

論 文 内 容 要 旨

題目 Calcilytic ameliorates abnormalities of mutant calcium-sensing receptor (CaSR) knock-in mice mimicking autosomal dominant hypocalcemia (ADH)

(Calcilytic は常染色体優性低カルシウム血症 (ADH) に類似した変異カルシウム感知受容体 (CaSR) ノックインマウスの異常を改善する)

著者 Bingzi Dong, Itsuro Endo, Yukiyo Ohnishi, Takeshi Kondo, Tomoka Hasegawa, Norio Amizuka, Hiroshi Kiyonari, Go Shioi, Masahiro Abe, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto

平成 27 年 Journal of Bone and Mineral Research に掲載予定

内容要旨

カルシウム (Ca) 感知受容体 (CaSR) は、副甲状腺や腎尿細管に高発現し、血中 Ca^{2+} 濃度に応じた副甲状腺ホルモン (Parathyroid hormone, PTH) の分泌や尿細管での Ca 再吸収を調節し、Ca 恒常性の維持に重要な役割を果たしている。CaSR 遺伝子の活性型変異に起因する常染色体優性低 Ca 血症 (Autosomal dominant hypocalcemia, ADH) は、PTH 分泌低下を伴う低 Ca 血症、高 P 血症や高 Ca 尿症など副甲状腺機能低下症と類似の病態を示す。しかし、ADH に対する活性型ビタミン D_3 の投与は低 Ca 血症を改善するものの、高 Ca 尿症の増悪をきたしやすく、腎石灰化、腎結石、腎不全のリスクとなることが知られている。また PTH 補充においても腎結石や骨石灰化が出現することから、本症に対する有用性の高い安全な治療法の開発が必要とされている。そこで、アロステリックな CaSR 阻害作用を発揮する calcilytic の ADH に対する治療効果を検討した。

まず、ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK) に我が国で報告されている 6 種のヒト CaSR 活性型変異遺伝子 (細胞外ドメイン変異 3 種: K47N, C129S, C131W、および膜貫通ドメイン変異 3 種: S820F, F821L, A843E) を過剰発現させたところ、ヒト変異 CaSR 蛋白の発現とともに細胞外 Ca^{2+} に対する細胞内 Ca^{2+} 上昇反応の亢進がみられた。Calcilytic である JTT-305/MK-5442 は用量依存的に活性型変異 CaSR による細胞内 Ca^{2+} 上昇の過剰反応を抑制した。次に ADH モデルマウスとして、ヒト CaSR の細胞

様式(8)

外ドメイン変異 C129S と膜貫通領域変異 A843E のヒト *CaSR* 活性型変異遺伝子をマウス *CaSR* 開始コドン下流に挿入した 2 種のノックイン(KI)マウスを作成した。これらの KI マウスはいずれも、血中 PTH 濃度の低下、低 Ca 血症、高 P 血症、高 Ca 尿症、腎 *CYP27b1* mRNA 発現低下を伴う血清 1,25 水酸化ビタミン D 濃度の低下や腎石灰化などを呈し、ヒト ADH の表現型を再現していた。重症型変異である A843E 変異を導入したマウスでは、より重篤な表現型を呈していた。PTH (1-34) の投与ではこれらの KI マウスにおける血清 Ca および P 濃度、血清 1,25 水酸化ビタミン D 濃度は改善したが、尿中 Ca 排泄はむしろ増加し、腎石灰化が見られた。しかし JTT-305/MK-5442 の投与では、これらの KI マウスの血中 PTH 濃度が上昇し、低 Ca 血症、高 P 血症、高 Ca 尿症、低 1,25 水酸化ビタミン D 血症がいずれも用量依存的に改善しており、腎石灰化も認められなかった。また、これらの KI マウスは骨代謝回転の低下による骨密度の上昇を認めしたが、JTT-305/MK-5442 の投与により、低下していた骨代謝回転が改善し、海綿骨を中心に骨密度がさらに増加した。以上より、JTT-305/MK-5442 は ADH に対する治療効果と安全性の高い有望な治療薬の候補であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1255 号	氏名	董 冰子
審査委員	主査 苛原 稔 副査 宮本 賢一 副査 親泊 政一		

題目 Calcilytic ameliorates abnormalities of mutant calcium-sensing receptor (CaSR) knock-in mice mimicking autosomal dominant hypocalcemia (ADH)
 (Calcilytic は常染色体優性低カルシウム血症 (ADH) に類似した変異カルシウム感知受容体 (CaSR) ノックインマウスの異常を改善する)

著者 Bingzi Dong, Itsuro Endo, Yukiyo Ohnishi, Takeshi Kondo, Tomoka Hasegawa, Norio Amizuka, Hiroshi Kiyonari, Go Shioi, Masahiro Abe, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto
 平成 27 年発行 Journal of Bone and Mineral Research に掲載予定
 (主任教授 安倍 正博)

要旨 カルシウム(Ca)感知受容体(CaSR)は、Ca の恒常性の維持に重要な役割を果たしているが、CaSR の活性型変異に起因する常染色体優性低 Ca 血症(autosomal dominant hypocalcemia: ADH)では、甲状腺ホルモン (PTH) の分泌低下を伴う低 Ca 血症、高 P 血症、高 Ca 尿症や腎結石などの病態を呈する。PTH の補充療法などの従来の ADH に対する治療法では低 Ca 血症は改善するものの高 Ca 尿症や腎結石がむしろ悪化するため、ADH に対する有効性および安全性の高い新規治療薬の開発が求められている。そこで申請者らは、ヒト胎児由来腎臓 (HEK) 細胞に我が国で報告された 6 種類の活性型変異 CaSR を強制発現させた培養系および、細胞外ドメイン変異 C129S と膜貫通領域変異 A843E を有するヒト CaSR の活

性型変異遺伝子を *CaSR* 開始コドンの下流に挿入した 2 種類のノックイン(KI)マウスを作製し、アロステリックな *CaSR* 阻害作用を発揮する calcilytic である JTT-305/MK-5442 の治療効果を検討した。

得られた結果は以下の通りである。

1. JTT-305/MK-5442 は、6 種類のヒト活性型変異 *CaSR* 蛋白を発現させた HEK 細胞における細胞外 Ca による過剰な細胞内 Ca 上昇反応を用量依存的に抑制した。
2. 作製した KI マウスは、C129S あるいは A843E を有するヒト *CaSR* を発現しており、血中 PTH 濃度の低下、低 Ca 血症、高 P 血症、高 Ca 尿症、腎 *CYP27b1* mRNA 発現低下を伴う血清 1,25 水酸化ビタミン D 濃度の低下、腎石灰化などヒト ADH と類似した病態を呈した。
3. JTT-305/MK-5442 をこれらの KI マウスに投与すると、血中 PTH 濃度の上昇とともに低 Ca 血症、高 P 血症、高 Ca 尿症および低 1,25 水酸化ビタミン D 血症が改善し、腎石灰化が消失した。
4. これらの KI マウスでは骨代謝回転が低下していたが、JTT-305/MK-5442 の投与により骨代謝回転の低下が改善し、海綿骨の骨密度が増加した。

以上の結果から、JTT-305/MK-5442 は従来の治療法では困難であった高 Ca 尿症や腎石灰化形成に対しても改善作用を有し、治療効果と安全性の高い有望な ADH の治療薬の候補と考えられた。本研究は、ADH の病態の解明と治療法の開発に寄与するものと考えられ、その臨床的意義は大きく学位授与に値すると判定した。