

分担研究報告書

分担研究課題 「ヒト胎盤オルガノイド作製とメタボローム解析」

研究分担者 西田 欣広

(大分大学医学部産科婦人科学講座)

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTの*in vitro*試験法が開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法が開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

ここではその中で分担研究「胎盤オルガノイドによる毒性評価系の開発」について要旨を述べる。ヒト流産は妊婦の7-10人に1人の割合で起こり、その90%は妊娠12週までの早期流産といわれている。その原因もほとんどが胎児の染色体異常とされている(産婦人科学会HP)。しかしながら胎盤の形成に関しては長い間、三次元胎盤モデルがなかったため、胎盤異常と流産の関係についての言及はほとんどなかった。これまで胎盤の形成異常の研究はその後の妊娠高血圧症候群や癒着胎盤との関係に多くの分子が関与しているとする報告がほとんどである。しかしながら、このような現象は結果であり、本来、胎盤の形成期から影響を受けているのではないかと仮説が本研究を進める背景になった。そこで細胞レベルから組織レベルの間の生体組織を模倣できる胎盤モデルとしてミニ胎盤(絨毛オルガノイド)の作成を行う構想に至り、2年前から先行研究としてミニ胎盤の樹立のため、培養条件を試行錯誤している。

今回、我々のグループでは三次元培養法開発の責任者であるHans Clevers教授(オランダ)直伝の手法を応用し、ヒトおよびマウス由来のミニ胎盤を樹立に成功した。このミニ胎盤を用いた生殖毒性評価を行う研究は我々の検索する限り、国内外においてほとんど報告例がない領域である。我々が独自に樹立したミニ胎盤を用いて初期オルガノイド組織より網羅的に代謝産物のメタボローム解析を行い、マーカー毒物(サリドマイド)添加環境下での代謝変動の解析を計画した。ミニ胎盤樹立からメタボローム解析によりこれまで細胞レベルでしか分からなかった未知な胎盤毒性評価系の開発を目指している。本研究により、迅速で低コスト、省動物に資する新規*in vitro* DNT評価手法(動物実験代替法)の開発の補完につながることを期待される。我々のヒト胎盤オルガノイド評価系により、化学物質の*in vitro*代謝プロファイルが明らかとなることから、胎盤代謝物を加味した評価ができることが期待され、試験系の予測精度ひいてはヒトへの外挿性の向上が期待できる。

A. 研究目的

(背景) 2010 年ころより“ミニ臓器”と呼ばれるオルガノイド研究が注目されるようになった。生体内組織や臓器にきわめて似ている 3D 培養システムは分化した組織の複雑な空間的パターンを再現でき、生理学的機能の解析に有用である。これまで様々な組織からオルガノイドが樹立され研究が進んでいる。

我々の生殖領域で扱う胎盤は胎児と母親の子宮に接続する臓器で妊娠時に形成される。妊娠初期に胎児が死亡する原因はほとんど解明されておらず、胎盤に起因するケースも多々あると想像されているが適切なモデルがこれまで存在しなかった。ヒトのミニ胎盤の作成は最も遅れていたが、2018 年末ようやく英ケンブリッジ大学の研究チームがその作成に成功した (Turco MY, et. al. *Nature*. 2018)。その後、我々の研究チームも約 2 年の先行研究でヒトおよびマウス由来の胎盤の絨毛幹細胞よりミニ胎盤の作成を行っている。本分担研究では子宮内胎児の成長のため、あらゆる機能をもつ初期胎盤の包括的メタボローム解析を主軸にした毒物代謝機能の解明を特に種差を通して明らかにすることを目指す。

(目的) 今回の研究課題では、三次元培養法開発の責任者である Hans Clevers 教授 (オランダ) 直伝の手法を応用し、ヒトおよびマウス由来の胎盤より安定したオルガノイド胎盤 (以下、ミニ胎盤) を樹立する。このミニ胎盤を用いた病態解析を行う研究は我々の検索する限り、国内外においてほとんど報告例がない領域である。さらに我々が独自に樹立したミニ胎盤を用いて初期オルガノイド組織より網羅的にマーカー毒物 (サリドマイド) を用いて代謝産物のメタボローム解析を行う。

メタボローム解析自体も我々はその微

量解析法ですでに特許を有しており、他の研究者より一歩進んだ研究環境にある。ミニ胎盤樹立からメタボローム解析によりこれまで細胞レベルでしか分からなかった未知なる胎盤機能への新たな挑戦への扉を開けるであろう。

本研究ではマウスとヒトの種差の違いによる初期絨毛での薬物毒性代謝を比較することでよりヒトに外挿できる試験系の予測精度の強化を補完することを目的とする。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

A-1: 大分大学倫理委員会承認 2022 年 12 月 12 日 (承認番号 2432)

A-2: 大分大学動物実験委員会承認 2023 年 5 月 19 日 (承認番号 232901)

B. 研究方法と結果

B-1: ヒトの胎盤オルガノイド作製 (*in vitro* / organoid) :

ヒト胎盤オルガノイド作製: 令和 5 年度は予定通り、人工妊娠中絶もしくは出産した妊婦の胎盤 (絨毛) 組織を、患者の同意を得て採取し、英ケンブリッジ大学グループの方法 (Sheridan MA, et al. *Nature Protocols*. 2020) を基本手技にして独自の手法を加え胎盤オルガノイドを作製する。それぞれの胎盤組織マーカーによる免疫染色により胎盤オルガノイドが形成されていることを確認した。

B-2: マウスの胎盤オルガノイド作製 (*in vitro* / organoid) :

マウス胎盤オルガノイド作製: また令

和5年度は妊娠マウス(ICRマウス,E10.5)より胎盤を採取し、ヒトと同様に胎盤オルガノイドを作成する。マウス胎盤は絨毛膜と脱落膜が混在したラビリンス構造でその分離は困難である。われわれの作成した胎盤オルガノイド構造も絨毛膜と脱落膜(プロラクチン陽性)が一部混在したオルガノイドとなって作成された。

B-3: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物(サリドマイド)添加による培養液メタボローム解析(metabolome analysis) :

モデル物質として、サリドマイド(thalidomide 分子量: 258.23、CAS No.: 50-35-1、純度98%以上、ロット番号: 0485409-26、富士フイルム和光純薬(株)[製造元: Cayman Chemical Co.])を使用した。

これまで独自に樹立したそれぞれのオルガノイド(1万個≒1drop matrigel)にモデル薬物としてサリドマイド(0-200 μM)を時間依存性(0-48hr)に作用させたサンプルリングが終了している。現在GC-MS用の試料を作成し、GC-MS/MS(QT8040, SHIMADZU)によるサンプル解析およびLabSolutions Insight BiologicsおよびSIMCA(SHIMADZU)ソフトによる多変量メタボローム解析(OPLS-DA法)を行っている。まず種差による薬物の生殖毒性評価を代謝産物の相違から網羅的に検討する。われわれの使用しているGS-MS/MS解析装置では約460種の一次代謝産物を網羅的に検出可能で、今回の検討で胎盤オルガノイドから検出される一次代謝産物は約250種が検出感度以上であった。現時点でのパイロット研究でのメタボローム解析の結果、サリドマイド負荷によりマウス胎盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は33種でヒト胎

盤オルガノイドからのみ検出される一次代謝産物は13種が確認された。このようにすでに組織から産生される一次代謝産物から検討することで種差に与える影響の新知見が得られており今後、詳細に解析を行っていく。

B-4: 樹立オルガノイドに対するマーカー薬物(サリドマイド)添加によるDNA二重鎖切断活性の解析(DNA double-strand breaks analysis) :

一方、細胞障害毒性の評価としてサリドマイド添加によるDNA二重鎖切断活性をわれわれの開発したパルスフィールド電気泳動法により解析を行い、再現性の確認作業を継続中である。

B-5: LC-MSによる培養上清中のサリドマイドおよびその代謝産物5- or 5'-hydroxythalidomideの測定

添加 24 時間後の培養上清中のthalidomideは95%以上が代謝されており、我々の確立したミニ胎盤は十分な薬物分解酵素活性を維持していることが判明している。現在さらに種差においてその代謝活性の相違について検討している。

C. 考察と結論

令和5年度はヒトとマウスよりそれぞれ胎盤オルガノイドを樹立することに成功し、当初の予定を完遂できたと考えている。先行論文に比較して効率的にかつ簡易にヒト胎盤を樹立することができた。再現性・継代も半年にわたって10回以上継代を安定的に管理することが可能となった。また、マウスにおいても同様にマウス専用のサプリメントを調整し、マウス胎盤オルガノイド用組織(ラビリンス構造)の構築を樹立した。特にマウス胎盤オルガノイド樹立は現在までに報告例もなくわれわれの樹立が世界でいち早く行われているもの

推定される。今後はさらにオルガノイド組織の精度を高めるとともに、省動物に資する発達神経毒性の新規評価手法の開発のためモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点から研究を深めていきたい。

D. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Masakazu Segawa, Yoshihiro Nishida, et al. Objective evaluation of tongue diagnosis ability using a tongue diagnosis e-learning/e-assessment system based on a standardized tongue image database. *Front Med Technol.* 2023 Mar 13;5:1050909. doi: 10.3389/fmedt.2023.1050909. eCollection 2023.

Nao Konagai, Yoshihiro Nishida, et al. Safe use of tocilizumab in pregnant women with Takayasu arteritis: three case studies. *RMD Open.* 2023 Feb;9(1):e002996. doi: 10.1136/rmdopen-2023-002996.

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. *Toxicology Letters.* Vol384. S88-S89,2023.

Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada. Effect of benzyloquinoline alkaloids on camptothecin-resistant topoisomerase I. *Toxicology Letters.* Vol384. S89,2023.

Masahiro Nishida, Yoshihiro Nishida*, et al. Mechanism of action of non-camptothecin inhibitor Genz-644282 in topoisomerase I inhibition. *Commun. Biol.* 5: 982.2022.
*corresponding author

Sizuko Yamamoto, Yoshihiro Nishida, et al.

The Postpartum Period Can Worsen Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-associated Encephalomyelitis: A Case Report. *Intern Med.* Sep 6. 2022.

Naomi Inoue, Yoshihiro Nishida*, et al. GC-MS/MS analysis of metabolites derived from a single human blastocyte. *Metabolomics.* Jan 25;17(2):17. 2021. *corresponding author

Naomi Inoue, Yoshihiro Nishida* et al. The benzyloquinoline alkaloids, berberine and coptisine, act against camptothecin-resistant topoisomerase I mutants. *Sci Rep.* 2021 Apr 8;11(1):7718. *corresponding author

西田欣広、花田克浩. DNA 二重鎖切断と婦人科関連の問題. *BIO Clinica.* 38(9).54-58.2023.

2. 学会発表 (抜粋)

Katsuhiro Hanada, Yoshihiro Nishida. Screening of genotoxic substances that induce DNA double-strand breaks occurred at DNA replication sites. The 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljublyana, Slovenia.(2023.9.10)

Yoshihiro Nishida, Katsuhiro Hanada. Effect of benzyloquinoline alkaloids on camptothecin-resistant topoisomerase I. The 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljublyana, Slovenia.(2023.9.10)

西田欣広、井上尚美、佐藤初美、衛藤聡、胎盤オルガノイド (ミニ胎盤) によるメタボローム解析、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2023. 5. 12)

井上尚美、西田欣広、河野康志、ヒト胎

盤における低酸素環境下での代謝変化についての検討、第 75 回日本産科婦人科学会学術講演会(2023. 5. 12)

西田欣広、井上尚実、花田克浩.
Camptothecin 耐性株に対する berberine の分子メカニズム、第 50 回日本毒性学会学術年会(2023. 6. 19)

花田克浩、西田欣広. 二重鎖切断を誘発する植物由来化合物のスクリーニング.
第 52 回日本環境変異原ゲノム学会(2023. 11. 12)

西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁. 胎盤オルガノイド（ミニ胎盤）を用いた糖代謝異常のメタボローム解析. 第 76 回日本産科婦人科学会学術講演会(2024. 4. 13)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 特許第 7134462 号・発明の名称：胚の評価法・発明者：西田欣広・特許権利者：大分大学・登録日：2022 年 9 月 2 日.

2) 特願 2023-067387, 発明の名称：ヒトオルガノイド様組織作成法・発明者：西田欣広、他 1 名・特許権利者：大分大学

3) 特願 2023-067391, 発明の名称：ヒトオルガノイド様組織培養液・発明者：西田欣広、他 1 名・特許権利者：大分大学