

分担研究報告書

分担研究課題 「胎盤オルガノイド毒性評価系の開発」

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* 試験法の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 に係る試験法の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の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。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(サリドマイド等)添加環境下での代謝変動の解析を計画した。ミニ胎盤樹立に引き続きメタボローム解析、RNA-Seq 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種差を考慮した開発を目指す。

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が期待される。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* 代謝プロファイルを明らかにし、RNA-Seq 解析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 年末に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い、安定的な精度での確立を目指している。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に主眼を置いている。

(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手法ですでに特許を有しており、他の研究者より一步進んだ研究環境にある。ミニ胎盤樹立、メタボローム解析、RNA-Seq 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培養条件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)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) :

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 μ M)を時間依存性(0-48hr)に作用させたサンプ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(3hrs)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38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47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、その手法に関しては論文化した。現在、再現性の確認作業を継続中である。

B-5: 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 (3hrs)によるmRNA発現の網羅的array解析 (RNA-Seq analysis) :

令和7年度はRNA-Seq解析を行ってより遺伝子レベルでの変動を解析した。全検出遺伝子数はhuman16378遺伝子に対してmouse20543遺伝子と検出された遺伝子数はマウスの方が多かった。変動遺伝子(p-value<0.05)もhuman 1,615遺伝子、mouse 6,582遺伝子と生物種間での大きな有意差があることが判明した。

B-6: 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。興味深いことにヒト胎盤オルガノイドでの代謝が約10倍早く、より活性を持つ構造に変換されることが判明し、ヒトでの毒性がマウスとは異なる可能性が強く示唆された。

令和7年度は、さらに各種薬物を用いてその代謝活性の種差における相違について検討し、生殖毒性評価の新しい評価系を提案できる可能性をまとめている。

B-7: single cell RNA seq (*sc RNA-Seq analysis*) 解析による薬物代謝の各組織間への影響解析

scRNA-seq 解析 (Single Cell Gene Expression Flex, Chromium X, 10x 社) を行った。その手順は以下の通りである。

薬物刺激後のオルガノイド RNA の定量は ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) を用いた。品質は TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA, USA) で確認した。シーケンスライブラリーは、200 ng の総 RNA を用いて、MGIEasy rRNA Depletion Kit および MGIEasy Fast RNA Library Kit (MGI Tech Co., Ltd., San Jose, CA, USA) を用いて調製した。ライブラリーは、DNBSEQ-G400 FAST シーケンサー (MGI Tech Co., Ltd.) 上で、ペアエンド 150 nt でシーケンスされた。すべてのシーケンスリードは、Trimmomatic (v.0.38) [T] を用いてトリミングした。トリミングされたリードはヒト hg38 ゲノムリファレンスのトランスクリプトにマッピングした。RSEM による遺伝子およびアイソフォームの発現量推定を用いて、基本カウントデータを生成した (GEO accession number GSE327639)。

結果を簡略に述べると我々の樹立したヒト胎盤オルガノイドの解析でこれまでの検討で 10 のクラスターに分類可能であり、cytotrophoblast (cluster 4,5)、syncytiotrophoblast (cluster 6) も明確に分画された。胎盤オルガノイドにおける薬物誘発性 DNA 二重鎖切断 (DSB) 形成のパターンが 2 次元培養系と比較、検討して明らかに異なることが判明した。特に syncytiotrophoblast で著明な p53 代謝経路の活性化が認められた。

C. 考察と結論

令和 7 年度は令和 6 年度に樹立したヒトとマウスよりそれぞれ胎盤オルガノイドを用いて RNA-seq 解析を行い、より詳細に分析、検討した。

種差から見た胎盤オルガノイドにおける薬物代謝ではヒトではバリン・ロイシン・イソロイシン生合成代謝経路を中心にした変動、マウスでは TCA サイクルからアスコルビン酸代謝系の有意な変動が確認され新しい知見を得ることができた。また scRNA-Seq 解析によりオルガノイド組織中の syncytiotrophoblast で著明な薬物誘発性代謝経路の活性化が確認された。

これまでの成果はヒト胎盤オルガノイドと薬物動態の新規解析法およびマウス胎盤オルガノイドを用いた生殖毒性の種差についての解析結果をそれぞれ英文誌へ論文化して投稿した。

最後にこの 3 年の研究成果をもとに今後さらに胎盤オルガノイドの精度を高め、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、種々のモデル薬物を使い、一次代謝産物評価と種差の観点を包括的にからめて生殖毒性研究を深めていく計画である。

D. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Takeshi Terabayashi, Takako Sasaki, Takeshi Ishizaki, Tadahiko Tomo, Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada. Analysis of accumulation of DNA double-strand breaks in mouse tissues by pulsed-field gel electrophoresis. Appl Pharmacol. 2025. Apr;497:117278. [doi: 10.1016/j.taap.2025.117278]

Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. Toxicology Letters. Vol.411, S157,2025.

Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. Toxicology Letters. Vol.411, S347-348, 2025.

Ryoya Shigefuji, Seiji Komatsu, Takeshi Terabayashi, Toshimasa Ishizaki, Tadashi Tomo, Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada. Mitotic abnormality induced by evodiamine, a tryptamine indole alkaloid. Toxicology and Applied Pharmacology 511. 117813. 2026.

西田欣広、花田克浩. 難治性の婦人科癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の可能性. 細胞. 5(7). 68-71. 2025.

2. 学会発表 (抜粋)

Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the accumulation of double-strand DNA breaks in mouse organs by DNA damaging agents using pulsed-field gel electrophoresis. The 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025.9.15 Athens, Greece.)

Yoshihiro Nishida, Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Satoshi Kitajima. A new approach to assessing reproductive toxicity using placental organoids. The 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), (2025.9.16. Athens, Greece.)

西田欣広、井上尚美、佐藤初美、小林栄仁:胎盤オルガノイドを用いた新しいヒト生殖毒性評価モデル系の可能性. 第77回日本産科婦人科学会学術講演会 (2025. 5. 24 岡山)

田邊明日香、花田克浩、西田欣広: 胎盤オルガノイドを用いたDNAダメージ誘導の二重鎖切断の検出系の開発. 第54回日本環境変異原ゲノム学会 (2025. 11. 22 静岡)

Katsuhiko Hanada, Takeshi Terabayashi, Yoshihiro Nishida. Investigation of the cytotoxic action of an indole alkaloid evodiamine. 第99回日本薬理学会 (2026. 3. 16 仙台)

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