

令和 6 年 4 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16782

研究課題名（和文）低出生体重児の胎盤におけるエピゲノム変異と疾患モデルの創出

研究課題名（英文）Epigenomic variation in the placenta of SGA infants and the generation of SGA-specific placental models

研究代表者

大池 輝 (Oike, Akira)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：90884552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低出生体重児（SGA）胎盤の病態メカニズムを明らかにするため、まず SGA胎盤の構成細胞を純化し、その胎盤細胞のエピゲノム変異の特徴、特にゲノムインプリンティング遺伝子の DNAメチル化の特徴について検討する。次に、SGA胎盤に由来する疾患TS細胞モデルを作製し、その細胞特性について明らかにする。さらに、病態を再現する疾患TS細胞の三次元培養について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠初期におこる低出生体重児（SGA）胎盤の病因メカニズムをSGA疾患特異的な栄養膜幹（TS）細胞を作製し、分子レベルで解明した。特に、満期胎盤からのTS細胞の樹立はSGAのみならず、妊娠高血圧腎症などのさまざまな周産期疾患の病態を試験管内で再現することができると期待でき、それら疾患の分子メカニズムの解明に大いに役立つことができる。また、疾患特異的なTS細胞は、胎盤の発生不全を原因とするさまざまな周産期疾患の新たな創薬ターゲットの探索や新規治療法の開発に役立つと期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the pathological mechanisms of small for gestational age (SGA) placentas, we first purify the constitutive cells of SGA placentas and analyze the epigenomic mutational features of these placental cells, particularly the DNA methylation of genomic imprinting genes. Next, SGA-specific TS cell models derived from SGA placentas are generated and their cellular characteristics are elucidated. Furthermore, we tried to establish the three-dimensional culture of SGA-specific TS cells that recapitulate the pathological conditions of SGA placenta.

研究分野：発生生物学

キーワード：低出生体重児（SGA） ヒト栄養膜幹細胞 三次元ヒト胎盤モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年の晩婚化の社会情勢と生殖医療技術の向上に伴い、様々な周産期合併症を伴うことが多く、特に低出生体重児（SGA）の発症頻度は、年々増加傾向にある（日本産科婦人科学会周産期登録）。このSGAの病因は、初期胎盤の分化異常（形成不全）がおもな原因ではないかと推測されているが、この仮説は未だ検証されるには至っていない。またSGAは、年齢、環境、栄養、ストレス等により発症時期や重症度が異なり、疾患の病因や病態に、胎盤細胞のエピゲノムの変異が深く関与することが指摘されている。さらに、胎児や胎盤の発育に関与するインプリント遺伝子の変異についても報告されている（Arngrimsson R. *Nature Genet.* 2005¹⁾ 他）。しかし、これらの報告は、胎盤全体を解析したもので、胎盤構成細胞を分離して、詳細に検討したものではない。また、新規医療品の開発は、胎児への影響を考慮するあまり現状進んでいない。

所属研究室では、最近世界で初めてヒト胎盤栄養膜幹（TS）細胞の樹立に成功した（Okac H et al. *Cell Stem Cell.* 2018²⁾）。このヒトTS細胞は、胎盤ホルモンを分泌する合胞体栄養膜（ST）細胞や子宮内膜への浸潤と血管新生を示す絨毛外栄養膜（EVT）細胞へ容易に分化可能である。また、遺伝子発現およびDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾機構は、生体の胎盤構成細胞に極めて類似する遺伝子特性を有する。申請者は、このヒトTS細胞を活用することで、妊娠中の母体の栄養状態や不適切な子宮内の環境が、SGA胎盤のエピゲノム異常を引き起こすメカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト低出生体重児（SGA）の胎盤細胞のエピジェネティックな分子機構を解析し、その病態を明らかにすること、また試験管内でSGAの三次元異常胎盤モデルを作製し、その病態を再現することである。

3. 研究の方法

（課題1）SGA胎盤細胞の遺伝子特性の解析：

胎盤には主要構成細胞である細胞性栄養膜（CT）細胞に加え、母体血や胎児由来のストロマ細胞などが含まれている。典型的SGA（10%タイル未満の児）の胎盤より消化酵素を用いて単一細胞にし、FACS法及び磁気細胞分離法を用いて、CT細胞のみを高純度（>95%）に分離した。高純度に精製したSGA胎盤のCT細胞の遺伝子発現とエピゲノム（DNAメチル化：パイサルファイト-seq法）解析を典型例10例に行った。既にデータを取得している標準ゲノム及びエピゲノムプロファイルと比較し、疾患特異的変異を生物統計学的手法で明らかにした。

（課題2）SGA由来疾患モデルTS（疾患TS）細胞の樹立と細胞特性の解析：

典型的なSGA胎盤の未分化なCT細胞より、疾患TS細胞株を樹立した。

（課題3）疾患TS細胞の三次元培養技術の確立：

マトリゲル包埋法などの手法を用い、ヒトTS（疾患TS）細胞と子宮内膜間質細胞や血管内皮細胞との三次元培養を行った。得られた三次元構造が胎盤絨毛を模倣しているかどうかにつ

いて、免疫組織学的手法を用いて解析し、最適な条件を決定した。また、疾患ヒトTS細胞から分化させた絨毛外栄養膜 (EVT) 細胞の毛細血管網への浸潤と置換能、合胞体栄養膜 (ST) 細胞の栄養・ガス交換能やホルモン産生能を評価し、疾患胎盤機能を正常モデルと比較することを計画した。

4. 研究成果

(1) 疾患構成細胞のエピゲノム特性の解析：

①栄養膜細胞の純化・精製：SGA を東北大学および関連医療機関より収集した (20 例)。胎盤組織は、消化酵素を用い単一細胞にし、磁気細胞分離法を用いて、未分化な CT 細胞を高純度 (>95%) に分離・精製した。対照として、妊娠満期の正常胎盤 (20 例) の CT 細胞を精製した。

②遺伝子発現解析：疾患細胞より精製した poly(A) RNA を用いて、RNA-seq 解析を行い、疾患特異性について検討した。SGA の発現量が有意に変化する遺伝子を 235 個同定した。共通して変動する遺伝子は 45 個であった。また発現量が有意に上昇していた遺伝子群には、胎盤発生に関連する遺伝子等がエンリッチしていた。BS-Seq 法により得られたメチロームデータの解析を行った。その結果、HDP で高メチル化となる約 1400 領域と HDP で低メチル化となる約 1900 領域を得た。次に、これらの DMR から 2 kb に TSS を持つ遺伝子 (高メチル化では約 500 遺伝子、低メチル化では約 500 遺伝子) について特徴的な遺伝子機能の探索を行った。ターゲット遺伝子を探索し、胎盤発生に関連する遺伝子をはじめ、インスリン分泌蛋白応答や血管新生に関連する遺伝子が有意にエンリッチすることが判明した。

(2) 疾患 TS 細胞の樹立と細胞特性の解析：

①疾患 TS 細胞の樹立：満期胎盤の CT 細胞から樹立した栄養膜細胞株は、増殖能が乏しく、初期胎盤由来の TS 細胞と明らかに形態が異なっていた。また、老化マーカーである SA β -Gal の活性を調べたところ、この満期胎盤から樹立した栄養膜細胞株では強い活性が認められ、細胞老化を起こしていることが判明した。満期胎盤の栄養膜細胞と初期胎盤由来の TS 細胞の間で、遺伝子発現量の違いがないか検討し、前者において SALL4, HAND1, ZNP42 のわずか 3 種類の転写因子の発現が著しく低いことを確認した。

そこで、細胞老化抑制に作用する p53 ドミナントネガティブ変異体 (p53DN) と同時に 3 種類の転写因子をそれぞれ満期の栄養膜細胞に遺伝子導入した。その結果、特定の転写因子により TS 様の形態を示す細胞株が得られることが判明した (図 1)。また、この満期由

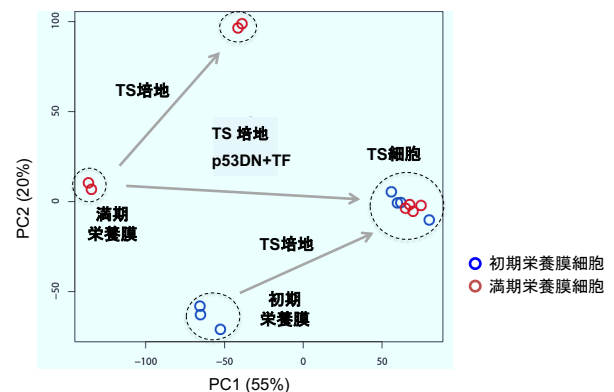


図 1. 満期由来 TS 細胞の発現解析

満期栄養膜細胞に p53DN と特定の転写因子 (TF) を導入して樹立した TS 細胞は、初期栄養膜由来の TS 細胞と遺伝子発現が類似。

来 TS 細胞の細胞分化能について解析したところ、ST 細胞、EVT 細胞へ正常に分化することが明らかとなった。

(3) 疾患 TS 細胞の三次元培養技術の確立：

複数のヒト子宮内膜組織より子宮内膜上皮オルガノイドの樹立と子宮内膜間質細胞の初代培養を行い、母体側のモデル作製のための細胞資源を確保した。また、子宮内膜上皮オルガノイドおよび間質細胞を用い、その空間的配置が生体組織と類似する子宮内膜モデルの三次元培養条件を確立した (図 2)。本モデルは、胚の着床する子宮内膜上皮の管腔面が外部に露出する特徴を有しており、ヒト胚モデルとの着床の瞬間が解析可能となった。本モデルとヒト ES 細胞およびヒト TS 細胞から作製した胚モデル (スフェロイドおよびブラストイド) を共培養したところ、胚の接着や子宮内膜上皮の消失など、着床工程の一部を再現した。今後、着床部位の解析や子宮内膜モデル内への浸潤、ラクナ形成などその後の胚発生を模倣する培養条件について検討を加えていく計画である。また、疾患 TS 細胞においても検討を進めていく予定である。

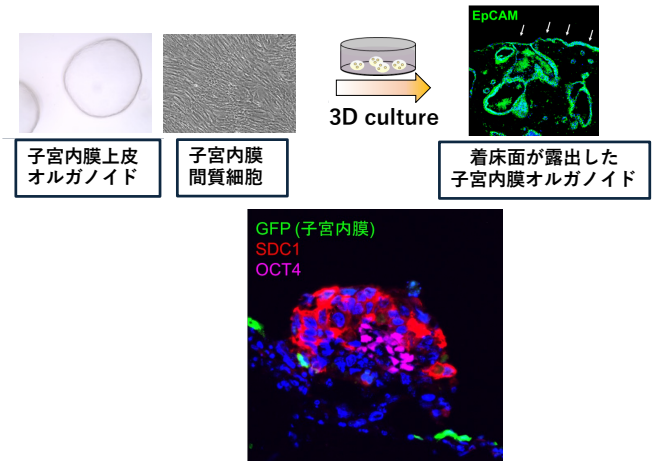


図 2. 子宮内膜モデルとブラストイドの共培養

ヒト子宮内膜上皮オルガノイドと子宮内膜間質細胞の三次元共培養による子宮内膜モデルの作製。子宮内膜モデルは着床面が外部に露出している(矢印)。子宮内膜モデルとヒト ES 細胞から作製した胚盤胞様構造(ブラストイド)の共培養。胚盤胞様構造は子宮内膜モデルに接着し、一部内部への浸潤を示した(下段)。

<引用文献>

- 1) Arngrimsson R. Epigenetics of hypertension in pregnancy. *Nature Genet.* 37(5):460-1. 2005.
- 2) Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, Kabayama Y, Suyama M, Sasaki H, Arima T. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 22(1):50-63. 2018.

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 1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 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 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 -

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 eadi4819
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 -

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 962-976
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大池 輝
2. 発表標題 ヒト栄養膜細胞を用いたシンシチンの研究
3. 学会等名 第3回「全能性プログラム」若手勉強会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oike Akira
2. 発表標題 Distinct functions of human Syncytins at the maternal-fetal interface Ape-specific endogenous retrovirus Syncytin-1 mediates cell fusion at the maternal-fetal interface
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大池 輝
2. 発表標題 CRISPRスクリーニングによるヒト栄養膜細胞分化機構の解析
3. 学会等名 新学術領域「全能性プログラム」若手勉強会 2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

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

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