



副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)の発現に関する病理学的研究 (助成研究報告)

北澤, 荘平
北澤, 理子

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 12:175-180

(Issue Date)

1996-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81007487>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007487>



助成研究報告——

副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) の 発現に関する病理学的研究

神戸大学医学部第二病理 北澤 莊平 (60年卒) 北澤 理子 (60年卒)

I. はじめに

腫瘍に伴う高 Ca 血症は、日常診療において極めて頻度の高い腫瘍随伴症候群のひとつである。高 Ca 血症は、その発生機序により2つに大別されてきた。即ち、癌の骨転移巣や多発性骨髄腫のように浸潤局所の骨融解によって起こるもの (Local Osteolytic Hypercalcemia, LOH) と、骨転移のない症例においても高 Ca 血症を呈することから、腫瘍細胞から分泌された液性因子が血流を介して骨吸収を促進し、高 Ca 血症をきたすというもの (Humoral Hypercalcemia of Malignancy, HHM) とに分類されてきた。

1987年 Suva らによって同定された副甲状腺ホルモン関連蛋白 (Parathyroid Hormone-related Protein, PTHrP) は、後者の主たる原因物質とされている¹⁾。PTHrP は、N 端側13個のうち8個のアミノ酸が副甲状腺ホルモン (PTH) と同一であり、腎や骨等の標的臓器において、共通の PTH/PTHrP レセプターに結合して、その作用を発現する。

私共は、1989年に N 端 PTHrP に対する monoclonal 抗体を作成して以後、主として免疫組織化学を用いて外科手術材料や剖検材料の解析を行ってきた²⁾。当時、PTHrP は、専ら腫瘍の高 Ca 血症惹起因子として注目されていたので、私どもの初期の目的も、“癌の病理組織学的検討を通じて、PTHrP を発現して高 Ca 血症を起こしうる癌と起こさない癌の病理形態学的差異を把握すること”にあったが、解析をすすめるうちに、悪性腫瘍のみならず正常組織に

においても広く PTHrP の分布を認めたので、PTHrP の生理的意義にも着目するようになった。

今回、私共は、PTHrP の種々の悪性腫瘍や一部良性疾患における PTHrP の発現と組織形態学的特徴との関連について集積してきた知見を報告する。

II. 材料と方法

私共の作成した抗 PTHrP monoclonal 抗体 (4B3)²⁾ は、IgM 分画に属する。PTHrP の active domain である N 端の fragment, human PTHrP (1-34) 50 μ g を抗原として Freund の complete adjuvant で emulsion 化して、8 週令 BALB/c マウスを1週間あけて3回免疫した後、脾臓を摘出し、脾臓細胞と nonsecreting mouse myeloma cell (P3/X63-Ag8.U1) とを50%の polyethylene glycol 存在下に融合した。Hybridoma のスクリーニングには human PTHrP (1-34) を固相化した ELISA プレートを用い、陽性クローンを限界希釈してサブクローニングを2回繰り返した。抗体の特異性に関しては高 Ca 血症を呈した肺癌組織抽出物を western blotting に供して 4B3 と反応する単一バンドを検出することを証明し、さらに、PTH との交差反応を有さないことを human PTH (1-34) を固相化した ELISA プレートで確認した。

免疫組織化学には、通常ホルマリン固定パラフィン包埋組織の5 μ m 薄切切片を用いた。

標本を xylene で脱樹脂, ethanol 系列で処理, 1 % H₂O₂/methanol にて内因性 peroxidase を失活後, hybridoma 4B3 の培養上清で 4C で一晚 incubate した後, HRP 標識抗マウス IgM 二次抗体で反応させ, 0.1 % H₂O₂ 存在下に DAB にて発色した.

対象は, 正常組織における PTHrP 発現の検討については, 剖検時に採取した正常臓器組織各 5 例を, 種々の悪性疾患の検討には, 肺癌 60 例, 子宮頸部良性及び悪性疾患 108 例, 腎癌 42 例, 卵巣腫瘍 22 例, 乳癌 34 例を検索した.

免疫組織化学の判定基準については, 以下のよう定めた.

- (-) : 陽性細胞が殆ど無い.
- (-+) : 陽性細胞が 10 % 未満.
- (+) : 陽性細胞が 10-50 % の範囲である.
- (++) : 陽性細胞が 50 % を越える.

Ⅲ. 結果及び考察

1. 正常臓器組織における PTHrP の発現

Table. 1 に示す様に, PTHrP は正常臓器組織においても広範な発現局在を示すことが明らかとなった. 皮膚, 食道, 膀胱, 子宮頸部のように扁平上皮や移行上皮で構成される上皮は, PTHrP 陽性を示した. これに対して, 胃, 小腸の腺上皮は PTHrP 発現を示さなかった. Fig. 1 に皮膚扁平上皮における免疫組織化学の一例を示す. 表皮基底層は PTHrP 陰性であるが有刺細胞層から顆粒層に PTHrP の強い局在を認めた. 細胞が分裂増殖する基底層には PTHrP の発現がなく, 表皮の分化極性と一致した局在を示すことから, PTHrP は keratinocyte の分化に密接に関与していることが示唆された.

正常皮膚においては, 表皮細胞は徐々に角化とともに上方へ送り出されてはがれ落ちるものであるから, これらの細胞で産生された PTHrP が内部環境に入ることは極めて起こりにくい.

このように, 正常組織における PTHrP の機能は寧ろ局所的で paracrine, autocrine 的であ

Table 1 PTHrP Expression in Normal Human Tissues (n = 5)

Skin and skin appendages	
Keratinocyte	++
Hair follicle	+
Mammary gland	+
Endocrine organs	
Parathyroid gland	+
Pancreatic islet	+
Adrenal cortex	+
Respiratory organs	
Trachea	-
Bronchial epithelia with squamous metaplasia	+
Digestive organs	
Esophagus	++
Stomach	-
Intestine	-
Hepatocyte	-
Neurogenic organs	
Brain, spinal cord and nerves	-
Meningoepithelium	+
Urogenital organs	
Kidney; glomerulus	-
renal tubules	+-
Bladder	+
Testis; germ cell and Sertoli cell	-
Leydig cell	+
Female reproductive organs	
Ovary; germ cell	-
Uterine; cervix	++
endometrium	-
Placenta; amnion sac and decidua	-
syncytiotrophoblast	+

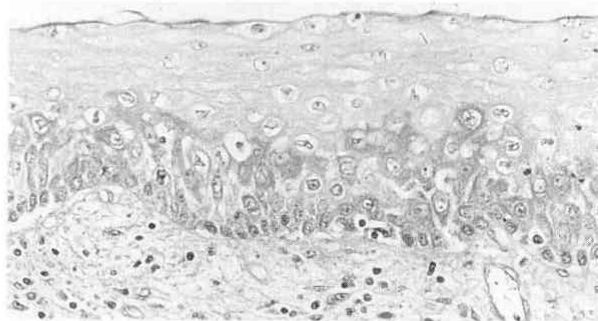


Fig 1 皮膚扁平上皮における PTHrP の局在

ることが想定される. さらに内分泌組織の一部, 即ち副甲状腺, 睪丸, 副腎皮質や, 脳髄膜細胞, 腎尿細管, 胎盤においても PTHrP 陽性を確認したが, これらの組織における PTHrP の生理的意義については, さらに今後の基礎的研究を要すると思われる.

2. 肺癌における PTHrP の発現

肺癌症例 60 例のうち, 高 Ca 血症を合併した症例は 10 例で, 血清 Ca は $13.0 \pm 2.1 \text{ mg/dl}$ (mean $\pm$ SD) であった. 50 例は血清 Ca 正常 ($8.6 \pm 0.5 \text{ mg/dl}$) であった. これら肺癌の組織型ごとの PTHrP 染色性を Table 2 に示す. 高 Ca 血症合併症例のうち 10 例中 9 例が PTHrP 陽性で, こ

れらは扁平上皮癌であり、高分化のものほど PTHrP 発現が高度である傾向を示した。1. で皮膚においても PTHrP の発現は角化に関連することが示唆されたが、扁平上皮癌組織においても細胞間橋の著明な部位や巣状角化巣の近傍では、特に強く染色される傾向を認めた。正常の気道は線毛上皮で構成され PTHrP の染色性を有しないが、喫煙者に見られた扁平上皮化生の部位では PTHrP 陽性を呈した。

Table 2 PTHrP Expression in Lung Cancer (60 cases)

Histological type	Positive/Total cases	Reactivity
<i>Cases with hypercalcemia (10 cases)</i>		
Squamous cell carcinoma		
Well differentiated	6/6	++
Moderately differentiated	2/2	+
Poorly differentiated	1/1	+
Adenocarcinoma		
Poorly differentiated	0/1	
<i>Cases without hypercalcemia</i>		
Squamous cell carcinoma		
Well differentiated	11/11	++
Moderately differentiated	12/12	+
Poorly differentiated	2/4	+
Adenosquamous cell carcinoma	1/1	+
Adenocarcinoma		
Well differentiated	0/3	
Moderately differentiated	0/5	
Poorly differentiated	0/2	
Small cell anaplastic carcinoma		
Oat cell type	2/2	+
Intermediate type	2/3	+
Large cell anaplastic carcinoma	1/7	+

高 Ca 血症合併例のうち 1 例は腺癌で PTHrP 陰性であった。PTHrP 以外の高 Ca 血症惹起因子として種々の Cytokine や Prostaglandin が知られており、腫瘍が産生するこれらの因子の関与が疑われた。

Table 2 に示すように、高 Ca 血症を有さない症例においても、PTHrP の発現は極めて高頻度であった。高 Ca 血症例と同様に分化型扁平上皮癌で PTHrP 発現が強い傾向を示した。また、小細胞癌は染色性は必ずしも強くないが、PTHrP 発現を認めた。

以上の結果から、PTHrP の組織局在が直ちに高 Ca 血症につながらないことが示唆された。さらに、PTHrP 陽性腫瘍組織の量と血清 Ca の相関についても検討を要すると思われた。

また、さらに病期が進展して末期に高 Ca 血症となる可能性を考慮すると、過剰な PTHrP 産生の影響を何らかの機序で代償していることも考えられる。

3. 子宮頸部疾患における PTHrP の発現

私どもは、1. 2. の結果より PTHrP 発現が扁平上皮の角化に関与するという考察を得たので、扁平上皮系がその殆どを占める子宮頸部腫瘍病変に着目して、PTHrP 発現を解析した。成人女性の子宮頸部に認められる reserve cell hyperplasia を PTHrP 免疫組織化学に供したところ、陽性所見を得、扁平上皮と円柱上皮のいずれにも分化しうる bipotential な reserve cell が PTHrP を発現していることは興味深い³⁾。慢性炎症に伴う病変のうち、バルトリン嚢胞、腺や円柱上皮の過形成による病変は PTHrP 陰性であった。

Table 3 に示す様に、子宮頸癌のうち扁平上皮癌は腺癌に比して PTHrP 発現が高く、しかも角化型で PTHrP 染色性が強いことは肺癌における観察と同様であった。このように子宮頸癌では組織亜型としては PTHrP を発現しやすい扁平上皮癌が殆どにも関わらず、今回の対象症例は全例血清 Ca 値は正常であり、切除対象例の多くが臨床病期的に比較的早期であったためと思われた。

私共は、子宮頸部扁平上皮癌の検討の中で、同程度の分化度を示す癌巣でも周囲間質の状態によっては PTHrP の発現に差違を示すことを観察した。Fig 2 は同一症例の比較であるが、癌巣の周囲に多くの間質線維芽細胞が近接している部位の方が PTHrP の染色性が高い傾向を示した。線維芽細胞は種々の factor を産生するが、TGF β は扁平上皮癌培養細胞系において PTHrP 産生を亢進させるという結果が既に報告されている。⁴⁾ このように癌巣の PTHrP 産生に関して浸襲部周囲の間質線維芽細胞との interaction が想定され、さらにそれが癌の増殖浸襲に何らかの機能的意義を有する可能性がある。

Table 3 PTHrP Expression in Uterine Cervical Neoplasia(108 cases)

Histological type	Positive/Total cases	Reactivity (++ + + - -)			
Squamous cell carcinoma (invasive)					
Keratinizing	8/8	7	1	0	0
Large non-keratinizing	20/22	10	9	1	2
Small non-keratinizing	15/15	3	11	1	0
Adenocarcinoma (invasive)					
Endocervical type	0/8	0	0	0	8
Endometrioid	1/3	0	0	1	2
Mixed (invasive)					
Adenosquamous	6/6	0	5	1	0
Co-existence	1/1	1	0	0	0
Cervical intra-epithelial neoplasia (CIN)					
Grade 1	11/12	2	8	1	1
Grade 2	10/11	1	8	1	1
Grade 3	9/15	2	4	3	6
with keratinizing	6/7	2	4	1	1
without keratinizing	3/8	0	1	2	5
Koilocytic atypia	2/4	0	0	2	2
Adenocarcinoma in situ (AIS)	0/3	0	0	0	3

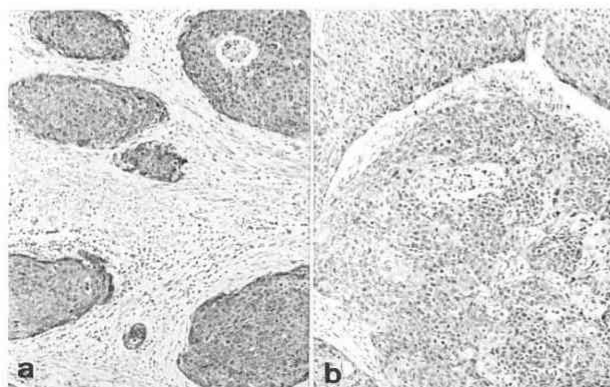


Fig. 2 子宮頸部癌症例の PTHrP 免疫組織化学. 間質の豊富な部位(a), 間質の乏しい部位(b)を示す.

4. 腎癌における PTHrP の発現

腎癌は高頻度の高 Ca 血症に合併することが知られ, PTHrP の発現頻度も高いと予測された. Table 4 に示すように, 腎細胞癌42例の検討においては, 40例が PTHrP 陽性を呈し, clear cell type, granular cell type という組織学的亜分類は PTHrP 発現に無関係であった. 腎癌において PTHrP は極めて普遍的に発現していることが示唆され, 更に興味深いことは, 腎癌においても, PTHrP 発現と高 Ca 血症には乖離を認めた.

Table 4 PTHrP Expression in Renal Cell Carcinoma(42 cases)

Histological type	Positive/Total cases	Reactivity (++ + + - -)			
<i>Cases with hypercalcemia (4 cases)</i>					
Clear cell subtype	3/3	1	1	1	0
Mixed subtype	1/1	1	0	0	0
<i>Cases without hypercalcemia (38 cases)</i>					
Clear cell subtype	29/31	7	4	18	2
Granular cell subtype	6/6	4	2	0	0
Mixed subtype	1/1	0	1	0	0

5. 卵巣腫瘍における PTHrP の発現

卵巣腫瘍の中で高率に高 Ca 血症を示す型として小細胞癌がある. 卵巣小細胞癌は極めて希な腫瘍で, 組織発生源についても明らかではない. 表層上皮系腫瘍に属する clear cell carcinoma や serous cyst adenocarcinoma においても高 Ca 血症の合併頻度は高い⁵⁾. Table 5 に卵巣腫瘍の組織型と PTHrP 染色性を示した. clear cell carcinoma, serous cyst adenocarcinoma は全例 PTHrP 陽性であったが, 表層上皮系に加え, 胚細胞腫瘍の teratoma や yolk sac tumor においても PTHrP 発現を認めた.

Table 5 PTHrP Expression in Ovarian Neoplasia(28 cases)

Histological type	Positive/Total cases	Reactivity (++ + + - -)			
Serous cystadenoma	1/2	0	0	1	1
Serous cystadenocarcinoma	5/5	2	2	1	0
Mucinous cystadenoma	0/2	0	0	0	2
Mucinous cystadenocarcinoma	0/2	0	0	0	2
Endometrioid adenocarcinoma	4/4	2	2	0	0
Clear cell adenocarcinoma	5/5	4	1	0	0
Dysgerminoma	1/1	0	0	1	0
Yolk sac tumor	3/3	2	1	0	0
Mature teratoma	2/2	0	2	0	0
Immature teratoma	1/2	0	0	1	1

6. 乳腺, 乳癌における PTHrP の発現

正常の乳腺組織では duct 部分に PTHrP の局在を認めたが, 乳汁分泌変化を呈する乳腺では, 腺房においても PTHrP 発現が高度であった (Table 1). 乳汁産生に際して, 局所での Ca 動員に PTHrP が重要な役割を担っていることが示唆されるが, それを裏付ける実験結果も報

告されている⁶⁾

Ductal carcinoma の浸潤癌の検討では、Table 6 に示すように papillotubular carcinoma において PTHrP 陽性例が多く (8/9), solid-tubular は殆ど陽性であり、papillotubular と solidtubular の混在する型は、両者の中間の陽性率を示すが、個々の症例では組織学的に papillotubular 像を示す部位に一致して PTHrP の染色性を認めた。

河野らは乳癌原発巣が PTHrP 陽性を示す症例では PTHrP 陰性症例に比して骨転移率が高い傾向を見出し、臨床的意義の深い検索結果であると思われた。さらに各遠隔転移部位毎の PTHrP 発現を比較検討し、骨転移巣は肺や肝転移巣と比べて PTHrP 陽性率が有意に高いことを報告した⁷⁾。同様の結果は Martin らによっても記載されている⁸⁾。詳細な機序は明らかでないが、転移巣周辺の微少環境によって、腫瘍の PTHrP 産生が調節乃至修飾されることに加え、腫瘍が paracrine/autocrine factor としての PTHrP を発現することが骨転移形成に何らかの寄与をする可能性も考えられた。

Table 6 PTHrP Mammary Carcinoma (34 cases)

Histological type	Positive/Total cases	Reactivity (++ + +- -)
Invasive ductal adenocarcinoma		
Papillotubular	8/9	2 6 1 0
Papillotubular+Scirrhou	6/12	2 4 6 0
Solidtubular+papillotubular	2/4	2 0 2 0
Solidtubular+Scirrhou	1/7	0 1 6 0
Solidtubular	0/3	0 0 1 2

IV. 終わりに

PTHrP は正常組織に局在を認め、悪性腫瘍においては高 Ca 血症の有無に関わらず、種々の臓器の腫瘍に広範囲に発現していた。しばしば腫瘍の組織型と PTHrP 発現に相関性があることや、周囲の間質が腫瘍細胞の PTHrP 産生を修飾することを示唆する所見が観察された。このように、PTHrP の局在を組織形態学的に検討することは、その機能的意義の解明の手がかりになると思われた。今後、更に検討を重ね、

腫瘍の病態解析や診断において幾らかでも貢献してゆきたいと考える。

V. 謝 辞

本研究をご指導頂いた第二病理学教室前田盛教授に感謝致しますと共に、貴重な症例をご提供頂き、臨床的見地からご教示を賜った国立神戸病院産婦人科福西秀信先生、県立成人病センター外科河野範男先生、神戸大学泌尿器科後藤章暢先生をはじめとする関係各先生方に篤くお礼申し上げます。

最後に、1989年、本研究を始めるに際して、ご助言頂いた深瀬正晃先生に感謝と追悼の意を表します。

VI. 参考文献

- 1) Suva, L.D. et al (1987): A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science*, 237, 893-896
- 2) Kitazawa, S. et al (1991): Immunohistologic evaluation of parathyroid hormone-related protein in human lung cancer and normal tissue with newly developed monoclonal antibody. *Cancer*, 67, 984-989
- 3) Kitazawa, S. et al (1992): Immunohistochemical evaluation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the uterine cervix. *Int J Cancer*, 50, 731-735
- 4) Hoeckman, K. et al (1990): Modulation of the production of a parathyroid hormone-like protein in human squamous carcinoma cell line by interaction with fibroblast. *Cancer Res*, 50, 3589-3598
- 5) Buckley, C.H. (1995): Interrelationships of non-gynaecological and gynaecological disease. In 'Obstetrical and gynaecological pathology' (edited by Fox, H.) Churchill Livingstone, London, Tokyo
- 6) Thiede, M.A. et al (1989) The mRNA encoding a parathyroid hormone-like peptide is

- produced in mammary tissue in response to prolactin. *Mol Endocrinol*, 1, 1443–1447
- 7) Kohno, N. et al (1994): Expression of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer with skeletal metastasis. *Surg Today*, 24, 215–220
- 8) Vargus, S.J. et al (1992): Localization of parathyroid hormone-related protein mRNA in breast cancer and metastatic lesion by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*, 8, 971–979