

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601  
研究種目：研究活動スタート支援  
研究期間：2021～2022  
課題番号：21K20651  
研究課題名（和文）ヒトナープ型ES/iPS細胞を用いた、三次元ヒト初期胚発生モデルの構築

研究課題名（英文）Establishment of a 3D early human embryonic development model using human naive ES/iPS cells

研究代表者  
柳田 絢加（Yanagida, Ayaka）  
東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：60906668  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ナープ型ヒトES細胞からヒト胚盤胞様構造（ブラストイド）を高効率で作成する方法の確立および、ブラストイドに含まれる原始内胚葉（卵黄嚢の源）の細胞数を増加させるよう分化誘導系の改良を行った。原始内胚葉の分化・増殖を促すサイトカインや阻害剤の発見、それらの至適濃度の決定および分化誘導中における添加タイミングの確立ができた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ブラストイドをより本来のヒト胚盤胞へ近づけることができた。またこれまで明らかでなかったヒトの原始内胚葉の分化、増殖を制御する分子機構解明に向けた礎が築けた。原始内胚葉の低形成が着床後の胚発生不全を起こすことが近年しされている。本研究はヒト胚発生研究において有用なプラットフォームの形成のみならず、ヒトの早期胚発生停止（流産）の原因解明、治療法開発へつなぐと期待される。

研究成果の概要（英文）：We improved a method for generating human blastocyst-like structures (blastoids) from naive human ES cells. After screening several cytokines and inhibitors, we found two promising candidates which increased the efficiency of blastoid formation and/or the number of hypoblast cells per blastoid.

研究分野：発生生物学

キーワード：ナープ型多能性幹細胞 ヒト胚発生 初期胚

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの妊娠・出産率向上へ向けて、ヒト胚発生機構の解明が重要である。ヒトの胚発生を研究するためには、胚の発生過程を継続的に観察・検証可能な実験系が必要である。しかし、マウス等の実験動物に比べ、実験に使用可能なヒト胚の入手、胚への遺伝子操作の難しさから、現在は限られた数のヒト胚の観察、他の動物胚を用いた実験に基づいた知見しか得られていない。近年、哺乳類間であっても種間で胚発生・分化制御機構に多くの違いがあることが明らかになってきており (Guo *et al.*, 2021; Roode *et al.*, 2012; Rossant 2018)、新たなヒト胚の提供によらず、ヒト胚発生研究に利用可能なヒト胚発生モデルの開発が必要である。

近年、1種類あるいは複数種類のマウス幹細胞を三次元培養することで、胚盤胞様構造(ブラストイド)が形成されることが報告された(Rivron *et al.*, 2018; Sozen *et al.*, 2019)。また、同様の方法でヒト幹細胞からヒトブラストイドの作製が試みられた(Liu *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2021)。しかし、長期の複雑な分化誘導が必要で、誘導効率が低く、ブラストイドを構成する多くの細胞が、実際の胚盤胞を構成する細胞と異なる遺伝子発現を示しており、実際の胚盤胞をどのくらい模倣しているか不明瞭という問題があり、胚発生研究に有用とは言えない(Rossant and Tam, 2021)。そこで、ヒト胚盤胞をより模倣したブラストイドの高効率誘導法の確立が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトナープ型 ES/iPS 細胞を用いた、三次元ヒト初期胚発生モデルの構築を目指し、ブラストイドの誘導方法の改良目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒトナープ型 ES 細胞を低吸着 96well プレート上に1ウェルあたり 100-150 細胞になるように播種し、MEK 阻害剤、TGBb シグナル阻害剤、Rock 阻害剤添加下で2日間培養後、TGFb シグナル阻害剤添加下で1-2日培養することで、他の細胞と混ぜることなく、ブラストイドが作製可能であることを見出した。また、このブラストイドは、形態のみならず、遺伝子発現の面でも実施のヒト胚盤胞と類似していることを明らかになった(yanagida *et al.*, 2021)。しかし、この誘導法で形成されるブラストイドは、実際の胚に比べて原始内胚葉の数が少ないという課題がある。原始内胚葉は胚が子宮へ着床後、卵黄嚢になる組織で、胎仔への栄養供給を担う必要な組織であるが、ヒト原始内胚葉の分化・増殖機構は明らかでない。そこで、上記の分化誘導法をベースとして、ブラストイドの誘導効率、原始内胚葉の数を向上させるサイトカインや阻害剤の探索、添加時期、添加濃度の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 候補のサイトカインや阻害剤の選定:

マウスや他の動物種で原始内胚葉の分化・増殖への関与が報告されているシグナルを調べ、そのシグナルを促進あるいは抑制するサイトカイン・阻害剤を候補として選定した。

#### (2) ブラストイドにおける原始内胚葉の分化・増殖時期の検証:

様々なステージのヒト着床前胚を用いた scRNA-seq 解析と蛍光免疫染色により、原始内胚葉の分化マーカーが近年漸く明らかになった。そこで、ブラストイド形成過程の各ステップ (Day1-Day4) のサンプルに対してこれらの原始内胚葉分化マーカーに対する蛍光免疫染色を行った。その結果、ヒト多能性幹細胞からブラストイド形成の過程でいつ原始内胚葉が出現し、どのように分化していくかを明らかにすることができた。また、その分化過程 (各分化マーカーが発現していく順番) はヒト胚盤胞の分化過程と同様であることが分かった。

#### (3) ブラストイドの作成率の向上

(1) で選定したサイトカイン・阻害剤をヒト多能性幹細胞からブラストイド形成の様々なタイミング (Day0-Day2, Day2-Day3, Day2-Day4) で添加し、ヒト多能性幹細胞を播種した1ウェル中のブラストイド形成数、および全ウェル中のブラストイド形成数を Day3 と Day4 において比較した。その結果、ブラストイドの作成率を向上させるサイトカイン/阻害剤を見出した。

(4) プラストイドに含まれる原始内胚数の増加

(3)の Day3, Day4 サンプルに対して、原始内胚葉マーカーとエピプラストマーカーで免疫蛍光染色、ホールマウント染色、共焦点顕微鏡によるイメージングを行い、原始内胚葉およびエピプラストの細胞数、割合を定量化した。その結果、原始内胚葉数の増加に作用するサイトカイン・阻害剤を2つ見出した。その後、その2つのサイトカイン・阻害剤を様々な濃度とタイミングでプラストイド形成過程に添加し、再び原始内胚葉およびエピプラストの細胞数、割合を定量化したところ、原始内胚葉の増加を促す至適濃度を明らかにした。また、正常な胚を模倣したプラストイドを作成するためには、単に原始内胚葉の数を増やせば良いわけではない。本来の胚盤胞を構成する3つの細胞系列(エピプラスト、原始内胚葉、栄養外胚葉)が共存することが必要である。そこで、有望なサイトカイン・阻害剤の、原始内胚葉以外の細胞系列に対する影響を各細胞系列に対するマーカー遺伝子に対する免疫染色および、細胞数の定量により評価し、添加濃度の最適化、有望な候補因子の更なる絞り込みを行った。その結果、2つ有望因子のうち1つは栄養外胚葉の分化を抑制する傾向があり、胚盤胞の形態維持にはネガティブに働くことが分かった。これらの因子がどのような機構で原始内胚葉の分化、増殖を制御するか今後さらに研究を行いたい。

本研究により、当初の目標であるプラストイドの誘導系改良のみならず、これまで明らかでなかったヒトの原始内胚葉の分化、増殖を制御する分子機構解明につながる結果を得ることができた。本研究がさらに発展すれば、実際の胚発生過程を再現可能なモデルの構築につながる可能性を秘めている。また、本研究が達成されれば、ヒト胚発生機序の解明へ向けた強力な研究ツールになる。発生過程における特定の遺伝子や細胞の機能・分化過程の検証が可能になることで、不妊原因の解明、妊娠・出産率向上への礎となると確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Naive stem cell-derived blastocyst model captures human embryo lineage segregation
3. 学会等名 the 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Cell surface fluctuations regulate early embryonic lineage sorting
3. 学会等名 The75th annual meeting of the Japanses Society for Cell Biology (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Naive stem cell-derived blastocyst model captures human embryo lineage segregation
3. 学会等名 The international Symposium "Totipotency and Germ Cell Development (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 子宮内で起こる胚発生を試験管内で創る・視る・理解する
3. 学会等名 第40回内分泌代謝学サマーセミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Capturing early human embryonic development using pluripotent stem cells
3. 学会等名 the 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Capturing early human embryo development in vitro
3. 学会等名 ホルモン療法を考える神奈川県医師の会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Capturing early human embryo development in vitro
3. 学会等名 SY-Stem (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayaka Yanagida
2. 発表標題 Cell surface fluctuations regulate early embryonic lineage sorting
3. 学会等名 Japanese Society for quantitative biology, 10th annual meeting (招待講演)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	University of Cambridge	Exeter University	