

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03792

研究課題名（和文）ヒト胎盤オルガノイドチップによる妊娠高血圧症の病態分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathological molecular mechanisms involved in pregnancy hypertension using human placental organoid chips

研究代表者

吉野 大輔（Yoshino, Daisuke）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80624816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト胎盤構造を模したマイクロ流体デバイス設計・試作し、胎盤絨毛がん細胞株と血管内皮細胞を用いた胎盤オルガノイドをチップ上で構築した。結果として、胎盤絨毛がん細胞株の細胞融合、胎盤絨毛がん細胞株とヒト臍帯静脈内皮細胞が複雑に絡み合った構造の形成、妊娠期特有のタンパク質発現を実現した。不明瞭であった持続的な高血圧刺激に対する血管障害のメカニズムについて、血圧刺激誘導性の血管内皮細胞のアポトーシスの発現とそれに関連するシグナル伝達経路の一部を特定することができた。一方で、胎盤オルガノイドチップの長期安定培養が困難であったために、胎盤や臍帯血管形成不全を誘導するメカニズムの特定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト胎盤を生体外で再現した機能的な実験モデル“ヒト胎盤オルガノイドチップ”を開発し、持続的な高血圧刺激に対する血管障害のメカニズムについて、血圧刺激誘導性の血管内皮細胞のアポトーシスの発現とそれに関連するシグナル伝達経路の一部を特定することができた。このチップと知見を基盤に、高血圧刺激による血管障害とそれに引き起こされる胎盤・臍帯血管形成不全のメカニズムを明らかにすることで、妊娠高血圧症合併症の治療・予防法開発に繋がる標的分子の特定が可能となる。特定した標的分子を中心に新たな治療法が開発できれば、“安全かつ安心な出産”を実現でき、少子高齢化に悩む我が国に多大な貢献が見込める。

研究成果の概要（英文）：We designed and fabricated a microfluidic device that mimics human placental structures and constructed placental organoids on a chip using placental choriocarcinoma cell lines and vascular endothelial cells. As a result, cell fusion of placental choriocarcinoma cell lines, formation of complex structures of placental choriocarcinoma cell lines and human umbilical vein endothelial cells, and pregnancy-specific protein expression were achieved. Regarding the mechanism of vascular damage in response to chronic hypertensive stimuli, which was unclear, we were able to identify the expression of blood pressure stimulus-induced apoptosis of vascular endothelial cells and some of the signaling pathways associated with it. On the other hand, due to the difficulty of long-term stable culture of placental organoid chips, we were unable to identify the mechanisms that induce placental and umbilical vascular dysplasia.

研究分野：メカノバイオロジー、生体医工学

キーワード：胎盤オルガノイド 高血圧 血管障害 マイクロ流体デバイス 静水圧

## 1. 研究開始当初の背景

世界に先駆けて超高齢社会に突入した我が国における最重要課題は国力の維持である。高齢者の健康寿命の延伸により国力の維持を目指した改革に注力されているが、長期的な視点においては人口の減少は免れず、国力は衰退の一途を辿る。この閉塞感が漂う現状を打破し、我が国の長期的な発展を実現するためには、少子化対策の観点において“安全かつ安心な出産”の実現が極めて重要である。医療技術の進歩に伴い、妊産婦と新生児の死亡率は共に極めて低い状態にあるが、20人に1人の割合で発症する妊娠高血圧症は、妊産婦の肝・腎機能障害、脳出血、死亡のみならず、胎児の発育不全と、それに関連した早産や新生児仮死などの重篤な合併症を誘引する。現状、これらの重篤な合併症の割合は増加傾向にある。妊娠高血圧症は母体の高齢化によりリスクが急激に増加するため、高齢出産が増加する我が国においては、妊娠高血圧症の治療法の確立が社会的急務である。妊娠高血圧症の治療法に繋がる疾患機序については様々な研究が進んでおり、母体から胎児に酸素や栄養を供給する胎盤および臍帯血管の形成不全が様々な合併症を引き起こす原因と考えられている (Pathiraja *et al*, *J Diagn Pathol* 2015 など)。しかし、高血圧刺激により胎盤・臍帯血管形成不全を引き起こすメカニズムは未だ明らかになっていない。胎盤と臍帯血管への酸素・栄養供給を担う母体血管の機能障害と高血圧刺激の関係を明らかにすることが、このメカニズム解明の糸口となり得る。

血管細胞の血圧応答 (メカノレスポンス) の研究は、黎明期から過渡期への移行期であり、先行研究において血圧刺激による血管新生や血管死の誘導が確認されている (Schwartz *et al*, *Circ Res* 1999; Prystopiuk *et al*, *J Cell Sci* 2018 など)。しかし、力学刺激としての血圧の実態が不明瞭であることが、血圧刺激の細胞応答に関する研究を現象論的なものに留めていた。我々はこれまでに、血圧刺激に対する血管恒常性制御の分子メカニズム (Yoshino *et al*, *Commun Biol* 2020) の大部分を明らかにし、血圧刺激の条件により血管内皮バリア障害や血管新生抑制、血管死の誘導が可能であることを確認した。これらの結果は高血圧刺激に起因する母体血管障害に繋がる重要な知見である。

これまでの知見を総合して、高血圧刺激により生じる母体側の血管障害が胎盤・臍帯血管形成不全を引き起こし、それに伴い発生する虚血状態や酸素・栄養供給不足が胎児発育不全に繋がることが妊娠高血圧症の実態と仮説を立てた。この仮説の検証、すなわち、疾患機序の解明には、妊娠高血圧症のモデル化と高血圧刺激による血管障害発生の分子メカニズムの解明が必要不可欠である。しかし、胎盤構造が動物種によって異なり、妊娠自体が母体に劇的な変化を起こす現象のため疾患モデルの確立が困難な現状にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、胎盤環境を胎盤細胞と血管細胞で再現するヒト胎盤オルガノイドチップを開発し、妊娠高血圧症の *in vitro* モデルを確立する。血圧刺激の実態を正確に把握した上で、妊娠高血圧症における胎盤・臍帯血管形成不全の分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

目的の達成に向け、下記の3つの研究項目を設定した。

(項目1) 妊娠高血圧症を再現するヒト胎盤オルガノイドチップの開発

ヒトの胎盤機能を有する3次元オルガノイドをポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のコインサイズのチップ上に再現することを試みた。開発した胎盤オルガノイドチップと独自に開発した流れ負荷培養系 (Yoshino *et al*, *J Biomech Sci Eng* 2013) と静水圧顕微鏡法 (Yoshino *et al*, *Commun Biol* 2020) を組み合わせることで、血行力学環境を精密に制御可能な妊娠高血圧症の *in vitro* モデルを構築した。

(項目2) 高血圧刺激に対する血管障害メカニズムの解明

血管内皮細胞の血圧刺激感知・応答機構の時空間的变化に着目して、高血圧刺激により血管障害が発生するメカニズムを明らかにすることに取り組んだ。静水圧負荷培養装置を用いて、50 mmHg の静水圧を短時間 (3 時間負荷, 21 時間静置) と長時間 (24 時間負荷) の2種類のモー

ドで血管内皮細胞に負荷し、血圧応答に関わるタンパク質の活性動態を解析した。

### (項目 3) 高血圧環境下の胎盤・臍帯血管形成不全の分子メカニズムの解明

開発した胎盤オルガノイドチップ内の母体血管に高血圧刺激を負荷し、胎盤構造や臍帯血管網の形成動態を観察し、血管恒常性制御の分子メカニズムの時空間変容を中心に解析することで胎盤や臍帯血管形成不全を誘導するメカニズムの特定を試みた。

## 4. 研究成果

### (項目 1) 妊娠高血圧症を再現するヒト胎盤オルガノイドチップの開発

ヒトの胎盤構造を模したマイクロ流体デバイスを設計・試作した。胎盤中の母体血管と胎児血管の接続部に相当する絨毛間腔に焦点を当て、中央部に絨毛間腔を模擬したジグザグ型の流路を配置し、その外側に母体血管と胎児血管を模擬する流路を有する 2 種類のデバイスを設計試作した。(図 1)。試作した胎盤構造を再現したマイクロ流体デバイスの絨毛間腔に相当する部分にコラーゲンゲルあるいは Matrigel を注入し、漏れや気泡が混入しないことを確認した(図 2)。さらに、胎盤絨毛がん細胞株とヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、オルガノイドチップ構築のための培養条件を最適化した。胎盤絨毛がん細胞株の細胞融合を確認し、胎盤絨毛がん細胞株とヒト臍帯静脈内皮細胞が複雑に絡み合った構造を作製することに成功した。また、妊娠期特有のタンパク質発現も確認できた。一方で、絨毛間腔様の構造の再現は困難であったため、プロトコル最適化の面で課題が残っている。

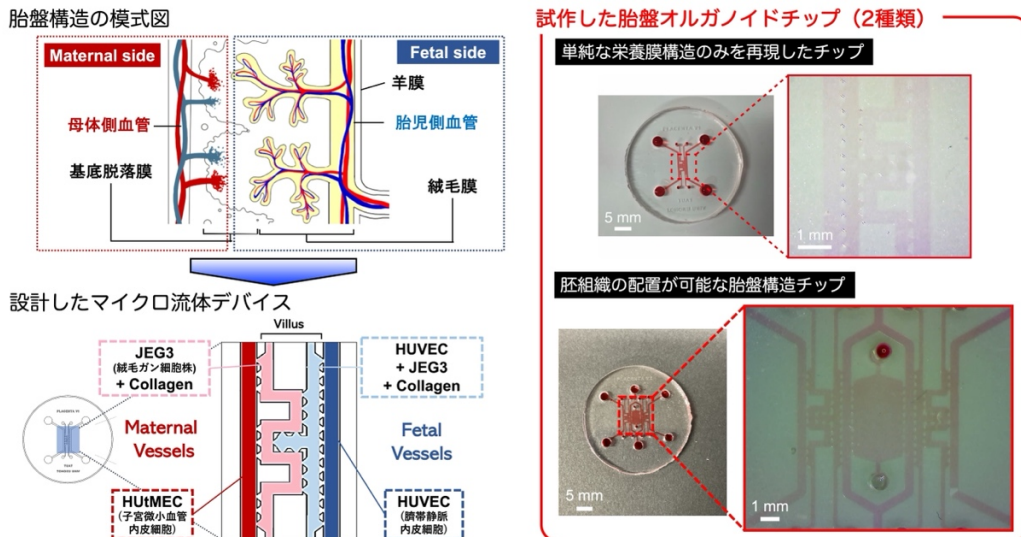


図 1: 設計・試作した 2 種類の胎盤オルガノイドチップ

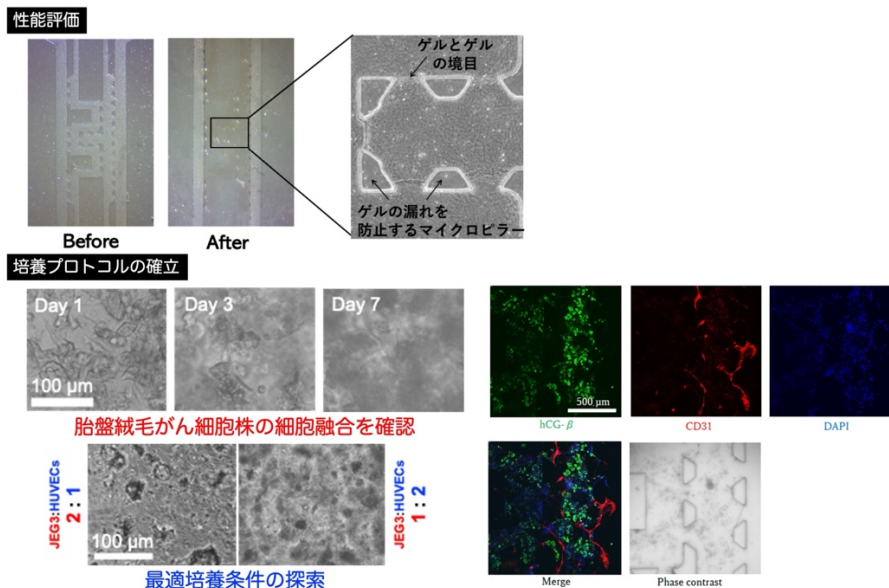


図 2: 試作した胎盤オルガノイドチップの性能評価・培養プロトコルの確立。(上段) Matrigel やコラーゲンゲルなどの ECM を用いた 3 次元細胞塊の培養がチップ状で可能であることを確認。(下段) 胎盤絨毛癌細胞株の融合や妊娠期特有のタンパク質 (hCG-β) 発現の確認。

## (項目 2) 高血圧刺激に対する血管障害メカニズムの解明

これまで不明瞭であった持続的な高血圧刺激に対する血管障害のメカニズムについて、血圧刺激誘導性のアポトーシスの発現とそれに関連するシグナル伝達経路の一部を特定することができた (図 3)。高血圧刺激の負荷時間が 12 時間を超えたあたりから、細胞質に局在したままの ERK 活性が認められた。持続的な高血圧刺激に対する活性型 ERK の局在を評価し、細胞質局在性の ERK 活性が血圧刺激負荷後 12 時間以降に起こることを確認し、慢性高血圧における血管死の誘導の制御因子として ERK1/2 が重要な役割を担うことがわかった。また、Bax や Bad などのアポトーシス促進性のタンパク質についてはそれらの発現や活性に血圧刺激による影響がない。一方で、アポトーシス抑制性のタンパク質である Bcl-2 については血圧刺激によって発現上昇が抑制されることがわかった。Bcl-2 ファミリーは、アポトーシス抑制性のタンパク質 (Bcl-2、Bcl-xL) とアポトーシス促進性のタンパク質 (Bax、Bad、Bid、Bik、Bim) の相対的な存在比が細胞のアポトーシスに対する感受性を決定することが知られている。この知見に基づき、持続的な血圧刺激による Bcl-2 の機能の抑制によって、存在比が変化し、Caspase-3 の活性による血管内皮細胞のアポトーシスの誘導を抑制できなくなった可能性があるかと結論づけた。

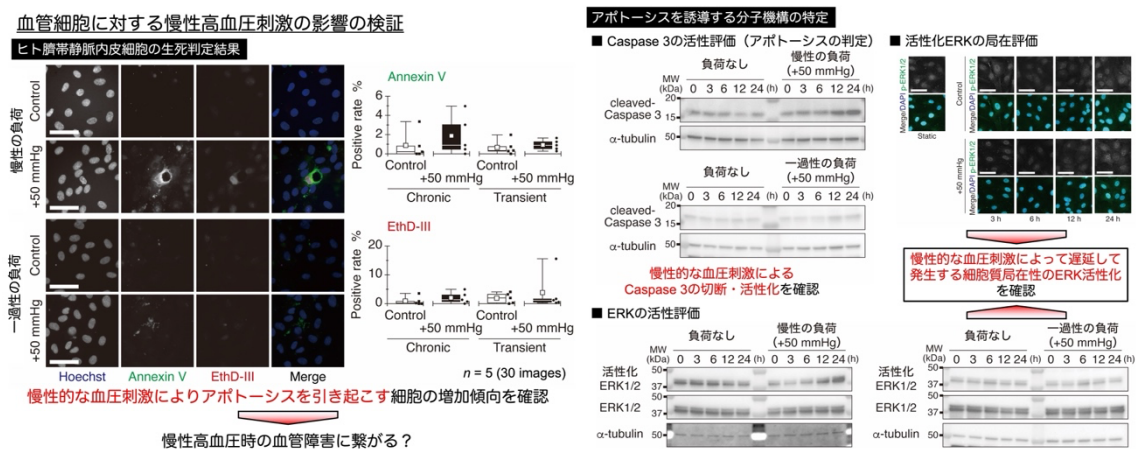


図 3: 慢性の高血圧刺激により血管障害が引き起こされる分子メカニズムの一端。

## (項目 3) 高血圧環境下の胎盤・臍帯血管形成不全の分子メカニズムの解明

開発に取り組んだヒト胎盤オルガノイドチップと静水圧負荷培養系の組み合わせによる実験系の構築を試みたが、臍帯血管を模倣した血管網構造を長期に維持することが困難であった。そのため、培養条件 (特に培養液の組成) の最適化による実験系の安定性向上に取り組むことを余儀なくされた。依然として 5 日間を超える培養が難しいため、引き続き培養条件の最適化に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 吉野大輔	4. 巻 38
2. 論文標題 血管内皮細胞は静水圧をどのように感知・伝達するのか？	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 293-297
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 無
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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 吉野大輔
2. 発表標題 生体にとっての「静水圧」とは何か？を正常と異常の観点から紐解く
3. 学会等名 第36回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sasaki Makoto, Funamoto Kenichi, Yoshino Daisuke
2. 発表標題 Spatial gradient of fluid shear stress prolongs nuclear translocation of nuclear factor-kappa B
3. 学会等名 Twentieth International Conference on Flow Dynamics (ICFD2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木真、船本健一、吉野大輔
2. 発表標題 血行力学刺激に支配される血管内皮メカノ炎症制御機構の解明
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野大輔
2. 発表標題 血圧刺激が血管新生を促進するメカニズムの解明
3. 学会等名 高血圧フォーラム2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daisuke Yoshino
2. 発表標題 Hydrostatic pressure regulates vascular endothelial integrity through differential activation of the ERK pathway
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉野 大輔
2. 発表標題 静水圧環境下の血管内皮細胞動態
3. 学会等名 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Yoshino
2. 発表標題 Mechanism driving hydrostatic pressure-induced endothelial tube formation
3. 学会等名 The 2nd Joint Meeting of ESCHM-ISCH-ISB (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究 分担者	郷 勇人  (Go Hayato)  (30443857)	福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授   (21601)	
研究 分担者	船本 健一  (Funamoto Kenichi)  (70451630)	東北大学・流体科学研究所・准教授   (11301)	

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