

## Embryology

# Artificial intelligence-driven analysis of embryo morphokinetics in singleton, twin, and triplet pregnancies

E. Gómez <sup>1,2,\*</sup>, A. Brualla<sup>3</sup>, N. Almunia<sup>1</sup>, A. Zepeda-Hernández<sup>4</sup>, M. Valcárcel<sup>1</sup>, I. Torres<sup>5</sup>, I. Burgos<sup>1</sup>, R. Jiménez<sup>1</sup>, A.M. Villaquirán<sup>1</sup>, and L. Parmegiani<sup>6</sup>

<sup>1</sup>IVF Laboratory, Next Fertility Murcia, Murcia, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, Spain

<sup>3</sup>Fairtality Ltd, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Fairtality Ltd, Rotterdam, The Netherlands

<sup>5</sup>Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

<sup>6</sup>Next Fertility GynePro, Bologna, Italy

\*Correspondence address. IVF Laboratory, Next Fertility Murcia, Avd Europa, 11, Bajo, 30007 Murcia, Spain. E-mail: emilio.gomez@nextfertility.es  <https://orcid.org/0000-0002-0126-1507>

## 単一胚移植後の一卵性多胎の謎に迫る

SETの普及により多胎は減少しているが、一卵性双胎や品胎の発生は依然として一定数存在する。本研究は、AIとタイムラプス技術を用いて、これらの稀な症例の胚発生動態を解析した初の報告であり、胚分裂の予兆となる因子の探索を目的としている。

# 研究背景：ARTにおける一卵性双胎・ 品胎のリスク

自然妊娠における一卵性双胎は0.4%、三つ子は0.004%であるが、ARTではそれぞれ1.56%、0.048%と高率になる。特に、胚盤胞移植、アシステッドハッチング（AH）、およびICSIがリスク因子として挙げられており、着床後のICM分裂や細胞の緩みが機序として仮説されている。

# 症例：三羊膜一絨毛膜性品胎の発生例

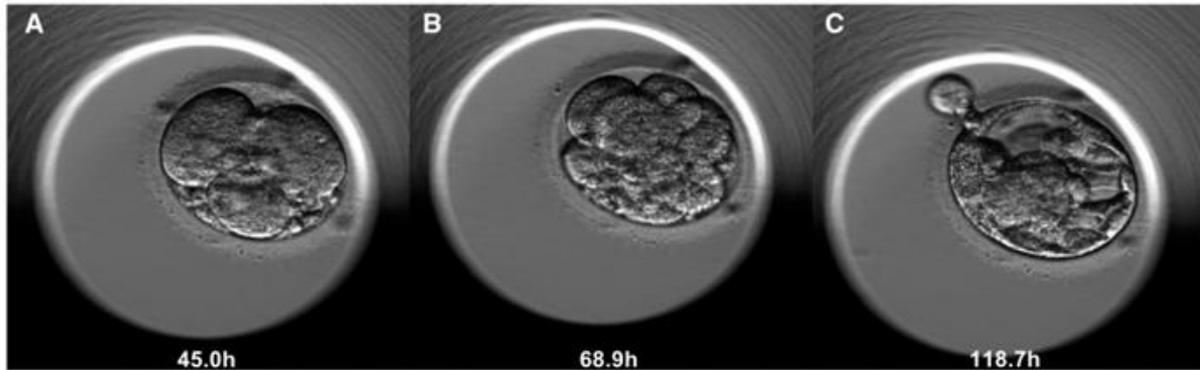
35歳女性、ICSI後にDay5の低グレード胚（ICM・TEともにC）をレーザーAH後に新鮮胚移植。移植後9日目の $\beta$ -hCGは71 mIU/mLで、妊娠7週のエコーにて3心拍を確認。31週で3児が帝王切開にて出生。過去の胚も発育不良であり、同様の分裂傾向が示唆される。



Figure 2. Ultrasound scan 7 weeks after transfer of a single embryo, showing three gestational sacs.

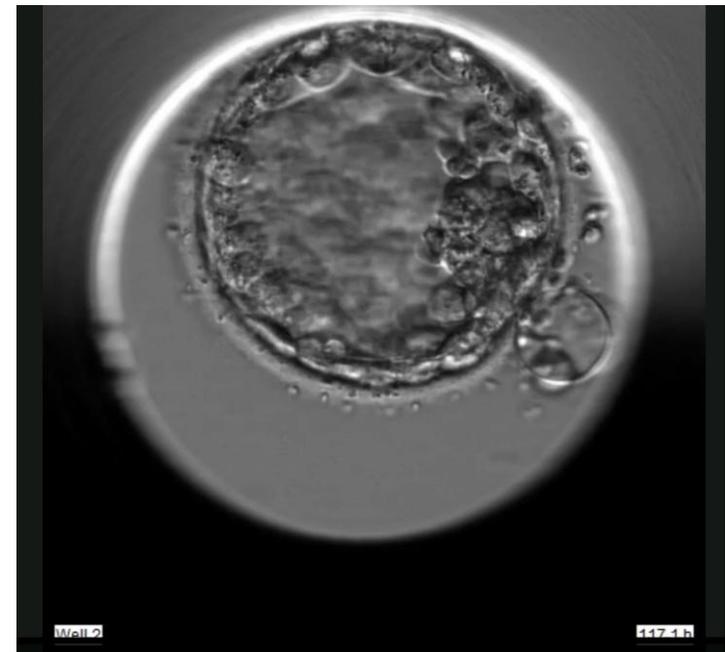
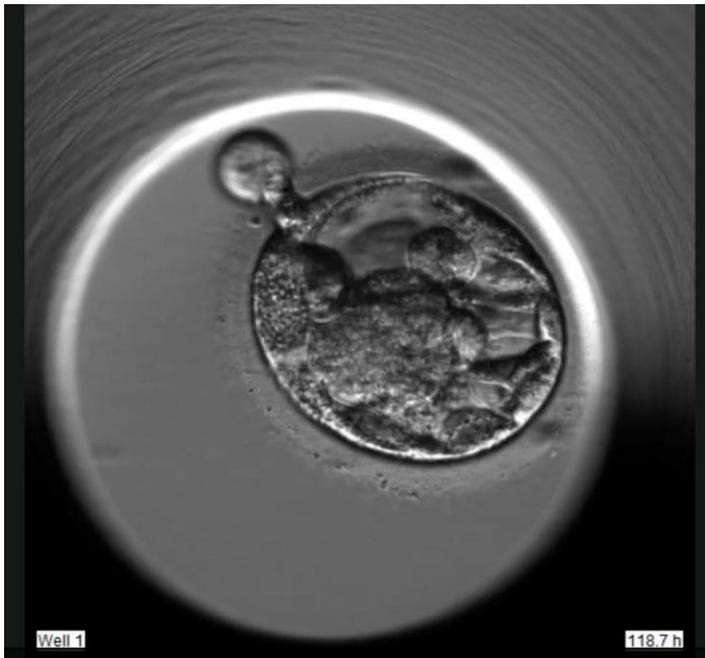
# 研究デザインとAIによる解析

Next Fertilityグループ2施設における18例（MZ/MT群9例、単胎群9例）を対象に、CHLOE-EQシステムを用いてモルフォキネティクスを比較。胚発育時間、胚サイズ、ICM構造などを定量評価し、統計的に比較。全例でICSI施行、AHは三つ子症例のみで実施された。



**Figure 1. Embryo that divided, resulting in a triamniotic monochorionic gestation. (A)** Day 2 of development (45.0 h post-insemination (hpi)). Three cells, 20% fragmentation. **(B)** Day 3 of development (68.9 hpi). Eight asymmetric cells, 20% fragmentation. **(C)** Day 5 of development blastocyst after assisted hatching just before embryo transfer (118.7 hpi).

胚の発育タイミングが、胚の分割(1つの胚から2つあるいは3つの同一胚が形成される現象)に関与しているかを明らかにするため、単胎妊娠に至った胚と一絨毛膜性の多胎妊娠に至った胚のモルフォキネティクス(形態発達動態)を比較しました(Video 1および2)。



**Table 1.** Characteristics of patients of the monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and Singleton cohorts.

|   | MZT-MTP      | Single pregnancy |
|---|--------------|------------------|
| N°  | 9            | 9                |
| Patient age (y)                                 | 41.56 ± 6.02 | 38.44 ± 6.17     |
| Paternal age (y)                                | 41.67 ± 8.73 | 39.11 ± 6.53     |
| Oocyte age (h)                                  | 28.56 ± 6.33 | 27.22 ± 3.87     |
| Oocytes origin (n)                              |              |                  |
| Vitrified                                       | 5            | 4                |
| Fresh   | 4            | 5                |
| Donated oocytes (n)                             | 6            | 9                |
| Semen origin (n)                                |              |                  |
| Couple  | 8            | 8                |
| Donor   | 1            | 0                |
| Testicular biopsy                               | 0            | 1                |
| Hyaluronate enriched embryo transfer medium (n) | 5            | 5                |

Data are mean ± SD unless stated otherwise. P-value >0.05 for each parameter.

18周期すべてにおいて、ICSIが受精方法として用いられました。三胎妊娠に至った胚のみがアシステッド・ハッチング(AH)を受けており、それ以外の周期では行われていません。卵子の年齢、卵子・精子の由来、患者背景などは、単胎群と多胎群で有意差はありませんでした

**Table 2.** Characteristics of the results of the monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and singleton pregnancies.

|   | MZT-MTP   | Single pregnancy |
|---|---|------------------|
| Transferred embryos                         | 9   | 9                |
| Beta-hCG (mIU/ml),<br>mean $\pm$ SD         | 966 $\pm$ 915.1                                 | 440 $\pm$ 477.6  |
| Miscarriage                                 | 3 (33%)   | 0                |
| Type of delivery                            |   |                  |
| Eutocic*                                    | 0   | 5                |
| Caesarean*                                  | 6   | 4                |
| Live newborn babies                         | 13 (5 set of twins<br>and 1 set<br>of triplets) | 9                |
| Male  | 9   | 3                |
| Female                                      | 4   | 6                |
| Birthweight (gr) Mean $\pm$ SD <sup>+</sup> | 2077 $\pm$ 561.5                                | 3268 $\pm$ 557.7 |

\* P-value = 0.025.

+ P-value = 0.0001.

妊娠転帰はおおむね両群で類似していましたが、多胎妊娠群では帝王切開率が高く、出生体重が低い傾向がみられました。 $\beta$ -hCG値は多胎群で高かったものの、有意差はありませんでした。多胎群では自然流産率が33.33%であり、9例中3例が妊娠24週未満で流産となりましたが、いずれの症例でも一方の胚のみが停止し、他方が発育を継続するような例はみられませんでした

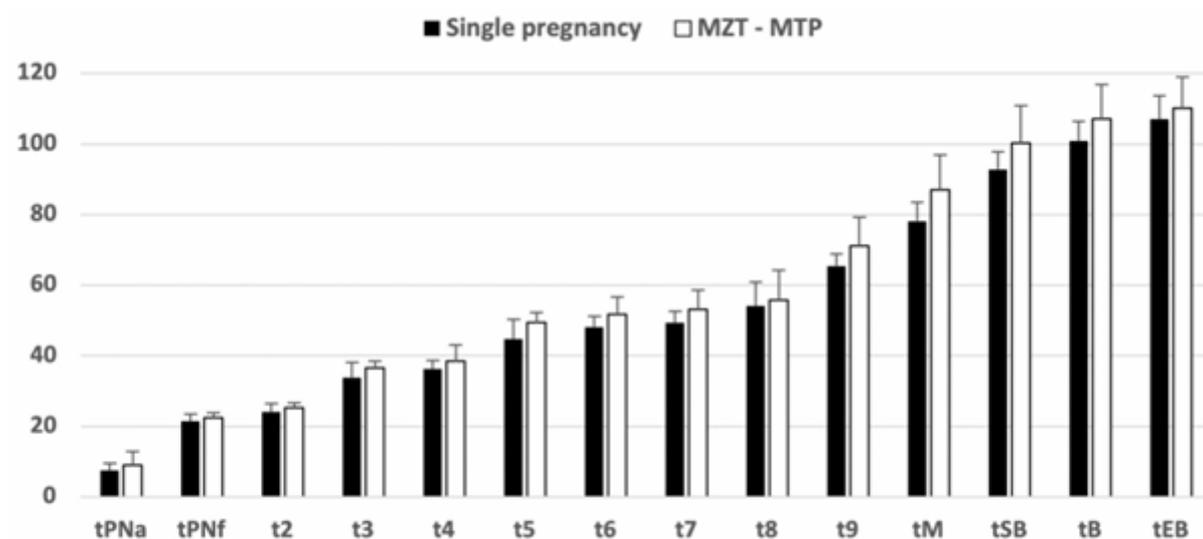
# 発育速度：t5とtMに注目すべき遅延

MZ/MT群の胚は、t5（5細胞到達）とtM（桑実胚期到達）で顕著な遅延を示した（それぞれ約4時間、6時間の差）。両者とも有意差はないが、P値は0.08および0.07と有意傾向。その他すべての時間的指標でも一貫して遅延傾向が確認された。

**Table 3.** Morphokinetic events of monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and singleton pregnancies.

| Morphokinetic event (h) | MZT-MTP (n = 9) | Single pregnancy (n = 9) |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| tPNa                    | 8.8 ± 3.64      | 7.5 ± 1.99               |
| tPNf                    | 22.0 ± 1.82     | 21.4 ± 2.17              |
| t2                      | 23.8 ± 1.79     | 24.2 ± 2.26              |
| t3                      | 36.0 ± 2.25     | 33.9 ± 4.17              |
| t4                      | 37.8 ± 4.79     | 36.2 ± 2.51              |
| t5                      | 48.7 ± 3.21     | 44.7 ± 5.61              |
| t6                      | 50.9 ± 5.18     | 48.1 ± 3.09              |
| t7                      | 52.2 ± 5.93     | 49.3 ± 3.32              |
| t8                      | 54.7 ± 8.59     | 54.1 ± 6.89              |
| t9                      | 70.2 ± 8.03     | 65.4 ± 3.44              |
| tM                      | 85.1 ± 10.00    | 78.1 ± 5.35              |
| tSB                     | 99.0 ± 10.5     | 92.9 ± 4.90              |
| tB                      | 106 ± 9.7       | 101 ± 5.6                |
| tEB                     | 109 ± 8.5       | 107 ± 6.6                |

Morphokinetic parameters recorded by CHLOE included tPNa (first frame of pronuclei appearance), tPNf (first frame of pronuclei fading); cell division from 2 to 9 cells or more: t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9 (first frame of 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9 discrete membrane-separated blastomeres); tM (cellular compaction and blurring of distinctive individual cell membranes); tSB (first identification of blastocyst cavitation); tB (blastocyst cavitation filling and the beginning of embryo expansion); and tEB (clearly expanded blastocyst with a minimum diameter of 190 µm). Data are mean ± SD. P-value for all comparisons >0.05.



**Figure 3. Morphokinetic events of the embryos transferred in the monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and singleton pregnancies.** Morphokinetic parameters recorded by CHLOE were pronuclear appearance (tPNa) and fading (tPNf); cell division of 2 to 9 cells or more (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9); morula formation (tM), start of blastulation (tSB), complete blastocyst stage (tB), and blastocyst expansion (tEB).  $P > 0.05$ .

## Gardner分類による胚の質評価

**Table 4.** Gardner's classification of trophoctoderm (TE) and inner cell mass (ICM) automatically generated by the artificial intelligence software CHLOE-EQ for monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and singleton pregnancies.

|       | MZT-MTP (n = 9) | Single pregnancy (n = 9) |
|-------|-----------------|--------------------------|
| TE A  | 8/9             | 7/9                      |
| TE B  | 0/9             | 1/9                      |
| TE C  | 1/9             | 1/9                      |
| ICM A | 6/9             | 7/9                      |
| ICM B | 1/9             | 1/9                      |
| ICM C | 2/9             | 1/9                      |

# 胚サイズとICM構造の比較

MZ/MT群では胚の直径および面積が小さく、胚サイズと分裂リスクの関連が示唆される。一方、ICMの面積や胚面積に対する比率には差がなく、ICMの大きさよりも構造の疎密や連結性の方が重要と考えられる。

**Table 5.** Embryo measurements (means  $\pm$  SD) for monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and singleton pregnancies.

|                                   | MZT-MTP<br>(n = 9) | Single pregnancy<br>(n = 9) |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Embryo diameter ( $\mu\text{m}$ ) | 162 $\pm$ 26.5     | 179 $\pm$ 25.9              |
| Embryo area ( $\mu\text{m}^2$ )   | 21 680 $\pm$ 7267  | 26 520 $\pm$ 7254           |
| ICM area ( $\mu\text{m}^2$ )      | 3456 $\pm$ 723.0   | 3350 $\pm$ 1179.6           |
| Embryo area/ICM area ratio        | 6.6 $\pm$ 2.65     | 8.5 $\pm$ 2.71              |

CHLOE-EQ was utilized to objectively measure different embryonic parameters. The blastocyst is a three-dimensional structure, so the focal plane of the embryo and the ICM were used to measure both the two-dimensional area and the diameter.  $P > 0.05$ .

# CHLOEスコアによる胚の質評価

着床可能性（EQスコア）は、単胎群で0.98、MZ/MT群で0.83と差があり、分裂しなかった胚の方が良好であった。BLASTスコア（胚盤胞到達予測）には大きな差はなかったが、発育の遅れと分裂リスクには相関がある可能性がある。

**Table 6.** BLAST and CHLOE-EQ scores for monozygotic twins and triplets (MZT-MTP) and singleton pregnancies.

|                | MZT-MTP<br>(n = 9) | Single pregnancy<br>(n = 9) |
|----------------|--------------------|-----------------------------|
| BLAST score    | 0.81 ± 0.11        | 0.85 ± 0.06                 |
| CHLOE EQ score | 0.83 ± 0.30        | 0.98 ± 0.01                 |

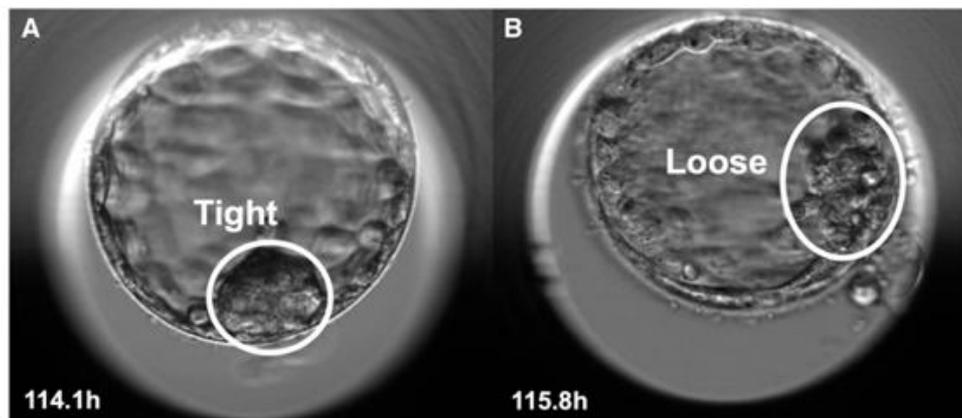
The BLAST score forecasts the embryo's ability to reach the blastocyst stage at 68 hpi. The CHLOE EQ score predicts the potential for embryo implantation. The EQ score is available starting from 30 hpi and fluctuates throughout embryonic development based on morphology and morphokinetics, up until the point of culture termination. Data are mean ± SD, P-value >0.05 for all comparisons.

# ロジスティック回帰とAUCの考察

CHLOE-EQで抽出された各指標に対し、回帰解析を行ったが有意な予測因子は特定できなかった。ただし、t5とtMにおいてAUCが0.76を超えており、将来的に予測モデルとしての可能性が示唆される。

# ICMの構造評価とその限界

ルーズなICM構造は、分裂リスクを高める可能性がある。MZ群で3例に、単胎群で1例に観察されたが、統計学的差はなし。ただし、タイムラプスではICMの内部構造まで把握しきれない限界があり、組織学的研究が今後の課題。



**Figure 4.** Observation of the blastocyst's inner cell mass (ICM) reveals varying degrees of cell decompaction. (A) Blastocyst exhibiting a tightly packed ICM at 114.1 h post-insemination (hpi). (B) Blastocyst exhibiting a poorly structured ICM at 115.8 hpi. These two embryos produced a single pregnancy after SET.

# β-hCG値と胎児アウトカムの違い

MZ/MT群ではβ-hCGが高値傾向（966 vs 440 mIU/mL）、出生体重は有意に低値（2077g vs 3268g）であった。妊娠継続率や分娩方法にも差があり、MZ/MTでは33%の自然流産、帝王切開率も高く、臨床的管理の重要性が増す。

# 桑実期コンパクションの重要性

桑実期の不完全なコンパクションは、胚発育不全やTE・ICMの質低下に関連。Hurらの報告を支持する形で、本研究でもtM遅延が分裂群に観察され、コンパクション異常がMZ形成の一因と推察される。

## 分裂機序とZGAの関与

Zygotic genome activation (ZGA) のタイミングの遅延が、発育の遅れと分裂の背景因子である可能性がある。ゲノム活性化、代謝異常、細胞接着異常など、複数の要因が絡み合いながらMZ形成に至ると考えられる。

# hCGと着床ウィンドウの仮説

以下のような仮説が成り立ちます：

- hCG↑ → IGFBP-1↓ → 脱落膜化↓ → 着床のタイミング遅延
- 着床までに時間がかかることで、胚はより長くin vitroまたは子宮内で浮遊し続ける
- この間に、**ICMの細胞接着が緩み、構造的に分裂しやすくなる (loose ICM)**
- → **一卵性多胎(とくに三つ子など)を誘発しやすくなる**

これは今後、オルガノイドやエンブリオイドを用いた実験モデルにより検証されるべき重要な仮説である。

# ヒアルロン酸含有培地の影響

高粘性のヒアルロン酸はICM間の接着を高め、胚分裂を防ぐ可能性があると考えられるが、本研究では両群で使用頻度は同等であり、現時点では決定的証拠はなし。

培養環境の検討が求められる。

# AI技術の臨床応用の展望

タイムラプスとAIの統合により、主観性を排除した胚評価が可能となった。今後は多施設共同研究により、AIを用いたMZリスク予測モデルの構築が期待される。倫理的配慮と情報提供も同時に重要である。

## SETにおけるリスクカウンセリングの再考

SETは多胎妊娠リスクを下げるがゼロにはできない。見た目が良くても、分裂リスクを内在する胚は存在するため、患者に対するリスク説明と同意取得がより重要となっている。

# 本研究の意義と限界

本研究はAIによる一卵性多胎と単胎の発育比較を初めて実施した先駆的研究である。一方、症例数が少なく、有意差を検出するには今後さらなる検証が必要である。多施設・長期データ収集が望まれる。

## 将来的展望と研究の方向性

ICMの構造や接着状態のより詳細な評価が可能となれば、移植前にMZリスクを評価する指標となる可能性がある。AI技術は今後、単に選別だけでなく、分裂の予兆を捉える「予知ツール」へと進化する可能性を秘めている。

# Take Home Message

- ✓ SET後でもMZ・MT妊娠はゼロではない。
- ✓ 分裂胚は一貫して発育が遅く、サイズが小さい。
- ✓ t5やtMの遅れは分裂リスクのサインとなる可能性。
- ✓ CHLOE-EQスコアは臨床判断に資する可能性あり。
- ✓ 胚選択・移植時には形態だけでなく、発育速度にも注目し、患者に適切な情報提供を行うべきである。

END

OXFORD

human  
reproduction

*Human Reproduction*, 2025, **40(3)**, 503–517

<https://doi.org/10.1093/humrep/deae258>

Advance Access Publication Date: January 10, 2025

Original Article

## Reproductive biology

# Human fallopian tube organoids provide a favourable environment for sperm motility

Nicolas Gatimel <sup>1,2,3,4,\*</sup>, Guillaume Perez <sup>3</sup>, Eloïse Bruno<sup>3,4</sup>, David Sagnat<sup>2,4</sup>, Corinne Rolland<sup>2</sup>, Yan Tanguy-Le-Gac<sup>1</sup>, Emeline Di Donato<sup>1</sup>, Claire Racaud<sup>2</sup>, Roger Léandri<sup>1</sup>, Célia Bettiol<sup>1,3</sup>, Céline Deraison<sup>2</sup>, Jean-Paul Motta <sup>2</sup>, Eric Huyghe<sup>1,3</sup>, and Nathalie Vergnolle <sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Medicine, Hôpital Paule de Viguier, CHU Toulouse, Toulouse, France

<sup>2</sup>IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, Univ Toulouse III—Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

<sup>3</sup>DEFE (Développement Embryonnaire, Fertilité, Environnement—Embryonic Development, Fertility, Environment), UMR1203, INSERM-Universities of Toulouse and Montpellier, Paule de Viguier Hospital, Toulouse, France

<sup>4</sup>Toulouse Organoid Platform of IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, Univ Toulouse III—Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

\*Correspondence address. Department of Reproductive Medicine, Hôpital Paule de Viguier, CHU Toulouse, 330 avenue de Grande Bretagne, 31059 Toulouse, France. E-mail: [gatimel.n@chu-toulouse.fr](mailto:gatimel.n@chu-toulouse.fr)  <https://orcid.org/0000-0002-4813-5532>

## スライドは解説を省略します

### Introduction

ヒトにおいて、卵管は妊娠成立に不可欠なさまざまな現象が起こる場所である。配偶子の移動、それらと卵管上皮との相互作用、卵子の受精、および着床前胚の発育の大部分は、いずれも卵管内で起こる。卵管は4つの領域に分かれており、子宮側から卵巣側へと、子宮間質部(約1cm)、峡部(約4cm)、膨大部(6~9cm)、そして漏斗部(卵管采)と続く(Ngら、2018)。それぞれの領域には重要な役割がある: 漏斗部は排卵時に卵丘-卵子複合体を捕捉し、受精が起こる膨大部では、卵子と精子の移動および生存が可能となる。膨大部-峡部接合部および峡部は初期胚の卵割が進行する場所であり、最終的に、胚盤胞腔の形成(空洞化)および胚盤胞の拡大は峡部および子宮間質部で起こる。卵管粘膜は、子宮頸管粘液と並んで、女性生殖管内で精子の貯蔵庫として機能する2つの重要な部位のひとつとされている(Holt and Fazeli, 2015)。したがって、卵管上皮は、線毛細胞と分泌細胞が担うさまざまな機能を通じて、精子の輸送や栄養供給(エネルギー代謝および精子獲能化)、卵丘細胞層および透明帯の通過(卵管液中の酵素による)、胚の初期発生(卵管の分泌物による)、および子宮への移動(線毛運動および収縮運動による)において、極めて重要な役割を果たす。卵管液の成分は、配偶子間相互作用および胚発生において、鍵となる直接的な役割を果たしていることが強調されるべきである(Gardnerら、1996; Tayら、1997; Leeseら、2001)。たとえば、ラクトフェリンのような特定のタンパク質は卵管上皮から分泌され、精子や卵子と相互作用し、配偶子間相互作用を調節する(Zumoffenら、2013)。解糖系やレドックス恒常性に関与するその他のタンパク質も、卵管液中に黄体期初期に特異的に分泌され、初期胚の発生に重要な役割を果たしている可能性がある(Zumoffenら、2013)。

## スライドは解説を省略します

さらに最近のデータでは、卵管上皮から分泌される細胞外小胞が精子の獲能化に重要な役割を果たすことが示されている(Alminanaら、2018; Bathalaら、2018; Alminana and Bauersachs, 2020)。また、卵管は精子の最終成熟段階と考えられる過程にも積極的に関与している(Schuhら、2004)。したがって、配偶子あるいは着床前胚の直接的な周囲環境を正確に評価しようとする場合、卵管上皮に着目することが不可欠である。卵管は生殖機能において極めて基本的な器官であるにもかかわらず、残念なことに、IVFの登場以降、この分野の研究はやや軽視されてきた。生殖補助医療(ART)および体外受精(IVF)の発展は、卵管性不妊、乏精子症・精子運動障害・奇形精子症、子宮内膜症、原因不明不妊など、さまざまな女性および男性不妊に対して解決策を提供してきた。しかし、ARTの進歩にもかかわらず、卵子回収あたりの出生率は依然として低く、ヨーロッパでは15~30%にとどまっている(Calhaz-Jorgeら、2017)。我々は、配偶子の機能獲得、受精、胚発生に関与する卵管因子をより深く理解することが、IVFにおける配偶子や胚の取り扱いおよび培養条件の改善に不可欠であると考えている。近年、幹細胞に関する知見と三次元(3D)培養の技術的進歩により、オルガノイドモデルの開発は医学研究の多くの分野で大きく進展している。オルガノイドは、多能性幹細胞あるいは成体幹細胞(ASC)から誘導される3D培養モデルであり、自己組織化と自己複製能を有しており、ヒトの複雑なin vitroモデルを再現可能である(Clevers, 2016)。その3D構造は、in vivoにおける細胞同士や細胞外マトリックスとの物理的相互作用を模倣している。

## スライドは解説を省略します

また、オルガノイドモデルは長期間の培養を可能とし、上皮細胞の構造や多様性を保ちながら維持できる。これらの3D細胞培養モデルは、in vivoに近い分子的・機能的特性を保持し、2次元培養に比べて遺伝的安定性が高いという利点もある(Lancaster and Knoblich, 2014; Kretzschmar and Clevers, 2016; Rossiら、2018)。Cleverらは、小腸から単離したASCを用いた最初のin vitroオルガノイドモデルを開発した先駆者である(Satoら、2009)。女性生殖器由来のヒトオルガノイドの開発はさらに新しく(Kesslerら、2015; Turcoら、2017; Haiderら、2018; Kopperら、2019)、特に初のヒト卵管(HFT)オルガノイドモデルの開発では、NotchおよびWntシグナル経路がその成長と分化に関与していることが示された(Kesslerら、2015)。Changら(2020)は、ヒト卵管幹細胞がオルガノイド内で自己再生能を数週間~9継代にわたって保持できることを報告した。これらの初期モデルは、クラミジア感染の卵管モデルの研究(Kesslerら、2019)や、卵管膨大部起源の卵巣漿液性腫瘍オルガノイドモデルとの比較にも応用された(Yucerら、2017)。さらに、これらのモデルは女性ホルモンおよび/またはゴナドトロピンの人工的または周期的投与に対して非常に説得力のある生理学的反応を示している(Borettoら、2017; Jungら、2017; Zhangら、2019)。しかしながら、現在のところ、女性生殖器オルガノイドを用いた生殖機能研究はほとんど行われていない。ヒト生殖に関与する卵管メカニズムの解明において、オルガノイドモデルは最も有望な研究モデルのひとつである。

本研究の目的は、HFTオルガノイドモデルを開発し、その機能的特性を評価することで、ヒト精子の生存および運動性に関する影響を明らかにすることである。生殖機能に関する卵管因子をよりよく理解することは、ARTにおけるヒト配偶子および胚の取り扱いや培養条件の改善につながると考えられる。

## 抄録

## 解説します

**研究課題:** ヒト卵管(HFT)オルガノイドモデルは、ヒト精子の生存および運動性にとって好ましい管腔側環境を提供するか？

**要約:** 分化後の新規HFTオルガノイドモデルの管腔側(アピカル)環境は、商用培地よりも優れた精子の運動性維持環境を提供する。

**既知の背景:** ヒト卵管は、配偶子の生存と機能獲得、受精過程、着床前胚の発達といった、妊娠成立に不可欠な重要イベントが起こる場である。これらの生殖機能に関わる卵管生理や要因をより良く理解し、依然として最適とは言えない体外受精(IVF)における配偶子処理や胚培養条件を改善するために、我々は成人幹細胞からHFTオルガノイドモデルを構築し、管腔側で精子との共培養を可能にすることを目指した。

**研究デザイン・対象・期間:** 2年間にわたり、両側卵管切除術(避妊目的の腹腔鏡下手術)を受けた10名の“ドナー”患者から採取した卵管組織を用いて、オルガノイド培養を行った。組織消化後、峽部および膨大部から単離した細胞をそれぞれ3Dマトリゲルに播種し、従来のオルガノイド培養用成長因子と女性生殖器分化誘導因子を用いて培養した。

**参加者／材料・方法:** HFTオルガノイドは、光学顕微鏡、走査・透過型電子顕微鏡、免疫蛍光染色、トランスクリプトーム解析により評価された。特定の培養用インサート上でオルガノイドを同時に培養した後、5人のドナー由来の精子を、対照培地または結腸オルガノイドおよびHFTオルガノイド(峽部および膨大部)管腔側にそれぞれ96時間配置した。各条件下で0、48、96時間後に、各200個の精子について生存率、運動性、および運動解析(CASA)を2重測定し、Wilcoxon検定で比較した。

## このスライドは解説を省略します

**主な結果および偶然の影響の可能性:** オルガノイドが卵管特異的に分化していることは、免疫蛍光染色、トランスクリプトーム解析、電子顕微鏡観察により、線毛細胞および分泌細胞の存在を通して確認された。我々は、HFTオルガノイドの管腔側に精子を放出させ、分析のために回収することに成功した。精子の生存率は、HFTオルガノイドと市販の精子培地で同程度であったが、精子運動性はHFTオルガノイド管腔側が他の対照(結腸オルガノイド、オルガノイド培地、市販受精培地)よりも有意に優れていた。48時間後、HFTオルガノイド内(膨大部:  $31\% \pm 17$ 、峡部:  $29\% \pm 15$ )の精子の前進運動率は、市販受精培地( $15\% \pm 15$ )よりも高かった( $P < 0.05$ )。96時間後には、他のすべての条件で精子の前進運動率はほぼゼロ( $< 1\%$ )となったのに対し、HFTオルガノイド内では膨大部 $12\% \pm 15$ 、峡部 $13\% \pm 17$ と有意に高いままであった( $P < 0.05$ )。またCASA解析では、HFTオルガノイドが市販IVF培地よりも高いキネマティックパラメータ(曲線速度、平均経路速度、直線速度、頭部側方運動幅)を維持しており、より効率的な運動性を示した。

**大規模データ:** 該当なし。

**限界および注意点:** 本研究はin vitroで行われており、オルガノイド培養条件が実際の卵管の細胞外マトリックスや血管構造を完全に再現することはできなかった。

**本研究の広い意義:** 本研究は、HFT生理の理解を深める新たな道を拓くものであり、生殖目的にHFTオルガノイドを応用する可能性を初めて示した。将来的には、配偶子の受精能や胚培養条件の改善に寄与する可能性がある。

このスライドは解説を省略します

## 材料と方法

### 卵管組織の採取

卵管は、避妊目的で腹腔鏡下両側卵管切除術を受けた10名の患者から採取された。**オルガノイド培養**

新鮮な卵管組織サンプル(n=10)は、採取後すぐに室温でLeibovitz培地(L-15、Sigma-Aldrich)に数分間保持された。近位部(峽部)および遠位部(膨大部)からそれぞれ15mmの組織片を切り出し、消化および細胞濾過を行った後、播種用に使用した。この断片の一部は、従来型の組織学的評価に使用するため保存された。反対側の卵管では、同じ部位(膨大部および峽部)の粘膜をこそぎ取ってトランスクリプトーム解析に使用し、全組織を走査電子顕微鏡(SEM)および透過電子顕微鏡(TEM)解析用に保存した。組織消化は、コラゲナーゼAまたはI(2.5mg/ml)および必要に応じてDispase II(Roche、1.2 U/ml)を用い、37°Cのヒートブロック下で振とうしながら40分間行った。600gで10分間の洗浄後、トリプシン/EDTA(0.25%)によって37°Cでさらに10分間消化し、PBS+3% BSAで洗浄後、70 $\mu$ mのフィルターで濾過した。その後、再び600gで遠心し、得られたペレットを1mlのPBSに懸濁した。トリパンブルー染色後に細胞数を計測し、15,000個の細胞を25 $\mu$ lのhESCグレードのマトリゲル(Matrigel, Corning)に氷上で混合し、Greiner社製48ウェルプレート(Sigma-Aldrich)に播種した。

## このスライドは解説を省略します

マトリゲルは37°Cで20分間重合させた後、各ウェルに250 $\mu$ lの完全培地Aを添加した(以下の組成)。

- Advanced DMEM/F12
- 2mM GlutaMAX
- 10mM HEPES
- 1 × N2 (Invitrogen)
- 1 × B27 (ビタミンAなし、Life Technologies)
- 1 × ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen)
- 50ng/ml ヒトEGF (Gibco)
- 25ng/ml ヒトNoggin (Peprotech)
- 0.5ng/ml ヒトWnt3a (R&D Systems)
- 1.25mM N-アセチルシステイン (Sigma-Aldrich)
- 10 $\mu$ M Y-27632 (Axon MedChem)
- 0.5 $\mu$ M A83-01 (Axon MedChem)
- 0.5 $\mu$ g/ml ヒトR-spondin 1 (R&D Systems)
- 10mM ニコチンアミド (Sigma-Aldrich)
- 10 $\mu$ M SB202190 (Sigma-Aldrich)
- 0.01 $\mu$ M PGE2 (Sigma-Aldrich)

培地は1日おきに完全培地Aで交換し、培養は湿度管理されたインキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>、95%空気)で平均10日間行った。

10日目に継代を行い、1ウェルあたり300 $\mu$ lのTrypLE (Thermo Fisher Scientific)を使用して細胞を分離、遠心洗浄後、一部の細胞はMatrigel上に再播種してプライマリーカルチャーとし、残りはCorning製のTranswellインサート上に薄層のMatrigelを用いて播種した。Transwellインサートを用いることで、卵管オルガノイドのアピカル(管腔側)コンパートメントに直接アクセスできる培養系が確立され、配偶子の投入および回収が容易となった(図1参照)。

継代と播種後、48ウェルプレートおよびTranswell(孔径0.4 $\mu$ m)に播かれたオルガノイドは、上記と同じ完全培地Aで10日間培養された。その後、分化誘導培地Bを用いて段階的に分化を誘導した。この分化培地には以下が含まれる:

- 5ng/ml KGF (FGF-7、Peprotech)
- 10ng/ml WNT7a (Peprotech)
- 0.2ng/ml エストラジオールE2 (Sigma-Aldrich)
- 10ng/ml プロゲステロンP4 (Sigma-Aldrich)

このスライドは解説を省略します

## 透過顕微鏡によるオルガノイドの観察と形態測定

オルガノイドの画像は、明視野観察には倒立顕微鏡(Nikon Eclipse)を、共焦点観察には共焦点顕微鏡(Opera Phenix)を用いて撮影された。画像の処理と解析にはHarmony®ソフトウェアが使用された。

## MatrigelプレートおよびTranswell上の3Dオルガノイドに対する免疫蛍光染色(IF)

免疫蛍光(IF)染色は、10サンプル(すべてのドナー患者10名分)に対して行われた。オルガノイドは、4%ホルムアルデヒド(FA, Sigma-Aldrich)を含むHank緩衝食塩水(HBSS, Gibco)で37°C・20分間固定された。その後、1% Triton X-100(Sigma-Aldrich)を含むHBSSで室温・40分間透過処理を行い、次に1% Triton X-100と3%ウシ血清アルブミン(BSA, Sigma-Aldrich)を含むブロッキングバッファーで37°C・1時間インキュベートされた。

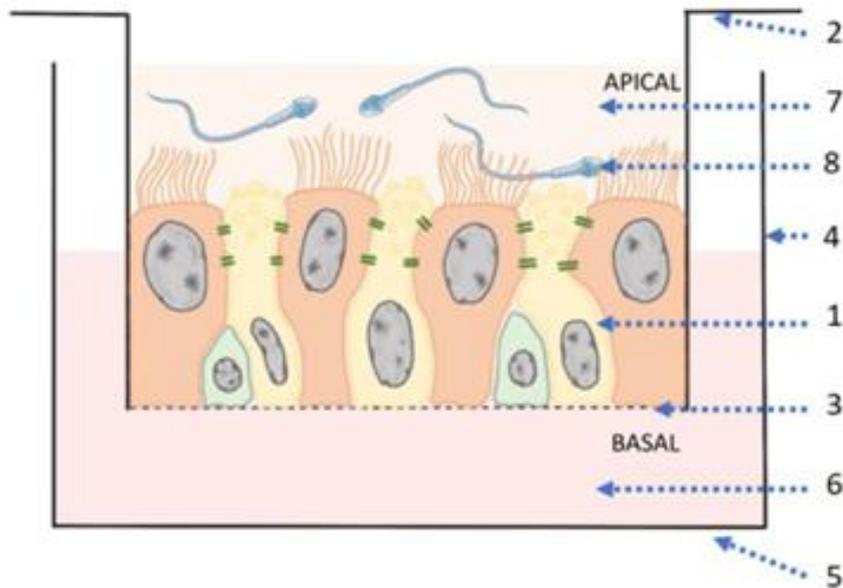
その後、オルガノイドは一次抗体で室温・一晩インキュベートされ、さらに37°Cで1時間追加インキュベーションされた。PBSで3回洗浄した後、二次抗体で37°C・1時間インキュベートし、最後にDAPI(Invitrogen)およびファロイジンで20分間核および細胞骨格を染色した。最終的に、Vectashieldマウンティング媒地(Vector Laboratories)を用いてスライドを封入した。

Ki67、PAX8、deTyr-Tubについて、それぞれの陽性細胞数をDAPIで染色された細胞核の総数に対する割合で算出し、峽部および膨大部のオルガノイドで比較した。解析パラメータおよび閾値設定は、各患者において峽部および膨大部で統一された。

患者ごとの解析細胞数は以下の通りである:

- Ki67: 5,196 ~ 27,158細胞
- PAX8: 5,196 ~ 27,158細胞
- deTyr-Tub: 5,196 ~ 27,158細胞

HFTオルガノイド内での峽部と膨大部の比較は、ペア解析により行われた。



**Figure 1. Human fallopian tube (HFT) organoid culture on Transwell Corning® for easy sperm drop-off and pick-up in the apical compartment.** The illustration shows an HFT organoid (1) in a cell-culture insert (2) comprising a microporous membrane (3) supported by a frame (4). The cell-culture insert (2) can be placed within a culture vessel (5), thus separating the culture vessel into two compartments: a lower basal compartment containing specific organoid culture medium (6) and an upper apical compartment containing minimum medium (7) enriched by apical secretome of HFT organoids. Gamete cells (8) can easily be dropped off and picked up in the apical compartment.

### Transwell Corning を用いたヒト卵管(HFT)オルガノイド培養系

この図は、HFTオルガノイド(①)が細胞培養インサート(②)内に存在する様子を示している。このインサートは多孔性の膜(③)とそれを支持するフレーム(④)から構成されており、培養容器(⑤)に設置できる。これにより、培養容器は2つのコンパートメントに分けられる：下部の基底側コンパートメントにはオルガノイド培養用の特定培地(⑥)が含まれ、上部のアピカル側コンパートメントには最小限の培地(⑦)が含まれ、HFTオルガノイドのアピカル分泌物によって濃縮される。配偶子細胞(⑧)はこのアピカル側コンパートメントに容易に投与・回収することができる。

### ■ この論文でのTranswell使用目的

この研究では、\*\*ヒト卵管オルガノイド (HFT organoids)\*\* をトランスウェル上で培養することにより：

1. 上皮の極性 (apical-basal polarity) を保持した状態で培養
  - 実際に、CD49f染色で基底側、PAX8や線毛のラベリングで管腔 (アピカル側) を確認
2. アピカル側に精子を投与し、回収するという実験系を実現
  - 精子との共培養やアピカル分泌物の採取などが可能に

図1でもその構造が模式図で示されており、以下のような二層構造が重要です：

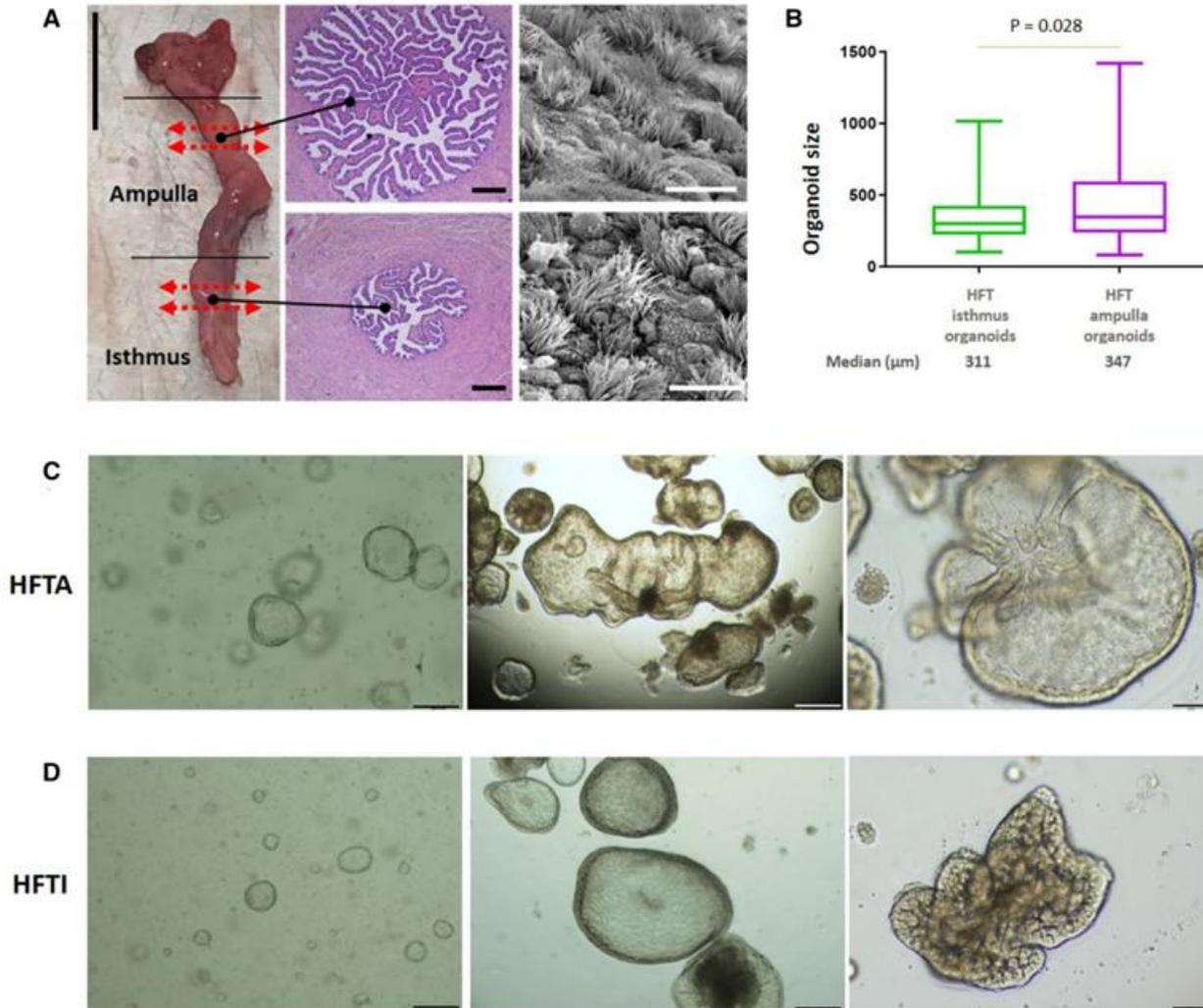
- 下層 (basal chamber)：培養液でオルガノイドの基底側を栄養供給
- 上層 (apical chamber)：実験的介入 (精子の投与や液の採取など)

### ■ Transwellとは？

\*\*Transwell® (Coming社)\*\* は、ポラス (孔のあいた) 膜で上下に分かれた二層構造の培養システムです。

- 上層 (インサート) に細胞やオルガノイドを挿入
- 下層 (ウェル) から基底側へ培養液を供給
- 極性形成、透過性実験、薬物透過、感染モデル、共培養などに使用

膜孔径や材質 (PET、PC、コラーゲンコートなど)、インサート径 (6/12/24/96 wellなど) も豊富に選択できます。



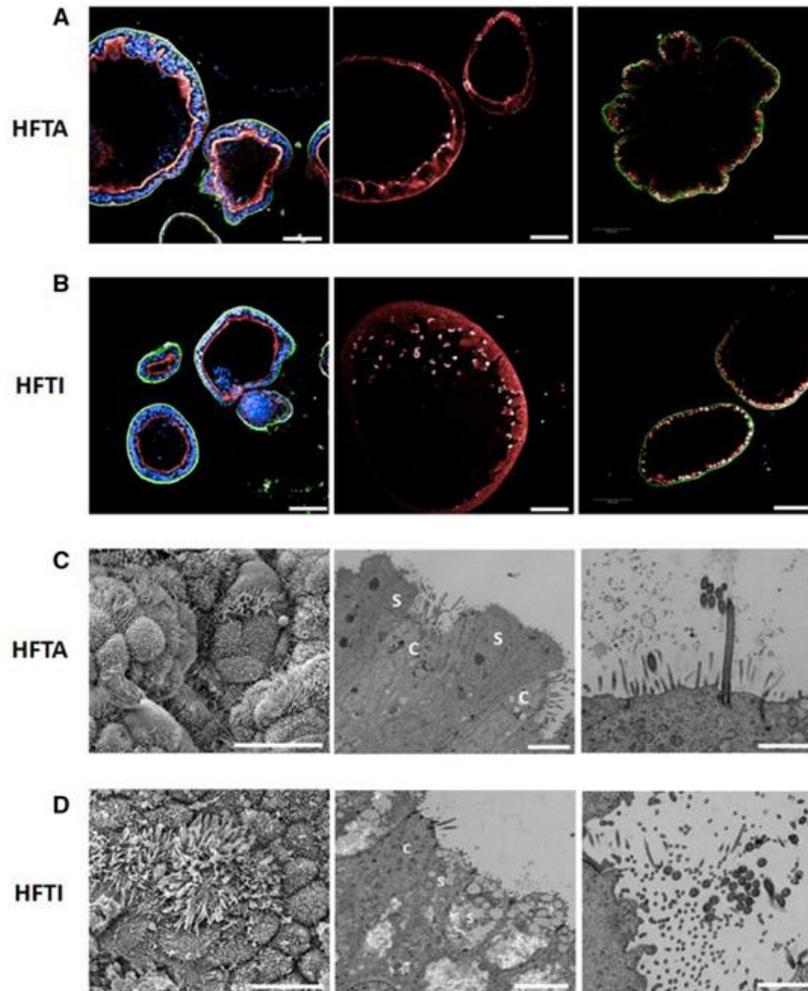
## Fig. 2: ヒト卵管由来オルガノイドの作製と成長評価

•内容: 患者由来の卵管組織から、近位部(峽部)と遠位部(膨大部)に分けてオルガノイドを作製。24日後の形態とサイズの比較を行った。

解説: 膨大部オルガノイドの方が峽部よりも有意に大きく成長し(中央値347 μm vs. 311 μm,  $P=0.008$ )、これが卵管部位による幹細胞の性質の違いを反映している可能性があります。経時的にオルガノイドは球状からより複雑な形態に変化し、上皮の分化を示唆します。

**Figure 2. Human fallopian tube ampulla (HFTA) and human fallopian tube isthmus (HFTI) 3D organoid cultures derived directly from patients' cells.**

(A) Patient tissue before cell culture. Left: Photograph of an ex vivo human fallopian tube retrieved from a patient; the ampulla and the isthmus are physically separated before mechanical and enzymatic treatments. The red arrows show the segments treated by standard histological procedures. Scale bar = 3 cm. Middle: Hemalun-eosin staining of the fallopian ampulla (top). Scale bar = 200 μm. Hemalun-eosin staining of the fallopian isthmus (bottom). Scale bar = 200 μm. Right: Scanning electron microscopy (SEM) of patient tissue from the ampulla (top) and isthmus (bottom). (B) Organoid axis length at passage n°1, Day 24. The long axis of the organoids was measured with adjustment for the number of organoids per well (linear regression). Number of organoids (n) was 147 and 118 in isthmus and ampulla group respectively. The size difference was significant ( $P = 0.028$ ). (C) HFTA organoid culture. Left: At passage n°0, Day 5. Scale bar = 40 μm. Centre: At passage n°1, Day 24. Scale bar = 200 μm. Right: at passage n°1, Day 24. Scale bar = 90 μm. (D) HFTI organoid culture. Left: At passage n°0, Day 5. Scale bar = 40 μm. Centre: At passage n°1, Day 24. Scale bar = 200 μm. Right: at passage n°1, Day 24. Scale bar = 90 μm.

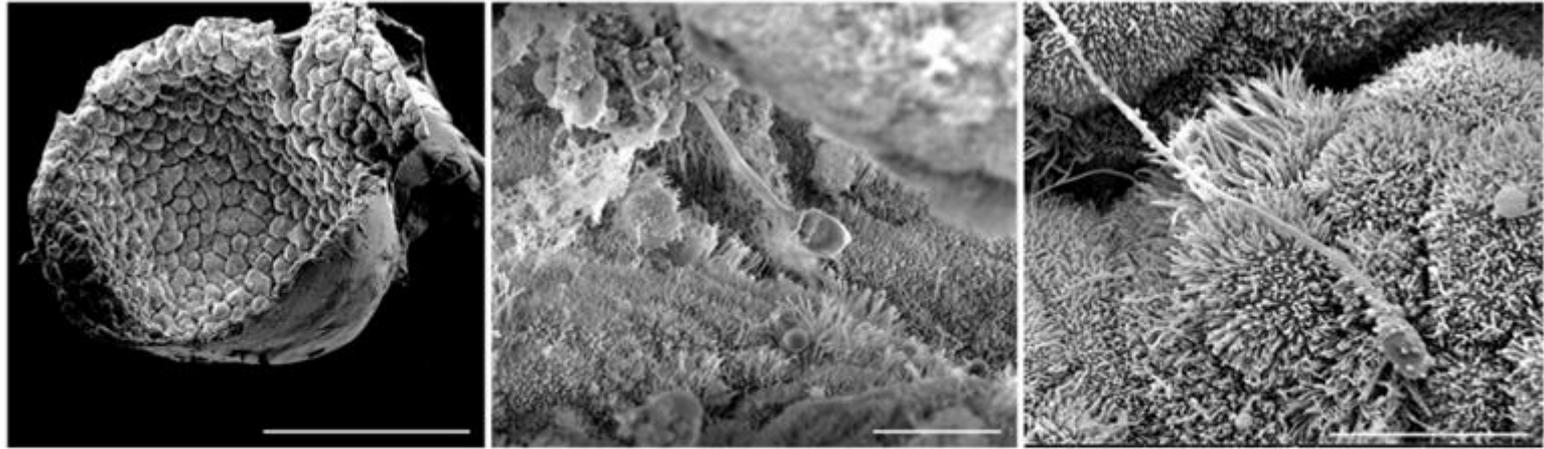


### Fig. 3: オルガノイドの分化形態と上皮構造の確認

•内容: 共焦点顕微鏡と電子顕微鏡によって、オルガノイドにおける上皮の極性と細胞種(線毛細胞・分泌細胞)を可視化。

•解説: CD49fで基底面、PAX8で分泌細胞、脱チロシン化チューブリンで線毛細胞を染色。電子顕微鏡では典型的な線毛構造(9+2構造)や線毛細胞と分泌細胞の混在が確認され、実際の卵管上皮に類似した分化が達成されたことが示されています。

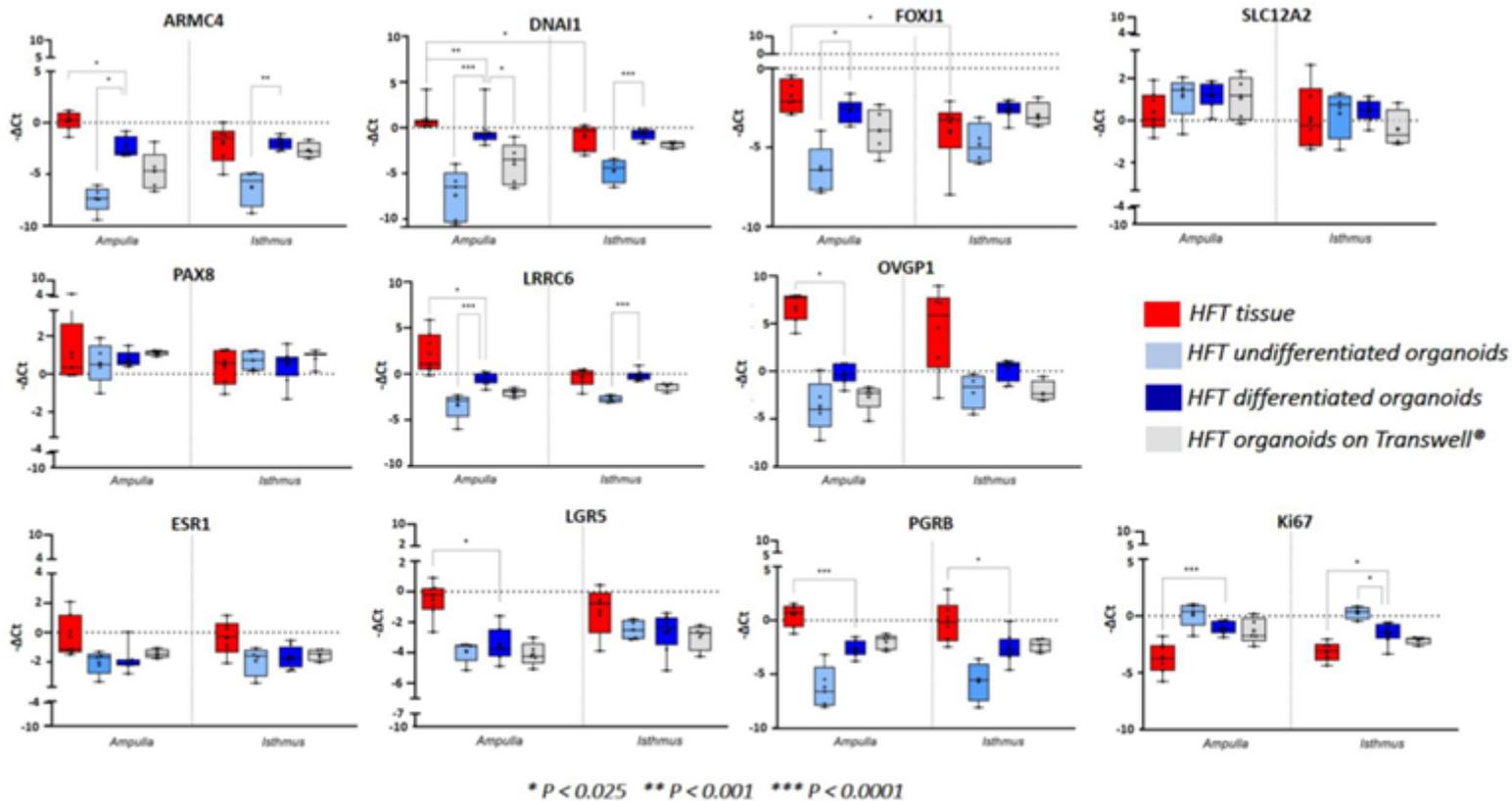
**Figure 3.** Human fallopian tube ampulla (HFTA) and human fallopian tube isthmus (HFTI) 3D organoids both show several features of differentiation. (A) HFTA organoids were observed in confocal microscopy at the end of passage n°1 after 24 days. Left: CD49f (green), phalloidin (red), and DAPI (blue). Scale bar = 100 µm. Centre: detyrosinated tubulin (red). Scale bar = 100 µm. Right: CD49f (green) and PAX8 (red). Scale bar = 100 µm. (B) HFTI organoids were observed in confocal microscopy at the end of passage n°1 after 24 days. Left: CD49f (green), phalloidin (red), and DAPI (blue). Scale bar = 100 µm. Centre: detyrosinated tubulin (red). Scale bar = 100 µm. Right: CD49f (green) and PAX8 (red). Scale bar = 100 µm. (C) Electron microscopy of an HFTA organoid at 24 days of growth. Left: SEM image. Scale bar = 20 µm. Centre: Transmitted electron microscopy (TEM) image; C = ciliated cell; S = secretory cell. Scale bar = 5 µm. Right: TEM image showing ciliary axoneme structure. Scale bar = 2 µm. (D) Electron microscopy of an HFTI organoid at 24 days of growth. Left: SEM image. Scale bar = 10 µm. Centre: TEM image; C = ciliated cell; S = secretory cell. Scale bar = 5 µm. Right: TEM image showing ciliary axoneme structure. Scale bar = 2 µm.



**Figure 4.** Scanning electron microscopy (SEM) images of human fallopian tube (HFT) 3D-organoids at the end of passage n°1 after 24 days of growth and differentiation. Left: global view of an HFT isthmus 3D organoid cut in half. Scale bar = 500  $\mu$ m. Centre and right: injected spermatozoa moving in HFT ampulla (centre) and isthmus (right) 3D organoids surrounded by ciliated and secretory cells of HFT organoids. Scale bar = 10  $\mu$ m.

#### Fig. 4: オルガノイド内での精子の可視化 (SEM画像)

- 内容:** 走査型電子顕微鏡で、オルガノイド内に存在する運動中の精子と、それを囲む線毛細胞・分泌細胞を観察。
- 解説:** オルガノイド内に放出された精子が、自然な卵管上皮のように線毛と分泌細胞に取り囲まれながら存在しており、卵管内腔の微小環境が模倣されていることを示しています。これはヒトの体内環境に近い *in vitro* モデルとしての有用性を裏付ける重要な証拠です。

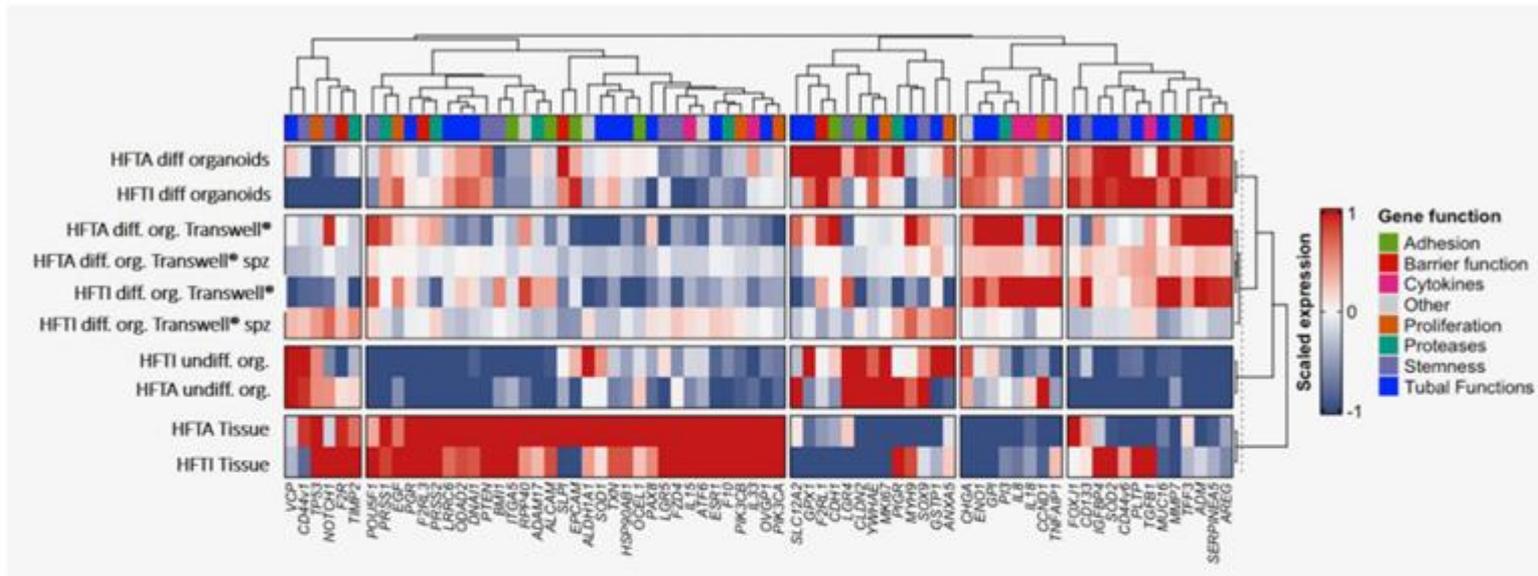


**Figure 5.** Relative gene expression ( $-\Delta C_t$ ) of 11 targeted genes related to ciliary, secretory, and other functions. Sample sizes ( $n$ —numbers) were respectively 8 and 8 for human fallopian tube (HFT) ampulla and isthmus tissue, 7 and 7 for undifferentiated HFT ampulla and isthmus 3D-organoids, 8 and 10 for differentiated HFT ampulla and isthmus 3D organoids, and 10 and 7 for HFT ampulla and isthmus organoids on Transwell. Significance was indicated by a mark: \* $P < 0.025$ ; \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ .

## Fig. 5: 分化に伴う遺伝子発現の変化

•内容: 11種類の代表的遺伝子の相対発現量( $-\Delta C_t$ 値)を比較(例: 線毛機能・分泌機能・接着因子など)。

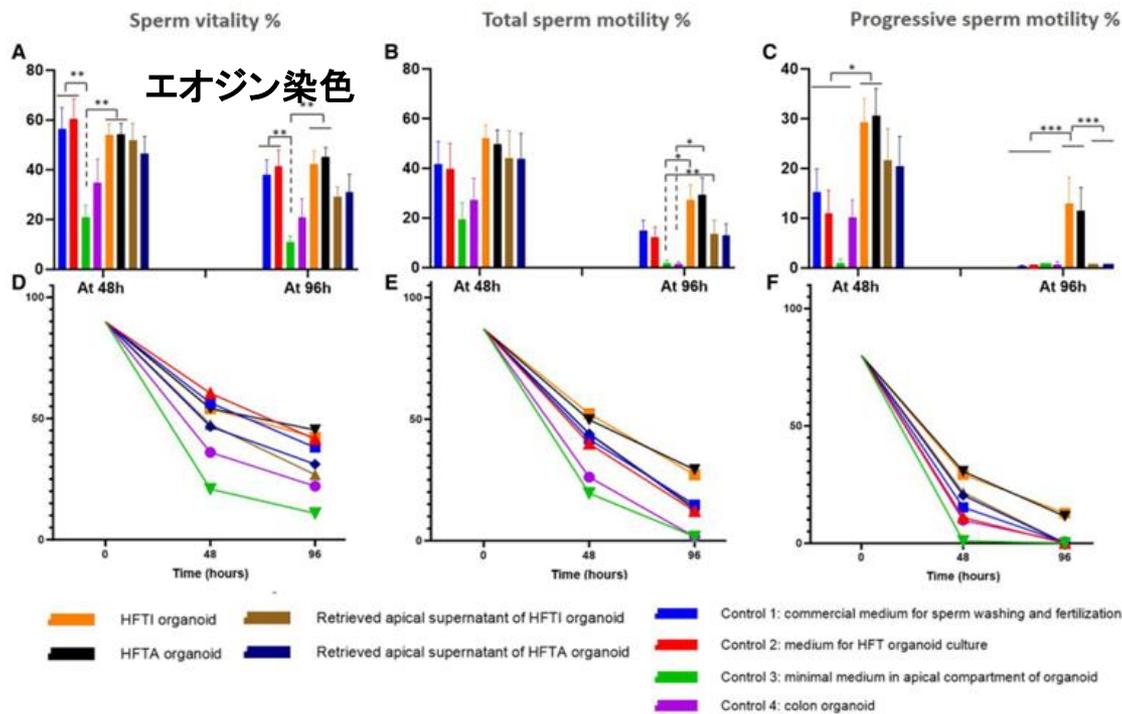
•解説: 分化後のオルガノイドでは、未分化状態に比べて線毛・分泌関連遺伝子の発現が有意に増加。これはホルモン刺激(E2, P4, WNT7aなど)によって、オルガノイドが卵管特異的な分化を遂げていることを示しています。



**Figure 6.** Heatmap representation of mRNA expression levels (scaled expression) analysed via qPCR Fluidigm approach. Eight different sample groups were considered: HFTA\_diff\_org (human fallopian tube differentiated ampulla organoids), HFTI\_diff\_org (human fallopian tube differentiated isthmus organoids), HFTA\_diff\_org\_trans (human fallopian tube differentiated ampulla organoids in transwell), HFTA\_diff\_org\_trans spz (human fallopian tube differentiated ampulla organoids in transwell after 4 days of coculture with human spermatozoa), HFTI\_diff\_org\_trans (human fallopian tube differentiated isthmus organoids in transwell), HFTI\_diff\_org\_trans spz (human fallopian tube differentiated isthmus organoids in transwell after 4 days of coculture with human spermatozoa), HFTA\_und\_org (human fallopian tube undifferentiated ampulla organoids), HFTI\_und\_org (human fallopian tube undifferentiated isthmus organoids), HFTA tissue (human fallopian tube ampulla tissue), and HFTI tissue (human fallopian tube isthmus tissue). The heatmap presents scaled expression values ranging from  $-1$  (blue) to  $1$  (red). Each cell represents the mean value of mRNA expression for a specific gene using multiple female human donors. Sample sizes ( $n$ -numbers) was 8 and 10 for HFT differentiated organoids ampulla and isthmus respectively, 10 and 7 for HFT organoids on Transwell ampulla and isthmus respectively, 7 and 7 for HFT undifferentiated organoids ampulla and isthmus respectively, 8 and 8 for HFT tissue ampulla and isthmus respectively. Gene functions are colour-coded at the top of the heatmap, including adhesion, barrier function, cytokines, proliferation, proteases, stemness, tubal functions, and others. Dendrograms was built on k-means hierarchical clustering of genes and sample groups, reflecting the Pearson similarity patterns within the dataset.

## Fig. 6: Heatmapによる遺伝子発現プロファイルの全体像

- **内容:** qPCRデータを基にしたヒートマップ。組織、未分化・分化オルガノイド(3D培養およびTranswell)、精子共培養後の比較。
- **解説:** 未分化オルガノイドは組織から大きく乖離した発現パターンを示すが、分化後オルガノイドは組織に類似した発現プロファイルを示す。また、精子との共培養後でも大きな発現変化はなく、モデルとしての安定性が確認されました。



両者の違いとその意義

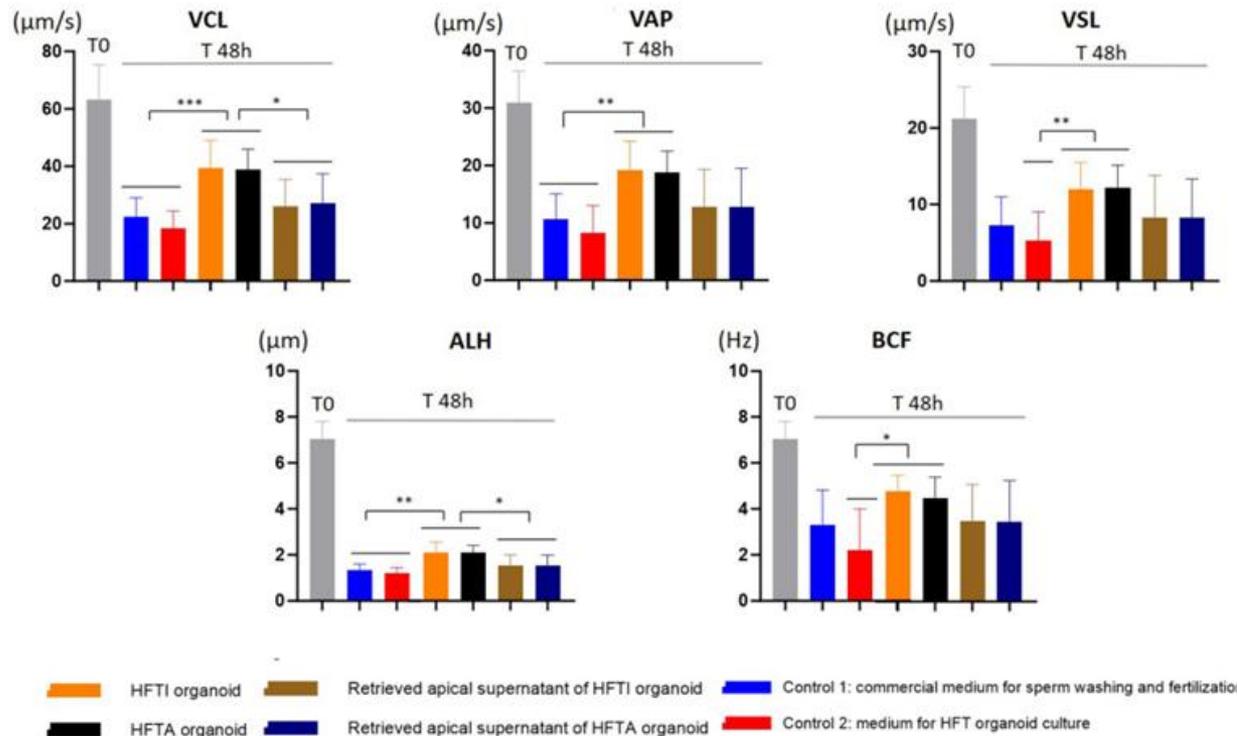
| 比較点          | HFT organoid  | apical supernatant             |
|--------------|---|--------------------------------|
| 精子とオルガノイドの接触 | 直接接触あり (物理的共培養)                                     | 接触なし (分泌液のみ)                   |
| 分泌物の供給       | オルガノイドからリアルタイムで供給され続ける                              | 培養液を1回収取して使用 (成分は静的)           |
| 意義           | オルガノイドの表面構造 (纖毛や細胞外マトリクス) との相互作用も含めた「in vivoに近い」モデル | 分泌物の液性因子 (セクレトーム) だけが影響しているモデル |

**Figure 7. Sperm vitality and motility after incubation in human fallopian tube (HFT) organoids and in different controls.** Sperm vitality after eosin staining (A, D), total sperm motility (B, E), and progressive sperm motility (C, F) at 48 and 96 h of incubation in human fallopian tube (HFT) ampulla and isthmus organoids on Transwell, in retrieved apical supernatants of HFT ampulla and isthmus organoids on Transwell, in colon organoids and in different control media: minimum essential medium (MEM), specific medium for sperm fertilization (Universal IVF Medium, CooperSurgical), and medium for HFT organoid culture in the basal compartment. Above (A, B, C), bars are mean  $\pm$  SEM. Below (D, E, F), follow-up of mean values from 0 to 96 h. N = 10 in each group. Significant differences are indicated by a mark: \* $P < 0.025$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## Fig. 7: 精子の生存率・運動率・前進運動率の比較

•**内容:**さまざまな培養条件下での精子の生存率・全運動率・前進運動率を48時間および96時間で評価。

•**解説:**HFTオルガノイドのアピカルコンパートメントに共培養された精子は、48時間後および96時間後において、他の培養条件(商用IVF培地、最小必須培地、結腸オルガノイドなど)に比べて有意に高い前進運動率を維持。これはオルガノイドが自然な卵管環境を再現し、精子機能を保持・促進できることを示しています。



**Figure 8. Sperm kinematic parameters measured with computer-assisted sperm analysis (CASA) analysis in HFT organoids and different controls.** Kinematic parameters measured with CASA analysis at 0 h (in grey) and at 48 h in the different conditions (controls and organoids). VCL, curvilinear velocity; VAP, average path velocity; VSL, straight-line velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat-cross frequency. Significant differences are indicated by a mark: \*P < 0.025; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

## Fig. 8: CASAによる精子運動キネティクス評価

- 内容**: 48時間後の精子運動性に関するキネティクス指標 (VCL, VAP, VSL, ALH, BCF) を比較。
- 解説**: HFTオルガノイド内に共培養された精子は、商用培地や他の条件と比べて、速度や頭部運動振幅など複数の運動パラメータで有意に高い値を示しました。特にVCL, VAP, ALHの向上が顕著で、卵管上皮環境が精子の有効運動性を高める可能性が示唆されます。

## Discussion

結論とあわせ3ページあります 解説します

生殖生理学において、卵管は妊娠に至るまでの重要な過程（配偶子の成熟能獲得、受精、着床前胚発生）が起こる器官として極めて重要である。しかしながら、生殖補助医療（ART）の発展により、卵管は長らく研究の焦点から外れ、軽視されてきた。したがって、卵管の機能を研究するための頑健なヒトin vitroモデルの開発が必要である。

近年、再生医療やがん研究の分野を中心にヒトオルガノイドモデルの開発が盛んに行われており、発生生理学と生物学の理解を深める目的で利用されてきた。これまで、卵管オルガノイドモデルの開発目的は、主にその発生に関するシグナル伝達経路の研究（Kessler et al., 2015; Alsaadi et al., 2023）、女性生殖管の胎児期発達（Venkata et al., 2022）、卵管由来の高悪性度漿液性卵巣癌（HGSC）のモデル化（Yucer et al., 2017）、およびクラミジア感染の影響評価（Kessler et al., 2015）に限定されていた。

一方で、本研究は、不妊症診断/治療改善のための卵管オルガノイド利用という観点から新たなアプローチを提供している。その背景には、従来のオルガノイドではアピカル（管腔）側へのアクセスが困難であったという技術的課題がある（Heidari-Khoei et al., 2020）。我々のモデルでは、成体組織からの細胞分離をベースとし、消化管オルガノイドと同様にWNT3aやRSPO1といった適切な増殖因子を用いた。また、Kesslerら（2015年）の示すように、HFTオルガノイドの継続的な増殖と分化にはWntおよびNotchのパラクリン経路が必要であり、幹細胞ニッチの維持や長期的な分泌細胞・繊毛細胞への分化を支える。さらに、我々のモデルではWNT7aを用いており、これは卵管幹細胞（ASC）の更新や卵管の発生・維持において、TGFシグナル経路を活性化する重要な因子である（Miller and Sassoon, 1998）。培養の終盤には、 $17\beta$ -E2を用いて分化と繊毛形成を促進し、プロシグナリング因子の作用が優位に働くように設計している。

このようにして構築したモデルの機能評価には、精子の行動を検証することが不可欠であった。最初、マトリゲルを貫通してのマイクロインジェクションを試みたが困難であったため、トランスウェル型インサートを用いたアピカル側に簡便にアクセスできる培養系を開発した(図1)。我々の知る限り、ヒト配偶子との共培養を実現した女性生殖器オルガノイドモデルはこれが初である。

この新しい培養系を用いて、患者由来のオルガノイド(峡部および膨大部)における精子の生存率・運動率を0、48、96時間で測定したところ、市販の受精用培地と比較しても優れた精子運動維持効果が認められた。精子運動性の時間経過に伴う低下は、卵管オルガノイドとの接触下では明らかに抑制されていた。特に96時間まで運動性が維持されたことは特筆すべきである。

この点に関して、ヒト卵管内での精子運動性に関する既存文献は少ないが、1975年に Ahlgren が示した研究では、性交後86~113時間の間には運動性のある精子は確認されなかったと報告されている。このことから、本モデルでの観察結果は良好な生理的条件を再現していると考えられる。

生存率に関しては有意差が小さく、卵管上皮には精子の運動性に特異的な影響を与える可能性が示唆された。また、コントロールとして使用した結腸オルガノイドではこの効果が見られず、オルガノイド培養環境(マトリゲルや培地)そのものの影響も否定された。したがって、卵管上皮の特異的な影響であることが裏付けられた。

CASAによる運動キネマティクス解析では、全ての条件で48時間後には一部指標の低下が見られたものの、HFTオルガノイド中の精子はVCL、VAP、VSL、ALHといった主要指標で有意に高い値を維持していた。これらの指標は、体内での受精能や生殖管内の移動能力と関連するとされており(Aitken et al., 1986; Mortimer et al., 1986; Larsen et al., 2000)、本モデルが生理的精子機能の評価に有用であることが示された。

## Conclusion

女性ホルモンへの曝露後に良好な分化特性を示す再現性の高いヒト卵管オルガノイドモデルと、頂端側コンパートメントに容易にアクセスできる培養システムを開発構築しました。この結果から、オルガノイドモデルを用いることで、卵管上皮が生殖過程に果たす役割の一端を観察可能であることが示された。今後は、卵管上皮が精子運動性に与える効果の分子メカニズムを解明することを目指します。

ヒト卵管は臨床的にアクセスが難しく、研究が進んでいませんでした。HFTオルガノイドは、卵管上皮、配偶子、胚との間の複雑な相互作用を解明するための、ヒトの細胞モデルとして有望です。不妊カップルへの医療ケアの向上を目指すうえで、新たな解決策の開発が求められており、オルガノイドモデルは生殖生物学における卵管メカニズムの理解を進めるための中核的なツールとなり得ます。

本研究の新規性は、HFTオルガノイドを用いて上皮細胞と配偶子の相互作用を研究するモデルを確立した点にあります。従来の細胞培養系では困難であった精子との長期(最大4日間)共培養を可能にし、メカニズムの理解や、受精能維持・向上への道を開きました。卵管環境の理解が深まることで、体外受精における受精および胚培養ステップの改良や、IVF用培地の組成改善が期待されます。さらに、細胞外小胞が卵管分泌物の主要な構成要素であり、受精や胚発生に重要な役割を果たすことから、HFTオルガノイドは細胞外小胞のバイオリアクターとしての可能性も持ちます。

これらの知見は、女性生殖器オルガノイドを用いた生殖医療研究の新たな展開を示すものであり、今後、卵子や胚との相互作用の研究へと発展していく可能性があります。

# The modeling of human implantation and early placentation: achievements and perspectives

Tanya Dimova <sup>1,\*</sup>, Marina Alexandrova<sup>1</sup>, Ivaylo Vangelov<sup>1</sup>, Yuan You<sup>2</sup>, and Gil Mor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology and Immunology of Reproduction “Acad. Kiril Bratanov”, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>C.S. Mott Center for Human Growth and Development, Wayne State University, Detroit, MI, USA

\*Correspondence address. Department of Immunobiology of reproduction, Institute of Biology and Immunology of Reproduction, Bulgarian Academy of Sciences, 73 blvd Tzarigradsko Shosse, Sofia 1113, Bulgaria. Tel: +359-882-412742. E-mail: tanyadimova@yahoo.com

 <https://orcid.org/0000-0001-8665-4352>

---

## TABLE OF CONTENTS

---

- Introduction
    - Human implantation and placentation in brief: a unique, ineffective, and difficult-to-study process
  - Modeling of the human implantation: the status quo
    - In vivo* (animal) models: primates and rodents
    - Ex vivo* models: endometrial and trophoblast explants
    - In vitro* models: primary cells, cell lines, stem cells, and 3D models
  - Perspectives
  - Concluding remarks
-

本レビューでは、ヒトにおける着床という、特異的かつ非効率的な、そして研究が困難なプロセスに注目し、現在最も使用されているin vivo、ex vivo、およびin vitroモデルについて要約した。このプロセスの特異性により、動物モデルよりもex vivoやin vitroモデルの方が優れていると結論付けられている。ここでは、初代妊娠組織や細胞、癌細胞や不死化細胞株、幹細胞に由来するモデルについて考察した。これらに対応する高度な三次元（3D）培養（スフェロイド、オルガノイド、およびアセンブロイド）は、in vivo環境を忠実に再現するため、ヒトの着床や初期胎盤形成のin vitroモデルとしてより有益であると考えられている。これらのモデルが、ヒト着床時の母体-胎児間の相互作用をどの程度表現できているか、またその研究応用に焦点を当て、検討した。さらに、その作製、取り扱い、標準化、検証、操作方法に関するいくつかの側面についても考察した。今後の展望としては、利用可能な3次元培養システムの体系化と、用語や方法論の統一が急務であると考えられる。胚盤胞および原腸胚モデルとヒト胚盤胞／原腸胚との類似性は、着床研究、発生生物学、再生医療、および創薬などの分野への新たな可能性を示している。しかし、これらの合成胚モデルは、将来の研究や産業界・臨床現場での広範な導入に影響を及ぼす倫理的・法的問題を提起しており、徹底的な議論が必要である。

# ヒトにおける着床と初期胎盤形成のモデリング：成果と展望

壁内着床の成功は、ヒト胚の生存にとって重要なステップである。ヒトにおける着床時の細胞および分子プロセスに関する知識には、まだ多くのギャップがある。ほとんどの妊娠喪失は着床前後または着床1週目に起こると考えられているが、この期間にヒトのin vivoおよびex vivo研究を行うことはできない(Macklon et al., 2002)。その結果、臨床的介入の可能性は依然として限られている。

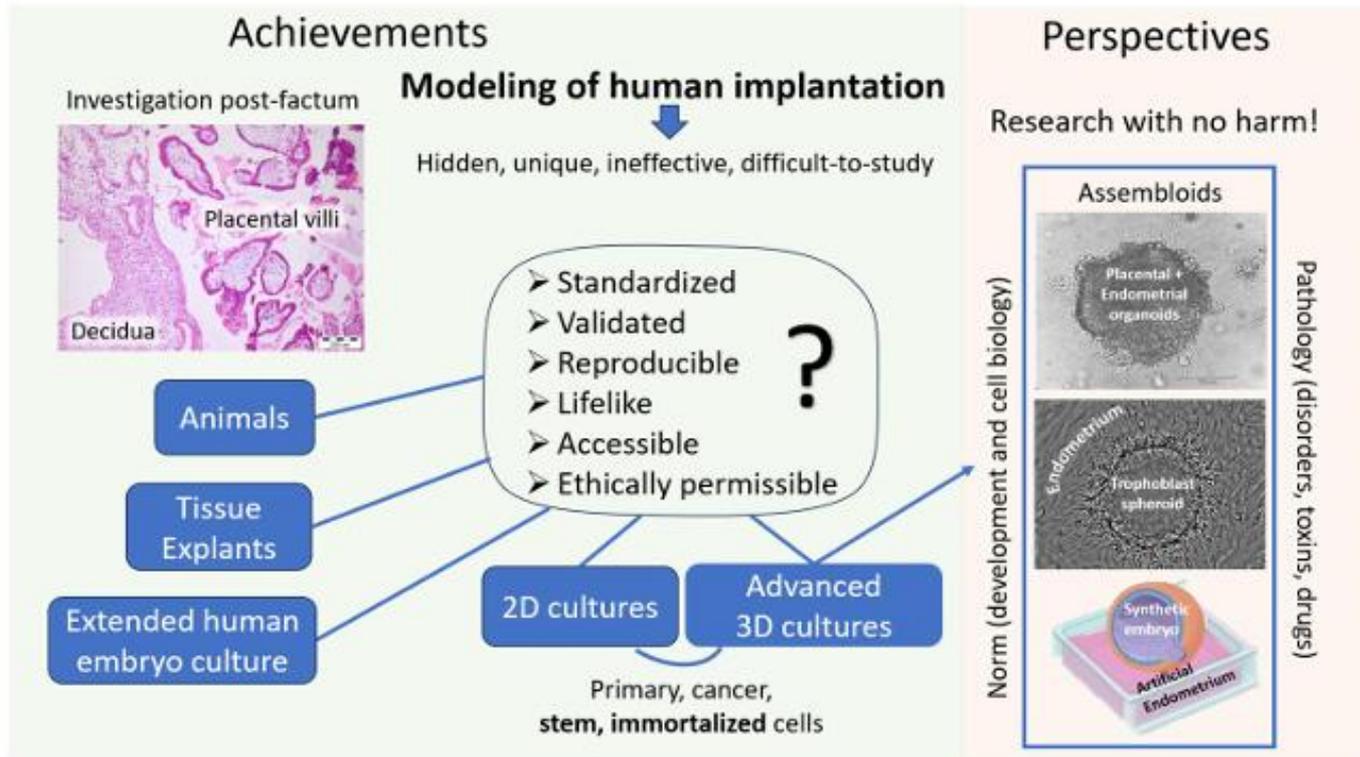
研究目的：本レビューでは、ヒトにおける着床という特異的かつ非効率的な、モデリングが困難なプロセスの特徴を概説し、最も使用されているin vivo、ex vivo、およびin vitroモデルの長所と短所を要約する。細胞株由来のモデルの多様性を示すとともに、これらのデータが同じ性質を持つ十分に確立された初代細胞によってどのように裏付けられているかについて述べる。高度な3D in vitroモデルの取り扱い、標準化、検証、操作方法に関する重要な側面について、広範囲にわたり論じた。特に注目したのは、絨毛外栄養膜細胞のハイブリッド表現型とHLAプロファイルを再現した胚盤胞様モデルである。絨毛外栄養膜細胞は、着床を成功させ、免疫的母体-胚認識において重要な役割を果たす、特異的でありながらあまり理解されていない細胞集団である。新たな倫理的ジレンマが生じてはいるものの、長期胚培養と合成胚モデルもまた、このレビューの対象とした。

検索方法：電子データベースであるPubMedを、MeSH用語とキーワードによる多段階検索戦略を用いて、開始時から2024年3月まで検索した。さらに、選択した論文で引用されている著者について、前方および後方参照検索を行った。

結果：霊長類やげっ歯類は、ヒト着床研究のための貴重なin vivoモデルである。しかし、壁内、腺、血管内浸潤の深さに加え、胎児の生存に関与するヒト特有の因子を伴うため、ヒト着床には特異的な特徴があり、種を超えたデータの外挿には限界がある。ex vivoモデルは短期間の培養であり、着床期間とは関連性がなく、標準化が困難である。さらに、選択的妊娠中絶から組織を入手することは、倫理的・法的な問題を引き起こす。培養が容易な癌細胞株は、自然形質転換を起こしやすく、正常な組織特性を欠くなど、様々な欠点がある。ヒトの着床や初期胎盤形成のin vitroモデリングには、ヒト外植片や初代細胞、または癌細胞株を、幹細胞特性を保持した不死化細胞株の培養液に置き換えて用いる方法が有効であると思われる。胎盤および子宮内膜の代替として、スフェロイド、オルガノイド、アSEMBロイドなどの高度な三次元（3D）モデルもまた、着床前後期における理解に著しい進歩をもたらした。これらの統合された複雑なモデルの最適化と標準化には、まだ多くの課題が残されている。これらのモデルに免疫要素を含めることは、免疫寛容のメカニズムを解明する上で有益であると思われる。幹細胞を用いた胚様モデルやIVF余剰胚を用いた研究は、新たな可能性をもたらすものであり、ヒト着床と初期胚形成のin vitroモデリングは、今後10年間のトレンドになると考えられている。このような研究に伴い、ヒト胚の道徳的地位や、余剰胚の提供に同意する女性の潜在的搾取といった新たな倫理的ジレンマも浮上している。ヒトの生殖に利益をもたらす可能性のあるヒト胚や胚を用いた研究を適切に規制するためにも、各国の法的・倫理的枠組みを慎重に評価し、確立することが極めて重要である。

結論：ヒト着床と初期胎盤形成のモデリングに関する利用可能な情報を系統的にまとめたものであり、この分野のさらなる研究を促進することにつながると思われる。高度な3Dモデルの長所、短所、適用可能性、利用可能性を厳密に分類することは、信頼性の高いアウトプットを提供するための研究の質の向上に役立つ。

## GRAPHICAL ABSTRACT



Human implantation is a unique, ineffective, and difficult-to-model process, with a variety of *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* models attempting to simulate certain phases of human implantation and related events; the advanced 3D implantation surrogates/assembloids are promising avenues for the future research of implantation.

## ■ 左側: Achievements (現在の到達点)

### 「ヒト着床モデル化」の課題

• ヒト着床は「隠れた・非効率的・研究が困難」なプロセスであり、直接観察や解析が難しいとされています。

• そのため、モデル化には以下のような条件を満たす必要があります:

- 標準化されている (Standardized)
- 検証済み (Validated)
- 再現性がある (Reproducible)
- 生体に近い (Lifelike)
- アクセス可能 (Accessible)
- 倫理的に許容される (Ethically permissible)

• これらをすべて満たすモデルは、いまだ「？」という位置づけです。

### 現在利用されているモデル

- 動物モデル (Animals)
- 組織切片 (Tissue explants)
- ヒト胚の長期培養 (Extended human embryo culture)
- 2D培養 (2D cultures): 主に細胞単層培養
- 進化した3D培養 (Advanced 3D cultures): 立体的な細胞構造を模倣する培養技術

※ 使用される細胞には、初代細胞、がん細胞、幹細胞、不死化細胞などが含まれます。

## ■ 右側: Perspectives (今後の展望)

目指す方向性: 「害のない研究 (Research with no harm)」

• アセンブロイド (Assembloids) と呼ばれる先進的な3Dモデルの活用が注目されています。

- 例: 胎盤および子宮内膜オルガノイドの共培養 (placental + endometrial organoids)
- トロフォブラスト球 (trophoblast spheroid) と内膜モデルの併用
- \*\*人工子宮内膜と合成胚 (synthetic embryo)\*\* の組み合わせも描かれています。

### 活用される分野

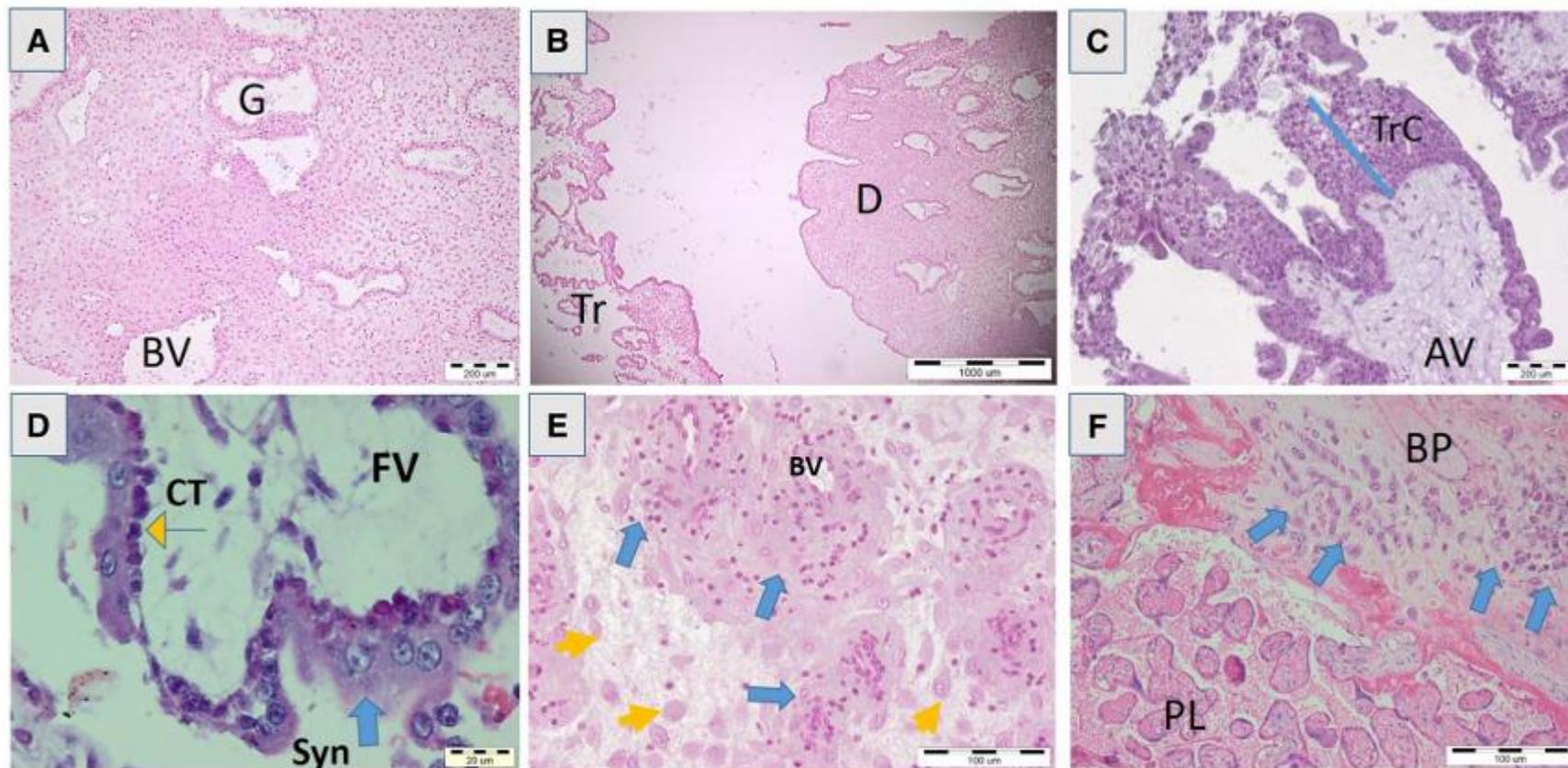
- 正常発生 (Norm: development and cell biology)
- 疾患研究や毒性・薬剤の影響評価 (Pathology: disorders, toxins, drugs)

## ■ 図下のキャプションの要約(補足)

ヒト着床は非常に特殊で非効率的、かつモデル化が困難なプロセスである。in vivo、ex vivo、in vitroのさまざまなモデルが着床過程の一部を模倣するために使われてきたが、今後は\*\*高度な3Dモデル(アセンブロイド)\*\*が有望である。

妊娠初期および後期におけるmaternal-fetal interfaceを示す組織学的画像のセットです。ヒト妊娠において、胎盤と子宮内膜の相互作用がどのように構造化されているかを理解するために非常に重要な図です。

136



**Figure 1. Maternal-fetal interface during early and term human pregnancy.** Paraffin sections stained with hematoxylin and eosin were obtained according to the published protocol (Terzieva et al., 2019). (A) decidualization of the endometrium, note numerous decidual glands and blood vessels. (B) Both parts of the placenta—decidua and trophoblast. (C) Anchoring placental villus with a column of cytotrophoblasts. (D) Floating placental villus with syncytio- (blue arrow) and cytotrophoblasts (yellow arrow). (E) Clusters of EVT (blue arrows) remodeling blood vessel and decidua (yellow arrows) around. (F) Term placental villi bordering basal plate (maternal surface) with numerous EVT (blue arrow). G, gland; BV, blood vessel; D, decidua; Tr, trophoblasts; AV, anchoring villus; TrC, cytotrophoblast column; FV, floating villus; Syn(ST), syncytiotrophoblasts; CT, cytotrophoblasts; EVT, extravillous trophoblasts; PL, placenta; BP, basal plate.

この図は、\*\*妊娠初期および後期におけるmaternal-fetal interfaceを示す組織学的画像のセットです。ヒト妊娠において、胎盤と子宮内膜の相互作用がどのように構造化されているかを理解するために非常に重要な図です。

(A)

- 内容: 妊娠初期の子宮内膜の脱落膜化(decidualization)を示す。
- 特徴: 腺構造(G:gland)や血管(BV:blood vessel)が多数見られる。
- ポイント: 子宮内膜が妊娠に対応して構造的に変化し、胎児側組織との受容準備を整える様子。

(B)

- 内容: 胎盤の2つの主要な構成要素、すなわち脱落膜(D:decidua)と栄養膜(Tr:trophoblast)を示す低倍率画像。
- ポイント: 母体と胎児の界面を広く俯瞰する図。

(C)

- 内容: \*\*固定型絨毛(anchoring villus)\*\*を示す。
- 特徴: 栄養膜細胞(cytotrophoblast:TrC)の柱状構造が脱落膜内に侵入している。
- 矢印: 青→柱状部分→細胞性栄養膜(cytotrophoblast)。

(D)

- 内容: \*\*浮遊絨毛(floating villus)\*\*の拡大図。
- 特徴: 表面に合胞体栄養膜(Syn)、内部に細胞性栄養膜(CT)が見える。
- ラベル: FV(floating villus)、黄色矢印→cytotrophoblast。

(E)

- 内容: \*\*EVT(extravillous trophoblast)\*\*の集簇(青矢印)が母体血管や間質細胞をリモデリングしている様子。
- 矢印: 青→EVT 黄→周囲の母体間質細胞

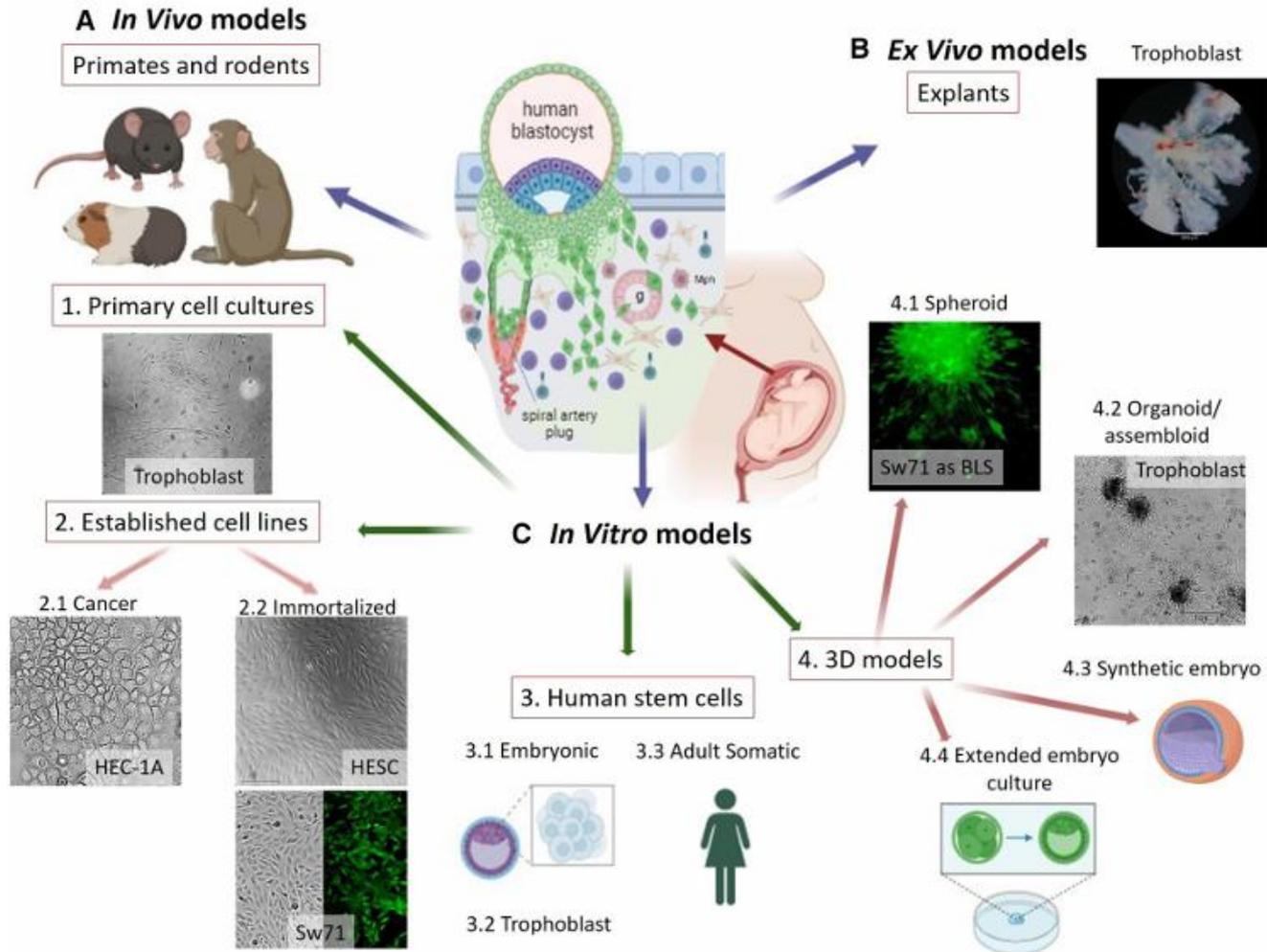
(F)

- 内容: 妊娠末期の胎盤絨毛が母体側基底板(basal plate)に接している様子。
- 特徴: 多数のEVT(青矢印)が見られ、胎盤が母体の血管系と密接に関わっていることを示す。
- ラベル: BP(基底板)、PL(胎盤)

■ 図の目的と意義: この図は、妊娠初期から末期にかけての母体と胎児の接触部位(胎盤界面)の構造的変化を視覚的に示し、次のような理解を助けます:

- 胎児側の栄養膜(trophoblast)がどのように母体組織に侵入・変化を加えるか
- 母体の脱落膜がどのように受容的な環境を作るか
- 合胞体栄養膜と細胞性栄養膜の役割の違い
- 妊娠末期にはEVTが母体血管にどのように関与しているか

# ヒト着床のモデリング



**Figure 2. Modeling of human implantation.** The range of *in vivo*, *ex vivo*, and conventional (2D) and advanced (3D) *in vitro* models, used to recapitulate trophoblast or/and decidua behavior in the peri-implantation period. (A) *In vivo* (animal) models: primates and rodents. (B) *Ex vivo* models: placental explants, representing the fetal part of the placenta. (C) *In vitro* conventional (2D) models: (1) primary cells (isolated from the maternal or fetal part of the placenta); (2) cancer (2.1) and immortalized (2.2) cell lines of maternal or fetal origin; (3) stem cells; (4) advanced 3D models: 4.1. spheroids of maternal or fetal origin, 4.2. self-organized organoids or assembloids, 4.3. synthetic embryos (blastula/gastrula) and 4.4. extended embryo culture. The scheme is created on Biorender.com. The microscope images are the authors' property and have not been published before.

この図は、「ヒト着床のモデリング (Modeling of human implantation)」のために用いられているさまざまな研究モデルの種類を、in vivo、ex vivo、in vitroのカテゴリに分けて整理したものです。それぞれのモデルが、どのように着床過程の一部を再現しようとしているかを示しています。

## 全体構成

中央の「ヒト胚盤胞 (human blastocyst) と子宮内膜」のイラストを中心に、3方向からアプローチが示されています：

- A : In vivoモデル (動物体内モデル)
- B : Ex vivoモデル (摘出組織を用いたモデル)
- C : In vitroモデル (体外モデル)
  - ↳ 通常の2D培養と進化した3D培養に分かれる

### 🐶 A. In vivo models (動物モデル)

- 対象：サル・マウス・モルモットなどの霊長類やげっ歯類
- 目的：着床期の\*\*母体や胎児側組織のふるまい (例：トロフォブラストの侵入など) \*\*を、生体内で直接観察

### 🧪 B. Ex vivo models (摘出絨毛組織モデル)

- 内容：\*\*胎盤絨毛の切片 (explants) \*\*を用いて培養する方法
- 利点：胎児側の胎盤組織に焦点を当て、脱落膜との相互作用も一部再現可能
- 課題：観察時間や組織の寿命が限られている



### ✅ まとめ：この図のポイント

- 着床研究には多様なモデルがあり、それぞれのモデルが異なる段階や構造を模倣しています。
- 従来の2D培養 (細胞単層) から3D構造モデルへと進化しており、より生体に近い再現が可能に。
- 今後は、倫理的に許容されつつ、高い再現性を持つ合成胚・オルガノイド系の応用が期待されています。

## 🧪 C. In vitro models (体外培養モデル)

さらに以下の4つのサブタイプに分類されます：

### 1. Primary cell cultures (初代培養細胞)

- 母体もしくは胎児側の組織から直接単離された細胞
- 例：トロフォブラストなど

### 2. Established cell lines (樹立細胞株)

- 2.1 Cancer-derived : HEC-1Aなど子宮がん細胞株
- 2.2 Immortalized (不死化細胞株) : HESC (ヒト内臓間質細胞)、Sw71 (胎児由来)

### 3. Human stem cells (ヒト幹細胞) |

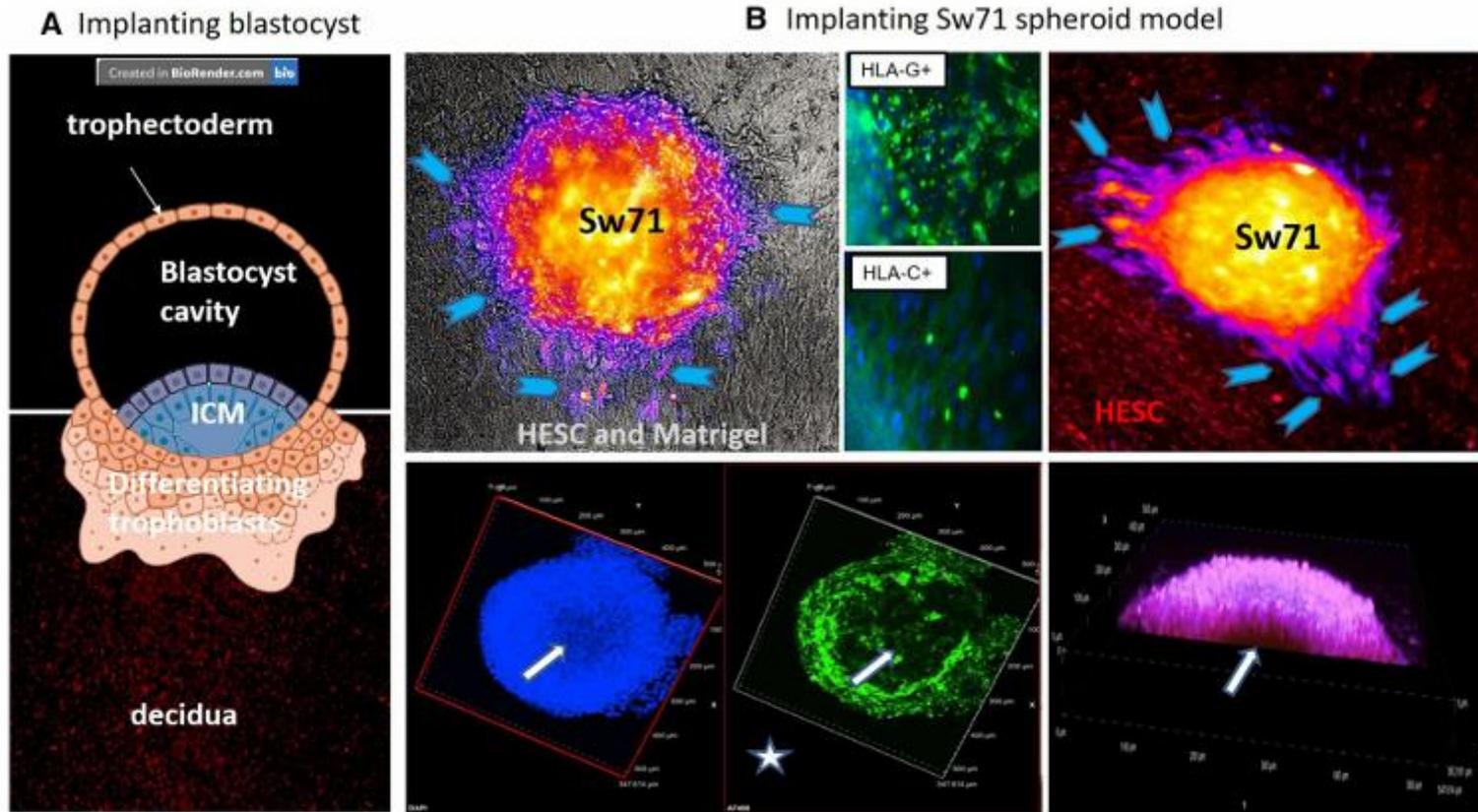
- 3.1 胚性幹細胞 (ESC)
- 3.2 トロフォブラスト幹細胞 (TSC)
- 3.3 体細胞由来のiPS細胞 (成人由来)

これらを用いることで、発生初期の細胞系譜を再現可能

### 4. Advanced 3D models (進化した3Dモデル)

- 4.1 Spheroid (球状構造体)
  - ↳ 例：Sw71細胞を用いたBLS (blastocyst-like structure)
- 4.2 Organoid/Assembloid (自己組織化構造)
  - ↳ 子宮内膜や胎盤オルガノイドを複合培養
- 4.3 Synthetic embryo (合成胚)
  - ↳ 幹細胞から胚様構造を作成し、着床様現象を模倣
- 4.4 Extended embryo culture (胚の長期培養)
  - ↳ 着床様イベントや胚体形成までの再現を目指す

# ヒト着床時の栄養芽層の移動と浸潤を研究するための代理モデルとしての胚盤胞様3D Sw71スフェロイドモデルの適合性



**Figure 3. Suitability of the 3D Sw71 spheroid model as a blastocyst-like surrogate to study trophoblast migration and invasion during human implantation.** (A) Overall view of an implanting human blastocyst (Day 7–9 post-fertilization). (B) Upper panel (light microscopy, ECHO Revolve microscope RVL-100-M, Echo, San Diego, CA, USA, magnification 10×): Left—Sw71 spheroid (yellow) placed on human endometrial stromal cells (HESC) monolayer (grey), covered with Matrigel as a substitute for ECM. Note the invading trophoblast cells from the spheroid periphery (blue arrowheads, purple zone). Right—Sw71 spheroid trophoblast cells (blue arrowheads, purple zone), migrating between the stromal endometrial cells (HESC in red). Middle—HLA-G and HLA-C expression (in green) by Sw71 spheroid's trophoblast cells. The staining is performed with antibodies against HLA-G (rabbit, polyclonal, E-AB-18031, Elabscience) and HLA-C (mouse, monoclonal, sc-166088, Santa Cruz Biotechnology), and cell nuclei are counterstained with Hoechst (in blue); B. Lower panel (confocal microscopy, Nikon AX/AX R Confocal Microscope System): Blastocoel-like cavity (white arrow) of the Sw71 spheroid. Left and right—The nuclei of Sw71 cells are visualized with Hoechst staining (blue and magenta, respectively); middle—Sw71 trophoblast cells are stained for HLA-G molecule (green).

## ◆ 図全体の構成

- 左 (A) : 実際のヒト胚盤胞の着床モデルの模式図
- 右 (B) : Sw71スフェロイドを使ったin vitroモデルの結果 (実験画像)

### ◆ A. Implanting blastocyst (着床中の胚盤胞)【模式図】

- 上段 : 胚盤胞の構造
  - Trophectoderm (外層) : 栄養膜細胞に分化
  - ICM (内部細胞塊) : 将来胎児になる部分
  - Blastocyst cavity : 胚胞腔
- 下段 : 子宮内膜 (decidua) に着床しかけている様子

▶ この構造をSw71スフェロイドで模倣しようとしているのが右側の図 (B) です。

### ◆ B. Sw71スフェロイドによる着床モデル (実験画像)

#### ◆ 上段左 (光学顕微鏡)

- 黄色の球状 : Sw71スフェロイド (トロフォブラスト由来)
- 灰色の背景 : HESC (子宮内膜間質細胞)
- 青矢印と紫領域 : スフェロイドの外側から侵入していく栄養膜細胞

#### ◆ 上段中央 (免疫染色)

- 緑色 : HLA分子の発現
  - HLA-G (上) : 胎盤特異的トロフォブラストマーカー
  - HLA-C (下) : 別のMHCクラス分子
- ▶ Sw71スフェロイドはHLA-G陽性一胎盤様細胞であることを示す

#### ◆ 上段右 (蛍光画像)

- 赤 : HESC (間質細胞)
- 黄色 : Sw71スフェロイド
- 青矢印 : スフェロイドから周囲へと移動している細胞

#### ◆ 下段 (共焦点レーザー顕微鏡 3D構築画像)

- 左 : 青 (Hoechst) で核染色されたSw71スフェロイド。白矢印は胚胞腔のような空洞 (blastocoel-like structure)
- 中央 : 緑 : HLA-G陽性細胞 (=トロフォブラスト)
- 右 : 細胞密度の3Dイメージ。侵入の深さも再現されている。

## ✓ 結論 (図から読み取れること)

- Sw71スフェロイドは、胚盤胞様の構造 (球状 + 内部腔) を形成し、
- 周囲の子宮内膜間質細胞に対して、実際の栄養膜細胞のように移動・侵入する
- HLA-G陽性細胞の存在により、胎盤様の性質が確認される

▶ これらのことから、Sw71スフェロイドは、着床過程の研究に使える有望なin vitroモデルであると示唆されています。

# ヒト、霊長類、げっ歯類の着床における主な相違点

**Table 1.** Main differences in implantation between humans, primates, and rodents.

|                               | Human   | Primates (great apes, old and new world monkeys)   | Rodents (mice, rats, guinea pigs, rabbits)  | References   |
|-------------------------------|---|--|---|--|
| Decidualization               | Spontaneous cyclic process independent on the embryo                                | Spontaneous cyclic process independent on the embryo                                     | Dependent on an embryonic stimulus  | Dollar <i>et al.</i> , 1982<br>Carter and Pijnenborg, 2011<br>James, 2014<br>Carp, 2020<br>Nakamura <i>et al.</i> , 2021               |
| Time and type of implantation | 9 days post coitum, Interstitial  | 9 days post coitum, Interstitial (great apes), centric (cynomolgus, rhesus macaques)     | 4 days post coitum, interstitial (guinea pigs), centric (rabbits), eccentric (mice, rats)                 | Lee and DeMayo, 2004<br>Nakamura <i>et al.</i> , 2016<br>Siriwardena and Boroviak, 2022  |
| Attachment                    | Polar trophoblast (ICM-adjacent) adheres to and breaches the endometrial epithelium | Polar trophoblast (ICM-adjacent) adheres to and breaches the endometrial epithelium      | Mural trophoblast (non-ICM-adjacent) adheres to the endometrial epithelium inducing apoptosis or entosis  | Enders <i>et al.</i> , 1983<br>Enders, 1993, 2000<br>Enders and Lopata, 1999<br>Carter, 2007   |
| Trophoblast subpopulations    | ST, CT and EVT  | ST, CT and EVT   | Two syncytial and a single mononuclear layer of unknown function, spongiotrophoblasts                     | Enders, 1989, 1995, 2000<br>Enders and Blankenship, 1999<br>Carter, 2007<br>Carter <i>et al.</i> , 2015<br>Elmore <i>et al.</i> , 2022 |
| Large intervillous spaces     | Yes   | Yes  | No, yes (guinea pigs)   | Schlafke and Enders, 1975<br>Enders, 1989  |
| EVT invasion depth            | Decidua basalis and the inner 1/3 of the myometrium                                 | Decidua basalis mainly, decidua basalis and the inner 1/3 of the myometrium (chimpanzee) | Decidua basalis mainly, deeper in rats, decidua basalis and the inner 1/3 of the myometrium (guinea pigs) | Enders, 2000<br>Caluwaerts <i>et al.</i> , 2005;<br>Vercruyssen <i>et al.</i> , 2006<br>Nakamura <i>et al.</i> , 2021                  |
| Type of placenta              | Hemochorial, villous, discoidal   | Hemochorial, villous, discoidal or bi-discoidal (macaques and marmosets)                 | Hemochorial, labyrinth, discoidal   | Myers, 1972<br>Carter, 2007<br>Burke <i>et al.</i> , 2010<br>Elmore <i>et al.</i> , 2022   |

EVT, extravillous trophoblast; ICM, inner cellular mass; ST, syncytiotrophoblast; CT, cytotrophoblast.

# ヒト着床モデルとして研究された霊長類とげっ歯類の長所と短所

**Table 2.** Advantages and disadvantages of the primates and rodents studied as models for human implantation.

|   | <b>Advantages</b>  | <b>Disadvantages</b>  | <b>Studies</b>  |
|---|--|---|---|
| <b>Primates</b> (great apes, old and new world monkeys) | Decidualization, same or similar type and time of implantation, the same type of placenta                                      | Expensive experiments long life cycle and gestation time<br>Specific housing<br>Low fertility<br>Ethical considerations | Myers, 1972<br>Enders, 1993, 1995, 2000<br>Carter and Pijnenborg, 2011;<br>Carter <i>et al.</i> , 2015<br>Schmidt <i>et al.</i> , 2015<br>Nakamura <i>et al.</i> , 2016, 2021   |
| <b>Rodents</b> (mice, rats, guinea pigs, rabbits)       | Low-cost experiments<br>Easy breeding, short maturation, available genetic information<br>Possibility of genetic modifications | Different decidualization, substantial mechanistic differences in implantation<br>Different trophoblast subpopulations  | Schlafke and Enders, 1975<br>Enders and Schlafke, 1969<br>Enders, 1989<br>Caluwaerts <i>et al.</i> , 2005<br>Simmons and Cross, 2005<br>Cross, 2005<br>Carter, 2007<br>Vercruysse <i>et al.</i> , 2006<br>Burke <i>et al.</i> , 2010<br>Ramathal <i>et al.</i> , 2010<br>Aplin and Ruane, 2017<br>Elmore <i>et al.</i> , 2022 |

# ヒト着床の研究に用いられたex vivoモデル およびin vitroモデル\_1

Table 3. Ex vivo and in vitro models used to study human implantation.

| Type            | Endometrium:<br>to study decidualization<br>and endometrial receptivity   | Reference   | Trophoblast:<br>to study CT proliferation, differentiation into EVT or<br>ST, EVT migration and invasion, syncytialization/<br>fusion, immune interactions (tolerogenic mechanisms),<br>apoptosis.  | Reference   |
|-----------------|---|---|---|---|
| Tissue explants | <p>◀ Segments of late-luteal-phase (4–7 days after the LH peak)</p> <p><b>Pros:</b> Closest to the <i>in vivo/in situ</i> features, n Production and regulation of the endometrial-derived cytokines, and other bio-active substances</p> <p><b>Cons:</b> Short-term cultures; The orientation of the endometrium is not preserved; Difficult standardization, timing of the biopsies, and specimen handling; <i>De novo</i> isolation for each experiment</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kliman <i>et al.</i>, 1990</li> <li>• Dudley <i>et al.</i>, 1992</li> <li>• Landgren <i>et al.</i>, 1996</li> <li>• Teklenburg and Macklon, 2009</li> <li>• Bersinger <i>et al.</i>, 2010</li> </ul>   | <p>◀ Segments of the villous part of 5–10 gw human placenta</p> <p><b>Pros:</b> Closest to the <i>in vivo/in situ</i> features to study the early stages of placentation (proliferation and differentiation of EVT from the cytotrophoblastic columns in a preserved villous structure)</p> <p><b>Cons:</b> Short-term cultures; difficult standardization; restricted access to specimens; <i>de novo</i> isolation for each experiment</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Genbacev <i>et al.</i>, 1992</li> <li>• Vicovac <i>et al.</i>, 1995</li> <li>• Caniggia <i>et al.</i>, 2000</li> <li>• Popovici <i>et al.</i>, 2006</li> <li>• Miller <i>et al.</i>, 2005</li> <li>• Baczyk <i>et al.</i>, 2013</li> <li>• Horii <i>et al.</i>, 2016</li> </ul>  |
| Primary cells   | <p>◀ <b>Epithelial and stromal endometrial cells:</b></p> <p><b>Pros:</b> Closest to the <i>in vivo/in situ</i> features; express progesterone-regulated markers of endometrial receptivity</p> <p><b>Cons:</b> Time- and source-consuming isolations; considerable differences in protocols for isolation; variable yields, purity and differentiation; limited viability; constant risk for unwanted spontaneous transformations, difficult standardization and propagation; fresh cell isolates are needed for each experiment</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Satyaswaroop <i>et al.</i>, 1979</li> <li>• Bentin-Ley <i>et al.</i>, 1995</li> <li>• Chan <i>et al.</i>, 2004</li> <li>• Teklenburg and Macklon, 2009</li> <li>• Masuda <i>et al.</i>, 2016</li> <li>• Horii <i>et al.</i>, 2016</li> </ul> | <p>◀ <b>Cytotrophoblasts (CT):</b></p> <p><b>Pros:</b> Closest to the <i>in vivo/in situ</i> features; dynamic phenotype; Specific upregulation of surface HLA-C and HLA-G upon differentiation; provide combination of protein and non-protein-coding markers for validation of a particular first-trimester trophoblast subpopulation</p> <p><b>Cons:</b> Time- and source-consuming isolations; considerable difference in protocols; Often mixed population; Limited life span, rapidly cease proliferation <i>in vitro</i>; Lack of generally accepted minimal criteria for a line to be determined as a pure primary, 1<sup>st</sup> trimester, human trophoblast cell line; <i>De novo</i> isolation for each experiment</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kliman <i>et al.</i>, 1990</li> <li>• Fisher <i>et al.</i>, 1989</li> <li>• King <i>et al.</i>, 2000</li> <li>• Genbacev <i>et al.</i>, 2011</li> <li>• Lee <i>et al.</i>, 2016</li> <li>• Abbas <i>et al.</i>, 2020</li> <li>• Horii <i>et al.</i>, 2020</li> <li>• Eikmans <i>et al.</i>, 2022</li> <li>• Greenbaum <i>et al.</i>, 2023</li> </ul> |

(continued)

# ヒト着床の研究に用いられたex vivoモデル およびin vitroモデル\_2

Table 3. (continued)

| Type         | Endometrium  | Reference  | Trophoblast  | Reference   |
|--------------|--|--|--|---|
| Cancer cells | <p><b>Pros:</b> Immortal and easy to propagate<br/><b>Cons:</b> Tumor cell features, constant possibility for unwanted spontaneous transformation</p> <p>◀ <b>HEC-1A/B – luminal epithelium.</b><br/><b>Pros:</b> Express cytokeratin 13 and 18, and retain estrogen, progesterone and androgen receptors, and CD55 found in implantation. Used as a model for non-receptive endometrium<br/><b>Cons:</b> Considerable difference in expression estrogen metabolism. Poor apical adhesiveness due to epithelial polarization</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mo et al., 2006</li> <li>Hannan et al., 2010</li> <li>Hevir-Kene and Rizner, 2015</li> </ul>  | <p>◀ <b>BeWo – CT able to differentiate into EVT or ST.</b><br/><b>Pros:</b> Express HLA-C and HLA-G mRNA, produce hCG; Adhesiveness to endometrial epithelium. Suitable for syncytialization<br/><b>Cons:</b> Near-triploid; HLA-G is not expressed</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Fattillo et al., 1968</li> <li>Kovats et al., 1990</li> <li>Al-Nasiry et al., 2006</li> <li>Bhat and Anderson, 2007</li> <li>Hannan et al., 2010</li> <li>James et al., 2016</li> <li>Rothbauer et al., 2017</li> <li>Ban et al., 2020</li> <li>Weber et al., 2021</li> <li>Li et al., 2023</li> </ul>   |
|              | <p>◀ <b>ECC-1 – luminal epithelium.</b><br/><b>Pros:</b> Well-differentiated, steroid-responsive; MUC secretion. Attachment surface with capacity to acquire a receptive phenotype<br/><b>Cons:</b> <b>N.B.!</b> The original line has been lost. Currently available ECC-1 cells are shown to be an Ishikawa 3-H-12 derivative, MCF-7/breast cancer cells, or a mixture of both</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Satyawaroop and Tabibzadeh, 1991</li> <li>Mo et al., 2006</li> <li>Evans et al., 2020</li> <li>Ban et al., 2020</li> </ul>                | <p>◀ <b>JEG-3 - CT able to differentiate into EVT or ST.</b><br/><b>Pros:</b> Express HLA-C, HLA-G and secrete HLA-G; adhesiveness to endometrial epithelium. Non- classical cell fusion model for syncytialization<br/><b>Cons:</b> Near tetraploid which correlates with HLA-G expression; Limited intercellular membrane fusion</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kohler and Bridson, 1971</li> <li>Kovats et al., 1990</li> <li>Apps et al., 2009</li> <li>Apps et al., 2011</li> <li>Hannan et al., 2006</li> <li>Zou et al., 2015</li> <li>Poloski et al., 2016</li> <li>McConkey et al., 2016</li> <li>James et al., 2016</li> <li>Rothbauer et al., 2017</li> <li>Weber et al., 2021</li> <li>Eikmans et al., 2022</li> </ul> |
|              | <p>◀ <b>Ishikawa cells – glandular + luminal epithelium.</b><br/><b>Pros:</b> Widely considered as good model for a receptive endometrium, normal endometrial function, and endocrine signaling<br/><b>Cons:</b> Stable up to 45 passages; <b>N.B.!</b> Sub clone 3-H-12 has been distributed since 1996 - not deposited in any cell bank</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nishida, 2002</li> <li>Castelbaum et al., 1997</li> <li>Hannan et al., 2010</li> <li>Vergaro et al., 2019</li> </ul>                      | <p>◀ <b>JAR-CT able to differentiate into EVT or ST.</b><br/><b>Pros:</b> Adhesiveness to endometrial epithelium. Non- classical cell fusion model for syncytialization<br/><b>Cons:</b> Express no or minimal amounts of HLA-C and HLA-G and did not secrete sHLA-G; Near- triploid; Limited intercellular membrane fusion</p>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kovats et al., 1990</li> <li>Heneweer et al., 2005</li> <li>Al-Nasiry et al., 2006</li> <li>Apps et al., 2009</li> <li>Apps et al., 2011</li> <li>Hannan et al., 2010</li> <li>James et al., 2016</li> <li>Rothbauer et al., 2017</li> <li>Weber et al., 2021</li> </ul>   |
|              | <p>◀ <b>RL95-2 –glandular epithelium.</b><br/><b>Pros:</b> Receptive glandular epithelial cells with lack of epithelial polarization; strong tendency to accumulate and to form gland-like structures<br/><b>Cons:</b> The line is trisomic 8 and has an 8% frequency of polyploidization</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Way et al., 1983</li> <li>Hannan et al., 2010</li> <li>Evans et al., 2020</li> <li>Ban et al., 2020</li> <li>John et al., 1993</li> </ul> | <p>◀ <b>AC1M-88 –EVT to model EVT adhesion and migration</b><br/><b>Pros:</b> Adhesiveness to endometrial epithelium; constitutively express HLA-G mRNA<br/><b>Cons:</b> The trophoblast cells are from the chorion leave- the non-villous part of the chorion that is not part of the placenta</p>                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Frank et al., 2000</li> <li>King et al., 2000</li> <li>Hannan et al., 2010</li> </ul>  |

(continued)

# ヒト着床の研究に用いられたex vivoモデル およびin vitroモデル\_3

Table 3. (continued)

| Type  | Endometrium   | Reference   | Trophoblast   | Reference  |
|---|---|---|---|--|
| <b>Epithelial and stromal endometrial cells</b>   |   |   |   |  |
| <b>Pros:</b> Derived from normal early pregnancy endometrium; easy to propagate; Healthy placental cell features; signs of preserved stemness   |   |   |   |  |
| <b>Cons:</b> Immortalization includes viral transduction or plasmid transfection that may alter initial cell features; sourced from different cycle time points or women in menopause                       |   |   |   |  |
| Immortalized cell lines   | <p>◀ <b>EM-E6/E7/TERT (epithelial, glandular)</b></p> <p><b>Pros:</b> Retain the natural characteristics of endometrial glands</p> <p><b>Cons:</b> Preferential use for cancer research</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kyo et al., 2003</li> <li>• Fitzgerald et al., 2021</li> </ul>   | <p>◀ <b>HESC (stromal)</b></p> <p><b>Pros:</b> Typical stroma morphology, karyotype and phenotype, similar reaction to treatment with ovarian steroids, retain the ability to undergo decidualization</p> <p><b>Cons:</b> Not clear if the decidualization is sustainable</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Krikun et al., 2004</li> <li>• Holmberg et al., 2012</li> <li>• You et al., 2019; You et al., 2021; You et al., 2023</li> <li>• Ban et al., 2020</li> </ul>   |
|   | <b>Trophoblast cell lines</b>   |   |   |  |
| <b>Pros:</b> Derived from normal early pregnancy primary trophoblast; easy to propagate; healthy placental cell features; signs of preserved stemness   |   |   |   |  |
| <b>Cons:</b> Immortalization includes viral transduction or plasmid transfection that may alter initial cell features; sourced from an advanced stage of trophoblasts differentiation than at implantation. |   |   |   |  |
| Immortalized cell lines   | <p>◀ <b>HTR-8/SVneo - CT able to differentiate in vitro to EVT</b></p> <p><b>Pros:</b> CK7 positive, secrete hCG. non-tumorigenic into nude mice. Express stemness associated factors; Can express HLA A, HLA-B and HLA- class II molecules upon IFN <math>\gamma</math> induction</p> <p><b>Cons:</b> Mixed population of CK7+ trophoblasts and Vim+ mesenchymal cells; Near triploid; may not be suitable for the study of intrauterine infection</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Graham et al., 1993</li> <li>• King et al., 2000</li> <li>• Paiva et al., 2009</li> <li>• Apps et al., 2009</li> <li>• Weber et al., 2013</li> <li>• Zou et al., 2021</li> <li>• Zou et al., 2015</li> <li>• James et al., 2016</li> <li>• Abou-Kheir et al., 2017</li> <li>• Elkmans et al., 2022</li> <li>• Sheridan et al., 2022</li> </ul> | <p>◀ <b>Swan71 (Sw71) - EVT</b> phenotype, migration and invasion models, immune interactions, and apoptosis</p> <p><b>Pros:</b> Expression of trophoblast markers, cytokines and growth factors, migration, and invasion abilities close to the primary trophoblasts. Preserved stemness; hybrid CK7+/Vim+, HLA- C+/HLA-G+ phenotype like primary EVT. Secrete fetal fibronectin and low levels of hCG; also retain the ability to fuse spontaneously. can express HLA-A and HLA-B, and HLA- class II molecules upon IFN-<math>\gamma</math> induction</p> <p><b>Cons:</b> Some authors reported no HLA-G or CK7 expression; near pentaploid</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Straszewski-Chavez et al., 2009</li> <li>• Apps et al., 2009</li> <li>• Fraccaroli et al., 2009</li> <li>• Holmberg et al., 2012</li> <li>• Racicot et al., 2014</li> <li>• Reiter et al., 2017</li> <li>• You et al., 2019</li> <li>• You et al., 2021</li> <li>• You et al., 2023</li> <li>• Guzman-Genuino et al., 2019</li> <li>• Ban et al., 2020</li> <li>• Alexandrova et al., 2023</li> <li>• Alexandrova et al., 2022b</li> <li>• Pastuscheck et al., 2021</li> <li>• Dietrich et al., 2023</li> </ul> |
|   | <p>◀ <b>HChEpC1b (EVT)—EVT function, autophagy as a protective mechanism</b></p> <p><b>Pros:</b> Derived from normal early pregnancy (7gw) placenta. CK7, HLA-G, and CD9 positive. Vimentin positive. Non-tumorigenic in nude mice. Near-diploid karyotype</p> <p><b>Cons:</b> Difficult to determine the origin</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Omi et al., 2009</li> <li>• Takahashi et al., 2017</li> <li>• Nakashima et al., 2019</li> </ul>  | <p>◀ <b>SGHPL-4 (MC-4)—EVT function and apoptosis, phagocytic activity.</b></p> <p><b>Pros:</b> Derived from early pregnancy primary EVT; constitutively express HLA-G mRNA; secrete hCG and express CK7 when grown on collagen, fibronectin, and gelatin; amenable to stable genetic manipulation</p> <p><b>Cons:</b> Rather long-lived than immortal</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Choy and Manyonda, 1998</li> <li>• Cartwright et al., 1999</li> <li>• Cartwright et al., 2002</li> <li>• McCormick et al., 2009</li> <li>• Hannan et al., 2010</li> <li>• James et al., 2016</li> </ul>   |
|   |   |   |   |  |

(continued)

# ヒト着床の研究に用いられたex vivoモデル およびin vitroモデル\_4

Table 3. (continued)

| Type                    | Trophoblast cell lines  |  |  |  |
|-------------------------|---|--|--|--|
| Immortalized cell lines | <p>&lt; <b>TEV-1 (EVT) - EVT function and immune interactions</b></p> <p><b>Pros:</b> CK7, HLA-G and CD9 positive; non-tumorigenic in nude mice; near-diploid karyotype; can express HLA-A and HLA-B and HLA-class II molecules upon IFN-<math>\gamma</math> induction</p> <p><b>Cons:</b> Not reported</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Feng et al., 2005</li> <li>Chen and Zou, 2008</li> <li>Apps et al., 2009</li> <li>Wang et al., 2011</li> <li>Wong et al., 2013</li> </ul> | <p>&lt; <b>HIPEC 65 (EVT) - EVT function</b></p> <p><b>Pros:</b> Derived from normal first-trimester primary EVT. CK7, HLA-G, and CD9 positive</p> <p><b>Cons:</b> A very weak expression of HLA-G and loss of CK7 expression on ongoing passages, no secretion of hCG</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pavan et al., 2003</li> <li>Handschuh et al., 2007</li> </ul>   |
|                         | <p>&lt; <b>B6Tert-1 (VT (CT) to EVT)—CT able to differentiate in vitro to EVT (EVT function) or ST (cell fusion)</b></p> <p><b>Pros:</b> Non-tumorigenic in nude mice; produce various biomarkers of normal EVT during the early weeks of gestation; ability for differentiation towards syncytium</p> <p><b>Cons:</b> EVT differentiation requires EGF supplemented, FCS-free medium</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Wang et al., 2006</li> <li>Fu et al., 2010</li> <li>Li et al., 2021</li> </ul>  | <p>&lt; <b>ACH-3P (VT (CT) to EVT)—EVT differentiation and function</b> in terms of autocrine and paracrine regulation. Derived after fusion of normal first-trim trophoblast with choriocarcinoma cells</p> <p><b>Pros:</b> Expression of trophoblast markers, invasion abilities and transcriptome close to the primary trophoblasts</p> <p><b>Cons:</b> Morphology, cytogenetics, and doubling time as of the parental cancer cells; Mixed population of villous and EVT; Near tetraploid</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Hidden et al., 2007</li> <li>Rothbauer et al., 2017</li> <li>Ban et al., 2020</li> <li>Pastuschek et al., 2021</li> <li>Weber et al., 2021</li> </ul> |

EVT, extravillous trophoblast; ST, syncytiotrophoblast; CT, cytotrophoblast; hCG, human chorionadotropin; CK7, cytokeratin 7; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; EGF, epidermal growth factor; FCS, fetal calf serum.

# ヒト着床および初期胎盤形成における母体-胎児界面を再現するために構築されたモデル\_1

**Table 4.** Assembled models to recapitulate maternal-fetal interface during human implantation and early placentation.

**Pros:** Closest similarity to maternal-fetal contact during human implantation and early placentation. Suitable to study the ultrastructure of trophoblast-endometrial contact, breaching of the endometrial epithelium, stromal migration/invasion

**Cons:** The same as of the sourced cells/tissues, hard to find human embryos for research, require high expertise and expensive resources

| Phase                            | Endometrium  |   | Trophoblast  | Reference  |
|----------------------------------|--|---|--|--|
| Apposition, adhesion, attachment | Endometrial explants of late luteal-phase (4-7 days after the LH peak) | + | First/second/third trimester primary trophoblast cells | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kliman et al., 1990</li> </ul> Endometrial receptivity, trophoblast adhesion to the stroma, ultrastructure of trophoblast-endometrial interaction.  |
|                                  |  | + | IVF embryos  | Landgren et al., 1996<br>Embryo penetration of the endometrial epithelium and stroma invasion  |
|                                  | Primary human endometrial epithelial cells in monolayer                | + | IVF embryos  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Simon et al., 1998; Meseguer et al., 2001; Caballero-Campo et al., 2002; Dominguez et al., 2010</li> <li>Galán et al., 2000</li> </ul> Apoptosis of the endometrial epithelial cells upon contact with the embryo-derived TE during apposition and adhesion |
|                                  | Primary human endometrial epithelial cells in monolayer                | + | Blastoids  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Evans et al., 2020</li> </ul> Adhesion and differentiation of the TE upon contact to the primary endometrial epithelial cells   |
|                                  | IIEC-1A cells  | + | JAR or JEC-3 spheroids                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kagawa et al., 2022</li> </ul> Endometrial receptivity and epiblast-induced local maturation of the polar TE, endowing blastoids with the capacity to directionally attach to hormonally stimulated endometrial cells as during implantation                |
|                                  |  | + | Mouse embryo   | <ul style="list-style-type: none"> <li>John et al., 1993</li> </ul> Attachment of spheroid to uterine epithelial cell monolayer  |
|                                  |  |   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Thle and Denker, 2002</li> </ul> Adhesiveness of endometrial epithelial cells   |
|                                  |  |   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Martin et al., 2000</li> </ul> Adhesiveness of endometrial epithelial cells   |
|                                  | ECC-1 cells  | + | Sw71 BLS   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Holmberg et al., 2012</li> </ul> Attachment of spheroids to endometrial epithelial cells with acquired receptive phenotype  |
|                                  |  | + | Stem cell-derived spheroids                            | Evans et al., 2020   |

(continued)

# ヒト着床および初期胎盤形成における母体-胎児界面を再現するために構築されたモデル\_2

Table 4. (continued)

**Pros: Closest similarity to maternal-fetal contact during human implantation and early placentation. Suitable to study the ultrastructure of trophoblast-endometrial contact, breaching of the endometrial epithelium, stromal migration/invasion**  
**Cons: The same as of the sourced cells/tissues, hard to find human embryos for research, require high expertise and expensive resources**

| Phase  | Endometrium | + | Trophoblast                                | Reference   |
|--|-------------|---|--|---|
|  |             |   |  | Adhesion of the spheroids to the endometrial epithelial cell lines  |
| Ishikawa cells                                     |             | + | JAR or JEG-3 spheroids                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Vergaro <i>et al.</i>, 2019</li> </ul> Transcriptomic analysis of the interaction of the trophoblasts with receptive vs. non-receptive (HEG-1A) endometrial epithelium cell lines  |
|  |             |   | IVF embryos or stem cell-derived spheroids | <ul style="list-style-type: none"> <li>Evans <i>et al.</i>, 2020</li> </ul> Adhesion of the spheroids to endometrial epithelial cell lines  |
| RL95-2 cells                                       |             | + | BeWo, JEG-3 or JAR spheroids               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ruane <i>et al.</i>, 2020, 2022</li> </ul> Human embryo breaching of the epithelium and the gene networks involved in implantation   |
|  |             |   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Thie and Denker, 2002 Thie <i>et al.</i>, 1998</li> <li>Hohn <i>et al.</i>, 2000</li> <li>Heneweer <i>et al.</i>, 2005</li> <li>Ho <i>et al.</i>, 2012</li> </ul> Adhesiveness of the apical plasma membrane of endometrial epithelial cell lines<br>The relationship between the adhesion of the trophoblast to epithelium and its differentiation<br>Modulation of epithelial adhesiveness and apicobasal polarity by contact with JAR spheroids<br>A high-throughput in vitro model for fluorometric assessment of spheroid attachment to human endometrial epithelial cells  |
| hTERT-EEC cells                                    |             | + | JAR spheroids                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Aboussahoud <i>et al.</i>, 2010</li> </ul> Trophoblast attachment  |
| Matrix-embedded epithelial and stromal cells (EMO) |             | + | IVF embryos                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bentin-Ley <i>et al.</i>, 2000</li> <li>Lalitkumar <i>et al.</i>, 2007</li> <li>Rawlings <i>et al.</i>, 2021</li> </ul> Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions during attachment and invasion showing a displacement of endometrial epithelial cells, and formation of a penetration cone with no endometrial or trophoblastic degeneration. Epithelial penetration was achieved primarily by cellular syncytiotrophoblast-like cells, developed simultaneously with penetration of the epithelium<br>Endometrial receptivity and TE attachment<br>Single-cell transcriptomics of differentiated and senescent subpopulations in both glands and stroma and role of the senescence in glandular epithelium and in the stroma on the implantation. |
|  |             |   | JAR spheroids                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Wang <i>et al.</i>, 2012</li> </ul> Attachment of human trophoblast spheroids to a 3D endometrium-like culture system with overall architecture, similar to that seen in endometrial tissue  |
| Apical out (AO)-EMO                                |             | + | IVF embryos or blastoids                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Shibata <i>et al.</i>, 2024</li> </ul> Model with exposed apical epithelium surface, dense stromal cells, and a self-formed endothelial network to recapitulate apposition, adhesion, and Syn invasion.  |
| OFEL, open-faced endometrial layer from EMO        |             | + | Blastoids                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kagawa <i>et al.</i>, 2022</li> </ul> Attachment on the receptive endometrial epithelium, epiblast-induced local maturation of the polar TE endows blastoid with the capacity to directionally attach to hormonally stimulated endometrial cells   |

Apposition, adhesion, attachment

(continued)

# ヒト着床および初期胎盤形成における母体-胎児界面を再現するために構築されたモデル\_3

Table 4. (continued)

Pros: Closest similarity to maternal-fetal contact during human implantation and early placentation. Suitable to study the ultrastructure of trophoblast-endometrial contact, breaching of the endometrial epithelium, stromal migration/invasion

Cons: The same as of the sourced cells/tissues, hard to find human embryos for research, require high expertise and expensive resources

| Phase  | Endometrium                                       | +                                     | Trophoblast  | Reference   |
|--|---|---------------------------------------|--|---|
| Invasion, stromal endometrial receptivity          | Primary human endometrial stromal cells monolayer | +                                     | AC-1M88 cells or spheroids   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Gellersen et al., 2010</li> </ul> The invasiveness of human endometrial stromal cells promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals, by encapsulation of the conceptus the decidua supports trophoblast invasion. |
|  |   |                                       | First trim villous trophoblasts  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Weimar et al., 2012</li> </ul> DSC of women with recurrent miscarriage have higher migratory response to trophoblast   |
|  |   |                                       | Mouse embryos  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Gonzalez et al., 2011</li> </ul> DSC supports trophoblast invasion by paracrine signals  |
|  |   |                                       | IVF embryos  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Vicovac et al., 1995</li> </ul> Trophoblast-stroma interaction, differentiation of trophoblasts  |
|  | Decidua parietalis explants                       | +                                     | First trimester villous trophoblast explants   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Hanashi et al., 2003</li> </ul> Human decidual b1 integrin and focal adhesion kinase participate in the trophoblast invasion   |
|  |   |                                       |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Grewal et al., 2010</li> </ul> Rho GTPase-PTK2-dependent remodeling of the endometrial stromal cell compartment may be critical for successful embryo implantation   |
|  | Proliferative-phase endometrial stromal cells     | +                                     |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Weimar et al., 2012</li> </ul> DSC of fertile women discriminate between high- and low-quality embryos unlike women with recurrent miscarriage   |
|  |   |                                       |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Carver et al., 2003</li> </ul> Trophoblast attachment to endometrial stroma and further implantation (invasion and migration of EVT) of the human embryo into the endometrial stroma   |
|  | HEC-1A spheroids                                  | +                                     | AC-1M88 cells  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Teklenburg et al., 2012</li> </ul> Lineage development and epi- and hypoblast segregation, a lineage-specific inactivation of parental X chromosome  |
|  | Ishikawa spheroids                                | +                                     |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dunk et al., 2003</li> </ul> Trophoblast-mediated decidual blood vessel remodeling   |
| RL95-2 spheroids                                   | +   |                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Hazan et al., 2010</li> </ul> Trophoblast mediated decidual blood vessel remodeling and role of uNK cells and macrophages         |   |
| HESC   | +   | Sw71 trophoblast spheroids            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Popovici et al., 2006</li> </ul> Trophoblasts attachment and gene expression of the endometrial stromal cells during implantation |   |
| Spiral arteries' segments from myometrial biopsies | +   | Primary trophoblasts or SGHPL-4 cells | <ul style="list-style-type: none"> <li>Buck et al., 2015, 2021</li> </ul> Model system for trophoblast invasion into gland-like endometrial spheroids                    |   |
|  |   |                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>You et al., 2019, 2021, 2023</li> </ul> Trophoblast invasion and migration into endometrial stroma                                |   |

IVF, in vitro fertilization; LH, luteinizing hormone; BLS, blastocyst-like structure; EMO, endometrial organoids; DSC, decidual stromal cells.

# ヒト着床過程の特異性と非効率性

ヒトの着床は、間質・腺・血管への侵入を伴う「侵襲型」であり、胚は子宮内膜に完全に埋没する。胎児側の栄養供給や免疫寛容の成立に直結する重要な過程である。。このような深部浸潤を伴う着床は、他の哺乳類には見られない特徴であり、複雑な組織再構築と免疫調整を必要とする。その結果、着床は非効率なプロセスであり、ヒト妊娠の自然失敗率の高さの一因となっている。

# ヒト着床と胎盤形成研究の難しさ

自然妊娠およびART（補助生殖医療）における胚損失の多くがこの時期に集中するにもかかわらず、研究が困難なことから未解明な要素が多く残されている。ヒトの着床期は、胚が子宮内膜に接着し浸潤するごく初期の過程であり、in vivoでの観察が倫理的・技術的に不可能である。また、ヒト胚や子宮内膜組織の取得には制約が多く、ex vivoやin vitroでの研究も標準化や再現性の面で課題がある。したがって、適切なモデルシステムの開発が喫緊の課題となっている。

# 従来のin vivoモデルの限界

霊長類や齧歯類などの動物モデルは、着床研究において一定の情報を提供してきたが、ヒトとは着床様式や胎盤構造、免疫応答などに顕著な差異が存在する。特に、間質浸潤の深さや母体免疫との相互作用においては、ヒト固有の特徴があり、これらの動物モデルでは完全な再現は困難である。

# ex vivoモデルの位置づけ

ヒトの子宮内膜や絨毛組織を用いたex vivo培養は、in vivo環境に近い情報を提供できる貴重な手法であるが、組織の生存期間が限られ、長期間の観察には適さない。また、標準化が難しく、妊娠中絶由来組織の使用に関しては倫理的・法的な課題も多い。そのため、ex vivoモデルには限界がある。

# in vitroモデルの多様性と進展

in vitroモデルには、初代培養細胞、がん細胞株、不死化細胞株、幹細胞誘導細胞など多様な選択肢があるが、それぞれに再現性・生理的類似性・操作性のバランスに課題がある。近年、幹細胞由来の細胞と高度な三次元培養を組み合わせることで、着床過程をより忠実に模倣するin vitroモデルの開発が進展している。

# 高度3D培養モデルの意義

従来の2次元培養では再現が難しかった母体－胎児間相互作用を、スフェロイドやオルガノイド、アセンブロイドといった三次元モデルが精密に再現できるようになってきた。これらの高度3Dモデルは、着床および初期胎盤形成の動態をより実際に近い状態で可視化・解析するための新たな研究基盤として注目されている。

# 免疫寛容機構の再構成の可能性

ヒト着床においては、トロフォブラスト細胞と母体免疫細胞との間で精緻な免疫寛容機構が構築される。最近のアセンブロイドモデルでは、子宮内膜細胞に加えて免疫細胞を導入する試みがなされており、局所免疫調節やHLA分子発現の解析など、着床免疫の理解に向けた新たな展開が期待されている。

# トロフォブラストの分化と役割

着床過程では、胚の外層である栄養外胚葉（TE）から分化したトロフォブラストが、細胞増殖・浸潤・融合・ホルモン分泌など多様な機能を発揮する。中でも、胎児と母体組織との境界を構成する絨毛外トロフォブラスト（EVT）は、免疫寛容の成立や子宮螺旋動脈の改変など、着床成功に極めて重要な役割を果たしている。

# 免疫学的“パラドックス”の再考

かつては、母体免疫系が胎児を排除しない現象は“免疫学的パラドックス”と考えられていたが、現在では、胎児由来のEVTが非古典的HLA（HLA-G, -E, -F）やHLA-Cを発現し、母体免疫細胞と特異的な相互作用を行うことが明らかになってきている。この高度に調節された局所免疫応答は、むしろ積極的な寛容誘導過程と捉えられる。

# 合成胚モデル（blastoids）の可能性 と課題

ヒト多能性幹細胞から誘導される胚様構造（blastoids）は、着床直前後の胚発生を再現するモデルとして注目されている。これらは着床研究や薬剤評価に新たな可能性を提供するが、一方で胚の道徳的地位や、ヒト胚と区別できない構造の扱いに関する倫理的・法的な議論も喚起しており、慎重な対応が求められている。

## 1. 科学界ではblastoidは「胚ではない」と区別する試み

- 現時点では、「ブラストイドは完全な着床能・全発生能を持たない」ため、自然胚とは異なるものとして定義されようとしています。
- しかしこれは技術的限界に基づくもので、将来的に限界が超えられると「法的・倫理的再定義」が迫られる可能性があります。

## 2. 規制の再構築が進行中

- 一部の国(例:英国のヒト受精・胚学局 HFEA)は、「胚に酷似した構造体」について、既存の胚研究規制とは別枠での新しいルール作りを模索しています。

## 3. オルガノイド・エンブリオイド・ブラストイドの連続性

- 卵巣オルガノイド、着床モデル、胎盤様構造(trophoblast organoid)などが一つのシステムとして再構成される未来において、個別の構造ではなく「全体」として胚に近い存在が構築されることも想定されており、これは倫理的にも極めて大きな問題になります。

# 着床研究におけるin vitroモデルの利点

in vitroモデルは、ヒト由来の細胞や組織を用いることで、動物モデルでは再現困難なヒト特有の着床過程を詳細に解析できる利点がある。特に、EVTの浸潤や母体免疫細胞との相互作用など、着床成功に不可欠な現象を再現・操作できる点で、基礎研究から応用研究まで幅広い可能性を持っている。

# 不死化細胞株と幹細胞由来モデルの比較

がん細胞株は取り扱いが容易である一方、腫瘍性変化や遺伝的不安定性の問題がある。これに対し、幹細胞由来の不死化細胞株や初代細胞をベースとしたモデルは、より生理的に近い特性を維持しており、EVTやSTへの分化能を備えたモデル構築が進んでいる。これらの選択と活用は、研究目的に応じた慎重な判断が求められる。

# 3Dアセンブロイドの構成と意義

アセンブロイドは、幾つかの細胞系統（例えば内膜上皮、間質、免疫細胞、トロフォブラスト細胞）を組み合わせて立体的に再構成した複合モデルであり、母体—胎児界面（MFI）の再現において最も高度なin vitroシステムとされる。これにより、細胞間相互作用、侵入様式、サイトカイン分泌など、多面的な解析が可能となっている。

# モデルの標準化と妥当性検証の重要性

高度化した3Dモデルの普及に伴い、各研究間での比較可能性を確保するためには、培養条件、構成細胞、評価指標などの標準化と妥当性検証が不可欠である。特に、同じ「着床モデル」とされるものでも、構成要素や再現される現象に大きな差異があり、科学的信頼性と再現性を担保する体制の整備が求められている。

# 免疫細胞を組み込んだモデルの展望

最近では、uNK細胞やマクロファージ、T細胞などの母体免疫細胞をアセンブロイドに組み込む試みが始まっており、局所免疫応答や免疫寛容誘導のメカニズムを再現することが可能になりつつある。これにより、免疫異常による着床障害や流産の新たな病態理解と治療開発に向けた道が開かれている。

# EVTのHLA発現と免疫調節機構

絨毛外トロフォブラスト（EVT）は、HLA-G、HLA-E、HLA-Fといった非古典的クラスI分子に加え、唯一の古典的HLAであるHLA-Cも発現し、母体側のNK細胞やT細胞と選択的に相互作用する。これにより、胎児由来抗原に対する拒絶反応を抑制しつつ、感染防御などの基本的な免疫機能は維持される。この高度な免疫制御は、着床維持に不可欠な仕組みである。

# 母体KIRと胎児HLA-Cの相互作用

母体のNK細胞表面に存在するKIR（キラー細胞免疫グロブリン様受容体）は、胎児側のHLA-Cと特異的に相互作用し、免疫応答の調整に関与する。母体KIRと胎児HLA-Cの組み合わせによっては、免疫寛容が促進される一方で、適合不全により着床失敗や胎盤形成不全を引き起こす可能性も示唆されている

。

# 将来的展望と課題

今後の研究では、ヒト着床モデルのさらなる高精度化に加え、着床期子宮内膜の個別化（パーソナライズド・エンドメトリウム）や免疫プロファイリングの導入など、臨床応用を見据えたアプローチが求められる。また、胚様モデルの法的・倫理的な取り扱いをめぐる社会的議論の深化も不可欠である。

以下chatGPT4によるまとめです。

## 結論① 着床研究の進歩と課題の両面性

本論文は、ヒト着床が「非効率的かつモデル化が困難な現象」であることを改めて強調している。着床の失敗は自然妊娠・ARTいずれにおいても主要な障壁でありながら、その分子メカニズムには多くの不明点が残る。研究手段の大部分はin vitroおよび3Dモデルに依存しており、それらの標準化と検証体制の整備が急務となっている。

## 結論② 着床モデルの体系化と分類の重要性

着床を模倣する多様なモデルが存在するなかで、それぞれの構成要素・再現可能な現象・臨床的意義について系統的に整理・分類することが求められる。特に、アセンブロイドやblastoidsのような高度モデルについては、応用範囲・制約・限界を明確にし、研究の質と透明性を担保することが、今後の分野全体の発展に不可欠である。

## **結論③ 新たな倫理的・法的課題**

近年、合成胚様構造や着床後の胚様モデル（gastruloids）の出現により、従来の胚研究とは異なる倫理的・法的問題が浮上している。胚に類似した構造をヒト幹細胞から作成する技術は、再生医療や創薬に新たな可能性を開く一方で、ヒト胚の道徳的地位、女性の胚提供に関する同意、国際的な規制整備など、慎重な対応が求められる。

## **結論④ 生殖医療における応用の可能性**

本レビューで紹介されたモデル群は、着床障害・流産・着床前診断の改善、新規バイオマーカー探索、さらには個別化医療（personalized implantation window）の構築など、生殖医療に直結する応用が期待される。基礎研究と臨床応用の架け橋として、これらのモデルのさらなる高度化と社会的受容が鍵となる。

## 結論⑤ 研究と社会の接続を見据えて

技術革新のスピードが加速するなかで、ヒト着床研究は科学的進展と社会的受容のバランスが問われる時代に入っている。科学者、臨床医、倫理学者、政策立案者の連携が求められ、今後の着床研究は「知の深化」だけでなく、「制度との接続」を意識した展開が必要である。

### Take Home Message

- ✓ ヒトの着床と初期胎盤形成は、依然として多くの謎に包まれた重要な過程である。
- ✓ 動物モデルでは限界があるため、ヒト由来の高度なin vitro・3Dモデルの活用が研究の中核となっている。
- ✓ 今後は、モデルの標準化、免疫系の再構成、倫理的枠組みの整備を通じて、着床メカニズムの解明と生殖医療への応用がさらに進むことが期待される。

END