

ヒト子宮内膜オルガノイドモデルを用いた ヒト着床現象の模倣

柴田 峻, 有馬 隆博

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

緒言

近年の生殖補助医療（ART）技術の向上は、目覚ましい。晩婚化、晩産化が進む現代において、胚培養液や胚移植技術の発展により ART は一般に普及し、妊娠の可能性を大きく広げているが、その成功率はまだまだ十分とはいえない。その原因として、胚の着床障害が注目されている。着床とは、胚が母体の子宮内膜へ侵入し、胎盤を形成し始める一連の妊娠成立過程を指す。動物種により、この着床機序は異なることが知られている。また倫理的・技術的な制約があるため、ヒト着床の詳細な分子機序は不明な点が多く、未解決な課題も多く残されており、研究のための最適なモデルの必要性が指摘されていた。一方、近年子宮内膜上皮細胞をマトリゲル内で培養することで、ホルモン応答性の担保や長期継代を可能とした子宮内膜オルガノイド（EMO）が報告された¹⁾。しかしながら、この EMO は単純な球状構造であり、胚が接着する管腔（アピカル）面が露出しておらず、着床研究に供するのが困難であった。そこで私たちは、まず、アピカル面が外側に露出した新たなヒト子宮内膜モデルの開発を行い、その特性が生体の子宮内膜と類似することを確認した。次に、ナイーブ型ヒト多能性幹細胞から誘導した胚盤胞様構造（プラストイド）を、この子宮内膜モデルと共培養することで、世界で初めてヒト胚着床を *in vitro* で再現する胚-子宮内膜アセンブロイドを作製することに成功した。このアセンブロイドを通じて、ヒト胚の着床過程について直接観察することが可能となった²⁾。このモデルについての詳細は、日本語の総説を³⁾参照していただきたい。本稿では、少し異なる視点からその内容を補いたい。

新たな子宮内膜オルガノイドモデルの作製

生体の子宮内膜組織はコラーゲンの含量が高い。私たちは EMO 培養時の 3D 培養基質に、コラーゲンを添加することを検討した。その結果、コラーゲンを用いた 3D 培養では、上皮細胞が細胞外基質の表層へ積極的に移動することを明らかにした。また、表面の上皮細胞層の高さを画像解析にて定量すると約 $20\mu\text{m}$ であり、これはヒト子宮内腔上皮層の高さとほぼ同等であった。また、管腔面に局在する絨毛が外を向き、基底膜が内側に位置することをラミニンなどのマーカータンパク質の免疫染色により確認した。これらの特徴から、私たちはこの新たな EMO をアピカルアウト EMO（AO-EMO）と命名した（図 1A）。この AO-EMO は、表面の上皮細胞と内側の屈曲した上皮細胞とが連続し、生体の子宮内膜組織の空間構成を模倣していた。次に、トリプシン処理により、表層に露出した細胞と内部の細胞集団を区別し、遺伝子発現の違いについて検討した。表層の細胞では、生体の子宮内膜表面上皮と同様、*WNT7A* の有意な発現上昇を示した（図 1B）。遺伝子オントロジー（GO）解析では、表層の細胞は“positive regulation of cell motility（細胞運動の正の調節）”“positive regulation of locomotion（運動の正の調節）”“positive regulation of cell migration（細胞移動の正の調節）”に関連する遺伝子が抽出され、ゲルの表層を覆うように移動する上皮細胞の表現型を反映していた。

AO-EMO のホルモン応答性

EMO はホルモン応答性を示す。AO-EMO に、エストラジオール (E_2)、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル (MPA)、プロラクチン (PRL) などのホルモンと 8-Br-cAMP を順次添加した。その結果、AO-EMO は分泌期にみられるような子宮内膜腺の顕著な肥厚を示し、プロゲステロン受容体 (PGR) 等の発現が増加した（図 1C）。また、分泌期特異的蛋白である PAEP（グリコデリン）の分泌量は、従来のマトリゲルでの培養条件

連絡先：柴田 峻 東北大学大学院医学系研究科
情報遺伝学分野

〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2 番 1 号 5 号館 9F

TEL : 022-717-7844

FAX : 022-717-7063

E-mail : shun.shibata.a3@tohoku.ac.jp

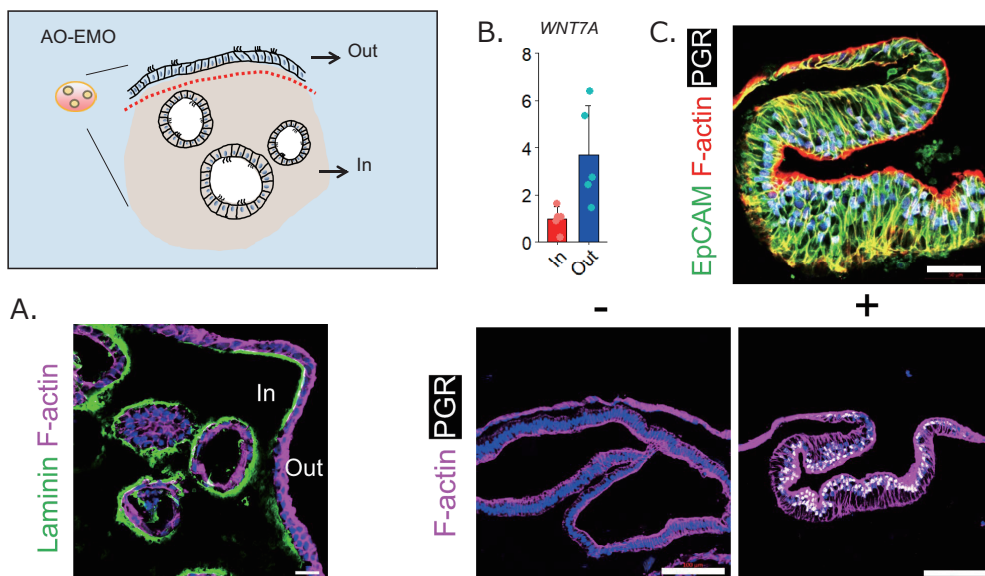


図1 新たな子宮内膜モデル (AO-EMO)

A: 内側に基底膜を形成 B: 管腔上皮マーカー WNT7A の遺伝子発現 C: ホルモン応答性

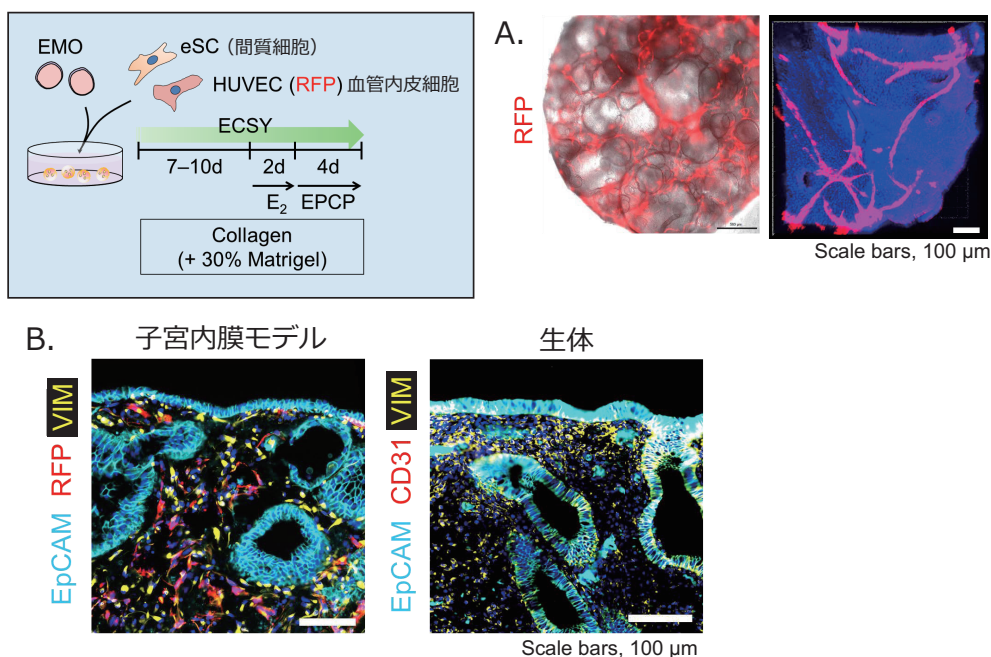


図2 複合型子宮内膜モデルの作製

A: 血管網ネットワークを形成 B: 生体の子宮内膜組織に類似した構造

よりも上昇していた。これらの結果より、AO-EMO のホルモン応答による成熟が、従来のマトリゲルを用いた EMO よりも高度であることを示唆していた。また、コラーゲン培養は、低酸素下での子宮内膜組織の修復時にみられる遺伝子発現パターンを示すことも明らかとなった。

複合型子宮内膜モデルの作製

子宮内膜組織は上皮細胞に加え、間質細胞、血管内皮細胞等により構成されている。私たちはまず、赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現する血管内皮細胞 (HUVEC) を、EMO と共培養した。その結果、HUVEC 同士が連結し、自律的に血管網を形成した (図2 A)。また、この血管網は、内部に空洞を有する管腔構造を形成してい

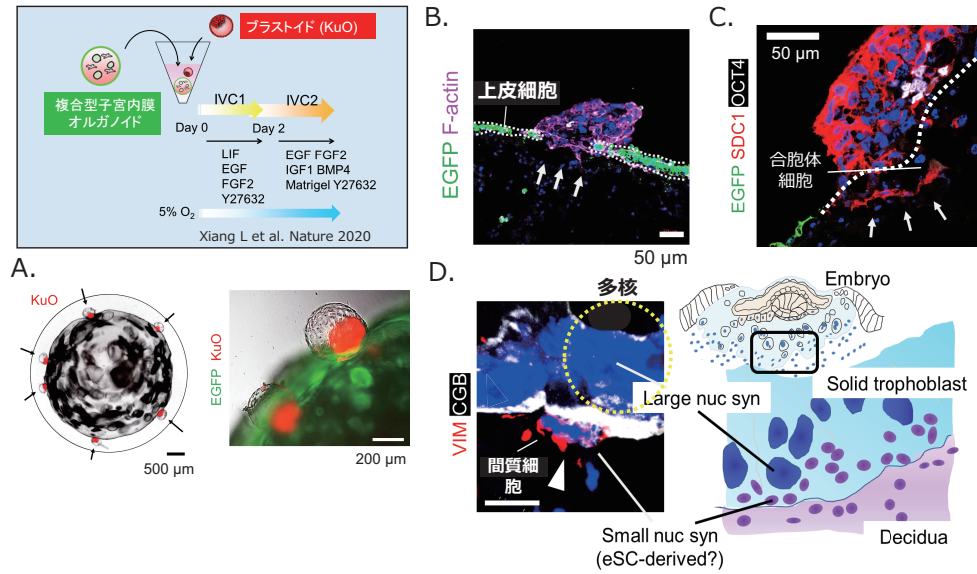


図3 ヒト Blastoid と子宮内膜モデルによる 3D 着床モデルの創出
A: 着床モデルによる胚浸潤の再現 B: 上皮細胞の破壊 C: 合胞体細胞の浸潤 D: 原始合胞体様構造の出現

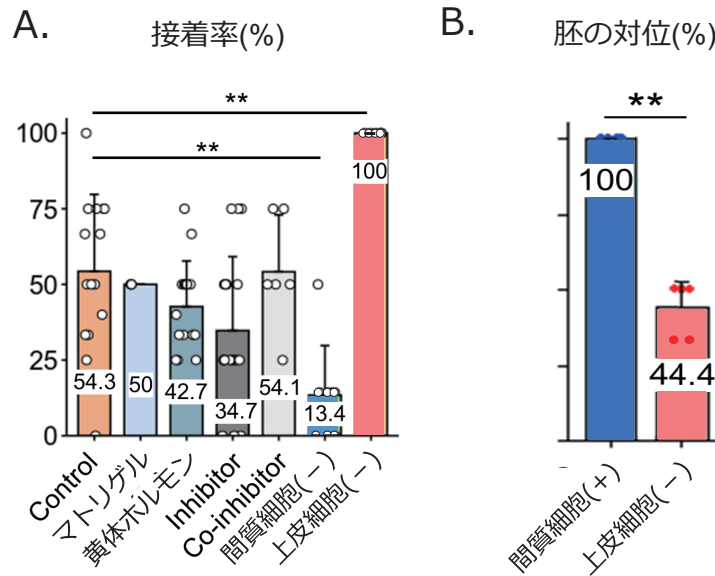


図4 胚着床への影響因子の検討
A: 間質細胞と上皮細胞は、ブラストイドの着床率に大きな影響を及ぼす。
B: 子宮内膜上皮を除いたモデルでは、着床の方向性がランダムとなる。

ることを確認した。さらに、間質細胞、HUVEC をカラーゲンベースのゲルに混合することで、生体内の子宮内膜組織と同様の空間配置と構成細胞を有する複合型ヒト子宮内膜モデルの作製に成功した (図 2 B)。遺伝子発現から総合的に評価するために、シングルセルのトランスクリプトーム解析を実施し、生体と類似することも確認した。以上より、細胞組成と空間的配置を模倣した、子宮内膜モデルの開発に世界で初めて成功した。

ヒト胚の着床を模倣する胚-子宮内膜アセンブロイドモデル

近年、ヒト胚の代替資源として、ヒト多能性幹細胞から誘導される胚盤胞様の構造であるブラストイド³⁻⁵⁾が注目されている。私たちは前出の複合型子宮内膜モデルとブラストイドを共培養し、その相互作用について検討した。子宮内膜上皮細胞を追跡するため、レンチウイルス

を用い緑色蛍光タンパク質 (GFP) を遺伝子導入し, GFP を恒常的に発現する EMO を樹立した. また, Kusabira Orange (KuO) を導入したナীব型ヒト ES 細胞からブラストイドを作製し, 複合型 EMO と浮遊培養で共培養を行った (図 3 A). その結果, ブラストイドは ICM 側から EMO に接着し, さらに内部に入り込むように扁平化した. ブラストイドの接着面では子宮内膜上皮が破壊され (図 3 B), OCT4+ の ICM 様細胞の構造の直下では, SDC1+ の合胞体栄養膜細胞が子宮内膜モデルの内部に浸潤している様子が確認された (図 3 C). さらに, 上皮細胞のバリアを破壊した合胞体栄養膜細胞は大きな核を形成し, 直下に存在するビメンチン (VIM) + 間質細胞と接触していた (図 3 D). 大きな核を含む合胞体栄養膜細胞の構造は, ヒト胚の着床後にみられる胚-子宮内膜界面の原始合胞体に類似していた. これらの結果より, 3D 共培養システムである胚-子宮内膜アセンブロイドは, 胚と子宮内膜の界面における事象を模倣していることが示唆された.

次に, この 3D 着床モデルを用いて, ブラストイドの接着に影響を与える因子について検討した (図 4 A). まず, 培地中に添加した低濃度のマトリゲルやホルモン, ホルモン受容体の阻害剤処理の影響を調べたが, 有意な変化は認めなかった. 一方で, 子宮内膜上皮と間質細胞は, 着床率に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった. つまり, 子宮内膜上皮細胞がない場合には, すべてのブラストイドが接着し, 間質細胞がない場合は, 接着率は優位に低下していた. また, 着床モデルを用いて, 胚の対位 (接着の方向性) について検討した (図 4 B). その結果, 上皮細胞がない場合, ブラストイドの接着の方向性がランダムであった. 以上により, 子宮内膜上皮細胞は基本的に胚着床のバリアとして働きながら, 正常な胚の接着の方向性 (対位) を制御していることが示唆された.

まとめ

これまで倫理的・技術的に困難であったヒト胚の着床現象の研究を行うため, 胚の代替となるブラストイドと子宮内膜モデルを利用し, 胚-子宮内膜アセンブロイドモデルを開発した. このモデルは, 胚と子宮内膜の境界面を 3D で可視化することを可能にし, ヒト胚発生初期の胚由来細胞と子宮内膜細胞の融合が起こることを観察することができた. 今後, さらに本システムの多様な胚由来細胞と子宮内膜細胞に, トランスフェクションやゲノム編集技術を活用し, 両方の細胞の相互作用に及ぼす影響を検討し, 着床に関与する分子メカニズムの全貌を明らかにすることが期待される. また, 胚着床のメカニズムの理解を深めることで, 生殖補助医療の成功率を高め, 反復着床不全に対する新たな解決策を提供できる可能性も期待できる.

参考文献

1. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, Hollinshead M, Marsh SGE, Brosens JJ, Critchley HO, Simons BD, Hemberger M, Koo BK, Moffett A, Burton GJ (2017) Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol* 19 (5), 568–577.
2. Shibata S, Endo S, Nagai LAE, Kobayashi EH, Oike A, Kobayashi N, Kitamura A, Hori T, Nashimoto Y, Nakato R, Hamada H, Kaji H, Kikutake C, Suyama M, Saito M, Yaegashi N, Okae H, Arima T (2024) Modeling Embryo-Endometrial Interface Recapitulating Human Embryo Implantation. *Science Advances* 10, eadi4819.
3. 柴田 峻, 小林枝里, 有馬隆博 (2023) 胎盤発生と細胞運命決定機構. *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 30 (1)
4. Yu L, Wei Y, Duan J, Schmitz DA, Sakurai M, Wang L, Wang K, Zhao S, Hon GC, Wu J (2021) Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature* 591, 620–626.
5. Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A, Guo G (2021) Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell* 28, 1016–1022 e1014.