

令和元年9月2日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19709

研究課題名(和文) ヒト胎盤栄養膜幹細胞を用いた妊娠高血圧症モデルの作成

研究課題名(英文) Development of pregnancy hypertension model using human placental trophoblast stem cells

研究代表者

有馬 隆博(Arima, Takahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80253532

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)：近年のストレス社会と高齢妊娠の増加により、妊娠高血圧症候群(HDP)などの周産期合併症の発症頻度は増加している。本研究では、疾患ヒト胎盤幹(TS)細胞を作成し、HDPなどの異常胎盤の病態を再現させ、その細胞特性と疾患特異的なエピジェネティック変異を明らかにすることを目的とした。異常胎盤組織の細胞性栄養膜細胞を分離、精製し、ヒトTS細胞の培養条件下に、疾患TS細胞の作製を試みた。まず胎状奇胎より、疾患TS細胞を樹立した。この細胞は、雄核発生を示した。また、妊娠中期以降の胎盤から作製したTS細胞の細胞特性と遺伝子特性は、妊娠初期の胎盤由来のTS細胞とは異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患TS細胞は、in vivoでは不可能であったヒト胎盤形成における分子機構やシグナル伝達機構について詳細に検討することが可能な胎盤細胞ツールとなる。そのため、妊娠高血圧症候群(HDP)などの病態解明などの基礎的研究だけでなく、治療薬剤の開発に応用が期待できる。また、周産期異常となる胎盤異常の治療法の開発に貢献するだけでなく、低出生体重、早産をもたらす他の疾患のモデル細胞作成や病態解明へと道を開くと予想される。これらの成果は、近年増加傾向にある高齢妊娠等を原因とする周産期合併症に対し効果的で、働き盛りの女性の健康増進とQOLの向上に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Recently, social stress and advanced maternal age have increased the frequency of perinatal complications including pregnancy-induced hypertension (PIH) and complete hydatidiform mole (CHM). However, the causes and effective treatments are still unclear. We have succeeded on establishing the human trophoblastic stem cells (TS cells), which show similar cell properties and gene expressions to those of corresponding primary trophoblast cells. In this study, we aim to establish disease TS cells as a PIH and CHM placenta model. We succeeded in establishing in vitro CHM model, which was higher proliferative. Next, we purified the undifferentiated trophoblast cells from the placenta tissues of second and third trimesters of pregnancy. Under the same culture conditions of human TS cells, we made disease TS cells. However, the cell properties and gene expressions were different from those of PIH placenta.

研究分野：産婦人科学、分子生物学

キーワード：ヒト胎盤栄養膜幹細胞 妊娠高血圧症候群(HDP) エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

近年のストレス社会と高齢妊娠の増加により、妊娠高血圧症候群 (HDP) は最も頻度の高い周産期合併症である。また、母児の生命予後に関わる重大な疾患である。また、胞状奇胎は、雄核発生で胎盤絨毛の異常増殖を特徴とし、年齢と共に増加し、悪性度を増す。これら疾患の発症機序は未だ明らかではないが、母体の加齢に伴う胎盤幹細胞ニッチの脆弱化が、胎盤細胞の分化障害とエピジェネティック変異を引き起こすことが明らかになりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では、疾患ヒト TS 細胞を作成し、異常胎盤の病態を再現させ、その細胞特性と疾患特異的なエピジェネティック変異を明らかにする。また、胎盤幹細胞ニッチを試験管内で再構築し、疾患の病因、病態を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 妊娠中・後期の胎盤栄養膜細胞の純化と精製：

10 例の正常妊娠および HDP 症例の胎盤、6 例の胞状奇胎組織を収集した。また、重症度、治療抵抗性など患者情報を登録した。

胎盤には主要構成細胞である栄養膜細胞に加え、母体血や胎児由来のストローマ細胞などが含まれている。正常胎盤、HDP および胞状奇胎の胎盤より消化酵素を用い単一細胞にし、FACS 及び磁気細胞分離法を用いて、細胞性栄養膜 (CT) 細胞を高純度 (>95%) に分離した。

### (2) 疾患 TS 細胞の作製：

ヒト TS 細胞の培養技術を基に、疾患 TS 細胞の複数株樹立を試みた。TS 細胞を絨毛外性 (EVT) および合胞体性 (ST) 栄養膜細胞に分化誘導し、均一な細胞を FACS にて分離した。細胞特性は、細胞増殖能、細胞分化能について“正常 TS 細胞”と比較した。

### (3) 遺伝子発現解析：

疾患 TS 細胞より精製した poly(A) RNA を用いて、RNA-seq 解析を行った。各サンプルにつき 50 million リードを取得した。マッピングおよび SNP コールには、TopHat および GATK を用いた。

### (4) 網羅的疾患エピゲノム解析：

次世代シーケンサーを用い、DNA メチル化およびヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3) の網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト疾患 TS 細胞の作製

雄核発生を示す胞状奇胎組織から分離、精製した CT 細胞を用い、TS 細胞培養条件下で疾患 TS 細胞を作製した (図 1)。この細胞は CT マーカー (TEAD、CDHI、ITGA6) の発現を認めた。また、H19 や CDKN1C など複数のインプリンティング遺伝子異常を認めた (図 2)。しかし、胞状奇胎に特徴的な異常増殖は認められず、倍加時間は正常の TS 細胞と類似していた。また、正常な TS 細胞の培養に必須な WNT 活性剤が、無添加の状態においても、この疾患 TS 細胞は増

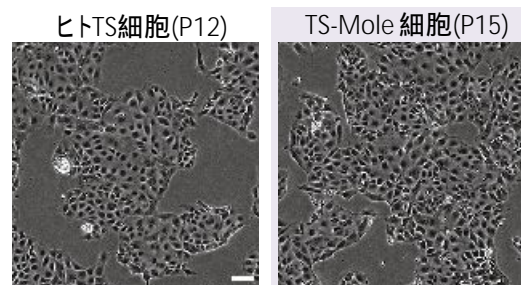


図 1 胞状奇胎 (Mole) の細胞株の樹立

殖を続けることが可能であった(図3)。つまり、古典的な Wnt シグナル単独ではなく、複数のシグナル伝達経路によって活性化されていることが示唆された。現在、HPD などの複数のヒト疾患 TS 細胞の樹立は進行中である。これらの疾患 TS 細胞の増殖は遅く、安定した細胞として継代するのに時間を要する。また、現在、複数の転写因子を遺伝子導入し、疾患 TS 細胞の樹立も試みている。

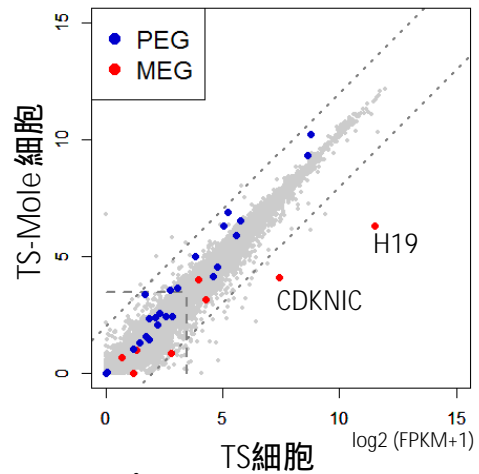


図2 インプリント遺伝子の発現量の比較

(2) ヒト中期・満期胎盤より CT 細胞の分離  
ヒト妊娠胎盤には、細胞性 (CT)・絨毛外性 (EVT)・合胞体性 (ST) 栄養膜細胞の3種類のトロフォブラストが存在する。CT は、高い増殖能をもつ上皮細胞であり、EVT と ST へと分化する能力をもつ。ヒト胎盤より分離した CT 細胞は、FACS を用い、95% 以上高純度で精製することを確認した(図4)。

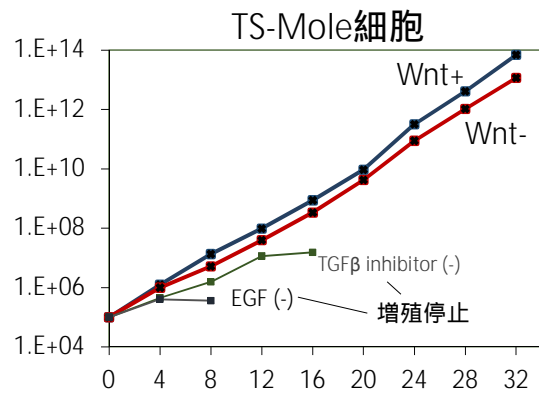


図3 Wnt 活性剤による TS-Mole 株の影響

(3) 妊娠中期胎盤から TS 細胞の樹立  
妊娠中期胎盤から CT 細胞を分離し、上記の培養条件で培養を開始した。ところが、増殖能は妊娠初期の CT 細胞より作製した TS 細胞より低く、ST、EVT へ分化誘導は十分にできなかった。増加時間は、約3倍(72時間)に遅延する結果であった(図5)。

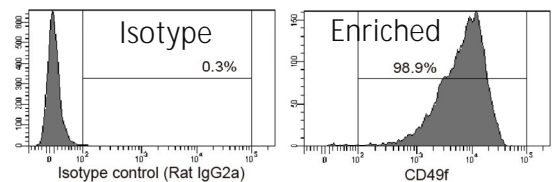


図4 CT 細胞の分離・精製

(4) ヒト中期 TS 細胞の遺伝子発現プロフィール  
妊娠初期の CT 細胞より作製した TS 細胞と分化誘導した EVT、ST は、生体から分離、精製したそれぞれの細胞と遺伝子発現パターンが類似していた。特に CT 特異的、ST 特異的、EVT 特異的に発現が認められた遺伝子においては、その発現の類似性を示した。しかし、中期胎盤より作製した CT 細胞と比較した場合、発現量の大きく異なる遺伝子が見出された(図6)。

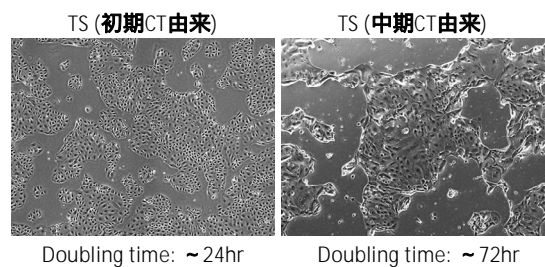


図5 中期胎盤から樹立した TS 細胞株

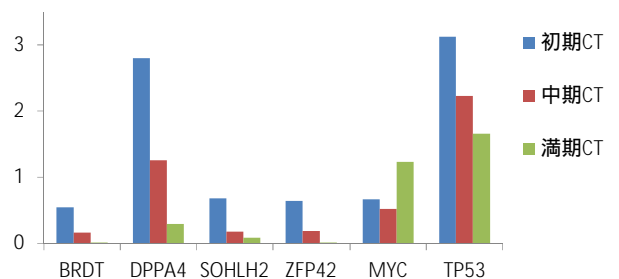


図6 満期 TS 細胞の誘導に使用した遺伝子

## (5) ヒト TS 細胞の DNA メチル化パターン

ヒト胎盤細胞は、以下に示すユニークな DNA メチル化のパターンを持つことが知られている。ヒトトロフォプラスト細胞ではゲノムの約 40%が中程度のメチル化の状態を示すこと、胎児および胎児由来の細胞で高メチル化されるプロモーター領域の一部が、ヒトトロフォプラスト細胞においては低メチル化状態にある（例：EFL5 や

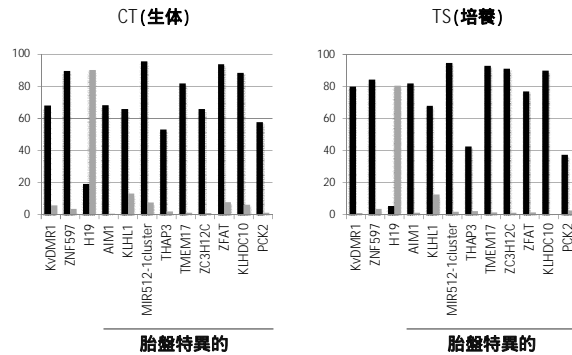


図7 TS 細胞の DNA メチル化プロファイル

INSL4 など) ヒトトロフォプラスト細胞特異的にアレル特異的な DNA メチル化状態を示す領域 (胎盤特異的ゲノムインプリンティングとして知られている) が、多数存在することなどである。これらの特徴が、ヒト TS 細胞において維持されているかどうかを調べるため、全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析を行った。その結果、TS 細胞は、中程度のメチル化パターンを示した。さらに、EFL5 のプロモーターは、低メチル化を示し、胎盤 - 胎児間でメチル化の相違を示す領域を明らかにした。胎盤特異的インプリント遺伝子のアレル特異的メチル化状態は、ほとんど同じパターンを示した (図 7)。妊娠中期の CT 細胞及び TS 細胞においても同様のメチル化パターンを保持していた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Hattori H, Kitamura A, Takahashi F, Kobayashi N, Sato A, Miyauchi N, Nishigori H, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N, Nakai K, [Arima T](#); Japan Environment & Children's Study Group. The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning 1 after blastocyst transfer: data from The Japan Environment and Children's Study. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 17(1):27, 2019. doi: 10.1186/s12958-019-0471-1. 査読有
2. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, [Arima T](#). Association of four imprinting disorders and ART. **Clinical Epigenetics**. 11(1):21, 2019. doi: 10.1186/s13148-019-0623-3. 査読有
3. Dodo M, Kitamura H, Shima H, Wati S, Ota N, Chiba H, Okae H, [Arima T](#), Igarashi K, Koseki H, Sekine H, Motohashi H. Lactate Dehydrogenase C Is Required for the protein Expression of a Sperm-specific Isoform of Lactate Dehydrogenase A. **The Journal of Biochemistry** [Epub ahead of print] 査読有
4. Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, Kabayama Y, Suyama M, Sasaki H, [Arima T](#). Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. **Cell Stem Cell**. 22(1):50-63. 2018. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.004. 査読有
5. Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima, Hashiyada Y, Kaneda M, Kan S, Imai K, Tanemura K, [Arima T](#), Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. **Scientific Reports**. 7(1):6815, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07039-5. 査読有
6. Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Kitamura A, Kikuchi H,

- Yoshida H, Arima T. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from frozen-thawed blastocyst transfer. **Clinical Epigenetics**. 9:79. 2017. doi: 10.1186/s13148-017-0379-6. 査読有
7. Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. **Scientific Reports**. 7:42336. 2017. doi: 10.1038/srep42336. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 岡江寛明, 有馬隆博. 第 14 回日本生殖発生医学会学術集会「ヒト胎盤幹 (TS) 細胞の樹立とその細胞特性」大阪. (2019) 招待講演
2. 有馬隆博. 第 63 回日本生殖医学会学術講演会・総会「ART によるエピジェネティクスの変調」(2018) 招待講演
3. 有馬隆博. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会「ヒト胎盤のトロフォブラスト幹細胞の樹立と臨床への応用、仙台国際センター (2018) 招待講演
4. 第 25 回日本胎盤学会学術集会、「ヒト胎盤栄養膜幹細胞の樹立とエピゲノム特性」、岡江寛明、有馬隆博、長崎 (2017) 招待講演
5. 日本人類遺伝学会第 62 回大会「生殖補助医療とヒトインプリンティング疾患」、有馬隆博、樋浦仁、神戸国際会議場 (2017) 招待講演
6. 第 35 回日本受精着床学会学術講演会「ART 由来出生児とゲノムインプリンティング」、有馬隆博、米子 (2017) 招待講演
7. 第 53 回日本周産期・新生児医学会学術集会シンポジウム「ART とエピジェネティクス」、有馬隆博、横浜 (2017) 招待講演
8. 第 44 回日本毒性学会学術年会「PCB とヒト精子におけるエピジェネティクス」、有馬隆博、横浜 (2017) 招待講演
9. Okae H, Arima T. International Symposium on Epigenome 2019 「Derivation of Human Trophoblast Stem Cells from Blastocysts and Villous Cytotrophoblast Cells. 」Tokyo, Japan. (2019)
10. Alvarez. AS, Kozai K, Chakraborty D, Iqbal K, Varberg KM, Brachova P, Okae H, Arima T, Schumann GG, Burns KH, Soares MJ. KEYSTONE SYMPOSIUM 2018 「Transposable element expression in placental development」New Mexico, USA. (2018)
11. IHEC Science Days & Annual Meeting 2017 「Derivation of Human Trophoblast Stem Cells from Blastocysts and Villous Cytotrophoblast Cells」Arima T, Okae H, Takahashi S. Berlin, Germany. (2017) ポスター

〔図書〕(計 10 件)

1. 樋浦仁, 岡江寛明, 有馬隆博. ゲノムインプリンティング. Science and Practice 『産科婦人科臨床』シリーズ 1 巻「生殖生理」. 中山書店. 246-255. 2019.
2. Hattori H, Hiura H, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Arima T. Therapeutic approaches to imprinting diseases. Epigenetics in Human Disease, Second Edition. Academic Press. 6:861-876. 2018
3. 岡江寛明, 有馬隆博. ヒト栄養膜幹細胞の樹立. 実験医学. 羊土社. 36(8):1375-1378. 2018.5
4. 岡江寛明, 有馬隆博. ヒトにおける栄養膜幹細胞の樹立. ライフサイエンス 新着論文

レビュー. ライフサイエンス統合データベースセンター.

DOI: 10.7875/first.author.2018.004. 2018.1.10

5. 有馬隆博. ART とエピジェネティクス. 日本周産期・新生児医学会雑誌 53 巻 5 号. 日本周産期・新生児医学会. 1520-1522. 2018.3
6. 濱田裕貴, 岡江寛明, 有馬隆博. インプリンティング疾患の解析と診断. 産科と婦人科 84(1): 64-68. 診断と治療社, 2017.12.16
7. 服部裕充, 樋浦仁, 有馬隆博. 生殖補助医療とインプリンティング疾患の発症. あゆみ欄 AYUMI. 医学のあゆみ ヒトインプリンティング疾患. 医歯薬出版株式会社 263(4):322-327, 2017.10.28
8. 濱田裕貴, 高橋聡太, 服部裕充, 有馬隆博. 生殖医療の安全性評価. 先端医療シリーズ 48 「臨床医のための最新産科婦人科」先端医療技術研究所, 71-75 2017.8.31
9. Miyauchi N, Kitamura A, Hiura H, Okae H, Kobayashi N, Hattori H, Takahashi S, Arima T. Epigenetic Alterations in Human Sperm. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer Nature. 1-16. 2017.6.
10. 有馬隆博, 宮内尚子, 北村茜, 樋浦仁, 岡江寛明, 千葉初音. 生殖補助医療とインプリンティング異常の予防. Pharma Medica 34(4): 47-51. メディカルレビュー社 2016