



Identification of parathyroid hormone messenger ribonucleic acid in an apparently nonfunctioning parathyroid carcinoma transformed from a parathyroid carcinoma with...

馬場, 久光

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0607

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000607>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	ば ば ひさ みつ 光 （大阪府）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第 499 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付	昭和61年 3 月31日
学位論文題目	Identification of Parathyroid Hormone Messenger Ribonucleic Acid in an Apparently Nonfunctioning Parathyroid Carcinoma Transformed from a Parathyroid Carcinoma with Hyperparathyroidism （副甲状腺機能亢進症を伴った副甲状腺癌から形 質変化し、一見非機能性と思われた副甲状腺癌 における副甲状腺ホルモン・メッセンジャーリ ボ核酸同定）

審 査 委 員	主査 教授 藤 田 拓 男
	教授 山 口 延 男 教授 藤 原 美 定

論 文 内 容 の 要 旨

副甲状腺機能亢進症を伴う副甲状腺癌（機能性副甲状腺癌）は稀な腫瘍で、原発性副甲状腺機能亢進症の原因の 3～4%を占めると報告されている。副甲状腺機能亢進症を伴わない副甲状腺癌（非機能性副甲状腺癌）は更に稀な腫瘍で、1969年 Holmes らは、1938 年以來の報告をもとに機能性副甲状腺癌46例と共に 4 例の非機能性副甲状腺癌の症例を記載した。それ以来、非機能性副甲状腺癌についての報告は 7 例を数えるのみである。非機能性副甲状腺癌は、副甲状腺由来の腫瘍が存在するにも拘らず血清カルシウム（s-Ca）、血清リン（s-P）、血清副甲状腺ホルモン（s-PTH）値が正常で副甲状腺機能亢進症を伴わないことを基準として診断されてきた。しかし、この様な腫瘍において PTH 合成が真に欠如しているのかどうかについての報告は未だ見られない。

最近、機能性副甲状腺癌の術後、非機能性副甲状腺癌として再発した腫瘍を得ることができた。再発時の s-Ca, s-P, s-PTH 値は全て正常で副甲状腺機能亢進症を伴わなかったが、腫瘍の切除後に一過性の低 Ca 血症が認められたことより、非機能性副甲状腺癌と思われたこの腫瘍が PTH を分泌していた可能性が示唆された。そこで、抗 PTH 抗体を用いて腫瘍組織の peroxidase - antiperoxidase

(PAP) 染色を行ったがPTHは検出し得なかった。

PTHはPTHm RNAの情報をもとに前駆体である pre-pro-PTHとして合成され、二度の加水分解を受け、pro-PTHを経て生成される。本研究においては非機能性副甲状腺癌におけるPTH合成の有無を、腫瘍組織中のPTHm RNAの存在を検索することによって検討した。

症 例

64才、女性。左鎖骨上窩腫瘍を主訴として来院した。患者は1981年8月、甲状腺左葉後面に付着する5×3 cm大の頸部腫瘍の切除術を受けており、この腫瘍は術前、明らかな副甲状腺機能亢進症を伴っていた[s-Ca, 12.4 mg/dl; s-P, 1.5 mg/dl; s-PTH, 1609 pg/ml (正常値 300 pg/ml 以下)]。腫瘍は甲状腺左葉、周囲リンパ節と共に根治的に切除されたが、右側副甲状腺は完全に残された。組織学的、腫瘍は特徴的な副甲状腺癌の所見を有しており、腺癌細胞は副甲状腺被膜に浸潤していた。術後 s-Ca, s-P, s-PTHは全て正常化し、2ヶ月後には各々 9.2 mg/dl, 2.6 mg/dl, 160 pg/ml となった。

術後経過は良好であったが1983年1月、定期検診で左鎖骨上窩腫瘍を指摘された。この腫瘍は副甲状腺機能亢進症を伴わず、s-PTHは200 pg/ml (正常値 300 pg/ml 以下) と正常であり、s-Ca, s-P, アルカリフォスファターゼ (ALP) も各々 9.3 mg/dl, 3.1 mg/dl, 66 IU/liter (正常値 36~100 IU/liter) と全て正常であった。摘出腫瘍は5×4×3 cm, 重量は60 gで、組織学的には初発時の腫瘍と同様であった。s-Caは術翌日 8.3 mg/dl まで下がったが、以降徐々に回復して2週間で正常化した。術後14日目のc-Ca, s-P, ALP, s-PTHは各々 9.3 mg/dl, 3.5 mg/dl, 78 IU/liter, 260 pg/ml であった。

材料と方法

Oligo-dT-cellulose は Bethesda Research Laboratories, Inc. 社のものを, [³⁵S] methionine (SA, 1090 Ci/mmol), rabbit reticulocyte lysate, tobacco mosaic virus (TMV) RNA, [¹⁴C] methylated protein mixture は Amersham U.K. 社のものを, ultrapure bovine PTH (1-84) は Immuno Nuclear Corp. 社のものを用いた。

Total poly (A⁺) RNA の調製について

腫瘍(再発癌)は切除後ただちに液体窒素中で凍結し、実験には均一で他組織の混在がないと思われる部分から11 gを用いた。まず最初に腫瘍をホモゲナイズし、Kronenberg らの方法に従い phenol-chloroform-isoamylalcohol 法を用いて total RNA を抽出, oligo-dT-cellulose affinity chromatography を用いて total poly (A⁺) RNA を精製した。ウシ副甲状腺からの total poly (A⁺) RNA の調製も同様にして行った。

無細胞蛋白合成系での total poly (A⁺) RNA を用いた蛋白合成について

total poly (A⁺) RNA からの蛋白合成は rabbit reticulocyte lysate 無細胞蛋白合成系で、標識

アミノ酸として [^{35}S] Methionine を用いて行った。rabbit reticulocyte lysate 100 μl , [^{35}S] Methionine 9 μl (約 0.1m Ci), 蒸留水16 μl から成る混合液各10 μl に total poly (A^+) RNA 1 μl もしくは TMVRNA 0.5 μl (蒸留水 0.5 μl を同時添加) を各々加えて 30°C, 60 分間のインキュベーションを行った。合成された全蛋白の量は, Whatman chromatography paper (Whatman Ltd 社) 上でトリクロロ酢酸 (TCA) により固定される沈澱物 (TCA-precipitates) の放射活性に拠った。また反応液の一部 (3 μl) には 5% TCA を加え, 得られた沈澱物を DTT buffer [0.1 M dithiothreitol, 0.3 M Tris-HCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)] 中で 10 分間煮沸した後, Laemmli 及び Stolarsky, Kemper の方法に準じた SDS-15% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動に供した。

無細胞蛋白合成系で合成された蛋白の免疫学的沈澱について

免疫学的沈澱は二抗体法で行い, 無細胞蛋白合成系の反応液の一部 (3 μl) に第一抗体として 2% モルモット抗 PTH 抗体 2 μl , 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS, 0.3% Gelatin を含む 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) 200 μl を加え 4°C, 24 時間のインキュベーションを行った。次に第二抗体としてヤギ抗モルモット IgG (栄研化学) 10 μl , 担体として正常モルモット血清 (栄研化学) 2 μl を加え, 更に 4°C, 24 時間のインキュベーションを行った後, 10,000 $\times g$, 10 分間の遠心分離により抗原・抗体複合体を沈澱させた。沈澱物は phosphate-buffered saline で 2 回洗浄した後 DTT buffer 30 μl に溶解し, その放射活性によって無細胞蛋白合成系で合成される蛋白のうち抗 PTH 抗体と免疫学的結合性を有する蛋白の量 (immunoprecipitates) を測定した。なお一部は 5% TCA による沈澱物と同様に SDS-15% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動に供した。ゲル電気泳動のパターンはオートラジオグラムにより, またゲルを細切した後, その放射活性を測定することにより分析した。

結 果

今回検索した非機能性副甲状腺癌における total RNA および total poly (A^+) RNA (tumor total RNA および tumor total poly (A^+) RNA) の含量は各々 $922 \pm 31 \mu\text{g/g}$ wet weight tissue, $21.2 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ wet weight tissue であった。tumor total poly (A^+) RNA の immunoprecipitates は TCA-precipitates の約 2.0~2.5% を占め, ウシ副甲状腺由来の total poly (A^+) RNA (bovine total poly (A^+) RNA) の immunoprecipitates とゲル電気泳動上全く同一部位 (分子量約 14,000) に一本の明瞭なバンドとして泳動された。更に両 immunoprecipitates のバンド共, 免疫学的沈澱の第一抗体反応の際に過剰量の bovine PTH (1-84) を添加すると消失した事より抗 PTH によって特異的に沈澱する蛋白であることが示された。ゲルを細切し放射活性を測定した結果もオートラジオグラムにおけるのと同様, 両 immunoprecipitates 共, 分子量約 14,000 の位置に主ピークを示した。

考 察

非機能性と思われた副甲状腺癌から調製した total poly (A⁺) RNA がウシ副甲状腺から調製した total poly (A⁺) RNA と同じく無細胞蛋白合成系において、抗 PTH 抗体によって特異的に沈澱し SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動上 pre-pro-PTH と同様の分子量約 14,000 を有する蛋白を生成することを示した。

ところで、ウシ副甲状腺から抽出した total RNA の 8~15S 分画が、抗 PTH 抗体と特異的に結合し pro-PTH より僅かに分子量の大きい蛋白を生成することを最初に示したのは Kemper らである。その後 Habener らにより過形成ヒト副甲状腺組織を用いて同様の事実が確認された。この蛋白は 115 個のアミノ酸から成る PTH の前駆体で pre-pro-PTH として今日一般的に認められており、今回 tumor total poly (A⁺) RNA から生成された蛋白も pre-pro-PTH であると考えられた。このことは非機能性と思われた副甲状腺癌の中にも PTHmRNA が存在していたことを示すものである。

この腫瘍は再発時、従来便宜的に用いられていた基準により非機能性副甲状腺癌と診断された。実際、副甲状腺機能亢進症は全く伴わず、s-Ca, s-P, s-PTH は繰り返し測定されたにも拘らず全て正常であった。ただ腫瘍の切除後、一過性に軽度の低 Ca 血症を来たことから、この腫瘍が PTH を分泌していたのではないかとの疑いが持たれた。本研究は従来の診断法による非機能性副甲状腺癌に PTHmRNA が存在する事を初めて示し、そうした腫瘍から PTH が合成・分泌されていたことを示唆したものである。なお、抗 PTH 抗体を用いた腫瘍組織の PAP 染色では PTH を検出し得なかった。これは細胞あたりの PTH 合成量が極めて少いか、あるいはまた PAP 染色法の感度が不十分な為であったと考えられる。

腫瘍から抽出した mRNA を用い無細胞蛋白合成系で合成される蛋白を分析することによって腫瘍細胞の組織由来を診断しようとする試みが行われてきている。副甲状腺機能亢進症を伴わない時、副甲状腺癌であるとの診断確定に困難を覚える研究者も多い。ここに示した方法が一見非機能性と思われる副甲状腺癌の診断に寄与するところが大きいものと考えられる。

結 語

機能性副甲状腺癌から形質変化し、一見非機能性と思われた副甲状腺癌において、PTH 前駆体である pre-pro-PTH を code する mRNA が存在するかどうかを検索した。

腫瘍から total poly (A⁺) RNA を phenol-chloroform-isoamylalcohol 法を用いて抽出し、oligo-dT-cellulose affinity chromatography によって精製した。腫瘍由来の total poly (A⁺) RNA はウシ副甲状腺由来の total poly (A⁺) RNA と同様、rabbit reticulocyte lysate 無細胞蛋白合成系において、抗 PTH 抗体によって特異的に沈澱し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上 pre-pro-PTH と同一部位に泳動される蛋白を合成した。

これらの結果は、pre-pro-PTH を code する mRNA (PTHmRNA) が、一見非機能性と思われ、副甲状腺癌の中にも存在することを示し、副甲状腺機能亢進症を伴わない副甲状腺癌においても PTH 合成が必ずしも欠如していないことを示唆したものである。

論文審査の結果の要旨

ペプチドホルモンはプレプロホルモンとしてDNAからメッセンジャーRNAを介して合成され、プレ及びプロの部分の加水分解による切断の後に分泌顆粒中に入って細胞表面に運ばれた後に細胞外に放出されるが、従来は、完成したホルモンの測定によるその分泌率の推定が、内分泌細胞の機能の唯一の判定法であり、機能性即ちホルモン分泌性腫瘍と非機能性即ちホルモン非分泌性腺癌の区別も、完成し分泌されたホルモンの、血中又は腫瘍組織中における量を測定することによってのみ行われていた。遺伝子工学的手法の応用によって、ホルモンの合成過程を核酸の同定によって知ることが出来る様になり、種々の生理的状态又は疾患でホルモンの転写又は翻訳の過程がどの様に变化するかを知ることは臨床内分泌学の研究の上で大きな進歩である。

本研究者は64才女性、副甲状腺癌の症例で、初診時には高カルシウム血症、低燐血症、血中副甲状腺ホルモンの高値から明らかな原発性副甲状腺機能亢進症が認められたが、2年后この腫瘍が再発し再手術したときには、組織学的には略々同様の所見を示したにもかかわらず、血清カルシウム、燐、副甲状腺ホルモンは全く正常であり、細胞の性状が転化してもはや副甲状腺ホルモンの分泌を行わなくなったと考えられる稀有の例について副甲状腺ホルモン・メッセンジャーリボ核酸の分析を行い、副甲状腺ホルモンの合成機序について考察を加えた。

副甲状腺組織は -80°C に保存、フェノール・クロロフォルム、イソアミルアルコールによって全RNAを抽出の後オリゴ-dT-セルローズによるアフィニティ、クロマトグラフィーを2回行ってpoly(A^+) RNAを分離した。これを兔網状赤血球溶血物による翻訳により ^{35}S メチオニン標識下にペプチド生成に用いた。この生成ペプチドを抗副甲状腺ホルモン抗体によって 4°C 24時間の反応によって沈澱せしめ、SDS-15%ポリ、アクリラマイドスラブゲルによる電気泳動によって分画し、ラジオオートグラフにより ^{35}S の活性を測定した。同時に牛副甲状腺からも同様の方法によってmRNAを抽出し副甲状腺ホルモンを生成させ抗体によって沈澱させて比較した。

臨床的に非機能性の副甲状腺癌であった本患者の組織からも少量の副甲状腺ホルモンメッセンジャーRNAが検出されたが、牛副甲状腺に比べるとその量ははるかに少ないものであった。これらの両組織からのmRNAによって生成された副甲状腺ホルモン抗体によって沈澱したペプチドは分子量約14,000でプレプロ副甲状腺ホルモンのそれに一致した。PAP法は感度が充分でなくホルモンの存在を証明出来なかった。

本研究は遺伝子工学の方法を臨床内分泌学に応用するところみとして副甲状腺癌のホルモン産生機構と細胞の転化の関連を世界に先がけて明らかにしたものであり、ホルモン産生腫瘍の病態生理について新しい知見を得た価値ある集積とみとめられる。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると考えられる。