

Title	ヒトiPS細胞より誘導した甲状腺細胞の甲状腺機能低下症への再生医療実現に向けて
Sub Title	Regenerative medicine for hypothyroidism with thyroid follicular cells derived from human iPS cells
Author	伊藤, 文展(Itō, Fumihiro) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 岡野, 栄之(Okano, Hideyuki) 小澤, 宏之(Ozawa, Hiroyuki) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 細谷, 誠(Hosoya, Makoto)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>前研究課題から引き続き未完成であったヒトiPS細胞から甲状腺濾胞細胞の誘導方法の確立を目指した。既報の甲状腺前駆細胞誘導法や、甲状腺誘導方法を一部改編した条件で甲状腺前駆細胞のマーカーであるPAX8およびNKX2.1陽性細胞を免疫染色にて確認することができた。しかしながらPCRにて十分なNKX2.1の発現が認められなかった。気道上皮誘導の既存報告も参考にし、条件変更を繰り返し行った。しかしながら同様にPCRではNKX2.1の発現量は多くはなかった。十分な誘導効率にて甲状腺前駆細胞を誘導する方法の確立ができず、甲状腺機能低下症への臨床応用はかなわなかった。</p> <p>We tried that thyroid follicular cells were induced from human iPS cells. PAX8 and NKX2.1, they are markers of thyroid precursor cells, positive cells on immunostaining were derived from human iPS cells. However, no adequate expression of NKX2.1 was observed by PCR. Although the condition change was repeated, the same results were obtained. Currently, the method for inducing thyroid precursor cells with sufficient induction efficiency has not been established. We could not perform regenerative medicine for hypothyroidism.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究 (B) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K16943 研究分野：甲状腺</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16943seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16943seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16943

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞より誘導した甲状腺細胞の甲状腺機能低下症への再生医療実現に向けて

研究課題名(英文) Regenerative Medicine for Hypothyroidism with Thyroid Follicular Cells derived from Human iPS Cells

研究代表者

伊藤 文展 (ITO, Fumihito)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：40528329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：前研究課題から引き続き未完成であったヒトiPS細胞から甲状腺濾胞細胞の誘導方法の確立を目指した。既報の甲状腺前駆細胞誘導法や、甲状腺誘導方法を一部改編した条件で甲状腺前駆細胞のマーカーであるPAX8およびNKX2.1陽性細胞を免疫染色にて確認することができた。しかしながらPCRにて十分なNKX2.1の発現が認められなかった。気道上皮誘導の既存報告も参考にし、条件変更を繰り返し行った。しかしながら同様にPCRではNKX2.1の発現量は多くはなかった。十分な誘導効率にて甲状腺前駆細胞を誘導する方法の確立ができず、甲状腺機能低下症への臨床応用はかなわなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞より甲状腺濾胞細胞を効率よく誘導することができれば、将来的に様々な甲状腺疾患に役立てることができ。甲状腺癌をはじめとする腫瘍性疾患により甲状腺切除を余儀なくされたり、頭頸部癌に対する放射線治療を受けたりすると、甲状腺機能低下症を引き起こす可能性がある。そのような患者には、現状ではチラーゼンの毎日の内服が必要になる。もしヒトiPS細胞より甲状腺濾胞細胞を誘導することが可能になれば、誘導した甲状腺濾胞細胞を移植することで毎日の内服も不要となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We tried that thyroid follicular cells were induced from human iPS cells. PAX8 and NKX2.1, they are markers of thyroid precursor cells, positive cells on immunostaining were derived from human iPS cells. However, no adequate expression of NKX2.1 was observed by PCR. Although the condition change was repeated, the same results were obtained. Currently, the method for inducing thyroid precursor cells with sufficient induction efficiency has not been established. We could not perform regenerative medicine for hypothyroidism.

研究分野：甲状腺

キーワード：甲状腺 ヒトiPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト人工多能性幹細胞 (以下 iPS 細胞) について、iPS 細胞から臓器別細胞を作成する意義について

ES 細胞および iPS 細胞は様々な種類の細胞に分化する多能性および性状を維持したまま細胞分裂できる自己複製能を併せ持つ細胞として定義されている。初期胚より細胞を取り出す ES 細胞には倫理上の問題や細胞移植に際しての免疫拒絶の問題がある。一方山中らによって報告された iPS 細胞は、体細胞を再プログラミングすることで得られるため、ES 細胞の抱える諸問題を解決することになり、臨床応用にむけた多能性幹細胞の研究が急速に発展することとなった。

(2) ヒト人工多能性幹細胞 (以下 iPS 細胞) から甲状腺濾胞細胞を作成する意義について  
甲状腺再生医療を考えた場合、甲状腺機能低下患者由来 iPS 細胞より甲状腺細胞を誘導し移植することとなる。甲状腺機能低下症には先天性のものと後天性のものがある。後天性の機能低下症としては、橋本病などの慢性甲状腺炎や、頭頸部癌治療に伴う放射線療法後の甲状腺機能低下、甲状腺癌切除に伴う機能低下症などが存在する。その際慢性甲状腺炎や甲状腺癌患者由来の iPS 細胞より甲状腺細胞を誘導すると、再度同疾患になる可能性があり、それらの患者への甲状腺再生医療はやや現実的ではない。一方甲状腺無形性などの先天性機能低下症や、放射線療法に伴う甲状腺機能低下症患者には、有用である可能性が示唆される。これらの患者には甲状腺再生医療が確立されると、甲状腺ホルモン薬の内服より一生解放されることとなり福音となる可能性がある。

### (3) これまでの研究成果

ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺濾胞細胞誘導の方法は確立されていない。既報を元に誘導法を改変することで前腸の誘導が可能となっている。これらの細胞の一部は甲状腺前駆細胞マーカーである NKX2.1 および PAX8 の陽性を確認している。

### 2. 研究の目的

iPS 細胞を用いることにより臓器形成の一部が *in vitro* で再現可能となり、疾患の発生過程の観察や、薬剤の効果・副作用予測に利用可能になってきている。本研究はヒト iPS 細胞から甲状腺濾胞細胞への誘導法を確立し、効率よく安全な甲状腺細胞の誘導を目指す。甲状腺機能低下症に対するの再生医療への実用化をめざし、最適移植部位の検討や癌化のリスクの検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 甲状腺前駆細胞への誘導 ヒト iPS 細胞については本大学生理学教室 (岡野栄之教授) で維持されている健常コントロールを用いる。これまでの分化誘導方法を改変し甲状腺の前駆細胞である前腸細胞への分化誘導を行っており前述のとおり NKX2.1 および PAX8 陽性細胞を確認している。しかしながら誘導効率が低いため、更なる改変を行い、およそ 50% の誘導効率を目指す。

(2) 甲状腺前駆細胞からの甲状腺細胞の誘導 甲状腺分化に甲状腺刺激ホルモン (TSH) が関わっていることが予測されること、また既報の甲状腺濾胞細胞誘導法を鑑み、1) で作成した甲状腺前駆細胞にリコンビナントヒト TSH 負荷し、その他の刺激条件を検討し、甲状腺濾胞細胞誘導に最適な条件を確立する。サイログロブリンが陽性となる細胞が誘導されていることは確認済みである。この方法での分化誘導が不十分な場合は、NKX2.1 および PAX8 を強制発現させてから選別することで甲状腺前駆細胞を大量調整し、その後 TSH にて負荷刺激し甲状腺への分化誘導を図る。

### (3) 分化誘導した甲状腺細胞の甲状腺としての機能評価

ヨード取り込みタンパクである NIS やサイログロブリン・TTF1 の免疫染色を行い、甲状腺特異的タンパクの発現を確認する。また、TSH 負荷による培養上清へのホルモン産生を測定する。その後外科的に甲状腺を摘出して甲状腺機能低下マウスを作製し、マウス血中甲状腺ホルモン濃度を測定し甲状腺機能低下を確認する。このマウスの腎被膜下に誘導された甲状腺細胞を移植し、4 週間後に甲状腺ホルモンを測定し機能改善を検討する。また移植した腎臓および移植組織を摘出し、HE 染色で甲状腺特異的な濾胞構造を、免疫染色で甲状腺特異的蛋白の発現を確認する。

### (4) 甲状腺機能低下症への臨床応用にむけて

ヒト iPS 細胞より誘導した甲状腺細胞を人体に移植することを想定した場合、どのような形状で培養したものを移植するのが一番生着率が高いかをマウスにて検討する。具体的には角膜や心筋ですでに一部臨床応用されているシート状、肝臓などで検討されている三次元培養の方法などを試みる。それぞれの培養法での組織学的な構造再現やホルモン産生能の違いについて検討する。1) にて甲状腺ホルモン産生能の検討にて、マウスの腎被膜下への誘導甲状腺細胞移植を計画している。しかしながら実際の甲状腺機能低下患者への移植を考えた際、腎被膜下への移植は侵襲が高くまた合併症のリスクがあるため、簡便かつ安全な方法とは言い難い。そこで腎臓被膜下以外にもより侵襲の少ない皮下や筋肉内など種々の部位で移植を行い、確実に生着が期待できなおかつ簡便・安全な部位を模索する。また可能な限り移植マウスの観察を行った後、最終的には移植部位を組織学的にも検討することで、実際の臨床応用にむけた腫瘍化のリスクについても考慮する。ヒト iPS 由来組織には常に腫瘍化のリスクはつきものであるが、一つにはより腫瘍化のリスクの少ない iPS 細胞の作成方法が待たれる。また移植細胞に未分化な細胞が含

まれることも腫瘍化のリスクであるため、甲状腺細胞のみを識別し純度が 100%に近い状態のものを移植できるような方法を検討する。

#### 4. 研究成果

前研究課題である「患者由来 iPS 細胞を用いた Pendred 症候群における甲状腺腫の解明」にてなしえなかった、ヒト iPS 細胞から甲状腺濾胞細胞の誘導方法の確立を引き続き目指した。既報の甲状腺前駆細胞誘導法 (Nat Biotechnol. 2011 Mar;29(3):267-72.) や、既報の甲状腺誘導方法 (Cell Stem Cell 17, 1-16 November 5, 2015) では再現性を確認できなかった。これらを一部改編した条件で甲状腺前駆細胞のマーカーである PAX8 および NKX2.1 陽性細胞を免疫染色にて確認することができてはいた。しかしながら PCR にて NKX2.1 の発現量が多くなく、甲状腺前駆細胞への誘導効率が高くない状況であった。甲状腺濾胞細胞と途中まで同じ発生分化経路をたどる気道上皮誘導の既存報告 (Stem Cell Reports 3, 394-403 September 9, 2014) も参考にし、条件変更を繰り返し行ったものの、十分な NKX2.1 の発現を確認できなかった。現状では十分に高い誘導効率にて甲状腺前駆細胞を誘導する方法の確立ができていない。それゆえ、本研究の主題である「健常人および Pendred 症候群患者由来の iPS 細胞よりそれぞれ甲状腺細胞を誘導し比較検討を行うこと」ができなかった。まずは誘導効率の良好な甲状腺前駆細胞誘導方法の確立する必要がある。その後甲状腺濾胞細胞へ成熟させ、形態学的にも機能的にも甲状腺濾胞細胞であることを確認することが求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	小川 郁  (OGAWA Kaoru)		
研究協力者	岡野 栄之  (OKANO Hideyuki)		
研究協力者	小澤 宏之  (OZAWA Hiroyuki)		
研究協力者	藤岡 正人  (FUJIOKA Masato)		
研究協力者	細谷 誠  (HOSOYA Makoto)		