

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6219164号
(P6219164)

(45) 発行日 平成29年10月25日 (2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日 (2017.10.6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 3 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2013-511700 (P2013-511700)	(73) 特許権者	591100596
(86) (22) 出願日	平成23年5月27日 (2011.5.27)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(65) 公表番号	特表2013-528052 (P2013-528052A)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(43) 公表日	平成25年7月8日 (2013.7.8)		ディカル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/058757		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開番号	W02011/147976		ュ・ドゥ・トルビアック 101
(87) 国際公開日	平成23年12月1日 (2011.12.1)	(73) 特許権者	513096967
審査請求日	平成26年5月9日 (2014.5.9)		サントル・オスピタリエ・ユニヴェルシテ
審査番号	不服2016-6018 (P2016-6018/J1)		ール・ドゥ・モンペリエ
審査請求日	平成28年4月22日 (2016.4.22)		CENTRE HOSPITALIER
(31) 優先権主張番号	61/354,310		UNIVERSITAIRE DE MO
(32) 優先日	平成22年6月14日 (2010.6.14)		NTPELLIER
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランス国、エフー34295 モンペリ
(31) 優先権主張番号	10305561.2		エ、アヴニユー・デュ・ドワイヤン・ガス
(32) 優先日	平成22年5月27日 (2010.5.27)		トン・ジロー 191
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者の子宮内膜の受容性を評価するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の子宮内膜の受容性を評価するための方法であって、以下からなる工程：

i) 患者から得られた子宮内膜生検試料中の 11 の遺伝子の発現レベルを測定する工程、ここで該遺伝子が MFAP5、ANGPTL1、PROK1、NLF2、LAMB3、BCL2L10、CD68、TRPC4、SORCS1、FST および KRT80 である；
および

ii) 子宮内膜生検試料中の遺伝子の発現レベルを対照と比較する工程、ここで、子宮内膜生検試料と対照との間の遺伝子の発現レベルの差の検出が子宮内膜が受容性であるかどうかを示す

を含む、方法。

【請求項 2】

インビトロ受精法 (IVF) 中に子宮内膜 - 胚同時培養のための子宮内膜同時培養の系を調製するための方法であって、以下からなる工程：

i) 患者から得られた子宮内膜生検試料中の 11 の遺伝子の発現レベルを測定する工程、ここで該遺伝子が MFAP5、ANGPTL1、PROK1、NLF2、LAMB3、BCL2L10、CD68、TRPC4、SORCS1、FST および KRT80 である；

ii) 子宮内膜生検試料中の遺伝子の発現レベルを対照と比較する工程、ここで、子宮内膜生検試料と対照との間の遺伝子の発現レベルの差の検出が子宮内膜が受容性であるかどうかを示す；

i i i) 子宮内膜細胞の集団を得るために、工程 i i) において受容性と評価された子宮内膜から得られた子宮内膜細胞を培養する工程；および
i v) 該子宮内膜細胞の集団を胚と同時培養する工程；
を含む方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の方法を実行するためのキットであって、ここで該キットが M F A P 5、A N G P T L 1、P R O K 1、N L F 2、L A M B 3、B C L 2 L 1 0、C D 6 8、T R P C 4、S O R C S 1、F S T および K R T 8 0 の発現レベルを特異的に測定するための手段として核酸のプライマー又はプローブを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の子宮内膜の受容性を評価するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生殖補助医療（A R T）における多くの進歩にも関わらず、調節卵巣刺激法（C O H）およびインビトロ受精（I V F）後の妊娠率は、依然として低い。着床失敗の三分の二は、不十分な子宮内膜の受容性または胚 - 子宮内膜ダイアログの不良に関連すると推定される。子宮内膜は、“着床の窓”と呼ばれる、空間的および時間的に制限された窓の期間中、胚盤胞の着床に対して受容性である。ヒトの場合、この期間は、L H サージの 6 ~ 1 0 日後に始まって、約 4 8 時間持続する。子宮内膜の受容性を評価するために、伝統的な判断基準である子宮内膜厚、子宮内膜の形態学的な観点、ならびに子宮内膜および子宮内膜下の血流を含む、いくつかのパラメータが示唆されている。しかし、それらの陽性適中率は、依然として限定的である。

20

【0003】

より最近では、ヒトの着床の窓のバイオマーカーを特定するために、トランスクリプトームを用いたアプローチが推し進められている。ヒト生検試料におけるマイクロアレイによる技術を用いて、数人の研究者らは、ヒト子宮内膜の前受容性（分泌期前期）から受容性（分泌期中期）の段階への移行に関連する遺伝子発現プロファイルの変化を観察している（Carson et al., 2002; Riesewijk et al., 2003; Mirkin et al., 2005; Talbi et al., 2006）。しかし、調節された様々な遺伝子の内、これらのすべての試験に共通するのは 2 つの遺伝子のみであった（Haouzi et al., 2009）。同一のアプローチを用いた結果におけるこのようなばらつきには、いくつかの説明があり得る：子宮内膜の生検日の違い、患者のプロファイルの違い、そして試験した子宮内膜の試料数が不十分であったことである（n = 11）。さらに、患者間のばらつきの影響を最小限にするために必須の条件であると思われるが、同一の患者において分泌期前期および中期を比較した試験は 1 試験のみであった（Riesewijk et al., 2003）。

30

【0004】

従って、当技術分野では、依然として、I V F の臨床的な結果の改善に役立つヒト子宮内膜受容性の信頼性のあるバイオマーカーの必要性がある。

40

【発明の概要】

【0005】

本発明は、患者の子宮内膜の受容性を評価するための方法であって、患者から得られた子宮内膜生検試料中の 11 の遺伝子の発現レベルの測定からなる工程を含み、該遺伝子が M F A P 5、A N G P T L 1、P R O K 1、N L F 2、L A M B 3、B C L 2 L 1 0、C D 6 8、T R P C 4、S O R C S 1、F S T および K R T 8 0 である、方法に関する。

【0006】

発明の詳細な説明

本発明者らは、着床の窓の期間中にヒトの子宮内膜で発現して、このようなマーカーとして用いることができる遺伝子を特定することを目的とした。男性不妊症因子における新

50

しい卵細胞質内精子注入法 (I C S I) の試みに先行して、一連の正常な応答者の患者 ($n = 31$) が、同一の自然周期の分泌期前期 ($LH + 2$) および分裂期中期 ($LH + 7$) の期間中に子宮内膜の生検を受けた ($n = 62$) 。試料は、DNA マイクロアレイを用いて解析して、マイクロアレイの解析は、各患者について分泌期前期および中期の段階の対にした試料により実施したが、これは患者間のばらつきを最小限にするために必須である。子宮内膜受容性の新しいマーカーを特定するために、本発明者らは、先ず、 $LH + 2$ および $LH + 7$ の試料群の間で著しく変化した遺伝子リストと、同一の自然子宮内膜周期段階を比較した他の4つのトランスクリプトーム試験 Carson et al., 2002; Riesewijk et al., 2003; Mirkin et al., 2005; Talbi et al., 2006) から得られた遺伝子リストの共通項を求めて、着床の窓の期間中に特異的に変化する、797の遺伝子を含む本試験独自の遺伝子リストを特定した (図1) 。これらのデータ (797 遺伝子) の階層的なクラスタリングの結果、このリストが2つの子宮内膜試料群に明確に分離することが示された。この分離を図1に例証する。面白いことに、これらの遺伝子の大部分は着床の窓の期間中にアップレギュレーションされた (アップレギュレーションされた遺伝子746、ダウンレギュレーションされた遺伝子51) (図1) 。

【 0 0 0 7 】

続いて、子宮内膜の受容性に関与すると推定されるバイオマーカーを特定するために、マイクロアレイの実験に適用される分類予測のための新しいアプローチが用いられた。着床の窓の候補遺伝子を選択するために、次に、本発明者らは、着床の窓の期間中に特異的に変化する本試験独自の遺伝子リストを予測遺伝子リストと比較した。その結果、本発明者らは、マイクロアレイの解析による報告書には列記されていない、子宮内膜の受容性を予測する最も強くアップレギュレーションされた10個の新しい遺伝子を選択した。これらの新しい遺伝子の内、4個の遺伝子はHaouziら(2009)において発表されている。発表されたこれらのバイオマーカーは、M F A P 5 (マイクロフィブリル関連タンパク質5) 、A N G P T L 1 (アンジオポエチン様1) 、P R O K 1 ととも呼ばれるE G - V E G F (内分泌腺由来血管内皮細胞増殖因子またはプロキネチシン1) 、およびC 2 C D 4 B ととも呼ばれるN L F 2 (核局在因子2またはC 2 カルシウム依存ドメイン含有4 B) であり、すべてがマイクロアレイ解析において着床の窓の期間中に、それぞれ、37、12.6、10.2および22.5倍に過剰発現する (表1) 。さらに、他のマイクロアレイ解析で見られた1つの遺伝子がヒト子宮内膜受容性の陽性対照として選択された：L A M B 3 (ラミニンベータ3) 。6つの未発表の遺伝子は、B C L 2 L 1 0 (B C L 2 様10) 、C D 6 8 抗原、T R P C 4 (一過性レセプター電位陽イオンチャネル、サブファミリーC、メンバー4) 、S O R C S 1 (ソルチリン関連V P S 1 0 ドメイン含有レセプター1) 、F S T (フォリスタチン) 、およびK R T 8 0 (ケラチン80) であり、これらは、着床の窓の期間中に同じく、それぞれ、4.7倍、5.3倍、7.7倍、9倍、9倍および14.6倍に過剰発現した (表1) 。結論：11の遺伝子 (M F A P 5 、A N G P T L 1 、P R O K 1 、N L F 2 、L A M B 3 、B C L 2 L 1 0 、C D 6 8 、T R P C 4 、S O R C S 1 、F S T 、およびK R T 8 0) は初めて選択された遺伝子であり、子宮内膜受容性の検査のための新しいバイオマーカーである。子宮内膜の生検は自然周期の期間中に実施し易い手順であり、従って、本発明は、I V F またはI C S C 後の着床不良の患者における新規の手法である。

【 0 0 0 8 】

従って、本発明は、患者の子宮内膜の受容性を評価するための方法であって、患者から得られた子宮内膜生検試料中の11の遺伝子の発現レベルの測定からなる工程を含み、該遺伝子がM F A P 5 、A N G P T L 1 、P R O K 1 、N L F 2 、L A M B 3 、B C L 2 L 1 0 、C D 6 8 、T R P C 4 、S O R C S 1 、F S T 、およびK R T 8 0 である方法に関する。

【 0 0 0 9 】

本明細書で用いられるように、「患者」という用語は、本発明が適用され得る哺乳動物の雌を指す。典型的には該哺乳動物はヒト (即ち、女性) であるが、霊長類、イヌ、ネコ

10

20

30

40

50

、ブタ、ヒツジ、ウシなどのその他の哺乳動物を対象とすることができる。

【 0 0 1 0 】

本発明に関連するすべての遺伝子は、それ自体、公知であり、以下の表 1 に列記されている。

【 0 0 1 1 】

【表 1】

遺伝子の 記号	遺伝子の名称	遺伝子 ID	変化倍率
MFAP5	ミクロフィブリル関連タンパク質 5	8076	37,01902142
ANGPTL1	アンギオポエチン様 1	9068	12,61880198
PROK1	内分泌腺由来血管内皮細胞増殖因子または プロキネチシン 1	84432	10,18590074
NLF2	核局在因子 2 または C2 カルシウム依存 ドメイン含有 4B	388125	22,53812032
LAMB3	ラミニン, ベータ 3	3914	20,42745619
BCL2L10	BCL2 様 10	10017	4,648031259
CD68	CD68 抗原	968	5,223325166
TRPC4	一過性レセプター潜在陽イオンチャネル, サブファミリー C, メンバー 4	7223	7,619199905
SORCS1	ソルチリン関連 VPS10 ドメイン含有レセプター 1	114815	8,985566271
FST	フォリスタチン	10468	8,992203809
KRT80	ケラチン 80	144501	14,59097378

表 A: 予測遺伝子セット

【 0 0 1 2 】

本発明の方法は、子宮内膜生検試料と対照の間の遺伝子の発現レベルの差の検出によって子宮内膜が受容性であるかどうかを示される、子宮内膜生検試料中の遺伝子の発現レベルの対照との比較からなる工程をさらに含んでもよい。対照は、受容性子宮内膜から得られた子宮内膜生検試料に存在してもよく、あるいは、非受容性子宮内膜から得られる子宮内膜生検試料からなってもよい。

【 0 0 1 3 】

好ましい態様において、患者は自然周期が観察される。本発明者らは、実際に、刺激された周期または自然の変更された周期は子宮内膜の受容性に影響を及ぼすと考えている。

「自然周期」という用語は、雌または患者が 1 個の卵母細胞を産生する自然周期を指す。

「変更された自然周期」という用語は、雌または患者が、組換え型 FSH または hMG に関連する GnRH アンタゴニストを用いた軽度の卵巣刺激下において 2 個から 5 個の間の卵母細胞を産生する過程を指す。「刺激された周期」という用語は、雌または患者が、組換え型 FSH または hMG に関連する GnRH アゴニストまたはアンタゴニストを用いた刺激下において 1 個よりも多い卵母細胞を産生する過程を指す。本発明者らは、実際に、調節卵巣刺激 (COS) のサイクルにおけるゴナドトロピンの投与が正常な子宮内膜受容性に関与する遺伝子の転写活性の混乱を来すことを見出している。従って、本発明は、特に複数回の着床不全の患者において、新しい展望を開く。この場合、子宮内膜のプロフィールの解析によって COS プロトコール中に大きく変化したプロフィールを明らかにすることが可能であり、臨床医に対して IVF 刺激プロトコールを修正するか、あるいは自然周期中のより遅い時期に胚移植を実施することを促す。特に、子宮内膜の受容性が COS

プロトコールによって深刻に損なわれる場合は、新鮮な胚の移植は中止されるべきであり、自然周期下において凍結された胚および融解された胚の移植が実施されるべきである。

【 0 0 1 4 】

本発明の方法は、患者がなぜ複数回の着床不全を起こすかを理解するためにも特に適している。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法は、患者の妊娠の結果の改善に特に適している。従って、本発明は、以下を含む患者の妊娠の結果を改善させるための方法にも関する：

i) 本発明の方法を実施することによって、患者の子宮内膜の受容性を評価する工程。

i i i) 工程 i) において子宮内膜が受容性と判断された時点で、胚を移植する工程。

10

【 0 0 1 6 】

工程 i i) の胚は、伝統的なインビトロ受精法 (c I V F) のプロトコールまたは細胞質内精子注入法 (I C S I) のプロトコールを介して得ることができる。「伝統的なインビトロ受精法」または「 c I V F 」という用語は、卵母細胞が、体外、つまりインビトロにおいて精子を受精する過程を指す。I V F は、インビボにおける受胎が失敗した際の不妊における主要な治療法である。「細胞質内精子注入法」または「 I C S I 」という用語は、1 個の精子が卵母細胞に直接注入されるインビトロの受精手順を指す。この手順は、雄の不妊要因を克服するために最も広く用いられるが、卵母細胞が精子によって容易に侵入され得ない場合、および場合によっては、特に精子提供に関連するインビトロにおける受精の方法としても用いることができる。

20

【 0 0 1 7 】

上記の表 1 に記載した通り、遺伝子の発現レベルの測定は様々な手法で実施することができる。一般に、測定される発現レベルは相対的な発現レベルである。

【 0 0 1 8 】

より好ましくは、前記測定は、子宮内膜生検試料をプローブ、プライマーまたはリガンドのような選択的な試薬と接触させる工程、およびそれによって、子宮内膜生検試料中に元々含まれる関心対象のポリペプチドまたは核酸の存在を検出する工程または量を測定する工程を含む。接触は、プレート、マイクロタイターディッシュ、試験管、ウェル、ガラス、カラムなどのような任意の適切な装置で実施してよい。具体的な態様において、接触は、核酸アレイまたは特異的リガンドアレイのような試薬でコーティングした基質上で実施される。基質は、ガラス、プラスチック、ナイロン、紙、金属、ポリマーなどを含む適切な任意の支持体のような固体または半固体の基質であってよい。基質は、スライド、膜、ビーズ、カラム、ゲルなどのように様々な形状および大きさであってよい。接触は、試薬と子宮内膜生検試料の核酸またはポリペプチドの間で形成される、核酸ハイブリッドまたは抗体 - 抗原複合体のような検出可能な複合体に適した任意の条件下で実施することができる。

30

【 0 0 1 9 】

好ましい態様において、発現レベルは、m R N A の量を測定することによって測定され得る。

【 0 0 2 0 】

40

m R N A の量を測定するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、子宮内膜生検試料に含まれる核酸は、先ず、例えば、溶解酵素または化学的な溶液を用いて、標準的な方法に従って抽出されるか、あるいは、製造業者の説明書に従って核酸結合樹脂によって抽出される。続いて、抽出された m R N A は、ハイブリダイゼーション (例えば、ノーザンブロット分析) および / または増幅 (例えば、R T - P C R) により検出される。好ましくは、定量的または半定量的 R T - P C R が、好ましい。リアルタイムの定量的または半定量的 R T - P C R は、特に有利である。

【 0 0 2 1 】

増幅のその他の方法は、リガーゼ連鎖反応 (L C R)、転写介在性増幅法 (T M A)、核酸鎖置換増幅法 (S D A)、および核酸配列に基づく増幅 (N A S B A) を含む。

50

【 0 0 2 2 】

少なくとも 10 個のヌクレオチドを持って、本明細書の関心対象の mRNA と相補性または相同な配列を示す核酸は、ハイブリダイゼーションのプロープまたは増幅プライマーとしての用途がある。このような核酸は、同一である必要はないが、典型的には、同等の大きさの相同領域と少なくとも約 80 % 同一、より好ましくは 85 % 同一、さらにより好ましくは 90 ~ 95 % 同一であると理解されている。特定の態様において、核酸を、ハイブリダイゼーションを検出するための検出可能な標識のような適切な方法と組み合わせて使用することは有利である。蛍光、放射性、酵素的またはその他のリガンド（例えば、アピジン / ビオチン）を含む、様々な適切な指標が当技術分野において公知である。

【 0 0 2 3 】

プローブは、典型的には、長さ 10 ~ 1000 個のヌクレオチド、例えば、10 ~ 800 個、より好ましくは 15 ~ 700 個、典型的には 20 ~ 500 個の一本鎖の核酸を含む。プライマーは、典型的には、増幅されるべき関心対象の核酸と完全に、またはほぼ完全にマッチするように設計された、長さ 10 ~ 25 個のヌクレオチドの短い一本鎖の核酸である。プローブおよびプライマーは、ハイブリダイゼーションする核酸に「特異的」であり、即ち、それらは好ましくは高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーションの条件下（最も高い融解温度 T_m に対応する、例えば、50 % ホルムアミド、5 × または 6 × S C C。S C C は 0.15 M NaCl、0.015 M クエン酸ナトリウムである）においてハイブリダイゼーションする。

【 0 0 2 4 】

先に記載した増幅および検出方法で用いられる核酸のプライマーまたはプローブは、キットとして構築されてもよい。このようなキットは、共通のプライマーおよび分子プローブを含む。好ましいキットは、増幅が生じたかどうかを調べるために必要な成分をさらに含む。キットは、例えば、P C R の緩衝液および酵素；陽性対照配列、反応コントロールプライマー；ならびに特異的な配列の増幅および検出のための説明書をさらに含んでも良い。

【 0 0 2 5 】

特定の態様において、本発明の方法は、子宮内膜生検試料から抽出された全 RNA を提供する工程、ならびに特に定量的または半定量的 R T - P C R を用いて、RNA を増幅および特異的プローブにハイブリダイゼーションさせる工程を含む。

【 0 0 2 6 】

もう一つの好ましい態様において、発現レベルは DNA チップ解析によって測定される。このような DNA チップまたは核酸マイクロアレイは、基質に対して化学的に接着した異なる核酸プローブからなり、基質はマイクロチップ、スライドガラスまたはマイクロスフェアの大きさのビーズであることができる。マイクロチップは、ポリマー、プラスチック、樹脂、多糖類、シリカもしくはシリカをベースとする材料、炭素、金属、無機のガラス、またはニトロセルロースから構成され得る。プローブは、約 10 ~ 約 60 塩基対であり得る c D N A またはオリゴヌクレオチドのような核酸を含む。発現レベルを調べるために、試験患者からの子宮内膜生検試料を任意で先ず逆転写に供して、標識し、ハイブリダイゼーションの条件においてマイクロアレイに接触させて、マイクロアレイの表面に接着したプローブ配列と相補性である標的核酸間の複合体を形成させる。続いて、標識されてハイブリダイゼーションした複合体を検出して、定量または半定量することができる。標識は、様々な方法で、例えば、放射性または蛍光の標識を用いることによって、達成してよい。当業者はマイクロアレイハイブリダイゼーション技術の多くの変異型が利用可能である（例えば、Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210 の総説を参照されたい）。

【 0 0 2 7 】

この状況において、本発明は、表 1 に列記する遺伝子に特異的である核酸を有する固体支持体を含む DNA チップをさらに提供する。

【 0 0 2 8 】

該遺伝子の発現レベルを測定するためのその他の方法は、該遺伝子によってコードされるタンパク質の量の測定を含む。

【 0 0 2 9 】

このような方法は、子宮内膜生検試料を、子宮内膜生検試料中に含まれるマーカータンパク質と選択的に相互作用することができる結合パートナーと接触させる工程を含む。結合パートナーは、一般に、ポリクローナルまたはモノクローナル、好ましくはモノクローナルであり得る抗体である。

【 0 0 3 0 】

タンパク質の存在は、競合、直接反応、またはサンドイッチタイプのアッセイのような免疫アッセイを含む、標準的な電気泳動および免疫診断学の技術を用いて検出することができる。このようなアッセイは、ウェスタンブロット；凝集試験；E L I S Aのような酵素標識および介在性免疫アッセイ；ビオチン／アビジンタイプのアッセイ；放射免疫アッセイ；免疫電気泳動法；免疫沈降法などを非限定的に含む。反応は、一般に、蛍光、化学発光、放射性、酵素の標識もしくは色素分子のような明示用標識、または抗原およびそれと反応する抗体（antibody）もしくは抗体（antibodies）の間の複合体の形成を検出するためのその他の方法を含む。

【 0 0 3 1 】

先に述べたアッセイは、一般に、抗原 - 抗体複合体が結合するた固相支持体からの液中の未結合タンパク質の分離を伴う。本発明の実施で用いることができる固体支持体は、ニトロセルロースのような基質（例えば、膜またはマイクロタイターのウェルの形）；ポリビニルクロリド（例えば、シートまたはマイクロタイターのウェル）；ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズまたはマイクロタイターのプレート）；フッ化ポリビニリジン；ジアゾ化した紙；ナイロンの膜；活性化したビーズ、磁氣的に反応性のビーズなどのような基質を含む。

【 0 0 3 2 】

特に、E L I S Aの方法を使うことが可能であり、マイクロタイターのプレートのウェルは、試験対象であるタンパク質に対する抗体でコーティングされる。続いて、マーカータンパク質を含むまたは含むと思われる子宮内膜生検試料を、コーティングされたウェルに加える。抗体 - 抗原複合体の形成を可能とするための十分なインキュベーション期間後、未結合の分子を除去するためにプレートを洗浄して、検出可能な標識された二次的結合分子を加えることができる。二次的結合分子は、捕捉された任意の試料マーカータンパク質と反応させて、プレートを洗い、当技術分野において周知の方法を用いて二次的結合分子の存在を検出する。

【 0 0 3 3 】

あるいは、免疫組織化学（I H C）の方法も好ましいとされ得る。I H Cは、特に、そのままの位置で子宮内膜生検試料中の標的を検出する方法を提供する。I H Cでは子宮内膜生検試料の全体の細胞の完全性が維持されて、従って、関心対象の標的の存在および所在の双方が検出可能である。典型的には、子宮内膜生検試料は、染色およびその後の光学顕微鏡による検査に備えて、ホルマリンで固定して、パラフィンに包埋し、薄切する。I H Cの現在の方法は、直接標識または二次抗体をベースとするもしくはハプテンをベースとする標識のいずれかを用いる。公知のI H Cの系の例は、例えば、EnVision（商標）（DakoCytomation）、Powervision（登録商標）（Immunovision, Springdale, AZ）、NBA（商標）キット（Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA）、HistoFine（登録商標）（Nichirei Corp, Tokyo, Japan）を含む。

【 0 0 3 4 】

特定の態様において、組織の切片（即ち、子宮内膜生検試料）は、関心対象の遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体と共にインキュベーションした後に、スライドまたはその他の支持体上にマウントすることができる。続いて、適切な固体支持体上にマウントされた試料における顕微鏡検査を実施することができる。顕微鏡写真の撮影に備えて、関心対象のタンパク質の存在を選択的に染め出すことによって強調するために、子

10

20

30

40

50

宮内膜生検試料を含む切片をスライドガラスまたはその他の平面状の支持体にマウントしてよい。

【0035】

従って、IHC子宮内膜生検試料は、例えば、(a)子宮内膜細胞を含む調製物、(b)固定および包埋された細胞、(c)該子宮内膜生検試料中の関心対象のタンパク質の検出を含み得る。いくつかの態様において、IHCの染色手順は、組織の切り出しおよび整形、固定、脱水、パラフィン浸潤、薄切切片の作製、スライドガラスへのマウント、ベーキング、脱パラフィン化、再水和、抗原の回収、ブロッキングの工程、一次抗体の適用、洗浄、二次抗体(任意で、適切な検出可能な標識に共役)、洗浄、カウンター染色、および鏡検などの工程を含むことができる。

10

【0036】

本発明は、上記の方法を実施するためのキットにも関連し、該キットは子宮内膜が受容性かどうかを示す表1の遺伝子の発現レベルを測定するための手段を含む。

【0037】

本発明のもう一つの目的は、本発明の方法に従って受容性と判断された子宮内膜から入手可能な子宮内膜の外植片に関する。

【0038】

従って、子宮内膜の外植片は、MFAP5、ANGPTL1、PROK1、NLF2、LAMB3、BCL2L10、CD68、TRPC4、SORCS1、FSTおよびKRT80からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を過剰発現する子宮内膜の細胞(例えば、上皮、間質細胞または腺細胞)を持つと言う点を特徴とする。好ましくは、子宮内膜の外植片は表1に記載するすべての遺伝子を過剰発現する。

20

【0039】

本発明に従って、このように子宮内膜の外植片は、患者の子宮の裏打ちの小片が摘出される際に、子宮内膜の生検から得ることができる。

【0040】

本発明の子宮内膜外植片は、IVF期間中の子宮内膜-胚同時培養のための子宮内膜同時培養の系を調製するために特に適している。

【0041】

特定の態様において、子宮内膜-胚同時培養は自己由来である(子宮内膜外植片および胚は同一の患者に由来する)。

30

【0042】

典型的には、子宮内膜外植片は子宮内膜細胞の集団を得るために処理される。例えば、子宮内膜外植片の処理はUS 2008064100;Eyheremendy et al., 2010;Spandorfer et al., 2004に記載される通りに実施することができる。

【0043】

得られる子宮内膜細胞はコンピテントな子宮内膜細胞として特徴付けられ得る。本明細書で用いられる通り、「コンピテントな子宮内膜細胞」という用語は、本発明に従って子宮内膜外植片から得られて、MFAP5、ANGPTL1、PROK1、NLF2、LAMB3、BCL2L10、CD68、TRPC4、SORCS1、FSTおよびKRT80からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子の過剰発現を示している子宮内膜細胞を指す。好ましくは、コンピテントな子宮内膜細胞は表1に記載するすべての遺伝子を過剰発現する。

40

【0044】

次に、胚盤胞を得るためにコンピテントな子宮内膜細胞の集団が胚と同時培養され得た後、胚盤胞は最終的に患者に移植することができる。

【0045】

従って、本発明のもう一つの目的は、上記に定義されるコンピテントな子宮内膜細胞の集団の存在下において胚を同時培養する工程を含む、胚を発生胚盤胞の段階まで成長させる方法に関する。

50

【 0 0 4 6 】

特定の態様において、胚を発生の際の胚盤胞の段階まで成長させる方法は、上記の通りに得られるコンピテントな子宮内膜細胞の層でコーティングした細胞培養表面で胚を同時培養する工程を含む。

【 0 0 4 7 】

「細胞培養表面」または「細胞培養マトリックス」という用語は、細胞培養に適した表面またはマトリックスのすべての種類を指す。「細胞培養表面」という用語は、組織培養のプレート、ディッシュ、ウェルまたはボトルを非限定的に含む。特定の態様において、培養表面は培養のプレート、ディッシュ、ウェルまたはボトルのプラスチック表面である。細胞培養表面は、コンピテントな子宮内膜細胞のコーティングと適合性でなければならない。本発明の一つの態様に従って、細胞培養表面は、コンピテントな子宮内膜細胞が自然に接着し得る方法で選択される。細胞培養表面の様々な材料が選択され得る。このような材料の例は、組織培養ディッシュまたはコラーゲンでコーティングされたディッシュを非限定的に含む。

10

【 0 0 4 8 】

典型的には、細胞培養表面にコンピテントな子宮内膜細胞の層を得るために、まず、コラーゲンを含む培養培地を用いてコンピテントな子宮内膜細胞を細胞培養表面にコーティングする。コンピテントな子宮内膜細胞を細胞培養表面に接着させるための十分な時間の後、コラーゲンを含む培養培地を除去して、コンピテントな子宮内膜細胞の増殖を可能とする培地で培地交換する。

20

【 0 0 4 9 】

特定の態様において、コンピテントな子宮内膜細胞は、胚と接触させる前に、それらの増殖を停止させるために予め処理する。従って、コンピテントな子宮内膜細胞は、ガンマ線照射によって、または細胞周期遮断物質を用いて不活化される。

【 0 0 5 0 】

もう一つの態様において、コンピテントな子宮内膜細胞は、コンピテントな子宮内膜細胞のセルラインを得るために不死化してもよい。

【 0 0 5 1 】

子宮内膜 - 胚同時培養のための条件（例えば、温度、CO₂レベルなど）および培養培地は当技術分野において周知であり、例えば、Eyheremendy et al., 2010およびSpandorf et al., 2004に記載されている。

30

【 0 0 5 2 】

従って、本発明の子宮内膜の同時培養系はインビトロにおける受精胚のインピボにおける着床の可能性を高めるために特に適している。「着床の可能性」は胚が子宮内で着床する可能性である。従って、本発明は、インビトロにおける受精胚のインピボにおける着床の可能性を高めるための方法に関する。この方法は、その他のIVFの方法に比して、培養中での胚の完全な孵化が達成されるか、あるいは孵化が促進されるように、胚を発生の際の胚盤胞の段階まで成長させるための上記の態様の一つを実施する工程を含む。この方法の特定の態様に従って、続いて、胚の向上した着床が達成されるように、胚盤胞は哺乳動物の宿主の子宮内に導入される。いくつかの態様において、インビトロにおける胚の完全な孵化は生存可能な妊娠の確立と相関する。典型的には、患者がこの手順の適切な候補と判断されると、この患者は子宮内膜の受容性を調べるために本発明の方法を受ける。子宮内膜が受容性と考えられると、子宮内膜の生検が実施されて、この期間中に、前記の通り、子宮内膜の外植片を得るために子宮の裏打ち細胞の薄片が採取される。続いて、子宮内膜外植片は検査機関または会社へ送付され得て、そこで処理および精製されて凍結される。次に、患者は典型的なIVF周期を受けて、卵巣内での卵子の成長を刺激するために投薬を受ける。患者の卵子が回収されて、精液と混合される。この時点で、検査期間は、上記の通り調製された、子宮内膜外植片に由来する子宮内膜の細胞の融解および培養を開始する。受精が確認されたら、患者の胚は子宮内膜細胞と同時培養される。胚盤胞の段階に達した時点で、患者の胚は着床および妊娠のために子宮に移植される。

40

50

【 0 0 5 3 】

本発明のいくつかの態様において、インビトロにおいて受精した哺乳動物の胚の出生の可能性を高める方法をさらに提供する。「出生の可能性」は、出生児が得られる胚の可能性を指す。該方法は、培養中の胚の促進された孵化の可能性または完全な孵化が達成されるように、上記の通り、胚を発生胚の段階まで成長させる工程を含む。続いて、胚盤胞は哺乳動物の宿主の子宮に移植される；そして、胚はインビボにおいて着床および成長して、本発明に従って培養されなかった胚のそれに比較して、胚の出生児を得る可能性が高められる。

【 0 0 5 4 】

本発明の方法は、高い着床率を提供することができて、従って、各周期において少ない胚が移植可能であり、その結果、多胎妊娠の発生率が低下するので、多胎妊娠を制限するためにも特に適切でもある。

【 0 0 5 5 】

本発明は、以下の実施例および図面によって詳細に例示される。しかし、これらの実施例および図面は、いかなる点においても本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきでない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 6 】

【 図 1 】 子宮内膜の受容性の新しいバイオマーカーの特定

【 図 2 】 自然周期下での着床の窓の期間中のWin Test (窓着床試験) 。

【 図 3 】 I V F 手順の期間における患者ケアマネジメントの結果

【 図 4 】 自然周期と刺激された周期の間の患者の受容性状態を確認するためのWin Test

【 図 5 】 I V F 手順の期間における患者ケアマネジメントの結果

【 図 6 】 複数回の着床不全の患者の受容性状態を確認するためのWin Test。

【 図 7 】 婦人科疾患を有する不妊女性の受容性状態を確認するためのWin Test。

【 図 8 】 卵母細胞提供のためのレシピエント患者における子宮内膜準備期間中のホルモン補充療法の影響を確認するためのWin Test。

【 0 0 5 7 】

実施例

実施例 1

材料および方法：子宮内膜の受容性の新しいバイオマーカーの特定 (Haouzi et al., 2009) (図 1)

患者の特徴および子宮内膜の生検：このプロジェクトは施設評価委員会の承認を得ている。試験集団は、書面によるインフォームドコンセントの後に補充された 31 名の患者 (年齢 30 . 4 歳 ± 3 . 2 歳) を含んだ。すべての患者が、Day 3 に正常な血清 FSH、LH、エストラジオールおよびAMHの値を示して、先行の1回目のICSI試行において正常な応答者であり、それらは、男性の不妊要因のICSIにおいて調べられた。2回目のICSI試行に先行する同じ自然周期の期間中、LHピーク後のDay 2 (LH + 2) およびDay 7 (LH + 7) にすべての女性について2回の子宮内膜生検試料を採取した。LHのサージは、月経の初日に基づいて患者本人が推定した。LHの時期が正確であることを確認するための組織学的な分析は実施しなかった。従って、月経の初日から1日の遅延の可能性は排除できない。各生検試料は、PBSで洗って、RLT RNA抽出緩衝液 (RNeasy kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) に入れて - 80 で凍結させた。

【 0 0 5 8 】

相補性RNA (cRNA) の調製およびマイクロアレイによるハイブリダイゼーション：すべてのRNA (100 ng) を、(Haouzi et al., 2009) に記載される通り、HG-U133 plus GeneChip全ゲノムオリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) に対するハイブリダイゼーションのために2倍に増幅した標識cRNAを調製するために使用した。

【 0 0 5 9 】

マイクロアレイデータの解析：HG-U133 plus 2.0アレイは、5 4 , 6 7 5 のオリゴヌクレオチドプローブのセットを含んで、それらは約 3 0 , 0 0 0 の固有のヒト遺伝子または予定される遺伝子に対応する。アレイ解析は、重要な R N A の検出（検出コールは「あり」または「なし」）を調べるため、および各プローブセットのシグナルの強度を測定するために、GeneChip Operating Software 1.2 (Affymetrix) を用いて実施した。

【 0 0 6 0 】

バイオインフォマティクおよびインシリコ分析：2 試料群、L H + 2 (n = 3 1) および L H + 7 (n = 3 1) の間で発現が有意な変動を示した遺伝子を特定するために、マイクロアレイの有意性解析 (SAM, Stanford University, USA, Tusher et al. 2001) を用いた。S A M は、変化倍率 (F C) の平均値または中央値、およびデータの順列に基づく偽陽性比率 (F D R) の信頼性パーセントを与える。

10

【 0 0 6 1 】

L H + 2 および L H + 7 の群からの子宮内膜試料 (n = 6 2) の発現プロファイルを比較するために、本発明者らは、主成分分析法 (P C A) および階層的なクラスタリング (Eisen et al., 1998; de Hoon et al., 2004) の双方を用いて監督されていない分類を実施した。P C A は、R A G E ウェブインターフェース (<http://rage.montp.inserm.fr>) (Reme et al., 2008) を介して R 統計解析ソフトウェアに基づくオリジナルのスク립トを伴う。可変プローブの発現レベルに基づく階層的なクラスタリング解析は、CLUSTER およびTREEVIEWのソフトウェアパッケージを用いて実施した。遺伝子発現プロファイルは、反復検査補正を用いたノンパラメトリックなMann WhitneyのU検定を用いて、R A G E で監督した解析モジュールにて解析して、S A Mソフトウェアを用いて確認した。

20

【 0 0 6 2 】

予測遺伝子の構築：他 (Reme et al., 2008) で幅広く説明される 3 ステップの過程は、対の試料のために修正されている。A f f y m e t r i x の検出コールは、全体を通して、「あり」1 および「それ以外」0 の 2 段階の発現レベルのみで使用した。他の研究者によって推奨される通り、プローブセットは、すべての試料を通じてありのコールの最少の数である試料分類のサイズの 1 / 2 を選択することによって、フィルターに掛けた。4 0 % の最少変動係数を用いて情報価値の低いシグナルのプローブセットをさらに排除して、最終的には、5 4 , 6 1 3 プローブセットの U 1 3 3 P チップから 1 6 , 1 3 0 プローブセットとなった。

30

【 0 0 6 3 】

データ次元の減少は、2 段階の基準 (あり = 1、それ以外 = 0) のマルチブルドゥローイングとして判断される試料群の各プローブセットの分布を比較することによって達成された。簡潔に言うと、ある患者の対の状況 (L H 2 および L H 7) を説明するために、双方の状況が同一のコールである場合は値が 0 であり、それらが異なる場合は値が 1 であるプローブセットのベクトルを構築した。続いて、このベクトルを χ^2 検定を用いてヌルベクトルと比較して、反復検定により P 値を補正した結果、2 0 0 ~ 5 0 0 のプローブセットのリストが得られて、続いて、スーパーバイズド解析 (supervised analysis) に使用した。このようなリストの試料分類を分離する能力は、先に記載された通り、反復検定のためのBonferroni補正および 2 分類比較における小さな試料数のためのYates補正を用いて、 χ^2 検定を用いた試料対試料の比較の有意性を最大限とすることによって評価する。有意な閾値に達したら、試料は同一の分類ではない。これを、対にした各分類の試料とその他の分類の任意の試料の比較について反復して、有意でない比較の最初の数および強度が求められる。リストの減少は、最も良好な向上を示すプローブセットを連続的に削除することによって、有意でない比較の数を最小限として達成される。プローブセットの除去によって基準がそれ以上改善されない場合は過程を中止して、残りのリストが予測遺伝子である。

40

【 0 0 6 4 】

リーブ - ワン - アウト (leave-one-out) 交差検証では、各試料ペアを順に除去して、

50

残りの試料に対して、最初の分類において記載したように、Bonferroni補正を用いて次元の減少および予測遺伝子構築の全体の過程を実施する。このようにして構築される各予測遺伝子について、レフトアウトされた試料がその分類に戻る誤分類のエラーを生じる可能性を検定して、この場合、有意でない比較の数は0でなければならない。

【0065】

結果

子宮内膜受容性の関数としての遺伝子発現プロファイル：まず、LH+2およびLH+7の試料の間で変動係数(40%)およびなし/ありの「検出コール」(少なくとも15の試料においてあり)を用いた選択を実施して、約16,200のプローブセットを示した。続いて、本発明者らは、LH+2およびLH+7の試料群の間でSAM解析を実施した(LH+2対LH+7、対の試料の解析)。これらの2群の間で1012の遺伝子が有意に変化して、LH+7の試料群では945のアップレギュレーションされた遺伝子および67のダウンレギュレーションされた遺伝子が含まれた(倍率変化2、およびP値<0.05)。

【0066】

予測遺伝子リストの妥当性検査：本発明者らは、まず、材料および方法に記載された通り、事前に作成された予測遺伝子リスト(60プローブセットを含む)を用いて、P値0.01におけるリーブ-ワン-アウト交差検証のエラーを6%として、LH+2およびLH+7の試料についてPCA解析を実施した。最初の二次元を用いたこのPCAにおいてLH+7試料の75%がその他の試料から分離されて、これはデータ情報の52%であった。次に、本発明者らは、3つの分泌期前期の試料および8つの分泌期中期の試料にあるTalbi et al. (2006)の試料に対して、予測遺伝子のリストを解析した。本発明者らの予測遺伝子リストを用いたこれらの非依存試料のPCA解析は、2試料群(LH+2およびLH+7)の間で最初の二次元を用いて明瞭な分離を可能として、これはデータ情報の53%であった。

【0067】

着床の窓の新しい候補遺伝子の選択：子宮内膜受容性の新しいマーカーを特定するために、本発明者らは、まず、同一の自然子宮内膜周期段階を比較する別の4つのトランスクリプトーム試験(Carson et al., 2002; Riesewijk et al., 2003; Mirkin et al., 2005; Talbi et al., 2006)の患者を用いて、LH+2およびLH+7の試料群の間で著しく変化する遺伝子リストの共通項を求めて、着床の窓の期間中に特異的に変化する797の遺伝子を含む本試験独自の遺伝子リストを特定した。本発明者らはこの同じデータ(797の遺伝子)を用いて階層的なクラスタリングを実施した。この遺伝子のリストは、2つの子宮内膜試料群の分離を可能とした。面白いことに、これらの遺伝子の大部分は着床の窓の期間中にアップレギュレーションされた(アップレギュレーションされた遺伝子746、ダウンレギュレーションされた遺伝子51)。

【0068】

着床の窓の候補遺伝子を選択するために、次に、本発明者らは、着床の窓の期間中に特異的に変化する本試験独自の遺伝子リストを予測遺伝子のリストと比較した。本発明者らは、マイクロアレイ解析による報告書には列記されていない、子宮内膜の受容性を予測する新しい10の遺伝子を選択した。これらの新しい遺伝子の内、4個の遺伝子のみがHaouziらに発表されている。(2009)。発表されたこれらの新しいマーカーは、MFAP5(マイクロフィブリル関連タンパク質5)、ANGPTL1(アンギオポエチン様1)、PROK1とも呼ばれるEG-VEGF(内分泌腺由来血管内皮細胞増殖因子またはプロキネチシン1)およびNLF2(核局在因子2)であり、すべてがマイクロアレイ解析において着床の窓の期間中に、それぞれ、37、12.6、10.2および22.5倍に過剰発現する。さらに、Riesewijkら(2003)およびTalbiら(2006)によって確立された他の2回のマイクロアレイ解析、ならびに本発明者らの試験で見出された遺伝子をヒト子宮内膜受容性の陽性対照として選択した。この遺伝子は、LAMB3であり、本発明者らの試験では20.4倍に、RiesewijkおよびTalbiの試験では、それぞれ、15倍および6.6

10

20

30

40

50

倍に過剰発現した。6つの未発表の遺伝子は、BCL2L10 (BCL2様10)、CD68、TRPC4 (一過性レセプター潜在陽イオンチャネル、サブファミリーC、メンバー4)、SORCS1 (ソルチリン関連VPS10ドメイン含有レセプター1)、FST (フォリスタチン)、およびKRT80 (ケラチン80)であり、これらは、着床の窓の期間中に同じく、それぞれ、4.7倍、5.3倍、7.7倍、9倍、9倍および14.6倍に過剰発現した。

【0069】

考察：

本発明者らのマイクロアレイ解析により、本発明者らは、ヒト子宮内膜受容性の一連のバイオマーカーを特定して、その中から、11の候補であるLAMB3、MFAP5、ANGPTL1、EG-VEGF (PROK1)、NLF2、FST、KRT80、BCL2L10、CD68、TRPC4およびSORCS1を選択した。

【0070】

ヒヒの子宮内膜の場合、ラミニンの発現が着床部位および子宮内膜の至るところで増加して、子宮内膜の受容性におけるこの細胞外マトリックス成分の役割を示唆する。また、LH+7試料群ではMAGP2とも呼ばれるMFAP5も過剰発現した。この遺伝子は、脈管構造のような弾性組織の重要な構成成分であるミクロフィブリルの成分であるミクロフィブリル関連糖タンパク質をコードする。従って、このタンパク質は、コラーゲンのような細胞外マトリックスおよびインテグリンのような細胞関連タンパク質の双方との相互作用によって、細胞マトリックスの相互作用を潜在的に調節して、細胞の情報伝達経路に
20
関与するように位置付けられる。さらに、最近では、MFAP5が、胚形成期間中の脈管構造、発生および正常な恒常性に関与する経路であるNotch情報伝達活性化において役割を担うことが示唆されている。

【0071】

本発明者らは、血管内皮細胞増殖因子ファミリーの2つのメンバーであるEG-VEGFおよびANGPTL1がヒトの子宮内膜で着床の窓の期間中に過剰発現することも見出した。PROK1とも呼ばれる内分泌腺由来血管内皮細胞増殖因子 (EG-VEGF) は、主としてステロイド産生組織で発現する新たに特定された血管形成および透過性促進因子である。EG-VEGFは、生殖年齢の患者由来の正常な着床前後の子宮内膜試料中でも発現して、閉経後の患者および子宮内膜癌の患者に由来する子宮内膜試料中で検出されることはほとんどない。EG-VEGFは、主として腺上皮細胞で発現して、ピークのタンパク質発現は月経周期の黄体期中期である。ヒトの子宮内膜にEG-VEGFおよびその受容体であるPROKR1が共存することは、EG-VEGFが増殖、血管形成および透過性をレギュレーションして、内皮の開窓の形成を誘導し得ることを裏付けるものである。ANGPTL1 (アンジオポエチン様1) はアンジオポエチン関連タンパク質ファミリーのメンバーである。インビトロ試験において、ANGPTL1はホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/Akt経路を介して抗アポトーシス活性を示して、血管形成をレギュレーションする。卵巣切除術を受けた雌のヒツジモデルにおいて、エストラジオール投与後にANGPTL1 mRNAが増加する。本発明者らの試験において、本発明者らは、子宮内膜の着床の窓の期間中にANGPTL1遺伝子が過剰発現することを観察した
30
40

【0072】

本発明者らのマイクロアレイデータおよび定量的PCRの解析では、NLF2遺伝子の発現がLH+7の試料群で強く発現して、着床の窓の期間における子宮内膜の再構築において役割を果たすことを示唆する。子宮内膜の間質への侵入は炎症によって促進される。C2CD4B (C2カルシウム依存ドメイン含有4B) とも呼ばれるNLF2は、最近、核因子として、また内皮細胞の炎症において役割を担う調節遺伝子のファミリーのメンバーとして同定された。インターロイキン1ベータで処理したヒト微小血管内皮細胞のゲノムワイドアレイスクリーニングにおいて最初に同定されたNLF2は、内皮細胞の炎症において細胞の構造および接着の変化を惹起する情報伝達経路の一部と思われる。
50

【 0 0 7 3 】

フォリスタチン (F S T) は、濾胞刺激ホルモン (F S H) の放出を特異的に阻害する一本鎖の性腺糖タンパク質である。フォリスタチンは、これまでは、子宮内膜に存在して、間質および上皮の細胞に局在するとされていた。上皮細胞からの F S H の分泌は、子宮腔内でのアクチビンの生物学的利用能を制限するために重要であると思われる。フォリスタチンは、アクチビン非依存性の影響も有していて、インヒピンおよび B M P (骨形成タンパク質) ファミリーの一部のメンバーを含む T G F - ベータサブファミリーのその他のメンバーを結合することもできる。ヒトの子宮では、 F S T をコードする遺伝子の発現パターンは、 I V F 後の胚盤胞の着床および順調な妊娠の結果における重要な事象である脱落膜化における役割と一致する。さらに、対照の妊孕性の女性に比して、 I V F 後に着床不全を示した女性の子宮内膜の上皮細胞において F S T の発現が少ないことが、近年報告されて、 F S T が着床において役割を担う可能性があるという見解を強化している。この所見は、ヒト受容性子宮内膜において F S T 遺伝子の発現の過剰発現を示した本試験と一致した。

10

【 0 0 7 4 】

本発明者らは、前受容性の子宮内膜に比して受容性子宮内膜における過剰発現により判断されるようになり、ケラチン 8 0 (K R T 8 0) 遺伝子が着床の窓のバイオマーカーであることも特定した。ケラチンは、特異的な機能を達成するために不可欠な上皮細胞の細胞構造を司る中間のフィラメントタンパク質である。これらのタンパク質は、食作用、飲作用、細胞接着、細胞運動性、亜細胞性の組織化および細胞分裂において、細胞レベルで必要とされる。組織レベルでは、構造タンパク質は、収縮およびインタクトな上皮において必要である。構造タンパク質は、微小管ネットワークを介して細胞内の輸送にも役割を担っている可能性がある。

20

【 0 0 7 5 】

アポトーシスは、周期の分泌期後期および月経期の期間中に子宮内膜の機能層から老化細胞を排除することによって、月経中の細胞の恒常性の維持に重要な役割を果たす。アポトーシスは、分泌期後期および月経中の子宮内膜の腺上皮において検出されて、増殖期または分泌期の開始時にはアポトーシスはごく少量しか検出されなかった。タンパク質の B c l 2 ファミリーのメンバーは、アポトーシスを制御してアポトーシス促進性および抗アポトーシス調節物質として作用する経路の基本的な要素である。これらの内、細胞アポトーシスを抑制することが先に示されている B C L 2 L 1 0 は、本試験では、ヒト受容性子宮内膜においては、前受容性子宮内膜に比べて、過剰に発現することが見出された。この所見は、月経周期を通じてのアポトーシス検出の期間と整合が取れていた。

30

【 0 0 7 6 】

マクロファージおよび樹状細胞の数および分布の変化は、着床および早期妊娠の成功におけるこれらの免疫担当細胞の想定される役割を示唆し得る。本試験において、本発明者らは、ヒトの単球および組織マクロファージによって高度に発現される膜貫通糖タンパク質をコードする受容性子宮内膜中の C D 6 8 遺伝子の過剰発現について報告した。このタイプ I の複合的膜タンパク質は、着床の窓の期間中に大量に発現する組織 - および臓器 - 特異的なレクチンまたはセレクチンに結合する。

40

【 0 0 7 7 】

T R P C 4 は、ヒトの子宮筋層においてカルシウム情報伝達に対してストア作動性カルシウム流入 (S O C E) を促進することができる一過性レセプター電位陽イオンチャネルファミリーの 1 つのメンバーである。 T R P C 4 の m R N A およびタンパク質は、先に、妊娠期のヒトの子宮筋層において過剰発現することが述べられている。しかし、本発明者らは、この遺伝子が受容性の子宮内膜において前受容性の子宮内膜に比べて過剰発現することを初めて報告して、着床過程における T R P C 4 の潜在的な役割を示唆する。

【 0 0 7 8 】

本試験においてヒトの着床の窓の期間中に過剰発現する S O R C S 1 は、 N 末端 V p s 1 0 p - D (酵母液胞タンパク質選別 1 0 タンパク質より命名) 、高レクチンドメイン、

50

単一の膜貫通ドメイン、および短い細胞質ドメインを含む、哺乳動物Vps10p-ドメインレセプターファミリーのサブグループの最初に同定されたメンバーである。sorCS1は、トランスゴルジネットワークにおいて開裂して成熟型となるプロタンパク質として合成されて、レセプターの異なる輸送を調節することができる異なる細胞質ドメインを持つ3つのイソ型として発現することが報告されていることから、この遺伝子の機能は解明されなかった。

【0079】

結論として、前受容性および受容性段階の間での子宮内膜の推移に関するトランスクリプトームパターンの解析を用いた本発明者らのデータは、特に複数回の着床不全を示す患者において、新しい展望を開くことができた。これらのバイオマーカーの解析は、(i) I V F手順に参加するすべての患者の子宮内膜の受容性状態の評価、およびその結果として、一部の正常な応答患者における変化した子宮内膜プロファイルの特定を可能とする。続いて、自然周期中にこれらのバイオマーカーによって与えられる情報は、その後、着床不全の患者におけるI V Fプロトコルを修正させるために利用することができる。

【0080】

実施例2：自然周期における子宮内膜受容性評価を用いた患者の例示的プロファイル

本発明の一つの態様に従って、患者の子宮内膜の受容性の評価は、自然周期の着床の窓(LH+7)の期間中における11のバイオマーカー(Win Test：窓着床試験)のmRNAの発現の測定からなる第1の工程(図2)、ならびに(i)患者が着床の窓の遅延を示して、そして、この場合はWin Testが着床の窓の検出に役立つ；(ii)Win Testによって患者が受容性の子宮内膜を呈していないことを確認することを可能として、そして、この場合は養子縁組の手順に向けて調整されるという2つのシナリオを含む第2の工程(図3：I V F手順期間中の患者ケアマネジメントの結果)を含む。

【0081】

実施例3：刺激された周期における子宮内膜受容性評価を用いた患者の例示的プロファイル

発明の一つの態様に従って、自然周期および刺激された周期で同一患者に由来する遺伝子発現を比較した結果、大半のケース(86%)において中等度に変化した受容性または少数のケース(14%)においてCOHプロトコル期間中に大きく変化した受容性のいずれかに関連する子宮内膜のプロファイルが明らかとなった(図4)。本発明は、Win Testの2つの結果を提供する：i) I V F手順の間中は新鮮な胚の移植を再考することができる。胚の凍結によってI V Fの試行を省くことができ、胚の移入は自然周期の遅い時期に実施することができる；ii)複数回の着床不全の患者では、子宮内膜プロファイルの分析(Win test)によってCOHプロトコル中の大きく変化したプロファイルを明らかにすることができて、臨床医がI V F刺激プロトコルを修正させるか、あるいは自然周期中のより遅い時期に胚の移植を実施するか、または患者を養子縁組の手順に向かわせることを促す(図5)。

【0082】

実施例4：「アラカルト」「十分な」治療をセットアップする手段としてのWin Test

本発明者らは、双方のプロトコル(GnRHアンタゴニストおよびアゴニスト)が子宮内膜の受容性に異なる影響を及ぼすことを説明している。患者ケアマネジメントに関する質問は、治療中の異なるGnRH類似体の影響および患者の不均一な反応に関して、「どのプロトコルを使用したか？」ということである。

【0083】

本発明の一つの態様に従って、複数回の着床不全の患者において、子宮内膜プロファイルの分析(Win test)は臨床医がI V F刺激プロトコルを修正することに役立つ(図6)。

【0084】

実施例5：婦人科疾患を有する不妊女性の受容性状態を確認するためのWin Test

本発明の一つの態様に従って、Win Testは、婦人科疾患を有する女性の子宮内膜受容性

10

20

30

40

50

を評価するためのマーカーとして使用することができる。これらの患者における低妊孕率の考え得る原因である、いくつかの婦人科疾患（例えば、子宮内膜症および腺筋症）と異常な子宮内膜受容性との潜在的な関連性がWin Testで調べることができる（図7）。

【0085】

実施例6：卵母細胞提供のためのレシピエント患者における子宮内膜準備期間中のホルモン補充療法の影響を確認するためのWin Test

本発明の一つの態様に従って、Win testは、子宮内膜の成熟のためのホルモン療法の改善に用いることができる。Win Testによって、自然周期に比べて、ホルモン補充療法（エストロゲンおよびプロゲステロン療法）下での卵母細胞レシピエント患者の着床の窓の時期における変化した子宮内膜のプロフィールが明らかとなる（図8）。

10

【0086】

「Win Test」（独自の遺伝子リストおよび予測遺伝子のリストの双方から得られた11の遺伝子セットを含む）は、独自のリストから得られた複数の遺伝子がプロテオミクスレベルの他の試験によって見出されていることから、特に関連性のある診断ツールである（表2）。

表2：

【0087】

【表2】

表2: 子宮内膜受容性のバイオマーカーと呼ばれる遺伝子とタンパク質発現レベルの相関性

20

名前	記号	トランスクリプトーム試験						プロテオミクス試験	
		Carson et al. (2002)	Riesewijk et al. (2003)	Mirkin et al. (2005)	Talbi et al. (2006)	Haouzi et al. (2009a)	Díaz-Gimeno et al. (2011)	Li et al. (2006)	Dominguez et al. (2009)
アネキシンA4	ANXA4		x 4	x 6.5	x 4.9	x 2.6	x 4.7	x 2.1	x 1.9
アネキシンA2	ANXA2		x 4	x 5.6	x 2				x 2.1
モノアミン オキシダーゼA	MAOA		x 15			x 9.9	x 8.4		x 3.4
トランスグリン2	TAGLN		x 6			x 5.9			x 1.7
L-プラスチン	LCP1			x 2.6	x 1.6				x 1.6
プロゲステロン レセプター膜成分1	PGRMC1				x -1.8				x -2.4
スタスミン 1	STMN1			x -3.2					x -2.2
アポリポタンパク質 L2	APOL2					x 2.4			x 3.7
アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 ファミリー、メンバーA3	ALDH1A3					x 16.5			x 1.8
S100 カルシウム結合 タンパク質 A10	S100A10					x 3.5			x 4.8

30

【0088】

参照：

40

本出願を通じて、様々な参照が本発明が関連する現在の技術水準を説明している。これらの参考の開示内容を引用例として本明細書に取り込む。

【0089】

【表 3】

Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. (2002). Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod.* 8(9):871-9.

De Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J. and Miyano, S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004;20:1453-4.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genomewide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:14863-8.

Eyheremendy V, Raffo FG, Papayannis M, Barnes J, Granados C, Blaquier J. (2010) Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 93(3):769-73.

Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Rème T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod.* 2009;24:198-205.

Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JJ, Williams S, Bocca S, Oehninger S. (2005). In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod.* 20(8):2104-17.

Rème T, Hose D, De Vos J, Vassal A, Poulain PO, Pantesco V, Goldschmidt H, Klein B. A new method for class prediction based on signed-rank algorithms applied to Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2008;11:9-16.

Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod.* 9(5):253-64.

Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veeck L, Davis OK, Rosenwaks Z. (2004) Autologous endometrial co-culture in patients with IVF failures: outcome of the first 1030 cases. *J Reprod Med* 49(6), 463–7.

Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. (2006). Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology.* 147(3):1097-121.

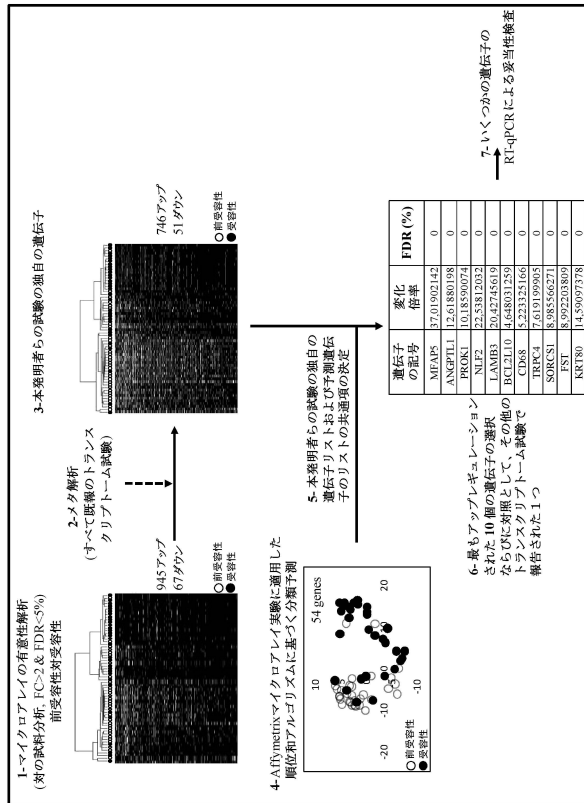
10

20

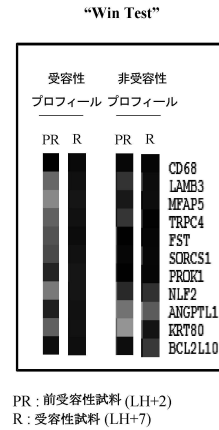
30

40

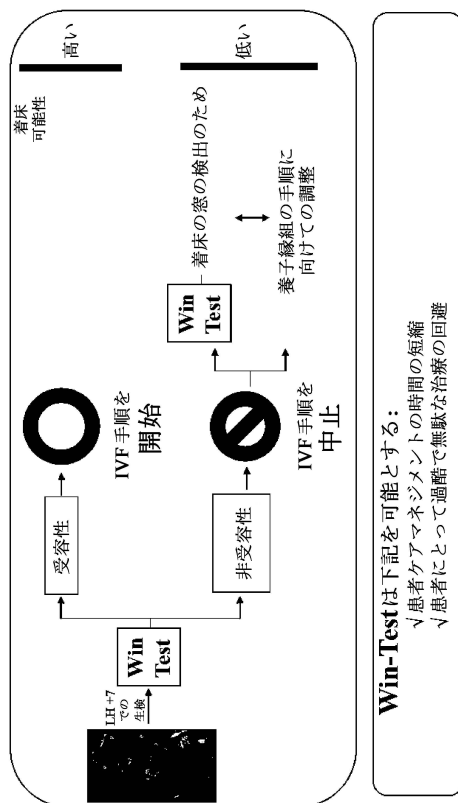
【図 1】



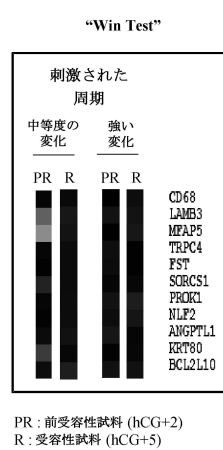
【図 2】



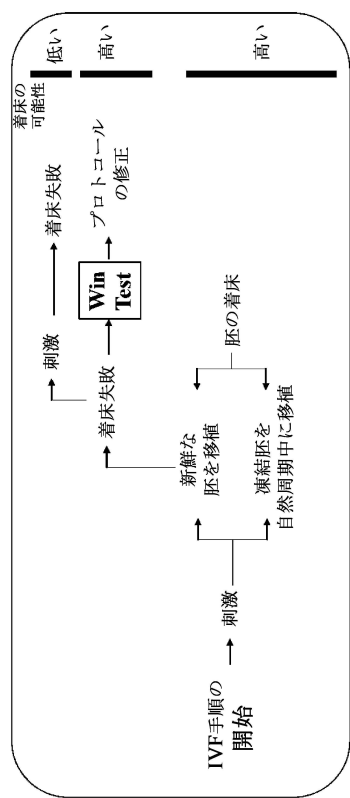
【図 3】



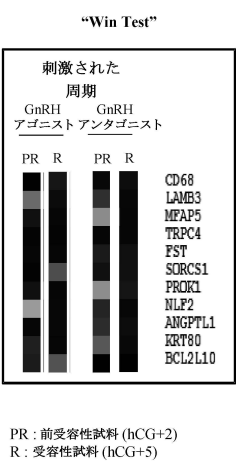
【図 4】



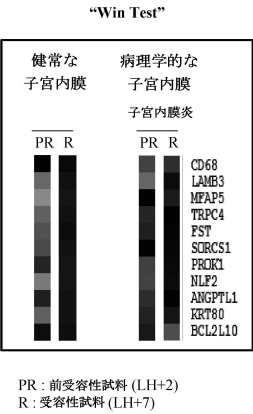
【図 5】



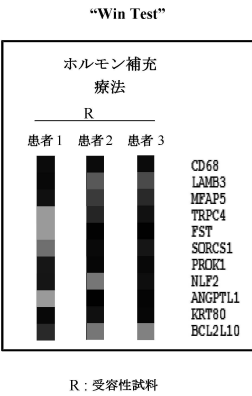
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(73)特許権者 515011944

ユニヴェルシテ・ドゥ・モンペリエ

フランス・F - 3 4 0 0 0・モンペリエ・リュ・オーギュスト・ブルソネ・1 6 3

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ハママー, サミル

フランス国、エフ - 3 4 2 9 5 モンペリエ・セデックス 5、アヴニユー・オーギュスタン・フリシェ 8 0、オピタル・サン・エロイ、イエールベ・アンセルム・ユー 1 0 4 0

(72)発明者 アウジ, デルフィーヌ

フランス国、エフ - 3 4 2 9 5 モンペリエ・セデックス 5、アヴニユー・オーギュスタン・フリシェ 8 0、オピタル・サン・エロイ、イエールベ・アンセルム・1 0 4 0

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 松田 芳子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/64100 (US, A1)

J. Reprod. Med. (2004) vol.49, no.6, p.463 - 467

Hum. Reprod. (2009) vol.24, no.1, p.198 - 205

Fertil. Steril. (2009) vol.92, no.3 supplement, p.556 (O-190)

Mol. Hum. Reprod. (2002) vol.8, no.9, p.871 - 879

Mol. Hum. Reprod. (2003) vol.9, no.5, p.253 - 264

Mol. Hum. Reprod. (2005) vol.20, no.8, p.2104 - 2117

Endocrinology (2006) vol.147, no.3, p.1097 - 1121

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

PubMed

JSTPlus (JDreamII)

BIOSIS/WPI (DIALOG)