

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591910

研究課題名(和文) 原発性上皮小体機能亢進症腺腫における cAMP / PKA シグナリングの解析

研究課題名(英文) Analysis of cAMP/PKA signaling pathway in adenoma of primary hyperparathyroidism

研究代表者

日比 八束 (Hibi, Ystuka)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：10399024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：原発性上皮小体機能亢進症の腺腫において、PRKAR1 タンパクの過剰発現があるかをウェスタンブロット法にて、同一症例から摘出した腺腫および正常腺でその発現を比較検討した。その結果、分析した腺腫8腺のうち5腺で正常腺に比べその過剰発現が確認された。さらに腺腫22腺と正常腺11腺を抗PRKAR1 抗体による免疫染色法を用いてAllred score法により解析したところ、腺腫におけるscoreは正常腺でのscoreに比べ有意に高値であり、同様に腺腫病変での過剰発現が証明された。さらにPKA活性は同タンパクの過剰発現から低下していることを示し、このことが腺腫発生の起因となりえることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：protein kinase A (PKA) regulatory subunit type 1a (R1a) is a major regulatory subunit that functions as an inhibitor of PKA kinase activity. Surgical specimens comprising 22 adenomas and 11 normal glands, obtained from 22 patients with primary hyperparathyroidism (PHPT), were analyzed. Western blot analysis revealed that 5 out of 8 adenomas high expressed of R1a, compared with normal glands. PKA activity in adenoma was significantly less in normal glands. Immunohistochemical analysis further demonstrated high expression of R1a in 20 out of 22 adenomas. The study suggested that R1a expression could contribute to monoclonal proliferation of parathyroid cells by impairing the cAMP/PKA signaling pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：原発性副甲状腺機能亢進症 PRKAR1 PKA

1. 研究開始当初の背景

以前我々は続発性(腎性)上皮小体機能亢進症において、結節性過形成腺とびまん性過形成腺に対し representational difference analysis 法を施行し、その結果 cAMP-dependent protein kinase (PKA) の regulatory subunit の1つである PRKAR1 遺伝子が結節性過形成腺で過剰発現していること、さらに結節性過形成腺ではこの PRKAR1 蛋白の過剰発現により PKA 活性が低下していることを報告した(Hibi Y, et.al. 2006 Up-regulation of the gene encoding protein kinase A type I alpha regulatory subunit in nodular hyperplasia of parathyroid glands in patients with chronic renal failure. J Clin Endocrinol Metab 91:563-568)。そこで腎性上皮小体機能亢進症の結節性過形成腺と同様モノクローナルに増殖するとされる原発性上皮小体機能亢進症腺腫においても Arnold A, et.al. 1988 Monoclonality and abnormal parathyroid hormone genes in parathyroid adenomas. N Engl J Med 318:658-662) PRKAR1 タンパクが過剰発現しているかを検討し腺腫が腫瘍化するメカニズムと cAMP/PKA シグナリングの関与につき解析することを計画した。

2. 研究の目的

原発性上皮小体機能亢進症は近年血中カルシウム値を測定する機会が増えたことにより、以前に比べその罹患が判明する患者数は増加の傾向にある。そのうち多発性内分泌腫瘍症など家族性に発生するものではその原因遺伝子の異常が判明しているが散発性の腺腫ではその発生要因は殆ど判明されていない。最近高齢者において病的骨折はその生活の質を著しく低下させ、さらには原発性上皮小体機能亢進症の合併はその増悪に大きく関与する。一方で散発性の原発性上皮小体の治療は現在のところ根治を目指すには外科的にその腫大腺を切除するしかなく、今後、とくに高齢者においては薬物などによる低侵襲性治療の確立が望まれる。そのためには散発性上皮小体機能亢進症の腺腫が発症するメカニズムを解明することが重要と考えた。

3. 研究の方法

原発性上皮小体腺腫の発生機序と cAMP/PKA シグナリングとの関連を解析するために、原発性上皮小体腺腫症例に対し、臨床的には生化学データや病理組織診断の見直しを実施し、さらに分子生物学的手法を用いて PRKAR1 α タンパクの発現状況や PKA 活性測定を施行した。具体的には原発性上皮小体腺腫および生検として摘出した正常腺より抽出したタンパクを用いてウェスタンブロッ

ト法を用いて PRKAR1 タンパクの発現状況を解析した。同様に PKA 活性測定アッセイを用いてそれぞれの PKA activity ratio を評価した。さらに原発性上皮小体腺腫患者の検体組織を用い、免疫染色による PRKAR1 タンパクの発現解析も行った。また細胞分裂状況を反映する PCNA 蛋白に対する抗体をもちいて免疫染色を行い、PRKAR1 抗体により染色された細胞との一致性につき検討した。

4. 研究成果

原発性上皮小体機能亢進症の腺腫において、PRKAR1 タンパクの過剰発現があるかをウェスタンブロット法にて、同一症例から抽出した腺腫および正常腺でその発現を比較検討した。

その結果、分析した腺腫 8 腺のうち 5 腺で正常腺に比べ、その過剰発現が確認された。さらに腺腫 22 腺と正常腺 11 腺を抗 PRKAR1 抗体による免疫染色法を用いて Allred score 法により解析したところ、腺腫における score は正常腺での score に比べ有意に高値であり、同様に腺腫病変での過剰発現が証明された。

腺腫 6 腺と正常腺 6 腺から抽出したタンパク質に対し cAMP を付加した PKA 活性 (total PKA activity) と cAMP を付加しない場合の PKA 活性 (free activity) を測定し Free/total PKA activity ratio を評価したところ、腺腫の Free/total PKA activity ratio は正常腺のそれより有意に低下していた (0.24 ± 0.18 vs. 0.63 ± 0.18)。

これにより PKA 活性は定常状態で同タンパクの過剰発現から低下していることを示し、このことは腺腫発生の起因となりえることを示唆した。

腺腫 22 腺において、症例の腺重量あたりの術前 intact PTH 値は、Allred score に対し正の相関を示した ($y=0.120x-0.446$, $R^2=0.82$, $p=0.013$)。

このことは細胞あたりの intact PTH の分泌量は PRKAR1 タンパクの発現量と相関関係にあることが示唆された。

腺腫の腫瘍細胞を主細胞と好酸性細胞のサブタイプに分けて、PRKAR1 タンパクの Allred score と PCNA の Labeling Index で評価するといずれの細胞も正常腺の主細胞に比べ有意に高値を示した。

この結果から主細胞と同様、好酸性細胞も腺腫の腫瘍化に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Hibi Y, Hayakawa N, Hasegawa M, Ogawa K, Shimizu Y, Shibata M, Kagawa C, Mizuno Y, Yuzawa Y, Itoh M, Iwase K. Unmasked renal impairment and prolonged hyperkalemia after unilateral adrenalectomy for primary aldosteronism coexisting with primary hyperparathyroidism: report of a case. Surg Today. (in press) 査読有

Hibi Y, Hayakawa N, Hasegawa M, Ogawa K, Shimizu Y, Shibata M, Kagawa C, Mizuno Y, Yuzawa Y, Itoh M, Iwase K. Unmasked renal impairment and prolonged hyperkalemia after unilateral adrenalectomy for primary aldosteronism coexisting with primary hyperparathyroidism: report of a case. Surg Today. (in press) 査読有

日比八束、当施設における甲状腺全摘術での副甲状腺温存と術後の副甲状腺機能について、日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌、査読無、31巻、2014、pp.14-18

Hibi Y, Ohye T, Ogawa K, Shimizu Y, Shibata M, Kagawa C, Mizuno Y, Kurahashi H, Iwase K. A MEN2A family with two asymptomatic carriers affected by unilateral renal agenesis. Endocr J. 2014;61(1):19-23. 査読有

Hibi Y, Kambe F, Imai T, Ogawa K, Shimizu Y, Shibata M, Kagawa C, Mizuno Y, Ito A, Iwase K. Increased protein kinase A type I regulatory subunit expression in parathyroid gland adenomas of patients with primary hyperparathyroidism. DOI: <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0267>

Endocr J. 2013;60(2):215-23. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

KIDNEY FUNCTION OF PATIENTS WITH PRIMARY ALDOSTERONISM AFTER ADRENALECTOMY (2014年、14th AAES CONGRESS) Sri Lanka
甲状腺・内分泌外科の課題と展望 当施設における原発性副甲状腺機能亢進症手術の検討 (2013年、第75回日本臨床外科学会総会)名古屋
当施設における甲状腺全摘術での副甲状腺温存と術後の副甲状腺機能について (2013年、第46回日本甲状腺外科学会総会)名古屋
発性アルドステロン症に副甲状腺機能亢進症を合併した1例 (2013年、第25回

日本内分泌外科学会総会)山形

副甲状腺機能亢進症における基礎・病理 (2012年、第45回日本甲状腺外科学会総会)横浜

TOTAL PARATHYROIDECTOMY WITH AUTOTRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH ENDO-STAGE RENAL DISEASE IN TOTAL THYROIDECTOMY (2012年、13th AAES CONGRESS) Singapore

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
日比 八束 (HIBI YATSUKA)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号: 10399024

(2)研究分担者
水野 豊 (MIZUNO YUTAKA)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号: 90595977 (2012年度削除)

(3)研究分担者
今井 常夫 (IMAI TSUNEO)
名古屋大学医学部附属病院・講師
研究者番号: 80252245 (2013年度削除)

(4)菊森 豊根 (KIKUMORI TOYONE)
名古屋大学医学部附属病院・講師
研究者番号: 90402635 (2013年度より
研究分担者)

(5)岩瀬 克己 (IWASE KATSUMI)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：70148261 (2013 年度削除)