

ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査

的確な胚移植による着床率の改善に向けて

要点

- 胚移植の時期と着床の窓（子宮内膜が受精卵を受け入れられる時期や時間には個人差があります）の時期がずれていると、着床不全に至る可能性があります。
- ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査は患者様一人一人に合った胚移植の時期を定めることで、着床が成功する可能性を高めます。
- ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査はゲノム検査です。
 - » 感度と精度が高い検査です。
 - » 臨床的にも科学的にも確認された遺伝子発現プロファイルに基づいています。
 - » 非劣性試験で従来の検査に対して非劣性が示されております。
 - » 高度な統計学的モデル及び最適化された解析により、客観性の高い検査結果をご報告いたします。
 - » 検査の結果により、患者様それぞれに合った胚移植の指針が得られます。
- 反復着床不全が認められる患者様に推奨いたします。

はじめに

子宮内膜では月経周期の間、組織の再構築を繰り返し、増殖期から分泌期へと移行しており、子宮内膜は、分泌期中期の短い期間に胚の着床を最も受け入れやすくなっています。この期間は着床の窓（WOI: Window of Implantation）と呼ばれ、自然な月経周期では19～21日目に認められます¹。月経周期の他の期間では、子宮内膜は受精卵を受け入れる状態になっていません²。このため着床が成功するには、着床に適した状態にある胚と胚を受け入れられる子宮内膜の存在が重要です。この2つの要因が同時にそろっていることが必要です³。着床可能な胚と子宮内膜が胚を受け入れられる時期がそろって

いないと、反復着床不全（RIF: Recurrent Implantation Failure）の一因となります。したがって、生殖補助医療の効果を最大限に引き出すには、子宮内膜が胚を受け入れられる時期を正確に特定し、予測することが不可欠です。実際に、胚移植の時期を最適化することで妊娠率が有意に改善することが複数の試験で示されており、現在臨床で受け入れられている子宮内膜着床能検査を受けたRIF患者様で最大73%まで改善しています⁴。

子宮内膜受容期検査の歴史

子宮内膜の受容期に対しては数十年にわたり研究されており⁵、当初は組織学的解析により子宮内膜受容期を評価する子宮内膜日付診が行われていましたが、この方法では正確さに限界があることがわかってきました⁶。体内の多くの組織にも当てはまりますが、子宮内膜の生理学的変化も、複数の遺伝子転写の結果として起きていることが示されています。自然な月経周期では、特定のホルモン応答遺伝子がアップレギュレート（遺伝子発現の上昇）、あるいはダウンレギュレート（遺伝子発現の低下）されており、これらの遺伝子転写物の相対的な存在量と構成比に基づいて、ある時点における特定の遺伝子発現シグネチャー（ある遺伝子群の発現パターンのこと）が得られます。子宮内膜生検により遺伝子発現シグネチャー（発現パターン）を調べることで、当該患者様のWOIの生理学的時期を予測することが可能です^{4,7}。

遺伝子発現シグネチャー（発現パターン）の測定に用いる技術

遺伝子の発現量はダイナミックレンジが極めて大きく、高発現している遺伝子と低発現している遺伝子とでは5桁の差があることも多く、ダイナミックレンジが極めて限られている染色体数とはこの点が大きく異なります。定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction）および次世代シーケンシング（NGS: Next-Generation Sequencing）など、特定の検体における遺伝子発現量を正確に測定することができる様々な方法が報告されています。RT-qPCR (Real Time-qPCR) 法は、ダイナミックレンジが最も広く、定量限界値が最も低く、結果の偏りが最も少ないことがよく知られています⁸。

ここでは、特定のトランスクリプトーム（全 mRNA の転写産物）の情報を子宮内膜検体において分析かつ同定するために、正確で信頼性の高い遺伝子発現測定法であるハイスループット型 RT-qPCR 法を用いた

ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査について報告します。

ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査

ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査 (ERPeakSM 検査) は、予定している胚移植時期 [例：プロゲステロン投与から 5 日後 (P+5、投与開始時点が P+0)] における子宮内膜検体の遺伝子発現プロファイル解析することを目的としたゲノム検査です。移植予定時期に子宮内膜の状態がどの時期にあるかを特定できることから、WOI のずれが認められたとしても、次の周期で胚移植の時期を得られた結果で調節し、このずれに対応することができます。

ERPeakSM 検査の開発および妥当性確認

候補遺伝子の特定 (図 1)

科学文献およびオンラインデータベースの詳細な調査により候補遺伝子を特定し、DAVID (Database for Annotation and Integrated Discovery) を用いて考えられる遺伝子機能を評価しました⁹。このアプローチにより最初の候補遺伝子として、受容期に関する情報が得られる可能性が高い 184 の遺伝子を特定しました¹⁰。

遺伝子パネルの選択 (図 2)

遺伝子パネルをさらに精査し、子宮内膜の受容期に関する RT-qPCR の有効性を評価するため、被験者から十分な同意を得て 2 群間試験を実施し、健康なドナーとホルモン補充療法を受けている不妊患者との間で遺伝子発現プロファイルを比較しました。

健康な女性の被験者 (A 群、n=96) では、LH+2 と LH+7 に細胞を採取し、不妊患者 (B 群、n=120) では P+5 に採取し¹⁰、これらの子宮内膜生検検体の解析により、

図1：候補遺伝子の特定



事前に特定していた 184 の遺伝子のうち、85 の遺伝子で 2 群間の倍率変化 (fold-change、相対比) に有意な群間差が認められたため、次の解析ではこれらの遺伝子を選択しました。

遺伝子オントロジー¹¹ という名前で知られる遺伝子機能予測解析を用いて、これら遺伝子の詳細な解析を行いました。その結果、細胞分裂と増殖、細胞のシグナル伝達と応答、細胞外の組織化と情報交換、免疫学的活性、血管増殖、血圧調節、ならびに胚の着床に、この 85 遺伝子すべてが関与していることが明らかとなりました。さらに重要なことに子宮内膜の受容期においても直接に関与している可能性が示唆されました。

子宮内膜の受容期に関与している主な遺伝子発現シグネチャーの詳細をさらに調べるために、85 遺伝子の主成分分析 (PCA) を実施したところ、子宮内膜の受容期を予測する上で、全検体の分散のうちの 99.5% 以上を一部の遺伝子群により説明できることが判明しました¹⁰。

非劣性試験 (図 3)

ERPeakSM 検査の性能を評価するため、IRB (Institutional Review Board、施設内治験審査委員会) の対象外となる

図2：遺伝子選択のプロセス



生殖能力のある健康な女性コホート

2回採取した対になる子宮内膜検体

遺伝子発現解析

遺伝子パネルの精査

研究用プロトコールを作成し、現在臨床で受け入れられている検査と結果を比較する非劣性試験を実施しました。試験対象の条件に合致した患者様から、医師主導の治療の一環としてERPeakSM検査を受けていただくことへの同意が取得されました。そして、被験者全員を匿名化し、結果を比較しました。

この非劣性試験の主な目的として、子宮内膜の受容期を判定するために新たに開発されたERPeakSM検査の有効性が検証されました。本試験の主な成果は、ERPeakSM検査と、現在臨床で利用可能な検査との一致率の評価でした。

CooperGenomicsは、計173の子宮内膜組織検体を入手し、検査を行いました。(図4)の緑色に強調表示された部分は、ERPeakSM検査の結果と、現在臨床で利用可能な検査の既知の結果とが一致していることを示しています。

臨床で利用可能な検査の結果が間違いなく真実であるという仮定に基づいてERPeakSM検査の結果を検証すると、ERPeakSM検査の精度は92.4%、感度は90.0% (95%CI: 80.5 ~ 95.9%)、特異度は94.1% (87.5 ~ 97.8%)をそれぞれ示しました。

CooperGenomicsは、検査を行った前述の173の子宮内膜組織検体に加え、現在臨床で利用可能な検査で「RNAの量が不十分」、「RNAの質が悪く測定不能」または「十分な情報がない」という結果が得られた8検体を入手し、検査しました。このうち、CooperGenomicsのERPeakSM検査では、8例中5例(62.5%)を「受容期前」、「受容期」又は「受容期後」のいずれかに分類することができ、8例中3例(37.5%)のみが子宮内膜組織の質が十分ではないことから「Non informative」に分類されました(図5)。

図3：非劣性試験のデザイン



匿名のRIF患者

子宮内膜生検

検査

解析

図4：ERPeakSM子宮内膜胚受容期検査と現在臨床で利用可能な検査との検体の一致率

		現在臨床で利用可能な検査				
		受容期前	受容期初期	受容期	受容期後期	受容期後
ERPeak SM 検査	受容期前	56	6			
	受容期	6	24	59	12	1
	受容期後					7
	Non informative	1*		1*		

**ERPeakSM子宮内膜胚受容期検査 (ERPeakSM検査) により十分な情報が得られないとされた検体は、組織の質が十分ではなかったため、すべての計算から除外した。

図5：十分な情報が得られなかった検体の結果の内訳

		現在臨床で利用可能な検査		
		RNAの量が少なすぎる	RNAの質が悪く測定不能	十分な情報がない
ERPeak SM 子宮内膜胚受容期検査	受容期前	2		
	受容期		1	1
	受容期後		1	
	Non informative	2		1

考察およびまとめ

ERPeakSM 子宮内膜胚受容期検査 (ERPeakSM 検査) は、胚移植の最適な時期を予測するため、子宮内膜生検検体の遺伝子発現プロファイルを解析するゲノム検査です。ERPeakSM 検査はここで説明している妥当性確認試験により、臨床で現在利用可能な検査との高い一致率を示しました。

ERPeakSM 検査の精度は 92.4%、感度は 90.0% (95% CI : 80.5 ~ 95.9%)、特異度は 94.1% (87.5 ~ 97.8%) でした。本試験で対照として用いた現在臨床で利用可能な検査でも感度は 90%、特異度は 97%

であり、ERPeakSM 検査は診断精度の高い検査であるといえます。したがって、不一致であった検体においては、臨床データが得られない限りは、どちらの検査が正しかったかを判断することは現状では困難といえます。

胚移植の実施時期と妊娠予後を追跡する臨床試験が現在進行中となっており、今後 ERPeakSM 検査の有用性に関する貴重な結果が得られると考えられます。

ERPeakSM 検査では、今回の臨床データを利用した統計学的学習によって、本検査の性能をより向上させることが可能であると予測されます。また、臨床検体や検査データおよび結果をさらに収集することで継続的な検査の改善が期待されます。

参考文献

1. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999;340:1796–1799
2. Garrido-Gómez T, et al. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril.* 2013;99:1078–1085
3. Teh WT, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:1419–1430
4. Ruiz-Alonso M, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2013;100:818–824
5. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* 1950;1:561–564
6. Coutifaris C, et al. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril.* 2004;82:1264–1272
7. Ruiz-Alonso M, et al. What a difference two days make: “personalized” embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study. *Hum Reprod.* 2014;29:1244–1247
8. Petek M. qPCR, Microarrays or RNA-sequencing: When to choose one over the other? Available at: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-microarrays-rna-sequencing-choose-one/> Last accessed June 2019
9. DAVID Bioinformatics Resource. Available at: <https://david.ncifcrf.gov/> Last accessed June 2019
10. Enciso M, et al. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Hum Reprod.* 2018;33:220–228
11. The Gene Ontology Resource. Available at: <http://geneontology.org/> Last accessed June 2019

[注意] 本サービスは薬機法の定めるところの医薬品、医療機器等ではありません。

©2022 ORIGIO Japan K.K. All Rights Reserved.

オリジオ・ジャパン株式会社

〒231-0021

神奈川県横浜市中区日本大通11 横浜情報文化センター4F

Tel. 045-319-6826 Fax. 045-319-6581

E-mail: contact.genomics-jp@coopersurgical.com

Web: <https://coopersurgicalfertility-jp.com/>



CooperSurgical[®]
Fertility Solutions