

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04852

研究課題名（和文）妊娠高血圧症候群の発症機序の解明に向けたヒト栄養膜細胞の血管浸潤モデルの開発

研究課題名（英文）Development of human trophoblast invasion models to elucidate the mechanisms of hypertensive disorders of pregnancy.

研究代表者

堀 武志（Hori, Takeshi）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：30808829

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠高血圧症候群は妊婦死亡や周産期死亡の原因となりうる疾患であるが発症メカニズムについては不明な点が多い。正常な胎盤では絨毛外栄養膜細胞（EVT細胞）によって母体血管のリモデリングが行われ、拡大した血管を通して豊富な血液が胎盤に供給される。この血管リモデリングが正常に行われないと妊娠高血圧症候群発症のリスク因子となると考えられている。しかし、血管リモデリングを詳細に解析する有用な細胞培養ツールが存在していない。本研究では、マイクロ流体デバイス内で、血管網とヒト栄養膜幹細胞（TS細胞）から分化させたEVT細胞を共培養することにより、血管リモデリングを生体外で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

本研究で開発したin vitroモデルは、EVT細胞がどのように血管リモデリングを行うのかを詳細に解析する上で大変重要である。血管リモデリングの不全は、正常な胎盤形成の妨げになり、妊娠高血圧症候群の発症や低出生体重児の出産に繋がる可能性がある。今後、本モデルを使用することにより、どのような医薬品や病原体が血管リモデリングに影響を及ぼし、母体と胎児に有害となる可能性があるのかを評価することが可能になるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hypertensive disorders of pregnancy (HDP) can lead to maternal and perinatal mortality, yet the mechanisms underlying their onset remain largely unclear. In a normal placenta, extravillous trophoblasts (EVT) remodel maternal spiral arteries, facilitating the supply of abundant blood to the placenta through these expanded vessels. It is suggested that failure of this vascular remodeling may trigger HDP. However, there has been a lack of effective in vitro cell culture models to analyze these processes. In this study, we successfully recapitulated vascular remodeling in vitro by co-culturing vascular networks and EVT cells differentiated from human trophoblast stem (TS) cells within a microfluidic device.

研究分野：医工学

キーワード：栄養膜幹細胞 TS細胞 絨毛外栄養膜細胞 EVT細胞 妊娠高血圧症候群 生体模倣システム in vitro 細胞培養モデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 創薬や生命現象を解明するために、ヒトの組織・臓器の機能と構造を模倣した3次元細胞培養モデル(Organ-on-a-chip, オーガンチップデバイス)の研究開発が現在活発に行われている。活発な開発の背景には、従来からあるシャーレ内での細胞培養や動物実験では解析・解明することのできないヒトの生命現象が多々存在することが明らかになってきたことがある。これまで開発されたオーガンチップデバイスには肺モデルのLung-on-a-chip (Huh D et al., Science. 328, 5986, 1662-8, 2010)等があり創薬や基礎研究において重要な役割を果たしてきている。しかし、オーガンチップデバイスの開発が十分でない臓器も存在し、胎盤はその一つである。

(2) 胎盤は、ヒトと動物で構造や構成細胞が異なる臓器であり、また、出産前の入手が困難な臓器である。そのため、胎盤における生命現象の解明、発達のメカニズム、病態発生のメカニズムを解明するためには、ヒト胎盤チップデバイスの開発が極めて重要となる。胎盤に関連した疾患として妊娠高血圧症候群がある。妊娠高血圧症候群は妊娠20週から産後12週の高血圧となる疾患である。およそ20人に1人の割合で起こるとされており、妊婦死亡や周産期死亡の主要な原因である。この病気の発生機序として、胎盤内のらせん動脈の形成不全が起こり胎盤への血流が阻害され、それを感知した母体が胎盤(胎児側)へ栄養を送る目的で血圧を高くすると考えられている。正常では、胎盤細胞の一種である絨毛外栄養膜細胞(EVT細胞)が母体のらせん動脈に入り込み、その動脈を拡大させる「血管リモデリング」が起き、これによりらせん動脈が太くなり多量の血液が胎盤へ送られる。この血管リモデリングの障害が妊娠高血圧症候群の原因になっている可能性があるが、未だに実証されておらず、このメカニズムを実証するための胎盤モデルの開発が望まれている。

(3) 上記の血管リモデリングのメカニズムの研究を、生体組織を用いて行う場合、胎盤組織のみならず子宮内膜の血管組織も解析しなければならず、母体を傷つけるという倫理的問題から研究数が極めて限られている。そのため、EVT細胞の血管への移動・侵入の様子や、その動態を制御している要因についてはほとんど知られてない。ヒト胎盤に類似した胎盤チップデバイスを作製し、EVT細胞の制御因子を見つけることが課題である。

2. 研究の目的

ヒト栄養膜幹細胞(TS細胞)を用いて、生体内と同等の機能を持ったEVT細胞を作製し、これを新たに設計するマイクロ流体デバイス(チップデバイス)内で血管内皮細胞と共培養することにより、EVT細胞の動態とそれを制御している因子を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイス内でEVT細胞と血管内皮細胞の共培養

EVT細胞による血管リモデリングを再現するために、まず、単層型のマイクロ流体デバイス内で灌流可能な血管網を作製した。このマイクロ流体デバイスは単層であり3つの流路を備えている。中央の流路にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)とフィブリンゲルを混合した溶液を導入した。2つのサイド流路(左右の流路)には培地を導入した。4-5日間培養すると灌流可能な三次元的な血管網が形成された。次に、ヒトTS細胞由来のEVT細胞をウェルプレート内で用意した。EVT細胞をウェルプレートから剥がし、懸濁させ、そのEVT懸濁液をサイド流路の一方へ導入した。導入後、EVT細胞の動態を蛍光顕微鏡下で観察した。

(2) EVT細胞による管腔形成

生体内では、EVT細胞による血管リモデリングの結果として、EVT細胞の管腔が形成される。これを再現するために2層型のマイクロ流体デバイスを開発した。このデバイスは、下層に灌流可能な血管網を作製することができ、上層にはEVT細胞の塊を設置することができるデザインをしている。下層と上層の間にはマイクロメッシュシートを挟んだ。このメッシュシートの表面張力を利用することにより、下層の流路へ血管内皮細胞を導入する時に、細胞が上層へ移行するのを防ぐことができる。また、EVT細胞塊を上層へ載せた後は、EVT細胞が徐々にメッシュシートの開口部を通過し、下層の血管網へ移動することができるデバイスデザインとした。

(3) EVT細胞の血管内皮細胞側への遊走の解析

EVT細胞が血管内皮細胞方向へと移動する現象を定量的に解析するために、EVT細胞塊を配置する流路と、血管内皮細胞を培養する流路を備えたマイクロ流体デバイスを作製した。この流体デバイスの中央流路(レーン)にはEVT細胞塊とマトリゲル/コラーゲンゲル(細胞外基質)を導入した。左右の流路の一方に血管内皮細胞と培地を導入し、もう一方には培地のみを導入した。中央の流路とサイドの流路はマイクロポストによって隔てられているが、細胞はこのポストの間を通過することができるように設計されている。

(4) ヒト胎盤絨毛オルガノイドの作製

胎盤内では、妊娠期間に伴い絨毛が成長する。絨毛が成長し脱落膜に接触すると、絨毛内部から EVT 細胞が生じると考えられている。EVT 細胞が絨毛から発生するメカニズムを調べるための有用な細胞培養モデルはこれまで存在していなかった。そのため、まず、絨毛を模倣した胎盤絨毛オルガノイドの作製を試みた。アガロース製のマイクロウェルプレート内に TS 細胞を播種し、細胞塊を作製した。その細胞塊を 3 種類の培地を用いて合計 8 日間培養した。すなわち、PreM (0.15% BSA, 50 units/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 1% ITS-X, 1% KSR, 0.2 mM L-ascorbic acid, 2.5 μ M Y-27632, 25 ng/mL EGF, 20 ng/mL BMP4, 50 ng/mL bFGF, 0.1 μ g/mL heparin, 2 μ M CHIR99021, 2 μ M SB202190 を含有した DMEM/F12)、W-DM (0.15% BSA, 50 units/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 1% ITS-X, 1% KSR, 0.2 mM L-ascorbic acid, 2.5 μ M Y-27632, 25 ng/mL EGF, 20 ng/mL BMP4, 50 ng/mL bFGF, 0.1 μ g/mL heparin, 0.5 μ M CHIR99021, 2 μ M SB202190 を含有した DMEM/F12)、S-DM (10% FBS, 50 units/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin を含有した DMEM/F12)を用いた。

4. 研究成果

(1) EVT 細胞と血管内皮細胞(HUVEC)の共培養

マイクロ流路デバイス内で HUVEC から成る血管網を作製し、そのデバイス内に、TS 細胞から誘導した EVT 細胞の懸濁液を導入した。その結果、個々のシングルセル状態の EVT 細胞が凝集して塊を形成し、さらに、その EVT 細胞の集合体が HUVEC 血管網に入り込んで行く様子を観察することができた。この現象は、EVT 細胞による血管リモデリングに類似していた。

(2) EVT 細胞による管腔形成

生体内では EVT 細胞が HUVEC 血管網に浸潤し、EVT 細胞から成る管腔が形成される。この管腔を *in vitro* で再現するために、2 層型のデバイスを作製した。下層に HUVEC 血管網を作製し、上層に TS 細胞から分化誘導した EVT 細胞の塊を載せた。その結果、EVT 細胞は下層の血管網へ浸潤した。共焦点顕微鏡を用いた解析により、浸潤した EVT 細胞から成る管腔構造を一部確認することができた。さらに、蛍光ビーズをデバイス内に導入し、溶液の流れを確認した結果、EVT 細胞から成る管腔部分に溶液を灌流することができることが明らかになった。

(3) EVT 細胞の HUVEC 方向への移動

(1)と(2)の実験により、EVT 細胞が HUVEC のある方向へと移動する現象を確認することができた。この移動を定量的に解析するために、EVT 細胞塊の移動を観察しやすくした 1 層型のマイクロ流体デバイスを作製した。このデバイスは 3 本並んだ流路を有する。流路と流路の境界は一部マイクロポストとした。EVT 細胞塊を中央の流路に入れ、左右の流路の一方には HUVEC と培地を、もう一方の流路には培地のみを入れた。その結果、EVT 細胞の HUVEC 方向への移動を定量的に解析することができ、コントロールと比較して有意差のある移動であることが明らかになった。

(4) ヒト胎盤オルガノイドの作製

アガロースマイクロウェル上に TS 細胞を播種し、8 日間培養した結果、胎盤オルガノイドを作製することができた。凍結切片を作製し内部の細胞の配置を免疫染色により解析した。その結果、オルガノイドの表面に合胞体性栄養膜細胞が存在することが明らかになった(図 1)。また、走査電子顕微鏡 (SEM) で観察した結果、オルガノイド表面の合胞体性栄養膜細胞には微絨毛が多く存在していた。さらに、細胞融合が生じていることを透過型電子顕微鏡 (TEM) で確認することができた。

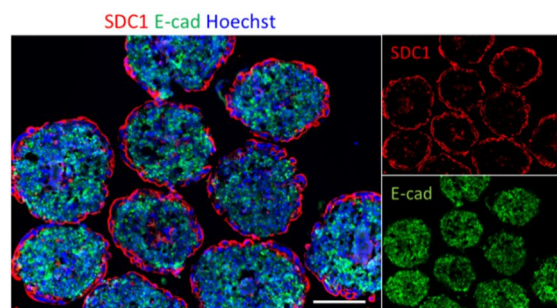


図 1: ヒト胎盤絨毛オルガノイドの凍結切片の免疫染色画像

SDC1(合胞体性栄養膜細胞のマーカー蛋白質)、E-cad(E-カドヘリン、未分化 TS 細胞のマーカー蛋白質)、Hoechst(核)。スケールバー: 200 μ m。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nashimoto Yuji, Hori Takeshi, Ostrovidov Serge, Katagiri Sayaka, Kaji Hirokazu	4. 巻 35
2. 論文標題 Engineering Oral Microenvironments Using Microphysiological Systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1293 ~ 1293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM4164	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 1
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 堀 武志、梶 弘和	4. 巻 57
2. 論文標題 “Organ on a chip” の外科・代謝栄養学への応用の可能性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of SURGICAL METABOLISM and NUTRITION	6. 最初と最後の頁 85 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11638/jssmn.57.4_85	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 -
1. 著者名 Goncalves Ines M., Rodrigues Raquel O., Moita Ana S., Hori Takeshi, Kaji Hirokazu, Lima Rui A., Minas Graça	4. 巻 26
2. 論文標題 Recent trends of biomaterials and biosensors for organ-on-chip platforms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioprinting	6. 最初と最後の頁 e00202 ~ e00202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bprint.2022.e00202	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 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-Cavaill? Marie-Line, Cavaill? 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 Carvalho Violeta, Goncalves Ines, Lage Teresa, Rodrigues Raquel O., Minas Graca, Teixeira Senhorinha F. C. F., Moita Ana S., Hori Takeshi, Kaji Hirokazu, Lima Rui A.	4. 巻 21
2. 論文標題 3D Printing Techniques and Their Applications to Organ-on-a-Chip Platforms: A Systematic Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 3304 ~ 3304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s21093304	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安藤萌, 堀 武志, 山本茜, 北野勇, 石原甲平, 水田太郎, 吉田昭太郎, 梨本裕司, 梶弘和
2. 発表標題 マイクロメッシュシートを利用した灌流可能な三次元血管網の開発
3. 学会等名 日本機械学会第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 堀 武志
2. 発表標題 ヒト栄養膜幹細胞を用いた三次元培養モデルの作製とその利用
3. 学会等名 第 41 回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤萌, 堀 武志, 山本茜, 北野勇, 石原甲平, 水田太郎, 吉田昭太郎, 梨本裕司, 梶弘和
2. 発表標題 灌流可能な人工血管網を作製するためのカラム型デバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会 (CHEMINAS 48)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 リー ジアユンライアン, 堀 武志, 岡江 寛明, 梨本 裕司, 有馬 隆博, 梶 弘和
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いたヒト胎盤モデルにおける灌流依存的細胞分化の解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会 (CHEMINAS 48)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 JIANG BIN, 堀 武志, 岡江 寛明, 大杉 勇人, 片桐 さやか, 梨本 裕司, 有馬 隆博, 梶 弘和
2. 発表標題 ヒト胎盤オルガノイドの作製と病原体曝露の影響の解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会 (CHEMINAS 48)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Hori
2. 発表標題 Microphysiological systems and 3D cell cultures for accelerating human placenta research.
3. 学会等名 第7回生体医歯工学共同研究拠点国際シンポジウム (ISBE2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hori T, Okae H, Kobayashi N, Arima T, Kaji H
2. 発表標題 A trophoblast stem cell-based model of the human placental barrier.
3. 学会等名 MicroTAS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木淳也, 堀武志, 岡江寛明, 有馬隆博, 梶弘和
2. 発表標題 微細加工技術を用いたヒト胎盤オルガノイドの作製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 武志
2. 発表標題 ヒト胎盤関門MPSの構築
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024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	梶 弘和 (Hirokazu Kaji) (70431525)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	

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