

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17383

研究課題名（和文）新規胎盤遺伝子の機能解析と周産期病態モデル構築

研究課題名（英文）Development of perinatal pathological models for novel placental genes

研究代表者

土田 奈々枝 (Tsuchida, Nanae)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：60817245

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）：胎盤は、栄養膜合体層、栄養膜細胞層そして絨毛外トロホプラストの3種類のトロホプラストを含み胎児の発育を担保するため多様な機能を兼ね備える。これまで、ゼノフリー下でiPS細胞からヒト絨毛性ゴナドトロピン産生トロホプラストを作製する系を構築した。このヒト胎盤初期発生モデルを応用し、さらに高度な生理活性機能を獲得した胎盤分化を通して胎盤初期発生の3D-オルガノイドモデルを開発することができた。今後、妊娠合併症を試験管内で解析する新規的なバイオツールとして期待できさらに研究開発進めていくロバスタな研究基盤が構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト多能性幹細胞を活用し、3次元組織化し生理機能性も獲得したオルガノイドの発生モデルをもとに、分化誘導法の最適化を定量的に評価できる系を胎盤発生に適応することができた。個体発生のサポート臓器として重要な胎盤に着目し、胎盤発生関連遺伝子の定量発現量を属性ごとに特性とバランスを分析し胎盤オルガノイドの発生動態と関連付けるデータ可視化モデルを構築した。試験管内モデルの乏しい周産期分野において、応用性の高い試験管内モデルができ、妊娠合併症などの研究促進へ貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The placenta contains three types of trophoblasts: trophoblast, trophoblast cell layer, and extravillous trophoblast, which have diverse functions to ensure the development of the fetus. We have established a system to generate human chorionic gonadotropin-producing trophoblasts from iPS cells under xeno-free conditions. By applying this model of early human placental development, we were able to develop a 3D-organoid model of early placental development through placental differentiation that has acquired even more advanced bioactive functions. This model is expected to be a novel bio-tool for in vitro analysis of pregnancy complications in the future, and a robust research foundation has been established for further research and development.

研究分野：産科学

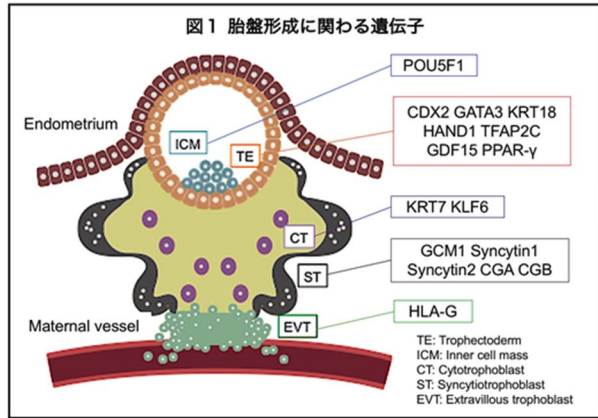
キーワード：胎盤 iPS細胞 トロホプラスト

1. 研究開始当初の背景

ヒトの受精卵からどのように胎盤が発生していくのか、また妊娠高血圧症候群や流産、胎児発育不全などの疾患はどのような胎盤発生異常によって引き起こされるのか。産婦人科領域の中で未解明の部分が多い、大きな研究課題である。

流産後や分娩後の胎盤検体を用いたこれまでの組織学的研究を中心に、断片的ではあるが発生の流れが分かってきた。受精卵は受精後5日目に胚盤胞となり、将来胎児となる内部細胞塊と胎盤を形成する栄養外胚葉とに分かれる。

この分化には、栄養外胚葉において発現する CDX2 と未分化マーカーである OCT4 の相互作用が関与すると考えられているが、その後連続して起こるトロホプラスト分化に至るまでの詳細な分子メカニズムは分かっていない。着床後、胚は子宮内膜組織へ埋没していき、栄養外胚葉は Cytotrophoblast (CTB) と Syncytiotrophoblast (STB) とに分化する。STB は hCG やエストロゲンなどのホルモン産生や栄養・ガス交換に寄与する。さらに、CTB から分化した Extravillous trophoblast (EVT) は母体のラセン動脈に浸潤してその血管壁を再構築し、子宮胎盤循環が完成する。こうした胎盤の発生には、前述した CDX のほか、図1のように様々な遺伝子が関わっているとされる。しかし、倫理的・技術的理由から胎盤初期発生の過程を再現しうるモデルはなく、特に未分化の受精卵の状態から栄養外胚葉へと運命が決定され、トロホプラストが分化していくごく初期の発生に関しては、分かっていないことが多い。そこで我々は、未分化なヒト iPS 細胞をトロホプラストへ分化させる培養系を利用し、初期の胎盤発生の分子メカニズムの解明を目指す。また、正常な発生機構を解明することは、胎盤関連疾患の発症機序や治療的介入を可能にすると考えられる。

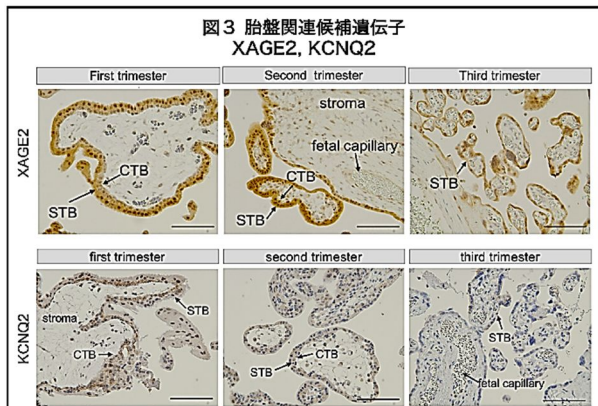
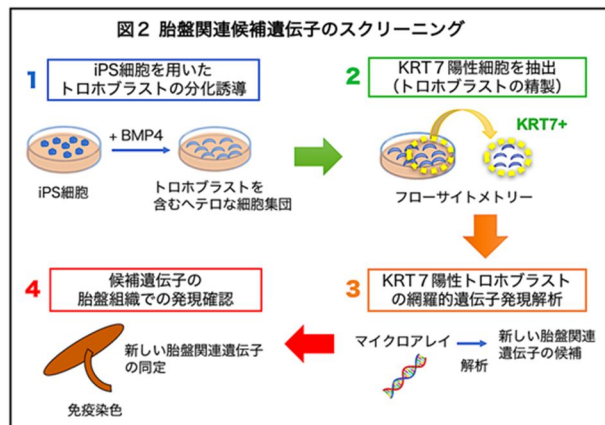


Kojima et al. Lab Invest. 2017 Oct;97(10):1188-1200より改変

2. 研究の目的

これまでに、ヒト iPS 細胞を用いたトロホプラストの分化誘導系が複数報告されており、主流は iPS 細胞に BMP4 を添加する方法である。当研究室では、世界で初めてゼノフリー（動物由来の物質を一切使用しない条件）下で、ヒト iPS 細胞からトロホプラストを分化誘導する系を構築した (Kojima J, et al. Laboratory Investigation, 2017)。このプロトコールによって得られた分化細胞は、CTB, STB, EVT の全てのトロホプラストを含む集団で、hCG やプロゲステロン等のホルモンを産生し、胎盤関連マーカーを発現することが分かっている。我々は、このトロホプラストの特徴を詳細に解析することで、vivo のモデルでは解明が困難なごく初期の胎盤発生に関わる新たな知見を得られるのではないかと考えた。

ここで問題となるのが、この誘導系で得られる分化細胞はトロホプラスト以外の細胞も混在するヘテロな集団だということである。そこで、pan-trophoblast marker として知られる Keratin 7 に着目し、トロホプラストを含む分化細胞からフローサイトメトリーで Keratin 7 陽性細胞を分離し、トロ



トロホプラストのみを精製した。次に、この Keratin 7 陽性細胞 (= トロホプラスト) の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。4 ラインの iPS 細胞から分化したトロホプラストで共通して高発現であった遺伝子の中から、これまで胎盤での発現が確認されていないもの、過去の RNA seq などで胎盤における発現が確認されているものの、その局在や機能解析はなされていない遺伝子を複数同定することができた。これらの発現についてヒト胎盤組織を用いて免疫染色で確認したところ、KCNQ2 (前述の に該当) と XAGE2 (前述の に該当) のみ発現しており、新たな胎盤関連遺伝子と考えられた (図 2、3。現在、論文投稿準備中)。XAGE2 は初期～後期のヒト胎盤組織全てにおいて発現しているが、KCNQ2 は初期のみで発現しており、我々の iPS 細胞を用いたトロホプラスト分化モデルは初期の胎盤発生に相当するモデルであることが推測される。

今回見つかった新たな胎盤関連遺伝子を文献的に調べると、KCNQ2 は電位依存性カリウムチャンネルサブユニットのひとつである KV7.2(KCNQ2)をコードする遺伝子であり、そのミスセンス変異は良性家族性新生児けいれんや新生児てんかん性脳症 7 型を引き起こすことが知られている。また、KV7.2 チャンネルはヒト胎盤の絨毛膜板の血管拡張に関与していることが分かっている。調べた限りでは、カリウムチャンネル遺伝子 (KCNQ3, KCNQ4, KCNQ5) と妊娠高血圧腎症の関連を報告した論文はあるが、KCNQ2 の胎盤における機能を報告したものはまだない。他方、XAGE2 は様々な悪性腫瘍で発現し、精巣を除く正常細胞では発現しないがん精巣抗原の一つとして知られる。その機能は不明だが、腫瘍形成に関係するのではないかと推定されている。公開されている過去の RNA seq のデータを見ると、ヒト正常組織の中で XAGE2 は胎盤に特異的に発現していることが示されているが、胎盤組織における局在や機能は分かっていない。

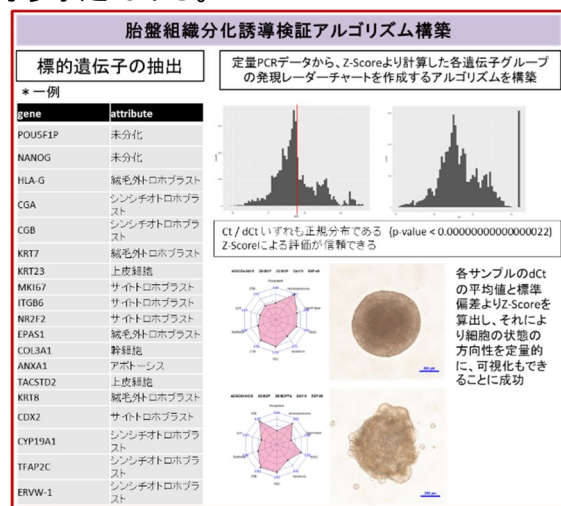
### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞を用いて、トロホプラストへの分化指向性には iPS 細胞のライン間による差が見られるため、当研究室で樹立した複数の iPS 細胞を用いて作成を試みる。トロホプラストの分化誘導とその形態・機能解析を実施する。分化効率、胎盤関連遺伝子の発現、ホルモン分泌などについて広く解析し機能性を推定する。胎盤の発生異常が関係しているとされる流産や妊娠高血圧症候群、胎児発育不全などの胎盤の検体を用いて免疫組織学的に調べる。周産期疾患とこれらの遺伝子との関連が同定された場合は、病態解明に向けて更なる分子レベルでの解析を行う予定である。

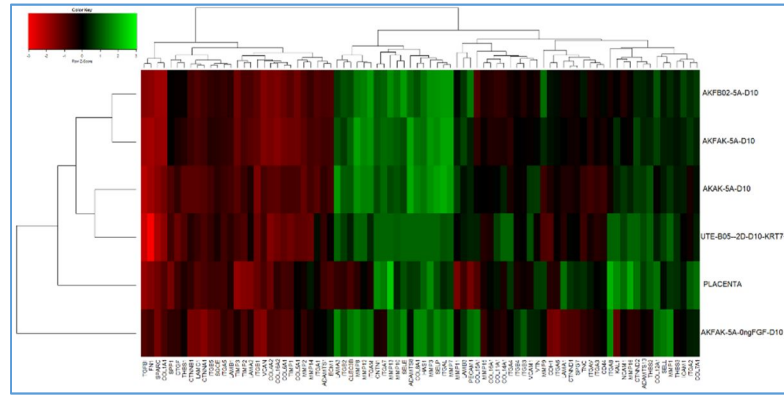
### 4. 研究成果

胎盤は、栄養膜合体層(STB)、栄養膜細胞層(CTB)そして絨毛外トロホプラスト(EVT)の3種類のトロホプラストを含み胎児の発育を担保するため多様な機能を兼ね備える。これまで、ゼノフリー(動物由来物質を一切使用しない条件)下で iPS) 細胞から hCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン) 産生トロホプラストを作製する系を構築した。さらに初代トロホプラスト分化系を応用し、新たなヒト胎盤発生バイオマーカーを 2 つ見いだすことに成功した (Tsuchida N, et al. Placenta 2019)。このヒト胎盤初期発生モデルを応用し、さらに高度な生理活性機能を獲得した胎盤分化を通して胎盤初期発生の 3D-オルガノイドモデルを開発することができた。

研究協力者らは、いち早く機械学習を応用した AI 技術をバイオデータ解析へ活用する幹細胞評価システム開発を進めてきた (Nishino K, et al. Hum Cell 2021)。新規的な 3D 組織化した胎盤オルガノイド分化誘導をモデルとして、分化誘導動態がオルガノイドの構成成分ごとに可視化でき、分化誘導システムごとに効率化に影響を与える要素を定量化出来るようなシステム基盤を前実験として新たに実証できた (図 胎盤組織分化誘導検証アルゴリズム構築)。胎盤発生特異的のバイオマーカーについては、所属する研究室で胎盤発生分子マーカーライブラリー解析プログラムを新たに開発した。細胞外基質マーカー群に対する網羅的定量 PCR 解析から、ヒト胎盤と近似した細胞外基質を有すること



が示唆された（図 ヒートマップ）。今後、妊娠合併症を試験管内で解析する新規的なバイオツールとして期待できさらに研究開発進めていくロバストな研究基盤が構築できた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------