

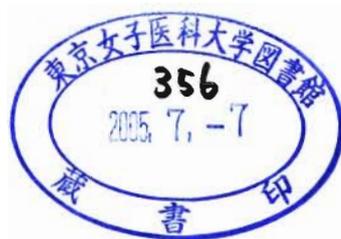
高リン血症により誘発されるヒト副甲状腺細胞増殖に
関与する遺伝子群の基礎的研究

(課題番号：15590985)

平成15年度～平成16年度
科学研究費補助金基盤研究(C)研究成果報告書

平成17年3月3日

研究代表者：佐藤幹二、
(東京女子医科大学内分泌センター内科)



はしがき

研究組織：

研究代表者：佐藤幹二（東京女子医科大学医学部内科 2 助教授）

交付決定額 平成 15 年度申請：220 万円

平成 16 年度申請：130 万円

総計 350 万円

研究発表

学会誌等：

- ① Sato K, Obara T, Yamazaki K, Kanbe M, Nakajima K, Yamada A, Yanagisawa T, Kato Y, Nishikawa T, Takano K. Somatic mutations of the MEN1 gene and microsatellite instability in tertiary hyperparathyroidism occurring during high phosphate therapy for acquired, hypophosphatemic osteomalacia J Clin Endocrinol Metab 86 : 5564-5571, 2001.
- ② Yamazaki Y, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Takano K, Obara T, Sato K. Genes Regulated by TSH and iodide in cultured human thyroid follicles : analysis by cDNA microarray. Thyroid 13:149-158, 2003.
- ③ Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K. Stimulation of Cellular Prion Protein (PrPc) Expression by TSH in Human Thyroid Follicles. Biochem Biophys Res Commun 305 : 1034-1039, 2003.
- ④ Kato Y, Sato K, Sata A, Omori K, Nakajima K, Tokinaga K, Obara T, Takano K. Hypercalcemia induced by excessive intake of calcium supplement presenting similar findings of primary hyperparathyroidism. Endocr J 51:557-562, 2004

口頭発表

1. 中島貴志子、柳澤徹雄、加藤佳幸、佐藤幹二、小野田教高**、栗原怜**、小原孝男*、高野加寿恵高リン (P) 血症がヒト副甲状腺に及ぼす細胞増殖促進作用機序 第 76 回内分泌学会、2003 年 6 月 (43 ページ参照)
2. 中島貴志子、佐藤幹二、小原孝男、高野加寿恵高リン血症がヒト副甲状腺に及ぼす細胞増殖促進作用機序 (第 2 報) 副甲状腺 (nodular hyperplasia) 器官培養系で高リン濃度の培養液により誘導される遺伝子群の解析第 77 回日本内分泌学会総会 日本内分泌学会雑誌 80 : 135 (抄録 P081)、2004 (44 ページ参照)
3. Sato K, Nakajima K, Takano K, Obara T. Gene Expression in Primary and Secondary Hyperparathyroidism : Phosphate-Induced Genes in Human Parathyroid Tissue in Organ Culture (abstract #SU 511)The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research, Seattle USA, October 1-5, 2004, J Bone Miner Res 19: suppl.1, S327, 2004. (45 ページ参照)
4. 中島貴志子、佐藤幹二、小原孝男、高野加寿恵原発性および続発性副甲状腺機能亢進症由来の副甲状腺細胞は共に高リン濃度培養液により細胞増殖と PTH の分泌が刺激される。第 78 回日本内分泌学会発表予定 2005 年 7 月 (46 ページ参照)

出版物：なし。

研究成果による工業所有権の出願・取得状況 なし。

平成15/16年度科学研究補助金研究成果報告書概要

1. 研究機関番号 32653
2. 研究機関名 東京女子医科大学
3. 研究種目名: 基盤研究(C)(2)
4. 研究期間 平成15年度~16年度
5. 課題研究番号: 15590985
6. 研究課題名: 高リン血症により誘発されるヒト副甲状腺細胞増殖に
関与する遺伝子群の基礎的研究
7. 研究代表者: 佐藤幹二 研究者番号 60138857
所属研究機関名・所属部局名(職名) 東京女子医科大学内分泌センター内科(助教授)

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者氏名	所属研究機関名・所属部局名	職名
	小原孝男	東京女子医科大学内分泌センター外科	教授

9. 研究成果の概要 (当該研究成果のまとめ、

当科では、成人発症性低リン(P)血症性骨軟化症の患者に長期間にわたりPを補充していたところ、3次性の副甲状腺機能亢進症を呈した症例を経験した。この患者の副甲状腺遺伝子を解析した結果、種々の遺伝子異常が生じていた(文献①)。したがって高P血症により副甲状腺細胞の増殖が刺激されつづけた結果、腫瘍化するにいたったと推測される。

そこで、原発性(I°-HPT)および続発性(II°-HPT)副甲状腺機能亢進症の患者から得られた副甲状腺細胞を用いてPTHが長期間にわたり分泌される器官培養系を確立した。この器官培養系で副甲状腺組織を培養すると、PTHの分泌は高P濃度下で促進され、かつ細胞増殖も促進した。つまり腎透析患者における病態をin vitroで再現できた。さらに、ヒトの全遺伝子を解析できるoligo-DNA microarray(41000個)を用いて、副甲状腺細胞に発現している遺伝子を解析したところ、ヒト副甲状腺腫細胞では種々の細胞接着因子、形態関連遺伝子、dopamine receptor D4、prionなどが強く発現していた。また、PTH、chromogranin-A、カルシウム感知受容体、ビタミンD受容体などの副甲状腺に関連した遺伝子も十分に発現していた。高P濃度の培養液にて培養すると、PTHを始めとして100個以上の遺伝子の発現が2倍以上に増加した。また、I°-HPTよりもII°-HPT患者より得た副甲状腺細胞の方が、Pに対する細胞増殖反応が大きかった。細胞増殖因子として、既知のもの(FGF-2, IGF-1, TGF- α など)の反応はそれほど顕著ではなかったため、未知の機序を介して細胞増殖が起こっている可能性も示唆された。今後は、P濃度を変えた場合に、最初にどのような増殖シグナルが生じるかを経時的に検討しPにより誘発される副甲状腺細胞の増殖機構を明らかにしていきたい。

10. キーワード

- (1) 副甲状腺,
- (2) cDNA microarray
- (3) リン(phosphate)
- (4) 副甲状腺ホルモン(PTH),
- (5) 成長因子,
- (6) prion

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID
FOR SCIENTIFIC RESEARCH (2002)

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 32653
2. RESEARCH INSTITUTION: INSTITUTE OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY
TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY
3. CATEGORY : KIBAN RESEARCH (C) (2)
4. TERM OF PROJECT : 2003-2004
5. PROJECT NUMBER : 15590985
- TITLE OF PROJECT : GENES REGULATED BY PHOSPHATE -INDUCED
PARATHYROID CELL PROLIFERATION IN ORGAN CULTURE: ANALYSIS USING
OLIGO-DNA MICROARRAY
6. HEAD INVESTIGATOR : REGISTERED NUMBER : 60138857
NAME: KANJI SATO
INSTITUTION: TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY,
TITLE OF POSITION : ASSOCIATE PROFESSOR
7. INVESTIGATORS NAME : TAKAO OBARA,
INSTITUTION : TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY
TITLE OF POSITION : PROFESSOR
8. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

A patient with hypophosphatemic osteomalacia, who was treated with high phosphate, developed tertiary hyperparathyroidism. Gene analysis of the four hyperparathyroid glands revealed several gene mutations, suggesting that high phosphate concentration stimulated parathyroid growth, accompanied by monoclonal proliferation of parathyroid (Reference①).

To clarify phosphate-induced cell proliferation of parathyroid gland, we established organ culture of parathyroid tissue obtained from patient with primary (I° -) or secondary hyperparathyroidism (II° -HPT). In this organ culture, intact PTH was actively secreted for more than 1 month. When parathyroid tissue were cultured with high phosphate medium, intact PTH secretion was increased and cell proliferation was also stimulated, thus reproducing clinical features of parathyroid glands in patients with II° -HPT.

Gene analyses by oligo-DNA microarray, which can analyze whole human genes at a single run (41000genes) revealed that parathyroid cells express abundantly collagens, proteins for cell adhesion and morphogenesis, signal transductions, dopamine receptor D4, prion, etc. Furthermore, parathyroid-specific genes such as PTH, chromogranin-A, calcium-sensing receptor, and vitamin D receptor were also significantly expressed. When parathyroid cells were cultured with high-phosphate medium, more than 100 genes including PTH were increased more than 100%, and parathyroid cells obtained from patients with II° -HPT proliferated to a greater extent than those from I° -HPT. Growth factors which are reported to be involved in parathyroid cell proliferation, such as FGF-2, IGF-1, or TGF- α , did not increase in response to high-phosphate medium, suggesting parathyroid cells proliferate via unknown-pathway. By analyzing microarray at earlier points, we are investigating what signals are the first to stimulate proliferation of parathyroid cells in response to high phosphate concentrations.

KEY WORDS (1) parathyroid gland, (2) cDNA microarray (3) phosphate
(4) PTH, (5) growth factors, (6) prion

AUTHORS, TITLE OF ARTICLE , JOURNAL, VOLUME, PAGE

1. Sato K, Obara T, Yamazaki K, Kanbe M, Nakajima K, Yamada A, Yanagisawa T, Kato Y, Nishikawa T, Takano K. Somatic mutations of the MEN1 gene and microsatellite instability in tertiary hyperparathyroidism occurring during high phosphate therapy for acquired, hypophosphatemic osteomalacia J Clin Endocrinol Metab 86 : 5564-5571, 2001.
2. Yamazaki Y, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Takano K, Obara T, Sato K. Genes Regulated by TSH and iodide in cultured human thyroid follicles : analysis by cDNA microarray. Thyroid 13 : 149-158, 2003.
3. Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K Stimulation of Cellular Prion Protein (PrPc) Expression by TSH in Human Thyroid Follicles. Biochem Biophys Res Commun 305 : 1034-1039, 2003.
4. Kato Y, Sato K, Sata A, Omori K, Nakajima K, Tokinaga K, Obara T, Takano K. Hypercalcemia induced by excessive intake of calcium supplement, presenting similar findings of primary hyperparathyroidism. Endocr J 51:557-562, 2004
5. Nakajima K, Takano K, Obara T. Sato K Phosphate-induced proliferation in parathyroid cells obtained from primary and secondary hyperparathyroidism (submitted to J Bone Miner Res)

高リン血症により誘発されるヒト副甲状腺細胞増殖に
関与する遺伝子群の基礎的研究

(課題番号：15590985)

平成15年度～平成16年度
科学研究費補助金基盤研究(C)研究成果報告書

平成17年3月3日

研究代表者：佐藤幹二、
(東京女子医科大学内分泌センター内科)

研究の目的

現在、本邦では慢性腎不全のために 30 万人以上が腎透析を受けている。腎不全が進行するにつれて、高リン血症が生じてくると、人体の中で、副甲状腺だけが腫大してくる。また PTH の分泌も亢進して、続発性副甲状腺機能亢進症が必発してくる (1,2)。この現象は、臨床的にも、また動物実験レベルでも確認されている (3)。続発性副甲状腺機能亢進症患者で副甲状腺が腫大してくる成因として、ビタミン D 受容体の減少、カルシウム感知受容体 (CaSR) の減少や、高リン血症が挙げられている (4-6)。しかし、なぜ高リン血症により副甲状腺細胞の増殖が刺激されるかは不明である。リンによる副甲状腺細胞の増殖機構が解明されれば、続発性副甲状腺機能亢進症を予防するような治療法も開発できる。

当科では、成人発症性の低リン血症性骨軟化症の一症例に、リンを長期間にわたり経口投与していたところ、次第に高カルシウム血症を呈して、副甲状腺が 4 腺とも腫大し、三次性の副甲状腺機能亢進症を生じた症例を経験した (7)。この患者は、現在にいたるまで腎機能は全く正常である。したがって、副甲状腺細胞の増殖を刺激するのは、腎機能とは関係なく、純粋に高リン血症であることが示唆される。さらに、副甲状腺腫 (4 個) の遺伝子解析を行ったところ、右上では癌抑制遺伝子である MEN1 遺伝子の近傍遺伝子の loss of heterozygosity (LOH) と MEN1 遺伝子の mutation が認められ、腫瘍化していることが判明した。したがって、血中リン濃度が低値から高値になると、副甲状腺細胞では、種々の細胞増殖因子の活性化や tumor suppressor gene の不活性化が惹起され、最終的には腫瘍化すると推測される (詳細は文献①参照)。

そこで、原発性副甲状腺機能亢進症および腎不全のため続発性副甲状腺機能亢進症患者より摘出された副甲状腺組織を用いて、高リン濃度の培養液にて培養することにより、細胞増殖と PTH の分泌が促進されるような組織培養系を確立した (8)。さらに、高リン濃度で培養した場合に、どのような遺伝子が誘導されてくるのかをヒトの全遺伝子を解析できる oligo-DNA microarray (41000 個用) を用いて検討した。リンにより副甲状腺内で誘導される遺伝子群が明らかになれば、続発性副甲状腺機能亢進症の解明のみならず、長期間にわたり腎透析を余儀なくされている腎不全患者に対する新しい治療法の開発につながるものと思われ、臨床的に重要な新知見が得られるものと期待される。

特に、今回は、原発性および続発性副甲状腺機能亢進症より得られた組織を用いて、リンに対する反応性に違いがあるか否かを重点的に検討した。

本研究の目的は、高リン濃度の培養液に反応して、副甲状腺細胞内で活性化される遺伝子を明らかにすることにより、二次性～三次性の副甲状腺機能亢進症 (9) を予防する治療法を開発することである。

研究方法 :

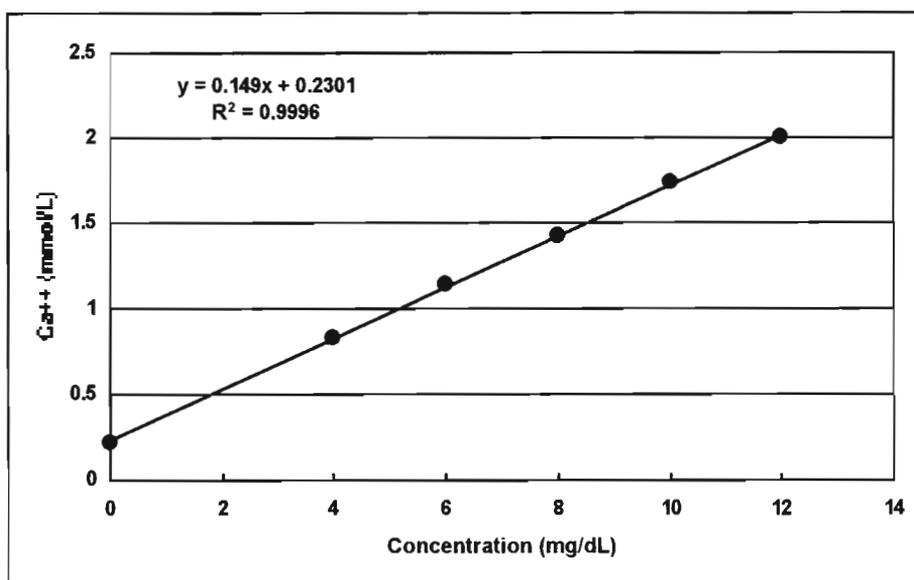
副甲状腺細胞の器官培養系の確立

原発性副甲状腺機能亢進症および続発性副甲状腺機能亢進症のため副甲状腺摘出術を受ける患者より、通常、手術前日に口頭および文書で説明し、同意書を頂いた。なお、この研究は当院の倫理委員会により承認されている（添付参考文献①参照）。

手術時に得られた副甲状腺腫瘍の一部（通常 50-200mg）を細切し、できるだけ短時間にコラーゲンを塗布したナイロンメッシュに載せて、そのまま器官培養した。培養液は、通常の市販の培養液（MEM）に、10%ウシ胎児血清を添加した培養液（以下、“preculture 培養液”と称する）を用いた。細切した副甲状腺組織切片（0.5x1.0x1.0mm）をコラーゲンを塗布したナイロン膜上に載せて、5%CO₂+95%air 下にて培養した。実験当初は週2回ほど培養液を交換していたが、1週間に一回でもよいことが判明している。

A) 培養液中の total カルシウム濃度とイオン化カルシウム濃度の相関

一般に、ヒトの血中の総カルシウム濃度は 8.5-10.0mg/dl であるが、その半分が血清蛋白と結合しており、50%弱がイオン化カルシウム（Ca⁺⁺）として存在している。生物学的に重要なのは蛋白に結合していない Ca⁺⁺であり、その正常値は 1.05-1.20mM (2.1-2.4 mEq/L) である。ところで、市販の培養液中にはカルシウム濃度として 7mg/dl 相当のカルシウムが含まれている。通常、培養液中には 10%ウシ胎児血清を添加している。このため、培養液中の Ca⁺⁺ は 50%以上となってしまふ。実際に、培養液中の総カルシウム濃度と Ca⁺⁺ 濃度を検討してみると、参照図のようになり（9 ページ）、総カルシウム濃度で 5.6-6.8mg/dl のところが、生理的に正常な Ca⁺⁺ 濃度であった。今回の実験に使用したウシ胎児血清の総カルシウム濃度は 15.9mg/dl、リン濃度は 12.1 mg/dl であった。したがって、10%のウシ胎児血清を含む preculture 培養液中の総カルシウム濃度は 8.6mg/dl となるが、実際の Ca⁺⁺ 濃度はやや高カルシウム血症ぎみとなっている。なお、実際の実験には、カルシウム、リンを含まない MEM medium (GIPCO 社に特別注文したもの) に適宜、リンやカルシウムを添加して実験をおこなった。培養液の組成を表 1 に示した（付表、46 ページ参照）。



参考付図：培養液中の総カルシウム濃度とイオン化カルシウム (Ca⁺⁺) 濃度

カルシウムを含まない MEM 培養液に種々の濃度のカルシウムを添加し、さらに 10% のウシ胎仔血清を加えて作成した培養液を、CO₂ incubator に入れて培養した場合の、総カルシウム濃度 (mg/dl) とイオン化カルシウム (Ca⁺⁺) を測定したもの。

ヒトを含めて陸上で生活している動物の血中の Ca⁺⁺ 濃度は 1.05–1.15mM (2.1–2.3mEq/L) 付近である。我々の開発した器官培養系では、このときの総カルシウム濃度は、5.5–6.5mg/dl 付近である。

B) intact PTH の測定

数日間、preculture 培養液で培養したあと、カルシウムあるいはリン濃度を変化させた培養液中にて、さらに 1 日間培養し、培養上清を採取し、-20°C で保存した。培養上清を採取後、コラーゲン膜上に張り付いている副甲状腺細胞より DNA を抽出し、1 ディッシュ中に含まれている DNA を測定した。通常、DNA 含量は 1–2μg/dish であった。さらに、培養液中の intact PTH 濃度を CLIA 法にて測定した (SRL 社に依頼)。Intact PTH の分泌は、通常、18 時間内に分泌された intact PTH 量を ng/μg DNA で表した。

C) [³H]thymidine の取り込みの測定

数日間、preculture 培養液で培養した後、リン濃度を変えた培養液で 1~2 日ほど培養した。ついで、[³H]thymidine を 50 万 cpm 添加し、さらに 18 時間ほど培養した後、DNA を抽出した。抽出した DNA の半量を定量に用いた。また、半量は液体シンチレーション・カウンターで放射活性を測定した。データは、cpm/μg DNA で表した。

D) cDNA microarray による解析

a) ^{32}P でラベル DNA microarray (GEArray Q series, Superarray Com)

(Human common Cytokine, Cat HS-003) にて 94 個の遺伝子の発現レベルを検討した。Total RNA を採取した後、 ^{32}P でラベルし、種々の遺伝子の cDNA を張り付けたシートと hybridize したあと、X 線写真にて感光度を検出する方法である。

b) Ajilent 社の oligo-DNA microarray

2003 年度からは、17000 個ないし 41000 個の遺伝子を同時に解析できる Ajilent 社の oligo-DNA microarray キットを用いて検討した。

リン濃度を変えて、1 日～3 日程培養した後、total RNA を採取した。この total RNA の純度を確認した後、reverse transcriptase を用いて cDNA を作成した。この際、低リン濃度で培養した副甲状腺細胞から得られた資料を緑色蛍光を発する cyanine 3 でラベルし、高リン濃度で培養した副甲状腺細胞から得られた資料を赤色蛍光を発する cyanine 5 でラベルした。

ついで、これらの蛍光でラベルされた cDNA をヒト遺伝子の合成 oligo-DNA を塗布した microarray と incubate し、各々の遺伝子スポットに結合した蛍光強度を測定した。

まず、各遺伝子スポット (フィーチャー) のシグナルを計測したあと (green Mean Signal, red Mean Signal)、バックグラウンドのシグナルや色素補正を行い、green Processed Signal と red Processed Signal を求めた。最終的に、リンによって誘導される遺伝子を求めた。 $\text{Log Ratio} = \log_{10}(\text{red Processed Signal} / \text{green Processed Signal})$
通常、2 倍以上に発現が増加して場合を増加、50% 以下に発現が抑制された遺伝子を抑制と判断した。

実験結果

A) Total RNA の精製法

この一連の実験にて、最大の難関となったのは、コラーゲン膜に接着している副甲状腺細胞より、microarray に要求される（分解されていない）total RNAを大量に採取することであった。

(a) 初期の実験（平成13年から14年度）

DNA microarray を施行するには、30 μ g以上のtotal RNAを要した。

通常、4個の副甲状腺組織切片（1x1x0.5mm）をコラーゲンゲル上に培養し、数日～30日ほど培養したあと、total RNAを抽出すると、1ディッシュから 1-2 μ gのtotal RNAしか採取できなかった。また、せっかく採取したtotal RNAも分解が進んでおり（図1、12ページ参照）、microarray に使用できるほどpure なtotal RNAを得ることはなかなか困難であった。

そこで大量の細胞を得ることのできるヒト甲状腺濾胞の浮遊培養系で培養した甲状腺濾胞より、total RNAを採取したところ、綺麗なtotal RNAが得られていることが判明した。したがって、total RNAの採取法に問題があるのではなく、やはり培養法に問題があることが判明した（なお、ヒト甲状腺細胞を用いた研究は、迅速かつ容易に纏まったので、文献②、および③として発表した）。

従来、コラーゲン膜上に付着した副甲状腺細胞をスパーテルなどにて掻き取っていたが、その後、組織切片が張り付いているコラーゲン膜を挟みにて迅速に切り取り、ナイロンメッシュごとRNA抽出液（RNeasy Mini Kit）にいれて、震盪して破碎する方法に変更したところ、ようやく綺麗なtotal RNAが採取できるようになった（図2、13ページ参照）。

(1) 後期の実験（平成15-16年度）

平成15年度になってから、それまで、2400個の遺伝子を解析できるDNA microarray にかわって、17000個～41000個の遺伝子を一度に解析できる oligo-DNA microarray が使用できるようになった。このoligo-DNA microarray を用いると total RNAが5 μ g程度あれば、十分に解析できることが判明した。また、研究手技も迅速になったせいも、極めて良好な total RNAを採取できるようになっている（図3、14ページ参照）。以上のような試行錯誤を経て、3年ほどを費やして、ようやく、ヒト副甲状腺細胞の全遺伝子が解析できるようなバイオアッセイ系を確立できた。

図 1 : Total RNAのelectropherogram

RNAは壊れてしまっている (実験番号15, 手術日03/2/10, 抽出日2/17)

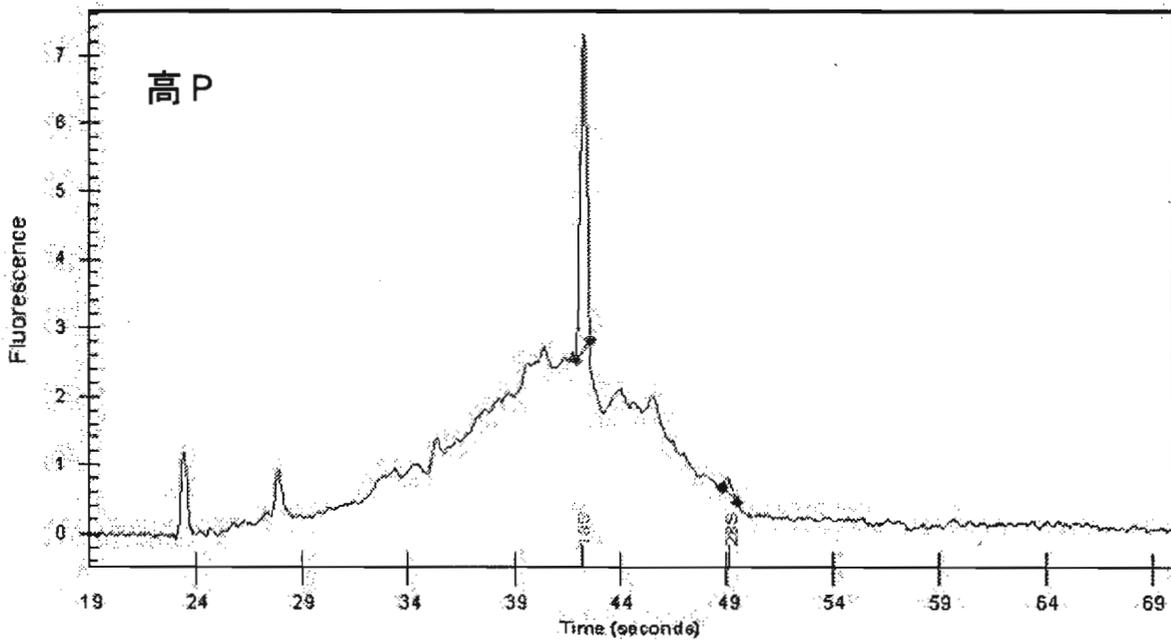
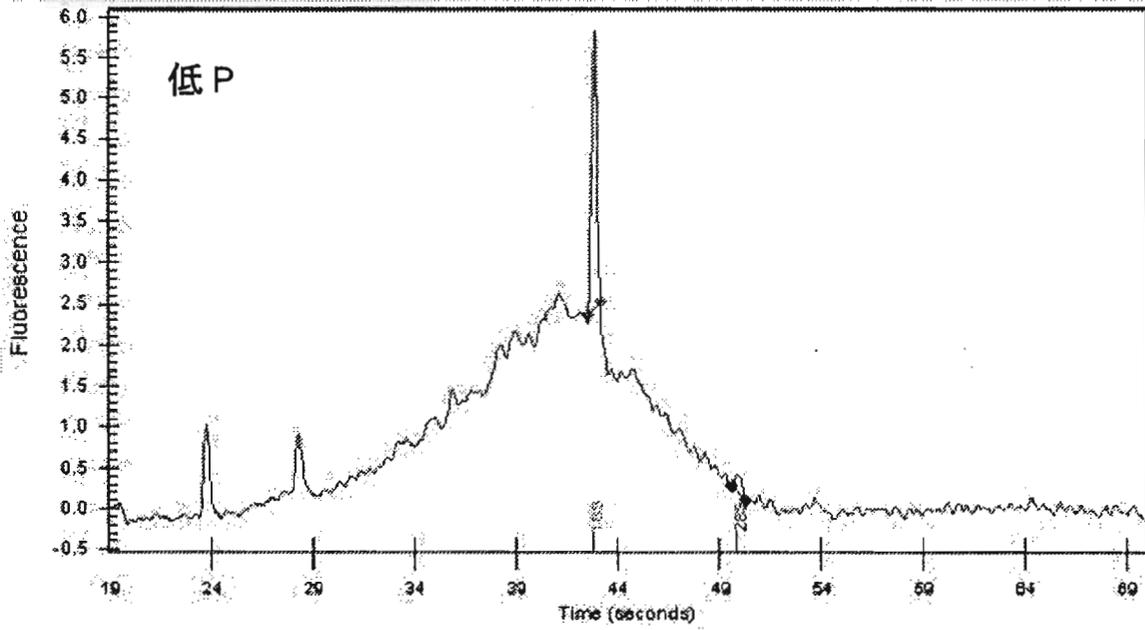


図2 : Total RNAのelectropherogram

RNAの一部が分解している (実験番号 2 4, 手術日 0 3/6/1 7, 抽出日 6/2 6)

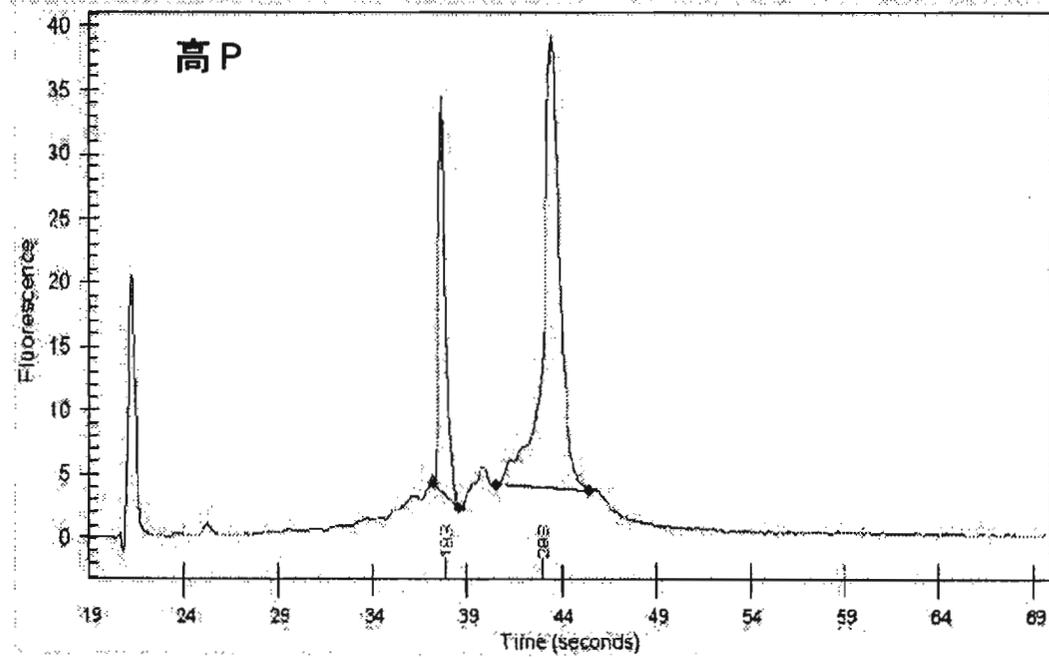
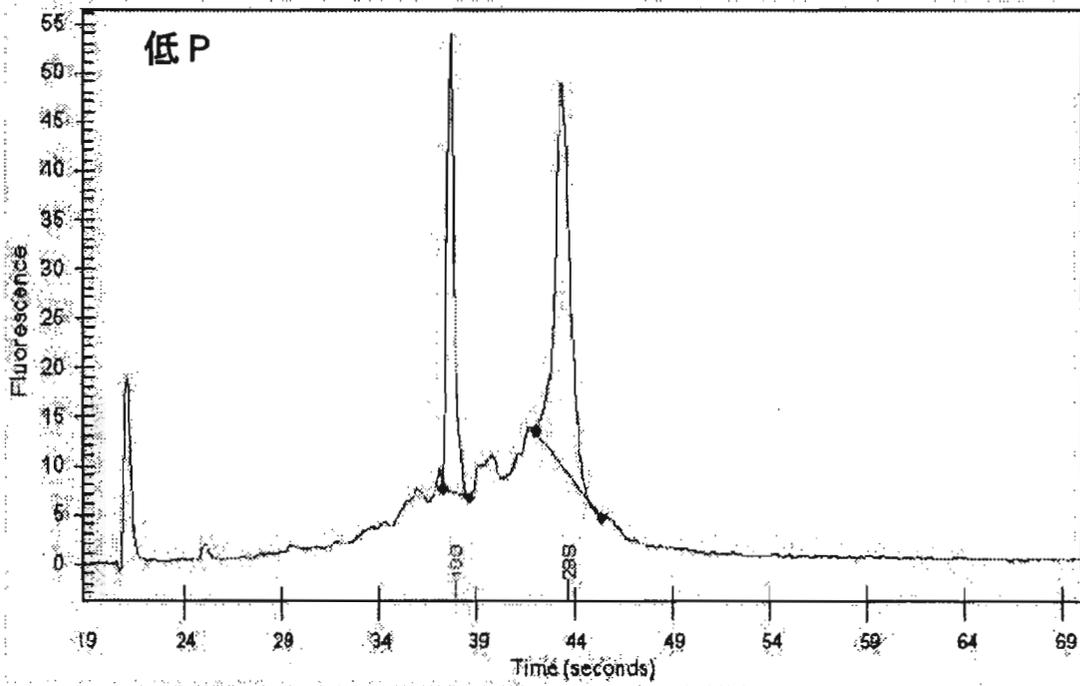
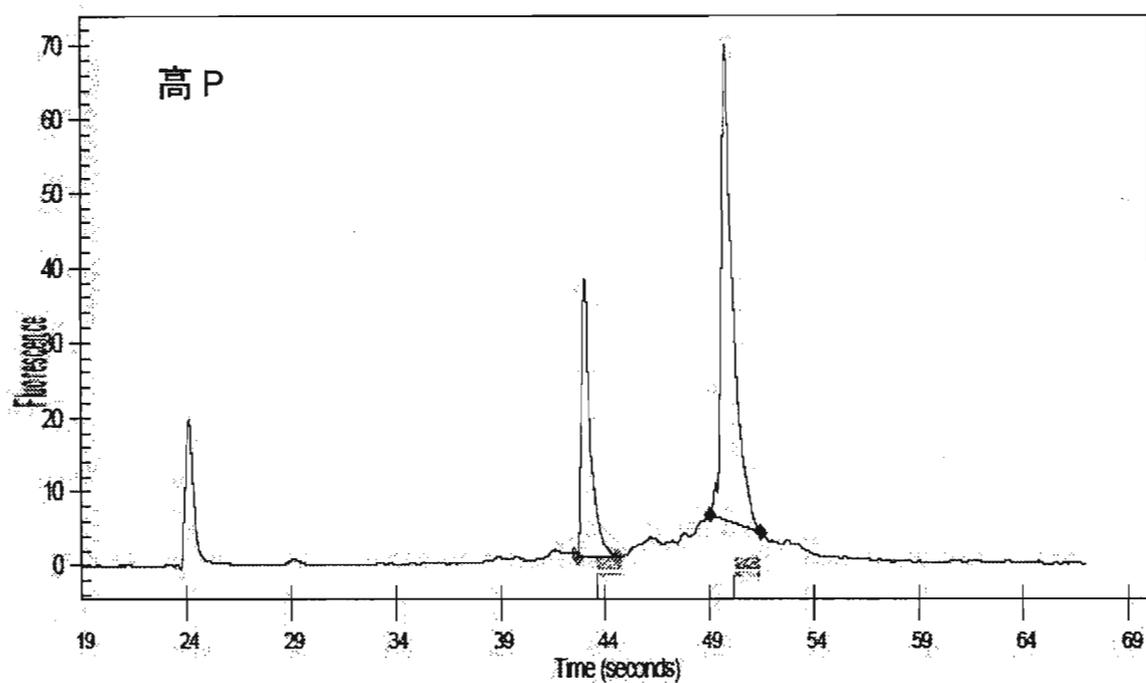
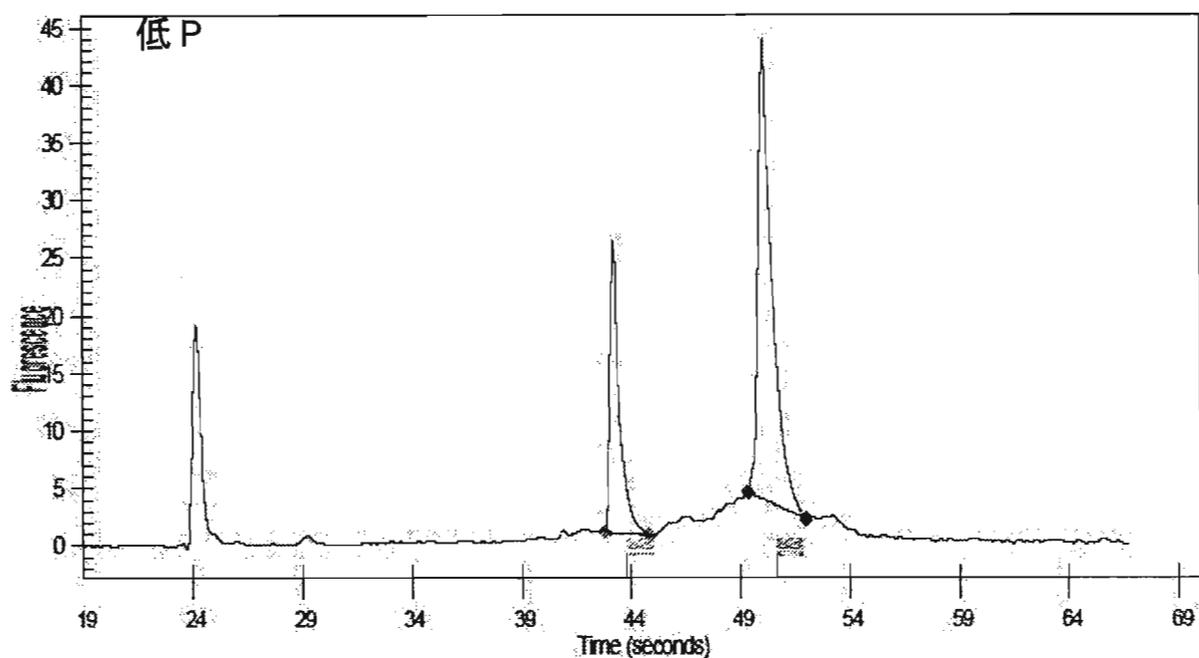


図3 : Total RNAのelectropherogram

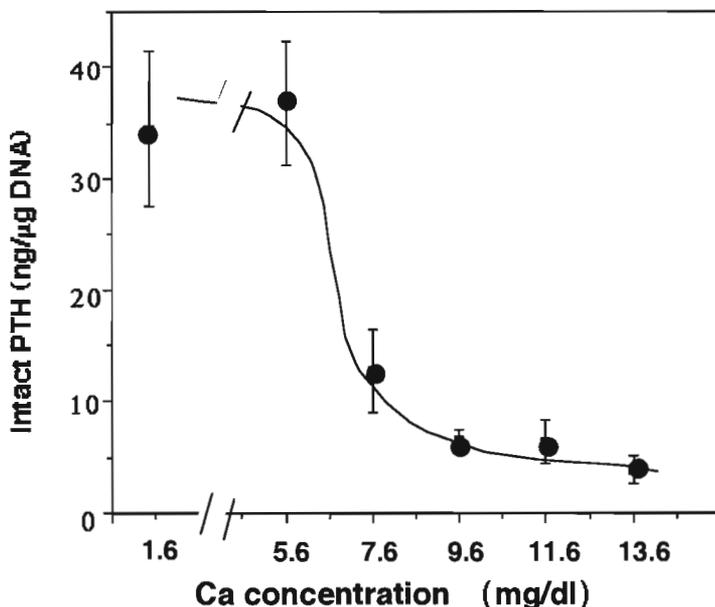
RNAが綺麗に取れている (実験番号 36, 手術日 04/1/7, 抽出日 1/20)



B) 培養液のカルシウム濃度が PTH 分泌に及ぼす影響

予測されたごとく、培養液中のカルシウム濃度が高くなるにつれて、intact PTH の分泌が抑制された (図 4)。特に、血中の総カルシウム濃度が 6-7mg /dl の範囲で intact PTH 分泌が急峻に抑制されていた。この時のイオン化カルシウム濃度で 1.1-1.3mM に相当した。これは、正常人の副甲状腺細胞のカルシウムの set point よりやや高値ではあるが、培養されている副甲状腺細胞は原発性副甲状腺機能亢進症由来のものである。したがって、培養副甲状腺細胞は、腎不全患者の副甲状腺のごとく、生理的な Ca^{++} 濃度よりもやや高いところで、intact PTH の分泌が抑制されていることが判明した。

図 4 : 培養液中の総カルシウム濃度が intact PTH の分泌に及ぼす影響



副甲状腺機能亢進症よりの副甲状腺腫切片を preculture 培養液で数日間培養した後、カルシウム濃度を変化させた培養液に変更後、さらに 12 時間培養した際に、培養液中に分泌された intact PTH 濃度を測定した。さらに副甲状腺切片の DNA を測定し、培養液中に分泌されてきた intact PTH 量を ng/μg DNA で表した。データは平均±SD (n=3)。

しかし、実験毎に大きなバラ付きがあり、特に原発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺は、高カルシウム濃度の培養液で培養しても、PTH の分泌抑制が乏しい傾向が認められた。

C) リン濃度がPTHの分泌と細胞増殖に及ぼす影響

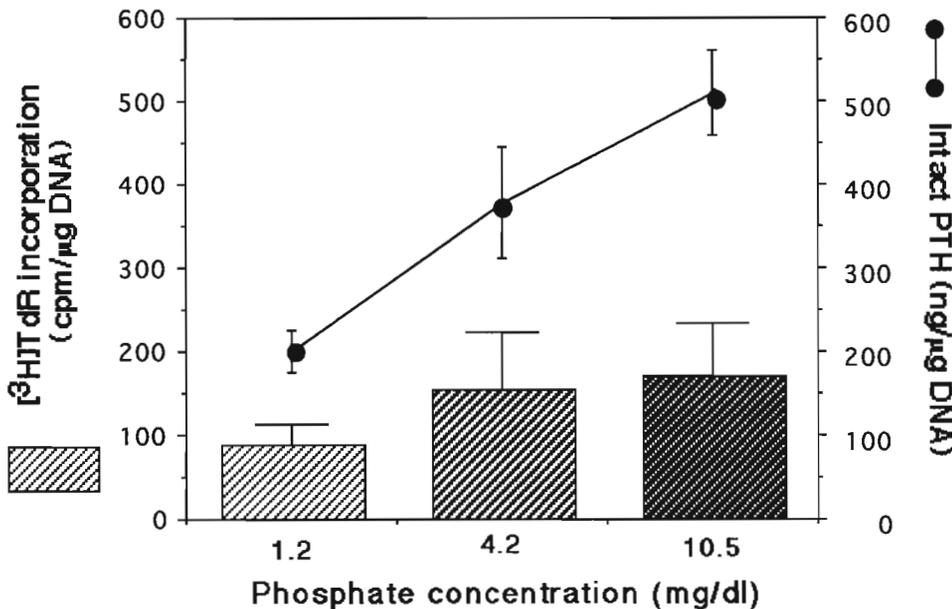


図5: 培養液中のリン濃度が副甲状腺細胞の細胞増殖とPTH分泌に及ぼす影響

続発性副甲状腺機能亢進症よりの副甲状腺腫切片を preculture 培養液で数日間培養した後、リン濃度を変化させた培養液に変更後、さらに72時間培養した際に、培養液中に分泌された intact PTH 濃度を測定した (カラム)。さらに ^3H -thymidine の取り込みを測定した (●—●)。Intact PTH は ng/ μg DNA、 ^3H -thymidine の取り込みは cpm/ μg DNA で表した。データは平均 \pm SD (n=3)。

D) 原発性副甲状腺機能亢進症および続発性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺腫を用いての比較検討

以上のような予備実験にて、本組織培養法は、腎透析患者の副甲状腺で生じている性質を保持していると思われたので、原発性副甲状腺機能亢進症と続発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺組織を用いて、リンに対する反応が異なるか否かを比較検討した。

a) 培養基間が細胞増殖とPTHの分泌に及ぼす影響

本研究の究極の目的は、長期間にわたり、腎透析患者の副甲状腺細胞でおきている現象を、in vitro の培養系で再現し、リンによる細胞増殖機序を解明することにある。したがって、この器官培養系で副甲状腺細胞の機能がどの程度、保持されているかを検討した。

原発性および続発性副甲状腺機能亢進症患者より提供していただいた副甲状腺腫切片を 1~4 週ほど培養しておき、低濃度 (2.0mg/dl) および高濃度 (10.4mg/dl) のリンを含んだ培養液に変更して 1 日培養後、 $[^3\text{H}]$ thymidine を添加し、18 時間後に DNA に取り込まれた放射活性を検討した。

図 6 に示したように、原発性副甲状腺機能亢進症より得られた副甲状腺腫細胞は一ヶ月以上にわたり、増殖能を保持しており、PTH の分泌能も旺盛であった。さらに、高リン濃度の培養液にて PTH の分泌が促進することも確認された。しかし、副甲状腺組織によって実験結果が異なり、リンに対する細胞増殖が認められなかったものもあった。また、PTH の分泌もリンにより刺激される場合もあったが、刺激効果が認められない場合もあった。

また、図 7 に示したように、続発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺腫細胞も、一ヶ月以上にわたり、細胞増殖能を保持しており、PTH の分泌も旺盛であった。しかし、リンに対する反応性は、4 週目よりも 1~2 週目に良好であることが判明した。

図6：I° - HPTの副甲状腺腫のリンに対する反応性

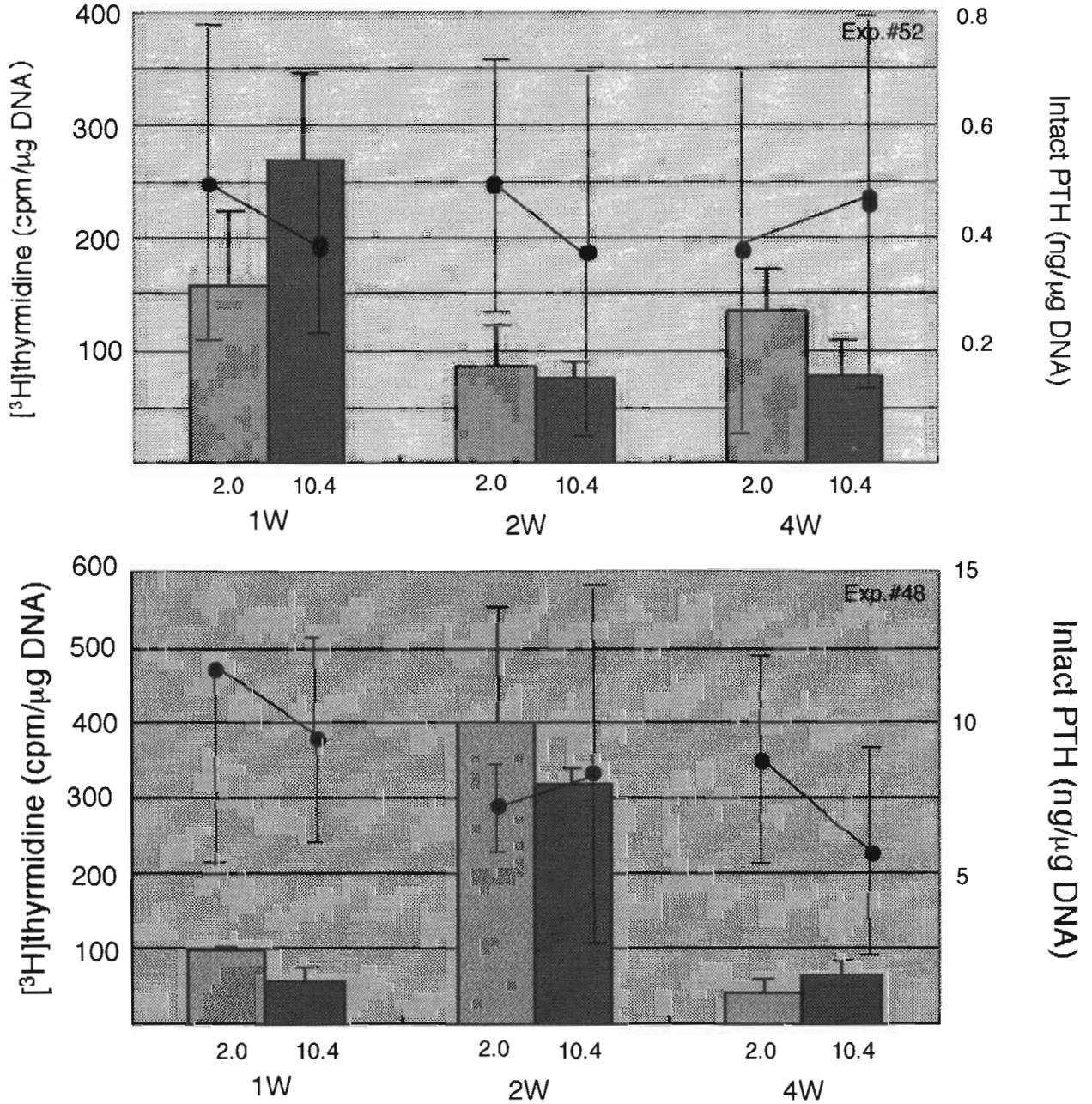


図6：原発性副甲状腺機能亢進症患者の手術時に得られた副甲状腺切片を1~4週間培養した後、低リン (2.0mg/dl) および高リン (10.4mg/dl) の培養液にて18時間培養後、 $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ を添加し、取り込まれた放射活性をcpm/ μg DNAで示した。同時に培養液を採取し、培養液中に分泌された intact PTHを ng/ μg DNAで示した (データは mean \pm SD, N=4)

図7：II° - HPTの副甲状腺腫のリンに対する反応性

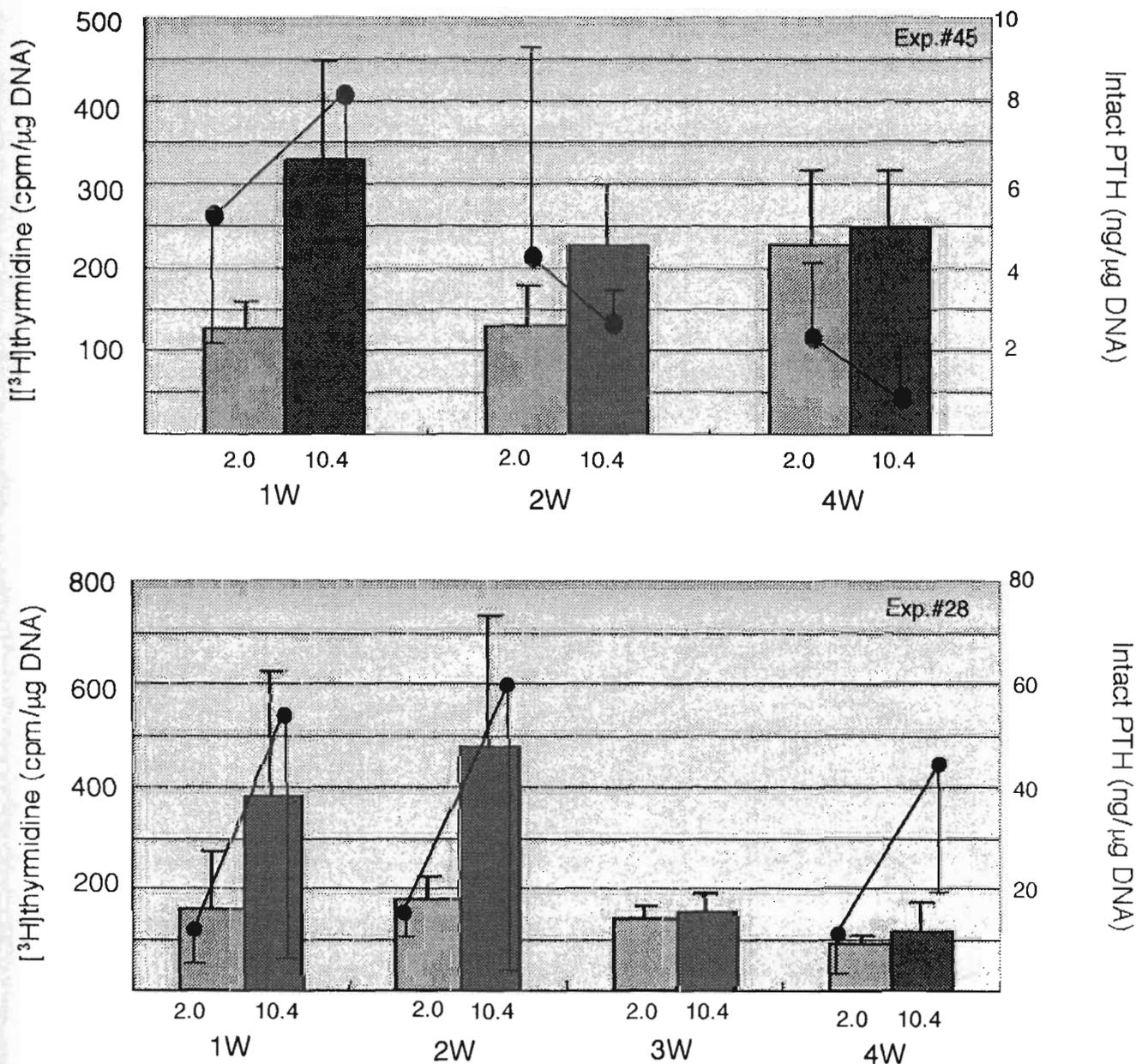
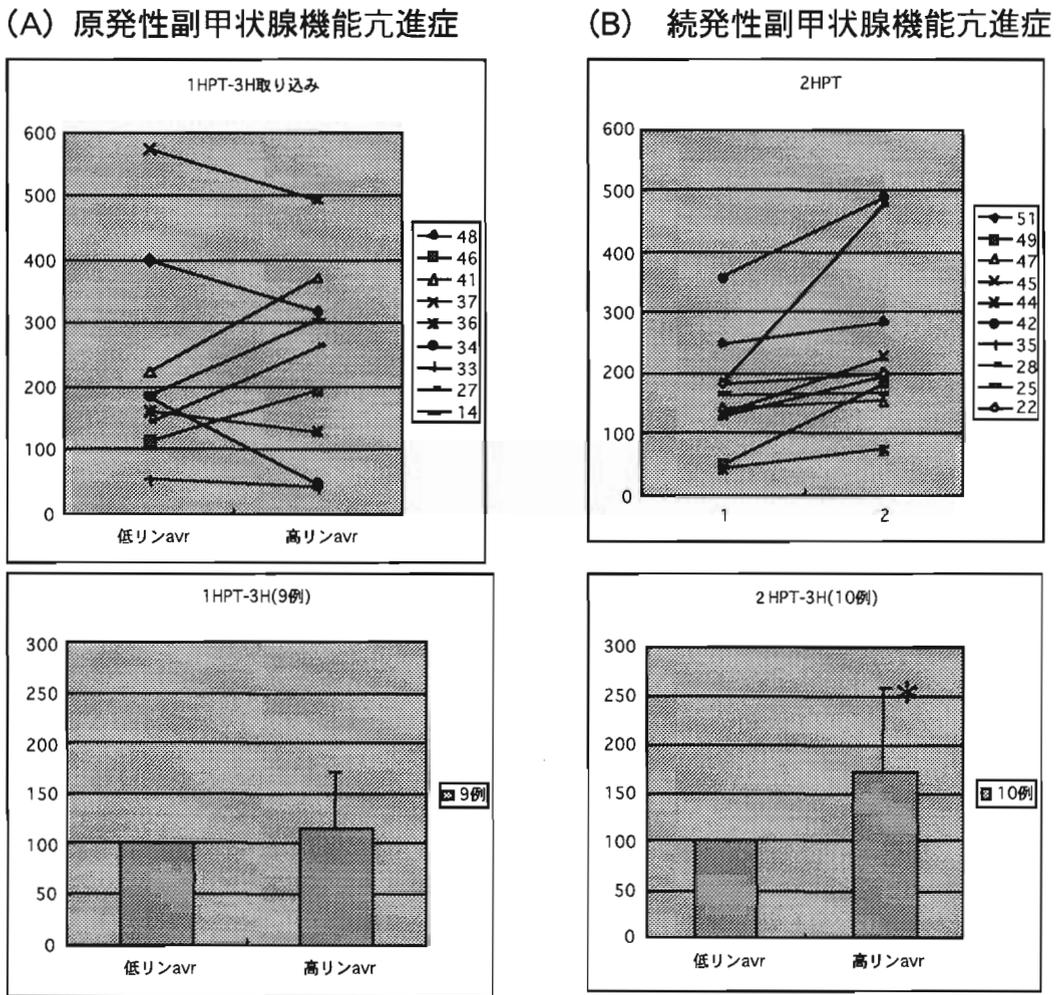


図7：続発性副甲状腺機能亢進症患者の手術時に得られた副甲状腺切片を1~4週間培養した後、低リン (2.0mg/dl) および高リン (10.4mg/dl) の培養液にて18時間培養後、³H]thymidineを添加し、取り込まれた放射活性をcpm/μg DNAで示した。同時に培養液を採取し、培養液中に分泌された intact PTHをng/μg DNAで示した (データは mean ±SD, N=4)

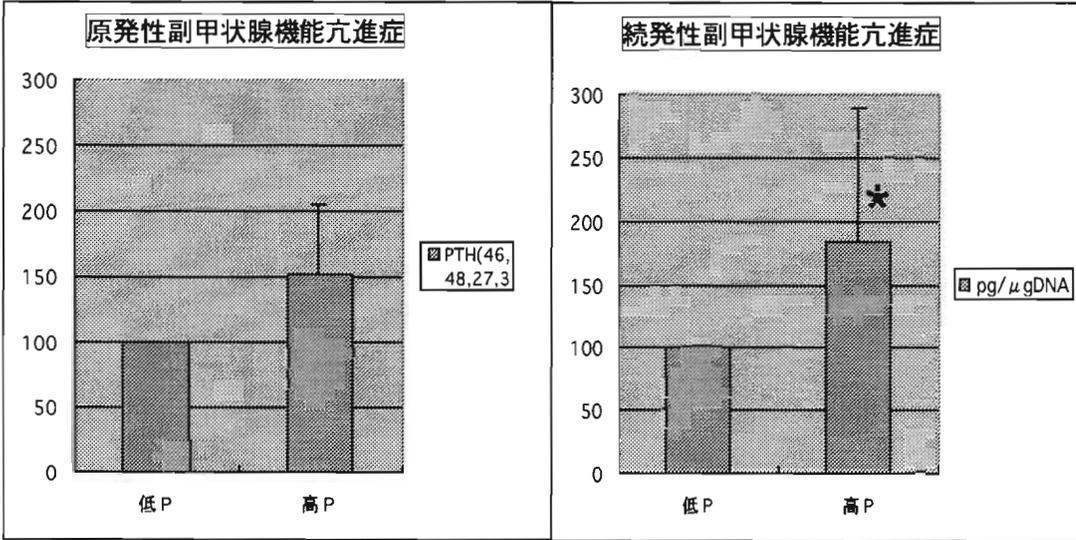
しかし、実験により、得られた副甲状腺組織により大いに異なるため 9 回（原発性副甲状腺機能亢進症）および 10 回（続発性副甲状腺機能亢進症）の実験結果を図 8 に示した。また、PTH の分泌は図 9 に示した。各実験ごとのバラ付きが大きいので、%increase で示した。

図 8：低リン濃度および高リン濃度培養液で培養した場合の $[^3\text{H}]$ thymidine の取り込み



原発性および続発性副甲状腺機能亢進症の手術時に得られた副甲状腺切片を 1-2 週間ほど preculture 培養液で培養後、低リン濃度 (2.0mg/dl) および高リン濃度 (10.4mg/dl) の培養液で培養し、18 時間の培養時間中にとりこまれた $[^3\text{H}]$ thymidine を cpm/mg DNA で示した。各々の実験は、triplicate または quadruplicate にて行っており、各平均値を示した。下図は低リン濃度値を 100 として、高リン濃度値を%で表示したもの。*P < 0.05

図9：原発性および続発性副甲状腺機能亢進症患者より得られた副甲状腺腫細胞のPTH分泌能



PTHの分泌能は図7& 8に示すごとく、用いた組織によって著しくバラ付きが大きかったので、低リン濃度の培養液で培養したときのPTHの分泌量を100%として、高リン濃度の分泌量を% increaseで示した。Intact PTHの分泌は、0.2-100ng/μg DNAと実験条件によって大きな違いが認められた。データは、5回の実験結果の平均±SDで示した。原発性の方は有意差が認められなかったが、続発性では、paired t testで有意差が認められた (P<0.05)。

原発性でも、続発性でも、リンに反応してPTHの分泌が増加することが確認された。原発性と続発性を比較すると、やはり、続発性の方がリンに反応して、より多くのPTHが分泌される傾向が認められた。

E) DNA microarray による細胞増殖因子の解析

実験開始の当初（2001-2002年）は、total RNA が十分に採取できなかったため、total RNA が少量（ $\sim 5\mu\text{g}$ ）で解析できる DNA microarray（GEArray Q series, Superarray Com）を用いた。副甲状腺細胞を preculture 培養液で数日間培養後、低リン濃度（ 1.2mg/dl ）および高リン濃度（ 10mg/dl ）の培養液にて3日間培養した後、total RNA を抽出し、 ^{32}P でラベルしたのち DNA microarray（GEArray Q series, Superarray Com）にて94個の遺伝子の発現レベルを検討した。結果の一部は前報にて報告したが、これらのデータは再現性に乏しく、また、解析できる遺伝子数も限られていた。

そこで、17000個 \sim 41000個の遺伝子を一気に解析できる Ajilent 社の oligo-DNA microarray を用いて、リンにより誘導される遺伝子を検討した。

a) 副甲状腺細胞に特有の遺伝子

表2および図10-14に示すごとく、ヒト副甲状腺細胞で最も多く発現している遺伝子は、種々の ribosomal 関連遺伝子、細胞接着因子（LU (Lutheran blood group)、osteonectin, fibronectin など）、形態形成因子、signal 伝達遺伝子、prion (X82545)、DRD4 (dopamine receptor D4) などであった。当然のことではあるが、副甲状腺ホルモン（PTH）遺伝子も著しく発現していた。また、リンにより PTH の分泌が促進された場合には、PTH mRNA の発現も2倍近く増加していた（図13）。しかし、PTH の分泌が促進されなかった場合には PTH mRNA の発現レベルに有意な変化は認められなかった（図10）。副甲状腺癌でも PTH の遺伝子が強く発現していたが、リンに対する反応性は認められなかった（図11）。

しかし、一例の続発性副甲状腺機能亢進症患者より得られた副甲状腺組織は、PTH の分泌（データは示さず）も PTH mRNA の発現も極めて乏しくかった。これはおそらく、preculture 培養液が軽度の高カルシウム血症になっているため、この患者の副甲状腺細胞では CaSR の発現も抑制されており、その結果、PTH の合成・分泌が抑制されたのであろうと推測している（図14）。

その他、副甲状腺細胞に特有な遺伝子として、chromogranin A の発現が多く認められた。また、vitamin D receptor (VDR) やカルシウム感知受容体 (CaSR) の発現も認められた。

b) 副甲状腺細胞の増殖に関与していると推測されている遺伝子

FGF 関連の遺伝子や TGF 関連の遺伝子を表3に示した。高リン濃度の培養液により培養しても、FGF 関連遺伝子の動きに有意な変化は認められなかった。しかし、TGF- β がやや増加していた（表3）。

図10 : I° -HPT 組織のリンに対する反応性

培養13日目 (Pを代えてから1日目でRNA抽出)

(#36, H16/1/7手術日)

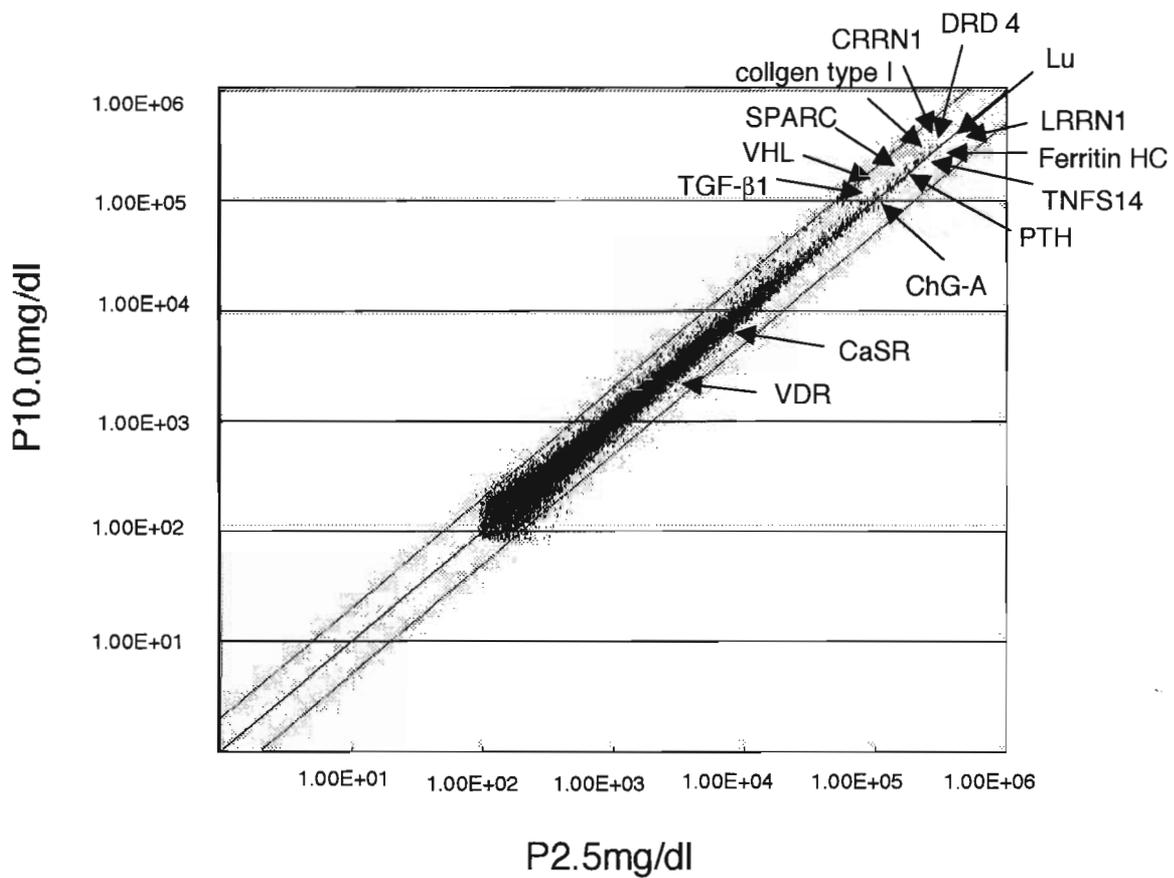


図11：副甲状腺癌組織のリンに対する反応性

培養9日目（Pを変えてから2日目でRNA抽出

（#24 H15/6/17 手術日）

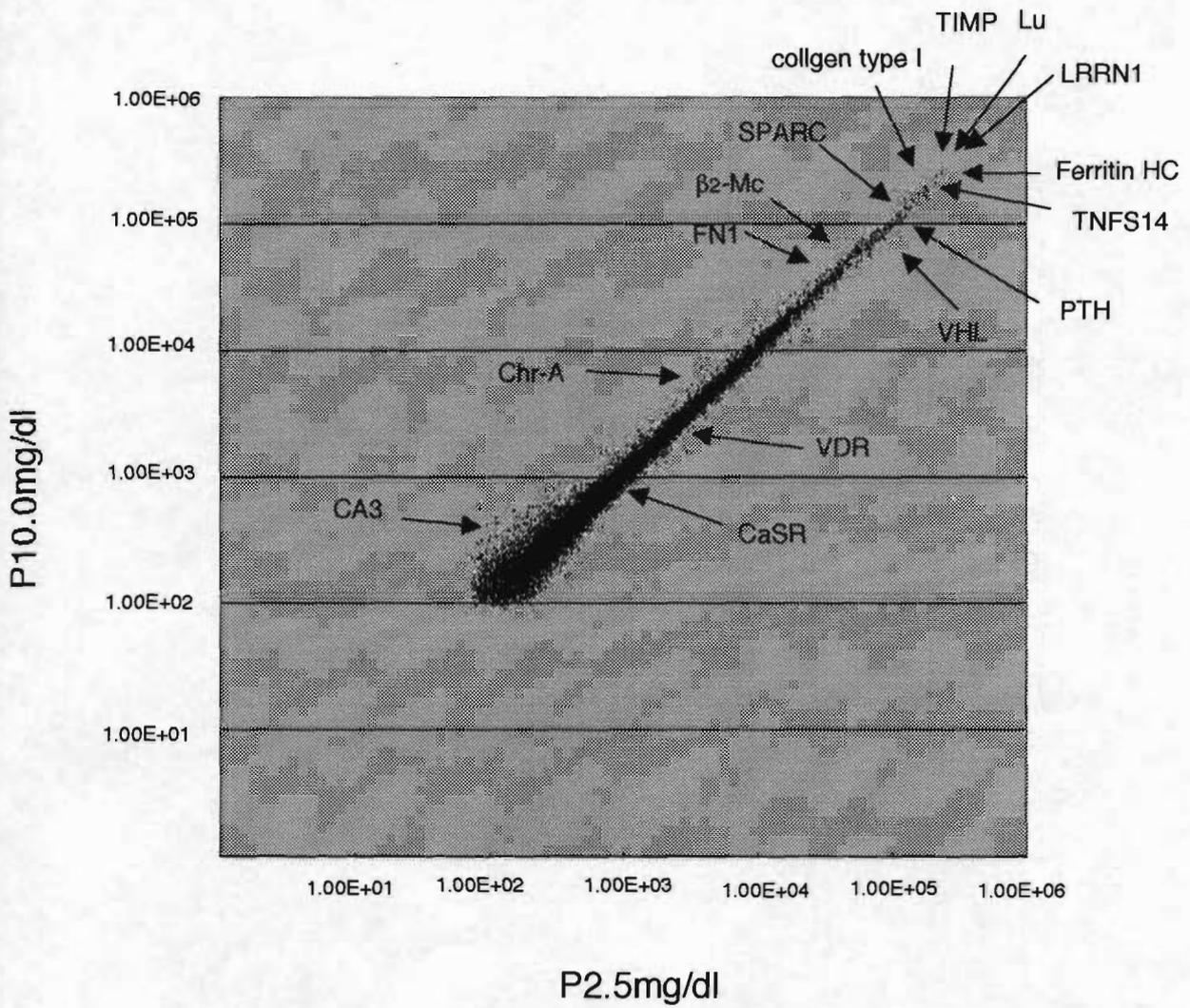


図12 : II° -HPT組織のリンに対する反応性

培養6日目 (Pを代えてから18時間でRNA抽出)

(#42, H16/4/7手術日)

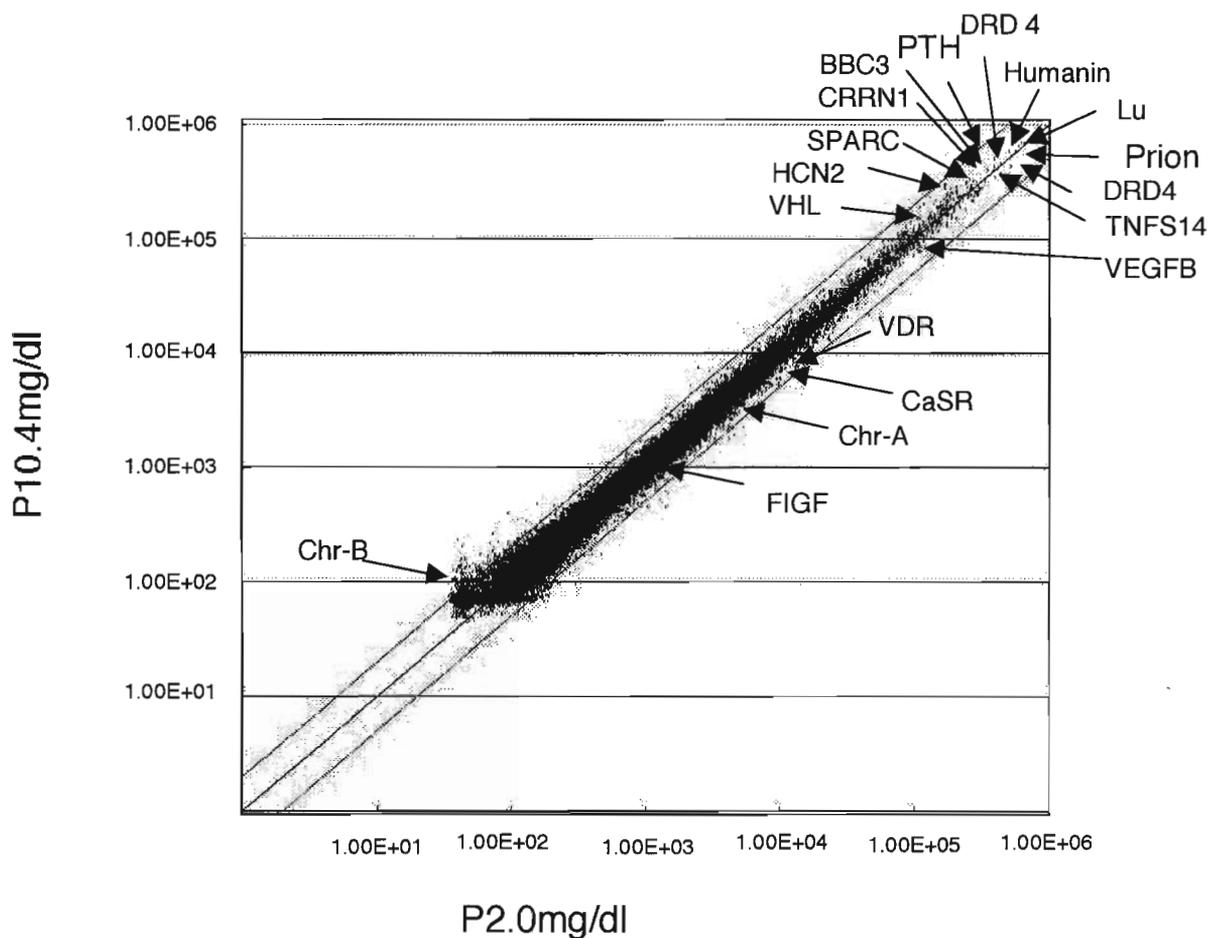


図13 : II° -HPT組織のリンに対する反応性

(#42, H16/4/7 手術日)

培養6日目;Pを代えてから4日目でRNA抽出

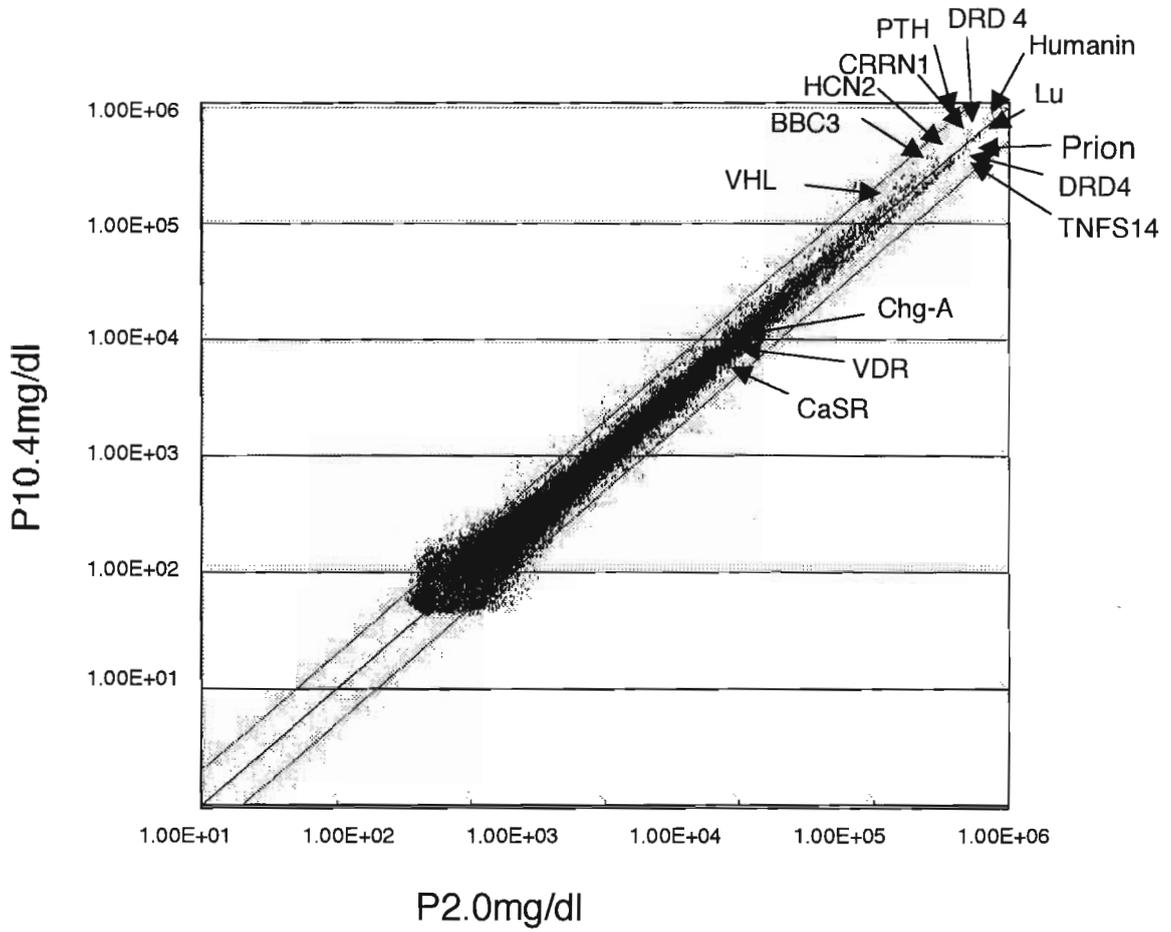
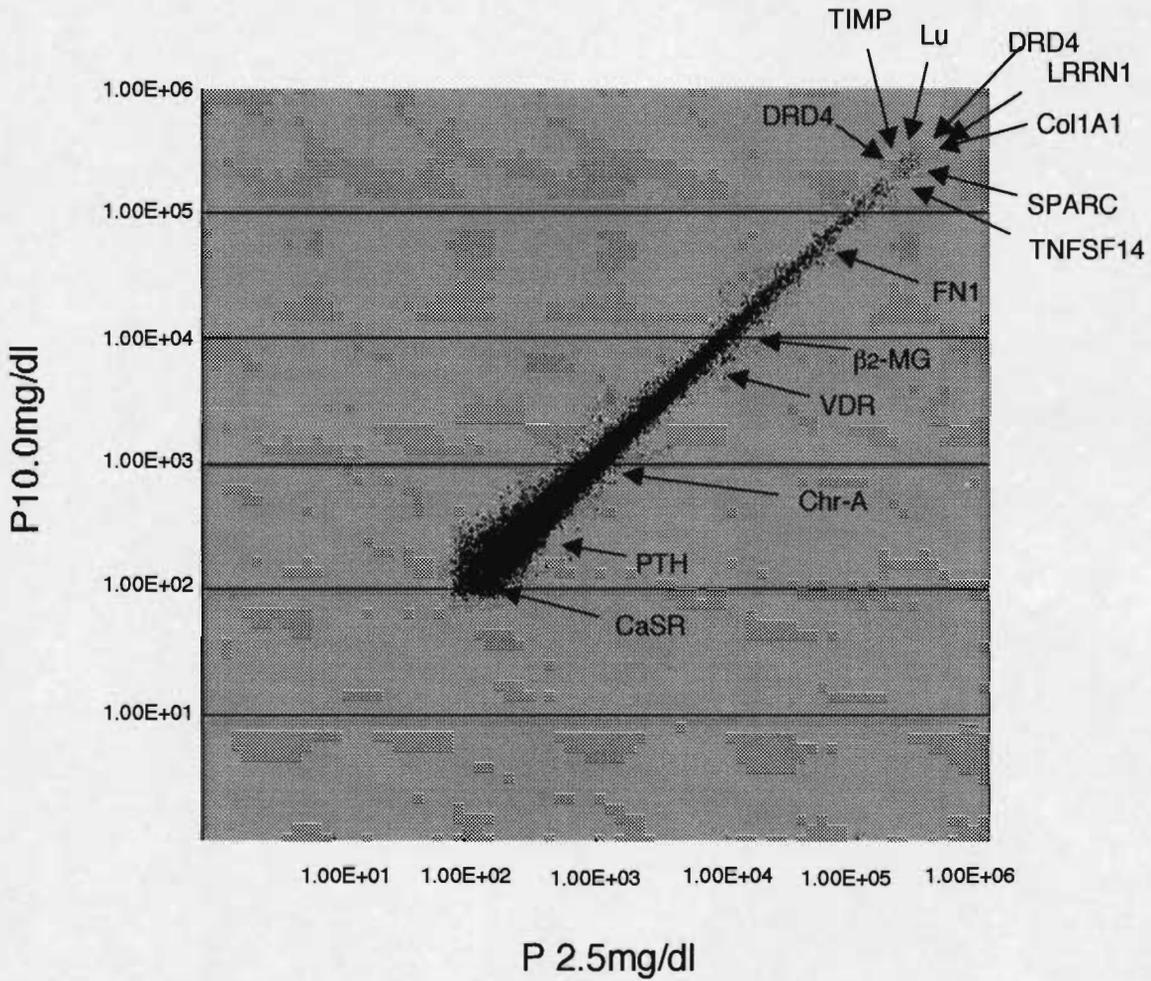


図14 : II° -HPT組織のリンに対する反応性

#26 (H15/7/9 手術日)

培養14日目 ; Pを変えてから1日目でRNA抽出



c) リンにより誘導される遺伝子

高リン濃度の培養液により培養することにより、2倍以上に増加した遺伝子が100個以上認められた。また、1/2以下に発現が抑制される遺伝子も50個ほど認められた。しかし、実験ごとにやや再現性が乏しいこともあったので、実験を反復してからpublishする予定である。なお、microarrayは極めて高価なので、今後は、より資金力のある研究陣と共同研究していく予定である。

考案

A) 既報のヒト副甲状腺細胞の培養系と本器官培養法の特徴

ヒトの副甲状腺は通常、米粒大（～30mg）の大きさであり、正常の甲状腺細胞を培養して、検討した成績は皆無である（10）。これまで、原発性または続発性副甲状腺機能亢進症の手術時に得られた副甲状腺腫をコラゲナーゼ処理にて、副甲状腺細胞を分離して、PTH の分泌を数時間ほど検討した報告は数多くあるが（10）、3-4 日ほど培養すると Ca による PTH の分泌抑制が認められなくなってしまう（11）。これは、単層培養すると、副甲状腺細胞のカルシウム感知受容体（CaSR）が激減してしまうためであることが判明している（12,13）。最近、低カルシウム濃度（0.5mM）の培養液で培養して、高カルシウム濃度（3.0mM）で増殖が抑制されるとの報告もあるが（14）、4 日以内の培養である。ごく最近、Ritter CS らは、ウシの副甲状腺をコラゲナーゼ処理したあと、コラゲンゲル内に包埋し、無血清培養液で培養することによりカルシウムに長期間反応する 3 次元培養系を確立している（15）。おそらく、副甲状腺機能を維持するには、細胞同士が接着して、organoid 構造を保持していく必要があるであろう（16）。

以上のように、高カルシウム濃度の培養液に反応して、PTH の分泌が抑制されたとの *in vitro* の報告は数多くあるが、高リン濃度の培養液に反応して、PTH の分泌が促進されたり、細胞増殖が促進されたとの報告は極めて少ない。それは、リンに対する副甲状腺細胞の増殖反応を検出するためには、少なくとも数日間の培養期間が必要であり、それだけの期間、副甲状腺細胞の機能を保持しながら培養できるシステムが開発されていなかったためである。

1996 年にいたり、ウシの副甲状腺のスライスまたはラットの副甲状腺をまるごと用いて、高リン濃度の培養液により PTH の分泌が刺激されることが次々と明らかになった（17,18,19）。しかし、collagenase 処理により得られた副甲状腺細胞では、リンに対する反応性が消失していた。

その後、ヒト副甲状腺細胞を用いて、高リン濃度の培養液により、PTH の分泌が促進されることが報告された（20）。さらに、続発性副甲状腺機能亢進症由来の副甲状腺細胞をマイルドにコラゲナーゼ処理して得られた細胞凝集塊をそのまま単層培養することにより、カルシウムに対する感受性を維持できたとの報告がなされている。しかし、この培養系では、リンに対して低濃度（0.5mM）および高濃度（4mM）で PTH の分泌が促進されるとの一部、非生理的な反応を呈し、*in vivo* の性質を維持しているとは言いがたい（21）。また、高濃度のカルシウム液で培養すると細胞増殖が促進されるなど、*in vivo* での成績と矛盾する成績も発表されている（22）。その後、ヒト副甲状腺細胞を Keratinocyte 培養用の無血清培養液中で 60 日ほど培養できたとの報告がある

(23)。

以上のごとく、リンに対する反応性を長期間にわたり保持したヒトの副甲状腺細胞の器官培養系はこれまでに報告が見当たらず、このような器官培養系を用いて、リンによる増殖制御機構を解明しようとした研究は皆無であり、当研究室の仕事が嚆矢である。

B) 高リン濃度の培養液による PTH の分泌と細胞増殖の促進について

長期間にわたり腎透析をうけている患者では、続発性副甲状腺機能亢進症が必発する。その成因は、高リン血症であることが判明しているが、高リン血症が何故、副甲状腺細胞の増殖を促進するのかは不明である。

我々は、原発性副甲状腺機能亢進症患者より得られた副甲状腺腫を用いて、高リン濃度の培養液に反応して、細胞増殖が促進される器官培養系を始めて確立できた。さらに、この器官培養系では、高リン濃度の培養液に反応して PTH の分泌も促進されることを見いだした。したがって、続発性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺でおきている現象を忠実に *in vitro* の器官培養系で再現できたといえる。

C) 副甲状腺腫の器官培養系で発現している主な遺伝子について

図 6 および図 7 に示すように、原発性副甲状腺機能亢進症および続発性副甲状腺機能亢進症患者より得られた副甲状腺腫を 1-2 週間ほど培養した後、発現している遺伝子を oligo-DNA microarray にて解析したところ、種々の ribosomal protein を始め、Lutheran blood group glycoprotein、osteonectin や fibronectin などの細胞接着因子、種々のコラーゲン蛋白、vimentin などの形態形成に関与している遺伝子が多く発現していた。その他、細胞増殖に関連している遺伝子が多数、増減していた。また、続発性副甲状腺機能亢進症では、prion 蛋白の発現が極めて強いものが認められた (表 2 参照)。

また、予測されたように PTH の遺伝子が極めて多く発現していた。さらに、PTH の分泌を調節している chromogranin A 遺伝子 (24) の発現も顕著に認められた。

ところで、原発性でも、続発性副甲状腺機能亢進症でも、CaSR (25) や VDR (26) の発現が減少していることが知られているが、今回の microarray にて、原発性でも続発性でも CaSR と VDR 遺伝子が十分に発現していることが確認された。正常人の副甲状腺を入手することは不可能なので、正常ヒトの副甲状腺細胞と比較していないので、CaSR や VDR の発現が減少しているか否かは不明である。しかし、CaSR や VDR の発現が症例毎に著しく異なっていることは事実であり、今後、臨床経過と比較検討していきたい。

D) 高リン濃度により誘発される遺伝子の動きについて

リンによりどのような遺伝子の発現が誘発または抑制されるかを検討するため、microarray により検討した。当初は、100 個程度の遺伝子を解析できる microarray を用いていた。前回の報告書 (8) では、insulin-like growth factor I (IGF-1)、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、TGF- β 3 (TGF- β 3)、fibroblast growth factor 17 (FGF-17)、c-fos induced growth factor などの発現がリンにより誘導されてくると報告したが、データの再現性が乏しいことが判明した。また、解析できる遺伝子数も少ないため、2003 年度以降は、多数の遺伝子を解析できる oligo-DNA microarray 法を用いて検討した。

副甲状腺腫は、原発性であれ、続発性であれ、monoclonal な増殖をしていることが明らかになっている。これらの細胞において細胞増殖に関与しているとされている遺伝子がこれまで数種類報告されているので、これらの遺伝子の動きについて検討してみた。

a) IGF-1

IGF-1 はもっとも強力な細胞増殖因子であり、ほとんどすべての細胞に対して anabolic な作用を発揮する。これまで、副甲状腺細胞でも IGF-1 や IGF-II が細胞増殖に関与していることが知られている (27)。しかし、今回の器官培養系では、リンに対する IGF-1 の反応はそれほど顕著なものではなかった。

b) TGF- α

TGF- α も副甲状腺細胞の増殖に関与しているとの報告もあるが(28,29)、我々の in vitro の系では TGF- α 遺伝子の動きは、それほど大きくは認められなかった。また、いくつかの実験では、TGF- β の発現レベルが亢進していることが認められている。

TGF- α は epidermal growth factor (EGF) 受容体に結合する。これまで、副甲状腺腫では、EGF 受容体の発現が亢進しており、正常副甲状腺では発現していないとされている (30)。今回の我々の実験系では、EGF の発現も EGF 受容体の発現も微々たるものであり、リンに対しての反応性も顕著なものではなかった。

c) FGF (fibroblast-growth factor)

FGF family は副甲状腺細胞の増殖刺激因子であるとの報告がある (31、32)。しかし、我々の副甲状腺細胞を用いた器官培養系では、リンに対する反応性はあまり顕著ではなかった。

d) Angiogenesis factors

いくつかの angiogenesis factor も血管内皮細胞と共同で、細胞増殖に関与していることが明らかとなっている (33)。我々の実験系では、血管内皮

細胞も一緒に培養されていると推測されているが、現在のところ、VEGF 系の遺伝子の動きはあまりリンとは関連していないようである。

D) 原発性と続発性副甲状腺機能亢進症の違いについて

原発性副甲状腺機能亢進症でも続発性副甲状腺機能亢進症でも CaSR や VDR の発現が減少していることが知られている。我々の実験では、正常ヒトの副甲状腺と比較検討することは不可能なので、原発性と続発性副甲状腺機能亢進症の副甲状腺でどの程度、これらの遺伝子発現が減少しているかは不明である。

そこで、原発性と続発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺でリンに対する反応性に違いが認められるか否かを検討した。原発性は腫瘍抑制遺伝子 (cyclin D, MEN-1 など) の loss of function mutation によることが多く、続発性副甲状腺機能亢進症はこれらとは別の遺伝子異常によるらしい。また、続発性ではリンにより増殖反応が刺激された結果であると推測されており、事実、我々の in vitro の器官培養系でもリンに対する反応性の違いが実証された。今後は、この理想的な器官培養系を用いて、原発性と続発性副甲状腺機能亢進症の違いについて、症例を重ねて、検討していきたい。

まとめ

生体がどのような機序でリン濃度を感知するのかは不明である。大腸菌や酵母ではリンセンサーが備わっていることが知られており、ほ乳類でも同様なリン感知機構が存在している可能性がある。

カルシウム感知受容体のように、人体にリン感知受容体があるか否かは不明である。しかし、臨床的な事実として、高リン血症があると人体のなかで、副甲状腺細胞だけが増殖する。この細胞増殖機構が解明されれば、透析患者に必発してくる続発性副甲状腺機能亢進症の予防法や治療法の開発ができる。

当研究室では、リンに反応して、細胞増殖が促進し、かつ、intact PTHの分泌も亢進するヒト副甲状腺細胞の器官培養系をほぼ 2 年かけて確立し、さらに total RNA の採取法に工夫をこらして、ようやく constant に oligo-DNA microarray にて解析できるようになった。

そして、原発性副甲状腺機能亢進症と続発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺細胞がリンに対してどのように対応するかを、比較検討したところ、原発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺細胞よりも、続発性副甲状腺機能亢進症から得られた副甲状腺細胞の方が、リンに呼応して細胞増殖する性質を強く保持していることが判明した。

いよいよ知的所有権を獲得できるような面白いデータができるのは、これからであるが、4年目となってしまった。マイクロアレイの解析には非常に高額の研究資金を要するので、この研究を今後どのように発展させていくか迷っていた。しかし、2004年10月に米国シアトル市で開催された米国骨代謝学会にて、ポスターにて発表したところ、共同研究の申し込みが複数の製薬会社からあった。そこで、今後は、これらのうちの一社と共同研究体制を整えて、地道に検討していきたい。

末筆になったが、これらのデータは今年内に、副甲状腺領域では最も impact factor の高い J Bone Miner Res 雑誌に投稿中である。

追記

① 副甲状腺細胞株の樹立

この4年間にわたる研究で実感したことであるが、副甲状腺細胞の cell line を樹立できれば、この研究が飛躍的に発展することが明白である。これまで、ラットの副甲状腺細胞を140代まで継代できたとの報告はあるが(34)、副甲状腺細胞の cell line は皆無である(35)。最近、MEN1患者の副甲状腺から細胞株を樹立したとの報告があったが、血管内皮細胞系の細胞株であり、PTHは産生していない(36)。そこで、当大学の倫理委員会にて、副甲状腺癌患者から提供された副甲状腺組織より、副甲状腺癌の cell line の樹立を申請し、2004年1月に許可して頂いた(参考資料⑤)。

現在、丸1年以上培養している副甲状腺細胞が一つ、および培養3ヶ月目のものが一つである。増殖が極めて遅いのが難点であるが、低カルシウム血症の培養液で培養すると、培養上清には intact PTH が高濃度に分泌されていることが判明しており、世界で初めての副甲状腺癌の細胞株の樹立ができそうである。

② 高カルシウム血症の成因に関する研究

当院にカルシウムサプリメントを大量に飲み過ぎて、高カルシウム血症を生じてしまい、原発性副甲状腺機能亢進症を疑われて、入院した症例を経験した。この患者は骨粗鬆症を恐れるあまり、カルシウムとして1日3-5gも摂取しており、高カルシウム血症を惹起したものと推測される。経過中、高カルシウム血症がありながら、intact PTH が高値であった時期があり、尿中カルシウム排泄量も多くなかったので、家族歴はないが、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症も疑われた。そこで、de novo に生じたカルシウム感知受容体(CaSR)の gain of function mutation を疑い、この研究費の一部を用いて、CaSRの遺伝子解析を行った。

CaSRの遺伝子配列には異常なく、カルシウム・サプリメントを中止してから高カルシウム血症も消退したので、カルシウム(牛骨由来なのでリン酸カルシウム)過剰摂取による高カルシウム血症であると診断された。この症例は日本内分泌学会の英文誌に報告済みである(文献④)。

文献

1. Silver J, Levi R. Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Clin Nephrol* 63:119-126, 2005.
2. Silver J. Molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 15 Suppl 5:2-7, 2000
3. Rodriguez M, Canalejo A, Garfia B, Aguilera E, Almaden Y. Pathogenesis of refractory secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 61 (Suppl.) 155-160, 2002
4. Estepa JC, Aguilera-Tejero E, Lopez I, Almaden Y, Rodriguez M, Felsenfeld AJ. Effect of phosphate on parathyroid hormone secretion in vivo. *J Bone Miner Res* 14 :1848-1854,1999.
5. Arnold A, Brown MF, Urena P, Gaz RD, Sarfati E, Drueke TB 1995 Monoclonality of parathyroid tumors in chronic renal failure and in primary parathyroid hyperplasia. *J Clin Invest* 95:2047-2053.
6. Rodriguez M, Nemeth E, Martin D The calcium-sensing receptor: a key factor in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288:F253-264, 2005.
7. Sato K, Obara T, Yamazaki K, Kanbe M, Nakajima K, Yamada A, Yanagisawa T, Kato Y, Nishikawa T, Takano K. Somatic mutations of the MEN1 gene and microsatellite instability in tertiary hyperparathyroidism occurring during high phosphate therapy for acquired, hypophosphatemic osteomalacia *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 5564-5571, 2001.
8. 佐藤幹二 高リン血症により誘導される副甲状腺細胞の増殖遺伝子：DNA array による検討（課題番号：13671164）平成13年度～平成14年度 科学研究費補助金基盤研究（C）研究成果報告書，平成15年3月
9. Prince R. Secondary and tertiary hyperparathyroidism In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Fifth edition, An Official Publication of the American Society for Bone and Mineral Research, editor Favus JM, 242-246, 2003
10. Hellman P. Culture of parathyroid cells. *Methods Mol Med* 107:291-301, 2005.
11. LeBoff MS, Rennke HG, Brown EM. Abnormal regulation of parathyroid cell secretion and proliferation in primary cultures of bovine parathyroid cells.

- Endocrinology. 113 :277-284, 1983.
12. Mithal A, Kifor O, Kifor I, Vassilev P, Butters R, Krapcho K, Simin R, Fuller F, Hebert SC, Brown EM. The reduced responsiveness of cultured bovine parathyroid cells to extracellular Ca²⁺ is associated with marked reduction in the expression of extracellular Ca(2+)-sensing receptor messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 136:3087-3092, 1995.
 13. Brown AJ, Zhong M, Ritter CS, Brown EM, Slatopolsky E: Loss of calcium responsiveness in cultured parathyroid cells is associated with decreased calcium receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 212:861-867, 1995.
 14. Liu W, Ridefelt P, Akerstrom G, Hellman P. Differentiation of human parathyroid cells in culture. *J Endocrinol.* 168(3):417-425, 2001.
 15. Ritter CS, Slatopolsky E, Santoro S, Brown AJ. Parathyroid cells cultured in collagen matrix retain calcium responsiveness: importance of three-dimensional tissue architecture. *J Bone Miner Res.* 19:491-498, 2004.
 16. Ridgeway RD, Hamilton JW, MacGregor RR 1986 Characteristics of bovine parathyroid cell organoids in culture. *In Vitro Cell Dev Biol* **22**:91-99.
 17. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest.* 97:2534-2540, 1996.
 18. Nielsen PK, Feldt-Rasmussen U, Olgaard K. A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrol Dial Transplant.* 11:1762-1768. 1996
 19. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, Rodriguez M. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res* 11:970-976, 1996.
 20. Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, Campistol JM, Torres A, Rodriguez M. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 9:1845-1852,1998.
 21. Roussanne MC, Gogusev J, Hory B, Duchambon P, Souberbielle JC,

- Nabarra B, Pierrat D, Sarfati E, Drmuke T, Bourdeau A. Persistence of Ca²⁺-sensing receptor expression in functionally active, long-term human parathyroid cell cultures. *J Bone Miner Res* March 13 : 354-362, 1998
- 22.. Roussanne MC, Lieberherr M, Souberbielle JC, Sarfati E, Druke T, Bourdeau A. Human parathyroid cell proliferation in response to calcium, NPS R-467, calcitriol and phosphate. *Eur J Clin Invest* 31:610-616, 2001
23. Liu W, Ridefelt P, Akerstrom G, Hellman P. Differentiation of human parathyroid cells in culture. *J Endocrinol.* 168 :417-425, 2000.
24. Tanaka R, Umemura S, Kakuta T, Fujisaki T, Sakai H, Saitoh A, Osamura RY. Co-expression of parathyroid hormone and chromogranin A in secondary hyperparathyroidism: a functional marker for secretory activity of hyperplastic nodules. *Pathol Res Pract.* 199 :93-99,2003.
25. Kifor O, Moore FD Jr, Wang P, Goldstein M, Vassilev P, Kifor I, Hebert SC, Brown EM. Reduced immunostaining for the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:1598-1606, 1996
26. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest.* 92 :1436-1443, 1993.
27. Sadler GP, Jones DL, Woodhead JS, Horgan K, Wheeler MH 1996 Effect of growth factors on growth of bovine parathyroid cells in serum-free medium. *World J Surg* 20:822-828[CrossRef][Medline]
28. Gogusev J, Duchambon P, Stoermann-Chopard C, Giovannini M, Sarfati E, Druke TB 1996 De novo expression of transforming growth factor- α in parathyroid gland tissue of patients with primary or secondary uraemic hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 11:2155-2162
29. Cozzolino M, Lu Y, Finch J, Slatopolsky E, Dusso AS
p21WAF1 and TGF- α mediate parathyroid growth arrest by vitamin D and high calcium. *Kidney Int.* 60:2109-2117, 2001.
30. Sadler GP, Morgan JM, Jasani B, Douglas-Jones A, Wheeler MH 1996 Epidermal growth factor receptor status in hyperparathyroidism:

- immunocytochemical and in situ hybridization study. *World J Surg* 20:736-742
- 31.. Lambert D, Eaton CL, Harrison BJ 1998 Fibroblast growth factors and their receptors in parathyroid disease. *World J Surg* 22:520-525
32. Sakaguchi K Acidic fibroblast growth factor autocrine system as a mediator of calcium-regulated parathyroid cell growth. *J Biol Chem.*;267:24554-24562, 1992.
33. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 24 :600-632, 2003
34. Sakaguchi K, Santora A, Zimering M, Curcio F, Aurbach GD, Brandi ML. Functional epithelial cell line cloned from rat parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 : 3269-3273, 1987
35. Brandi ML, Fitzpatrick LA, Coon HG, Aurbach GD. Bovine parathyroid cells: cultures maintained for more than 140 population doublings. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(6):1709-1713, 1986
36. Benvenuti S, Masi L, Falchetti A, Mancini L, Formigli L, Zecchi S, Amorosi A, Tonelli F, Brandi ML 1997 HPE cells: a clonal endothelial cell line established from human parathyroid tissue (human parathyroid cell line). *Endothelium* 5:37-49.

表1

ヒト副甲状腺細胞を低P濃度および高P濃度の培養液で培養し、発現が誘導された遺伝子

遺伝子名	遺伝子の性質	Log Ratio	シグナル強度 低P濃度	シグナル強度 高P濃度
遺伝子名	遺伝子の性質	増減した比率	P 2.0mg/dl	P10.4m/dl
1 LU	Homo sapiens Lutheran blood group (Aubergier b antigen included) (LU), mRNA	1.33E-02	6.74E+05	6.34E+05
2 X82545	H.sapiens mRNA for prion protein	2.46E-02	6.44E+05	6.91E+05
3 DRD4	Homo sapiens dopamine receptor D4 (DRD4), mRNA	2.21E-02	6.07E+05	6.29E+05
4 RPS27	Homo sapiens ribosomal protein S27 (metalloproteinin 1) (RPS27), mRNA	1.87E-01	3.94E+05	6.07E+05
5 LRRN4	Homo sapiens leucine rich repeat neuronal 4 (LRRN4), mRNA	9.10E-03	5.78E+05	5.90E+05
6 MECT1	Homo sapiens mucoepidermoid carcinoma translocated 1 (MECT1), mRNA	-1.42E-02	5.72E+05	5.54E+05
7 FLJ14464	Homo sapiens hypothetical protein FLJ14464 (FLJ14464), mRNA	-2.43E-02	5.31E+05	5.02E+05
8 SNX26	Homo sapiens sorting nexin 26 (SNX26), mRNA	8.97E-02	4.01E+05	4.93E+05
9 PTH	Homo sapiens parathyroid hormone (PTH), mRNA	2.61E-01	2.52E+05	4.60E+05
10 HCN2	Homo sapiens hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2 (HCN2), mRNA	3.97E-03	4.54E+05	4.59E+05
11 L_962604	Maternal-antigen-that-embryos-require, an oocyte-specific maternal effect protein that may play a role in embryonic development, may serve as an autoantigen in autoimmune premature ovarian failure	-2.34E-02	4.60E+05	4.35E+05
12 BM6839360	K-ESTO116111 S9SNU601 Homo sapiens cDNA clone S9SNU601-68-604 5, mRNA sequence	-1.00E-01	5.34E+05	4.24E+05
13 BC023384	Homo sapiens heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1, mRNA (cDNA clone MGC:26221 IMAGE:4826825), complete cds	2.10E-02	4.02E+05	4.22E+05
14 BM811643	AGENCOURT_6489566 NIH_MGC_125 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5724059 5, mRNA sequence	-1.26E-02	4.29E+05	4.17E+05
15 AK023580	Homo sapiens cDNA FLJ13518 fs, clone PLAGE1005799	5.16E-02	3.98E+05	4.04E+05
16 LOC283248	Homo sapiens hypothetical protein LOC283248 (LOC283248), mRNA	-2.14E-02	4.22E+05	4.02E+05
17 L_929549	Protein kinase C-like 2, a serine-threonine kinase related to protein kinase C, associates with Rho-GTP (ARHA), plays a role in regulating cell-cell adhesion and may play a role in Rho-signaling and apoptosis	-8.41E-03	3.94E+05	3.97E+05
18 BBC3	Homo sapiens Bcl-2 binding component 3 (bbc3), mRNA, complete cds	-7.87E-02	4.51E+05	3.76E+05
19 BC015180	Homo sapiens homeo box A3, transcript variant 1, mRNA (cDNA clone MGC:10155 IMAGE:3905733), complete cds	-7.39E-02	4.08E+05	3.46E+05
20 FLJ10490	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10490 (FLJ10490), mRNA	1.01E-01	2.60E+05	3.28E+05
21 M21963	Human (clone pC68) MHC class I-ILA-CX52 mRNA, 3 end cds	5.77E-02	2.79E+05	3.17E+05
22 L_1930407	AUTO: Very strong similarity to (Homo sapiens) FTH1: Ferritin heavy polypeptide 1, a ferroxidase involved in iron storage, heme biosynthesis, cell growth, oxidative stress response, and transcription, may play a role in iron transport, apoptosis, ...	9.91E-02	2.50E+05	3.14E+05
23 BC000845	Homo sapiens cDNA clone IMAGE3457769, partial cds	-4.53E-02	3.42E+05	3.08E+05
24 TPSG1	Homo sapiens tryptase gamma 1 (TPSG1), mRNA	8.57E-02	2.45E+05	2.99E+05
25 RPS28	Homo sapiens ribosomal protein S28 (RPS28), mRNA	3.77E-03	2.96E+05	2.98E+05
26 L_1152555	Ribosomal protein L26, a component of the large 60S ribosomal subunit	2.38E-01	1.71E+05	2.95E+05
27 BC013284	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4025174, partial cds	-2.32E-02	3.06E+05	2.90E+05
28 L_959221	Ribosomal protein S2, a putative component of the small 40S ribosomal subunit, may bind RNA, upregulated in squamous cell carcinoma and in breast and colon tumors	2.83E-02	2.71E+05	2.89E+05
29 L_3539839	AUTO: Very strong regional similarity to (Homo sapiens) bk119182.3: Protein containing an acyl transferase domain, has low similarity to uncharacterized S_pombe Spac11g7.05cp	5.27E-02	2.53E+05	2.55E+05
30 TMSL4	Homo sapiens thymosin-like 4 (TMSL4), mRNA	2.16E-02	2.70E+05	2.84E+05

31 HZ0961	Yn66b08.s1 Soares adult brain N265H855Y Homo sapiens cDNA clone IMAGE173367_3, mRNA sequence	1.29E-01	2.09E+05	2.52E+05
32 FHTT	Homo sapiens fragile histidine triad gene (FHTT), mRNA	-5.23E-03	2.82E+05	2.78E+05
33 L_33590537	AUTO: Very strong regional similarity to (Homo sapiens) KIAA0592: Protein of unknown function, has high similarity to uncharacterized mouse D6Wsu116e	-5.99E-02	3.16E+05	2.75E+05
34 BMP8A	Bone morphogenetic protein 8 (osteogenic protein 2), a member of the transforming growth factor-beta superfamily, may play a role in skeletal development, highly expressed in osteosarcoma	-7.41E-02	3.27E+05	2.75E+05
35 EEF1A1	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1), mRNA	1.06E-01	2.14E+05	2.73E+05
36 RPS18	Homo sapiens ribosomal protein S18 (RPS18), mRNA	-9.31E-02	2.10E+05	2.51E+05
37 L_33547304	AUTO: Very strong regional similarity to (Homo sapiens) TCEA2: Transcription elongation factor A (SII) 2, TFIIIS-related transcription elongation factor, promotes cleavage of nascent mRNA and readthrough of arrested RNA polymerase II holoenzymes, may ...	-6.38E-02	3.00E+05	2.55E+05
38 CASKIN1	Protein with strong similarity to cask-interacting protein 1 (rat Caskin1), which is a brain specific protein that binds the calcium calmodulin-dependent serine protein kinase Cask, contains six ankyrin repeats, two central SAM domains, and an SH3 domain	-5.09E-02	2.90E+05	2.58E+05
39 MGC10814	Homo sapiens hypothetical protein MGC10814 (MGC10814), mRNA	7.46E-02	2.15E+05	2.55E+05
40 L_1923477	AUTO: Very strong similarity to (Homo sapiens) RPL26: Ribosomal protein L26, a component of the large 60S ribosomal subunit	1.25E-01	1.89E+05	2.53E+05
41 KLK3	Homo sapiens kallikrein 3, (prostate specific antigen) (KLK3), transcript variant 2, mRNA	1.10E-01	1.96E+05	2.55E+05
42 L_1993420	AUTO: High similarity to (Homo sapiens) RPLP1: Ribosomal protein P1, acidic phosphoprotein component of the large 60S ribosomal subunit	-1.43E-01	1.81E+05	2.51E+05
43 AY029066	Homo sapiens Humannin (HN1) mRNA, complete cds	-7.18E-02	2.95E+05	2.55E+05
44 AY033611	Homo sapiens placenta immunoregulatory factor PLIF mRNA, complete cds	-9.50E-02	3.07E+05	2.47E+05
45 LBX1	Homo sapiens transcription factor similar to D. melanogaster homeodomain protein lady bird late (LBX1), mRNA	1.25E-02	2.39E+05	2.45E+05
46 RPS20	Homo sapiens ribosomal protein S20 (RPS20), mRNA	-4.09E-02	2.69E+05	2.64E+05
47 BC018448	Homo sapiens cDNA clone IMAGE-4452456, partial cds	6.06E-02	2.13E+05	2.44E+05
48 AF357221	Homo sapiens FKSG88 mRNA, complete cds	-9.37E-02	3.00E+05	2.42E+05
49 AK025837	Homo sapiens cDNA: FLJ22184 fs, clone HRC00983	-3.11E-02	2.59E+05	2.41E+05
50 SPRL5A	Homo sapiens small proline rich-like (epidermal differentiation complex) 5A (SPRL5A), mRNA	2.23E-02	2.22E+05	2.34E+05
51 OAZ1	Homo sapiens ornithine decarboxylase antizyme 1 (OAZ1), mRNA	2.52E-02	2.19E+05	2.32E+05
52 CDC42EP5	Homo sapiens CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5 (CDC42EP5), mRNA	-4.88E-02	2.59E+05	2.32E+05
53 HCNA4	Homo sapiens mRNA for hyperpolarization-activated channel type 4 (HCNA4)	-4.41E-02	2.53E+05	2.28E+05
54 DIA1	Homo sapiens diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase) (DIA1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant M, mRNA	1.85E-02	2.18E+05	2.27E+05
55 RPL13	Homo sapiens ribosomal protein L13 (RPL13), transcript variant 2, mRNA	-1.27E-02	2.34E+05	2.27E+05
56 FLJ35453	Homo sapiens hypothetical protein FLJ35453 (FLJ35453), mRNA	1.34E-02	2.17E+05	2.24E+05
57 ATP1B1	Homo sapiens ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1), mRNA	4.77E-02	2.00E+05	2.22E+05
58 MGC10772	Homo sapiens hypothetical protein MGC10772 (MGC10772), mRNA	6.37E-02	1.90E+05	2.26E+05
59 RPS8	Homo sapiens ribosomal protein S8 (RPS8), mRNA	1.04E-01	1.72E+05	2.18E+05
60 TCN1	Homo sapiens transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family) (TCN1), mRNA	-1.04E-01	2.74E+05	2.16E+05
61 LEP4	Homo sapiens late envelope protein 4 (LEP4), mRNA	-1.29E-02	2.20E+05	2.14E+05
62 M11886	Human MHC class IHLA-C allele HLA-C4, partial cds	8.25E-02	1.76E+05	2.13E+05
63 L_1956607	AUTO: Very strong regional similarity to (Homo sapiens) CYP51A1: Cytochrome P450 51 (lanosterol 14-alpha-demethylase), a cytochrome P450 enzyme that is involved in cholesterol biosynthesis	-1.21E-01	2.82E+05	2.13E+05
64 BC005354	Homo sapiens ribosomal protein, large P2, mRNA (cDNA clone MGC:12453 IMAGE:4052568), complete cds	-4.54E-02	2.36E+05	2.13E+05
65 MTND1	Homo sapiens cDNA: FLJ21627 fs, clone COL08058	-1.55E-01	1.49E+05	2.13E+05
66 SMARCC2	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2 (SMARCC2), transcript variant	-2.30E-02	2.21E+05	2.10E+05

2, mRNA

67 TPT1	Homo sapiens B-JHCC-24 tumor antigen mRNA, complete cds	1.02E-01	1.61E+05	2.34E+05
68 FLJ31052	Homo sapiens hypothetical protein FLJ31052 (FLJ31052), mRNA	-1.18E-02	2.09E+05	2.04E+05
69 RPL41	Homo sapiens ribosomal protein L41 (RPL41), mRNA	5.13E-02	1.80E+05	2.32E+05
70 RPS14	Homo sapiens PRO2640 mRNA, complete cds	-1.78E-02	2.08E+05	2.30E+05
71 AK091537	Homo sapiens cDNA FLJ34218 fis, clone FCBBF3022311	-4.63E-02	2.21E+05	1.39E+05
72 SLC31A2	Homo sapiens solute carrier family 31 (copper transporters), member 2 (SLC31A2), mRNA	2.15E-01	1.21E+05	1.99E+05
73 RPS6	Homo sapiens ribosomal protein S6 (RPS6), mRNA	7.78E-02	1.64E+05	1.96E+05
74 HES7	Homo sapiens hairy and enhancer of split 7 (Drosophila) (HES7), mRNA	-2.33E-04	1.94E+05	1.94E+05
75 TMSB4X	Homo sapiens thymosin, beta 4, X chromosome (TMSB4X), mRNA	5.74E-03	1.91E+05	1.94E+05
76 UBCE7P5	Homo sapiens likely ortholog of mouse ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 5 (UBCE7P5), mRNA	8.19E-02	1.60E+05	1.93E+05
77 RPS11	Homo sapiens ribosomal protein S11 (RPS11), mRNA	5.92E-02	1.67E+05	1.92E+05
78 BC040191	Homo sapiens, Similar to expressed sequence A1414849, clone IMAGE:4814106, mRNA	3.34E-02	1.77E+05	1.32E+05
79 RPL19	Homo sapiens ribosomal protein L19 (RPL19), mRNA	-7.48E-04	1.92E+05	1.91E+05
80_L_931617	Member of the interferon-induced transmembrane protein family, has a region of high similarity to a region of human IFITM1, which transduces antiproliferative and homotypic adhesion signals and regulates L-selectin (human SELL) expression	3.69E-03	1.87E+05	1.69E+05
81 KCNU16	Homo sapiens potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16 (KCNU16), transcript variant 1, mRNA	2.22E-01	1.13E+05	1.62E+05
82 OGRF	Homo sapiens opiod growth factor receptor (OGFR), mRNA	8.20E-02	1.54E+05	1.86E+05
83 NPAS3	Homo sapiens neuronal PAS domain protein 3 (NPAS3), mRNA	9.85E-03	1.80E+05	1.84E+05
84 RPLP1	Homo sapiens ribosomal protein, large, P1 (RPLP1), mRNA	4.01E-02	1.68E+05	1.84E+05
85 RPS25	Homo sapiens ribosomal protein S25 (RPS25), mRNA	4.96E-02	1.63E+05	1.83E+05
86 RPL37A	Homo sapiens ribosomal protein L37a (RPL37A), mRNA	-5.75E-03	1.85E+05	1.82E+05
87 TMSB4X	Homo sapiens thymosin, beta 4, X chromosome (TMSB4X), mRNA	1.88E-02	1.73E+05	1.73E+05
88 D28356	Homo sapiens mRNA for fructose-bisphosphate aldolase A, SUTR region	-6.06E-02	2.04E+05	1.73E+05
89 FTL	Homo sapiens ferritin, light polypeptide (FTL), mRNA	-1.46E-01	2.46E+05	1.76E+05
90 RPL7	Homo sapiens ribosomal protein L7 (RPL7), mRNA	6.43E-02	1.52E+05	1.76E+05
91 WNT6	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 6 (WNT6), mRNA	-5.57E-02	2.00E+05	1.76E+05
92 RPS27	Homo sapiens ribosomal protein S27 (metalloproteinase 1) (RPS27), mRNA	3.10E-02	1.63E+05	1.75E+05
93_L_935683	Member of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors (GPCR), has high similarity to uncharacterized mouse GrcA	7.15E+03	1.70E+05	1.72E+05
94_RPS13	Homo sapiens ribosomal protein S13 (RPS13), mRNA	-1.44E-02	1.73E+05	1.68E+05
95 PBP	Homo sapiens prostatic binding protein (PBP), mRNA	9.05E-03	1.63E+05	1.65E+05
96 RPL23	Homo sapiens ribosomal protein L23 (RPL23), mRNA	9.11E-02	1.35E+05	1.65E+05
97 RPL10A	Homo sapiens ribosomal protein L10a (RPL10A), mRNA	3.70E-02	1.53E+05	1.66E+05
98 BC015735	Homo sapiens NADPH-dependent FMN and FAD containing oxidoreductase, mRNA (cDNA clone MGC:22987 IMAGE:4869561), complete cds	-4.38E-02	1.83E+05	1.65E+05
99_L_964631	Pseudouridylylase synthase 1, may function as a RNA-pseudouridine synthase of type I	1.50E-02	1.58E+05	1.64E+05
100_L_929594	Protein containing 12 C2H2 type zinc finger domains, which bind nucleic acids, has a region of moderate similarity to a region of mouse Zfp287, which is a Kruppel-type zinc finger transcription factor that regulates the expression of cytokines in T cells	7.33E-02	1.35E+05	1.59E+05

< Table 2 >

Representative genes in the parathyroid glands		Log ratio	P (2.0mg/dl)	P (10mg/dl)
1	PTH parathyroid hormone (PTH), mRNA	2.61E-01	2.52E+05	4.60E+05
2	VDR vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor (VDR), mRNA	-1.57E-01	9.10E+03	6.34E+03
3	CASR calcium-sensing receptor (hypocalcemic hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism) (CASR), mRNA	-1.20E-01	6.58E+03	4.99E+03
4	CHGA chromogranin A (parathyroid secretory protein 1) (CHGA), mRNA	-1.59E-01	6.54E+03	4.53E+03
Fibroblast Growth Factors				
1	FGF23 fibroblast growth factor 23 (FGF23), mRNA	2.28E-01	5.03E+01	8.51E+01
2	FGF13 fibroblast growth factor 13 (FGF13), transcript variant 1A, mRNA	1.23E-01	3.28E+03	4.35E+03
3	FGF4 fibroblast growth factor 4 (heparin secretory transforming protein 1.) (FGF4), mRNA	1.19E-01	1.77E+02	2.33E+02
4	FGF12 Fibroblast growth factor 12, a predicted growth factor that may play roles in cell signaling, neurogenesis, and heart development	9.64E-02	2.75E+02	3.44E+02
5	FGF3 fibroblast growth factor 3 (FGF3), mRNA	7.43E-02	4.50E+04	5.34E+04
6	FGF6 fibroblast growth factor 6 (FGF6), mRNA	7.29E-02	3.11E+02	3.68E+02
7	FGF2 fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA	7.13E-02	1.08E+03	1.27E+03
8	FGF17 fibroblast growth factor 17 (FGF17), mRNA	4.93E-02	8.56E+01	9.58E+01
9	FGF1 acidic fibroblast growth factor [alternatively spliced] [human, cardiac allograft, mRNA Partial, 357 nt]	4.83E-02	4.56E+02	5.10E+02
10	FGF20 fibroblast growth factor 20 (FGF20), mRNA	4.11E-02	4.54E+02	4.99E+02
11	FGF14 fibroblast growth factor 14 (FGF14), transcript variant 2, mRNA	3.58E-02	1.98E+02	2.15E+02
12	FGF11 fibroblast growth factor 11 (FGF11), mRNA	2.58E-02	1.12E+03	1.19E+03
13	FGF19 fibroblast growth factor 19 (FGF19), mRNA	2.06E-02	4.72E+02	4.95E+02
14	FGF7 fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor) (FGF7), mRNA	1.00E-02	2.51E+02	2.57E+02
15	FGF18 fibroblast growth factor 18 (FGF18), transcript variant 2, mRNA	5.83E-03	4.22E+02	4.28E+02
16	FGF5 fibroblast growth factor 5 (FGF5), transcript variant 1, mRNA	0.00E+00	4.39E+01	6.38E+01
17	FGF16 fibroblast growth factor 16 (FGF16), mRNA	-1.32E-03	1.47E+03	1.47E+03

18	FGF19	fibroblast growth factor 19 (FGF19), mRNA	-1.85E-03	1.37E+03	1.37E+03
19	FGF8	fibroblast growth factor 8 (androgen-induced) (FGF8), transcript variant B, mRNA	-4.95E-03	3.23E+02	3.19E+02
20	FGF22	fibroblast growth factor 22 (FGF22), mRNA	-4.86E-02	8.54E+01	7.64E+01
21	FGF21	fibroblast growth factor 21 (FGF21), mRNA	-1.11E-01	4.48E+02	3.47E+02
22	FGF18	fibroblast growth factor 18 (FGF18), transcript variant 1, mRNA	-1.36E-01	2.13E+02	1.56E+02
23	FGF10	fibroblast growth factor 10 (FGF10), mRNA	-1.85E-01	1.07E+02	6.99E+01

Transforming Growth Factors

1	TGFB2	transforming growth factor, beta 2 (TGFB2), mRNA	2.23E-01	4.26E+01	7.11E+01
2	CTGF	connective tissue growth factor (CTGF), mRNA	1.95E-01	4.61E+03	7.22E+03
3	TGIF2	TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox) (TGIF2), mRNA	1.34E-01	2.17E+02	2.95E+02
4	TGFA	transforming growth factor, alpha (TGFA), mRNA	3.15E-02	1.01E+02	1.09E+02
5	TGFB2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFB2), mRNA	2.89E-02	6.60E+02	7.05E+02
6	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1), mRNA	1.68E-02	1.45E+05	1.51E+05
7	L_1000057	transforming growth factor beta-like family, contains a transforming growth factor beta (TGfb)	6.62E-03	5.06E+02	5.14E+02
8	LTBP2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2, contains EGF-like and cysteine repeats,	-2.10E-03	1.75E+03	1.74E+03
9	TINP1	TGF beta-inducible nuclear protein 1 (TINP1), mRNA	-3.44E-03	7.70E+03	7.64E+03
10	TGFB3	transforming growth factor, beta 3, mRNA (cDNA clone MGC:21261 IMAGE:4477175), complete cds	-4.70E-03	1.09E+02	1.08E+02
11	TIEG2	TGFB inducible early growth response 2 (TIEG2), mRNA	-2.63E-02	9.18E+02	8.64E+02
12	TGFBRAP1	transforming growth factor, beta receptor associated protein 1 (TGFBRAP1), mRNA	-6.42E-02	4.06E+03	3.51E+03
13	L_960574	factor, a homeodomain transcription factor that represses SMAD2 (MADH2),	-8.33E-02	2.14E+03	1.76E+03
14	TIAF1	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1 (TIAF1), transcript variant 1, mRNA	-8.69E-02	1.28E+03	1.05E+03
15	TGFB3	transforming growth factor, beta 3 (TGFB3), mRNA	-1.02E-01	3.95E+03	3.12E+03
16	TGIF2LX	TGFB-induced factor 2-like, X-linked (TGIF2LX), mRNA	-1.05E-01	1.23E+02	9.63E+01
17	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease) (TGFB1), mRNA	-1.24E-01	9.06E+02	6.82E+02

付表：MEM 培養液の組成表

低 P (2.0mg/dl) 濃度

高 P (10.4mg/dl) 濃度

Ca7.2mg/dl P0.9mg/dl(或いは 1.4mg/dl)

CaCl ₂	199.8mg/l (Ca72mg/l)
KCl	400
MgSO ₄	98
NaCl	6800
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	8.1(12.6)*
Na ₂ HPO ₄	33.0(51.3)*
D-Glucose	1000
Lipoic Acid	0.2
Phenol Red	0.25
Sodium Pyruvate	110
L-Alanine	25
L-Alanine · HCl	127
L-Asparagine · H ₂ O	50
L-Aspartic Acid	30
L-Cystine · 2HCl	31
L-Cysteine HCl · H ₂ O	100
L-Glutamic Acid	75
L-Glutamine	292
Glycine	50
L-Histidine HCl · H ₂ O	42
L-Isoleucine	52
L-Leucine	52
L-Lysine · HCl	73
L-Methionine	15
L-Phenylalanine	32
L-Proline	40
L-Serine	25
L-Threonine	48
L-Tryptophan	10
L-Tyrosine(disodium salt)	52
L-Valine	46
VITAMINS	
L-Ascorbic Acid	50
Biotin	0.1
D-Ca Pantothenate	1
Choline Chloride	1
Folic Acid	1
i-Inositol	2
Niacinamide	1
Pyridoxal HCl	1
Riboflavin	0.1
Thiamine HCl	1
Vitamin B ₁₂	1.4

同
同
同
同
84#
340.8#

(中性になるよう NaH₂PO₄ · H₂O : Na₂HPO₄ = 1 : 4 で添加。つまり NaH₂PO₄ · H₂O 8.1mg/l と Na₂HPO₄ 33.0mg/l で P トータル 0.9mg/l にして
いる)

その他の組成は右と同じである。

* (中性になるよう NaH₂PO₄ · H₂O : Na₂HPO₄ = 1 : 4 で添加。つまり NaH₂PO₄ · H₂O 8.1mg/l



これに 9.1%FCS 添加(FCS100ml/1000mlMEM)
FCS100%には P121mg/l,Ca159mg/l 含まれている
ので、ファイナル P20(25)mg/l、Ca86mg/l となる。

これに 9.1%FCS 添加(FCS100ml/1000mlMEM)
と Na₂HPO₄ 33.0mg/l で P トータル 0.9mg/l
にしている) FCS100%には P121mg/l,Ca159mg/l
含まれているので、ファイナル P104(100)mg/l、
P104(100)mg/l、Ca86mg/l となる。

参考文献

当院倫理委員会で承認された患者様への説明文書と同意書

- (A) 研究課題名 原発性および続発性副甲状腺機能亢進症患者様より
得られた副甲状腺細胞の増殖機構に関する基礎的研究
(東京女子医科大学倫理委員会 承認番号 439)

副甲状腺腫瘍の手術を受けられる患者様へのお願い	50 ページ
副甲状腺腫の摘出術を受ける患者様への説明文書	51 ページ
同意書	52 ページ

- (B) 研究課題名 甲状腺癌および副甲状腺癌の細胞株の樹立
(東京女子医科大学倫理委員会 承認番号 469)

甲状腺癌または副甲状腺癌の摘出術を受ける 患者様への説明文書	54 ページ
同意書	56 ページ
倫理委員会審査申請書	57 ページ

副甲状腺腫瘍の手術を受けられる患者様へのお願い

_____様に於かれましては
手術を間近に控えて、いろいろと御心配なことと申し上げます。

ところで、手術が無事に終了して、副甲状腺腫が取り出され後、その組織は、病院病理部に運ばれて、病理組織診断に使用されます。病理学的診断には、ごく一部の組織で十分ですので、残りの組織は焼却廃棄されております。

つきましては、手術で取り出されたあと、組織の一部を分けていただき、下記の目的に使用させていただきたくお願い申し上げます。

堅苦しい文面で恐縮ですが「患者様への説明文書」を御一読いただき、納得していただければ、「同意書」に御署名していただければ、幸甚です。

研究題目 原発性および続発性副甲状腺機能亢進症患者様より
得られた副甲状腺腫の増殖機構に関する基礎的研究

なお、この研究は、女子医科大学の倫理委員会の審議を経て平成15年11月26日に認可されております（受付番号439）。

以上、宜しくお願い申し上げます。

平成 年 月 日

東京女子医科大学内分泌センター内科
大学院医学研究科・内科系専攻 病態治療学分野 教授
佐藤幹二

副甲状腺腫の摘出術を受ける患者様への説明文書

研究課題名 原発性および続発性副甲状腺機能亢進症患者様より得られた
副甲状腺細胞の増殖機構に関する基礎的研究

副甲状腺機能亢進症には、副甲状腺細胞が増殖して副甲状腺ホルモンが過剰に分泌され高カルシウム血症が生じてくる原発性副甲状腺機能亢進症と、腎不全のため高リン血症となり、そのため副甲状腺細胞が増殖して副甲状腺ホルモンが過剰に分泌されてくる続発性副甲状腺機能亢進症があります。どちらも手術療法が根治的な治療法です。

原発性副甲状腺機能亢進症は、副甲状腺細胞に癌増殖遺伝子 (oncogen) や癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) に異常が生じて、細胞増殖が生じていくことが判明してきております。一方、腎不全患者に必発してくる続発性副甲状腺機能亢進症は高リン血症により誘発されてくることが明らかにされておりますが、その成因は不明です。リンによって誘発される副甲状腺細胞の増殖機序が解明されれば、透析患者様を苦しめている続発性副甲状腺機能亢進症の予防法や新しい治療法が開発される可能性があります。

(1) 研究の目的

そこで、副甲状腺細胞の増殖機序を解明するために、手術により摘出されたあなた様の副甲状腺腫の一部を術者より分けていただき、次のような基礎研究に使用させていただければ幸いです。リンにより副甲状腺細胞内で誘導される遺伝子群が明らかになれば、腎透析患者さんに必発してくる続発性副甲状腺機能亢進症に対する予防法や新しい治療法の開発につながるものと期待されます。なお、正常人の副甲状腺は米粒大（～30mg）であり、これまでこのような目的の研究は皆無でありました。

(2) 研究方法

手術が滞りなく終了したあと、術者より摘出された副甲状腺の一部を手術室で分けていただきます。その副甲状腺腫切片は、直ちに当内分泌センター内科の研究室に運ばれた後、当日内に特殊な培養液で培養を開始します。そして、高リン濃度の培養液で培養することにより、どのような遺伝子が活性化されるかを、最新式の cDNA microarray 法を用いて解析いたします。なお、分けていただく試料は病理学的検討に使用した残りのもの（数十ミリグラム）ですので、

病理診断などには全く影響がありません。

(3) 研究協力の任意性と撤回の自由

この研究への協力の同意はあなたの自由意志で決めてください。強制いたしません。また、同意しなくても、あなたの不利益になるようなことはありません。また、一旦、同意された場合でも、不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができます。

(4) 試料提供者にもたらされる利益および不利益

本研究の結果が、直ちに、あなたに有益な情報をもたらす可能性は現在のところ乏しいと考えられます。しかし、この研究の成果は副甲状腺細胞の増殖機構の解明に必ず寄与します。その結果、将来、あなたと同じような病気に苦しむ方々の診断や予防、治療などがより効果的に行われるようになります。

(5) 個人情報保護および研究成果の公表

あなたの協力によって得られた研究の成果は、提供者本人やその家族の氏名などが明らかにならないようにした上で、学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公に発表されることがあります。

(6) 研究から生じる知的財産権の帰属

この研究成果しだいでは、特許権などが生じる可能性がありますが、その権利は国、研究機関、民間企業を含む共同研究機関および研究遂行者などに属し、あなたには属しません。また、その特許権などをもととして経済的利益が生じる可能性もありますが、あなたはこれについても権利があるとは言えません。

(7) 費用負担に関する事項

ここで行われる遺伝子解析研究に必要な費用は、公的な研究助成金から出され、あなたが負担することはありません

以上のような次第ですので、是非とも、この研究に御協力をお願い申し上げます。

説明日 平成 年 月 日

説明場所 東京女子医科大学内分泌センター（外来・入院病棟）

説明者 東京女子医科大学内分泌センター内科

佐藤幹二

同意書

東京女子医科大学内分泌センター

小原孝男（外科教授） 内分泌センター所長

高野加寿恵（内科教授）内分泌センター副所長

私は、研究課題「原発性および続発性副甲状腺機能亢進症患者様より得られた副甲状腺細胞の増殖機構に関する基礎的研究」について、研究分担者より説明文書を用いて説明を受け、その目的、方法、分析結果のお知らせの方法等について十分理解しました。ついで、次の条件で研究協力に同意します。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でしてください）

- 研究目的
- 研究方法
- 研究協力の任意性と撤回の自由
- 試料提供者にもたらされる利益および不利益
- 個人情報の保護
- 研究成果の公表
- 研究から生じる知的財産権の帰属
- 費用負担に関する事項

この研究の臨床的意義について理解いたしましたので、摘出された私の副甲状腺組織の一部をこの研究に使用することに同意します。

説明を受けた期日 平成 年 月 日

説明者 東京女子医科大学内分泌センター内科
佐藤幹二

平成 年 月 日

住所

氏名 _____

甲状腺癌または副甲状腺癌の摘出術を受ける患者様への説明文書

研究課題名 “甲状腺癌および副甲状腺癌の細胞株の樹立”

甲状腺癌や副甲状腺癌は、大部分は予後の良いものですが、時には肺や骨に転移してくることもあります。またリンパ節に転移してくることもあります。現在、これらの治療は、外科的治療が主体ですが、根治的治療を目指すには、甲状腺癌や副甲状腺癌の性質を良く検討していく必要があります。

癌細胞は永遠に増殖する機序を獲得しておりますので、試験管の中でも永久に増殖しつづけることができます。このような性質をもった細胞を細胞株 (cell line) と称します。

そこで、手術が無事終了した後に、あなた様より摘出された甲状腺/副甲状腺癌の組織の一部を術者より分けていただき、当科の研究室にて細胞株を樹立して、あなた様の病気の性質を検討させていただきたく存じます。

手術を間近に控えて、いろいろとご心配な毎日と推察申し上げますが、以下の説明文をお読みいただき、この研究に御協力いただければ幸いです。

(1) 研究の目的

手術が無事に終了した後、あなた様の甲状腺癌/副甲状腺癌の組織を一部分けていただき、甲状腺癌/副甲状腺癌細胞株の樹立をおこないます。そして、樹立された癌細胞の性質を分子生物学的に検討し、病態の解明や将来の治療に役にたつような基礎的検討を行うことを目的としております。

(2) 研究方法と資料の他の研究への利用

手術が滞りなく終了したあと、摘出された甲状腺/副甲状腺の一部を術者より手術室で分けていただきます。その切片は、直ちに当内分泌センター内科の研究室に運ばれた後、当日内に培養液で培養を開始します。なお、分けていただく試料は病理学的検討に使用した残りのもの(数十 mg)ですので、病理診断などには全く影響がありません。研究に使用した後の組織(資料)は廃棄処分にし、他の研究目的に使用されることはありません。

(3) 研究協力の任意性と撤回の自由

この研究への協力の同意はあなたの自由意志で決めてください。強制いたしません。また、同意しなくても、あなたの不利益になるようなことはありません。

せん。また、一旦、同意された場合でも、不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができます。

(4) 試料提供者にもたらされる利益および不利益

本研究の結果が、直ちに、あなたに有益な情報をもたらす可能性は現在のところ乏しいと考えられます。しかし、この研究の成果は甲状腺癌／副甲状腺癌の病態の解明に寄与します。その結果、将来、あなたと同じような病気に苦しむ方々の診断や予防、治療などがより効果的に行われることが期待されます。

(5) 個人情報保護および研究成果の公表

あなたの協力によって得られた研究の成果は、提供者本人の氏名などが明らかにならないようにしたうえで、学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公に発表されることがあります。

(6) 研究から生じる知的財産権の帰属

この研究成果しだいでは、特許権などが生じる可能性がありますが、その権利は国、研究機関、民間企業を含む共同研究機関および研究遂行者などに属し、あなたには属しません。また、その特許権などをもととして経済的利益が生じる可能性もありますが、あなたはこれについても権利があるとは言えません。

(7) 費用負担に関する事項

ここで行われる遺伝子解析研究に必要な費用は、公的な研究助成金から出され、あなたが負担することはありません

以上のような次第ですので、是非とも、この研究に御協力をお願い申し上げます。

説明日 平成 年 月 日

説明場所 東京女子医科大学内分泌センター（外来・入院病棟）

説明者 東京女子医科大学内分泌センター内科

大学院医学研究科

病態治療学分野 教授 佐藤幹二

同意書

東京女子医科大学内分泌センター

小原孝男（外科教授） 内分泌センター所長

高野加寿恵（内科教授） 内分泌センター副所長

私は、研究課題「甲状腺癌および副甲状腺癌の細胞株の樹立」について、研究分担者より説明文書を用いて説明を受け、その目的、方法、分析結果のお知らせの方法等について十分理解しました。ついては、次の条件で研究協力を同意します。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でしてください）

- 研究目的
- 研究方法
- 試料の他の研究への利用（なし）
- 研究協力の任意性と撤回の自由
- 試料提供者にもたらされる利益および不利益
- 個人情報の保護
- 研究成果の公表
- 研究から生じる知的財産権の帰属
- 費用負担に関する事項

この研究の臨床的意義について理解いたしましたので、摘出された私の腫瘍組織の一部をこの研究に使用することに同意します。

平成 年 月 日

住所

氏名 _____

(女子医倫理委様式1)

倫理委員会審査申請書

高倉公朋学長殿

平成16年1月5日提出
申請者名 高野加寿恵
所属名 内分泌センター内科
職名 内科2主任教授

※ 受付番号 _____

1 課題名 甲状腺癌および副甲状腺癌の細胞株の樹立		
2. 実施(研究)責任者名	所属	職名
佐藤幹二	内分泌センター内科 大学院内科系専攻病態治療学分野	教授
3. 実施(研究)分担者名	所属	職名
小原孝男	内分泌センター外科	教授
佐藤幹二	内分泌センター内科	教授
加藤佳幸	同上	医療練士
柳澤徹雄	同上	医療練士
中島貴志子	同上	研究技師
4. 実施(研究)事項等の概要		
甲状腺癌または副甲状腺癌のため手術を受ける患者より、あらかじめ informed consent を得ておく。手術が無事終了した後に、腫瘍組織の一部(50~200mg)を術者より無菌的に分けていただく。一部は、直ちにヌードマウスに移植する。また、一部は、10%ウシ胎児血清入りの培養液にて培養を行い、腫瘍細胞を培養していく。継代できるようになった時点で、limiting dilution 法により cloning を行い、腫瘍細胞株を樹立する。		
5. 実施(研究)事項等の対象および実施場所		
対象：当院で甲状腺癌または副甲状腺癌の摘出術を受けた患者 実施場所：内分泌センター内科研究室および実験動物中央施設。		

注；実施計画書、インフォームド・コンセントの説明書・同意書および審査に必要と思われる参考文献・資料等を各17部添付すること。
注：※字欄は記入しないこと。

6. 本課題実施の医学的・医療的意義

当内分泌センターでは、1年間で甲状腺癌の手術が50例以上ある。大部分は、予後の良い乳頭癌であるが、時には、肺や骨に転移してくることもある。特に骨転移のある例は難治性であり、¹³¹I治療も奏功しないことが多い。そこでこのような患者の甲状腺癌の細胞株を樹立し、骨転移やリンパ行性転移を起こしやすい機序を分子生物学的観点から検討していきたい。

また、当内分泌センターでは、1年間で副甲状腺癌の手術が1-2例ある。副甲状腺癌をヌードマウスに移植すると、高カルシウム血症のため直ちに死亡してしまうせい（未発表データ）、これまで副甲状腺ホルモン（PTH）産生性の副甲状腺癌細胞株は樹立されていない。そこで、副甲状腺癌細胞を特殊な培養液（カルシウム濃度を低くして、リン濃度を高くした培養液）を用いて培養し、細胞株を樹立したい。

PTH産生性のヒト副甲状腺細胞の細胞株が樹立できれば、PTHの分泌機構の研究や細胞増殖機構の研究を容易に行うことができるようになり、新しい治療法の開発にも繋がると期待される。

副甲状腺癌は高カルシウム血症を惹起し、患者のQOLを著しく損傷する。腫瘍を摘出しても、再発がしばしば生ずる予後不良の悪性腫瘍である。副甲状腺癌の細胞株が樹立できれば、将来的には免疫を強化するような遺伝子（GM-CSF）を細胞に導入し、本症患者に癌免疫療法を行うこともできると期待される。

なお、当研究室では、腫瘍細胞の樹立や、ヌードマウスの移植などは、十分な経験を積んでおり、これまで十分な実績もある。

参考文献 1 ; Sato K, et al. Jpn J Cancer Res 78 : 1044 - 1048, 1987.
2 ; Sato K, et al. J Bone Miner Res 7 : 847-857, 1993.

7. 倫理的配慮について

①実施（研究）等により個人が受ける不利益並びに危険

実験はすべて、摘出された腫瘍組織の一部を用いて行われるので、個人が受ける不利益や危険性は皆無であるといえる。

②実施（研究）等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

摘出された腫瘍組織は速やかに病理学的検討に提供されるが、ごく一部を本研究に使用させていただくように、術前に、研究分担者が文書を用いて説明し、文書にて同意を求める。

③その他（対象となる個人の人権擁護など）：甲状腺癌も副甲状腺癌も遺伝性の疾患ではなく、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化により生ずる普遍的な病態である。実験結果はすべて匿名化して公表されるので、個人の人権擁護などの問題は生じないと思われる。

8. その他

※ 検査の結果 1) 承認 2) 条件付承認 3) 変更の勧告 4) 不承認 5) 対象外
※倫理委員長印 ※通知年月日 平成 年 月 日 ※通知番号