

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07252

研究課題名（和文）副甲状腺の機能維持に関わる新たな細胞（PMCs）の同定と腺構成細胞の再検討

研究課題名（英文）Identification of new parathyroid cells, parathyroid maintenance cells (PMCs), and re-evaluation of parathyroid constituent cells

研究代表者

辰巳 徳史 (Tatsumi, Norifumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60514528

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）：本研究では副甲状腺細胞の機能形態維持を果たす細胞parathyroid maintaining cells (PMCs)を特定するため、副甲状腺細胞の再検討する実験をおこなった。副甲状腺細胞を詳細に分類するために副甲状腺のシングルセルトランスクリプトーム解析を行い主細胞、酸好性細胞とは異なる細胞集団を同定した。この細胞がPMCである可能性が示唆され、その細胞集団を副甲状腺で確認すると血管に隣接した細胞であることが明らかとなった。これらのことから、本研究ではPMCsに相当する細胞の存在とそれが存在する領域の特定を果たした。この結果は、副甲状腺細胞の新たな研究の扉を開く重要な発見につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年々増加する慢性腎不全によって、副甲状腺の過形成患者が増加している。副甲状腺の過形成は、過剰なPTHを産生・分泌し、循環器系の重篤な障害につながることが知られており、副甲状腺の過形成を抑制・治療できる方法が求められている。我々は本研究で、副甲状腺に存在する新たな細胞集団（PMC）を同定し、それらが細胞増殖や内分泌機能に大きな役割を果たす可能性を見出した。PMCの詳細な理解は、副甲状腺の過形成の治療だけでなく、過形成に至る前の予防にも応用可能である。また、これまでの概念を覆す新規細胞の同定という学術的な新規性も持つ研究となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted experiments to reassess parathyroid cells in order to identify the parathyroid maintaining cells (PMCs) responsible for maintaining the function and morphology of parathyroid cells. To classify parathyroid cells in detail, we performed single-cell transcriptome analysis of the parathyroid gland and identified a cell population distinct from chief cells and oxyphil cells. This suggested that these cells could be PMC, and upon examining this cell population in the parathyroid gland, it was found to be located adjacent to blood vessels. From these findings, we confirmed the existence of cells corresponding to PMC and identified the regions where they are located. This result led to an important discovery that opens new doors for research on parathyroid cells.

研究分野：発生学、機能形態学、分子生物学

キーワード：副甲状腺 parathyroid シングルセルトランスクリプトーム Gcm2 主細胞 副細胞 細胞増殖

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血中カルシウム濃度の維持は、副甲状腺細胞が血中カルシウム濃度の低下を感知し、パラトルモン(PTH)を分泌することで、骨からのカルシウムの放出を促すことによって行われている。慢性腎不全に起因する副甲状腺機能亢進症では過形成になった副甲状腺細胞から過剰な PTH が分泌され、持続的な骨からのカルシウムの放出が二次的に循環器疾患を引き起こすため、副甲状腺の過形成メカニズムの解明が副甲状腺機能亢進症の治療に必須だと考えられている。しかしながら、まだ過形成メカニズムは解明できていない。その原因は、多くの副甲状腺研究が過形成が起きた副甲状腺を用いて行われており、正常な副甲状腺の情報がほとんど議論されていないことに起因しているためである。甲状腺細胞の詳細な理解は、副甲状腺の過形成メカニズムの解明につながることで予測されており、その治療に大きく貢献することが期待されている。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究結果 (Yamada et al.,2019) から副甲状腺には機能と形態を維持する細胞が存在する可能性を想起した。我々はこの細胞を **parathyroid maintaining cells (PMCs)** と名付け PMCs の存在を確認するために、副甲状腺細胞の再検討と PMCs の同定を研究の目的とした。PMCs の同定とその理解は副甲状腺の過形成メカニズムを解き明かす鍵になると考えられる。

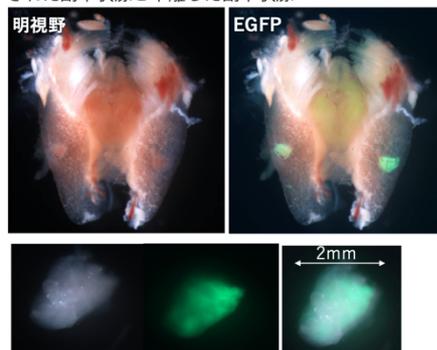
3. 研究の方法

PMCs を同定するために副甲状腺の再検討が必要となり、その方法としてシングルセルトランスクリプトーム解析による細胞種の同定を試みた。トランスクリプトームの解析結果から、特定の細胞集団を同定可能な細胞マーカーの同定を *in situ* HCR 法で検証した。また、増殖能を持った細胞の分布について、高解像度な解析を行った。

4. 研究成果

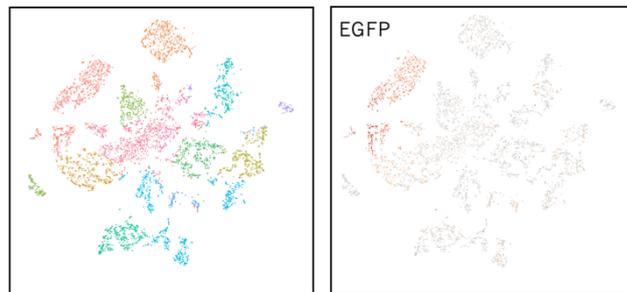
①マウス副甲状腺は非常に小さく、甲状腺に埋没している器官であるため、顕微鏡下で副甲状腺を特定するのは非常に困難である。そこで我々は副甲状腺特異的に発現する遺伝子 *Gcm2* を EGFP に置換した BAC クローンが挿入された *Gcm2*-EGFP マウスを用いて、副甲状腺が甲状腺内で可視化できるかを検証した。その結果 *Gcm2*-EGFP マウスを用いると甲状腺内の副甲状腺が容易に認識でき、それによって副甲状腺をきれいに単離する事が可能となった (図 1)。

図1
Gcm2-EGFPマウスでEGFP蛍光タンパク質で可視化された副甲状腺と単離した副甲状腺



②次にシングルセルトランスクリプトームを行うために、副甲状腺をバラバラにする方法を検証した。副甲状腺は甲状腺の中で分厚い被膜に覆われたタイトな上皮集団であるため、通常の細胞をバラバラにする操作では非常に難しいことが明らかとなった。そのためプロトコルを見直し、週齢を6~8週のマウスを用いること、副甲状腺を特別に調整した酵素液の中で処理することで、シングルセルトランスクリプトーム解析が行える細胞の調整が可能となった。その細胞を用いて、解析をおこない、結果を得ることができた。約6000個の細胞がシーケンスされ、14のクラスターに分けることができた(図2)。その中からさらにEGFP遺伝子の有無で副甲状腺の細胞集団の特定を行った(図2)。この副甲状腺細胞のクラスターは大きく3つに分類でき、更に詳細に分離すると5つに分けることができた。3つのクラスターはそれぞれ主細胞と酸好性細胞ともう一つの集団に分けられた。この集団はセルサイクルや副甲状腺の機能に関連した遺伝子発現が他の集団よりも高い特徴を持っており、PMCsではないかと考えた。

図2 シングルセルトランスクリプトーム解析による副甲状腺の細胞クラスターとEGFP陽性細胞の分布



③この細胞を副甲状腺内で同定するために、in situ HCR法の改変であるin situ paletteを用いて細胞の同定が可能であるかを検証した。in situ paletteは副甲状腺で知られているいくつかのマーカー遺伝子で検証し、この方法によって1細胞レベルで遺伝子発現を確認できることが明らかになった(図3 マゼンタ=PTH)。さらにPMCsと考えられる細胞集団で特異的に発現する遺伝子Xについて発現解析を行った結果、血管に隣接する細胞で非常に強い遺伝子Xの発現(図4 緑色)を示す細胞が認められた。遺伝子Xの副甲状腺における機能はまだ明らかでないが、他の細胞では強い細胞増殖を誘導することが知られており、血液のカルシウムレベルを感知して、細胞増殖やPTH分泌などを周囲の細胞に伝え調節をする中心的な細胞である可能性が考えられた。この細胞は我々の考えているPMCsに相当する細胞であることが強く示唆された。

図3 副甲状腺細胞マーカーによるin situ paletteの検証
マゼンタ=PTH

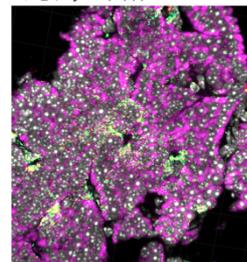
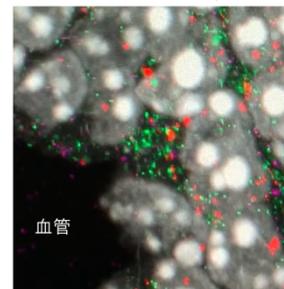
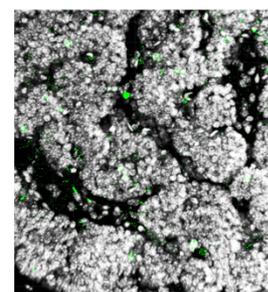


図4 PMCs集団特異的のマーカー(遺伝子X=緑)のin situ palette



④PMCsに相当する細胞は細胞増殖マーカー遺伝子の発現が多いことから、細胞増殖を行う細胞との関連が示唆された。そこで副甲状腺の細胞増殖が実際にどこで行われているのかを検証するために、増殖細胞マーカー(Ki67)抗体を用いて副甲状腺における増殖細胞の観察を行った。その結果、Ki67陽性細胞は血管に隣接する領域に多く分布することが明らかとなった。

図5 副甲状腺の増殖細胞(Ki67染色=緑) 黒い溝=血管



本研究では PMCs とと思われる細胞集団が存在することをシングルセルトランスクリプトーム解析から明らかにし、PMCs 特異的なマーカー遺伝子が血管に隣接する細胞で強く発現していることを明らかにした。また副甲状腺の増殖細胞は血管周囲に多いことも明らかとなった。これらのことから、血管に隣接する PMCs は血中のカルシウム濃度に応じて周りの細胞の増殖や PTH の分泌などの調節し、副甲状腺の機能と形態の維持を行っている可能性が明らかになり、副甲状腺には主細胞と副細胞の他に、PMCs 細胞の存在を細胞生物学的、分子生物学的に示した初めての研究結果となった。この細胞のさらなる詳細な解析は副甲状腺の過形成メカニズムの解明に貢献し、その治療に大きな発展をもたらすことが期待される。

<参考文献>

Yamada T, Tatsumi N, Anraku A, et al. PLoS One. 14(1):e0210662. 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辰巳徳史, 岡部正隆
2. 発表標題 副甲状腺のシングルセルトランスクリプトーム解析によるPMCs細胞の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳徳史, 岡部正隆
2. 発表標題 副甲状腺の内分泌機能の維持に必要な細胞の新陳代謝を担う細胞群PMCsの探索
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部正隆
2. 発表標題 鰓から副甲状腺へ
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳 徳史, 橋本 尚詞, 岡部 正隆
2. 発表標題 Three-dimensional distribution of proliferating endocrine cells in parathyroid gland of mice of different ages
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	岡部 正隆 (Okabe Masataka)		研究議論

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