

副甲状腺組織の機能再生に向けて

～多能性幹細胞由来 PTH 分泌細胞の誘導法の開発～

岩脇 菜摘

大阪ハイテクノロジー専門学校 生命工学技術科 バイオサイエンス専攻

要旨：副甲状腺組織は、その組織より分泌される副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone: PTH) によって、血中 Ca^{2+} 濃度といった内分泌の調節を厳密に制御しており、生命維持活動に重要な役割を担っている。現在のところ副甲状腺組織の機能不全に対する根本的な治療法はなく、新しい介入法の実用化が求められている。最近様々な分野で期待されている再生医療では、多様な細胞へと分化する能力と半永久的な高い増殖能を持つ多能性幹細胞を用いた治療法が注目されている。もしも、この多能性幹細胞から副甲状腺組織を作り出すことができれば移植による治療が可能になると考えられる。そこで本研究では、多能性幹細胞から PTH を発現する副甲状腺細胞の誘導法の開発を試みた。マウス胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell; ES 細胞) を材料とし、自発的な分化誘導:胚様体および疑似胚発生モデル:Gastruloid を介した誘導法を検討した。自発的な分化誘導:胚様体法では、副甲状腺マーカー遺伝子 *Gata3*, *Gcm2*, *Pth* の発現上昇が認められなかった。一方で、初期胚発生と類似した分化を伴う Gastruloid 法を用いたところ、マーカー遺伝子の発現上昇が認められ、副甲状腺細胞の出現が示唆された。そこでさらなる効率化を目指し、*Gcm2* 遺伝子を過剰発現させた ES 細胞を用いて誘導したところ、期待していた通り *Pth* 遺伝子を高発現する副甲状腺細胞の誘導が可能であった。以上の結果は、多能性幹細胞より *Pth* 発現副甲状腺細胞の誘導が可能となり、副甲状腺組織再生を目指した治療方法の開発に繋がる。さらに、本研究の用いた Gastruloid による誘導法は試験管内において副甲状腺の発生過程を可視化できることから、副甲状腺の理解に重要な知見となりうる。

Keywords：多能性幹細胞, 副甲状腺, PTH, 分化誘導, 再生医療

1. 緒言

副甲状腺組織は、体内においてカルシウムやマグネシウムなどのミネラル代謝に重要な役割を果たしている¹⁾。副甲状腺組織で発現しているカルシウム感受性受容体(CaSR)と副甲状腺ホルモン(Parathyroid Hormone; PTH)が連携することで血液中のカルシウム量は一定に保たれる。一定に保たれる仕組みとして、血液中のカルシウム量が低下すると、副甲状腺細胞で発現している CaSR がカルシウム低下を検知し、それによって副甲状腺細胞から PTH 分泌が促進される。一方で血液中のカルシウム量の増加が検知されると、PTH の分泌が抑制される。その後、骨や腎臓に作用し、カルシウムの排出あるいは吸収を促すことで血中のカルシウム濃度を厳密に制御する。そのため、副甲状腺において腫瘍や遺伝的疾患によってその機能が果たされなくなると生体内のカルシウムバランスが崩れ、副甲状腺機能亢進症や、低カルシウム血症などの疾患となる。現在のところ、副甲状腺組織の機能不全に対する治療法は、投薬によるカルシウム補充法しかない。また、臨床研究として、PTH を直接補充するといった方法も考えられているが、どちらも対症療法であり、その投薬量の管理が難しく、根本的な治療ではない。そのため、生涯にわたって治療を続けられないといけないため、患者さんへの肉体的、精神的負担が大きく、新規治療方法の開発が求められている。

近年、再生医療による新しい医療が現実のものとなってきている。再生医療は、損傷した組織あるいは機能不全となった部位に新たに正常な細胞を移植することでその機能回復を期待する治療法であり、これ

まで治療が不可能であった疾患にも対応できると期待されている。再生医療に用いられる細胞の中でも我々は多能性幹細胞に着目した。多能性幹細胞は、「様々な細胞へ分化できる能力」と「半永久的に増殖できる能力」を持つことから、移植細胞の供給源として期待されており、現在多くの分野で研究が進められている²⁾。副甲状腺組織は、非常に小さい内胚葉由来の臓器となり、咽頭嚢に属する上皮系の組織となる。しかし、その発生過程は非常に複雑で詳細な研究が進んでいないことから、この発生を試験管内で再現することは非常に難しい。実際、多くの研究者が、Pth を発現する細胞を作り出そうとしているが、正常な機能を有した副甲状腺細胞の誘導法の報告はない。そこで、本研究では、自発的に分化させる胚様体と、近年新しく確立された Gastruloid に着目した方法を検討した。胚様体法は人工的に特異な方向へ分化を促すのではなく、自然に分化する方法であるため、目的細胞の誘導方法が確立されていなくても自然に分化する過程で出現してくる可能性がある。しかし、単純な方法であるため、複雑な発生過程を経る細胞は分化できるのか不明なこと、狙って分化誘導するわけではないので効率が悪いことなどが考えられる。胚様体法に対し、Gastruloid は試験管内で胚発生を模倣する疑似胚モデルであり、正常な胚発生を追うことが出来る³⁾。そのため、複雑な発生過程を経る副甲状腺であっても正常な発生過程を経た副甲状腺様細胞の出現が期待できると考えた。本研究では、マウス胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell; ES 細胞)を材料とし、Gastruloid を介して機能性を持った副甲状腺様細胞を得ることを目的とした。

2. 方法

2-1 マウス ES 細胞の培養

マウス ES 細胞は、C57BL/6J マウスより樹立された。培養条件は、KnockoutDMEM に non-Essential Amino Acid, GlutaMax, 2-mercaptoethanol, 20% KnockoutSR(全て LifeTechnologies)を添加したマウス ES 細胞培養液を用い、0.1%ゼラチンコート上で 5%CO₂, 37°C インキュベーター内で培養した。毎日培地交換を行い、2日に一度、トリプシンによる継代を行った。

2-2 胚様体の誘導

コンフルエントに達したマウス ES 細胞をトリプシン処理によって単一細胞まで解離し回収した。その後、非接着のディッシュに 2.5×10^4 cells/cm² になるように細胞を播種し、10%FBS-DMEM 中で 5%CO₂, 37°C インキュベーターにて培養した。培地交換は2日間ごとに実施し、6日間培養した。

2-3 Gastruloid の誘導

コンフルエントに達したマウス ES 細胞をトリプシン処理によって単一細胞まで解離し回収した。その後、非接着のディッシュに 2.5×10^4 cells/cm² になるように細胞を播種し、1%KSR-Ndiff227(TAKARA)中で、5%CO₂, 37°C インキュベーターにて培養した。誘導 48 時間後に Wnt シグナルを活性化するために chiron を 3μM になるように添加した。誘導 72 時間後に 1%KSR-Ndiff227 に戻し、6日間培養した。培地交換は2日間ごとに実施した。

2-4 RNA 抽出および RealtimePCR 法による遺伝子発現解析

胚様体、Gastruloid とともに誘導日数 2, 4, 6 日にサンプリングを行った。RNA 抽出は、Trizol(LifeTechnologies)を用いて実施した。得られた RNA より TAKARA PrimeScript™ RT Master Mix を

用いて逆転写を行い，cDNA を得た．Realttime-PCR は，TAKARA TB Green® Premix Ex Taq™ II を用いて，CFX Connect リアルタイム PCR システム（BIORAD）にて行った．解析方法は，ddCT 法を用いて比較解析を実施した．

2-5 マウス Gcm2 遺伝子のクローニングおよび過剰発現細胞株の作成

マウス腎臓組織の cDNA を鋳型とし，PCR によってマウス Gcm2 遺伝子のクローニングを行った．得られた遺伝子を piggybac system vector plasmid（pPB-CAG-IRES-puro）における CAG promoter 以下に ligation した．得られた plasmid を用いてマウス ES 細胞へ electroporation 法による遺伝子導入を行った．導入後，puromycin を含むマウス ES 培養液にて 48 時間薬剤選抜を実施，得られた細胞を実験に用いた．

3. 結果

3-1 胚様体および Gastruloid の誘導

マウス ES 細胞を用いて胚様体および Gastruloid の誘導を行った．古典的な方法である胚様体は，浮遊状態で ES 細胞を培養することで自発的かつランダムに様々な細胞へ分化することが可能である．一方で，Gastruloid は多能性幹細胞の能力に着目した新しい誘導法である．Gastruloid は，分化途中で Wnt シグナルを活性化することで正常な胚発生を模範した形で分化が伴う細胞体である．そのため，この Gastruloid 中に副甲状腺細胞の出現が期待できる．大量に Gastruloid を誘導する必要があるため，本実験では改良し細胞数と培養環境を検討することで Gastruloid を得ることが可能であった．胚様体は，誘導日数が増すごとに腔状の構造を持つ凝集体が認められた（図 1，上部写真）．Gastruloid は，2 日目までは胚様体と大きな違いはないが，wnt シグナルの活性化によって誘導 4 日目，および 6 日目において縦方向に細胞体が延伸していることが認められる．これは初期胚発生における前後軸の構築を示す（図 1，下部写真）．以上のことから正常に胚様体および Gastruloid の誘導が可能であった．

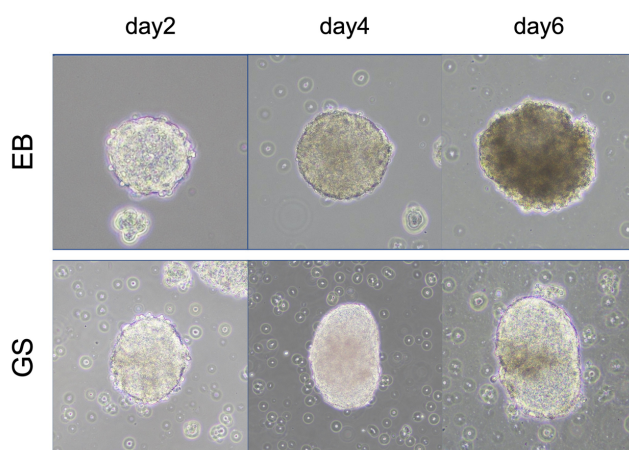


図1. 胚様体およびGastruloidの誘導

3-2 胚様体および Gastruloid における副甲状腺発生関連遺伝子の発現解析

得られた胚様体および Gastruloid において副甲状腺細胞が出現しているか評価するため，リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現解析を実施した．副甲状腺組織の発生では，初期内胚葉分化を示す Gata3 遺伝子，Pth を示す Pth 遺伝子，そして Pth 遺伝子の発現制御を行っており，副甲状腺組織の発生におけるマス

ター因子としていられている *Gcm2* 遺伝子を指標とした^{4,5)}。胚様体では、*Gata3* 遺伝子は培養日数を経るごとに上昇することが認められた。しかしながら、分化日数が経ても *Gcm2* および *Pth* 遺伝子の上昇は認められなかった(図2)。

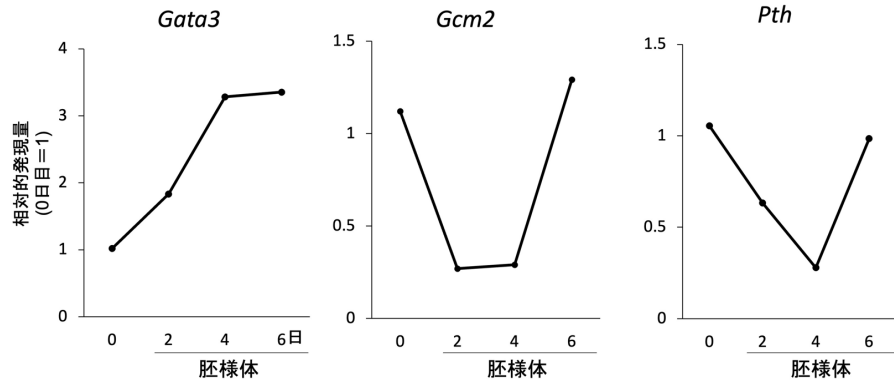


図2. 胚様体における副甲状腺発生関連遺伝子の発現解析

一方 *Gastruloid* では、胚様体と同様に *Gata3* 遺伝子の上昇が4日目まで認められた。驚くべきことに胚様体と比較して、*Gcm2* および *Pth* 遺伝子の発現が上昇していることが認められた。特に *Pth* 遺伝子の上昇は顕著であった。しかしながら、分化日数が進むことで *Gcm2* 遺伝子の発現低下が認められた(図3)。

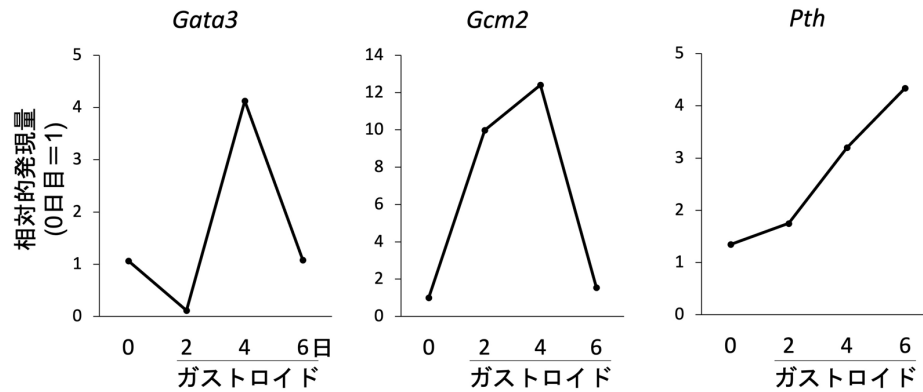


図3. *Gastruloid*における副甲状腺発生関連遺伝子の発現解析

3-3 *Gcm2* 過剰発現 ES 細胞由来 *Gastruloid* における副甲状腺発生関連遺伝子の発現解析

前実験において示された *Gastruloid* では *Pth* 遺伝子の発現上昇は認められたが、副甲状腺細胞の発生において重要な機能をもつ *Gcm2* 遺伝子の発現低下が認められた。そこで、*Gcm2* を恒常的に発現する ES 細胞を用いて *Gastruloid* を誘導することで、*Pth* 遺伝子をより高く発現する高性能な副甲状腺細胞が得られる可能性があると考え、*Gcm2* 過剰発現細胞を作成した。得られた *Gcm2* 過剰発現細胞は、未分化状態で維持することができ、さらに *Gcm2* 遺伝子の発現が 100 倍以上に増加していることが示された(図4)。

次に、これまでと同様の方法にて *Gastruloid* の誘導を試みたところ、コン

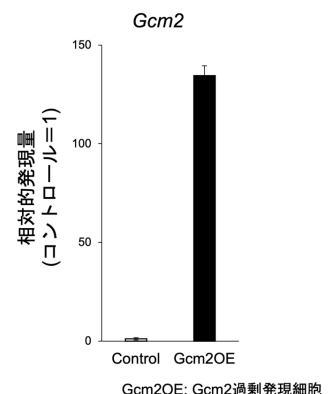


図4. *Gcm2*過剰発現細胞の作成

コントロールと同様に Gastruloid が得られた。得られた Gastruloid にて副甲状腺発生関連遺伝子について発現解析を行った。Gata3 遺伝子の発現は、コントロール細胞と同様に 4 日目までに発現上昇し、その後減少することが示された。期待していた通り、Pth 遺伝子の発現は培養日数を経過するごとに上昇していき、6 日目では 7 倍以上となっていた(図 5)。

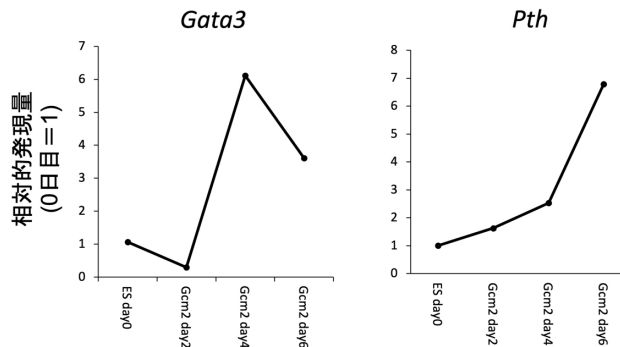


図5. Gcm2過剰発現細胞由来Gastruloidにおける副甲状腺発生関連遺伝子の発現解析

4. 考察

本研究では、マウス ES 細胞から副甲状腺細胞の誘導を行った。これまで多くの研究者によって多能性幹細胞から副甲状腺細胞の誘導が試みられてきた。しかしながら、現状、正常な機能を持つ副甲状腺細胞の誘導方法は確立されているとは言い難く、これまでとは異なる方法での誘導法が必要である。副甲状腺細胞の誘導が困難な理由として、正常なモデル細胞が存在しないこと、そして複雑な発生過程を経るため詳細が知られていないことが挙げられる。副甲状腺組織の発生は、内胚葉系譜でかつ甲状腺より発生が分かれ、咽頭嚢とよばれる別系譜へ移行したのちにさらに胸腺などの他の組織と分かれ副甲状腺へと分化する。このような複雑な発生過程を試験管内で再現することは現状では不可能である。本研究では、マウス多能性幹細胞がもつ多能性に着目し、試験管内で人工的に誘導するのではなく、自発的に分化させることができる胚様体法および自己組織化する Gastruloid を介した誘導法の開発を試みた。

胚様体法では、Gata3 遺伝子の発現上昇が認められた。これは初期内胚葉へと分化していることが示唆される。しかしながら、Gcm2 や Pth 遺伝子の発現上昇が認められなかったことから副甲状腺細胞への分化ができず、単純な初期内胚葉系譜の細胞に分化していることが考えられる。

一方で、Gastruloid では、胚様体と異なり、Gata3 遺伝子の上昇に伴って、Gcm2 や Pth 遺伝子の発現が上昇していることが認められた。これは初期内胚葉を経て、より複雑な内胚葉系譜、副甲状腺細胞へと分化していることが示唆される。これは Gastruloid に期待していた発生が行われていることを示し、非常に興味深い結果である。しかしながら、培養日数を経過するごとに Gcm2 遺伝子の発現が低下していることから副甲状腺細胞の機能低下が示唆される。そこで、さらなる効率化、および高性能な副甲状腺細胞を得るために、Gcm2 過剰発現細胞を用いた Gastruloid を誘導した。Gcm2 遺伝子は、Pth 遺伝子を中心とした副甲状腺細胞の発生に関わる遺伝子群を制御するマスター因子であることが知られている。そこで、Gcm2 遺伝子を恒常的に発現する細胞を用いることで機能的な副甲状腺細胞を得ることが可能ではないかと考えた。期待していた通り、Pth 遺伝子の発現がコントロール細胞と比べ、高い発現を示すことが明らかとなった。これは機能性を持つ副甲状腺細胞の出現が示唆され、効率的な方法であると考えられる。

5. 結語

現在の医療では、機能破綻した副甲状腺組織の再生は難しい。本実験の成果は、これまで不可能であった多能性幹細胞を由来とした副甲状腺細胞を得ることが可能であることを示す。これは、機能再生に対する移植に必要な細胞を大量に得る新しい技術である。また、副甲状腺は非常に複雑な発生を伴う組織であるが、このような複雑な組織へと分化させる技術はあまりなく、本方法で用いた **Gastruloid** は新たに誘導方法として有効な技術であるということが示された。以上の結果は副甲状腺組織再生に関わる治療方法の開発に繋がる。さらに、**Gastruloid** による誘導は副甲状腺の発生過程を可視化できる可能性があることから、副甲状腺の理解に重要な知見となりうる。

謝辞

本研究においてご協力いただいた近畿大学病院 高度先端総合医療センター 再生医療部の皆様には、温かいご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Okabe M et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17716-9.
- [2] Yamanaka S. Cell Stem Cell. 2020 Oct 1;27(4):523-531.
- [3] Moris N et al. Nature. 2020 Jun;582(7812):410-415.
- [4] Peissig K et al. Endocrinol Metab Clin North Am. 2018 Dec; 47(4):733-742.
- [5] Liu Z et al. Dev Biol. 2007 May 1;305(1):333-46