

偽性副甲状腺機能低下症の疾患特異的 iPS 細胞由来
尿細管細胞を用いた PTH 負荷に対する
cAMP およびリン酸の反応の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

中村 吉宏

修了年 2021 年

指導教員 阿部 雅紀

偽性副甲状腺機能低下症の疾患特異的 iPS 細胞由来
尿細管細胞を用いた PTH 負荷に対する
cAMP およびリン酸の反応の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

中村 吉宏

修了年 2021 年

指導教員 阿部 雅紀

【目次】

【概要】	1
【研究の背景】	3
1. 偽性副甲状腺機能低下症の病態と診断法.....	3
2. Ellsworth-Howard 試験	5
3. Ellsworth-Howard 試験による偽性副甲状腺機能低下症診断の問題.....	6
4. 疾患特異的 iPS 細胞の臨床応用.....	7
【研究目的】	9
【対象と方法】	10
1. 対象患者.....	10
2. 山中 4 因子の導入を用いた末梢血単核細胞からの iPS 細胞の樹立.....	13
3. ヒト iPS 細胞株からの尿細管細胞誘導.....	16
4. 誘導尿細管細胞の免疫蛍光染色.....	18
5. 未分化 iPS 細胞の除去.....	18
6. 誘導尿細管細胞の遺伝子発現解析.....	19

7. リアルタイム PCR 法による mRNA の発現測定.....	20
8. in vitro での尿細管細胞に対する PTH 負荷による cAMP の反応性の確認.....	20
9. in vitro での尿細管細胞に対する PTH 負荷によるリン酸の取り込み反応の確認..	22
10. 症例 2 の <i>GNAS</i> 遺伝子変異の解析	23
11. 統計解析	24
【結果】	25
1. 末梢血単核細胞からの iPS 細胞の樹立と確認.....	25
2. ヒト iPS 細胞株からの尿細管細胞分化誘導	25
3. 誘導尿細管細胞の遺伝子発現解析	25
4. リアルタイム PCR 法による mRNA の発現測定	26
5. 分化誘導尿細管細胞に対する PTH 負荷による cAMP の反応	27
6. PRTEC および分化誘導尿細管細胞に対する PTH 負荷によるリン酸の取り込み 反応.....	27
7. 症例 2 の <i>GNAS</i> 遺伝子異常の確認	29
【考察】	30

【結語】	41
【謝辞】	42
【表】	43
【図】	51
【参考文献】	73
研究業績	79

【概要】

遺伝性腎尿細管疾患は一般臨床において正確な機能評価による最終診断を行うことは困難なことが多い。偽性副甲状腺機能低下症においても、副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone: PTH）に対する腎尿細管の反応（尿中 cAMP とリン酸増加反応）を指標に、副甲状腺機能低下症の鑑別診断を行う Ellsworth – Howard 試験が臨床にて行われている。しかし、Ellsworth – Howard 試験は煩雑かつ厳格な条件下で行う必要があり、評価が困難な事例も多い。そこで我々は患者の末梢血から患者の遺伝情報を有する疾患特異的人工多能性幹細胞（iPS 細胞：induced pluripotent stem cell）を作製し、尿細管細胞に分化させ、PTH を添加し、cAMP の増加とリン酸の細胞内取り込みを評価することで正確な偽性副甲状腺機能低下症の診断法を確立することを目的とした。

胚性幹細胞を維持する転写因子である山中 4 因子をセンダイウイルスベクターにより患者末梢血単核細胞に導入して iPS 細胞を作製し、Bone Morphogenetic Protein-2、Bone Morphogenetic Protein-7、Activin-A、Retinoic acid の添加により尿細管細胞への分化誘導を行い、免疫蛍光染色、ヒト腎近位尿細管細胞株との遺伝子発現の比較、PTH 負荷に対する cAMP の反応の確認にて、尿細管細胞への分化を確認した。

正常 iPS 細胞から作製した尿細管細胞に対して PTH (0、 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} M)の負荷をおこない細胞内と培養上清中の cAMP を測定し、PTH 濃度依存性に cAMP の増加反応を確認した。一方、偽性副甲状腺機能低下症患者由来の iPS 細胞から作製した尿細管細胞では PTH 負荷後に細胞内と培養上清中で一致する cAMP 増加反応は見られなかった。

また、同様に iPS 細胞から分化させた尿細管細胞に PTH 負荷を行い、細胞内へのリン酸の取り込みをラジオアイソトープ ^{32}P を用いて確認したところ、PTH 濃度依存性にリン酸の取り込み低下が認められた。一方、偽性副甲状腺機能低下症患者の iPS 細胞から作製した尿細管細胞では、cAMP 同様に有意な反応が認められなかった。

以上より、偽性副甲状腺機能低下症患者から採取した血液中の末梢血細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、尿細管細胞に分化させ、PTH に対する細胞内・外の cAMP と細胞内へのリン酸の取り込みをみることで、*in vitro* にて新たな方法で正確に診断ができる可能性が示された。

【研究の背景】

1. 偽性副甲状腺機能低下症の病態と診断法

副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone : PTH）は破骨細胞による骨吸収を促進することで細胞外液中にカルシウム(Ca^{2+})を遊離させ、遠位尿細管細胞では Ca^{2+} の再吸収を亢進させる。近位尿細管細胞では 25(OH)D の 1 位水酸化を促進し、ビタミン D の活性化をもたらす、活性型ビタミン D は腸管からの Ca の再吸収を亢進させる。また、近位尿細管細胞においてはリン酸排泄を亢進させる作用をもつ(図 1)¹⁾。近位尿細管におけるリン酸の再吸収にておいては、ナトリウム依存性リントランスポーター (NaPi) を介した経細胞輸送が行われ、特に NaPi2a が中心的な役割をなすとされている²⁾。偽性副甲状腺機能低下症は PTH が正常に分泌されているにもかかわらず、主に尿細管細胞における PTH に対する不応性により、低カルシウム血症、高リン血症をきたし、副甲状腺機能低下症に類似した症状を呈する遺伝性疾患である。日本国内の 1 年間の期間有病率は 100 万人当たり 3.4 人とされており³⁾、比較的希少な疾患である。

偽性副甲状腺機能低下症の原因として、PTH の受容体と、細胞内シグナル伝達系のサイクリック AMP (cAMP) を生成するアデニルシクラーゼとの間の G α 蛋白の活性低下が主な原因とされている⁴⁾。偽性副甲状腺機能低下症は

PTH 刺激に対する尿中 cAMP と尿中リン酸排泄の増加反応の違いで大きく 2 つのサブタイプに分類されている。I 型は PTH 刺激に対して cAMP の増加反応がみられないもので、さらに細かく I a, I b, I c 型に分類され、II 型は PTH 刺激による尿中 cAMP の増加反応は正常であるが尿中リン酸排泄増加反応が乏しいものである (表 1) ⁵⁾。Gsa 蛋白をコードする *GNAS* 遺伝子領域は複雑なインプリンティング調節を受けている。母由来アリの Gsa 蛋白発現と父由来アリの Gsa 蛋白発現抑制には組織特異性があり、多くのホルモン標的組織では母由来アリの発現が優位であるために異常 Gsa 蛋白をコードする遺伝子が母から由来したときにはホルモン抵抗性を来し、偽性副甲状腺機能低下症 Ia 型となる。一方、異常 Gsa 蛋白をコードする遺伝子が父から由来したときには子はホルモン抵抗性を伴わない偽性偽性副甲状腺機能低下症となる。Ib 型では *GNAS* 遺伝子近傍の DNA メチル化パターン異常がみられ Gsa タンパク発現量の低下が原因であると推測されるが、その機序は不明である。II 型は PTH 受容体機構の cAMP 以降の系における異常と考えられているが、こちらは病態が明らかになっていない ⁶⁾。

偽性副甲状腺機能低下症の臨床診断は難病支援センター (ホルモン受容機構異常に関する調査研究班) ⁷⁾ により示されており (表 2)、主に症状、血中カ

ルシウム・リン濃度、腎機能、intact PTH 濃度、GNAS 遺伝子異常が診断項目となっている。上記にて評価が困難な場合、もしくは前述した病型診断を行う場合、Ellsworth – Howard 試験が施行される。

2. Ellsworth-Howard 試験

Ellsworth R と Howard JE が 1934 年に外因性 PTH 投与時の尿中各溶質排泄量の変化を検討した研究を報告した⁸⁾。それ以降、PTH 1 回静脈内投与後の腎反応性をみる検査は Ellsworth – Howard 試験と呼ばれている。PTH に対する腎尿細管の反応（尿中 cAMP とリン酸増加反応）を指標に、副甲状腺機能低下症の鑑別診断を行う検査である（図 2）⁹⁾。検査適応は低カルシウム・高リン血症を示す患者に限られ、治療により血清カルシウム値と血清リン値が正常化している副甲状腺機能低下症患者では治療による反応性の変化がありうるため、結果の判定に問題が生じる可能性がある⁹⁾。正確な検査結果を求める場合、各電解質異常による症状出現のリスクがあるが、未治療にて検査に臨む必要がある。また、正確な検査結果を得るためには一定の尿量が必要で、所定の時間での飲水、採尿の正確さも必要であり、容易な検査とは言えない。

しかし、前述したように、表 2 で示した偽性副甲状腺機能低下症の診断基準では鑑別できない症例もあり、特発性副甲状腺機能低下症（PTH 分泌不全によ

る低カルシウム血症)においても、intact PTH 濃度は血中カルシウム濃度により変化するため、intact PTH 30 pg/mL 未満にならない事がある為¹⁰⁾、その際は Ellsworth - Howard 試験を施行が必要である。また、病型診断を行うことで、偽性副甲状腺機能低下症は病型により遺伝様式も異なる為、家族内の疾患検索にも有用である他、病型により甲状腺刺激ホルモンや、成長ホルモン放出ホルモンへの不能性を示す合併疾患の頻度の違いも知られており¹¹⁾、それらに注意することもできる。その為、現在でも偽性副甲状腺機能低下症の診断において、Ellsworth - Howard 試験は重要な検査であると言える。

3. Ellsworth-Howard 試験による偽性副甲状腺機能低下症診断の問題

日本大学医学部附属板橋病院腎臓高血圧内分泌内科では低カルシウム・高リン血症の患者に対し、入院にて Ellsworth-Howard 試験を施行してきた。しかし、前述の低カルシウム・高リン血症の条件を満たさなくてはいけない条件や、満たしていても偽性副甲状腺機能低下症の場合、腎内石灰化による腎尿細管機能障害の合併や薬剤性尿細管機能障害の合併により、正確な Ellsworth-Howard 試験の実施が困難な症例も多い。また、低カルシウム血症に対する活性型ビタミン D 製剤や Ca 製剤の休薬が不可能な症例では、正確な Ellsworth-Howard 試験を実施することができないなどの問題点があった。その為、

Ellsworth-Howard 試験での問題点を解決した新たな Ellsworth-Howard 試験に代わる診断検査の開発が期待される。

4. 疾患特異的 iPS 細胞の臨床応用

人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell : iPS 細胞）は、個人の皮膚線維芽細胞や末梢血単核細胞から、山中 4 因子の導入にて作製可能である。その後、目的の細胞や組織に分化誘導することにより再生医療の移植細胞源として期待されている。また、iPS 細胞は患者の遺伝情報を保持したあらゆる細胞を作製することができるため、遺伝性疾患を有する患者体細胞から iPS 細胞（疾患特異的 iPS 細胞）を作製し、疾患を有する臓器細胞に分化誘導させることで、*in vitro* での疾患発症機序の解明や治療薬開発の画期的なツールとして有用となることが期待されている¹²⁾。

疾患特異的 iPS 細胞を用いた *in vitro* での病態の再現により、患者数が少ないことで臨床研究が遅れている希少疾患においても、患者本人がその場になくても繰り返し細胞を用いて研究ができる。また、病変部位のサンプル採取が困難な疾患においても、低侵襲で患者から採取した体細胞を分化誘導することで目的の細胞を増殖させることができる。その為、サンプル採取困難な中枢神経系の疾患での研究も進んでいる¹³⁾。

遺伝性腎尿細管疾患として偽性副甲状腺機能低下症、**Bartter** 症候群、**Gitelman** 症候群、**Liddle** 症候群、偽性低アルドステロン症、腎性尿崩症などがある。しかし、一般臨床ではこれら遺伝性腎尿細管疾患の尿細管機能の正確な評価から最終診断に至るには困難なことが多い。その為、遺伝性腎尿細管疾患特異的 iPS 細胞から腎尿細管細胞を分化誘導することで、*in vitro* で培養尿細管細胞での正確な機能評価による最終診断が可能となり、さらには有効な治療薬を選択できる可能性がある。腎臓病領域においても疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態再現や治療開発等が検討されてきているが^{14・15)}、尿細管機能評価については、まだあまり進んでいない。

【研究目的】

今回、日本大学医学部附属板橋病院に通院中の偽性副甲状腺機能低下症患者の末梢血単核細胞から樹立した疾患特異的 iPS 細胞由来腎尿細管細胞を用いて、*in vitro* での PTH 負荷に対する cAMP およびリン酸の反応を検討することで、正確な偽性副甲状腺機能低下症の診断法を確立することを目的とした。

【対象と方法】

1. 対象患者

下記に示す 3 症例のサンプル採血については日本大学医学部附属板橋病院における臨床研究倫理審査委員会による承認を受け(RK-140912-11)、患者ごとに十分な説明を行い、文書による同意を取得した。

症例 1 36 歳 女性 診断：ファール病、カルバマゼピン長期投与に伴う肝チトクローム P450 の酵素誘導によるビタミン D の異化促進、尿細管障害の疑い
[現病歴] 17 歳よりてんかんの診断で抗痙攣薬を内服していた。29 歳の痙攣発作時に Ca 7.3 mg/dl, P 4.2 mg/dl を指摘された。副甲状腺機能低下症が疑われ前医にて Ellsworth-Howard 試験を施行、偽性副甲状腺機能低下症Ⅱ型の診断となり、アルファカルシドール内服が開始された。その後、再精査を希望され当院を受診した。心奇形, 難聴, 顔貌異常なし。知的・身体的発育の問題なし。

身長 165.3 cm

[既往歴] 上記経過の他特記なし。

[家族歴] 母親が統合失調症

[検査結果] 頭部単純 CT：両側基底核に石灰化を認める(図 3-1 (A))

Ellsworth-Howard 試験前の血液検査結果：(検査前からアルファカルシドール内服中断。) Ca 8.6 mg/dl、P 3.4 mg/dl、アルブミン 4.3 g/dl、intact PTH 39 pg/ml、eGFR 84.3 ml/min/1.73m²

Ellsworth-Howard 試験結果(図 3-1 (B))：尿中リン・cAMP 排泄、共に増加反応を認める。

→ 前医での結果に反して、Ellsworth-Howard 試験では偽性副甲状腺機能低下症は否定された。低カルシウム血症はカルバマゼピン長期投与に伴う肝チトクローム P450 の酵素誘導によるビタミン D の異化促進や尿細管障害が疑われた。

症例 2 71 歳 男性 診断：偽性副甲状腺機能低下症(II型の疑い)

[現病歴] 40 歳時に痙攣発作をきたした際に精査され基底核石灰化、小脳石灰化、低カルシウム血症を指摘された。その際に Ellsworth-Howard 試験が施行され、偽性副甲状腺機能低下症II型と診断されカルシトリオール内服が開始された。元来、高血圧症ならびに腎内石灰化による腎機能障害があり、経過とともに腎機能は悪化を来し、再精査目的に入院となった。円形顔貌、低身長(148.7 cm)あり。

心奇形、難聴指摘なし。知的・身体的発育の問題なし。 [既往歴] 63 歳時に前立腺癌のため放射線内部照射 [家族歴] 骨折、失神、尿路結石の家族歴なし。

[検査結果] 頭部単純 CT：両側基底核、両側歯状核、大脳白質に広範な石灰化

を認める(図 3-2 (A))。

Ellsworth-Howard 試験前の血液検査結果：(検査前にカルシトリオールは内服中断。) Ca 9.6 mg/dl、P 3.7 mg/dl、アルブミン 4.3 g/dl、intact PTH 40 pg/ml、eGFR 20.5 ml/min/1.73m²

Ellsworth-Howard 試験結果(図 3-2 (B))：尿中 cAMP 排泄は増加反応がみられるものの、尿中リン排泄は増加反応がみられない。

→ 腎機能悪化に伴い、eGFR 30 ml/min/1.73m²を下回ってしまい、偽性副甲状腺機能低下症の診断基準を満たさないが、偽性副甲状腺機能低下症II型を示唆するものであった。

症例 3 49 歳 女性 診断： 偽性副甲状腺機能低下I型

[現病歴] 49 歳時に両手のしびれを来とし、近医を受診し、Ca 6.5 mg/dl、intact PTH 472 pg/ml を指摘され、精査目的に入院となった。心奇形、難聴、顔貌異常の指摘なし。知的・身体的発育の問題なし。身長 151.7 cm。

[既往歴] 25 歳から気管支喘息の治療を継続している。 [家族歴] 骨折、失神、尿路結石の家族歴なし。

[検査結果] 頭部単純 CT：両側基底核に若干の石灰化を認める(図 3-3 (A))。

Ellsworth-Howard 試験前の血液検査結果：(検査前の活性型ビタミン D 製剤の内

服なし) Ca 7.5 mg/dl、 P 3.8 mg/dl、 アルブミン 4.0 g/dl、 intact PTH 375 pg/ml、
eGFR 104.7 ml/min/1.73m²

Ellsworth-Howard 試験結果(図 3-3 (B))：尿中リン・cAMP 排泄、共に増加反応は認めない。

→ 偽性副甲状腺機能低下症I型と考えられる。Albright 遺伝性骨異栄養症を疑う
身体所見がなく、家族歴がないことからIb 型の可能性がある。

2. 山中 4 因子の導入を用いた末梢血単核細胞からの iPS 細胞の樹立

1) 末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells、PBMC) の分離

患者から EDTA-2Na 入り採血管 2 本分の末梢血を得た。この末梢血を Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) (043-29791, FUJIFILM Wako, Osaka, Japan) と 1 : 1.5 で混合して希釈した。次に、Ficoll-Paque PREMIUM (17544202, Cytiva, MA, USA)を 4 ml ずつ 15 ml チューブに入れ、希釈した血液 8 ml を Ficoll-Paque PREMIUM に重層した。1200 回転、室温で 30 分間遠心後、単核細胞(PBMC)が集まった中間層 (1ml 程度) をピペットでチューブに回収した。回収した PBMC は 2 度、D-PBS で洗浄した。StemPro-34 SFM (serum free)培地 (10639-011, Thermo Fisher Scientific)5 ml に 100 ng/ml Stem cell factor (PHC2116, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、100 ng/ml Fms-like tyrosine kinase-3 ligand

(PHC9414, Thermo Fisher Scientific)、20 ng/ml Thrombopoietin (PHC9514, Thermo Fisher Scientific)、10 ng/ml Interleukin-6 (IPHC0065, Thermo Fisher Scientific)、2 mM L-glutamine(25030, Thermo Fisher Scientific)を加えて作製した PBMC 用完全培地を用い、PBMC を懸濁させた後、トリパンブルー染色液を用いて細胞数をカウントした。PBMC 用完全培地を使用して 5×10^5 cell/well になるように 24 well plate に PBMC を播種し、37°C、5% CO₂ のインキュベーターで培養し、24 時間後に 0.5 ml の培地を除き、0.5 ml の PBMC 用完全培地を添加して、4 日間培養を継続した。

2) センダイウイルスベクターを使用した山中 4 因子 (OCT3/4,SOX2, KLF4,c-MYC) の導入

遺伝子導入は CytoTune-iPS 2.0 (69000-41, nacalai tesque, Kyoto, Japan)を使用した。1)で 4 日間培養した PBMC は、ピペッティングによって細胞をプレートから剥離して 15 ml チューブに回収した。細胞懸濁液はトリパンブルーで細胞数をカウントし、室温で 10 分間遠心分離を行った。PBMC は D-PBS (11482-15, nacalai tesque,)に再懸濁をし、トリパンブルーを用いて細胞数をカウントした。その後、PBMC 用完全培地に各因子が MOI=5 となるようにベクター溶液を調整し、細胞へ添加して 24 時間培養した。翌日、6 well plate に D-PBS を well あ

たり 1.5 ml 入れ、そこに iMatrix (T303, Nippi, Tokyo, Japan) を 9.6 μ l を入れて、すぐに攪拌し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで 1 時間以上反応させてプレートをコーティングした。その後、このプレートをインキュベーターから取り出して、上清を除去し、PBMC CM 培地を 1.5 ml 加えて、再び、インキュベーターに入れ 1 時間置いた。前日に遺伝子導入した細胞をインキュベーターから取り出して細胞をチューブに回収し、細胞懸濁液をコーティングしたプレートに添加して培養を 3 日目まで続けた。3 日後に培地を PBMC 用完全培地から StemFit 培地 (AK02N, Ajinomoto, Tokyo, Japan) に変更し、コロニーが形成されるまで毎日培地を交換しながら培養を継続した。

(日本大学遺伝子組換え実験計画承認番号 2018 医 17)。

3) iPS 細胞の評価 (アルカリフォスファターゼ染色、nanog と octamer-binding transcription factor 4 の蛍光免疫染色)

iPS 細胞の未分化状態を確認するために、細胞は D-PBS で 2 回洗浄した後に、10% 中性緩衝ホルマリンで 10 分間、室温で固定した。固定液を除き、D-PBS で 2 回洗浄した後、ファストブルー-BB とナフトール AS-MX リン酸塩によるアルカリフォスファターゼ (ALP) 検出キット (85L2-1KT, Sigma-Aldrich, MO, USA) で iPS 細胞の評価を行った。また、iPS 細胞の未分化状態を確認する

ために nanog と octamer-binding transcription factor 4(oct-4)の蛍光免疫染色も行った。iPS 細胞及び尿細管細胞は D-PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。次に、ディッシュ内の培地を破棄し、PBS で 2 回洗浄した後、0.1% Triton-X を含む PBS で Permeabilization を行った。10%アルブミンを含む D-PBS で 20 分間ブロッキングを行った後に、表 3 に示す 1 次抗体を使用して、4°Cでオーバーナイトのインキュベーションを行った。細胞を PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、2 次抗体として 500 倍希釈の Alexa-594 Goat anti rabbit IgG(A-11012, Thermo Fisher Scientific)か Alexa-594 Goat anti mouse IgG(A-11005, Thermo Fisher Scientific)を使用し、室温で 30 分間インキュベーションを行った。終了後、PBS で 5 分間、3 回洗浄し、1000 希釈の DAPI (D212,DOJINDO, Kumamoto, Japan)で核染色を行い、IX73 倒立顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) で細胞を蛍光観察した。

3. ヒト iPS 細胞株からの尿細管細胞誘導

Narayanan らが報告したヒト ES 細胞を腎近位尿細管細胞に分化させる方法¹⁶⁾を基に、患者の末梢血単核細胞から誘導した iPS 細胞と、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室から提供を受けた iPS 細胞

株である 201B7（皮膚線維芽細胞由来）および HPS0360（末梢血単核細胞由来）について尿細管細胞に分化誘導を行った。

まず、各 iPS 細胞は、10 uM になるように Rho 結合キナーゼ阻害薬 y-27632 (ALX-270-333-M001, Enzo Life Sciences, NY, USA)を StemFit 培地に添加して、1 時間培養を行った。D-PBS で 2 回洗浄し、0.5×Tryple-select-0.25 mM EDTA(12563011, Thermo Fisher Scientific)で 3 分間インキュベーション後、再び細胞を D-PBS で洗浄した。ディッシュに培地を加えて、スクレーパーで iPS 細胞を剥離してチューブに回収し、ピペッティング操作にて細胞塊をいくつかに分離し(単独の細胞にならないようにする)、1:50 に希釈した Matrigel (356234, Coning, NY, USA) をコーティングしたディッシュに播種した。翌日から尿細管細胞に分化誘導するために、10 ng/ml Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2)(355-DEC-010, R &D systems, MN, USA)、2.5 ng/ml Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP7) (354-BP-010, R &D systems)、10 ng/ml activin-A (338-AC-010, R &D systems)、および 0.1 μmol/l retinoic acid (695/50, R &D systems)を含む Renal epithelial cell growth 培地 (REGM BulletKit) (cc-3190, Ronza, Basel, Switzerland) に変更し、2 日毎に培地を交換して、21 日間培養を継続した。

4. 誘導尿細管細胞の免疫蛍光染色

尿細管細胞への分化を確認するために、誘導終了時に Aquaporin 1 と γ -glutamyltransferase 1 の免疫蛍光染色を行った。免疫蛍光染色の方法は「2-3) iPS 細胞の評価 (アルカリフォスファターゼ染色、nanog と octamer-binding transcription factor 4 の免疫蛍光染色)」の項と同様である。使用した 1 次抗体は表 3 に示す。また分化誘導した尿細管細胞のポジティブコントロールとして、ヒト腎近位尿細管細胞株(Renal Proximal Tubule Epithelial Cells : RPTEC、RONZA)を用いた。

5. 未分化 iPS 細胞の除去

各 iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞中に残存する iPS 細胞を除去するために iPS 特異的細胞表面糖鎖を認識する rBC2LCN に細胞毒 (PE23) を結合した rBC2LCN-PE23 (180-03231,FUJIFILM Wako, Osaka, Japan)¹⁷⁾を培地に 100 倍希釈で添加し、48 時間培養を行った。これより先の実験には未分化細胞を除去した尿細管細胞を、10%FBS 含有 DMEM 培地 (D6429-500M, Sigma-Aldrich) を使用してサブコンフルエントまで培養し、0.25% Trypsin-EDTA (25200056,Thermo Fisher Scientific)を用いて継代を行った。

6. 誘導尿細管細胞の遺伝子発現解析

RPTEC とそれぞれの iPS 細胞から分化誘導させた近位尿細管細胞の遺伝子発現について検討した。それぞれの細胞の培地を破棄し、D-PBS で洗浄後、TRIzol Reagent (1559608, Thermo Fisher Scientific) 1 ml を加えて攪拌した。クロロホルム 200 μ l を加えて 15 秒間、手で攪拌し、室温で 2~3 分置いた後、4°C で 15000 回転 15 分間遠心分離を行い、上清を新しいエッペンチューブに移した。上清に 2-プロパノール 500 μ l を加えて転倒混和し、4°C で 15000 回転 15 分間遠心分離を行った。上清を捨て、沈殿物に 70%エタノールを加えて混和し、4°C で 10000 回転 5 分間遠心し、total RNA を得た。混在する DNA を除去するために、total RNA は、DNase I(18068-015, I Thermo Fisher Scientific)で処理を行ってから High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific)にて逆転写し、cDNA を得た。その後、それぞれの遺伝子について KOD Fx(KFX-101,TOYOBO,Osaka,Tokyo)を使用して PCR (94°C/2 分で加温後、98°C/10 秒、55~60°C(表 4 参照)/10 秒、68°C/60 秒のサイクルを 30 サイクル)を行った。PCR product は 2 %アガロースゲルで泳動し、FUSION SOLO System (Vilber Lourmat, Collégien, France)で撮影した。使用したプライマーは表 4 に記す。

7. リアルタイム PCR 法による mRNA の発現測定

iPS 細胞から誘導した尿細管細胞および RPTEC について、 10^{-7} M の PTH 添加による *Parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R)* と *Sodium-phosphate cotransporter type2 (NaPi2a)* mRNA の発現を検討した。これらの遺伝子の発現は KOD Sybr qPCR Mix (QKD-201, TOYOBO) を使用した Sybr green 法で定量した。6. と同様の方法によって得た cDNA を使用し、StepOne Plus real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて、 $98^{\circ}\text{C}/2$ 分で加温後、 $98^{\circ}\text{C}/10$ 秒、 $60^{\circ}\text{C}/10$ 秒、 $68^{\circ}\text{C}/30$ 秒のサイクルを 40 サイクル行った。各遺伝子の発現はスタンダードを用いた相対定量で求め、*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* を内部標準として発現量を補正した。GAPDH は Premix EX Taq Probe qPCR (RR390A, Takara, Tokyo, Japan) を使用した Probe 法で行った。 $95^{\circ}\text{C}/20$ 秒で加温後、 95 秒/ 1 秒と $60^{\circ}\text{C}/20$ 秒のサイクルを 40 サイクル行った。使用したプライマーおよびプローブは表 5 に記す。

8. in vitro での尿細管細胞に対する PTH 負荷による cAMP の反応性の確認

Nagai らのマウス前骨芽細胞株への PTH 負荷実験の報告¹⁸⁾を参考に下記の実験を行った。6well プレートに iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞を 1×10^5

cell/well を播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。次に well 内の培地を除去し、D-PBS で 2 度洗浄後、cAMP の分解を防ぐために 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, I7018, Sigma-Aldrich) を終濃度が 100mM となるように 0.1% albumin 含有 DMEM/F-12 培地(08460-95,nacalai, Tokyo, Japan)に添加した。この培地を使用して PTH の濃度が 0、 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} M になるように添加し、細胞を 2 時間インキュベーションした。培地はエッペンチューブに回収し、細胞は D-PBS で 2 度洗浄後、0.1N HCl を 400 μ l 入れ、そのまま 20 分間室温でインキュベーションを行った。その後、細胞はスクレーパーで剥離し、ピペッティングを繰り返して均一化を行った後にエッペンチューブに集め、10,000 回転、4°C で 10 分間遠心分離を行い、上清を新しいエッペンチューブに移した。この上清と前述の培地を無水酢酸と 4M KOH を使用して cAMP のアセチル化を行い、cAMP EIA kit(581002, Cayman Chemical Company, MI, USA) を用いて、細胞内および培地中の cAMP 量を測定した。細胞内 cAMP は、Pierce BCA protein assay kit(23227, Thermo Fisher Scientific)を使用してタンパク質量を測定し、補正を行った。

9. in vitro での尿細管細胞に対する PTH 負荷によるリン酸の取り込み反応の確認

Pfister ら¹⁹⁾や Nagai ら¹⁸⁾の尿細管細胞への PTH 負荷実験方法に基づき、下記の実験を行った。まず、Pi free medium、Pi free uptake solution、STOP solution の調合を行った。組成は表 6 に記す。12 well plate に各近位尿細管細胞を 80% コンフルエントに到達するまで培養した。DMEM/F-12 HAM に 0.1% BSA を加えた medium(1ml)に入れ替え、PTH を 6 段階の濃度(PTH 0、 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} M)で添加し(n=4)、4 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。その後、培地を吸引し、Pi free medium にて 3 回洗浄をおこなった。Pi free medium を加えた状態で 2 時間培養した。(※RPTEC を用いた追加実験にて 1 時間半経過した時点で、NaPi2a 阻害薬である PF-06869206 [HY-112065 MedChemExpress, NJ,USA] (1 μ M)入り Pi free medium に入れ替えた。) Pi free medium を吸引後、Pi free uptake solution を 0.5 ml 添加し、5 分後に氷冷の stop solution 0.7 ml を添加した。培地を吸引し、Pi free medium にて 3 回洗浄した。Pi free medium を除いた状態で次に 0.1N NaOH を 400 μ l 添加し、ピペッティングで細胞を底面から剥がし、40 μ l をタンパク測定用に保管し、残りを AQUASOL-2(6NE9529, Packard BioScience, MA, USA) 2.5 ml 入りの計測用バイアルへ入れ、

液体シンチレーションカウンターにて測定を行った。Lowry 法にてそれぞれのサンプルの蛋白質濃度を測定し、蛋白補正を行った。

10. 症例 2 の *GNAS* 遺伝子変異の解析

GNAS 遺伝子の exon 内の変異についてサンガー法でシーケンスを行った。患者の DNA は、末梢血単核細胞から Wizard Genomic DNA purification kit(A1120, Promega)を使用して精製した。*GNAS* 遺伝子のプライマーを作製して PCR を行い、2 %アガロースゲルで PCR product を確認した後、QIA quick Gel Extraction Kit (28704, QIAGEN, Hilden, Germany)で PCR product を精製した。BigDye Terminator V3.1 (4337457, Thermo Fisher Scientific) を使用して、蛍光色素で標識した伸長反応を行い、Applied Biosystems 3130xi genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific)で塩基配列を調べた。変異解析については、Ensembl (EMBL-EBI, Sanger Centre) データベースをリファレンスゲノムとし、The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP, NCBI)で遺伝子の多型情報を調べた。

11. 統計解析

結果は平均値±標準偏差（standard error: SE）として表記し、IBM SPSS[®] Statistics 27(SPSS Inc, IL,USA)、EZR²⁰⁾を使用して、各細胞への PTH 負荷時の cAMP、³²P の取り込み反応をみた実験における PTH 濃度の多群間比較については Kruskal-Wallis 検定と Steel 検定にて $P < 0.05$ を有意とした。

【結果】

1. 末梢血単核細胞からの iPS 細胞の樹立と確認

末梢血より単核細胞を分離し、山中4因子を導入し培養を続け、iPS細胞様コロニー形成を確認した(図4)。樹立したiPS細胞様コロニーはALP染色陽性(患者細胞とiPS細胞(HPS0360))で、iPS細胞であることを確認した(図5)。また、NanogとOct-4の蛍光免疫染色においても患者細胞(症例3)とiPS細胞(HPS0360)で染色陽性を認め、未分化iPS細胞であることを確認した(図6-A・B)。

2. ヒト iPS 細胞株からの尿細管細胞分化誘導

iPS細胞(HPS0360株)と症例1・3由来iPS細胞を尿細管細胞へ分化誘導し、その後尿細管細胞への分化を確認するため、誘導終了時にAQP1、GGT1の蛍光免疫染色を行った。その結果、いずれもほとんどの細胞でAQP1、GGT1の発現を認め、近位尿細管細胞への分化が確認できた(図7-A・B)。

3. 誘導尿細管細胞の遺伝子発現解析

iPS細胞由来の尿細管細胞にてヒト尿細管細胞でみられる遺伝子発現がみられているか、iPS細胞(HPS0360、症例1・2・3)から作製した尿細管細胞の(表4)で示したプライマーを用いたPCR産物でアガロースゲル電気泳動を行った。

コントロールに用いた RPTEC と比較して、iPS 細胞(HPS0360)から作製した尿細管細胞ではコントロールに用いた RPTEC と比較して、*CD13*, *Na⁺/K⁺ATPase*, *NBC1*, *OCT1*, *OCTN2*, *MDR1*, *PEPT1*, *PEPT2*, *AQP1*, *GGT*, *KSP-CAD* が同様に発現したが、*Vit D3 Hydr*, *SGLT2* の発現は弱かった。また遠位尿細管マーカー *NCCT*、糸球体マーカー *PODXL*、集合管マーカー *AQP3* も RPTEC と同様に発現していた。iPS 細胞(HPS0360)と iPS 細胞(症例 1・2・3)の各マーカーの発現はほとんど同じであったが、症例 1 の *MDR* の発現は弱かった。(図 8)。以上より iPS 細胞から尿細管細胞が誘導された事を確認した。

4. リアルタイム PCR 法による mRNA の発現測定

Parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R) と *Sodium-phosphate cotransporter type2 (NaPi2a)* のリアルタイム PCR 法による mRNA の発現測定では、*PTH1R* はどの iPS 細胞(HPS0360、症例 1・2・3)においても発現が認めれた。また、*NaPi2a* は RPTEC では発現が認められるが、iPS 細胞(HPS0360、症例 1・2・3)由来尿細管細胞では明らかな発現が認められなかった。(図 9)。

5. 分化誘導尿細管細胞に対する PTH 負荷による cAMP の反応

iPS 細胞 (HPS0360) から分化誘導した尿細管細胞に PTH を負荷し、細胞内と細胞外 (培養液中) にて 6 濃度間において有意差を認め (細胞内: $P=0.02$ 、培養液中: $P=0.02$)、PTH 濃度依存性の cAMP 濃度の上昇が確認された (図 10)。

各症例の患者由来の iPS 細胞から分化させた尿細管細胞にて同様の実験を行ったところ、症例 1 の iPS 細胞由来の尿細管細胞では培養液中および細胞内においても、iPS 細胞 (HPS0360) 由来の尿細管細胞と同様に 6 濃度間において有意差を認め (細胞内 $P=0.008$ 、培養液中 $P=0.002$)、濃度依存性の cAMP 濃度の上昇を確認した。一方、症例 2 および 3 では、症例 2 では培養液中、症例 3 では細胞内で PTH 濃度間における有意差は認められたものの、細胞内と培養液中での結果が一致せず、症例 1 と較して濃度間の差も小さかった(細胞内 症例 1 : $P=0.008$ 、症例 2 : $P=0.14$ 、症例 3 : $P=0.01$ 、培養液中 症例 1 : $P=0.002$ 、症例 2 : $P=0.02$ 、症例 3 = 0.10)。 (図 11 - 1・2・3)。

6. RPTEC および分化誘導尿細管細胞に対する PTH 負荷によるリン酸の取り込み反応

RPTEC と iPS 細胞 (HPS0360) 由来の尿細管細胞に PTH 負荷を行った。

RPTEC では PTH 濃度依存性のリン酸の取り込みの変化は認められなかった($P=0.28$)。(図 12 A) 一方、iPS 細胞 (HPS0360)由来尿細管細胞においては 6 濃度間において有意差を認め($P < 0.05$)、PTH 濃度依存性の細胞内へのリン酸の取り込み低下が確認された($P = 0.04$)。(図 13)

RPTEC にて反応が認められなかったことについて、結果 4 で示したように RPTEC では iPS 細胞由来の尿細管細胞と比してリン酸トランスポーターである NaPi2a の発現が強く、PTH 負荷により、細胞内リン酸吸収が強く起こっている可能性があり、NaPi2a 阻害薬である PF-06869206 を添加して同様の実験を行ったところ、4 濃度間にて有意差が認められ($P = 0.03$)、PTH 濃度依存性の細胞内へのリン酸の取り込み低下が確認された (図 12 B)。

次に、臨床症例 1・2・3 の患者由来の iPS 細胞から分化させた尿細管細胞にて PTH に対するリン酸の細胞内取り込みを検討した。いずれの患者でも 3 濃度間での統計学的な有意差は認められなかった(患者 1 : $P=0.15$ 、患者 2 : $P=0.05$ (取り込みは上昇) 、患者 3 : $P = 0.23$)。患者 1 は 0M と 10^{-7} M の間でリン酸の取り込みの平均の低下は認められたが、Steel 検定で統計学的な有意差は認められなかった ($P=0.06$)。一方、患者 2 と 3 では取り込み低下は認められなかった。(図 14)。

7. 症例 2 の *GNAS* 遺伝子異常の確認

臨床においても本研究における *in vitro* での検証においても偽性副甲状腺機能低下症が疑われる症例 2 の患者にて遺伝子変異解析をおこない、*GNAS* 遺伝子に表 7 に示す様、4 カ所の 5' untranslated region (UTR 変異、2 カ所の Missense 変異、2 カ所の Noncoding transcript 変異、2 カ所の 3' UTR 変異を認め、*GNAS* 遺伝子異常による偽性副甲状腺機能低下症であることが確認された。

【考察】

本研究では偽性副甲状腺機能低下症患者から採取した末梢血単核細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、尿細管細胞に分化させ、PTH に対する細胞内・外の cAMP と細胞内へのリン酸の取り込みについて検討を行った。その結果、臨床において偽性副甲状腺機能低下症の診断時に施行される Ellsworth-Howard 試験のように尿細管における PTH の反応性を確認することが可能な、今までに報告のない新たな方法を示すことができた。

2006 年に山中らが発表した iPS 細胞の論文では皮膚繊維芽細胞から iPS 細胞が作製された²¹⁾。その後、iPS 細胞作製時のゲノムの挿入技術の進歩による iPS 細胞の樹立効率の改善もあり²²⁾、現在では末梢血細胞からも iPS 細胞が作製できるようになった。これにより、臨床で行われる採血と同時に、患者から低侵襲にて iPS 細胞の作製の材料となる細胞を採取することができるため、臨床応用しやすいものと考えられる。

多能性幹細胞の尿細管細胞に分化誘導については、Kim らが 2005 年にマウス ES 細胞に対してレチノイン酸、アクチビン、BMP7 を使用して分化誘導し、尿細管上皮細胞を作製したことを報告した²³⁾ほか、ES 細胞から尿細管上皮細胞への分化を促進する多くの分化誘導因子が報告されている^{24,25)}。本研究

では、Narayanan らが報告したヒト ES 細胞を近位尿細管細胞への分化方法¹⁶⁾に基づき、同じ濃度、同じ培養時間で BMP2、 BMP7、 レチノイン酸、 アクチビン A を用いてマトリゲル上で iPS 細胞の分化誘導を行った。近位尿細管から Henle ループの細い下行脚にかけた上皮細胞に全周性に発現している *AQP1*²⁶⁾、腎臓等の細胞膜に発現している *GGT1* の発現を免疫染色で確認した。また、尿細管上皮細胞で発現する 20 のマーカーとなる mRNA の発現を RT-PCR 法で確認し、ヒト腎近位尿細管細胞株とほぼ同様の発現を確認することができた。

また、iPS 細胞からの分化細胞を移植細胞源とする再生医療や、疾患特異的 iPS 細胞からの分化細胞を用いた新薬の開発、また今回の様な遺伝性疾患の *in vitro* 診断法の確立のためには、分化細胞や分化組織への未分化 iPS 細胞の混入が大きな問題であった。そのため、今回の研究では Tateno ら¹⁷⁾が開発した iPS 細胞の糖鎖を特異的に認識し、細胞を除去する rBC2LCN-PE23 の添加を行い、未分化 iPS 細胞の混入除去を行った。

以上の結果と、その後に行った PTH 負荷において cAMP の産生やリンの細胞内取り込みにおいて反応が見られたことから、iPS 細胞を尿細管細胞（近位尿細管細胞主体）へ分化したと判断した。PTH 負荷に対する尿細管の機能を評

価するうえで、臨床の Ellsworth-Howard 試験では経静脈的に PTH を負荷するため、尿細管のどの部位にも PTH は作用し、いずれの部位も通過した尿を検体として採取する。評価の対象とする cAMP はどの尿細管の部位でもセカンドメッセンジャーとして働く。一方、リンの取り込みは主に近位尿細管細胞で行われるため、近位尿細管細胞のみでの cAMP とリンの動態の評価には十分であると考えられ、また近位尿細管細胞以外の尿細管細胞が並存していても評価には支障がないと考えられる。

今回の研究では iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞において、PTH 刺激による cAMP の反応、リン酸の取り込み低下を検討した。iPS 細胞 (HPS0360) 由来の尿細管細胞では PTH 濃度依存性に、培養上清および細胞内において cAMP 濃度の上昇を認めた。これは臨床における Ellsworth-Howard 試験と一致する反応であり、Narayanan らがヒト ES 細胞から近位尿細管細胞を分化させた尿細管細胞に PTH を負荷した報告¹⁶⁾や、Nagai らがマウス前骨芽細胞株に PTH を負荷した報告¹⁸⁾と同様に PTH 負荷により cAMP 濃度の上昇が認められた。

PTH 負荷時のリン酸の取り込み反応の試験においては、RPTEC ではリン酸の取り込みに変化は認められず、iPS 細胞 (HPS0360) 由来の尿細管細胞では PTH 濃度依存性にリン酸の取り込み低下を示唆する結果が得られた。iPS 細胞

(HPS0360) 由来の尿細管細胞での反応は実験を行うにあたり参考にした Nagai らがオポッサム腎臓近位尿細管細胞株に PTH を負荷した報告¹⁸⁾の結果に一致した。臨床における Ellsworth-Howard 試験においては正常尿細管の場合、尿中のリン酸排泄が増加するが、これは近位尿細管細胞においてのリン酸の再取り込みの低下に起因するものであり、iPS 細胞 (HPS0360) 由来の尿細管細胞で認められた反応が Ellsworth-Howard 試験に相当するものと考えられる。今回、PTH 負荷試験を行うにあたり、尿細管腔からリン酸の再吸収を行うリン酸トランスポーター*NaPi2a* の発現を測定した結果、各 iPS 細胞(HPS0360、症例 1・2・3)から分化誘導した尿細管細胞では *NaPi2a* の発現はほとんど認められなかったが、RPTEC では明確に認めた。RPTEC は分化近位尿細管細胞であるが、iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞の全てが近位尿細管細胞だけに分化したのではない可能性があり、*NaPi2a* の発現の違いに影響を与えていると考えられた。この *NaPi2a* の機能を調査するため、リン酸トランスポーター (NaPi2a) 阻害剤である PF-06869206 を添加して PTH 負荷を行ったところ、iPS 細胞 (HPS0360) 由来の尿細管細胞同様に PTH 負荷にてリン酸の取り込み低下が認めれた。このように in vitro の尿細管細胞に PTH 負荷を行い、リン酸の取り込み低下を確認する際、*NaPi2a* の発現が強い場合、PTH 負荷とは無関

係にリン酸が取り込まれてしまうため、差が認められないものと考えられた。

なお、*NaPi2a* の発現が認められなくても、本研究において iPS 細胞由来の尿細管細胞では PTH 負荷時に細胞内へ ^{32}P の取り込みが確認できたので、*NaPi2c* 等のその他のリントランスポーター²⁾が発現していると考えられ、PTH 負荷時のリン酸の取り込み反応を確認するには問題がないと考えられる。

このように、今回の iPS 細胞から分化誘導した尿細管細胞において PTH が PTH 受容体の $\text{Gs}\alpha$ 蛋白を介してアデニルシクラーゼから cAMP を産生し、リン酸の排泄を起こす *in vitro* の系が確立されたと考えられる。

そのうえで、実際の症例 1（カルバマゼピンの影響による低カルシウム血症）と症例 2（偽性副甲状腺機能低下症）、症例 3(偽性副甲状腺機能低下症)の患者 iPS 細胞由来尿細管細胞において PTH 負荷試験をおこなった。

症例 1 では、コントロールの iPS 細胞由来の尿細管細胞と同様に細胞内外において cAMP 濃度の上昇と、細胞内へのリンの取り込み低下が見られ、臨床での Ellsworth-Howard 試験同様、偽性副甲状腺機能低下症を否定する結果になった。

症例 2 においては細胞内・外での cAMP 濃度の上昇は一致せず、細胞内へのリン酸の取り込みも不変であり、in vitro においては偽性副甲状腺機能低下症 I 型を示唆する結果となった。臨床での Ellsworth-Howard 試験においては尿中 cAMP の上昇がみられたもののリン酸の取り込み低下が認められなかったため、偽性副甲状腺機能低下症 II 型の診断となっており、いずれも偽性副甲状腺機能低下症を示唆する結果だが、異なるタイプが示唆された。本症例では、遺伝子解析にて *GNAS* 遺伝子変異をみとめ、Albright 遺伝性骨異栄養症を示唆する臨床所見があり、いずれも Ia 型の所見であり、本研究の in vitro の実験結果と一致する。それ故に in vitro での PTH 負荷試験は正確に偽性副甲状腺機能低下症のタイプを識別できたと考えられる。臨床における Ellsworth-Howard 試験にて尿中 cAMP の上昇が認められた明確な理由は定かではないが、本症例では腎不全をすでに合併していたため、障害された腎尿細管細胞の反応を見ていることから、細胞内の恒常性を維持するための cAMP 反応性の上昇や、cAMP を分解する環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性が低下等のメカニズムが存在する可能性も考えられた。すでに不可逆性の腎障害がある患者においても、障害のない尿細管細胞で機能評価ができることが iPS 細胞由来尿細管細胞を用いた利点と言える。

症例 3 では、細胞内・外での cAMP 濃度の上昇は一致せず、細胞内へのリン酸の取り込みも不変であり、臨床での Ellsworth-Howard 試験と同様に偽性副甲状腺機能低下症 I 型を示唆する結果になった。

上記の結果を踏まえ、iPS 細胞由来の尿細管細胞への PTH 負荷時の細胞内・外での cAMP 濃度の変化とリンの取り込みの変化を組み合わせることで、*in vitro* にて診断目的での新たな方法での負荷試験が施行でき、より正確な鑑別が可能であることが示された。

本研究では PTH 負荷時の cAMP の反応は明確であったが、リン酸の取り込み反応の変化は患者細胞において明確でない部分があった。理由として、臨床における Ellsworth-Howard 試験において一定の高リン血症条件で PTH 負荷を行っているが、細胞実験では同様の条件ではなかった点と培養尿細管細胞の極性の問題が考えられる。尿細管は管腔構造であり、トランスポーターは管腔内外の電解質の輸送に関与するため、本来は内外どちらとして働くか極性があると考えられる。しかし、本実験のように尿細管細胞がプレートに付着培養された場合は尿細管腔内外の極性がない。本研究にてリン酸の取り込み低下が認められたことから、少なくとも尿細管内腔としての働きをしているものと考えられるが、尿細管内腔として全てが働いていない可能性が考えられる。培養細胞に

において3次元構造の尿細管腔を形成させることは未だに困難であり、Taubらはマトリゲルを用いてマウス腎上皮細胞培養にて管状構造の形成に成功した²⁷⁾が、構造的には不完全であり、通常の培養方法では *in vitro* での再現は困難とされている。一方、ES細胞やiPS細胞を用いて3次元にて培養を行い作製する細胞塊であるオルガノイドにおいては、分化した組織の複雑な空間的パターンを再現でき、腎臓オルガノイドにおいても尿細管腔が形成されることが確認されている²⁸⁾。この手法を用いれば、極性を考慮したさらに精度の高い実験を行える可能性はあるが、検体の採取方法などさらに検討が必要であると考えられる。

偽性副甲状腺機能低下症の診断基準にも含まれる *GNAS* 遺伝子の変異については、変異の種類と表現型の相関は弱く、同一の変異でも症状の種類、程度に違いが見られるとされる²⁹⁾。また、偽性副甲状腺機能低下症の全てが *GNAS* 遺伝子の塩基配列に変異があるとは限らず、メチル化によるエピゲノムの異常も知られている⁶⁾。さらに、偽性副甲状腺機能低下症II型においてはPTH受容体機構のcAMP以降の作動系の異常とされており、*GNAS* 遺伝子は関与していない可能性が高い。そのため、遺伝子解析での診断には今のところ限界があり、正確な機能評価のためには実際の患者自身の尿細管細胞を用いることが必要と

なる。また、Ellsworth-Howard 試験は正確な評価をおこなうために治療薬の中断が必要で、煩雑かつ厳格な条件下で行う必要があり、患者への負担が大きく、小児への実施も困難である。一方、本研究の手法を用いることで、採血時に1回の検体採取で診断が可能となるため、患者が負荷試験の為に入院する必要性や薬剤中断によるリスクも軽減できるため、患者自身への負担を大幅に減少することが可能となる。問題点としては検査にかかる時間と費用に関して、実際の Ellsworth-Howard 試験は事前の休薬期間を除いて検査自体は1日で終了し、検査入院に掛かる医療費は約15万円(※当院において。当院では前日入院をし、検査後は安全の為に経過観察の時間を置き、2泊3日で検査入院を行っている。)である一方、本法では細胞培養に時間が掛かり、最低1ヵ月程は時間を要し、用いる材料も多い為、費用も前述の医療費より安いとは言えない。ただし、今後、iPS細胞の作製とその後の分化誘導に関する技術の向上や、iPS細胞を用いた研究・医療の普及により時間と費用を削減できる可能性がある。本法が実用化することにより、偽性副甲状腺機能低下症を含め、その他の遺伝性腎尿細管疾患の診断においても新しい診断の選択肢を提示することが可能となる。また、新しい診断法を確立する過程で新たな知見を得ることが

できれば、将来的には機序が明らかになっていない偽性副甲状腺機能低下症 II 型を含めた機序の解明や、新たな治療法の開発に繋がることも期待できる。

腎臓病領域において遺伝性腎尿細管疾患は複数あり、いずれも一般臨床においては尿細管機能の正確な評価は困難なことが多い。本研究では偽性副甲状腺機能低下症を対象としたが、それぞれの機能確認法は別に確立する必要があるものの、同様にそれ以外の疾患にも応用できる可能性がある。同じ腎領域においては、本実験と同様な機能検査はされていないものの、Fanconi 症候群を呈する Lowe 症候群の患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製して腎細胞に分化させ形態を評価した報告⁽³⁰⁾や、Alport 症候群の患者の尿から採取された尿細管細胞から iPS 細胞を作製して蛋白の発現を解析した報告⁽³¹⁾等もされており、今後も各領域において疾患特異的 iPS 細胞の研究が進んでいくと予想される。

本研究の限界として、コントロールに用いた RPTEC は初代培養細胞ではない為、各遺伝子発現が初代培養細胞とは異なる可能性がある。また、前述したように、尿細管細胞内へのリンの取り込み実験において 3 次元的な尿細管腔が形成されていないため、正確な反応がみられていない可能性が考えられる。そのため、腎オルガノイドによる検討など、培養方法を含め今後さらなる実験の改良が必要であると考えられる。そして、今回の方法では iPS 細胞を作製する

際にメチル化などのエピジェネティックスはリプログラミングされる為、DNAメチル化異常によって生じた偽性副甲状腺機能低下症は正確に診断できない可能性がある。iPS細胞の作製に用いた元の細胞のエピジェネティックスを記憶している可能性を示した報告もあり³²⁾、尿から採取された尿細管細胞を用いれば検査の正確性を上げることができる可能性がある。

また、今回行ったiPS細胞を用いた検査方法では、過去に同様な研究が行われた報告はなく、本研究でも症例数は少ない為、偽陽性、偽陰性に関する十分なデータが得られていない。それらの事も踏まえ、今回対象とした偽性副甲状腺機能低下症は希少疾患であり、本施設においても該当患者は2名であり少数例での検討であったため、実験系をより確立したうえで、複数施設で多数例での検討を行う必要があると考えられた。

【結語】

偽性副甲状腺機能低下症患者から採取した血液中の末梢血細胞を疾患特異的 iPS 細胞由来尿細管細胞に分化させ、PTH に対する細胞内・外の cAMP と細胞内へのリン酸の取り込みをみることで、臨床において偽性副甲状腺機能低下症の診断時に施行される Ellsworth-Howard 試験のように尿細管における PTH の反応性を確認することが可能な、今までに報告のない新たな方法を示すことができた。

【謝辞】

本研究にあたり、研究全般において御指導いただきました日本大学医学部機能形態学系細胞再生移植医学 福田昇 教授、日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野 阿部雅紀 教授、畑中善成 助手、羽毛田公 博士、田中翔 博士に心から感謝致します。そして、研究全般において多くの御援助をいただきました日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野 常見明子 研究員、陳蘭 研究員、齋藤孝輔 博士、統計についてご助言いただいた日本大学医学部医学科数学 宇田川誠一 教授ほか御協力いただきました皆様に深く感謝いたします。

【表】

表 1. 偽性副甲状腺機能低下症の分類

病型		I 型		II 型
		I a型	I b型	
外因性PTHに対する反応性	尿中cAMP	↓	↓	→
	尿中リン	↓	↓	↓
Albright遺伝性骨異栄養症		あり	一部の症例で軽度	あり(?)
分子遺伝学的異常	母由来のGNASの変異/欠失	70%		
	GNAS上流のメチル化異常	20%	90%以上	
	その他	(PRKAR1A変異)		(PRKAR1A変異)
遺伝形式		常染色体優性母系遺伝	常染色体優性母系遺伝 または遺伝なし	

Albright 遺伝性骨異栄養症：円形顔貌、低身長、肥満、短指症もしくは軟部組織の異所性石灰化などの身体所見を呈する疾患。

文献 5 より引用.

表 2. 偽性副甲状腺機能低下症の診断基準

<厚生労働省指定難病 236 診断基準>

- A. 症状
1. 口周囲や手足などのしびれ、錯感覚 2. テタニー 3. 全身痙攣
- B. 検査所見
1. 低カルシウム血症、正又は高リン血症
2. eGFR 30mL/min/1.73m²以上 3. Intact PTH 30pg/mL以上
- C. 鑑別診断
ビタミンD欠乏症を否定する。
- D. 遺伝学的検査
1. GNAS遺伝子の変異 2. GNAS遺伝子の転写調節領域のDNAメチル化異常

<診断のカテゴリー>

Definite：Aのうち1項目以上+Bの全てを満たしCの鑑別すべき疾患を除外し、Dのいずれかを満たすもの。

Probable：Aのうち1項目以上+Bの全てを満たしCの鑑別すべき疾患を除外したもの。

Possible：Aのうち1項目以上+Bの全てを満たすもの。

→Definite、Probableを対象とする。

文献 6 より引用.

表 3. 使用した一次抗体

<p>octamer-binding transcription factor 4 (Oct-4)</p>	<p>Rabbit anti Oct-4A (C30A3) monoclonal antibody (#2840、Cell Signaling Technology、Massachusetts、USA) 100 倍希釈</p>
<p>nanog</p>	<p>Rabbit anti nanog (D73G4) monoclonal antibody (#4903、Cell Signaling Technology、Massachusetts、USA) 100 倍希釈</p>
<p>Aquaporin 1 (AQP1)</p>	<p>Rabbit anti AQP1 antibody (20333-1-AP、Proteintech、Rosemont、USA) 500 倍希釈</p>
<p>γ-glutamyltransferase 1 (GGT1)</p>	<p>Mouse anti GGT1 antibody (AB55138、Abcam、Cambridge、UK) 250 倍希釈</p>

表 4. 使用したプライマーのリスト

Marker / Gene	Primer Pairs	Amplicon (bp)	Annealing temperature (°C)
CD13 / <i>ANPEP</i>	F 5'-CACACACCGTTCCTGGATCTCCTCT-3' R 5'-GCTCCAACAGGCGAAGGTCACT-3'	76	60
Vit D3 Hydr / CYP27B1	F 5'-GGAAATTCTCGTGTCCCAGA-3' R 5'-TGACACAGAGTGACCAGCGTA-3'	80	55
Na ⁺ /K ⁺ ATPase / ATP1B1	F 5'-GCTGACCCGCCATCGCCAT-3' R 5'-ACCAACTGCCACCGGTCCTG-3'	114	60
GLUT5 / <i>SLC2A5</i>	F 5'-CCCCAGCTCTTCATCACTGTTGGC-3' R 5'-TTTGGAACACAAGGAGGGGGCC-3'	148	55
SGLT2 / <i>SLC5A2</i>	F 5'-ACGCCTGATTCCCGAGTTCT-3' R 5'-AGAACAGCACAATGGCGAAGT-3'	110	60
NBC1 / <i>SLC4A4</i>	F 5'-CCAAACTGGAGGAGCGACGGAAG-3' R 5'-CACACACATGCTTGAGGAAGGA -3'	90	55
OAT1 / <i>SLC22A6</i>	F 5'-TCTACTCCTGGTTCTTCATTG-3' R 5'-CGGAGTACCTCCATACTCAAT-3'	142	55
OCT1 / <i>SLC22A1</i>	F 5'-GCCGAGAACCTTGGGAGAA-3' R 5'-CACGACATCGCCGCAA-3'	110	55
OCTN2 / <i>SLC22A5</i>	F 5'-GGTTTGGCCGGAAGAATGT-3' R 5'-CCATGCCTACAAGGACAAACAG-3'	120	55
MDR1 / <i>ABCB1</i>	F 5'-GCCCTTGTTAGACAGCCTCATATTT-3' R 5'-GGACAGGCGGTGAGCAAT-3'	141	55
PEPT1 / <i>SLC15A1</i>	F 5'-CTTCTCTGTCACGGGATTGGA-3' R 5'-TGCCTGAAGCACCGACTTC-3'	70	55
PEPT2 / <i>SLC15A2</i>	F 5'-TCTCCTTGGTGTATGTGCTTGG-3' R 5'-TGATGCCTCCTGTCCCCAAAG-3'	132	60

AQP1 / <i>AQP1</i>	F 5'-AAGCTCTTCTGGAGGGCAGT-3' R 5'-CACCTTCACGTTGTCCTGGACCG-3'	137	60
GGT / <i>GGT1</i>	F 5'-TGAGCCCAGAAGTGAGAGCAGTTG-3' R 5'-ATGTCCACCAGCTCAGAGAGGGT-3'	85	60
KSP-CAD / <i>CDH16</i>	F 5'-TCCCATGCCTACCTCACCTT-3' R 5'-TTGCAGCGACACACGATCA-3'	125	55
NCCT / <i>SLC12A3</i>	F 5'-CACCAAGAGGTTTTGAGGACATG-3' R 5'-GACAGTGGCCTCATCCTTGAA-3'	70	60
NKCC2 / <i>SLC12A1</i>	F 5'-TGGGGAGTCATGCTCTTCATTCGC-3' R 5'-CCACGAACAAACCCGTTAGTTGC-3'	149	60
PODXL / <i>PODXL</i>	F 5'-ACCTACCCTGCCAGAGACCAT-3' R 5'-AGATCCTCACACTTTGCCAGTT-3'	120	60
AQP3 / <i>AQP3</i>	F 5'-GACGCTGGGAGCCTTCTTG-3' R 5'-GCTGGTTGTCGGCGAAGT-3'	80	60
GAPDH / <i>GAPDH</i>	F 5'-TTGACGCTGGGGCTGGCATT-3' R 5'-GTGCTCTTGCTGGGGCTGGT-3'	157	60

表 5. 使用したプライマーとプローブ

Parathyroid hormone 1 receptor

Sense	5'-ACCTGCACAGCCTCATCTTC-3'
Antisense	5'-TTGTTCCCGGAGCTCAAGTC-3'

NaPi2a

Sense	5'-TGCTCAACTCCCTGCTCAAG- 3'
Antisense	5'-GAACTGCTCTGGACCACGAA- 3'

GAPDH

4326317E (Thermo Fisher Scientific)

表 6. 各試薬の組成

Pi free medium 終濃度

NaCl	137 mM
KCl	5.4 mM
CaCl ₂	2.8 mM
MgSO ₄	1.2 mM
HEPES-Tris pH7.4	10 mM

溶媒は H₂O を用いる。

Pi free uptake solution 終濃度

KH ₂ PO ₄	100 mM
³² P	1μCi/ml

Pi free medium に上記の薬剤を加える。

STOP solution 終濃度

NaCl	137 mM
Tris-HCl pH7.2	10 mM
KH ₂ /K ₂ HPO ₄ pH7.5	2 mM

溶媒は H₂O を用いる。

表 7. 症例 2 における GNAS 遺伝子変異

rs number	position	genotype	consequence	HGVS.c
rs369158171	Chr20:58840651	heterozygous	Missense Variant	c.545C>G
rs6026578	Chr20:58888417	homozygous	Non Coding Transcript Variant	g.53678C>G
rs1800900	Chr20:58840055	heterozygous	5 Prime UTR Variant	g.5316A>C
rs13831	Chr20:58900136	heterozygous	3 prime UTR variant	g.65397A>C
rs7121	Chr20:58903752	homozygous	Missense Variant	c.393C>G
rs143800311	Chr20:58889223-5	Insertion	5 Prime UTR Variant	g.58889233_58889234insGGCGCGGCGC
rs919196	Chr20:58909030	heterozygous	non coding transcript exon variant	g.74291T>C
rs6026579	Chr20:58888938	homozygous	5 Prime UTR Variant	g.54199C>T
rs3787497	Chr20:58841705	heterozygous	5 prime UTR variant	g.58841705A>G
rs3730177	Chr20:58910965	heterozygous	3 prime UTR variant	c.136G>A

4 カ所の 5' untranslated region (UTR) 変異、2 カ所の Missense 変異、2 カ所の Noncoding transcript 変異、2 カ所の 3' UTR 変異を認め、GNAS 遺伝子異常による偽性副甲状腺機能低下症であることが確認された。

【図】

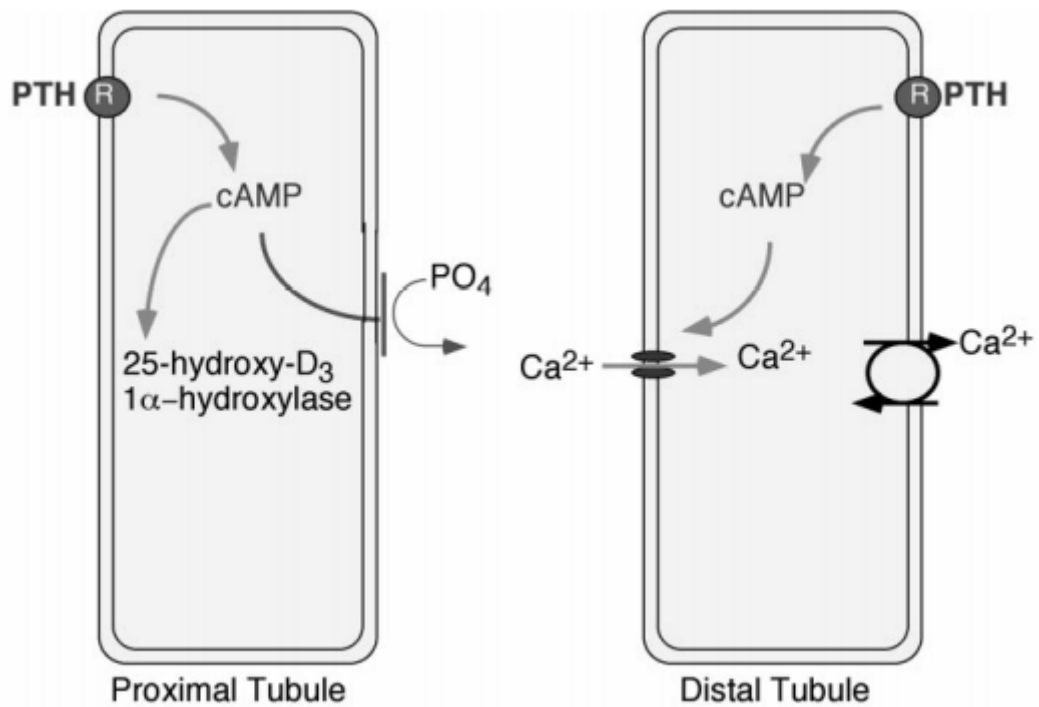


図 1. 尿細管細胞における PTH の作用

PTH は近位および遠位腎尿細管細胞においてセカンドメッセンジャーである cAMP 生成を増加させる。近位尿細管細胞では 25(OH)D の 1 位水酸化の促進とリン酸排泄の促進、遠位尿細管細胞では Ca²⁺ の再吸収を亢進させる。

文献 2 より引用。

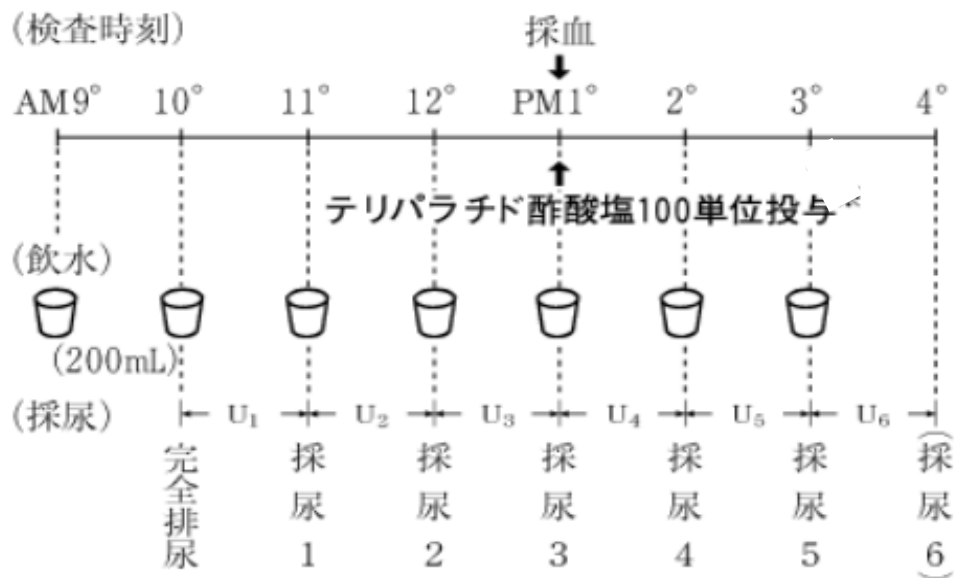


図 2. Ellsworth-Howard 試験の実施法と判定基準

・尿中 cAMP 排泄

PTH 投与前後 1 時間の尿中 cAMP 排泄を比較して、投与後が投与前と比較して

10 倍、かつ $1\mu\text{mol}$ 以上の増加があれば陽性（正常反応）とする。

・尿中 P 排泄

PTH 投与前後 2 時間の尿中リン排泄を比較して、投与後が投与前と比較して

35mg 以上の増加があれば陽性(正常反応)とする。

文献 8 より引用.

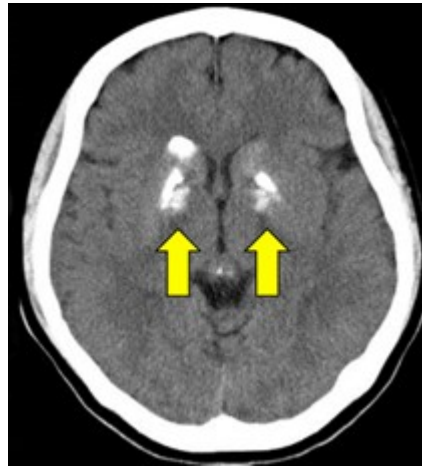


図 3-1 (A) 症例 1 : 頭部単純 CT 画像

矢印に示す部位に石灰化を認める。

前医

尿中cAMP (左 : PTH負荷前後1時間の排泄量の差) (右 : PTH負荷前後1時間の排泄量の比)		尿中リン酸排泄 (PTH負荷前後2時間の差)
12.7 μ mol/時間	54.9倍	23.6 mg/2時間
→ 反応あり		→ 反応なし

当院

尿中cAMP (左 : PTH負荷前後1時間の排泄量の差) (右 : PTH負荷前後1時間の排泄量の比)		尿中リン酸排泄 (PTH負荷前後2時間の差)
5.42 μ mol/時間	38.9倍	67.8 mg/2時間
→ 反応あり		→ 反応あり

図 3-1 (B) 症例 1 : Ellsworth-Howard 試験結果

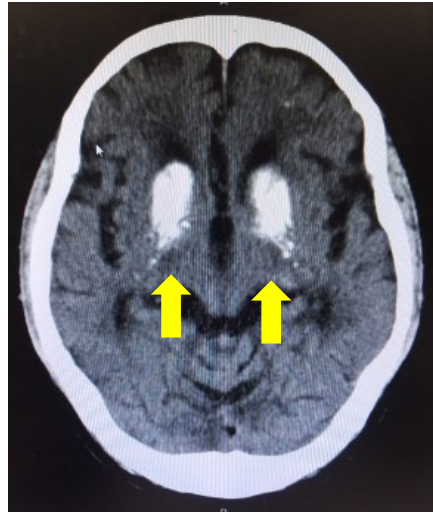


図 3-2 (A) 症例 2 : 頭部単純 CT 画像

矢印に示す部位に石灰化を認める。

尿中cAMP (左 : PTH負荷前後1時間の排泄量の差) (右 : PTH負荷前後1時間の排泄量の比)		尿中リン酸排泄 (PTH負荷前後2時間の差)
926.7 μ mol/時間	22.9倍	6.2 mg/2時間
→反応あり		→反応なし

図 3-2 (B) 症例 2 : Ellsworth-Howard 試験結果

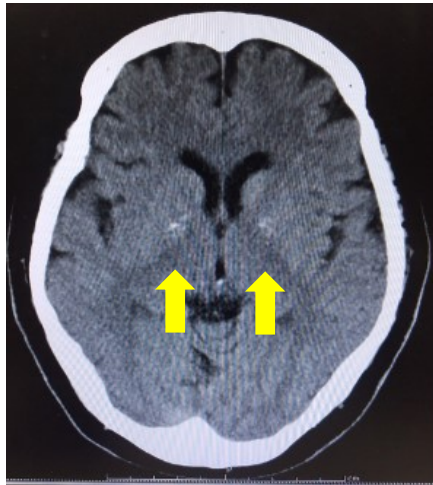


図 3-3 (A) 症例 3 : 頭部単純 CT 画像

矢印に示す部位に石灰化を認める。

尿中cAMP (左 : PTH負荷前後1時間の排泄量の差) (右 : PTH負荷前後1時間の排泄量の比)		尿中リン酸排泄 (PTH負荷前後2時間の差)
0.15 μ mol/時間	1.6倍	12 mg/2時間
→反応なし		→反応なし

図 3-3 (B) 症例 3 : Ellsworth-Howard 試験結果

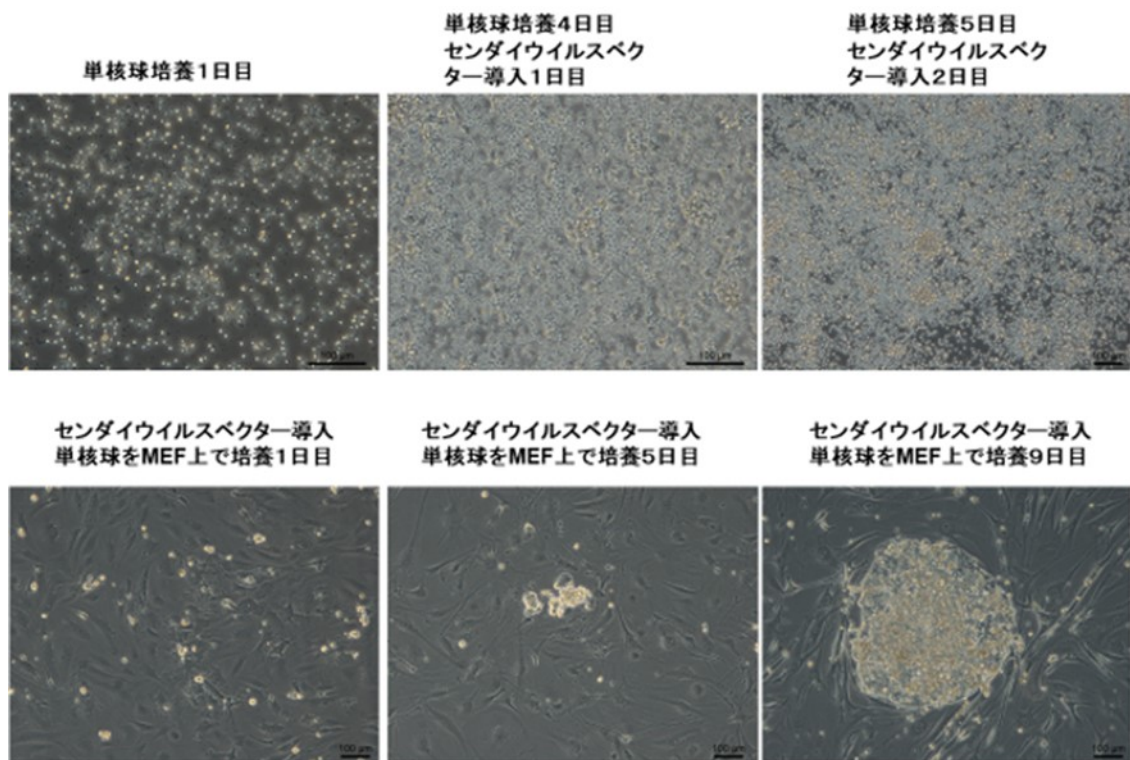


図 4. 単核細胞にセンダイウイルスベクターで山中 4 因子を導入し、コロニーが形成されるまで（細胞：患者 1 由来）

末梢血より単核細胞を分離し、山中 4 因子を導入し培養を続け、約 2 週間程で iPS 細胞様コロニーが形成されていった。

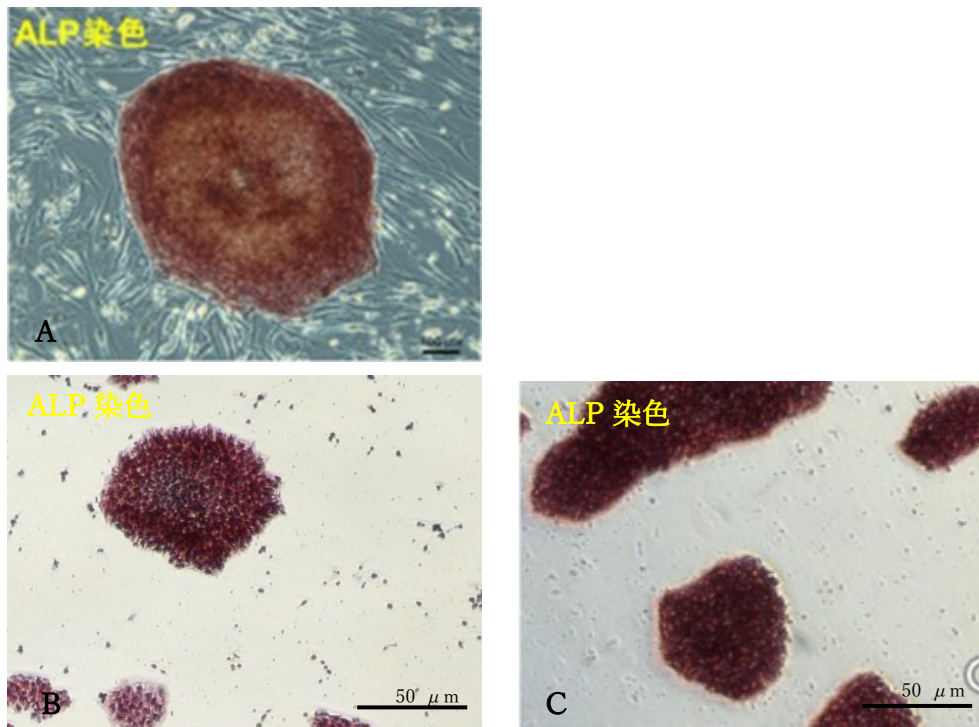


図5. アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色 (A : 症例 1 由来、B : 症例 3 由来、C : iPS 細胞(HPS0360))

患者の末梢血単核細胞から樹立した iPS 細胞様コロニーはそれぞれ、ALP 染色にて、iPS 細胞(HPS0360)と同様に染色された。その結果から、未分化 iPS 細胞であることを確認できた。

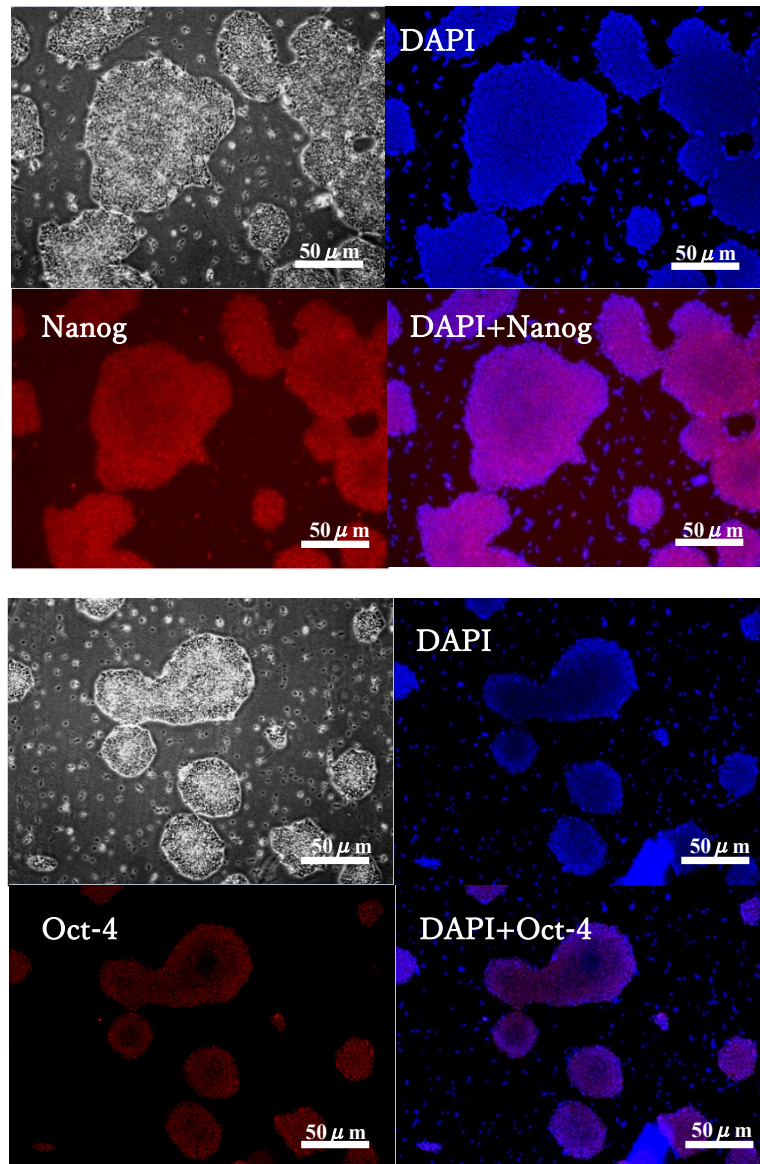


図 6-A . iPS 細胞(HPS0360)の Nanog、Oct-4 抗体を用いた免疫染色

Nanog と Oct-4 の蛍光免疫染色において iPS 細胞(HPS0360)で、それぞれ染色陽性であった。(DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole による核染色)。

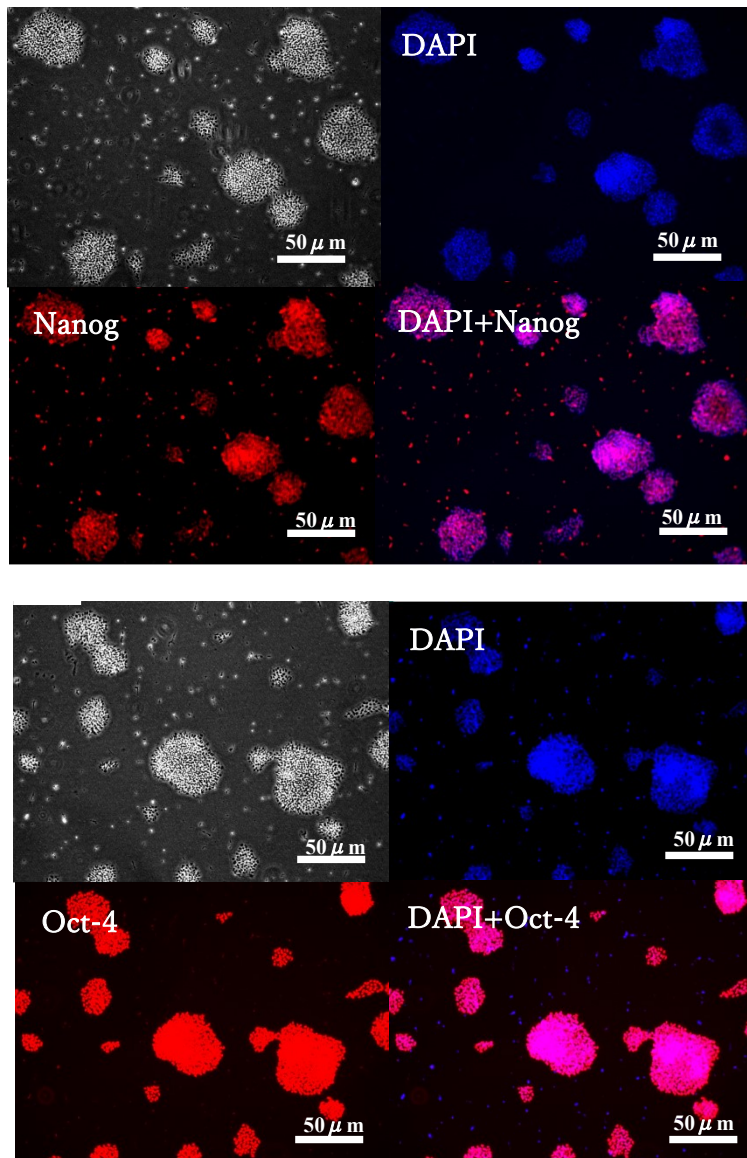


図 6-B. iPS 細胞(症例 3 由来)の Nanog、Oct-4 抗体を用いた免疫染色

Nanog と Oct-4 の蛍光免疫染色において iPS 細胞(症例 3 患者由来)では、iPS 細胞(HPS0360)と同様にほとんどの細胞で染色陽性を認めた。それぞれの染色性に明らかな差は認めなかった。(DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole による核染色)

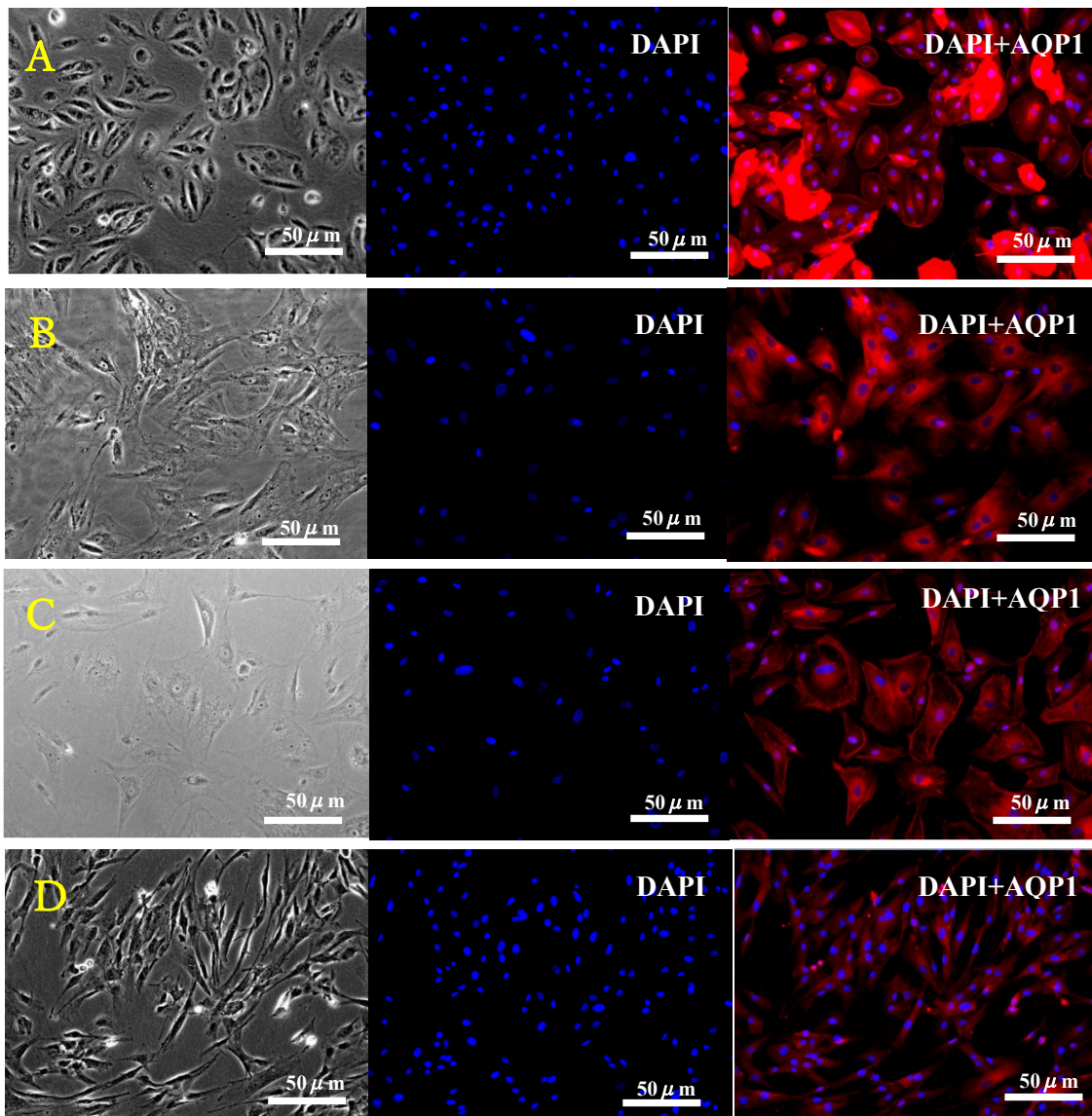


図 7-A. 各尿細管細胞(A:RPTEC、B: iPS 細胞(HPS0360)由来、C: iPS 細胞(症例 1)由

来、D: iPS 細胞(症例 3)由来)の Aquaporin1 抗体を用いた免疫染色

iPS 細胞 (HPS0360 株) と症例 1・3 由来 iPS 細胞由来の尿細管細胞において、RPTEC

と同様に Aquaporin1 (AQP1)染色ではほとんどの細胞が陽性であった。(DAPI : 4',6-

diamidino-2-phenylindole による核染色)

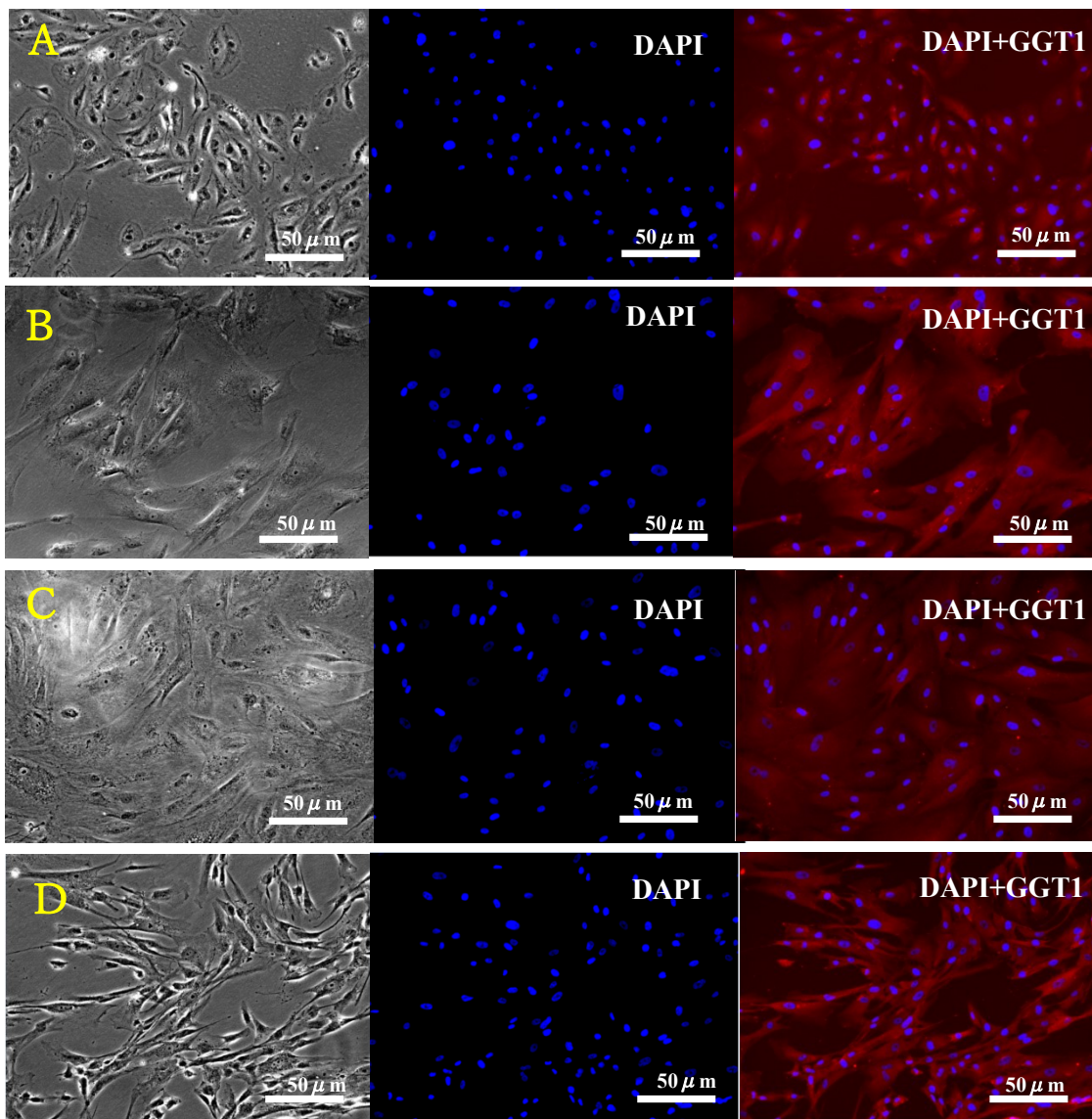


図 7-B. 各尿細管細胞(A:RPTEC、B: iPS 細胞(HPS0360)由来、C: iPS 細胞(症例 1)由来、D: iPS 細胞(症例 3)由来)の γ -glutamyltransferase1 抗体を用いた免疫染色

iPS 細胞 (HPS0360 株) と症例 1・3 由来 iPS 細胞由来の尿細管細胞において、RPTEC と同様に γ -glutamyltransferase1 (GGT1)染色が陽性であった。(DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole による核染色)

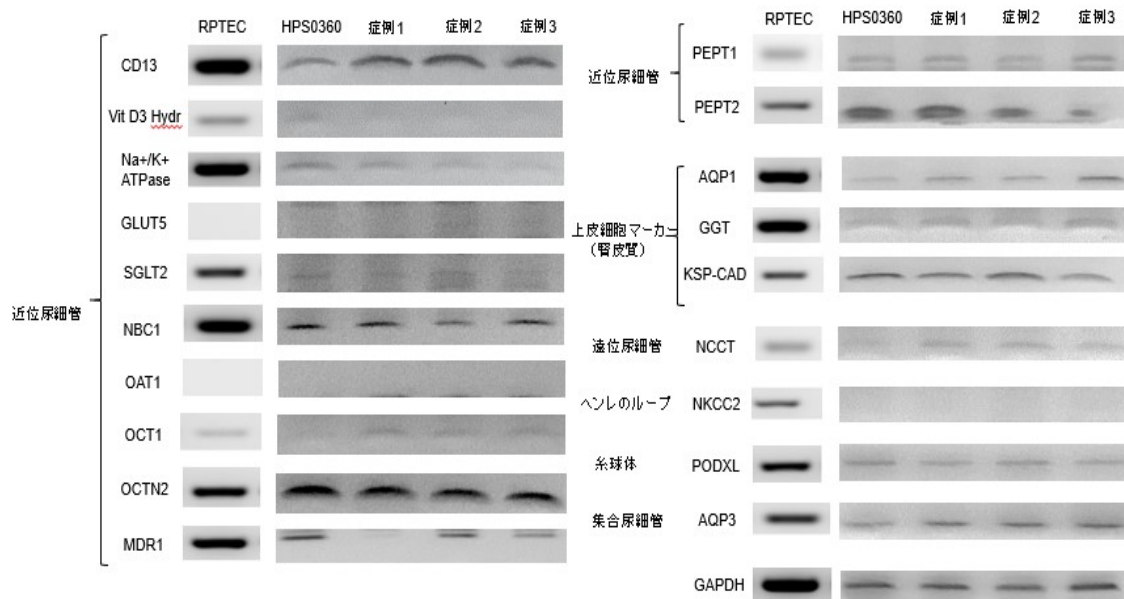


図 8. RPTEC と iPS 細胞(HPS0360、症例 1・2・3)から分化させた尿細管細胞での遺伝子発現(アガロースゲル電気泳動)

iPS 細胞(HPS0360)から作製した尿細管細胞ではコントロールに用いた RPTEC と比較して、*CD13*, *Na⁺/K⁺ATPase*, *NBC1*, *OCT1*, *OCTN2*, *MDR1*, *PEPT1*, *PEPT2*, *AQP1*, *GGT*, *KSP-CAD* が同様に発現したが、*Vit D3 Hydr*, *SGLT2*, 発現は弱かった。また遠位尿細管マーカー *NCCT*、糸球体マーカー *PODXL*、集合管マーカー *AQP3* も RPTEC と同様に発現していた。iPS 細胞(HPS0360)と iPS 細胞(症例 1・2・3)の各マーカーの発現はほとんど同じであったが、症例 1 の *MDR* の発現は弱かった。

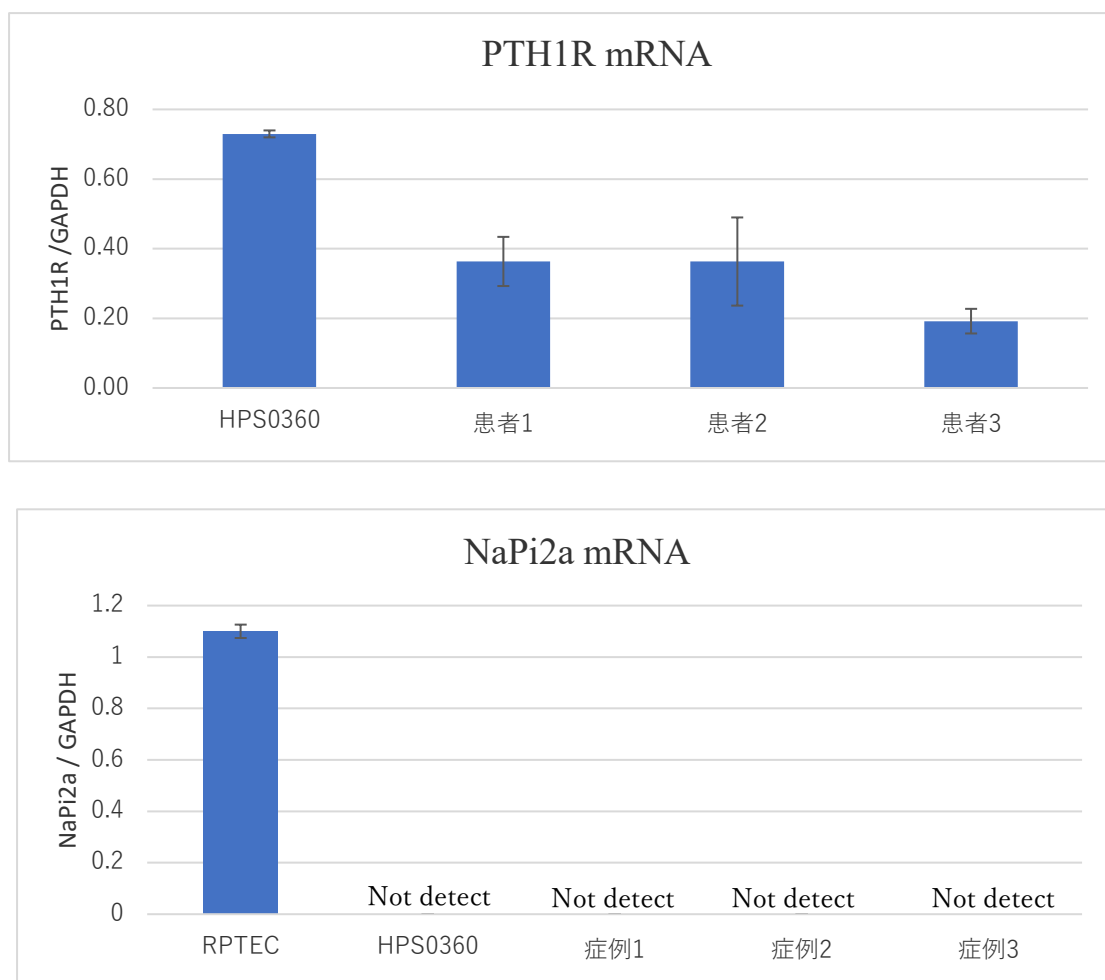


図9. *PTH1R* と *NaPi2a* のリアルタイム PCR 法による mRNA 発現測定

PTH1R と *NaPi2a* の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で測定した(n=3)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。*PTH1R* はどの iPS 細胞(HPS0360、症例1・2・3)においても発現が認められた。また、*NaPi2a* は RPTEC では発現が認められるが、iPS 細胞(HPS0360、症例1・2・3)由来尿細管細胞では明らかな発現が認められなかった。

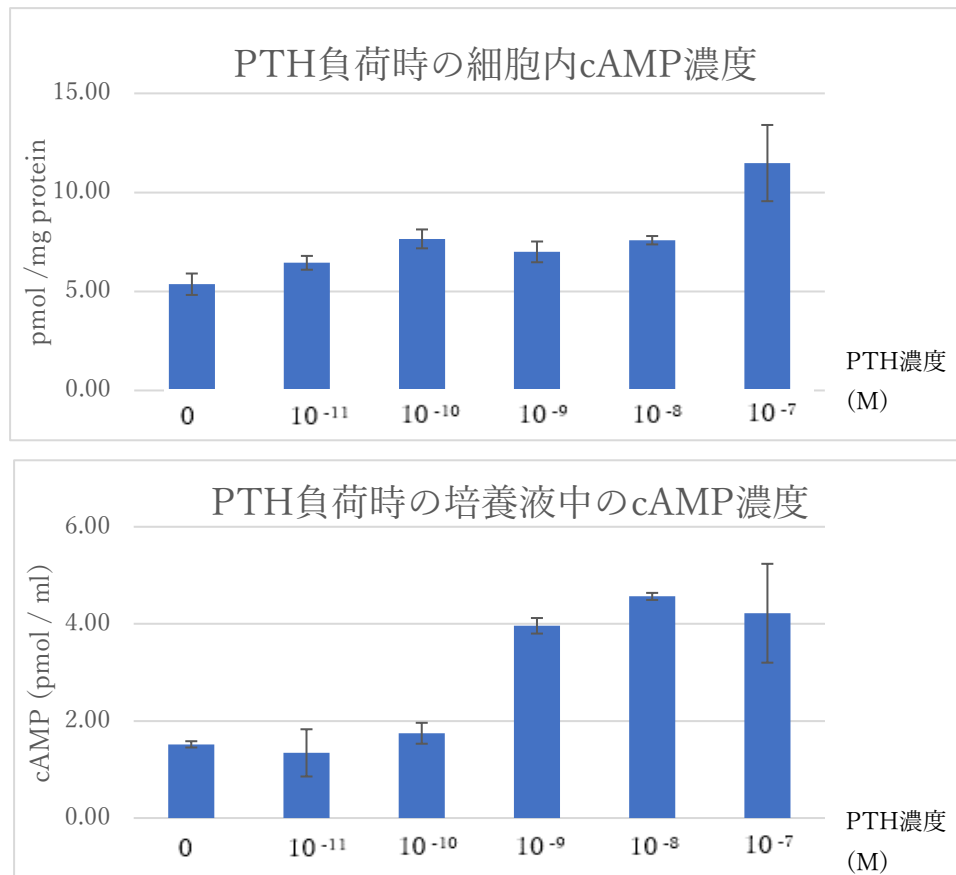


図 10. HPS 0360 由来の尿細管細胞に対する PTH 負荷における細胞内と培養液中における cAMP 濃度の変化

PTH 負荷時の cAMP の濃度を測定した(n=3)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。細胞内と培養液中の共に、6 濃度間において有意差を認め (細胞内: $P = 0.02$ 、培養液中: $P = 0.02$)、PTH 濃度依存性の cAMP 濃度の上昇が確認された。

(Steel 検定の結果: 0 M と各濃度間、細胞内: 10⁻¹¹M : $P = 0.40$ 、10⁻¹⁰M : $P = 0.18$ 、10⁻⁹M : $P = 0.40$ 、10⁻⁸M : $P = 0.18$ 、10⁻⁷M : $P = 0.18$ 、培養液中: 10⁻¹¹M : $P = 0.95$ 、10⁻¹⁰M : $P = 0.95$ 、10⁻⁹M : $P = 0.18$ 、10⁻⁸M : $P = 0.18$ 、10⁻⁷M : $P = 0.18$)

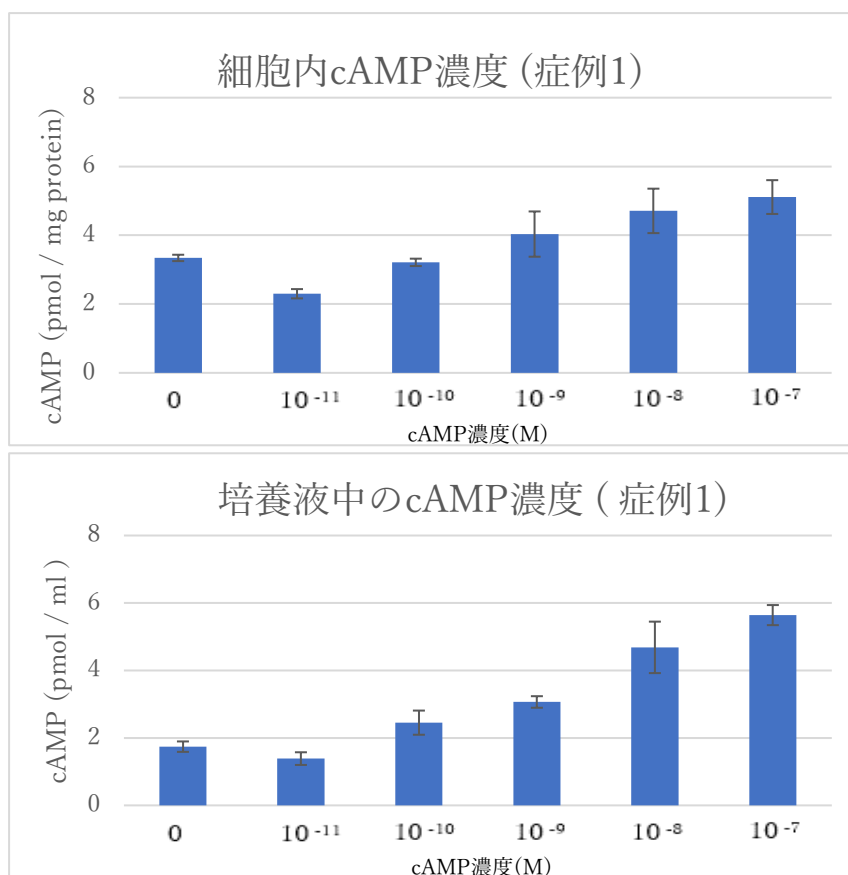


図 11-1. 症例 1 の iPS 細胞由来尿細管細胞に対する PTH 負荷における細胞内と培養液中における cAMP 濃度の変化

PTH 負荷時の cAMP の濃度を測定した(n=4)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。細胞内と培養液中の共に、6 濃度間において有意差を認め (細胞内 $P=0.008$ 、培養液中 $P=0.002$)、PTH 濃度依存性の cAMP 濃度の上昇が確認された。(Steel 検定の結果：0 M と各濃度間、細胞内：10⁻¹¹M： $P=0.08$ 、10⁻¹⁰M： $P=0.97$ 、10⁻⁹M： $P=0.85$ 、10⁻⁸M： $P=0.66$ 、10⁻⁷M： $P=0.08$ 、培養液中：10⁻¹¹M： $P=0.46$ 、10⁻¹⁰M： $P=0.46$ 、10⁻⁹M： $P=0.83$ 、10⁻⁸M： $P=0.83$ 、10⁻⁷M： $P=0.83$)

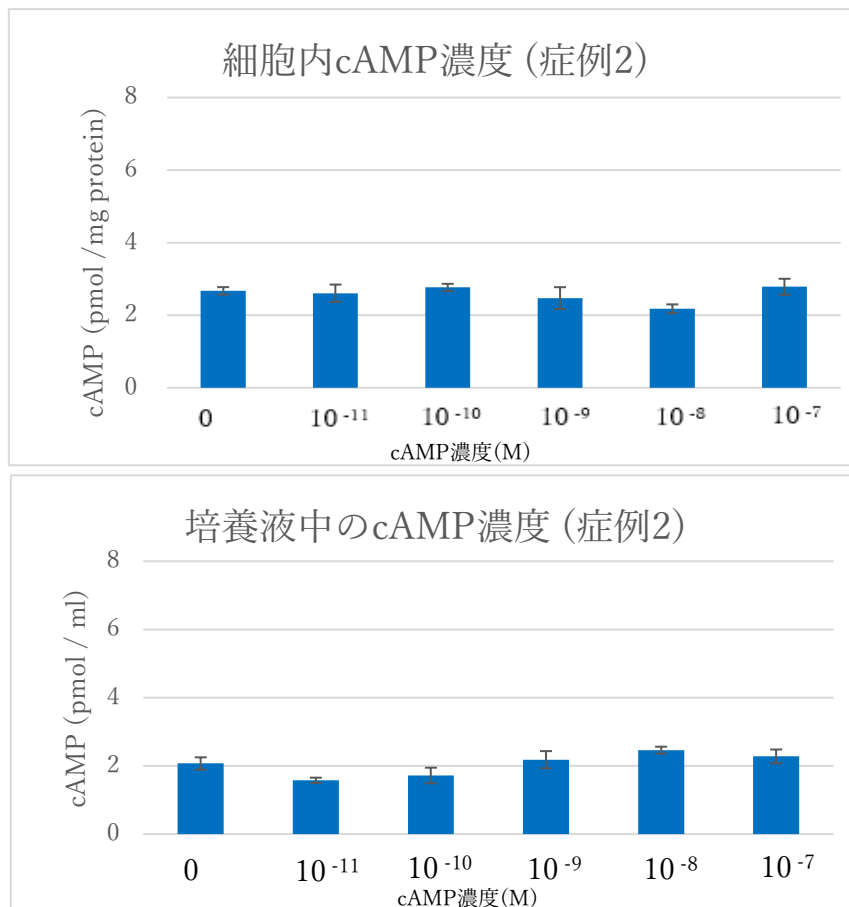


図 11-2. 症例 2 の iPS 細胞由来尿細管細胞に対する PTH 負荷における細胞内と培養液中における cAMP 濃度の変化

PTH 負荷時の cAMP の濃度を測定した(n=4)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。培養液中では有意差を認め($P = 0.02$)、細胞内では有意差は認められなかった($P = 0.14$)。(Steel 検定の結果：0 M と各濃度間、細胞内：10⁻¹¹M： $P = 1.00$ 、10⁻¹⁰M： $P = 0.87$ 、10⁻⁹M： $P = 0.67$ 、10⁻⁸M： $P = 0.08$ 、10⁻⁷M： $P = 0.97$ 、培養液中：10⁻¹¹M： $P = 0.16$ 、10⁻¹⁰M： $P = 0.67$ 、10⁻⁹M： $P = 0.99$ 、10⁻⁸M： $P = 0.28$ 、10⁻⁷M： $P = 0.86$)

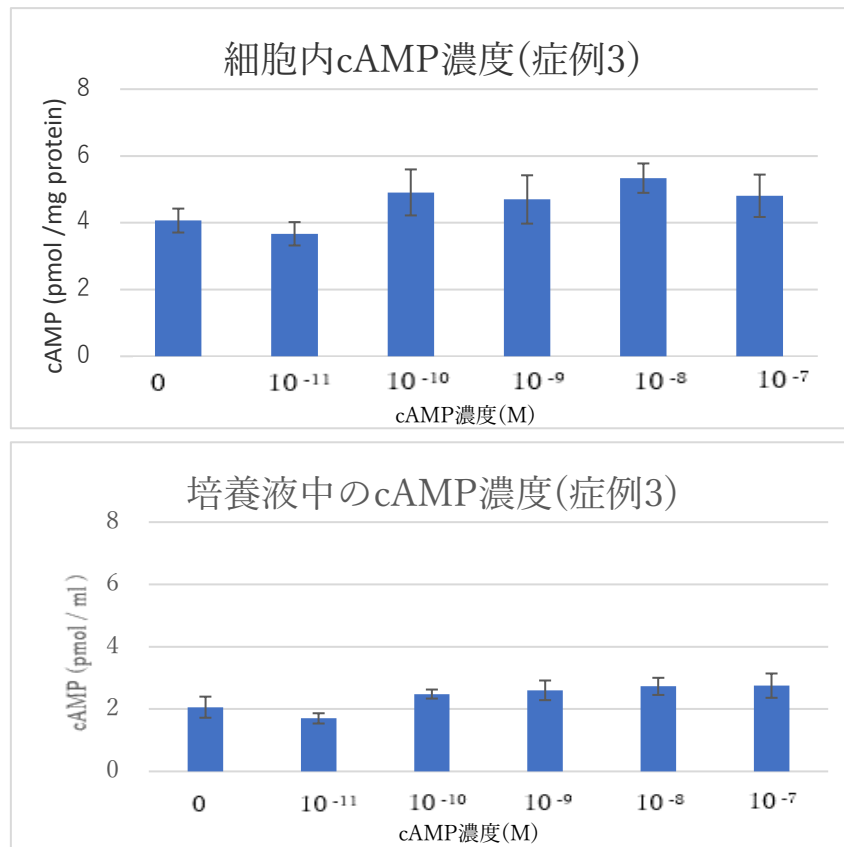


図 11-3. 症例 3 の iPS 細胞由来尿細管細胞に対する PTH 負荷における細胞内と培養液中における cAMP 濃度の変化

PTH 負荷時の cAMP の濃度を測定した(n=4)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。6 濃度間で細胞内では有意差を認め(P = 0.01)、培養液中では有意差は認められなかった(P = 0.10)。

(Steel 検定の結果：0 M と各濃度間、細胞内：10⁻¹¹M : P = 0.68、10⁻¹⁰M : P = 0.12、10⁻⁹M : P = 0.23、10⁻⁸M : P = 0.08、10⁻⁷M : P = 0.08、培養液中：10⁻¹¹M : P = 0.86、10⁻¹⁰M : P = 0.46、10⁻⁹M : P = 0.86、10⁻⁸M : P = 0.28、10⁻⁷M : P = 0.66)

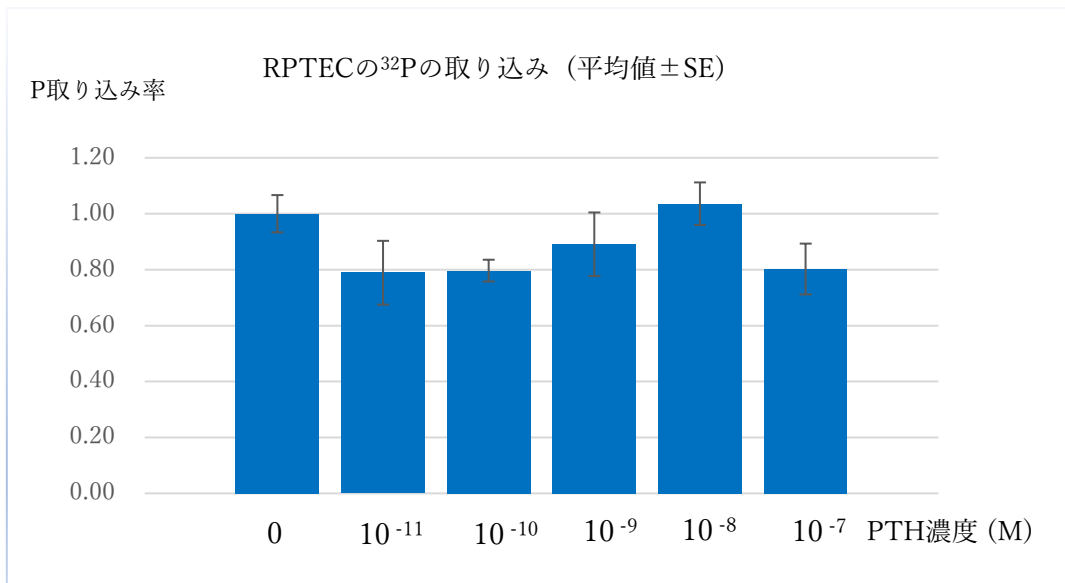


図 12 A. RPTEC に対する PTH 負荷時の細胞内 ³²P 取り込みの変化

PTH 負荷時の ³²P の取り込み率を測定した(n=4)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。PTH 濃度間に有意差は認められなかった($P = 0.28$)。(Steel 検定の結果：0 M と各濃度間：10⁻¹¹M： $P = 0.67$ 、10⁻¹⁰M： $P = 0.16$ 、10⁻⁹M： $P = 0.92$ 、10⁻⁸M： $P = 0.99$ 、10⁻⁷M： $P = 0.46$)

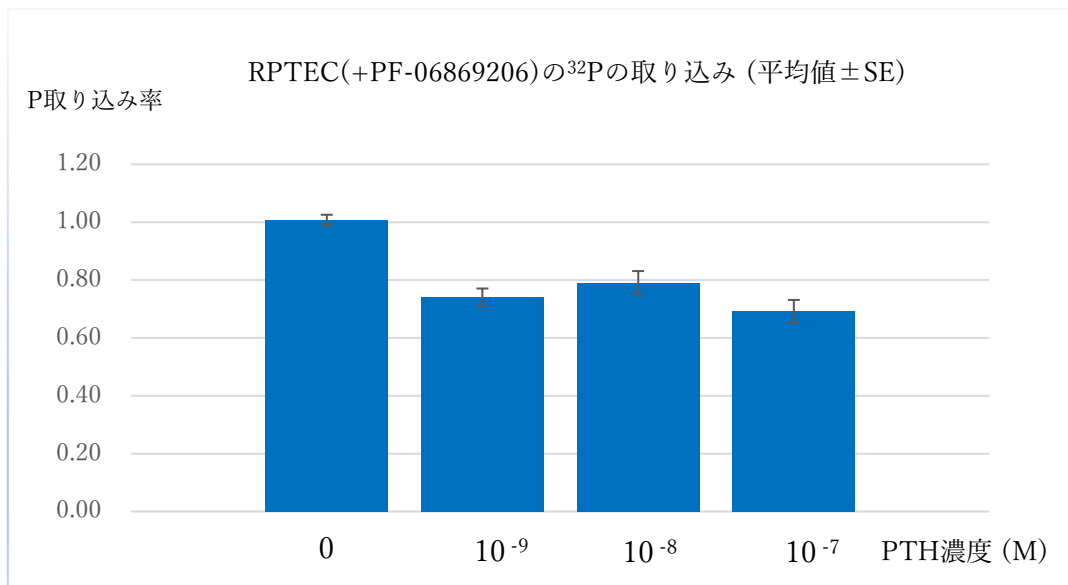


図 12 B. PF-06869206 を添加した RPTEC に対する PTH 負荷時の細胞内 ³²P 取り込みの変化

PTH 負荷時の ³²P の取り込み率を測定した(n=4)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。4 群間にて有意差を認め ($P = 0.03$)、PTH 濃度依存性の細胞内へのリンの取り込み低下が確認された。PTH 濃度間に有意差は認められなかった ($P = 0.28$)。(Steel 検定の結果：0 M と各濃度間：10⁻⁹M： $P = 0.88$ 、10⁻⁸M： $P = 0.20$ 、10⁻⁷M： $P = 0.056$)

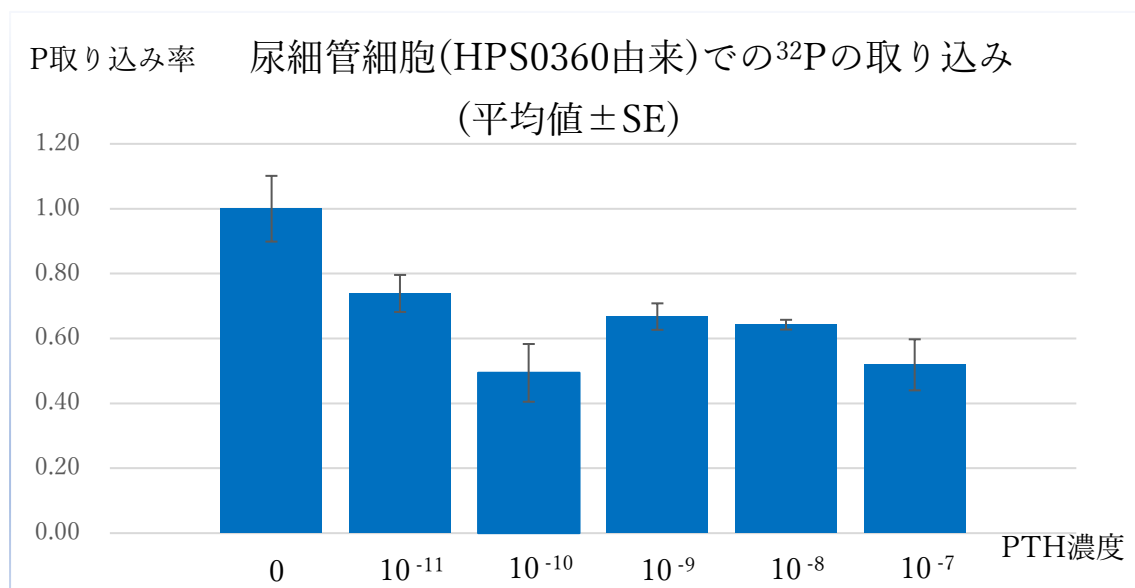


図 13. 尿細管細胞 (iPS 細胞 [HPS0360 由来]) に対する PTH 負荷時の細胞内³²P 取り込みの変化

PTH 負荷時の³²P の取り込み率を測定した(n=4)。グラフは平均値 ± 標準誤差で示した。6 濃度間において有意差を認め ($P = 0.04$)、PTH 濃度依存性の細胞内へのリンの取り込み低下が確認された。(Steel 検定の結果：0 M と各濃度間：10⁻¹¹M： $P = 0.49$ 、10⁻¹⁰M： $P = 0.09$ 、10⁻⁹M： $P = 0.13$ 、10⁻⁸M： $P = 0.09$ 、10⁻⁷M： $P = 0.14$)



図 14. 尿細管細胞（症例 1・2・3 の iPS 細胞由来）に対する PTH 負荷時の細胞内 ^{32}P 取り込み率の変化

PTH 負荷時の ^{32}P の取り込み率を患者 1・2・3 の iPS 細胞由来の尿細管細胞にて測定した(n=4)。グラフは平均値 \pm 標準誤差で示した。いずれも ^{32}P の取り込み低下に関し、3 濃度間での統計的な有意差は認められなかった(患者 1 : $P=0.15$ 、患者 2 : $P=0.05$ (取り込みは上昇) 、患者 3 : $P=0.23$)。患者 1 は 0M と 10^{-7}M の間で平均の低下はみとめたが、Steel 検定で統計的な有意差は認めな

かった($P=0.06$)。一方、患者 2 と 3 では取り込み低下は認められなかった。

(Steel 検定の結果(0 M と各濃度間) 患者 1 : $10^{-8}\text{M} : P = 0.44$ 、 $10^{-7}\text{M} : P =$

0.06 、患者 2 : $10^{-8}\text{M} : P = 0.08$ 、 $10^{-7}\text{M} : P = 0.15$ 、患者 3 : $10^{-8}\text{M} : P = 0.40$ 、

$10^{-7}\text{M} : P = 0.15$)

【参考文献】

1. Goodman HM : Endocrinology concepts for medical students. *Physiol Educ.* 2001 ;25: 213-24.
2. Miyamoto K, Sugino S, Shoji Kuwahara S, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci.*2011; 100: 3719-30.
3. Nakamura Y, Matsumoto T, Tamakoshi A, et al. Prevalence of idiopathic hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism in Japan. *J Epidemiol.* 2000; 10: 29-33.
4. Linglart A, Levine MA, Jüppner H. Pseudohypoparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2018; 4: 865-888.
5. 日本内分泌学会編集：内分泌代謝専門医研修ガイドブック 1版.2018. 診断と治療社
6. 皆川真規：低カルシウム血症 偽性副甲状腺機能低下症. *日本内科学会雑誌.*2007; 96: 713-718.

7. 難病情報センター 偽性副甲状腺機能低下(指定難病 236)
<https://www.nanbyou.or.jp/entry/233> (参照 2020 年 8 月 20 日)
8. Ellsworth R, Howard JE: Studies on the physiology of the parathyroid glands. Bull. Johns. Hopkins. Hosp.1934; 55: 296-308.
9. 尾形悦郎, 山本通子, 松本敏夫,他 : ヒト PTH (1-34) による Ellsworth-Howard 試験の実施法と判定基準. 日本内分泌学会雑誌.1984 ; 60: 971-984.
10. Okazaki R, Matsumoto T, Furukawa Y, et al. Serum intact parathyroid hormone concentration measured by a two-site immunoradiometric assay in normal subjects and patients with various parathyroid disorders.Endocrinol Jpn. 1992; 39: 115-120.
11. Mantovani G, Bondioni S, Linglart A, et al. Genetic analysis and evaluation of resistance to thyrotropin and growth hormone-releasing hormone in pseudohypoparathyroidism type Ib. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92 :3738-42.
12. Park H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell. 2008 ;134 :877-886.
13. Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. Mol Brain. 2014; 7:22.

14. Freedman BS. Modeling Kidney Disease with iPS Cells. *Biomark Insights*. 2015; 10: 153-69.
15. Rota C, Morigi M, Imberti B. Stem Cell Therapies in Kidney Diseases: Progress and Challenges. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 2790.
16. Narayanan K, Schumacher KM, Tasnim F, et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells. *Kidney Int*. 2013; 83: 593–603.
17. Tateno H, Onuma Y, Ito Y, et al. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. *Stem Cell Reports*. 2015; 4: 811-820.
18. Nagai S, Okazaki M, Segawa H, et al. Acute down-regulation of sodium-dependent phosphate transporter NPT2a involves predominantly the cAMP/PKA pathway as revealed by signaling-selective parathyroid hormone analogs. *J Biol Chem*. 2011; 286: 1618-1626.
19. Pfister MF, Lederer E, Forgo J, et al. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem*. 1997; 272: 20125-20130.

20. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*.2013; 48: 452-458.
21. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006; 126: 663–676.
22. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al. An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *Stem Cells*. 2013; 31: 458-466.
23. Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelial. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 3527-3534.
24. Mae S, Shirasawa S, Yoshie S, et al. Combination of small molecules enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into intermediate mesoderm through BMP7-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*.2010; 393. 877-882.
25. Batchelder CA, Lee CCI, Matsell DG, et al. Renal ontogeny in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and directed differentiation of human embryonic stem cells towards kidney precursors. *Differentiation*. 2009; 78: 45-56.

26. Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, et al. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol.*1993; 120: 371–383.
27. Taub M, Wang Y, Szczesny TM, et al. Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA.*1990; 87: 4002-4006.
28. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature.* 2015; 526: 564-568.
29. Linglart A, Bastepe M, Jüppner H. Similar clinical and laboratory findings in patients with symptomatic autosomal dominant and sporadic pseudohypoparathyroidism type Ib despite different epigenetic changes at the *GNAS* locus. *Clin Endocrinol.* 2007; 67: 822-831.
30. Hsieh WC, Ramadesikan S, Fekete D, et al. Kidney-differentiated cells derived from Lowe Syndrome patient's iPSCs show ciliogenesis defects and Six2 retention at the Golgi complex. *PLoS One.* 2018; 13: e0192635.

31. Chen W, Huang J, Yu X, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from renal tubular cells of a patient with Alport syndrome. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2015; 8: 101-109.
32. Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010; 467: 285-90.

研究業績

中村 吉宏

I 発表 ①一般発表 32 (共 20)

②特別発表 なし

II 論文 ①原著論文 7 (共 7)

②症例報告 2 (共 2)

③総説 なし

III 著書 なし

以上

I 発表

① 一般発表

1. 中村 吉宏, 小池 将夫, 原澤 信介, 日野浦 礼, 山川 俊, 足田 匡史, 松崎 真和, 鷺尾 武彦, 大久保 具明, 古屋 真吾, 川俣 博文, 渡邊 和宏, 菊島 公夫, 松本 直也, 瀬戸 博美, 平山 篤志: 腎自然破裂に対して経カテーテル動脈塞栓術により軽快した維持透析患者の一例: 第 526 回日本大学医学会例会, 東京, 2014 年 7 月
2. 畑中 善成, 小林 洋輝, 小澤 慶太, 田中 翔, 田平 和宣, 羽毛田 公, 中村 吉宏, 森田 博之, 福本 勝文, 上野 高浩, 相馬 正義: 呼吸器疾患の経過観察中に下垂体病変を伴う中枢性尿崩症と診断した 2 症例: 第 533 回日本大学医学会例会, 東京, 2015 年 9 月
3. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 畑中 善成, 羽毛田 公, 上野 高浩, 福田 昇, 相馬 正義: 副腎髄質に発現する K-Cl 共役輸送体と血圧日内変動制御の関連: 第 5 回日本高血圧学会臨床高血圧フォーラム, 東京, 2016 年 5 月
4. 宇都宮 慧, 及川 治, 堀越 周, 馬場 晴志郎, 鈴木 紘子, 小林 洋輝, 大月

伯恭, 林田 迪子, 小熊 秀隆, 中村 吉宏, 鈴木 敏子, 岡村 真喜誉, 阿部 雅紀, 岡田 一義: 両腎摘出後に内シャント感染から感染性心内膜炎を併発した HD 患者の 1 剖検例: 第 61 回日本透析学会学術集会・総会, 横浜, 2016 年 6 月

5. 大野 迪子, 及川 治, 堀越 周, 鈴木 紘子, 馬場 晴志郎, 小熊 秀隆, 中村 吉宏, 阿部 雅紀, 岡田 一義, 相馬 正義, 樋口 輝美: HD 導入期アナフィラキシーショック後に心停止を来し、蘇生に成功した一例: 第 59 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2016 年 6 月

6. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 村田 悠輔, 畑中 善成, 田平 和宣, 羽毛田 公, 上野 高浩, 福田 昇, 相馬 正義, 崎元 暢: 新規 ApoA1 遺伝子変異による家族性低 HDL 血症: 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 東京, 2016 年 7 月

7. 鄭 立晃, 中村 吉宏, 東 龍英, 高島 弘至, 安田 文彦, 王 靖枝, 菊池 史, 阿部 雅紀: メトトレキサート(MTX)・ロイコボリン救援療法中に併発した急性腎障害に対して血液浄化療法が奏功した 1 症例: 第 62 回日本透析学会学術

集会・総会, 横浜, 2017 年 6 月

8. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 畑中 善成, 羽毛田 公, 上野 高浩, 福田 昇, 阿部 雅紀, 相馬 正義: 腎臓における嗅覚受容体と本態性高血圧の関連: 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017 年 6 月

9. 丸山 範晃, 鄭 立晃, 丸山 高史, 及川 治, 吉田 好徳, 奈倉 千苗美, 北井 真貴, 逸見 聖一朗, 高島 弘至, 岡村 雅広, 村田 悠輔, 古川 哲也, 中村 吉宏, 堀上 友実, 秋谷 友里恵, 阿部 雅紀: 腹膜透析導入時に高齢者総合的機能評価を用いてスクリーニングを行い必要なアシストを検討した 1 例: 第 545 回日本大学医学会例会, 東京, 2017 年 9 月

10. 中村 吉宏, 小林 洋輝, 田中 翔, 畑中 善成, 羽毛田 公, 福田 昇, 阿部 雅紀: 気管支喘息発作を合併したバセドウ病の一症例: 第 545 回日本大学医学会例会, 東京, 2017 年 9 月

11. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 畑中 善成, 羽毛田 公, 菱木 三佳乃, 上野 高浩, 福田 昇, 阿部 雅紀, 相馬 正義: 高血圧自然発症ラットの副腎生体内

時計の異常と時計制御遺伝子への影響: 第 40 回日本高血圧学会総会, 松山,
2017 年 10 月

12. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 畑中 善成, 羽毛田 公, 菱木 三佳乃, 上野
高浩, 福田 昇, 阿部 雅紀, 相馬 正義: 高血圧自然発症ラットの腎臓におけ
る Olfactory receptor 活性化と高血圧性腎症バイオマーカーとしての Olfactory
receptor 59 の可能性: 第 40 回日本高血圧学会総会, 松山, 2017 年 10 月

13. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 畑中 善成, 羽毛田 公, 菱木 三佳乃, 上野
高浩, 福田 昇, 阿部 雅紀, 相馬 正義: SHR/Izm の内臓脂肪における生体内
時計の異常: 第 40 回日本高血圧学会総会, 松山, 2017 年 10 月

14. 小林 洋輝, 阿部 雅紀, 中村 吉宏, 田中 翔, 畑中 善成, 羽毛田 公: 両側性
原発性アルドステロン症の予測モデル: 第 47 回日本腎臓学会東部学会,
横浜, 2017 年 10 月

15. 小林 洋輝, 阿部 雅紀, 中村 吉宏, 田中 翔, 畑中 善成, 羽毛田 公: 原発性
アルドステロン症における各種ホルモンが血圧に与える影響について: 第 47

回日本腎臓学会東部学術学会, 横浜 , 2017 年 10 月

16. 田中 翔, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 畑中 善成, 羽毛田 公, 常見 明子, 上野 高浩, 福田 昇, 阿部 雅紀, 相馬 正義: エクソーム解析を用いた原発性高カ
イロミクロン血症患者の検討: 第 27 回臨床内分泌代謝 Update, 神戸, 2017 年
11 月

17. 中村 吉宏, 田中 翔, 小林 洋輝, 村田 悠輔, 畑中 善成, 羽毛田 公, 福田
昇, 阿部 雅紀, 相馬 正義: 甲状腺中毒症と重篤な気管支喘息発作が併発し
た一例: 第 27 回臨床内分泌代謝 Update, 神戸, 2017 年 11 月

18. 中村 吉宏, 小林 洋輝, 阿部 雅紀, 相馬 正義: 日本人高齢者集団における
アディポネクチンと腎機能低下の関係: 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 新
潟 , 2018 年 6 月

19. 中村 吉宏, 小林 洋輝, 阿部 雅紀, 相馬 正義: 日本人高齢者集団における
アディポネクチン受容体遺伝子(ADIPOR1,ADIPOR2)の一塩基多型と腎機能
の関係: 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 新潟 , 2018 年 6 月

20. 宮里 紘太, 田中 裕也, 岡村 真喜誉, 中村 吉宏, 鄭 立晃, 高島 弘至, 奈倉 千苗美, 阿部 雅紀: 腹膜透析カテーテル挿入術後早期に透析液の皮下リークを認めた一例: 第 24 回日本腹膜透析医学会学術集会, 徳島 ,2018 年 10 月
21. 田中 翔, 中村 吉宏, 畑中 善成, 阿部 雅紀: 肥満を契機に診断した成人男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症: 第 28 回臨床内分泌代謝 Update, 福岡 ,2018 年 11 月
22. 中村 吉宏, 田中 翔, 渡邊 健太郎, 田久保 正洋, 小須田 南, 田中 彩, 畑中 善成, 石原 寿光, 福田 昇, 阿部 雅紀: GH/IGF-1 値に影響する薬剤使用中に診断された先端巨大症の 2 症例: 第 28 回臨床内分泌代謝 Update, 福岡 ,2018 年 11 月
23. 吉岡 弘貴, 佐々木 佑介, 鈴木 秋吾, 橋本 翔, 中原 健, 船越 大吾, 桜井 文紀, 堀 祐太郎, 大日方 大亮, 吉澤 剛, 松井 強, 持田 淳一, 山口 健哉, 高橋 悟, 川本 俊輔, 中村 吉宏, 畑中 善成: デノスマブ治療中に重篤な低カルシウム血症をきたした前立腺癌骨転移の一例: 第 628 回日本泌尿器科学会東京地方会, 東京 ,2018 年 12 月

24. 中村 吉宏, 田中 翔, 堀上 友実, 畑中 善成, 福田 昇, 阿部 雅紀: 顆粒細胞腫により下垂体機能低下症をきたした一例: 第 92 回日本内分泌学会学術総会, 仙台, 2019 年 5 月
25. 宇都宮 慧, 中村 吉宏, 小林 洋輝, 阿部 雅紀: 高齢日本人集団におけるアディポネクチン受容体の一塩基多型と血清アディポネクチン、及び腎機能との関係: 第 62 回日本腎臓学会学術総会, 名古屋, 2019 年 6 月
26. 中村 吉宏, 田中 翔, 畑中 善成, 川本 俊輔, 清水 諭, 高尾 信輝, 宮里 紘太, 吉田 好徳, 丸山 範晃, 阿部 雅紀: 褐色細胞腫を合併した血液透析患者の一例: 第 64 回日本透析学会学術集会・総会, 横浜, 2019 年 6 月
27. Chen Lan, 福田 昇, 大月 伯恭, 田中 翔, 中村 吉宏, 松本 太郎, 阿部 雅紀: SHR 由来血管平滑筋細胞で miR-145 の低下で増加した補体 C3 は合成型形質変換に関与する (Increased Complement 3 with Suppression of miR-145 Induces the Synthetic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells from SHR): 第 42 回日本高血圧学会総会, 東京, 2019 年 10 月

28. 渡邊 健太郎, 中村 吉宏, 畑中 善成, 山口 賢, 江頭 富士子, 石原 寿光:
Euglycemic ketoacidosis を示した Basedow 病合併 2 型糖尿病の 1 例: 第 29 回
臨床内分泌代謝 Update, 高知, 2019 年 11 月
29. 中村 吉宏, 村田 悠輔, 川本 俊輔, 田中 翔, 畑中 善成, 福田 昇, 阿部 雅
紀: 妊娠中に全身の多発骨折を契機に診断されたクッシング症候群の一例:
第 93 回日本内分泌学会学術総会, 浜松(オンライン開催), 2020 年 7-8 月
30. 中村 吉宏, 福田 昇, 常見 明子, Chen Lan, 田中 翔, 畑中 善成, 阿部 雅
紀: 偽性副甲状腺機能低下症疾患特異的 iPS 細胞由来尿細管細胞への PTH 負
荷におけるリン酸および cAMP の反応の検討: 第 63 回 日本腎臓学会学術総
会, 横浜(オンライン開催), 2020 年 8 月
31. 中村 吉宏, 小林 洋輝, 田中 翔, 畑中 善成, 福家 吉伸, 福田 昇, 阿部 雅
紀: 原発性アルドステロン症におけるアルドステロン過剰分泌の程度が各臨
床所見に与える影響について: 第 21 回 日本内分泌学会 関東甲信越支部学
術集会, 新潟(オンライン開催), 2020 年 10 月

32. 中村 吉宏, 福田 昇, 常見 明子, Chen Lan, 田中 翔, 畑中 善成, 阿部 雅紀:

偽性副甲状腺機能低下症患者の疾患特異的 iPS 細胞由来尿細管細胞を用いた

PTH 負荷試験: 第 21 回 日本内分泌学会 関東甲信越支部学術集会, 新潟(オ

ンライン開催), 2020 年 10 月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

1. Kobayashi H, Abe M, Nakamura Y, Takahashi K, Fujita M, Takeda Y, Yoneda T, Kurihara I, Itoh H, Tsuiki M, Wada N, Ichijo T, Katabami T, Ogawa Y, Kawashima J, Yoshimoto T, Sone M, Inagaki N, Watanabe M, Kamemura K, Matsuda Y, Izawa S, Tanabe M, Tanabe A, Suzuki T, Naruse M; JPAS/JRAS Study Group. Association Between Acute Fall in Estimated Glomerular Filtration Rate After Treatment for Primary Aldosteronism and Long-Term Decline in Renal Function. Hypertension.2019;74(3):630-638.
2. Maruyama N, Higuchi T, Ono M, Oguma H, Nakamura Y, Utsunomiya K, Akiya Y, Horikami T, Yamazaki T, Okawa E, Ando H, Abe M. Correlation Between Aortic Calcification Score and Biochemical Parameters in Hemodialysis Patients. Contrib Nephrol. 2019;198:40-51.

3. Chen L, Fukuda N, Otsuki T, Tanaka S, Nakamura Y, Kobayashi H, Matsumoto T, Abe M. Increased Complement 3 With Suppression of miR-145 Induces the Synthetic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(10)
4. Maruyama T, Takashima H, Oguma H, Nakamura Y, Ohno M, Utsunomiya K, Furukawa T, Tei R, Abe M. Canagliflozin Improves Erythropoiesis in Diabetes Patients with Anemia of Chronic Kidney Disease. *Diabetes Technol Ther.* 2019;21(12):713-720.
5. Kobayashi H, Nakamura Y, Abe M, Kurihara I, Itoh H, Ichijo T, Takeda Y, Yoneda T, Katabami T, Tsuiki M, Wada N, Ogawa Y, Sakamoto R, Kawashima J, Sone M, Inagaki N, Yoshimoto T, Yamada T, Okamoto R, Matsuda Y, Fujita M, Watanabe M, Tamura K, Tanabe A, Naruse M; JPAS/JRAS Study Group. Effect of cosyntropin during adrenal venous sampling on subtype of primary aldosteronism: analysis of surgical outcome. *Eur J Endocrinol.* 2020;182(3):265-273.
6. Chen L, Fukuda N, Shimizu S, Kobayashi H, Tanaka S, Nakamura Y, Matsumoto T, Abe M. Role of complement 3 in renin generation during the differentiation of mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318(5):C981-C990.

7. Shimizu S, Tei R, Okamura M, Takao N, Nakamura Y, Oguma H, Maruyama T, Takashima H, Abe M. Prevalence of Zinc Deficiency in Japanese Patients on Peritoneal Dialysis: Comparative Study in Patients on Hemodialysis. *Nutrients*. 2020;12(3):764.

② 症例報告

1. Tanaka S, Ueno T, Tsunemi A, Nakamura Y, Kobayashi H, Hatanaka Y, Haketa A, Fukuda N, Soma M, Abe M. Lipoprotein Lipase Deficiency Arising in Type V Dyslipidemia. *Intern Med*. 2019 ;58(2):251-257.
2. Tanaka S, Fujishiro M, Nakamura Y, Hatanaka Y, Abe M. Retention of aberrant cortisol secretion in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia after unilateral adrenalectomy. *Ther Clin Risk Manag*. 2019 ;15:337-342.

③ 総説

なし

III 著書

なし