

## 原 著

## 腎不全透析患者のビタミンD受容体および副甲状腺ホルモン遺伝子多型の検討

加 藤 仁

## Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Parathyroid Hormone Genes in End-Stage Renal Disease

Kato Hitoshi (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Kamoda, Kawagoe, Saitama 350-8550, Japan)

Polymorphisms of vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone (PTH) genes have been demonstrated in several studies to be linked with bone mineral density and parathyroid function. In patients with end-stage renal disease (ESRD), vitamin D and / or PTH play important roles in the progression of secondary hyperparathyroidism. In this study, the influence of VDR gene and PTH gene polymorphisms on parathyroid function was evaluated in 189 patients with ESRD, of whom 150 received hemodialysis and 39 continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). VDR gene polymorphisms were defined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using Bsm-I and Fok-I and PTH gene polymorphisms were similarly defined by PCR-RFLP using Bst-BI and Dra-II. VDR genotypes were BB = 7%, BB = 16%, bb = 77%, and FF = 47%, Ff = 42%, ff = 11%. PTH genotypes were BtBt = 3%, Btbt = 21%, btbt = 76% and DD = 1%, Dd = 17%, dd = 82%. Patients without the VDR f allele showed significantly lower serum intact PTH ( $91 \pm 11$  :  $128 \pm 14$  pg / ml,  $p < 0.05$ ) and higher serum phosphate ( $5.7 \pm 0.2$  :  $5.1 \pm 0.1$  mg / dl,  $p < 0.01$ ) than those with the f allele. In the non-diabetic nephropathy group, serum intact PTH of patients without the f allele was clearly lower than in those with the f allele ( $84 \pm 14$  :  $136 \pm 16$  pg / ml,  $p < 0.01$ ), but no differences were seen in other clinical parameters. The f allele frequency was significantly higher in the high PTH group –(over 300 pg / ml and parathyroidectomy)– than in the low PTH group –(under 65 pg / ml)– ( $0.75$  :  $0.46$ ,  $p < 0.05$ ). In VDR gene polymorphism by Bsm - I and in PTH gene polymorphisms by Bst - BI or Dra - II, no relationship was seen between gene polymorphisms and clinical parameters. Our results indicate that parathyroid function may be influenced by the Fok-I polymorphism of the VDR gene in patients with ESRD.

**Keywords:** gene polymorphism, ESRD, VDR, PTH

*J Saitama Med School 2001;28:17-25*

(Received November 13, 2000)

## 緒 言

腎性骨異常症は長期透析患者の増加、高齢者ならびに糖尿病性腎症由来の透析導入患者の増加に伴い、維持透析の合併症としてより重要な臨床上の問題となってきた。また最近、腎性骨異常症の原因として副甲状腺機能低下に基づく低回転骨や無形成骨の存在が問題視されているが<sup>1-3)</sup>、腎性骨異常症の中で2次性副甲状腺機能亢進症による線維性骨炎は、依然として透析患者の重要な合併症として無視できない。慢性腎不全での2次性副甲状腺機能亢進症の発生機序は腎実質の減少に伴う $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 産生に必要な $1\alpha$ 水酸化酵素活性の低下、低カルシウム血症、腎からの排泄障害に起因する高リン血症<sup>4-6)</sup>などが複雑に関連していることが知られている。また、2次性副甲状腺機能亢進症に対しては、合成 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を使

埼玉医科大学総合医療センター第四内科

[平成12年11月13日受付]

用し血清カルシウム値、副甲状腺機能の調整が試みられているが、この治療に反応しない症例の存在が注目され、副甲状腺組織でのビタミンD受容体およびCa感受性受容体<sup>7-10)</sup>の遺伝子発現の異常が指摘されている。透析患者でのビタミンD受容体およびCa受容体遺伝子などの研究は副甲状腺機能異常の発現機序の解明に有効な研究手段と考えられる。

本研究では、ビタミンD受容体遺伝子、副甲状腺ホルモン遺伝子の多型性と透析患者の副甲状腺機能との関係を明らかにする目的で研究を企画した。

## 対象ならびに方法

## 1. 対象症例について

埼玉医科大学総合医療センター人工腎臓部および関連施設にて透析療法を受けている慢性腎不全患者189名（男性99名、女性90名）を対象とした。対象者の平均年齢は $57 \pm 1$ （SEM）歳、透析方法は血液透析（HD）150名、持続的腹膜透析（CAPD）39名で、平均透析

期間  $5.5 \pm 0.3$  ( SEM ) 年であった。原疾患は、慢性糸球体腎炎 106 名 ( 56.1 % ), 糖尿病性腎症 58 名 ( 30.7 % ), ならびに多発性囊胞腎症、妊娠中毒後遺症などの腎疾患 25 名 ( 13.2 % ) であった。また、対象とした 189 名中 7 症例は 2 次性副甲状腺機能亢進症 ( II<sup>o</sup>HPT ) の治療を目的に副甲状腺摘出術を受けていた。透析療法では、カルシウム濃度 3.0 mEq / 1 の透析液を使用した。

## 2. 方 法

### 1) ビタミン D 受容体 ( VDR ) および副甲状腺ホルモン ( PTH ) 遺伝子多型の同定について

対象とした全患者に研究の目的と抽出した DNA を流用しないことを説明し同意を得た上で、患者末梢血より genomic DNA を抽出した。抽出方法は、DNA Extractor WB Kit ( Wako 社 )<sup>11)</sup> を用い、下記の手順で行った。EDTA を添加した末梢血 1 ml に溶解液 ( 1% ( w/v ) Triton X-100, 0.32 M ショ糖 ) を 1 ml 加え、細胞から細胞核分画を抽出した。細胞核を含む抽出液に酵素反応液 ( 1% ( w/v ) SDS, 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM Tris - HCl ( pH 8.0 ) ) 400 μl と蛋白分解酵素 ( 17 mg / ml proteinase K ) 30 μl を加え、37°C, 1 時間保温し、核膜および核蛋白を分解した。さらに、1% ヨウ化ナトリウム溶液 ( 7.6 M NaI, 20 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 40 mM Tris - HCl ( pH 8.0 ) ) 600 μl を添加し、タンパク質および脂質等を可溶化状態にした後、40% ( w/s ) イソプロピルアルコール 1.0 ml と混和沈殿させ、DNA を採取した。

VDR および PTH の遺伝子多型の同定は、Polymerase Chain Reaction - restriction fragment length polymorphism ( PCR-RFLP ) 法を用いた。Primer は日本バイオサービスに委託し合成したものを TAE 緩衝液 ( 40 mM Tris - acetate, 1 mM EDTA, pH 8.3 ) にて 2.5 μM に溶解し用いた ( Table 1 )。

VDR 遺伝子の Bsm - I 多型は Morrison NA らの報告<sup>12)</sup> に準じて判定した。すなわち、genomic DNA 2.5 μl, Taq DNA polymerase ( strategene 社 ) 0.15 μl, 1.25 mM dNTP 4.0 μl ( 2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP ) を用いた。

dTIP), primer 各々 2.5 μl, および Buffer ( 200 mM Tris - HCl, 100 mM KCl, 100 mM ( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 mg / ml BSA ) 13.5 μl の計 20.15 μl を 94°C 40 秒, 60°C 60 秒, 72°C 60 秒の条件で、40 cycle の PCR を thermalcycler ( タカラ社製 ) を用いて行った。

VDR 遺伝子の Fok - I 多型は、Gross C らの報告<sup>13)</sup> に準じ、94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 45 秒の条件で、35 cycle の PCR を行った。

PTH 遺伝子の Bst - BI 多型と Dra - II 多型は、Mullersman JE らの報告<sup>14)</sup> に準じ、94°C 45 秒, 50°C 60 秒, 72°C 60 秒の条件で、35 cycle の PCR を行った。

各々の PCR 産物 5 μl を 1% アガロース・ミニゲルを用いた電気泳動 ( 100V, 30 分 ) を行い、エチジウム・プロマイド染色で特異的な DNA 断片が単一に増幅されていることを確認した。その後、PCR 産物 10 μl に各制限酵素 10 単位および Buffer ( 10 mM Tris - HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol ) を加え計 20 μl とし、至適温度で 3 時間反応させた。その後、2.5% アガロース・ミニゲルにて電気泳動 ( 100 V, 45 分 ) を行い、エチジウム・プロマイド染色により切断の有無を判定した。

判定の表現法としては、制限酵素の認識部位を持ち切開される対立遺伝子を小文字、認識部位を持たないで切開されない対立遺伝子を大文字で表記した。すなわち、VDR の Bsm - I 多型は b, B, Fok - I 多型は f, F, PTH の Bst - BI 多型は bt, Bt, Dra - II 多型は d, D で表した。

用いた制限酵素 Bsm - I, Fok - I および Dra - II は Boehringer Mannheim 社 製、Bst - BI は Toyobo 社 製を使用した。Fig.1 にゲノム遺伝子上の PCR 産物の部位、塩基数および制限酵素の認識部位を示す。

### 2) 臨床検査項目について

血液透析施行患者は透析開始時、腹膜透析施行患者は定期的外来を受診時に採血し、下記の項目を測定した。血清総蛋白 ( TP ), 血清アルブミン ( alb ), 血清

**Table 1.** PCR primers of VDR and PTH gene polymorphisms

#### I. VDR gene

##### a) Bsm - I genotype

forward primer ; 5' - CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA - 3'  
reverse primer ; 5' - AACCAAGCGGGAAAGAGGTCAAGGG - 3'

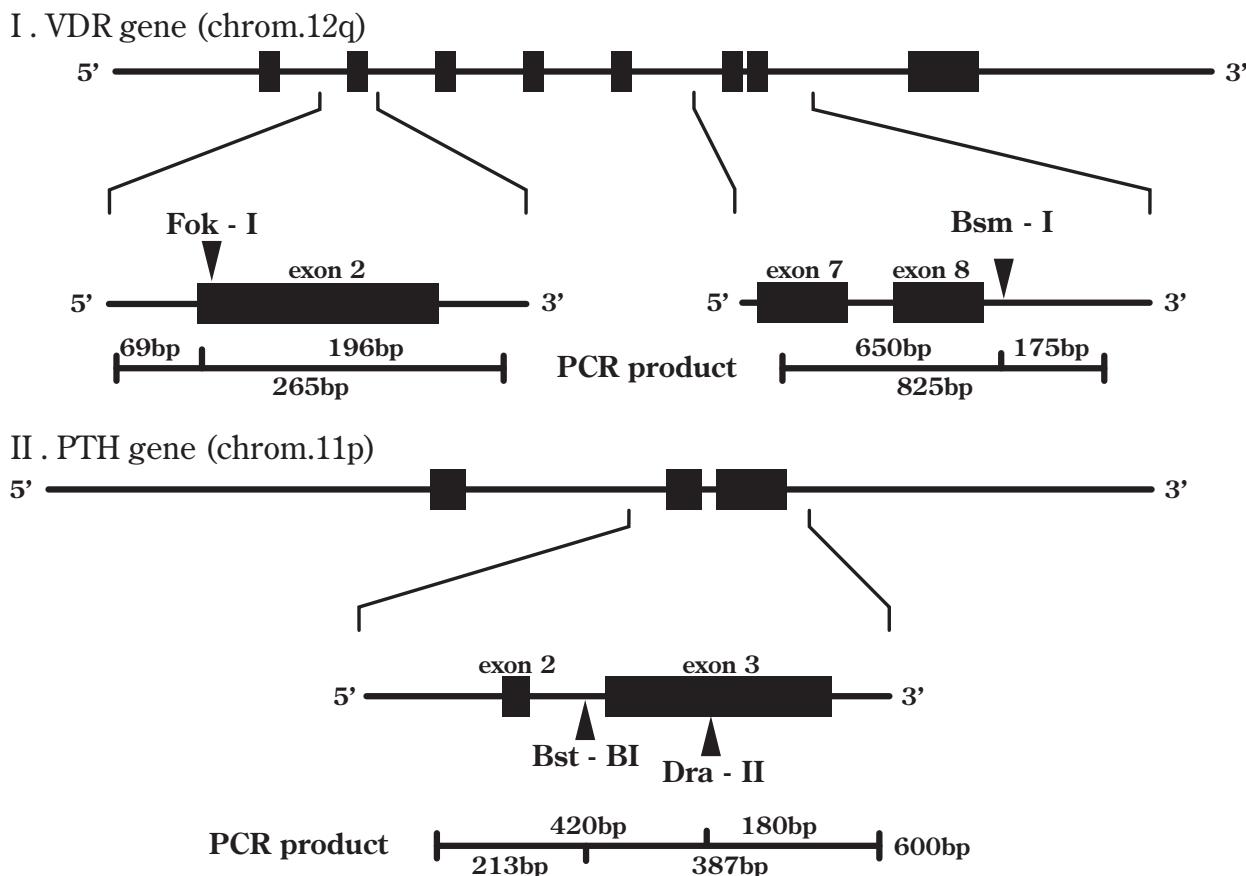
##### b) Fok - I genotype

forward primer ; 5' - AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT - 3'  
reverse primer ; 5' - ATGGAAACACCTTGCTTCTCCCTC - 3'

#### II. PTH gene

##### Bst - BI genotype and Dra - II genotype

forward primer ; 5' - CATTCTGTGTACTATAGTTG - 3'  
reverse primer ; 5' - GAGCTTGAATTAGCAGCATG - 3'



**Fig. 1.** The maps of PCR products and restriction sites by enzymes on VDR and PTH gene. The primers for Fok - I polymorphism, which are encompassing the second exon of VDR gene, are used to amplify 265 bp PCR product. The restricted PCR products by Fok - I are resolved into 196 bp and 69 bp fragments. The primers for Bsm - I polymorphism, which are encompassing the seventh and eighth exons of VDR gene, are used to amplify 825 bp PCR product. The restricted PCR products by Bsm - I are resolved into 650 bp and 175 bp fragments. The primers for Bst - BI and Dra - II polymorphisms, which are encompassing the second and third exons of PTH gene, are used to amplify 600 bp PCR product. The restricted PCR products are resolved into 213 bp and 387 bp fragments by Bst - BI, and then into 420 bp and 180 bp fragments by Dra - II.

総アルカリ fosfataーゼ (ALP), 血清カルシウム (Ca), 血清リン (P), 血清尿素窒素 (BUN), 血清クレアチニン (Cr) はオート・アナライザーにて測定した。血清インタクト PTH (iPTH) は、アレグロ intact PTH キットを用い immuno-radiometric assay (IRMA) 法で測定した。Ca 値は alb 値 4 g / dl 未満の場合には次の補正式により補正した値を用いた。補正 Ca 値 (mg / dl) = 実測 Ca 値 (mg / dl) + (4 - 血清アルブミン値 (g / dl))。炭酸カルシウム, 活性型ビタミン D 服用量は一日換算量で算出した。

### 3) 統計処理

測定値は, mean  $\pm$  SE で表した, Student's t test および Fisher's exact test を用い, p 値が 5 % 未満を有意差有りとした。なお, 副甲状腺組織が 3 次性に増殖していると考えられる iPTH 値が 600 pg / ml 以上の症例 (1 例), および副甲状腺摘出症例 (7 例) は, 臨床検査値の統計処理から除外した。

## 結果

1) 遺伝子多型の分布および対立遺伝子頻度の検討成績  
全対象症例に VDR および PTH 遺伝子多型をすべて試みたが, Bsm - I 多型 146 例, Fok - I 多型 165 例, Bst - BI 多型 123 例, Dra - II 多型 164 例で遺伝子多型の判定が可能であった (Table 2)。

(1) VDR 遺伝子の Bsm - I 多型分布は, BB : Bb : bb = 7 : 16 : 77 % で, 対立遺伝子の頻度は B : b = 15 : 85 % であった。また, VDR 遺伝子の Fok - I 多型分布は FF : Ff : ff = 47 : 42 : 11 % で, 対立遺伝子の頻度は, F : f = 68 : 32 % であった (Table 2)。

(2) PTH 遺伝子の Bst - BI 多型分布は, Bt Bt : Bt bt : bt bt = 3 : 21 : 76 % で, 対立遺伝子の頻度は Bt : bt = 14 : 86 % であった。また, PTH 遺伝子の Dra - II 多型分布は DD : Dd : dd = 1 : 17 : 82 % で対立遺伝子の頻度は, D : d = 10 : 90 % であった (Table 2)。

(3) 各々 4 つの遺伝子多型の分布, 対立遺伝子の

**Table 2.** Allele frequency and genotype distribution of VDR and PTH gene polymorphism in patients with ESRD

polymorphism	allele	genotype
VDR gene		
Bsm - I ( n=146 )	B : b = 15 : 85%	BB : Bb : bb = 7 : 16 : 77%
Fok - I ( n=165 )	F : f = 68 : 32%	FF : Ff : ff = 47 : 42 : 11%
PTH gene		
Bst - BI ( n=123 )	Bt : bt = 14 : 86%	BtBt : Btbt : btbt = 3 : 21 : 76%
Dra - II ( n=164 )	D : d = 10 : 90%	DD : Dd : dd = 1 : 17 : 82%

In VDR gene polymorphisms, B allele shows absence and b allele shows presence of restriction site by Bsm - I, similarly F allele shows absence and f allele shows presence of restriction site by Fok - I. In PTH gene polymorphisms, Bt allele shows absence and bt allele shows presence of restriction site by Bst - BI, similarly D allele shows absence and d allele shows presence of restriction site by Dra - II.

**Table 3-a.** Clinical parameters of VDR genotypes in patients with ESRD

	Bsm-I polymorphism			Fok-I polymorphism		
	BB	Bb	bb	FF	Ff	ff
numbers	10	23	113	77	70	18
%male	60	48	50	41	60	44
age (years)	52 ± 5.5	57 ± 3.3	56 ± 1.2	55 ± 1.7	58 ± 1.5	58 ± 1.8
duration (years)	5.6 ± 0.9	5.6 ± 0.9	5.6 ± 0.4	5.1 ± 0.5	6.0 ± 0.4	6.9 ± 1.2
Ca (mg/dl)	10.1 ± 0.4	9.6 ± 0.2	9.5 ± 0.1	9.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.2
P (mg/dl)	5.6 ± 0.5	5.3 ± 0.3	5.5 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.4
intact PTH (pg/ml)	74 ± 21	44 ± 7	130 ± 12	91 ± 11	135 ± 17	104 ± 18
CaCO3 (g/day)	3.1 ± 0.8	2.8 ± 0.4	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.9 ± 0.4
vitamin D (μg/day)	0.08 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.04

† Values are expressed as means ± SEM.

\* Significantly different between FF and Ff genotype. (p values < 0.05)

**Table 3-b.** Clinical parameters of PTH genotypes in patients with ESRD

	Bst-BI polymorphism			Dra-II polymorphism		
	BtBt	Btbt	btbt	DD	Dd	dd
numbers	3	26	94	2	27	135
%male	0	50	45	50	52	49
age (years)	43 ± 2.3	60 ± 2.6	57 ± 1.4	62 ± 0.5	58 ± 2.8	56 ± 1.2
duration (years)	2.6 ± 0.1	4.9 ± 0.6	6.3 ± 0.4	5.8 ± 3.5	5.0 ± 0.5	5.9 ± 1.4
Ca (mg/dl)	9.4 ± 0.3	9.1 ± 0.2	9.5 ± 0.1	10.3 ± 0.5	9.5 ± 0.2	9.5 ± 0.0
P (mg/dl)	5.0 ± 0.5	5.0 ± 0.3	5.5 ± 0.2	4.4 ± 0.4	5.8 ± 0.3	5.4 ± 0.1
intact PTH (pg/ml)	66 ± 48	103 ± 27	113 ± 13	39 ± 29	115 ± 23	110 ± 10
CaCO3 (g/day)	2.0 ± 0.6	3.6 ± 0.4	3.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2
vitamin D (μg/day)	0.08 ± 0.08	0.14 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.50 ± 0.50	0.19 ± 0.05	0.16 ± 0.02

† Values are expressed as means ± SEM.

**Table 4.** Clinical parameters with and without f allele of VDR in patients with ESRD

	whole		non diabetic group	
	f (-)	f (+)	f (-)	f (+)
number	77 ( 44 )	88 ( 56 )	50	65
age (years)	55 ± 15	58 ± 12	54 ± 2.3	57 ± 1.6
duration (years)	5.1 ± 3.9	6.2 ± 3.7	6.1 ± 0.6	6.7 ± 0.5
Ca (mg/dl)	9.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.7 ± 0.1	9.5 ± 0.1
P (mg/dl)	5.7 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.3 ± 0.2
intact PTH (pg/ml)	91 ± 11	128 ± 14	84 ± 14	136 ± 16
CaCO3 (g/day)	3.3 ± 0.22	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.2
Vit D (μg/day)	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.03

† Values are expressed as means ± SEM

§ f (-) means the patients without f allele, f (+) means the patients with f allele

\* Significantly different between f (+) and f (-) group (p values < 0.05)

\*\* Significantly different between f (+) and f (-) group (p values < 0.01)

頻度を性別および非糖尿病性腎症例と糖尿病性腎症例に分けて比較したが、多型分布、対立遺伝子頻度ともに差を認めなかった。

## 2) 臨床検査所見と遺伝子多型との関係の検討成績

(1) 全対象の臨床検査所見の平均は、それぞれTP  $6.49 \pm 0.04$  g / dl, alb  $4.07 \pm 0.03$  g / dl, BUN  $74.2 \pm 1.3$  mg / dl, Ca  $9.4 \pm 0.1$  mg / dl, P  $5.4 \pm 0.1$  mg / dl, iPTH  $106 \pm 9$  pg / ml, 炭酸カルシウム投与量  $3.2 \pm 0.1$  g / day, 活性型ビタミンD投与量  $0.18 \pm 0.02$   $\mu$ g / dayであった。

(2) すべての対象例を原疾患より非糖尿病性腎症例と糖尿病性腎症例とに分けて比較した。糖尿病性腎症例は非糖尿病性腎症例に比して、血清Ca値は低値 ( $9.2 \pm 0.1$  :  $9.6 \pm 0.1$  mg / dl;  $p < 0.01$ ) を示したが、血清総蛋白値 ( $6.5 \pm 0.1$  :  $6.5 \pm 0.1$  g / dl), 血清P値 ( $5.6 \pm 0.2$  :  $5.4 \pm 0.2$  mg / dl), iPTH値 ( $108 \pm 18$  :  $145 \pm 20$  pg / ml) には統計学的有意差を認めなかった。

(3) VDR遺伝子のFok-I多型の検討では、FF群はFf群に比してiPTHが低値 ( $91 \pm 11$  :  $135 \pm 17$  pg / ml;  $P < 0.05$ ) であったが、その他の臨床検査値とは統計学的有意差を認めなかった (Table 3-a)。また、対立遺伝子fの有無による2群間で比較すると、f(-)群はf(+)群に比してP値は有意に高値 ( $5.7 \pm 0.2$  :  $5.1 \pm 0.1$  mg / dl;  $P < 0.01$ ) で、iPTH値は有意に低値 ( $91 \pm 11$  :  $128 \pm 14$  pg / ml;  $P < 0.05$ ) であった (Table 4)。さらに、糖尿病性腎症例を除外した非糖尿病性腎症例では、f(-)群はf(+)群に比してよりiPTH

は低値であった (Table 4)。また、これら2群間には年齢、男女比、透析歴、透析方法、原疾患、Ca値、P値および炭酸カルシウムと活性型ビタミンD投与量には有意な差を認めなかった。

(4) VDR遺伝子のBsm-I多型、PTH遺伝子のBst-BI多型およびDra-II多型についての検討では、多型別ならびに対立遺伝子別に比較検討したが、いずれも臨床検査所見との間に有意な差を見いだせなかった (Table 3-a, 3-b)。

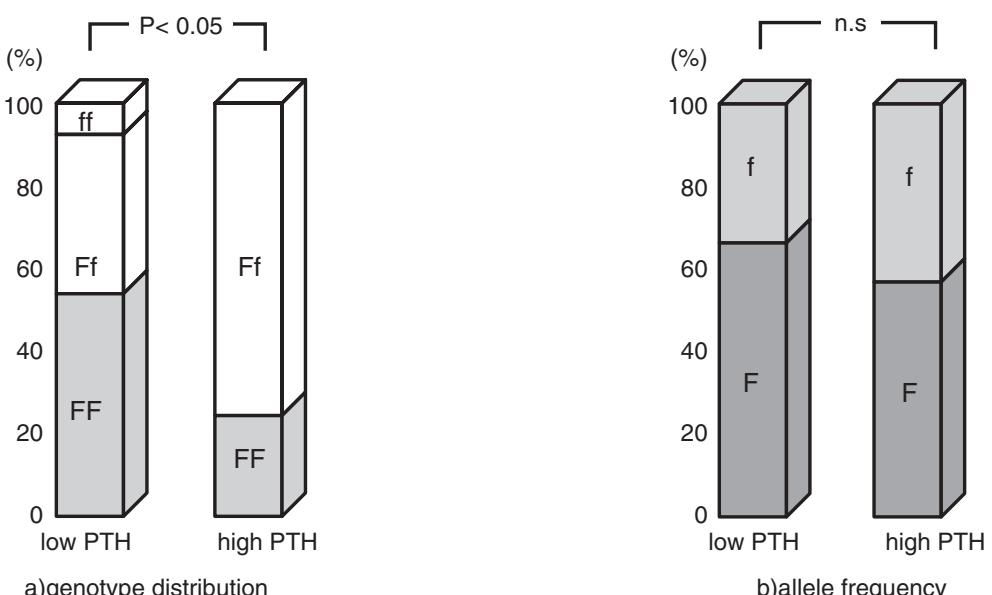
(5) VDR遺伝子のFok-I多型およびBsm-I多型のそれについて対立遺伝子の組合せにより、臨床検査所見と比較してみたがいずれも相関は認められなかった。PTH遺伝子のBst-BI多型およびDra-II多型による検討も同様であった。

## 3) 低PTH値症例と高PTH値症例および副甲状腺摘出症例での遺伝子多型分布検討成績

iPTH値  $65$  pg / ml未満 (85名) の低PTH症例とiPTH値  $300$  pg / ml以上および副甲状腺摘出例の高PTH症例 (12名) を抽出し、2群間で比較検討した。

(1) VDR遺伝子のFok-I多型分布は、高PTH群でFF : Ff : ff =  $25$  :  $75$  :  $0$  %, 低PTH群でFF : Ff : ff =  $54$  :  $38$  :  $8$  %を示し、低PTH群でFF多型を有する頻度が有意に多かった (Fig. 2)。しかし対立遺伝子頻度は、高PTH群でF:f =  $46$  :  $54$ , 低PTH群でF:f =  $75$  :  $25$ を示し、低PTH群ではF対立遺伝子が多かったが、統計学的有意差を認めなかった (Fig. 2)。

(2) VDR遺伝子のBsm-I多型、PTH遺伝子のBst-BI



**Fig. 2.** VDR genotype distribution and allele frequency by Fok-I in high PTH group and in low PTH group in patients with ESRD. The high PTH group was consisted of 12 patients, who had serum intact PTH level over  $300$  pg / ml or had parathyroidectomy. The low PTH group was 85 patients with serum intact PTH level less than  $65$  pg / ml. The carriage rate of f allele was significantly higher in the high PTH group than in the low PTH group ( $p$  values  $< 0.05$  by Fisher's exact test). There were not significant difference in the allele frequency between two groups.

多型および Dra - II 多型では、高 PTH 群と低 PTH 群の間に多型分布、ならびに対立遺伝子頻度で有意差は認められなかった。

#### 4) 遺伝子多型と骨塩量の関係

単純X線で第2中手骨の骨塩密度を測定する digital image processing 法によって、97症例の骨密度を測定し、VDR および PTH 遺伝子多型と比較した。VDR および PTH 遺伝子多型と骨塩量の間には関連性は見出せなかった。

#### 考 案

VDR 遺伝子は、第12染色体長腕に存在し9つの exon を有し、制限酵素 Bsm - I の認識部位は、intron 8 に存在する<sup>12)</sup> (Table 1)。この Bsm - I 多型は、骨粗鬆症との関係を中心に国内外に多くの報告<sup>15-20)</sup>があり、腎不全例での報告<sup>21-25)</sup>も散見される。

ヒト VDR cDNA の塩基配列には翻訳開始コドンである ATG が9塩基を挟んで二カ所に存在することが知られており、Miyamoto らにより最初の ATG に T → C の変異多型 (ATG → ACG) が存在することが報告され<sup>26)</sup>、Gross らはその遺伝子多型が Fok - I による PCR - RFLP 法で同定できることを報告した<sup>13)</sup>。この Fok - I 多型の対立遺伝子 F は、DNA 結合領域に相当する exon 2 に存在する最初の ATG の ACG への変異を意味し、翻訳開始点は9塩基下流となり、翻訳された VDR 蛋白は3アミノ酸短かいことになる。すなわち、VDR 遺伝子の Fok - I 多型は VDR 蛋白に違いがあるので、その機能にも差異ができる可能性が推測される。しかし、Fok - I 多型と疾患関連性の検討は未だ多くなく、腎不全症例での検討は極めて少ない。

PTH 遺伝子は第11染色体短腕に存在し、3つの exon と2つの intron より構成されている (Table 1)。PTH 遺伝子の転写調節機構は、転写開始部より上流にビタミン D 抑制性 DNA エレメント (negative vitamin D responsive element; VDRE) と細胞外 Ca 抑制性 DNA エレメント (negative Ca responsive element; nCaRE) が存在することが明らかにされ<sup>27, 28)</sup>、ビタミン D や Ca による PTH 遺伝子転写能の抑制機序が明らかにされている<sup>29-32)</sup>。

PTH 遺伝子 Bst - BI 多型は intron 2 に、Dra - II 多型は exon 3 に存在するが、アミノ酸には変化のない silent mutation である。Bst - BI 多型は、原発性副甲状腺機能低下症、家族性良性高カルシウム血症、原発性副甲状腺機能亢進症などで検討されているがこれらの疾患との関連性は認められていない<sup>33-35)</sup>。また、Dra - II 多型は遺伝性副甲状腺機能低下症例において発見された<sup>36)</sup>が、その後の報告は少ない。

著者の研究では、PTH 遺伝子の Bst - BI 多型では BtBt : Btbt : btbt = 3 : 21 : 76%，対立遺伝子頻度は Bt : bt = 14 : 86%，Dra - II 多型は DD : Dd : dd =

1 : 17 : 82%，対立遺伝子頻度は D : d = 10 : 90% であった。しかし、PTH 遺伝子多型分布に関する報告は少なく、本邦での多型分布は明らかではない。1987年 Almahroos GM らの報告<sup>37)</sup>では Bt : bt = 56 : 44% で、これと著者の成績と比較すると Bt が 14% と低頻度であり、人種差が存在する可能性も推測された。また著者の検討では、Bst - BI 多型および Dra - II 多型と透析患者の副甲状腺機能には関連性を認めなかった。しかし、今回著者が検討した成績では、PTH 遺伝子の Bst - BI および Dra - II 多型には、その分布に著しい偏りが存在していることが明らかになった。そのため遺伝子多型との関連性についての結論を導くには、さらに多数の症例で調べる必要があると考えられる。

今回の著者の研究成績では VDR 遺伝子の Bsm - I 多型分布は BB : Bb : bb = 7 : 16 : 77% で、対立遺伝子頻度は B : b = 15 : 85% であった。Bsm - I 多型分布には人種差が存在し、白人に比べ日本人では BB 多型が著しく少ないことが明かとなっている。時田らの日本人女性での報告<sup>38)</sup>は、BB : Bb : bb = 2 : 26 : 72% と著者の研究成績と分布は同じであり、また Tsukamoto らの本邦における血液透析患者の報告<sup>39)</sup>も BB : Bb : bb = 6 : 20 : 74% と同様の傾向を示している。1996年以降、日本腎臓学会、日本透析医学会などで透析患者における Bsm - I を中心とした VDR 遺伝子多型に関する報告が幾つかの施設よりなされ、透析患者の副甲状腺機能や骨塩量と VDR 遺伝子多型の間の関連性を指摘する報告<sup>40-42)</sup>や、反対に関連がないとするものある<sup>43, 44)</sup>。今回の著者の検討では、副甲状腺機能と VDR 遺伝子多型との関連性は認められなかった。このように研究者間で、その成績に差ができる原因としては、透析患者の副甲状腺機能が遺伝的背景よりも透析療法などの外的要因により強く影響される可能性や、本邦では Bsm - I 多型分布に BB が著しく少ないという偏りがあることが、研究結果の相異に影響していると思われる。

著者の研究では、Fok - I 多型は FF : Ff : ff = 47 : 42 : 11% で、対立遺伝子頻度は F : f = 68 : 32 であった。一方、Miyamoto らの研究<sup>26)</sup>では閉経前の日本女性 110 人における VDR 遺伝子 Fok - I 多型は、FF : Ff : ff = 27 : 58 : 15% と著者の研究成績より FF の頻度が少ない。この理由としては腎不全という特異な病態の関与も考えられるが、今後透析症例数を増やしさらに検討を重ねる必要があると思われる。

今回著者が行った研究では、Fok - I 多型の FF 群を示す者は Ff 群に比して iPTH が有意に低値 (91 ± 11 : 135 ± 17 pg / ml; P < 0.05) であった (Table 2-a)。また、対立遺伝子 f の有無による比較でも、f (-) 群は f (+) 群に比して P 値が有意に高値 (5.7 ± 0.2 : 5.1 ± 0.1 mg / dl; P < 0.01) で、iPTH 値は有意に低値 (91 ± 11 : 128 ± 14 pg / ml; P < 0.05) を示した (Table 3)。さらに、糖尿病症例を除外した非糖尿病性腎症例に限

定した比較では、f (-) 群と f (+) 群の iPTH 値の差異はより明確であった ( $84 \pm 14$  :  $136 \pm 16$  pg / ml; P 0.01)。これら 2 群間には年齢、男女比、透析歴、透析方法、原疾患および炭酸カルシウムと活性型ビタミンD 投与量には有意な差を認めなかった。一方、iPTH 値 65 pg / ml 未満 (85 名) の低 PTH 症例と iPTH 値 300 pg / ml 以上および副甲状腺摘出例の高 PTH 症例 (12 名) を比較したところ、高 PTH 群で FF : Ff : ff = 25 : 75 : 0 %、低 PTH 群で FF : Ff : ff = 54 : 38 : 8 % の値が得られ、高 PTH 群で f 対立遺伝子を有する頻度が有意に高いことが明らかに出来た (Fig. 2)。以上のごとく、本研究で VDR 遺伝子の Fok - I 多型における f 対立遺伝子の有無が慢性腎不全患者の副甲状腺ホルモン分泌に影響している可能性が示唆され、糖尿病を原疾患とした症例を除外する事で f (-) 群と f (+) 群の間により明確な iPTH 値の差を認めた。糖尿病患者は、二次性副甲状腺機能亢進症の頻度が少なく PTH 分泌の低下が示唆されている<sup>45, 46</sup>。また、高度の副甲状腺機能亢進症は三次性機能亢進症と考えられる副甲状腺細胞の自家増殖を認めるために、著しい臨床検査値の異常を呈する。今回の検討で、糖尿病症例および高度の副甲状腺機能亢進症例を除外することで腎不全患者の iPTH 値のみに差を認めたことは、他の修飾因子を洗練することで遺伝子多型という遺伝的背景因子の副甲状腺機能に対する影響がより明確になった可能性が考えられる。

VDR 遺伝子の Fok - I 多型が、どのような機序で副甲状腺の PTH 分泌に影響しているかは、現時点では依然明らかでないが、Arai らは VDR 遺伝子の F 対立遺伝子と f 対立遺伝子を COS - 7 細胞および HeLa 細胞に導入する方法でこの問題を検討している<sup>47</sup>。この研究では、VDR 遺伝子の F 対立遺伝子ならびに f 対立遺伝子を導入した細胞で細胞間にビタミンDとの結合能に差を認めていない。遺伝子導入された COS - 7 細胞のビタミンD - 24 水酸化酵素の転写活性は F 対立遺伝子を持つ場合は、f 対立遺伝子に比して約 2 倍高いと述べている。一方、線維芽細胞に遺伝子導入した報告<sup>48</sup>では、Fok - I 遺伝子多型による差を認めていない。ビタミンD - 24 水酸化酵素は、1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の 24 位を水酸化させビタミンDの不活性に関与する酵素である。このことは、Fok - I 多型の差によってもビタミンDの代謝に差がでることや、またその反応も細胞の種類により異なる可能性を示している。すなわち、活性型ビタミンD刺激による腸管からの Ca, P 吸収、副甲状腺細胞における PTH 分泌抑制および骨細胞における反応性などに Fok - I 多型による違いが存在する可能性が推察される。

今後、この Fok - I 遺伝子多型による VDR 遺伝子および VDR 蛋白の機能、および透析患者における炭酸カルシウムや活性型ビタミンDに対する反応性をさ

らに検討する必要性があると思われる。

## 結 語

- 透析療法を受けている慢性腎不全患者における、VDR 遺伝子多型及び PTH 遺伝子多型の影響を臨床的に検討した。
- 制限酵素 Bsm - I による VDR 遺伝子多型、制限酵素 Bst - BI, Dra - II による PTH 遺伝子多型と臨床的のパラメーターとの関連性は認められなかった。
- Fok - I による VDR 遺伝子多型では、f 対立遺伝子を持たない患者は、持つ患者に比し血清リン濃度が高いにも関わらず血清 iPTH 値は低値を示した。特に、非糖尿病性腎症例では、f 対立遺伝子の有無による血清 iPTH 値の差異はより明確であった。
- 血清 iPTH 値が 300 pg / ml 以上および副甲状腺摘出例の副甲状腺機能亢進症の患者では、血清 iPTH 値が 65 pg / ml 未満の副甲状腺機能低下症の患者に比べ f 対立遺伝子を持つ頻度が有意に高かった。
- Fok - I を用いた VDR 遺伝子多型は、透析患者の副甲状腺機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究の当初より御指導頂いた埼玉医科大学総合医療センター第四内科松村治講師、並びに本稿の御高覧をして顶いた御手洗哲也助教授および磯田和雄教授に深謝致します。また、本研究に御協力頂いた第四内科教室の諸先生方に御礼申し上げます。本研究の一部は、平成 8 年度文部省科学助成金を用いて行った。本研究の要旨は、第 40 回日本腎臓学会および第 43 回日本透析医学会にて発表した。

## 文 献

- Martinez I, Saracho R, Moina I, Montegro J, Llach F. Is there a lesser hyperparathyroidism in diabetic patients with chronic renal failure? *Nephrol Dial Transplant* 1998;13 Suppl 3:9-11.
- Akizawa T, Kinugasa E, Akiba T, Tukamoto Y, Kurokawa K. Incidence and clinical characteristics of hypoparathyroidism in dialysis patients. *Kidney Int Suppl* 1997;62:S72-4.
- Smans AK, Van Landeghem GF, D'Haese CP, Couttenye MN, De Broe EM. Is there a link between erythropoietin therapy and adynamic bone disease? *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1248-9.
- Llach F, Massry SG. On the mechanism of secondary hyperparathyroidism in moderate renal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:601-6.
- Lopez-Hilker S, Rapp N, Martin K, Slatopolsky E. On the mechanism of the prevention of secondary hyperparathyroidism by phosphate restriction.

- Kidney Int 1986;29:164. (abstract)
- 6) Lopez-Hilker S, Dusso AS, Rapp NS, Matin KJ, Slatopolsky E. Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol Am J Physiol 1990;259:F432-7.
  - 7) Fukagawa M, Kaname S, Igarashi T, Ogata E, Kurokawa K. Regulation of parathyroid hormone synthesis in chronic renal failure in rats. Kidney Int 1991;39:874-81.
  - 8) Korkor BA. Reduced binding of [<sup>3</sup>H]1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in parathyroid glands of patients with renal failure. N Engl J Med 1987;316:1573-7.
  - 9) Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giavannini M, Goureau Y, Sarfati E, et al. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. Kidney Int 1997;51:328-36.
  - 10) Nemeth EF, Steffey EM, Fox J. The parathyroid calcium receptor: a novel therapeutic targeting hyperparathyroidism. Pediatr Nephrol 1996;10:257-79.
  - 11) Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. Nucleic Acids Res 1994;22:1774-5.
  - 12) Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature 1994;367:284-7.
  - 13) Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Freldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. J Bone Miner Res 1996;11:1850-5.
  - 14) Mullersman JE, Shields JJ, Saha BK. Characterization of two novel polymorphisms at the human parathyroid hormone gene locus. Hum Genet 1992;88:589-92.
  - 15) Tsuritani I, Brooke-Wavell KS, Mastana SS, Jones PR, Hardman AE, Yamada Y. Does vitamin D receptor polymorphism influence the response of bone to brisk walking in postmenopausal women? Horm Res 1998;50:315-9.
  - 16) Kikuchi R, Uemura T, Gorai I, Ohno S, Minaguchi H. Early and late postmenopausal bone loss is associated with Bsm I vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. Calcif Tissue Int 1999;64 (2):102-6.
  - 17) Deng HW, Li JL, Johnson M, Gong G, Davis KM, Recker RR. Change of bone mass in postmenopausal Caucasian women with and without hormone replacement therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes. Hum Genet 1998;103 (5):576-85.
  - 18) Suarez F, Rossignol C, Garabedian M. Interactive effect of estradiol and vitamin D receptor gene polymorphisms as a possible determinant of growth in male and female infants. J Clin Endocrinol Metab 1998;83 (10):3563-8.
  - 19) Murakami F, Hgino H, Shimomura T, Ikawa S, Hirano Y, Iijima K, et al. Association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphism - changes in radial bone mineral density with long term follow up : longitudinal study. Rinsho Byori 1998;46 (8):766-73.
  - 20) Feskanich D, Hunter DJ, Willett WC, Hankinson SE, Hollis BW, Hough HL, et al. Vitamin D receptor genotype and the risk of bone fractures in women. Epidemiology 1998;9 (5):535-9.
  - 21) Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y. Vitamin D receptor gene polymorphisms affect secondary hyperparathyroidism in hemodialyzed patients. Am J Kidney Dis 1998;32 (3):464-9.
  - 22) Tagliabue J, Farina M, Imbasciati E, Vergani C, Annoni G. Bsm I polymorphism of vitamin D receptor gene in hyperparathyroid or hypoparathyroid dialysis patients. Am J Clin Pathol 1999;112 (3):366-70.
  - 23) Karkoszka H, Chudek J, Strzelczyk P, Wiecek A, Schmidt-Grayk H, Ritz E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and the rate of bone loss of the femur neck and lumbar spine in hemodialized patients with chronic renal failure. Pol Merkuriusz Lek 1998;5 (28):199-202.
  - 24) Yokoyama K, Shigematsu T, Tukada T, Ogura Y, Takemoto F, Hara S, et al. Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. Kidney Int 1998;53 (2):454-8.
  - 25) Fernandez E, Fibla J, Betriu A, Piulats JM, Almirall J, Montoliu J. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 1997;8 (10):1546-52.
  - 26) Miyamoto K, Taketani Y, Arai E, Yamamoto H, Iemori Y, Chikamori M, et al. A novel polymorphism in the vitamin D receptor gene and bone mineral density: Study of vitamin D receptor expression and function in COS-7 cells. J Bone Miner Res 1996;11

- (Suppl 1):S116 (abstract).
- 27) Okazaki T, Ando K, Igarashi T, Ogata E, Fujita T. Conserved mechanism of negative gene regulation by extracellular calcium. *J Clin Invest* 1992;89: 1268-73.
- 28) Okazaki T, Chung U, Nishishita T, Ebis S, Usuda S, Mishiro S, et al. A redox factor protein, refl, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium. *J Biol Chem* 1994;45:27855-62.
- 29) Haussler MR, Mangelsdorf DJ, Komm BS, Terpening CM, Yamaoka K, Allegro EA, et al. Molecular Biology of the vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 1988;44:263-305.
- 30) Pike JW. Vitamin D3 receptors: Structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr* 1991;11: 189-216.
- 31) Demay MB, Kiernan MS, Deluca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1, 25 - dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry* 1992;89:8097-101
- 32) Suzuki M, Hirasawa Y. Decreased parathyroid hormone secretion in chronic hemodialysis patients without active vitamin D treatment. *J Bone Miner Metab* 1991;9:283-6.
- 33) Almahroos G M, Docherty K, Fletcher J A, Webb T, Heath D A. Studies of the parathyroid hormone gene in normal subjects, and in subjects with primary hyperparathyroidism and familial benign hypercalcemia. *J Endocrinol* 1987;115:183-6.
- 34) Ahn TG, Antonarakis SE, Kronenberg HM, Igarashi T, Levine MA. Familial isolated hyperparathyroidism: a molecular genetic analysis of 8 families with 23 affected persons. *Medicine ( Baltimore )* 1986;65:73-81.
- 35) Scmidtke J, Kruse K, Pape B, Sippell G. Exclusion of close linkage between the parathyroid hormone gene and a mutant gene locus causing idiopathic hypoparathyroidism. *J Med Genet* 1986;23:217-9.
- 36) Mullersman JE, Shields JJ, Saha BK. Characterization of two novel polymorphisms at the human parathyroid hormone gene locus. *Hum Genet* 1992;88:589-92.
- 37) Almahroos GM, Docherty K, Fletcher JA, Webb T, Heath DA. Studies of the parathyroid hormone gene in normal subjects, and in subjects with primary hyperparathyroidism and familial benign hypercalcemia. *J Endocrinol* 1987;115:183-6.
- 38) 時田章史, 藪田敬次郎. ビタミンD受容体多型性と骨量. *Clinical Calcium* 1995;5:68-70.
- 39) Tukamoto Y, Heishi M, Nagaba Y, Kobayashi N, Nomura Y, Takahashi K, et al. More on hyperparathyroidism and the vitamin D receptor. *Nature Med* 1996;2:1162.
- 40) 岡田倫之, 濱野高行, 三上聰司, 高畠義嗣, 林晃正, 勝二達也, 他. 透析患者の二次性副甲状腺機能亢進症に対するビタミンD受容体遺伝子多型の影響. *日本透析医学会雑誌* 2000 (suppl);33:632. (abstract)
- 41) 田原英樹, 趙秀憲, 奥野仙二, 金昌雄, 辻本吉広, 森田有津子, 他. 腎性二次性副甲状腺過形成に対するVDR遺伝子多型の影響. *日本透析医学会雑誌* 1999 (suppl); 32: 612. (abstract)
- 42) 竹田徹郎, 高江州義滋, 萩野下丞, 桜林耐, 青池郁夫, 宮崎滋, 他. *日本透析医学会雑誌* 1997 (suppl); 30: 692. (abstract)
- 43) 矢野彰三, 杉本利嗣, 神澤道子, 塚本達雄, 服部哲也, 服部三郎, 他. *日本腎臓学会誌* 2000;42:178. (abstract)
- 44) 藤井桂, 小出昌伸, 松尾美也子, 櫻本博也, 松尾政子, 今井正哉, 他. *日本透析医学会雑誌* 1997 (suppl);30:692. (abstract)
- 45) Andress DL, Kopp JB, Maloney NA, Coburn JW, Sherrard DJ. Early deposition of aluminum in bone in diabetic patients on hemodialysis. *N Engl J Med* 1987;316:292-6.
- 46) Felsenfeild AJ, Rodriguez M, Coleman M, Ross D, Llach F. Desferrioxamine therapy in hemodialysis patients with alminum-associated bone disease. *Kidney Int* 1989;35:1371-8.
- 47) Arai H, Miyamoto K, Takeshi Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997;12(6):915-21
- 48) Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of Fok-I variants. *J Bone Miner Res* 1998;13(11):1691-9.