

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04339

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を用いた人工胎盤の創成と胎盤機能再生医療の開発

研究課題名（英文）Three-dimensional human placental buds synthesized from induced pluripotent stem cells for regenerative therapy that can restore placental function

研究代表者

近藤 英治 (Kondoh, Eiji)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10544950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞から誘導した絨毛様細胞、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞の3要素を用いて共培養を行いhCGを産生する立体的器官芽（ミニ胎盤）を作成することに成功した。このミニ胎盤には3種のトロフォブラストが混在して局在することを免疫組織染色で確認した。したがって、本研究で作成したミニ胎盤は、胎盤形成におけるトロフォブラストの分化を反映するin vitro 3Dモデルとして利用できる可能性がある。また、このミニ胎盤が超免疫不全マウス生体内で生着することも確認しており、胎盤形成のin vivoモデルとしても活用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早発型の妊娠高血圧腎症（pre-eclampsia; PE）や胎児発育不全（fetal growth restriction; FGR）の児の予後は不良である。PE、FGRは胎盤形成不全に起因しており、胎盤機能再生治療の開発は喫緊の課題である。本研究で作成したミニ胎盤は、より生体に近い機能的な胎盤組織培養系としても使用でき胎盤を対象とした研究が飛躍的に進むことが期待される。また、ミニ胎盤を生着させたヒト化マウスは病的胎盤に起因する産科疾患のin vivoモデルとして、個別化医療に向けた研究材料としても有望であり、当該研究分野において革新的な研究手法の確立に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Human iPS cell-derived trophoblast-like cells, human amnion-derived mesenchymal stem cells, and human umbilical vein endothelial cells were co-cultured to produce a three-dimensional organ bud (mini placenta) that produces human chorionic gonadotropin (hCG). Immunohistochemistry confirmed that three types of trophoblasts coexist and localize to this mini-placenta. Therefore, the mini-placenta established in this study may be used as an in vitro 3D model that reflects trophoblast differentiation during placenta formation. This mini-placenta has also been confirmed to engraft immunodeficient mice and might be used as an in vivo model of placental formation.

研究分野：preeclampsia, placental insufficiency

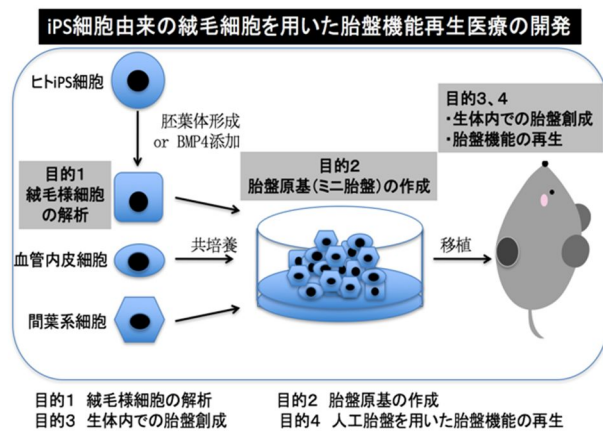
キーワード：placental organoid

1. 研究開始当初の背景

病的胎盤に起因する早発型の重症妊娠高血圧症候群や胎児発育不全の児の予後は不良である。胎盤機能が妊娠中期(妊娠 12-28 週)に不全状態に陥ると、児は生存できたとしても神経発達障害や脳性麻痺を合併する頻度が高くなる。これまで、早発型の重症妊娠高血圧症候群や胎児発育不全に対して、胎盤機能が低下した場合は胎児予備能の許容限界まで在胎期間を延長する待機療法が行われてきたが、良好な予後を得られない症例も未だ多数存在している。早発型の重症妊娠高血圧症候群や胎児発育不全の周産期予後を改善するためには、低下した胎盤機能を再生させるなど、斬新な着想による新規治療法の開発が必須であり、我々は胎盤機能を再生する治療を開発したい、という強い思いで本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、病的胎盤を補完する人工胎盤を創成・移植することで、胎盤機能の再生を目指すという革新的な治療法の開発を目指し、iPS 細胞を用いて機能的なヒト胎盤を創り出し、胎盤機能不全に対する「人工胎盤移植による胎盤機能再生医療」を開発し実臨床へ展開するための基礎的知見を得ることを目的とした。すなわち、本研究は、研究期間内に、1)ヒト iPS 細胞から誘導した絨毛様細胞の分化段階やホルモン産生能などの細胞生物学的性質を明らかにし、2)試験管内で立体的な胎盤の原基(器官芽)を誘導し、さらに、3)作成した胎盤の原基を超免疫不全マウスへ移植しその生着および胎盤機能の検証を行い、4)胎盤機能不全モデルマウスを用いて人工胎盤移植により胎盤機能が再生することを明らかにすることを目的とした。



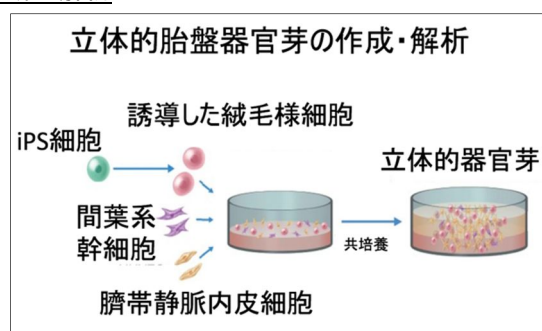
3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞から絨毛様細胞への誘導およびその生物学的性質についての検討

人工胎盤を創生するにあたり、第一段階として既報に倣い BMP4 添加法を用いてヒト iPS 細胞より絨毛様細胞を誘導作成した。誘導した絨毛様細胞がどの分化段階に相当し、どのように成熟するのか、その経時変化を検討するために、採取した培養上清中の progesterone、hCG 濃度を ELISA 法で、また回収した絨毛様細胞における CK 7、Oct4、CDX2、ERVW1、HLAG 等の発現を定量 PCR 法やフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) 試験管内での立体的胎盤原基(ミニ胎盤)の作成・解析

満期の選択的帝王切開術患者より採取した羊膜由来間葉系幹細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞を用い、1)で iPS 細胞から誘導した絨毛様細胞を加え共培養を行い、立体的器官芽を誘導した。器官芽を維持培養し、器官芽形成 1 日後、2 日後、3 日後の CK7、HLAG、HCG、CD31、CD90 発現の局在を免疫組織染色で検討した。



(3) 超免疫不全マウス生体内でのヒト胎盤創成

非妊娠 NOD/SCID マウスへのヒト胎盤器官芽移植を行い、移植胎盤器官芽の移植・生着を確認した。マウスの子宮腔内に作成したミニ胎盤を移植し、移植後 7 日目に血液の採取と子宮の回収を行なった。血中 hCG 濃度を測定し、生着の目安とした。また生着した移植ミニ胎盤における CK7、hCG、HLAG などの発現を免疫組織染色で検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞から絨毛様細胞への誘導およびその生物学的性質についての検討

BMP4 処理後の iPS 細胞の絨毛様細胞への分化を確認するために、多能性および trophoblast 系統の代表的な分化マーカーの発現を継時的に調べた。多能性マーカーである Oct4 の発現は、BMP 処理の 4 日目以降顕著に減少した。Trophectoderm のマーカーである CDX2 の発現は BMP 投与後 2 日目に急激に上昇し、4 日以降著減した。Pan-trophoblast マーカーである CK7 発現は、BMP 処

理後 4 日目以降に著しく増加し、EVT (extravillous trophoblasts) の特異的マーカーである HLA-G の発現も BMP 処理後 4 日目以降に著増した。Syncytiotrophoblast のマーカーである CGB、ERVW1 は BMP4 投与 6 日目以降に著増していた。CK7, HLAG 発現変化は免疫蛍光染色で、培養上清の hCG 濃度の推移は ELISA 法でも確認した。

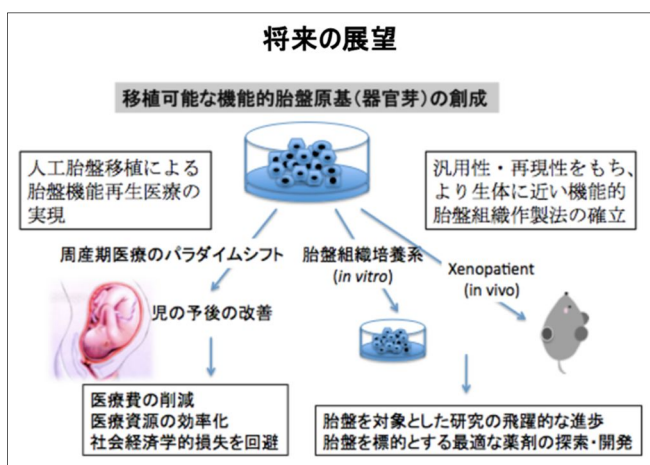
(2) 試験管内での立体的胎盤原基(ミニ胎盤)の作成・解析

BMP4 で誘導した iPS 細胞由来絨毛様細胞を羊膜由来間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞と共培養することにより、24 時間後には立体的な組織塊が自然に形成された。この自己組織化は、BMP4 で 2 日間、4 日間、6 日間処理した iPS 細胞由来絨毛様細胞を用いた場合は観察されたが、BMP4 で 8 日間処理した iPS 細胞由来絨毛様細胞を用いた場合には観察されなかった。BMP4 で 4 日間処理した iPS 細胞由来絨毛様細胞を用いた場合に 3 次元組織が最大となったため、以下の実験には BMP4 で 4 日間処理した iPS 細胞由来絨毛様細胞、羊膜由来間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞とを共培養使用して作成した 3 次元組織を用いた。

3 日間培養した三次元組織は、主に CK7 陽性細胞で構成され、羊膜由来間葉系幹細胞のマーカーである CD90 を発現する細胞に囲まれていた。CD31 陽性の血管内皮細胞は、三次元組織内に散在していた。マトリゲルに浸潤した細胞は CK7 と HLA-G の両方に陽性であったが、hCG 陽性細胞は主にクラスターを形成していた。三次元組織培養上清中の hCG 濃度は 24 時間から 72 時間にかけて徐々に上昇した。したがって、本研究で作成した三次元組織は、胎盤形成における絨毛細胞の分化を反映する *in vitro* 3D モデル (ミニ胎盤) として利用できる可能性がある。例えば病的胎盤由来の iPS 細胞から誘導した絨毛様細胞を用いた人工胎盤は、病因の解明や新規薬剤の開発にも応用できるなど、将来、胎盤を対象とした研究が飛躍的に進むことが期待される。

(3) 超免疫不全マウス生体内でのヒト胎盤創成

3 日間培養した三次元組織を 9 つ NOD/SCID マウスの子宮内に移植したところ 2 つが生着した。着床部位の周囲には血管が、生着した組織内の血管内にはマウスの赤血球が観察された。移植組織の辺縁には HLAG 陽性の細胞を認めた。なお、効率を高めるため iPS 細胞由来絨毛様細胞、羊膜由来間葉系幹細胞、臍帯静脈内皮細胞のカクテル(器官芽形成に用いる比率と同じ)をマトリゲル内へ懸濁しマイクロ胎盤を作成し、NOD/SCID マウスの子宮内腔へ注入したが、生着を認めなかった。本研究を発展させることにより、将来、胎盤機能不全に対する再生医療の実現へとつながることが期待される。また、本研究で確立した胎盤様三次元組織は、病的胎盤に起因する産科疾患の *in vitro*, *in vivo* モデルとして当該研究分野において革新的な研究手法として利用できる可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mai Sato
2. 発表標題 Three-dimensional synthesized human placenta from an iPSC-derived organ bud transplant
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mai Sato
2. 発表標題 Three-dimensional synthesized human placenta from an iPSC-derived organ bud transplant
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	曾根 正勝 (Sone Masakatsu) (40437207)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	
研究分担者	山原 研一 (Yamahara Kenichi) (50450888)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	千草 義継 (Chigusa Yoshitsugu) (80779158)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	