

特別賞

医薬品の胎児への移行性を評価する新技術

～ヒト胎盤バリアモデルの作製技術～

1 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

2 関東化学株式会社

堀 武志¹ 梶 弘和¹ 塚田 海斗² 山口 宏之²

1. 緒 言

妊婦の血中から胎児へと物質が移行する際は、胎盤のバリア(関門)を透過する必要がある。透過する物質としては、栄養素や酸素などの胎児にとって良いものだけでなく、時として胎児に悪影響を及ぼす薬物や病原体などがある。しかし、透過する物質を予測することは極めて難しい。

胎盤の中には母体血と接触している絨毛があり、この絨毛の表面が物質透過におけるバリアの役割を果たしている(図1)。絨毛の表面は、融合した合胞体性栄養膜細胞(バリア細胞)により一面が覆われており、これが強力なバリアの所以となる。妊娠初期では、絨毛のバリア細胞の下には細胞性栄養膜細胞が並んでいる。この細胞性栄養膜細胞は融合しバリア細胞に変化する性質を持つ(図1)。一方で、古いバリア細胞は常に部分的に除去されている。この細胞のターンオーバーにより胎盤バリアの健康は維持されている。

胎盤バリアの構造やバリアを構成する細胞は種によって大きく異なる。この理由により、物質の胎盤透過性はヒトと実験動物とでは大きく異なるため、動物実験により得られた物質透過性情報からヒトにおける透過性情報を推測することが難しい。一方で、ヒト胎盤の情報を得るために、出産後の妊婦から戴いた丸々1つの胎盤を物質透過性試験に使用することがある。これを ex vivo 透過性試験と呼ぶが、この試験は煩雑を極め、また、胎盤の供給には限りがあるため多検体評価ができないという課題がある。

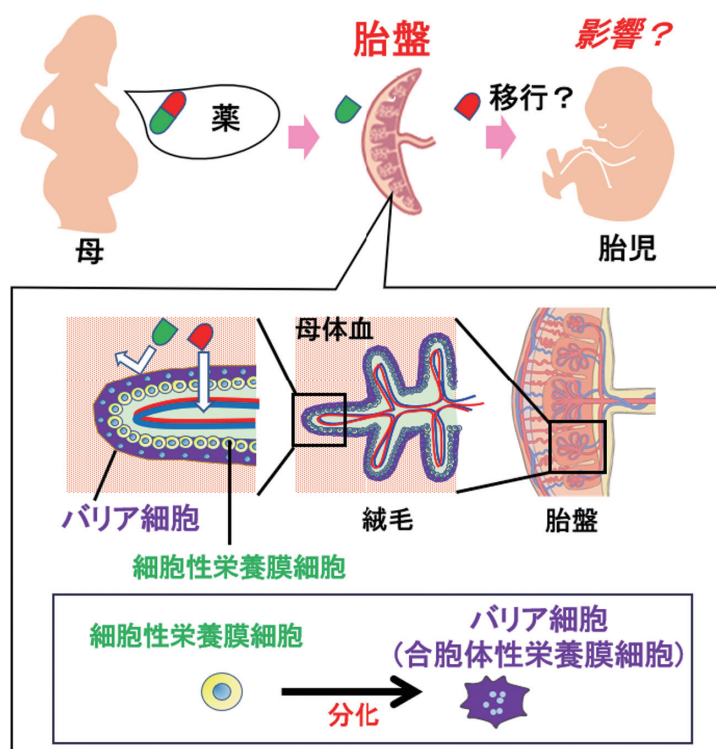


図1 ヒト胎盤バリアの構造と医薬品の胎盤透過

ヒトの胎盤内には絨毛があり、絨毛は母体血と接触している。絨毛の表面において母体血から胎児血への物質移行/輸送が起きる。妊娠初期の絨毛の表面は、2種類の胎盤細胞から成る2層構造をしている。

このような背景から、ヒトの胎盤細胞(栄養膜細胞)を用いた細胞培養技術により、胎盤バリアモデルを開発する試みが世界中でなされてきた。これまでは、拡大培養が容易であり、長期的に管理することができる絨毛癌由来細胞株(BeWo 細胞等)が主に使用されてきた。この細胞をインサートカラム内の多孔膜上で培養し、細胞シートを形成させることにより、絨毛表面を模した胎盤バリアモデルを作製することができる(図2)。しかしながら、絨毛癌に由来する細胞は生体内の胎盤細胞と比べて著しく異なる機能を持っているため、実際のヒト胎盤バリアを正確に模倣しているとは言い難い。一方、ヒトの胎盤から単離した初代胎盤細胞(初代細胞性栄養膜細胞)は、生体内の胎盤細胞と同様に高い細胞機能を持っている優れた細胞である。しかし、初代胎盤細胞は汎用の培地では長期的な拡大培養ができないという問題があり、また、ex vivo 透過性試験と同様に胎盤の供給制限の問題がある。

2018年に東北大学医学部の Okae, Arima らは、初代の細胞性栄養膜細胞と同じく高い胎盤機能を持ち、長期的に維持管理できるヒト胎盤幹細胞の樹立に成功した¹⁾。この幹細胞は、未分化能を維持させながら5カ月以上の増殖が可能であり、化合物の添加によりバリア細胞へと分化させることもできる。この胎盤幹細胞の作製技術が明らかになったことにより、ヒトの胎盤研究は飛躍的に進んだ。しかしながら課題もあり、この幹細胞から胎盤バリアモデルを作製することは困難であった。胎盤幹細胞からバリア細胞へと分化させると、細胞は形を変え、基板に接触している面積が減少するため、培養基板の全面を覆った細胞シートを作製することができなかった。さらに、バリア細胞は細胞基板への接着力が弱く、すぐに剥がれてしまうという課題もあった。

この問題を解決するため、2024年に我々は、細胞接着性の高いコラーゲンビトリゲル膜上で胎盤幹細胞を培養し、3種類の培養液を用いて緩やかにバリア細胞へと分化させることにより、ヒトの胎盤絨毛を模した胎盤バリアモデルの作製に世界で初めて成功した²⁾。本論文では、胎盤バリアモデルの作製過程について記述し、さらに、このモデルを活用した展望について述べる。

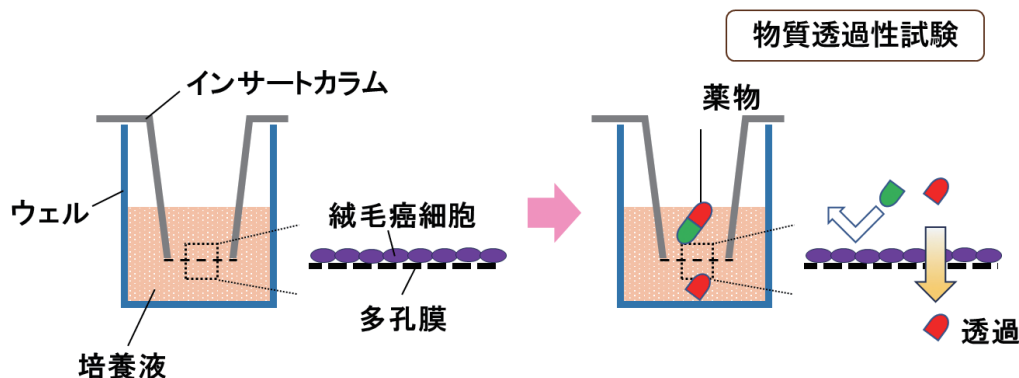


図2 従来の胎盤バリア細胞培養モデルの例

ある種の薬物は胎盤バリアを通過することが知られている。インサートカラムにあるポリエチレンテレフタレート製等の多孔膜の上に絨毛癌細胞を培養することにより細胞シート状の胎盤バリアモデルを作製することができる。しかし癌細胞は生体内の胎盤細胞とは異なる機能を保持しているという問題点がある。

2. 絨毛を模したヒト胎盤オルガノイドの作製技術

胎盤バリアモデルを作製するため、我々は再度、生体内の絨毛構造に着目した(図1)。妊娠初期の胎盤の絨毛表面は、外側にバリア細胞、内側に未分化な細胞性栄養膜細胞がある。未分化な細胞性栄養膜細胞がバリア細胞へと分化し融合することで、絨毛の成長に伴う肥大化(形態変化)に対応している。そのため、この2種類の胎盤細胞が共存する細胞培養系を構築することが、胎盤バリアモデルを作製する上での重要なステップであると考えた。

複数種類の細胞が共存する組織様の構造体をオルガノイドと呼ぶ。オルガノイドは、幹細胞等を *in vitro* (生体外) で培養することにより作製される。培養皿などの2次元平面で培養された細胞と比べて生体に近い機能を持っているため、創薬や基礎生物学分野において活発に研究されている。我々はまず、ヒト胎盤オルガノイドの作製を試みた。一般的にオルガノイドは、マトリゲルと呼ばれる細胞の足場タンパク質を多量に含むゲルの中で作製される。既存の胎盤オルガノイドも例にもれず、これまでマトリゲルの中で作られてきた³⁾。しかし

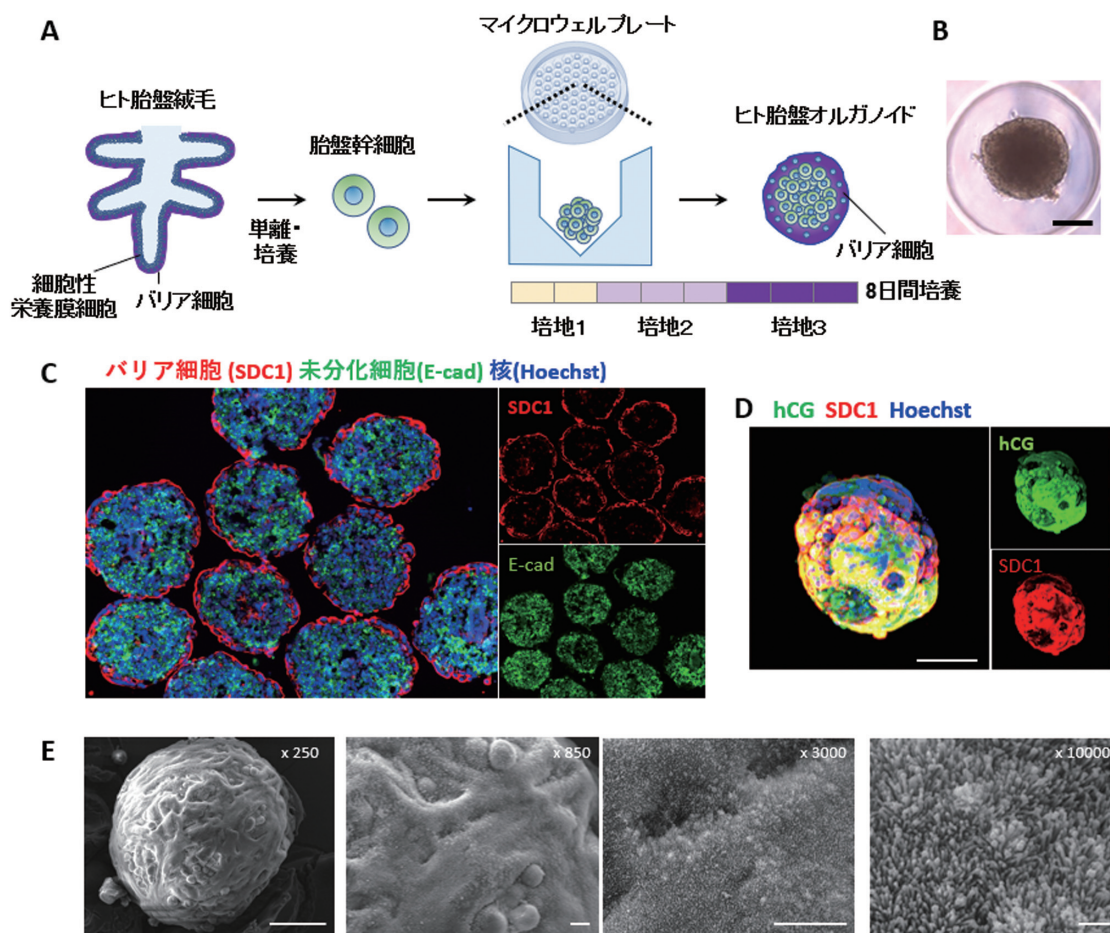


図3 作製したヒト胎盤オルガノイド

A. 胎盤オルガノイドの作製方法。B. 作製した胎盤オルガノイド(8日目)。C. 胎盤オルガノイドの内部解析。凍結凍結切片を作製し免疫染色を行った。SDC1、E-カドヘリンはそれぞれバリア細胞と未分化細胞のマーカータンパク質。D. 共焦点顕微鏡観察による胎盤オルガノイドの3Dイメージ。E. 電子顕微鏡を用いた表面解析。スケールバー: 200 μm (B-D)、100 μm (E, x250)、10 μm (E, x850と x3000)、1 μm (E, x10000)。

ながら、この方法で初代胎盤細胞から作られた胎盤オルガノイドは、オルガノイドの内側でバリア細胞が生まれ、外側には細胞性栄養膜細胞が存在する状態となる。すなわち、実際の絨毛とは内側と外側が反転した構造をしている。胎盤細胞のような上皮細胞は頂端側(apical側)と基底膜側(basal側)という極性を持つが、既存の胎盤オルガノイドに関しては、この細胞極性が逆転しているように思われた。細胞極性に関する同様の問題は、腸管オルガノイドなどの他の臓器オルガノイドでも報告がある。原因はオルガノイドを作製する際に使用されたマトリゲルであると考えられている⁴⁾。マトリゲルは、細胞の足場タンパクである基底膜成分を多量に含むゲルであるため、細胞はマトリゲル側を足場側(基底膜側)と認識し、オルガノイド内部の方を頂端側(絨毛の表面側)と認識した可能性がある。

我々はマトリゲル中で細胞を培養しない方法で胎盤幹細胞の三次元的な培養を試みた。マトリゲルの代わりに寒天の主成分であるアガロースを用いた。アガロースゲルを用いて、直径1 mmのウェルを多数備えたマイクロウェルプレートを作製し、各ウェルの中で400個程度の胎盤幹細胞を培養した。細胞はアガロースゲルに接着できないため、細胞同士が接着し、培養1日目には各ウェル内に一つの細胞凝集体(スフェロイド)が形成された。アガロースゲルはハイドロゲルであり粗い網目状構造をしている。そのため、スフェロイドの四方八方から培地中の栄養素や酸素を届けることができた。

このスフェロイドを、胎盤細胞の増殖や分化、成長を促す因子を含む3種類の培地を用いて育てたところ、8日目に、絨毛表面のような滑らかな表面を有したオルガノイドが形成された(図3AとB)。このオルガノイドを詳細に解析したところ、オルガノイド表面の細胞は、バリア細胞のマーカー蛋白質(細胞が特徴的に持つ蛋白質)であるSDC1(シンデカン1)やhCG β を有していることが明らかになった(図3CとD)。さらに、オルガノイド表面を電子顕微鏡で解析すると、微絨毛が多数観察され、生体内の絨毛組織と類似していた(図3E)。

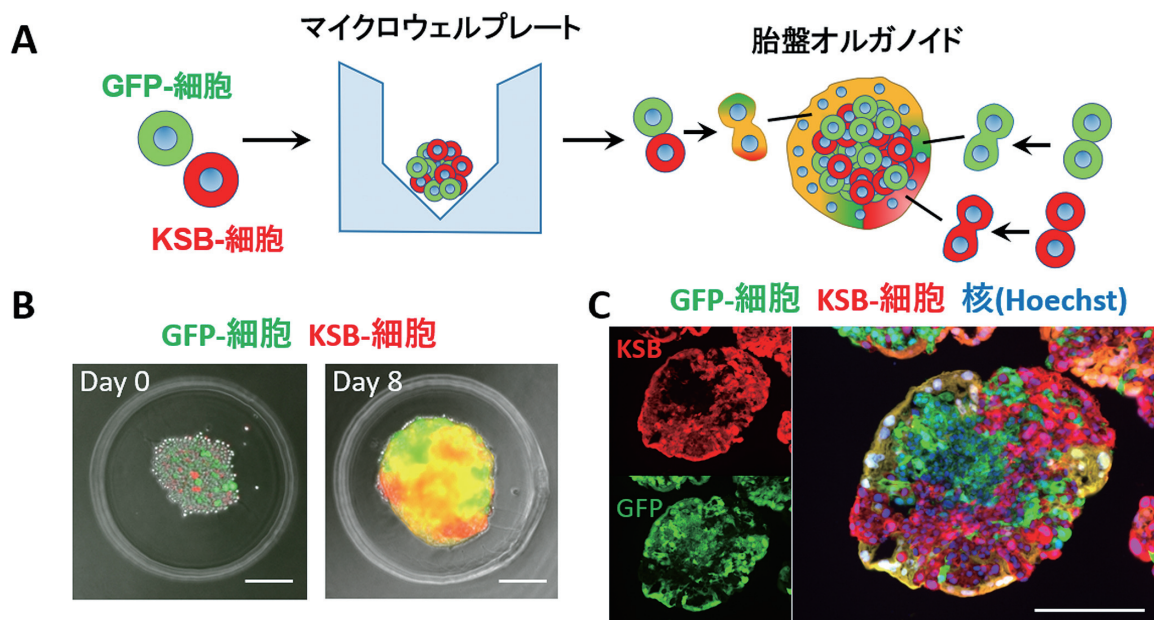


図4 バリア細胞の融合の証明

A. GFP 発現細胞と KSB 発現細胞を混ぜて胎盤オルガノイドを作製した。B. 培養中の胎盤オルガノイドの蛍光顕微鏡画像。C. 凍結切片を作製し蛍光顕微鏡によりオルガノイド内部を解析した。黄色いラインは、融合したバリア細胞を示している。スケールバー：200 μ m

生体内のバリア細胞は融合し多核の巨大な細胞を形成してる。作製したオルガノイド表面にあるバリア細胞の融合を実証するため、遺伝子改変された2種類の胎盤幹細胞を使用した。すなわち、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) を発現する胎盤幹細胞と、オレンジ色蛍光タンパク質 (Kusabira-Orange, KSB) を発現する胎盤幹細胞を使用した。この2種類の細胞を混合し、アガロースマイクロウェルプレート内で培養した (図4A)。得られたオルガノイドの凍結切片を作製し、オルガノイドの断面を観察した結果、オルガノイド表面は黄色に観察され、これは蛍光緑と蛍光オレンジの細胞が融合したことを示唆していた。これらの結果から、絨毛を模した胎盤オルガノイドの作製に成功したと結論付けた。

3. ヒト胎盤バリアモデルの作製技術

胎盤オルガノイドを作製する培養条件が明らかになったため、次に、この培養条件を基に胎盤バリアモデルの作製を試みた。胎盤バリアモデルは、物質の透過性を定量的に評価できる形状であることが望ましかったため、インサートカラムの膜部分に平面状の胎盤オルガノイドを形成させることに挑戦した。

使用するインサートカラムとして、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構の Takezawa らと関東化学株式会社が開発した ad-MED ビトリゲル 2 を用いた。ad-MED ビトリゲル 2 は、コラーゲンの繊維密度を高くする技法 (ガラス化法) を用いて作製された乾燥コラーゲン膜を備えている。このガラス化コラーゲン膜は、水和しても高い強度を保っているため、細胞を載せても破れることは無い。コラーゲンは生体内で細胞の足場としての役割を果たすことができ、一般的に細胞のコラーゲン膜への接着は人工的なポリエチレンテレフタレート膜等への接着よりも強い。

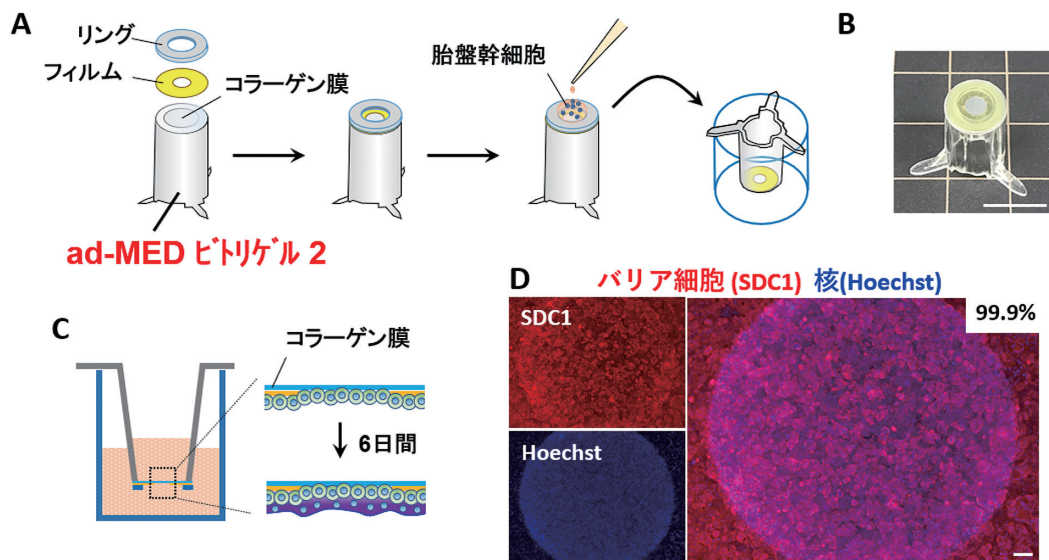


図5 ad-MED ビトリゲル2を用いた胎盤バリアモデル

A. 胎盤バリアモデルの作製方法。B. インサートカラムの写真。C. 胎盤バリアモデルの模式図。D. 胎盤バリアモデルの免疫染色画像。バリア細胞を赤色、細胞の核を青色で表示。コラーゲン膜の約100%の領域がバリア細胞により被覆されていた。スケールバー：1 cm (B) と 200 μ m (D)。

胎盤バリアモデルを作製しやすいように ad-MED ビトリゲル 2 に軽微の加工を施し、その後、胎盤幹細胞をカラムのコラーゲン膜上に載せた (図5A と B)。球状の胎盤オルガノイドの作製条件を基に、3種類の培地で細胞を培養した結果、細胞がコラーゲン膜の表面を完全に覆った (図5C)。バリア細胞のマーカー蛋白質である SDC1 を免疫染色したところ、表

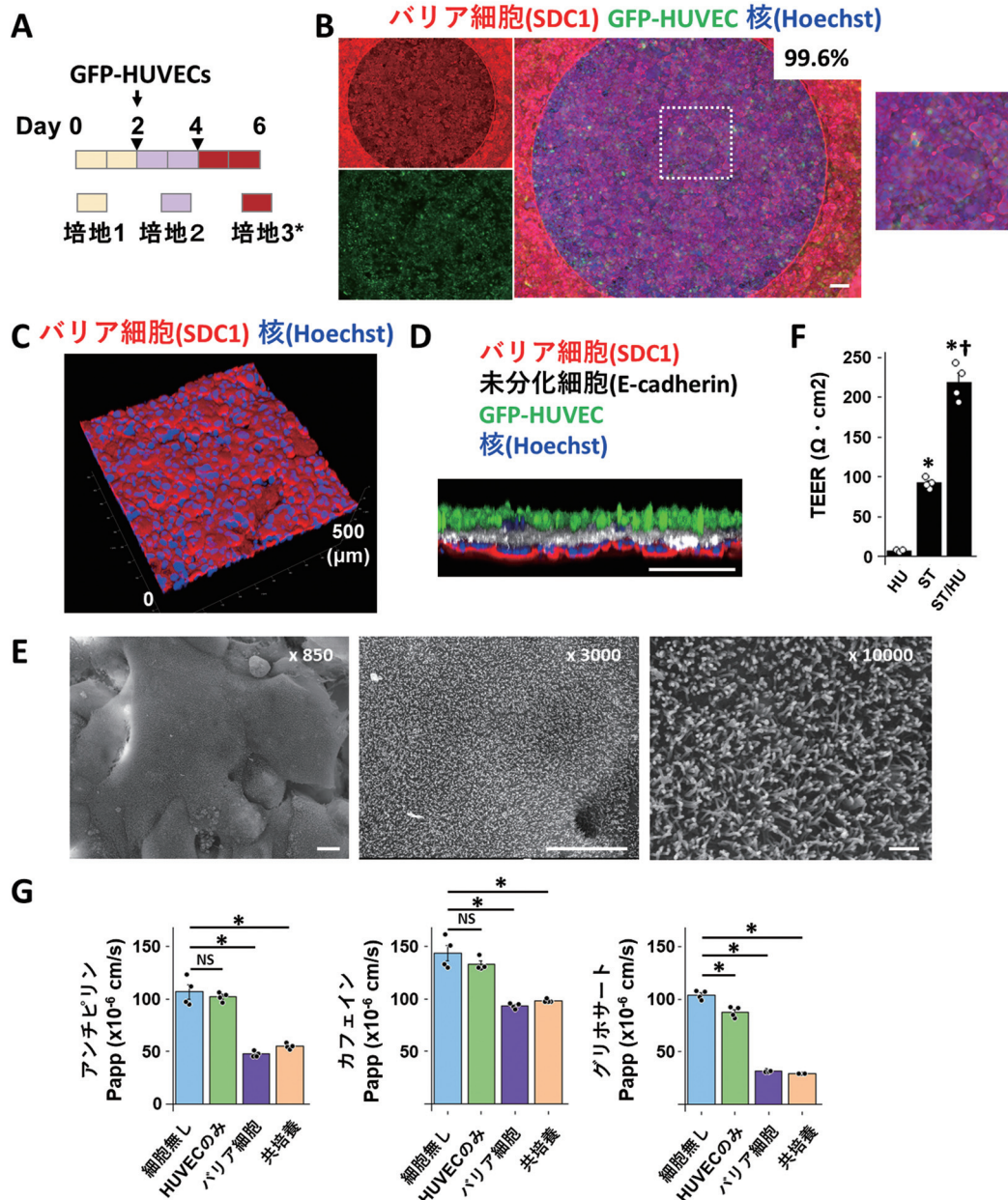


図6 胎盤バリアモデル(血管内皮細胞との共培養)

A. 胎盤バリアモデルの培養スケジュール。Day 2に血管内皮細胞 HUVECs をインサートカラム内に添加した。B. バリア細胞と血管内皮細胞 HUVECs との共培養画像。C. 胎盤バリアモデルの3D 解析画像。D. 3D 解析画像 (側面図)。バリア細胞 (赤)、未分化細胞 (白)、血管内皮細胞 (緑) の層状構造をしていた。E. 電子顕微鏡による表面解析。F. 胎盤バリアモデルの経上皮電気抵抗値。G. 物質透過性試験。スケールバー: 200 μm (B)、200 μm (D)、10 μm (E, x850 and x3000)、1 μm (E, x10000)。* $P < 0.05$, Dunnett's test. † $P < 0.05$, Student's t test (ST [バリア細胞] vs. ST/HUVEC)

面のほぼ全ての細胞がバリア細胞で覆われていることが明らかになった(図5D)。バリア細胞による被覆率がこれほど高いバリアモデルは他になく、従来に無いバリアモデルを作製することができた。

生体内の絨毛内部には胎児の血管が通っており、血管の内皮細胞は物質透過を制限する血管内皮バリアとして部分的に機能している(図1)。そこで我々は、胎盤バリア細胞と血管内皮バリアの共培養を試みた。図6Aに示すように、胎盤幹細胞の培養開始2日目に、インサートカラム内に血管内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)を播種した。胎盤幹細胞はコラーゲン膜の裏側に播種され培養されているため、コラーゲン膜を挟んだ反対側で血管内皮細胞 HUVECs を培養した。血管内皮細胞の存在下でも、胎盤幹細胞はバリア細胞へと分化することができた(図6B)。共焦点顕微鏡を用いた三次元解析では、やや凸凹したバリア細胞層が観察された(図6C)。側面から観察するとバリア細胞層、未分化細胞層(胎盤幹細胞層)、血管内皮細胞層(GFP発現 HUVECs)が観察され、生体内の絨毛を模倣していた(図6D)。作製した共培養系は経上皮電気抵抗(TEER)が高く、すなわち、バリアの堅牢性が向上していた(図6F)。バリア細胞/血管内皮細胞の共培養系においても胎盤オルガノイドと同様に微絨毛を表面に有しており、生体内の絨毛に類似していた。次に、バリアモデルを用いて、胎盤透過性情報のあるモデル物質の透過性を調べた。母体血中から胎児血への移行率が高いことで知られているアンチピリン(解熱鎮痛薬)やカフェインはバリア細胞や共培養系(胎盤バリア細胞と HUVEC の共培養系)を良く通過した。一方で、グリホサート(除草剤)は比較的透過しなかった。この胎盤透過性に関するこの傾向は、娩出されたヒト胎盤を用いた ex vivo 試験の結果と類似していた(図6G)。したがって、本胎盤バリアモデルを使用することにより多検体物質に対して、これまで以上に簡便に物質透過性試験を遂行できる可能性が示された。

4. 今後の展望

わが国ではサリドマイド薬害事件などを契機に、医薬品の次世代試験の重要性が認識されるようになった。1950-60年代に鎮静・睡眠薬などとして使用されていたサリドマイドは、妊娠初期の妊婦が服用した場合、胎児の手や肢などに奇形を生じさせ、日本を含めて世界的な問題となった。齧歯類を用いた動物実験ではサリドマイドによる奇形は観察されず、ヒトに対する毒性予測の難しさを示唆していた。

現在でも、妊婦は胎児への影響を心配して医薬品の服用を控えたり、ウイルスを含める病原体への感染に対して特段注意を払っている。我々の新たな胎盤モデル作製技術が、物質の胎盤透過性についての迅速かつ正確なデータの取得に繋がれば、妊婦とその家族の心配を軽減し、生活の質(quality of life, QOL)を向上させることができるものと考えている。

一方、細胞培養を用いた評価技術の開発は、動物実験代替法としても大変注目されている。現在、食品や化粧品、医薬品の安全性評価などのために数々の動物実験が行われている。それらの試験は社会的に重要であり、また多くの人々に望まれているものである。しかしながら、特に EU を中心に動物愛護に対する関心が高まり、動物試験をできるだけ縮小できないものか、と考える人々が増えてきた。EU では、化粧品の安全性試験のための動物実験は全面的に禁止され、日本でも動物実験が縮小されている。したがって、特に胎盤のような種差の大きい臓器に関する試験において、動物実験に頼らず、ヒト細胞培養モデルを使用する意

義は極めて大きい。このようななか、米国では2022年にバイデン大統領が「FDA 近代化法案 (FDA modernization act 2.0)」に署名し可決され、創薬における動物実験の義務を廃止した。この背景には動物実験の限界と、ヒト細胞培養モデルの有用性が認識されるようになったことが関係していると言われている。今後は、医薬品開発における本細胞培養モデルの有用性をさらに示し、動物実験代替法として、化学物質や医薬品の安全性試験に関する各種ガイドラインに登録されるように取り組みたい。

5. 結 言

胎盤の構造には著しい種差があり動物実験の結果をヒトへ外挿することが難しく、一方で、胎盤バリアモデルの作製に利用できるヒト胎盤細胞が存在しなかったため、有用な in vitro バリアモデルが存在しなかった。今回我々は、胎盤絨毛を模したヒト胎盤オルガノイドと胎盤バリアモデルを作製する方法を世界で初めて明らかにした²⁾。この胎盤バリアモデルを使用することにより、胎児への副作用を抑えた医薬品をこれまで以上の精度で開発することができるものと期待される。また、ウイルスなどの病原体の胎児への移行性が明らかになれば、より適切な医療に繋げられるものと考えられる。さらに、作製したヒト胎盤モデルは、ヒト胎盤の形成機序の解明や胎盤に関連した妊娠高血圧症候群などの疾患の発症機序の解明にも貢献するものと考えられる。

最近の報告によると胎盤幹細胞はナীব型 iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells, 人工多能性幹細胞) や通常の線維芽細胞からも作製できることが明らかになっている^{5, 6)}。このことは様々な細胞から胎盤幹細胞を作製できることを意味する。すなわち、胎盤関連の疾患をもった患者に由来する胎盤幹細胞を作製できる可能性が高い。患者由来の胎盤幹細胞から胎盤バリアモデルや胎盤オルガノイドモデルを作製することにより、疾病に対する理解がより深まることを期待している。

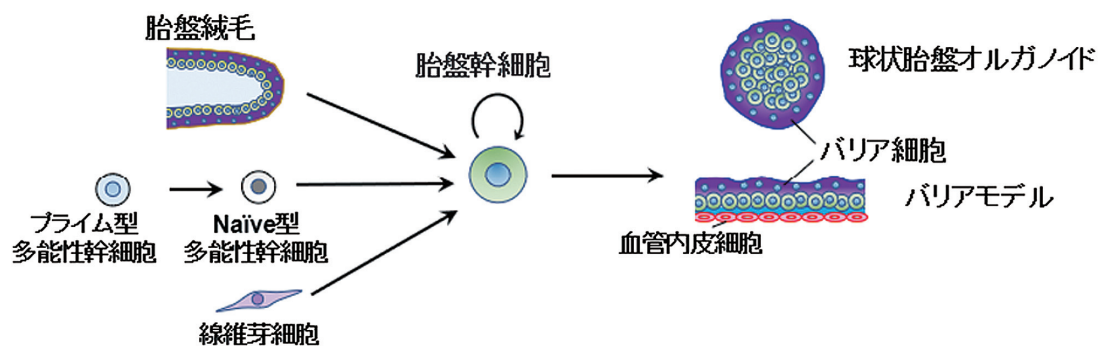


図7 胎盤幹細胞を使ったバリアモデルの作製

6. 謝 辞

筆頭著者の堀は、胎盤幹細胞に関わる様々な実験についてご教授くださいました東北大学 医学部 有馬隆博博士、岡江寛明博士、柴田 峻博士、小林記緒博士、小林枝里博士、大池 輝博士に心より感謝申し上げます。また、本研究に関しまして大変お世話になっています東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 梨本裕司博士に厚く御礼申し上げます。コラーゲンビトリゲルに関しまして連携させていただいております関東化学株式会社の皆様に御礼申し上げます。

本研究の一部は、革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST)、科学研究費補助金などの支援を賜り遂行されました。ここに深く感謝致します。

7. 参考文献

1. Okae, H., H. Toh, T. Sato, et al.: Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 22(1): p. 50-63 e6, 2018.
2. Hori, T., H. Okae, S. Shibata, et al.: Trophoblast stem cell-based organoid models of the human placental barrier. *Nat Commun*. 15(1): p. 962, 2024.
3. Turco, M.Y., L. Gardner, R.G. Kay, et al.: Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature*. 564(7735): p. 263-267, 2018.
4. Co, J.Y., M. Margalef-Catala, X. Li, et al.: Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep*. 26(9): p. 2509-2520 e4, 2019.
5. Dong, C., M. Beltcheva, P. Gontarz, et al.: Derivation of trophoblast stem cells from naive human pluripotent stem cells. *Elife*. 9, 2020.
6. Liu, X., J.F. Ouyang, F.J. Rossello, et al.: Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. *Nature*. 586(7827): p. 101-107, 2020.