

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19561

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から分化誘導した甲状腺細胞の組織化と機能評価

研究課題名(英文) Functional analyses of tissue engineered thyroid gland fabricated with human iPS cells derived-thyocytes

研究代表者

荒内 歩 (Arauchi, Ayumi)

東京女子医科大学・医学部・研究生

研究者番号：40724141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、甲状腺機能低下症に対する再生医療を目標としている。臨床応用を念頭に開発されたバイオリアクターを用いて、ヒトiPS細胞から甲状腺細胞への分化誘導を行い、獲得した細胞について遺伝子学的かつ組織学的に解析した。第一段階では、内胚葉マーカーsox17/FOXA2の発現について解析し、mRNA・タンパク質の発現を確認でき、内胚葉への分化を確認することができた。その後、甲状腺刺激ホルモンなどを添加した培地にて培養した細胞が、甲状腺に特異的な遺伝子・タンパク質発現を示すことを確認し、培養上清中に甲状腺ホルモンの存在も確認できた。今後は、構造的・機能的により成熟した甲状腺組織を再生することを目指す。

研究成果の概要(英文)：The replacement of regenerated thyroid follicular cells (TFCs) is a promising therapeutic strategy for patients with hypothyroidism. Differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) to TFCs was induced using a bioreactor developed with clinical application and we analyzed these cells genetically and histologically. At first, suspension culture with Activin A treatment produced definitive endodermal cells that expressed Sox17 and FoxA2 in the RT-PCR and flow cytometric analysis. Further treatment with thyroid-stimulating hormone (TSH) induced TFCs expressing thyroid transcription factors Pax8, Nkx2-1 and various types of thyroid proteins including TSH receptor, sodium-iodide symporter, thyroglobulin and thyroid peroxidase. Interestingly, differentiated cells secreted free thyroxine in vitro. These results indicate successful differentiation of human iPSCs to functional TFCs that may enable us to fabricate thyroid tissues for regenerative medicine and disease models.

研究分野：再生医療

キーワード：甲状腺 ヒトiPS細胞 再生医療 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

先天性あるいは中枢性甲状腺機能低下症、レセプターの異常による甲状腺ホルモン不応症、橋本病などの自己免疫疾患を含む慢性甲状腺炎、本邦において有病率 1.3 人/1,000 人である甲状腺がんの甲状腺全摘出術をはじめとした、外科的治療後に併発しうる甲状腺機能低下症にいたるまで、甲状腺ホルモン剤の内服を余儀なくしている患者数は、国内でおよそ 70 万人と言われている(森昌朋編、最新医学別冊新しい診断と治療の ABC 25 甲状腺疾患、改訂第 2 版: 199-207、2012)。現在、甲状腺機能低下症の治療として、甲状腺ホルモン剤の内服が一般的であるが、生体内の恒常性を司る、非常に精密な内分泌組織のフィードバック機構を再現することは不可能である。また、甲状腺ホルモンは、小児期の成長や発達に不可欠であり、先天性甲状腺機能低下症の場合、長期にわたり内服を余儀なくすることは、QOL の低下にもつながりかねない。我々はこれまでに、先行研究として、甲状腺細胞シートの皮下移植により、甲状腺機能低下症モデルの甲状腺機能を回復することに成功した (Arauchi A et al., *Tissue Eng Part A*, 2009)。甲状腺細胞シートは、当研究室にて発明された、温度応答性培養皿を用いて培養されるものであり、培養細胞を温度変化のみによって回収するため、従来の酵素処理と異なり、細胞にダメージを与えずに獲得することができる (Yamada N, et al., *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*, 1990)。しかし、甲状腺機能低下症を対象とした細胞シート治療を実現化するにあたって、細胞ソースが問題として挙げられる。本研究は、このような現状を踏まえ、ヒト iPS 細胞から、甲状腺機能を半永久的に維持することのできる細胞を分化誘導する手法を確立し、獲得した細胞の生体内での機能を検証することで、新たな治療手段へと導くことを主たる目的としている。さらには疾患モデルの作製や甲状腺細胞・組織の分子生物学および発生学研究などのツールとしても有効なものとなると考えている。

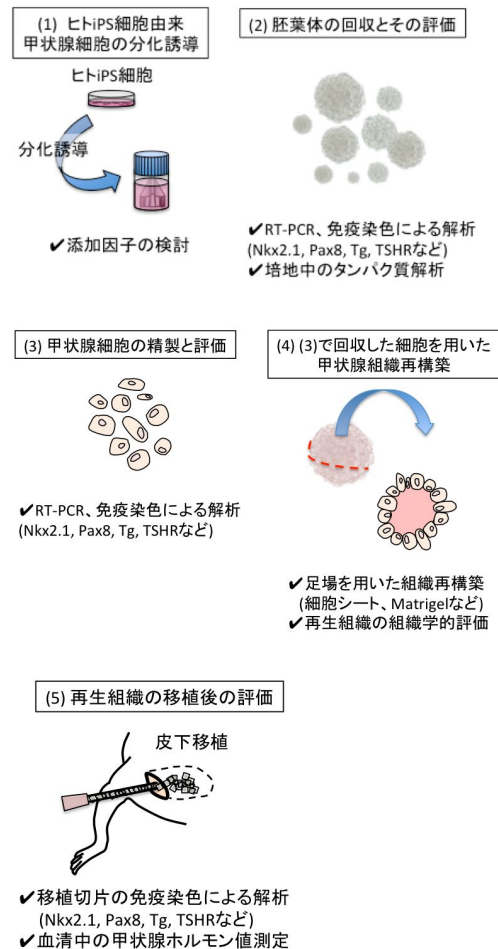
2. 研究の目的

本研究は、甲状腺ホルモン剤の内服による対処療法の代替として、細胞によるホルモン補充療法の確立を最終的な目標としている。ヒト iPS 細胞から分化誘導した甲状腺細胞を用いて、甲状腺組織を再構築し、ヒト iPS 細胞由来の甲状腺組織の移植によって甲状腺機能低下症モデルの機能回復を図ることを目的とする。三次元浮遊攪拌培養法を用いて、ヒト iPS 細胞から甲状腺細胞を分化誘導する培養法を確立し、それにより効率的に獲得した細胞を甲状腺機能低下症モデルに移植し、機能回復の有無を検証する。分化誘導により獲得した甲状腺細胞は、薬剤に替わる治療用

途ばかりではなく、疾患モデルの作製や甲状腺細胞・組織の分子生物学および発生学研究などのツールとしても有効なものとなると考えられる。

3. 研究の方法

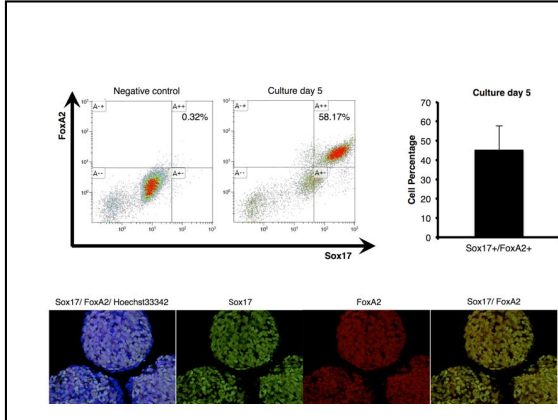
- (1) ヒト iPS 細胞を用い、甲状腺細胞の効率的な分化誘導法を確立する。
- (2) 分化誘導にて得られた、胚葉体内の甲状腺細胞に対し、遺伝子・機能評価を行う。
- (3) 甲状腺機能を獲得したと考えられる細胞をセルソーターにて分離し、遺伝子・機能解析を行う。
- (4) (3)で回収された細胞を用い、甲状腺特有の濾胞構造の再構築を行う。再生した甲状腺組織について、組織学・機能学・遺伝子学的に解析する。
- (5) あらかじめ甲状腺全摘出術を施した甲状腺機能低下症モデルに、(4)で評価した甲状腺組織を移植し、経時的に血中甲状腺ホルモン値を測定し、生体内における機能評価を行う。また、移植部位切片の組織学的解析を行う。



4. 研究成果

(1) まず、「3. 研究の方法」で挙げた、「(1) ヒト iPS 細胞を用い、甲状腺細胞の効率的な分化誘導法を確立する」について、獲得細胞数のスケールアップが可能となる、当研究室の松浦博士によって開発されたスピナーフラスコを用いた独自の手法により、胚性内胚葉を経て甲状腺濾胞上皮細胞へ分化誘導培養を行った。既報の胚性内胚葉への分化誘導法を用い、内胚葉マーカーである *sox17* と *FoxA2* について、両遺伝子・タンパク質を発現する細胞が 45%以上認められ、胚体内胚葉への分化誘導を確認できた(図 1)。

(図 1)

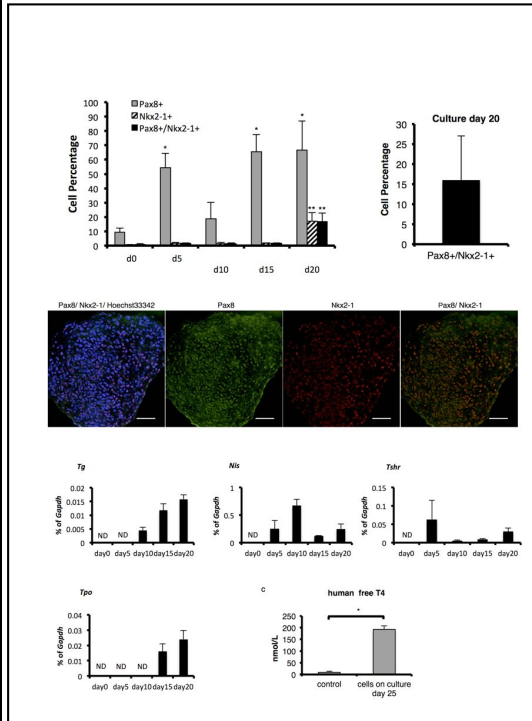


(2) また、「3. (2)分化誘導にて得られた、胚葉体内の甲状腺細胞に対し、遺伝子・機能評価を行う」の項目については、甲状腺細胞の分化に必要な転写因子である *Pax8*/*Nkx2-1* について、mRNA 発現ばかりでなく、フローサイトメトリー・免疫染色でも共陽性の細胞を確認できた。さらに、甲状腺に特異的な遺伝子(*TSHR*, *NIS*, *TG*, *TPO* など)の mRNA 発現とともに、*Pax8* や *Nkx2-1* が陽性である細胞に、共発現しているのを免疫染色にて確認できた。回収した甲状腺細胞の機能評価としては、分化培養後の培地中の甲状腺ホルモン遊離 thyroxine (*freeT4*) が、細胞を培養していないコントロール培地と比較し、有意に上昇していることを確認できた(図 2)。よって、ここまでの研究結果にて、スピナーフラスコを用いた分化誘導法により、ヒト iPS 細胞から甲状腺に特異的な遺伝子の発現を認め、甲状腺の組織学的・機能学的特徴を備えた細胞へと分化誘導することができたとと言える。

(3) 最終年度では、前年度で達成した、研究実施計画における、「3. (1) ヒト iPS 細胞を用い、甲状腺細胞の効率的な分化誘導法を確立する」「3. (2) 分化誘導にて得られた、胚葉体内の甲状腺細胞に対し、遺伝子・機能評価を行う」について、バイオリアクターを用いた浮遊攪拌培養法により、ヒト iPS 細胞由来甲状腺細胞の分化誘導に成功したことを論文として発表した。また、段階的に分化誘導因子を選択・添加するようプロトコールに変更を加えることで、甲状腺細胞膜上に認められ

る *TSH* レセプターを、RT-PCR 解析において、これまで以上に強く発現する細胞を獲得することができた。

(図 2)



「3. (3) 甲状腺機能を獲得したと考えられる細胞をセルソーターにて分離し、遺伝子・機能解析を行う」以降の項目に着手した。分化誘導にて得られた胚葉体を、MACs 法を用いて *TSH* レセプターを発現している細胞を回収し、浮遊培養系での三次元組織化を試みているが、回収できる細胞数が少ないため、難航しており、現在、RT-PCR や免疫染色での解析とともに、今後は、回収した細胞の接着培養も行う予定である。「3. (4) (3)で回収された細胞を用い、甲状腺特有の濾胞構造の再構築を行う。再生した甲状腺組織について、組織学・機能学・遺伝子学的に解析する」については、組織構築に重要である細胞構成を検討するため、ラットの甲状腺組織を用いて、甲状腺濾胞細胞と間質細胞との関係性を追求するため、これらの細胞の共培養実験を進行中である。「3. (5) 甲状腺機能低下症モデルに、(4)で評価した甲状腺組織を移植し、経時的に血中甲状腺ホルモン値を測定し、生体内における機能学的・組織学的解析を行う」は未施行であるが、3. (1)(2)で回収した胚葉体の甲状腺機能低下モデルへの皮下移植実験では、移植部位切片の組織学的解析において典型的な甲状腺濾胞構造を確認できておらず、さらに甲状腺機能の回復も認められていないことから、iPS 細胞由来甲状腺細胞の単離と評価、またこれらの単離した細胞を用いて、甲状腺特有の濾胞構造の再構築を行うことが今後の重要な課題となる。

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 1 件)

Arauchi Ayumi, Matsuura Katsuhisa, Shimizu Tatsuya, Okano Teruo
Functional Thyroid Follicular Cells Differentiation from Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Suspension Culture, *Frontiers in Endocrinology*, 有, 2017, 10.3389/fendo.2017.00103

〔学会発表〕(計 2 件)

荒内歩、松浦勝久、清水達也、岡野光夫
ヒト iPS 細胞由来甲状腺細胞の評価 (第 16 回日本再生医療学会総会、2017)

荒内歩、松浦勝久、清水達也、岡野光夫
ヒト iPS 細胞から分化誘導した甲状腺濾胞上皮細胞の in vivo における組織学的観察 (第 59 回甲状腺学会学術集会、2016)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒内 歩 (ARAUCHI, Ayumi)

東京女子医科大学・医学部・研究生

研究者番号：40724141