

学位論文題名

Hydrochlorothiazide Effectively Reduces Urinary
Calcium Excretion in Two Japanese Patients with
Gain-of-Function Mutations of the Calcium-Sensing Receptor Gene

(カルシウム感知受容体遺伝子の機能獲得型変異を有する
日本人2症例においてヒドロクロロサイアザイドは
効果的に尿中カルシウム排泄を減少させる)

学位論文内容の要旨

カルシウム感知受容体(CaR)は7回膜貫通型G蛋白共役型受容体スーパーファミリーに属する。このG蛋白共役型受容体のサブファミリーは細胞外のN端側に約600のアミノ酸という非常に長い構造を有することで特徴づけられる。CaRは副甲状腺及び腎に強く発現し、細胞外カルシウムが直接CaRを活性化し、それにより副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌を抑制し、さらに腎でのカルシウムの再吸収を抑制する。CaR遺伝子のクローニング後、この遺伝子変異がヒトにおける血清カルシウム濃度の異常の原因となることが示された。本遺伝子の機能喪失型変異が、家族性良性高カルシウム血症や新生児重症型副甲状腺機能亢進症の病因となる一方、機能獲得型の変異は常染色体優性低カルシウム血症や散発性の高カルシウム尿性低カルシウム血症の病因となる。CaRの機能獲得型変異は、不適切に低い血清カルシウム濃度においてPTHの分泌を抑制、また腎におけるカルシウムの再吸収を抑制し、そのためPTHの低下、低カルシウム血症、相対的な高カルシウム尿症が引き起こされる。CaRの機能獲得型変異による常染色体優性低カルシウム血症や散発性の低カルシウム血症と原発性副甲状腺機能低下症との鑑別は重要である。というのは、CaRの機能獲得型変異で発症する患者では、ビタミンD及びカルシウム補充の結果として高カルシウム尿症や続発する腎機能低下といった危険が高いからである。無症候性の家族性高カルシウム尿性低カルシウム血症患者ではビタミンDによる治療はルーチンには行われるべきでなく、症状を有する患者に限定すべきである。CaRの機能獲得型変異を有する患者におけるサイアザイド系利尿剤の有用性について論じた報告はこれまでのところないが、本薬剤は試みるべき価値のある治療と思われる。その尿中カルシウム低下作用が、特発性高カルシウム尿症の治療に有効であったとする報告や、副甲状腺機能低下症患者においてビタミンD治療の副作用なしに、効果的に血清カルシウムレベルを維持したとの報告もある。

今回、申請者は、異なる新規のCaRの機能獲得型突然変異の結果発症した高カルシウム尿症を伴う重症低カルシウム血症の日本人の2散発例を経験した。症例1は現在18才の日本人男性である。日令24、けいれん重積を呈し、その際の血清カルシウム及び、リンはそれぞれ4.6 mg/dl, 10.2 mg/dl、PTHは測定感度以下であった。血清カルシウムが低値(7.6 mg/dl以下)でも、尿中カルシウム排泄は正常から高値を示した。7才3か月時、血清カルシウムを適切な濃度に維持するのに、1, 25(OH)₂ビタミンD₃を一日あたり1.2 µg/kg要した。腎エコー検査で腎石灰化が同定された。ヒドロクロロサイアザイドの投与が2 mg/kg/dで開始され、その後高カルシウム尿症の著明な軽快を認めた。同時に、血清カルシウム

を正常下限に維持するのに要する 1, 25(OH)₂ビタミンD₃ 投与量が 0.036 µg/kg/d に減少した。症例 2 は現在16才の日本人女性である。日令5、全身性の強直性けいれんを生じ、その際の血清カルシウム (5.2 mg/dl) 及び、マグネシウム (1.7 mg/dl) は低値であり、血清リンは高値 (8.7 mg/dl) で、PTH は測定感度以下であった。低い血清カルシウム濃度にもかかわらず、尿中カルシウム、クレアチニン比は高値 (0.84-1.68) を示した。経口カルシウム投与 (3-4 g/d) 及び1α(OH)ビタミンD₃ (0.2-0.5 µg/kg/d) の投与にもかかわらず血清カルシウムは激しく変動し (5.6-8.0 mg/dl) し、間欠的にしびれ感や、易疲労感、さらにテタニーを呈した。1α(OH)ビタミンD₃ の投与量の増加 (0.6-0.8 µg/kg/d) により尿中カルシウム排泄がさらに増加し、5才時に施行した腎のCT 検査で、両側腎の石灰化を認めた。12才時、1 mg/kg/dのヒドロクロロサイアザイドの投与が追加され、その後尿中カルシウム排泄が著明に減少し、同時に、血清カルシウムを正常下限近くまで上昇させた。また、ビタミンD投与量が減少し、患者の症状も軽快した。

この 2 症例について CaR 遺伝子の機能獲得型変異を疑い、同遺伝子解析を行なった。末梢白血球よりゲノム DNA を抽出し既存のプライマーを用い、PCR にて各エクソンを増幅後、直接塩基配列決定法により遺伝子変異の有無を検討した。症例 1 ではエクソン 7 の nt2528 に C から A への 1 塩基変異をヘテロで認めた。この変異により CaR の第 7 膜貫通領域のコドン 843 のアラニンがグルタミン酸に置換する (A843E 変異)。症例 2 では、エクソン 3 の nt 374 に T から C への 1 塩基置換をヘテロで認め、これにより CaR の細胞外領域に L125P ミスセンス変異がもたらされた。どちらの変異も正常日本人 50 人には認めない変異であった。家族の解析では、どちらの患者の両親にも遺伝子変異は同定されず、この変異が突然変異で生じたことを示している。続いて、L125P、及び A843E 変異型 CaR の *in vitro* での機能解析実験を行なった。同定された遺伝子変異を有する変異型受容体の作成を、missense primer を用いた site-directed mutagenesis にて行った。こうして得られた、変異型及び正常型受容体をそれぞれ HEK293 細胞に一過性にトランスフェクションし培養した後、様々なカルシウム濃度下で刺激し、反応終了後、細胞内 IP₃ 濃度を測定し検討した。野生型カルシウム感受受容体と変異型受容体の細胞外カルシウム濃度の増加に対する IP₃ の変動であるが、変異型受容体では濃度-反応曲線の左方移動を認め、より低い濃度で受容体が活性化されることが示された。以上の結果から 2 症例とも、CaR 遺伝子の機能獲得型突然変異が病因であると証明された。

CaRの機能獲得型ミスセンス変異の25報告のうち、少なくとも14はN端側の細胞外ドメインに存在する。これは、特にこの部位が変異によって誘導される活性化に敏感であることを示している。さらにJansenらは、CaRのN端側の116番目のアラニンから136番目のプロリンまでの部位がカルシウム感受受容体の非活性化構造維持に重要であることを証明した。L125P変異はこの部位に位置するので、同様のメカニズムによりL125P変異株の機能を活性化させるのかもしれない。A843E変異は第7膜貫通領域に存在した。この部位はヒト、ウシ、ラット、トリなどのCaRで保存されており、これはコドン843のアラニンがCaRの機能にとって重要なことを示している。さらに、第5膜貫通領域のF788C変異やL733R変異、第6膜貫通領域のF806S変異も*in vitro*の機能解析で機能獲得型変異であることが証明されている。これらの知見が、A843E変異がCaRの機能亢進の原因となり、その結果として疾患が生じることを示唆する。

まとめとして、ヒドロクロロサイアザイドは、尿中カルシウム排泄を減じビタミンDの投与必要量を減少させるとともに、血清カルシウム濃度を維持し患者の症状を緩和した。CaRの機能獲得型変異を有する患者にとっては、長期にわたるビタミンDとカルシウム製剤の補充により生じる高カルシウム尿症の増悪と、その結果による腎不全が予後を左右する最も重要な因子である。それ故、CaRの機能獲得型変異を有する患者においては多量のビタミンDやカルシウム製剤の補充は控えるべきである。このため、サイアザイド系利尿剤は、特に無症候性の低カルシウム血症と高カルシウム尿症を有する患者における第一選択薬剤となるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小林 邦彦
副査 教授 本間 研一
副査 教授 野々村 克也

学位論文題名

Hydrochlorothiazide Effectively Reduces Urinary Calcium Excretion in Two Japanese Patients with Gain-of-Function Mutations of the Calcium-Sensing Receptor Gene

(カルシウム感知受容体遺伝子の機能獲得型変異を有する日本人2症例においてヒドロクロロサイアザイドは効果的に尿中カルシウム排泄を減少させる)

カルシウム感知受容体(CaR)は7回膜貫通型G蛋白共役型受容体スーパーファミリーに属し、N端側に約600のアミノ酸からなる細胞外ドメインを有する特徴をもつ。CaRは副甲状腺や腎に強く発現し、細胞外カルシウムが直接CaRを活性化し、それにより副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌を抑制し、さらに腎でのカルシウムの再吸収を抑制する。CaR遺伝子のクローニング後、この遺伝子変異がヒトにおける血清カルシウム濃度異常の原因となることが示された。本遺伝子の機能喪失型変異が、家族性良性高カルシウム血症や新生児重症型副甲状腺機能亢進症の病因となる一方、機能獲得型の変異は常染色体優性低カルシウム血症や散発性の高カルシウム尿性低カルシウム血症の病因となる。CaRの機能獲得型変異は、不適切に低い血清カルシウム濃度においてPTHの分泌を抑制、また腎におけるカルシウムの再吸収を抑制し、低PTH血症、低カルシウム血症、相対的な高カルシウム尿症が起る。CaRの機能獲得型変異による常染色体優性低カルシウム血症や散発性の低カルシウム血症と原発性副甲状腺機能低下症との鑑別は重要である。理由は、CaRの機能獲得型変異で発症する低カルシウム血症に対するビタミンD及びカルシウム補充は、高カルシウム尿症や続発する腎機能低下といった危険が高いためである。CaRの機能獲得型変異を有する患者におけるサイアザイド系利尿剤の有用性について論じた報告はないが、本薬剤は尿中カルシウム低下作用があり、特発性高カルシウム尿症の治療に有効であったとする報告や、副甲状腺機能低下症患者においてビタミンD治療の副作用なしに、効果的に血清カルシウムレベルを維持したとの報告もある。

今回、申請者は、異なる新規のCaRの機能獲得型突然変異の結果発症した高カルシウム尿症を伴う重症低カルシウム血症の日本人の2散発例を見出した。症例1は現在18才の日本人男性。日令24にけいれん重積を呈し、その際の血清カルシウム及び、リンはそれぞれ4.6 mg/dl, 10.2 mg/dl、PTHは測定感度以下であった。血清カルシウムが低値(7.6 mg/dl以下)でも、尿中カルシウム排泄は正常から高値を示した。7才3か月時、血清カルシウムを適切な濃度に維持するのに、1, 25(OH)₂ビタミンD₃を一日あたり1.2 µg/kg要した。腎エコー検査で腎石灰化が同定された。ヒドロクロロサイアザイドの投与が2 mg/kg/dで開始され、その後高カルシウム尿症の著明な軽快を認めた。同時に、血清カルシウムを正常下限に維持するのに要する1, 25(OH)₂ビタミンD₃投与量が0.036 µg/kg/d

に減少した。症例2 は現在16才の日本人女性。日令5、全身性の強直性けいれんを生じ、その際の血清カルシウム (5.2 mg/dl) 及び、マグネシウム (1.7 mg/dl) は低値であり、血清リンは高値 (8.7 mg/dl) で、PTH は測定感度以下であった。低い血清カルシウム濃度にもかかわらず、尿中カルシウム、クレアチニン比は高値 (0.84-1.68) を示した。経口カルシウム投与 (3-4 g/d) 及び $1\alpha(\text{OH})$ ビタミンD₃ (0.2-0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) の投与にもかかわらず血清カルシウムは激しく変動し (5.6-8.0 mg/dl) し、間欠的にしびれ感や、易疲労感、さらにテタニーを呈した。 $1\alpha(\text{OH})$ ビタミンD₃ の投与量の増加 (0.6-0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) により尿中カルシウム排泄がさらに増加し、5才時に施行した腎のCT 検査で、両側腎の石灰化を認めた。12才時、1 mg/kg/dのヒドロクロロサイアザイドの投与が追加され、その後尿中カルシウム排泄が著明に減少し、同時に、血清カルシウムを正常下限近くまで上昇させた。また、ビタミンD投与量が減少し、患者の症状も軽快した。

この2 症例について CaR 遺伝子の機能獲得型変異を疑い、同遺伝子解析を行ない、症例1 ではエクソン7 の nt2528 にC からA への1 塩基変異をヘテロで認めた。変異はCaR の第7 膜貫通領域のコードン843 のアラニンがグルタミン酸に置換する (A843E 変異)であった。症例2 では、エクソン3 の nt 374 にT からC への1 塩基置換をヘテロで認め、CaR の細胞外領域の L125P ミスセンス変異であった。家族解析では、何れの両親にも遺伝子変異は同定されず、denovo の突然変異であった。L125P、及び A843E 変異型 CaR の in vitro での機能解析実験を行なった。同定された遺伝子変異を有する変異型受容体の作成を、site-directed mutagenesis にて行い、変異型及び正常型受容体をそれぞれ HEK293 細胞に一過性にトランスフェクションし培養した後、様々なカルシウム濃度下で刺激し、反応終了後、細胞内 IP₃ 濃度を測定し検討した。変異型受容体ではカルシウム濃度-反応曲線の左方移動を認め、より低い濃度で受容体が活性化されることが示された。以上の結果から2 症例とも、CaR 遺伝子の機能獲得型突然変異が病因であると証明された。

CaRの機能獲得型ミスセンス変異の25報告のうち、少なくとも14はN端側の細胞外ドメインに存在する。一方、Jansen らは、CaRのN端側の116番目のアラニンから136番目のプロリンまでの部位がカルシウム感受受容体の非活性化維持に重要であることを証明している。L125P変異はこの部位に位置するので、同様のメカニズムにより機能を活性化させるのかもしれない。A843E変異は第7膜貫通領域に存在した。この部位はヒト、ウシ、ラット、トリなどのCaRで保存されており、コードン843のアラニンがCaRの非活性化維持に重要なことを示している。

結論：ヒドロクロロサイアザイドは、尿中カルシウム排泄を減じビタミンDの投与必要量を減少させるとともに、血清カルシウム濃度を維持し患者の症状を緩和する。CaRの機能獲得型変異を有する患者にとっては、長期にわたるビタミンDとカルシウム製剤の補充により生じる高カルシウム尿症の増悪と、その結果による腎不全が予後を左右する最も重要な因子である。それ故、CaRの機能獲得型変異を有する患者においては多量のビタミンDやカルシウム製剤の補充は控えるべきである。一方、サイアザイド系利尿剤は、特に無症候性の低カルシウム血症と高カルシウム尿症を有する患者における第一選択薬剤となる可能性が高い。

公発表に際して、副査の野々村教授からサイアザイド使用中の腸管でのCa 吸収について、腎の石灰化はnephrocalcinosisに相当するが、その治療後の変化について、治療用のPTHの入手の可能性について、ステロイド使用の経験についてなど、副査の本間教授から本症の症状発現の機序、サイアザイドの効果発現の機序について、機能獲得変異とCa 結合性との関係についてなど、主査の小林教授からCa 感受受容体の生体における本来の機能について、またこの遺伝子の系統発生的意義についての質問があったが、申請者は自らの治験と文献から概ね妥当な回答をした。

本研究は、2種類の新しいCa 感受受容体機能獲得変異を見出すと共に、サイアザイド系薬剤がその変異疾患の治療に有効であることを実証した点で高く評価され、今後の本症の治療展望が開けることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。