原 著

慢性維持透析患者の二次性副甲状腺機能亢進症における 副甲状腺ホルモン遺伝子および増殖関連遺伝子の発現 —1,25(OH)₂D₃ 投与の影響—

林 春 幸 入江 康 文 横関 一 雄 小 林 進*
伊 藤 靖* 松 下 一 之* 磯 野 可 一*
三愛記念クリニック 千葉大学第2 外科*

key words: 二次性副甲状腺機能亢進症, 1,25(OH)₂D₃, パルス療法, preproPTH, c-myc, オルニチン脱炭酸酵素
〈要旨〉

二次性副甲状腺機能亢進症患者より摘出した副甲状腺における, preproPTH, c-myc, オルニチン脱炭酸酵素遺伝子 (ODC) mRNA の発現をノーザンブロット法で調べ, 術前に投与した 1,25(OH)₂D₃ (D₃) の影響を検討した. 3 例 11 個の副甲状腺において preproPTH の発現は最小の発現量を 1 とした場合最大約 2 倍程度の多寡が見られたものの, 副甲状腺の大きさや組織型の多様性と相関した変化ではなかった. c-myc の発現は 1 例の 4 個の副甲状腺のうち 2 個で発現増大が認められた. しかしこれらの副甲状腺の大きさや組織型には際立った特徴はなく, その発現増大の原因は明らかではなかった. ODC mRNA の発現量はすべての副甲状腺においてほぼ一定であった. D₃ は 4 μg を 4 例に対して術前 3.5~48 時間に経口投与した. 摘出した 13 個の副甲状腺の遺伝子発現を検討した結果, preproPTH, c-myc, ODC いずれの発現も 3 例の非投与例と差が認められなかった. したがって副甲状腺摘出術の適応となるような二次性副甲状腺機能亢進症においては, D₃ 4 μg 投与では, これらの遺伝子発現は抑制されないものと考えられた.

mRNA expression of preproPTH and growth-related genes in secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure patients—effect of 1,25(OH)₂D₃—

Haruyuki Hayashi, Yasubumi Irie, Kazuo Yokozeki, Susumu Kobayashi*, Yasushi Ito*, Kazuyuki Matsushita*, Kaichi Isono*

Sanai Memorial Clinic; Second Department of Surgery, Chiba University School of Medicine*

mRNA expression of preproPTH, c-myc and ornithine decarboxylase (ODC) in secondary hyperparathyroidism was examined by Northern blot analysis, and the effect of 1,25(OH)₂D₃ (D₃) on their expression was tested. Relative levels of preproPTH mRNA in 11 hyperplastic parathyroids from 3 control patients ranged from 1 to 2, but were not correlated with size or histological findings. Two of 4 parathyroid glands from one patient exhibited overexpression of c-myc mRNA, however, no particular characteristics in terms of size or histological findings were noted in these parathyroid glands. The level of ODC mRNA expression was the same in all of the parathyroid glands. D₃ (4 μg) was administered orally to 4 patients 3.5~48 hours before parathyroidectomy. There were no differences between the levels of preproPTH, c-myc, or ODC mRNA in 13 parathyroid glands from D₃-treated patients and parathyroid glands from 3 control patients. These results indicate that D₃ does not

suppress the expression of preproPTH, c-myc or ODC mRNA in secondary hyperparathyroidism which is an indication for parathyroidectomy.

緒言

慢性維持透析患者における二次性副甲状腺機能亢進症の原因が、活性型ビタミンDである $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (D_3) の低下によることが数々の知見により示されている。ウシの副甲状腺細胞を D_3 存在下に培養すると、PTH 生合成の初期過程である preproPTH mRNA の転写が抑制され^{1,2)}、ラットの腹腔内に D_3 を投与しても同様の転写抑制が見られる³⁾。また preproPTH 遺伝子 DNA の解析がなされた結果、遺伝子の 5' 側に負の転写調節領域があり、 D_3 存在下、転写が抑制されることが示された⁴⁾。さらに二次性副甲状腺機能亢進症患者に D_3 の経静脈的投与を行うと、血清カルシウムの上昇を介さずに血清 PTH レベルの低下することも示されている⁵⁾。血清 PTH 低下作用は D_3 の経口投与でも認められ⁶⁾、長期間の大量間欠投与、いわゆるパルス療法により、副甲状腺のサイズが縮小する例も認められている⁷⁾。

一方、 D_3 の低下が副甲状腺細胞の増殖刺激となり、過形成を引き起こすという直接的証拠は示されていない。しかし、 D_3 が細胞増殖の抑制作用を有する証拠はいくつか示されている。白血病細胞由来の HL60^{8,9)} や、T-リンパ球¹⁰⁾ などの培養系に D_3 を添加すると、細胞増殖に関連した癌遺伝子である c-myc mRNA の発現が抑制され、ウシの副甲状腺細胞の血清による増殖刺激後の c-myc mRNA の発現増大や細胞増殖も、 D_3 添加により抑制される¹¹⁾。ところがこれらの実験は機能亢進をきたした副甲状腺細胞に対する効果を見たものではない。腎不全状態においては D_3 の副甲状腺への結合が抑制されているとの報告もあり¹²⁾、機能亢進をきたした副甲状腺に対しても D_3 が、preproPTH や c-myc 遺伝子の発現を抑制する効果を有するか、検討する必要があると思われる。

慢性維持透析患者の二次性副甲状腺機能亢進症において、 D_3 がこれらの遺伝子発現を抑制するかどうかを検証するためには、副甲状腺摘出術

(PTX) の適応となるようなかなり進行した二次性副甲状腺機能亢進症例とともに、発生初期段階の症例も対象としたいところである。しかしこのような症例は PTX の適応とはならず、本病態の発生と進行に伴う遺伝子発現の変化を検討することは困難である。

そこで本研究においては、PTX 適応となった症例のなかに混在する大きさの異なる副甲状腺に着目し、高度に増殖巨大化した副甲状腺と正常サイズに近い小さな副甲状腺における遺伝子発現を比較することにより、 D_3 の投与に対する反応性に違いが認められないか検討した。さらに preproPTH, c-myc に加え、各種の細胞種で増殖に関連して発現増大することが知られている、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)遺伝子 mRNA の発現¹³⁾ も検討した。

対象と方法

遺伝子発現の検討は7症例から摘出した副甲状腺について行った。全症例の年齢、性、透析歴、術前の PTH (ヤマサキットにて中間部 PTH を測定)、総 Ca、無機 P、パルス療法の効果を表1に示した。症例1～3は対照群であり、症例4～7は副甲状腺摘出術直前に D_3 投与を行った治療群である。症例5は手術時点までパルス療法を継続していたが、他の症例は手術数か月前にパルス療法が中止されていた。症例5と7はパルス療法施行中血清 PTH レベルが低下し、パルス療法有効と判断されたが、副作用のため治療中止に至った症例である。表2に摘出した計24個の副甲状腺の部位、重量、組織型、および手術直前の D_3 投与時点を示した。 D_3 の投与はパルス療法と同量の $4\text{ }\mu\text{g}$ の Rocaltrol® を経口投与した。術前3.5時間投与の場合は、薬液をカプセルから抜き出して投与した。

副甲状腺は摘出後ただちにグアニジン溶液 (4 M guanidinium isothiocyanate, 5 mM sodium citrate, pH 7.9, 0.1 M β -mercaptoethanol, 0.5% Sarkosyl) 内でホモジナイズし -20°C で保存し

た。この溶液より塩化セシウム法¹⁴⁾により、総 RNA を抽出した。各種遺伝子 mRNA の発現は、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法により検出した。抽出された RNA 10 μ g を 50%ホルムアミド/2.2 M ホルムアルデヒド溶液中で変性し、1%アガロース/ホルムアルデヒドゲル上に電気泳動した。このゲルをエチヂウム染色し、28S および 18S リボソーム RNA の染色性より RNA の品質および量を確認した。その後ゲルより RNA をニトロセルロースフィルターにブロッ

ティングし、紫外線照射（ストラタリンカー）により、固着した。このフィルターをハイブリダイゼーション溶液（0.9 M sodium chloride, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 5 mM EDTA, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1%ウシ血清アルブミン, 0.1% SDS）でプレハイブリダイゼーションした後、同溶液に熱変性超音波切断ニシン精巢 DNA (100 μ g/ml) とマルチプライムラベリング法（アマーシャム社製キット）により ³²P をラベルしたプローブ DNA を熱変性後加え、68°C で 12~18 時間ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション終了後のフィルターの洗浄は、ヒト DNA プローブを用いた場合は 0.1×SSC (15 mM sodium chloride, 1.5 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS にて 68°Cで行い、ラット DNA プローブを用いた場合は 2×SSC, 0.1% SDS にて 50°Cで行った。次にこのフィルターを高感度 X 線フィルムに露出し、各ノーザンブロットのオートラジオグラフィーを得た。

preproPTH mRNA 検出用のプローブは、症例

表 1 対象症例

症例 (歳)	透析歴 (年)	PTH (ng/ml)	術前検査 Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	パルス 療法
1. 42 女	4	250	9.6	5.6	無効
2. 20 女	3	130	8.8	8.6	無効
3. 51 女	10	200	10.8	7.4	無効
4. 51 女	11	190	10.1	7.0	無効
5. 64 女	8	110	9.6	6.8	有効 (施行中)
6. 32 男	10	150	10.5	6.8	無効
7. 55 女	18	130	9.0	8.0	有効

表 2 副甲状腺の重量および組織型

症例	部位	重量	組 織	D ₃ 投与
1	a 右上	3.4 g	主細胞過形成（異形成）	投与せず
	c 左下	0.6	主細胞過形成	
	d 左上	1.5	主細胞過形成	
2	a 右上	0.9	主細胞過形成	投与せず
	b 右下	0.5	主細胞過形成	
	c 左下	0.6	主細胞過形成	
	d 左上	0.3	主細胞過形成	
3	a 右上	2.8	主細胞過形成，石灰化	投与せず
	b 右下	0.3	多結節性主細胞過形成	
	c 左下	1.8	多結節性主細胞過形成	
	d 左上	1.9	多結節性主細胞過形成	
4	a 右上	2.9	多結節性主細胞過形成	3.5 時間前
	b 右下	<0.1	主細胞過形成	
	c 左下	0.9	多結節性主細胞過形成	
5	b 右下	0.7	主細胞過形成（異形成）	3.5 時間前
	c 左下	1.1	主細胞過形成	
	d 左上	0.2	主細胞過形成	
6	a 右上	1.8	主細胞過形成	22 時間前
	c 左下	0.7	主細胞過形成	
	d 左上	3.5	主細胞および好酸細胞過形成	
7	a 右上	0.4	主細胞過形成	48 時間前
	b 右下	0.6	多結節性主細胞過形成	
	c 左下	0.7	主細胞過形成	
	d 左上	0.4	主細胞過形成	

図 1 Nucleotide sequence of human preproPTH cDNA (Hendy et al. 1981) Primers used for RT-PCR reaction were shown as shadowed sequences.

図 2 Purified RT-PCR product

6の副甲状腺 (6d) より抽出した RNA を鋳型として、逆転写-PCR 反応により cDNA を増幅し用いた。使用したプライマーはヒト preproPTH cDNA 配列¹⁵⁾のコードン 1 から 80 をはさむように、21 および 22 塩基を DNA 合成機にて作成した (図 1)。PCR 反応後精製した DNA のサイズは理論値の 238 塩基対と一致することが確認された (図 2)。c-myc プロブはヒトのゲノムのクローン (Oncor 社) より制限酵素 Pst I で処理して得た exon II の 400 塩基対を用いた。ODC プロブはラットの cDNA クローン pmODC-1¹⁶⁾より Sal I /Pvu II 処理によって得た DNA 断

図 3 Expression of preproPTH and c-myc mRNA in parathyroid RNAs from parathyroids (1a to 3d), liver (L), colon (C), and colon cancer (T) were examined by Northern blot analysis. Upper column: preproPTH, middle column: c-myc, lower column: ethidium bromide staining of the gel.

片, 1.7 塩基対を用いた。

結果

摘出した副甲状腺より抽出された RNA を用い、ノーザンブロット法により、各 mRNA の発現を検討した。preproPTH mRNA の発現は、0.9 kb の一本のバンドとして検出され (図 3)、これまでの報告と一致した¹⁵⁾。一方陰性対照である肝、大腸、大腸癌組織には発現が検出されなかった。発現量は 2a, 2c のように多いものと 1a, 3a のように少ないものと、約 2 倍程度のばらつきが認められた。また同一症例の副甲状腺にも発現量の違いが認められた。しかし発現量の多寡と重量や組

図4 Effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on preproPTH and c-myc mRNA expression. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($4\mu\text{g}$) was administered orally 3.5 (case 4, 5), 22 (case 6) or 48 (case 7) hours before parathyroidectomy. Upper column: preproPTH, middle column: c-myc, lower column: ethidium bromide staining of the gel.

組織の間に相関は認められなかった。

c-myc mRNA はこれまで大腸癌組織で発現増大があることが知られている¹⁷⁾。今回の検討で副甲状腺組織における c-myc mRNA の発現量は、対照の肝組織より若干多く、大腸非癌部組織より少なく、ほぼ一定であることが明らかとなった(図3)。ただし症例3のaとdの2個の副甲状腺において、例外的に発現が増大していることが認められた。これらの副甲状腺の重量は2.8gと1.9gであり、大きな副甲状腺であったが、1aの3.4gとより大きな副甲状腺において c-myc の発現増大は認められなかった。したがって、必ずしも c-myc の発現量と副甲状腺の大きさに、相関が認められるとは考えられなかった。また組織型も一方は主細胞過形成(びまん型増殖)であり、一方は、多結節性主細胞過形成であり、c-myc の発現増大と組織型の間にも関連は認められなかった。

次に、 D_3 投与症例における preproPTH mRNA の発現を検討した(図4)。その結果、対照の非投与例と比較して、 D_3 投与後3.5~48時間いずれの時点においても、発現量にほとんど差がなく、 D_3 投与により発現が抑制されるような傾向は認められなかった。同じく c-myc の発現量も D_3 投与例と非投与例の間に差を認めなかった。

図5 Expression of ornithine-decarboxylase mRNA and effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was administered orally 3.5 (case 4) or 22 (case 6) hours before parathyroidectomy.

c-myc と同様増殖関連遺伝子である ODC mRNA の発現は、すべての副甲状腺においてほとんど一定であった(図5)。c-myc mRNA の発現増大を認めた 3a, 3d においても ODC mRNA の発現増大は認められなかった。ODC mRNA の発現量も preproPTH, c-myc 同様、 D_3 投与、非投与症例の間に差はなく、ODC mRNA の発現も、 D_3 投与によって、抑制されないものと考えられた。

考察

今回の検討により、二次性副甲状腺機能亢進症における副甲状腺において、その大きさや組織型の多様性に拘わらず preproPTH, ODC いずれの mRNA の発現量もほぼ一定であることが示された。preproPTH mRNA の発現量については、これまでに *in situ* ハイブリダイゼーション法による検討があるが、同様の結果が得られている¹⁸⁾。c-myc の発現は、4個の副甲状腺のうち2個で増大している例が認められた。しかしこの発現増大も組織型や重量に関連したものではなく、これまでのところその原因は不明である。二次性副甲状腺機能亢進症における多様な増殖様式に関連した遺伝子発現を明らかにするためには、今回検討されなかった他の遺伝子の発現変化につき、調べる必要があると思われた。

術前の D_3 投与の影響は preproPTH, c-myc, ODC いずれの遺伝子発現にも認められなかった。これまでの報告では、培養系における

preproPTH^{1,2)}ならびに c-myc¹¹⁾ の抑制と、ラット腹腔内投与後の preproPTH の抑制が認められる³⁾。いずれの系においてもその投与量をヒト投与量に体重 50 kg として換算すると 10 μ g 以上となる。通常のパルス療法に用いる 4 μ g の投与量では、遺伝子発現は抑制されないのかもしれない。しかし実験系と異なり、PTX 適応となるような副甲状腺機能亢進症例においては、高 Ca、高 P 血症を合併している場合が多く、これ以上の大量の D₃ 投与による検討はできなかった。

さらにほとんどの実験系は、正常副甲状腺または副甲状腺細胞を用いた検討であり、今回のようなヒト生体内における過形成した副甲状腺を対象としたものではない。二次性副甲状腺機能亢進症においては、副甲状腺の D₃ 結合能が低下していること¹²⁾、さらに 7/8 腎摘後 4 週間の腎不全ラットでは、D₃ の preproPTH mRNA の抑制効果に対し、抵抗性が生じることが示されている¹³⁾。したがって今回の検討で、遺伝子発現に D₃ 投与の影響が見られなかった原因は、投与量の不足とともに、副甲状腺自体の反応性の低下も十分考えられる。今回検討した症例は、パルス療法の適応からはずれた高度の機能亢進症であり、PTX 適応とならないような軽度の症例においては D₃ 投与の遺伝子発現に対する影響が検出できる可能性も考えられる。

今回の検討はこれまでの実験系と同じく、主として D₃ 一回投与の効果を見たものである。例外的に症例 5 は手術直前までパルス療法が継続されており、遺伝子発現にはパルス療法の影響も加わっていたと思われる。ところがこの症例でも遺伝子発現量は他症例と全く差がなかった。したがって今回一回投与で認められなかった遺伝子発現に対する影響が、パルス療法のような D₃ の反復投与により、検出できる可能性は少ないと思われる。

症例 5, 7 は、本研究における投与量と同量の一回 4 μ g のパルス療法により血清 PTH レベルの減少を認めている。したがって今回の検討で、D₃ 投与により preproPTH mRNA の減少が認められなかったからといって、パルス療法が無効

であったというわけではない。これまで D₃ の作用点は主として preproPTH mRNA の発現抑制と考えられていたが、PTH 蛋白への翻訳過程における抑制も十分考えられる。あるいは D₃ 投与により、c-myc、ODC 以外の増殖関連遺伝子の抑制があり、副甲状腺の増殖抑制が起こった結果、血清 PTH レベルが低下したのかもしれない。今後これらの点につきさらに検討することが望まれた。

文献

- 1) Silver J, Russel J, Sherwood LM : Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4270-4273, 1985
- 2) Russell J, Lettieri D, Sherwood LM : Suppression by 1,25(OH)₂D₃ of transcription of the pre-parathyroid hormone gene. *Endocrinology* 119 : 2864-2866, 1986
- 3) Silver J, Naveh-Manly T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM : Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest* 78 : 1296-1301, 1986
- 4) Okazaki T, Igarashi T, Kronenberg HM : 5'-Flanking region of the parathyroid hormone gene mediates negative regulation by 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *J Biol Chem* 263 : 2203-2208, 1988
- 5) Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ : Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxycholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest* 74 : 2136-2143, 1984
- 6) Tsukamoto Y, Nomura M, Marumo F : Pharmacological parathyroidectomy by oral 1,25(OH)₂D₃ pulse therapy. *Nephron* 51 : 130-131, 1989
- 7) Fukagawa M, Okazaki R, Takano K, Kaname S, Ogata E, Kitaoka M, Harada S, Sekine N, Matsumoto T, Kurokawa K : Regression of parathyroid hyperplasia by

- calcitol-pulse therapy in patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 323 : 421-422, 1990
- 8) Reitsma PH, Rothberg PG, Astrin SM, Trial J, Bar-Shavit Z, Hall A, Teitelbaum SL, Kahn AJ : Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature* 306 : 492-494, 1983
- 9) Bar-Shavit Z, Kahn AJ, Stone KR, Trial J, Hilliard T, Reitsma PH, Teitelbaum SL : Reversibility of vitamin D-induced human leukemia cell-line maturation. *Endocrinology* 118 : 679-686, 1986
- 10) Matsui T, Takahashi R, Nakao Y, Koizumi T, Katakami Y, Mihara K, Sugiyama T, Fujita T : 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-regulated expression of genes involved in human T-lymphocyte proliferation and differentiation. *Cancer Res* 46 : 5827-5831, 1986
- 11) Kremer R, Bolivar I, Goltzman D, Hendy GN : Influence of calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 125 : 935-941, 1989
- 12) Korkor AB : Reduced binding of [³H] 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N Engl J Med* 25 : 1573-1577, 1987
- 13) Yoshida M, Hayashi H, Taira M, Isono K : Elevated expression of the ornithine decarboxylase gene in human esophageal cancer. *Cancer Res* 52 : 6671-6675, 1992
- 14) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 : 5294-5299, 1979
- 15) Hendy GN, Kronenberg HM, Potts Jr JT, Rich A : Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7365-7369, 1981
- 16) Kahana C, Nathans D : Isolation of cloned cDNA encoding mammalian ornithine decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 3645-3649, 1984
- 17) Imaseki H, Hayashi H, Taira M, Ito Y, Tabata Y, Onoda S, Isono K, Tatibana M : Expression of c-myc oncogene in colorectal polyps as a biological marker for monitoring malignant potential. *Cancer* 64 : 704-709, 1989
- 18) 田中勇治, 妹尾久雄, 富永芳博, 舟橋啓臣, 佐藤圭介, 沼野正浩, 松井信夫, 高木 弘 : 腎性上皮小体機能亢進症患者における結節性過形成とびまん性過形成の PTHmRNA の発現. *腎と骨代謝* 5 : 373-378, 1992
- 19) Fukagawa M, Kaname S, Igarashi T, Ogata E, Kurokawa K : Regulation of parathyroid hormone synthesis in chronic renal failure in rats. *Kidney Int* 39 : 874-881, 1991