

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09030

研究課題名(和文) iPS細胞からの新規甲状腺、副甲状腺モデル細胞の樹立

研究課題名(英文) establishment of a novel thyroid and parathyroid cells from iPS cells

研究代表者

鈴木 悟 (Suzuki, Satoru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30222061

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)：甲状腺、副甲状腺モデル細胞樹立を目指した。iPS細胞の樹立と最適化を行い、甲状腺、副甲状腺上皮細胞への分化誘導法の最適化のために、内胚葉細胞への分化誘導、前腸内胚葉細胞への分化誘導を行い、最終的に甲状腺前駆細胞または第3咽頭嚢細胞への分化誘導を行った。これまでに第3咽頭嚢内胚葉由来の胸腺上皮前駆細胞の分化誘導法が報告されている。その手法で使用されているFGF, BMP, WNT, SHHのシグナリング誘導リガンドまたは特異的阻害剤を第4咽頭嚢内胚葉に対して様々な組み合わせで投与したところ、副甲状腺前駆細胞または甲状腺C細胞前駆細胞のマーカー遺伝子群の発現を誘導できる組み合わせを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞に対する反応を検証するためには、その細胞が継代、すなわちちょうど植物の植え替えのように持続的に育てられなくてはなりません。現在の継代出来る細胞株はそのほとんどが癌細胞から派生した細胞株です。甲状腺や副甲状腺細胞は、細胞のなかでも高度に分化した細胞で、継代出来る細胞株はほとんどありません。この研究では、iPS細胞の技術を利用し、高度に分化した細胞株を樹立、癌化を含めたさまざまな変化における分子メカニズムを解明するため推進しました。結果、甲状腺、副甲状腺細胞に分化する前の状態までの細胞を作成することに成功しました。

研究成果の概要(英文)：To establish thyroid and parathyroid cell lines, we have been established and optimized the iPS cells. Prior to optimize the differentiation derivative method for thyroid and parathyroid epithelium cells, we have induced the differentiation for an endoblast cells and a foregut endoblast cells. Consequently, we have succeeded to differentiate thyroidal outrider cells or the third pharyngeal bursa cells. The differentiation derivative method of the thymus epithelium outrider cell derived from the third pharyngeal bursa endoblast is reported so far. After giving various combination of signaling inducing ligands such as FGF, BMP, WNT, and SHH or their inhibitors for the differentiation to fourth pharyngeal bursa endoblast, we have succeeded to identify the combination that could guide the expression of the marker gene cluster of parathyroid gland outrider cell or the thyroid gland C cell outrider cell.

研究分野：thyroidology

キーワード：thyroid parathyroid

### 1. 研究開始当初の背景

福島県では東日本大震災後、震災当時18歳以下の住民に超音波による甲状腺検査を行っている。この事業により、多くの乳頭癌が発見されている。現時点で、この多発は放射線被曝の影響ではなく、精度の高い甲状腺超音波検査を行っているため、ごく初期の微小癌を含めた早期癌を見つけている可能性が高い。微小癌の自然経過がよくわかっておらず、切除しなくても予後が変わらないかもしれない癌を切除することで過剰医療の可能性が臨床上的問題点として指摘されている。一方で、個々の症例では、リンパ節転移や甲状腺外浸潤を来している症例も多く認められ、症例によっては甲状腺全摘となる場合がある。甲状腺全摘の場合、甲状腺機能低下症のみならず、副甲状腺の偶発的な切除により副甲状腺機能低下症を来す場合もある。これらの低下症は、現在では、一生ホルモン剤、カルシウム製剤を毎日服用し続けなくてはならず、若年者でのこの永続的な服用は、定期通院を一生強いることになり、それ自体生活の質を低下させる。

研究開始までの応募者の臨床的な報告から、若年者の甲状腺について疫学的見地から次のことが明らかにされてきた。

1. 甲状腺乳頭癌の多くは大きさが2.3年の経過では有意に変化しないこと。
2. 甲状腺自体の大きさは、年齢やBody Mass Index(以下BMI)よりも体表面積に相関し、女性の方が大きいこと。左葉より右葉が大きいこと。
3. 甲状腺片葉欠損では、健側甲状腺が代償的に肥大することにより甲状腺機能を補うこと。
4. 甲状腺内に残存する胸腺は、年齢とともに消失することは知られているが、これがBMIの上昇や、性差が独立した因子として関わっていること。
5. 甲状腺結節形成は良性悪性を問わず血液中の甲状腺ホルモンに影響は与えないが、TSHの低下と相関すること。

これらの臨床的知見から得られたデータを用い、それぞれの知見の分子メカニズムを明らかにすることそして微小癌の予後因子についての知見を得るためには疫学的方法では限界がある。基礎研究としてin vitroでの細胞実験モデルを構築し、さらにはin vivoでの甲状腺結節、癌モデル動物を構築することが望まれた。

### 2. 研究の目的

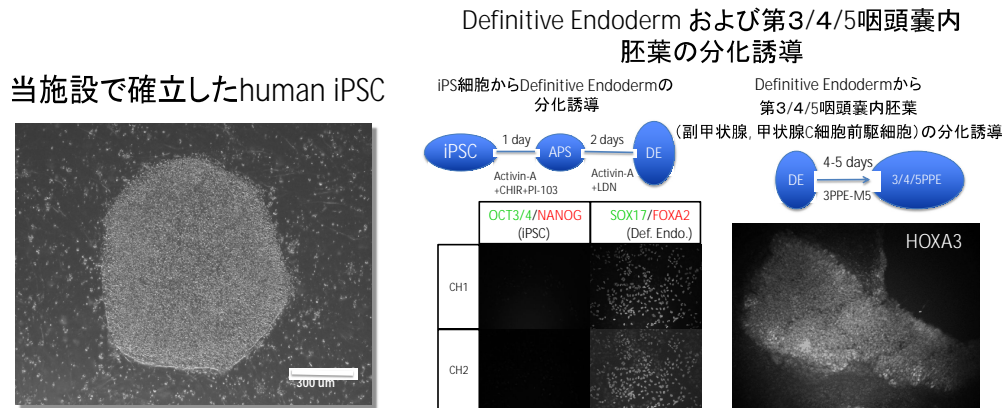
一連の原因による甲状腺、副甲状腺機能低下症解決のため、最終的に自己の甲状腺、副甲状腺を再生し、従来からの自己移植方法を用い、前腕部皮下に移植する方法が望まれる。この方法により、正常甲状腺によるホルモン分泌、副甲状腺による血清カルシウム、リン濃度の自己調節が可能となり、機能低下症を完治できる。最終的には、そこがゴールとなるが、その過程で甲状腺結節、癌の自然経過モデルを構築し、微小癌の予後因子を明らかにし、分子機構の詳細を明らかにすることにより、新しい分子標的治療薬を含めた新規治療法の確立も可能であり、目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、1. iPS細胞から、甲状腺、副甲状腺細胞の誘導と確立。2. in vitroにおける甲状腺、副甲状腺ホルモン発現調節の分子機構の解明。並びに結節、癌化誘導条件の検索を主な目的とし、さらに3. 機能低下症モデルマウスを用いて細胞の移植実験あるいは癌生育実験を通し、治療効果の評価を行うこととする。

## 1. 試験管での甲状腺、副甲状腺モデル細胞の最適化

モデル細胞樹立のため既に下記の段階の細胞は樹立済みである。第1段階:iPS細胞の樹立と最適化(下左図)。第2段階:甲状腺、副甲状腺上皮細胞への分化誘導法の最適化(下右図)をする。



最終段階として、分化誘導に関わるシグナル伝達経路を活性化することで、甲状腺からのサイログロブリン合成、副甲状腺からのPTH前駆体合成等の確認を行う。

## 2. 副甲状腺における、カルシウムによるPTH遺伝子発現に対するネガティブフィードバック機構の解明

## 3. 甲状腺結節の発症生育と癌化、その分子のプロセス解明

モデル細胞構築により、濾胞形成、ひいては結節形成を試験管レベルで観察可能となり、結節における遺伝子プロファイルを探索することにより、腺腫形成との違いを明らかにする。

## 4. マウスへの移植実験

PAX8, Gcm2 遺伝子ノックアウトマウスその他、副甲状腺機能低下症マウスが報告されており、入手可能である。これらのマウスに確立した細胞を移植することにより、血清カルシウム、PTH、ビタミンD代謝物の濃度変化、骨量評価を行い、臨床応用が可能であるか評価する。

## 4. 研究成果

初年度は、甲状腺濾胞細胞と副甲状腺上皮細胞に共通する前駆細胞である、前腸内胚葉細胞の分化誘導法の最適化までを実施した。iPS細胞から、甲状腺、副甲状腺細胞の分化誘導の確立をした。正常iPS細胞 409B2を用いて、これまでに甲状腺濾胞細胞 (thyroid follicular cell, TFC)と副甲状腺上皮細胞 (parathyroid epithelial cell, PTEC)の共通の前駆細胞である、前腸内胚葉細胞の分化誘導法の確立を行ってきた。

### STEP1. 内胚葉細胞の分化誘導

内胚葉細胞の分化誘導は2段階誘導法を用いた。まず、iPS細胞から内胚葉細胞への発生運命が決められている前方原条 (anterior primitive streak, APS) を分化誘導するためのシグナル分子と低分子化合物を投与し24時間培養した。さらに、APSを内胚葉 (definitive endoderm, DE) に分化誘導するためのシグナル分子と低分子化合物を投与し24時間培養した。免疫組織化学法によって分化状態を解析したところ、約90%の効率でiPS細胞からDE (FOXA2/SOX17二重陽性) を分化誘導できるようになった。

### STEP2. 前腸内胚葉細胞の分化誘導

内胚葉形成後において頭尾軸に沿ったパターン形成が行われ、内胚葉細胞から前腸内胚葉細胞、

中腸内胚葉細胞、後腸内胚葉細胞が分化誘導される。それぞれの細胞では領域特異的なマーカー遺伝子群(OTX2, PDX1, HOXD13)の発現が誘導される。TFC と PTEC の共通前駆細胞である前腸内胚葉細胞を誘導するためのシグナル分子または低分子化合物を投与し、RT-PCR 法によって各領域特異的なマーカーの発現を確認したところ、前腸内胚葉マーカーである OTX2 の発現上昇が確認できた。一方、中腸内胚葉マーカーである PDX1, 後腸内胚葉マーカーである HOXD13 の発現は確認できなかった。以上の結果は、iPS 細胞から前腸内胚葉の分化誘導が可能になったことを示している。

その後、甲状腺前駆細胞または第3咽頭嚢細胞への分化誘導を行った。これまでに第3咽頭嚢内胚葉由来の胸腺上皮前駆細胞の分化誘導法が報告されている。その手法で使用されている FGF, BMP, WNT, SHH のシグナリング誘導リガンドまたは特異的な阻害剤を第4咽頭嚢内胚葉に対して様々な組み合わせで投与したところ、副甲状腺前駆細胞または甲状腺 C 細胞前駆細胞のマーカー遺伝子群の発現を誘導できる組み合わせを同定した。

実験経過中、簡便な遺伝子改変方法の最適化に成功したため報告した(Sci Rep 2020;10:13927)。

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 1件）

1. 著者名 Yokouchi Yuji, Suzuki Shinichi, Ohtsuki Noriko, Yamamoto Kei, Noguchi Satomi, Soejima Yumi, Goto Mizuki, Ishioka Ken, Nakamura Izumi, Suzuki Satoru, Takenoshita Seiichi, Era Takumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid repair of human disease-specific single-nucleotide variants by One-SHOT genome editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70401-7	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 -

〔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
研究分担者	横内 裕二 (Yokouchi Yuji) (60252227)	熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員  (17401)	
研究分担者	中村 泉 (Nakamura Izumi) (80423804)	福島県立医科大学・医学部・博士研究員  (21601)	
研究分担者	大河内 千代 (Ookouchi Chiyo) (90583609)	福島県立医科大学・医学部・助教  (21601)	

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
---------	---------