

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15699

研究課題名（和文）カニクイザルを用いた妊娠疾患モデル作製と表現型解析

研究課題名（英文）Generation of a cynomolgus monkey model for pregnancy complications

研究代表者

武藤 真長（Muto, Masanaga）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任助教

研究者番号：50868867

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）：ヒトの胎盤では妊娠維持や胎児への栄養供給に重要なトロホプラスト細胞の機能破綻により妊娠高血圧症候群などの重篤な疾病が引き起こされる。本研究ではヒトに最も近縁な動物モデルであるカニクイザルを用いて、トロホプラスト細胞の機能解析を生体レベルで行うための実験モデル構築を目指した。カニクイザルの胎盤および胚盤胞期胚から樹立したトロホプラスト幹細胞を樹立しその性状解析を行った。センダイウイルス由来因子をレンチウイルスベクターへ導入することでウイルスの力価を高めることに成功し、カニクイザル胚盤胞のトロホプラスト細胞へ高い生存率を維持したまま遺伝子導入するための手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において申請者はヒトに最も近縁な動物モデルであるカニクイザルのトロホプラスト幹細胞（TS細胞）を樹立した。これによりTS細胞を用いたキメラ胎盤の表現型解析が可能となった。またレンチウイルスベクターを用いたトロホプラスト特異的な遺伝子操作に成功し、霊長類トロホプラスト細胞の機能評価を個体レベルで行える可能性を示した。この研究により霊長類を用いた妊娠高血圧症候群の疾患モデルを作製することが可能となり、将来的な臨床的応用への展開が期待されるだけでなく、実験動物としてのカニクイザル受胎率・出産率の向上や、ひいては家畜の生産率の向上へと波及すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Preeclampsia is characterized by functional deficiency of trophoblast cells in placenta. In this study, we utilized cynomolgus monkey to establish the experimental model for analyzing the functional trophoblast cells. We performed the generation of trophoblast stem (TS) cells and analyzed the character of the TS cells. We also developed the trophoblast-specific gene-manipulation system using the advanced lentiviral vector for cynomolgus monkey blastocyst embryos. We succeeded to provide a high efficiency of lentiviral transduction and a high survival rate of the cynomolgus monkey blastocyst embryos.

研究分野：生殖生物学

キーワード：カニクイザル トロホプラスト 妊娠高血圧症候群 レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

妊娠 20 週以降に高血圧を認める妊娠高血圧症候群は、全妊婦の 5-10% が発症し、重症化すると、脳出血、肝機能障害等を母体に引き起こし、また胎児も発育不全や最悪の場合は致死となるなど、母児ともに深刻なリスクを伴う。胎盤を起因とする疾病であるが発症機序は不明であるため、早期に胎盤を摘出する以外に根本的な治療法が存在しない。

ヒトの胎盤では、適切な場所で分化したトロホプラスト細胞が妊娠維持や胎児への栄養供給などの重要な機能を担っている。特に絨毛外トロホプラスト (Extravillous Trophoblast: EVT) 細胞は子宮らせん動脈の血管内皮へ浸潤することで血管拡張 (リモデリング) を起こし、胎児への十分な栄養供給を行うために必須である。妊娠高血圧症候群の発症機序として、EVT 細胞の不適切な分化および浸潤不全であることが知られている。しかしながら妊娠高血圧症候群患者においてなぜ EVT 細胞の浸潤が不十分となるのかは不明であり、そもそも正常な EVT 細胞の分化・浸潤における詳細な分子機構の全容も明らかとなっていない。

これまでのマウスなどのげっ歯類を用いたトロホプラスト細胞の分化・浸潤機構の研究は行われてきたが、げっ歯類とヒトの胎盤では栄養交換を担う合胞体トロホプラスト細胞 (Syn-T 細胞) 層の形態に大きな違いがある。また、マウス胎盤ではヒトで観察される浸潤性を獲得した EVT 細胞に相当する細胞が存在しない。さらに最近樹立されたヒトトロホプラスト幹細胞 (TS 細胞) は EVT 細胞や Syn-T 細胞へと分化可能であるが、マウス TS 細胞は不可能である。これらのことから、ヒトとげっ歯類のトロホプラスト細胞には形態学的、遺伝子発現レベルで大きな違いがあるため、将来的にヒト妊娠疾患や着床障害などの治療戦略に向けた研究を行う上でげっ歯類モデルは適していない。また、ヒト TS 細胞は試験管内において分化能を有するが、その細胞を使ったキメラ解析などの個体レベルにおける機能評価はヒト試料を用いる限り不可能である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒトに最も近縁な動物モデルであるカニクイザルの胎盤から TS 細胞を樹立し、キメラ胎盤作製を目指した。また、カニクイザルを用いたレンチウイルスベクターによるトロホプラスト細胞特異的な遺伝子操作法の開発を行い、生体レベルでのトロホプラスト細胞機能評価法の開発を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 既に報告のあるヒト TS 細胞と同様の培養条件を用いてカニクイザル TS 細胞の樹立を試みた。
- (2) カニクイザル TS 細胞から EVT 細胞および Syn-T 細胞への分化誘導を行った。
- (3) センダイウイルス由来因子をレンチウイルスベクターへ導入し、高効率なトロホプラスト細胞特異的な遺伝子操作法の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) カニクイザル胎盤を胎齢 44 日 (E44、第一周産期)、E85 (第二周産期)、E126 (第三周産期) で採取し、ITGA6 陽性の細胞性トロホプラスト細胞 (CT 細胞) をソーティングし、ヒト TS 細胞と同様の培養条件を用いてカニクイザル TS 細胞樹立を行った (図 1 A, B)。免疫染色によりこれら細胞では GATA3, ITGA6, TP63, KRT7, CDH1, TEAD4 などの TS 細胞のマーカータンパク質を発現していることがわかった (図 1 C)。また、ELF5 プロモーター領域が低メチル状態を示し、トロホプラスト細胞に特徴的に発現する miRNA クラスターの発現を確認した。これらの性状解析から、樹立された細胞は TS 細胞としての性質を有していることがわかり、またヒト TS 細胞と同様のメカニズムで TS 細胞が樹立できることも明らかとなった。

(2) ヒト TS 細胞は、TGFβ 阻害剤、NRG1、マトリゲル存在下において母体組織への浸潤能を獲得した EVT 細胞へ、また Forskorin 存在下において Syn-T 細胞へと分化誘導可能である[1]。この手法をカニクイザル TS 細胞に応用して EVT 細胞の分化誘導実験を行ったところ、細胞の形態は EVT 細胞および Syn-T 細胞様の形態とはならないことがわかった(図 1D)。このことから、カニクイザルにおいて EVT 細胞および Syn-T 細胞の分化メカニズムは、ヒト細胞とは異なることが示唆された。今後はカニクイザル胎盤の単一細胞遺伝子発現解析を行い、Syn-T 細胞および EVT 細胞で特徴的なシグナル伝達経路を明らかにし、カニクイザル TS 細胞の分化誘導条件を同定していくための基礎データを取得することを考えている。

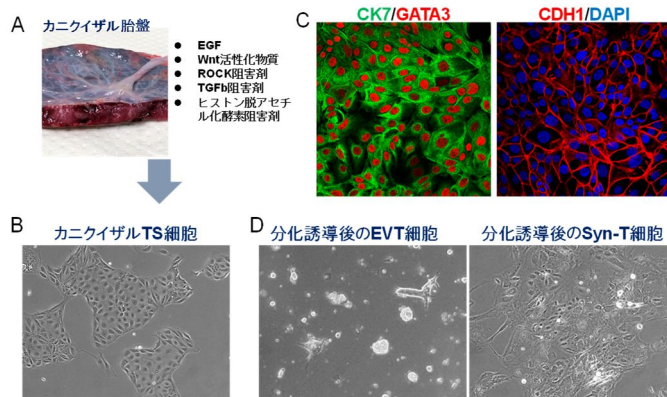


図 1. カニクイザル胎盤から TS 細胞を樹立

(A) カニクイザル胎盤から単一細胞を回収し、各種化合物の処理を行い培養することで (B) TS 細胞を樹立した。(C) CK, GATA3, CDH1 の免疫染色により、樹立した細胞はトロホプラスト幹細胞性を有することを確認した。(D) TS 細胞から EVT, Syn-T 細胞への分化誘導を行ったところ、ヒト細胞と同様の形態は見られなかった。

(3) カニクイザルのトロホプラスト細胞の機能評価を行うため、カニクイザル TS 細胞を用いた手法と同時にレンチウイルスベクターを用いたカニクイザル胎盤特異的遺伝子導入法の開発を試みた。レンチウイルスベクターを胚盤胞期胚に感染させることで胎盤トロホプラスト細胞のみに遺伝子導入が可能となる。通常のレンチウイルスベクターをカニクイザル胚に感染させると大部分が死滅してしまうという問題があったが、我々が開発したセンダイウイルス由来因子を導入した改良型レンチウイルスベクターを用いることで、1 ウイルス粒子当たり感染効率を劇的に向上させることに成功した。これによりカニクイザル胚に感染させるウイルス粒子数を抑えることができ、遺伝子導入を高効率に維持したまま胚発生率を改善することに成功した。

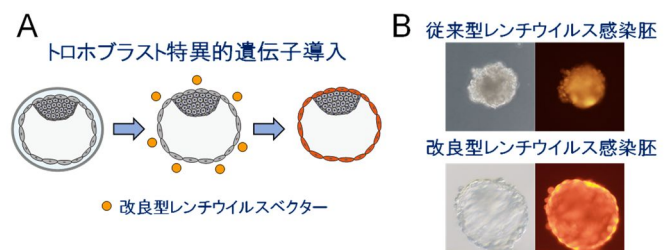


図 2. (A) カニクイザルにおけるレンチウイルスベクターを用いたトロホプラスト細胞特異的遺伝子導入法の開発。(B) 従来型のレンチウイルスを高タイターで感染させた場合、感染のダメージにより死滅することが多かったが、改良型レンチウイルスを用いることで胚発生率を改善させることに成功した。

これらの成果により、霊長類トロホプラスト細胞の機能評価を個体レベルで行える可能性を示し、また霊長類を用いた妊娠高血圧症候群の疾患モデルを作製することが可能となった。

この成果は将来的な臨床的応用への展開が期待されるだけでなく、実験動物としてのカニクイザル受胎率・出産率の向上や、ひいては家畜の生産率の向上へと波及すると考えられる。

<引用文献>

[1] Okae H et al, Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2018 Jan 4;22(1):50-63.e6.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Muto M, Chakraborty D, Varberg KM, Moreno-Irusta A, Iqbal K, Scott RL, McNally RP, Choudhury RH, Aplin JD, Okae H, Arima T, Matsumoto S, Ema M, Mast AE, Grundberg E, Soares MJ.	4. 巻 118(50)
2. 論文標題 Intersection of regulatory pathways controlling hemostasis and hemochorial placentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2111267118.	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 Varberg KM, Iqbal K, Muto M, Simon ME, Scott RL, Kozai K, Choudhury RH, Aplin JD, Biswell R, Gibson M, Okae H, Arima T, Vivian JL, Grundberg E, Soares MJ.	4. 巻 118(10)
2. 論文標題 ASCL2 reciprocally controls key trophoblast lineage decisions during hemochorial placenta development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016517118	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 武藤真長、依馬正次	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学のあゆみ	5. 総ページ数 5
3. 書名 カニクイザル～ヒト橋渡し研究の大本命～	

〔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
---------	---------