

第 62 回日本産科婦人科学会・学術講演会

シンポジウム 2 「子宮内膜の機能調節とその病態」

(3) ヒト着床における子宮内膜腺上皮の複合的機能の分子制御

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

助教 内田 浩

Molecular Mechanism of Multiple and Orchestrated Functions in Endometrial Epithelial Cells during Human Implantation

Hiroshi UCHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo

緒 言

生殖補助医療における日進月歩の技術革新による受精率の向上が不妊症にもたらした医療貢献は言を待たない。しかしながら一方で、近年の胚移植総回数の漸増に対して、妊娠率は伸び悩んでいる現状がある。その原因として、移植胚数の制限なども影響を及ぼしている可能性はあるものの、主因は「着床」の分子機序解明の立ち遅れにあると考えられる。そもそも着床が、子宮内腔というブラックボックスで起こる生命現象であるがために、その解析を技術的あるいは倫理的に阻んでいる。機序解明の立ち遅れた着床の成功率の伸び悩みが、高い受精率をそのまま妊娠率に結びつけることを困難にし、生殖補助医療のひとつのジレンマを形成しているといえる。

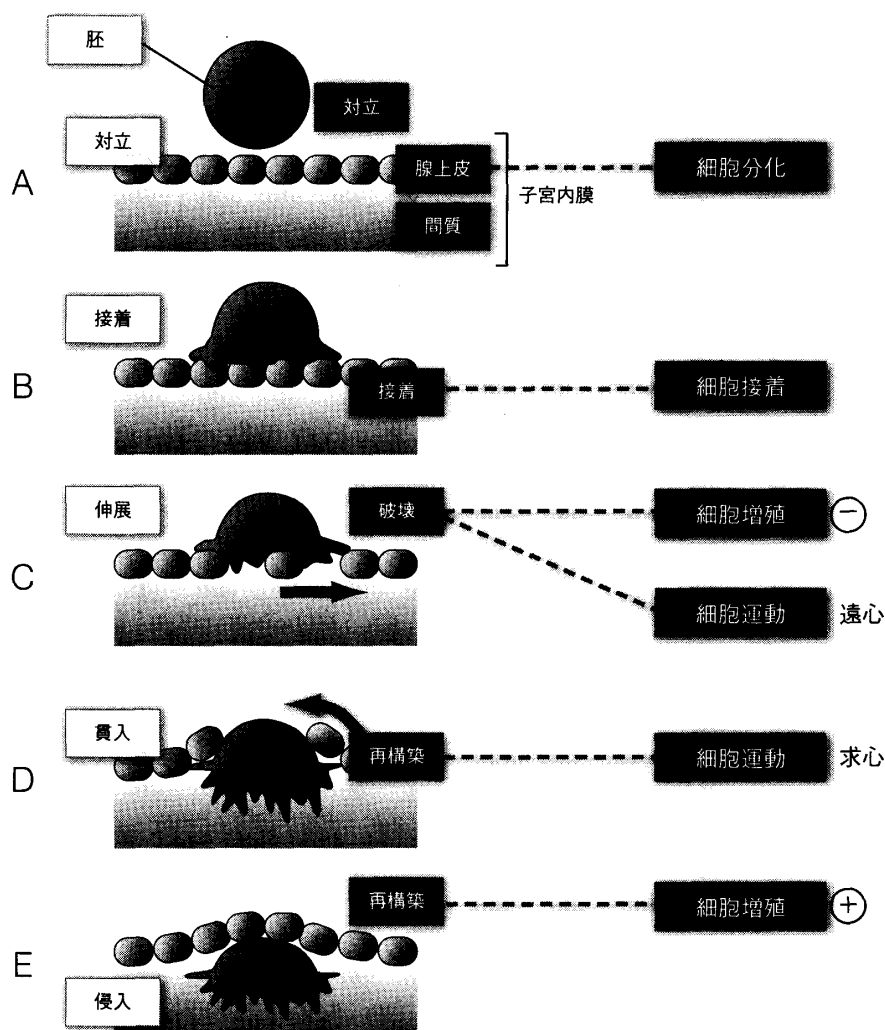
着床は動的な胚と静的な子宮内膜上皮細胞の、二つの状態の異なった異種細胞のコンタクトという生体内でも稀な現象である。胚の対立(apposition)・接着(adhesion)・伸展(outgrowth)・貫入(penetration)・侵入(invasion)という一連の精緻

な現象として捉えられる着床は、受容側の子宮内膜上皮からみれば、対立・接着・上皮バリアの破壊・再構築の多段階作用として再定義される(図 1)。

しかしながら、それら一連の現象を統合的に制御指揮する因子については、合目的でありながら、その存在についてすら明確にされていない。さらに、長い着床研究の中でも、受容側である子宮内膜上皮の着床補助ツールとして臨床利用に至ったものは卵巣ホルモンに限定されており、それに顕著に代替しうる薬剤はいまだ開発されていないのが現状である。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(histone deacetylase inhibitor; HDACI)は転写因子がゲノムにアクセスしやすい状態であるヒストンのアセチル化を可逆的にキャンセルするヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である(図 2)。したがって HDACI の使用は遺伝子転写亢進を促し、分化、増殖などの細胞機能に影響を及ぼす¹⁾。生殖領域においてもその影響についてはすでに指摘されていた²⁾。近年、その HDACI が、子宮内膜間質細胞を

Key Words: Implantation, Glycodelin, Histone Deacetylase Inhibitor (HDACI), N-cadherin, Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)

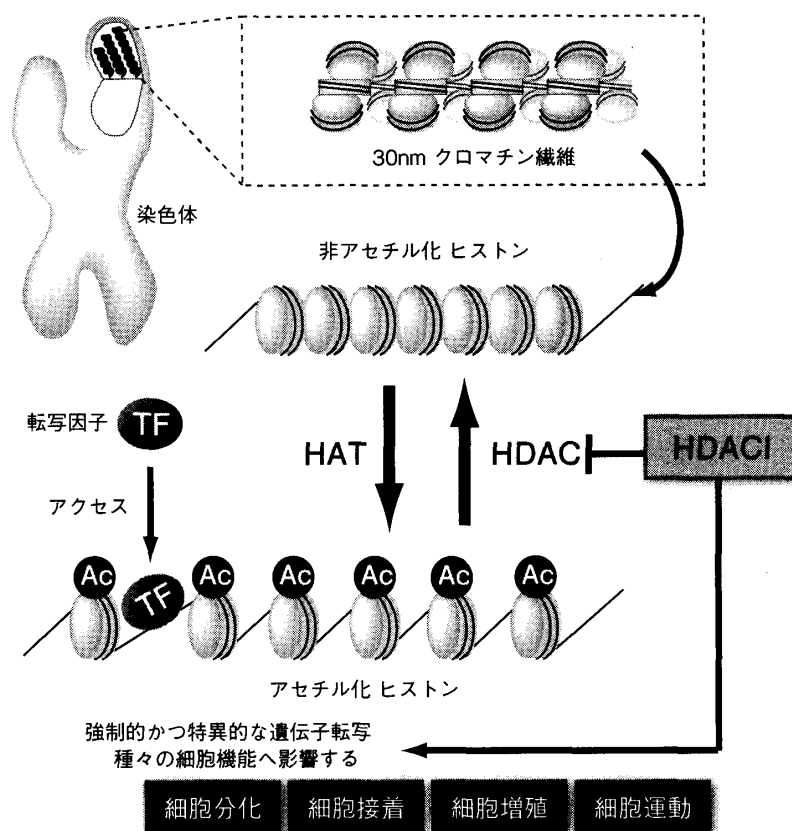


【図1】胚と子宮内膜上皮細胞の動態からみた多段階機序で構成されるヒト着床

分化誘導し、脱落膜化しうることが明らかとなった³⁾。しかし、着床の成立において、胚が最初に相互作用を引き起こすのは間質ではなく上皮細胞である。そのため着床の初期成立から維持までの解析を目的とする本研究では子宮内膜の上皮細胞の動態に着目している。生体内で生殖器官を中心とした部位時期特異的発現をする分泌タンパク質グリコデリン (Glycodelin) は、子宮内膜上皮細胞では着床時期 implantation window に一致して発現が誘導され⁴⁾⁵⁾、精子-胚結合を阻害あるいはNK細胞を不活性化することで多胎予防や、妊娠の免疫寛容に関与するとされた⁶⁾⁷⁾。また、IVF 成功例やメトホルミン[®]で排卵が回復した多嚢胞性卵巣症候群患者では血中グリコデリン濃度が高く、逆に機能性不妊、低用量ピル服用者、習慣流産、初期

流早産患者では血中グリコデリン濃度が低いという報告があり、グリコデリンが生殖に正に働くことが強く示唆される⁵⁾。

上皮細胞は生体内で物理的・免疫学的にバリアを形成しており、隣接細胞との接着はタイトであり細胞運動はわずかで静的な状態にあると言える。それら上皮細胞群が中皮細胞様の形態的・機能的変化を経て、運動能力を獲得して動的な状態になる生体反応を上皮間充繊転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) と呼称するが、初期発生段階の分化細胞の生体内移動で認められる。近年は悪性細胞の浸潤能メカニズムとしても着目されている⁸⁾⁹⁾。子宮内膜上皮細胞では卵巣ホルモンの影響で EMT を惹起し、細胞極性が中皮細胞様になり、着床の接着に備えると提唱され



【図2】 ヒストンアセチル化と遺伝子転写機構

た¹⁰⁾.

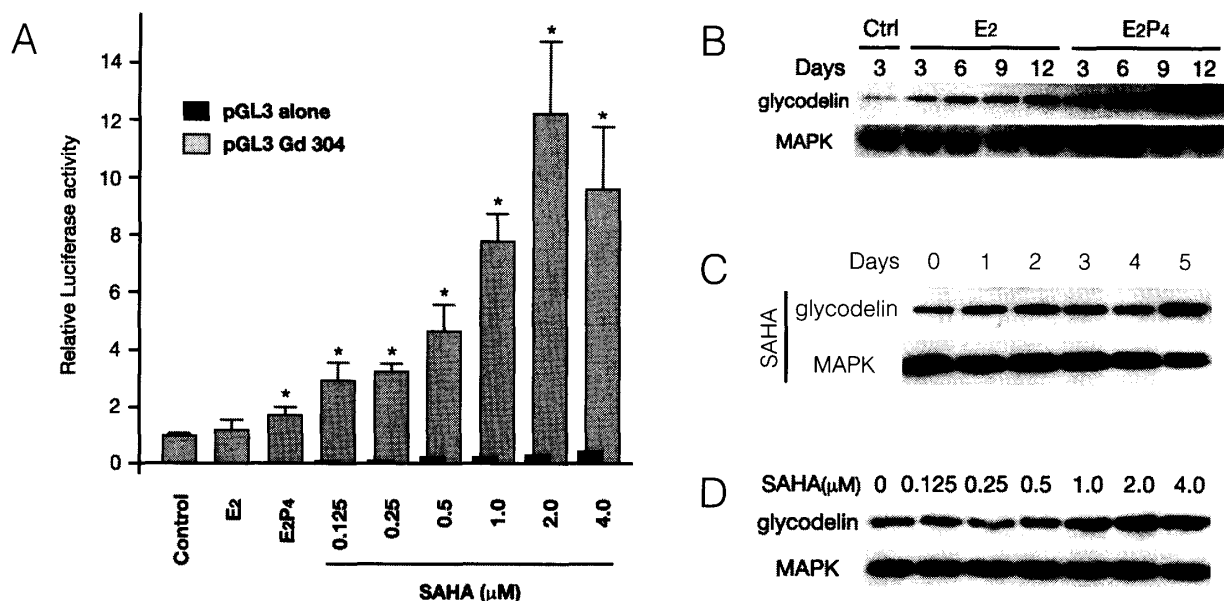
これらの知見から、「卵巣ホルモン(estradiol+ progesterone: E2P4) (およびその代替薬剤としての HDACI) が、グリコデリンの発現誘導を通して子宮内膜上皮細胞の対立・接着・上皮バリアの破壊・再構築の一連の機序に、分化・接着・増殖・運動といった細胞の基本機能を統合的に制御することで関与し、また同時に惹起される EMT が運動を亢進させることで、上皮バリアの再構築を加速させるという合理的・合目的なシステムが存在する」という独自の仮説の証明を試みた。

方法と成績

(1) HDACI による子宮内膜上皮細胞でのグリコデリン人為的発現誘導

本研究は一貫して細胞株を用いた in vitro 系での解析系を採用した。子宮内膜上皮細胞、胚のモデルとして、それぞれヒト子宮内膜上皮細胞株 Ishikawa, ヒト絨毛細胞株 JAR を用いて、定性的ではなく統計学的有意差を求めることを可能とす

る定量的な解析を行った。ヒト子宮内膜上皮細胞モデルとして使用した Ishikawa 細胞は、数ある上皮細胞株の中でも、卵巣ホルモン受容体を保有する希有なものであり¹¹⁾、着床にとって重要な細胞極性も維持されている点でも、ヒト着床研究には最も適しているといわれている¹²⁾。また、HDACI としては、副作用が少ないため、すでに米国ではリンパ腫の治療薬として認可され臨床使用されている suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Zolinza[®]) を用いた。はじめに卵巣ホルモンあるいは SAHA で Ishikawa 細胞にグリコデリンの発現誘導が可能であるか解析を行った。グリコデリンのプロモーターを組み込んだプラスミドを遺伝子導入した Ishikawa 細胞では、SAHA の添加により、卵巣ホルモンよりも効率よく濃度依存的にプロモーター活性が上昇した(図 3A)¹³⁾。免疫沈降およびウェスタンブロットの結果から、グリコデリンのタンパク質発現も SAHA 添加によって時間および濃度依存的に誘導が可能であることが明らかとなった(図 3B~D)¹³⁾。



【図3】 卵巣ホルモン、HDACi とグリコデリンの誘導

(2) HDACi と子宮内膜上皮細胞分化能

ヒト着床の初期段階として、胚と子宮内膜上皮細胞の対立から接着へと進むステップがある。Ishikawa 細胞に卵巣ホルモンあるいは SAHA を添加すると、菲薄扁平化、進展化という形態変化が観察される(図 4A, a~c)。子宮内膜上皮細胞分化の機能マーカーとしてグリコゲンの産生が知られるが、グリコゲンの産生量をアッセイ系で計測すると形態変化同様に卵巣ホルモンおよび SAHA の液性刺激によって、グリコゲン産生量が有意に上昇することが示された(図 4B)。さらに、これらの変化はグリコデリンを small interference RNA (siRNA) の導入によってグリコデリン発現を抑制すると消失した(図 4A, d, 4B)¹³⁾。

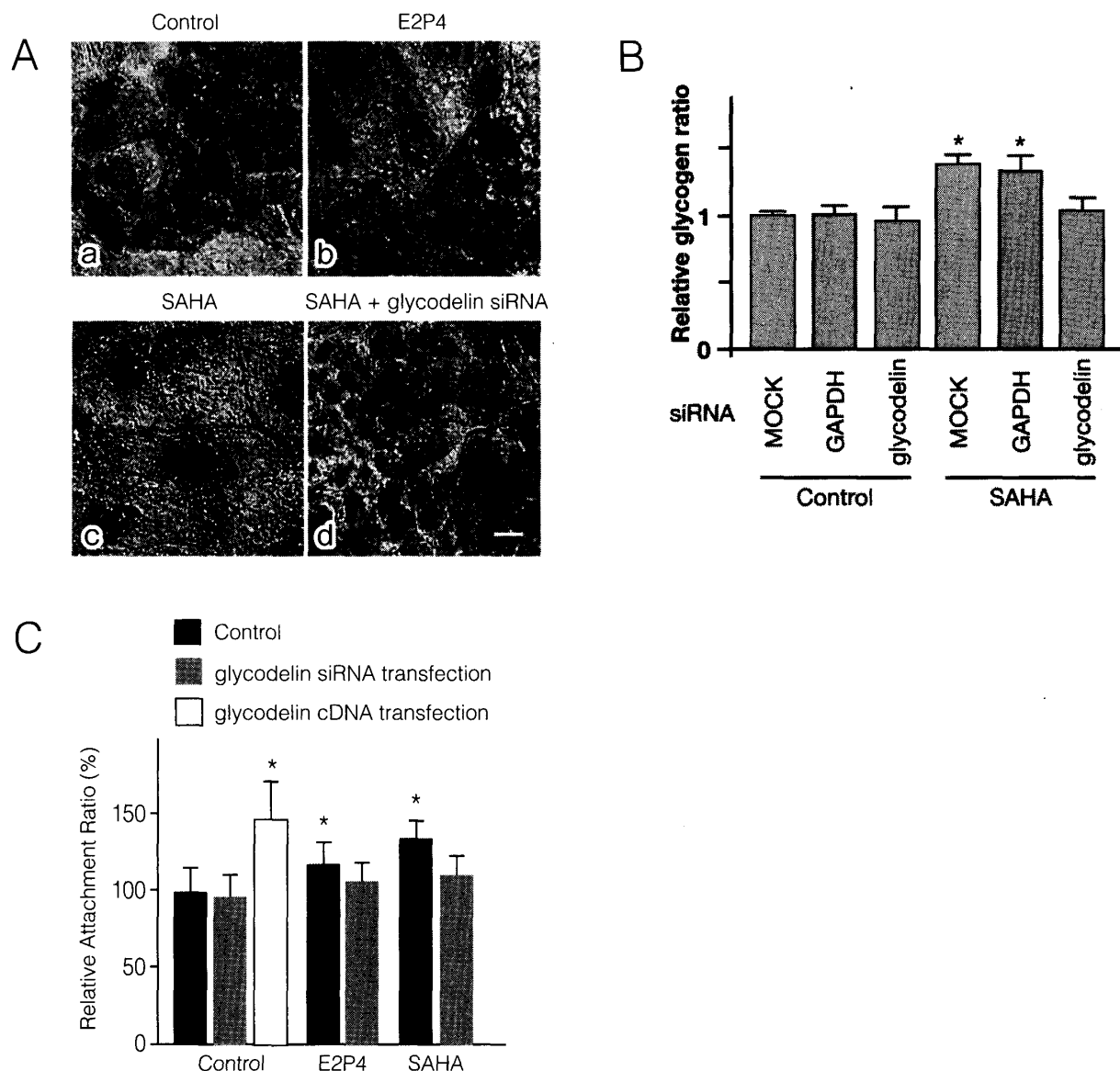
(3) HDACi と子宮内膜上皮細胞接着能

対立に引き続く胚と子宮内膜上皮との接着の機能解析として、in vitro 着床アッセイを行った。絨毛細胞株 JAR をトリプシン処理で単独細胞として振盪培養を行うと、球状細胞塊(spheroid)が形成されるため、振盪培養時間を調整し径 50~100 μm 程度とし、胚モデルとして利用した。この spheroid と飽和培養した Ishikawa 細胞を一定時間の共培養に供すると、一部の胚モデルが Ishikawa 細胞に接着するため、その比率を薬剤無添加群と比較し相対的接着率を算出した。その結

果、卵巣ホルモンおよび SAHA による液性刺激は接着率を上昇させ、分化機能解析同様に、その上昇は siRNA によるグリコデリンの発現抑制によってキャンセルされた。また、逆にグリコデリン cDNA の遺伝子導入を行うと、一切の液性刺激なしに顕著な着床率の上昇を示した(図 4C)¹⁴⁾。

(4) HDACi と子宮内膜上皮細胞増殖能

グリコデリンによる Ishikawa 細胞の細胞増殖能への影響を調べるために、蛍光タンパク質 EGFP あるいは EGFP タグを付したグリコデリン遺伝子を導入した Ishikawa 細胞の増殖解析を行った。一定期間の培養の結果 48 時間後に EGFP グリコデリン遺伝子導入による有意な細胞増殖抑制を観察した(図 5A)。両細胞とも EGFP の蛍光によってセルソーターで確実に遺伝子発現をしている細胞を集め、ヘキスト染色による DNA 量解析を行い細胞周期の様子を解析した。その結果、EGFP グリコデリンの遺伝子導入は S 期の細胞を減少させ、G1 期の細胞を増加させた(図 5B)。さらに、細胞回転の制御因子群の発現動態を RT-PCR 法を用いて調べたところ、EGFP グリコデリン発現細胞群では、細胞回転抑制因子群の p21, p27, p16 が有意差をもって発現上昇していることが明らかとなった(図 5C)¹⁵⁾。EGFP タグの付されていないグリコデリン遺伝子を導入しても、一過性導



【図4】 卵巣ホルモン、HDACi と子宮内膜上皮細胞の分化・接着

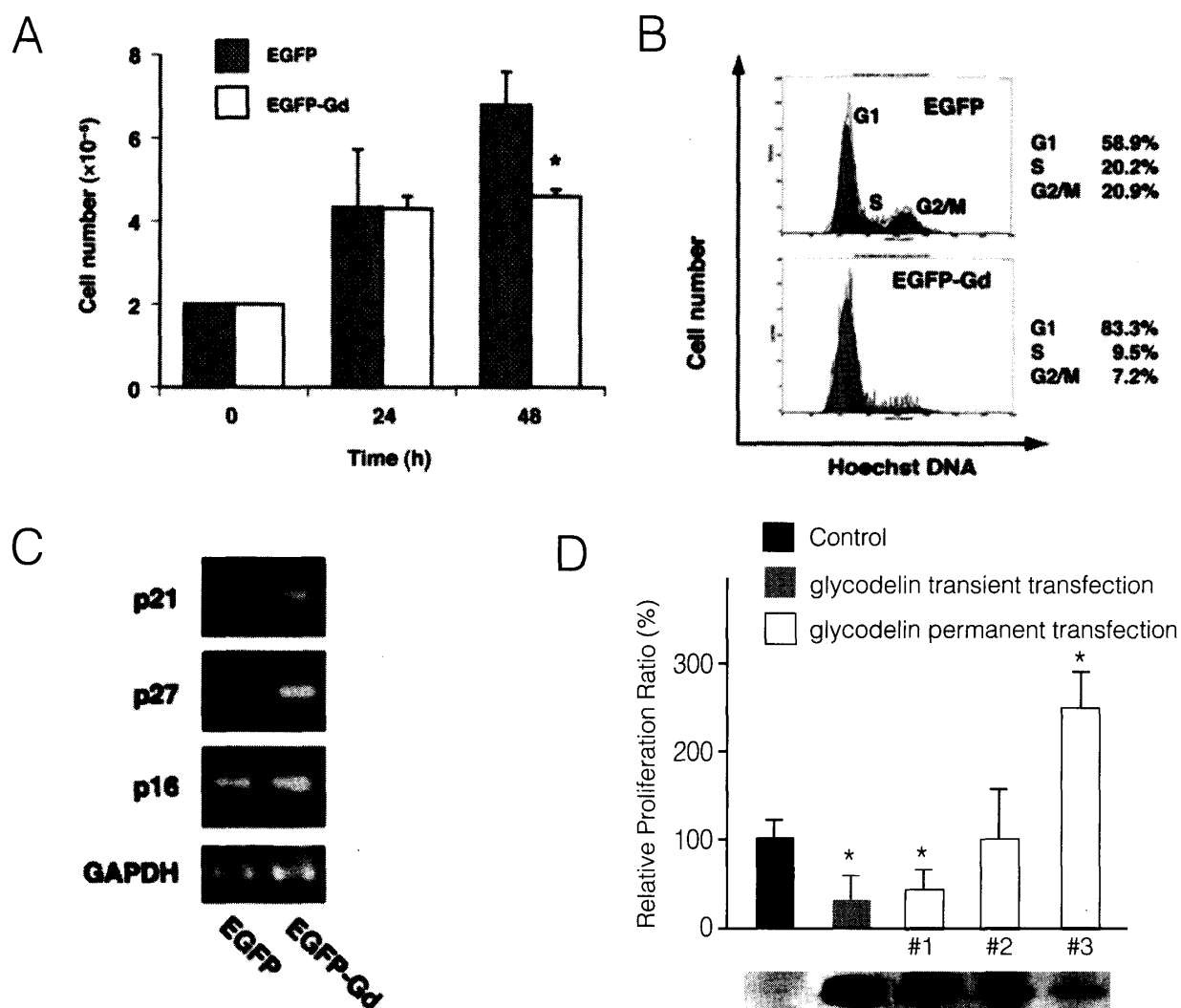
入による大量発現によって Ishikawa 細胞の増殖能は明らかに抑制されるが、興味深いことに恒久的発現株をクローニングすると、グリコデリンの発現量が減少するに従い、むしろ細胞増殖能は上昇していく様子も観察された(図 5D)。

(5) HDACi と子宮内膜上皮細胞運動能

図 1 の仮説図で示したように、ヒト着床における子宮内膜上皮細胞の細胞運動は、胚の侵入経路の形成を目的とした上皮細胞層バリアの破壊にあたる遠心方向への運動と、胚の通過後の破壊されたバリアの再構築を目的とした求心方向の運動が起こると考えられる。先行する遠心方向の細胞運

動によって胚は貫入と同時に伸展(outgrowth)が促進されることがヒト子宮内膜間質細胞の研究から明らかになっている¹⁶⁾。そこで上皮細胞の遠心方向の運動は、胚の伸展面積の比較で検討することとした。胚伸展面積はコントロールと比べ、SAHA 添加によって卵巣ホルモン添加以上に有意に増加した(図 6A, a~c)。

一方、求心方向の細胞運動は空隙を充填するための運動であることから、同様の性質の運動の定量解析である創傷治癒アッセイをもって検討した。飽和培養の Ishikawa 細胞をスクラッチして無細胞領域を作成し、一定時間の培養後に閉鎖し



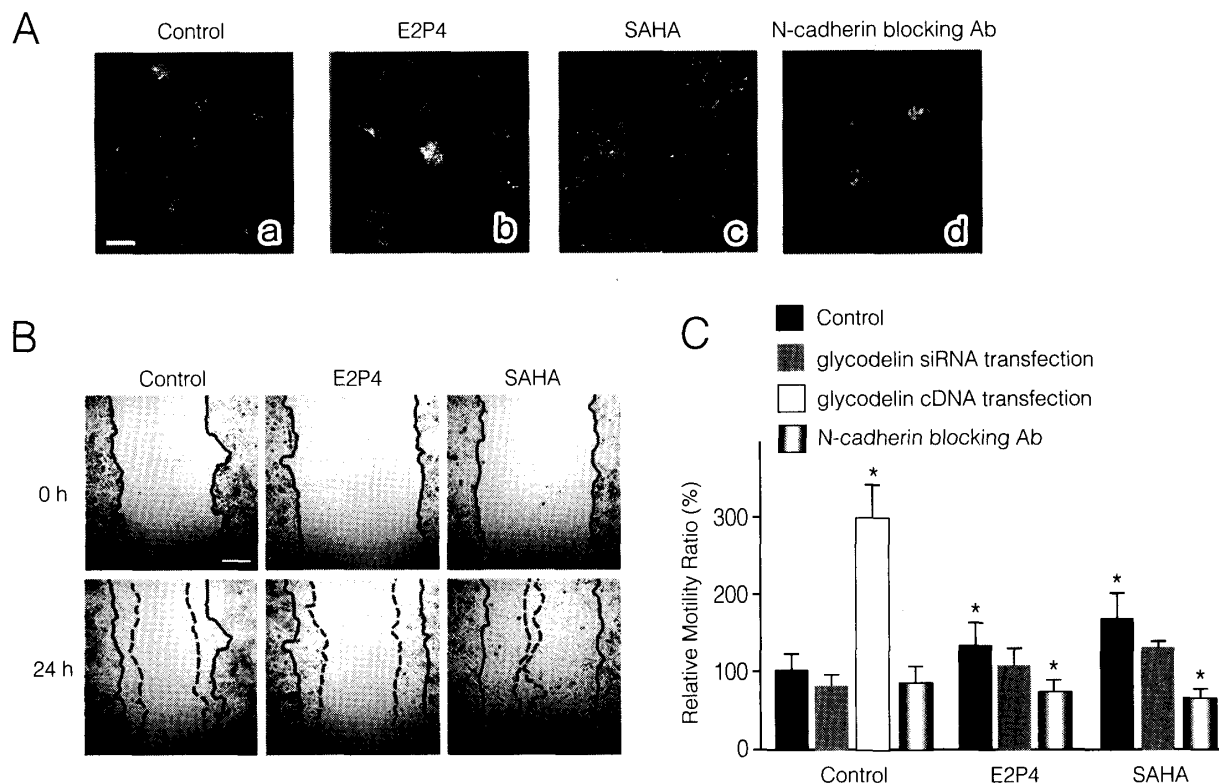
【図5】 卵巣ホルモン、HDACI と子宮内膜上皮細胞の増殖

た創傷の面積の定量解析を行ったところ、卵巣ホルモンあるいはSAHA刺激により有意差をもって求心方向の細胞運動能は上昇していた(図6B, C)¹⁷⁾。

(6) HDACI と子宮内膜上皮細胞の EMT

前記の通りヒト着床においても子宮内膜上皮細胞は遠心方向、求心方向双方に細胞運動を示す可能性が示唆されることから、上皮細胞の運動に参与する EMT が惹起されている可能性の検討を行った。EMT における特徴的所見のひとつに、上皮細胞の細胞細胞間接着分子カドヘリンが E-cadherin から N-cadherin 主体に変わるカドヘリンスイッチと呼ばれる現象がある⁸⁾⁹⁾。そこで、卵巣ホルモン添加および SAHA 添加双方でカドヘリン発現に変化があるか検討してみたところ、液性

刺激による E-cadherin の減弱、N-cadherin の増加という、いわゆるカドヘリンスイッチが、生化学的・細胞免疫学的に観察された。さらにその傾向は胚モデルである JAR spheroid を添加し共培養することで、より顕著になることを見いだした。同様の液性刺激および胚モデル接着による発現誘導は、カドヘリンとは別の中皮細胞マーカーであるビメンチン染色でも観察された。一方、N-cadherin の局在を in vitro 着床アッセイにおいて抗体による染色で観察したところ、胚モデル JAR spheroid を中心とした同心円上に、胚からの距離依存的に胚近傍でより強く局在することが明らかとなった(図7)。また、前記細胞運動機能の遠心方向、求心方向のそれぞれの機能亢進は N-cadherin の機能阻害抗体の添加で抑制された(図6)。



【図6】 卵巣ホルモン、HDACIと子宮内膜上皮細胞の運動

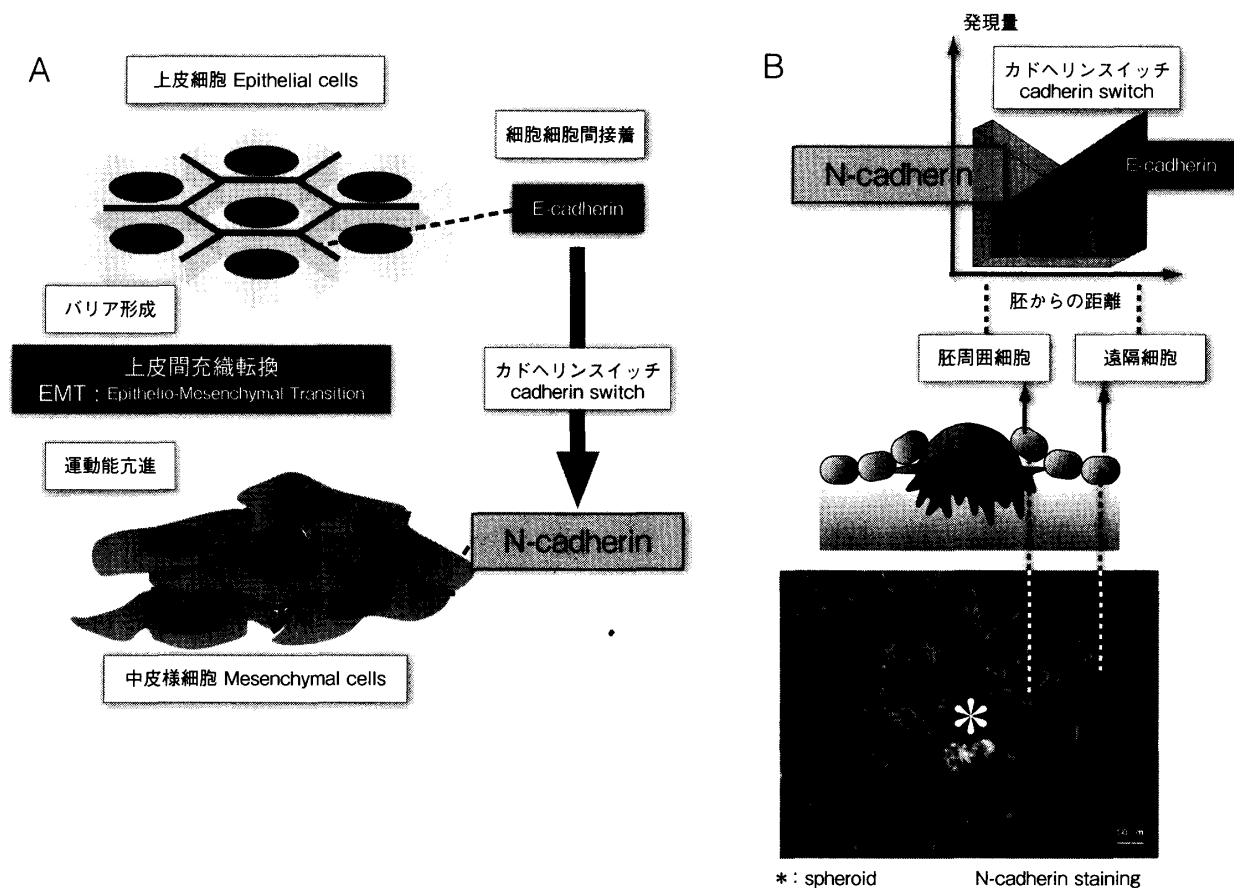
考 察

ヒト着床は胚の動態から子宮内膜との対立・接着・伸展・貫入・侵入と多段階に進行していくことが知られている。一方で胚の受容側にあたる子宮内膜上皮細胞からの視点では、ヒト着床は胚との対立から接着へと進み、次に、胚の貫入のためのスペース形成を目的とした上皮細胞層バリアの破壊が起こる。そして最終的には物理学的・免疫学的に無防備な貫入胚の被覆のために、破壊された上皮細胞層バリアの迅速な再構築が行われると考えられる(図1, 8)。しかしながら、子宮内膜上皮細胞のヒト着床における動態の解析は思うほど進んでいない。例えば、最終段階の再構築に関しては、フィブリン様物質が一過性に形成されて被覆し、やがて元通りになるように描かれていることが多いが、その一切の機序は不明である¹⁸⁾。

本研究ではヒト着床における子宮内膜上皮細胞の一連の動態の機序解明のために、対立・接着・破壊・再構築のマルチステップを、分化・接着・増殖・運動の4つの細胞基本機能の組み合わせと

捉えるアプローチを試みた。

最初のステップは胚と子宮内膜上皮細胞層とのアクセスであるが、受容側である子宮内膜上皮細胞層がその受容体制の準備をいつ開始するのかについては議論の決着をみていない。すなわち、胚の接近によって対立に先立って開始されるのか、あるいは胚との対立や接着が引き金となるのかという議論である。本研究の結果では、卵巣ホルモンを添加することでグリコデリンがあらかじめ発現誘導された¹³⁾。すなわち子宮内膜上皮細胞の種々の機能へ影響を及ぼしうるグリコデリンの発現誘導は、胚の存在を必要としていないことを示している(図3)。これは生体内におけるグリコデリンの着床期での発現上昇⁴⁾⁵⁾からも支持されることであるが、子宮内膜上皮細胞の胚受容体制は胚の到来前から準備されていると考えられる。グリコデリンの発現上昇とともに、卵巣ホルモン添加はEMTに特徴的な、ビンキュリンの発現誘導や、カドヘリンスイッチ(E-cadherinの減弱、N-cadherinの増強)を惹起することが示された(図7)¹⁷⁾。EMTは、上皮細胞が中皮様細胞となり運動



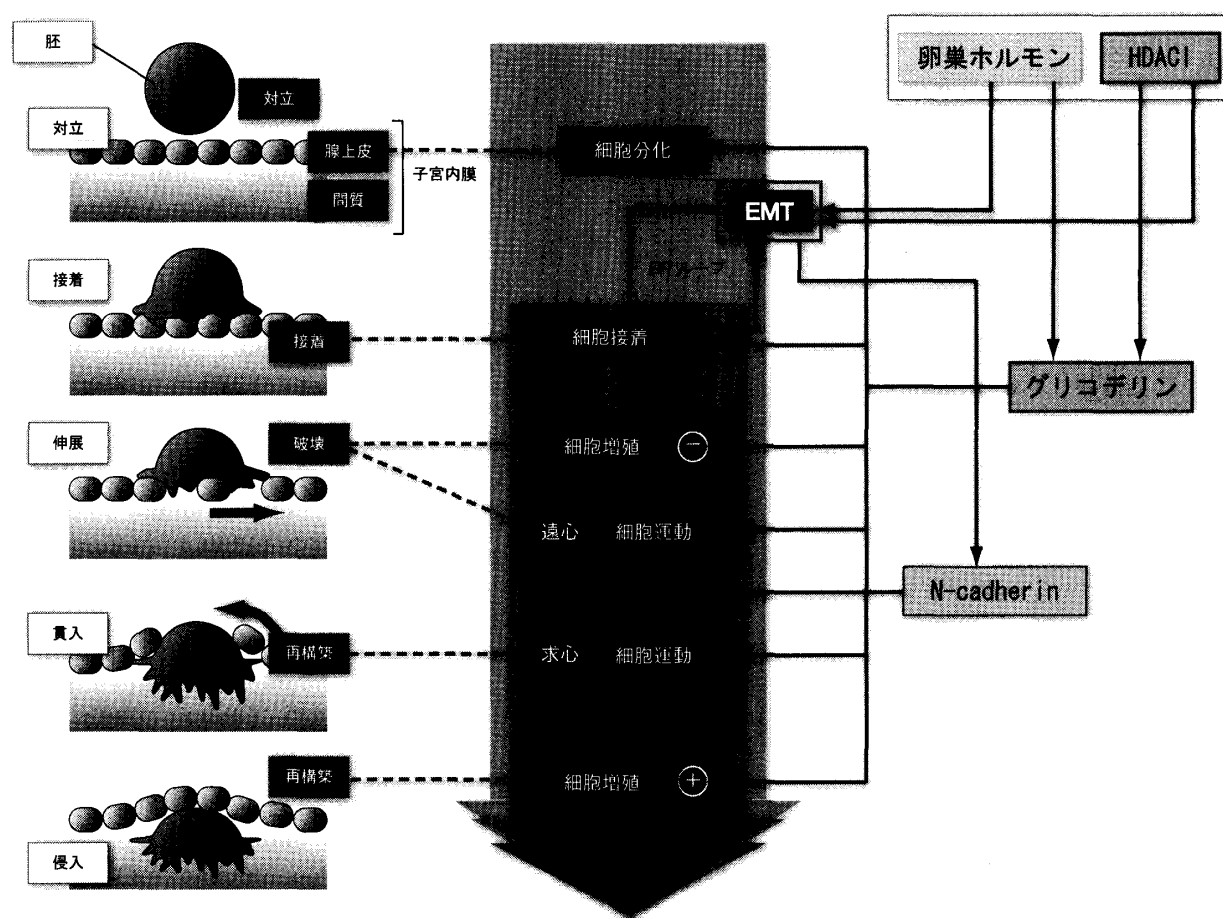
【図7】 ヒト着床と EMT

能を亢進する現象としてとらえられているが、運動能の亢進とは、別の角度から考えれば、運動能を裏打ちするためのアクチンなどの細胞内の細胞骨格タンパク質群の再配列が起こることであり、同時に細胞の運動局面においては細胞の極性が変化することが要求されるということである。この細胞の極性変化はヒト着床にとって重要な役割を占めていることが知られている¹⁰⁾。EMT 様変化を通じたと考えられる細胞極性変化は間接的に細胞の形態変化としてとらえられた(図 4A)¹³⁾。つまり、ここでも胚の到来前に卵巣ホルモンという液性刺激によって子宮内膜上皮細胞側は胚の受容のための準備を開始あるいは完了していることを示唆している。そして、合理的なことに EMT 様のカドヘリンやビンキュリンの特徴的な発現変化は、胚モデルとの共培養(in vitro 着床アッセイ)によって、さらに顕著な効果として現れた。この EMT ループとも呼べる回路は、卵巣ホルモンが胚到来の有無を問わずに、子宮内膜上皮細胞層の

胚受容の準備開始のトリガーとなりえること、そしてさらに実際に胚が到達することで、胚受容に適した子宮内膜上皮細胞の環境はさらに加速あるいは維持されるという合理的なシステムの存在が示唆される(図 8)。

そして恐らく卵巣ホルモンや胚の対立によって変化を誘発された細胞極性は、子宮内膜上皮細胞表面の膜タンパク質の発現量や局在を変化させることとなり、胚との接着能の亢進へと連携していくことが予想される。実際に卵巣ホルモンの添加は子宮内膜上皮細胞にグリコデリンを発現誘導することで、胚との接着能を亢進させる(図 4C)¹⁹⁾。子宮内膜上皮細胞の機能的分化はグリコゲン産生量の比較実験によっても裏打ちされる現象である(図 4B)¹³⁾。これらの結果から、ヒト着床の初期段階における対立・接着のステップでは、細胞の分化・接着機能の変化が鍵を握っていると考えられる。

接着した胚はその後、子宮内膜組織に対して伸



【図8】 卵巣ホルモン、HDAC1に誘導されるグリコデリンと EMT によるヒト着床の制御

展・貫入していくが、その際に子宮内膜上皮細胞層はバリアを形成しているため、胚の通路を確保するためには、一旦破壊される必要がある。そのひとつの機序として子宮内膜上皮細胞の細胞死が起こることはマウス、ヒトともに報告があるが、本研究の結果から、さらに付加的な機序が存在すると考えられる。細胞は隣接細胞がなんらかの理由でなくなった場合に増殖や運動が開始されるという性質を持つ(接触阻害:コンタクトインヒビション)。胚の接着により子宮内膜上皮細胞が細胞死に陥った場合、バリアには空隙が生じるが、その空隙形成は接触阻害の解除となり、空隙充填のための残存細胞の増殖・運動が開始されることが予想されるが、これは胚の通路確保には不利益となる。本研究によれば卵巣ホルモンで誘導可能なグリコデリンを子宮内膜上皮細胞モデルに強制発現させると、細胞周期のG1/Sチェックポイントの通過を阻害することで細胞増殖能は抑制される

(図5)¹⁵⁾。また卵巣ホルモン添加により空隙充填とは逆方向の遠心方向への細胞運動を示唆する胚モデルの進展面積は顕著に上昇した(図6A)。以上の結果は、細胞死による単純な胚進路空間形成のみでなく、その空隙を充填しない、あるいは、さらに拡大するために、子宮内膜上皮細胞の細胞増殖抑制と、遠心方向への細胞運動亢進の機序が付加的に設けられていることが示唆される(図8)。

ところが、この胚の伸展・貫入には合理的な機序も、物理学的にも免疫学的にも重要なバリアの破壊という点では、妊娠の成立・維持には不利となっていく。恐らくは胚の貫入がある程度進行した時点で、胚侵入への移行段階で子宮内膜上皮細胞層のバリアは、破壊から再構築へと正反対へのスイッチ変換がなされるものと想像される。細胞の機能としてもその機序は恐らく正反対であると考えられ、細胞増殖は亢進し、細胞運動は遠心方向から求心方向へと変換されるであろう。そして、

バリアの再構築は急務であることを考えれば、主体は細胞運動によるルーズな胚の被覆であり、引き続き緩徐ながらタイトな被覆へとつなぐ細胞増殖亢進と考えられる。細胞運動の亢進は空隙の充填であり創傷治癒アッセイが至適な解析モデルであるが、卵巣ホルモンの添加は、有意に求心方向の運動機能を高める(図 6B)。分子機序としては、運動の方向は遠心方向、求心方向と正反対であるが、その両者に卵巣ホルモン誘導性のグリコデリンと、同じく卵巣ホルモンによる EMT 様変化によって発現上昇し、局在変化を示す N-cadherin が重要な役割を担っている(図 6)。一方、細胞増殖制御の分子としてはグリコデリンが候補であり、その発現量によって細胞増殖の抑制・亢進双方のアウトプットを示しうる(図 5D)。これらの結果からは、ヒト着床の接着以降の後半のステップである子宮内膜上皮細胞の破壊と再構築は、細胞の増殖と運動の正負の働きによるコンビネーションで制御されている様子が描ける(図 8)。ただし、この非常に興味深い細胞運動と細胞増殖の、正反対へのスイッチ変換の機序についてはまったくわかっておらず、今後の研究課題である。

以上、本研究の一連の結果からはヒト着床における子宮内膜上皮細胞の次のような動態が提唱されうる。すなわち、「卵巣ホルモンによる液性刺激は、グリコデリンの発現を誘導することで細胞分化を惹起し、細胞の形態変化などを通じて、胚の到来前から胚の受容体制の準備開始を指令する(implantation window)。同時に卵巣ホルモンによって、中皮様細胞マーカーであるビメンチンの増強が示すように EMT 様の変化も起こり、細胞の極性変化を通じた胚の受容体制構築のアシストがなされる。その受容体制構築は接着能の亢進として、胚とのコミュニケーションの実現へと連携していく。そして、E-cadherin の減弱とともに N-cadherin が増強(カドヘリンスイッチ)すると細胞の運動能が亢進し、その運動方向に応じて胚の貫入ルートの確保や、破壊された子宮内膜上皮細胞層の再構築へと働きかける。さらにその子宮内膜上皮細胞層の破壊と再構築の機序は同細胞の細胞増殖が負や正に制御されることによって支え

られる。」というものである¹⁹⁾²⁰⁾。子宮内膜上皮細胞の細胞分化・接着・増殖・運動の共通の制御因子はグリコデリンであり、連続した段階で構成されるヒト着床をグリコデリンが協調的かつ合目的に制御すると換言できる。特筆すべきは、そのグリコデリンの発現誘導をはじめ、グリコデリン発現を通じた細胞への様々な影響のすべてを、卵巣ホルモんに代替し、さらに強力に実現する薬剤として、すでに臨床応用されている HDACI である SAHA (Zolinza[®]) が示されたことである。この事実から、同薬剤が新たな着床支援薬剤としての応用の可能性を秘めており、生殖補助医療における新たな治療戦略ツールとして注目に値するものと思われる。

謝 辞

第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会において、シンポジウムでの講演の機会を与えて下さいました稲葉憲之学術集会長、座長の労をお執り下さいました久保田俊郎教授、神崎秀陽教授に深謝申し上げます。本研究を支えて下さいました共同研究者の方々にも感謝申し上げます。

共同研究者(敬称略)

丸山哲夫、升田博隆、長島 隆、荒瀬 透、小野政徳、梶谷 宇、各務真紀、太田邦明、小田英之、西川明花、宮崎 薫、吉村泰典(教授)

文 献

- 1) Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349—352
- 2) Uchida H, Maruyama T, Arase T, Ono M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y. Histone acetylation in reproductive organs: significance of histone deacetylase inhibitors in gene transcription. *Reprod Med Biol* 2005; 4: 115—122
- 3) Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S, Yoshimura Y. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 16675—16682

- 4) Seppälä M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002; 23: 401—430
- 5) Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, Hautala L, Chiu PC, Yeung WS. Glycodelin in reproductive endocrinology and hormone-related cancer. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 121—133
- 6) Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppälä M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63: 377—383
- 7) Okamoto N, Uchida A, Takakura K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen L, Koistinen R, Seppälä M, Mori T. Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26: 137—142
- 8) Anastasiadis PZ, Reynolds AB. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 604—610
- 9) Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121: 727—735
- 10) Thie M, Herter P, Pommerenke H, Durr F, Sieckmann F, Nebe B, Rychly J, Denker HW. Adhesiveness of the free surface of a human endometrial monolayer for trophoblast as related to actin cytoskeleton. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 275—283
- 11) Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell* 2002; 15: 104—117
- 12) Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for Study of Human Embryo Implantation: Choice of Cell Lines? *Biol Reprod* 2010; 82: 235—245
- 13) Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada H, Yoshimura Y. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology* 2005; 146: 5365—5373
- 14) Uchida H, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, Oda H, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y. Histone deacetylase inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation. *Hum Reprod* 2007; 22: 2615—2622
- 15) Ohta K, Maruyama T, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y. Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth. *Mol Hum Reprod* 2008; 14: 17—22
- 16) Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16189—16194
- 17) Uchida H, Maruyama T, Ono M, Ohta K, Kajitani T, Masuda H, Nagashima T, Arase T, Asada H, Yoshimura Y. Histone Deacetylase Inhibitors Stimulate Cell Migration in Human Endometrial Adenocarcinoma Cells through Up-Regulation of Glycodelin. *Endocrinology* 2007; 148: 896—902
- 18) Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345: 1400—1408
- 19) Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Masuda H, Arase T, Sugiura I, Onouchi M, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y. Human endometrial cytodifferentiation by histone deacetylase inhibitors. *Human Cell* 2006; 19: 38—42
- 20) Uchida H, Maruyama T, Kagami M, Oda H, Nishikawa S, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y. Epigenetic Treatment in Assisted Human Embryo Implantation. *J Mam Ova Res* 2009; 26: 116—121

Synopsis

Recent developed technology in assisted reproductive technologies (ART) has resulted in higher fertilization rates for infertile couples. However, failure of the embryo implantation to endometrial epithelial cells (EECs) blocks successful pregnancy. For EEC dynamics, human implantation can be divided into the multiple steps of processes, which are apposition and adhesion to the embryo, destruction to make space for embryo penetration and reconstruction to cover undefended penetrating and invading embryo. Human implantation can be redefined a multi-step event requiring the orchestrated regulation of EECs, involving cell proliferation, differentiation, motility, and adhesion.

Reversible histone acetylation regulates gene transcription and histone deacetylase inhibitors (HDACI) induce specific genes. Recently, it is reported that HDACIs can induce differentiation in various typed of cells including human endometrial stromal cells (ESCs). Because of the temporospatial expression pattern, which is highly expressed during implantation window in EEC, a progesterone-induced EEC protein, Glycodelin is one of the differentiation markers of EEC.

To elucidate the EEC dynamics, we performed a variety of cell assays using human endometrial epithelial cell line, Ishikawa cells, and human trophoblastic cell line, JAR, as an EEC and an embryo model, respectively. By treatment of Ishikawa cells with ovarian steroid hormones (estradiol plus progesterone; EP) or one of HDACI, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), resulted in the following observations. Glycodelin promoter activity was accelerated in promoter assay. Glycodelin expression was upregulated at both mRNA and protein level. Through upregulation of Glycodelin expression, flattened and wide-spreaded morphological change was observed and Glycogen synthesis, which indicates EEC functional differentiation, was upregulated. These results indicate that ovarian steroid hormones can induce cell differentiation without signal from embryo.

It is known that alteration of EEC polarity is required for human implantation. In motile status of epithelial cells, such as translocation of differentiated cells to appropriate area in early development, or invasion of malignant cells, epithelial cells morphologically and characteristically exchange to mesenchymal-like cells. This phenomenon is called 'Epithelial mesenchymal transition (EMT)'. During EMT, cell polarity is exchanged. By treatment of EP or SAHA, the expression of vinculin, one of mesenchymal cell markers, was upregulated. Both downregulation of E-cadherin and upregulation of N-cadherin, which is named 'cadherin switch' and characteristic to EMT, were also observed in immunoblotting study. Moreover, these distinctive alterations of protein expression were enhanced by coculture with embryo model. These results indicate that EP can exchange cell polarity in assistance with induction of cell differentiation and evoked EMT. It is important to prepare the receptivity of EEC to catch embryo in the beginning of human implantation.

Against the 'prepared' EEC, embryo apposite and then adheres. In this study, we analyzed the adhesion ratio using in vitro implantation assay. Treatment of EP or SAHA increased the adhesion of EEC to embryo model, compared to untreated Ishikawa cells.

After adhesion, embryo outgrows and penetrates through EEC barrier. It is known that apoptosis of EEC is occurred to make space for embryo wide growth and penetration. In addition of cell apoptosis, it is thought to be advantages that EEC slow proliferation and migration away, to keep embryo traffic course. Transfection of glycodelin cDNA caused suppression of cell proliferation through stop at G1/S checkpoint in cell cycle. Treatment of EP and SAHA resulted in broadened embryo outgrowth area, indicating EEC migration away to make space.

Subsequently to the destruction of EEC barrier by apoptosis, suppression of cell proliferation, and migration away, EEC barrier should be reconstructed to protect the undefended top of the penetrating and invading embryo. Probably, quick and loose reconstruction by cell ascending motion is provided to the exposed embryo and then slow and tight reconstruction by cell proliferation is followed. In wound healing assay, motion to cover the vacant space was quickened by stimulation with EP or SAHA. All these regulations were almost completely canceled by glycodelin gene silencing by

glycodelin siRNA. In association of Glycodelin-mediated effect, through EMT-mediated upregulation and redistribution of N-cadherin, stimulation with EP or SAHA enhanced migration in both descending and ascending direction to embryo.

Collective these results indicate the following mechanism of EEC dynamics; prior to embryo arrival, ovarian steroid hormones prepare the receptivity of EEC to catch embryo by cell differentiation through induction of Glycodelin and driving of EMT. At the next step, apposition between embryo and EEC accelerate and maintain Glycodelin induction and EMT, resulting highly elevation of adhesion activity. EEC barrier dramatic alterations, which is damage followed by reconstruction, are regulate by Glycodelin- and EMT-mediated cell proliferation and cell motility. A key molecule, Glycodelin, orchestrates the continuous designed mechanism of human implantation. Furthermore, SAHA can induce Glycodelin and therefore SAHA can regulate the EEC continuous functions during human implantation, indicating the potential of SAHA as an assistant therapeutic tool for reproductive medicine by targeting Glycodelin.
