

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15098

研究課題名（和文）ヒト胚発生過程を可視化する多階層幹細胞オルガノイドモデルの創出

研究課題名（英文）Creation of a Stem Cell-based Organoids for Visualizing Human Embryonic Development

研究代表者

柴田 峻（Shibata, Shun）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40885670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新たに創出したアピカルアウトの子宮内膜オルガノイドとヒトナীব型ES細胞から誘導したブラストイドを、三次元下で共培養することで、ヒト胚着床過程を可視化する多階層幹細胞アセンブロイドを確立した。また、本モデルを用いた解析により、着床における子宮内膜細胞の役割と胚浸潤過程での母体との相互作用の分子メカニズムの一端を解明することに応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体を反映した胚構成幹細胞、子宮内膜（幹）細胞を三次元オルガノイド培養技術で組み合わせ、従来の不死化細胞株や二次元培養を用いたアッセイよりも、さらに正確にヒト胚の着床進展機構を模倣し、多くの知見を得ることを可能にした。この点が、これまでに報告のない学術的価値と独創性を示す内容である。また、その成果は、倫理的な制約のために「ブラックボックス」となっていたヒト初期胚発生機構の理解を広げ、さらには、流産、着床障害など妊娠初期の異常に対する治療の標的や治療戦略を創出することにも繋がると予想される。

研究成果の概要（英文）：In this research, we established a multi-tiered stem cell assembloid that visualizes the human embryo implantation process by co-culturing newly created apical-out endometrial organoids with blastoids derived from human naive-type ES cells in three dimensions. Furthermore, through analysis using this model, we applied it to elucidate aspects of the molecular mechanism of interaction between the endometrial cells' role during implantation and the maternal environment during the embryo invasion process. This innovative approach offers unprecedented insights into the complex dynamics of early human development and opens new avenues for studying the intricate mechanisms of embryo implantation, potentially leading to advancements in reproductive medicine and fertility treatments.

研究分野：分子生物学

キーワード：TS細胞 ES細胞 子宮内膜 胎盤発生 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

受精卵より形成されたヒト胚盤胞は、受精後 6-7 日頃に、子宮内膜上に着床する。その後、ヒト胚は母体子宮内膜内に深く埋没する (図 1)。胚は、そのゲノムの半分が母体に対し異物であるが、胚特異的な抗炎症環境が構築され、母体に受容される。ヒト胚発生の分子機構に関する知見の大部分はマウスを中心とした動物モデルを用いた解析により得られている。しかしながら、胚発生における着床機構は、ヒトと動物では大きく異なる。これまで、受精卵が子宮内膜に着床するには、最適の時期があり、少しでもずれていると着床が難しいため「implantation window (着床の窓)」と呼ばれ、このプロセスは、様々な分子が関与することが報告されている (Quinn CE. Hum Reprod Update 2009)。しかし、倫理的な制約もあり、その分子機構はほとんど明らかではない。

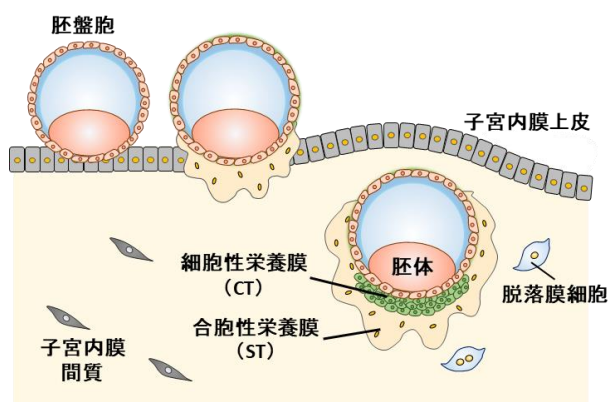


図 1 ヒト胚着床と多様な母体-胚間相互作用
ヒト胚は着床後、子宮内膜組織に深く埋没し、母体細胞と多様な相互作用を示す。

2. 研究の目的

「どのような分子メカニズムによりヒト胚発生、すなわち着床過程が成立するのか」について、ヒト TS 細胞、ES 細胞と子宮内膜幹細胞を混合・三次元培養を行うことで、子宮内での胚発生過程を連続的に解析可能な胚-母体オルガノイドを創出し、理解することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト胚モデルの作製 (プラストイド) :

胚モデルについては、先行研究に基づきナイーブ型ヒト ES 細胞を用いて胚盤胞様構造 (プラストイド) の作製を行った。

(2) 性周期を反映した性ホルモン応答性の子宮内膜モデルの確立 :

手術摘出後のヒト子宮組織を細切・酵素処理により、子宮内膜上皮および間質細胞を単離した。子宮内膜上皮および間質細胞をゲル内で混合培養し、エストロゲンおよびプロゲステロン添加により、ホルモン応答能 (子宮内膜上皮マーカー : PAEP および PR、脱落膜化マーカー : PRL および IGFBP1) を免疫染色により確認した。作製したモデルについて、シングルセル RNA-seq を行い、モデル内の細胞集団を同定し、生体子宮内膜組織・培養胚盤胞データとの統合により比較解析を行い、モデルを評価した。

(3) ヒト胚-母体オルガノイドの作製

作製した子宮内膜モデルとヒトプラストイドモデルを三次元的に共培養し経時的に初期胚関連マーカーの発現や浸潤・分化について組織学的解析を用いて確認した。最適化した条件にてまた、蛍光タンパク質を発現する胎児由来の細胞由来の疑似胚盤胞（プラストイド）と子宮内膜細胞を共培養し、経時的観察を行い、胚着床アセンブロイドモデルの構造形成過程の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胚モデルの作製：

着床前に相当するナイーブ型ヒト ES 細胞を用いて安定的に疑似胚盤胞（プラストイド）の作製を行った。また、培養中も細胞が識別できるような蛍光タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立し、蛍光による追跡を可能とした。

(2) 子宮内膜モデルの作製：

複数ドナー由来の子宮内膜上皮オルガノイドの樹立と間質細胞の単離に成功した。これに子宮内膜間質細胞や HUVEC を混合し、三次元培養を行った。免疫染色によりマーカーの発現を確認した後、RNA-seq および snRNA-seq を行った。その結果、子宮内膜モデルは、ホルモン応答性を保有しており、空間的配置と構成細胞が生体子宮内膜組織と類似していることがわかった (図 2)。また、ELISA により着床期特異的分泌タンパク質であるグリコデリン量を定量したところ、従来の子宮内膜オルガノイドと比して、本モデルは、その分泌量が高く、成熟度の高さが示唆された。さらに、子宮内膜モデル内には、管腔構造を有する血管網が形成され、子宮内膜オルガノイドの血管化に成功した。

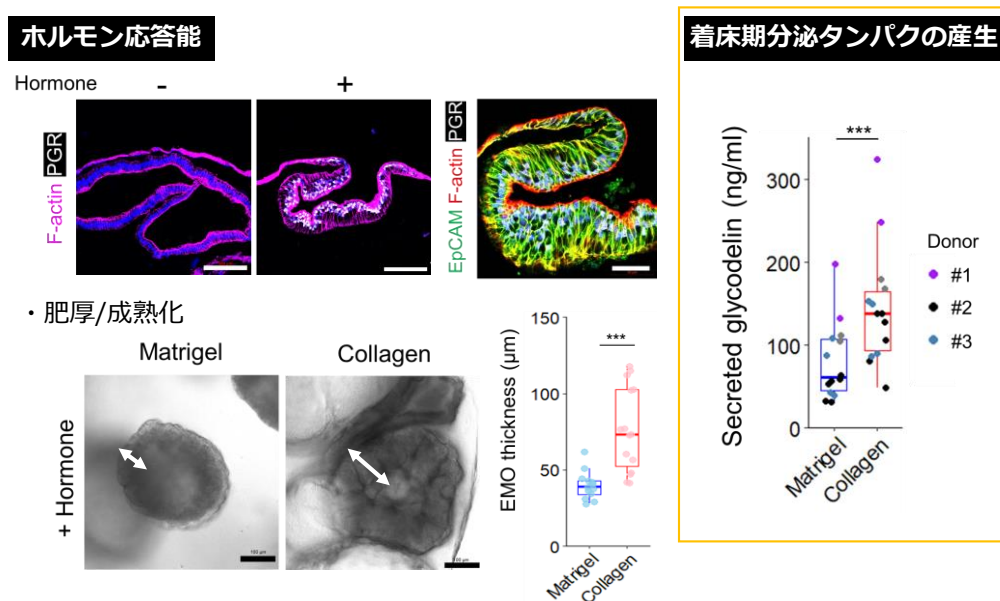


図 2 アピカルアウトを示す子宮内膜オルガノイドモデル

(3) 胚モデルおよび子宮内膜モデルの共培養：

上記の疑似胚盤胞と子宮内膜モデルの共培養を行った。疑似胚盤胞が子宮内膜モデルに接着した後、子宮内膜上皮バリアを破壊し、内部に浸潤することを確認した (図 3)。本研究の内容は、Science Advances に論文掲載された (Shibata S et al. Science Advances. 2024. DOI: 10.1126/sciadv.adi4819)。

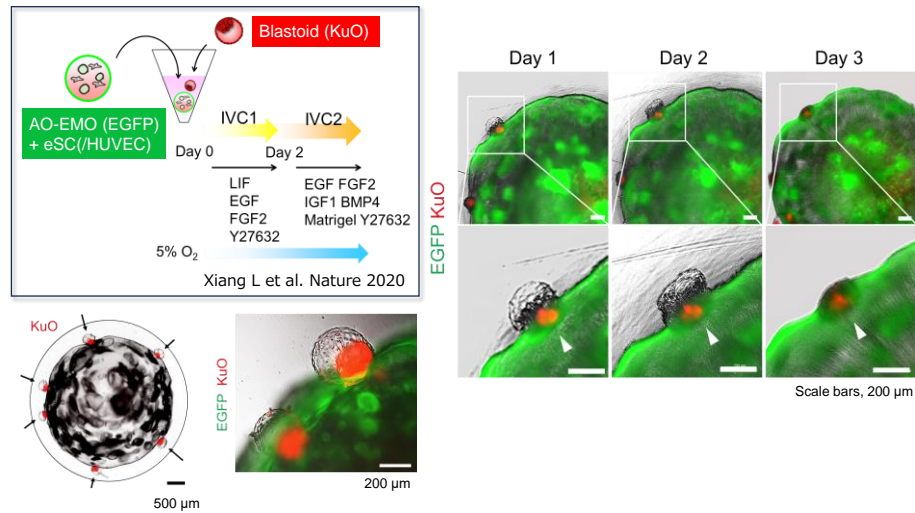


図 3 ヒトブラストイドと子宮内膜モデルの三次元下での共培養
通常 (ヒト) は胚の ICM 側から接着 (polar attachment) する。本研究のブラストイドモデルは、子宮内膜モデルに正常な対位で接着後、内部に浸潤する (Shibata S et al. Science Adv. 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

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 Jrime, 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 -
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 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 -
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 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 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 e2311372120
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 該当する

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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 遠藤俊, 柴田峻, 大池輝, 小林枝里, 岡江寛明, 有馬隆博
2. 発表標題 マルチオミックス解析による妊娠高血圧症候群の胎盤特性
3. 学会等名 第30回日本胎盤学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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 Shun Shibata, Luis A. E. Nagai, Akira Oike, Eri H. Kobayashi, Norio Kobayashi, Ryuichiro Nakato, Mikita Suyama, Hiroaki Okae, Takahiro Arima
2. 発表標題 Modeling Embryo Endometrial Interface Recapitulating Human Embryo Implantation.
3. 学会等名 IHEC2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有馬 隆博、柴田峻
2. 発表標題 ヒト胎盤発生過程におけるエピジェネティクス制御と疾患との関連 - ヒトTS細胞を用いた基礎的な研究 -
3. 学会等名 第43回日本妊娠高血圧学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田 峻, 遠藤俊, 大池輝, 小林枝里, Luis Augusto Eijy Nagai, 中戸隆一郎, 岡江寛明, 有馬隆
2. 発表標題 胎児-母体アセンブロイドを用いたin vitroにおけるヒト胚着床現象の再現
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

〔図書〕 計3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 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	

1. 著者名 柴田 峻, 小林 枝里, 有馬 隆博	4. 発行年 2023年
2. 出版社 金原出版(株)	5. 総ページ数 6
3. 書名 産婦人科の実際	

〔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
---------	---------