

日本医療研究開発機構 成育疾患克服等総合研究事業 事後評価報告書

公開

I. 基本情報

研究開発課題名：（日本語）子宮内膜分子解析と人工知能による着床障害の診断ストラテジーの確立
（英語）Establishment of diagnostic strategies for recurrent implantation failure using endometrial molecular analysis and artificial intelligence

研究開発実施期間：令和4年4月27日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）廣田 泰
（英語）Yasushi Hirota

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人 東京大学医学部附属病院 教授
（英語）Professor, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

II. 研究開発の概要

(和文) 2 ページ以上

1. 研究開発の概要

現代社会において晩婚化・少子高齢化は大きな社会問題である。晩婚化に伴い不妊治療を受ける患者および生殖補助医療（体外受精／顕微授精・胚移植）を受ける患者も増加している。世界的に見ると 2050 年には 15%のカップルが不妊となると推定されており、日本の 022 年のデータでは、出生児の 10 人に 1 人が生殖補助医療を介した妊娠であることから生殖補助医療の重要性は非常に高まっている。生殖補助医療においては、良好胚を複数回移植しても妊娠しない着床不全（着床障害）が問題となっており、その患者数は生殖補助医療を受ける患者の 15-20%にのぼるとされる。しかしながら、着床不全の原因を特定する有効な診断ストラテジーがなく、生殖医療最大の課題となっている。診断法として、子宮因子へは MRI・超音波検査、子宮鏡検査、子宮内膜組織診などが行われ、胚性因子へはタイムラプスインキュベーターによる胚の連続観察や胚生検による胚染色体異数性検査などが行われているが、いずれも単独で十分な診断法でなく、各検査の質向上が急務となっている。子宮因子の検索として昨今着床期子宮内膜の特定の遺伝子発現を次世代シーケンサー（NGS）により解析して、患者ごとの「着床の窓」と呼ばれる着床に適したタイミングを特定する技術が臨床現場では広く使用されるようになってきている。しかしながらこういった技術も必ずしも妊娠・出生につながっているとは言えず、新たなアプローチが求められている。

本研究は、子宮因子、胚性因子の双方から着床不全の新たな診断ストラテジーを確立することを目的とした。子宮因子に対して、①着床期子宮内膜組織を用いた着床能分子マーカーの開発、②人工知能（AI）を用いた子宮鏡による着床不全（着床障害）自動診断システム開発、胚性因子に対して、③AI を用いたタイムラプス胚画像による胚品質の自動評価システムの開発、を行った。①は、着床期ヒト子宮内膜を用いた着床不全予測のバイオマーカー遺伝子が着床不全患者の胚移植の妊娠予後予測に有用かどうかの検討や、不妊症・着床不全の原因として知られ、その存在が炎症などを通して子宮内膜の性質に変化を加えうると考えられている子宮腺筋症を合併する着床不全患者に対してプロスタグランジンが着床不全の特異的なマーカーになるかを検討した。②では、子宮鏡下の診断に経験を要する慢性子宮内膜炎に着目して研究を行った。③では、タイムラプス画像のみでの評価モデルに加え、年齢、着床不全となる子宮因子等の臨床背景を加味したモデルについても検討した。特に、日本においてはアクセスが良く情報量が非常に多いものの検者による診断格差が問題となる子宮の MRI 画像（特に子宮内膜蠕動運動）を AI により定量化し、解析に加えることを目指した。

研究統括は廣田が担当し、①は廣田、大須賀、福井、堤、久須美、松本、②は廣田、松尾、久須美、松本、③は廣田、大須賀、赤枝、堤、松本が主に担当し、研究チームは互いに連携を取り機能的に研究を実施できたため、順調に成果が得られた。本研究の成果は、項目ごとに下記に記載した。

計画①：着床期子宮内膜組織を用いた着床能分子マーカーの開発

1) ヒストンメチル化による子宮内膜機能制御とその関連分子群を用いた子宮内膜の着床能バイオマーカー

着床過程は、胚が子宮内膜に接着する過程（胚接着）と、その後に胚の最外層に位置する栄養膜細胞が子宮内膜に入り込む過程（胚浸潤）を経て成立する。胚が子宮内膜に接着すると、その周囲に存在する間質細胞は脱落膜細胞へ分化し、胚は脱落膜内に浸潤する。本研究では、ヒト着床期子宮内膜を着床不全群とコントロールである妊娠群に分け、網羅的遺伝子発現解析を行った。妊娠群と着床不全群の間で発現変動のある遺伝子を探索したところ、抑制的エピゲノム修飾を担うヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化（H3K27me3）の標的遺伝子群の発現上昇が着床不全群で生じていることを見出した。さらに H3K27me3 の修飾に関わる主要な酵素 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) 発現が着床不全群で低下していた。これらの結果から着床期子宮内膜の EZH2 および H3K27me3 関連遺伝子群が着床能のバイオマーカーになる可能性を見出した。

次に、Ezh2 の子宮内膜における機能的意義を調べる目的で、Ezh2 を子宮特異的に欠損したマウスを用いて解析を行ったところ、Ezh2 欠損マウスは新生仔をほとんど産まず重篤な不妊になった。Ezh2 欠損子宮での不妊のメカニズムを探るため、マウス着床期子宮内膜を用い RNA-seq 解析を行うとともに、H3K27me3 に対する ChIP-seq 解析を行った。Ezh2 が H3K27me3 修飾を介して、細胞周期遺伝子の細胞分裂に関わる遺伝子群の発現を抑制していることを見出した。マウス胚浸潤期の子宮内膜を組織形態学的に観察したところ、Ezh2 欠損子宮では間質細胞が増殖し続け、多核の脱落膜細胞への分化がほとんど起こっていないことが判明した。この間質細胞の分化異常はその後、胚が子宮内膜へ浸潤することを妨げていることがわかった。

本研究の結果、Ezh2 による抑制的ヒストン修飾が子宮内膜細胞の分化を誘導し胚浸潤を調節していることが示され、着床制御の新たなメカニズムを解明することができた。以上の研究成果は国際学術誌 *Cell Death and Diseases* に掲載された。EZH2 および H3K27me3 関連分子群は、着床期ヒト子宮内膜を用いた着床能の分子マーカーとして利用できる可能性がある。

2) 子宮内膜の LIF および COX-2 による着床制御と子宮内膜の LIF と COX-2 を用いた着床能バイオマーカー

子宮における LIF の機能を探るため、LIF を子宮の上皮細胞層でのみ LIF を欠損させた LIF 子宮上皮特異的欠損 (LIF eKO) マウス、子宮上皮・間質細胞の両方で欠損した LIF uKO マウスを作成し、その解析を通して着床期子宮における LIF の機能を調べた。その結果、LIF eKO メスにおける妊娠成功率は正常なコントロールのマウスの 1/5 程度に減少し、LIF uKO では産仔が得られない完全不妊となった。

これらの不妊の原因を探るべく、胚着床期の子宮の解析を行ったところ、LIF eKO・LIF uKO いずれも胚接着不全が生じていることが明らかとなった。LIF は分泌型因子として細胞膜上の受容体に作用し、細胞の機能を変化させることが知られている。LIF が胚接着を促すメカニズムを探るため、LIF 欠損子宮及びその子宮内に存在する胚について RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、LIF の有無は胚の遺伝子発現にはほとんど影響しない一方で、子宮の上皮細胞に対しては転写因子 STAT3 を介した遺伝子発現惹起に寄与していることが明らかとなった。胚接着前の時期に LIF eKO・uKO マウスそれぞれに対し LIF 精製タンパク質 (rLIF) を投与したところ、胚接着不全が改善された。LIF eKO においては胚接着前期の rLIF 投与によって産仔数の顕著な改善も認めた。一方、LIF uKO においては rLIF 投与を行ってもなお産仔が得られなかった。このことから、胚接着前の子宮上皮で発現している LIF は胚接着に寄与する一方で、胚接着後に間質細胞で発現する LIF はその後の胚生育に重要であることが示唆された。実際に、子宮内膜の形態を 3 次元 (3D) 観察し、胚生育への影響を解析したところ、正常子宮では上皮細胞層が胚を深く包み込む谷底構造 (胚生育巣) を形成しているのに対し、LIF 欠損子宮ではそのような上皮形態変化が全く生じていないことが明らかとなった。一方で、rLIF 投与を行うと、LIF eKO においては正常子宮と同様の谷底構造が観察されたが、LIF uKO においては上皮形態変化がほとんど生じておらず、これが妊娠維持を行えない一因であると示唆された。本研究結果は国際学術誌 *Cell Death Discovery* に掲載された。

次に、子宮に局限した COX の機能を探るため、COX-2 子宮特異的欠損 (COX-2 uKO) マウス、更には COX-1 も欠損した COX-1/COX-2 二重欠損 (DKO) マウスを作成し、その解析を通して着床期子宮における両酵素の機能を調べた。その結果、COX-2 uKO の産仔数は正常なコントロールのマウスの 1/4 程度に減少し、COX-1/COX-2 DKO では産仔が得られない完全不妊となった。これらの不妊の原因を探るべく、次に胚接着前および胚浸潤期の子宮の解析を行った。その結果、COX-2 uKO は胚接着前子宮で異常を示さなかった一方、COX-1/COX-2 DKO の子宮では PG 産生が減少し、胚配置異常と胚接着不全が生じていた。また、胚浸潤期において、COX-2 uKO の子宮では脱落膜化不全と胚浸潤異常をきたすことが明らかとなった。COX は PG 産生を介して生理作用を発揮することから、重要な PG 分子種を探るため LC-MS/MS による定量解析を行った。その結果、COX-1/COX-2 DKO では胚接着前の子宮で、COX-2 uKO では胚浸潤期で PG 産生が低下していた。更に、COX-2 uKO で低下していた PGE2・PGD2 を補充した場合、COX-2 uKO における脱落膜化が改善すること

が明らかとなった。以上の研究成果は国際学術誌 JCI insight に掲載された。

さらにヒト着床期子宮内膜における RNA-seq 解析から、LIF、COX-2 が着床不全患者の着床期子宮内膜で発現の低下傾向を示した。LIF および COX-2 のヒト子宮内膜での発現低下は、着床不全へ関与し、着床能の分子マーカーとしても利用できる可能性が明らかとなった。

3) 子宮腺筋症におけるプロスタグランジンとトランスクリプトを用いた子宮内膜の着床能バイオマーカー

子宮腺筋症患者の着床期ヒト子宮内膜を用いたリピドミクスとトランスクリプトームにより、対照群の妊娠例に比べて着床不全例でプロスタグランジン (PG) 産生増加、増加または低下する特定の mRNA が見出された。子宮腺筋症が着床不全を起こす機序に子宮内膜の高 PG が関連している可能性、子宮腺筋症症例において着床期子宮内膜の PG 測定や特定の遺伝子測定で着床不全が予測できる可能性が示唆された。

計画②：AIを用いた子宮鏡による着床不全（着床障害）（CE）自動診断システムの開発

慢性子宮内膜炎（CE）は不妊症や着床不全（着床障害）にしばしば合併するが、診断には熟練した術者が必要である。本研究では、子宮鏡動画による CE の自動診断 AI システムを開発した。正常例 50 件、CE 例 31 件（計 81 例）を用い、教師あり学習によりモデルを構築。5 秒間のフレーム単位での診断では、感度 82.5%、特異度 77.7%を達成。さらに、8 群の交差検証とアンサンブル学習により、少数例でも汎用性のあるモデル構築を実現した。今後症例数を拡充し、実臨床での活用を見据えたシステムの精度向上と最適化を進める予定である。

計画③：AIを用いたタイムラプス胚画像による胚品質の自動評価システムの開発

タイムラプス胚画像と臨床背景を統合した妊娠予測 AI モデルの開発を進めた。まず、胚タイムラプス画像のみを用いた予測では、静止画 30 枚を用いたモデルで平均の AUC 0.634 を得た。次に、採卵時年齢を加えた統合モデルでは平均の AUC 0.662 となり、統計的に有意な精度向上が認められた ($P=0.0431$)。さらに、着床不全外来の臨床データ (CD138 陽性細胞数、子宮鏡診断、MRI、妊娠転帰等) を活用し、胚因子に加えて子宮因子や母体因子も取り入れた妊娠予測アルゴリズムの構築を進めた。シネ MRI を含む 160 例の患者データでは、画像と系列データを組み合わせた AI モデルにより、Accuracy 0.73、Recall 0.91、AUC 0.72 の予測精度を得た。画像の動態解析においては、子宮の蠕動運動を数値化し、可視化可能であることも確認された。

2. 顕著な成果

(1) 子宮内膜のエピゲノム修飾 H3K27me3 を調節する EZH2 による着床調節とその関連遺伝子群を用いた子宮内膜の着床能バイオマーカー

概要：(200 字程度)

ヒト着床期子宮内膜において、エピゲノム修飾の一種である H3K27me3 およびその修飾酵素 EZH2 の発現が着床不全群で低下していることを見出した。さらに、EZH2 を子宮特異的に欠損したマウスでは、細胞周期遺伝子の制御異常により子宮内膜間質細胞の分化が障害され、胚の浸潤が妨げられ不妊となることが明らかとなった。これらの結果は、EZH2-H3K27me3 経路が子宮内膜の構造的・機能的成熟を通じて着床成立を制御していることを示しており、この経路の分子群が着床能のバイオマーカーおよび新たな治療標的となる可能性を示唆する重要な知見を得た。

(2) 着床を調節する LIF を用いた子宮内膜の着床能バイオマーカー

概要：(200 字程度)

子宮内で分泌されるサイトカイン LIF が、胚の着床およびその後の胚発育において異なる細胞種で異なる役割を担うことを明らかにした。上皮特異的 LIF 欠損マウス (LIF eKO) では胚接着が障害され妊娠率が著

しく低下し、上皮および 間質両方で欠損した LIF uKO マウスでは完全な不妊となった。LIF は子宮上皮において STAT3 を介して胚接着を促進し、間質では脱落膜形成と胚の生育環境の構築に関与することが示された。着床期ヒト着床期子宮内膜の解析から、LIF が着床不全患者の着床期子宮内膜で発現低下傾向を示した。これらの知見は、LIF が着床と妊娠維持に不可欠な分子であることを示しており、着床不全の診断や治療標的としての LIF の可能性を示唆する重要な成果である。

(3) 着床を調節する COX-2 を用いた子宮内膜の着床能バイオマーカー

概要：(200 字程度)

COX-2 子宮特異的欠損マウスおよび COX-1/COX-2 二重欠損マウスを用いて、着床期における COX 酵素の役割を解析した。COX-2 欠損では胚浸潤期に脱落膜化不全と胚浸潤異常が、二重欠損では胚接着不全と完全不妊が認められた。プロスタグランジン (PG) 定量解析により、各時期における PG 産生低下が確認され、特に PGE2・PGD2 の補充により脱落膜化が改善した。着床期ヒト着床期子宮内膜の解析から、COX-2 が着床不全患者の着床期子宮内膜で発現低下傾向を示した。これらの結果から、COX-2 は PG 産生を介して子宮内膜の着床環境を制御しており、着床不全の新たな治療標的となる可能性が示された。

(4) AI を用いた子宮鏡所見による慢性子宮内膜炎診断ツールの開発

概要：(200 字程度)

不妊症患者の子宮鏡動画 81 例を用いて、AI による慢性子宮内膜炎 (CE) の自動診断システムを開発した。教師あり学習により構築したモデルは、フレーム単位で感度 68.4%、特異度 80.7%、5 秒間のフレームを用いると感度 82.5%、特異度 77.7%と良好な精度を示した。熟練を要する子宮鏡診断の客観化と精度向上が期待され、今後の CE 診断の標準化・効率化に大きく寄与する可能性がある。

(5) AI を用いたタイムラプス・シネ MRI 子宮鏡所見を用いた妊娠予測ツールの開発

概要：(200 字程度)

胚のタイムラプス画像と臨床背景を統合した妊娠予測 AI モデルを開発した。胚画像単独モデルの AUC は 0.637 であったが、採卵時年齢を加えた統合モデルでは AUC が 0.662 に向上し、有意な精度改善を示した。また、着床不全外来の臨床データを加えたモデルは、Accuracy 0.73、Recall 0.91、AUC 0.72 の高精度を達成した。シネ MRI による子宮蠕動運動の可視化も可能となり、妊娠予測の精度向上と子宮機能評価の両面で臨床応用が期待できる。

In modern society, delayed marriage and declining birthrates have contributed to rising infertility and growing reliance on assisted reproductive technologies (ART) including in vitro fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and embryo transfer (ET). By 2050, 15% of couples worldwide are expected to face infertility. In Japan, one in twelve babies born in 2021 was conceived through ART, underscoring the significance of ART. However, recurrent implantation failure (RIF)—affecting 15–20% of ART patients despite transfer of good-quality embryos—remains a major unresolved issue due to the lack of effective diagnostic strategies. This research aimed to develop new diagnostic approaches for RIF by addressing both uterine and embryonic factors.

Plan 1: Development of Molecular Biomarkers for Implantation Ability Using Human Implantation-Stage Endometrial Tissue

1) Regulation of Endometrial Function by Histone Methylation

Embryo implantation involves embryo attachment to the endometrium followed by trophoblast invasion. Stromal cells differentiate into decidual cells to support embryo invasion.

Comparing human endometrium during peri-implantation period from patients with implantation failure and pregnant controls, we found that genes targeted by repressive histone modification H3K27me3 were upregulated in the implantation failure group, while EZH2, the key enzyme for H3K27me3, was decreased. This suggests EZH2 and H3K27me3-related genes may serve as biomarkers for embryo implantation. Using uterine-specific *Ezh2* knockout mice, we observed severe infertility. RNA-seq and ChIP-seq analyses showed *Ezh2* suppresses cell cycle genes via H3K27me3. Histology revealed excessive stromal proliferation and impaired decidualization, blocking embryo invasion. This study, published in *Cell Death and Diseases*, reveals a novel implantation mechanism where *Ezh2*-dependent histone modification regulates endometrial differentiation and embryo invasion.

2) Regulation of Implantation by Uterine-Derived Secreted Factors

RNA-seq showed decreased LIF and COX2 in implantation failure patients, and mouse models clarified their roles. Mice lacking LIF in uterine epithelium (LIF eKO) had pregnancy rates reduced to 1/5 of controls, and complete infertility occurred in mice lacking LIF in both epithelium and stroma (LIF uKO). Both models showed impaired embryo attachment. LIF acts via STAT3-mediated gene activation in uterine epithelium, with minimal effect on embryos. Recombinant LIF administered before attachment rescued embryo attachment in both models, but only LIF eKO mice showed improved litter size. This suggests epithelial LIF is critical for attachment, while stromal LIF supports later embryo development. 3D imaging revealed that normal uteri form an epithelial crypt structure enveloping the embryo, absent in LIF-deficient uteri; rLIF restored this in LIF eKO but not uKO mice. This study was published in *Cell Death Discovery*.

We also studied COX enzymes using uterine-specific COX-2 knockout (COX-2 uKO) and COX-1/COX-2 double knockout (DKO) mice. COX-2 uKO mice had ~25% litter size of controls; DKO mice were infertile. COX-2 uKO uteri were normal before embryo attachment but showed defective decidualization and embryo invasion. DKO uteri had reduced prostaglandin (PG) production, abnormal embryo positioning, and attachment failure. LC-MS/MS identified decreased PG species, and PGE2/PGD2 supplementation restored decidualization in COX-2 uKO uteri. Published in *JCI Insight*.

Plan 2: AI-Based Automated Diagnosis of Chronic Endometritis (CE) Using Hysteroscopic Images

Chronic endometritis (CE), often linked to infertility, requires expert diagnosis via biopsy or hysteroscopy. We developed an AI system for automatic CE diagnosis from hysteroscopic videos. Using 81 patient videos (50 normal, 31 CE), supervised learning achieved 82.5% sensitivity and 77.7% specificity based on 5-second video frames. Cross-validation and ensemble learning improved robustness despite limited data. We plan to expand the dataset and refine the system for clinical use.

Plan 3: AI-Based Embryo Quality Assessment Using Time-Lapse Imaging Integrated with Clinical Data

We developed a pregnancy prediction AI model combining time-lapse embryo images and clinical data. A model using 30 static embryo images achieved AUC 0.637; adding patient age improved AUC to 0.662 ($P=0.0431$). Incorporating clinical data from implantation failure clinics (CD138 cell counts, hysteroscopy, MRI, pregnancy outcomes), we built an algorithm considering embryo, uterine, and maternal factors. In 160 patients including cine-MRI data, the combined AI model reached 0.73 accuracy, 0.91 recall, and 0.72 AUC. We also quantified and visualized uterine peristalsis dynamics, enhancing functional assessment.