

令和元年6月4日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09628

研究課題名(和文) 副甲状腺細胞の株化手法の開発

研究課題名(英文) Development of methods to establish cell-line of parathyroid cells

研究代表者

角田 隆俊 (KAKUTA, Takatoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50276854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺細胞は細胞分裂頻度が非常に低く、その実質細胞のin vitro培養は極めて困難である。遺伝子導入により不死化した細胞株も確立されておらず、今後、副甲状腺機能亢進症の研究を進展させ、その治療法を開発するために、本研究では培養副甲状腺細胞の増殖手法の開発を目的として、副甲状腺機能亢進症を呈する患者の過形成副甲状腺に特異的に発現するマイクロRNAを探索して初代培養に導入し、また、静止期細胞のカルシウム受容体を介した細胞周期への移行促進により細胞分裂頻度を亢進させて副甲状腺細胞の長期の維持を可能とし、研究での使用に耐える培養系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常、副甲状腺細胞の分裂頻度は非常に低いが、腎不全が進行し透析治療が開始されると副甲状腺細胞の増殖が刺激されて副甲状腺機能亢進症が発症する。副甲状腺の過形成と副甲状腺ホルモンの過剰分泌は骨代謝や心血管系の異常を引き起こして患者の予後を悪化させる。副甲状腺機能亢進症の発症と進行の機序を明らかにし、新たな治療法を開発を推進するために副甲状腺細胞の培養系を用いた研究は必須であるが、これまでに株細胞も確立されておらず、その培養は非常に困難であった。本研究で開発された培養法は、副甲状腺細胞初代培養の長期維持を可能とするもので、副甲状腺機能亢進症の研究の使用に耐えうるものとして有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Because the frequency of cell division in parathyroid gland is very low, in vitro culture of the parathyroid cell is extremely difficult. Many attempts to immortalize the parathyroid cell by gene transfer have not succeed. To progress the study of hyperparathyroidism for the purpose of development of new treatments, we have been searched the method to proliferate the parathyroid cells.

In this study, two methods were developed to elongate the lifespan of cultured parathyroid cells. One was transfection of microRNA which is characteristic in the hyperplasia parathyroid gland into the primary culture. The other was increase in frequency of the cell division through the shift of cell state from G0- to G1-state by treatment with calcimimetics. Both methods enabled the long-term maintenance of the parathyroid cell in vitro, and established the culture system to persist for the use in the hyperparathyroidism studies.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：副甲状腺細胞 副甲状腺機能亢進症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺は副甲状腺ホルモン (PTH) を分泌して体内のカルシウム量の調節を行う内分泌器官である。副甲状腺細胞は誕生後も青年期まで分裂増殖を行うが、成人後の増殖能は非常に低く、18~76歳の副甲状腺で調べられた細胞のturn over は1年間で平均5.24%であり、平均細胞寿命は約20年と考えられている (Wang Q, et al. Clin Endocrinol (Oxf) 46: 343-349, 1997)。これは、細胞分裂の頻度が正規分布に従うと仮定すると、最も頻繁に分裂する細胞でも3年毎に1回より多く分裂することはないほど増殖能が低いことを示している。分裂を行う細胞は腺全体にランダムに分布しており、幹細胞のようなものは知られていない。またアポトーシスに関して正常副甲状腺では検出されておらず (Drüeke TB, et al. Nephrol Dial Transplant. 12: 2228-2233, 1997)、細胞寿命で自然に起こる細胞数の減少を補うために、細胞周期のG0期にある細胞がG1期へ移行して増殖サイクルを一回りだけ行い、またG0期へ戻ると推測されている。

この様に正常ではほとんど分裂増殖の見られない副甲状腺細胞であるが、腎不全患者に二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) が発症すると細胞分裂が促進されることが知られている。SHPTは慢性腎不全の過程で進行する、血中のカルシウムやリン、ビタミンDの濃度調整不良に反応した適応症として発症し、副甲状腺細胞の増殖と過形成、PTHの過剰な産生と分泌を特徴とする。これにより、骨吸収、血管と柔組織の石灰化などが引き起こされ、心血管系疾患のリスクを増大させることが知られている。我々の研究室ではSHPTの発症と進行の機序を解明し、患者への負担の少ない新たな治療法の開発を目指している。現在まで、副甲状腺過形成の機序の研究は腎不全モデル動物を使用して行われることが多く、より単純化した実験系として副甲状腺細胞の細胞培養を用いた解析はあまり進んでいない。その主な理由は、過形成を呈する副甲状腺から単離した細胞を培養環境へ移すと細胞分裂頻度が急激に低下し、数回の継代後は全く増殖しなくなり死滅してしまうからである。少数の長期間継代培養の報告もあるが (Brandi ML et al. Proc Natl Acad Sci USA 83:1709-1713, 1986. 徳光正行 他、日本尿路結石症学会誌 2:87-91, 2003)、私どもの経験からも、副甲状腺細胞の初代培養の継代維持は大変困難であると思われる。培養系に移すことで副甲状腺細胞の性質が劇的に変化するのは増殖能に限られず、例えば高濃度リン酸を含む培地での培養下で副甲状腺組織のスライスがPTH産生を増加させるのに対し、組織から単離された副甲状腺細胞の平面培養では全く変化が見られないという報告もあり (Kjaerulff P et al. Nephrol Dial Transplant 11:1762-1768, 1996)、通常の培養法では過形成副甲状腺の重要な性質を維持できない可能性が考えられる。

一方、初代培養細胞にSV40-T 遺伝子やテロメラーゼ遺伝子などの発がん関連遺伝子を導入して株化を図る手法もよく行われるが、ヒト副甲状腺細胞では類似の手法で確立された細胞株は存在せず、私たちの研究室においても遺伝子導入による株化を何度か試みたが、未だ成功には至っていない。多くの組織・細胞種においてその不死化細胞株が作出される中で、副甲状腺細胞は遺伝子導入による株化が成功していない数少ない細胞種のひとつである。私たちはこれが、細胞を分裂静止期 (G0期) に留め置くための機構が作用している可能性があるとのデータを得ている。

このような状況下で、私たちはヒト副甲状腺細胞の培養を用いたSHPTの解析を可能にするために、過形成副甲状腺から単離した細胞でスフェロイド (細胞集塊) を作製し、長期培養を実現している (Kanai G, et al. Kidney Int. 75(5):490-498, 2008)。スフェロイド培養は数ヶ月~半年以上の間、安定にPTHを産生・分泌し続けるが、細胞の分裂増殖はほとんど見られない。また、この培養系では長期間の遺伝子ノックダウンが可能であり、遺伝子発現の制御実験に適している。

今後、副甲状腺過形成の機序についてさらに解析を進めるためには、増殖可能な副甲状腺細胞の培養系の確立は必須と思われる。よって、本研究においては副甲状腺細胞の細胞株の樹立に繋がる副甲状腺の細胞培養手法の検討・開発を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

副甲状腺細胞は細胞分裂頻度が非常に低く、その実質細胞の *in vitro* 培養は極めて困難である。遺伝子導入により不死化した細胞株も確立されておらず、今後、副甲状腺期の亢進症の研究を進展させ、その治療法を開発するためには、機能的な副甲状腺細胞の増殖を促進する培養法の確立が急務である。本研究では、培養副甲状腺細胞の増殖手法の開発を目的として、副甲状腺機能亢進症を呈する患者の過形成副甲状腺に特徴的な遺伝子発現を探索し、これを副甲状腺細胞の初代培養やスフェロイド培養に導入して増殖能を付加し、さらにカルシウム受容体を介した細胞周期への移行促進により細胞分裂頻度を亢進させることで、副甲状腺機能亢進症の研究での使用に耐えうる培養副甲状腺細胞の培養手法の検討・開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 過形成副甲状腺に特徴的な遺伝子発現の探索

過形成副甲状腺における網羅的な遺伝子発現の検索を行うための予備的な調査からは、過形成の原因となる遺伝子の検出には大量に存在する副甲状腺ホルモンのmRNAが障害になることが予測されていた。そこで最近、細胞機能の調節に重要な働きをしていることが明らかにされつつあるマイクロRNAを検索対象とし、同じ患者から摘出された過形成の進行した副甲状腺と過形成のほとんど見られない副甲状腺からそれぞれマイクロRNAを抽出し、次世代

シーケンスを行って網羅的に検出したマイクロ RNA の解析から、過形成の進行した、あるいは過形成のほとんど見られない副甲状腺に特異的な発現を示すマイクロ RNA を探索し、その機能について培養系を用いて検討した。

(2) カルシウム受容体を介した細胞周期への移行促進

最近、二次性副甲状腺機能亢進症の治療薬として開発されたカルシウム受容体作動薬はカルシウム受容体にアロステリックに作用して、副甲状腺ホルモンの産生と分泌に著しい抑制効果をもたらしている。また、長期的な服用作用として過形成副甲状腺の退縮が報告されており、私たちの研究は、カルシウム受容体作動薬を処方された患者の副甲状腺で、細胞の分裂頻度と細胞死の頻度が共に上昇していることを明らかにしている。通常、副甲状腺の実質細胞のほとんどは静止期 (G0 期) にあり変わることはないが、私たちのデータは、カルシウム受容体作動薬がこれらの G0 期の細胞を細胞周期 G1 期へ移行させ易くして分裂頻度を上げていることを示したが、細胞周期へ復帰した細胞のほとんどが細胞死への経路を選択することで細胞死頻度を上げていることも示唆していた。したがって、細胞周期へ復帰した細胞の細胞死経路への進行を妨げることで、細胞の増殖が進行させるのではないかと考え、その手法の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 過形成副甲状腺に特徴的な遺伝子発現の探索

ヒト過形成副甲状腺の遺伝子発現の調節に重要な働きをしていると考えられているマイクロ RNA について RNA シークエンスを行い、副甲状腺に発現しているマイクロ RNA の網羅的な調査を行った。検体として原発性副甲状腺機能亢進症患者からは肥大した 1 腺を、二次性副甲状腺機能亢進症患者からは過形成の進行度の異なる 2 腺を、それぞれ数名の患者から採取し、計 9 腺について調査した。各腺から抽出したマイクロ RNA について次世代シーケンスによって、それぞれ 100 万リードを超える塩基配列を決定し、既知のマイクロ RNA 配列にマッピングしたところ、全体の約 25% の配列の一致を見た。これらの既知のマイクロ RNA はおよそ 2600 種類に分類され、そのうち、いずれかの腺で 10 万リード以上検出されたものが 26 種類、1 万 ~ 10 万リード検出されたものが 42 種類あった。同じ患者由来の過形成の進行度が異なる腺の間での比較では、いずれかで 1 万リード以上検出されたもののうち、過形成進行度の大きな腺で小さい腺の 2 倍以上の発現が検出されたものが 14 種類 (最大 30.6 倍)、過形成進行度の小さな腺で大きな腺の 2 倍以上の発現が検出されたものが 22 種類 (最大 6.3 倍) あった。原発性と二次性の比較では、いずれかの腺で 1 万リード以上検出されたもののうち、原発性で二次性の 2 倍以上の発現が検出されたものが 56 種類 (最大 17.0 倍)、二次性で原発性の 2 倍以上の発現が検出されたものが 18 種類 (最大 1000 倍) あった。

これらのうちから、特に過形成の進行した腺で共通して発現が顕著であったいくつかのマイクロ RNA についてはその mimic RNA を、過形成の進行していない腺で共通して発現が顕著であったいくつかのマイクロ RNA については inhibitor RNA を副甲状腺細胞の初代培養に導入して増殖に関する機能を検討した。

その結果、miR-10a と miR-148 の 2 種類の mimic RNA をそれぞれ導入された副甲状腺細胞は対照と比べて長く維持されることが判明した。細胞の分裂頻度も決して高くないが認められ、mimic の導入を定期的に継続することで長期の維持が可能であることが示された。

(2) カルシウム受容体を介した細胞周期への移行促進

副甲状腺細胞が発ガン遺伝子の導入でも不死化し難いのは、副甲状腺細胞の分裂頻度が非常に低く、ほとんどの細胞が細胞周期の静止期 (G0 期) にあるためと考えられる。二次性副甲状腺機能亢進症の患者のうち、カルシウム受容体作動薬の処方を受けた患者と受けなかった患者から摘出された副甲状腺の比較から、() カルシウム受容体作動薬を処方された患者の副甲状腺では G0 期の指標である p27Kip1 の発現が低下していること、() カルシウム受容体作動薬を処方された患者の副甲状腺では分裂増殖する細胞の指標である c-myc を発現する細胞の頻度が亢進していること、が観察され、カルシウム受容体の活性化を介した細胞周期へ移行の可能性が示された。さらに細胞周期に復帰した細胞で過剰に発現した c-myc が細胞死を誘発していることを示すデータが得られたため、Myc Associate factor X (MAX) を導入し、c-myc とのヘテロダイマー形成による細胞死抑制を試みたところ、分裂頻度は低いままであるが、副甲状腺細胞を通常より長く維持することが可能になった。

以上の手法の開発により、副甲状腺細胞の初代培養を長く維持することが可能となったので、今後、これらの細胞を使用して副甲状腺機能亢進症の研究を推進すると共に、株化された副甲状腺細胞の確立を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

金井 巖太、澤田佳一郎、中村道郎、角田隆俊、深川雅文、二次性副甲状腺機能亢進症における microRNA 解析 日本腎臓学会誌 vol.60、466、2018 査読あり

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金井 巖太

ローマ字氏名：KANAI, Genta

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：00535221

研究分担者氏名：澤田 佳一郎

ローマ字氏名：SAWADA, Kaichiro

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：客員講師

研究者番号(8桁)：10420952

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森谷 ひとみ

ローマ字氏名：MORIYA, Hitomi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。