATA3変異の機能喪失を証明した。ZnF2(zinc-finger domain)以降に欠失があるc.1063delCでも転写活性は低下し、C末端の欠失しているアミノ酸もGATA3の機能に重要であると考えられた。同一変異の家族例で症状の多様性が認められ、GATA3の標的遺伝子の多型やその発現量の差によって症状が異なる可能性がある。今回、子宮・膈の奇形を合併する症例が2例あり、Mueller管形成にGATA3が関与する可能性が示唆された。

【結論】日本人HDR症候群で、新規変異を含む5つの変異を同定し、機能喪失を証明した。症状は多様で、その機序を明らかにするには、GATA3の標的遺伝子の同定などが必須である。またHDR症候群の患者では、子宮・膈の奇形の検索を考慮し、Müller管形成へのGATA3の関与も今後検討が必要である。

第2章

Identification, functional characterization, and the effects of the calcimimetics NPS R-568 of novel loss of gain of function mutations of the calcium-sensing receptor.
(カルシウム受容体の機能獲得型変異、機能喪失型変異の同定と機能解析、カルシミメティックスNPS R-568の変異カルシウム受容体機能への効果について)

【背景と目的】CASR(カルシウム感知受容体)は副甲状腺や腎尿細管に発現し、血清カルシウムが上昇すると、PTH分泌を抑制、尿細管でのカルシウム再吸収を抑制して尿中カルシウム排泄量を増加させ、血清カルシウムを一定に保つ役割を果たす。しかし、CASRの機能獲

得型変異では、血清カルシウムが低いにも関わらず PTH 分泌が抑制されたまとなり、尿細管でのカルシウム再吸収は抑制され尿中カルシウム排泄が高値となる ADH (常染色体優性低カルシウム血症) を発症する。逆に、CASR の機能喪失型変異では、血清カルシウム高値にも関わらず、PTH 分泌は抑制されず、腎尿細管でのカルシウム再吸収は抑制されず、高カルシウム血症、相対的低カルシウム尿症を来す。機能獲得型変異のヘテロ接合体では軽度の高カルシウム血症を来す FHH (家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症)、ホモ接合体で、新生児期に重篤な高カルシウム血症を呈する NSHPT (新生児重症副甲状腺機能低下症) を発症する。今回、ADH、FHH 症例で、CASR 遺伝子解析を行い、変異 CASR の機能解析を施行した。更に、CASR の正のアロステリックモデュレーター(カルシミメティクス)である NPS R-568 による変異 CASR の機能・細胞膜発現量の変化についても検討した。

【対象と方法】ADH と診断した患者 3 名とその家族、FHH と診断した患者 2 名で、CASR 遺伝子解析を行った。さらに変異 CASR の機能解析を HEK293 細胞に野生型、変異 CASR 発現ベクターを遺伝子導入し、Gi-MAPK 経路と Gq-IP₃ 経路の二つのシグナル伝達をルシフェラーゼレポーターシステムで解析した。細胞膜表面の発現はウエスタンブロット、蛍光免疫染色、フローサイトメトリーで観察した。さらに NPS R-568 投与後の変異 CASR の機能回復の有無を検討した。

【結果】ADH 3 名で S122C、P569H、I839T、FHH 2 名で A110T、R172G のミスセンス変異をヘテロ接合性に同定した。機能獲得型変異では、Gi-MAPK、Gq-IP₃ 両経路の解析で、カルシウム用量反応曲線の左方偏位、EC50 低下、最大反応上昇を認めた。しかし、細胞膜表面の発現量は野生型とほぼ同等であった。機能喪失型変異では、同様に両経路の解析でカルシウム用量反応曲線の右方偏位、EC50 上昇を認めた。また細胞膜表面の発現量は野生型よりやや増加傾向がみられた。更に、NPS R-568 添加により機能喪失型変異の両シグナル伝達経路の活性化はいずれも野生型と同程度まで回復を認めたが、細胞膜表面の発現量に変化はなかった。

【考察】今回の検討では機能獲得変異、機能喪失変異でそれぞれ Gi-MAPK、Gq-IP₃ の両経路の機能亢進、機能低下を認め、今回同定した変異部位は、機能選択性に影響を与えないことが示された。機能喪失型変異は、過去の報告で、その約半数が膜表面発現量の低下があるとされるが、今回の変異では細胞膜表面の発現量低下は見られず、リガンド結合能の低下又は立体構造の変化によるシグナル伝達への影響が想定された。同定した機能喪失型変異に対して、NPS R-568 投与によりその受容体機能の正常化が可能であり、今後 FHH や NSHPT に対するカルシミメティクスの臨床応用も考慮できる。

【結論】同定した変異 CASR は機能獲得型変異、機能喪失型変異であることが証明された。また機能喪失型変異では NPS R-568 により機能の正常化が得られることから、今後、臨床応用への発展が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	水上	尚典
副査	教授	野々村	克也
副査	教授	清水	宏
副査	教授	有賀	正

学位論文題名

Molecular Genetics Analyses of the Cause of Hypocalcemia and Hypercalcemia

(カルシウム異常をきたす疾患の分子遺伝学的解析)

本研究は、カルシウム異常症の原因となる、GATA3 遺伝子異常による HDR 症候群、カルシウム感受受容体 (以下 CASR) 異常による常染色体優性低カルシウム血症 (以下 ADH)、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (以下 FHH) について、患者より変異を同定し、*in vitro*にて変異体の機能解析を行ったものである。CASR では、アロステリックモデュレーターによる変異受容体の効果について検討し、将来的な治療薬としての発展性を検討した。

発表終了後、清水教授より、c. 1043delC では起こっていないと推定されるが、c. 432insG の変異では NMD (nonsense-mediated mRNA decay) を来し、生体内ではタンパク質として発現されないのではないかという質問があった。今回の検討では、NMD が起きずに変異 GATA3 が発現していると想定し機能解析を行ったが、その可能性はあり得ると返答した。また、CASR のヘテロ接合体の機能喪失型変異では自覚症状を伴わない軽度の高カルシウム血症を来す事もあるとのことで、実際に報告されている症例より多く変異を有するのではないかと指摘があり、今後の検討課題であると返答した。

有賀教授より、GATA3 は胸腺に発現を認め、T 細胞の機能にも重要であるが、HDR 症候群において免疫異常を合併するという報告はないかという質問があった。現在まで、HDR 症候群で免疫異常を合併するという報告はなく、内耳、副甲状腺、腎臓では、GATA3 のハプロ不全により症状が出現するが、免疫細胞などでは、一つのアリルよりの正常な GATA3 の発現により、機能が保たれるのではないかと返答した。また、HDR 症候群において、GATA3 の胎生期での発現がそれぞれの臓器形成に重要である場合、副甲状腺や内耳などにおいて画像などで低形成などの所見を認めるのかという質問があり、感音性難聴に関しては、内耳神経の発達に GATA3 の発現が重要であり特に内耳の構造異常という報告はない、また、副甲状腺に関しては画像で評価することは困難であり、低形成を明らかにした報告はないと返答した。

野々村教授より、CASR では、カルシウム結合によりシグナル伝達系は同じように活性化する

のかとの質問があった。Gタンパク共役受容体では、一つの受容体に複数のGタンパクが共役しており、以前はリガンドが結合すると、同時に複数のシグナル伝達系が活性化すると考えられていた。しかし現在はGタンパク共役受容体の機能選択性という点が注目されている。つまり、リガンド結合後、必ずしも全てのシグナル伝達系が同時に同程度に活性化されないという事象である。今回、各変異でGi-MAPK系とGq-IP3系が異なった活性化、不活化が起きないかを検討するため、二つの情報伝達系について検討を行った。また、アロステリックモデュレーターも情報伝達系に異なった作用を発揮するかどうかを観察した。その結果全ての変異で、二つの情報伝達に関して差異は認めず、機能選択性というメカニズムについては明らかにすることはできなかったと返答した。

水上教授より、今回検討を行ったFHH症例はいずれも自覚症状がなかったが、何らかの症状を呈して見つかるFHH症例ではどのような症状があるのかという質問があり、新生児期に重篤な高カルシウム血症を呈する新生児重症副甲状腺機能亢進症では脱水、哺乳不良、意識障害などの症状が出現するが、高カルシウム血症の程度が軽度である場合には、易疲労感、情緒不安定、多飲などの症状が出現する可能性があり、合併症として、胆石や膵炎が報告されていると返答した。また、治療薬としては、临床上、カルシミメティクスとカルシリティクスのいずれが重要かとの質問があり、いずれも重要だが、FHHは程度が軽く治療の必要ない症例も多く、カルシミメティクスはすでに臨床応用されているシナカルセトがあるが、カルシリティクスに関しては、まだ、臨床応用されている薬物はなく、臨床適応されるカルシリティクスの開発がより重要ではないかと返答した。

HDR症候群に関する論文は、Endocrine Journal, 2011, 58 (2), 123-130に掲載されており、この知見はHDR症候群での新たな臨床所見の合併の可能性について、また、Mueller管形成におけるGATA3の関与の可能性について言及している。また、カルシウム感知受容体の機能解析は、今後、受容体のシグナル伝達の機序解明に重要であり、アロステリックモデュレーターの変異受容体の機能変化の成果は、CASR異常症の新たな治療法として期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。