

症 例

PTHrP 産生による高カルシウム血症を遺伝子レベルで
確認した大細胞肺癌の 1 剖検例

片上 信之

要旨：症例は 41 歳の女性，臨床病期 IV 期 (T4N0M1) で発症した．当初は高カルシウム (高 Ca) 血症を呈さず，3 年後の腫瘍量が著明に増加した T4N3M1 状態で症状を有する高 Ca 血症が初発した．高 Ca 血症の成因を精査した結果，血中 PTHrP-N 端活性 (1/34) は上昇し PTH intact と 1,25 (OH)₂D₃ が抑制されていたため腫瘍による PTHrP 産生と考えた．この確認のため剖検を施行すると肺原発巣と縦隔リンパ節の組織内 PTHrP-N 端活性はそれぞれ 1.2 ng/g wet weight, 165.6 ng/g wet weight であるが，正常肺組織では検出されなかった．抗 PTHrP 抗体を用いた免疫組織染色では腫瘍細胞内に PTHrP が濃染された．肺原発巣の抽出液を用いた Northern blot 法で PTHrP の messenger RNA が検出された．以上より高 Ca が癌組織による PTHrP 産生によることを証明した．肺大細胞癌で遺伝子レベルでの高 Ca 血症の原因分析は現在まで例がないため報告した．

キーワード：肺大細胞癌，高カルシウム血症，PTHrP，ノーザンプロット法，免疫組織化学

Large cell lung cancer, Hypercalcemia, PTHrP, Northern blot, Immunohistochemistry

緒 言

悪性腫瘍に合併した高カルシウム血症 (高 Ca 血症) は肺癌患者でしばしば遭遇し，その原因は癌細胞による骨への局所浸潤，破壊ないし液性因子と考えられている¹⁾．後者の液性因子に関しては現在まで様々な研究がなされてきた．最近，PTH related peptide の精製分離とクローニングがなされ，悪性腫瘍による高 Ca 血症の原因物質として脚光を浴びるようになった^{2,3)}．この度，高 Ca 血症を呈した大細胞肺癌症例において血中および組織中の PTHrP をラジオイムノアッセイ法によって測定し，腫瘍組織の免疫染色および組織抽出液中の PTHrP の messenger RNA の存在を Northern blot 法によって証明したので報告する．

症 例

症例：38 歳，女性，服飾デザイナー．

主訴：腰痛，両下肢の麻痺．

既往歴：22 歳時に虫垂炎，28 歳時に急性肝炎で通院治療．

家族歴：父親が急性アルコール中毒で死亡．

喫煙歴：シガレット 15 本/日 × 20 年間．

飲酒歴：ビール中瓶 1 本/日．

現病歴：1987 年 10 月 23 日から 88 年 1 月 19 日まで左胸水型肺腺癌 (T4N0M1, stage IV) にて本院に入院し胸腔ドレナージとアドリアマイシン (20 mg × 3)，シスプラチン (20 mg × 3)，OK 432 (5 KE) の胸腔内注入および全身化学療法 (シスプラチン 90 mg/m²，マイトマイシン 8 mg/m²，ビンデシン 3 mg/m² × 2) を 2 コース受け，また腹壁の転移巣にはリニアックを照射し完全寛解した．1989 年 8 月に右腋窩リンパ節転移を来したため外科的に摘除した．1990 年 5 月には右胸壁への胸痛を伴う腫瘍浸潤を認めたため放射線を 45 Gy 局所照射した．しかしながら効果はみられなかったため転院し，温熱療法を 4 回うけ症状は改善した．その後，8 月には腰痛と腹痛，両下肢麻痺が出現し，また便秘傾向も出現したため本院に 8 月 20 日に再入院した．

入院時現症：意識清明．身長 166 cm，体重 45 Kg．血圧 139/74 mmHg，体温 36.3℃．脈拍 53/分，整，呼吸数 18/分．皮膚はやや乾燥．肺音，心音は異常なし．左鎖骨上窩リンパ節腫大あり．肝脾腫なし．両下肢の完全麻痺と筋萎縮あり．病的反射無し．

入院時検査所見：血液化学検査 (Table 1) では血中 Ca は 13.9 mg/dl (血中アルブミン値で補正) と上昇していた．その他の検査値は LDH が 1171 I.U./l (正常値 200 ~ 450 I.U./l)，PTHrP-N 端 (1/34) 活性 30 pg/ml (正常値は < 20 pg/ml)，PTHrP-C 端活性 169 pmol/l と上昇していたが，ALP 156 I.U./l，BUN 7 mg/dl，creatinine 0.9 mg/dl と正常であった．1,25 (OH)₂D₃ は低

Table 1 Laboratory data on admission

Hematology		BUN	7 mg/dl
WBC	3,200 /mm ³	Creatinine	0.9 mg/dl
RBC	368 × 10 ⁴ /μl	CRP	0.2 mg/dl
Hb	11.9 g/dl	Na	140 mEq/l
Plat	22.7 × 10 ⁴ /μl	K	4.7 mEq/l
St.	7 %	Cl	102 mEq/l
Seg.	60 %	Ca	6.6 mEq/l
Eo.	3 %	P	1.7 mEq/l
Lym.	22 %	Tumor marker	
Mo.	7 %	CEA	6.8 ng/ml
Coagulation test		Hormonal study	
APTT	35.8 sec	PTHrP-N	30 pg/ml (normal < 20 pg/ml)
PT	11.2 sec	PTHrP-C	169 pmol/ml (20 - 80 pmol/ml)
fibrinogen	360 mg/dl	PTH intact	< 5 pg/ml (normal ; 23 - 73 pg/ml)
FDP	< 0.2 μg/ml	1,25(OH) ₂ D ₃	20 pg/ml (normal ; 20 - 76 pg/ml)
Blood chemistry			
TP	6.5 g/dl		
ALb	3.3 g/dl		
ChE	0.63 pH		
GOT	49 I.U./l		
GPT	15 I.U./l		
ALP	156 I.U./l		
T-bil	0.4 mg/dl		
LDH	1,171 I.U./l		

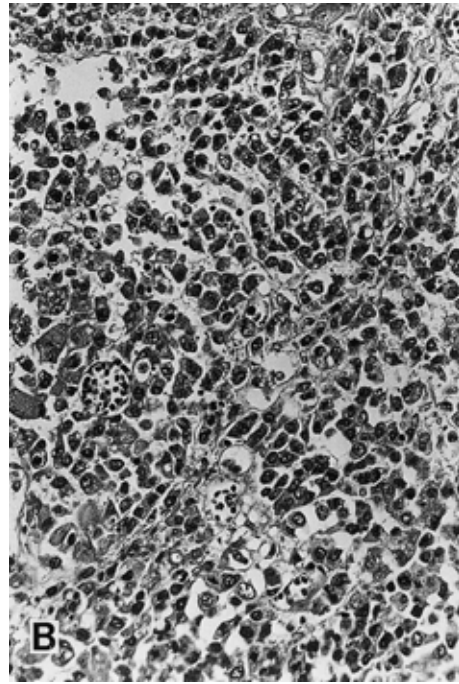
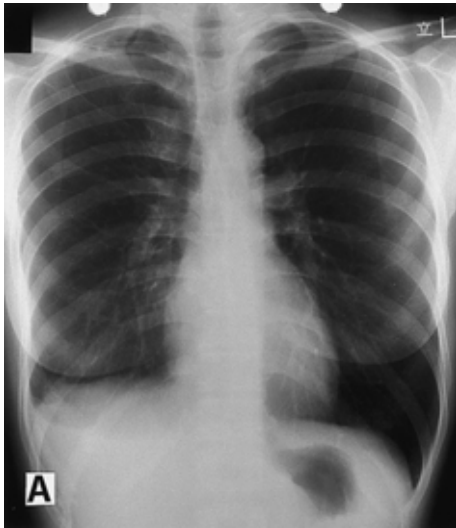


Fig. 1 A ,1 B Chest X-ray on final admission showing a slight amount of right pleural effusion(1 A).Autopsied right lung tumor(1 B)revealing uniformly solid architecture : neither gland formation nor keratinization is noted (hematoxylin-eosin).

値であった .

入院時胸部レントゲン写真 (Fig. 1) : では右側胸水貯留を少量認める以外に異常は認めなかった . 骨シンチ

グラフィーでは骨全体にび慢性の取込があるも明らかな骨転移は認めなかった . 胸部および腹部 CT スキャンでは右肺門 , 縦隔リンパ節腫大 , 腹部大動脈周囲リンパ節

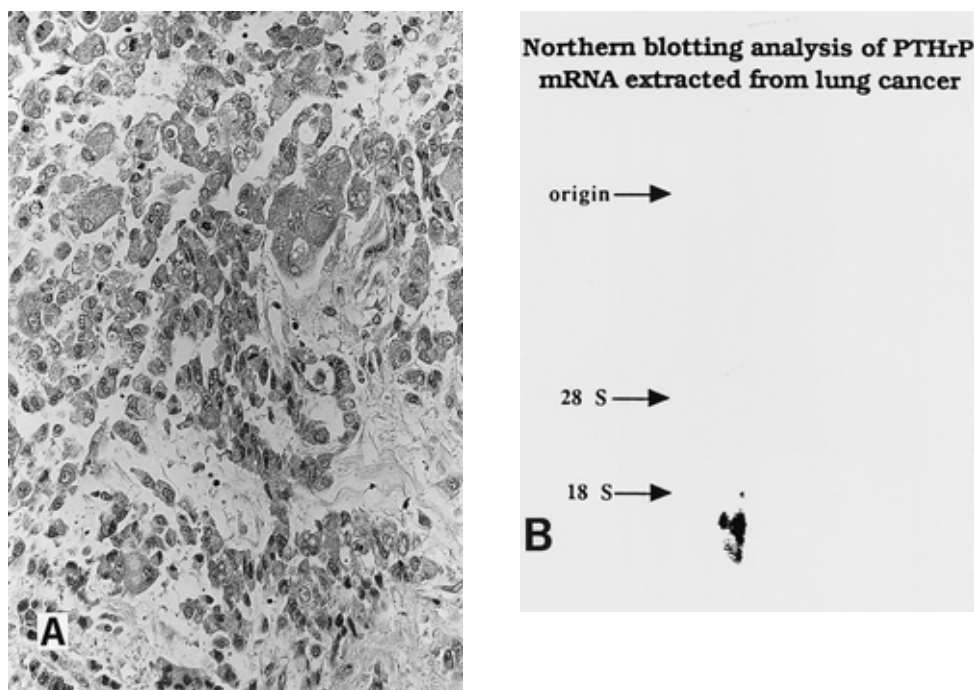


Fig. 2 A, 2 B Immunohistochemical staining (2 A) demonstrating that numerous cancer cells are positively stained with PTHrP (peroxidase-anti-peroxidase method). Northern blot analysis of PTHrP mRNA extracted from autopsied material showing a single major hybridization band, roughly corresponding in size to 18 S ribosomal RNA (2 B).

腫大，肝転移巣および両側の胸水貯留を少量認めた。

入院後経過：入院時に認められた高カルシウム血症は PTH-rP 高値，PTH intact や $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が抑制されていることから PTHrP に由来する humoral hypercalcemia of malignancy (HHM) と考えられた。Fig. 3 に示すように入院翌日から急速に意識障害と脱水症状が出現したため生理的食塩水 3,000 ml/日の補液とプレドニゾロン 60 mg/日，カルシトニン 160 U/日投与するも血中カルシウムは低下せず第 33 病日に突然腹痛を訴えた後にショック状態に陥り同日午前 11 時 35 分に死亡した。1 時間後に病理解剖を施行した。

病理解剖所見：右肺 S8 の領域に 1.5×1.0 cm の原発巣有り，この腫瘍は胸壁，横隔膜を連続的に越え肝臓に達していた。両側肺門，縦隔，左鎖骨上リンパ節転移を認めた。肝臓および後腹膜リンパ節の多発性転移と Th 12~L3 にかけての骨転移を認めた。直径 8 cm 大の S 状結腸破裂を 2 箇所にも認めた（直接死因）。肺原発巣の顕微鏡所見 (Fig. 2 A) は充実性に比較的均一な腫瘍細胞が増殖しており，腺腔形成や角化傾向は認めず免疫組織染色では CEA 染色 (-)，ケラチン染色 (-)，NSE 染色 (-)，S-100 蛋白染色 (-)，ビメンチン染色 (+) であることから大細胞癌と診断した。また抗ヒト PTHrP 抗体を用いた PAP 染色で腫瘍細胞内が陽性に染色された。原発巣および縦隔リンパ節中の PTHrP-N 端 (1-34)

の組織内濃度はそれぞれ 1.2 ng/g wet weight, 165.6 ng/g wet weight であり正常肺組織中には PTHrP-N 端活性は検出されなかった。さらに Northern blot 法を用いて腫瘍組織からの抽出液中に PTHrP の mRNA が存在するかを検討したところ Fig. 2 B に示すように 18 S messenger RNA に一致して hybridization signal を認めた。

考 察

肺癌患者に高 Ca 血症が発症する機序として (1) 肺癌の広範な骨転移によって骨破壊と骨融解が生じるいわゆる local osteolytic hypercalcemia (LOH) による場合，(2) 明らかな骨転移がなく腫瘍からある種の液性因子が分泌され，これが高 Ca 血症を惹起する humoral hypercalcemia of malignancy (HHM) の場合，(3) 偶然に原発性副甲状腺機能亢進症が合併した場合，(4) 異所性に PTH や $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が産生される場合が考えられる。これらの病態の鑑別には骨の CT スキャンや MRI，骨シンチグラフィを用いた画像診断と血中の PTH intact や PTHrP, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の測定が必要である。そして (1) の LOH による病態では画像診断上，広範な骨破壊像がみられ，血中の PTH や PTHrP, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は低値ないし正常である。この場合は LOH を惹起する tumor necrosis factor- α , β , interleukin 1 α ,

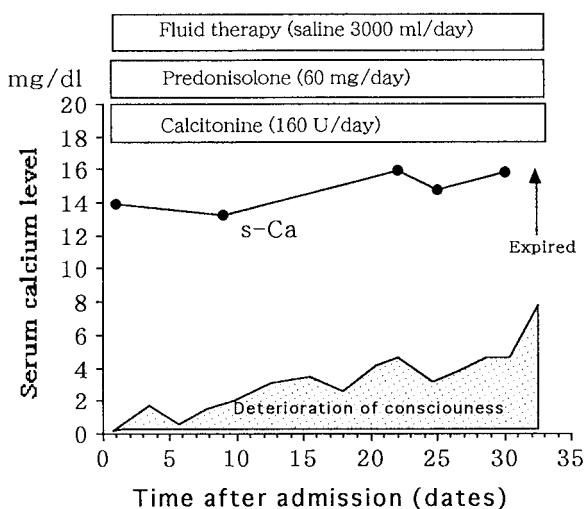


Fig. 3 Clinical course

1 β , 6などのサイトカインが腫瘍細胞によって局所で産生されている⁴⁾⁻⁶⁾。(2)の病態では画像診断上、腫瘍の転移による広範な骨破壊像はなくPTHrPは上昇するがPTHは正常以下に抑制され、1,25(OH)₂D₃は正常ないし抑制される。もっとも乳ガンの場合のように骨転移をとまなっていることもある⁷⁾。HHMの原因物質としては本症例に認められたように血中のPTHrPが増加することが殆どである⁸⁾。(3)の病態ではもちろん血中PTHは上昇し、多くの場合1,25(OH)₂D₃は上昇するが骨破壊を伴わない¹⁾。(4)の病態はきわめて稀で異所性PTH産生腫瘍は肺小細胞癌の1例が報告されているだけであり⁹⁾、1,25(OH)₂D₃産生腫瘍は肺癌では報告されていない。本症例では骨シンチグラフィーに異常はなく血中PTHrPは上昇し、PTH intactと1,25(OH)₂D₃は抑制されていたことから上記した²⁾のHHMによると考えられた。さらにこの病態を組織レベル、遺伝子レベルでも確認し、確かに腫瘍組織からのPTHrP分泌による高Ca血症であることを証明した。もっとも肺扁平上皮癌において同様のNorthern blot法を用い、遺伝子レベルで切除肺の腫瘍組織中のPTHrPのmessenger RNAを証明した報告が1991年に初めて報告¹⁰⁾されているが、免疫組織レベルでの検討はなされていない。

原発性肺癌における高Ca血症の頻度はBenderら¹¹⁾によると高Caを10.5 mg/dL以上と定義した場合は、200例中12.5%に認め、組織型では扁平上皮癌が23%、大細胞癌が12.7%、腺癌が2.5%、小細胞癌は0%であった。また高Ca血症を10.6 mg/dL以上と定義した山口ら¹²⁾の報告によると全肺癌中、その頻度は6%であった。もっともこの頻度は定義するCa値によって異なり、高Ca血症を臨床症状が出現する12 mg/dL以上と定めた我々の報告⁸⁾では肺癌654例中、4%に認め、組織型別

の頻度は扁平上皮癌が7%、大細胞癌が6.7%、小細胞癌が3.5%、腺癌が2.2%であった。以上の報告より、肺癌での高Ca血症は稀な病態ではなく、組織型別には扁平上皮癌と大細胞癌に頻度が高いと考えられる。

肺癌に高Ca血が合併することは本症例のように癌自体がかなり進行し、腫瘍量としても大きな場合が多い。12 mg/dL以上の高Ca血症を呈した自験例26例の検討⁸⁾では臨床病期IIIBが2例、IV期が24例でありI期~IIIA期のいわゆる手術適応のある症例はなかった。本症例では1987年の第1回目入院時の臨床病期はIV期(T4N0M1)で、リンパ節転移はなく遠隔転移も腹壁のみであったが1990年の入院時は同じIV期でもT4N3M1で、全身のリンパ節転移、多発性肝転移を認め腫瘍量そのものは第1回入院時に比べるとはるかに大きかった。また、高Ca血症出現後の予後はきわめて悪く自験例26例の検討でも種々の治療にもかかわらず高Ca血症出現後の中間生存期間はわずか19日であった。本症例の場合も高Ca血症発現後の生存期間は33日間であった。すなわち高Ca血症だけを是正してもその基礎にある肺癌自体に有効な治療法がなされない限り予後の改善は困難であることを示している。肺癌の末期においては化学療法が施行できるほど全身状態は良好ではなく、また再治療が殆どで化学療法に抵抗し放射線による局所治療で病勢の進行を止めることはできない。つまり進行癌における高Ca血症発現は重要な予後不良因子と考えられる。以上、高カルシウム血症を呈し血中および腫瘍組織中のPTHrP-N端活性量を測定の上、免疫組織学的および分子生物学的にも腫瘍によるPTHrP産生を証明した肺大細胞の1剖検例を報告した。

最後に血中および腫瘍組織中のPTHrP-N端活性、Northern blot解析をおこなって頂いた宮崎医科大学第3内科片上秀喜博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Stewart AF, Horst R, Deftos L, et al: Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia. *N Engl J Med* 1980; 303: 1377-1383.
- 2) Burtis WJ, Wu T, Bunch C, et al: Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 1987; 262: 7151-7156.
- 3) Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall REH, et al: A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: Cloning and Expression. *Science* 1987; 237: 893-896.
- 4) Kawano M, Yamamoto I, Iwato K, et al: Interleukin-

- 1 beta rather than lymphotoxin as the major bone resorbing activity in human multiple myeloma. *Blood* 1989 ; 73 : 1646 - 1649.
- 5) Hata H, Xiao H, Petrucci M, et al : Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma : A characteristic of immature tumor cells. *Blood* 1993 ; 81 : 3357 - 3364.
- 6) Yoneda T, Nakai M, Moriyama K, et al : Neutralizing antibodies to human interleukin 6 reverse hypercalcemia associated with a human squamous carcinoma. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 737 - 740.
- 7) Grill V, Ho P, Body JJ, et al : Parathyroid hormone-related protein : Elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 ; 73 : 1309 - 1315.
- 8) 片上信之 : 呼吸器疾患における高カルシウム血症 肺癌, サルコイドーシスを中心に . 病理と臨床 1996 ; 14 : 309 - 317.
- 9) Yoshimoto K, Yamasaki R, Sakai H, et al : Ectopic production of parathyroid hormone by small cell lung cancer in a patient with hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 ; 68 : 976 - 981.
- 10) Tanaka H, Kobayashi S, Masaoka A, et al : Hypercalcemia induced by parathyroid hormone-related protein from lung cancer tissue. *Chest* 1991 ; 100 : 1451 - 1452.
- 11) Bender RA, Hansen H : Hypercalcemia in bronchogenic carcinoma. *Ann Intern Med* 1974 ; 80 : 205 - 208.
- 12) 山口 建, 本田 聡, 長崎光一 : 癌とカルシウム血症 . 代謝 1990 ; 27 : 287 - 298.

Abstract

A Case of PTH Related Protein-Producing Large Cell Carcinoma of the Lung

Nobuyuki Katakami

Department of Pulmonary Diseases, Kobe City General Hospital,
Minatojima Nakamachi 4 - 6, Chuoku, Kobe 650 0046, Japan

A 41-year old woman with lung cancer was admitted to our hospital with constipation, lumbago and paraplegia. Her serum calcium level was 13.9 mg/dl. She expired on the 33 rd hospital day despite vigorous fluid and supportive therapy. An autopsy was performed 1 hour later. The cause of death was rupture of the sigmoid colon and panperitonitis. To evaluate the etiology underlying the symptomatic hypercalcemia in the autopsied lung, we measured serum and tumor tissue concentrations of PTH-related protein (PTHrP) by radioimmunoassay using a specific antibody against human PTHrP (1 - 34), and performed immunohistochemical staining by the peroxidase-anti-peroxidase method with the same PTHrP antiserum. Northern blot analysis was also performed to detect messenger RNA in cancer tissue. All of these tests were positive for PTHrP. To the best of our knowledge, this is the first reported autopsied case demonstrated to be a PTHrP-producing large cell lung cancer by molecular biological methods.