137　ヒト疾患未分化胎盤幹細胞モデルの作製と病態解明	岡江　寛明

【目的】妊娠高血圧症候群（hypertensive disorders of pregnancy：HDP）は、妊娠 20 週以降の高血圧を主徴とする疾患であり、発症頻度は全妊婦の約 10%にもおよぶ。HDP の病因としては、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化・機能異常が有力視されているが、詳細なメカニズムは不明である。我々は最近、妊娠初期のヒト胎盤より栄養膜幹細胞（TS 細胞）を樹立することに成功した。ヒト TS 細胞は、胎盤を構成するあらゆる栄養膜細胞へと分化する能力を持つため、ヒト胎盤研究のための優れたモデルとなる。本研究では、この技術を発展させ、HDP のモデル細胞を作製することにより、その発症機構に迫ることを目的とした。

【方法および結果】

1.　妊娠初期の栄養膜細胞において特異的に発現する転写因子の同定

我々が確立した TS 細胞の培養技術を用い、妊娠末期の栄養膜細胞より TS 細胞の樹立を試みたが、細胞株は得られなかった。妊娠末期の栄養膜細胞から TS 細胞が得られない原因を探るため、妊娠初期と末期の栄養膜細胞の RNA-seq 解析を行った。その結果、妊娠末期と比べ、妊娠初期の栄養膜細胞において 10 倍以上高い発現を示す転写因子を 5 遺伝子同定した（*BRDT*、*DPPA4*、*SALL4*、*SOHLH2*、*ZFP42* ）。さらに、ヒト iPS 細胞の誘導に用いられる *LIN28A* が、妊娠初期の栄養膜細胞において特異的に発現していることを見出した。

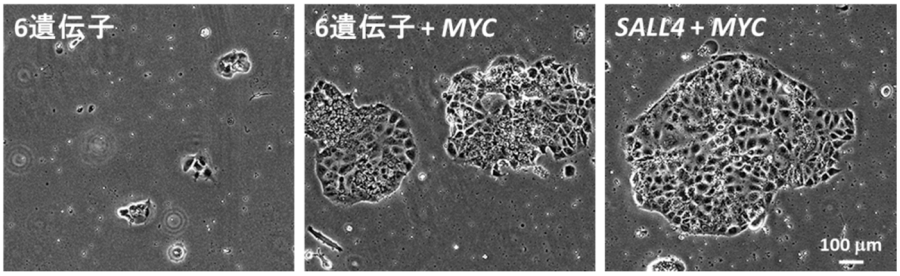
2. 妊娠末期の栄養膜細胞を用いた TS 細胞の樹立

RNA-seq 解析によって同定した 6 遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み、妊娠末期の栄養膜細胞に導入することで TS 細胞の誘導を試みたが、細胞株は得られなかった。そこで、iPS 細胞の誘導効率を高めることが知られている *MYC* を加えて再度実験を行ったところ、TS 細胞を誘導することに成功した。さまざまな遺伝子の組み合わせで実験を繰り返し、妊娠末期の栄養膜細胞から TS 細胞を誘導するためには、*SALL4* と *MYC* が必要であることを突き止めた（図）。この手法を用い、HDP 胎盤 3 例、正常胎盤 7 例より TS 細胞を樹立することに成功した。

3.　TS 細胞を用いたオルガノイドの作製

HDP の病態を詳しく解析するためには、試験管内でヒト胎盤様構造を再現する必要がある。そのため、正常 TS 細胞を用いたオルガノイドの作製を試みた。まず、TS 細胞をマトリゲルに包埋し、通常の TS 細胞用の培地を用いて培養を行ったが、大部分の細胞が合胞体性栄養膜細胞へと分化してしまい、オルガノイドは得られなかった。そこで、培地に含まれる増殖因子や小分子化合物の組み合わせを変えて検討を重ねたところ、未分化細胞と合胞体性栄養膜細胞からなるオルガノイドを作製することに成功した。

妊娠末期の栄養膜細胞より樹立した TS 細胞



137. ヒト疾患未分化胎盤幹細胞モデルの作製と病態解明

岡江　寛明

東北大学 大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

Key words：ヒト栄養膜幹細胞，胎盤，妊娠高血圧症候群（HDP），オルガノイド

緒　言

妊娠高血圧症候群（hypertensive disorders of pregnancy：HDP）は、妊娠 20 週以降の高血圧を主徴とする疾患であり、発症頻度は全妊婦の約 10%にもおよぶ［1］。HDP を発症すると、けいれん発作や腎機能障害、胎児発育不全などの合併症のリスクが跳ね上がるため、母児の健康状態に重大な影響を与える可能性がある。有効な予防法や根本的な治療法は確立されておらず、重症化した場合には、児の発育が不十分な場合であっても、速やかに妊娠を終結する必要がある。HDP の病因としては、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化・機能異常が有力視されているが、詳細なメカニズムは不明である。従来のヒト胎盤研究には、ヒト絨毛癌細胞株や SV40 T 抗原を導入して不死化した栄養膜細胞株、あるいはマウスなどの実験動物が用いられてきた［2，3］。しかし、癌細胞株や不死化細胞株が正常細胞の機能を保持しているかどうかは不明であり、また、胎盤構造や妊娠期間の違いから、実験動物で得られた結果をヒトに外挿することも容易ではない。我々は最近、妊娠初期のヒト胎盤より栄養膜幹細胞（TS 細胞）を樹立することに成功した［4］。ヒト TS 細胞は、胎盤を構成するあらゆる栄養膜細胞へと分化する能力を持つため、ヒト胎盤研究のための優れたモデルとなる。本研究では、この技術を発展させ、HDP のモデル細胞を作製することにより、その発症機構に迫ることを目的とした。

方法および結果

1.　妊娠初期の栄養膜細胞において特異的に発現する転写因子の同定

我々は妊娠初期の胎盤から未分化な栄養膜細胞を単離し、TS 細胞を樹立することに成功した［4］。しかし、同様の手法を用いて妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞の樹立を試みたが、細胞株は得られなかった（図 1）。そこで、妊娠初期と末期の栄養膜細胞の遺伝子発現を比較するために、RNA-seq 解析を行った。その結果、妊娠末期と比べ、妊娠初期の栄養膜細胞において 10 倍以上高い発現を示す転写因子を 5 遺伝子同定した（*BRDT*、*DPPA4*、*SALL4*、*SOHLH2*、*ZFP42* ）。さらに、ヒト iPS 細胞の誘導に用いられる *LIN28A* が、妊娠初期の栄養膜細胞において特異的に発現していることを見出した。

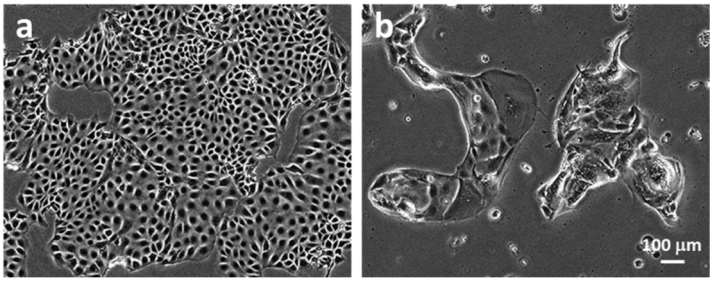


図 1. 妊娠初期および末期の栄養膜細胞

a）妊娠初期の栄養膜細胞より樹立した TS 細胞。

b）妊娠末期の栄養膜細胞。TS 細胞用の培地で培養しても細胞株は得られなかった。

2. 妊娠末期の栄養膜細胞を用いたTS細胞の樹立

RNA-seq解析によって同定した6遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み、妊娠末期の栄養膜細胞に導入することでTS細胞の誘導を試みたが、細胞株は得られなかった。そこで、iPS細胞の誘導効率を高めることが知られている*MYC*を加えて再度実験を行ったところ、妊娠末期の栄養膜細胞よりTS細胞を誘導することに成功した（図2）。さまざまな遺伝子の組み合わせで実験を繰り返し、TS細胞の誘導には*SALL4*と*MYC*が必要であることを突き止めた。また、作製したTS細胞が、胎盤を構成する2種類の栄養膜細胞（合胞体性栄養膜細胞および絨毛外栄養膜細胞）へと分化する能力を持つことも確認した。この手法を用い、HDP胎盤3例、正常胎盤7例よりTS細胞を樹立することに成功した。

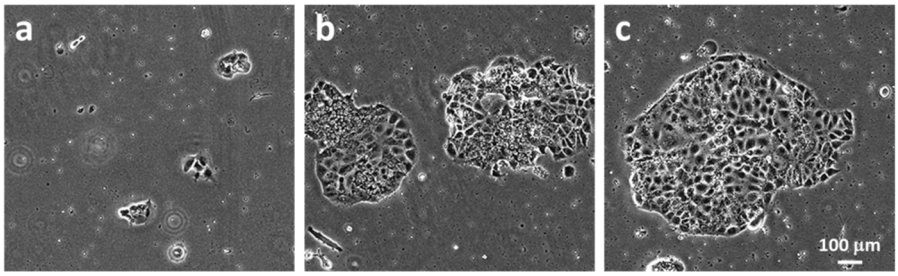


図2. 妊娠末期の栄養膜細胞を用いたTS細胞の樹立

a）6遺伝子（*BRDT*、*DPPA4*、*LIN28A*、*SALL4*、*SOHLH2*、*ZFP42*）を導入した妊娠末期の栄養膜細胞。TS細胞は得られなかった。

b）妊娠末期の栄養膜細胞に6遺伝子および*MYC*を導入して作製したTS細胞。

c）妊娠末期の栄養膜細胞に*SALL4*および*MYC*を導入して作製したTS細胞。

3. TS細胞を用いたオルガノイドの作製

HDPの病態を詳しく解析するためには、試験管内でヒト胎盤様構造を再現する必要がある。そのため、正常TS細胞を用いたオルガノイドの作製を試みた。まず、TS細胞をマトリゲルに包埋し、通常のTS細胞用の培地を用いて培養を行ったが、大部分の細胞が合胞体性栄養膜細胞へと分化してしまい、オルガノイドは得られなかった。そこで、培地に含まれる増殖因子や小分子化合物の組み合わせを変えて検討を重ねたところ、未分化細胞と合胞体性栄養膜細胞からなるオルガノイドの作製に成功した（図3）。さらに、オルガノイドがヒト絨毛性ゴナドトロピンなどのホルモンを産生することも確認した。

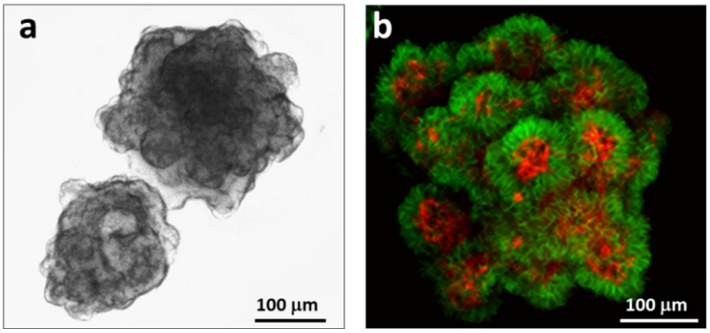


図3. ヒトTS細胞より作製したオルガノイド

a）明視野像。

b）蛍光像。緑：E-cadherin（未分化細胞）、赤：SDC1（合胞体性栄養膜細胞）

考　察

本研究では、*SALLA* と *MYC* の導入により、妊娠末期の栄養膜細胞からヒト TS 細胞を樹立する手法を確立した。さらに、HDP 胎盤より疾患特異的 TS 細胞を樹立することに成功するとともに、ヒト TS 細胞からオルガノイドを作製するための条件を見出した。HDP は、絨毛外栄養膜細胞の浸潤異常や、sFLT1 や PIGF などの血管新生調節因子の分泌異常によって引き起こされると考えられている［5, 6］。現在、HDP 胎盤より樹立した疾患特異的 TS 細胞からオルガノイドを作製し、これらの異常が再現されるかどうかについて検討を進めている。HDP は複数の遺伝的要因や環境要因が関与する多因子性の疾患であり、症例ごとに発症機構が異なることが予想される。今後は、さらに多くの HDP 症例について疾患特異的 TS 細胞の樹立を進めるとともに、ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノムなどの多階層データを取得することにより、疾患の層別化を図り、HDP の予防法や治療法の開発へとつなげていきたい。また、本研究で確立した TS 細胞の樹立・培養技術は、HDP のみならず、流産や早産、胎児発育不全、絨毛癌など、胎盤の異常に起因するさまざまな疾患の研究にも役立つと期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院医学系研究科の有馬隆博教授である。本研究を遂行するにあたって、多大なご協力いただきました九州大学生体防御医学研究所の佐々木裕之教授、須山幹太教授、東北大学大学院医学系研究科の研究室の皆様に感謝致します。最後に、貴重な検体をご提供いただきました患者様、ご家族様に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Mustafa R, Ahmed S, Gupta A, Venuto RC. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. J Pregnancy. 2012;2012:105918. Epub 2012 May 23. Review. PMID: 22685661 DOI: 10.1155/2012/105918.

2) Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? Biol Reprod. 2010 Feb;82(2):235-45. Epub 2009 Jul 1. Review. PMID: 19571263. DOI: 10.1095/biolreprod.109.077800.

3) Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. Nat Rev Genet. 2001 Jul;2(7):538-48. Review. PMID: 11433360

4) 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. 2018 Jan 4;22(1):50-63.e6. Epub 2017 Dec PMID:29249463 DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.004.

5) Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest. 2003 Mar;111(5):649-58. PMID: 12618519

6) Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. Biol Reprod. 2003 Jul;69(1):1-7. Epub 2003 Mar 5. Review. PMID: 12620937