

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03072

研究課題名（和文）ヒト胎盤幹細胞を用いた革新的な周産期疾患モデリング

研究課題名（英文）Innovative disease modeling of pregnancy complications using human trophoblast stem cells

研究代表者

岡江 寛明（Okae, Hiroaki）

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：10582695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ヒト胎盤幹細胞（TS細胞）の培養技術を活用し、妊娠高血圧腎症（PE）の発症機構に迫ることである。我々は以前、妊娠初期のヒト胎盤からTS細胞を樹立する手法を確立したが、同様の手法を妊娠中期以降の胎盤に適用することはできなかった。本研究では、SALL4とp53変異体を用いて、妊娠中期以降の胎盤からTS細胞を樹立する手法を確立した。次に、早発型PEよりヒトTS細胞を樹立し、血管新生調節因子の分泌異常や、絨毛外栄養膜細胞の浸潤異常など、PEの表現型を一部再現することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの妊娠合併症は妊娠中期以降に発症するが、これまで妊娠中期以降の胎盤細胞を長期培養することはできなかった。本研究で確立したTS細胞の樹立法は、妊娠中期以降の胎盤にも適用することができるため、疾患の発症機構の解析や、医薬品のスクリーニングへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to investigate the pathogenesis of preeclampsia (PE) using human trophoblast stem cells (TSCs). We previously established TSCs from first-trimester human placentas, but it has not been able to apply the same technique to placentas obtained from later developmental stages. In this study, we established a method to establish TSCs from placentas in late gestation by transiently overexpressing SALL4 and a p53 dominant mutant. Next, we established human TSCs from early-onset PE patients and succeeded in recapitulating some key features of PE, such as abnormal secretion of angiogenic factors and abnormal invasion of extravillous cytotrophoblast cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：胎盤 妊娠高血圧症候群 栄養膜幹細胞（TS細胞）

1. 研究開始当初の背景

胎盤は胎児と母体をつなぐ重要な臓器であり、その異常はさまざまな妊娠合併症の原因となる。私たちは、妊娠初期のヒト胎盤から胎盤幹細胞 (TS 細胞) を樹立することに成功している (Cell Stem Cell 2018)。TS 細胞は、高い増殖能と多分化能を保持しており、正常な胎盤の発生や機能の研究に有用である。しかし、妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞を誘導することが出来なかったため、TS 細胞の培養技術を疾患研究へと応用することは困難であった。本研究では、リプログラミングの手法を用い、妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞を誘導する技術を確立する。さらに、この技術を活用し、代表的な妊娠合併症である妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia: PE) より疾患 TS 細胞を樹立する。本研究で得られる成果は、これまであまり研究が進んでこなかった妊娠合併症の発症機構の解明や治療法の開発へとつながると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、疾患 TS 細胞の作製技術を開発することで、妊娠合併症研究のための全く新しい手法を提供することである。これまで、胎盤異常に起因するヒト疾患の研究には、モデル動物や絨毛癌細胞株、分娩後の胎盤組織などが用いられてきた。しかし、哺乳類の胎盤構造や妊娠期間は種によってきわめて多様であり、動物モデルを用いた研究には限界がある。また、疾患を発症後一定期間経過した胎盤組織を用いてその発症過程を理解することも困難である。実際に、多くの妊娠合併症の発症原因はよく分かっておらず、有効な予防法や治療法も限られている。疾患 TS 細胞を用いて病態を再現することが可能になれば、妊娠合併症の治療法・予防法の開発に大きく貢献すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞を樹立する手法の確立

妊娠初期と中・後期胎盤の遺伝子発現比較から、初期で特異的に発現する転写因子を同定した。次に、同定した転写因子を中・後期胎盤から単離した栄養膜細胞に導入し、TS 細胞の樹立を試みた。また、これらの転写因子に加え、リプログラミング効率を高める作用を持つ MYC や p53 ドミナントネガティブ変異体 (p53DN) などの導入も同時に検討した。

(2) PE に由来する疾患 TS 細胞の樹立と解析

PE は 34 週以前に発症する早発型と、それ以降に発症する遅発型に分類される。早発型は主に胎盤の異常が関与し、重症化しやすい傾向にある。一方、遅発型は母親の遺伝子的要因や環境要因の寄与が大きいと考えられている (Nature Reviews Nephrology 2019)。本研究では、早発型 PE に由来する胎盤組織を用いて、疾患 TS 細胞の樹立を行った。さらに、樹立した疾患 TS 細胞を分化誘導し、PE 患者で見られる血管新生因子の分泌異常や絨毛外栄養膜細胞の浸潤異常が見られるかどうかを解析した。

(3) PE 発症への関与が指摘されている遺伝子の機能解析

ヒト TS 細胞における CRISPR スクリーニングを行い、TS 細胞の増殖や分化に関する遺伝子を同定した。同定した遺伝子のうち、PE 発症に関与する可能性が指摘されている遺伝子について、個別に KO TS 細胞を作製して詳細な機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞を樹立する手法の確立

まず、妊娠初期および満期の栄養膜細胞を単離し、遺伝子発現比較を行った。その結果、初期の栄養膜細胞で特異的に発現する転写因子を 3 種類同定した (HAND1, SALL4, ZFP42)。また、満期の栄養膜細胞は細胞老化を起こしている可能性が示唆された。そこで、同定した転写因子に加え、細胞老化を抑制する作用を持つ p53DN を満期の栄養膜細胞に遺伝子導入した。その結果、SALL4 と p53DN を導入した場合に限り、TS 細胞様の形態を示す細胞株が得られた (図 1)。

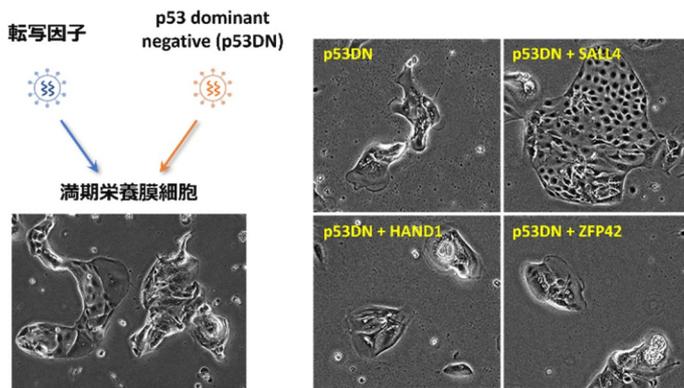


図 1. 満期由来 TS 細胞の樹立。

SALL4 と p53DN を組み合わせることで、満期栄養膜細胞から TS 細胞を樹立することに成功した。

また、この満期由来 TS 細胞の分化能を解析したところ、胎盤を構成する合胞体 (SynT) および絨毛外栄養膜 (EVT) 細胞へと正常に分化することが明らかとなった。また、RNA-seq 解析により、満期由来 TS 細胞と初期胎盤由来の TS 細胞はよく似た遺伝子発現パターンを持つことも確認した。

次に、満期由来 TS 細胞に染色体異常がないかを確認するため、マイクロアレイを用いた SNP 解析を行った。その結果、11 番染色体短腕部位で、高頻度に LOH が観察された (7/11 症例) (図 2)。さらに解析を進めたところ、LOH を示す細胞では、母親由来のアレルが欠損し、細胞周期を負に制御するインプリント遺伝子 KIP2 の発現が抑制されていることを見出した。そこで、SALL4 と p53DN に加え、KIP2 の発現を一時的に抑えるために shKIP2 を満期の栄養膜細胞に導入し、TS 細胞の樹立を行った。その結果、LOH がみられたのは、39 ライン中わずか 4 ラインと著しく減少した。よって、SALL4、p53DN、shKIP2 を組み合わせることで、満期胎盤から質の高い TS 細胞が樹立可能であることが明らかとなった。

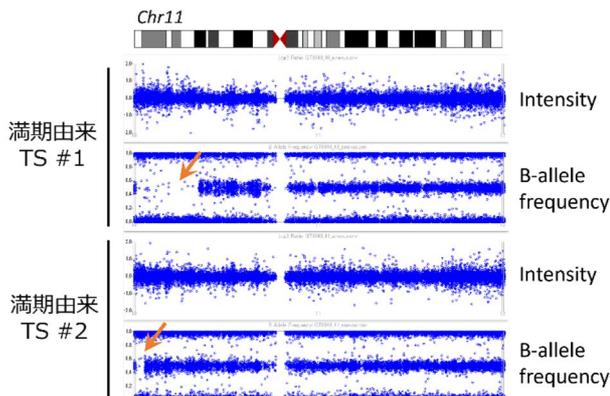


図 2. 満期由来 TS 細胞で観察されたゲノム異常. 11 番染色体短腕部位で、高頻度に LOH (赤矢印) が観察された (7/11 症例)。代表的な 2 例を示す。

(2) 妊娠高血圧症候群に由来する疾患 TS 細胞の樹立と解析

早発型 PE 20 例よりヒト TS 細胞を樹立した。また、コントロールとして、満期胎盤由来の正常 TS 細胞を 14 株樹立した。まず、疾患 TS 細胞を SynT 細胞へと分化誘導し、PE への関与が指摘されている血管新生調節因子 FLT1 および PIGF の分泌量を解析した。その結果、妊娠高血圧腎症に由来するヒト TS 細胞において、PIGF 分泌量の有意な減少が観察された。一方、FLT1 の分泌量は上昇傾向であった (図 3)。この結果は、PE を発症した患者の血中における FLT1 および PIGF 量の異常とよく一致する。また、SynT 細胞のマーカーである hCG の分泌量に差は見られなかったため、疾患 TS 細胞の SynT 細胞への分化に大きな異常はないことが示唆された。PE の発症には、血管調節因子の分泌異常に加えて、絨毛外栄養膜細胞の子宮への浸潤異常が関与すると考えられている。そこで、疾患 TS 細胞を絨毛外栄養膜細胞へと分化誘導したところ、正常 TS 細胞に比べて浸潤能が低い傾向が観察された。以上より、疾患 TS 細胞を用いて PE の病態を一部再現することに成功した。

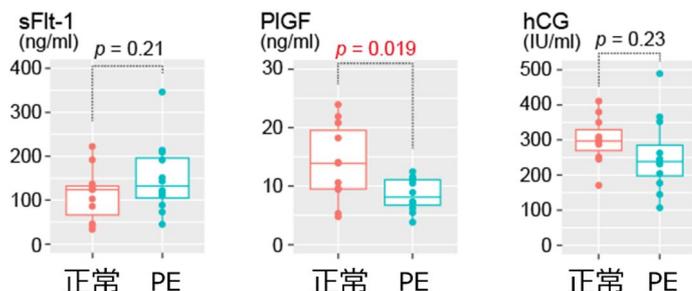


図 3. 疾患 TS 細胞における血管新生調節因子の分泌量. PE 由来の疾患 TS 細胞において、PIGF の分泌量の有意な減少を認められた。

(3) PE 発症に関与する可能性が指摘されている遺伝子の機能解析

ヒト TS 細胞における CRISPR スクリーニングを行い、増殖および分化制御に関わる遺伝子を探索した。まず、マウスの胎盤発生に重要な遺伝子や転写因子を中心とした 850 の遺伝子について gRNA を設計し、Cas9 を恒常的に発現する TS 細胞に導入した。導入した TS 細胞を維持もしくは分化誘導したのち、ゲノム DNA を回収して gRNA 配列を増幅後、次世代シーケンサーを用いて増殖・分化に関与する遺伝子を同定した。同定した遺伝子のうち、PE への関与が指摘されている 2 つの転写因子 (GCM1 および DLX3) に着目し、詳細な機能解析を行った。その結果、両転写因子は SynT 細胞と EVT 細胞の両方の分化に必須であることを確認した。さらに、RNA-seq、ChIP-seq、HiChIPなどを組み合わせることで、GCM1 および DLX3 によって制御される遺伝子群を同定し (図 4)、成果を論文として発表した (PNAS 2023)。

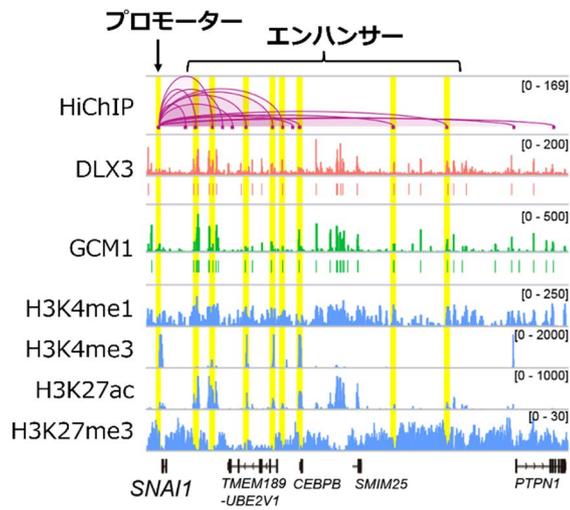


図 4. GCM1 および DLX3 のターゲット遺伝子の予測. GCM1、DLX3 の ChIP-seq、ヒストン修飾の ChIP-seq、H3K4me3 を用いた HiChIP を組み合わせ、ターゲット予測を行った。図は、同定した遺伝子の一つである SNAI1 のゲノム領域を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kuna Marija, Dhakal Pramod, Iqbal Khursheed, Dominguez Esteban M., Kent Lindsey N., Muto Masanaga, Moreno-Irusta Ayelen, Kozai Keisuke, Varberg Kaela M., Okae Hiroaki, Arima Takahiro, Sucov Henry M., Soares Michael J.	4. 巻 120
2. 論文標題 CITED2 is a conserved regulator of the uterine?placental interface	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2213622120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2213622120	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 -
1. 著者名 Kobayashi Eri H., Shibata Shun, Oike Akira, Kobayashi Norio, Hamada Hirotaka, Okae Hiroaki, Arima Takahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Genomic imprinting in human placentation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12490	査読の有無 無
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 Jeyarajah Mariyan J., Jaju Bhattad Gargi, Kelly Rachel D., Baines Kelly J., Jaremek Adam, Yang Fei-Hung P., Okae Hiroaki, Arima Takahiro, Dumeaux Vanessa, Renaud Stephen J.	4. 巻 119
2. 論文標題 The multifaceted role of GCM1 during trophoblast differentiation in the human placenta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2203071119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2203071119	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 Kobayashi Norio, Okae Hiroaki, Hiura Hitoshi, Kubota Naoto, Kobayashi Eri H., Shibata Shun, Oike Akira, Hori Takeshi, Kikutake Chie, Hamada Hirotaka, Kaji Hirokazu, Suyama Mikita, Bortolin-Cavaii? Marie-Line, Cavaii? J?r?me, Arima Takahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30775-w	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

1. 著者名 Muto Masanaga, Chakraborty Damayanti, Varberg Kaela M., Moreno-Irusta Ayelen, Iqbal Khurshheed, Scott Regan L., McNally Ross P., Choudhury Ruhul H., Aplin John D., Okae Hiroaki, Arima Takahiro, Matsumoto Shoma, Ema Masatsugu, Mast Alan E., Grundberg Elin, Soares Michael J.	4. 巻 118
2. 論文標題 Intersection of regulatory pathways controlling hemostasis and hemochorial placentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2111267118
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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,	4. 巻 9
2. 論文標題 ASCL2 reciprocally controls key trophoblast lineage decisions during hemochorial placenta	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 e2016517118.
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Frost Jennifer M., Amante Samuele M., Okae Hiroaki, Jones Eleri M., Ashley Brogan, Lewis Rohan M., Cleal Jane K., Caley Matthew P., Arima Takahiro, Maffucci Tania, Branco Miguel R.	4. 巻 30
2. 論文標題 Regulation of human trophoblast gene expression by endogenous retroviruses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 527 ~ 538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-023-00960-6	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 Kaela M., Dominguez Esteban M., Koseva Boryana, Varberg Joseph M., McNally Ross P., Moreno-Irusta Ayelen, Wesley Emily R., Iqbal Khurshheed, Cheung Warren A., Schwendinger-Schreck Carl, Smail Craig, Okae Hiroaki, Arima Takahiro, Lydic Michael, Holoch Kristin, Marsh Courtney, Soares Michael J., Grundberg Elin	4. 巻 14
2. 論文標題 Extravillous trophoblast cell lineage development is associated with active remodeling of the chromatin landscape	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-023-40424-5	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

1. 著者名 Shimizu Takanori, Oike Akira, Kobayashi Eri H., Sekiya Asato, Kobayashi Norio, Shibata Shun, Hamada Hirotaka, Saito Masatoshi, Yaegashi Nobuo, Suyama Mikita, Arima Takahiro, Okae Hiroaki	4. 巻 120
2. 論文標題 CRISPR screening in human trophoblast stem cells reveals both shared and distinct aspects of human and mouse placental development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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.2311372120	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 Hori Takeshi, Okae Hiroaki, Shibata Shun, Kobayashi Norio, Kobayashi Eri H., Oike Akira, Sekiya Asato, Arima Takahiro, Kaji Hirokazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Trophoblast stem cell-based organoid models of the human placental barrier	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-024-45279-y	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 Shibata Shun, Endo Shun, Nagai Luis A. E., H. Kobayashi Eri, Oike Akira, Kobayashi Norio, Kitamura Akane, Hori Takeshi, Nashimoto Yuji, Nakato Ryuichiro, Hamada Hirotaka, Kaji Hirokazu, Kikutake Chie, Suyama Mikita, Saito Masatoshi, Yaegashi Nobuo, Okae Hiroaki, Arima Takahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Modeling embryo-endometrial interface recapitulating human embryo implantation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.adi4819	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 C19MC is essential for the differentiation potential of hPSCs into trophoblast lineages
3. 学会等名 The 55th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 Critical role of genomic imprinting in human placental development
3. 学会等名 新学術・全能性 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 Unlocking the mysteries of pregnancy with stem cells
3. 学会等名 熊本大学発生医学研究所セミナー(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human PSCs
3. 学会等名 IRCMS seminar "New Horizons in Developmental Biology" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human PSCs
3. 学会等名 熊本大学発生医学研究所セミナー(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田峻、岡江寛明、有馬隆博
2. 発表標題 ヒト胚着床モデル-母胎アセンブロイド-の開発
3. 学会等名 ART FORUM ' 21 生殖の分子機構への新たなアプローチ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡江寛明、有馬隆博
2. 発表標題 生殖医学研究の最前線 進歩し続ける基礎研究
3. 学会等名 66th生殖医学会学術講演会・総会：シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 遺伝子機能にもとづくヒトとマウス胎盤の進化的対応関係の理解
3. 学会等名 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 Disease modeling with human trophoblast stem cells
3. 学会等名 The 18th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 遺伝子からひも解くヒトとマウス胎盤の対応関係
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 ヒトとマウス胎盤の対応関係の理解
3. 学会等名 新学術・全能性 第5回公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡江寛明
2. 発表標題 ヒト栄養膜幹細胞を用いた胎盤研究
3. 学会等名 第4回 有性生殖学会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 柴田峻、岡江寛明、有馬隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院(金原出版)	5. 総ページ数 5
3. 書名 ヒト胎盤発生と幹細胞	

1. 著者名 岡江寛明、有馬隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 ヒト初期発生におけるエピジェネティクス	

1. 著者名 小林枝里、岡江寛明、有馬隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 トロホプラスト幹細胞と展開	

1. 著者名 大池 輝, 小林 枝里, 小林 記緒, 柴田 峻, 岡江 寛明, 北村 茜, 宮内 尚子, 有馬 隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館 / ニューサイエンス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ヒトTS細胞を用いた胎盤疾患モデルの構築	

〔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
研究分担者	柴田 峻 (Shibata Shun) (40885670)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	削除：2023年1月19日

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
---------	---------