

## 甲状腺細胞シートの甲状腺機能低下モデルへの移植と評価



荒内 歩

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

甲状腺機能低下症に対する甲状腺ホルモン剤の補充に替わり、再生医療の分野において新しい治療法を確立することは出来ないかと考えた。そこで、当研究室における細胞シート工学を用い、生体内でも内分泌組織としての機能を持つ甲状腺組織の再構築を研究の目的とした。温度応答性培養皿を用いてラット甲状腺細胞シートを作製し、あらかじめ甲状腺全摘出術を施したラットの甲状腺機能低下症モデルに移植した。移植後、移植部位の切片での組織学的観察と、血中の甲状腺ホルモン値を測定した機能的解析の両面より、甲状腺細胞シートの生体内における内分泌組織としての評価を行った。HE染色による移植部位の切片では、移植した細胞シートが甲状腺に特有な濾胞構造を主体とした組織像を呈しており、一部には微小血管の新生も認められた。また、甲状腺摘出後、著明な低下を示していた血中の甲状腺ホルモン値が、甲状腺細胞シートの移植後1ヶ月にわたり上昇し、甲状腺機能を回復していた。

1. 序論 : 現在、甲状腺ホルモン剤の内服により甲状腺機能を補充している甲状腺機能低下症には、原発性甲状腺機能低下症と、様々な甲状腺疾患に対する外科的治療などによって発症する甲状腺機能低下症がある。この甲状腺機能低下症に対する永続的な内科的治療における患者の精神的また経済的負担を考慮し、再生医療分野からの視点で新しい治療法を確立することができないかと考えた。当研究室では、細胞シート工学により作製した、角膜細胞シートや心筋細胞シートをはじめとする再生組織の臨床応用に成功してきた。そこで、同様の方法により、生体内でも甲状腺機能を保持する甲状腺組織の再構築を研究の

目的とした。

2. 実験方法 : まず、酵素処理を用いず低温処理のみにより、培養細胞をシート状のまま回収することの出来る温度応答性培養皿上に、摘出した4週齢ラットの甲状腺細胞懸濁液(1枚の細胞シートにつき4匹分の甲状腺細胞数を含むように設定した)を $1 \times 10^6$ 個/mlにて播種し、37°Cインキュベーター内で1週間培養した。培養液は、DMEMに10%FBSと1%penicillin/streptomycinを添加し、温度応答性培養皿はφ35mmのものとした。細胞がコンフルエントになったら、培養皿を37°Cのインキュベーターから20°Cのインキュベーターに移動して5分ほど放置し、甲状腺細

胞シートを回収した。一方で、8週齢ラットに顕微鏡を用いてあらかじめ甲状腺全摘手術を施し、甲状腺機能低下症モデルを作製した。これらのモデルを、それぞれ1/4シート(1匹分の細胞数)、1/8シート(1/2匹分の細胞数)、1/16(1/4匹分の細胞数)シートを移植する群に分け、移植をせずに経過も見た群、全く手術を行なわなかったコントロール群と比較した。甲状腺細胞シートは1/4・1/8・1/16のサイズにメスを用いて分割した後、甲状腺全摘手術の1週間後に臀部の皮下に移植した。評価法は、移植部位切片のHE染色と抗TTF-1抗体による免疫学的染色での組織学的観察、血中の甲状腺ホルモン値( $ft_3$ ,  $ft_4$ )の経時的測定による機能的解析を行なった。移植部位切片の作製は、移植後4週目とし、甲状腺ホルモン値測定は、甲状腺摘出前、甲状腺摘出後1週目(細胞シート移植前)、甲状腺細胞シート移植後1週目、甲状腺細胞シート移植後2週目、甲状腺細胞シート移植後3週目、甲状腺細胞シート移植後4週目の6点で行なった。

3. 結果 : HE染色により、*In vitro*で作製した甲状腺細胞シート切片においても甲状腺に特異的な濾胞構造を認めたが、移植部位切片の観察により、モデル皮下組織内に移植した甲状腺細胞シートは3~5倍に厚さを増し、濾胞構造を主体とした生体内の甲状腺にとっても近い組織像を呈していた(Figure 1)。また、細胞シート内に微小血管の新生も認められた。甲状腺濾胞上皮細胞に対し特異的に陽性となる抗TTF-1抗体を用いた免疫学的染色では、濾

胞上皮細胞が濾胞構造を構築している像が多数認められた(Figure 2)。血中の甲状腺ホルモン値の測定では、甲状腺全摘手術を行なった全てのモデルにおいて、術後1週目には著明な低下が認められた。全ての甲状腺細胞シートを移植した群では、 $ft_3$ ,  $ft_4$ いずれにおいても移植を行なわなかった群と比較して、移植後1週目から上昇傾向を示し、術後4週目には甲状腺摘出前に近いほどまでに機能を回復しており、有意差( $p<0.01$ )を認めた。特に、予測していた通り、1/4シートを移植した群では、甲状腺ホルモンの回復が著明であったが、移植後4週目には低下傾向が見られた。

4. 考察 : 甲状腺は多数の濾胞構造が集まることで一つの組織をなしているが、今回作製した甲状腺細胞シートにおいても、濾胞構造が認められ、さらに移植することにより濾胞構造が増加し厚みを増し、より生体内の甲状腺組織に近い構造を成していた。また、甲状腺全摘手術を施した甲状腺機能低下症モデルに、甲状腺細胞シートを移植することにより甲状腺機能を改善することができた。移植した甲状腺細胞シートのサイズで機能回復の違いを比較すると、やはり予想通り2枚の甲状腺細胞シートを移植したモデルが最もホルモンの上昇が顕著であったが、移植後4週目においてホルモンが低下した理由としては、脳下垂体からのネガティブフィードバックと考えられる結果も得られた。これらのことより、*in vitro*により作製した甲状腺細胞シートは、生体内においても機能を果たし、甲状腺ホルモンを分泌していたと言える。また今後更な

る改善を加え、より生体に近い甲状腺組織の三次元構造を再生することで、原発性および術後の甲状腺機能低下症に対して有効な治療法になるであろうと考える。これらの結果より、*in vitro* で作製した甲状腺細胞シートは *in vivo* において甲状腺特有の構造を維持し、より生体内の甲状腺組織に近い形態を成しており、血中の甲状腺ホルモン値の推移からも内分泌組織としての機能も果たしていたといえる。

5. 今後の展望: 上述の実験方法においての問題点として、移植する甲状腺細胞シートをメスを用いて小さく分割するため、細胞数やシートの状態に影響を与えやすいことが挙げられる。そこで、現在は、甲状腺細胞シート 1 枚につき 1 匹分の甲状腺細胞数が含まれるように、細胞シート作製のための温度応答性培養皿の大きさを  $\phi 35\text{mm}$  から  $\phi 17.5\text{mm}$  のものへ変更した。そのため、 $1/4 \cdot 1/8 \cdot 1/16$  サイズの細胞シートは、それぞれ新しい大きさの細胞シートで  $1 \cdot 1/2 \cdot 1/4$  サイズで移植することができるようになった。また、細胞シート工学を用いて甲状腺組織を再構築することの有効性を確認するため、甲状腺組織を培養せずに細切して細胞シート同様に皮下移植した結果を比較するモデルを追加し、検討中である。現時点では、細切した甲状腺組織と甲状腺細胞シートの移植後の結果を比較してみると、切片では、やはり *in vitro* で培養した細胞シートのほうが濾胞構造の形態や微小血管の新生の点から見て、より生体内のものに近い組織像を呈していたものの、血中甲

状腺ホルモン値の推移において、移植後 4 週間では差異が認められていない。そのため、今後はさらに長期間での血中ホルモン値の追究が必要であると考えられる。

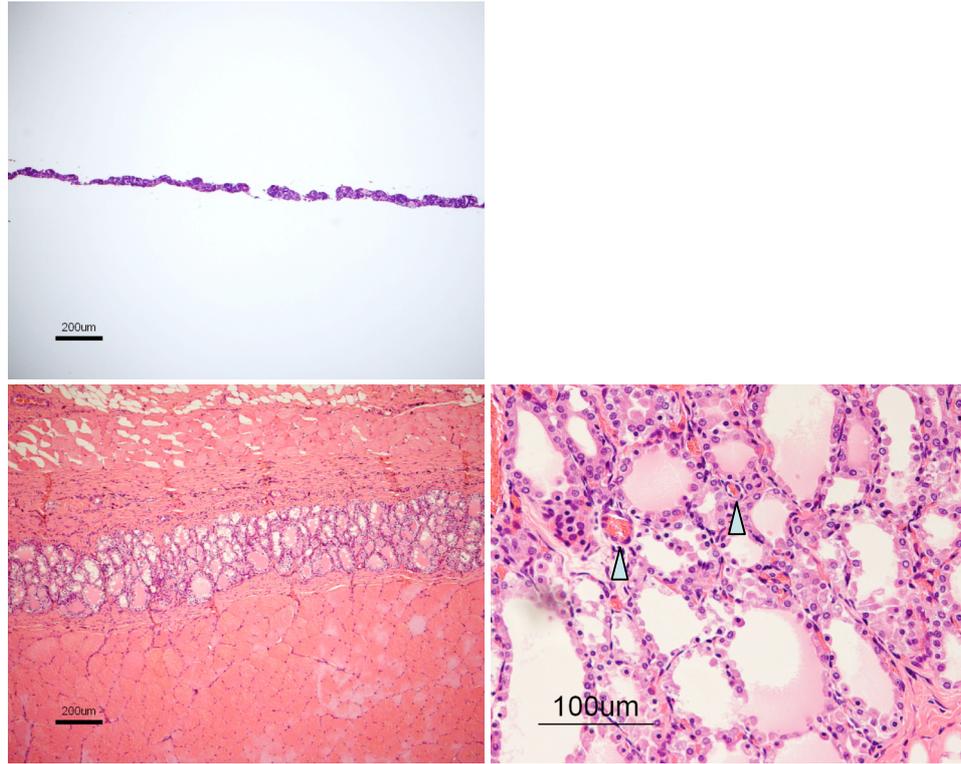


Figure 1

上；*in vitro*で作製した移植前の甲状腺細胞シートのHE染色像。培養後1週間目で、濾胞構造が認められている。  
 下；甲状腺機能低下モデルの皮下組織内に甲状腺細胞シートを移植し、移植後4週間目の移植部位切片のHE染色像  
 典型的な甲状腺濾胞構造を中心とした組織像であり、新生血管も認められる（矢印）。

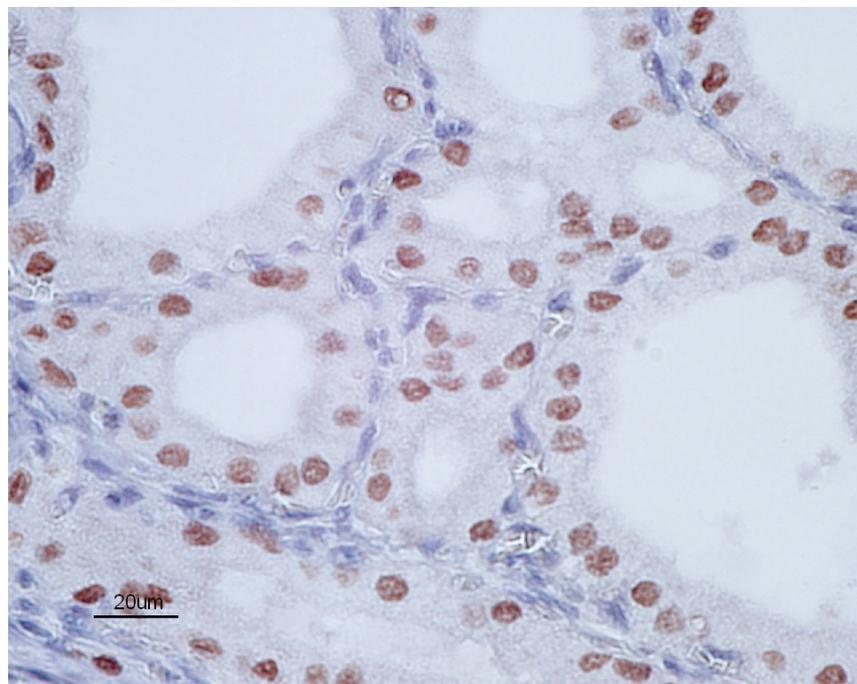


Figure 2

甲状腺濾胞上皮細胞に特異的な抗TTF-1抗体にて免疫染色した甲状腺細胞シートの移植部位切片。  
 濾胞構造を形成する甲状腺濾胞上皮細胞が認められる。