

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34408
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K10179
研究課題名（和文）ヒトiPS細胞からの生理機能を有した副甲状腺細胞分化誘導同法の開発と機能評価

研究課題名（英文）Development of a differentiation method for parathyroid cells from human iPS cells

研究代表者
中塚 隆介（Nakatsuka, Ryusuke）
大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90454561
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞からの副甲状腺細胞分化誘導法の開発を試みた。開発した分化誘導法では、各発生段階に応じた分化マーカーの発現が確認され、in vitroにおいて発生期の分化系譜に沿った副甲状腺誘導が行われていることが確認された。分化細胞において、副甲状腺ホルモン（PTH）を産生する細胞が一部存在することが明らかとなった。さらに、カルシウム感受性受容体（CaSR）と上皮細胞接着分子（EpcAM）を発現する細胞が分化誘導された副甲状腺細胞と想定された。以上より、iPS細胞から副甲状腺の分化・成熟過程をin vitroで再現した分化誘導による副甲状腺細胞分化の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
副甲状腺は骨の代謝に重要な臓器であるが、in vitroでの副甲状腺細胞の維持培養が実現していない。そのため、副甲状腺過形成などの副甲状腺疾患における治療法や医薬品の開発が進展してこなかった。副甲状腺過形成のメカニズム解明や副甲状腺疾患治療薬の開発において、本研究の成果である副甲状腺細胞分化誘導法は非常に有用であり、過形成の抑制薬スクリーニングに応用することで、副甲状腺機能亢進症の根治的な治療薬の開発に寄与することができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a new method of inducing the differentiation of parathyroid cells from human iPS cells based on embryologic development. We also succeeded in identifying differentiated parathyroid cells using an immunofluorescence analysis and flow cytometric analyses. Furthermore, we determined whether TGF β /epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, which is considered to be one of the causative pathways of parathyroid hyperplasia, is involved in the parathyroid cell proliferation that was observed in our differentiation model. As a result, the number of differentiated parathyroid cells increased due to TGF β stimulation. On the other hand, the number of differentiated parathyroid cells decreased due to the administration of erlotinib, which is an EGFR antagonist. Thus, using our method, we enabled the evaluation of the mechanism underlying parathyroid hyperplasia, as it mimics the developmental process of the parathyroid gland.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：副甲状腺 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺は骨の代謝回転に重要な臓器である。副甲状腺疾患、特に副甲状腺機能亢進症は骨粗鬆症の発症と密接に関係している。しかしながら、副甲状腺疾患の治療法は外科的切除や対症療法が主であり、十分な治療法が確立していない。新たな治療法の開発には、生理的な副甲状腺細胞の単離培養が重要となるが、ヒト副甲状腺細胞は過形成組織以外では得られず、長期培養も困難である。新たな治療法の開発には、ヒト培養細胞を用いた病態解明や薬剤のスクリーニング、薬効評価が重要と考えられる。しかしながらヒト副甲状腺細胞は、過形成組織以外では単離培養することができない。副甲状腺疾患には発症メカニズムの詳細が明らかとなっていない疾患もあるが、生理的なヒト副甲状腺細胞を用いることが出来ないことは、病態解明などの研究開発にも影響を及ぼしている。

患者自身の体細胞から樹立され、ほぼ無限に増殖する能力を有する多能性幹細胞である **iPS** 細胞を用い、ヒト副甲状腺細胞の分化誘導法を開発することは、これらの問題解決に非常に有用である。これまでヒト **iPS** 細胞は製薬、再生医療、病態研究など幅広く利用されている。さらに希少疾患や遺伝性疾患に対する、疾患特異的 **iPS** 細胞の樹立などへの応用も進められている。そのため、副甲状腺の分化誘導法の確立は、副甲状腺機能亢進症や副甲状腺機能低下症の治療薬開発や病態解明に役立つと考えられるが、副甲状腺においては **iPS** 細胞から生理的機能を有する細胞の分化誘導法の確立には至っていなかった。

2. 研究の目的

副甲状腺疾患の治療では、副甲状腺機能亢進症では外科的切除が主であり、副甲状腺機能低下症に至っては根治的治療法が確立していない。新規治療の開発や副甲状腺を用いた硬組織研究の発展を妨げる要因としては、生理的なヒト副甲状腺細胞の単離培養が困難であることが考えられた。多能性幹細胞から副甲状腺細胞の分化誘導については、ヒト **ES** 細胞から副甲状腺ホルモン (**PTH**) を発現する副甲状腺細胞様の細胞の作製が報告されている。しかしこれらの報告では、細胞の機能評価はされておらず、また分化誘導法にマウス胎児線維芽細胞が用いられている。そのため医薬品開発や移植医療への応用には適さない。一方、副甲状腺と発生の起源を同じくする胸腺では、多能性幹細胞から分化誘導法が複数報告されている。分化した細胞から副甲状腺細胞への分化転換では、胸腺細胞からの分化転換により細胞外カルシウム濃度に応答して **PTH** の発現を変化させる細胞の作製が報告されている。しかし、胸腺は **T** 細胞の分化成熟に必要であり、また成人になると退縮してしまうため、分化誘導用の細胞供給源としては問題を含んでいる。一方で **iPS** 細胞は多分化能と増殖能を有しており、これまでも様々な組織の細胞への分化誘導が報告されている。**iPS** 細胞の分化誘導系において、発生期の分化系譜を理解し、その分化プロセスを模倣することが重要である。副甲状腺の発生分化のプロセスについては、多くのことが解明されており、分化誘導法に応用できるものもある。また、**iPS** 細胞を分化誘導する際に、副甲状腺の予定領域を含む領域を効率良く振り分ける手法が開発され、効率の良い分化誘導技術が確立されつつある。

これらの先行研究から、**iPS** 細胞からの副甲状腺の分化誘導は十分に可能と考えられたが、分化誘導法は未だ確立しておらず、長期にわたる細胞の維持や *in vivo* 移植などの機能的評価の報告は無い。そこで、本研究では、**iPS** 細胞を用い生理的機能を有する副甲状腺細胞を作製することを目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

ヒト **iPS** 細胞からの副甲状腺細胞分化誘導

生体の発生において副甲状腺は胚体内胚葉から前方前腸内胚葉を介し、第 3 (第 4) 咽頭弓を経て形成される。また、胸腺は発生の起源を副甲状腺と同じくするため、胸腺の分化誘導法も参考にした分化誘導を行った。フィーダーフリー培養した **iPS** 細胞を各ステップに応じて分化誘導した。それぞれのステップについて、分化した細胞から **mRNA** を抽出し各分化段階のマーカー遺伝子発現を **PCR** により解析するほか、フローサイトメトリー (**FCM**) 解析により細胞表面マーカー発現を解析することで、胚体内胚葉の誘導、第 3 鰓弓の誘導、副甲状腺の誘導の各段階に分けて評価した。

(1) 胚体内胚葉 (definitive endoderm, DE) の誘導

iPS 細胞を **DE** に分化誘導し、マーカー発現を解析した。**DE** への分化誘導は、既報 (**Differentiation**, 2016) に則って行った。

(2) 第3咽頭弓 (branchial arch) の誘導

胸腺と副甲状腺は共に第3、第4咽頭弓から発生する。この過程において、レチノイン酸と Wnt シグナル抑制の重要性が報告されている。そこで、レチノイン酸と Wnt/beta-catenin シグナル阻害剤 (Wnt inhibitor; IWR1-endo) により第3咽頭弓系譜への誘導を行った。

(3) 副甲状腺の誘導

副甲状腺分化は Sonic Hedgehog (SHH) により促進される。また、胸腺細胞からの分化転換の報告 (Tissue eng part C methods. 2011) では Activin A と SHH が有効とされている。そこで、第3咽頭弓に誘導した細胞から、SHH と Activin A による副甲状腺分化誘導を試みた。

ヒト iPS 細胞由来分化副甲状腺細胞の同定

これまでの分化誘導法の開発に至る報告において、分化した副甲状腺細胞の形態学的な同定や分化効率の具体的な評価はされてこなかった。そこで、分化した副甲状腺細胞の形態学的同定を試みた。さらに、細胞表面上の Calcium sensing receptor (CaSR) および Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) 発現を指標としたセルソーティングと PTH の mRNA 発現解析を組み合わせることによる分化した副甲状腺細胞の分離同定を試みた。

副甲状腺細胞分化誘導の効率化

In vivo において、副甲状腺の過形成は ErbB2 の過剰なリン酸化により引き起こされることが示唆されている。生体の副甲状腺において、ErbB2 は TGF α によりリン酸化されることが示されており、TGF α からの ErbB2 を介する経路が副甲状腺の過形成に関与していると考えられることから、TGF α によりヒト iPS 細胞からの副甲状腺細胞分化が促進するかを第3咽頭弓に誘導した細胞への TGF α 刺激により確かめた。また、この分化誘導促進が EGFR のリン酸化の抑制により低下するかを、Erlotinib を用いた副甲状腺分化により調べた。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞からの副甲状腺細胞分化誘導

iPS 細胞を、Activin A を含む分化誘導培地によって分化誘導することで胚体内胚葉 (DE) および前方前腸内胚葉 (AFG) へと分化誘導した。DE への分化誘導によって未分化幹細胞のマーカー (SSEA4, TRA1-60, OCT4, SOX2) の発現が低下し、一方で DE および AFG のマーカー (CXCR4, SOX17, FOXA2) の発現が上昇した。胸腺の分化誘導法を基にし、レチノイン酸と IWR1-endo を用いた第3咽頭弓誘導を行った。その後、細胞を Sonic hedgehog および Activin A で刺激することで副甲状腺へと分化誘導した。分化誘導のステージに応じて、第3咽頭弓のマーカー (HOXA3, TBX1) や副甲状腺マーカー (GCM2, PTH) を有意に発現する分化細胞が出現することが明らかとなった (図1)。

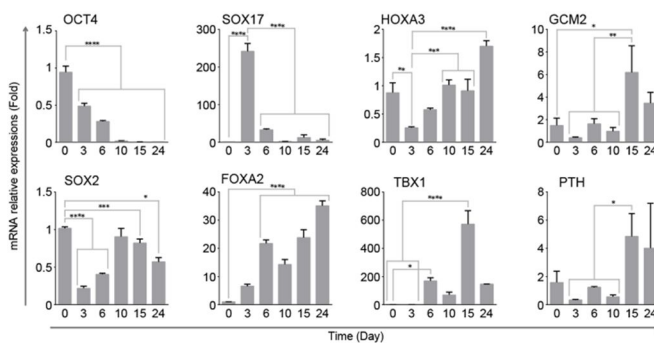


図1 分化誘導に伴う遺伝子発現の変化
胚体内胚葉 (Day3)、前方前腸内胚葉 (Day6)、第3咽頭弓 (Day10)、副甲状腺 (Day15, 24) における各マーカー遺伝子の発現。

ヒト iPS 細胞由来分化副甲状腺細胞の同定

副甲状腺細胞へ分化した細胞を同定するため、分化誘導した細胞を副甲状腺マーカー (PTH, GCM2) の免疫蛍光染色を行った。分化誘導した副甲状腺細胞は生体組織でみられるような細胞塊として存在しており、PTH, GCM2 を発現していた。細胞塊における PTH は、一部において小胞様に発現している様子が観察された。分化誘導後の細胞について、副甲状腺細胞で発現しているとされる CaSR および EpCAM を用いた FCM 解析を行った。さらに、CaSR+EpCAM+細胞、CaSR+EpCAM-細胞、CaSR-EpCAM+細胞と CaSR-EpCAM-細胞をソーティングし、これらの細胞における副甲状腺マーカー (PTH, CaSR, GCM2) および胸腺細胞マーカー (FOXN1) の mRNA 発現を比較解析した。その結果、分化誘導により、CaSR や EpCAM を発現する分化細胞がみられた。また、PTH を発現する副甲状腺細胞は CaSR 陽性細胞分画に存在し、特に CaSR+EpCAM+細胞に集約されることが明らかとなった (図2)。

分化誘導の時間経過により、分化した副甲状腺細胞 (**CaSR+EpCAM+**) の割合がどのように変化するか経時的に解析した。未分化細胞を除外した細胞 (**SSEA4-TRA1-60-**) の **CaSR** と **EpCAM** 発現を **FCM** により解析した。分化誘導の初期段階で、**DE** から **AFE** への分化により **EpCAM+** 細胞が出現し、その後に **CaSR+** 細胞が出現することが明らかとなった。さらに、**SHH** の刺激を 1 週間から 2 週間続けることにより **CaSR+EpCAM+** の割合が上昇した。これらの結果より、**EpCAM** 陽性の上皮細胞様細胞から副甲状腺細胞が分化、成熟が進むに従い出現することが示唆された。

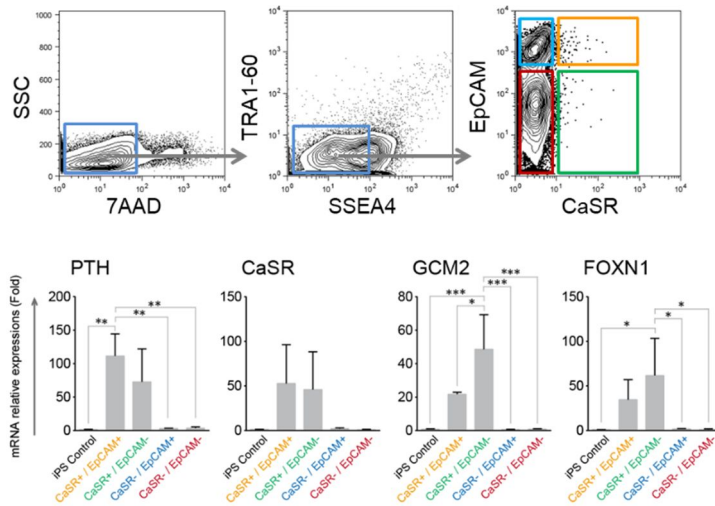


図 2 分化細胞の同定
誘導後の細胞から **EpCAM+CaSR+** 細胞 (分化細胞と想定される) をソーティングし、**PCR** で解析した。**EpCAM+CaSR+** 細胞の **PTH** および **GCM2** 発現が高いことから、この分画の細胞が副甲状腺分化細胞であることが推測される。

副甲状腺細胞分化誘導の効率化

TGF α の刺激により、副甲状腺細胞への分化誘導効率に変化するかを調べた。副甲状腺細胞の分化、成熟が進むと考えられる分化段階より **SHH** とともに TGF α による刺激を行った。また、**EGFR** のリン酸化を阻害する **Erlotinib** を用い、副甲状腺分化が **EGFR** からの刺激に関係しているかを調べた。分化した副甲状腺細胞が含まれると考えられる **CaSR+EpCAM+** 分画は、TGF α 処理群において濃度依存的に増加していることが示された。一方で、**Erlotinib** 処理により **CaSR+EpCAM+** 分画の有意な減少と、**CaSR-EpCAM-** 分画の有意な増加が認められた (図 3)。これらの結果より、TGF α から **EGFR** を介するシグナルが副甲状腺細胞の分化を促進している可能性が示唆された。

7AAD(-)SSEA4(-)TRA1-60(-) cells

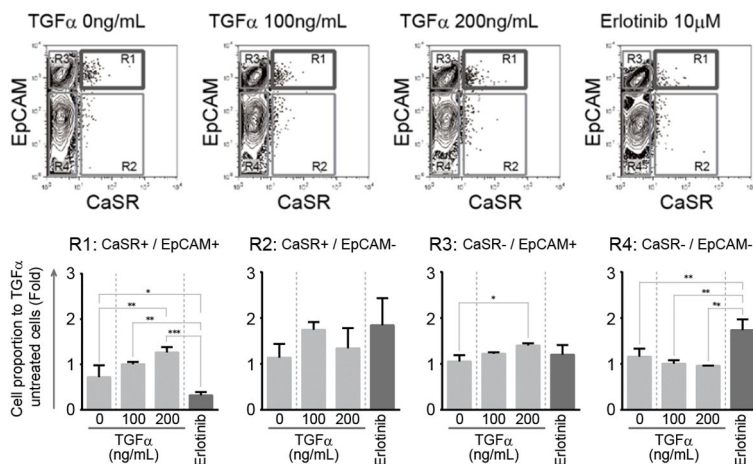


図 3 TGF α 刺激による分化副甲状腺細胞の増加
副甲状腺細胞の分画は、TGF α 処理群において濃度依存的に増加し、**200ng/mL** では未処理群に対し有意に増加していることが示された。**Erlotinib** (**EGFR** チロシンキナーゼ阻害剤) 処理により副甲状腺細胞分画の有意な減少が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中塚隆介、加藤憲、緒方浩顕、人見浩史
2. 発表標題 iPS細胞からのヒト副甲状腺細胞分化誘導法の開発と分化細胞の同定
3. 学会等名 第5回日本CKD-MBD研究会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中塚隆介、野崎中成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞より分化した副甲状腺細胞の同定と過形成メカニズムへのアプローチ
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中塚隆介、加藤憲、野崎中成、人見浩史
2. 発表標題 ヒトiPS細胞より分化した副甲状腺細胞の同定とEGFRシグナル抑制による過形成抑制
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 副甲状腺細胞の作製方法	発明者 中塚隆介、人見浩史	権利者 関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-199409	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------