

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16816

研究課題名（和文）新しいヒト胎盤モデルを用いた妊娠高血圧症候群の分子生物学的な解明

研究課題名（英文）Investigating molecular biology of induced hypertension pregnancy by using a new human placental model

研究代表者

小島 淳哉（Kojima, Junya）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70617539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では疾患群の胎盤の網羅的解析を行った。現在ターゲット遺伝子を絞り込んでいる最中である。一方iPS細胞を胎盤へと分化させ、細胞膜に発現しかつpan trophoblast markerとされているKRT7を発現している細胞を回収。網羅的に解析を行いその中で XAGE2が発現していることを確認した。以上よりXAGE2が初期胎盤形成に関与する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎盤の形成不全は妊娠高血圧症候群、胎児発育不全を始めとする様々な疾患と関与するといわれている。胎盤の初期形成のメカニズムを解析することはこれら、母児共に予後不良の転機を起こしうる重篤な疾患の解明につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：We performed a comprehensive analysis of placentas of disease groups comparing with control groups, in this study, We are currently in the process of the target genes related with pregnancy induced hypertension. On the other hand, We used iPS cells and differentiated into trophoblast lineage. The cells expressing KRT7, which is expressed on the cell membrane and is considered a pan trophoblast marker, were collected. We performed a comprehensive analysis and confirmed that XAGE2 is expressed in these cells. These results suggest that XAGE2 is involved in early placental development.

研究分野：胎盤

キーワード：胎盤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤は着床後受精卵である胚盤胞における栄養外胚葉が子宮内膜上皮に接着し、その後細胞性栄養膜(Cytotrophoblast: CT)、合体性栄養膜(Syncytiotrophoblast: ST)、絨毛外トロホプラスト(Extravillous trophoblast: EVT)へと分化し上皮内に浸潤し基底膜を破り脱落膜化した間質更には筋層へと侵入していく。浸潤したトロホプラストが母体血管である螺旋動脈のリモデリングを経て母体 胎児との間に交通が生じ胎盤床が形成されていく。

妊娠高血圧症候群は母子ともに予後不良な疾患である。その病因・病態として初期胎盤形成の際、分化したトロホプラストが子宮筋層内への浸潤不全や螺旋動脈のリモデリングの形成不全を引き起こす。それが引き金になり全身の血管内皮障害を起こし、高血圧・蛋白尿等の症状が発症する。現在のところ、効果的な治療法は児の早期娩出に限られている。これまで妊娠高血圧症候群に対する研究は多数あるが、本疾患の原因は依然として不明な点が多かった。これまでに於ける妊娠高血圧症候群の研究では、clinical trialの研究や患者本人から血液を採取し成分を解析するもの、また分娩後に娩出された胎盤検体を用いるもの等がある。前者では病気のメカニズムを解析する事は困難で、後者の細胞は既にトロホプラストとして分化が進んでいる状態である。またヒトにおいて栄養膜幹細胞は存在せず、マウスで代替するのみであった。つまり現存する実験モデルでは胎盤の栄養膜幹細胞からトロホプラストへの分化過程を研究する事は不可能であり妊娠高血圧症候群の疾患メカニズムの解明に対する研究にも限界があった。

そのため本疾患の病態は依然不明の点が多く、臨床においても血圧管理を中心とした妊娠継続を図るもののみで疾患そのものへの有効な治療法も存在しない。

### 2. 研究の目的

応募者が構築した、iPS細胞を絨毛細胞系へ分化誘導する系を用いる。本モデルではこれまで研究が不可能であった胎盤形成の栄養膜幹細胞からCT、ST、EVT様への細胞分化を、iPS細胞を用いて各トロホプラスト様細胞に分化させることに成功、フローサイトメトリーを用いてそれぞれの細胞を分離し回収、各細胞の分化過程を見ることが出来る。その結果、これまで不可能であった胎盤の初期形成過程にアプローチする。

本研究は上記の新しいiPS細胞という新しいツールを使用したヒト胎盤モデルを用いて、妊娠高血圧症候群をこれまで不可能であった胎盤初期形成の角度からアプローチする。本研究の結果、妊娠高血圧症候群において栄養膜幹細胞からトロホプラストへの分化過程に影響をもたらす遺伝子が特定できる可能性がある。

そして本研究の目的は妊娠高血圧症候群の病態解明、新規診断マーカーの特定、治療法の開発へとつなげていく事を目標とする。

### 3. 研究の方法

第一段階として東京医科大学病院にて疾患群とコントロール群に分けて胎盤を採取する。採取した胎盤より切片を作成、レーザーマイクロディセクションを用いて、CT、ST、EVTよりRNAを抽出、cDNAライブラリーを合成しRNA-sequenceを用いて健常者のコントロール群と比較し網羅的解析を行う。この網羅的解析においては、妊娠高血圧症候群のCT、ST、EVTにおける新規遺伝子も含めてターゲット遺伝子を絞り込んでいく。

第二段階はiPS細胞を絨毛系へと分化させて系を用いて同定した新規ターゲット遺伝子の機能解析を行う。

- (1) 同定されたターゲット遺伝子の発現ベクター、ノックダウンベクターを作成
- (2) 作成したベクターを組み込んだレンチウイルスを作成。iPS細胞に目的遺伝子を組み込む。更にCRISPER-cas9システムを用いて同遺伝子をノックアウトしたiPS細胞を作成する。
- (3) それぞれ作成したiPS細胞の幹細胞としての特性を確認。その後iPS細胞を絨毛系へと分化誘導を行い、強制発現ベクター及びノックダウン、ノックアウトiPS細胞の分化誘導推移をコントロールのiPS細胞と比較する事で初期胎盤形成における同遺伝子の機能を解析する。

第三段階では妊娠高血圧症候群モデルマウスを用いたin vivoにおいて評価する。本ステップは第二段階で得られた結果を、妊娠高血圧症候群モデルマウスを用いたin vivoにおいて評価する。以下の手順で解析を進める。

- (1) 妊娠高血圧症候群モデルマウス作成にはこれまで多くの報告あるようにhuman sFlt-1をレンチウイルスに組み込み胎盤に強制発現させて作成する。
- (2) これまでの実験の結果で絞り込まれたターゲット遺伝子のGFPによるtag付き発現ベクター、ノックダウンベクターを作成。
- (3) 同ベクターをレンチウイルスに組み込み、妊娠高血圧症候群マウスの胚盤胞に感染させて胎盤特異的に強制発現、ノックダウンを行い同遺伝子のin vivoにおける機能を評価し、タ

ターゲット遺伝子が今後妊娠高血圧症候群の分子標的薬となりうるかを検証する。さらに同時に同妊娠マウスモデルの妊娠経過中の血液を採取し、解析する事により妊娠高血圧症候群の新規診断マーカーのスクリーニングを行う。

#### 4. 研究成果

本研究では妊娠高血圧症候群の中でも予後の悪いとされている早発型のうち更に妊娠 28 週以下の疾患群と同週数における早産群の胎盤を回収した。その後それらより RNA を抽出。疾患群とコントロール群の胎盤の RNA シーケンスによる網羅的解析を行った。この解析では新規ターゲットも含めるためにリード数を増やして解析し、現在ターゲット遺伝子を絞り込んでいる最中である。

一方 iPS 細胞由来のトロホプラスト 系統細胞より胎盤初期形成を探索するために、4 種類の iPS 細胞を 50 ng/mL の BMP4 で 10 日間処理した。その後、フローサイトメトリーにより分化した細胞から汎トロホプラストマーカーであるケラチン 7 (KRT7) 陽性の細胞を回収し、マイクロアレイ解析にて網羅的に解析を行った。

我々のマイクロアレイのデータを、過去の大規模解析におけるヒトのトランスクリプトームと比較したところ、KRT7+細胞の遺伝子発現パターンは胎盤と同様であった。合計 259 の発現上昇遺伝子は、よく知られた GATA3, HAND1 などのトロホプラストマーカーを含む 4 つの KRT7+グループすべてで共通して発現していた。これらの発現上昇遺伝子のうち、2 つの新しい胎盤形成に関与する可能性がある遺伝子を同定した。その一つは、癌/精巣抗原 (CTA) である XAGE ファミリーのメンバーである XAGE2 である。CTA は、様々な組織型の悪性腫瘍に発現する腫瘍関連抗原の大きなファミリーであるが、精巣生殖細胞を除く正常組織には一般に見いだされない。XAGE2 の胎盤での分布はまだ不明であったが本研究では CT と ST に染色されたが、間質には染色されないことを発見した。

もう一つの候補である KCNQ2 は電位依存性カリウムチャネル (Kv7 チャネル) をコードしている。Kv7 チャネルは様々な血管で同定され、血管弛緩を促進する重要な役割を果たすと考えられている。KCNQ2 は胎盤第 1 期の CT にのみ発現していたが、今後生理学的な観点からの研究が必要になると思われる。本研究により、詳細な機能は今後の課題ではあるが、XAGE2、KCNQ2 が新たに胎盤形成に関与する可能性のある新たな遺伝子を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Moritake Tetsuya, Kojima Junya, Kubota Kaiyu, Terauchi Fumitoshi, Isaka Keiichi, Nishi Hirotaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Kruppel like factor 5 is upregulated and induces cell proliferation in endometrial cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12745	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 Masataka Ono, Junya Kojima, Ei Hasegawa, Yotaro Takaesu, Toru Sasaki, Hirotaka Nishi	4. 巻 48
2. 論文標題 Anti-Mullerian hormone levels following laparoscopic ovarian cystectomy with subcutaneous abdominal wall lifting for ovarian endometriomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology	6. 最初と最後の頁 91-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nanae Tsuchida, Junya Kojima, Atsushi Fukuda, Mayumi Oda, Tomoyuki Kawasaki, Hiroe Ito, Naoaki Kuji, Keiichi Isaka, Hirotaka Nishi, Akihiro Umezawa, Hidenori Akutsu.	4. 巻 89
2. 論文標題 Transcriptomic Features of Trophoblast Lineage Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Treated With BMP 4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 20-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2019.10.006	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kaiyu Kubota, Junya Kojima, Hirotaka Nishi
2. 発表標題 Attenuated expression of Kruppel-like factor 5 in the decidua of women who experience sporadic miscarriage
3. 学会等名 Society for the study of reproduction 51th annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------	---------