

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861363

研究課題名(和文) iPS細胞、ES細胞から甲状腺組織への分化誘導

研究課題名(英文) The study of the differentiation instructions from an induced pluripotent stem cell and an embryonic stem cell to the thyroidal organization.

研究代表者

菅野 真史 (KANNO, MASAFUMI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90444215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在、再生医学の研究は細胞レベルから組織レベルへと発展してきている。多くの体細胞のマスター遺伝子が解明され、多能性幹細胞からの分化誘導が可能となっている。我々は機能的甲状腺細胞への分化誘導をES細胞とiPS細胞を用いて行った。まずES細胞を胚様体へと分化誘導し、4日目にNKX2.1およびPAX8を、7日目以降にTSHを添加し続け甲状腺ホルモン分泌細胞へ分化誘導した。しかし、iPS細胞ではホルモン分泌細胞への分化を認めなかった。EBの分化様態が不均一であった可能性が考えられる。一方、神経幹細胞への分化誘導は効率的に行えることが判明した。現在、甲状腺ホルモン分泌細胞と神経幹細胞の研究を行っている。

研究成果の概要(英文)：The regeneration medicine has been developed from a cell level into an organization level. The master gene of many somatic cells were elucidated, and it is differentiated from the pluripotent stem cells such as ES cells or iPS cells. We tried an effective differentiation into functional thyrocyte from pluripotent stem cells. At first, we differentiated ES cells to the embryo body, NKX2.1 and PAX8 were added on the 4th day, and kept adding TSH after the 7th day. As a result, we succeeded in making ES cells differentiate into the thyroid hormone secretion cell. However, though differentiation by iPS cell was tried equally, thyroid hormone secretion cell didn't appear. We assume a possibility that the differentiation modality of EB was nonuniform compared with that of ES. On the other hand, differentiation into neural stem cell could have been performed efficiently. Currently we're researching the thyroid hormone secretion cell and neural stem cell.

研究分野：医学

キーワード：embryonic stem cell iPS cell thyroid embryo body

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺機能低下症は橋本病などの疾患によるものや、甲状腺手術による二次的なものなど生じる原因は多く、患者数は60万人以上と推定されている。(2011年製薬会社調べ)甲状腺ホルモンが不足すると甲状腺機能低下症を放置すれば代謝機能の低下をもたらす、強い倦怠感やむくみが生じたり、心機能の悪化を招き、時に生命にも影響しかねない状況となるため、患者はレボチロキシンナトリウムを日々経口摂取し続ける必要がある。東日本大震災の際に製薬工場の被災により甲状腺ホルモン製剤が不足し全国的に深刻な影響が出たことは記憶に新しい。安定した甲状腺ホルモン分泌細胞を作製し安全に臨床利用できれば、多くの患者が甲状腺ホルモン剤を毎日内服する必要から解放され、ホルモン製剤が不足するといった事態の心配もなくなる。患者のQOLと医療経済に対する貢献は非常に大きなものとなる。近年、再生医療の研究も注目されており、ES細胞から甲状腺組織を作成し、マウスに移植し機能改善することに成功した。今後は自己組織によるiPS細胞作製、正常甲状腺への分化、移植が求められる。

## 2. 研究の目的

甲状腺機能低下症は橋本病などの疾患によるものや、甲状腺手術による二次的なものなど生じる原因は多く、患者数は60万人以上と推定されている。甲状腺ホルモンが不足すると身体機能が低下し多様な臨床症状を呈するため、患者はレボチロキシンナトリウムを日々経口摂取し続ける必要がある。近年、再生医療の研究も注目されており、ES細胞から甲状腺組織を作成し、マウスに移植し機能改善することに成功した。今後は自己組織によるiPS細胞作製、正常甲状腺への分化、移植が求められる。

我々は24年度よりES細胞から甲状腺組織を再生する研究を継続しており、本研究では引き続きiPS細胞を用いた甲状腺再生の研究を進める。

## 3. 研究の方法

(1) iPS細胞の樹立とiPS細胞およびES細胞から胚葉体の形成。対象マウスの甲状腺細胞(無甲状腺マウス使用の際は上皮細胞)を摘出し、培養継代したのちにCytolune-IPS ver. 1.0を用いて、指定プロトコール通りにiPS細胞樹立を行う。すでに当研究室で所持しているES細胞および新たに樹立したiPS細胞をLIFを除いた培地で浮遊培養し細胞の集合体(胚様体)を形成させる。胚様体は分化誘導の源になり、その中の細胞が徐々に胚体外内胚葉や原始外胚葉へと分化する能力を持つ。

(2) iPS細胞とES細胞の胚様体を甲状腺; 慮胞細胞へと分化誘導する。胚様体形成後4日目でDoxインダクション法によってNKX2.1とPAX8を発現させる。7日目より3次元培養にしてTSI-1を作用させると約3週後に甲状腺組織が形成される。今回この系に、それぞれ胚葉体形成後アクチビンおよびbFGF等のいくつかの因子を追加し分化誘導促進を図る。さらに2,3日後に甲状腺刺激ホルモン、インスリン、ヨウ化カリウムを加え甲状腺漁胞上皮様細胞へのさらなる安定誘導を図る。分化誘導の成否を確認するのは甲状腺ホルモンの放出とthyroid transcription factorそしてPAX-8の発現および電子顕微鏡像で形態を確認することによる。分化誘導した細胞のホルモン放出の安定化、も

しくはホルモン放出量のコントロールを試みる。TSH の投与 ヨードの投与量でコントロールする。

(3) 分化誘導した甲状腺細胞のマウス腎被膜下移植、甲状腺組織内移植を試みる。

以下の4種のマウスを用いる( )橋本病のモデルの1つである nonobese diabetic (NOD) マウス (ii) NOD マウスに移植術後免疫抑制を行うもの( )免疫不全 (SCID) マウス (iv) 甲状腺摘出術後の SCID マウスを考えている 移植方法各々に腎被膜下、もしくは甲状腺組織内(甲状腺が存在した頸部)に移植を行う。評価方法任意の移植術後経過日数にて血液中の甲状腺ホルモンの増減を確認する。その時点での移植組織の生着を顕微鏡下に確認する。さらに免疫組織染色も行う。

(4) 以上ここまでの結果をまとめ、さらなる研究へ展開するための問題点と課題を提供する。さらに、臨床応用に展開するためのフィードバックを行う。

#### 4. 研究成果

現在、再生の研究は細胞レベルから組織レベルへと発展してきている。多くの体細胞へのマスター遺伝子が解明され、ES細胞やiPS細胞等の幹細胞からの分化誘導が可能となっている。しかしながら、その手順が体系的に一般化された細胞はまだ少なく、組織再生に至ってはごく一部の組織に限られた機関でしか行われていない。我々は機能的甲状腺細胞への効率的な分化誘導をES細胞とiPS細胞を用いて行うことを試みた。まずES細胞を用いて胚様体へと分化誘導した。胚様体の作成効率を上げるた

め、分化している細胞がほぼ0%の細胞培養液を用いた。また細胞の生存率を上げるための種々の工夫を行った。胚体形成後4日目にNKX2.1およびPAXSを発現させた。7日目より甲状腺刺激ホルモンを添加し続け甲状腺細胞へと誘導を行った。甲状腺ホルモンに必要なヨウ化カリウムの微量添加で細胞分化の促進を試みた。形態を電子顕微鏡で確認し Thyroid transcription factor-1 および Paired Box-8を免疫染色で確認した。

これを同様に樹立されたiPS細胞で試みた。しかしiPS細胞での甲状腺細胞への分化誘導が困難であり、この理由としてES細胞に比べて誘導したEBの分化様体が不均一であり、異なった胚葉系へと分化傾向を示す細胞が混在してしまっているためと考えた。この原因を考慮し実験を重ね、神経幹細胞への分化誘導はiPS細胞でも非常に効率よく行えることができた。iPS細胞をLIFを除いた培地で浮遊培養し、胚葉体を形成させた。胚様体は原始外胚葉分化する能力を持つ。胚様体にfgf2を含む無血清培地による浮遊培養法をおこなうことによって単一細胞由来の一時ニューロスフェアを作成した。これが神経系前駆細胞 神経幹前駆細胞となる。次に、その状態から接着培養とし、分散培養することにより2次ニューロスフェアを作製した。二次ニューロスフェアより神経管前駆細胞を経て分化した神経細胞・グリア細胞を作成した。この誘導の成功を tubulin、gfap、CNPaseによる免疫染色で確認した。

現在甲状腺に先んじて、神経幹細胞のマウス移植実験を行っている。

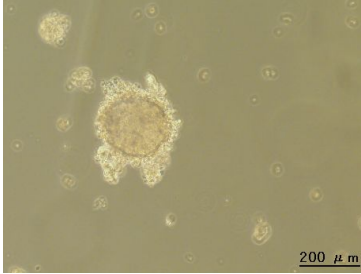


図 1 . Embryoid Body(EB)

EB ( 図 1 ) を F2 を含む無血清培地による浮遊培養法 ( neurosphere 法 ) によって単一細胞由来のニューロスフェアの作製に成功した。その状態から分散継代し 2 次・3 次ニューロスフェアへの誘導も成功した。2 次及び 3 次ニューロスフェア ( 図 2 ) を構成する細胞は未分化な神経幹・前駆細胞、分化した神経細胞やグリア細胞となる。

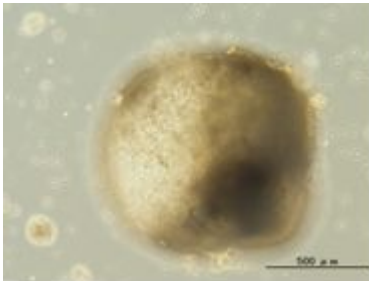


図 2 . 3 次ニューロスフェア

現在マウスを用いた実験を開始し、甲状腺機能障害モデルマウスの作成及び飼育、および移植研究へと移る段階であり、治療計画より遅れてはいるものの今後も実験を進めていく予定である。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 9 件 )

- 1 . Kanno M, Narita N, Sakashita M, Takabayashi T, Fujieda S.

Retrospective Study of thyroid cancer with infiltration of trachea and/or esophagus.

The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, 東京, 2016/3/29

- 2 . 菅野真史、吉田加奈子、徳永貴広、成田憲彦、藤枝重治 上顎癌治療の統計的考察 ~ 当科開設以来 3 2 年の解析 ~ , 第 26 回日本頭頸部外科学会, 名古屋, 2016/1/29
- 3 . 菅野真史、徳永貴広、成田憲彦、藤枝重治 口腔癌治療の統計的考察 ~ 当科 20 年の解析 ~ , 第 28 回日本口腔咽頭科学会, 大阪, 2015/9/11
- 4 . 菅野真史、成田憲彦、加藤幸宜、高林哲司、坂下雅文、藤枝重治 アンドロゲンレセプター陽性進行唾液腺導管癌に対する抗アンドロゲン療法 の臨床検討, 第 4 回耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス, 旭川, 2015/9/5
- 5 . Kanno Masafumi, Narita Norihiko, Fujieda Shigeharu. Long-term result of MAB therapy for AR-positive advanced salivary duct carcinoma. 第 39 回日本頭頸部癌学会・第 4 回アジア頭頸部癌学会, 京都, 2015/6/5
- 6 . 菅野真史、嶋田理佳子、岡本昌之、成田憲彦、藤枝重治 急速進行を呈した甲状腺悪性リンパ腫, 日耳鼻福井県地方部会学術講演会, 福井, 2015/3/28
- 7 . Kanno M, Shimada R, Susuki D, Narita N, Fujieda S. Retrospective Study of

thyroid cancer with infiltration of trachea and/or esophagus.

13th Asia-Oceania ORL-HNS Congres,  
台北,台湾 2015/3/20

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

8. 菅野真史、成田憲彦、藤枝重治

アンドロゲンレセプター陽性の進行唾液腺導管癌に対する抗アンドロゲン療法の臨床検討

第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 福岡, 2014/5/17

9. Masafumi Kanno, Norihiko Narita, Taiyo Morikawa, Shigeharu Fujieda.

The transition of laryngeal cancer incidence rate during the last two decades in Fukuiprefecture.

18th WCBIP / WCBE,京都,2014/4/13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅野 真史 (KANNO, Masafumi)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90444215