

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05762

研究課題名(和文) 胚と母体の相互作用再現を目的とした試験管内子宮内環境基盤の構築

研究課題名(英文) Developing an in-utero environmental infrastructure in vitro to reproduce embryo-maternal interactions.

研究代表者

高島 康弘 (Yasuhiro, Takashima)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：70469930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はナープ型ヒト多能性幹細胞から栄養外胚葉(TE)を作製することに成功した。さらに栄養外胚葉(TE)から細胞性栄養膜細胞(CT)およびCTオルガノイドの作製に成功した。作製したCTは自己複製能が高く、遺伝子発現や形態もヒトの胎盤から誘導した栄養膜幹細胞と似ており、CT幹細胞を樹立することができたと考える。さらにCTは、ヒトの体内では合胞性栄養膜(ST)と絨毛外栄養膜(EVT)の両方へ分化できる細胞で、本研究で作製したnCT(ナープ由来CT)もSTとEVTに分化できた。また、カニクイ胚が着床した直後の子宮内膜を取得し、網羅的解析を実施し、着床期の遺伝子プロファイリングの取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎盤は妊娠を維持する上で必須の臓器である。胎盤の異常が起こると、妊娠高血圧症候群や胎児発育不全などの合併症を引き起こされる。子宮や胎盤を調べることは重要であるが、技術的な面でも、倫理的な面でも困難であった。多能性幹細胞を用いることで、サンプル数を増やすことや遺伝子編集など、さまざまな実験を行うことが出来る。本研究で構築されたモデルは、従来の倫理的規制を遵守したまま、初期胚の研究の可能性を広げ、将来、不妊症や、胎盤に関連した妊娠合併症の病態解明に繋がることが期待される。カニクイザル妊娠初期から得られた遺伝子情報はヒトでは解析不可能な時期であり、ヒト着床期を推察する重要なデータとなる。

研究成果の概要(英文)：We have successfully generated trophoblast (TE) from naive human pluripotent stem cells (PSCs). Furthermore, we succeeded in generating cytotrophoblasts (CTs) and CT organoids from the TE. Naive PSC-derived CTs (nCT) have high self-renewal capacity, gene expression and morphology similar to trophoblast stem cells derived from human placenta, suggesting that CT stem cells could be established. CTs can differentiate into both syncytiotrophoblast (ST) and extravillous trophoblast (EVT). nCTs generated in this study could also differentiate into ST and EVT. In addition, the endometrium of cynomolgus monkey embryos was obtained after the implantation, and single-cell RNA-sequencing was performed to obtain gene expression profiling of the implantation period.

研究分野：初期発生

キーワード：栄養膜幹細胞 多能性幹細胞 子宮内膜 ヒト カニクイザル 霊長類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日まで着床期以降に関する研究はマウスが主であった。しかしヒトとマウスは、胎盤の構造、子宮の構造、ホルモン応答性等、差異があり、マウスの知見をヒトに応用することは必ずしも適切ではない。着床前から着床期にかけての初期発生様式に関してもげっ歯類であるマウスと霊長類は遺伝子発現に異なる点があり、ヒトあるいは非ヒト霊長類での初期発生研究が重要である。妊娠合併症の約 15%は胎盤あるいは子宮内・胚体外組織に原因があるとされる。また 10 組に 1 組は不妊治療を行っていることも知られている。質の高い受精卵を子宮内に戻した場合ですら流産する場合は多く、胚のみならず胎盤や子宮も含めた包括的な理解が重要である。しかしながら、ヒト生体内における着床は妊娠しているかも不明な時期であり、生体で研究することは困難である。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞を用いて、胎盤細胞の誘導し、胎盤分化モデルを作製する。またアクセスが可能な霊長類組織サンプルやヒト組織サンプルを採取し、網羅的遺伝子発現を解析することや試験管内培養モデルを確立する。

2. 研究の目的

本研究の将来の目標は、ブラックボックスである霊長類の着床機構、脱落膜化機構、着床期以降の胚発生を試験管内で再構築し、分子メカニズム明らかにし、霊長類着床後発生学の基盤を構築することである。この大きな目標のために、着床を構成する各細胞を試験管内で培養し、再構築を行う。霊長類における胚発生をサポートする胎盤細胞の誘導・解析と機能的な子宮内膜モデルを構築し、胚と母体の相互作用再現を目的とした試験管内子宮内環境基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

胎盤の絨毛を構成するトロホブラスト細胞は、胚（胎児）由来である。霊長類胚はマウス胚に比べ準備のためのハードルは高い。倫理面に対する問題の困難さもある。我々が 2014 年に樹立した naïve 型ヒト iPS 細胞は、着床前胚盤胞のエピプラストに一致し、今までできなかった着床前より早期の初期発生研究を可能とした。そこでトロホブラスト細胞は多能性幹細胞を利用し、誘導する。

一方で子宮内膜細胞は生体からバイオプシーすることで採取し解析する。特にヒトでは不可能である着床直後の子宮内膜細胞の遺伝子発現解析は、妊娠直後のカニクイザル子宮をサンプリングし、single-cell RNA-seq を用いることによって、遺伝子発現プロファイルを明らかにする。

(1) 着床前栄養外胚葉への誘導

胎盤は胎児の外側にある栄養膜という組織から成り、妊娠を維持する上でとても重要な臓器である。これまで、マウスの栄養膜細胞の発生についての研究はなされてきたが、発現する遺伝子などで、ヒトの栄養膜の発生とは異なる点も多くある。一方、ヒトの栄養膜の研究は絨毛癌の癌細胞株を使ったものがあるが、この細胞は通常の細胞とは違う性質を持つ癌細胞であるため、正常の発生モデルに置き換えることは難しいという問題があった。我々は、naïve 型 ES/iPS 細胞から誘導した。誘導する際、報告されているヒト胚の single-cell (sc) RNA-seq に基づき、着床前胚盤胞の栄養外胚葉 (TE) を誘導した。naïve 型 ES/iPS 細胞由来栄養外胚葉 (nTE) と胚盤胞の TE を比較解析した。

(2) 栄養外胚葉を起点として、胎盤細胞への分化系譜を明らかにする。

胚は子宮に着床した後、TE は細胞性栄養膜細胞 (CT) へと分化し、その後合胞性栄養膜 (ST) と絨毛外栄養膜 (EVT) の両方へ分化し、CT、ST、EVT が絨毛及び胎盤を構成していく。近年、有馬博士、岡江博士の研究グループによって胎盤から CT 幹細胞が樹立できる報告がなされた。nTE (naïve 型 ES/iPS 細胞由来 TE) から試験管内で nCT、nST、nEVT に誘導する。子宮に着床したカニクイザル胚 (E15 前後) や、培養したヒト胚、妊娠第一期の胎盤の遺伝子発現を調べ、誘導に必要なシグナルを決定する。また nTE から nCT への系譜を解析する。

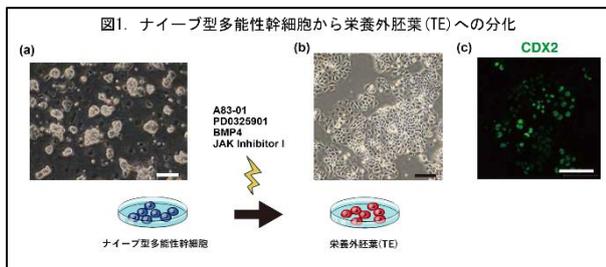
(3) カニクイザル妊娠初期子宮における遺伝子発現プロファイルの取得

子宮内環境を試験管内で整えるためには、コントロールとなる生体データが必要である。ヒトでは妊娠直後の解析は妊娠しているかも明らかではない時期であり、倫理的にも技術的にも不可能である。そこで胚着床後のカニクイザルから子宮内膜を取得し、遺伝子発現プロファイルを調べる。

4. 研究成果

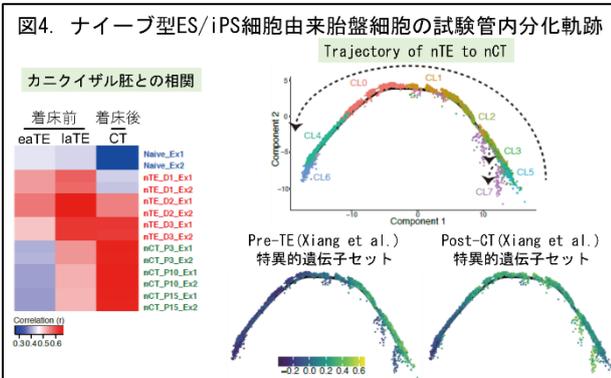
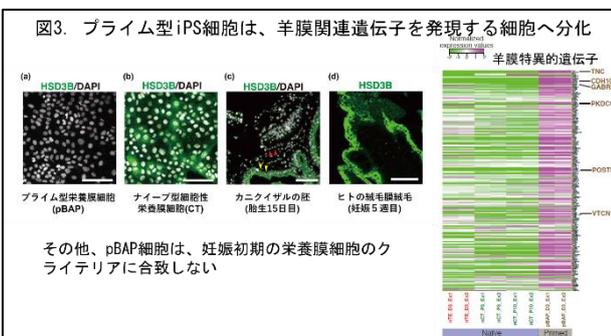
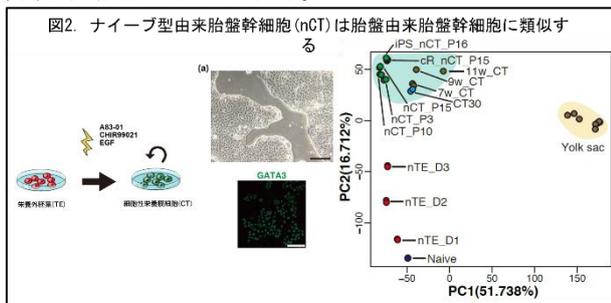
(1) 着床前栄養外胚葉への誘導

報告されているヒト胚の scRNA-seq を解析した結果、胚盤胞の TE において TACSTD2 と ENPEP の二つの表面抗原が発現することを同定した。またこの表面抗原を利用し、シグナルのスクリーニングを行った結果、BMP、A83-01、PD0325901、JAK inhibitor I という 4 因子を用いて naïve 型 ES/iPS 細胞から TE を作製することに成功した (naïve 型 ES/iPS 細胞由来 TE (nTE)) (図 1)。

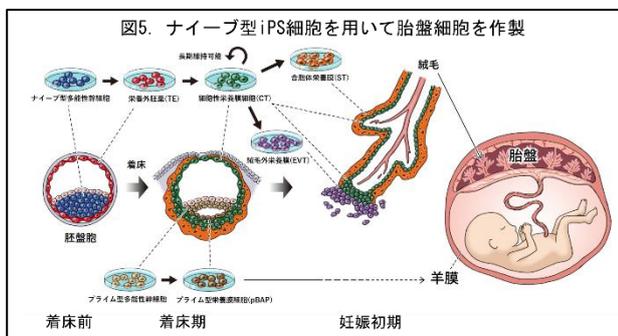


(2) 栄養外胚葉を起点として、胎盤細胞への分化系譜を明らかにする。

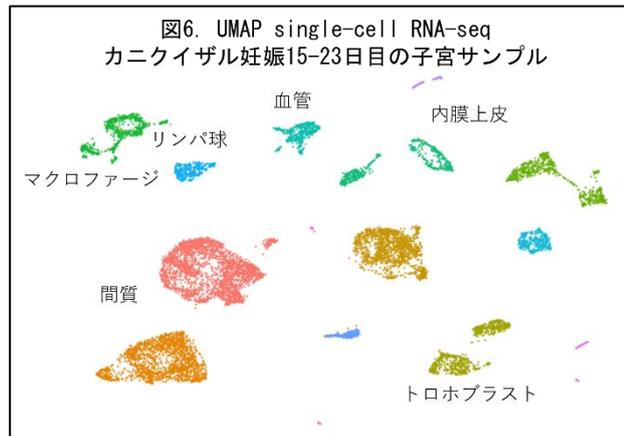
TE は子宮に着床し、CT に分化する。ヒト第 1 妊娠期検体を利用し、CT に発現する表面抗原を検索した結果、SIGLEC6 を同定した。またシグナルに関わる受容体を検索し、A83-01、CHIR99021、EGF (ACE) が重要であることを同定した。これは既報の論文データとも合致する結果であった。nTE から ACE 培地を用いて培養したところ、実際に CT に誘導できた (nCT) (図 2)。誘導した nCT は ST および EVT にも誘導できた。一方、従来型の primed 型 ES/iPS 細胞を分化させると、CT には分化せず、羊膜細胞に分化することが分かった (図 3)。最後に scRNA-seq を利用し、in vivo カニクイザル胚やヒト胚の長期培養と比較した結果、我々の誘導方法は TE から CT への発生と非常に類似していることが分かった (図 4)。さらに報告されたヒト胚を培養し得られた single-cell RNA-sequencing の結果にもよく一致していた。これらを図 5 にまとめるが、ナイーブ型ヒト多能性幹細胞から誘導したトロホプラスト細胞は、ヒト着床期を含むトロホプラスト発生を模倣していることを示唆した (Io et al. Cell Stem Cell 2021)。本分化システムは着床期を理解するために非常に有用なモデルであることが分かった。さらに詳細なプロトコルを論文として報告した (Io et al. STAR Protocols 2021)。今後、新規遺伝子の同定、機能的な解析等、胚を用いては困難な研究を実施する。



(3) カニクイザル妊娠期初期子宮における遺伝子発現プロファイルの取得。子宮内膜の解析は、ヒトで実施すると同時にカニクイザルを利用し、研究を実施した。カニクイザルの子宮から子宮を全摘することなく、ニードルバイオプシーによって子宮の一部から子宮内膜を取得し、培養するための方法・システムを確立した。カニクイザル生理周期にあわせて、増殖期と分泌期に子宮内膜サンプルの回収を行った。子宮内膜は、上皮と間質細胞からなる。内膜上皮は、オルガノイドとして培養を行った。一方で間質細胞は 2 次元で維持培養した。子宮内膜上皮オルガノイドの培養は、EGF、Rspodin-1、を含む培地を用いることで、維持可能になった。間質細胞では、ウシ血清を用いることで、維持することができ、カニクイザルにおける内膜上皮および間質細胞の培養条件を決定した。さらにホルモン刺激を行うことによって、遺伝子発現変動の解析を実施し、脱落膜期の遺伝子を発現する子宮内膜上皮と間質細胞を誘導す



ることに成功した。
一方で特にヒトでは解析が困難な胚が着床した妊娠初期の子宮からもサンプリングを実施した。カニクイ胚が着床した後の子宮内膜を取得し、内膜上皮と間質細胞の脱落膜化の網羅的解析(single-cell RNA-seq)を実施した。子宮内膜を散布稟議し、解析した結果、上皮・間質・免疫細胞・トロホブラストの遺伝子発現に一致する細胞集団を同定することができ、着床直後の子宮内の遺伝子発現解析を実施している(図6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6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 Kishimoto Keiko, Shimada Akiko, Shinohara Haruka, Takahashi Tsukasa, Yamada Yuko, Higuchi Yuichiro, Yoneda Nao, Suemizu Hiroshi, Kawai Kenji, Kurotaki Yoko, Hanazawa Kisaburo, Takashima Yasuhiro, Sasaki Erika	4. 巻 53
2. 論文標題 Establishment of novel common marmoset embryonic stem cell lines under various conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102252 ~ 102252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102252	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 Takahashi Kazutoshi, Nakamura Michiko, Okubo Chikako, Kliesmete Zane, Ohnuki Mari, Narita Megumi, Watanabe Akira, Ueda Mai, Takashima Yasuhiro, Hellmann Ines, Yamanaka Shinya	4. 巻 17
2. 論文標題 The pluripotent stem cell-specific transcript ESRG is dispensable for human pluripotency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1009587 ~ 1009587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009587	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Semi Katsunori, Takashima Yasuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Pluripotent stem cells for the study of early human embryology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 104 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12715	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 Okubo Takumi, Takashima Yasuhiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Exploring the human extraembryonic mesoderm using naive pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2022.08.005	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kunitomi Akira, Hirohata Ryoko, Arreola Vanessa, Osawa Mitsujiro, Kato Tomoaki M., Nomura Masaki, Kawaguchi Jitsutaro, Hara Hiroto, Kusano Kohji, Takashima Yasuhiro, Takahashi Kazutoshi, Fukuda Keiichi, Takasu Naoko, Yamanaka Shinya	4. 巻 2
2. 論文標題 Improved Sendai viral system for reprogramming to naive pluripotency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100317 ~ 100317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100317	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 該当する

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 22件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive human pluripotent stem cells
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive human pluripotent stem cells
3. 学会等名 SY-STEM, IMP/IMBA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ナイーブ型多能性幹細胞に関する成果と可能性
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ナイーブ型多能性幹細胞の維持培養法
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 CiRA Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Studying primate early development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第11回日本マーマセツト研究会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Analyzing human peri-implantation development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 ASHBi Symposium 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Analysing human peri-implantation development using in vitro models by naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 Placental Biology Course University of Cambridge（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ヒトのいのちから人を人為的に作る研究の進展とその倫理的問題
3. 学会等名 ゲノム問題検討会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 iPS細胞の誕生とこれから
3. 学会等名 大阪府高齢者大学校（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 Epigenetics in Early Mammalian Development（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 松藤 未夏, 大久保 巧, 高島 康弘
2. 発表標題 ヒトにおいて、N-cadherinは原始内胚葉の接着に必要である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月 俊吾, 遠山 周吾, 菱木 貴子, 岩崎 未央, 高島 康弘
2. 発表標題 Naive型ヒト多能性幹細胞の網羅的解析とFeeder free化への挑戦
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 ナীব型ヒトiPS細胞研究に関するアップデート
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 ナীব型iPS細胞とヒトES/iPS細胞運命制御の基盤を理解する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 ナীব型ヒトiPS細胞研究に関するアップデート
3. 学会等名 日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 ナীব型多能性幹細胞を利用したヒト着床期発生
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第10回日本マーマセット研究大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 ナীব型iPS細胞の可能性と課題
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國富晴子、高倉賢人、高島康弘
2. 発表標題 中間中胚葉のシングルセルRNA 解析によるミューラー管特異的遺伝子群の同定
3. 学会等名 第10回日本マーマセット研究大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modelling peri-implantation development using naive human pluripotent stem cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 Living Systems Institute Seminar, University of Exeter (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 高島康弘
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞に関する研究
3. 学会等名 第一回全能性研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modelling peri-implantation development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高里 実	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 129
3. 書名 実験医学2021年11月号	

〔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	中家 雅隆 (Nakaya Masataka) (90805459)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任助教 (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			
オーストリア	IMBA			
英国	University of Exeter	University of Cambridge		