

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K16009
研究課題名(和文) 過形成副甲状腺の周辺脂肪組織に検出される異所的な副甲状腺ホルモン産生細胞の解析
研究課題名(英文) Analysis of parathyroid hormone producing cells in adipose tissues surrounding hyperplasia parathyroid glands
研究代表者
巽 亮子 (TATSUMI, Ryoko)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：60631819
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：二次性副甲状腺機能亢進症患者から摘出した過形成副甲状腺とその周辺組織を調査し、31名中23名(74.2%)の患者において副甲状腺を取り巻く脂肪組織からの副甲状腺ホルモン(PTH)産生と脂肪組織中に散在する異所性PTH産生細胞のコロニーを見出した。この異所性PTH産生細胞と脂肪組織の由来を明らかにするため、腎不全免疫不全ラットの甲状腺下にヒト副甲状腺の組織片を移植したところ、1～3カ月後に移植片で脂肪細胞の分化マーカーPPAR α とPerilipinの発現を検出した。副甲状腺細胞は脂肪細胞への分化転換が可能であり、腺周囲に蓄積する脂肪組織は腺外に排出された副甲状腺細胞に由来すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二次性副甲状腺機能亢進症(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、副甲状腺ホルモンの過剰な産生と分泌を特徴とする。進行したSHPTは高カルシウム血症や高リン血症を促進させ、異所性石灰化や血管硬化症などを誘発して透析患者の予後に関わるが、SHPTの発症と進行については不明な点が多い。本研究はSHPTの発症と進行を周辺組織を含めて総合的に理解するために、過形成副甲状腺への脂肪蓄積のメカニズムについて調査する。その成果により高い有効性を持つ新たな治療法の開発基盤を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：I investigated hyperplasia parathyroid glands and the neighboring organs which were removed from patients with secondary hyperparathyroidism and found the colony of the ectopic parathyroid hormone (PTH)-producing cell which lay scattered in adipose tissue which surrounded the parathyroid gland in 23 of 31 (74.2%) patients. After transplanting the piece of the human parathyroid gland under the thyroid gland of the renal failure immunodeficiency rat to clarify origins of the ectopic PTH-producing cell and adipose tissue, it detected expression of differentiation marker PPAR α and Perilipin of the adipose cell in grafts 1-3 months later. The parathyroid gland cell was available for the transdifferentiation to a adipose cell, and it was thought that the adipose tissue which accumulated around parathyroid glands came from a parathyroid cells pushed out from glands.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：二次性副甲状腺機能亢進症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二次性副甲状腺機能亢進症(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、副甲状腺ホルモン(PTH)の過剰な産生と分泌を特徴とする。進行したSHPTは高カルシウム血症や高リン血症を促進させ、透析患者の予後に関わる異所性石灰化や血管硬化症を誘発する。治療薬として活性型ビタミンD3製剤やカルシウム受容体作動薬が用いられるが、薬剤抵抗性を獲得して進行したSHPTでは副甲状腺摘出術(PTx)が施されることが多い。PTxは当院においても年間20例以上が行われているが、副甲状腺機能を残すため通常は摘出腺の一部を腕の筋肉などに自家移植することが行われる。しかしながら、副甲状腺の全摘出後に自家移植を行わない場合でも患者の血中に長期間少量のPTHが検出される場合のあることが知られており(Iwamoto et al. J Nephrol. 2012)、これは胸腺などで知られている異所性の微量なPTH分泌では到底説明できるものはないにもかかわらずその分泌源は不明であった。また、原発性副甲状腺機能亢進症の過形成腺摘出術後の患者の血中PTH濃度とBMI(Body Mass Index)との間に根拠不明の正の相関が報告されており(Tran H, J Clin Endocrinol Metab 2014)肥満とPTH産生の関連が示唆されていた。一方、PTxで摘出される過形成腺には脂肪組織が付随していることが多く、中には脂肪組織にすっぽりと覆われている場合もある(図1)。これらの事実から、PTxで十分に取り除けなかった過形成腺周囲の脂肪が少量のPTHを分泌し続けていることが疑われることから、過形成副甲状腺周囲に蓄積する脂肪組織からのPTH分泌の可能性が考えられた。副甲状腺と周辺組織の培養による予備的な実験はこの予想を裏付ける結果を示したので、さらに詳細な検討を行うことにした。



図1. PTxで摘出されたSHPT患者の過形成副甲状腺。ヒトは通常4つの副甲状腺を持つが正常腺は米粒大である。摘出腺には脂肪組織が付着しているもの(左上、左下)、全体を覆っているもの(右下)が見られるが、これらの外側にも周囲脂肪組織が存在する。

2. 研究の目的

本研究の目的は「過形成副甲状腺周囲の脂肪組織での異所的なPTH分泌を確認し、異所性PTH産生と過形成腺周囲への脂肪蓄積の関係を明らかにする」ことである。

心臓などでは臓器に蓄積した異所性脂肪組織中で発生した炎症が近傍の血管や筋肉へ波及して悪影響を及ぼすことが報告されており、副甲状腺に蓄積した脂肪組織も副甲状腺機能亢進症の進行に影響している可能性が考えられる。本研究で副甲状腺周囲の脂肪蓄積の機序が明らかになればSHPTの進行抑制に役立つ知見が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) SHPT患者より摘出した副甲状腺とその周辺組織の組織培養による異所性PTH分泌の検出

副甲状腺の周辺組織から異所性 PTH の分泌が疑われたので、SHPT 患者より摘出した副甲状腺とその周囲組織など（付着した脂肪とさらにその周囲の脂肪組織、胸腺、皮下脂肪）を別々に培養して、培地に分泌される PTH 濃度と分泌量を推定した。インフォームドコンセントにより同意を得た患者の PT× 摘出物は直ちにそれぞれの組織に分離され生理的食塩水で洗浄された後に適当な大きさに細断して 6 穴培養皿へ移され、10%牛胎児血清、50U/ml ペニシリン、50 μg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM/F12+GlutaMax-1 培地（Invitrogen、CA、USA）中で 37℃、5%CO₂ の条件下で 24 時間培養された。培地中の PTH 濃度は電気化学蛍光免疫アッセイ法（Elecsys intact PTH; Roche、Switzerland）により測定した。

(2) 副甲状腺周辺組織の組織切片の免疫組織化学

副甲状腺周辺組織からの異所性 PTH 産生細胞の存在を検出するために、(1)で培養した組織片をホルマリン固定して作製したパラフィンブロックより組織切片をスライドグラス上に接着させて通常の方法で免疫組織化学を行った。抗ヒト PTH 抗体（sc28992 Santa Cruz、CA、USA）、抗ヒト GCM2 抗体（ab201170 Abcam、UK）はマニュアルに従い 1%のブロッキング試薬（Invitrogen）を含むリン酸バッファー（PBS）で希釈して使用した。0.05%Tween を含む PBS で洗浄した後に Horse radish peroxidase 結合二次抗体で処理し、再び 0.05%Tween を含む PBS で洗浄してからジアミノベンジジン（DAB; 富士フイルム和光純薬 大阪）で呈色した。

(3) SHPT 動物モデルへのヒト副甲状腺組織の移植

副甲状腺周辺組織における異所性 PTH 産生細胞の由来を決定するために、SHPT モデル動物を用いた解析を行った。5 ないし 6 週齢の免疫不全ラット（ヌードラット）の腎臓の 5/6 を切除して腎不全とし、高リン食餌により SHPT モデル動物とした。SHPT の進行は血中 PTH をモニターして推測し、十分に血中 PTH 濃度が上昇したものをドナーとして用いた。ヒト副甲状腺はインフォームドコンセントを得た SHPT 患者より PT× により摘出されたものを細断して用い、組織片をドナーラットの甲状腺と気管の間に挿入した。対照として同じ副甲状腺の組織片を腎臓の切断面に挿入した。1~6 ヶ月後に麻酔下で安楽死させ、気管と腎臓を回収した。回収した組織はホルマリンで固定し、パラフィンブロックとして組織切片を作製して蛍光免疫組織染色を行った。抗ヒト特異抗原抗体（STEM121; タカラバイオ、滋賀）、抗 PPAR γ 2（GTX114668; GeneTex、TX、USA）、抗 perilipin A（ab3526; Abcam、UK）はそれぞれのマニュアルに従い、1%のブロッキング試薬（Invitrogen）を含むリン酸バッファー（PBS）で希釈して使用した。0.05%Tween を含む PBS で洗浄した後に、二次抗体として Alexa594 結合抗マウス IgG 抗体と Alexa488 結合抗ウサギ IgG 抗体で処理し蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) SHPT 患者より摘出した副甲状腺とその周辺組織の組織培養による異所性 PTH 分泌の検出
インフォームドコンセントを得た PT× 適用患者 31 名から摘出された副甲状腺と周辺組織を培養し、分泌される PTH を検出した（表 1）。31 名中 23 名（74.2%）に異所性の PTH 分泌が検出されたが、うち 22 名は副甲状腺に付着あるいは接する脂肪組織（Adjacent adipose）に強い PTH 分泌能が検出された（試料数としては 46/56、82.1%）。10 名はその外側の周辺脂肪組織（Distant adipose）にも弱い PTH 分泌が検出された（試料数としては 13/54、24.1%）。1 名は Adjacent adipose が回収されなかったが、回収された Distant adipose には PTH 分泌が検出された。対照として異所性 PTH 分泌の知られている胸腺では 14 名中 4 名（28.6%）で検出された（試料数としては 4/14、28.6%）。陰性対照の 21 名の皮下脂肪に PTH 分泌は検出されなかった。

この結果より、過形成副甲状腺に付着・接着する脂肪組織に強い異所性 PTH 分泌能のあることが明らかにされた。

表 1 . 副甲状腺とその周囲組織からの PTH 分泌

| Tissues | PTH secretion % of patients | Specimens % of Positive* | Secreted PTH (ng/day/0.1g tissue) average \pm SD of positive specimens |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|
| PTG parenchyma | 100.0 % (31/31) | 100.0 % (76/76) | 125.8 \pm 156.6 |
| Ectopic (total) | 74.2 % (23/31) | | |
| Adjacent Adipose | 71.0 % (22/31) | 82.1 % (46/56) | 29.3 \pm 63.7 |
| Distant Adipose | 35.5 % (11/31) | 24.1 % (13/54) | 6.1 \pm 9.5 |
| Thymus | 28.6% (4/14) | 28.6 % (4/14) | 5.9 \pm 5.8 |
| Subcutaneous adipose | 0.0 % (0/21) | 0.0 % (0/21) | 0.03 \pm 0.02 |

(2) 脂肪組織の組織切片の免疫組織化学

過形成副甲状腺の周囲の脂肪組織に異所性 PTH 分泌能のあることが明らかになったが、脂肪細胞自身が PTH を分泌しているのかどうかは不明である。そこで PTH 分泌能の示された脂肪組織の組織切片に対し、抗体を用いた検出を行った。抗 PTH 抗体を用いた検出では、脂肪組織中に副甲状腺実質細胞と似た形態を持つ PTH 産生細胞からなる小さなコロニーが多数検出された (図 2)。副甲状腺の分化マーカーである GCM2 に対する抗体を用いた検出も PTH 分泌細胞と同じ分布を示した。

この結果より、異所性 PTH 産生が実験操作中の副甲状腺細胞の混入によるものではないことは明らかで、摘出以前から異所性 PTH 産生細胞はこれらの組織中で機能していたと思われる。

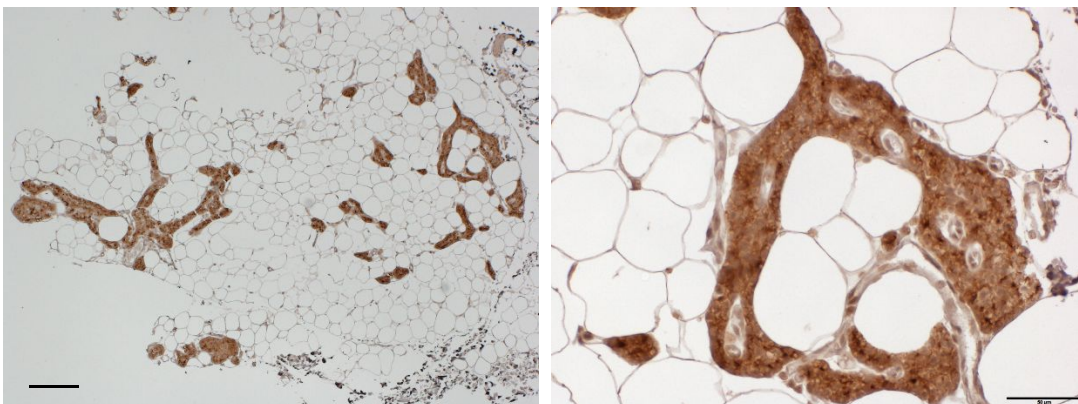


図 2 . 抗 PTH 抗体による副甲状腺周囲の脂肪組織における異所的な PTH 産生細胞の検出 (呈色 : DAB、スケールバー 左 : 200 μ m、右 : 50 μ m)

(3) SHPT 動物モデルへのヒト副甲状腺組織の移植

過形成副甲状腺周辺の脂肪組織とそこに散在する PTH 分泌能細胞の由来を調べるために、SHPT モデル動物の甲状腺下にヒト副甲状腺の切片を移植した(図3)。当初は移植片周辺に脂肪組織が蓄積して異所性 PTH 分泌が再現されることを期待して、これらの細胞がヒトとラットのどちらに由来するかを明らかにする予定であったが、げっ歯類では過形成副甲状腺に脂肪の蓄積する例は知られておらず、ヒト過形成副甲状腺の再現はできなかった。しかしながら移植後 1~3 か月の移植片に脂肪マーカー (PPAR 2 と perilipin A) の発現が検出され、副甲状腺細胞の脂肪分化能が明らかにされた。

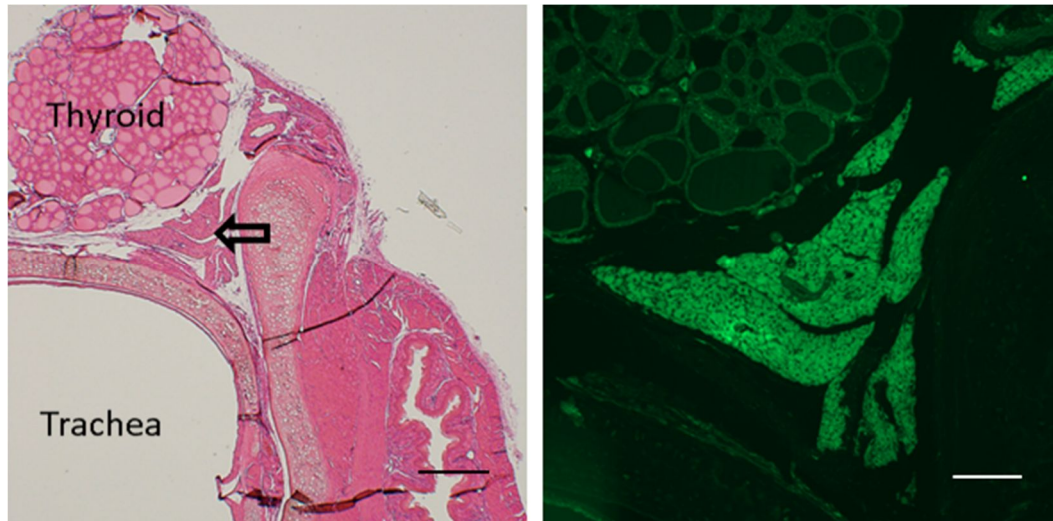


図3 . ラット甲状腺下へのヒト副甲状腺切片の移植。左: 移植部分の組織切片の HE 染色 (矢印; 移植片、スケールバー; 500 μ m) 右: 隣接切片の抗ヒト特異抗体染色(スケールバー; 50 μ m)

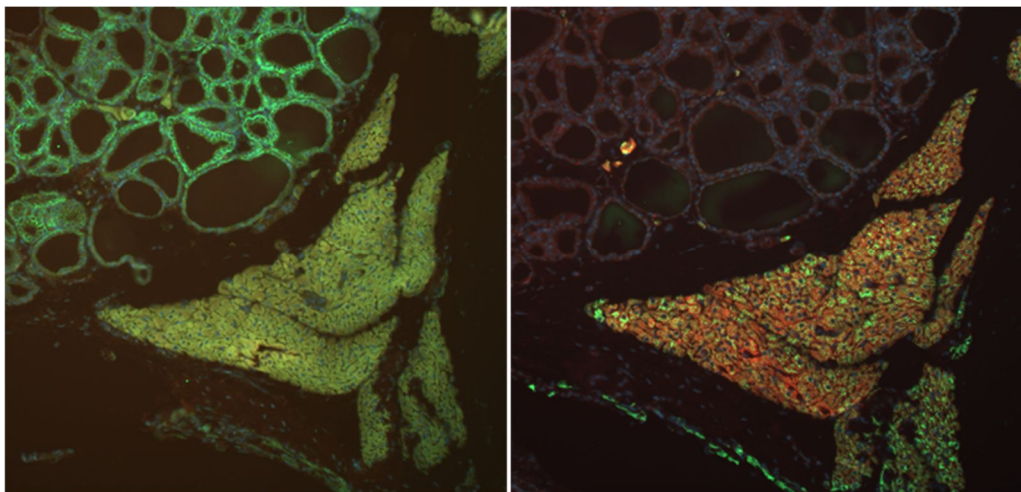


図4 . ラット甲状腺下へのヒト副甲状腺移植片に発現される脂肪分化マーカーの検出(二重染色 緑; 脂肪マーカー、赤; ヒト特異抗体) 左: PPAR 2、右: perilipin A

(4) 結論と今後の展望

今回の結果は、多くの SHPT 患者の過形成副甲状腺の周辺脂肪組織中に異所性 PTH 分泌細胞が散在することを明らかにし、またヒト副甲状腺細胞が脂肪分化能を有することを示した。これの結果より過形成副甲状腺周辺の脂肪蓄積の機序を考えると、副甲状腺の過形成が進行し単一の大きな結節が腺全体を占め周囲に厚い被膜を形成する過程で、小さな結節を構成していた細胞が被膜外へ押し出され、その一部が脂肪細胞へ分化転換したと推測される。今後の調査により、この機序を明らかにするとともに、腺に蓄積する脂肪が SHPT の進行にどのような影響を与えるものであるかを明らかにしたい。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kakuta Takatoshi、Sawada Kaichiro、Kanai Genta、Tatsumi Ryoko、Miyakogawa Takayo、Ishida Mari、Nakazawa Raima、Fukagawa Masafumi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Parathyroid hormone-producing cells exist in adipose tissues surrounding the parathyroid glands in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60045-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|--|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 角田 隆俊 (KAKUTA Takatoshi) (50276854) | | |
| 研究協力者 | 金井 厳太 (KANAI Genta) (00535221) | | |
| 研究協力者 | 澤田 佳一郎 (SAWADA Kaichiro) (10420952) | | |
| 研究協力者 | 都川 貴代 (MIYAKOGAWA Takayo) (50631842) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 石田 真理 (ISHIDA Mari) | | |
| 研究協力者 | 中澤 来馬 (NAKAZAWA Raima) | | |
| 研究協力者 | 深川 雅史 (FUKAGAWA Masafumi) (00211516) | | |