

学位論文（博士）

Differential gene expression in decidualized human
endometrial stromal cells induced by different stimuli

（異なる刺激方法により誘導された培養子宮内膜脱落膜化細胞における遺伝子発現の違い及び *in vivo* における脱落膜化細胞との比較）

氏名 田中 結美子

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 産科婦人科学講座

令和6年6月

目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	5
【結果】	8
【考察】	16
【結語】	18
【謝辞】	19
【参考文献】	19

【要旨】

ヒト子宮内膜間質細胞（ESCs）の脱落膜化は、胚の着床や妊娠の成立に不可欠である。この脱落膜化という現象は、*in vitro* において、初代培養の ESCs に cAMP、メドロキシプロゲステロンアセテート（MPA）やエストラジオール（E2）などの脱落膜化刺激を加えて培養することで誘導することが可能である。しかし、脱落膜化の誘導には多くの刺激プロトコールが存在する。これまで異なる刺激方法により誘導された脱落膜化細胞にどのような違いがあるのかは不明であった。我々は異なる刺激方法（MPA、E2+MPA、cAMP、cAMP+MPA）により誘導した脱落膜化細胞の網羅的遺伝子解析を行い、そのトランスクリプトームや細胞機能の違いなどを比較した。さらに、既報の *in vivo* におけるヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンスデータを用いることで、*in vitro* の刺激方法の中でどの方法が最も *in vivo* に近い刺激であるのかということについて検討した。*in vitro* での刺激方法ごとに得られた脱落膜化細胞について、RNA シーケンスを用いて発現変化遺伝子（DEGs）を同定し、さらに Gene Ontology 解析により細胞機能の解析を行った。cAMP を用いた刺激（cAMP、cAMP+MPA）では、cAMP を用いない刺激（MPA、E2+MPA）に比べ 2 倍多く遺伝子発現が変化していた。細胞機能変化に関しては、cAMP を用いた刺激では、「angiogenesis」、「inflammation」、「immune system」、「embryo implantation」などが、MPA を用いた刺激（MPA、E2+MPA、cAMP+MPA）では「insulin signaling」がそれぞれ特異的な機能変化として確認された。*in vivo* 脱落膜化に関しては、過去に報告されたヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンスデータを用いて分析を行った。これにより明らかとなった *in vivo* 脱落膜化での細胞機能変化は、*in vitro* 脱落膜化のなかでは、cAMP+MPA 刺激と最も近いものであった。*in vitro* 脱落膜化において、異なる刺激方法により得られた脱落膜化細胞のトランスクリプトームや細胞機能変化は異なっていたが、cAMP+MPA 刺激が最も *in vivo* 脱落膜化に近い刺激方法である可能性が示された。

【研究の背景と目的】

子宮内膜への胚の着床は妊娠の成立において不可欠であり、胚とそれを受容する子宮内膜間ではさまざまな情報伝達が行われている (1)。月経周期の中で、ヒト子宮内膜間質細胞 (Endometrial stromal cells; ESCs) は、エストロゲンやプロゲステロンの作用により、その形態や機能が周期的に変化する (2-5)。増殖期において、エストロゲンにより刺激を受けた ESCs は、分泌期にはプロゲステロンの作用により、その形態だけではなく、細胞機能についても大きく変化する。分泌期における子宮内膜間質細胞の変化は脱落膜化と呼ばれる。脱落膜化は胚の着床や妊娠の成立に非常に重要なプロセスであり、脱落膜化不全は着床不全や流産、不妊症の原因となるといわれている (6-8)。

ヒトの生体内における *in vivo* での脱落膜化を直接的に研究することは倫理的な観点から難しい。よって、これまで脱落膜化についての研究は *in vitro* での実験が主体として行われてきた。*in vitro* 脱落膜化は初代培養の ESCs にメドロキシプロゲステロンアセテート (MPA) を加えて 14 日間培養することで誘導される (2, 9)。また、生体内では黄体からはプロゲステロンに加えエストロゲンも分泌されることを考慮し、MPA にエストラジオール (E2) を加える方法 (2, 11-16) でも脱落膜化を誘導することができる。また、cAMP はプロゲステロンのセカンドメッセンジャーであり、MPA に比べて 4 日間という短い期間で脱落膜化を誘導することができるため、MPA の代わりに広く使用されている (2, 10)。さらに近年ではより強く脱落膜化を誘導できる cAMP と MPA を組み合わせた方法 (1) も多く用いられている。このように、*in vitro* における脱落膜化の誘導には様々な方法が存在することが知られている。

脱落膜化は、このような *in vitro* 脱落膜化モデルを用いた研究により、さまざまな細胞内シグナル伝達、それらの関連分子や転写因子など、多くの因子により調節されているということがわかってきた (9, 17-22)。しかし、これらの結果について注意すべきは、脱落膜化の刺激方法が研究により異なっている、という点である。Insulin like growth factor binding protein 1 (IGFBP1) と prolactin (PRL) は ESCs の脱落膜化において特異的に誘導されるため (1,2,10,20,21,23,24)、*in vitro* 脱落膜

化のマーカー遺伝子として用いられている。いずれの脱落膜化誘導方法においても、これらのマーカー遺伝子の発現誘導は確認できるが、IGFBP1 や PRL 以外の遺伝子発現パターンについては刺激方法により異なるという報告がある (19,25,26)。このことから、我々は、異なる脱落膜化刺激により誘導された脱落膜細胞はすべて同じ脱落膜化とは言えないのではないかと、もし異なるのであればどのような違いがあるのかを明らかにしたいと考えた。

さらに、*in vitro* 脱落膜化が *in vivo* 脱落膜化を再現できているかどうかということは非常に重要である。これまで、ヒト子宮内膜を用いたトランスクリプトーム解析により、増殖期と分泌期後期の発現変化遺伝子を比較した報告はあるが (27,28)、ヒト子宮内膜はもともと多様な細胞で構成されており、これらの解析では ESCs のみのトランスクリプトーム変化を特定することはできなかった。そのため、*in vivo* 脱落膜化において ESCs でどのような遺伝子発現変化や細胞機能変化が起こっているのかということについては不明であった。しかし近年、シングルセル RNA シーケンスにより、ヒト子宮内膜における 1 細胞ごとのトランスクリプトームが明らかとなった (29)。これにより、*in vivo* 脱落膜化での ESCs のみのトランスクリプトーム変化を調べることが可能となった。*in vivo* および *in vitro* 脱落膜化におけるトランスクリプトームの変化を比較することで、最も *in vivo* 脱落膜化に近い刺激方法を明らかにできると考えた。

本研究では、様々な刺激方法 (MPA、E2+MPA、cAMP、cAMP+MPA) で誘導された脱落膜化 ESCs (decidualized ESCs; dESCs) の遺伝子発現や細胞機能について比較検討し、さらに、ヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンスデータを用いることで、*in vivo* 脱落膜化に最も近い脱落膜化刺激方法は何かということを確認した。

【方法】

1. 試薬

DMEM、L-グルタミン、1x トリプシン-EDTA、ストレプトマイシン、ペニシリンは Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。ウシ胎児血清(FBS)は Biological Industries Ltd.(Beit Haemek, Israel) から購入した。コラゲナーゼ、ジブチル-cAMP(db-cAMP)、エストラジオール (E2)、メドロキシプロゲステロンアセテート (MPA) は Sigma Chemical Co Ltd. (St Louis, MO, USA) から購入した。

2. ESC の分離

ヒト子宮内膜組織は、子宮筋腫の手術を受けた 40～45 歳の月経周期が正常な患者から子宮摘出時に採取した。手術時にホルモン療法を受けていない患者を対象とした。すべての患者からインフォームドコンセントを得るとともに、山口大学医学部附属病院の施設審査委員会からの承認を得ている(H26-102-7)。すべての実験はヘルシンキ宣言に従って行われた。ESC の分離に使用した子宮内膜サンプルは、組織学的に増殖期後期であると診断されたものである (57)。組織サンプルは、4 mM グルタミン、50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、50 IU/ml ペニシリンを含む Phenol Red-free DMEM で洗浄し、 $<1\text{mm}^3$ の断片に細切した。ESC は、過去の報告通り単離した (58)。細胞を 75cm^2 組織培養フラスコに 10^5 細胞/ cm^2 となるように、グルタミン、抗生物質、10% dextran-coated charcoal-stripped FBS を含む Phenol Red-free DMEM で 37°C 、95% O_2 、5% CO_2 の環境下で培養した。増殖した細胞を 1x トリプシン-EDTA で処理し、各実験用に再培養した。

3. in vitro 脱落膜化誘導

脱落膜化誘導を行うために、ESCs を cAMP (0.5mM) で 4 日間もしくは、MPA (10^{-6}M) で 14 日間培養することで脱落膜化を誘導した。MPA と cAMP は主な脱落膜化誘導物質であり、いずれの方法も基本的な脱落膜化誘導方法である (1)。これらの基本的なプロトコールの他に、14 日間の MPA 刺激に E2 (10^{-8}M) を加える方法 (E2+MPA)、4 日間の cAMP 刺激に MPA を加える方法 (cAMP+MPA) で脱落膜化を誘導した。これらの組み合わせも同様に広く用いられてきた刺激方法である。我々は、4 つの脱落膜化刺激プロトコール (cAMP、cAMP+MPA、MPA、E2+MPA) を用いて、脱落膜化を誘導した。培養の終了時点が 4 日間プロトコール (cAMP、cAMP+MPA) と 14 日間プロトコール (MPA、E2+MPA) で異なるため、それぞれ 4 日間もしくは 14 日間、脱落膜化刺激を行わずに培養するコントロール ESCs (non-dESCs) を用意した。脱落膜化刺激の濃度と培養期間については我々のこれまでの報告に基づくものとし (9, 11,50)、メディアウム交換は 2 日毎に施行した。

4. RNA シーケンスによる全トランスクリプトーム解析

子宮筋腫に対し手術を施行された1人の患者から採取した ESCs を以下の6群に振り分けた。(コントロール (4日間刺激群)、cAMP、cAMP+MPA、コントロール (14日刺激群)、MPA、E2+MPA)。RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)を使用し、培養細胞から total RNA の抽出を行った。RNA シーケンスは過去の報告と同じ方法で行った (59-61)。遺伝子発現値は「transcripts per million」(TPM) として、以前の報告と同様に算出した (62)。TPM の値に1を加えて計算し、それぞれのコントロールと比較して、遺伝子発現量が2倍以上異なるものを *in vitro* 脱落膜化における発現上昇または発現低下遺伝子と定義した。

5. シングルセル RNA シーケンスデータの *in silico* 解析

過去に報告されたヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンスデータ (GEO accession: GSE111976) を使用し、*in vivo* 脱落膜化における ESCs のトランスクリプトームデータを解析した (29)。使用した文献の中では、細胞を個別のグループに分けるため、「t-distributed stochastic neighbor embedding」(t-SNE) による次元削減が行われていた。マーカー遺伝子の発現変化をもとに、ESCs の細胞群を同定し、解析に使用した。我々は Seurat (version 4.0.3) を用いてトランスクリプトーム解析を行った。4人の患者から得られた増殖期後期 (月経周期の9日目~11日目) における ESCs 189 細胞と、5人の患者から得られた分泌期後期 (月経周期の24日目~27日目) における ESCs 137 細胞のトランスクリプトームを比較した。分泌期後期の細胞で脱落膜化マーカーの一つである FOXO1 (1,63) が発現していることを確認した。各遺伝子の発現レベルを決定するために、増殖期および分泌期のそれぞれすべての細胞の平均 TPM を計算し、得られた値を遺伝子発現量とした。TPM の値に1を加えて計算し、分泌期後期の遺伝子発現量が、増殖期後期と比較して2倍以上異なるものを *in vivo* 脱落膜化における発現上昇または発現低下遺伝子と定義した。

6. リアルタイム RT-PCR

RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)を使用し、培養細胞から total RNA の抽出を行った。逆転写反応とリアルタイム RT-PCR は過去の報告と同じ方法で行った (58)。内部標準として MRPL19 を使用した。

7. バイオインフォマティクス

階層的クラスタリング解析は R パッケージ「Cluster」(version 2.1.4) を用いた (66)。DAVID Bioinformatics Resources (version 6.8) (<https://david.ncifcrf.gov/>) を使用し、発現変化遺伝子からどのような GO term に検出されるかを調べた (67)。P 値 < 0.01 を有意とし、得られた GO term を「reduce and visualize gene ontology (REVIGO)」により要約した (30,31,68)。

8. 統計解析

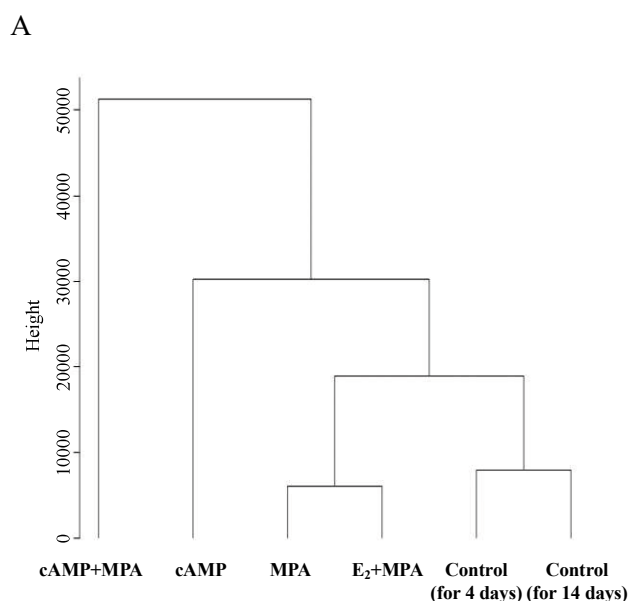
統計学的有意差の検討において、Tukey-Kramer 検定を用いて群間比較を行った。統計解析には R (version 4.0.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用した。P 値 < 0.05 を有意差ありとした。

【結果】

1. 脱落膜化刺激ごとの発現変化遺伝子

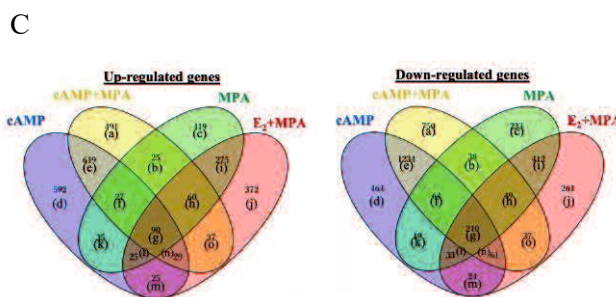
それぞれの刺激を用いて *in vitro* で誘導した脱落膜化の遺伝子発現を RNA シーケンスにより調べた。RNA シーケンスに用いる dESCs サンプルにおいては、脱落膜化マーカーである IGFBP-1、PRL 発現誘導が起こっていることを確認した。4 つの脱落膜化刺激 (MPA、E2+MPA、cAMP、cAMP+MPA) により誘導された dESCs 群と 2 つのコントロール群 (非刺激群) のトランスクリプトームについて、階層的クラスタリング解析を行い比較した (図 1A)。いずれの方法で誘導された dESCs 群もコントロール群とは異なるクラスターに分類された。cAMP も MPA も単独で脱落膜化を誘導することが可能であり、これらは異なるクラスターに分類された。E2+MPA は MPA と同じクラスターであったが、cAMP+MPA は cAMP とは別のクラスターであった。cAMP は MPA や E2+MPA よりもコントロール群から遠くに位置しており、cAMP+MPA が最もコントロール群から離れたクラスターに分類された。これらの結果から、MPA 刺激により誘導される遺伝子発現プロファイルは cAMP により誘導されるものとは大きく異なっており、MPA 刺激と比較して cAMP 刺激はより顕著な脱落膜変化を引き起こすことが示された。また、MPA に E2 を加えても遺伝子発現

はほとんど変化しなかったが、cAMP に MPA を添加すると、遺伝子発現は大きく変化した。次に、脱落膜化刺激方法毎に得られたトランスクリプトームについてコントロール群との比較を行い、dESCs の発現変化遺伝子を同定した。各脱落膜化刺激による発現上昇/低下遺伝子数は以下のとおりであった。cAMP: 1442/2109、cAMP+MPA: 1378/2443、MPA: 956/1058、E₂+MPA: 913/1087 (図 1B)。発現変化遺伝子数を比較すると、cAMP を使用しない刺激方法 (MPA、E₂+MPA) に比べ cAMP を用いた刺激方法 (cAMP、cAMP+MPA) の方が、2 倍程度多くの遺伝子が増加していた。4 つの刺激群における発現変化遺伝子を比較したところ、発現上昇/低下遺伝子のうちすべての刺激方法に共通する遺伝子数はそれぞれ 90/210 遺伝子と少なかった (図 1C)。cAMP 刺激と MPA 刺激を比較すると共通して発現が増加する遺伝子数は 177、低下する遺伝子は 326 遺伝子であった (図 1D)。cAMP に MPA を添加すると、cAMP 単独で誘導されるものとは異なる多くの発現変化遺伝子がみられた。MPA 刺激と cAMP+MPA 刺激を比較すると (図 1D)、MPA に cAMP を添加することで MPA 単独に比べ多くの異なる発現変化遺伝子がえられることが明らかとなった。MPA 刺激と E₂+MPA 刺激を比較すると (図 1D)、E₂ 添加により MPA 単独に比べ多くの異なる発現変化遺伝子が得られた。



B

	cAMP	cAMP+MPA	MPA	E ₂ +MPA
Up-regulated genes	1442	1378	956	913
Down-regulated genes	2109	2443	1058	1087
Total	3551	3821	2014	2000



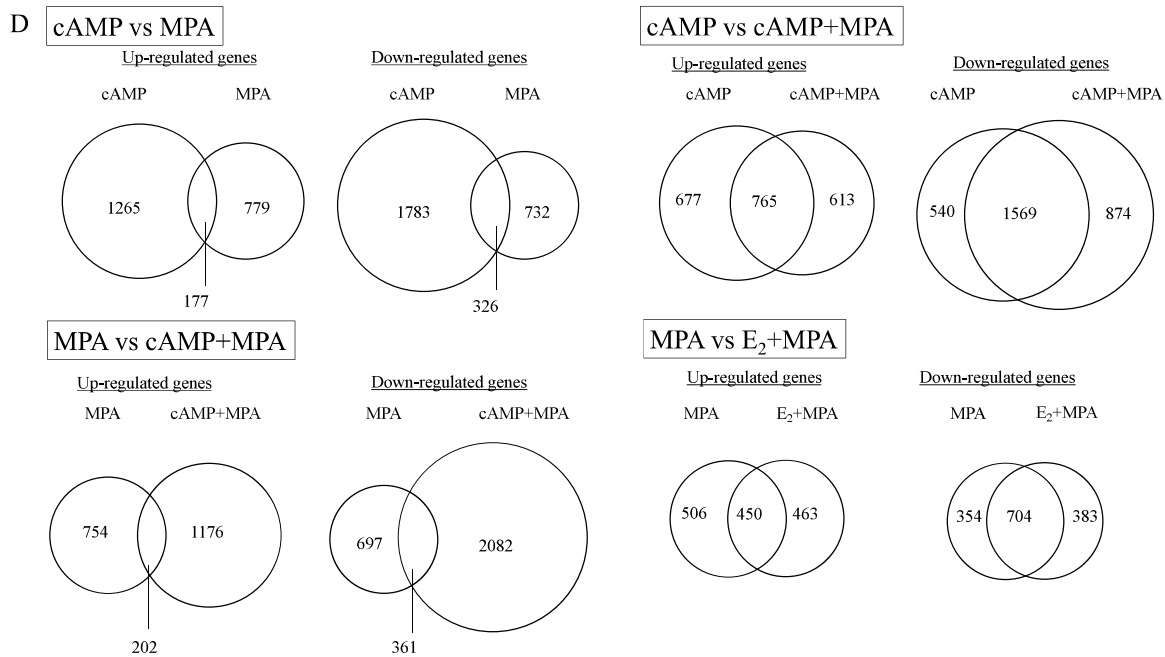


図 1. 異なる脱落膜化刺激による発現変化遺伝子

A. 4つの異なる脱落膜化刺激（cAMP, cAMP+MPA, MPA, E₂+MPA）により誘導された dESC およびコントロール群のトランスクリプトームに対し、階層クラスター解析を行った。遺伝子発現パターンの距離を高さとして示した。B. 4つの刺激方法により誘導された dESC の発現変化遺伝子数。C. 4つの脱落膜化刺激により誘導された発現変化遺伝子の 4 集合ベン図。D. 脱落膜化刺激毎に発現が上昇もしくは低下する遺伝子をそれぞれ比較したベン図。

脱落膜化刺激の違いにより遺伝子発現が異なることから、dESC の細胞機能変化も刺激により異なるのではないかと考えた。このことについて検討するため、発現が上昇・低下した遺伝子について Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、多くの GO term が検出された。これらを、既報の方法と同様に、removing redundancy using reduce and visualize gene ontology (REVIGO) を用いて GO term の要約を行った (30, 31)。そして、要約された GO term を細胞機能ごとにいくつかのグループに分類した (図 2)。「Gene ratio」は全遺伝子のうち各 term に含まれる遺伝子の割合であり、円のサイズで示し、P 値は色の濃さで示した。いずれの刺激方法においても、発現が上昇もしくは低下した遺伝子の GO term から、「cell morphology」、「signal transduction」、「cell proliferation」、

「metabolism」、「differentiation」という細胞機能変化が同定された (図 2 のオレンジ色の長方形)。

これらの細胞機能変化は 4つの脱落膜化刺激すべてに共通するものであった。一方で、

「angiogenesis」、「inflammation」、「immune system」、「embryo implantation」に関連する細胞機能変化

は cAMP を用いた刺激 (cAMP、cAMP+MPA) で発現が上昇した遺伝子により得られるものであり (図 2 の青色の長方形)、cAMP を用いていない刺激 (MPA、E2+MPA) では確認できなかった。

「insulin signaling」については、MPA を用いた刺激 (MPA、E2+MPA、cAMP+MPA) により発現が上昇する遺伝子の細胞機能変化であり、MPA を用いない刺激 (cAMP) では確認されなかった。これらの細胞機能変化は cAMP もしくは MPA を用いた刺激に特異的な細胞機能変化であると考えられた。

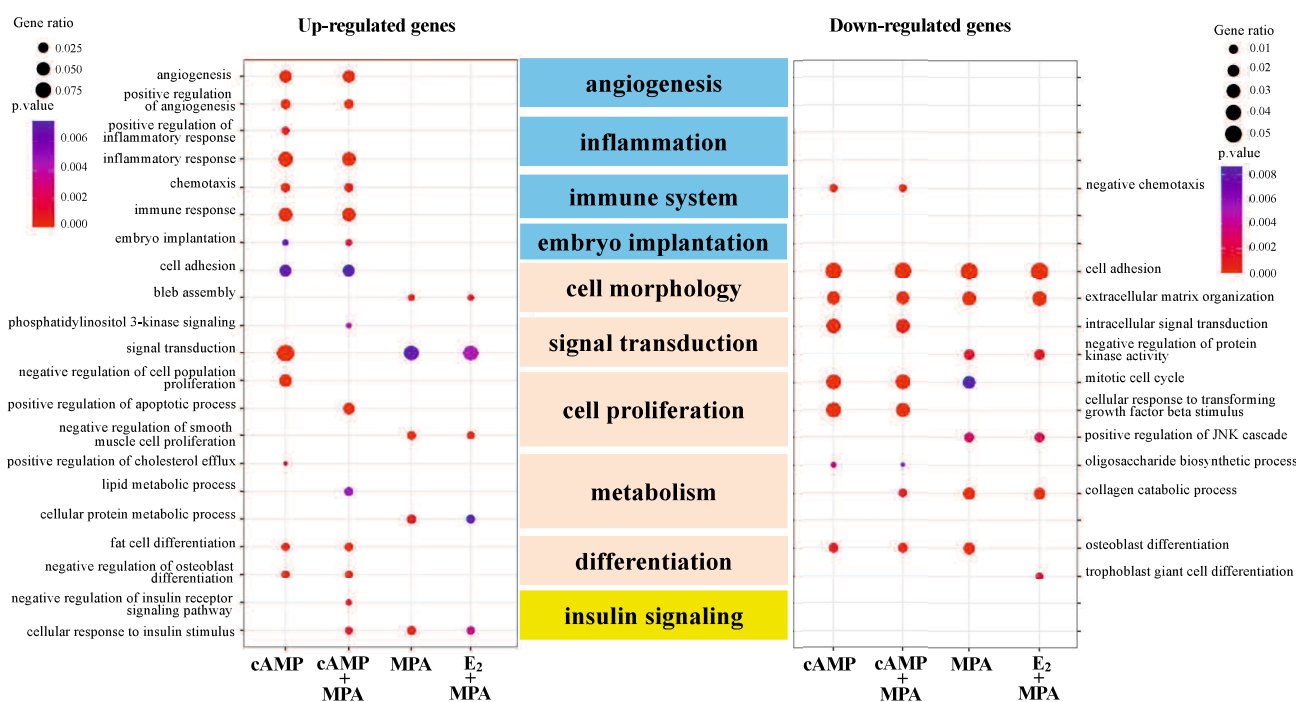


図 2. 異なる刺激方法により誘導された dESCs の細胞機能変化の違い

各脱落膜化刺激により得られた発現上昇もしくは低下遺伝子に対し、GO-REVIGO 解析を行った。得られた GO term を細胞機能変化毎に分類した (中央部分)。共通する細胞機能はオレンジ色の長方形で示した。cAMP を用いた刺激による細胞機能は青色で、MPA を用いた刺激による細胞機能は黄色で示した。各細胞機能の代表的な GOterm を図の横に示した。全遺伝子数に対する、各 term における遺伝子数の割合を「Gene ratio」とし、円の大きさと示した。各 term の P 値は色で示した。

これらの特異的細胞機能変化に関連する遺伝子について、RNA シーケンスの validation アッセイを施行することとした。GO term に含まれるいくつかの遺伝子を選び、リアルタイム RT-qPCR によりその発現変化を検討した (図 3)。RNA シーケンス解析の結果と一致して、cAMP を用いた刺激

(cAMP、cAMP+MPA) により「angiogenesis」(ANGPT2、VEGFA)、「inflammation」(PTGS2、IL1A)、「immune system」(CXCL12、CD40)、「embryo implantation」(IL1B)に関連する遺伝子の発現上昇が示されたが、cAMP が含まれない刺激 (MPA、E2+MPA) では遺伝子発現が上昇しなかった。一方で、「insulin signaling」に関連する遺伝子 (IRS2) については MPA を用いた刺激 (MPA、E2+MPA、cAMP+MPA) で発現が上昇したが、MPA を用いない刺激 (cAMP) では発現は上昇しなかった。

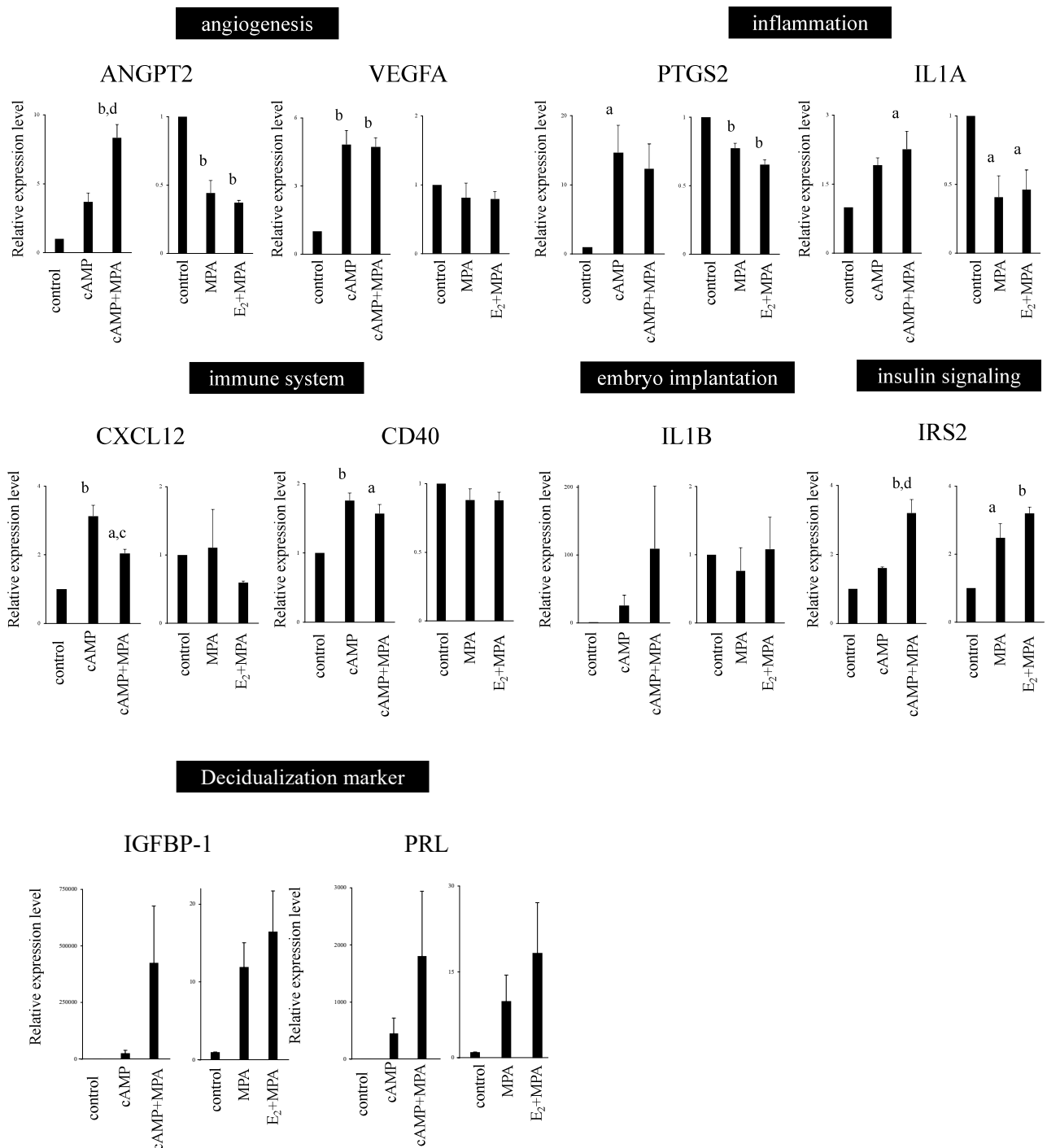


図 3. リアルタイム RT-PCR による RNA シーケンスデータの検証

ESCs に 4 日間の脱落膜化刺激 (cAMP もしくは cAMP+MPA)、14 日間の脱落膜化刺激 (MPA もしくは E2+MPA) を加えて培養した。また、それぞれ同じ日数の脱落膜化刺激を加えないコントロール ESCs の培養も行った。特異的な細胞機能変化に関連する遺伝子を 8 遺伝子選択し、これらの遺伝子および脱落膜化マーカー (IGFBP-1 および PRL) について、リアルタイム RT-PCR により mRNA の発現レベルを定量した。内部標準である MRPL19 により値を補正した。各脱落膜化細胞 (cAMP、cAMP+MPA、MPA、E2+MPA) の相対的な mRNA 発現レベルを、対応するコントロールに対する倍率変化を計算した。

2. in vivo 脱落膜化における発現変化遺伝子および細胞機能変化の同定

次に、in vivo 脱落膜化に最も近い脱落膜化刺激はどれかということについて検討した。in vivo 脱落膜化における発現変化遺伝子を同定するため、過去に報告されたヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンスのデータを使用した (29)。脱落膜変化は月経周期の中の分泌期後期に進行するため (2)、増殖後期子宮内膜 (月経周期の 9 日目~11 日目) における ESCs189 細胞のトランスクリプトームと、分泌期後期子宮内膜 (月経周期の 24 日目~27 日目) における ESCs137 細胞のトランスクリプトームを比較し、in vivo 脱落膜化で変化する遺伝子の同定を試みた。in vivo 脱落膜化で発現が上昇あるいは低下した遺伝子はそれぞれ、2579 遺伝子、3768 遺伝子であった。これらの発現変化遺伝子について GO-REVIGO 解析を行い、得られた GO term を in vitro 脱落膜化における解析 (図 2) と同様に、いくつかの細胞機能に分類した (図 4)。in vitro 脱落膜化で 4 つの刺激方法に共通する細胞機能変化 (「cell morphology」、「signal transduction」、「cell proliferation」、

「metabolism」、「differentiation」) は、すべて in vivo 脱落膜化でも確認することができた。同様に、cAMP を用いた刺激により誘導された細胞機能変化である 「angiogenesis」、「inflammation」、

「immune system」については in vivo 脱落膜化でも確認できた。一方で、「embryo implantation」に関連する細胞機能変化は検出されなかった。MPA を用いた刺激により誘導された細胞機能である

「insulin signaling」は in vivo 脱落膜化でも確認された。これらは発現上昇遺伝子による変化であった。このように、in vivo 脱落膜化における dESCs の細胞機能変化は cAMP+MPA 刺激による in vitro 脱落膜化に最も近いものであった (図 2)。

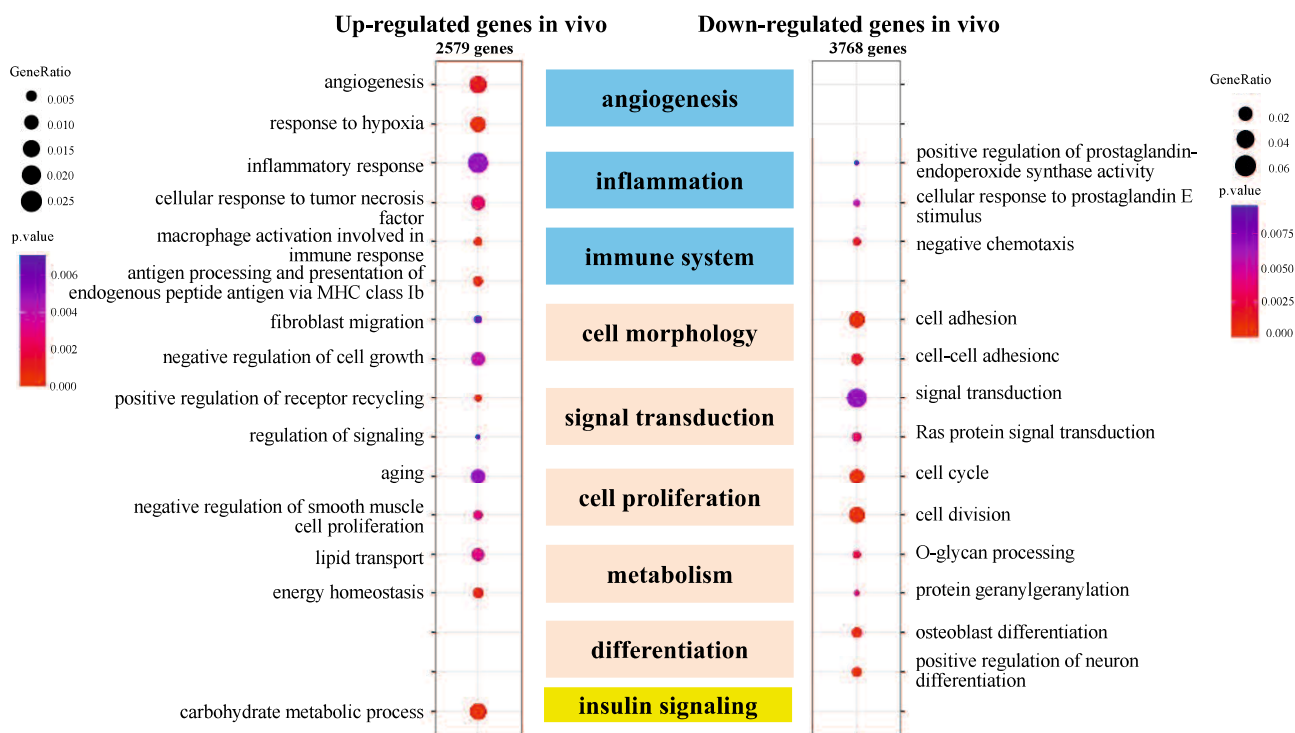


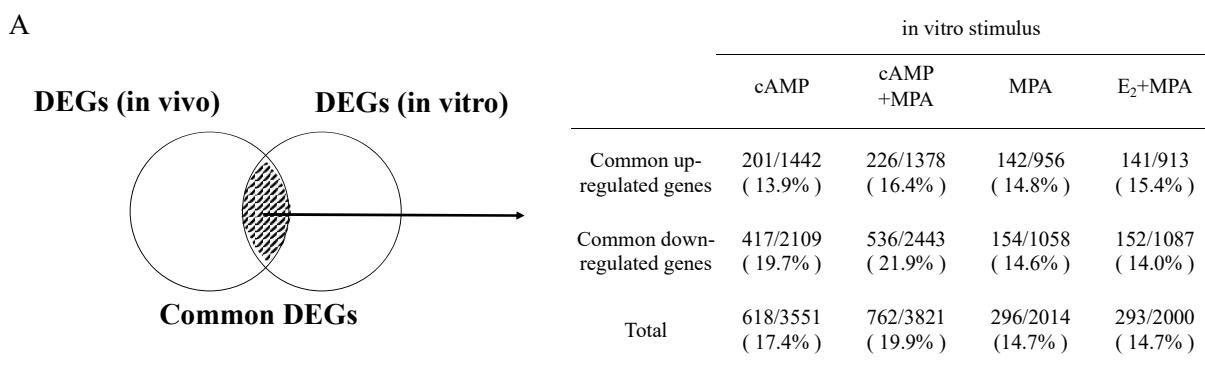
図 4. in vivo 脱落膜化における発現変化遺伝子のもつ細胞機能変化

過去に報告されたヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンスデータから、in vivo 脱落膜化において発現が上昇する遺伝子 2579 遺伝子、低下する遺伝子 3768 遺伝子が同定された。これらの遺伝子に対し、GO-REVIGO 解析を施行した。得られた GO term を細胞機能変化毎に分類した（中央部分）。各細胞機能の代表的な GO term を図の横に示した。全遺伝子数に対する、各 term における遺伝子数の割合を「Gene ratio」とし、円の大ききで示した。各 term の P 値は色で示した。

3. in vivo および in vitro 脱落膜化における発現変化遺伝子の比較

in vivo および in vitro 脱落膜化において共通する発現変化遺伝子数を図 5 に示した。4 つの in vitro 脱落膜化刺激のうち、cAMP+MPA 刺激が最も多くの in vivo 脱落膜化との共通発現変化遺伝子を有していたが（762 遺伝子）、一致率はわずか 19.9%であった（図 5A）。次に、これら cAMP+MPA 刺激と in vivo 脱落膜化に共通する 762 遺伝子が関連する細胞機能変化について調べた（図 5B）。「signal transduction」、「cell proliferation」については、発現上昇・低下のいずれの結果でも確認できた。「angiogenesis」、「immune system」「metabolism」、「insulin signaling」は発現が上昇した遺伝子の細胞機能変化として、「cell morphology」、「differentiation」は発現が低下した遺伝子の細胞機能変化として同定された。「inflammation」は共通する遺伝子の細胞機能変化としては検出され

なかった。以上より、cAMP+MPA 刺激により変化する遺伝子のうち約 20%が in vivo 脱落膜化でも同様に変化していること、また、これらの共通する遺伝子は、in vivo 脱落膜化で誘導される細胞機能変化のうち「inflammation」を除くすべての機能に関与していることがわかった。



B

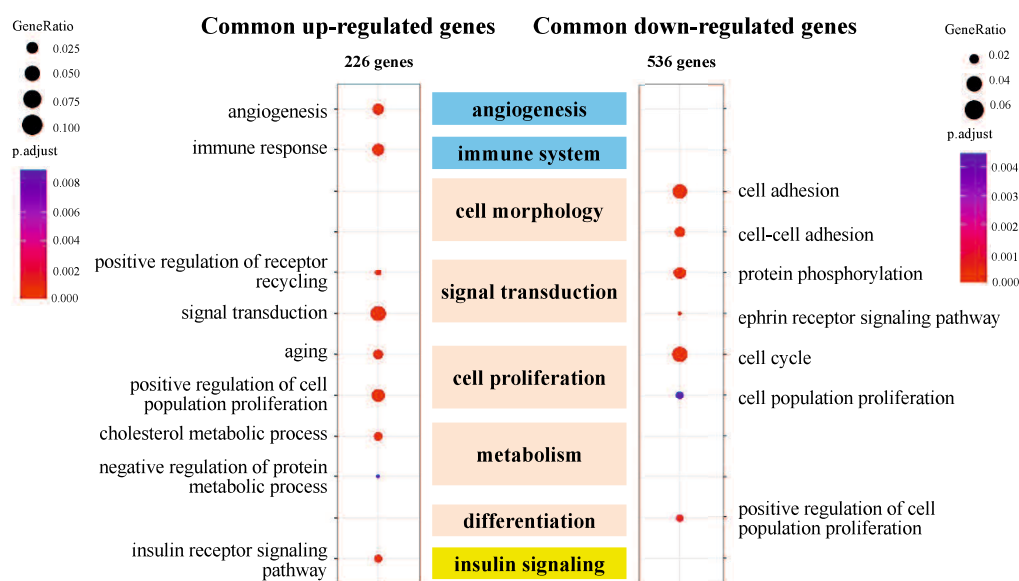


図 5. in vivo 脱落膜化と in vitro 脱落膜化における遺伝子発現変化および細胞機能の比較

A. in vitro 脱落膜化における発現変化遺伝子について in vivo と比較した。それぞれの刺激により変化した遺伝子に対し、共通する遺伝子の割合を%で示した。B. in vivo 脱落膜化と cAMP+MPA 刺激による in vitro 脱落膜化の共通発現変化遺伝子の細胞機能変化。共通する発現上昇遺伝子として 226 遺伝子、低下遺伝子として 536 遺伝子を同定し、これらに対し GO-REVIGO 解析を行った。得られた Got erm を細胞機能変化毎に分類した (中央部分)。各細胞機能の代表的な GO term を図の横に示した。全遺伝子数に対する、各 term における遺伝子数の割合を「Gene ratio」とし、円の大きさを示した。各 term の P 値は色で示した。

【考察】

in vitro の脱落膜化は長くにわたり研究が行われてきたが、脱落膜化誘導に用いられる刺激は研究により異なっており、誘導される遺伝子プロファイルや細胞機能がどのように刺激方法により異なるかについては不明であった。今回我々の研究により、異なる刺激方法により誘導された dESCs の遺伝子発現プロファイルや細胞機能が刺激方法により大きく異なっているということが明らかとなり、in vitro 脱落膜化について論議する際の有益な知見を得ることができたと考える。

異なる刺激方法で誘導された dESCs のトランスクリプトームを解析することで、いずれのプロトコールでも、「cell morphology」、「signal transduction」、「cell proliferation」、「metabolism」、「differentiation」などの脱落膜化で重要とされる細胞機能変化が起きていることが明らかとなった。cAMP 刺激では、MPA や E2+MPA 刺激に比べより多くの遺伝子発現が変化し、細胞機能変化についても「angiogenesis」、「inflammation」、「immune system」、「embryo implantation」などの脱落膜化で重要とされる細胞機能変化をもたらした。cAMP を用いない刺激（MPA、E2+MPA）ではこれらの細胞機能変化は見られなかった。以前にもこれらの細胞機能に関連する遺伝子発現は、MPA 刺激では変化せず、cAMP 刺激により上昇するということが報告されている（5,25,32-37）。

脱落膜化過程において、ESCs にプロゲステロン刺激を加えると、細胞内 cAMP 濃度が上昇するため、cAMP はプロゲステロンのセカンドメッセンジャーであると考えられている（1,9）。ESCs に cAMP を加えて培養することで、細胞内の cAMP 濃度は速やかに上昇し、下流のシグナリング経路を活性化するため（1,14）、cAMP は4日間という短い期間で脱落膜化を誘導することができる。一方で、MPA を用いた（cAMP を用いない）誘導では細胞内の cAMP 濃度が上昇するまでに10日以上かかるため、脱落膜化誘導にはより長い期間が必要となる（9,38）。また cAMP は、MPA に比べ脱落膜化マーカーの遺伝子発現を高度に上昇させることも報告されており（1,9）、プロゲステロンに比べ、cAMP はより強力な脱落膜化誘導刺激であると言える。よって、本研究においても、cAMP 刺激では、MPA や E2+MPA 刺激に比べ明らかに強い遺伝子発現変化と細胞機能変化をもたらしたと考えられる。

興味深いことに、cAMP 単独刺激では「insulin signaling」に関する細胞機能変化は確認できず、MPA を用いた脱落膜化刺激方法でのみみられることが明らかとなった。脱落膜化において起こる

代謝変化の一つとして、グルコース代謝がある (39,40)。我々や他の研究者たちは、E2+MPA 刺激や cAMP+MPA 刺激により、インスリンシグナリング経路に関する遺伝子である、insulin receptor (INSR)、insulin receptor substrate 1 (IRS1)、insulin receptor substrate 2 (INSR2) などの発現が上昇し、細胞内への糖取り込みが促進することを報告している (11,22,24,41-44)。プロゲステロンは、リガンド依存性転写因子として核内受容体に作用することで、遺伝子の転写を制御するため (45)、インスリンシグナリングはプロゲステロン受容体 (PR) を介した経路で制御されており、cAMP の影響を受けない MPA 特有の細胞機能変化であると考えられる。実際に、MPA により活性化した PR は IRS2 のプロモーター領域に結合し、その発現を上昇させ、脱落膜化におけるグルコース取り込みを上昇させる (24,46)。インスリンシグナリングだけでなく、他の遺伝子発現調節に関しても、MPA 特異的な作用が以前に報告されている。Superoxide dismutase 1 (SOD1) は、E2+MPA 刺激により誘導された脱落膜化では発現が上昇するが、cAMP では上昇しない (47)。同様に、脱落膜化に重要な転写因子とされる heart and neural crest derivatives-expressed transcript2 (HAND2) も、cAMP ではなく E2+MPA 刺激で誘導された脱落膜化で発現が上昇することが知られている (48)。これらの報告は、特定の遺伝子発現や細胞機能の中には cAMP ではなく、MPA 刺激により変化するものがある、ということを裏付けるものである。

本研究で、cAMP もしくは MPA 刺激により誘導される細胞機能変化については、すべて cAMP+MPA 刺激で誘導されることが明らかとなった。これは、cAMP+MPA 刺激で活性化する経路は、cAMP と MPA それぞれにより活性化した経路が組み合わさるためであると考えるのが妥当である。しかし、それぞれの経路の活性化に加え、cAMP シグナリングとプロゲステロン/PR シグナリングは互いにクロストークすることが知られている (1,2)。cAMP は脱落膜化において重要な転写因子である signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5)、CCAAT/enhancer binding protein β (CEBP β)、forkhead box protein O1A (FOXO1) などの発現を誘導するが (1,49,50)、これらの因子は PR の DNA 結合を促進し、脱落膜化過程における標的遺伝子の発現を増強する (46,51)。さらに、cAMP は、nuclear corepressor (NCoR) や silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) などのコリプレッサーの結合を阻害したり、steroid receptor coactivator-1(SRC-1)や CREB binding protein (CBP) などのコアクチベーターの結合を促進すること

で、PR の転写制御を増強することが報告されている (52-54)。一方で、プロゲステロン/PR の複合体は脱落膜化に重要な STAT5、CEBPβ、FOXO1 などの転写因子の転写活性を調節することが可能である (49,55,56)。このような相互作用により、cAMP+MPA 刺激では様々な機能を有する脱落膜化が誘導できると考えられる。

これまでの *in vivo* 脱落膜化における発現変化遺伝子の同定には、子宮内膜組織全体を用いたトランスクリプトーム解析が行われてきた。しかし、子宮内膜は多種類の細胞で構成されているため、ESCs 特異的な変化を捉えるのが困難であった。本研究では、過去に報告されたヒト子宮内膜のシングルセル RNA シーケンス解析データを用いることで、初めて *in vivo* における脱落膜化細胞のみの遺伝子発現変化や細胞機能変化を同定することができた。ヒト子宮内膜脱落膜化においては、2579 遺伝子の発現が上昇し、3768 遺伝子の発現低下が示され、「angiogenesis」、「inflammation」、「immune system」、「cell morphology」、「signal transduction」、「cell proliferation」、「metabolism」、「differentiation」、「insulin signaling」などの脱落膜化で重要とされる細胞機能変化がおこっていることも明らかとなった。これらの細胞機能については、*in vitro* 脱落膜化で誘導された細胞機能と近いものであった。細胞機能の中で、「embryo implantation」については *in vitro* 脱落膜化で確認されたものの、*in vivo* ではみられない細胞機能変化であったが、我々がシングルセル RNA シーケンス解析に用いた ESCs のデータは通常着床が終了した後の時期である分泌期後期の子宮内膜に由来するものであることが理由であると考えられた。細胞機能という観点からみると、*in vivo* 脱落膜化に最も近い脱落膜化を誘導できるのは cAMP+MPA 刺激であった。

【結語】

異なる刺激方法により誘導された脱落膜化細胞の遺伝子発現プロファイルや細胞機能変化は大きく異なるものであることが示された。検証されたプロトコールの中では、cAMP+MPA 刺激が最も *in vivo* に近い脱落膜化を再現することが可能であるということが明らかとなった。しかし、*in vitro* 脱落膜化で変化する遺伝子は、*in vivo* とは異なっている遺伝子も多いため、*in vitro* 脱落膜化の研究で得られた結果の解釈には留意する必要がある。今回の結果は、これまでの脱落膜化に関する *in vitro* での研究結果をより深く理解するだけでなく、将来的な脱落膜化研究の計画にも非常に役立つ

ものであると考える。

【謝辞】

当研究における RNA シーケンス解析の協力を頂いた山口大学遺伝子実験施設に謝意を表す。本論文は Scientific Reports, 2024 Apr 14: 7726 の論文の和訳であり、学位論文として投稿することを許可されている。

【参考文献】

- 1 Gellersen, B. & Brosens, J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol.* **178**, 357-372 (2003).
- 2 Gellersen, B. & Brosens, J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev.* **35**, 851-905 (2014).
- 3 Zhu, H., Hou, C. C., Luo, L. F., Hu, Y. J. & Yang, W. X. Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions. *Gene.* **551**, 1-14 (2014).
- 4 Gellersen, B., Brosens, I. A. & Brosens, J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* **25**, 445-453 (2007).
- 5 Murata, H., Tanaka, S. & Okada, H. The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization. *Biomolecules.* **12**, 1275 (2022).
- 6 Salker, M. *et al.* Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* **5**, e10287 (2010).
- 7 Laird, S. M., Tuckerman, E. M. & Li, T. C. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online.* **13**, 13-23 (2006).
- 8 Ticconi, C., Di Simone, N., Campagnolo, L. & Fazleabas, A. Clinical consequences of defective decidualization. *Tissue Cell.* **72**, 101586 (2021).
- 9 Matsuoka, A. *et al.* Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**, E291-299 (2010).
- 10 Tamura, I. *et al.* Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* **153**, 5612-5621 (2012).
- 11 Tamura, I. *et al.* Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* **28**, 1656-1669 (2014).
- 12 Murata, H. *et al.* Transcriptional regulation of LGALS9 by HAND2 and FOXO1 in human

- endometrial stromal cells in women with regular cycles. *Mol Hum Reprod.* **27**, gaab063 (2021).
- 13 Maekawa, R. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis revealed stable DNA methylation status during decidualization in human endometrial stromal cells. *BMC Genomics.* **20**, 324 (2019).
- 14 Tamura, I. *et al.* Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization. *J Biol Chem.* **295**, 4673-4683 (2020).
- 15 Tamura, I. *et al.* Genome-wide analysis of histone modifications that underlie the dynamic changes in gene expression during decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* **29**, gaad019 (2023).
- 16 Kida, N. *et al.* Exposure to cigarette smoke affects endometrial maturation including angiogenesis and decidualization. *Reprod Med Biol.* **20**, 108-118 (2021).
- 17 Wang, W., Taylor, R. N., Bagchi, I. C. & Bagchi, M. K. Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBPbeta involves cyclin E-cdk2 and STAT3. *Mol Endocrinol.* **26**, 2016-2030 (2012).
- 18 Aghajanova, L. *et al.* The protein kinase A pathway-regulated transcriptome of endometrial stromal fibroblasts reveals compromised differentiation and persistent proliferative potential in endometriosis. *Endocrinology.* **151**, 1341-1355 (2010).
- 19 Popovici, R. M., Kao, L. C. & Giudice, L. C. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology.* **141**, 3510-3513 (2000).
- 20 Tamura, I. *et al.* Importance of C/EBPbeta binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* **155**, 275-286 (2014).
- 21 Tamura, I. *et al.* Novel function of a transcription factor WT1 in regulating decidualization in human endometrial stromal cells and its molecular mechanism. *Endocrinology.* **158**, 3696-3707 (2017).
- 22 Jozaki, K. *et al.* Glucose regulates the histone acetylation of gene promoters in decidualizing stromal cells. *Reproduction.* **157**, 457-464 (2019).
- 23 Tamura, I. *et al.* The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization. *J Biol Chem.* **293**, 5270-5280 (2018).
- 24 Neff, A. M., Yu, J., Taylor, R. N., Bagchi, I. C. & Bagchi, M. K. Insulin Signaling Via Progesterone-Regulated Insulin Receptor Substrate 2 is Critical for Human Uterine Decidualization. *Endocrinology.* **161**, bpz021 (2020).
- 25 Murata, H. *et al.* Progesterin-induced heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 inhibits angiopoietin 2 via fibroblast growth factor 9 in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol.* **19**, 14-21 (2019).
- 26 Cho, H. *et al.* Progesterin-induced heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 is associated with fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril.* **99**, 248-255 e242 (2013).
- 27 Talbi, S. *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases

- and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. **147**, 1097-1121 (2006).
- 28 Ponnampalam, A. P., Weston, G. C., Trajstman, A. C., Susil, B. & Rogers, P. A. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod*. **10**, 879-893 (2004).
- 29 Wang, W. *et al.* Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle. *Nat Med*. **26**, 1644-1653 (2020).
- 30 Shirafuta, Y. *et al.* Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice. *Endocrinology*. **162**, bqab128 (2021).
- 31 Maekawa, R. *et al.* Different DNA methylome, transcriptome and histological features in uterine fibroids with and without MED12 mutations. *Sci Rep*. **12**, 8912 (2022).
- 32 Okada, H. *et al.* Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. *J Obstet Gynaecol Res*. **40**, 1180-1187 (2014).
- 33 Tsuzuki, T. *et al.* Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **168**, 95-101 (2013).
- 34 Matsui, N., Kawano, Y., Nakamura, S. & Miyakawa, I. Changes in vascular endothelial growth factor production associated with decidualization by human endometrial stromal cells in vitro. *Acta Obstet Gynecol Scand*. **83**, 138-143 (2004).
- 35 Yu, J. *et al.* Human Endometrial Stromal Cell Differentiation is Stimulated by PPARbeta/delta Activation: New Targets for Infertility? *J Clin Endocrinol Metab*. **105**, 2983-2995 (2020).
- 36 Tamura, M. *et al.* Interleukin-1beta elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. *J Clin Endocrinol Metab*. **87**, 3263-3273 (2002).
- 37 Zhao, D., Lebovic, D. I. & Taylor, R. N. Long-term progestin treatment inhibits RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) gene expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. **87**, 2514-2519 (2002).
- 38 Brar, A. K., Frank, G. R., Kessler, C. A., Cedars, M. I. & Handwerger, S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine*. **6**, 301-307 (1997).
- 39 Dean, M. Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy. *Biol Reprod*. **101**, 297-305 (2019).
- 40 Tamura, I. *et al.* Glucose and lipid metabolisms in human endometrial stromal cells during decidualization. *Endocr J*. **70**, 465-472 (2023).
- 41 Tamura, I. *et al.* The essential glucose transporter GLUT1 is epigenetically upregulated by C/EBPbeta and WT1 during decidualization of the endometrium. *J Biol Chem*. 101150 (2021).
- 42 Frolova, A. *et al.* Facilitative glucose transporter type 1 is differentially regulated by progesterone and estrogen in murine and human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. **150**, 1512-1520 (2009).
- 43 Frolova, A. I. & Moley, K. H. Quantitative analysis of glucose transporter mRNAs in endometrial

- stromal cells reveals critical role of GLUT1 in uterine receptivity. *Endocrinology*. **152**, 2123-2128 (2011).
- 44 Thirone, A. C., Huang, C. & Klip, A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab*. **17**, 72-78 (2006).
- 45 Ng, S. W. *et al.* Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *Int J Mol Sci*. **21**, 4092 (2020).
- 46 Kaya, H. S. *et al.* Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. *Mol Endocrinol*. **29**, 882-895 (2015).
- 47 Sugino, N., Karube-Harada, A., Sakata, A., Takiguchi, S. & Kato, H. Different mechanisms for the induction of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod*. **17**, 1709-1714 (2002).
- 48 Shindoh, H., Okada, H., Tsuzuki, T., Nishigaki, A. & Kanzaki, H. Requirement of heart and neural crest derivatives-expressed transcript 2 during decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. *Fertil Steril*. **101**, 1781-1790 e1781-1785 (2014).
- 49 Takano, M. *et al.* Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. **21**, 2334-2349 (2007).
- 50 Tamura, I. *et al.* Transcription factor C/EBPbeta induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Cell Endocrinol*. **520**, 111085 (2021).
- 51 Vasquez, Y. M. *et al.* FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization. *Mol Endocrinol*. **29**, 421-433 (2015).
- 52 Rowan, B. G., Garrison, N., Weigel, N. L. & O'Malley, B. W. 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol*. **20**, 8720-8730 (2000).
- 53 Rowan, B. G., Weigel, N. L. & O'Malley, B. W. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. **275**, 4475-4483 (2000).
- 54 Wagner, B. L., Norris, J. D., Knotts, T. A., Weigel, N. L. & McDonnell, D. P. The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol Cell Biol*. **18**, 1369-1378 (1998).
- 55 Lee, J. H. *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) plays a critical role in implantation via progesterone receptor in uterus. *FASEB J*. **27**, 2553-2563 (2013).
- 56 Christian, M., Pohnke, Y., Kempf, R., Gellersen, B. & Brosens, J. J. Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms: promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. **16**, 141-154 (2002).

- 57 Noyes, R. W., Hertig, A. T. & Rock, J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* **122**, 262-263 (1975).
- 58 Tamura, I. *et al.* Differential Effects of Progesterone on COX-2 and Mn-SOD Expressions Are Associated with Histone Acetylation Status of the Promoter Region in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **96**, E1073-1082 (2011).
- 59 Takagi, H. *et al.* Transcriptional coactivator PGC-1alpha contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBPbeta and p300. *J Biol Chem.* **298**, 101874 (2022).
- 60 Watanabe, K. *et al.* A novel somatic mutation of SIN3A detected in breast cancer by whole-exome sequencing enhances cell proliferation through ERalpha expression. *Sci Rep.* **8**, 16000 (2018).
- 61 Tamura, I. *et al.* Effects of Melatonin on the Transcriptome of Human Granulosa Cells, Fertilization and Blastocyst Formation. *Int J Mol Sci.* **23**, 6731 (2022).
- 62 Li, B., Ruotti, V., Stewart, R. M., Thomson, J. A. & Dewey, C. N. RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty. *Bioinformatics.* **26**, 493-500 (2010).
- 63 Adiguzel, D. & Celik-Ozenci, C. FoxO1 is a cell-specific core transcription factor for endometrial remodeling and homeostasis during menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod Update.* **27**, 570-583 (2021).
- 64 Ayakannu, T. *et al.* Validation of endogenous control reference genes for normalizing gene expression studies in endometrial carcinoma. *Mol Hum Reprod.* **21**, 723-735 (2015).
- 65 Ham, S., Harrison, C., Southwick, G. & Temple-Smith, P. Selection of internal control genes for analysis of gene expression in normal and diseased human dermal fibroblasts using quantitative real-time PCR. *Exp Dermatol.* **25**, 911-914 (2016).
- 66 Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. & Hornik, K. cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.1.4 — For new features, see the 'Changelog' file (in the package source), <https://CRAN.R-project.org/package=cluster>. (2022).
- 67 Huang, D. W. *et al.* DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **35**, W169-175 (2007).
- 68 Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. & Smuc, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* **6**, e21800 (2011).