

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19247

研究課題名（和文）霊長類子宮内膜オルガノイドを用いた人工着床系の開発と着床機構の解明

研究課題名（英文）Reconstitution of implantation process with primate endometrial organoid

研究代表者

依馬 正次（Ema, Masatsugu）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、胚受容能を有する新規の試験官内着床系を構築することを目的とした。ヒト子宮内膜を模倣するヒト子宮内膜オルガノイド（Turco et al., 2017）を先ず再現することを試みたところ、オルガノイドを作製することに成功し、エストラジオール、プロゲステロンなどのホルモン添加によって内膜が肥厚することを確認した。次に、サル子宮サンプルからも子宮内膜オルガノイドを作成し、ホルモンに反応することを確認した。また、RNA-seq解析によって、胚受容能関連遺伝子の発現変化を確認した。さらに、プラストイドとの反応により、プラストイドが子宮内膜オルガノイドに接着することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

着床とは、胚盤胞が子宮壁に接着して浸潤していく過程であり、正常な妊娠の成立に必須である。ヒト着床機構の解明は、不妊・不育や流産の原因解明などの観点から社会的意義が高いものの、ヒトでは侵襲的な研究が許容されないために、生検サンプルや培養レベルの研究が大部分であった。今回得られた知見は、不妊の原因や治療法の新規標的の発見に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish an in vitro system to recapitulate implantation. Firstly, we tried to recapitulate human endometrial organoid (EMO) that is originally reported by Turco and coworkers, and succeeded to establish the EMO that responds to hormone. Next, we established monkey EMO that responds to hormone. The RNA-seq analysis showed alterations of gene expression which are markers for receptivity. Furthermore, we observed that blastoids prepared from naive pluripotent stem cells attached to the EMO.

研究分野：発生学

キーワード：着床 不妊 胚盤胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

着床とは、胚盤胞が子宮壁に接着して浸潤していく過程であり、正常な妊娠の成立に必須である。ヒト着床機構の解明は、不妊・不育や流産の原因解明などの観点から社会的意義が高いものの、ヒトでは侵襲的な研究が許容されないために、生検サンプルや培養レベルの研究が大部分であった。このため、個体・遺伝子レベルの着床研究は主にマウスをモデル動物として推進され、多くの知見が集積してきた。しかし、ヒトとマウスでは、胚盤胞が子宮壁に着床する方向が異なっていること、子宮内膜に接着後形成される胎盤の解剖学的構造や構成する細胞群が大きく異なっており、結果をヒトへ外挿する上での障壁となっていた (Wang and Dey, *Nat. Rev. Genet.*, 2006; Hemberger et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2020)。さらに、子宮というブラックボックスの中で起こる着床過程をリアルタイムで明らかにすることは、殆どのモデル動物で困難である。一方、近年ヒト子宮内膜を模倣する子宮内膜オルガノイドが作製され、これまで着床研究に長く用いられてきたがん由来子宮内膜細胞よりも、生体に極めて近い性質を有することが報告された。(Turco et al., *Nat. Cell. Biol.* 2017)。しかし、ヒト子宮内膜オルガノイドが着床能 (= 胚受容能) を有するかどうかはヒト胚を用いて評価しなくてはならず、倫理上困難である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトに最も近い実験動物であるカニクイザルから樹立された子宮内膜オルガノイドとカニクイザル胚を用いて、胚受容能を有する新規の試験官内着床系を構築することを目的とする。さらに、そのオルガノイド系を用いて着床初期の接着・浸潤過程に寄与する遺伝子を絞り込み、霊長類で着床に寄与する遺伝子を世界で初めて個体レベルで実証することも目的とする。

3. 研究の方法

子宮内膜オルガノイドの樹立

カニクイザル子宮内膜オルガノイドを用いた人工着床系を構築するために、ヒト子宮内膜を模倣するヒト子宮内膜オルガノイド (Turco et al., 2017) を先ず再現することを試みてからカニクイザルを用いた実験に移行する。具体的には、ヒト子宮から内膜を単離し、単一細胞化処理を行う。その後エストラジオール、プロゲステロンなどのホルモン添加によって内膜が肥厚することを確認する。子宮内膜オルガノイドが胚受容能を有するかどうか評価する。

カニクイザル胚盤胞

我々によって樹立された GFP トランスジェニックカニクイザル (Scita et al., *Sci. Rep.*, 2016) から用意した精子と野生型雌の卵子を顕微授精により受精卵を作製、体外培養により GFP 陽性胚盤胞を得る。

子宮内膜オルガノイドと胚盤胞の相互作用評価

胚盤胞と子宮内膜オルガノイドを反応させ、浸潤が見られるかどうか評価する。内膜細胞の基底膜下に浸潤しているか明らかにするため、イメージングを取得後、基底膜マーカーの Laminin による免疫染色を行い、基底膜が融解し、その下層に GFP 陽性細胞が移動しているか評価する。

着床に関わる遺伝子群の解析

着床初期の接着・浸潤過程に寄与する分子機構を解明するために、ヒト着床に関わる数百の候補遺伝子群 (胚性因子・子宮因子・免疫因子など) の一部について機能的実証を行う。具体的には、候補遺伝子のうち、(1) 胚側の遺伝子、(2) 接着・浸潤に関わる膜タンパク質をコードする候補遺伝子について、樹立された試験官内着床アッセイ系を用いて評価する。HB-EGF、ErbB1/4、インテグリン、などの膜タンパク質 8 遺伝子について sgRNA を設計し、Cas9 タンパク質とともに受精卵に導入することでノックアウト胚盤胞を作成する。既に先行研究により、100%の効率でノックアウトサルを作製する技術を既に確立している (Tsukiyama et al., *Nat. Commun.*, 2019)。ノックアウト胚盤胞をサル子宮内膜オルガノイド中に注入し、ライブイメージングと免疫染色を行い、接着・浸潤能を評価する。

4. 研究成果

研究項目 1：カニクイザル子宮内膜オルガノイドを用いた人工着床系の構築

ヒト子宮内膜を模倣するヒト子宮内膜オルガノイド (Turco et al., 2017) を先ず再現することを試みたところ、オルガノイドを作製することに成功し、エストラジオール、プロゲステロンなどのホルモン添加によって内膜が肥厚することを確認した。さらに間質細胞を混ぜることで、より組織構造的に近い三次元構造を再現することが判明した。次に、サル子宮サンプルからも子宮内膜オルガノイドを作成し、エストラジオール、プロゲステロンなどのホルモンに反応して肥厚することを確認した。また、RNA-seq 解析によって、胚受容能関連遺伝子の発現変化を確認した。さらに、ブラストイドとの反応により、ブラストイドが子宮内膜オルガノイドに接着することを確認した。

研究項目 2：着床初期の接着・浸潤過程に寄与する分子機構を解明する

ヒト着床に関わる数百の候補遺伝子群の一部について機能的実証をするために、項目 1 で樹立された試験管内人工着床アッセイ系を用いて評価することを目指したが、アッセイ系の確立に時間がかかったため、ノックアウト候補の絞り込みの途中までしか進まなかった。今後、アッセイを継続して実施する予定である。

今後の展開

これまでヒト着床過程に関与することが示唆されている候補遺伝子群は、胚性・子宮・免疫因子を含めると数百以上類推されてきたものの、ヒトを含めた霊長類での実験的検証は困難であった。今回、ヒトおよび非ヒト霊長類の 1 種であるカニクイザルの試験管内着床系を用いた機能アッセイを確立することが出来た。今後、着床に関わる候補遺伝子発現を体系的に操作することによって、胚性・子宮側の胚受容能を司る分子機構を解明することが可能であると考えている。

これらの知見は、不妊の原因や治療法の新規標的の発見に繋がることが期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Shoma, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu	4. 巻 22
2. 論文標題 Similarities and differences in placental development between humans and cynomolgus monkeys	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12522	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 Miyazaki Takehiro, Kanatsu-Shinohara Mito, Ema Masatsugu, Shinohara Takashi	4. 巻 108
2. 論文標題 Signal regulatory protein alpha is a conserved marker for mouse and rat spermatogonial stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 682 ~ 693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioad006	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本翔馬, 小原実穂, 山海直, 依馬正次
2. 発表標題 試験管内人工着床系開発に向けたカニクイザル着床期子宮内膜オルガノイドの構築
3. 学会等名 第64回 日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本翔馬, 依馬正次
2. 発表標題 カニクイザル胎盤発生機序の解明
3. 学会等名 第116回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本翔馬, 小原実穂, 山海直, 依馬正次.
2. 発表標題 試験管内人工着床系開発に向けたカニクイザル着床期子宮内膜オルガノイドの構築
3. 学会等名 第64回 日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 カニクイザル胎盤発生機序の解明
2. 発表標題 松本翔馬, 依馬正次
3. 学会等名 第116回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 松本 翔馬, 依馬 正次	4. 発行年 2022年
2. 出版社 生体の科学	5. 総ページ数 2
3. 書名 マカクにおける遺伝子改変技術と疾患モデルの作製	

1. 著者名 岡村 永一, 依馬 正次	4. 発行年 2022年
2. 出版社 遺伝子医学	5. 総ページ数 6
3. 書名 カニクイザルを用いた生命科学研究の最新動向	

〔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	村上 節 (Murakami Takashi) (20240666)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	辻 俊一郎 (Tsuji Shunichiro) (30601546)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (14202)	

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