様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　６ 月 ２７ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ２０９８７

研究課題名（和文）iPS細胞由来栄養外胚葉の幹細胞化

研究課題名（英文）Stem Cell Conversion of iPS Cell-Derived Trophectoderm

研究代表者
伊尾　紳吾（Io, Shingo）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：５０７５９７６９

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）：胎盤は母児の健康に欠かすことができない臓器である。胎盤の起源は受精卵に含まれる栄養外胚葉である。ヒト栄養外胚葉を維持培養した報告はない。本研究では、試験管内で栄養外胚葉幹細胞を樹立することを目的とした。ES細胞、iPS細胞から栄養膜細胞への分化誘導技術を確立した。また、多施設の研究者でも扱いやすい細胞モデルとなるように細胞培養方法を改良した。栄養外胚葉幹細胞を樹立するため、栄養外胚葉の性質を維持し続けている指標として、CDX2の遺伝子発現をモニタリングする戦略をとった。モニタリング戦略により、栄養外胚葉幹細胞として維持するための化合物の組み合わせが明らかになりつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞や組織幹細胞の登場により、胎児の様々な細胞へ分化誘導が可能となり、細胞の発生過程や多能性維持機構の解明が進んでいる。このような背景と、胎盤学の専門性を活かし、栄養膜細胞の発生の出発点である栄養外胚葉の細胞培養と維持方法の開発に取り組んだ。ヒト栄養外胚葉幹細胞は、ヒト胎盤の初期発生の研究、疾患のモデル化、生殖医療研究の有用なツールとなり得る。

研究成果の概要（英文）：The placenta is an indispensable organ for maternal and fetal health, responsible for hormone secretion, which is important for the maintenance of pregnancy, and for the exchange of nutrients and gases between the fetus and the mother. There are no reports of maintenance culture of human trophectoderm. The aim of this study was to establish trophectoderm stem cells in vitro.
We established a technique for differentiation of ES and iPS cells into trophoblast cells. In addition, we improved the cell culture method to make the cell model easy to handle for researchers at multiple institutions.
In order to establish trophectoderm stem cells, we adopted the strategy of monitoring CDX2 gene expression as an indicator of continued maintenance of trophectoderm characteristics. The monitoring strategy is revealing a combination of compounds to maintain the cells as trophectoderm stem cells.

研究分野：幹細胞学

キーワード：幹細胞　iPS細胞　胎盤　栄養膜細胞　細胞培養　産婦人科　発生生物学　人体発生学

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

胎盤は妊娠の維持に重要なホルモン分泌、胎児と母体との間の栄養・ガス交換を担う、母児の健康に欠かすことができない臓器である。この胎盤の起源は、着床前胚の胚盤胞である。ヒト胚盤胞は栄養外胚葉(将来胎盤を作る細胞)と内部細胞塊(胎児を作る細胞)から構成される。 ES 細胞、iPS 細胞や組織幹細胞の登場により、胎児の様々な細胞へ分化誘導が可能となり、細胞の発生過程や多能性維持機構の解明が進み、ヒト発生生物学や再生医学は著しい発展を遂げた。このような背景と、産科学、とくに胎盤学のスペシャリティーを活かし、栄養膜細胞(トロホブラスト)の発生の出発点である栄養外胚葉に注目し、多能性幹細胞を用いた研究を進めている。

２．研究の目的

ES 細胞や iPS 細胞からトロホブラストへの分化誘導技術を応用することで、受精卵の着床メカニズム、トロホブラストの発生過程や、胎盤関連妊娠合併症の病態解明に迫ることができる。しかし、様々な多能性幹細胞の分化培養系から考えても、ES 細胞や iPS 細胞から目的とする細胞に分化誘導することは手間暇のかかる作業である。

iPS 細胞由来栄養外胚葉を利用した研究の効率的推進のためには、栄養外胚葉の性質を長期間維持可能な細胞が必要となる。

様々な研究室・研究者が栄養外胚葉細胞を用いて実験し、研究分野が拡大していくためには、容易に培養可能な栄養外胚葉幹細胞の樹立が重要である。本研究では、着床前トロホブラストの性質を持ち、長期維持培養が可能な、誰でも扱いやすい栄養外胚葉幹細胞を樹立することを目的とする。

３．研究の方法

まず、トロホブラスト系譜に関する遺伝子発現データの再解析を行う。

具体的には、ナイーブ型 iPS 細胞由来トロホブラストや、既報のヒト胚・妊娠初期胎盤の RNA シーケンスデータを用いて、pathway 解析を行う。抽出した pathway の作動薬・拮抗薬を候補化合物とする。マウスやカニクイザル（*Macaca fascicularis*）のデータも用いて、種差に注目した遺伝子解析も検討する。

次に、CDX2-GFP レポーターiPS 細胞株を樹立する。具体的には、CRISPR/Cas9 システムを用いて作成した CDX2-GFP レポーター細胞株を樹立する。

作出した CDX2-GFP レポーターiPS 細胞株を用いた大規模化合物スクリーニングを実施する。大規模化合物スクリーニングを行い、GFP の発色を維持する細胞の比率が高い化合物を候補とする。

最後に、候補化合物を用いた長期維持培養と分化能の評価を行う。候補化合物を組み合わせ、栄養外胚葉幹細胞として 1 ヶ月以上にわたって維持培養ができる培養液を確立する。栄養外胚葉幹細胞からトロホブラストの終末分化まで達成できるかを評価する。

４．研究成果

まず、トロホブラスト系譜に関する遺伝子発現データの再解析を行った。

既報のヒト胚・妊娠初期胎盤の RNA シーケンスデータ、シングルセル RNA シーケンスデータを用いて検討を行った。ヒト胚データからは、栄養外胚葉を胚盤葉上層と胚盤葉下層と比較する形で、栄養外胚葉に特徴的な遺伝子を絞り込んだ。具体的には、SLC12A3、CDX2、HAND1、ESRRB、AQP3 等が栄養外胚葉に特徴的な遺伝子であった。

また、トロホブラストには段階があり、栄養外胚葉、細胞性栄養膜細胞、合胞体栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞のそれぞれに特徴な遺伝子と、共通する遺伝子をグループ化した。栄養外胚葉幹細胞の樹立のためには、ヒト胚レベルでも、ヒトトロホブラスト系譜の中でも、栄養外胚葉に特異的な遺伝子を選定する必要がある。そして、我々は複数候補の中から、転写因子である CDX2 をマーカー遺伝子として選定した。CDX2 は、マウス、カニクイザル、ヒトの栄養外胚葉で共通して発現する特徴的な転写因子だった。

CRISPR/Cas9 システムを用いて、CDX2-GFP レポーター細胞株を樹立した（図 1）。我々の成果として、ナイーブ型多能性幹細胞から栄養外胚葉までの分化が可能となったため、その分化誘導系を用いて、細胞を分化させ、CDX2 発現と GFP 発色が相関することを確認した。

ナイーブ型多能性幹細胞由来栄養外胚葉への分化誘導には、MEK シグナルの阻害（PD0325901）、Nodal シグナルの阻害（A83-01）、JAK/STAT シグナルの阻害と Bone Morphogenic Protein type

4 (BMP4)を用いることで、迅速かつ効率的に誘導されることがわかった。PD0325901については、FGF receptor tyrosine kinase inhibitor PD173074で代替可能であることもわかった。
分化誘導の起点となる細胞タイプが重要であるかを検討した。ナイーブ型多能性幹細胞ではなく、プライム型多能性幹細胞を起点とした場合、栄養外胚葉とは性質が異なる遺伝子発現パターンを示した。
栄養外胚葉の分化や維持に関わると考えられる pathway に関して、ヒト胚・妊娠初期胎盤のRNA シーケンスデータを用いて検討した。抽出した pathway の作動薬・拮抗薬を候補化合物とした。複数の候補化合物を組み合わせて、維持培養を試み、qRT-PCR やフローサイトメトリーで化合物の絞り込みに挑んだ。また、大規模化合物スクリーニングを行い、GFP の発色を維持する細胞の比率が高い化合物を候補とした。pathway 解析から抽出した候補化合物と、大規模化合物スクリーニング結果から、一つの候補化合物として、リゾホスファチジン酸(Lysophosphatidic acid; LPA)を発見した。既報では、脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸がマウス子宮上皮の脱落膜化に重要な役割を果たしていること、マウスの妊娠初期に重要な因子と考えられている。一方で、リゾホスファチジン酸がヒトの妊娠初期に必須であるかについては、現段階では報告がない。
ナイーブ型多能性幹細胞由来栄養外胚葉誘導 2 日目の CDX2 陽性細胞に、リゾホスファチジン酸で再培養すると、約 40% の細胞が 7 日後も GFP を発現し続けた（図 2）。
複数の候補化合物を組み合わせ、栄養外胚葉細胞として維持できる培養液成分を検討中である。幹細胞として、1 ヶ月以上にわたって維持培養ができること、また、維持培養した細胞がトロホブラストの終末分化まで達成できるかを今後評価していく。
栄養外胚葉幹細胞を維持培養するための候補化合物の一つを同定したことは、今後の栄養外胚葉幹細胞の樹立に近づく成果だと考えられる。

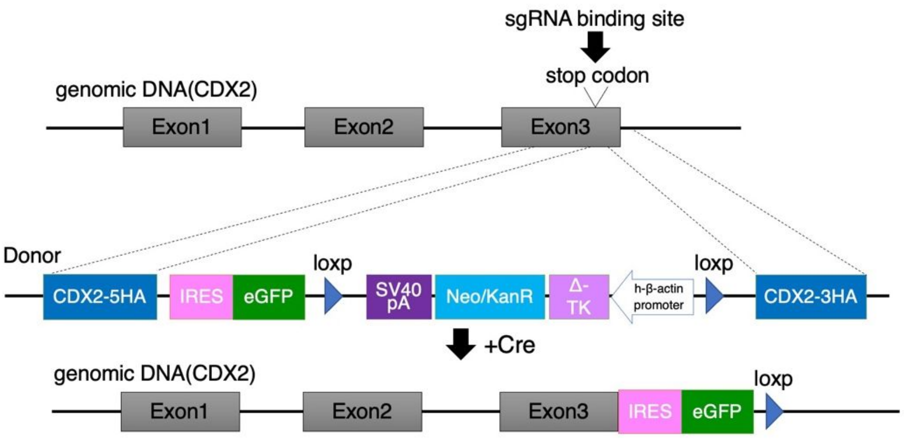

図 1　CDX2-GFP ノックインのための CRISPR ターゲットのデザイン。
Cre 発現により Neo カセットを除去。

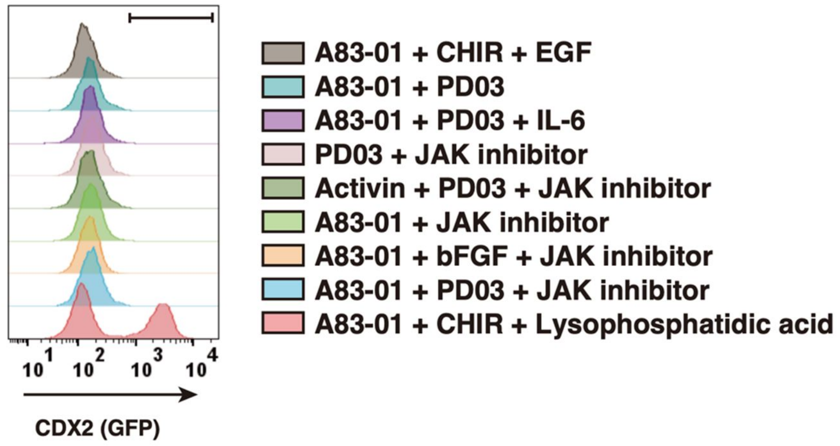

図 2 CDX2-GFP 陽性 TE 様細胞のフローサイトメトリー解析。
CDX2 陽性細胞を 2 日目に選別し、7 日目まで再培養した。CDX2-GFP は A83-01+CHIR+リゾホスファチジン酸下で検出された。A83-01（1μM）； CHIR99021（2μM）； EGF（50ng/ml）； PD0325901（1μM）；JAK inhibitor、JAK 阻害剤（1μg/ml）；Lysophosphatidic acid、リゾホスファチジン酸（5μM）。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Io Shingo、Iemura Yoshiki、Takashima Yasuhiro	４．巻 2
２．論文標題 Optimized protocol for naive human pluripotent stem cell-derived trophoblast induction	５．発行年 2021年
３．雑誌名 STAR Protocols	６．最初と最後の頁 100921～100921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Io Shingo、Kabata Mio、Iemura Yoshiki、Semi Katsunori、Morone Nobuhiro、Minagawa Atsutaka、Wang Bo、Okamoto Ikuhiro、Nakamura Tomonori、Kojima Yoji、Iwatani Chizuru、Tsuchiya Hideaki、Kaswandy Belinda、Kondoh Eiji、Kaneko Shin、Woltjen Knut、Saitou Mitinori、Yamamoto Takuya、Mandai Masaki、Takashima Yasuhiro	４．巻 28
２．論文標題 Capturing human trophoblast development with naive pluripotent stem cells in?vitro	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Cell Stem Cell	６．最初と最後の頁 1023～1039.e13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2021.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 伊尾　紳吾、近藤　英治、高島　康弘、万代　昌紀
２．発表標題 新型ヒトiPS細胞を用いた絨毛細胞への分化誘導
３．学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
４．発表年 2021年

１．発表者名 伊尾　紳吾、万代　昌紀
２．発表標題 新世代ヒトiPS細胞を用いて着床期トロホブラストを模倣する
３．学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会
４．発表年 2021年

１．発表者名
伊尾　紳吾、近藤　英治、山田　重人、万代　昌紀

２．発表標題
次世代ヒトiPS細胞を用いたトロホブラストの創出

３．学会等名
第57回日本周産期・新生児医学会学術集会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Shingo Io, Eiji Kondoh, Yasuhiro Takashima, Masaki Mandai

２．発表標題
Modeling of Trophectoderm to Cytotrophoblast Transition with Human Naive iPS Cells

３．学会等名
The 68th Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation（国際学会）

４．発表年
2021年

１．発表者名
Shingo Io, Eiji Kondoh, Yasuhiro Takashima, Masaki Mandai

２．発表標題
Human trophoblast development is captured by naive induced pluripotent stem cells in vitro

３．学会等名
The 22nd World Congress of International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy（国際学会）

４．発表年
2021年

１．発表者名
Shingo Io, Eiji Kondoh, Yasuhiro Takashima, Masaki Mandai

２．発表標題
Modeling trophectoderm to cytotrophoblast transition with naive human pluripotent stem cells

３．学会等名
The International Federation of Placenta Associations 2021（国際学会）

４．発表年
2021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