

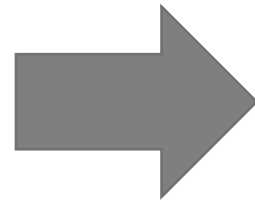
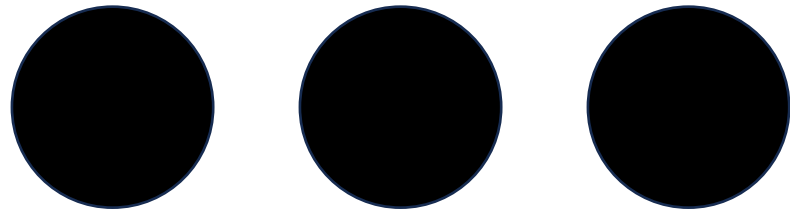
ヒト胚モデルの作製方法

柳田 絢加

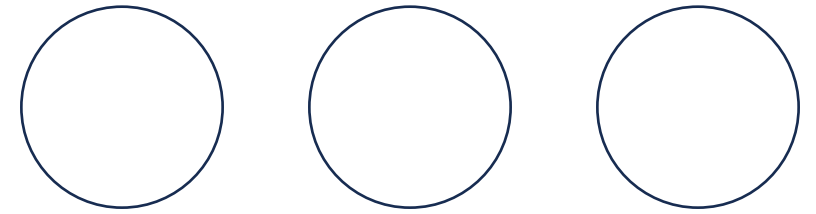
東京大学大学院 農学生命科学研究科

幹細胞を用いた 胚モデル

幹細胞



胚を模倣した構造体

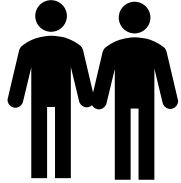


ヒト胚モデルはどのように作られるか?

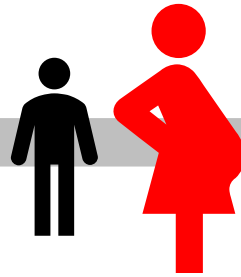
- ヒト胚モデル研究はどのように始まったか
- 実際のヒト胚モデルの作製方法
- ヒト胚モデルによる科学的・社会的貢献

ヒト胚発生研究の流れ

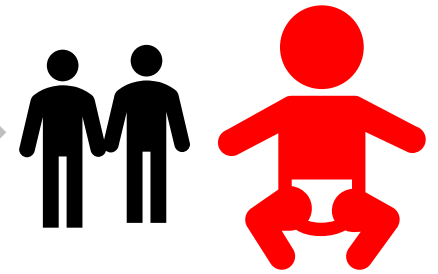
次世代の継承



妊娠の難しさ



妊娠継続の難しさ



不妊症・流産・先天性疾患

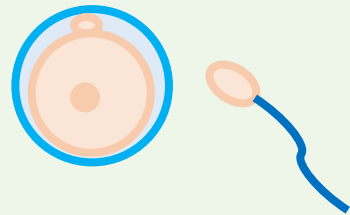
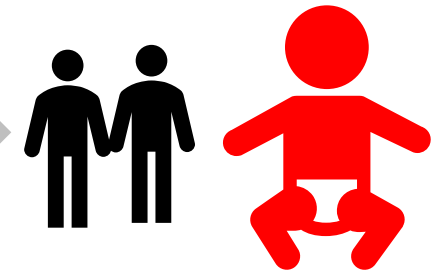
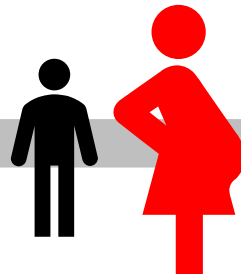
様々な要因が複合的に組み合わさっている

ヒト胚発生研究の流れ

次世代の継承

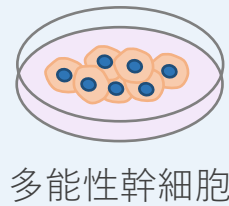
妊娠の難しさ

妊娠継続の難しさ



体外受精, 顕微授精など

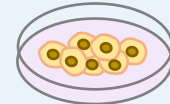
生殖補助医療へ貢献



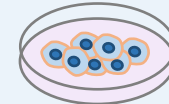
多能性幹細胞



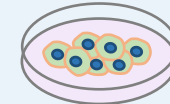
● 器官の**細胞**を**2次元**で再現する試み



心筋細胞

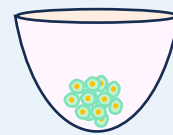


神経細胞



膵臓の細胞など

● 器官の**構造**を**3次元**で再現する試み



「オルガノイド」

腸オルガノイド

脳オルガノイド など

「生殖器官の再現の試み」

始原生殖細胞の模倣

↓
精子・卵子の源の再現

「ガストロイド」「アッセンブロイド」



原腸陥入→器官形成の模倣



複数種の細胞による器官の模倣



複数臓器のオルガノイド

ヒト胚発生研究の流れ

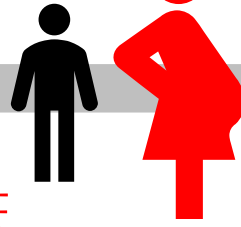
次世代の継承

妊娠の難しさ

妊娠継続の難しさ

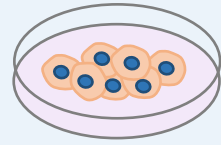
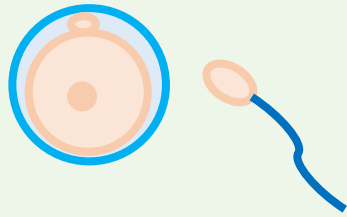
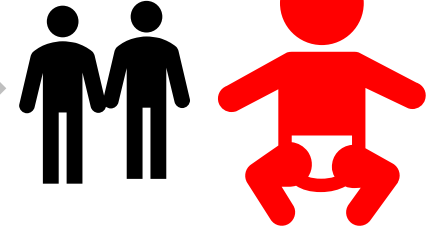


受精



着床

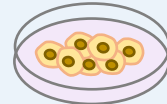
器官の形成



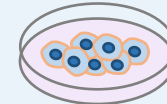
多能性幹細胞

???

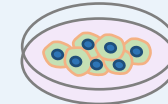
● 器官の**細胞**を**2次元**で再現する試み



心筋細胞

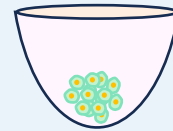


神経細胞



膵臓の細胞など

● 器官の**構造**を**3次元**で再現する試み



「オルガノイド」

腸オルガノイド

脳オルガノイド など

「生殖器官の再現の試み」

始原生殖細胞の模倣

↓
精子・卵子の源の再現

体外受精, 顕微授精など

生殖補助医療へ貢献

「ガストロイド」「アッセンブロイド」



原腸陥入→器官形成の模倣



複数種の細胞による器官の模倣



複数臓器のオルガノイド

『着床周辺期』研究の難しさ

➤ 着床、胎仔成長が子宮内で起こる

→ 直接・連続して観察することが難しい

➤ ヒト(霊長類)の長い妊娠期間、少ない排卵数

	マウス	ヒト
発情周期	4 - 5日	約28日
通常の排卵数	約10個	約1個

→ 実験の試行回数、実験条件の最適化、再現性の担保が難しい

➤ 動物種により異なる着床・胚発生様式

動物種により異なる 妊娠日数・着床方法・胚の形



ヒト胚発生を理解するには、ヒト胚の研究が重要

『ヒト胚の研究』の難しさ

➤ 倫理的懸念

➤ 入手性

- ・ 数
- ・ 質や遺伝的背景のばらつき

➤ 遺伝子や細胞の機能検証の難しさ

- ・ 遺伝子の機能解明 → 遺伝子欠損
- ・ 遺伝子や特定の細胞の動態解明 → 遺伝子や細胞への標識物の導入
- ・ ヒト胚研究にむけた基盤技術の開発
遺伝子編集、ライブイメージング、培養技術 など

着床周辺期のヒト胚発生 はまだ未解明

受精 0日	胚盤胞 5-7日	着床 7日	原腸陥入の開始 14日～	器官形成の開始 40日～	胎児期 56日～ 受精8週 (妊娠10週)
----------	-------------	----------	-----------------	-----------------	--------------------------------

An ethical framework for human embryology with embryo models

Rivron NC, Martinez Arias A, Peter MF et al., *Cell*, 17;186(17):3548-3557, 2023

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.028>

Figure.1



幹細胞研究を、着床周辺期の研究に発展できないか?

→ 着床不全, 早期流産, 先天性疾患の理解・治療へ

幹細胞を用いた マウス胚モデルの作製

幹細胞を用いたマウス胚モデル

マウス 胚盤胞モデル(ブラストイド)

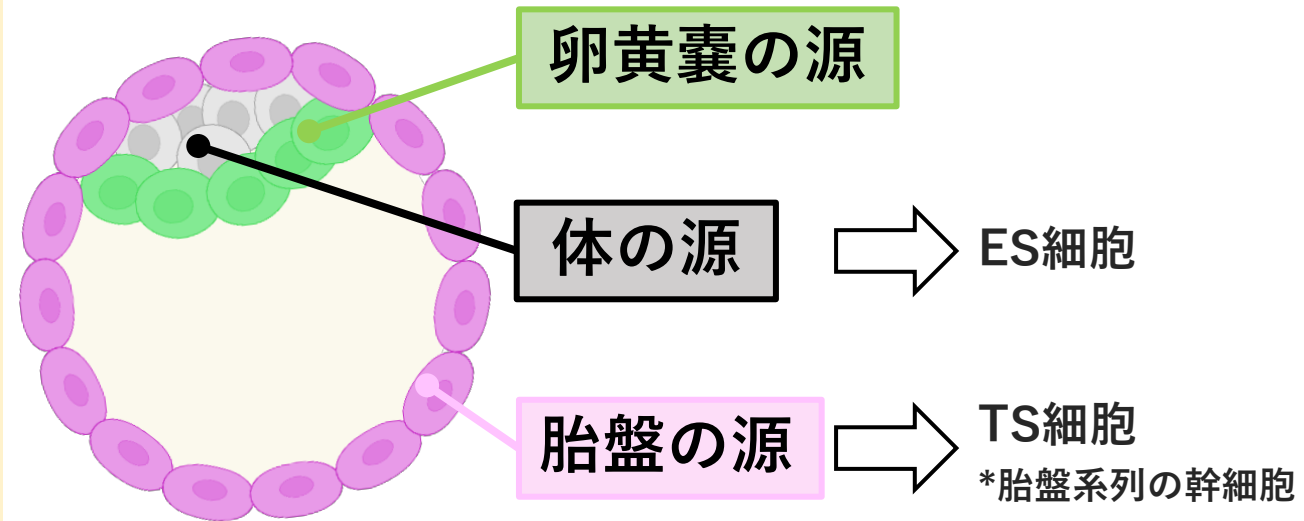
Blastocyst-like structures generated solely from stem cells

Rivron N.C. *et al.*
Nature 557(7703):106-111 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>

多能性幹細胞(ES細胞)とTS細胞(胎盤系列の幹細胞)を混ぜ、分化・自己集合により胚盤胞様構造を作製

Rivron N et al., *Nature*, 2018

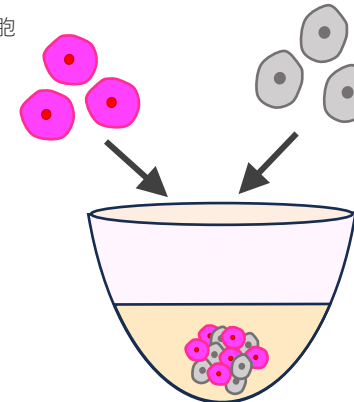
➤ 胚盤胞を構成する細胞



マウスTS細胞

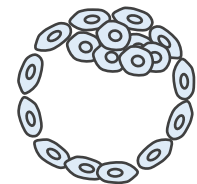
*胎盤系列の幹細胞

マウスES細胞

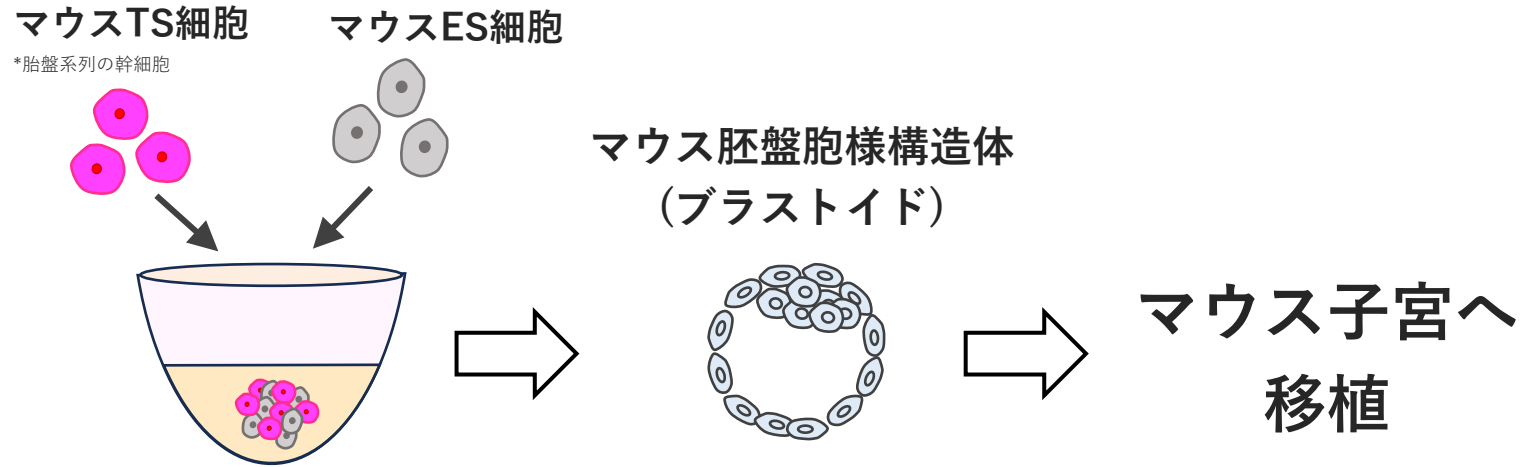


液の中で細胞塊を作成

マウス胚盤胞様構造体
(ブラストイド)



マウス胚モデルの子宮への移植



・ 2018年 子宮内で**着床後胚様への発生はみられない**



幹細胞マウス胚モデルの改善

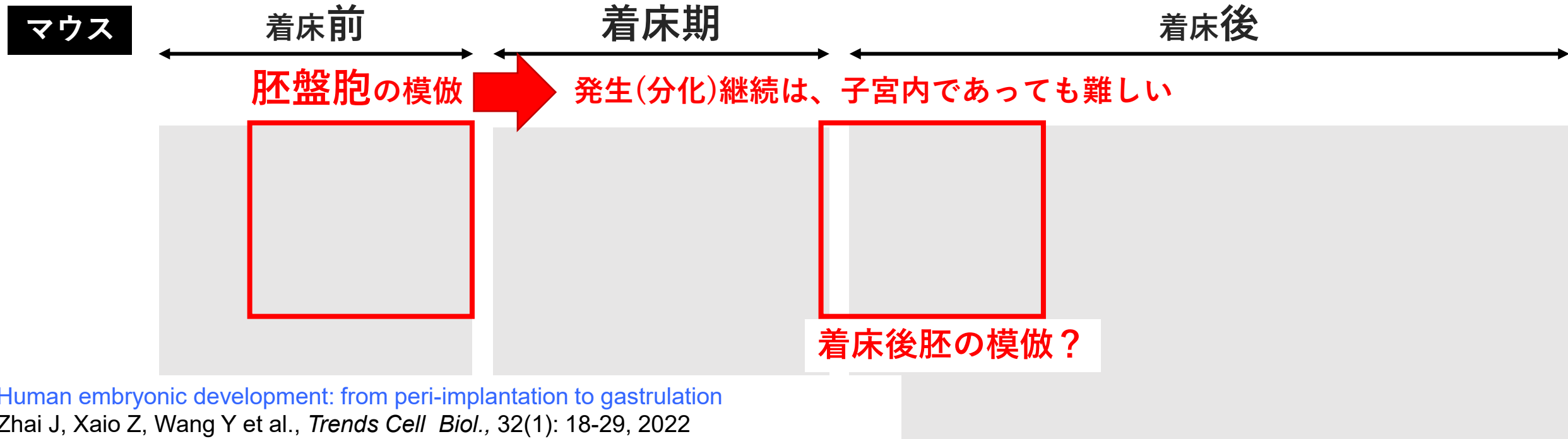
・ 2024年 マウス胚モデルから**胎仔は得られていない**

マウス 胚盤胞モデル
(ブラストイド)

Blastocyst-like
structures generated
solely from stem cells

Rivron N.C. *et al.*
Nature 557(7703):106-111
(2018).
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>

幹細胞を用いたマウス胚モデル



Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation

Zhai J, Xaio Z, Wang Y et al., *Trends Cell Biol.*, 32(1): 18-29, 2022

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.008>

Figure1 A

Illuminating the "Black Box" of Progesterone-Dependent Embryo Implantation
Using Engineered Mice

Vineet K Maurya, Francesco J DeMayo, Jogn P Lydon, *Front Cell Dev Biol.* 9:640907

<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640907>

Figure1

幹細胞を用いた マウス『着床後胚モデル』

マウス 着床後胚モデル (受精後6日胚相当)

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

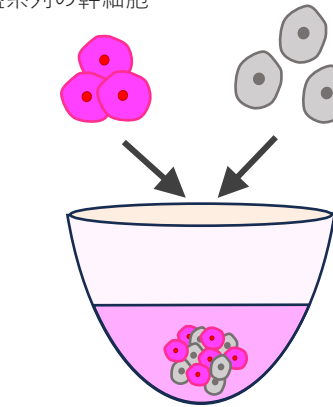
Harrison S, Sozen B *et al.*
Science 356(6334):eaal1810 (2017).
<https://www.science.org/doi/10.1126/science>.

胎盤系列様細胞

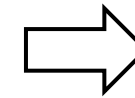
マウスTS細胞

マウスES細胞

*胎盤系列の幹細胞



分化
自己集合



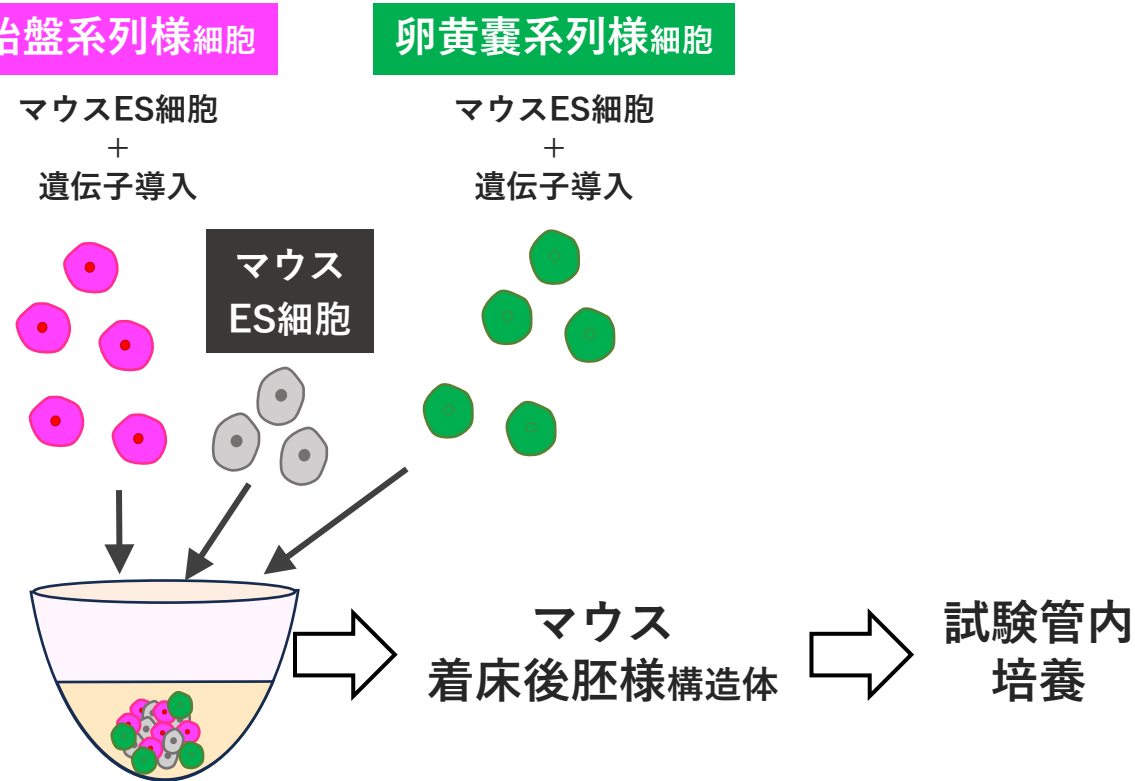
マウス
着床後胚様構造体

(受精後6日胚相当)

さらに発生が進んだ胚を模倣できるか?

幹細胞を用いた マウス『着床後胚モデル』

マウス着床後胚モデルの培養（～受精後8.5日相当）



Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs

Tarazi S, Aguilera-Castrejon, A, Joubran C et al., *Cell* 185(18):3290-3306.e25 (2022)
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.028>

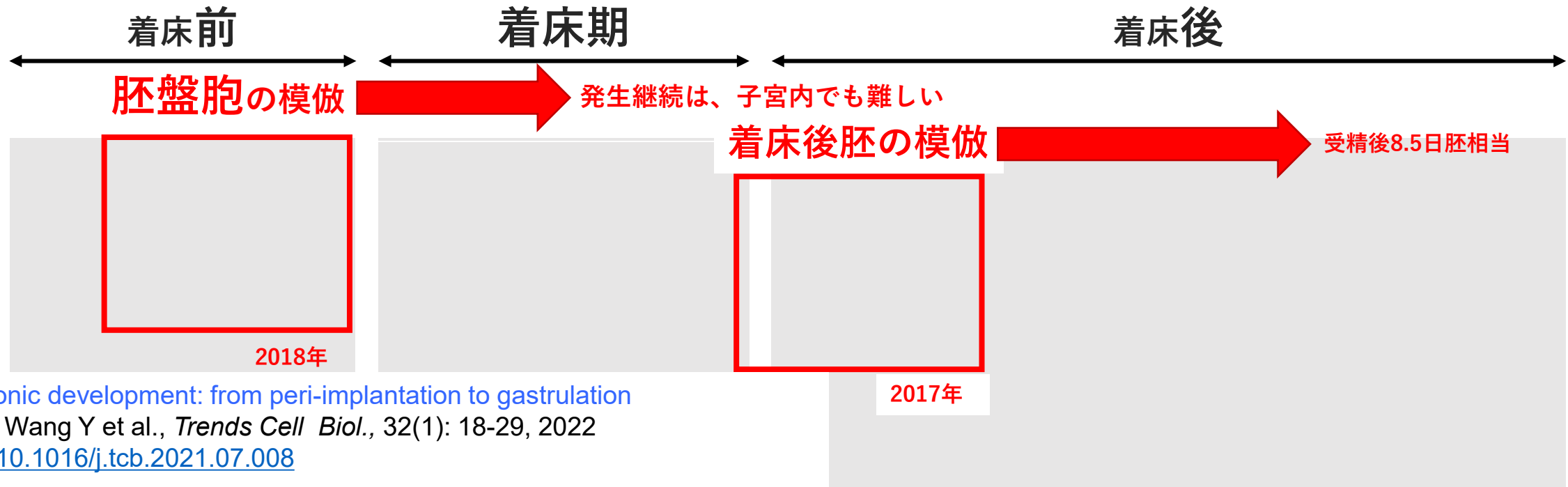
受精後8.5日相当の胚 (器官形成初期) まで模倣

分化効率はかなり低い・・・～2%

Tarazi S et al., *Cell* 2022

幹細胞を用いたマウス胚モデル

マウス



Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation

Zhai J, Xaio Z, Wang Y et al., *Trends Cell Biol.*, 32(1): 18-29, 2022

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.008>

Figure1 A

Illuminating the "Black Box" of Progesterone-Dependent Embryo Implantation Using Engineered Mice

Vineet K Maurya, Francesco J DeMayo, Jogn P Lydon, *Front Cell Dev Biol.* 9:640907

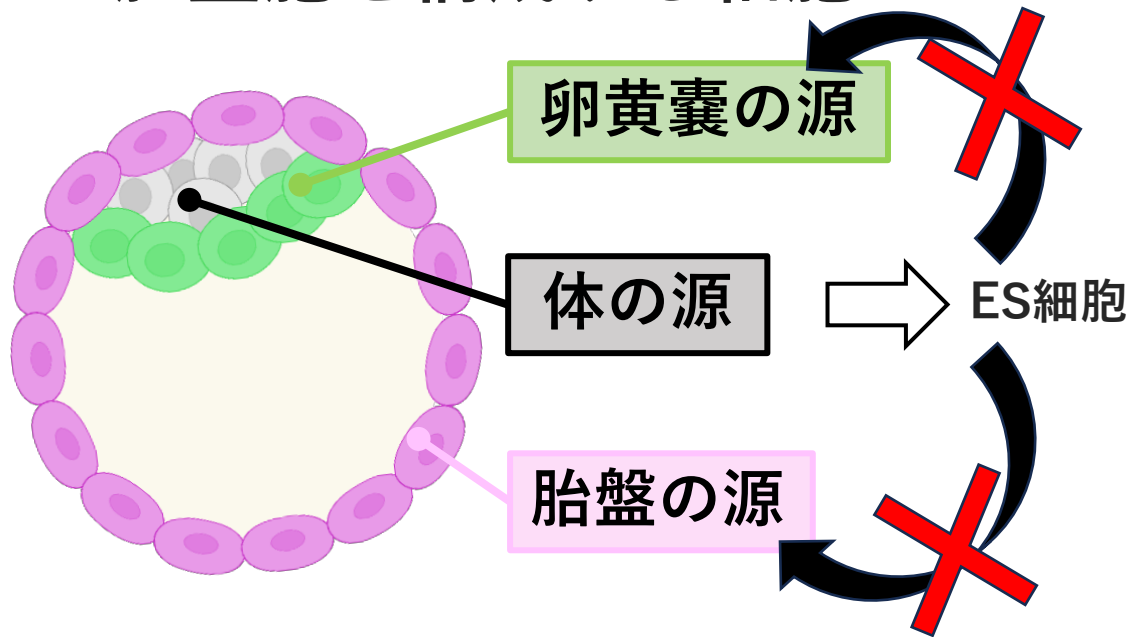
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640907>

Figure1

幹細胞を用いた ヒト胚モデルの作製へ

『ヒト幹細胞』研究の進展

➤ 胚盤胞を構成する細胞



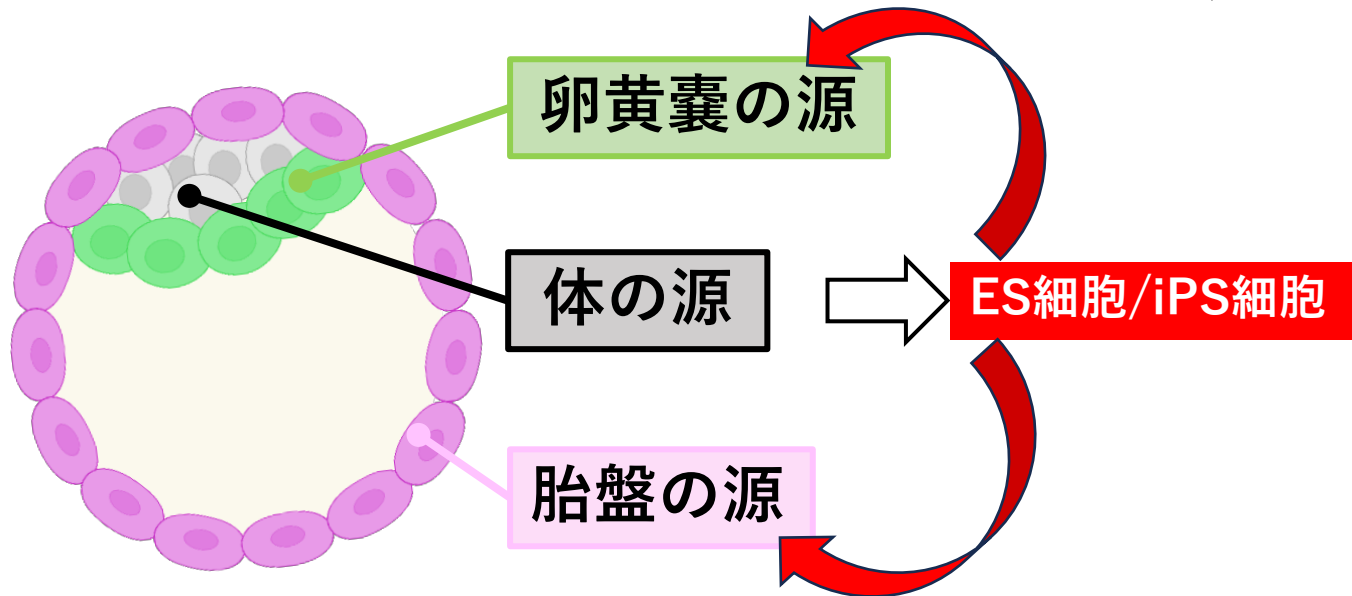
➤ ヒト多能性幹細胞

* 着床後胚の体の源に近い性質

- ヒトES細胞 Thomson J.A et al., 1998
- ヒトiPS細胞 Takahashi K et al., 2007

『ヒト幹細胞』 研究の進展

➤ 胚盤胞を構成する細胞



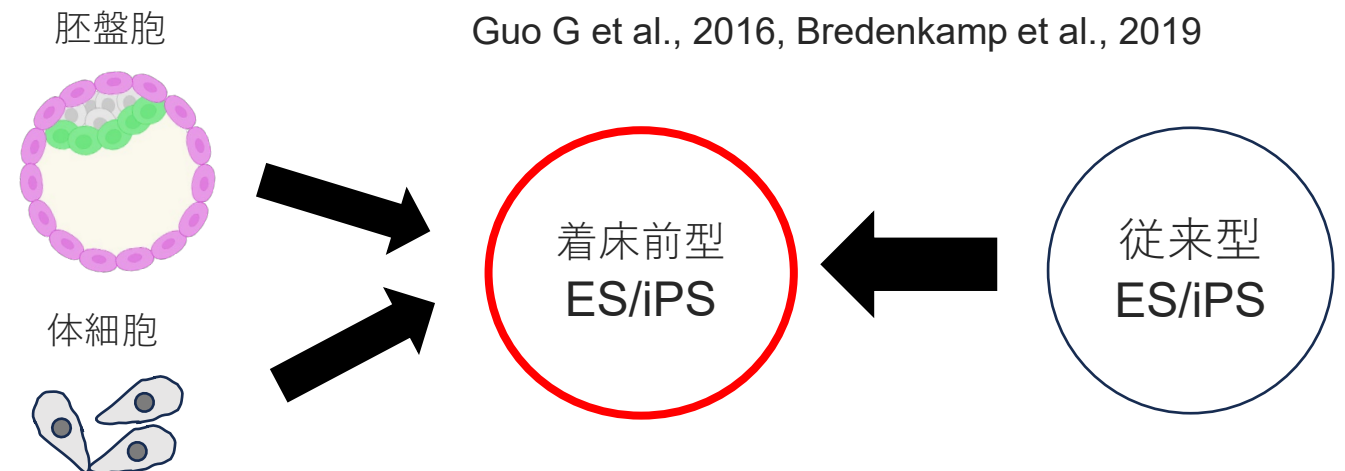
➤ ヒト多能性幹細胞

* 着床後胚の体の源と近い性質

- ヒトES細胞 Thomson J.A et al., 1998
- ヒトiPS細胞 Takahashi K et al., 2007

• 着床前型ヒトES, iPS細胞

Takashima Y et al., 2014, Theunissen T.W. et al., 2014
Guo G et al., 2016, Bredenkamp et al., 2019



幹細胞を用いた『ヒト着床前胚モデル (ブラストイド)』

多能性幹細胞 → 胚盤胞 の模倣

ES, iPS細胞の
分化・自己集合 (USA)

Blastocyst-like structures generated from
human pluripotent stem cells

Yu L *et al.*
Nature 591(7851):620-626 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03356-y>

体細胞のリプログラミング
分化・自己集合 (オーストラリア)

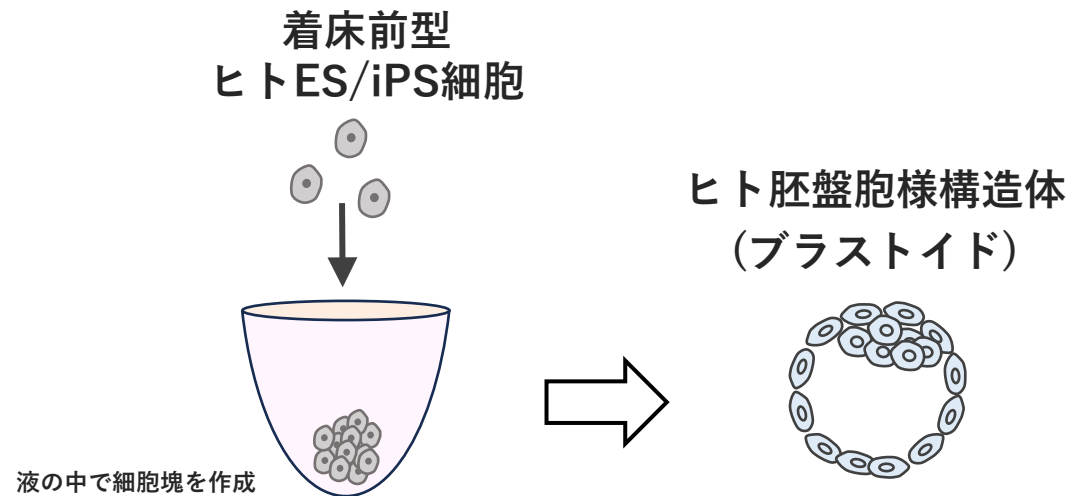
Blastocyst-like structures generated from
human pluripotent stem cells

Liu X *et al.*
Nature 591(7851):627-632 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03372-y>

ES, iPS細胞の
分化・自己集合 (UK)

Naive stem cell blastocyst model captures
human embryo lineage segregation

Yanagida A *et al.*,
Cell Stem Cell 28(6): 1016-1022.e4 (2021)
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.031>



- ・ 試験管内 → 着床後胚を構成する一部の細胞には分化する
- ・ 子宮内 → ヒト胚モデルでは検証不能

どの段階まで模倣可能か?

胚モデルの子宮への移植 実施報告

マウス胚モデル → マウス子宮へ

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells.

Rivron, N.C et al.

Nature 557, 106–111 (2018).

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>

ウシ胚モデル → ウシ子宮へ

Bovine blastocyst-like structures derived from stem cell cultures

Pinzon-Arteaga C, Wang Y, Wei Y et al.,

Cell Stem Cell, 30(5) 611-616.e7, 2023

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.04.003>

サル胚モデル → サル子宮へ

Cynomologus monkey embryo model captures gastrulation and early pregnancy

Li J, Zhu Q, Cao J, Liu Y and Ku Y et al.,

Cell Stem Cell, 30(4) 362-377.e7 2023

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.03.009>

**動物子宮内での
胚モデルの発生進行は 観察されていない**

- ・ 移植後数日は細胞が残存
- ・ 着床後胚の発生はみられない
- ・ 胎仔は得られていない

Rivron N et al., *Nature*, 2018

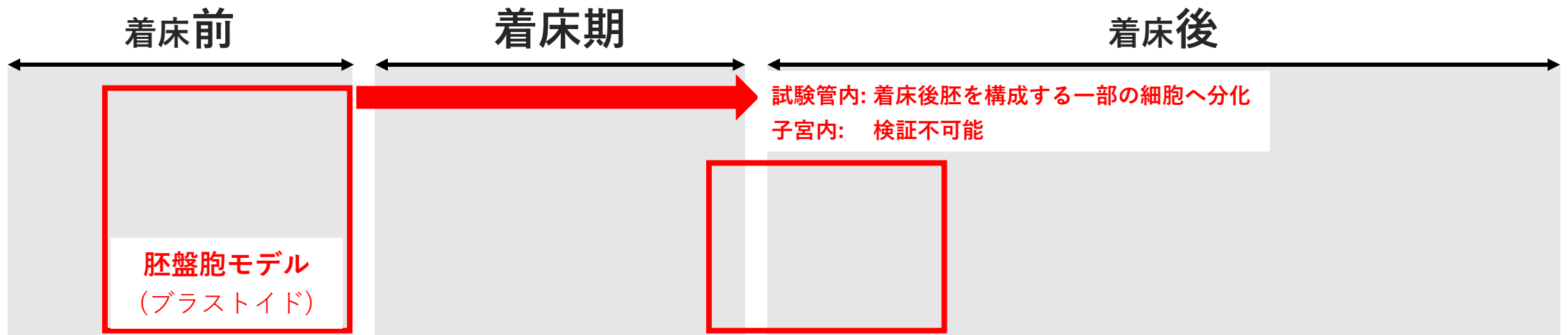
- ・ 試験管内(体外) で2週間培養
- ・ 牛の子宮へ移植,
- ・ 移植後 7 日に妊娠のホルモン陽性
- ・ 移植した胚の発生を示唆するデータなし

Pinzon-Arteaga C et al., *Cell Stem Cell*, 2023

- ・ 移植後(D17, D23, D28)hCG等のホルモンは検出されるが...
- ・ 着床後の胚発生はみられない

Li J et al., *Cell Stem Cell*, 2023 21

幹細胞を用いた ヒト胚モデル



着床後胚モデル

Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation
Zhai J, Xaio Z, Wang Y et al., *Trends Cell Biol.*, 32(1): 18-29, 2022
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.008>

Figure1 A

Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I:
What do we know about formative placental development following implantation?
J L James, A M Carter, L W Chamley, *Placenta.* 33(5):327-34, 2012
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.020>

Figure1

幹細胞を用いた『ヒト着床後胚モデル』

多能性幹細胞 → 着床後胚 を模倣（～受精後14日目相当）

Pluripotent stem cell-derived model of the post-implantation human embryo

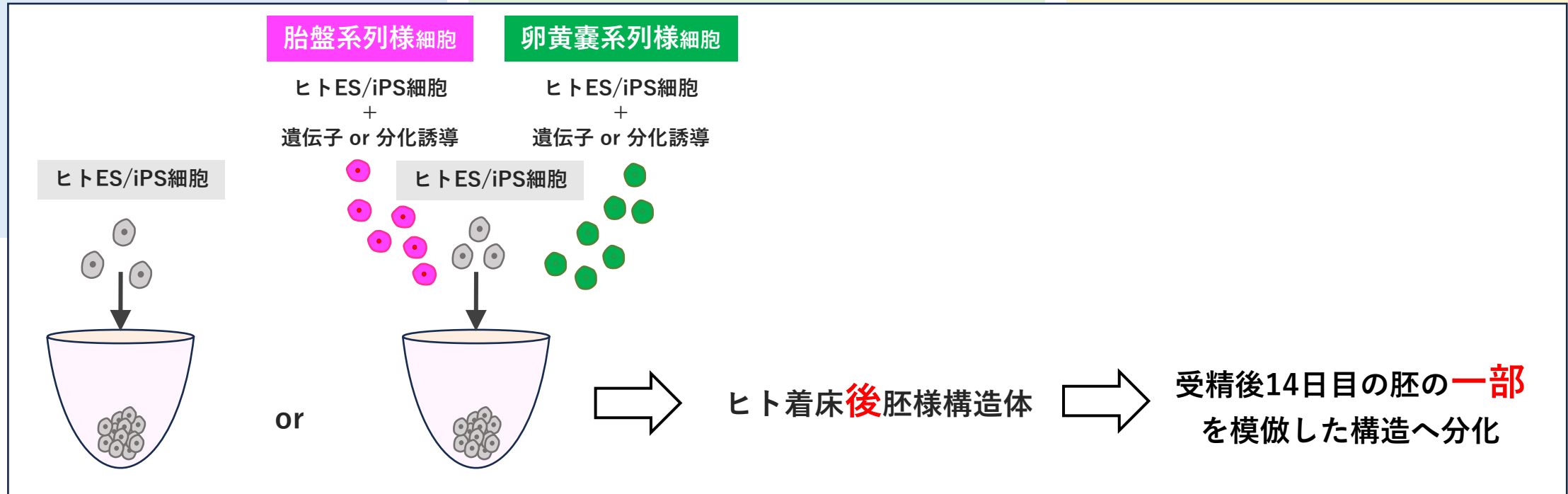
Weatherbee, B.A.T. *et al. Nature* 622, 584–593 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06368-y>

Self-patterning of human stem cells into post-implantation lineages

Pedroza, M *et al. Nature* 622, 574–583 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06354-4>

Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells

Oldak B *et al., Nature* 622, 562–573 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06604-5>



幹細胞を用いた『ヒト着床後胚モデル』

多能性幹細胞 → 着床後胚 を模倣（～受精後14日目相当）

Pluripotent stem cell-derived model of the post-implantation human embryo

Weatherbee, B.A.T. *et al. Nature* 622, 584–593 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06368-y>

Self-patterning of human stem cells into post-implantation lineages

Pedroza, M *et al. Nature* 622, 574–583 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06354-4>

Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells

Oldak B *et al., Nature* 622, 562–573 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06604-5>

Stem cells used to model a two week-old human embryo

Moris N, *Nature* 622 :469-470 (2023).

doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-023-03150-y>

構造の一部を模倣した部位	Weatherbee <i>et al</i>	Pedroza <i>et al</i>	Oldak <i>et al</i>
体の源	✓	✓	✓
羊膜の源	-	✓	✓
卵黄嚢の源	-	✓	✓
胎盤の源	-	-	✓
始原生殖細胞様細胞	✓	✓	✓
血液前駆細胞様細胞	-	-	✓

幹細胞を用いた『ヒト着床後胚モデル』

多能性幹細胞 → 着床後胚 を模倣（～受精後14日目相当）

Pluripotent stem cell-derived model of the post-implantation human embryo

Weatherbee, B.A.T. *et al. Nature* 622, 584–593 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06368-y>

Self-patterning of human stem cells into post-implantation lineages

Pedroza, M *et al. Nature* 622, 574–583 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06354-4>

Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells

Oldak B *et al., Nature* 622, 562–573 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06604-5>

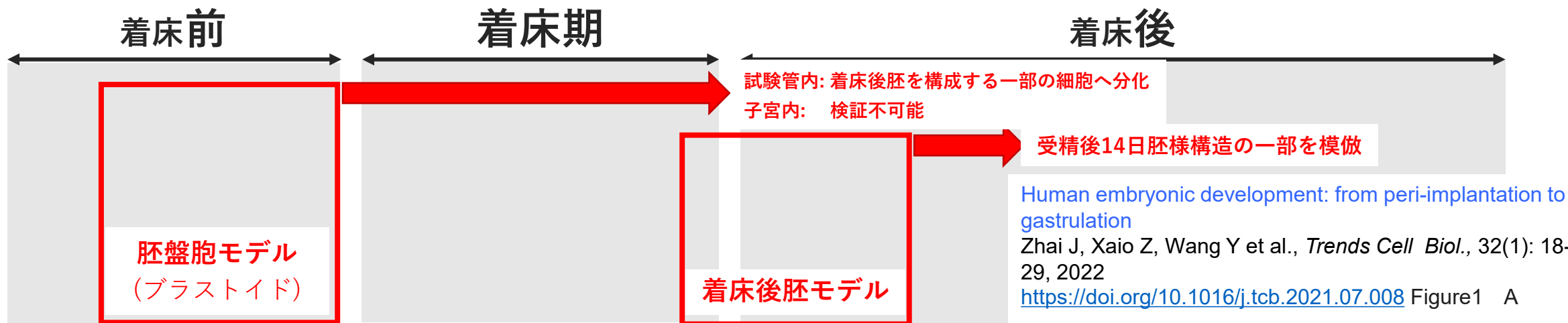
Stem cells used to model a two week-old human embryo

Moris N, *Nature* 622 :469-470 (2023).

doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-023-03150-y>

構造の一部を模倣した部位	Weatherbee <i>et al</i>	Pedroza <i>et al</i>	Oldak <i>et al</i>
誘導効率は低い (1-2%)			
正常胚と同等レベルの胚モデル作製は難しい			
始原生殖細胞様細胞	✓	✓	✓
血液前駆細胞様細胞	-	-	✓
本来の胚に存在しない細胞	✓	✓	✓

幹細胞を用いた ヒト胚モデル



?

胎盤系列様細胞を欠く
着床前胚モデル

?

胎盤系列様細胞を欠く
着床後胚モデル

Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I:
What do we know about formative placental development following implantation?
J L James, A M Carter, L W Chamley, *Placenta.* 33(5):327-34, 2012
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.020> Figure1

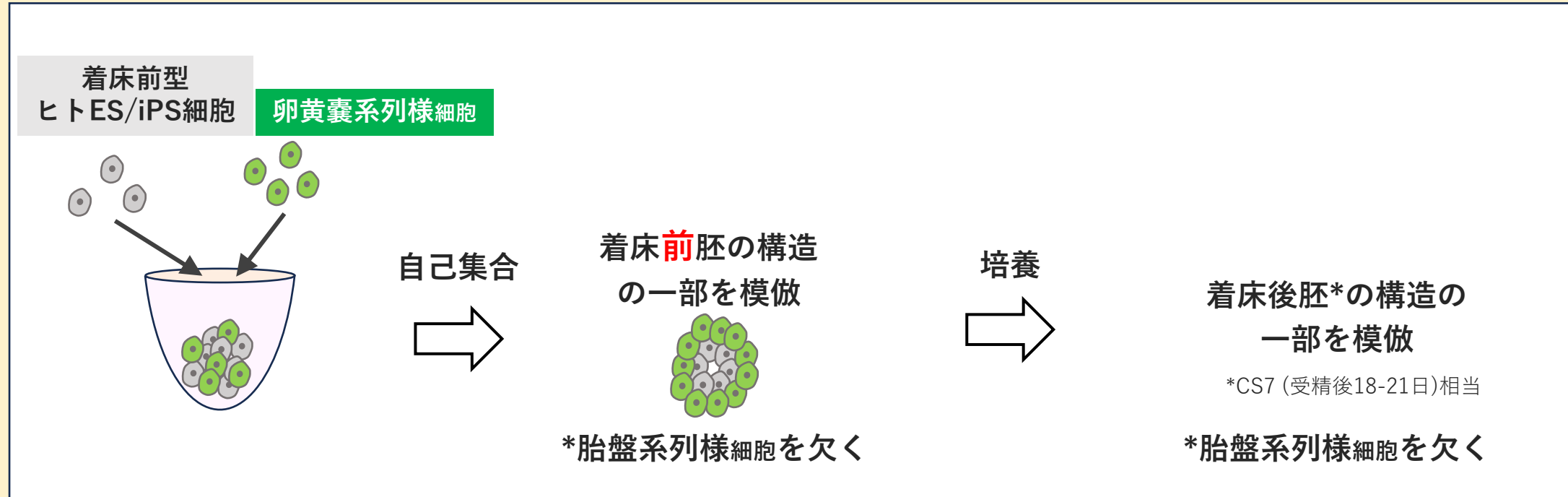
胎盤の源を欠く ヒト着床前~後胚モデル (バイラミノイド)

多能性幹細胞 → 着床前~後胚 を模倣

Hypoblast from human pluripotent stem cells regulates epiblast development

Okubo T, Rivron N, Kabata M et al., Nature 626:357-366 (2024).

<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07166-w>



胎盤の源を欠く ヒト着床後胚モデル (ペリ-ガストロイド)

多能性幹細胞 → 着床後胚 を模倣

Modeling post-implantation stages of human development into early organogenesis with stem-cell-derived peri-gastruloids

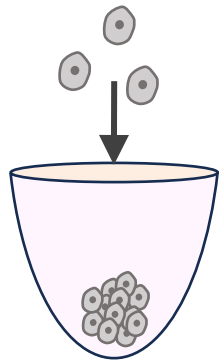
Liu L, Cell 186(18):3776-3792.e16 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.018>

ヒト多能性幹細胞
(Expanded pluripotent stem cells)

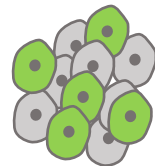
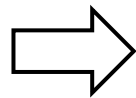
体の源様細胞

からなる着床後胚様構造

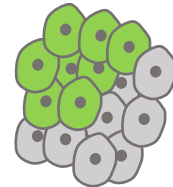
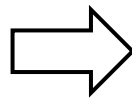
&
卵黄嚢系列様細胞



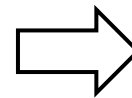
分化誘導



培養



培養



『ペリ-ガストロイド』

受精後20日目の胚の
一部を模倣した構造

*胎盤系列様細胞を欠く

*胎盤系列様細胞を欠く

ヒト胚モデルの『評価方法』

- 様々な評価軸が存在
- 研究目的ごとに、目指す模倣レベルが異なる

ヒト胚モデルの『評価方法』

評価軸の一例

□ 形態

□ 構成する細胞の種類

□ 構成する細胞の状態 (分化段階)

□ 構成する細胞の割合

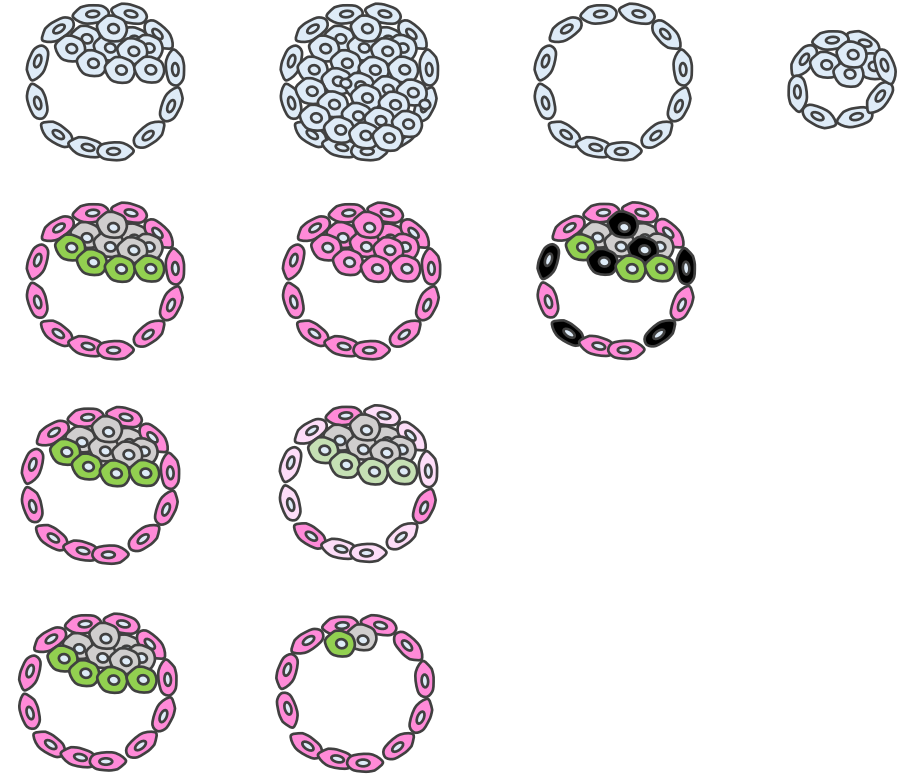
□ 機能

- 最も厳しい機能評価：子宮内での個体産生能の検証
→ ヒトでは行うべきではない。

□ 再現性

- 研究結果の**確らしさ**の基盤
- 再現性が低いと… 疾患モデル作製の際、「アーティファクト」と「疾患特有の現象」の区別ができない。

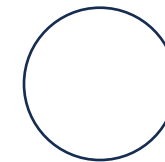
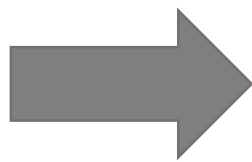
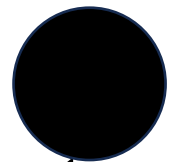
胚盤胞モデルを例にして考えると



幹細胞を用いた ヒト胚モデル

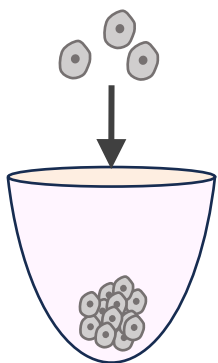
幹細胞

ヒト胚を模倣した構造体



- 従来型ヒトES/iPS細胞
- 着床前型ヒトES/iPS細胞
- Expanded多能性幹細胞

ヒト多能性幹細胞

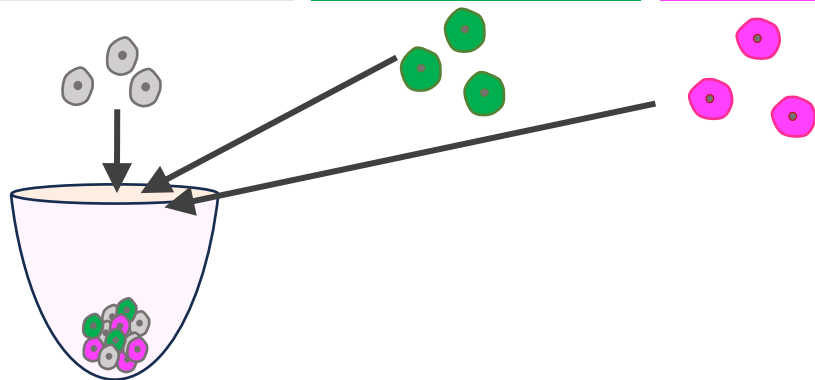


ヒト多能性幹細胞から誘導した

ヒト多能性幹細胞

卵黄嚢系列様細胞

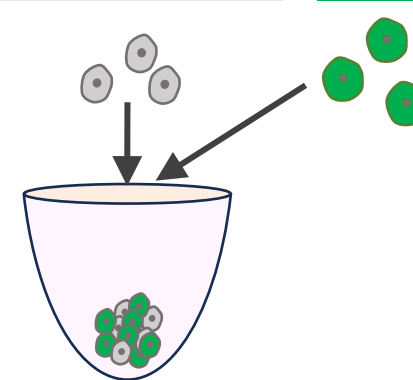
胎盤系列様細胞



ヒト多能性幹細胞から誘導した

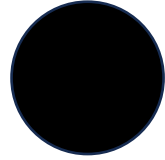
ヒト多能性幹細胞

卵黄嚢系列様細胞

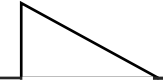
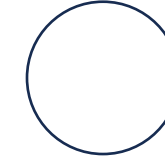


幹細胞を用いた ヒト胚モデル

幹細胞



ヒト胚を模倣した構造体



着床前

着床期

着床後

胚盤胞モデル
(ブラストイド)

Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation?

J L James, A M Carter, L W Chamley, *Placenta*. 33(5):327-34, 2012

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.020> Figure1

試験管内: 着床後胚を構成する一部の細胞へ分化
子宮内: 検証不可能

着床後胚モデル

Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation
Zhai J, Xaio Z, Wang Y et al., *Trends Cell Biol.*, 32(1): 18-29, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.008> Figure1 A

受精後14日胚様構造の一部を模倣

胎盤系列様細胞を欠く

着床前胚モデル
(バイラミノイド)

胎盤系列様細胞を欠く

着床後胚モデル
(ペリガストロイド)

CS7(受精後17-21日胚)
の一部を模倣

受精後20日胚様構造
の一部を模倣

James J L et al., *Placenta*, 2012

Zhai J et al., *Trends Cell Biol.*, 2022より改変

ヒト胚モデルの 展開・期待

受精	胚盤胞	着床	原腸陥入の開始	器官形成の開始	胎児期
0日	5-7日	7日	14日～	40日～	56日～ 受精8週 (妊娠10週)

An ethical framework for human embryology with embryo models

Rivron NC, Martinez Arias A, Peter MF et al., *Cell*, 17;186(17):3548-3557, 2023

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.028>

Figure.1



着床周辺期の胚モデル開発が始まった段階

ヒト胚モデルの 展開・期待

受精	胚盤胞	着床	原腸陥入の開始	器官形成の開始	胎児期
0日	5-7日	7日	14日～	40日～	56日～ 受精8週 (妊娠10週)

An ethical framework for human embryology with embryo models

Rivron NC, Martinez Arias A, Peter MF et al., *Cell*, 17;186(17):3548-3557, 2023

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.028>

Figure.1



着床周辺期の胚モデル開発が始まった段階

胚モデルの改良・空白期間の胚モデル開発・従来の幹細胞研究との融合

着床不全・早期流産・先天性疾患の解明, 治療法開発へ