Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism

矢野, 彰三

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2001-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2324
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002324

※ 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。

【100】

氏　名・(本　籍)　**矢野　彰三　(兵庫県)**

博士の専攻分野の名称　　博　士　(医　学)

学　位　記　番　号　　博い第１３３８号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　　平成１３年３月３１日

【学位論文題目】

Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism

腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症では副甲状腺細胞増殖能の亢進にカルシウム感知受容体発現の低下が関係する

審　査　委　員

主査　教授　千原　和夫

教授　守殿　貞夫　　教授　前田　盛

はじめに

これまで腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症（2° HPT）の進展は血中活性型ビタミンD レベルの低下および副甲状腺におけるビタミンD 受容体（VDR）発現の低下すなわちビタミンD 作用の低下によって主に説明されてきた。一方、副甲状腺には血中Ca 濃度を感知し副甲状腺ホルモン（PTH）分泌を制御するCa 感知受容体（CaSR）が存在し、腎不全では正常対照に比しその発現が低下していることが報告されている。CaSR 不活性型変異によって引き起こされる新生児重度副甲状腺機能亢進症や家族性低Ca 尿性高Ca 血症の一部の症例では副甲状腺が腫大すること、CaSR ノックアウトマウスでは著明な高Ca 血症に副甲状腺の腫大を伴うこと、さらに腎不全ラットの副甲状腺の腫大をCaSR アゴニストが抑制することなどが報告され、CaSR 発現の低下あるいはCaSR 機能の低下が副甲状腺の増殖に関与する可能性が示唆されている。本研究では2° HPTで副甲状腺腫大が生じる機序をより明らかにする目的でヒト副甲状腺におけるCaSR およびVDR の発現レベルと細胞増殖能との関係について解析を行った。

対象および方法

患者背景

重篤な2° HPTをきたした長期血液透析患者18人（平均年齢47.5歳）より副甲状腺摘除術の際に得られた副甲状腺52腺および甲状腺癌患者4人（平均年齢54.0歳）から手術時に同時摘出された副甲状腺4腺を用いた。甲状腺癌患者4人の血中Ca レベルはいずれも正常であり、4腺の副甲状腺は正常対照とした。透析患者の透析歴は平均13.4年、9人が1α(OH)D_3 0.25～0.5μgの連日投与、残り9人は1α, 25$(OH)_2D_3$ 4μgまたは8μg/ 週の間歇投与を受けていた。2° HPTおよび正常対照の血中補正Ca、P、クレアチニン(Cr)、アルカリフォスファターゼ(ALP、N：100-303)、intact PTH (Allegro Intact PTH-RIA kit) はそれぞれ10.67、9.03 (mg/ dl)、6.32、3.58 (mg/ dl)、10.05、0.68 (mg/ dl)、1820、226 (IU/ L)、1715、26 (pg/mL) であった。いずれの患者からも同意を得た上、本研究を行った。

抗体

CaSR 抗体、ADD、はNPS社、Dr. K. Rogers より供与していただいた。ADDはヒトCaSR の細胞外ドメイン214-235アミノ酸残基に対するマウスモノクローナル抗体である。VDR 抗体は抗ヒトVDR ラットモノクローナル抗体(9A7γ.E10.E4) をNeo Markers より、Ki67 に関してはラビットポリクローナル抗体をDAKO より購入し、それぞれ50倍および100倍に希釈し使用した。

免疫組織化学

免疫化学染色はホルマリン固定・パラフィン包埋された副甲状腺の連続切片を用いてABC法で行った。すなわち、キシレンによる脱パラ、エタノールによる脱水ののち、0.3%H_2O_2 メタノールで内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行い、PBS で洗う。VDR、Ki67 に関しては400W 10分のマイクロウエーブ処理にて抗原を賦活化した後、一次抗体をかけ4°Cで一昼夜おく。PBS でよく洗った後、ビオチン結合した二次抗体を30分作用させ、再び洗い、ペルオキシダーゼでラベルされたストレプトアビジンを30分作用させる。最後に3.3ジアミノベンジジン(DAB) を含んだ0.1%H_2O_2 PBS を10分間作用させる。CaSR に関してはヘマトキシリンで核の染色を追加した。また、VDR、Ki67 に関してはNi^{2+} とCo^{2+} をそれぞれ最終濃度0.3% となるようDAB 溶液に添加した。

発現蛋白量の半定量化

1腺につき6 視野を無作為に抽出し、Ki67 については200倍視野におけるKi67 陽性細胞数を計測し、

同一視野のCaSR およびVDR の発現量については次に示すスケールを用いて1視野毎に数値化し、その平均値を各腺のスコアとした。すなわち、染色性が75％以上をGrade 3、50-75％をGrade 2、25-50％をGrade 1、25％以下をGrade 0とし、各腺のスコアを求めた。

統計学的解析

結果は全て平均±標準誤差で示した。対応のない2群の比較には *t*検定を用い、単回帰分析、重回帰分析にて解析を行った。P<0.05を統計学的有意とした。

結　果

全副甲状腺におけるCaSR 、VDR の発現レベルと増殖能の検討

CaSR は細胞-細胞境界にその発現が確認され、CaSR が7回膜貫通型受容体であるという事実に合致した所見であった。一方、VDR およびKi67 は核に存在しており、今回の検討でも主に核が染色された。透析患者の副甲状腺では正常対照に比しKi67 陽性細胞数の明らかな増加すなわち増殖能の亢進とCaSR およびVDR 発現の著明な低下が認められ、それぞれこれまでの報告に合致した結果であった。

腫大副甲状腺における組織学的検討

2° HPTを示す副甲状腺は組織学的に、結節部とびまん性増殖部に大別される。モノクローナルな増殖を示し、より増殖能が高いといわれている結節内部ではびまん性増殖部に比し明らかにCaSR 発現が低下しており、Ki67 陽性細胞が多く認められた。一方、同部位でのVDR 発現には明らかな差異はみられなかった。そこで次に、結節形成の有無により2° HPTの52腺を2群（N +/ -）に分類したところ、N(+)群(40腺)ではN(-)群(12腺)に比し有意の増殖能の亢進とCaSR 発現の低下が認められたのに対し、VDR 発現には有意差が認められなかった。

CaSR 、VDR の発現レベルと増殖能との単回帰分析

透析例52腺についてCaSR 、VDR のタンパク発現量と増殖能との相関を検討したところ、Ki67 陽性細胞数はCaSR 発現レベルと有意の負の相関（R=-0.457、p=0.0007）を認めたが、VDR 発現レベルとも有意の負の相関（R=-0.31、p=0.0253）を認めた。

副甲状腺増殖能に対する重回帰分析

CaSR 発現レベルとVDR の発現レベルは高い相関（R=0.653、p <0.0001）を示したので、さらに重回帰分析を行ったところ、Ki67 陽性細胞数はVDR を考慮に入れてもCaSR 発現レベルと有意の負の相関がみられた。それに対し、VDR との相関はCaSR を考慮に入れると消失した。

考　察

以上の成績から、CaSR が副甲状腺の細胞増殖の調節に関与する可能性が示されたが、細胞内シグナル伝達の詳細については明らかでない。CaSR を発現している骨芽細胞株、間葉系細胞株あるいはCaSR を強制発現させた線維芽細胞では細胞外Ca 濃度を上昇させることによって細胞増殖能の亢進が認められ、これにはc-Src キナーゼやMAP キナーゼ活性の亢進が関与するとされている。一方、副甲状腺では細胞外Ca 濃度を上昇させるとPTH 分泌および合成は抑制され、細胞増殖能は低下すると考えられている。副甲状腺細胞がなぜ他の細胞と逆の振舞いになるのかは今後の課題である。

2° HPTの副甲状腺でCaSR の発現が減少する機序についても未だ不明である。活性型ビタミンD によりCaSR の発現が調節されるならば、2° HPTにおけるビタミンD 作用の低下によりCaSR 発現が減少する可能性も考えられるが、現在のところビタミンD によるCaSR 発現調節についてはコンセンサスが得られていない。ビタミンD -VDR 以外の何らかの他の因子を介して調節されている可能性もある。

2° HPTの程度が軽度であれば薬理量のビタミンD を間歇的に投与するビタミンD パルス療法が有効であるが、ビタミンD 抵抗性を持つような重症の2° HPTになると高Ca 血症をきたし治療の継続が困難になる。CaSR アゴニストの治療薬としての有用性は慢性腎不全患者に対する短期投与によるPTH 分泌抑制効果や腎不全ラットに対する長期投与による副甲状腺腫大の抑制作用などの報告から明らかであったが、本研究結果は2° HPTを呈した透析患者においてビタミンD パルス療法以上にCaSR アゴニストが有効である可能性を示唆している。臨床的に重要なのはCaSR アゴニストをビタミンD と併用すればビタミンD の副作用である高Ca 血症や高P 血症をきたすことなく2° HPTをコントロールしうるであろうということであり、これまでと全く異なる作用機序の新薬の開発・認可が待たれるところである。

以上、我々は腎不全による2° HPTの進展機序の一つに副甲状腺におけるCaSR 発現の低下があること、またCaSR 発現の低下は副甲状腺増殖能の亢進に強く関与しており、この関係はVDR に依存しないことを証明した。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1341号	氏　名	矢野彰三
論文題目	Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism （腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症では副甲状腺細胞増殖能の亢進にカルシウム感知受容体発現の低下が関係する）		
審査委員	主　査　千原和夫 副　査　寺尾貞夫 副　査　前田　盛		
審査終了日	平成13年3月5日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

腎不全に続発する二次性副甲状腺機能亢進症は活性型ビタミンDの低下とともに腎性骨異栄養症をきたす２大要因であり、患者のQOLを大きく損なう重大な問題である。従来より腎不全に合併する副甲状腺の過形成および腫大は、腎における１α水酸化酵素欠乏のため活性型ビタミンDである1,25-(OH)2ビタミンD3の生成が低下し血中1,25-(OH)2ビタミンD3濃度の低下、それに付随する副甲状腺ビタミンD受容体(VDR)発現の低下の結果、生理的なフィードバック機構であるビタミンDによる副甲状腺に対する抑制が減弱し、副甲状腺ホルモン合成・分泌が促進されるのみならず副甲状腺細胞の増殖が起こると理解されてきた。実際、腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症の治療では、血中Ca値を上昇させ、血中P値を低下させるための炭酸カルシウムの服用と活性型ビタミンD（あるいは１-α(OH)ビタミンD3）の投与が基本である。また、二次性副甲状腺機能亢進症が軽症から中等度に進展した場合には薬理量のビタミンDを間歇的に投与するビタミンDパルス療法も有効である。しかし、なかにはビタミンD抵抗性の重症の二次性副甲状腺機能亢進症に進展する場合があり、このような症例では外科的治療すなわち副甲状腺摘除やエタノール注入による副甲状腺破壊などを施行せざるを得なかった。しかし、患者にとって負担や疼痛を伴う観血的治療よりも薬物による非観血的治療が望ましいのは論を待たない。近年、Ca感知受容体（Ca-sensing receptor, CaSR）がクローニングされ、Ca代謝における役割が明らかにされつつある。CaSRは副甲状腺にも発現しており、血中Ca値を感知し副甲状腺ホルモン合成・分泌を制御すること、また腎不全ではその発現が低下していること、CaSR不活性型変異やCaSRノックアウトマウスでは高Ca血症および副甲状腺腫大がみられること、さらに腎不全ラットで起こる副甲状腺腫大をCaSRアゴニストが抑制することなどが報告され、CaSRの働きが損なわれることが副甲状腺の増殖や副甲状腺ホルモンの合成・分泌の促進に重要な意味を持つ可能性が示唆されてきた。そこで申請者は、ヒトの副甲状腺においてCaSRおよびVDRの発現量と細胞増殖能の関連を調べた。CaSRおよびVDRはそれぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫組織化学で染色し、発現量を定量した。

細胞の増殖能は、Ki67陽性細胞を計測することによって評価された。重篤な二次性副甲状腺機能亢進症をきたした長期血液透析患者の副甲状腺では、甲状腺癌を手術した時に同時に摘出された正常副甲状腺と比べてKi67陽性細胞数は明らかに増加し、一方CaSRとVDRの発現量は著明に低下していた。これらの相関を単回帰分析で求めたところKi67陽性細胞数はCaSR発現レベル、VDR発現レベルともに有意の負の相関を認めた。さらに重回帰分析を行うと、Ki67陽性細胞数はVDRを考慮にいれてもCaSR発現レベルと有意の負の相関が見られたのに対し、VDRとの相関はCaSRを考慮に入れると消失した。この成績は、腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症の進展には、VDR発現量低下以上にCaSR発現量低下が深く関与していることを示唆している。さらに透析患者から得られた副甲状腺組織のうち、モノクローナルな増殖を示しより増殖能が高いとされている結節部を周辺のびまん性増殖部と比較したところ、結節内部で明らかにCaSR発現が低下し、Ki67陽性細胞が多く認められた。一方、VDR発現には両部位で差がなかった。この成績も副甲状腺細胞増殖能とCaSR発現量の密接な関係を示唆するものである。これらの結果は、二次性副甲状腺機能亢進症を示す透析患者の治療にビタミンDパルス療法以上にCaSRアゴニストが有効である可能性を示唆しており、臨床への応用が期待される。

以上、本研究は、腎不全に続発する二次性副甲状腺機能亢進症の病態について、副甲状腺細胞の増殖能とCa感知受容体およびビタミンD受容体の関連を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかったCa感知受容体発現量低下の二次性副甲状腺機能亢進症進展における意義について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。