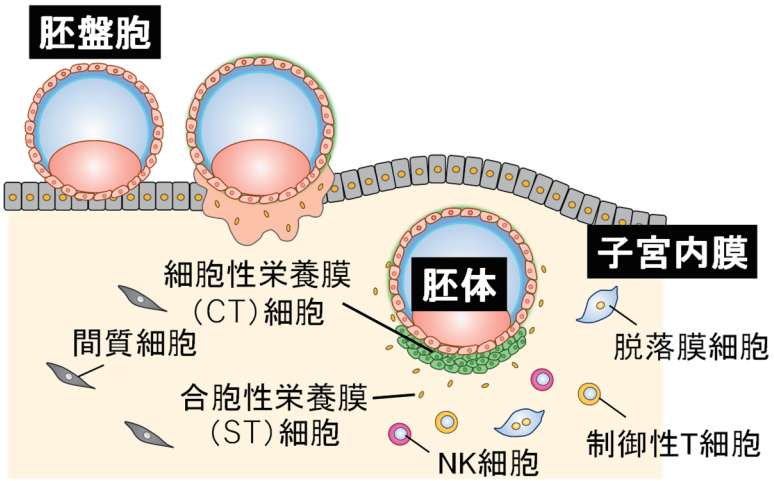
123　ヒト着床モデルによる母胎間分子シグナル機構の解明	柴田　峻

【目的】近年の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っている。しかし、ART の成功率は、20%程度と頭打ち状態にあり、ART 不成功例の主原因として、着床機能不全が指摘されている。本研究では、胎児・母体由来の複数の幹細胞を組み合わせた *in vitro* 着床モデル（Assembloid）を創成し、胚の着床・発生機序について理解を深め、新規の不妊治療法の開発や創薬応用に役立てることを目的とした。

【方法および結果】1. ナイーブ型 ES 細胞よりブラストイドの作製：ナイーブ型 ES 細胞よりマイクロウェルを用いて培養条件（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検討し、ヒト胚盤胞様構造物（ブラストイド）の作製に成功した。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 10 ロット以上の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。またヒトと同様に、マウス（ICR）においても、子宮内膜上皮オルガノイドの樹立と間質細胞の単離を行った。また、両者の混合によるマウス三次元子宮内膜モデルも確立した。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。4. 胚着床オルガノイドモデルの作製：ブ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製することに成功した。興味深いことに、浮遊培養下で両者を共培養すると、ブ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、ブラストイドが ICM 側から付着し、子宮内膜上皮のバリアが破られ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。このような生体を反映したこれまでにない着床モデルの作製により、これまでブラックボックスであった着床の分子機構の一端が明らかとなった。

胚着床オルガノイドモデルの作製



123. ヒト着床モデルによる母胎間分子シグナル機構の解明

柴田　峻

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，胚着床，オルガノイドモデル

緒　言

最近のヒト生殖補助医療（ART）の技術向上は目覚しく、不妊症対策が国家的な重要課題とされている。しかし、胚の着床率は依然として低く、なかでも形質良好胚を繰り返し移植しても妊娠に至らない難治性着床不全の症例（年間約 17 万人）の存在がクローズアップされている。母体にとって胚は、半異物（セミアログラフト）であるが、子宮内では母体からの攻撃を受けない「免疫特権」を有する。しかし、この胎児寛容システムがうまく機能しないことが、着床不全や流産の原因となる。現状、ホルモン補充療法が行われているが、改善は見込めない。血球（血小板、リンパ球）などの細胞治療も検討されているが、その有効性を示すエビデンスはない。

妊娠成立には、胚および子宮内膜の双方が成熟後、協調して相互作用し、免疫寛容を獲得する必要があり、その不適性化は流産となる。その改善策には、着床機構の解析が不可欠で、両者の相互作用を観察可能なモデルが有効である。しかし、現存の胚着床モデルとして報告されているのは、生体とかけ離れた絨毛癌細胞や子宮内膜癌細胞を用いたものである。近年、ヒト胚性幹（ES）細胞に自己組織化を促すことで、三胚葉分化や原腸陥入などの初期発生事象が模倣されている［1］。しかし、この初期胚モデルには、胎盤系譜の細胞は存在せず、子宮との相互作用まで解析可能なモデルとは言えない。代表者らのグループは、最近ヒト胎盤幹（TS）細胞の樹立に世界で初めて成功した［2］。このヒト TS 細胞は、長期（80 継代）均一で未分化状態を維持し、合胞体栄養膜（ST）細胞や絨毛外栄養膜（EVT）細胞に分化する多分化能を有する。また、 免疫不全マウスに移植すると、着床時に出現する「原始合胞体細胞」が形成され、胎盤ホルモンを産生することを示した。また、近年オルガノイドを基盤とする三次元培養技術の発展により、生体内組織の空間的配置や分化パターンの模倣が部分的に可能となり、発生学・幹細胞研究や創薬への応用が期待されている。胚の母体への着床機構についても、生体を反映した細胞資源と三次元培養技術を駆使し、“着床環境（ニッチ）”を模倣するモデルを構築することで、これまで「ブラックボックス」であった分子機序の解明が期待できる。そこで本研究では、胎児・母体由来の複数の幹細胞を組み合わせた *in vitro* モデル（Assembloid）を創成し、胚の着床・発生機序について理解を深め、新規の不妊治療法の開発や創薬応用に役立てることを目的とした。

方法および結果

1. ナイーブ型 ES 細胞よりブラストイドの作製

ナイーブ型 ES 細胞よりマイクロウェルを用いて培養条件（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（［3，4］）検討し、ヒト胚盤胞様構造物（ブラストイド）の作製に成功した（図 1）。

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（［5，6］）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 10 ロット以上の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（図 2）、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。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。

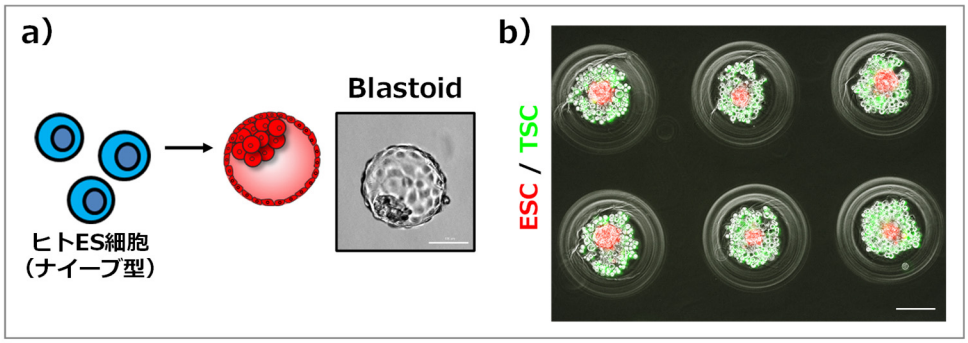


図 1. ヒト胚盤胞様構造物（ブラストイド）
a）胚着床オルガノイドの模式図。
b）GFP-EMOs と Kusabira-Orange（KuO）-Blastoid。
（論文投稿中）。

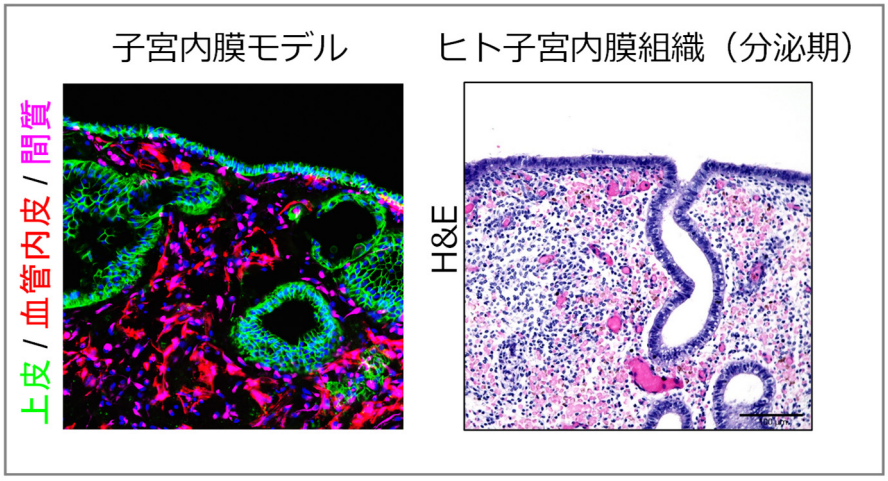


図 2. 三次元子宮内膜オルガノイドモデルの確立
Apical-out 子宮内膜オルガノイド（AO-EMO）＋eSC/HUVEC の EpCAM（青）、VIM（黄）に対する免疫染色。HUVEC（赤）。Scale bar : 100 μ m。
（論文投稿中）。

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）。

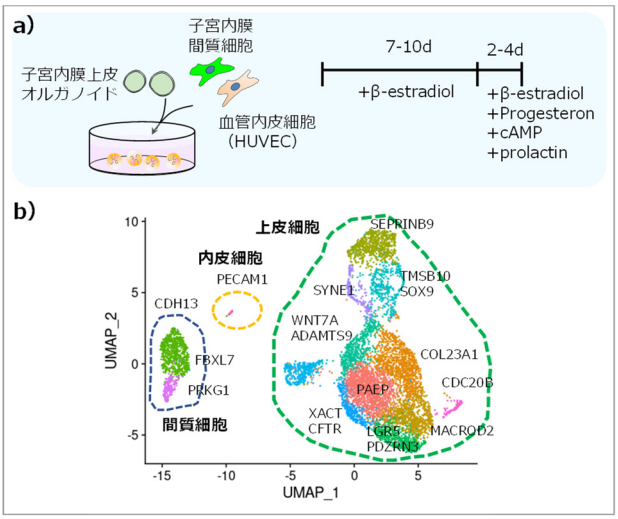


図 3. 子宮内膜モデルの単一核解析（snRNA-seq）

a）培養方法の模式図。

b）子宮内膜モデルの細胞集団（UMAP）。

（論文投稿中）

4. 胚着床オルガノイドモデルの作製

ブ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製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、ブ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、ブラストイドが ICM 側から付着し、子宮内膜上皮のバリアが破られ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。このような生体を反映したこれまでにない着床モデルの作製により、これまでブラックボックスであった着床の分子機構の一端が明らかとなった。

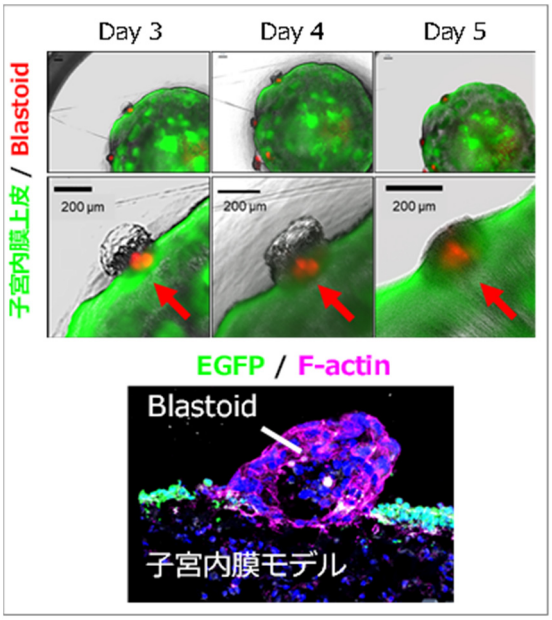


図 4. ヒト胚着床オルガノイドモデル

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）

考　察

ヒト着床プロセスを反映した本研究の「ヒト胚着床オルガノイドモデル」は、多くが未解明の「胚 - 母体間コミュニケーション」の分子機構の解明に資するのみならず、母体・胎児双方の細胞を対象としたゲノム編集や薬剤等種々の介入研究を実施可能にし、他因子が原因の着床不全にも、新たな解決策を提供することができる。本着床モデルをさらに発展させ、現在は、胎児免疫寛容獲得機構の解析が可能な免疫細胞との共培養システムの開発に取り組んでいる。免疫抑制剤の投与は、感染症リスクの増加等様々な懸念も存在する。つまり、胎児特有の免疫制御機構の解明は、新規の免疫抑制剤研究の可能性を広げる。免疫抑制剤の需要は拡大しており、世界市場は 1.5 兆円規模とも言われ、年間 20%増加している。一方で、新たな機序の創薬は停滞している。本成果は、不妊治療の長期化による患者の心身・経済的負担の低減やそれに伴う医療費負担の改善、少子化対策など多くの社会課題解決に資するだけでなく、移植医療全般における新規免疫制御剤の研究開発にも資することが期待できる。さらに、妊娠経過の異常（周産期合併症）は、母子の健康に大きな課題を残す。効果的な ART の実現は、諸問題を克服し、先制医療の実現、周産期合併症の克服に繋がり、持続可能な社会への実現に向けて貢献することが期待できる。加えて、本研究成果による着床モデルは、大規模スクリーニングや創薬プラットフォームとなり得る。創出されたシーズは、胎児特有の免疫特権を利用した免疫抑制剤としての開発や女性ホルモン活性を活かした医薬品の開発、ヘルスケア産業など幅広い分野への展開が可能である。また、不妊に対する細胞治療等新たな再生医療技術の開発に繋がり、国際的な競争力も高めると期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたって、多大なご協力をいただきました東北大学大学院医学系研究科有馬教授をはじめ、研究室の皆様に感謝致します。また、研究の支援をして頂いた上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1） Moris N, Anlas K, van den Brink SC, Alemany A, Schröder J, Ghimire S, et al. An in vitro model of early anteroposterior organization during human development. Nature. 2020 Jun;582(7812):410-415. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32528178. DOI: 10.1038/s41586-020-2383-9.

2） Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018 Jan 4;22(1):50-63.e6. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29249463. DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.004.

3） 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. 2021 Jun 3;28(6):1016-1022.e4. Epub 2021 May 5. PMID: 33957081. DOI: 10.1016/j.stem.2021.04.031.

4） Kagawa H, Javali A, Khoei HH, Sommer TM, Sestini G, Novatchkova M, et al. Human blastoids model blastocyst development and implantation. Nature. 2022 Jan;601(7894):600-605. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34856602. DOI: 10.1038/s41586-021-04267-8.

5） Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. Nat Cell Biol. 2017 May;19(5):568-577. Epub 2017 Apr 10. PMID: 28394884. DOI: 10.1038/ncb3516.

6) Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. Development. 2017 May 15;144(xxxx10):1775-1786. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28442471. DOI: 10.1242/dev.148478.