

# ヒト胎盤幹細胞を用いた着床不全治療法の開発

東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野 助教 柴田 峻

## 要 約

近年、体外受精などの生殖補助医療(ART)技術の発展は著しく、その受療件数は年々増加している。しかしながら、その成功率は20%程度と頭打ち状態にある。ART不成功の主因として、着床不全が指摘されるが、着床現象については分子機序を含め不明な点が多く、改善に繋がる治療法の開発には至っていない。本研究では、ヒト胎盤幹(TS)細胞と子宮内膜細胞を用いて、ヒト胚着床現象を*in vitro*で再現し、着床の分子機序の解明と新たな着床不全治療の開発に繋げることを目的とした。我々は、ヒトTS細胞の三次元培養条件の最適化を行い、高効率でスフェロイドを形成させる培養条件を決定した。本条件では、ヒトTS細胞、ヒト栄養膜オルガノイドのみならずヒト子宮内膜上皮オルガノイドが生育可能であった。これらの細胞群の三次元下での混合培養により、ヒトTS細胞との接触が子宮内膜上皮細胞の増殖と腺成熟を促すことが示唆された。さらに我々は、培養条件の調節により、その空間的配置が生体子宮組織と酷似する改良型の子宮内膜上皮オルガノイドの作製に成功した。本オルガノイドは、ホルモン添加により成熟化を示し、脱落膜化能を有する子宮内膜間質細胞を含有するなど、着床期の子宮内膜の性質を反映する。今後、この*in vitro*モデルに血管・免疫細胞を付加することで、母体免疫も加味したモデルへ発展させる。これらの成果は、着床を制御する胚-母体間の相互コミュニケーションの包括的な理解やその分子機序に基づく着床不全治療戦略立案に寄与すると期待できる。また、子宮内膜の受容能を促す等、妊娠成功率の向上を図るための新しい細胞資源としてのTS細胞の有用性が示唆され、今後、応用に向けた研究を推進していく計画である。

## 緒 言

昨今の社会情勢や晩婚化に伴う高齢妊娠の増加に伴い、生殖補助医療(ART)の受療件数は年々増加している。しかしながら、移植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て移植しても妊娠に至らない難治性着床不全の症例が多数存在する。着床不全の原因のひとつに、胚-子宮内膜間の相互作用の不適性化が考えられる。その改善策を見出すには、着床機構をはじめとした胎児-母体間相互作用の理解が不可欠である。しかし、ヒト胚の使用には倫理的な制約がある。また、着床機序や初期発生機構は動物種により大きく異なり、動物モデルの知見を外挿できる範囲は少ない。したがって、母子間の相互作用を観察可能なヒト細胞モデルの活用が研究の発展に寄与し得る。近年、幹細胞やオルガノイド等の培養法の発展により、生体組織の部分的な模倣が可能になり、発生学や幹細胞研究等への応用が進んでいる。私たちの研究室では、2018年に世界で初めてヒト栄養膜幹(TS)細胞を樹立することに成功している<sup>1</sup>。このTS細胞は、受精卵および妊娠初期の胎盤組織から樹立でき、その遺伝子発現

やエピゲノムは生体胎盤を構成する栄養膜細胞と極めて類似し、未分化を維持した状態での長期培養や胎盤構成細胞への分化誘導が可能であり、ヒト胎盤研究に大変有用な細胞である。また、母体側の細胞に関しても、これまで長期維持が不可能であった子宮内膜上皮のオルガノイドの培養法が確立され、子宮体がんや子宮内膜症等の病態の反映が検討されはじめている<sup>2,4</sup>。本研究では、ヒトTS細胞および子宮内膜細胞を用い、ヒト胚着床や初期発生機構を*in vitro*で再現し、新たな着床不全治療法開発の基盤を創出することを目的とした。

## 方 法

### 1. ヒト子宮内膜上皮オルガノイドの培養と子宮内膜間質細胞の初代培養

子宮内膜上皮オルガノイドの樹立は既報<sup>2</sup>に従って行った。同意を得た妊娠6-8週の女性の中絶検体脱落膜組織を細切し、酵素液(コラゲナーゼV/ディスパーゼII)に浸し、37℃で1時間振盪しながら反応後、セルストレイナー(100  $\mu$ m)にトラップされた細胞分画をマトリゲルに包埋し培養した。2-3日に1

度の頻度で培地交換を行った。継代の際は、基礎培地を用いて培養プレートから剥離し、ピペッティングにより断片化させた。断片化させたオルガノイドを希釈し、マトリゲル内に包埋し継代した。子宮内膜間質細胞は、酵素処理後40  $\mu$ mのセルスストレーナーを通過した細胞分画をT-75フラスコに播種し、16時間後に非接着細胞を除去し、10%ウシ胎児血清(FBS)含有DMEM培地にて培養することで単離した。本研究は、東北大学倫理委員会の承認のもと行った。

## 2. ヒトTS細胞の培養

ヒトTS細胞は、既報<sup>15</sup>に従い培養を行った。凝集塊形成のための浮遊培養は非接着処理96ウェルUボトムプレートを用いて行った。

## 3. ヒト子宮内膜細胞のホルモン処理

子宮内膜上皮オルガノイドおよび子宮内膜間質細胞のホルモン処理は、培地に下記の濃度にて試薬を添加することで行った。 $\beta$ -エストラジオール( $E_2$ , 10 nM)、メドロキシプロゲステロン17アセテート(MPA, 1  $\mu$ M)、8-Br-cAMP(50  $\mu$ M)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG, 1  $\mu$ g/ml)、ヒト胎盤性ラクタゲン(hPL, 20ng/ml)、プロラクチン(PRL, 20ng/ml)。

## 4. ヒト子宮内膜モデルの作製

断片化させたヒト子宮内膜上皮オルガノイドとヒト子宮内膜間質細胞を混合し、ゲル化させた後、オルガノイド用培地で培養した。7-8日間培養後、 $E_2$  (10 nM)、MPA (1  $\mu$ M) および8-Br-cAMP (50  $\mu$ M) を添加し、成熟化を行った。

## 5. 免疫染色

細胞およびオルガノイドは4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、PBSで洗浄後、5%正常ヤギ血清および0.3% Triton X - 100含有PBSで1時間非特異的反応をブロックした。次いで、一次抗体を添加し4°Cで一晩反応後、蛍光標識二次抗体(Life Technologies) およびHoechst 33342(同仁化学)で染色した。観察はBZ-X810(Keyence)およびLSM 710(Carl Zeiss)を用いて行った。一次抗体は下記を使用した。抗EpCAM抗体(Cell Signaling, #2929S)、抗PGR抗体(Cell Signaling #8757S)、抗

FOXA2抗体(abcam, #ab108422)、抗SOX9抗体(Atlas antibodies, #HPA001758)、抗Vimentin抗体(Cell signaling, #5741S)。

## 6. ヘマトキシリン・エオジン染色

ヒト脱落膜組織は4% PFAで固定し、PBSで洗浄後、エタノールの希釈系列にて脱水後、CT-Pro20 (GenoStaff)を用いてパラフィン包埋し、3-5  $\mu$ mの厚さにて切片を作製した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、BZ-X810(Keyence)を用いて観察した。

## 7. フローサイトメトリー

Accutase(Life Technologies)を用いて細胞を剥離し、氷上で30分間抗体反応を行った。PBSで洗浄後、細胞を2% FBS含有PBSに懸濁し、BD FACS Canto II(BD Biosystems)およびFlowJo(LLC)を用いて解析した。抗体は、FITC-CD90 (eBioscience, #11-0909-42)、CD31(abcam, #ab134168)を用いた。

## 8. 定量的リアルタイムRT-PCR

RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAの抽出と精製を行った。cDNAは、PrimeScript II(タカラバイオ)を用いて作製し、リアルタイムPCR反応はStepOnePlus Real-Time PCR System(Applied Biosystems)とTB Green Premix Ex Taq™ II(タカラバイオ)を用いて行った。

## 結果

### 1. ヒト子宮内膜上皮オルガノイドの樹立

脱落膜組織より先行研究の方法<sup>2</sup>に従い、子宮内膜上皮オルガノイドを樹立した。オルガノイドについてwhole-mount染色を行い、上皮細胞マーカーであるEpCAMが陽性であることを確認した(図1A、B)。次に、ヒトTS細胞と子宮内膜上皮細胞の適切な共培養条件を検討した。はじめに、ヒトTS細胞を低吸着96 wellプレートに播種し、均質な凝集塊(スフェア)が形成される最小限の培養成分(Minimummedium)を決定した(図1C)。当該培地を用いることで、既報の培地(Expansion medium: ExM)と同様、子宮内膜上皮オルガノイドの樹立が可能であると同時に栄養膜オルガノイドの培養も可能であった(図1D)。

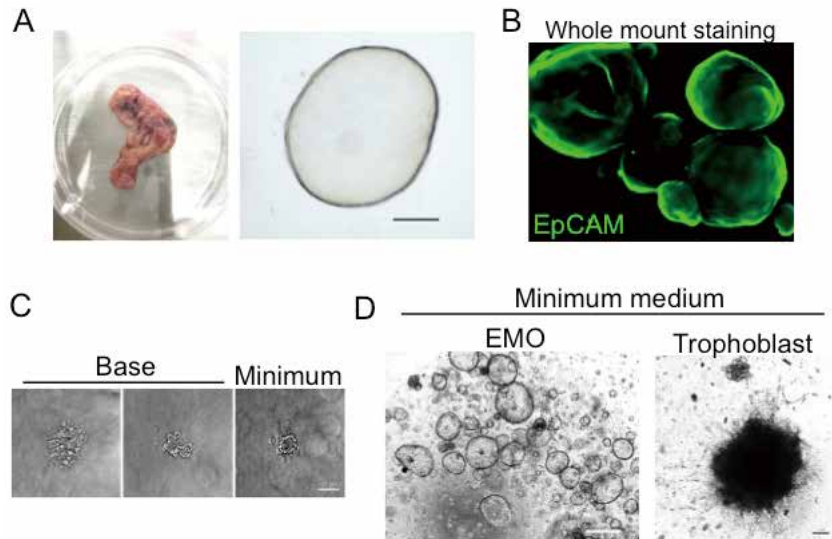


図1. 子宮内膜オルガノイドと三次元培養条件の検討

- (A) 妊娠6週のヒト脱落膜組織(左)と樹立した子宮内膜上皮オルガノイド. Scale bar, 200  $\mu$ m (右).  
 (B) 子宮内膜上皮オルガノイドのWhole mount免疫染色の画像. 緑: EpCAM.  
 (C) ヒトTS細胞の浮遊培養. Scale bar, 100  $\mu$ m.  
 (D) 最小限 (minimum) 培地で樹立した子宮内膜オルガノイドと栄養膜オルガノイド. Scale bar, 500  $\mu$ m (左), 200  $\mu$ m (右).

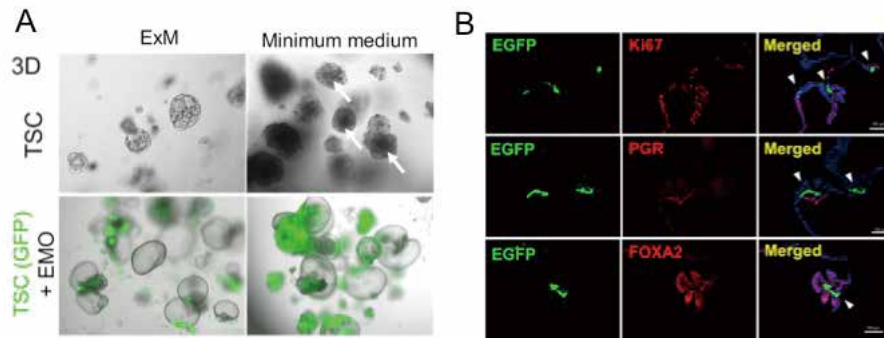


図2. 子宮内膜細胞とTS細胞の共培養

- (A) マトリゲル内で共培養した子宮内膜上皮オルガノイドとヒトTS細胞 (EGFP) の明視野画像. ExM: 子宮内膜上皮オルガノイド用培地. 矢印: 三次元下で増殖するTS細胞. 緑: EGFP (ヒトTS細胞).  
 (B) ヒトTS細胞と子宮内膜上皮オルガノイドの免疫染色画像. 矢印: ヒトTS細胞. 緑: EGFP (TS細胞), 赤: Ki67 (上段), PGR (中段), FOXA2 (下段), scale bar, 100  $\mu$ m.

## 2. ヒトTS細胞-子宮内膜上皮細胞間相互作用

次に、ヒトTS細胞と子宮内膜上皮オルガノイドをマトリゲルに混合し、三次元下で共培養を行った。ヒトTS細胞は恒常的にEGFPを発現する細胞株を用いた。既報の子宮内膜上皮オルガノイド用培地 (ExM) では、子宮内膜上皮オルガノイドは生育するものの、TS細胞については、空胞化するなど未分化状態を維持できなかった。一方、我々の決定したMinimum培地を用いた場合、TS細胞は三次元下で効率的に増殖し、子宮内膜上皮オルガノイドとともに培養可能であった(図2A)。共培養した細胞について免疫染色を行い、TS細胞と子宮内膜上皮オ

ルガノイドの相互作用について解析した。子宮内膜上皮オルガノイドにおけるTS細胞 (EGFP+) 近傍の細胞は、非接触部位の細胞と比べて増殖細胞のマーカーであるKi67陽性細胞が多く、また、ホルモンに応答して発現するPGRや子宮内膜腺上皮マーカーであるFOXA2についてもTS細胞との接触部位の子宮内膜上皮細胞にて発現が促された(図2B)。以上により、ヒトTS細胞と子宮内膜上皮オルガノイドの両者が生育可能な共培養条件を見出し、ヒトTS細胞の接触により子宮内膜上皮の増殖、ホルモン応答、腺分化が促進されることが示唆された。

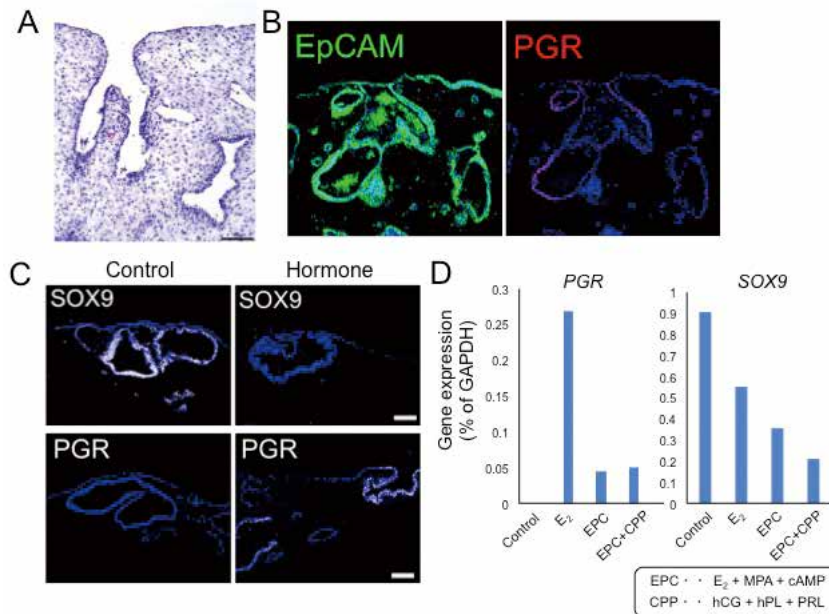


図3. 改良型子宮内膜上皮オルガノイドの確立

- (A) 妊娠6週のヒト脱落膜組織のHE染色画像。Scale bar 100  $\mu$ m。  
 (B) 改良型子宮内膜上皮オルガノイドの免疫染色画像。緑:EpCAM、赤:PGR、青:核。  
 (C) ホルモン処理群と対照群の改良型子宮内膜上皮オルガノイドの免疫染色画像。白:SOX9(上段)、PGR(下段)、青:核。Scale bar, 100  $\mu$ m。  
 (D) 改良型子宮内膜上皮オルガノイドの遺伝子発現解析結果

### 3. 改良型ヒト子宮オルガノイドの確立

妊娠6週の脱落膜組織について、HE染色を行いその形態を確認した。子宮内膜上皮は管腔から連続した腺上皮が組織内部に埋没する(図3A)。既存の子宮内膜上皮オルガノイドは単純な嚢胞状の構造をとるため、生体組織と形態的に類似しているとは言い難い。ヒト子宮内膜上皮オルガノイドを、Minimum培地と特定の添加因子および培養基剤を用いて培養することで、子宮内膜上皮は、空間的配置が生体と類似する構造をとることがわかった(図3B)。この改良型ヒト子宮内膜上皮オルガノイドに対して、エストラジオール(E<sub>2</sub>)、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル(MPA)、8-Br-cAMP、胎盤より分泌されるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、ヒト胎盤性ラクタゲン(hPL)、子宮内膜間質細胞より分泌されるプロラクチン(PRL)等を添加することで、未分化マーカーであるSOX9の発現低下やE<sub>2</sub>応答性分子PGRの発現上昇等にみられるホルモン応答を示すことを確認した(図3C, D)。

### 4. ヒト子宮内膜アセンブロイドモデルの確立

次に、我々は、着床において重要な役割を果たす子宮内膜間質細胞の付加を検討した。ヒト脱落膜組織より単離したヒト子宮内膜間質細胞が繊維芽細胞マーカーCD90については陽性、血管内皮マ-

カーCD31については陰性であることを確認した(図4A)。また、ホルモン添加により、敷石状の形態変化や脱落化マーカー遺伝子の発現上昇を示した(図4B, C)。子宮内膜間質細胞を改良型子宮内膜オルガノイドに混合し、上皮細胞と間質細胞の共存が可能であることを確認した(図4D)。

### 考察

本研究では、ヒト胎盤幹(TS)細胞と母体細胞を用いて、ヒト胚着床現象を*in vitro*で再現し、着床の分子機序の解明と新たな着床不全治療の開発に繋げることを目的とした。我々は、ヒトTS細胞の浮遊培養条件の最適化を行い、高効率でスフェロイド形成可能な最小限の至適培養条件を決定した。先行研究で用いられる子宮内膜上皮オルガノイド用の培地を用いた場合、ヒトTS細胞は三次元下で未分化を維持できなかった。一方で、我々が決定した培養条件では、子宮内膜上皮オルガノイド、ヒトTS細胞、ヒト栄養膜オルガノイドの増殖が可能であり、当該条件を用いることにより、TS細胞と子宮内膜上皮細胞の相互作用を三次元培養下で解析可能となった。興味深いことに、ヒトTS細胞との接触により子宮内膜上皮の増殖や腺成熟が促され、胎盤形成過程の栄養膜と子宮内膜の相互作用を反映している可能性が示唆された。さらに我々は、空間的配置がよ

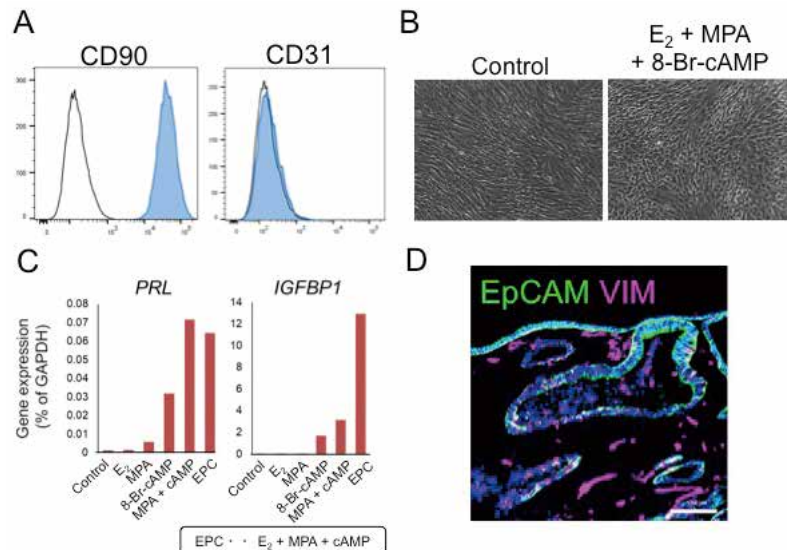


図4. 子宮内膜間質細胞と子宮内膜アセンブロイドモデルの作製

- (A) 子宮内膜間質細胞の表面抗原解析結果。  
 (B) 対照群とホルモン処理群の子宮内膜間質細胞の位相差画像。  
 (C) ヒト子宮内膜間質細胞の遺伝子発現解析結果。  
 (D) 改良型子宮内膜上皮オルガノイドと間質細胞を混合したアセンブロイドモデルの免疫染色画像。  
 緑: EpCAM, 紫: Vimentin, 青: 核. Scale bar, 100  $\mu$ m.

り生体組織と類似した改良型子宮内膜上皮オルガノイドの確立に成功した。従来の子宮内膜上皮オルガノイドは胚の着床する管腔面が構造内部に埋没しているため、着床の瞬間の再現には適さなかった。しかしながら、我々の確立した改良型子宮内膜上皮オルガノイドは、管腔面が外部に露出し、子宮内膜上皮の管腔面と胚の接触の観察が可能となった。さらに、改良型子宮内膜上皮オルガノイドに、脱落膜化能を有する子宮内膜間質細胞も共存させることが可能であった。今後、血管内皮、免疫細胞の付加を検討し、生体の再現精度を向上したアセンブロイドを作製したい。胚モデルとの共培養により、母体免疫も加味した着床モデルへ発展させる。これらの成果は、着床を制御する胚-母体間の相互コミュニケーションの包括的な理解やその分子機序に基づく着床不全治療開発の基盤となることと期待している。また、子宮内膜の成熟を促す等妊娠成功率の向上を図るための新しい細胞資源としてのTS細胞の有用性が示唆され、今後は、応用に向けた研究を推進していく計画である。

#### 参考文献

- Okao et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2018), 22(1), 50-63.e6.
- Turco et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nature Cell Biology* (2017) 19(5), 568-577.
- Boretto et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development* (2017), 144(10), 1775-1786.
- Boretto et al. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nature Cell Biology* (2019), 21(8), 1041-1051.
- Takahashi et al. Loss of p57KIP2 expression confers resistance to contact inhibition in human androgenetic trophoblast stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2019), 116(52), 26606-26613.

## **Abstract**

Although the development of assisted reproductive technology (ART) has been remarkable, the success rate of ART is still low at around 20%. One of the main causes is implantation failure. However, detailed mechanisms of human embryo implantation are still unknown and no therapeutic approaches have been developed. Thus, the aim of this study is to recapitulate human implantation using human fetal and maternal cells in vitro, and to develop a new treatment for implantation failure using human cell resource including human trophoblast stem (hTS) cells. We optimized the 3D culture conditions for formation of hTS cell spheroids. Under these conditions, not only hTS cells and human trophoblast organoids but also human endometrial epithelial organoids (hEMO) can be efficiently cultured. Co-culture experiments of hTS cells and hEMO revealed that contact with hTS cells stimulates proliferation and glandular maturation of endometrial epithelial cells. Furthermore, by modifying 3D culture conditions, we succeeded in generating improved type of EMO (AdvEMO) whose spatial arrangement closely resembles in vivo human endometrium tissues. This organoid exhibited maturation by sex hormone treatment and could include endometrial stromal cells. In the future, endothelial cells and immune cells will be added for further improvement of modeling accuracy. These results are expected to contribute to the development of treatment strategies for implantation failure. Moreover, the usefulness of hTS cells as a new cell resource to improve the pregnancy success rate, by promoting endometrial receptivity, has been suggested. We would like to promote research for application in the future.