

副甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する 低カルシウム食飼育の影響

川根徹也 原元信貴 伊藤秀文 堀内 登

Effect of Low Calcium Diet on Parathyroid Hormone Receptor Gene Expression

Tetsuya KAWANE, Nobutaka HARAMOTO, Hidefumi ITOH and Noboru HORIUCHI

Parathyroid hormone (PTH) acts on bone and kidney by binding to PTH/PTH-related protein receptor (PTH1R) and regulate calcium (Ca) and phosphorous (P) homeostasis. This experiment was undertaken to investigate the effect of Ca and vitamin D restriction (-Ca-D) diet on PTH1R mRNA expression in the major PTH target tissues such as bone and kidney. Rats fed -Ca-D diet showed significant decrease in serum Ca and P on day 14 and day 7, respectively. Serum PTH and 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ [1, 25(OH)₂D₃] markedly increased on day 14 and day 1, respectively. Renal Vitamin D-1 α -hydroxylase activities increased slightly during day 1-7 and markedly during day 14-35. PTH1R mRNA abundance determined by Northern blot analysis did not change in bone and kidney, when rats were fed -Ca-D diet for up to 14 days. These results suggest that down-regulation of PTH1R in PTH target tissues is due to degradation, internalization and desensitization of the receptor protein without transcriptional attenuation.

Key words : parathyroid hormone receptor, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, bone, kidney

緒 言

副甲状腺ホルモン(PTH)は84個のアミノ酸からなるポリペプチドで骨や腎臓に作用し、生体のカルシウム(Ca)やリン酸の代謝を調節する¹⁾。PTHは、骨において骨芽細胞を介して破骨細胞を活性化する。一方、腎においては、Caの再吸収を促進し、さらに活性型ビタミンDである1,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃]の産生を亢進させるとともに、ビタミンDの不活性化酵素であるビタミンD-24-水酸化酵素(24-水酸化酵素)の合成を抑制する^{1,2)}。これらの作用の結果と

して、PTHは血液中のCaレベルを上昇させる。また、PTHは腎臓でリン酸利尿を引き起こすことで血液中のリン酸のレベルを低下させる。さらに、尿中への環状AMP(cAMP)の排泄を増加させるとともに、ナトリウム、水や炭酸の再吸収を抑制し、尿中への排泄を高める。

PTHは、骨や腎で発現している分子量約70kDaの膜タンパク質であるPTH/PTHrP受容体(PTH1R)に結合することでその作用を発揮する。PTHが標的細胞上のPTH1Rに結合すると、シグナルが細胞内に導入される。その二次メッセンジャーとして、cAMP、イノシトール三リン酸お

よび細胞内Caイオンの濃度が上昇し、最終的に標的細胞としての生理応答が引き起こされる³⁾。標的細胞のPTH1Rの発現量は細胞の外部環境に適応するために大きく変動することが知られている⁴⁾。

本研究ではラットを低Ca食で飼育し、血液中のCaレベルを低下させた場合、PTHやその他の血中成分の濃度、およびPTHの標的臓器である骨と腎臓のPTH1R遺伝子発現レベルがどのように変化するかを解析した。

材料と方法

1. 実験動物

6週齢のSD系ラット(日本クレア, 東京)を0.01%のCaと0.3%のPを含むビタミンD欠乏低Ca食(-Ca-D食), もしくは正常食で, 1から35日間飼育した。麻酔下でラットを屠殺し, 大腿骨, 腎臓および血液を採取した。大腿骨は骨髄を除去した組織を, 腎臓は髓質を分離した腎皮質組織を, 液体窒素を用いて急速凍結した後, -80℃で保存した。

2. 血清の生化学分析

血清中のカルシウムはオルトクレゾールフタレイコンプレキソンを用いたキレート発色法で, また, リン濃度はFiske-Subbarrowの方法により, いずれも比色法で定量した。血清中の1,25(OH)₂D₃濃度は, [³H]ラベルされた1,25(OH)₂D₃を用いてRadio Receptor Assay(RRA)法により測定した⁵⁾。血清中のPTHはIRMAにより測定した。

3. ノーザンブロット法によるPTH1R mRNAレベルの解析

解凍した大腿骨および腎皮質を4Mのグアニジンチオシアネートを含むLysing buffer中でホモジナイズし, Total RNAを抽出した。20μgのTotal RNAを, ホルムアルデヒドを含む1.2%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。泳動により分離したRNAをナイロン膜に転移させ, [³²P]でラベルしたPTH1R cDNAをプローブとして, ハイブリダイゼーションを行った。そして, この膜を洗浄した後, Molecular Imager FX(BioRad, CA, USA)を用いて放射能分布を画像化するこ

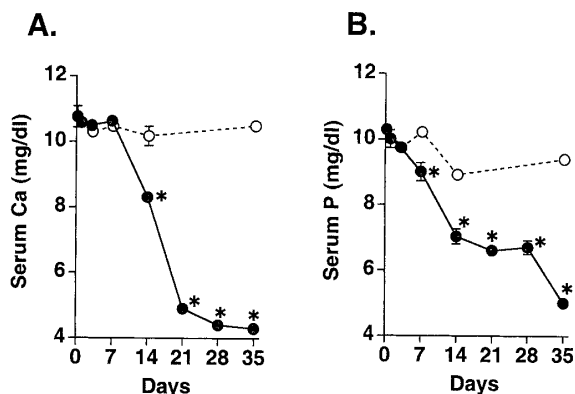


Fig. 1 Time course of the effect of -Ca-D diet on serum Ca (A) and P (B) concentrations in rats. Rats were fed -Ca-D diet (●) or normal laboratory chow (○) for the indicated periods. Serum Ca and P were measured colorimetrically. The data are expressed as the mean \pm SEM of 4 animals. *, $P < 0.05$ (compared with normal control at each point)

とで, PTH1R mRNAを定量した⁴⁾。

4. ビタミンD-1 α -水酸化酵素(1 α -水酸化酵素)活性の測定

屠殺直後の新鮮な腎皮質をホモジナイズ緩衝液(0.19Mスクロース, 25mMコハク酸ナトリウム, 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 20mM Tris-Hepes, pH 7.4)で洗浄し, この緩衝液を用いて, 5% [w/v] ホモジネートを作製した。これに, 基質として5μgの25OHD₃を加え, 37℃で30分間インキュベートした。反応停止後, ビタミンD代謝産物を抽出し, 生成した1,25(OH)₂D₃をRRA法で定量した⁶⁾。

5. 統計解析

結果の数値は平均値 \pm 標準誤差で表記した。有意差検定はFisher's protected least significant difference法による分散分析により行った。p値が5%未満のとき統計的に有意差があると見なした。これら統計解析にはStatView 4.02(Abacus Concepts, CA, USA)のプログラムを用いた。

結果

1. 低Ca食が血中Caおよびリン(P)濃度におよぼす影響

ラットを-Ca-D食で飼育した場合の血清中CaおよびP濃度の変化を調べた(Fig. 1)。正常食で2週間飼育した場合は, 血清CaとPの濃度はほと

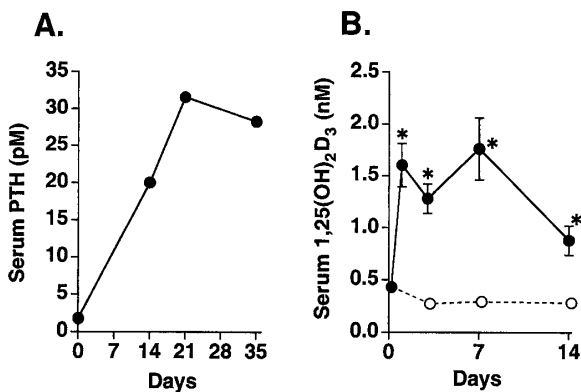


Fig. 2 Time course of the effect of -Ca-D diet on serum PTH (A) and 1, 25(OH)₂D₃ (B) concentrations in rats. Rats were fed -Ca-D diet (●) or normal laboratory chow (○) for the indicated periods. Serum PTH was measured by IRMA and serum 1, 25(OH)₂D₃ was determined by radioreceptor assay. The data are expressed as the mean ± SEM of 4 animals. *, P < 0.05 (compared with normal control at each point).

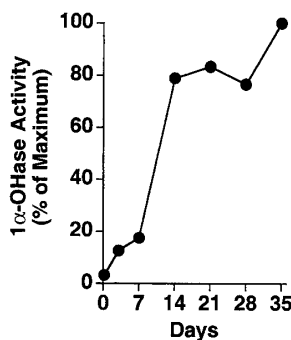


Fig. 3 Changes in renal vitamin D-1 α-hydroxylase activities in rats fed -Ca-D diet. Rats were fed -Ca-D diet for the indicated periods. Kidney homogenates were prepared and incubated with 25OHD₃. Synthesized 1, 25(OH)₂D₃ was determined by radioreceptor assay. The data are expressed as the mean.

んど変動しなかった。一方、-Ca-D食で飼育したラットの血清Ca値は7日目までほとんど変化しなかったが、14日目以降は有意に低下した。血清P濃度は-Ca-D食の摂取により徐々に低下してゆき、7日目以降コントロールに比べて有意な低値を示した。

2. 低Ca食が血中PTHおよび活性型ビタミンDにおよぼす影響

-Ca-D食で14-35日間飼育すると、血清中の

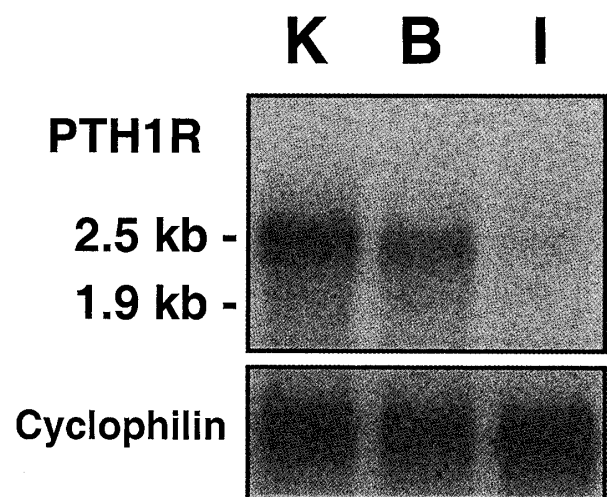


Fig. 4 Northern blot analysis of PTH1R and cyclophilin mRNA in rat kidney (K), bone (B) and intestine (I). Rats fed -Ca-D diet for 14 days were sacrificed, and thereafter femur and kidney cortex were removed. Total RNA (20 μg) was subjected to Northern blot analysis.

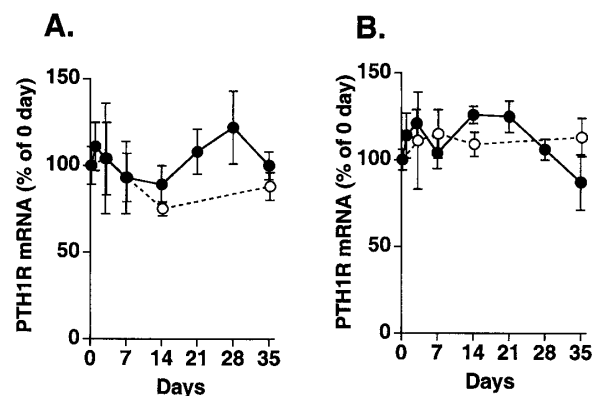


Fig. 5 Time course of the effect of -Ca-D diet feeding on PTH1R mRNA abundance in bone (A) and kidney (B) of rats. Rats were fed -Ca-D diet (●) or normal laboratory chow (○) for the indicated periods. PTH1R mRNA was determined using Northern blot analysis and the mRNA abundance was normalized to that of the cyclophilin mRNA.

PTHは著しく上昇した(Fig. 2A)。また、-Ca-D食にして1日後には、血中1,25(OH)₂D₃濃度は著明に上昇し、この高値は7日目まで維持されたが、14日目にはやや減少した(Fig. 2B)。さらに、この1,25(OH)₂D₃の合成酵素で腎臓に存在する1α-水酸化酵素量の変化を、その酵素活性を測定することにより評価した(Fig. 3)。この酵素活性は、

-Ca-D食飼育1日目と7日目において、0日と比べた場合、明らかに上昇していたが、上昇程度は小さかった。しかし、14日目以降35日目までは顕著な亢進が見られた。

3. 低Ca食がPTH1R mRNAレベルにおよぼす影響

骨と腎皮質組織におけるPTH1R mRNAの発現を確認するために、骨、腎及び小腸組織からTotal RNAを抽出し、ノーザンブロット法で解析を行った(Fig. 4)。骨と腎組織において、2.5kbの主要なシグナルと1.9kbのシグナルが確認された。小腸ではPTH1RのmRNAが検出されなかった。このうち、骨と腎において、主要な2.5kbのPTH1R mRNAレベルの変化をノーザンブロット法を用いて定量した(Fig. 5)。-Ca-D食で14日間飼育しても、ラットの骨と腎皮質のPTH1R mRNAレベルはほとんど変動しなかった。

考 察

標的細胞におけるPTH1Rの発現量は、この受容体のリガンドであるPTH⁷⁾や、リガンド以外のホルモンや増殖因子、例えばインスリン様成長因子I型(IGF-I)⁸⁾などにより下降調節(down-regulation)を受けることが知られている。前者をHomologous down-regulation、また、後者をHeterologous down-regulationと呼ぶ⁹⁾。本研究ではラットを-Ca-D食で飼育することで、血中PTH濃度を著明に上昇させた場合、主要なPTHの標的臓器である骨と腎臓において、期待されるPTH1R遺伝子発現の下降調節について検討した。

ラットを-Ca-D食で飼育すると、血中のPTHレベルは著しく上昇し、その上昇は21日目でピークの約 3×10^{-11} Mとなり、この高値は以降持続した。PTHは培養した骨芽細胞において、 10^{-10} ~ 10^{-9} M以上の濃度でPTH1R mRNAレベルを低下させることが知られている¹⁰⁾。しかし、血中濃度の上昇は 10^{-10} Mに満たないことから、PTH濃度の上昇は、PTH1R mRNAレベルには影響を与えないものと考えられる。

また、ラットを-Ca-D食で飼育すると、血中の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は速やかに上昇して 10^{-9} M以上となり、その顕著な上昇は14日間にわたって持続し

た。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、培養した骨芽細胞において 10^{-9} M以上の濃度でPTH1R mRNAレベルを低下させることが知られている¹¹⁾。しかし、ラットを-Ca-D食で14日間飼育しても、PTH1R遺伝子発現は下降調節されなかった。この結果から、骨と腎臓のPTH1R mRNAレベルは、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の上昇によって影響を受けないことが明らかとなった。これは、ビタミンD受容体などの $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が機能するために必要な因子の発現が、*in vivo*と培養細胞で異なるためではないかと考えられた。

さらに、低Ca高PTH血症動物のPTH標的臓器において、細胞表面の生理的に活性なPTH1R量は減少していることが知られているが¹²⁾、これは、受容体のインターナリゼーションの増加や分解の亢進、さらに、PTH1Rのリン酸化などによる脱感作に起因しているものと考えられる。

PTHは 1α -水酸化酵素の産生を増大させることが知られている。本研究においても、血中PTH濃度の上昇と腎臓の 1α -水酸化酵素の活性は強く連動していた。一方、-Ca-D飼育1日目では、この腎臓の 1α -水酸化酵素活性の上昇はわずかであるにもかかわらず、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は顕著な高値を示した。これは、-Ca-D食での飼育初期は、血中のCaとPのレベルが正常に保たれているために、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の消費が少なくても血中Caの恒常性が維持できている。すなわち、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の分解は亢進していないために、 1α -水酸化酵素活性のわずかな上昇によっても、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が著しく上昇したものと考えられる。一方、-Ca-D飼育が長期にわたると、骨吸収と腸管からのCa吸収を積極的に行わないと生体Caの恒常性が維持できない。このため、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は大量に消費されるが、顕著に活性が上昇した腎臓の 1α -水酸化酵素によって補充されるために、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が高濃度で維持されるものと考えられる。

結 論

低カルシウムビタミンD欠乏食でラットを飼育すると、血中PTH濃度および $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は顕著に上昇した。しかし、PTHの主要標的器

官である骨と腎臓のPTH1R mRNAレベルは低下しなかったため、骨と腎臓のPTH1Rの下降調節は遺伝子の転写のレベルではなく、受容体の分解や不活性化により行われていると考えられる。

文 献

- 1) 堀内 登：骨代謝とその異常(I)－カルシウム調節ペプチドホルモン(副甲状腺ホルモン, カルチトニン)の作用－. 日本歯科評論 **539**; 185-199 1987.
- 2) 堀内 登：骨代謝とその異常(II)－骨および腎における活性型ビタミンD₃[1, 25(OH)₂D₃]の作用－. 日本歯科評論 **540**; 167-179 1987.
- 3) Mannstadt, M., Jüppner, H. and Gardella, T. : h Receptor for PTH and PTHrP : their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* **277**; F665-F675 1999.
- 4) Kawane, T., Saikatsu, S., Akeno, N., Abe, M. *et al.* : Starvation-induced increase in the parathyroid hormone/PTH-related protein receptor mRNA of bone and kidney in sham-operated and thyroparathyroidectomized rats. *Eur J Endocrinol* **137**; 273-280 1997.
- 5) Saikatsu, S., Akeno, N. and Horiuchi, N. : Comparison of single cartridge (C18/OH) and high performance lipid chromatography sample purification for the thymus radioreceptor assay of 1, 25(OH)₂D. *Klinisches Labor* **39**; 737-744 1993.
- 6) Akeno, N., Matsunuma, A., Maeda, T., Kawane, T. *et al.* : Regulation of vitamin D-1 α -hydroxylase and 24-hydroxylase expression by dexamethasone in mouse kidney. *J. Endocrinol* **164**; 339-348 2000.
- 7) Kawane, T., Minura, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Horiuchi, N. : Parathyroid hormone (PTH) suppresses rat PTH/PTH-related protein receptor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **287**; 313-322 2001.
- 8) Kawane, T. and Horiuchi, N. : Insulin-like growth factor suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* **140**; 871-879 1999.
- 9) Guo, J., Liu, B-Y. and Bringhurst, F. R. : Mechanisms of homologous and heterologous desensitization of PTH/PTHrP receptor signaling in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* **273**; E383-E393 1997.
- 10) Jongen, J. W., Willemstein-van Hove, E. C., van der Meer, J. M., Bos, M. P. *et al.* : Down-regulation of the receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide by PTH in primary fetal rat osteoblasts. *J Bone Miner Res* **11**; 1218-1225 1996.
- 11) Xie, L. Y., Leung, A., Segre, G. V., Yamamoto, I. *et al.* : Downregulation of the PTH/PTHrP receptor by vitamin D₃ in the osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Am J Physiol* **270**; E654-E660 1996.
- 12) Turner, G., Coureau, C., Rabin, M. R., Escoubet, B. *et al.* : Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor messenger ribonucleic acid expression and PTH response in a rat model of secondary hyperparathyroidism associated with vitamin D deficiency. *Endocrinology* **136**; 3751-3758 1995.

著者への連絡先：堀内 登, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔生化学講座
 Reprint requests : Noboru HORIUCHI, Department of Biochemistry
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan