

中島正洋 (佐賀県) 昭和40年2月25日生

授与年月日 平成8年3月31日

主論文 Expression of Parathyroid Hormone-Related Peptide in Human Thyroid Tumours

ヒト甲状腺腫瘍における副甲状腺ホルモン関連ペプチド発現の検討

M. Nakashima, A. Ohtsuru, W. T. Luo, T. Nakayama, H. Enomoto, T. Usa, T. Kiriya, M. Ito, S. Nagataki, S. Yamashita, I. Sekine

(J Pathol, Vol.175 : 227-236 : 1995)

長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設
病態生理学部門

(主任: 関根一郎教授)

論文内容の要旨

緒言

副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因物質として同定されたが、現在では発生の種々の正常組織や、高カルシウム血症に関係のない腫瘍組織に広くその発現が報告されている。PTHrP は PTH 様作用を有するが、腎や骨の PTH/PTHrP 受容体を介するカルシウム調節に関与する一方、PTHrP は上皮細胞の増殖や分化に対する局所におけるサイトカインとしての作用が示唆されている。また EGF や TGF- β は甲状腺濾胞細胞の成長因子の一つで、これらのサイトカインは PTHrP 遺伝子発現を誘導することが知られている。本研究では様々なヒト甲状腺腫瘍における PTHrP 発現の有無を、免疫組織化学、*In situ* hybridization, RT-PCR を用いて検討した結果、その特徴的分布と悪性化との関連性について新知見を見出した。

材料と方法

1) 免疫組織化学: 外科的に切除された原発性甲状腺

癌82例、濾胞状腺腫9例、腺腫様甲状腺腫16例を用い免疫組織化学を行った。甲状腺癌は組織学的に66例(80.5%)が乳頭癌、12例(14.6%)が濾胞癌、4例(4.9%)が未分化癌であった。組織学的分化度により、乳頭癌は papillary, colloid-rich follicle, colloid-absent follicle の3型に、また濾胞癌は colloid-rich follicle と colloid-absent follicle の2型に分類し、これらの組織型が共存する場合はそれぞれにおいて PTHrP の発現を評価した。標本は10%中性ホルマリン固定パラフィン包埋切片で、抗 PTHrP 抗体 (monoclonal; Oncogene Science) を一次抗体に、抗マウス IgG-Alp を二次抗体として BCIP/NBT にて発色を行った。陽性対照としてヒト肺扁平上皮癌由来 PTHrP 産性細胞を用い、これと同等あるいは強い免疫活性を有すものを強陽性、弱いものを陽性、免疫活性のないものを陰性とした。

- 2) *In situ* hybridization (ISH): 6カ月以内に得られた比較的新鮮な乳頭癌4例の10%中性ホルマリン固定パラフィン包埋切片において PTHrP mRNA 発現を検討した。methyl green pyronine 染色により胞体内 RNA の存在を確認した。ラット PTHrP cDNA を Nick translation kit (BRL) によりピオチン化したプローブを用い ISH を行った。RNase 処理後の PTHrP cDNA とピオチン化 Bluescript plasmid DNA による ISH を対照とした。
- 3) RT-PCR: 切除乳頭癌3例、未分化癌由来培養細胞株 WRO, 正常対照としての Graves' disease の切除例、陽性対照としての PTHrP 産性肺癌よりそれぞれ RNA を抽出し、ヒト PTHrP primer として 5'AGACTGGTTCAGCAGTGGAG 3' (sense, exon 5) と 5'ATCGAATCCAGCGACGTTG 3' (antisense, exon 6) を、ヒト β -actin primer として 5'TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA 3' (sense, exon 4) と 5'AGTACTTGCCTCAGGAGGA 3' (antisense, exon 6) を用いた RT-PCR を行った。

結果

- 1) 組織型にかかわらずほとんど全て (99%) の甲状腺癌が PTHrP 免疫活性陽性であるのに対し、周囲正常濾胞は全て陰性であった。さらに濾胞状腺腫において1例のみが PTHrP 陽性で腺腫様甲状腺腫の全てが陰性であった。
- 2) 組織学的分化度別にみた PTHrP 発現は乳頭癌、濾胞癌ともに高分化の colloid-rich follicle に陽性率が低い (乳頭癌: 22%, 濾胞癌: 50%) のに対し、比較的低分化である colloid-absent follicle

(乳頭癌：94%，濾胞癌：100%)や papillary component (100%)には高い陽性率をみた。さらに強陽性は colloid-absent follicle (乳頭癌：40%，濾胞癌：64%)と papillary component (67%)のみにみられた。未分化癌については全例が強陽性であり、組織内に出現する破骨細胞型多核巨細胞は特に強い PTHrP 免疫活性を示した。

- 3) 癌において原発巣とリンパ節転移巣との間に PTHrP 陽性率に有意差はみられなかったが、周囲組織浸潤を示す例では浸潤部に強い免疫活性を示した。また砂粒体の有無による癌細胞における PTHrP 局在の差はなかった。
- 4) ISH により PTHrP mRNA 発現は癌部のみで、RT-PCR においても特異的な 510bp の PCR 産物は癌組織のみに検出された。

考察

PTHrP は免疫組織化学的にほとんどの甲状腺癌組織に陽性で、他の良性腫瘍や正常濾胞には陰性であり、ISH, RT-PCR による mRNA レベルの検討によっても同様の結果であった。このことは PTHrP 陽性甲状腺腫瘍は悪性であり、PTHrP 免疫染色が癌と腺腫との鑑別に有用である可能性を示唆する。

PTHrP は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症 (HHM) の原因物質として知られているが、今回検索した症例に HHM を呈したものはなく、甲状腺癌組織において PTHrP 発現は局所における病態形成に何らかの作用を発揮しているものと考えられる。そこで更に、癌の組織型、増殖 (分化) 形態、浸潤傾向、リンパ節転移の有無、石灰化の有無、扁平上皮化生による PTHrP 発現の差異を検討した。

組織型による PTHrP 陽性率に有意差を認めなかったが、コロイドを形成する高分化の colloid-rich follicle に対し、比較的低下分化のコロイドを形成しない colloid-absent follicle や papillary component に PTHrP 免疫活性は強くみられ、未分化癌は全例 PTHrP 強陽性であり、PTHrP 発現と甲状腺癌細胞における分化機能の一つであるコロイド産生能の消失との間に何らかの関係が示唆された。甲状腺癌では組織型の予後に及ぼす影響について一定の見解はないが、腺外周囲組織浸潤は重要な予後因子の一つとされる。本研究において、PTHrP 発現の陽性率が高いためリンパ節転移の有無による PTHrP 発現に有意差はみられなかったが、癌の周囲組織浸潤部では他の部位より PTHrP 免疫活性が強かった。今後、甲状腺癌組織における PTHrP 発現の予後決定因子としての役割が解析される必要がある。

乳頭癌はしばしば小石灰化巣を形成するが、石灰化部と周囲癌組織における PTHrP 発現の増強はみら

れなかった。一方、PTHrP は keratinocyte の分化・成熟への関与が示唆されており、PTHrP は皮膚扁平上皮のみならず呼吸上皮の扁平上皮化生部への局在も証明されている。今回、8例の乳頭癌が扁平上皮化生を示したが、これらの化生部全てが PTHrP 強陽性であり、腫瘍性病変においても PTHrP 発現が扁平上皮への分化に関与していることが示唆された。

以上、本研究によりヒト甲状腺組織における特徴的 PTHrP 局在の差異を見出した。PTHrP は甲状腺濾胞細胞の悪性化に伴い発現され、特にコロイド産生能の消失や周囲組織浸潤に関連して強く発現されることより、PTH/PTHrP 受容体を含めた PTHrP の機能的意義の解析は、甲状腺組織の癌化や腫瘍進展の解明に有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

申請者中島正洋は平成4年3月長崎大学医学部を卒業し、医師国家試験に合格、同年4月に長崎大学大学院医学研究科に入学し、病理学を主科目として所定の単位を修得した。その間、原研病態生理学部門主任関根一郎教授の指導のもとに、学位論文「Expression of Parathyroid Hormone-Related Peptide in Human Thyroid Tumors」を完成し、参考論文5編を添えて長崎大学大学院医学研究科委員会に学位を申請した。同委員会は論文内容の要旨を検討し受理を決定後、下記の通り審査委員を選出した。学位申請者は、平成8年2月21日に行われた大学院研究発表会において主論文の内容について研究発表を行い、試問に答えた。委員は主査を中心として慎重に審査の上、平成8年2月21日の定例委員会でその結果を報告した。

主論文の要旨は次の通りである。

副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因物質として1987年に同定されたが、最近では上皮細胞の増殖や分化に関する局所におけるサイトカインとしての作用が注目されている。本研究はヒト甲状腺腫瘍における PTHrP 発現の有無を、免疫組織化学、*In situ* hybridization (ISH), RT-PCR を用いて検討した結果、特徴的分布と悪性化との関連性について新知見を見出したものである。

外科的に切除された原発性甲状腺癌82例、濾胞状腺腫9例、腺腫様甲状腺腫16例を用い免疫組織化学を行った。ほとんど全て (99%) の甲状腺癌が PTHrP 免疫活性陽性であったのに対し、正常濾胞は全て陰性であり、さらに腺腫において異型腺腫1例のみが PTHrP 陽性で、腺腫様甲状腺腫の全てが陰性であった。これらの結果は ISH, RT-PCR による遺伝子転写レベルの検討によっても同様であり、PTHrP 発現の有無が甲状腺腫瘍の良悪の鑑別に有用である可能性を

示唆する。次に、PTHrP 発現と甲状腺癌の病態形成との関連を評価するために、癌の組織型、増殖・分化形態、浸潤傾向、リンパ節転移の有無、石灰化の有無、扁平上皮化生部による PTHrP 発現の差異を検討した。組織型による PTHrP 陽性率に有意差を認めなかったがコロイドを形成する colloid-rich follicle に対し、コロイドを形成しない colloid-absent follicle や papillary component に PTHrP 免疫活性は強くみられ、未分化癌は全例 PTHrP 強陽性であり、PTHrP 発現と甲状腺癌細胞の分化機能の一つであるコロイド産生能の消失との間に何らかの関係が示唆された。甲状腺癌では腺外周囲組織浸潤は重要な予後因子の一つとされるが、癌においてリンパ節転移の有無による PTHrP 発現に有意差はみられなかったが、周囲組織浸潤を示す例では浸潤部に PTHrP 免疫活性が強かった。このことは PTHrP が甲状腺癌の進展に関与している可能性を示唆しており、今後、甲状腺癌組織における PTHrP 発現の予後決定因子としての役割が解析される必要がある。乳頭癌はしばしば小石灰化巣を形成するが、石灰化部と周囲癌組織における PTHrP 発現の増強はみられなかった。一方、PTHrP はケラチノサイトの分化・成熟への関与が示唆されており、PTHrP は皮膚扁平上皮のみならず呼吸上皮の扁平上皮化生部への局在も証明されている。今回、8 例の乳頭癌が扁平上皮化生を示したが、これらの化生部全てが PTHrP 強陽性であり、腫瘍性病変においても PTHrP 発現が扁平上皮への分化に関与していることが示唆された。

以上のように、本研究はヒト甲状腺組織における特徴的 PTHrP 局在の差異を見出した。医学研究科委員会は、審査委員の報告に基づき検討した結果、PTHrP が甲状腺濾胞細胞の悪性化に伴い発現され、特にコロイド産生能の消失や周囲組織浸潤に関連して強く発現されることを明らかにした本研究は、甲状腺組織の癌化や腫瘍進展の解明に貢献するものであり、学位に値するものと認め合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 田口 尚
副査 教授 矢野 捷介
副査 教授 池田 高良