

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ART (生殖補助医療) における胚着床率の劇的向上に向けた多階層幹細胞・着床ニッチ構築を目指すヒト胚発生オルガノイドモデル作製
(英語) Generation of human embryonic organoid model by multi-layered stem cells and implantation niche construction

研究開発実施期間: 令和3年6月1日 ~ 令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 柴田 峻
(英語) Shun Shibata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東北大学・大学院医学系研究科・助教
(英語) Tohoku University Graduate School of Medicine・Assistant professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

超少子化が加速する現代社会において、不妊症対策は国家的な重要課題である。最近の生殖補助医療 (ART) の技術向上は目覚ましいものの、胚の着床率は依然として低く (約20%)、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。また、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予測されるが、これまで効果的な治療法の開発は進んでいない。その理由として、①ヒトとマウスでは着床機構が大きく異なり、外挿できないこと ②ヒト胚を使用した実験には、倫理的制約がある等が挙げられる。つまり、着床不全の課題を克服するためには、胚および子宮内膜の双方の相互作用を観察可能な適切な胚着床モデルが必須である。そこで本研究では胚および母体の細胞とオルガノイドをはじめとする三次元培養技術を活用し、ヒト胚着床オルガノイドモデルを確立することを目的とした。

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 (Turco et al. Nature Cell Biol. 2017)。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 (ブラストイド) 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。また、このアセンブロイドの観察を通じて、ブラストイドから派生した合胞体細胞と子宮内膜細胞が誘導することを発見した。これらの現象は、同意・承認を得て使用したヒト胚の培養でも再現できることを確認した。得られた成果は論文化（Shibata S et al. Science Advances 2024）した。以下に、その詳細を記す。

（1）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 μm 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

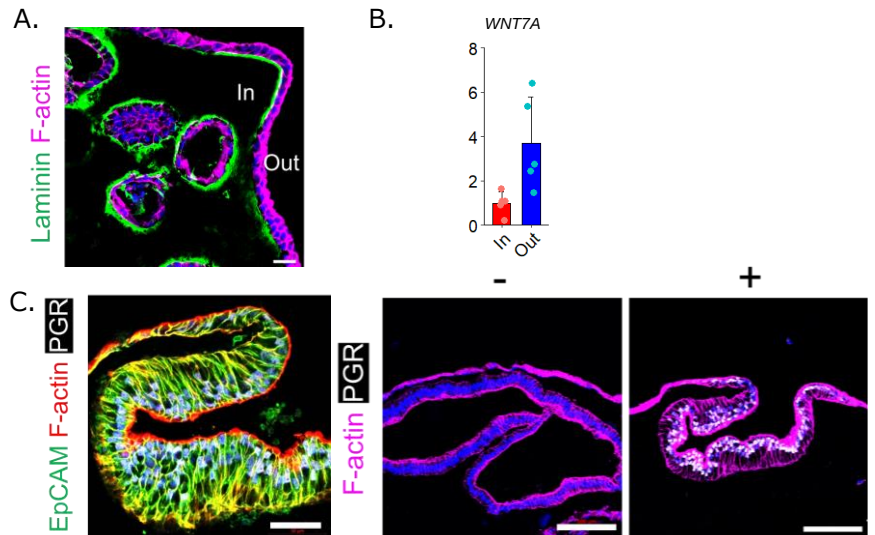


図 1.新たな子宮内膜モデル（AO-EMO）

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

する繊毛が外を向き、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。

（2）AO-EMO のホルモン応答性

EMO は、ホルモン応答能を示す。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。

(3) 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 2A)。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ることを確認した。さらに、間質細胞、HUVEC をコラーゲンベースのゲルに混合することで、生体

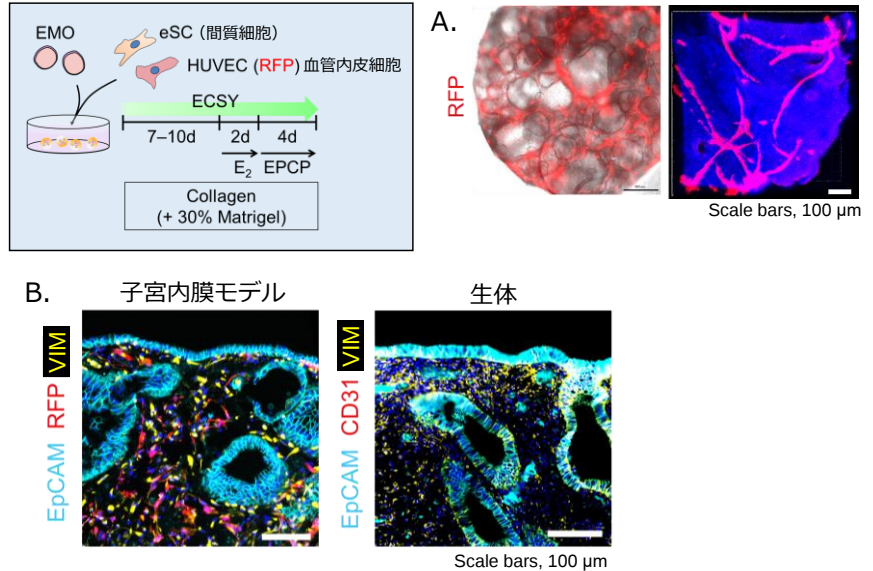


図 2. 複合型子宮内膜モデルの作製

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

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 2B)。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。

(4) 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が注目されている (Yu L et al. Nature. 2021. Yanagida A et al. Cell Stem Cell. 2021.等)。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

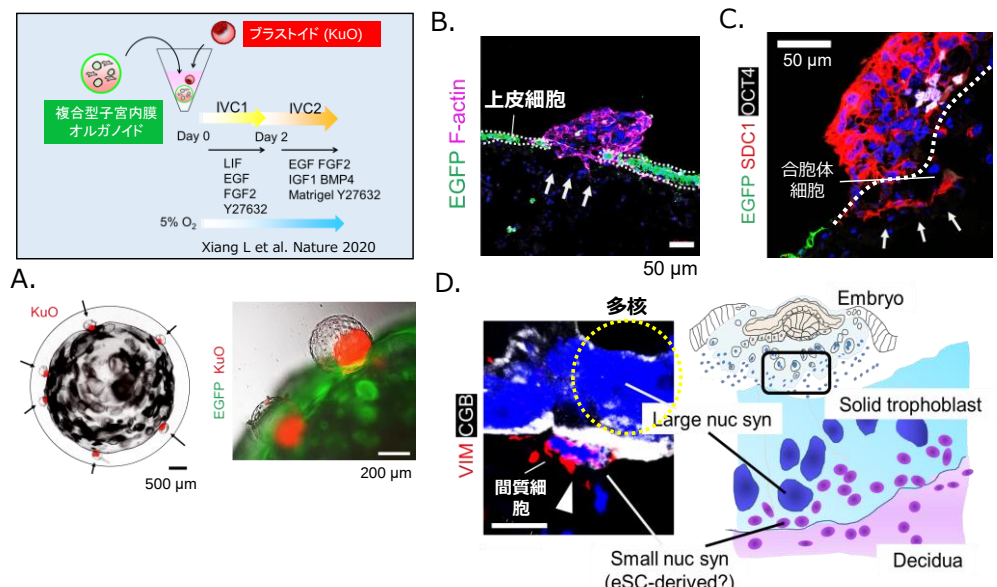


図 3. ヒト Blastoid と子宮内膜モデルによる 3D 着床モデルの創出

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

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て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 3A）。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 3B）、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 3C）。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 3D）。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 4A）。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 4B）。その結果、上皮細胞が無い場合、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。

以上、私たちはこれまで倫理的・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、さらに免疫細胞の役割、つまり免疫特権における分子メカニズムについて研究を進めていきたいと考えている。

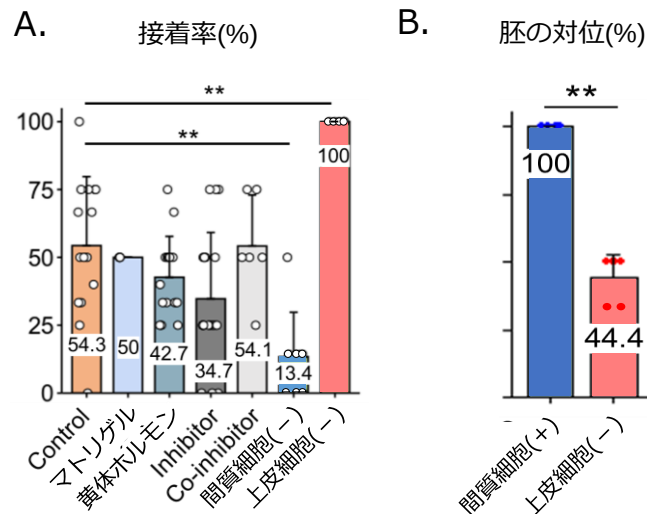


図 4. 胚接着への影響因子の検討

A. 間質細胞と上皮細胞は、ブラストイドの接着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、接着の方向性がランダムとなる

This research focuses on developing a novel human embryo implantation organoid model to address implantation failures in infertility treatments. Utilizing 3D culture techniques and pluripotent stem cells, we have successfully engineered a new human endometrial model and an embryo-uterine lining assembloid that replicates human embryo implantation in vitro. These advancements offer a critical tool for further exploration and potential resolution of implantation issues. The findings have been published in Science Advances in 2024.

(1) Creation of a New Endometrial Organoid Model

We developed a novel endometrial organoid model (EMO) mimic in vivo endometrial tissue. We named this model Apical-Out EMO (AO-EMO) due to its structural mimicry of the human endometrium. Further analyses differentiated surface from internal cells and showed increased expression of WNT7A, similar to natural conditions. This model successfully represents the dynamics and spatial arrangement of endometrial tissue, providing insights into epithelial cell behavior.

(2) Hormonal Responsiveness of AO-EMO

AO-EMO exhibited significant thickening of the endometrial glands, typical of the secretory phase, and an increase in the expression of progesterone receptors (PGR) among other markers. Furthermore, the secretion of PAEP (glycodelin), a protein specific to the secretory phase, was higher in AO-EMO compared to traditional Matrigel cultures. These findings suggest that the hormone-induced maturation of AO-EMO is more advanced than that of EMOs cultured in traditional Matrigel. Additionally, collagen culturing revealed gene expression patterns associated with endometrial tissue repair under hypoxic conditions.

(3) Creation of a Composite Endometrial Model

Endometrial tissue comprises epithelial cells, stromal cells, and vascular endothelial cells. By mixing stromal cells and HUVECs in a collagen-based gel, we successfully developed a composite human endometrial model that mimics the spatial arrangement and cellular composition of in vivo endometrial tissue. Single-cell transcriptome analysis was conducted to comprehensively evaluate gene expression, confirming similarities to in vivo conditions. This achievement marks a global first in the development of an endometrial model that replicates both cellular composition and spatial configuration.

(4) Embryo-Endometrial Assembloid Model Mimicking Human Embryo Implantation

We co-cultured blastoids with our composite endometrial model to study their interactions. The blastoids adhered to the EMO from the ICM side and flattened into the model. This adhesion disrupted the endometrial epithelium, and beneath the ICM-like cells, syncytiotrophoblast-like cells were observed infiltrating the endometrial model. These syncytiotrophoblast-like cells, forming large nuclei, contacted the underlying stromal cells, resembling the primitive syncytium at the embryo-endometrial interface after implantation in humans. We then used this 3D implantation model to explore factors affecting blastoid adhesion. It was evident that the presence of endometrial epithelial and stromal cells significantly influenced the implantation rate. Without endometrial epithelial cells, all blastoids adhered; absence of stromal cells significantly decreased adhesion rates. Furthermore, studies on the orientation of blastoid adhesion revealed that without epithelial cells, the direction of blastoid adhesion was random. These results suggest that endometrial epithelial cells act as a barrier to embryo implantation while controlling the correct orientation (apposition) of normal embryo adhesion.

We have developed an embryo-endometrial assembloid model using blastoids as alternatives to human embryos and a uterine model, facilitating the study of human embryo implantation, a process previously hindered by ethical and technical challenges. This model enables 3D visualization of the interface between the embryo and the endometrium, allowing for the observation of the fusion between embryonic and endometrial cells at the early stages of human embryonic development.