

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19546

研究課題名（和文）ヒト胎盤幹細胞を用いた胚着床オルガノイドの創出と着床不全細胞治療への挑戦

研究課題名（英文）Embryonic implantation organoids using human placental stem cells and challenges to treatment of implantation defects

研究代表者

有馬 隆博（ARIMA, TAKAHIRO）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80253532

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ART不成功例の主要因は着床不全が指摘されている。現状では有効な治療法は存在していない。本研究では、ヒト胎盤幹（TS）細胞の着床不全に対する有効性を、in vitroにて検証するため、ヒト胚盤胞様構造物（ブラストイド）と子宮内膜細胞の共存した胚着床オルガノイドモデルを作製し、このモデルを基に、ヒトTS細胞の付加による着床率の向上（1.8倍）を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ES細胞に対して自己組織化を促すことで、原腸形成や三胚葉分化などの胚発生過程を模倣するモデルが報告されている。しかしながら、これらのモデルには胎盤系譜の細胞群が欠落しているため、着床後の発生における胎盤発生のモデルにはならない。本研究の最大の特徴は、独自に開発したヒトTS細胞の培養技術と遺伝子情報を活用し、世界初の胚着床オルガノイドモデルを作製する点である。またヒトTS細胞は、着床不全に対する革新的な細胞療法として新規性が高く、その期待度も高い。またこのTS療法は、妊娠成功率の飛躍的な向上を図るための先進医療として、少子化対策に貢献するイノベーションになると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Implantation failure has been identified as a major factor in ART failure rates. Currently, no effective treatment exists. In this study, in order to verify the efficacy of human placental stem (TS) cells against implantation failure in vitro, we have built the embryo-implantation organoid model in which human blastocyst-like structures (blastoids) and endometrial cells coexisted, and based on this model, we clarified that the addition of human TS cells improved the implantation rate (1.8 fold).

研究分野：産婦人科学、分子生物学

キーワード：生殖補助医療（ART） 胚着床不全 胎盤幹細胞 オルガノイド

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

我が国をはじめ急激な少子高齢化が進む先進諸国では、出生数減少は大きな社会的課題である。生活や労働環境の変化は、晩婚化や初産の高齢化をもたらし、体外受精や顕微授精などの生殖補助医療（ART）を選択する不妊治療患者数は、年々増加の一途を辿る。しかし、ARTの成功率は、約25%程度に頭打ち状態であり、胚移植回数の増加や不妊治療の長期化は、心身や経済的な負担増をもたらし、出産を諦める大きな要因となっている。ART不成功例の主原因は、着床機能不全（障害）が指摘されているものの、現状ではホルモン大量投与が主で、未だ有効な治療法は存在しない。またヒト初期胚の研究は、倫理的な制約と種差の違いから遅滞してきた。最近、私たちは世界で初めてヒト胎盤幹（TS）細胞を樹立することに成功した¹⁾。このTS細胞は、外来遺伝子を導入することなく、長期間未分化状態を維持できる特徴を有する。また、免疫不全マウスの皮下に移植した場合は、着床時に特徴的な構造の形成や母体血の流入が起こるなど、生体の着床状態を再現可能な特徴を示していた。さらに、TS細胞の特徴として、1)細胞増殖作用 2)低い癌化リスク 3)免疫抑制機構（母体と胎児間）などの特性を有するために、ARTの際、子宮内に移植胚と同時にTS細胞を移植すれば、自然状態に近い着床環境をサポートすることで、妊娠成功率の飛躍的向上を図るための新しい画期的な技術として有用である。

2. 研究の目的

本研究では、まずヒト胚モデルと子宮内膜細胞の共存した胚着床オルガノイドモデルを作製し、ヒト着床機序について理解を深める。次に、TS細胞の付加による着床率向上に向けた新たな細胞療法確立のため、TS細胞の着床不全に対する有効性を、*in vitro*にて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TS細胞および子宮内膜細胞を用いたヒト胚着床オルガノイドの作製

TS細胞およびヒト子宮内膜のオルガノイドが共存可能な培養条件の検討を行った。オルガノイド共培養時の子宮内膜上皮の応答について、細胞肥厚などの形態変化や腺成熟マーカー（PAEP, PR α ）の発現確認、細胞増殖マーカーの染色（Ki67）を行った。子宮内膜間質細胞については、妊娠子宮内膜に特徴的な脱落膜の分化マーカー（PRL, IGFBP1）の発現を確認した。

(2) 胎児免疫寛容機構の再現

免疫寛容成立や胎盤発生に重要なNK細胞やCD4+Tリンパ球等の免疫細胞を胚着床オルガノイドと混合培養し、NK細胞活性、制御性T細胞の分化度（CD25+/FoxP3+）や、胎盤構造（浸潤の深さ・分化度）を指標にその表現型を解析し、胎盤-免疫細胞間クロストークを可視化し、その機序について検討した。

(3) 着床不全モデルに対するTS細胞の影響

ナイーブ型胚性幹（ES）細胞を用い、ヒト胚盤胞モデルを作製した。さらに着床不全を反映するモデルを作製し、そのモデルへのTS細胞付加による着床能への影響を確認した。着床能については、平面培養した子宮内膜上皮のアピカル面への接着を指標にしたスクリーニング系を用いて、TS細胞の効果を検証した。さらに、胚着床オルガノイドを用いて機能的な着床促進効果（子宮内膜の応答、TS細胞の分化など）を確認した。

4. 研究成果

(1) ナイーブ型 ES 細胞よりプラストイドの作製:

ナイーブ型ヒト胚性幹 (ES) 細胞よりマイクロウェルを用いて混合培養条件 (細胞数、播種時期、培地・添加因子成分) をこれまでの報告を基に^{2),3)} 検討し、ヒト胚盤胞様構造物 (プラストイド) の作製に成功した (図 1)。

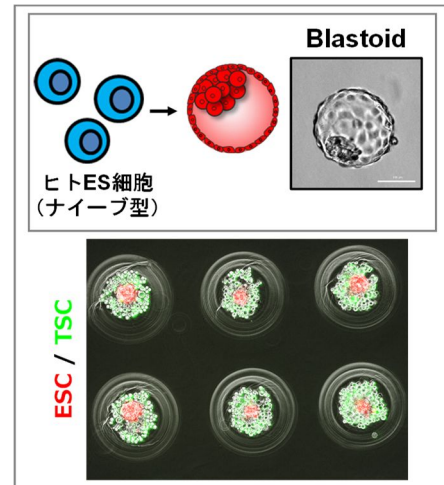


図 1 ES 細胞よりプラストイドモデル
ナイーブ型 ES 細胞よりプラストイドの作製

(2) 子宮内膜オルガノイドの作製:

子宮内膜上皮オルガノイドは、既報^{4),5)}を基に樹立した。複数ドナー由来の手術摘出後のヒト子宮組織 (倫理承認済) より子宮内膜上皮オルガノイドを樹立した。また、同時に子宮内膜間質細胞を単離した。次に、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る応答能 (子宮内膜 (腺) 上皮: PAEP、PR、脱落膜化マーカー: PRL、IGFBP1 等) を確認した (図 2)。また、この子宮内膜オルガノイドの機能的評価を行うため、黄体期のホルモンに応答して肥厚、成熟化すること、および外側の管腔上皮様と内側の腺上皮様組織に区別し、子宮内膜着床期上皮マーカーが増加することを確認した。

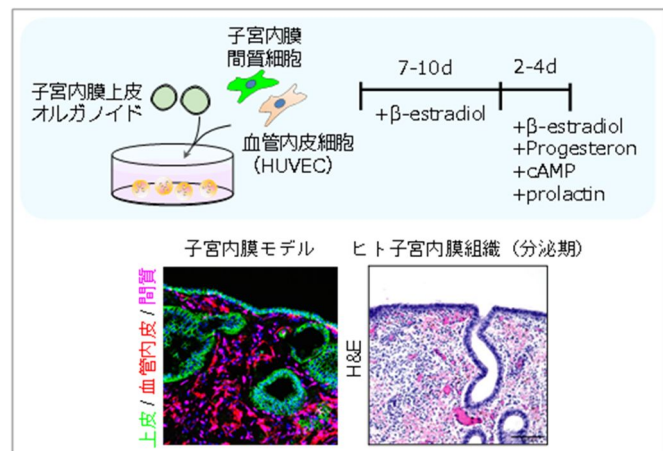


図 2 子宮内膜上皮オルガノイドモデル
妊娠初期の脱落膜組織より子宮内膜上皮細胞のオルガノイドの作製

(3) 遺伝子発現解析:

子宮内膜モデルについて、単一核解析によりシングルセルレベルでの遺伝子発現解析を行った。混合した細胞の子宮内膜上皮・間質、内皮細胞についてそれぞれ検出し、特に上皮細胞には腺細胞や繊毛細胞、増殖性の細胞など多様な細胞集団が含まれていることがわかった。この子宮内膜オルガノイドに、疾患モデルを活用し、母体-胎盤間のシグナル伝達経路などの解析に応用できる (図 3)。

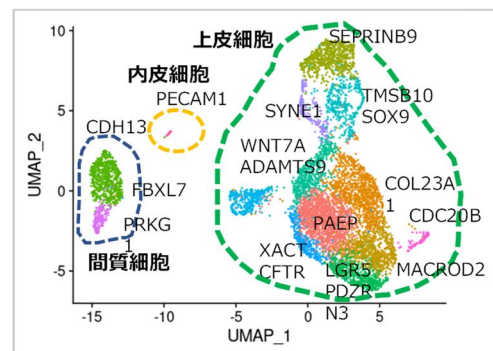


図 3 子宮内膜モデルの単一核遺伝子発現解析

(4) 胚着床オルガノイドモデルの作製:

プラストイドと子宮内膜オルガノイドモデルを共培養し、胚の着床状態を観察できるオルガノイドモデルを作成することに成功した(図4)。興味深いことに、浮遊培養下で両者を共培養すると、プラストイドが子宮内膜モデル内に埋没していく様子が観察された。切片を詳細に解析すると、子宮内膜上皮のバリアが破られてプラストイドが ICM 側から付着しているのを確認した。また、シンシチウムの浸潤には、子宮内膜間質細胞の細胞融合が関与していることを明らかにした。こうした生体を反映した、これまでにないう着床モデルを作製することで、これまでブラックボックスであった着床の分子機構や着床不全の病態を明らかにした。

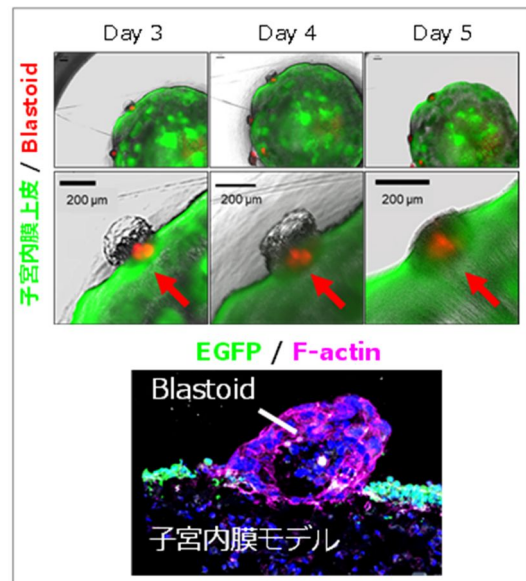


図4 ヒト胚着床オルガノイドモデル共培養によりヒト胚着床オルガノイドモデルを作製(論文投稿中)

(5) TS細胞の着床能への影響:

着床能については、平面培養した子宮内膜上皮のアピカル面への接着を指標にしたスクリーニング系を用いて、TS細胞の効果を検証した。さらに、胚着床オルガノイドを用いて機能的な着床促進効果(子宮内膜の応答、TS細胞の分化など)を確認した(図5)。

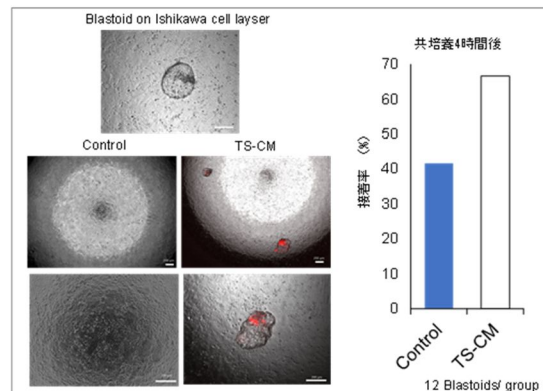


図5 TS-CM 接着アッセイ実施例図面

<引用文献>

- 1) 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.
- 2) Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A, Guo G. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. **Cell Stem Cell**. 3;28(6):1016-1022.e4. 2021.
- 3) Kagawa, H., Javali, A., Khoei, H.H., Sommer, T.M., Sestini, G., Novatchkova, M., Scholte op Reimer, Y., Castel, G., Bruneau, A., Maenhoudt, N. Human blastoids model blastocyst development and implantation. **Nature**. 10.1038/S41586-021-04267-8. 2021.
- 4) Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, Hollinshead M, Marsh SG, Brosens JJ, Critchley HO, Simons BD, Hemberger M, Koo BK, Moffett A, and Burton GJ. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. **Nat Cell Biol**. 19(5): 568-577. 2017.
- 5) Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, Amant F, Timmerman D, Tomassetti C, Vanhie A, Meuleman C, Ferrante M, Vankelecom H. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. **Development**. 15;144(10):1775-1786. 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Muto Masanaga, Chakraborty Damayanti, Varberg Kaela M., Moreno-Irusta Ayelen, Iqbal Khursheed, 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 -
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 Kaela M. Varberg, Khursheed Iqbal, Masanaga Muto, Mikaela E. Simon, Regan L. Scott, Keisuke Kozai, Ruhul H. Choudhury, John D. Aplin, Rebecca Biswell, Margaret Gibson, Hiroaki Okae, Takahiro Arima, Jay L. Vivian, Elin Grundberg, and Michael J.	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 Tando Y, Hiura H, Takehara A, Ito-Matsuoka Y, Arima T, Matsui Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Epi-mutations for spermatogenic defects by maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e70322.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.70322.	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
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
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 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 -
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, Horii 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 Hada Masashi, Miura Hisashi, Tanigawa Akie, Matoba Shogo, Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Hirose Michiko, Watanabe Naomi, Nakato Ryuichiro, Fujiki Katsunori, Hasegawa Ayumi, Sakashita Akihiko, Okae Hiroaki, Miura Kento, Shikata Daiki, Arima Takahiro, Shirahige Katsuhiko, Hiratani Ichiro, Ogura Atsuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 84 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.348782.121	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 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 -
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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 6件/うち国際学会 6件)

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 有馬隆博.
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
3. 学会等名 第25回小児分子内分泌研究会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

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 Okae H, Arima T
2. 発表標題 Critical role of genomic imprinting in human placental development
3. 学会等名 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 Kobayashi N, Okae H, Kaji H, Suyama M, Arima T
2. 発表標題 Activation of the miRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 IHEC2022(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 樋浦仁、服部裕充、有馬隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社メディカルドゥ	5. 総ページ数 6
3. 書名 生殖補助医療とエピゲノム疾患	

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	

1. 著者名 濱田裕貴, 宮内尚子, 有馬隆博	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床婦人科産科	

1. 著者名 服部裕充, 有馬隆博	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ARTラボ 生殖補助医療の必須知識とラボテクニック	

〔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	小林 記緒 (KOBAYASHI NORIO) (10803885)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	小林 枝里 (KOBAYASHI ERI) (70634971)	東北大学・医学系研究科・助教 (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
---------	---------