

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本尿路結石症学会誌 (2003.11) 2巻1号:87～91.

PTH産生能を有するヒト副甲状腺上皮細胞の継代培養

徳光正行, 山口 聡, 高下紀子, 八竹 直, 水永光博, 増井  
則昭, 石田裕則, 安住 誠, 加藤祐司, 奥山光彦, 金子茂男

## ◆Session 5-3

## PTH 産生能を有するヒト副甲状腺上皮細胞の継代培養

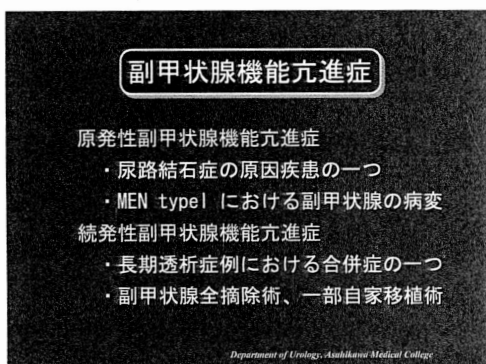
1) 仁友会 石田病院 泌尿器科 2) 旭川医科大学 泌尿器科

徳光 正行 <sup>1)</sup>	山口 聡 <sup>2)</sup>	高下 紀子 <sup>2)</sup>	八竹 直 <sup>2)</sup>
水永 光博 <sup>2)</sup>	増井 則昭 <sup>2)</sup>	石田 裕則 <sup>2)</sup>	安住 誠 <sup>2)</sup>
加藤 祐司 <sup>2)</sup>	奥山 光彦 <sup>2)</sup>	金子 茂男 <sup>2)</sup>	



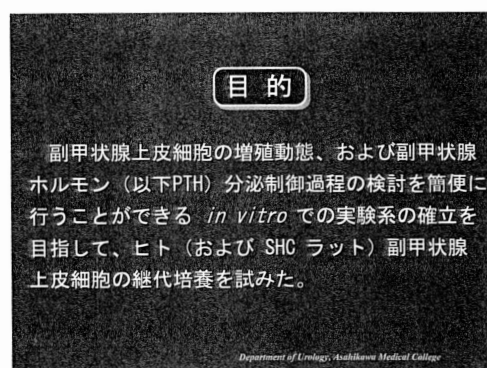
Dr. Tokumitsu

昨年旭川で初めて結石症学会に参加させていただきました。と言いましても、出番は懇親会の余興の司会進行役でしたが、懇親会の席上、今回の開催地が道後温泉とお聞きして、ぜひ出席したく思い、今回このようなヒトの副甲状腺上皮細胞の培養に関する演題を出させていただきました。



## ▲【スライド1】

われわれ泌尿器科医が治療対象とする副甲状腺疾患は、その亢進症が主なものであります。原発性に関しては尿路結石症の原因疾患の一つとして、また続発性に関しては、長期血液透析症例における合併症の一つとして問題となります。現時点では、副甲状腺上皮細胞の増殖動態、PTH 産生の制御について不明な点が多いため、この両者ともに保存的な副甲状腺のコントロールが難しく、最終的には外科的摘除術に頼らざるを得ない状況も起こりますし、続発性の場合には、自家移植術後の移植腺再発の問題も存在しています。これは、それらを検討できる有用な疾患モデルが未だないことも一つの要因として挙げられましょう。



## ▲【スライド2】

今回報告いたします検討は、実は9年前の1994年に開始したものです。当時、共同演者の山口が、高コレステロールラット：SHCラットを用いた二次性副甲状腺機能亢進症モデルの移植実験をしていました。レシピエントの副甲状腺を全摘除し、その後同系ラットの副甲状腺を移植するというものでした。実験はラットの生きや、移植腺の腺量の状況などに結果が左右されるという問題を含んでいました。ちょうどその頃、私は大学院を修了する前後で時間もあり、その実験の手伝いをしていました。私の研究がマウスの様々な細胞株を樹立し化学発癌剤を投与して、当時流行の癌抑制遺伝子 p53変異を検討するというものでしたので、軽い気持ちで「副甲状腺上皮の細胞株が出来ると、実験も楽にできますよね」なんて言ってしまったのが、今日まで延々と実験を続けているきっかけになっています。「口は災いの元」と言うことでしょうか。ということで、検討の目的は、副甲状腺上皮細胞の増殖動態、および副甲状腺ホルモン分泌制御過程の検討を簡便に行うことができる *in vitro* での実験系の確立を目指して、副甲状腺上皮細胞の継代培養を試みました。

**方法**

**副甲状腺組織の採取**

ヒト副甲状腺組織：42歳男性（透析歴13年）

平成2年1月 慢性腎不全にて血液透析開始

平成8年10月 副甲状腺3腺腫大（Intact PTH 671 pg/ml）  
二次性副甲状腺機能亢進症の診断確定

平成15年2月 副甲状腺全摘除術、一部右前腕自家移植術  
（Ca 10.4 mg/dl、P 5.7 mg/dl）  
（PTH：Intact 1,143、HS 100,000 pg/ml）

十分なinformed consentの後、組織の一部を培養に使用

ラット副甲状腺組織：SHCラット、24週齢以降の腫大腺組織

Department of Urology, Asahikawa Medical College

## ▲【スライド3】

組織の採取は、ヒトでは1994年以降、十分な informed consentのもと同意の得られた、二次性機能亢進症症例の全摘除術時に、無菌的に採取した組織の一部を培養に用いました。SHCラットにおいては腫大副甲状腺を得られる24週齢以降のラットを sacrifice して組織を採取しました。今回の継代に成功した症例の病歴を示します。42歳男性で、平成2年より13年間の透析歴を有しています。透析6年目に3腺の腫大と Intact PTH の上昇が確認され、二次性副甲状腺機能亢進症の診断が確定。本年2月に保存的治療によるコントロールが不良となり、副甲状腺全摘除ならびに一部右前腕自家移植術を施行しております。

**方法**

**副甲状腺上皮細胞の分離**

trypsin, collagenase, Dispase を使用

**培地**

D-MEM, RPMI-1640 を基本として使用  
低Ca高P濃度培地や FBS, NEAA, growth factor, caspase inhibitor等を添加

**副甲状腺上皮細胞の継代**

trypsin, collagenase, Dispase を使用

**PTH産生能の検討**

培養上清の高感度 PTH 濃度の測定 (RIA)  
抗ヒト 1-84 PTH 抗体による蛍光免疫組織化学染色

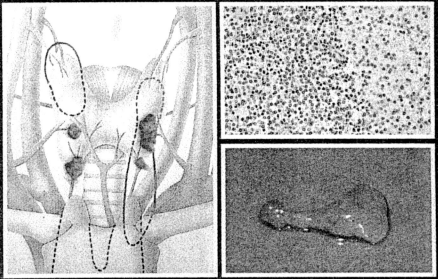
Department of Urology, Asahikawa Medical College

## ▲【スライド4】

上皮細胞の分離や継代には、trypsin, collagenase, Dispase を、medium には D-MEM, RPMI-1640 を基本として、それらの低Ca高P濃度調整培地、FBS や NEAA 添加培地、EGF や IGF 等の growth factor や steroid を加えたもの、さらには、上皮の継代が困難な原因が apoptosis に起因する可能性も考えられたため、各種 caspase inhibitor を加えた培地も試してみました。Culture dish も collagen coated のものも使用してみました。

PTH 産生能の検討については培養上清の高感度 PTH を RIA 法にて検出し、また、Biogenesis 社の抗1-84PTH 抗体による蛍光免疫組織化学染色を行い、その発現を確認しました。

**ヒト副甲状腺上皮細胞の採取**

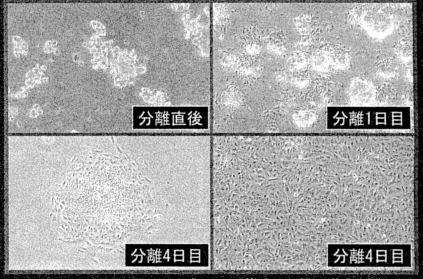


Department of Urology, Asahikawa Medical College

## ▲【スライド5】

今回継代に成功した症例の摘出組織です。2003年2月12日の手術時に4腺すべてを摘除し、一部を自家移植、一部を培養に使用しました。HE染色上はスライド右上のように chief cell, oxyphil cell, water-clear cell の3者が過形成を示す像でした。培養に使用する組織はスライド右下のように、可能なかぎり周囲の組織を滅菌バサミで cutting、除去し、メスの歯を使用して用手的にミンチにした後に、酵素処理しています。

**分離と初代培養 (collagenase + Dispase, 1997)**

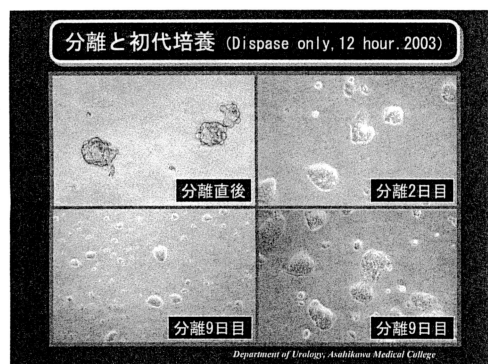


Department of Urology, Asahikawa Medical College

## ▲【スライド6】

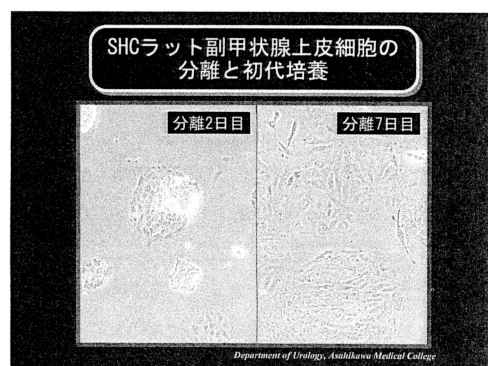
初代培養の状況を示します。初代培養成功の鍵は、いかに fibroblast を除くことができるかということに尽きます。細胞の分離に当初 trypsin を使用したことがありましたが、毒性が強すぎて分離には適していませんでした。種々の上皮細胞分離に用いられる collagenase の単独使用は、副甲状腺上皮細胞に関しては効果が不十分でした。1997年頃からはスライドに示しますように collagenase と Dispase を併用し、数時間の digestion を試してみました。確かに viability の高い上皮の分離が可能となりましたが、fibroblast の増生も急速に始まるため、fibroblast を除く様々な方法を講じて、上皮細胞の単離増殖は困難でした。毎年厳冬期に、名古屋市立大学と旭川医大でウインターカンファレンスというものが開催されていますが、その頃、郡先生とこの培養に関してお話を頂いたことが有りましたが「昔試みたことがあるが、それは無理だよ」と即答されました。郡先生がそうおっしゃるので、やはり無理なのだろう

と思う反面、だとすればまだやってみる価値は有りそうかなとも考え、その後もいろいろ工夫してみました。しかしそう簡単には行きませんでした。



#### ▲【スライド7】

今年1月にもこのカンファレンスが行われたとき、名古屋市立の浅井先生が、口腔粘膜上皮の培養細胞を用いた実験的尿道下裂の治療の検討を発表されました。その時、細胞の分離に Dispase を使用していたのですが、その使用法が私の使用法と少し異なっていたため、それをヒントに、改良を加えてみました。500U/ml の Dispase を含有した D-MEM 培地を用いて over night の酵素処理を行いました。スライドのように上皮細胞集塊はかなり小さなものとなりましたが、fibroblast の抜けが良く、さらに低速遠心分離で細胞集塊のみを得て harvest したところ、緩徐に上皮細胞のみがうまく増殖する状況が得られました。分離後9日目でもほとんど fibroblast の増殖は認められませんでした。これで継代培養の下準備ができたわけです。



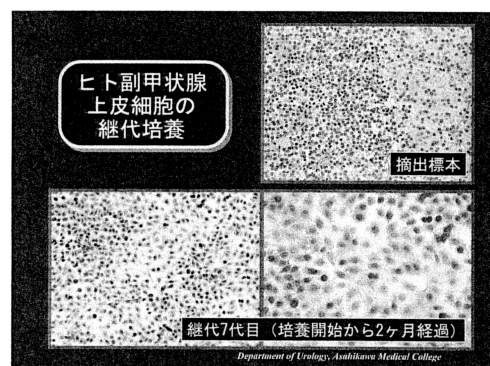
#### ▲【スライド8】

これは SHC ラットの24週齢における腫大した副甲状腺から得られた上皮細胞の初代培養所見です。これは collagenase と Dispase の2者による2時間程度の digestion の様子です。これは15代目程度まで比較的うまく継代できたものですが、やはり fibroblast の増殖をいかに抑えていくかということが重要点になります。



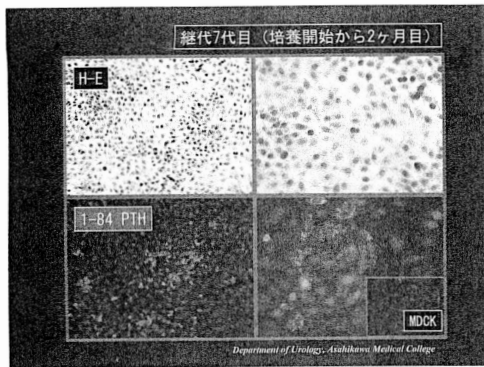
#### ▲【スライド9】

今回継代に成功しています副甲状腺上皮細胞の至適と考えられた条件をスライドに示します。上皮の分離には、500U/ml の Dispase を含有した D-MEM 培地を用いて12時間以上の digestion と、その後の低速遠心分離による細胞集塊の採取が効果的でありました。培地は10%FBS含有の D-MEM という、Ca や P 濃度の調整や growth factor 等を全く添加しないシンプルなものでも培養が可能でした。Passage については、普通の培養細胞であれば trypsin が一般的に使用されますが、16代を数える現在まで、500U/ml の Dispase を含有した D-MEM を使用しています。37°C、約30~40分の incubation で、上皮に damage を与えずに十分はがすことが出来ます。trypsin を使おうかとも考えましたが、必要に迫られていないので、まだ試していません。



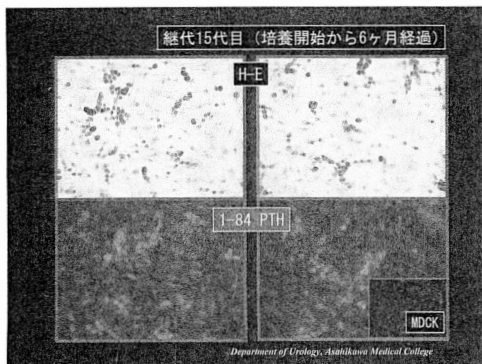
#### ▲【スライド10】

スライド下段に、継代開始から2ヶ月目、7代目の培養細胞の HE 染色所見を示します。右上は副甲状腺摘除標本 HE 染色ですが、摘出時同様、培養細胞も chief cell、oxyphil cell、water-clear cell の3者が mono-layer に増生しており、fibroblast の存在しない上皮のみの培養が継続できています。



▲【スライド11】

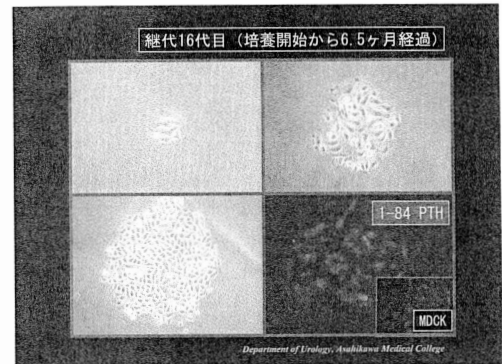
この7代目の培養細胞を抗ヒト1-84 PTH抗体で蛍光免疫染色してみました。HEと比較してみますと、特に chief cell において PTH の発現が強く認められておりますが、他の2種の細胞にも若干発現しているものがあるようですこの7代目前後までの培養液上清の PTH 濃度は、上皮細胞 $1 \times 10^6$ 個あたり1mlのmedium内に約2日の培養で1,000pg/ml程度のHS-PTHを検出することができます。しかしこのまま単純に継代を続けていきますと、その値は極端に低下し、15代目まで継代の後に凍結保存していますが、10代目以降のものではほとんど検出されなくなってしまう。継代数を重ねつつ、かつPTH産生能を有する細胞を得たいので、この7代目細胞を用いて限界希釈法に準じてクローニングをすすめることにしました。



▲【スライド12】

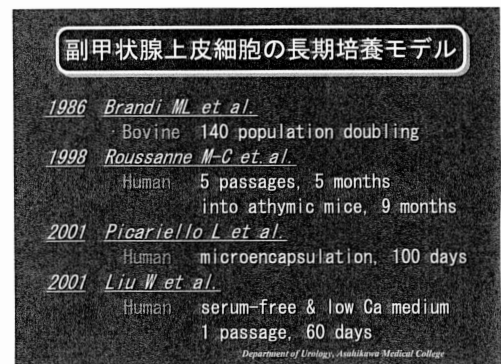
始めから一気に一個ずつの細胞まで希釈すると増生が起こらない可能性もあるかと考え、24wellのculture dish4枚、約100wellに、1well当り数十個前後harvestして増殖させ、それらの上清のPTHをスクリーニングし、PTH濃度の高いものをいくつかひろい、さらに同様に継代するという方法を繰り返して、徐々に絞り込みを行ってみました。今月初め、細胞分離から6ヶ月経過し、継代15代目となる細胞群で、上清のPTH濃度の高いもののいくつかをスライドに示します。まだ完全なクローンに至っていない状況ではありますが、抗ヒト1-84 PTH抗体にて染色される、形態学的に chief cell と考えられ

る細胞群が継代されていることが確認できます。



▲【スライド13】

これは今月中旬から行っています現在進行中のものです。16代目の上皮細胞をスライドのように限界希釈法にてcloningをすすめており、何とかPTH産生能を有するものを得ようとしているところです。さらに可能であれば、chief cell、oxyphil cell、water-clear cellそれぞれの細胞のcloneをひろい、その差も検討してみたいと考えています。



▲【スライド14】

これまでに報告されております副甲状腺上皮細胞長期培養モデルは1986年のNIHのグループが成功したBovineのものが嚆矢となります。これは140 population doublingまで可能であったとのことですから、継代数にして30代前後まで培養できたということになりましょう。ヒトでは1998年、フランスのRoussanneらが、ヒトの副甲状腺組織50~60腺を一気に集めて分離し、月1回の継代で5代5ヶ月間、上皮細胞を培養、さらにそれをヌードマウスに移植して、9ヶ月維持できたと報告しています。2001年にはItaliaのグループが、分離した上皮集塊をalginate-polylysine-alginateのマイクロカプセルに入れて移植実験を行い、PTHの産生を100日間確認したとか、Swedenのグループが低Ca濃度の無血清培地で1回の継代と60日間の培養が可能であったと報告しています。

本検討におきましては、1g以下の小さい副甲状腺組

織から上皮細胞を効率良く分離し、PTH 産生能を有したままの細胞を現時点で16代目まで維持することが可能でありました。さらに cloning を行って cell line 化した後に、細胞それぞれの増殖動態のみならず、PTH 産生の機序、特にその制御に関して研究を進めていきたいと考えています。

**まとめ**

- ・ヒトおよびSHCラットの副甲状腺上皮細胞の継代培養を行った。
- ・上皮細胞の分離と継代には、Dispase の使用が効果的であった。
- ・継代7代目以降において、上皮細胞のPTH分泌能が著しく低下していった。
- ・PTH産生能を有する上皮細胞の絞り込みを行い、培養開始から6.5ヶ月経過した現在、PTH産生能を有する16代目の上皮細胞を継代維持している。

Department of Urology, Asahikawa Medical College

▲【スライド15】

まとめを示します。ヒトならびに SHC ラットの副甲状腺上皮細胞の継代培養を行いました。上皮細胞の分離と継代には、Dispase の使用が効果的でした。継代7代目以降において、上皮細胞の PTH 産生能が著しく低下しました。PTH 産生能を有する上皮細胞の絞り込みを行って、細胞の分離から6.5ヶ月経過した現在、PTH 産生能を有する16代目の副甲状腺上皮細胞を継代維持しています。

以上です。