

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18685

研究課題名(和文) 桑実胚organoidを用いたin vitro着床モデルの開発

研究課題名(英文) Establishment of an in vitro implantation model with embryo organoid

研究代表者

阿部 高也 (Takaya, Abe)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師

研究者番号：10720609

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)：マウスを用いて試験管内で着床前後の胚と子宮組織で起きる細胞間相互作用を再現できるin vitro着床モデルを開発するため、着床前後の胚培養法および子宮組織を試験管内で再現する擬似子宮組織の作製に取り組んだ。その結果、胚盤胞期胚(受精後3.5日目)を着床後の受精後5.5日目胚相当に培養することに成功した。また、子宮内膜上皮細胞と間質細胞を用いて擬似子宮組織の三次元培養を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

試験管内で子宮組織の細胞環境を再現して、そこで胚を発生させる着床モデルの開発は、胚発生における子宮の役割、着床や胎盤形成のメカニズムを解明する上で重要な役割を果たす可能性があり学術的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：An in vitro implantation model which can recapitulate the cell-cell interaction between an embryo and a uterine tissue is required to make better understanding of the implantation mechanism. However, it has not been developed yet. To overcome this issue, a mouse in vitro implantation model has been tried to be developed by using 3-dimensional cell culture of endometrial tissue and embryo culture. As a result, the embryo culture during preimplantation stage from blastocyst (E3.5) to around E5.5 stage was achieved and a 3D culture method of uterine tissue using endometrial epithelial cells and stromal cells was succeeded to be established.

研究分野：マウス初期発生

キーワード：マウス 着床 胚培養 子宮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発達した胎盤を有するヒトやマウスを含む真獣類において妊娠は着床、脱落膜化、胎盤形成、そして出産の複雑な過程を経る。その各過程は次の発生段階に進むためには欠かすことはできない。ヒトでは出産に至るまでの効率が低く、着床前に胚の30%が失われることが報告されている(Larsen et al., 2013)。しかし、着床のメカニズムや着床から始まる胚と子宮で起こる細胞間相互作用については十分に明らかにされていないこともあり、特に着床前後に起きる流産の原因解明は困難である。その原因の一つとして、胚の発生過程を母体内で継続的に観察(ライブイメージング)することが難しく、またそれを補う *in vitro*(試験管内)モデルが確立されていないことが挙げられる。ヒトのモデル動物としてよく使われるマウスにおいては、着床前後の胚培養法が報告されているが(Bedzhov et al., 2014; Hsu, 1972; Morris et al., 2012)、それらは胚を単独で培養皿で培養する方法である。そのため、胚と子宮で起こる相互作用のメカニズムを解明するためには、*in vitro*で子宮組織を再構築して、胚を着床させるモデル(*in vitro*着床モデル)の開発が必要である。また、ヒトへの応用を考慮すると受精卵を必要としない代替法が必須であると考えられた。そこで着床前胚由来の幹細胞を組み合わせ胚様の細胞集合体(擬似胚)を作製する方法について検討した。最終的な目標として、開発した *in vitro*モデルを用いて着床から胎盤形成に至るまでの胚と子宮で起きる細胞間相互作用の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究課題では、マウスを用いた子宮上皮組織の三次元培養法と着床前後の胚培養法の開発およびそれら組み合わせた *in vitro*着床モデルの構築を目的とする。これにより着床時期の胚と子宮組織で起きる細胞間相互作用についてライブイメージングなどによる細胞レベルでの解析が可能となることが期待される。また、着床に関わる遺伝子機能解析やドラッグスクリーニングへの応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1)子宮上皮組織の三次元培養

マウス子宮組織から子宮内膜上皮細胞と子宮間質細胞を単離して、ゲルを用いた三次元培養により上皮構造を再構築する(擬似子宮組織)。

(2)胚培養

受精後 3.5(E3.5)日目胚を回収して、着床後の前後軸形成が起きる E5.5 日目胚までの胚培養法を確立する。

(3)擬似子宮組織での胚培養

擬似子宮組織内で E3.5 日目胚を培養して、*in vitro*で着床の再現を試みる。

(4)着床前胚様の細胞集合体(擬似胚)

幹細胞を組み合わせ、個体に発生することのできる擬似胚/人工胚の作製法を検討する。使用するマウス胚性幹細胞(ES細胞)(HK3iES細胞)(Kiyonari et al., 2010))の着床後胚への寄与率とその分布を検証する。

4. 研究成果

(1)子宮上皮組織の三次元培養

マウス子宮をトリプシン処理することで子宮内膜上皮細胞と子宮間質細胞を解離させた。トリプシン処理の反応時間を変えることで、上皮細胞と間質細胞を分けて単離することが可能となった。単離した細胞は、マーカー遺伝子の抗体染色により、上皮細胞(Sox17)と間質細胞(Vimentin)であることを確認した。回収した上皮細胞は、増殖させて継代培養も可能であった。その後、三次元培養により上皮構造の再構築を試みた。ゲル内に間質細胞を包埋して、そのゲル表面上皮細胞を播種することで上皮様構造を擬似化することに成功した(これを擬似子宮組織と呼ぶ)(図1)。また、擬似子宮組織においても、マーカー遺伝子の発現は維持されていることが確認された。

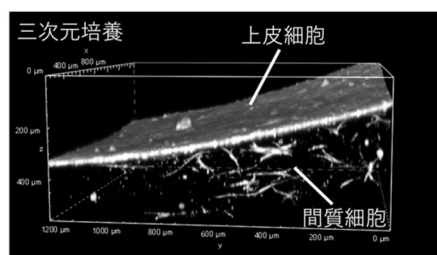


図1: 擬似子宮組織の三次元培養

また、擬似子宮組織においても、マーカー遺伝子の発現は維持されていることが確認された。

(2) 胚培養

E3.5 日目に子宮から胚盤胞期胚を回収して着床後胚(E5.5 相当)に発生させる胚培養法の検討を行った。基本的な培養条件は先行論文を参考にした(Ivan Bedzhov et al., 2014)。手始めに先の報告に従い、胚盤胞期胚を培養皿の上に置いた状態で胚培養を行った。その結果、培養5日目において、E5.5 日目胚様に発生した胚を確認することができた。しかしながら、この方法では培養皿に張り付き発生していくため、扁平な形態になる傾向が強かった。また、E5.5 日目胚様に発生する効率は、播種した胚の数%であった。さらに、培養皿に張り付くまでは、培地の中で浮遊しており、どこに接着するか予測がつかなかった。そのため、接着する様子をライブイメージングで捉えることは非常に難しいことがわかった。

この問題を解決するため、三次元培養ゲルを用いた培養法を試みた。子宮内の着床間近の胚盤胞期胚の組織切片観察より、胚は窪みの様な場所に位置していることがわかる。そこでスタンプ(穴の鋳型)を用いて、培養ゲルに窪み(穴)を加工することを考案し、スタンプの形状を設計し作製した。その後、ゲルの作製方法など検討した結果、ゲルへ最大直径数百 μm の穴を加工することが可能となった。そして、この穴の中で胚培養を行った結果、胚は接着するまで穴に止まり(図2)ゲルに接着し、E5.5 日目胚様に発生させることに成功した(図3)。さらに、接着する様子をライブイメージングで撮影することに成功した。培養し

た胚で分化マーカー遺伝子の発現を確認したところ、正常に発現していることが確認できた。しかし、E5.5 日目様に発生する効率は数%に留まっている。

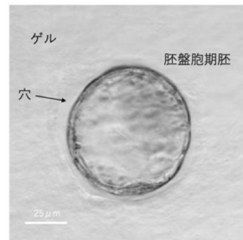


図2: ゲルに開けた穴の中にある胚

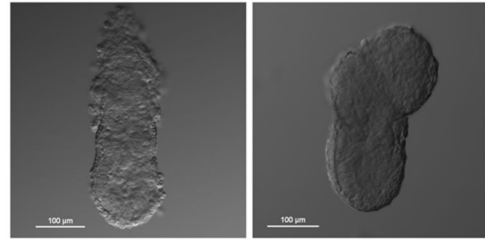


図3: 左, E5.5 日目胚; 右, E3.5 日目胚を5日間培養した胚

(3) 擬似子宮組織を用いた胚培養

(1)の擬似子宮組織と(2)の胚培養法を用いて共培養を試みた。しかしながら、(2)の胚単独で培養する方法の培養効率を向上させるような効果は今のところ得られていない。in vivo の子宮は、ホルモンによる制御により胚を受け入れることのできる時期が限られており、擬似子宮組織においてその時期に対応する細胞環境を整える必要があると考えられ、これは残された課題である。

(4) 着床前胚様の細胞集合体(擬似胚)

使用したES細胞(HK3i ES細胞)は、8細胞期胚に注入するとES細胞がほぼ100%寄与するキメラマウスが得られることが報告されている(Kiyonari et al., 2010; Ukai et al., 2017)。しかしながら、注入後の8細胞期胚、胚盤胞期胚、および着床後胚における細胞分布について詳細な解析がなされていない。そこで、GFPを発現するES細胞を野生型8細胞期胚に注入して、注入後の8細胞期胚、胚盤胞期胚および着床後胚への寄与率をGFPの発現により評価した。その結果、注入した数十個のES細胞は胚の中央に集まり塊となり、その後、胚盤胞期胚においてICM、着床後胚のエピプラストに高効率に寄与することがわかった。また、それ以外の組織への寄与はほとんど見られなかった。これにより、擬似胚にこのES細胞を用いることで身体を作る基になる細胞は十分に補える可能性があることが示唆された。

胚盤胞期胚は将来に身体の基となる内部細胞塊(ICM)、胎盤になる栄養外胚葉、そして羊膜になる原始内胚葉から構成されている。ICMにはES細胞、栄養外胚葉にはTS細胞(栄養膜幹細胞)が樹立されている。また、2022年には原始内胚葉に由来するPrES細胞(原始内胚葉幹細胞)の樹立法が報告された(Ohinata et al., 2022)。これらの幹細胞を組み合わせて擬似胚/人工胚を作製する報告がなされているが、まだ個体の発生には至っていない(Ohinata et al., 2022; Rivron et al., 2018)。その原因として、TS細胞のみで完全な胎盤をつくることができない、また現在ではPrES細胞が樹立されたが、羊膜をつくる幹細胞が欠けていたことが考えられた。一方で、8細胞期胚を用いた新規な幹細胞樹立法により8細胞期胚の割球に性質が似た幹細胞(EPSC: expanded potential stem cell)が樹立できることが報告された(Yang et al., 2017)。8細胞期胚は胚盤胞期より早い発生段階であるため、その割球は胚盤胞期胚を構成する全ての細胞に分化することができる細胞である。このEPSCとES細胞をくみあわせることで、栄養外胚葉と原始内胚葉となる細胞を補えると考えた。しかしながら、その後、着床前胚とEPSCの遺伝子発現を

詳細に調べた報告がなされ、EPSC の性質は 8 細胞期胚の割球とは類似しておらず、通常の ES 細胞に近く着床後胚の胚体外組織への寄与も非常に低いことが示された (Posfai et al., 2021)。この報告を鑑みて EPSC を用いることは保留して、上記の他の研究を優先した。

引用文献

- Bedzhov, I., Leung, C. Y., Bialecka, M. and Zernicka-Goetz, M. (2014). In vitro culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. *Nat Protoc* 9, 2732-2739.
- Hsu, Y. C. (1972). Differentiation in vitro of mouse embryos beyond the implantation stage. *Nature* 239, 200-202.
- Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, S. and Aizawa, S. (2010). Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genesis* 48, 317-327.
- Larsen, E. C., Christiansen, O. B., Kolte, A. M. and Macklon, N. (2013). New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 11, 154.
- Morris, S. A., Grewal, S., Barrios, F., Patankar, S. N., Strauss, B., Buttery, L., Alexander, M., Shakesheff, K. M. and Zernicka-Goetz, M. (2012). Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. *Nat Commun* 3, 673.
- Ohinata, Y., Endo, T. A., Sugishita, H., Watanabe, T., Iizuka, Y., Kawamoto, Y., Saraya, A., Kumon, M., Koseki, Y., Kondo, T., et al. (2022). Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm. *Science* 375, 574-578.
- Posfai, E., Schell, J. P., Janiszewski, A., Rovic, I., Murray, A., Bradshaw, B., Yamakawa, T., Pardon, T., El Bakkali, M., Talon, I., et al. (2021). Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency. *Nat Cell Biol* 23, 49-60.
- Rivron, N. C., Frias-Aldeguer, J., Vrij, E. J., Boisset, J. C., Korving, J., Vivie, J., Truckenmuller, R. K., van Oudenaarden, A., van Blitterswijk, C. A. and Geijsen, N. (2018). Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature* 557, 106-111.
- Ukai, H., Kiyonari, H. and Ueda, H. R. (2017). Production of knock-in mice in a single generation from embryonic stem cells. *Nat Protoc* 12, 2513-2530.
- Yang, J., Ryan, D. J., Wang, W., Tsang, J. C., Lan, G., Masaki, H., Gao, X., Antunes, L., Yu, Y., Zhu, Z., et al. (2017). Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature* 550, 393-397.

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abe, T. Inoue, K. I. Furuta, Y. Kiyonari, H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Pronuclear Microinjection during S-Phase Increases the Efficiency of CRISPR-Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors in Mouse Zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 107653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107653	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 Hisao Honda, Takaya Abe, Toshihiko Fujimori	4. 巻 118
2. 論文標題 The Chiral Looping of the Embryonic Heart Is Formed by the Combination of Three Axial Asymmetries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 742-752
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tatsumi Hirata, Go Shioi, Takaya Abe et al.	4. 巻 31
2. 論文標題 A Novel Birthdate-Labeling Method Reveals Segregated Parallel Projections of Mitral and External Tufted Cells in the Main Olfactory System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0234-19.2019.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部高也、井上健一、古田康秀、清成寛
2. 発表標題 Harnessing the CRISPR/Cas9 System in Mouse Genome Engineering @ LARGE, RIKEN BDR
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部高也、井上健一、古田康秀、清成寛
2. 発表標題 マウス受精卵におけるCRISPR/Cas9を用いた遺伝子改変マウスの作製
3. 学会等名 第四回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaya Abe
2. 発表標題 Fluorescent reporter mouse lines and image analyses reveal distinct region-specific cell behaviors in the visceral endoderm
3. 学会等名 The 15th TRANSGENIC TECHNOLOGY MEETING (国際学会)
4. 発表年 2019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