

Title	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
Sub Title	Clarification of pendred syndrome goiter with iPS cells derived from the patients
Author	伊藤, 文展(Ito, 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	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>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。現状では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ていないと言わざるを得ない。引き続き、より誘導効率の良好な甲状腺前駆細胞誘導方法の確立を行う。</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 will continue to change conditions and aim for establishment of efficient thyroid follicular cells induction from human iPS cells.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2017 課題番号：15K20226 研究分野：甲状腺</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20226seika

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.

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20226

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Clarification of Pendred syndrome Goiter with iPS Cells Derived from the Patients

研究代表者

伊藤 文展(Ito, Fumihiro)

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): 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、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。現状では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ていないと言わざるを得ない。引き続き、より誘導効率の良好な甲状腺前駆細胞誘導方法の確立を行う。

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 will continue to change conditions and aim for establishment of efficient thyroid follicular cells induction from human iPS cells.

研究分野：甲状腺

キーワード：甲状腺 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 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”と、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が、山中らにより報告されたiPS細胞は、体細胞にOct3/4・c-Myc・Klf4・Sox2の4つの遺伝子を組み込むことで再プログラミングすることで得られるため(Cell, 2007;131:861-72)、前述のES細胞の抱える諸問題を解決することとなり、臨床応用に向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。

ヒトを対象とする場合も、各組織・器官の初期発生機序を分子レベルで詳細に解析することが、ES/iPS細胞を用いて臓器形成をin vitroで模倣することにより可能になった。この際、疾患によって失われた組織・細胞の変化をもin vitroで再現し得ると考えられる。すなわち、実際の診療時にはすでに病態が完成していることが多く疾患の発生過程を経時的に観察することは困難なところを、疾患保有者からiPS細胞を樹立し疾患臓器に誘導すれば、疾患の形成過程をin vitroで経時的に観察できるため、病態の解明に有効である。さらに分化誘導された細胞は、薬剤の効果や副作用の出現の有無を予測する薬剤スクリーニングとして利用することができ、これまで動物モデルなどの作成が困難であった疾患における薬物治療法の開発などに応用が可能である。

(2) Pendred 症候群の甲状腺腫・甲状腺機能低下

Pendred 症候群は、感音性難聴および甲状腺腫を主兆とする常染色体劣性遺伝性疾患である。1896年英国の医師Pendredにより、甲状腺腫および高度感音難聴の姉妹の報告がされたのが疾患名の由来である。約半数の患者でSLC26A4遺伝子変異が認められ主要な原因と考えられているが、残りの半数の原因は不明である。難聴は先天性難聴である場合や小児期より徐々に進行する進行性変動性難聴である場合など様々である。約80%に前庭水管拡大を認め、蝸牛にMondini奇形を認める場合も多い。また前庭機能低下によるめまいを併発することもある。約1/3の症例で10歳前後で甲状腺機能障害に伴う甲状腺腫を発生する。その原因はヨード有機化の不全型障害によると考えられているが、甲状腺機能は正常な例もある。ヒト疾患変異を導入した遺伝子改変マウスでは表現型が見られず、またSlc26A4ノックアウトマウスでも甲状腺は正常であり、難聴についても甲状腺機能低下についても未だ病態生理や誘発因子は未解明で、予防法も明らかではない。

(3) ヒト iPS 細胞より甲状腺誘導法の確立

現在までのところ、ヒト iPS 細胞を用いた

甲状腺細胞誘導の方法は確立されていない。今回の検討ではまずヒト iPS 細胞から甲状腺濾胞細胞への誘導法の確立を目指し、これにより未解明のPendred症候群における甲状腺機能障害の病態生理の詳細を明らかにする。また、安全で安価な甲状腺誘導法を確立することで、国内に多数いる甲状腺機能低下症患者にiPS細胞由来の甲状腺細胞の移植を行う甲状腺の再生医療が将来的に可能となる。

2. 研究の目的

ヒト 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。Pendred 症候群では難聴および甲状腺機能障害が生じるがその病態メカニズムは未解明である。

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科では、倫理委員会承認の元で疾患特異的 iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究を行っている。現在までにヒト iPS 細胞を用いた甲状腺分化誘導法は報告がないが、今回の研究でその方法が確立されることにより様々な甲状腺疾患の機能解析に役立つ。特に、我々は既に Pendred 症候群患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立しており、未だ未解明な Pendred 症候群における甲状腺機能障害の解明をすることで、本疾患の適切な治療や予防法の確立(診療ガイドライン化)や遺伝カウンセリングへの寄与、予防的な薬剤治療の開発などが将来的に可能となる。

また、ヒト iPS 細胞から甲状腺への分化誘導法を確立することは、甲状腺機能低下症患者に対する再生医療という観点でも重要である。甲状腺機能低下症は、クレチン症や慢性甲状腺炎といった甲状腺疾患、甲状腺癌に対しての治療として甲状腺全摘・亜全摘を行った場合、さらには頭頸部癌放射線治療後などで生じる。これらの甲状腺機能低下を生じた患者は甲状腺薬であるレボチロキシナトリウムの内服を一生継続する必要があり、本邦で約30万人が内服している。2011年3月の東北地方太平洋沖地震の際に国内でのレボチロキシナトリウム製剤の98%のシェアを占める「チラーヂンS錠」等を生産する工場が被災したため、製造が一時停止し処方制限が生じたことは記憶に新しい。現在までにヒト iPS 細胞からの甲状腺誘導方法はまだ確立されていないが、今回の研究の成果により安全にかつ効率よく、また低コストで甲状腺が誘導できるようになれば、将来的には一生ホルモン内服から解放される、甲状腺機能低下への再生医療が実現可能となる。

3. 研究の方法

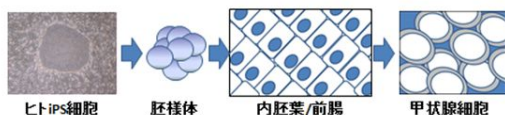
(1) 甲状腺前駆細胞への誘導

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。まず既報の分化誘導方法を参考に甲状腺の前駆細胞である前腸細胞

への分化誘導を行う。条件検討を進め、NKX2.1 および PAX8 の陽性細胞である甲状腺前駆細胞への高効率な分化誘導法を確立する。

(2) 甲状腺前駆細胞からの甲状腺細胞の誘導

ヒト ES/iPS 細胞からの甲状腺細胞への誘導法については現在まで論文報告がない。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、またマウス ES 細胞を用いた検討にて甲状腺前駆細胞からリコンビナント TSH で甲状腺濾胞細胞への分化誘導されたという報告 (Nature, 2012;491:66-71) 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、様々な条件で培養を行い、甲状腺濾胞細胞誘導に最適な条件を確立する。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

甲状腺特異的タンパクの免疫染色と甲状腺ホルモン産生能の検討

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。

誘導できた甲状腺細胞をマウスの腎臓に移植しホルモン産生能を確認

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) Pendred 症候群患者由来疾患特異的 iPS 細胞による甲状腺細胞の作成

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科では、倫理委員会承認の元で疾患特異的 iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究を行っている。これまでに研究協力者である細谷らは Pendred 症候群患者 3 症例の末梢血より、疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。この Pendred 症候群由来 iPS 細胞より内耳細胞を誘導することで Pendred 症候群における聴力低下発症の機序を解明する研究を行っている。現在までのところ内耳細胞への分化誘導に成功し、その細胞において PENDRIN (ペンドレッド症候群で遺伝子異常が生じる蛋白) が細胞内に

凝集することを確認している。この研究で使用している Pendred 症候群疾患特異的 iPS 細胞を用い、甲状腺に分化誘導し Pendred 症候群由来の甲状腺細胞を作成する。

(5) Pendred 症候群甲状腺細胞の機能評価、甲状腺腫・甲状腺機能低下発症のメカニズムの解明

Pendred 症候群の甲状腺腫の原因は、ヨード有機化不全障害といわれている。しかし、症例によって甲状腺腫・機能障害の程度は様々であり、この個体差が生じる要因は現時点で分かっていない。Pendred 症候群由来の甲状腺細胞を用いて甲状腺機能障害を発症するメカニズムを解明する。すでに樹立された症候の異なる 3 症例 3 変異の Pendred 症候群患者由来 iPS 細胞から甲状腺細胞を誘導し、濾胞細胞における PENDRIN 発現の細胞内での分布、細胞内凝集体の有無や、ヨード負荷の有無における細胞増殖能やホルモン産生能、細胞死について詳細に検討する。研究が順調に進んだ場合は、ホルモン分泌を調節する薬剤の網羅的探索や、甲状腺機能低下を予防する薬物療法の可能性について、小スケールでの予備実験的検討を行いたい。

4. 研究成果

まずは既報の iPS 細胞より甲状腺前駆細胞である前腸誘導方法 (Nat Biotechnol. 2011 Mar;29(3):267-72.) の追実験を行った。しかしながら、効率よく甲状腺前駆細胞のマーカである NKX2.1 および PAX8 の陽性細胞を誘導することは不可能であった。そこで既報の誘導方法より種々の誘導因子を加えたり、培養日数の再検討を行い、NKX2.1 および PAX8 陽性細胞を 50% 程度の誘導効率で誘導することができるようになった。誘導した細胞に TSH 負荷を行い、甲状腺濾胞細胞へ分化誘導するよう培養を継続したが、形態学的には濾胞構造の確認を得るに至らなかった。胎児の濾胞細胞増殖には TSH およびインスリン負荷が必要との既報 (Endocrinology. 1990 Feb;126(2):869-75.) があったため、あわせてインスリン負荷を行ったが、インスリンの有無で明らかな相違は認められなかった。また細胞培養液の遊離トリヨードサイロニン・遊離サイロキシン・サイログロブリンの濃度を測定したが、培養液単体のコントロールと比較して有意な上昇が認められなかった。

引き続き既報の甲状腺前駆細胞である前腸誘導方法 (Nat Biotechnol. 2011 Mar;29(3):267-72.) を一部改編した誘導方法にて、効率よい甲状腺前駆細胞の誘導を目指した。免疫染色では甲状腺前駆細胞のマーカである NKX2.1 および PAX8 の陽性細胞を約 50% の誘導効率で確認できるに至った。しかしながら PCR では PAX8 の強発現は確認出来るのにたいして、NKX2.1 の発現を確認することができなかった。

そこで 2015 年に報告された甲状腺誘導方法

(Cell Stem Cell 17, 1-16 November 5, 2015)に従った誘導方法を追実験してみた。しかしながら前述と同様の結果であり、PAX8は強発現であるものの、NKX2.1の発現を確認することができなかった。いずれにせよ既報の甲状腺前駆細胞誘導方法に再現性がないと考えられ、新たな条件の確定が必要と考えられた。これらの誘導条件を一部変更することでPCRでもNKX2.1の発現を確認することができた。しかし発現量が少なく誘導効率は良くないと推測される。わずかに甲状腺前駆細胞が誘導されている可能性より、さらに条件変更を繰り返し、まずは効率よく甲状腺前駆細胞誘導の方法を確立する。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の確認ができるように実験をすすめる方針とした。

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。しかしながら同様に免疫染色ではある程度PAX8およびNKX2.1陽性細胞が確認できるものの、PCRではNKX2.1の発現量は多くはなかった。現状では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ていないと言わざるを得ない。それゆえ、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。並行して行っている研究課題「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」において引き続き、より誘導効率の良好な甲状腺前駆細胞誘導方法の確立を行う。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できるように、実験を計画していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 文展 (ITO, Fumihiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号: 40528329

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

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)