

学 校 名	東 京 慈 恵 会 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	多次元分析から観た病態へ至る副甲状腺細胞の立ち 居振る舞い ―遺伝子発現プロファイルと細胞系譜解析による細胞 変化の検討―		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①副甲状腺 ②内分泌 ③マウス ④遺伝子発現 ⑤組織構築 ⑥細胞分化 ⑦細胞系譜		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 部 正 隆	東 京 慈 恵 会 医 科 大 学 医 学 部	教 授	研究代表者 統括

○研究分担者

[illegible]

多次元分析から観た病態へ至る副甲状腺細胞の立ち居振る舞い — 遺伝子発現プロファイルと細胞系譜解析による細胞変化の検討 —

1. 研究の目的

(1) 本研究計画は、慢性腎不全モデルマウス (CKD マウス) を用いて、二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) に至る過程でどのように副甲状腺細胞が変遷していくのかを検討するものである。

① 緑色蛍光タンパク質 (GFP) を副甲状腺特異的に発現する遺伝子組換えマウスを用いて慢性腎不全を誘導し、SHPT の副甲状腺構成細胞の分類と配置を single-cell transcriptome 解析により明らかにする。すでに本研究室で得られている正常副甲状腺の single-cell transcriptome 解析の結果と比較することで、SHPT に至る過程における、副甲状腺を構成する細胞の変遷とその細胞系譜を明らかにする。

② 副甲状腺を構成する細胞の配置や詳細な遺伝子発現を明らかにするためのこれまでにない新たな方法を検証して、解像度の高い組織解析を行う。

(2) 上記の実験結果が副甲状腺培養細胞を用いて再現することが可能であるのかをラット副甲状腺培養細胞 PT-r を用いて検討を行う。

これらにより 正常と SHPT に至る過程における副甲状腺細胞の時間的空間的な変化を解明し、その成果を医学と生物学の双方に還元する ことを本研究計画の目的とした。

2. 研究の計画

(1) SHPT 副甲状腺の基本構造の解析

① これまでの研究から、副甲状腺細胞が非常に整った索構造を示し、その間には血管が存在していることが共焦点レーザー顕微鏡で確認されている。この血管から滲み出た血漿成分の Ca^{2+} の濃度を副甲状腺細胞が感知することで、PTH の分泌を行う。しかし、副甲状腺細胞の分布は血管に近いものと遠いものがあり、血管と副甲状腺細胞の配置が機能にどのように関係するのかについての詳細は明らかではない。SHPT における副甲状腺細胞の変化がどのような場所から起こるのかを詳細に知るため、副甲状腺細胞と血管との関係を明らかにする必要がある。そこで、副甲状腺が EGFP で可視化可能な Gcm2-EGFP マウスを用いて、動脈に RITC-ゼラチンを導入して解析を行い、副甲状腺細胞と血管との関連を検証した。

(2) SHPT 副甲状腺の single-cell transcriptome 解析

① Gcm2-EGFP マウスを用いて、アデニン含有試料を与えることにより、CKD を発症させ、SHPT 状態になったマウスから副甲状腺を取り出し、Single cell transcriptome 解析を行う。この際、CKD マウスの作成方法と Single cell transcriptome 用の細胞調整方法も新たに開発を行う。

(3) 副甲状腺細胞の細胞種特定のための新たな実験手法の検証

① 副甲状腺は主細胞と酸好性細胞の2種類の細胞に分類されるが、我々のこれまでの研究結果から同じ用なマーカー遺伝子を発現する副甲状腺細胞の中でいくつかの異なる細胞クラスターが存在することが明らかとなっている。それら細胞クラスターをより高解像度で分類するために、in situ HCR法の改変方である in situ HCR法の検証を行った。この方法では1度に3種類の遺伝子を mRNA1 分子の解像度で検出することが可能であり、SHPT 副甲状腺の解析をする上で非常に有用な情報をもたらす方法となる。

(4) 副甲状腺培養細胞 PT-r を使った再現実験

① SHPT マウスを作成するためには6週間以上の時間を要することから、より簡便に SHPT 副甲

甲状腺の状態が再現する方法が必要になると考えられた。そこで現存する唯一の副甲状腺培養細胞であるPT-rを用いて、その細胞がSHPTの解析に使用可能なものであるのかを検証する。

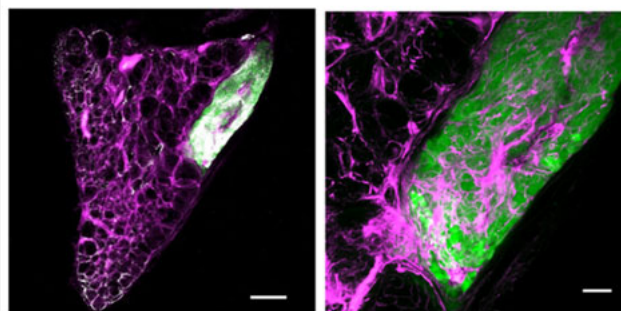
3. 研究の成果

(1) SHPT 副甲状腺の基本構造の解析

①副甲状腺がEGFPで可視化できるGcm2-EGFPマウスにRITCゼラチンを動脈から還流し、甲状腺ごと副甲状腺を取り出して共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。その結果、副甲状腺内の血管が詳細に観察できた。

副甲状腺内を走行する太い血管が甲状腺で認められる太い血管のシャープな像に比べ、ぼやけたような不鮮明な像となっていることが明らかとなった(図1)。これは副甲状腺内の血管でRITCゼラチンが

図1 RITCゼラチンによる副甲状腺を走る血管の可視化の検証実験



左：甲状腺とEGFPで可視化された副甲状腺
右：副甲状腺拡大像

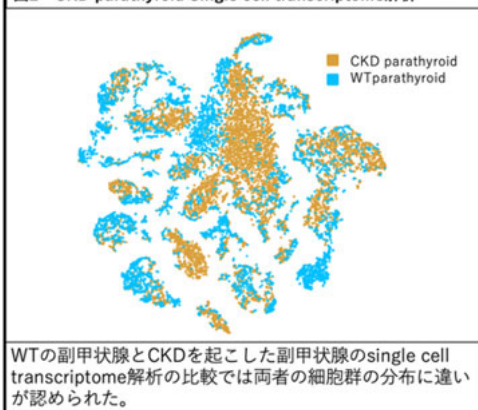
漏出しているためにこのように像が不鮮明になることが明らかとなった。甲状腺内の血管では漏出は観察されないため、副甲状腺の血管は血漿成分を透過しやすい有窓性の特殊な構造を持つ内皮細胞で構成されている可能性が示唆された。このような報告は未だなく、世界で初めて明らかになった研究成果である。

(2) SHPT 副甲状腺の Single-cell transcriptome 解析

①Single-cell transcriptomeを行うためにGcm2-EGFPマウスの生産と細胞の調整法について検証し、これまでよりも非常に効率の良い、細胞調整が可能となった。また、Gcm2-EGFPマウスを用いてCKDマウスを作成し、血清データからCKDになっていることを確認した。この方法でCKDを発症したSHPTの副甲状腺からSingle-cell transcriptome解析用細胞を調整することができた。

②SHPT副甲状腺からSingle-cell transcriptomeを行い、以前に行っていた正常な副甲状腺のSingle-cell transcriptomeと統合解析を行った。結果、CKDを発症したSHPT副甲状腺では正常副甲状腺と比較して副甲状腺細胞の分布が変化していることが明らかとなった(図2)。この結果は本研究が初めて明らかにしたものである。

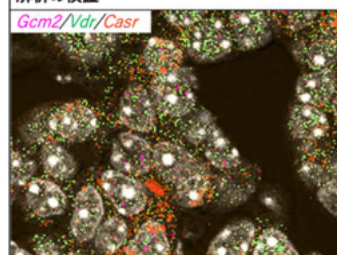
図2 CKD parathyroid Single cell transcriptome解析



(3) 副甲状腺細胞の細胞種特定のための新たな実験手法の検証

①Single-cell transcriptomeは遺伝子発現によって細胞群を分類した解析であり、その詳細を組織切片等で確認、解析する必要がある、今回その方法としてin situ palette(ネッパジーン株)を用いて検証を行った。数種類のプローブを作製して組織での遺伝子発現を確認した結果、非常に高解像度に副甲状腺細胞で発現する遺伝子を可視化することができた(図3)。

図3 in situ paletteを使った発現遺伝子の解析の検証



副甲状腺で発現する遺伝子をin situ paletteを使用して検出した。1分子のmRNA発現を可視化し、細胞特異的な発現の違いを検出できることが明らかになった。

(4) 副甲状腺培養細胞 PT-rを使った再現実験

①ラット副甲状腺に由来する培養細胞であるPT-rの培養とその性状の確認を行った。PT-rは副甲状腺の様々な遺伝子を発現する一方、副甲状腺に比べGcm2などの遺伝子発現が弱いことが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) 本研究全体は 2 年計画の研究として立案しており、初年度は CKD 副甲状腺の single-cell transcriptome と組織での解析方法の開発を中心に行い、一定の成果を得た。各研究内容の反省点を以下に記述する。

①SHPT副甲状腺の基本構造の解析の反省点として

ア Gcm2-EGFP マウスのジェノタイプに問題があり、使用できるマウスの数に制限があった。
イ 技術的な難しさから、さらなる解析方法の検証が必要となった。

現時点では Gcm2-EGFP のジェノタイプ問題は解決されており、CKD 発症 SHPT 副甲状腺の基本構造の解析を行う予定である。

②SHPT 副甲状腺の Single-cell transcriptome 解析の反省点として

ア ①と同様にマウスの生産に問題があった。

イ Single-cell transcriptome 解析が年度末になってしまったため、結果の検証が十分にできていない。

CKD 発症 SHPT 副甲状腺と野生型とのデータ解析から存在する細胞の違いが明らかであるため、どの細胞群に違いがあるのかを明らかにする予定である。

③副甲状腺細胞の細胞種特定のための新たな実験手法の検証の反省点として

in situ palette は非常に新しい手法だが、自家蛍光消失装置 (TiY0) の導入もあり問題なく行うことが出来、今後 SHPT 副甲状腺で増加、減少する細胞群の特定をこの方法で行う予定である。

④副甲状腺培養細胞 PT-r を使った再現実験の反省点として

PT-r の培養方法など取り扱いに苦労したが、現在は安定的に行えている。CKD 模倣培地などは試せていないため、検証が必要である。

上記の研究を総合的に判断するとマウスの産生や技術的な検証に時間を費やしたが、必要な研究を遂行できたと考えられる。本年度の結果は非常に重要であり、学会での発表を控えていたため、研究発表の成果が得られていないことが大きな反省点である。

(2) 考察

現在 Single-cell transcriptome を使用した研究はものすごい数が行われており、ヒト組織を用いた解析も多くなっている。副甲状腺についてもヒト組織を使った研究の報告がなされているが、用いられている試料は病状を示した組織である。そのため、それらで得られているデータは必ずしも正常な性状を示さないことが問題になっている。我々はマウスを使い、正常な副甲状腺と CKD を発症させ SHPT になった副甲状腺を使用することで、正常から病態への変化を捉えることができる唯一の研究となっている。実際本研究で得られたデータは SHPT では正常な副甲状腺で存在する細胞群が存在しないことが明らかとなった。このような知見はこれまでになく、正常な副甲状腺で存在する細胞がどのように変遷してしまうのかを明らかにすることが治療への鍵になると考えられる。そのため、今後更に、治療薬の影響のデータを追加することで、病状を示す副甲状腺が正常とどのように異なり、また、薬剤に対する感受性がどのように変化してしまうのかという問いにたいして、医学と生物学の双方に還元できる結果が得られることが期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表
なし

(3) 出版物
なし