

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 中村 明枝

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)

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、膣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膣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能低下を認めた。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・膣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・膣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】ADH3 名で S122C、P569H、I839T、FHH2 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。