

Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横村, 光司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1262

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 409号	学位授与年月日	平成16年 2月20日
氏名	横村光司		
論文題目	<p>Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D₃-1α-hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer (肺癌患者の肺胞マクロファージにおける 25-hydroxyvitamin D₃-1α-hydroxylase 遺伝子発現の亢進)</p>		

論文題目

Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer

(肺癌患者の肺胞マクロファージにおける 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase 遺伝子発現の亢進)

論文の内容の要旨

[はじめに]

25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase (1 α -hydroxylase)は、健常状態においては主に腎の近位尿細管において、活性型の 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25-(OH)₂D₃]を産生し、カルシウム代謝において主要な役割を果たしている。一方、サルコイドーシス等の肉芽腫性疾患においても、腎外性にこの酵素が過剰発現し、高カルシウム血症や高カルシウム尿症の原因となることが知られている。我々は以前 RT-PCR 法を用いて肺胞マクロファージ (pulmonary alveolar macrophage; PAM) における同酵素の遺伝子発現を初めて確認し、サルコイドーシスにおいては健常者よりその発現が亢進しており、さらにその発現量が疾患活動性、血清イオン化カルシウム、1,25-(OH)₂D₃/25-hydroxyvitamin D₃[25-(OH)D₃]比と相関することを明らかにした【Am J Med 2001】。その検討において肺癌患者の PAM においても 1 α -hydroxylase の発現が亢進している可能性を発見した。これまで、サルコイドーシス以外の疾患における同酵素の遺伝子発現の亢進を示した報告はほとんどない。今回、肺癌患者における 1 α -hydroxylase 遺伝子発現を詳細に検討した。

[対象ならびに方法]

肺癌患者 22 名 (男性 14 名・女性 8 名、組織型：腺癌 12 名、小細胞癌 5 名、扁平上皮癌 5 名、病期：IA 期 5 名,IB 期 1 名,IIA 期 1 名,IIIA 期 2 名,IIIB 期 10 名,IV 期 3 名、年齢：44～83 歳) とコントロール 18 名 (男性 16 名、女性 2 名、疾患：肺線維症 5 名、肺気腫 4 名、器質化肺炎 4 名、健常者 5 名、年齢：30～77 歳)。

PAM：気管支肺胞洗浄；bronchoalveolar lavage (BAL)により回収した。BAL では、経口的に気管支鏡を区域気管支に楔入し、生理食塩水を 50ml ずつ 3 回、計 150ml を気管支鏡の鉗子口から緩徐に注入し回収することを繰り返した。回収液より遠心分離法により細胞を分離し、測定に用いた。

RNA 抽出及び RT-PCR：acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)法により BAL で回収された PAM から総 RNA を抽出、逆転写後に 1 α -hydroxylase 及びコントロールとして human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を PCR 法で測定し、各々の比を取ることで半定量的な PCR とした。

血液検査：気管支鏡検査の際に採血を行い、カルシウム(Ca)、血清イオン化カルシウム (Ca⁺⁺)、parathyroid hormone (PTH)、parathyroid hormone related protein (PTH-rP)、1,25-(OH)₂D₃、25-(OH)D₃等の血清濃度の測定を行った。

[結果]

肺癌患者の肺胞マクロファージにおける 1 α -hydroxylase mRNA の発現量は、コントロー

ルに比しおよそ2倍 (0.61 ± 0.20 vs. 0.34 ± 0.11 ; $p < 0.0001$) 亢進していた。肺癌患者を臨床病期によって、コントロール群、early 群 (IA 期~IIIA 期)、advanced 群 (IIIB~IV 期) に分類し 1α -hydroxylase mRNA の発現量を比較したところ、臨床病期の進行している患者でより発現が亢進していることが確認された (0.34 ± 0.11 , 0.52 ± 0.11 , 0.69 ± 0.23)。また、肺癌患者における 1α -hydroxylase mRNA の発現量は、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度 ($p=0.03$)、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比 ($p=0.0008$) と相関していた。肺癌患者とコントロール群において、血清 Ca、 Ca^{++} 、PTH、PTH-rP、 $25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ には差を認めなかったが、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比は肺癌患者において高値であった (1.95 ± 0.72 vs. 2.64 ± 1.06 ; $p=0.02$)。特に advanced 群の血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比 (3.09 ± 0.99) はコントロール群 (1.95 ± 0.72)、early 群 (2.10 ± 0.94) のいずれより高値であった。

[考察]

肺癌患者の PAM において 1α -hydroxylase mRNA の発現が亢進していることが明らかになった。また肺癌患者の PAM における 1α -hydroxylase mRNA の発現量は、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度、 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比とよく相関しており、PAM に発現していた 1α -hydroxylase は活性型ビタミン D の産生する作用を有し、肺局所におけるビタミン D 産生に関与していることが推察された。ビタミン D はこれまでに、*in vitro* で T 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞等の機能を抑制する事、また実験動物レベルでは、Th1 細胞よりの TNF- α 及び IFN- γ の産生を抑制することで結節性硬化症のモデルである experimental autoimmune encephalomyelitis の発症を抑えること、さらに移植モデルにおいて移植片の生着率を上昇させること等が示されており、活性型ビタミン D が免疫抑制機能を有することが明らかにされている。肺癌患者では免疫機構の破綻が起こり、病初期における腫瘍特異的な免疫反応や、進行期においては全身的な免疫抑制が認められることが報告されていることから、PAM による肺局所での活性型ビタミン D の産生亢進が肺癌患者に認められる免疫抑制の一因となっている可能性が考えられる。

[結論]

肺癌患者の肺泡マクロファージにおいて $25\text{-hydroxyvitamin D}_3$ - 1α -hydroxylase の遺伝子発現が亢進していることを発見した。このことは、肺局所における活性型ビタミン D の産生を高め、それが肺癌患者の免疫機能を抑制している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

腎の近位尿細管において $25\text{-hydroxyvitamin D}_3$ - 1α -hydroxylase (1α -hydroxylase) は、活性型の $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ [$1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$] を産生し、カルシウム代謝において主要な役割を果たしている。サルコイドーシス等の肉芽腫性疾患において、高カルシウム血症や高カルシウム尿症が認められることがあり、この酵素の過剰発現が関連していると考えられている。申請者らは以前 RT-PCR 法を用いて肺泡マクロファージ (pulmonary alveolar macrophage; PAM) における同酵素の遺伝子発現を初めて確認し、サルコイドーシスにおいては健常者よりその発現が亢進していることを明らかにした。本研究はこれまで報告のない肺癌患者の PAM における 1α -hydroxylase 遺伝子発現およびその臨床的意義を解明することを目的としている。

対象は肺癌患者 22 名（男性 14 名・女性 8 名）であり、組織型（腺癌 12 名、小細胞癌 5 名、扁平上皮癌 5 名）および病期（IA 期 5 名,IB 期 1 名,IIA 期 1 名,IIIA 期 2 名,IIIB 期 10 名, IV 期 3 名）は種々である。経口的に気管支鏡を区域気管支に楔入し、気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) により得られた細胞を遠心分離し PAM を回収した。Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法により総 RNA を抽出、逆転写後に 1α -hydroxylase 及びコントロールとして human glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を PCR 法で測定し、各々の比を算出した。この結果をカルシウム (Ca) およびイオン化カルシウム (Ca^{++})、parathyroid hormone (PTH)、parathyroid hormone related protein (PTH-rP)、 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 等の血中のカルシウム代謝の指標と比較した。

肺癌患者の PAM における 1α -hydroxylase mRNA の発現量 (0.61 ± 0.20) は、コントロール (0.34 ± 0.11) に比し有意に亢進していた ($p < 0.0001$)。組織学的には各病型で有意差はなかったが、臨床病期が進行するにつれて early 群 (IA 期~IIIA 期; 0.52 ± 0.11)、advanced 群 (IIIB~IV 期; 0.69 ± 0.23) と発現が有意に亢進していた。

血清 Ca、 Ca^{++} 、PTH、PTH-rP、 $25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ は肺癌患者とコントロール間に有意差を認めなかったが、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比は肺癌患者の中でも advanced 群でコントロール群および early 群に比し有意に高値であった。肺癌患者における 1α -hydroxylase mRNA の発現量は、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度 ($p=0.03$)、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比 ($p=0.0008$) と有意に相関していた。

これらの結果から申請者は、肺癌患者の PAM において 1α -hydroxylase mRNA の発現が亢進していると結論した。肺癌患者の PAM における 1α -hydroxylase mRNA の発現量は、血清 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度、 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3/25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ 比と相関しており、PAM に発現していた 1α -hydroxylase は活性型ビタミン D を産生する作用を有し、肺局所におけるビタミン D 産生に関与していることを推察している。活性型ビタミン D が免疫抑制機能を有することが明らかにされていることから、肺癌患者における免疫機構の破綻の一因となっている可能性を考察している。

本研究は以下の点でこれまでにない新たな知見を含んでいる。それらは、PAM において 1α -hydroxylase mRNA の発現を確認する方法の明確化、肺癌患者の中で特に進行例の PAM における 1α -hydroxylase mRNA 発現の亢進、 1α -hydroxylase mRNA と活性型ビタミン D や血中カルシウム代謝の指標との比較などであり、活性型ビタミン D の肺癌細胞に対する作用についての考察も注目される。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) PAM および生検による検討の差異
- 2) PCR primer の設定
- 3) BAL により得られた細胞の活性
- 4) 癌細胞およびその周辺組織の組織学的検討
- 5) 肺癌患者に対する BAL の適応と診断的意義
- 6) 肺の各葉における病変の特質
- 7) 肺癌以外の疾患における 1α -hydroxylase mRNA の発現
- 8) PTH および PTHrP と活性型ビタミン D との関連
- 9) 活性型ビタミン D の腫瘍細胞に対する作用
- 10) 腫瘍患者のサイトカインと 1α -hydroxylase mRNA

1 1) 肺癌の各病期における内分泌因子

これらに対し、申請者の回答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大 関 武 彦
副査 北 川 雅 敏 副査 鈴 木 一 也