

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ー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ー		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

本研究計画では、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）が発症する過程において、副甲状腺細胞がどのように変遷していくのかを検討するものである。これにより、SHPT の発症過程における副甲状腺細胞の時間的および空間的な変化を明らかにするとともに、その成果を医学と生物学の両分野に貢献させることを本研究計画の目的とする。

2. 研究の計画

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以下の研究計画を行う。

①SHPT 副甲状腺の各種構成細胞の分布解析

昨年度実施したCKDマウスのSHPT副甲状腺single cell (sc)RNA-seqデータと、既に実施済みの正常副甲状腺scRNA-seqデータとの詳細な比較解析を行う。これにより、CKDによるSHPT発症過程における副甲状腺細胞の変遷を明らかにする。また、正常副甲状腺とSHPT副甲状腺細胞間で変化の大きい遺伝子に着目し、その遺伝子の発現分布を組織化学的に解析することで、各構成細胞の分布・配置を明らかにする。さらに、Trajectory解析によって時系列的な変化も解析し、細胞がどのような位置で、形態的・機能的な変化を生じながら変遷していくのかを解明する。

②カルシウム受容体作動薬投与によるSHPT副甲状腺細胞種の変化解析

カルシウム感受性受容体（CaSR）は血中カルシウム濃度をモニタリングし、低カルシウム状態を感知すると副甲状腺の増殖やPTH分泌を促進する。CKDでは低カルシウム血症が生じやすく、それに伴い副甲状腺の異常増殖およびPTH分泌が亢進し、SHPTが引き起こされる。これに対して、CaSR作動薬はCaSRに結合し、血中カルシウム濃度の上昇を模倣する細胞内シグナルを活性化することで、副甲状腺の増殖やPTHの産生・分泌を抑制する。

しかし、CKD患者へのCaSR作動薬治療においては、薬剤に対する抵抗性を示す細胞が出現し、PTHの過剰分泌が制御不能となり、三次性副甲状腺機能亢進症（THPT）に移行することがある。このような抵抗性獲得のメカニズム解明のため、CKDマウスモデルにCaSR作動薬を投与し、副甲状腺を対象としたscRNA-seq解析を実施する。これにより、PTH分泌が持続するCaSR作動薬抵抗性細胞の特定を試み、その分子特性やシグナル伝達経路を明らかにすることで、将来的な治療標的としての可能性を検討する。

③SHPT の発症過程を解明

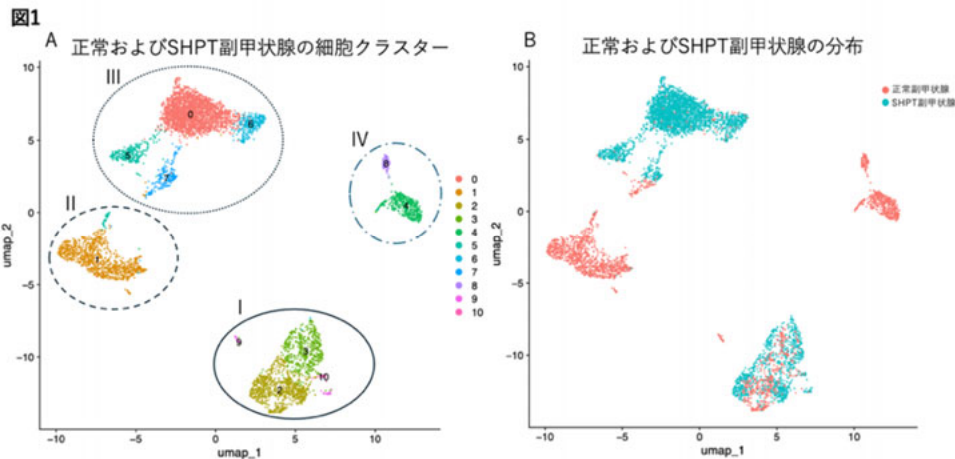
これまでの全ての解析結果を踏まえ、正常な副甲状腺がSHPTに至る過程で各構成細胞がどのような変化を示すかを包括的にまとめる。正常な副甲状腺構成細胞の細胞系譜と分布を含め、これまでにない副甲状腺の詳細な高次機能形態アトラスを完成させる。

3. 研究の成果

(1) SHPT 副甲状腺の各種構成細胞の分布解析

正常副甲状腺およびSHPT副甲状腺のscRNA-seq解析で、副甲状腺細胞のみを抽出しクラスター解析を行った結果、4つの大きな細胞群（クラスターⅠ～Ⅳ）に大別され、10のサブクラスターに分類された（図1A）。正常副甲状腺細胞とSHPT副甲状腺細胞の分布には明らかな相違が認められた（図1B）。これまでの我々の正常副甲状腺のscRNA-seqの解析から、主に3つのクラスターが同定されており、それぞれ遺伝子発現プロファイルから主細胞（クラスターⅠ）、酸好性細胞（クラスターⅣ）、および、高活性型主細胞（クラスターⅡ：我々が「第三の細胞群」と命名）がある。SHPT副甲状腺ではクラスターⅡおよびⅣがほとんど認められず、正常とは異なる

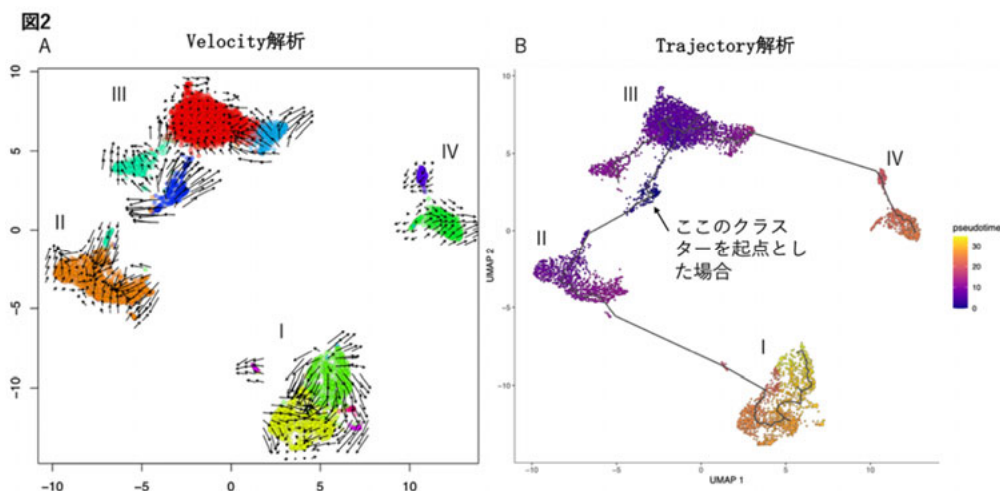
新たなクラスター（クラスターⅢ）が顕著に形成されていることが明らかになった（図1A, B）。このクラスターⅢは主にSHPT由来の細胞で構成されており、副甲状腺過形成に関与する可能性が示唆された。さらに、クラスターⅢはPTH遺伝子の発現が最も高く、細胞活性も著しく亢進しており、過形成の中心的役割を担う細胞群であることが示唆された。



このクラスターⅢの性質を明らかにするため、各クラスター間の分化関係を解析すべく、細胞の発展方向と速度を予測する Velocity 解析および細胞の遷移パターンを明らかにする Trajectory 解析を実施した（図2A, B）。

その結果、主細胞に相当するクラスターⅠはサブクラスター3から2へと分化していく様子が観察され、正常副甲状腺とSHPT副甲状腺細胞間で大きな違いは認められなかった（図2A-Ⅰ）。酸好性細胞に相当するクラスターⅣでは2方向に分化矢印が確認され、異なる分化段階の細胞群が存在する可能性が示された。クラスターⅡ（第三の細胞群）は、クラスターⅢ内のサブクラスター7から分化していることが推測され、クラスターⅡはクラスターⅠとは独立した**新規の副甲状腺細胞群**である可能性が高いと考えられた（図2A-Ⅲ）。さらに、SHPT副甲状腺特異的に観察されたクラスターⅢは、サブクラスター7や6からサブクラスター0の方向へと分化する経路が示唆されたが、サブクラスター0の矢印は短く、分化が進行していないことから、クラスターⅢの細胞はクラスター0へと分化する**SHPT特異的な細胞**であると考えられた。これらの細胞は**Identified SHPT Hyperplastic Cell: iSHyC**と名付けた。Trajectory解析の結果では、各クラスターの変遷パターン予測を行い、クラスターⅡ、Ⅲが比較的類似しており、そこからクラスターⅠやⅣへと変遷する可能性を示唆した。

以上の結果から、SHPT副甲状腺においては、正常副甲状腺に存在する高活性主細胞（クラスターⅡ）や酸好性細胞（クラスターⅣ）が消失し、変わって細胞活性が著しく亢進したSHPT特異的な異常細胞群（iSHyC, クラスターⅢ）が出現することが明らかとなった。



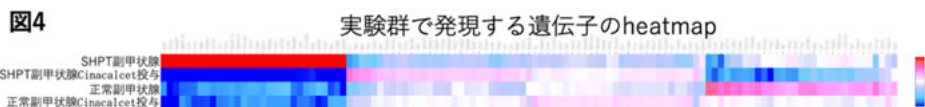
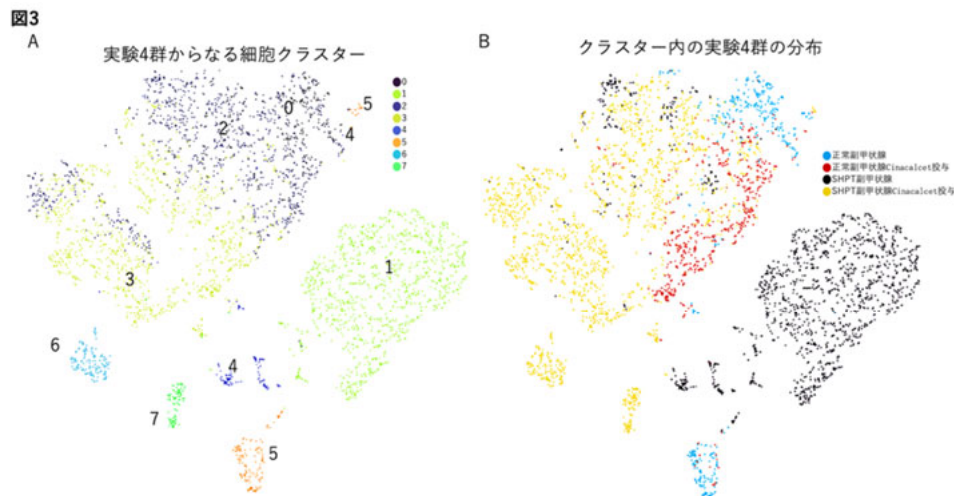
(2) カルシウム受容体作動薬投与によるSHPT副甲状腺細胞種の変化解析

SHPTの治療薬として使用されるカルシウム受容体作動薬 Cinacalcet をCKDモデルマウスに投与し、その細胞構成の変化をscRNA-seqにより検証した。本解析では、以下の4群（①正常マウ

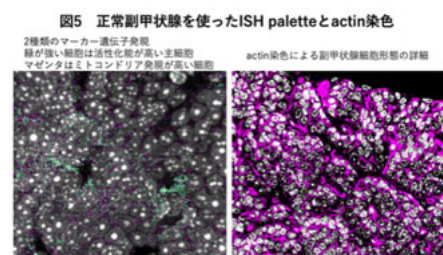
ス、②正常マウス+Cinacalcet 投与、③CKD マウス、④CKD マウス+Cinacalcet 投与) を対象とし、すべての群を同時に解析する必要があることから、従来の scRNA-seq 法ではなく、単離核由来の mRNA を解析する Gem-X 法を用いた。各群には約 15 匹のマウスを使用し、CKD モデルはアデニン食を 2 か月間投与して SHPT を誘導した。Cinacalcet (30 mg/kg) はサンプリング 2 時間前に投与し、副甲状腺を摘出して解析を行った (図 3)。その結果、得られた細胞は 7 つのクラスターに分類された (図 3A, B)。正常副甲状腺では、クラスター 0 および 2 が主細胞、クラスター 5 が酸好性細胞に相当すると考えられた。SHPT 副甲状腺では、ほとんどの細胞が独立したクラスター 1 を形成しており、一部が主細胞クラスター (0 および 2) にも存在していた。クラスター 1 は先に定義した SHPT 特異的細胞群 iSHyC に対応すると考えられる。

Cinacalcet を投与した正常マウスでは、主細胞がクラスター 0 および 2 に加えてクラスター 3 にも分布し、酸好性細胞 (クラスター 5) は減少していた。SHPT 副甲状腺 Cinacalcet 投与群では、クラスター 1 に相当する iSHyC が消失し、主細胞であるクラスター 0 および 2 に細胞が再分布していた。また、この群ではクラスター 3 の細胞数が増加し、新たに独立したクラスター 6 および 7 にも細胞が分布していたことが確認された (図 3A, B)。

これらの結果から、カルシウム受容体作動薬は、SHPT に特異的な過形成関連細胞 (iSHyC) を効果的に減少させることが明らかとなった。一方で、正常な主細胞に隣接するクラスター 3 や、Cinacalcet 投与後の SHPT 副甲状腺で特異的に出現したクラスター 6 および 7 の細胞群が確認され、これらは Cinacalcet の投与によって新たに生じた細胞群である可能性に加え、SHPT により変化した細胞が本来の主細胞や酸好性細胞へと戻れなくなった状態を示している可能性も考えられた。さらに、Cinacalcet を投与した正常副甲状腺においても、遺伝子発現パターンに変化が見られ、薬剤が正常組織にも影響を及ぼす可能性が示唆された。遺伝子発現の変化を heatmap で解析した結果、SHPT 副甲状腺で高発現していた遺伝子群 (赤色) は Cinacalcet 投与により著明に減少し、治療効果の高さが示された (図 4)。しかし、正常副甲状腺の発現パターンと完全には一致せず、一部の細胞は Cinacalcet に対する薬剤抵抗性を示している可能性も示唆された。これらの結果から、カルシウム受容体作動薬 Cinacalcet は、異常に活性化した SHPT 特異的細胞群 (iSHyC) を速やかに減少させる一方で、薬剤投与後の副甲状腺には正常とは異なる新たな細胞群が出現しうることが明らかとなった。

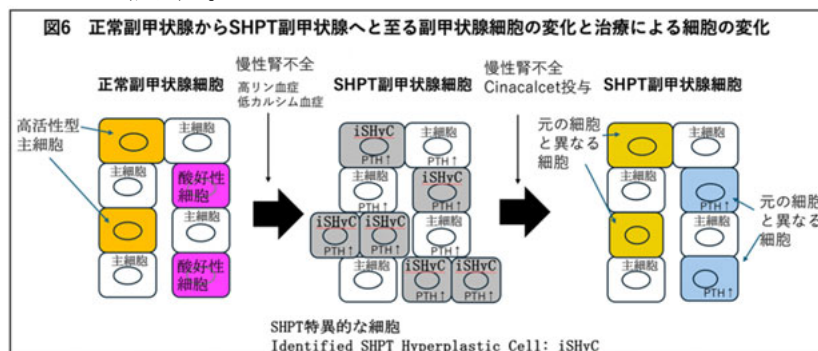


変化が顕著であった遺伝子Xおよびミトコンドリア関連遺伝子について、ISH paletteを用いて遺伝子発現の局在を観察した。その結果、正常副甲状腺においてこれらの遺伝子の発現が確認され、遺伝子Xおよびミトコンドリア遺伝子の発現が高い細胞が存在することが明らかとなった。さらに、副甲状腺細胞の組織形態を詳細に評価するため、actin染色を行ったところ、本染色法が形態観察に有用であることが確認された。



(3) SHPTの発症過程を解明

上述の2つの結果から、SHPTの発症には、CKDが副甲状腺細胞の性質（分化）を大きく変化させることが主たる要因であることが明らかとなった。今回の解析では、副甲状腺における幹細胞の同定には至らなかったものの、CKDによる高リン血症や低カルシウム血症が副甲状腺細胞を刺激し、主細胞以外の細胞の性質が変化することで、SHPTに特異的な細胞群（iSHyC）が形成される可能性が示唆された。iSHyCはミトコンドリア遺伝子の発現が高く、HE染色においても酸好性を示すことが予想されることから、SHPTで観察される酸好性細胞の過形成結節を構成する主要な細胞であると考えられる。一方で、iSHyCはカルシウム受容体作動薬Cinacalcetの投与により減少するため、不可逆的な細胞ではない可能性も示唆された。ただし、Cinacalcet投与後にiSHyCが元の酸好性細胞や高活性型主細胞に完全に戻るのではなく、別の細胞状態に移行している可能性も考慮する必要がある。また、CKDがiSHyCの形成を引き起こす主因であると考えられるが、その誘導には低カルシウム血症だけでなく、高リン血症やその他の病態要因も関与していることが示唆された（図5）。



4. 研究の反省・考察

本研究は2年計画で立案され、初年度はCKD副甲状腺におけるsingle-cell transcriptome解析と組織解析手法の開発に重点を置き、2年目にはそれを発展させるかたちでSHPTの発症機序や治療薬の影響に関する解析を実施し、一定の成果を得ることができた。

反省点としては、解析により同定されたマーカー遺伝子を用いて、副甲状腺構成細胞を組織上で可視化・分類することを予定していたが、カルシウム受容体作動薬の投与実験に多くのマウスを使用したため、組織解析用のSHPT副甲状腺試料が十分に確保できなかった。また、SHPTへと変化する機構の詳細な検討のために、副甲状腺由来培養細胞PT-rを用いた解析も予定していたが、最適な培養条件の確立には至らなかった。

今後はこれらの反省点を踏まえて解析を継続し、得られた成果をもとに論文作成や学会発表へとつなげていきたいと考えている。

本研究は、解析準備や技術確立に多くの時間を要したものの、計画した内容を遂行し、重要な知見を得ることができたと判断している。今年度の成果は非常に意義深いため、あえて学会発表を控えてきたが、今後は速やかに成果を発信し、社会への還元を図っていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①なし
- ②

(2) 口頭発表

- ①なし
- ②

(3) 出版物

- ①なし
- ②