

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16337

研究課題名（和文）異種動物体内での機能的な副甲状腺再生

研究課題名（英文）Functional parathyroid glands generated using blastocyst complementation

研究代表者

加納 麻弓子（Kano, Mayuko）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：20868129

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：胚盤胞補完法を用いた副甲状腺の作製を試みた。Gcm2を標的とした受精卵ゲノム編集により副甲状腺欠損胚を得た。小さなマウス副甲状腺を可視化するためにPth-tdTomatoレポーターマウスES細胞を開発し、副甲状腺欠損胚に注入してキメラマウスを作製した。キメラマウスの副甲状腺はtdTomato陽性でありマウスES細胞由来であることが示唆された。キメラマウスは正常な血中Caを維持し、低Ca刺激に応じてPTH分泌を認めたことから作製された副甲状腺が機能的であることが示唆された。副甲状腺機能低下症モデルマウスへの移植実験の結果、マウスES細胞由来の副甲状腺が移植臓器として機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精卵ゲノム編集による効率的な臓器欠損胚の作製と胚盤胞補完法とを組み合わせることが、臓器補完の有用な手段となることが示唆された。Ca応答性のある機能的な副甲状腺を作製に成功したこと、多能性幹細胞由来の副甲状腺が移植臓器として有用であったことは、将来のヒト-動物間胚盤胞補完法によるヒト多能性幹細胞からの副甲状腺作製と臨床応用の可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：We attempted to generate functional parathyroid glands (PTGs) from mouse embryonic stem cells (mESCs) by using blastocyst complementation (BC) could be a better strategy for generating functional PTG cells and compensating loss of parathyroid function. Using CRISPR-Cas9 knockout of Gcm2, we efficiently produced parathyroid deficient embryos for BC. In these embryos, mESCs differentiated into endocrinologically mature PTGs that rescued Gcm2 knockout mice from neonatal death. The mESC-derived PTGs responded well to extracellular calcium, restoring calcium homeostasis on transplantation into mice surgically rendered hypoparathyroid. These results demonstrate that BC can produce functional endocrine organs and constitute a concept in treatment of hypoparathyroidism.

研究分野：内分泌学

キーワード：副甲状腺 多能性幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

副甲状腺は小さな内分泌臓器であり、カルシウム感知受容体 (Ca-sensing receptor, CASR) を介して自ら末梢のカルシウム (Ca) を感知することで副甲状腺ホルモン (PTH) を分泌し、体内の Ca 濃度を狭い範囲で厳密に調節している。頸部手術などにより副甲状腺機能は障害されるが、現行の補充療法には限界がある。副甲状腺機能低下症に対して Ca 製剤や活性型ビタミン D 製剤が用いられており、血中 Ca を正常下限値に保つことを目標に治療が行われる。しかし、補充療法下の副甲状腺機能低下症患者のうち約 40% で高 Ca 尿症を認め、慢性腎不全のリスクが高いことが報告されている (Mitchell, DM. et.al. J Clin Endocrinol Metab, 2012)。また、補充療法下であっても QOL が低下し様々な身体的、精神的症状があることが報告され、PTH 分泌不全そのものが原因である可能性が示唆されている (Büttner, M. et.al. Endocrine, 2017)。

副甲状腺の以下のような点で再生医療に適している。(1) サイズが小さく、少ない移植細胞数でも機能することが期待される。(2) 多くの内分泌臓器は上位組織からの司令あるいは相互作用が重要であるが、副甲状腺は独立して機能している。(3) 臨床において安全かつ簡便な皮下移植の実績があり、免疫拒絶の問題を攻略できれば身体のどこにあっていても機能することが期待できる。現在までにヒト多能性幹細胞からの *in vitro* 分化誘導法は確立していない。周囲の Ca 濃度に応じて PTH 分泌を調節できる機能的な副甲状腺が作製されていないのである。

多能性幹細胞からの *in vitro* 分化誘導法とは異なる臓器再生のアプローチとして胚盤胞補完法がある。胚盤胞補完法とは、遺伝子ノックアウト (KO) により特定の臓器を欠損させた動物胚に正常な多能性幹細胞を顕微注入しキメラが成立すると、欠損した臓器が完全に多能性幹細胞に由来するものに置換されるというものである。当研究室では胚盤胞補完法を異種動物にも拡張し、膵臓欠損マウス体内にラット由来の膵臓を (Kobayashi, T. et.al. Cell, 2010)、続いて膵臓欠損ラット内にマウスの膵臓を作製することに成功している (Yamaguchi, T. et.al. Nature, 2017)。

### 2. 研究の目的

副甲状腺の再生医療は Ca・リン (P) の生理的な調整を可能にし、腎合併症のない安全で有効な治療手段となる可能性がある。本課題では *in vivo* 臓器再生法である胚盤胞補完法を用い、動物体内で末梢の Ca を感知しホルモン調節を行う機能的な副甲状腺を作製する。

### 3. 研究の方法

- (1) 副甲状腺欠損マウス体内でマウス ES 細胞由来の副甲状腺を作製する  
受精卵ゲノム編集を用いて副甲状腺発生に必須の遺伝子ある *Glial cells missing2* (*Gcm2*) を KO し、副甲状腺欠損マウス胚を得る。マウスでは副甲状腺のサイズが非常に小さく、甲状腺周囲だけでなく気管や縦隔にも存在し得るため、組織学的な同定が難しい。この問題を解決し、ホストとドナー双方の副甲状腺を蛍光標識して区別するために、副甲状腺特異的に発現する *Pth* と *tdTomato* とを 2A ペプチドにより連結した *Pth-tdTomato* レポーターマウス embryonic stem cell (ES) 細胞株の開発を行う。*Gcm2*<sup>-/-</sup>マウス胚に *Pth-tdTomato* レポーターマウス ES 細胞を顕微注入する。得られた *Gcm2*<sup>-/-</sup>キメラマウスの副甲状腺が組織学および機能的に補完されているかを明らかにする。
- (2) 副甲状腺機能不全マウスへの移植により、作製した副甲状腺の機能を評価する  
*Pth-tdTomato* レポーターマウス ES 細胞から樹立した *Pth-tdTomato* レポーターマウスに対し、副甲状腺摘出術を行うことで術後副甲状腺機能低下症モデルを作製し、マウス ES 細胞由来の副甲状腺を移植する。移植方法は手技的に容易かつ安全性が腎被膜下移植とする。移植前後における血中 Ca、P や PTH、重炭酸ナトリウム負荷試験への応答性について、経時的に評価することが必要である。
- (3) 副甲状腺機能欠損ラット体内でマウス ES 細胞由来の副甲状腺を作製し移植を行う  
*Gcm2*<sup>-/-</sup>ラット胚に *Pth-tdTomato* レポーターマウス ES 細胞を顕微注入しキメラを作製する。通常ラット胚はマウスと異なり長期の *in vitro* 培養はできない。そのため偽妊娠メスを使用して *in vivo* 胚培養を行いながら、キメラを作製する必要がある。ラット体内で作製されたマウス ES 細胞由来の副甲状腺を副甲状腺機能不全マウスへ移植し、安全性および有効性を評価する。

### 4. 研究成果

受精卵ゲノム編集を用いて副甲状腺の発生に必須の遺伝子である *Gcm2* を KO した。遺伝子型解析の結果、目的とする *Gcm2* ホモ変異が約 95 % という高い効率で得られた。*Gcm2*<sup>-/-</sup>マウス新生児の血中 PTH は野生型と比較し有意に低下し、生後まもなく死亡した (死亡率 > 95 %)。また、*Gcm2*<sup>-/-</sup>マウスの頸部から縦郭にかけての組織から採取した total RNA を用いて行った qPCR の結果より、*Pth* 発現が野生型と比較して著明に低下していた。組織学的解析の結果、

*Gcm2*<sup>-/-</sup>マウスでは両側の副甲状腺が欠損していた。以上の結果から、受精卵ゲノム編集を用いた副甲状腺欠損マウスの作製に成功した。

次に、同定が難しいマウス副甲状腺を可視化するために *Pth-tdTomato* レポーターマウス ES 細胞を開発し、*Gcm2*<sup>-/-</sup>副甲状腺欠損胚に ES 細胞を注入してキメラマウスを作製した。キメラマウス体内では両側に tdTomato を発現する副甲状腺が認められ、正常な血中 Ca 濃度を維持し長期にわたって生存した。ヘマトキシリンエオジン染色および免疫染色の結果から注入したマウス ES 細胞は組織学的に正常な副甲状腺へと分化したことがわかった。マウス ES 細胞由来の副甲状腺について 10xGenomics を用いたシングルセル解析を行ったところ、PTH を分泌する主細胞は完全にマウス ES 細胞由来であったのに対して、血管内皮細胞や間葉系細胞などの周囲組織はマウス ES 細胞由来の細胞と *Gcm2*<sup>-/-</sup>副甲状腺欠損胚由来の細胞がキメラ状に入り混じることが明らかとなった。

マウス ES 細胞由来の副甲状腺を術後副甲状腺機能低下症モデルマウスへ腎被膜下移植を行った。移植を受けた術後副甲状腺機能低下症モデルマウスはシャム群と比較して血中 Ca 濃度および重炭酸負荷試験への PTH の反応性が改善した。この結果はマウス ES 細胞由来の副甲状腺が移植臓器として機能することを示しており、再生医療および移植医療への可能性が期待される。

最後に、*Gcm2* を標的とした受精卵ゲノム編集を用いて副甲状腺機能欠損ラットを作製した。表現型解析の結果、マウスと同様に副甲状腺は完全に欠損しているものと考えられた。 *in vivo* 胚培養後の副甲状腺ラット胚盤胞に *Pth-tdTomato* レポーターマウス ES 細胞を注入し、異種間キメラを作製した。100 個の胚を移植し、出生した新生児は 3 匹であった。異種間キメララットは tdTomato 陽性のマウス ES 細胞由来の副甲状腺を有していたが、臍ヘルニアを認め出生後すぐに死亡した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kano Mayuko, Mizuno Naoaki, Sato Hideyuki, Kimura Takaharu, Hirochika Rei, Iwasaki Yasumasa, Inoshita Naoko, Nagano Hisato, Kasai Mariko, Yamamoto Hiromi, Yamaguchi Tomoyuki, Suga Hidetaka, Masaki Hideki, Mizutani Eiji, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 120
2. 論文標題 Functional calcium-responsive parathyroid glands generated using single-step blastocyst complementation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2216564120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 加納 麻弓子
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた内分泌臓器再生
3. 学会等名 第40回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加納 麻弓子、水野 直彬、水谷 英二、正木 英樹、須賀 英隆、中内 啓光
2. 発表標題 カルシウム応答性を有する機能的な副甲状腺再生
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加納麻弓子
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた神経内分泌器官作出と機能解析
3. 学会等名 日本神経内分泌学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayuko Kano, Eiji Mizutani, Naoaki Mizun, Hidetaka Suga, Hiromitsu Nakauchi
2. 発表標題 Regeneration of Parathyroid Glands that Function in Response to Calcium
3. 学会等名 9th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (SICEM 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayuko Kano
2. 発表標題 Regeneration of Parathyroid Glands that Function in Response to Calcium
3. 学会等名 KES Metabolic Bone Disease Study Group (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayuko Kano
2. 発表標題 Toward endocrine organ regeneration using pluripotent stem cells
3. 学会等名 11th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (SICEM 2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加納麻弓子
2. 発表標題 発生工学を応用した 機能的な副甲状腺の再生
3. 学会等名 第33 回臨床内分泌代謝 Update (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------