



Familial hypocalciuric hypercalcemia caused by an R648stop mutation in the calcium-sensing receptor gene

山内, 美香

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-06-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2696

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002696>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 171 】

氏 名 ・ (本 籍) 山 内 美 香 (兵 庫 県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1879号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成15年6月11日

【 学位論文題目 】

Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Caused by an R648stop
Mutation in the Calcium-Sensing Receptor Gene
(カルシウム感知受容体に R648stop の変異を認めた家族性
低カルシウム尿性高カルシウム血症)

審 査 委 員

主 査 教 授 千 原 和 夫

教 授 春 日 雅 人

教 授 横 野 浩 一

はじめに

カルシウム感受性受容体（以下 CaR）は G 蛋白共役型受容体で副甲状腺に存在し、細胞外 Ca 濃度を感じて副甲状腺ホルモン(PTH)分泌を調節する。また腎臓では Ca の再吸収調節に関わる。CaR の不活性型変異により家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症(FHH)と新生児重症副甲状腺機能亢進症(NSHPT)が生じる。FHH では CaR の機能低下のため、高 Ca 血症にもかかわらず PTH は軽度上昇し低 Ca 尿症となるが、軽症で良好な臨床経過をとり、主にヘテロな変異による。NSHPT は重症型でヘテロ、コンパウンドヘテロ、ホモと様々である。副甲状腺における CaR の PTH 分泌調節以外の役割の詳細は不明であるが、細胞増殖調節への関与を示唆する報告がある。実際、CaR ノックアウトマウスで副甲状腺腫大を認めることや、腎不全モデルラットにおいて CaR アゴニストが副甲状腺腫大を抑制し、続発性副甲状腺機能亢進症(sHPT)を改善するといった報告は、副甲状腺における CaR 発現あるいは機能の低下が副甲状腺細胞増殖促進をきたす可能性を示唆する。またヒトにおいても NSHPT 患者や一部の FHH 患者では副甲状腺腫大を認める。一方、CaR の各領域の機能についても不明な点が多い。本研究では未だ明らかとなっていない副甲状腺における CaR の役割と受容機構について特に CaR の副甲状腺細胞増殖調節への関与、CaR の異常による副甲状腺組織の変化、本受容体の各領域の役割について明らかにするために、著明な副甲状腺腫大を伴った FHH 例について CaR の機能解析と副甲状腺の組織学的検討を行った。

対象および方法

患者背景

症例は 74 歳女性で 71 歳時高 Ca 血症、PTH 高値を認めるも経過観察されていた。74 歳時、PTH のさらなる上昇を認めたため当科入院した。Ca 11.4 (8.4-9.9)mg/dl、P 3.0 (2.4-4.5)mg/dl と高 Ca 血症にも関わらず intact PTH 292 (10-65) pg/dl と高値を示し、尿中 Ca 排泄は Ca クリアランス/Cr クリアランス比で 0.003 と低値で、Mg 2.9mg/dl と上昇がみられ、FHH に合致する所見であった。血縁者 17 名中 9 名に高 Ca 血症を認め、Ca クリアランス/Cr クリアランス比は 0.01 以下と低値を示した。画像検査で右下極に腫瘤像を認め、シンチグラフィで同部に集積を認めた。本例では FHH は存在するも、PTH 値が他の血縁者と比して著明高値であること、PTH 作用の存在が示唆されたこと、画像で腫瘤像を認めたことから、非常にまれではあるが FHH に原発性副甲状腺機能亢進症(pHPT)を合併した可能性を考え手術を施行した。左上腺は正常大であったが残りの 3 腺は腫大を認め、右上下腺は全摘し、左の上下 2 腺は biopsy を行った。

本症例と血縁者 17 名、および 50 名の正常コントロールについて同意を得た上、以下の検

討を行った。

免疫組織染色

免疫染色はホルマリン固定、パラフィン包埋された副甲状腺を用い ABC 法で行った。キシレンによる脱パラ、エタノールによる脱水後、0.3% H₂O₂ メタノールで内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。ビタミン D 受容体(VDR)、Ki67 はマイクロウェーブ処理にて抗体を不活化した後一次抗体を反応させた。ビオチン結合した二次抗体投与後ペルオキシダーゼでラベルしたストレプトアビジンを作用させた。最後に 3.3 ジアミノベンジジンを含んだ 0.1% H₂O₂ PBS を作用させた。CaR はハマトキシリンでの核染色を追加した。また、VDR、Ki67 は Ni²⁺ と Co²⁺ をそれぞれ最終濃度 0.3% で添加した。CaR 抗体、ADD はヒト CaR の細胞外ドメイン 214-235 アミノ酸残基に対するマウスモノクローナル抗体である。VDR 抗体と Ki67 はそれぞれ抗ヒト VDR ラットモノクローナル抗体(9A7γ.E10.E4)とラビットポリクローナル抗体である。

遺伝子解析

本例、血縁者の末梢白血球よりゲノム DNA を抽出し、PCR 産物の直接シーケンシング法により、CaR 遺伝子全翻訳領域（エクソン 2～7）の変異の有無を検討した。コドン 648 アルギニンが終始コドンとなる変異を認めたため、正常コントロール 50 名について制限酵素 Dde I を用いた restriction fragment length polymorphism 解析により多型であるかどうかを検討した。

CaR 発現実験と機能解析

コドン 648 アルギニンが終始コドンとなる変異の機能解析をするため、正常 CaR と本変異を有する受容体遺伝子および FLAG 標識を、pcDNA3 (Invitrogen Corp.) を用いてヒト胎児腎細胞(HEK293)に導入した。ウエスタンブロット法によりこの細胞の膜表面における CaR 発現を検討した。すなわち、細胞表面をビオチン化し、全細胞成分抽出物より抗 FLAG 抗体により CaR のみを抽出した。これを SDS-PAGE 法にて電気泳動し、ビオチン化されたバンドを ECL システム (Amersham) にて感光した。一方機能解析は同様の細胞を用いて細胞外イオン化 Ca 上昇に対する細胞内イオン化 Ca の変化を測定した。

結果

組織学的検討

組織所見では正常サイズであった左上腺は過形成を示した。一方腫大していた 3 腺は正常と同程度からやや多い脂肪組織を認め、lipohyperplasia に合致する所見と考えられた。細胞増殖の指標である Ki-67 染色では、一般に pHPT では染色細胞が散在し正常副甲状腺組織ではほとんど染色されない。本症例では標本中に 1 個認めた。VDR、CaR は pHPT ではいずれも

その発現が低下する。本例ではVDR、CaRとも正常と同程度に染色された。

遺伝子解析

コドン 648(膜貫通領域の第 1 細胞内ループ)のアルギニンが終始コドンとなる変異(R648stop)をヘテロで認め、血縁者では高 Ca 血症を示した例にのみ同様の変異をヘテロで認めた。正常者 50 名で検討した結果、本変異が多型でないことが示された。

CaR の発現及び機能解析

本変異型では正常より短い CaR の発現を確認した。これは R648stop にて想定される蛋白産物と合致した。細胞外 Ca 濃度の変化に対する細胞内 Ca 濃度の変化は本変異型では、全く反応を認めなかった。

考察

副甲状腺におけるPTH分泌調節以外のCaRの役割として、細胞増殖調節への関与が示唆されている。重度のsHPT を示す慢性腎不全患者では副甲状腺のCaRとVDR発現が低下することが知られているが、我々はこれまでに、腎不全患者における副甲状腺組織の検討からCaRがVDRより増殖の調節に重要である結果を得ている。本例の組織所見においてCaRの機能不全があるにもかかわらずVDR発現は正常であったことは、VDRよりCaRの方が細胞増殖調節に重要であることをさらに裏付ける結果といえる。また主にCaRのホモの変異が原因であるNSHPTでは副甲状腺腫大を認めるが、多くがヘテロな変異で生じるFHHの副甲状腺では正常から軽度腫大を示すとされている。ヘテロの変異の場合はその変異部位によって腫大をきたす例ときたさない例がある可能性が考えられる。本例ではin vitroでCaRの不活性型変異を証明し、組織にて副甲状腺腫大を確認した。このことから副甲状腺においてCaRの本変異による機能不全が細胞増殖の調節に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

副甲状腺正常組織では実質細胞と脂肪細胞を1:1の割合で認める。CaRの異常による副甲状腺組織の変化に関しては、NSHPTではpHPTと同様実質細胞の増殖を認める。FHHにおける組織は正常と同程度の脂肪組織を有したlipohyperplasiaを示すとされている。本例もこれに合致する所見であり、CaRのヘテロな変異ではlipohyperplasiaをきたす可能性が示唆された。また免疫染色の結果からCaRの機能不全はVDR発現に影響を及ぼさないことが示唆された。

CaRの各領域の機能については、細胞外領域がCaとの結合に関わるとされている。一方、膜貫通領域、細胞内領域については細胞内第2あるいは第3細胞内領域で終始コドンとなったレセプターは膜表面への発現ができないことや、C端が膜への発現に関与することが報告されている。本例では第1ループまでしかないにもかかわらずCaRが発現しており、この部位が膜への発現に関与することが判明した。膜貫通領域、細胞内領域は情報伝達を担うと考

えられているが、本例は細胞内第1ループ以降の部分を欠いているため情報伝達に膜貫通領域、細胞内領域のいずれが重要であるかという点については言及できない。細胞外領域の変異例でも副甲状腺腫大の報告例はあるが、膜貫通領域、細胞内領域でいうと細胞内領域C端に変異を有するFHH患者で副甲状腺腫大を認めており、細胞内領域が副甲状腺腫大に重要な役割を有する可能性が考えられる。

また、副甲状腺腫大の有無がpHPTとFHHの鑑別点になりうるか否かの臨床上的の問題点があるが、本FHH例のように画像で副甲状腺腫大が確認されることがあり、腫大の有無は鑑別点にならない。

以上、FHH例でのCaR遺伝子のR648stopとなる新規変異を証明し、さらに副甲状腺におけるCaRの役割と受容機構の一端を解明した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1879号	氏 名	山内 美香
論文題目	Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Caused by an R648stop Mutation in the Calcium-Sensing Receptor Gene カルシウム感受受容体に R648stop の変異を認めた家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症		
審査委員	主 査 千原和夫 副 査 春日雅人 副 査 横野 浩一		
審査終了日	平成 15 年 5 月 28 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

カルシウム感受受容体 (calcium-sensing receptor, CaR) は 1993 年に Brown らによって副甲状腺から単離、構造決定された G 蛋白共役型受容体で、副甲状腺以外に腎臓、骨、腸管、脳などに存在する。今まで知られている主な作用は、細胞外 Ca 濃度を感知して副甲状腺ホルモン (PTH) 分泌を調節すると共に腎臓では Ca の再吸収調節に関わることである。ところが CaR ノックアウトマウスで副甲状腺腫大を認めることや、腎不全モデルラットにおいて CaR アゴニストが副甲状腺腫大を抑制し、続発性副甲状腺機能亢進症 (sHPT) を改善するといった報告は、副甲状腺における CaR 機能の低下が副甲状腺細胞増殖促進をきたす可能性を示唆しており、副甲状腺における PTH 分泌調節以外に副甲状腺の細胞増殖調節への関与が考えられる。しかしヒトにおいてマウスやラットと同様なことが考えられるかどうかは不明である。申請者は、CaR の不活性型変異により起こった家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症 (FHH) の 1 家系の患者の内、74 歳女性で、著明な副甲状腺腫大を伴い画像で腫瘍像を認めたため非常にまれではあるが FHH に原発性副甲状腺機能亢進症 (pHPT) が合併した可能性のもとに手術された症例を経験し、患者および家族の informed consent 取得後、副甲状腺の組織学的検討ならびに CaR 遺伝子の解析および CaR の機能解析を行った。この患者は、71 歳頃たまたま高 Ca 血症 (11.4mg/dl)、intact PTH 高値 (292pg/ml) を発見され pHPT が疑われたが尿中 Ca 排泄は Ca クリアランス/Cr クリアランス比で 0.003 と低値で、Mg 2.9mg/dl と上昇がみられ、FHH に合致する所見であった。また血縁者 17 名中 9 名に高 Ca 血症を認め、Ca クリアランス/Cr クリアランス比は 0.01 以下と低値を示したことより FHH の家系と診断した。しかし本患者は、他の血縁者と比して血中 PTH が著しく高値であり明らかな副甲状腺腫瘍を認めたため手術に踏み切った。左上腺は正常大であったが残りの 3 腺は明らかに腫大していたので右上下腺は全摘し、左の上下 2 腺は biopsy を行った。組織所見として、正常サイズの左上腺は過形成であったが、腫大していた 3 腺は正常よりやや多い脂肪組織を認め、lipohyperplasia に合致する所見であった。細胞増殖の指標である Ki67 染色では、一般に pHPT では染色細胞が散在し正常副甲状腺組織ではほとんど染色されない。

本症例では標本中に 1 個認めた。VDR、CaR は pHPT ではいずれもその発現が低下する。本例では VDR、CaR とともに正常と同程度に染色された。重度の sHPT を示す慢性腎不全患者では副甲状腺の CaR と VDR 発現が低下することが知られているが、申請者達はこれまでに、腎不全患者における副甲状腺組織の検討から CaR が VDR より増殖の調節に重要である結果を得ている。本例の組織所見において CaR の機能不全があるにもかかわらず VDR 発現は正常であったことは、VDR より CaR の方が細胞増殖調節に重要であることを示唆している。本症例と血縁者 17 名、および 50 名の正常コントロールについて末梢白血球よりゲノム DNA を抽出し、PCR 産物の直接シーケンス法により、CaR 遺伝子全翻訳領域（エクソン 2～7）の変異の有無を検討したところコドン 648 アルギニンが終始コドンとなる新規の変異を認めた。本変が原因である新生児重症副甲状腺機能亢進症（NSHPT）では副甲状腺腫大を認めるが、多くがヘテロな変異で生じる FHH の副甲状腺では正常から軽度腫大を示すとされている。本例では発現実験で CaR の不活性型変異を証明し、組織にて副甲状腺腫大を確認した。このことから副甲状腺において CaR の本変異による機能不全が細胞増殖の調節に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

以上、本研究は、家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症の 1 家系で見出されたカルシウム感知受容体の新しい遺伝子変異について、その作用と病像形成における意義を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかったカルシウム感知受容体と副甲状腺細胞増殖の密接な関係について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。