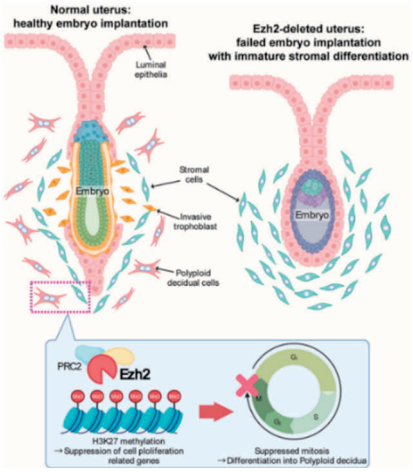
158　胚浸潤に着目した着床・妊娠成立機構の解析	藍川　志津

【目的】女性の社会進出に伴い、体外受精などの高度生殖医療の需要はますます高まっている。本邦においては出生児の約 14 人に 1 人が高度生殖医療により誕生している（2019 年日本産婦人科学会統計）。一方で、良好胚を選別し移植したとしても妊娠しない着床障害が問題となっており、生殖補助医療による妊娠成功率は未だに約 30%で頭打ちしている。着床障害はこれまで診断・治療法が全く提案されておらず、その要因として、正常な胚着床を担保する子宮側の制御メカニズムが未だブラックボックスであることが挙げられる。着床障害の原因が不明であるがために胚移植をさらに継続するしかない患者が多く存在しており、着床の機序解明や新しい診断・治療法の開発を目指した基礎研究が喫緊の課題となっている。着床は複数のステップからなる複雑な過程である。子宮内に到達した胚（受精卵）は適切な着床位置を決定すると、子宮内膜上皮へ接着する。更に強く子宮内膜に定着し胎盤形成を行うため、上皮への接着後、胚は子宮内膜間質へ浸潤（胚浸潤）する。胚接着部位周辺では通常、間質細胞が上皮細胞様に分化し、強固な複層（脱落膜）を成す。上皮の間をくぐり抜けた胚栄養膜は脱落膜に接触しながら、更に浸潤していく。本研究者らは以前の研究で、脱落膜の形成不全を示すマウス子宮では胚浸潤及びその後の妊娠維持が異常になることを見出している。このことは、胚接着部位周辺に形成される脱落膜が胚浸潤に必須であることを示唆している。本研究では、脱落膜が胚浸潤を促すメカニズム解明を目的として解析を行うこととした。

【方法】妊娠転帰の判明しているヒト着床期子宮内膜について RNA-seq 解析を行い、妊娠成立群と着床異常群とで発現に差の見られる遺伝子を探索した。発現量及びエンリッチメント解析の結果から、特に重要と考えられた核内因子 Ezh2 について、機能解析のため子宮特異的 KO マウスを解析した。KO マウスは妊孕能の確認と組織形態学的解析を行うと共に、胚浸潤期の子宮内膜を回収し、ChIP-seq、RNA-seq による下流シグナル経路の探索を行った。

【結果】ヒト着床期子宮内膜における RNA-seq 解析の結果、着床障害群では核内因子 Ezh2 の発現低下が生じていた。Ezh2 はヒストン H3 リシン残基のメチル化（H3K27me3）を介して遺伝子発現抑制に関わる分子であるが、着床障害群では Ezh2 の標的遺伝子群の発現上昇を認め、Ezh2 の発現・機能低下が示唆された。Ezh2 の着床期子宮における解析のため、子宮特異的 KO マウスを作製・解析した。その結果、このマウスは顕著な産仔数の減少が生じており、その原因として脱落膜形成及び胚浸潤に異常が起きていることを見出した。更に、胚浸潤期の子宮内膜について、RNA-seq 及び H3K27me3 に対する ChIP-seq 解析を行った。その結果、Ezh2 は H3K27me3 修飾を介して細胞周期遺伝子の発現を負に制御し、間質細胞が脱落膜細胞へと分化することを促進していることが明らかとなった。

Ezh2 による着床期子宮内膜の機能制御機構



158. 胚浸潤に着目した着床・妊娠成立機構の解析

藍川　志津

東京大学 大学院医学系研究科 産婦人科学講座

Key words：着床，胚浸潤，脱落膜

緒　言

女性の社会進出に伴い、体外受精などの高度生殖医療の需要はますます高まっている。本邦においては出生児の約 15 人に 1 人が高度生殖医療により誕生している（2018 年日本産婦人科学会統計）。一方で、良好胚を選別し移植したとしても妊娠しない着床障害が問題となっており、生殖補助医療による妊娠成功率は未だに約 30%で頭打ちしている［1］。着床障害はこれまで診断・治療法が全く提案されておらず、その要因として、正常な胚着床を担保する子宮側の制御メカニズムが未だブラックボックスであることが挙げられる。着床障害の原因が不明であるがために胚移植をさらに継続するしかない患者が多く存在しており、着床の機序解明や新しい診断・治療法の開発を目指した基礎研究が喫緊の課題となっている。

着床は複数のステップからなる複雑な過程である。子宮内に到達した胚（受精卵）は適切な着床位置を決定すると、子宮内膜上皮へ接着する。更に強く子宮内膜に定着し胎盤形成を行うため、上皮への接着後、胚は子宮内膜間質へ浸潤（胚浸潤）する。胚接着部位周辺では通常、間質細胞が上皮細胞様に分化し、強固な複層（脱落膜）を成す。上皮の間をくぐり抜けた胚栄養膜は脱落膜に接触しながら、更に浸潤していく［2］。

本研究者らは、脱落膜の形成不全は胚浸潤及び胚生育の不良を引き起こすこと、脱落膜では HMGB1、Hif2a、Rb1 といった核内因子が高く発現しており、これらの分子の子宮特異的欠損（uKO）マウスは脱落膜形成異常と胚浸潤・胚生育の不良を引き起こすことを見出してきた［3〜5］。よって、脱落膜における核内因子の機能を明らかにすることは、不妊治療の新たな診断・治療法確立に有用である。特に、脱落膜で発現する各種核内因子がどのようにして胚に作用し、その浸潤を促しているのかについては明らかとなっていない。核内因子は通常発現細胞内で機能を発揮することを踏まえると、何らかの分泌型因子の発現誘導を介して作用を発揮している可能性が極めて高いと考えた。

方　法

1. ヒト着床期子宮内膜における網羅的遺伝子発現解析

ヒトにおける着床異常に関与しうる分子を探索するため、東京大学医学部附属病院の着床外来において、医師が着床障害を疑った患者に対して、インフォームドコンセントのうえで着床期子宮内膜検体を採取した。ホルモン補充周期による着床期（黄体ホルモン投与 7 日目）の子宮内膜を採取した。検体採取後、患者の胚移植による臨床妊娠の有無を追跡調査し、妊娠を認めた場合はコントロール、妊娠しなかった場合は着床障害群と規定した。研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を受けて行った（承認番号：2019241G、10991）。

回収した組織から RNeasy Plus Mini Kit（Qiagen）により RNA 抽出を行い、RNA-seq をマクロジェン・ジャパンで行った。得られた Raw リードファイルはヒトゲノム配列（GRCh38/hg38）上に Hisat2 version 2.1.0 を用いてアライメントし、Subread ツール中の featureCount 機能を用いて各遺伝子座上におけるリード数をカウントした。コントロール・着床障害のサンプル間での発現量を比較するため、リードカウントファイルを DESeq2 version 1.16.1 に供試し、2 倍以上発現量の差異かつ有意差 $P<0.05$ で認めた遺伝子を Differential

expressed genes（DEGs）として評価した。更にこれらの遺伝子を、Enrichr を用いて解析した。

2. 子宮特異的 *Ezh* 欠損マウス（*Ezh2* uKO）の解析

1）妊孕能の確認

子宮特異的な Ezh2 の機能解析のため、Ezh2-loxp マウスを子宮特異的 Cre（Pgr-Cre）と交配させることにより子宮特異的 *Ezh2* 欠損マウス（以下 *Ezh2* uKO）を作製した。

妊娠過程の解析のため、コントロール及び *Ezh2* uKO メスマウスを野生型オスマウスと 16 時以降に同居させ、翌朝膣栓の確認を行った。膣栓確認日を妊娠 1 日目と定義し、その後任意の妊娠日に解剖、産仔数の確認を行った。着床期である妊娠 5・6 日目については、着床部位で血管透過性が亢進することを利用し、解剖の 3 分前に 1% Chicago Blue-saline を静脈内投与することで着床部位の可視化を行った。

2）組織形態学的観察

組織切片観察のため、凍結組織をクライオスタットで 12 μm 厚に薄切した。4% PFA-PBS で固定後、任意の抗体での免疫染色、もしくは H&E 染色を行った。3D 免疫染色用の子宮組織は、解剖後速やかに 20% DMSO-MeOH で固定し、その後抗 E-Cadherin 抗体による蛍光免疫染色及び Benzyl acetate:Benzyl Benzoate＝1 : 2 による組織透明化を行った。染色画像の取得には Nikon AXR、3D 画像構築のため Imaris（oxford instruments）を使用した。

3）RNA-seq 解析

妊娠 4 日目子宮、妊娠 6 日目胚着床部位を解剖後瞬間凍結し、NucleoSpin を用いて RNA 抽出したのち、RNA-seq をマクロジェン・ジャパンで行った。得られた Raw リードファイルはマウスゲノム配列（GRCm38/mm10）上にアラインメントし、以下ヒト検体の RNA-seq 時と同様に解析を行った。

4）ChIP-seq 解析

妊娠 6 日目に回収した胚着床部位子宮を縦長に切り開き、ダウンスホモジナイザーを用いて脱落膜細胞を遊離させた。回収した脱落膜細胞から更に Nuclei ez lysis buffer（Sigma）中で核を単離し、MNase 処理により DNA を断片化した。H3K27me3 に対する ChIP は Magna ChIP G - Chromatin Immunoprecipitation Kit（Millipore）により行った。ChIP-seq は Novogene にて行った。得られた Raw リードファイルはマウスゲノム配列（GRCm38/mm10）上に bowtie2 version 2.3.3.1 を用いて アライメントし、MACS2 によりピークコールを行った。Tag density plot および Heatmap は ngsplot version version 2.47.1 を用いて作成した。

結果および考察

1. ヒト着床障害子宮内膜では EZH2 の発現低下と H3K27me3 標的遺伝子群の発現上昇を認める

ヒト着床障害における原因因子の探索のため、その後妊娠した、あるいは妊娠できなかった（＝着床障害）患者から回収した分泌期（ヒトにおける着床期に相当）子宮内膜について、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。得られた発現変動遺伝子のうち、着床障害群で発現が高かった遺伝子群について、Enrichr によるパスウェイ解析を実行したところ、これらの遺伝子は H3K27me3 の標的となることがわかった。H3K27me3 は Polycomb repressor complex 2（PRC2）と呼ばれるタンパク質複合体によって生じるヒストン修飾であり、一般に近傍遺伝子の発現抑制に機能することが知られる［6］。そこで PRC2 構成因子それぞれについての遺伝子発現を比較したところ、H3K27me3 修飾を行う主要な酵素である EZH2 について、着床障害群で有意な発現低下を認めた。このことから、着床障害時の子宮内膜では EZH2-H3K27me3 による遺伝子発現制御が破綻していることが示唆された。

2. *Ezh2* uKO 子宮では胚浸潤異常を伴う産仔数低下が生じる

ヒト子宮内膜における結果を受け、次に Ezh2-H3K27me3 が着床や妊孕能に寄与するか、その機能的意義を検

証することとした。まず Ezh2 の子宮内膜における発現解析を行ったところ、交尾直後では上皮で発現し、その後胚が子宮内腔に到達する妊娠 4 日目では上皮と間質で発現を確認した。更に胚接着後に分化した間質細胞、すなわち脱落膜細胞で発現が見られ、特に胚浸潤期の妊娠 6 日目で高い発現を示した。次に Ezh2 の機能を子宮特異的に解析するため、子宮特異的 Cre を用いて *Ezh2* uKO を作製した。その結果、*Ezh2* uKO メスではコントロールの約 1／4 の産仔数という、顕著な妊孕能の低下を示した（図 1）。更に妊娠初期過程に遡り、妊娠異常の起点を探ったところ、*Ezh2* を欠損した子宮では胚接着の遅延と、顕著な胚浸潤の抑制（図 2）が生じていた。以上の結果から、Ezh2 はマウスにおいても着床期で何らかの機能を有していること、特に脱落膜で胚浸潤に向けた機能を発揮していることが想定された。

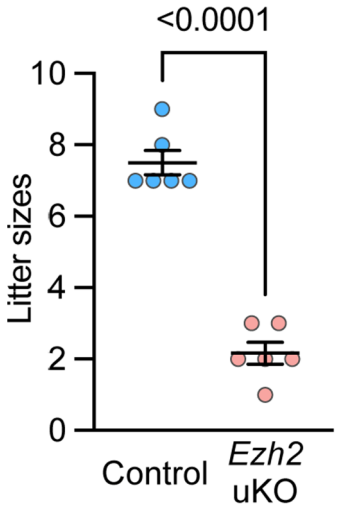


図 1. *Ezh2* uKO における妊孕能低下
Ezh2 uKO は Control に比して産仔数（litter size）が減少する。
グラフは平均値±標準誤差を示し、統計学的解析に Student's t-test を用いた。

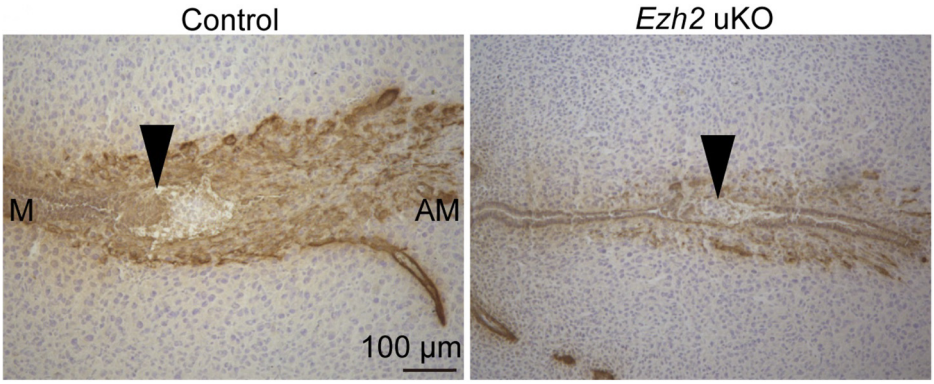


図 2. *Ezh2* uKO における胚浸潤異常
妊娠 6 日目子宮内膜において、胚細胞のうち、浸潤能を示す胚栄養膜を、マーカー分子 CK-8 により染色した（茶色）。*Ezh2* uKO では子宮内膜に浸潤している細胞が少ない。矢頭：胚、M：mesometrial pole（子宮外膜側）、AM：Anti-mesometrial pole（反子宮外膜側）、Scale bar：100 μm。

3. 着床期子宮内膜の Ezh2 は H3K27me3 修飾を介して細胞周期遺伝子の発現を制御している

次に、Ezh2 による脱落膜機能制御の機構を探る目的で、胚浸潤期子宮内膜における RNA-seq 及び H3K27me3 に対する ChIP-seq 解析を行った。その結果、*Ezh2* uKO の子宮内膜では細胞周期の特に G2/M 期に関わる遺伝子座周辺で H3K27me3 修飾が顕著に低下していること、実際に G2/M 関連細胞周期遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。また、RT-qPCR により、Ccnd2 及び Cdkn2b という細胞周期関連 2 遺伝子の発現が *Ezh2* uKO で上昇していることを確認した。

着床期子宮で見られる分化間質細胞、すなわち脱落膜細胞は、核が細胞質に 2 つ以上存在する polyploid の特徴で知られる［7］。これは分化の際、間質細胞が S 期を経て DNA 複製を行うものの、通常 M 期に起こる細胞分裂を生じないためである。脱落膜細胞は polyploid の性質を持つことにより、胚の生育や胎盤形成を支持する分子を多く発現できるようになると考えられている［7］。我々のシーケンス解析から、*Ezh2*uKO では G2/M へ移行する遺伝子群の発現が上昇していたことから、Ezh2 は間質細胞の脱落膜細胞への分化を誘導することでその後の胚浸潤ならびに妊娠維持を促進していると想定された。

4. 子宮内膜における Ezh2 は細胞周期制御を介して間質細胞の分化を誘導する

*Ezh2*uKO におけるシーケンス結果を受け、*Ezh2*uKO では実際に細胞周期異常とそれに伴う脱落膜化能低下が生じているかを検証した。S 期のマーカーとして BrdU、G2/M のマーカーとして phospholyrated Histone H3（pHH3）の免疫染色を行った。その結果、コントロールと *Ezh2* uKO の比較において、BrdU 陽性細胞数に差は見られなかった一方、pHH3 陽性細胞は *Ezh2* uKO 子宮内膜で顕著に増加していた。

脱落膜細胞は十分に分化すると、細胞増殖が停止していながらも生理的機能は維持されている終末分化の状態、すなわち細胞老化状態になることが知られる［8］。そこで、妊娠 8 日目の子宮内膜において細胞老化のマーカーである senescence-associated beta-galactosidase（SA-β-gal）染色を施行した。その結果、*Ezh2*uKO ではコントロールと比べ弱い染色像が得られた（図 3）。

以上の結果から、Ezh2 は子宮内膜において細胞周期の特に G2/M 移行を阻害することにより、間質細胞の脱落膜化を誘導し、胚の浸潤並びにその後の妊娠維持に寄与していることが明らかとなった。着床障害患者においても EZH2 の発現が低下していたこと、且つ着床障害子宮内膜では間質細胞の増殖・分化に異常が見られること［5］から、今回明らかとなったメカニズムはヒト子宮内膜においても機能していると想定される。

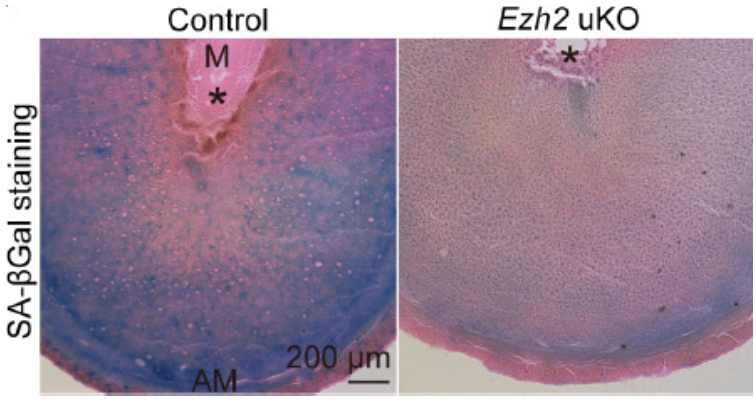


図 3. *Ezh2* uKO における脱落膜化異常

妊娠 8 日目子宮内膜において、脱落膜化の評価のため、SA-β-gal 染色を行った（青色）。*Ezh2*uKO では脱落膜化が減弱している。* : 胚、M : mesometrial pole（子宮外膜側）、AM : Anti-mesometrial pole（反子宮外膜側）、Scale bar : 200μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医学部附属病院女性診療科・産科の廣田泰准教授、福井大和博士である。

文　献

1) Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. Nat Med. 2012 Dec;18(12):1754-67. PMID: 23223073, DOI: 10.1038/nm.3012.

2) Yuan J, Aikawa S, Deng W, Bartos A, Walz G, Grahammer F, Huber TB, Sun X, Dey SK. Primary decidual zone formation requires Scribble for pregnancy success in mice. Nat Commun. 2019 Nov 28;10(1):5425. PMID: 31780662, DOI: 10.1038/s41467-019-13489-4.

3) Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T, Takeda N, Tanaka T, Hiraoka T, Akaeda S, Fujita H, Shimizu-Hirota R, Igaue S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Fujii T, Osuga Y. HIF2α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment. J Clin Invest. 2018 Jul 2;128(7):3186-3197. Epub 2018 Jun 18. doi: 10.1172/JCI98931, DOI: 10.1172/JCI98931.

4) Aikawa S, Deng W, Liang X, Yuan J, Bartos A, Sun X, Dey SK. Uterine deficiency of high-mobility group box-1 (HMGB1) protein causes implantation defects and adverse pregnancy outcomes. Cell Death Differ. 2020 May;27(5):1489-1504. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31595043, DOI: 10.1038/s41418-019-0429-z.

5) Akaeda S, Hirota Y, Fukui Y, Aikawa S, Shimizu-Hirota R, Kaku T, Gebril M, Hirata T, Hiraoka T, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Takeda N, Fujii T, Osuga Y. Retinoblastoma protein promotes uterine epithelial cell cycle arrest and necroptosis for embryo invasion. EMBO Rep . 2021 Feb 3;22(2):e50927. Epub 2021 Jan 5. PMID: 33399260, DOI: 10.15252/embr.202050927.

6) Margueron R, Reinberg D, The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature . 2011 Jan 20;469(7330):343-9. PMID: 21248841, DOI: 10.1038/nature09784.

7) Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. Reproduction . 2009 Jun;137(6):889-99. Epub 2009 Mar 23. PMID: 19307426, DOI: 10.1530/REP-08-0539.

8) Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, Dey SK. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. J Clin Invest. 2010 Mar;120(3):803-15. PMID: 20124728, DOI: 10.1172/JCI40051.