

学位授与番号：甲 1111 号

氏 名：山田 琢

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：令和 1 年 7 月 10 日

学位論文名：

Gcm2 regulates the maintenance of parathyroid cells in adult mice.

（Gcm2 は成獣マウスにおいて副甲状腺細胞の維持を調節する）

学位論文審査委員長：教授 南沢享

学位論文審査委員：教授 浦島充佳 教授 武山浩

論文要旨

氏名	山田 琢	指導教授名	横尾 隆
主論文			
Gcm2 regulates the maintenance of parathyroid cells in adult mice (<i>Gcm2</i> は成獣マウスにおいて副甲状腺細胞の維持を調節する)			
Taku Yamada, Norifumi Tatsumi, Akane Anraku, Hideaki Suzuki, Sahoko Kamejima, Taketo Uchiyama, Ichiro Ohkido, Takashi Yokoo, Masataka Okabe PLOS ONE. 14(1):e0210662 · January 2019, e0210662			
要旨			
【背景・目的】			
ジンクフィンガー型転写因子である、Glial cells missing homolog 2 (GCM2)は、副甲状腺の発達に不可欠な転写因子である。 <i>Gcm2</i> が欠如すると副甲状腺は形成されないため <i>Gcm2</i> は副甲状腺の主な調節因子と考えられている。さらに、 <i>Gcm2</i> は、発生時のみならず、生後も生涯にわたり発現し続けており、そのため、 <i>Gcm2</i> は成人副甲状腺細胞の分化と生存に関与していると推測されている。一方で、副甲状腺細胞の過剰増殖によって引き起こされる副甲状腺機能亢進症では未解明である細胞増殖の制御機構が注目されており、副甲状腺のマスターレギュレーターである <i>Gcm2</i> との関連性も予想されている。しかし、成人副甲状腺で <i>Gcm2</i> の機能を解析した研究はいまだにない。そこで、本研究では、タモキシフェン誘導型 <i>Gcm2</i> コンディショナルノックアウトマウスを用いて成獣での <i>Gcm2</i> 機能を解析した。			
【方法】			
タモキシフェン投与1か月後と7か月後のマウスで血液生化学検査、副甲状腺組織形態、副甲状腺組織の遺伝子発現、副甲状腺細胞の増殖及び細胞死の変化を観察した。心採血により、血清Ca, P, PTH濃度の測定。副甲状腺組織切片を用いたH.E染色、 <i>in situ</i> hybridizationによる <i>Gcm2</i> calcium-sensing receptor(<i>Casr</i>)と parathyroid hormone(<i>Pth</i>)の発現検査、Ki-67及びPCNA免疫抗体染色、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)染色を行った。			
【結果】			
タモキシフェン投与1か月後の <i>Gcm2</i> ノックアウトマウスでは血清Ca、P、PTHの濃度に有意な変化は観られず、 <i>Casr</i> と <i>Pth</i> の遺伝子発現にも変化はなかった。一方で、Ki-67陽性細胞の割合は減少し、TUNEL陽性細胞の割合には変化がなかった。タモキシフェン投与7か月後の <i>Gcm2</i> ノックアウトマウスでは副甲状腺組織の萎縮と副甲状腺細胞の減少が観られた。また、血清Ca、PTHの濃度が有意に減少し、血清P濃度は有意に上昇していた。さらに、 <i>Casr</i> と <i>Pth</i> を発現している細胞が顕著に減少していた。			
【結論】			
本研究結果から、 <i>Gcm2</i> の減少は副甲状腺細胞の増殖の減少と、細胞死の割合の増加そして副甲状腺機能の低下を引き起こすことが解った。つまり、本研究において <i>Gcm2</i> は、成人の副甲状腺細胞の増殖と維持に重要な役割を果たしていることが示された。			

学位論文審査結果の要旨

大学院博士課程（腎臓内科学）、山田琢氏の学位論文は、横尾隆教授、再派遣先である岡部正隆教授のご指導の下、2019年にPLOS ONE誌（インパクトファクター2.76, 2018）に「*Gcm2* Regulates the Maintenance of Parathyroid Cells in Adult Mice」の題名で掲載された。令和元年7月5日、浦島充佳教授、武山浩教授および南沢を審査員とする公開学位審査会を開催し、山田氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験に準じる質疑応答を行った。以下、審査委員会における審査結果を記載する。

1. 本学位論文の科学的価値：本研究は、慢性腎不全患者におけるカルシウム維持機構に関する山田氏の臨床的な疑問点から着眼され、それを基礎研究から明らかにすることを目指した研究である。ジンクフィンガー型転写因子である、Glial cells missing homolog 2 (GCM2)は、副甲状腺の発達に不可欠な転写因子である。*Gcm2*が欠如すると副甲状腺は形成されないことから、*Gcm2*は副甲状腺細胞のマスター遺伝子と考えられている。しかし、*Gcm2*は、発生時のみならず、生後も生涯にわたり発現し続けているため、*Gcm2*は成人副甲状腺細胞の分化と生存に関与していると推測されていた。さらに、副甲状腺細胞の過剰増殖によって引き起こされる副甲状腺機能亢進症における*Gcm2*との関与も示唆されているが、成人副甲状腺で*Gcm2*の機能を解析した研究はこれまで報告されていなかった。本研究結果から、*Gcm2*の発現減少は副甲状腺細胞の増殖の減少と、細胞死の割合の増加そして副甲状腺機能の低下を引き起こすことが明らかにされた。つまり、本研究において*Gcm2*は、成獣マウス副甲状腺において、副甲状腺細胞の増殖と維持に重要な役割を果たしていることが示された。
2. 本研究は、研究上の倫理規範に準じて実行されている。
3. 以上の点を踏まえて、以下の項目を含む質疑が審査員より山田氏になされた。
 - ・U検定の場合、正規分布の場合中間値であらわすが、平均値のグラフになっているのはなぜか。
 - ・P値の決め方は連続して多重検定するとより厳しい値になるがどうか。
 - ・今回の結果は臨床に応用できそうか。
 - ・タモキシフェンを投与したコントロールは用いなかったか、また、タモキシフェンを投与しなかった変異マウスコントロールは用いなかったか。

- ・7か月目まで長く見た根拠はなにか。
 - ・臨床的に本結果はどのように活かすか。
 - ・IPS細胞ではGCM2を使って副甲状腺を分化誘導しているのか。
 - ・7MPIでCasr、Pthは減っているのだから、*Gcm2*がCasr、Pthの発現に影響しないとは言えないのではないか。
 - ・*Gcm2*の役割についてturnover維持に必要なだが、発現に必須ではないとしている点についてどのように考えているのか。
 - ・臨床的に二次性副甲状腺機能亢進症で*Gcm2*は細胞増殖に関与していそうか。
- これらの質疑に対し、山田氏は研究結果及び文献的考察に基づき、適確に回答した。

以上の結果を踏まえ、浦島教授、武山教授とともに慎重に審議し、本研究は*Gcm2*が副甲状腺細胞の発生だけでなく、増殖と維持にも必須であることをはじめて示した研究であり、将来の臨床的研究にもつながる点でも重要である。本論文は学位論文として十分に価値あるものと審査委員会では認定した。