

妊娠成立に向けた子宮内膜間質細胞の
脱落膜化と腺の成熟過程における
**Exchange protein directly activated by
cAMP (Epac) の役割**

**The role of Exchange protein directly activated by
cAMP (Epac) in the process of decidualization of
endometrial stromal cells and the maturation of
glands for the establishment of the pregnancy**

草間 和哉

目次

緒言	・・・ 1
第 1 章 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Epac の関与	・・・ 4
第 1 節 実験材料及び実験方法	・・・ 4
1-1. ヒト子宮内膜間質細胞 (ESCs) と内膜間質細胞株 (EtsTs) の単離と培養	
1-2. Epac の免疫染色	
1-3. <i>In vitro</i> 脱落膜化	
1-4. Small interfering (si) RNA 処置	
1-5. ウェスタンブロット解析	
1-6. リアルタイム RT-PCR 解析	
1-7. IGFBP1 の ELISA 解析	
1-8. 増殖アッセイ	
1-9. 活性型 Rap1 の検出	
1-10. ルシフェラーゼレポーターアッセイ	
1-11. 統計処理	
第 2 節 実験結果	・・・ 10
2-1. ヒト子宮内膜組織における Epac1 及び Epac2 の局在	
2-2. ESCs の脱落膜化に対する Epac 選択的 cAMP アナログの効果	
2-3. <i>In vitro</i> 脱落膜化に対する Epac1、Epac2 及び Rap1 発現抑制の効果	
2-4. ESCs における Rap1 の活性化に対する Epac の関与	
2-5. 卵巣ステロイドによる脱落膜化誘導に対する Epac 選択的 cAMP アナログの効果	
2-6. Epac による PRL 転写調節機構の解明	
第 3 節 考察	・・・ 19
第 4 節 小括	・・・ 21
第 2 章 ヒト ESCs の脱落膜化に対する新規 Epac2 下流因子の同定と役割	・・・ 22
第 1 節 実験材料及び実験方法	・・・ 22
1-1. ESCs の単離と培養	

1-2.	siRNA 処置	
1-3.	液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー (LC-MS/MS) 解析	
1-4.	ウエスタンブロット解析	
1-5.	リアルタイム RT-PCR 解析	
1-6.	IGFBP1 の ELISA 解析	
1-7.	増殖アッセイ	
1-8.	老化関連βガラクトシダーゼ (SA-β-Gal) 染色	
1-9.	統計処理	
第 2 節	実験結果	・・・ 24
2-1.	Epac2 下流因子の同定	
2-2.	脱落膜マーカー発現に対するカルレティキュリン(CRT)発現抑制の効果	
2-3.	卵巣ステロイド誘導性の脱落膜化に対する CRT 発現抑制の効果	
2-4.	ESCs の老化に対する Epac2、CRT 発現抑制の効果	
第 3 節	考察	・・・ 29
第 4 節	小括	・・・ 31
第 3 章	早期妊娠ラットの子宮内における Epac の発現と役割	・・・ 32
第 1 節	実験材料及び実験方法	・・・ 32
1-1.	妊娠動物の作成	
1-2.	子宮組織切片の調製及び免疫染色	
1-3.	ウエスタンブロット解析	
1-4.	着床遅延モデルの作成	
1-5.	非妊娠ラットへの卵巣ステロイド投与	
1-6.	人為的脱落膜化誘導モデル	
1-7.	ESCs の単離と培養	
1-8.	リアルタイム RT-PCR 解析	
1-9.	siRNA 処置	
1-10.	統計処理	
第 2 節	実験結果	・・・ 35
2-1.	着床周辺期の子宮内における Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現	
2-2.	着床遅延子宮内における着床前後の Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現	

2-3. Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現に対する卵巣ステロイドの効果	
2-4. 偽妊娠ラットの人為的脱落膜化における Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現	
2-5. ラット脱落膜化に対する cAMP/PKA シグナルの関与	
2-6. ESCs の <i>in vitro</i> 脱落膜化に対する Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT の役割	
第 3 節 考察	・・・ 43
第 4 節 小括	・・・ 45
第 4 章 ヒト子宮内膜腺の成熟における Epac2/CRT の役割	・・・ 46
第 1 節 実験材料及び実験方法	・・・ 46
1-1. ヒト子宮内膜腺上皮細胞株 (EM1)の培養	
1-2. siRNA 処置	
1-3. ウェスタンブロット解析	
1-4. リアルタイム RT-PCR 解析	
1-5. PGE ₂ の ELISA 解析	
1-6. SA-β-Gal 染色	
1-7. 統計処理	
第 2 節 実験結果	・・・ 48
2-1. CRT 発現に対する Epac2 ノックダウンの効果	
2-2. 着床関連因子の発現に対する Epac2 と CRT 発現抑制の効果	
2-3. PKA または Epac 誘導性の着床関連因子発現に対する Epac2、CRT 発現抑制の効果	
2-4. 細胞老化に対する Epac2 と CRT の発現抑制の効果	
第 3 節 考察	・・・ 52
第 4 節 小括	・・・ 54
総括	・・・ 55
謝辞	・・・ 58
引用文献	・・・ 59

本論文中で使用した略語は以下の通りである。

cAMP : cyclic adenosine monophosphate
CDC25HD : cell division cycle 25-homology domain
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein
CNB : cyclic nucleotide-binding domain
COX2 : cyclooxygenase-2
CPT : 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyl cAMP
CREB : cAMP responsive element binding protein
CRT : calreticulin
CS-FBS : charcoal stripped-fetal bovine serum
DAB : 3,3'-diaminobenzidine
db-cAMP : dibutyl-cyclic adenosine monophosphate
DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium
DTPRP : decidual/trophoblast prolactin-related protein
E₂ : 17β-estradiol
ELISA : enzyme-linked immunoassay
Epac : exchange protein directly activated by cAMP
ER : endoplasmic reticulum
ESCs : endometrial stromal cells
EtsTs : immortalized endometrial stromal cells
FOXO1 : forkhead box O1
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDP : guanosine diphosphate
GEF : guanine nucleotide exchange factor
GTP : guanosine triphosphate
HOXA10 : homeobox A10
IGFBP1 : insulin-like growth factor binding protein 1
IL11RA : interleukin 11 receptor, alpha
LC-MS/MS : liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LIF : leukemia inhibitory factor
MPA : medroxyprogesterone acetate
OVX : ovariectomy
P₄ : progesterone
PBS : phosphate buffered saline
PGE₂ : prostaglandin E₂
Phe : N⁶-Phenyl-cAMP

PKA : protein kinase A

PRL : prolactin

PVDF : polyvinylidene difluoride

Rap : Ras-associated protein

RNA : ribonucleic acid

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

SA- β -Gal : senescence-associated β galactosidase

SDS : sodium dodecylsulfate

siRNA : small interfering RNA

TBST : tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20

緒言

哺乳類 (主に真獣類) の妊娠成立において、排卵、受精、胞胚の発達、着床、胎盤形成は重要な過程である。ヒトにおいても受精後の適切な胞胚の発達と着床に向けた子宮内膜の機能的変化、すなわち胞胚受容能の獲得が妊娠の成立には不可欠である。この受容能の獲得には、子宮内膜間質細胞の脱落膜化と内膜腺の成熟が必要である。ヒトでは、月経周期の増殖期においてエストラジオール (E_2) の作用により子宮内膜が肥厚し、らせん動脈の増生と内膜腺が形成される。分泌期中期から後期にかけて、主に黄体から分泌されるプロゲステロン (P_4) の作用により肥厚した子宮内膜は脱落膜化により浮腫状となり、らせん動脈のさらなる増生、内膜腺はらせん構造へと成熟し、粘液を分泌する。脱落膜の役割は、妊娠時における胎児由来栄養膜細胞の浸潤の制御や、母体の免疫寛容及び、ガス交換と栄養供給である¹⁾。ヒトでは胞胚の有無に関わらず月経周期の分泌期において脱落膜化する。胞胚が子宮内膜上皮に接着すると、胞胚外層の栄養膜細胞が子宮内膜へ浸潤し、着床部位周辺から間質細胞の脱落膜化がさらに促進される。この脱落膜化組織は、妊娠が成立すると胎盤の構成組織として機能する。しかし、妊娠が成立しなければ、黄体からの P_4 分泌の減少に伴い、子宮内膜組織が維持できなくなり月経時に体外へ排出される。

一方、ラットなどの齧歯類は脱落膜を形成するが、その形成機構はヒトと異なる。齧歯類は発情周期において脱落膜化は起こらず、胞胚の着床など物理的刺激が子宮内膜上皮に加わると、脱落膜化が起こる^{1,2)}。しかしながら、胎盤を形成することや卵巣ステロイドにより調節を受けるなどヒトとの共通点も多い。ヒトの妊娠に関する解析は倫理的な問題を多く含むため行うことが困難であるが、齧歯類はこれらの共通点や、様々な遺伝子操作方法が確立しているなど、妊娠モデル動物として広く用いられている。

妊娠における脱落膜の重要性は、多数の遺伝子改変マウスを用いた解析からも証明されている。マウス妊娠子宮には、インターロイキン-11 (IL-11) 受容体 α 鎖 (IL-11RA) が常に発現しており、IL-11は脱落膜化時に発現が上昇する³⁾。このIL-11RAを欠損したマウスでは、性周期回帰、排卵、受精、胚盤胞形成に障害はみられないが、脱落膜化が阻害され不妊になる⁴⁾。一方、プロスタグランジン (PG) 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 2は、着床部位の子宮内膜間質細胞や上皮細胞に発現しており、その欠損マウスでは、着床、脱落膜化が阻害される⁵⁾。さらに、COX2により産生される PGI_2 が脱落膜化を誘起することも報告されている⁶⁾。白血病抑制因子 (LIF) は、子宮内膜腺細胞から分泌され、着床前の LIF の発現亢進が胞胚の着床を誘起するため、LIF 欠損マウスでは、着床不全と脱落膜化障害により不妊になることが報告されている^{7,8)}。近年、脱落膜化時に内膜間質細胞で発現が上昇する癌抑制遺伝子である p53 を子宮特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスは、脱落膜の異常な老化を起こし、早産を引き起こすことが報告されている⁹⁾。

内膜間質細胞は、卵巣ステロイドである E₂ と P₄ の作用により、線維芽細胞様の形態から、敷石状の脱落膜細胞へと分化する。この分化と共に脱落膜細胞に特異的なタンパク質であるプロラクチン (PRL)¹⁰⁾、インスリン様成長因子結合タンパク質 1 (IGFBP1)¹¹⁾ の分泌が亢進し、cAMP シグナルの活性化に伴いフォークヘッド転写因子 FOXO1¹²⁾ の発現が上昇する。In vitro においても内膜間質細胞に P₄ を処置すると、in vivo と同様に線維芽細胞様の形態から、敷石状の形態へと変化し、PRL や IGFBP1 の分泌能の亢進が起こる。また、in vitro において、PGE₂¹³⁾、リラキシン¹⁴⁾、ゴナドトロピン¹⁵⁾ や様々なサイクリック AMP (cAMP) アナログ¹⁶⁾ の処置による細胞内の cAMP 濃度の上昇は、プロテインキナーゼ A (PKA) シグナル伝達経路を活性化させ、P₄ 非存在下でも脱落膜化を誘導する。この培養内膜間質細胞を用いた in vitro 脱落膜化誘導モデルは、脱落膜の形成メカニズムを解明する上で非常に有用であり、広く用いられている。

cAMP シグナルを仲介する因子として PKA が最もよく知られていた。しかし、1998 年 de Rooij らと Kawasaki らにより、PKA とは異なる cAMP シグナル仲介因子として Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) が同定され、もう一つの cAMP シグナル伝達経路が着目されている¹⁷⁻¹⁹⁾。Epac には N 末端側の構造が異なる 2 つのサブタイプの Epac1 と Epac2 がある²⁰⁾ (Fig. 1)。Epac は cAMP により直接活性化されるグアニンヌクレオチド交換因子 (cAMP-GEF) であり、cAMP が Epac の cAMP 結合ドメイン (CNB) に結合すると Epac の立体構造が変化し、CDC25 ホモロジドドメイン (CDC25HD) に低分子量 GTP 結合タンパク質である Rap が結合する。この結合により、Rap は不活性の GDP 結合型から活性の GTP 結合型へと変換され、下流へとシグナルが伝達されていく。これまでに、Epac 選択的 cAMP アナログと PKA 選択的 cAMP アナログ、さらに Epac 選択的な阻害剤が開発され、両シグナルの活性化を区別が出来るようになり、種々の細胞で Epac シグナルの役割が明らかとなってきている。

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞では、Epac 選択的 cAMP アナログの処置による Rap1 の活性化が細胞間ジャンクションの形成を促進することが報告されている²¹⁾。また、ウシ副腎皮質細胞においては、Epac の活性化により副腎皮質ステロイドホルモンの合成が促進することや、マウス膵 β 細胞では、Epac が Rap1 を介して Ca²⁺ の細胞内への流入を制御し、インスリンの分泌を調節していることも明らかになっている^{22,23)}。過去に申請者らは、cAMP/Epac シグナル伝達経路が胎盤形成に関わることを報告した。即ち、胎児の発育に重要な絨毛性ゴナドトロピン (hCG) や P₄ の産生と栄養膜細胞の特徴であるシンシチウム化とよばれる細胞融合が Epac の活性化により促進されることを報告している²⁴⁾。このような結果から、これまで報告されてきた cAMP シグナル伝達経路の活性化に伴う細胞機能の変化過程には PKA だけでなく、Epac が関わっている可能性が推察される。母性胎盤ともいふべき子宮内膜の脱落膜化や腺の成熟における PKA シグナル経路の重要性は既に知られているが、Epac シグナル経路の子宮

内膜機能における役割に関する知見は全く報告されていない。

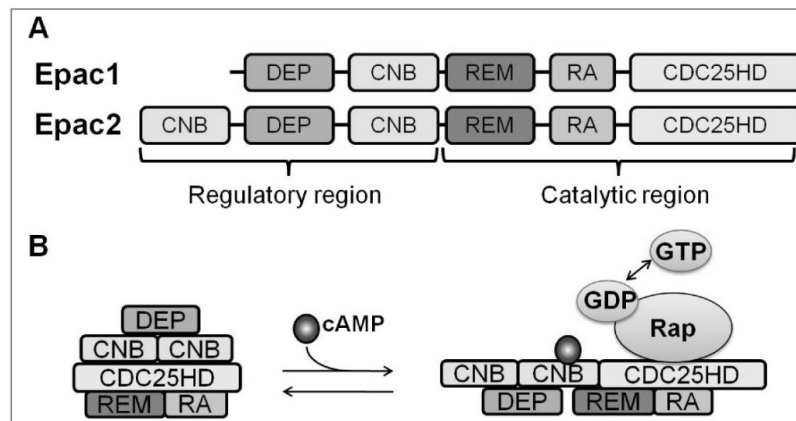


Figure 1. The multi domain structure of Epac

A: Epac1 and Epac2 have the regulatory region with the cyclic nucleotide-binding domain (s) (CNB) and the catalytic region with the CDC25-homology domain (CDC25HD) responsible for the guanine-nucleotide-exchange activity. The Desheveled-Egl-10-Pleckstrin (DEP) domain is involved in membrane localization, the Ras exchange motif (REM) stabilizes the catalytic helix of CDC25HD and the Ras-association (RA) domain is a protein-interaction motif. B: Activation of Epac (indicated for Epac2) by cAMP results in the opening of the protein to enable interaction with Rap and, consequently, the conversion of GDP-Rap to GTP-Rap.

本研究では、妊娠の成立に必須である子宮内膜間質細胞の脱落膜化と内膜腺の成熟過程における cAMP/Epac シグナルの役割について明らかにする。

第1章では、ヒト子宮内膜組織における Epac の発現を精査し、培養ヒト子宮内膜間質細胞を用いて脱落膜化過程における Epac の役割を解析した。第2章では Epac シグナルの下流因子を同定し、脱落膜化との関連について解析を行った。第3章では、ラットの着床周辺期子宮における Epac 発現と脱落膜化への関与についてラット子宮組織及び培養ラット子宮内膜間質細胞を用いて解析を行った。また、第4章では、子宮内膜腺細胞の成熟における Epac シグナル経路の役割について解析を行った。

第1章 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Epac の関与

ヒト子宮内膜間質細胞 (ESCs) は、月経周期の分泌期に脱落膜細胞へと分化 (脱落膜化) し、着床に適した状態に変わる。脱落膜化は、主に卵巣ステロイドの作用による細胞内の cAMP シグナルの活性化により起こり、ESCs は、線維芽細胞様の形態から敷石状の形態へと変化する。また、脱落膜化過程では、妊娠に必要な PRL や IGFBP1 の産生が亢進する。重要な細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP のシグナル仲介因子は PKA が知られている¹⁶⁾。しかしながら、新規の cAMP シグナル仲介因子として Epac が同定され、現在、2つのサブタイプ Epac 1 と Epac 2 が報告されている。以前のヒト絨毛癌細胞株を用いた検討では、Epac シグナルの活性化により妊娠維持に不可欠な hCG や P₄ の産生と合胞体化が促進されること明らかにした²⁴⁾。しかしながら、母体 (子宮内膜) 側の胎盤形成である脱落膜化にも cAMP/PKA シグナルが重要であることが既に報告されているものの、cAMP/ Epac シグナルの子宮内膜機能における役割に関する知見はない。そこで、脱落膜化における Epac シグナル伝達経路の意義を明らかにすることを目的として、主にヒト ESCs の *in vitro* 脱落膜化モデルを用いて検討を行った。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ヒト子宮内膜間質細胞 (ESCs) と内膜間質細胞株 (EtsTs) の単離と培養

ESCs は、以前単離し、増殖させた後に凍結されたストック細胞を用いた。本細胞は、正常な月経周期を有し、ホルモン療法を受けてない子宮内膜症又は子宮筋腫の患者から手術の際にインフォームドコンセントを行い得られた(承認番号 07-02)。内膜組織より Satyaswaroop らの方法²⁵⁾を参考にして、ESCs を単離した。ESCs は、50 µg/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシン、0.5 µg/mL ファンギゾン (Life Technologies) 及びチャコール処理した 10% (v/v) ウシ胎仔血清 (CS-FBS、Biological industries) を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)/F12 培養液にて培養した。なお、単離した ESCs は少なくとも 95% がビメンチン陽性、サイトケラチン陰性であることを確認した。さらに、内膜間質細胞株 (EtsTs) は、以前、当研究室で樹立したもの²⁶⁾を用い、上記 ESCs と同様に培養を行った。ESCs、EtsTs は、10% (v/v) CS-FBS 及び抗生物質 (50 µg/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシン、100 µg/ml ネオマイシン、GIBCO)、抗真菌薬 (0.5 µg/ml アムホテシリン B、GIBCO) を含む DMEM/F12 培養液で培養した。

1-2. Epac の免疫染色

4% パラホルムアルデヒドで約 10 時間浸し、固定した子宮内膜組織は、70% エタノールに一晩、95% エタノールに 6 時間、99.5% エタノールに一晩、再び 99.5%

エタノールに 5 時間、無水エタノールに 5 時間、再び無水エタノールに一晩、キシレンに 3 時間、再びキシレンに 2 時間浸した。その後、パラフィンに浸して 65 °C で 4 時間インキュベートし、さらに 1 時間パラフィン中でインキュベーションした。この作成されたパラフィン包埋ブロックの組織切片をポリ-L-リジン (PLL) でコートしたスライド上に調製した。パラフィン包埋切片を 65 °C で 30 分間加熱した後、キシレン及びエタノール溶液に順次浸し、脱パラフィン処理を行った。Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、抗原賦活化反応として 100 °C に加熱した 10 mM クエン酸緩衝液に組織スライドを浸し、20 分間ボイルした。30 分間室温で静置した後、PBS で洗浄し、10 % ヤギ正常血清にて室温で 2 時間ブロッキングを行った。ポリクローナル抗 Epac1 抗体 (#ab21235, 6.7 µg/ml, Abcam)、抗 Epac2 抗体 (clone H-220, 2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) と 4 °C で一晩反応させた。PBS で洗浄 (5 分、3 回) した後、アミノ酸ポリマーと西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型抗ウサギ IgG 抗体 (Histofine Simple Stain MAX-PO MULTI, Nichirei) と共に室温で 60 分間インキュベートした。PBS で洗浄 (5 分、3 回) 後、3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (Histofine Simple Stain DAB solution, Nichirei) を基質として発色反応を行った。発色反応に続いてメチルグリーンにて核染色を行い、脱水処理後にエンテランで封入した。

1-3. *In vitro* 脱落膜化

ESCs、EtsTs (3×10^4 個/well) を 24 穴プレートに播種し、10 % CS-FBS 含有 DMEM/F-12 メディウムで 37°C、24 時間培養した。その後、2 % CS-FBS 存在下で Epac 選択的 cAMP の 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyl cAMP (CPT) (Biolog Life Science Institute)、PKA 選択的 cAMP の N⁶-Phenyl-cAMP (Phe) (Biolog Life Science Institute) をそれぞれ 200 µM ずつ単独処置、または Phe (200 µM) と CPT (10、50、200 µM) を共処置し、48 時間培養した。また、同様に播種した ESCs に P₄ (1 µM) 及び E₂ (10 nM)、または、これら卵巣ステロイドに加え CPT (200 µM) を処置し、8 日間培養した。なお、2 日おきにメディウム交換をした。各実験において培養終了後、細胞及び培養メディウムを回収し、以下の解析を行った。

1-4. Small interfering (si) RNA 処置

ESCs (3×10^4 個/well) を 24 穴プレートに播種し、10 % CS-FBS 含有 DMEM/F-12 メディウムにて 37 °C で一晩培養した。その後、それぞれ 30 pmol の Epac1 (5'-AUU GAG AUU CUU CUG CUC CUU GAG G-3', 5'-CCU CAA GGA GCA GAA GAA UCU CAA U-3', Invitrogen)、Epac2 (5'-UGU UCU UUA AGU CUG ACU GUA UUC G-3', 5'-CGA AUA CAG UCA GAC UUA AAG AAC A-3', Invitrogen)、Rap1 (5'-CGA GUA CUG UGG AUG UGA A-3', Santa Cruz Biotechnology) 特異的 siRNA、また、対照群として非標的コントロール siRNA (Qiagen) をプロトコールに従い、LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) を用いて細胞に導入した。

1-5. ウェスタンブロット解析

培養細胞を RIPA Buffer (Cell Signaling Technology) で回収した後、不溶性物質を取り除去するために遠心分離 (4 °C、13,000 rpm、10 分間) し、その上清をサンプルとした。Bradford 法に基づくタンパク質定量試薬 (Bio-Rad) を用いて、各サンプル中のタンパク質量を定量した。各サンプル (20 µg のタンパク質を含む) に 4×Loading Buffer (200 mM Tris (pH 6.8)、8 % SDS、0.4 % ブロモフェノールブルー)を加え、3 分間煮沸した後、5~20 %グラディエントポリアクリルアミドゲルを用い電気泳動 (26 mA 定電流) を行った。その後、タンパク質を PVDF メンブランに転写 (128 mA、定電流) し、イムノブロック液にて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、抗 Epac1 抗体 (1:2000、Cell Signaling Technology)、抗 Epac2 抗体 (1:2000、Cell Signaling Technology)、抗 Rap1 抗体 (1:2500、Upstate) または抗 p-CREB 抗体 (87G3、1:100、Cell Signaling Technology) と共に 4 °C で一晩インキュベートした。TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% Tween) でメンブランを洗浄 (10 分、3 回) 後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 または、同標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:5000、Vector laboratories) を用いて 1 時間インキュベートした。TBST で洗浄 (10 分、3 回) 後、化学発光試薬 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate、Millipore または、Western Lightning™、PerkinElmer Life Sciences Inc.) で発光させ、バンドを確認した。なお、同じメンブランにおいて、内部標準である GAPDH タンパク質を検出するため、ストリッピング液 [62.5 mM Tris (pH 6.8)、2 % SDS、0.7 % 2-メルカプトエタノール] を用いて脱抗体反応 (50 °C、30 分間) を行った。TBST で洗浄後、ブロッキングを行い、抗 GAPDH 抗体 (1:5000、Sigma-Aldrich)、次いで二次抗体を反応させた。得たバンドをデンシトメトリーにより数値化し、目的のバンドの数値を、内部標準である GAPDH のバンドの数値で補正することにより、各サンプル間のタンパク質量の比を求めた。

1-6. リアルタイム RT-PCR 解析

トータル RNA の抽出は ISOGEN (Nippon Gene) を用い、添付のプロトコールに従って行った。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、iScript™ One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green (Bio-Rad) でリアルタイム RT-PCR 解析を行った。本解析に用いたプライマーの配列は以下に示す通りである。RT-PCR 反応は iCycler サーマルサイクラー (Bio-Rad) を用いて 50 °C で 30 分間の逆転写反応、95 °C で 5 分間の逆転写酵素の失活に次いで 95 °C で 10 秒間の変性反応、60 °C で 30 秒のアニーリング反応と伸長反応を 45 サイクル行った。各サンプル中の mRNA 発現量を比較するため、Comparative Ct 法で解析した。即ち、ある一定の蛍光強度を示したサイクル数を閾値 (Ct) とし、目的遺伝子の Ct と内部標準である GAPDH の Ct より、以下の計算式でサンプル間の発現量の比を求めた。

$$\text{発現量} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{サンプル A}} - \Delta Ct_{\text{サンプル基準}}$$

$$\Delta Ct_{\text{サンプル A}} = Ct_{\text{目的遺伝子サンプル A}} - Ct_{\text{GAPDH サンプル A}}$$

$$\Delta Ct_{\text{サンプル基準}} = Ct_{\text{目的遺伝子サンプル基準}} - Ct_{\text{GAPDH サンプル基準}}$$

<i>IGFBP1</i>	S	5'-AATGGATTTTATCACAGCAGACAG-3'
	AS	5'-GGTAGACGCACCAGCAGAGT-3'
<i>PRL</i>	S	5'-AAAGGATCGCCATGGAAAG-3'
	AS	5'-GGTCTCGAAGGGTCCACTG-3'
<i>FOXO1</i>	S	5'-AAGGGTGACAGCAACAGCTC-3'
	AS	5'-TTCTGCACACGAATGAACTTG-3'
<i>GAPDH</i>	S	5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3'
	AS	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

1-7. IGFBP1 の ELISA 解析

培養メディウム中の IGFBP1 タンパク質量は human IGFBP1 DuoSet kit (R&D Systems) の使用法に従ったサンドイッチ ELISA 法で定量した。メディウムは、遠心分離 (4 °C、10,000 rpm、10 分間) し、その上清をサンプルとした。96 穴プレートにキット内の Capture Antibody を加え、室温で一晩静置した。PBST (20 mM phosphate buffer (pH 7.45)、150 mM NaCl、0.05% Tween) で 3 回洗浄した後、20 mM phosphate buffer (pH 7.45)、150 mM NaCl、5% Tween、0.05% NaN₃ を含むブロッキング液にて室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後、リコンビナントヒト IGFBP1 (0.125~2 ng/mL の希釈系列) または、培養メディウムサンプルをウェルに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後、Detection Antibody を加え、室温で 2 時間インキュベートした。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液 (ImmunoPure[®] Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated, Thermo SCIENTIFIC) を加え、室温で 2 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後、Substrate solution を加え、室温で 20 分間インキュベーションを行い、1 M H₂SO₄ を加えて呈色反応を終了させた。反応終了後マイクロプレートリーダー (TECAN、Wako) を用いて吸光波長 450 nm の吸光度を測定した。得られたスタンダードの吸光度から検量線を作成し、サンプル中の IGFBP1 濃度を算出した。なお、データを、細胞溶解液中に含まれる総タンパク質量にて補正を行い、相対値で表した。

1-8. 増殖アッセイ

ESCs に Epacl、Epac2 または Rap1 siRNA を 24 時間処置した。さらに 24 時間または 8 日間培養した後、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-terrazolium, monosodium salt (WST-8) を加え 37 °C で 20 分間培養した。マイクロプレートリーダー (TECAN、Wako) で培養液の吸光波長 450 nm の

吸光度を測定した。得られた吸光度から、細胞の生存率を相対値で表した。

1-9. 活性型 Rap1 の検出

活性型 Rap1 (GTP-結合型 Rap1) の検出には、Rap1 Activation Assay kit (Millipore) を用いた。培養細胞をキット内の Rap1 Activation Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl、2.5 mM MgCl₂、1% NP40、10% glycerol) で回収した。遠心分離 (4 °C、14,000 rpm、5 分間) 後、上清を回収し、その一部を総 Rap1 量を調べるために別に回収した。残りの上清に Ral GDS-Rap1 結合ドメインを結合したアガロース (GTP 結合型 Rap1 に特異的に結合する) を加え、4 °C で 45 分間穏やかに攪拌した。遠心分離 (4 °C、14,000 rpm、10 秒間) 後、上清を取り除き、Rap1 Activation Lysis Buffer を加えて洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、上清を取り除き、2×Loading Buffer (100 mM Tris (pH 6.8)、4 % SDS、0.2 % ブロモフェノールブルー) を加えた。このサンプルと総 Rap1 量を調べるために予め回収した細胞溶解液を 3 分間煮沸した後、5~20 % グラディエントポリアクリルアミドゲル (SuperSepTM Ace、Wako) で電気泳動 (26 mA 定電流) し、タンパク質を PVDF メンブランに転写 (128 mA、定電流) した。イムノブロック液 (Dainippon Sumitomo Pharma) でメンブランを室温で 1 時間ブロッキングした。その後、抗 Rap1 抗体 (1:2500、Millipore) を用いて、前述のウエスタンブロット解析と同様の操作を行い、活性型 Rap1 量を調べた。

1-10. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

PRL は主に下垂体と脱落膜で産生されるが、その転写機構は異なる。脱落膜由来 PRL (dPRL) は、下垂体由来 PRL の転写開始点から約 6000 塩基対上流から転写される。なお、dPRL と下垂体由来 PRL のアミノ酸配列は同じである。そこで dPRL のプロモーター領域の配列 (-dPRL-wt: -332~ +65) を、ヒト子宮内膜間質細胞のゲノム DNA をテンプレートにした PCR で増幅した。このプロモーター領域には、C/EBPβ と C/EBPδ の結合部位がある。C/EBPβ と C/EBPδ の結合配列を変異させた (dPRL-mutβ: -270~-301, dPRL-mutδ: -291~-311, dPRL-mutβδ: -270~-311) DNA フラグメントは以下に示すプライマーを用いて、PCR 法で調製した。調製して得られた PCR 産物を制限酵素 Kpn1/Xho1 で pNL1.3 (Promega) へサブクローニングし、レポータープラスミドとした。pNL1.3 はレポーター遺伝子としてトゲオキヒオドシエビ由来のルシフェラーゼが用いられており、この産生されたルシフェラーゼは分泌型のため、培養液を用いて転写活性を測定する。24 穴プレートに播種したサブコンフルエントの ESCs の培養液を 2 % CS-FBS 含有 DMEM/F12 メディウムへ交換し、一晚培養した後、脱落膜化刺激を 1 時間行った。その後、調製したレポータープラスミド (1 μg) をリン酸カルシウム共沈殿法 (133 mM CaCl₂, 25 mM HEPES, 140 mM NaCl) で導入、37°C にて 4 時間インキュベート後、PBS で洗浄し、脱落膜化刺激を 48 時間行った。その後培養液を回収し、レポーター遺伝子の酵素活性を Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega)

を用いて、ルミノメーターMithras LB940 (Berthold Technologies) にて測定した。

dPRL-mut β	S	5'-ATGCTGAGCATCATGTCTGGTCTCTGCTCA-3'
	AS	5'-ATGATGCTCAGCATCTTACAACACACAGAG-3'
dPRL-mut δ	S	5'-GTGTGTCGTACGATGTTTAGCAACATGCTC-3'
	AS	5'-ATCGTACGACACACAGAGCAGCCCTCAGA-3'
dPRL-mut $\beta\delta$	S	5'-GTGTGTCGTACGATGCTGAGCATCATGCTC-3'
	AS	5'-GACGCTCAGCATCGTACGACACACAGAGC-3'

1-11. 統計処理

ELISA とリアルタイム RT-PCR の結果を平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定には、Tukey-Kramer 多重比較を行い、危険率 5 % ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. ヒト子宮内膜組織における Epac1 及び Epac2 の局在

増殖期と分泌期の子宮内膜組織における Epac1 及び Epac2 の局在を免疫組織染色法で調べた。Epac1 は増殖期と分泌期の子宮内膜において管腔上皮 (le)、腺上皮 (ge)、間質細胞 (s) に発現していた (Fig. 2 A, B)。また、Epac2 も管腔上皮、腺上皮、間質細胞に発現していた (Fig. 2 C, D)。Epac1 と Epac2 発現は分泌期において核膜でみられた。さらに、月経周期の増殖期、分泌期で Epac1 と Epac2 発現に違いはみられなかった。ネガティブコントロールにおいて非特異的な染色はなかった (Fig. 2 E, F)。

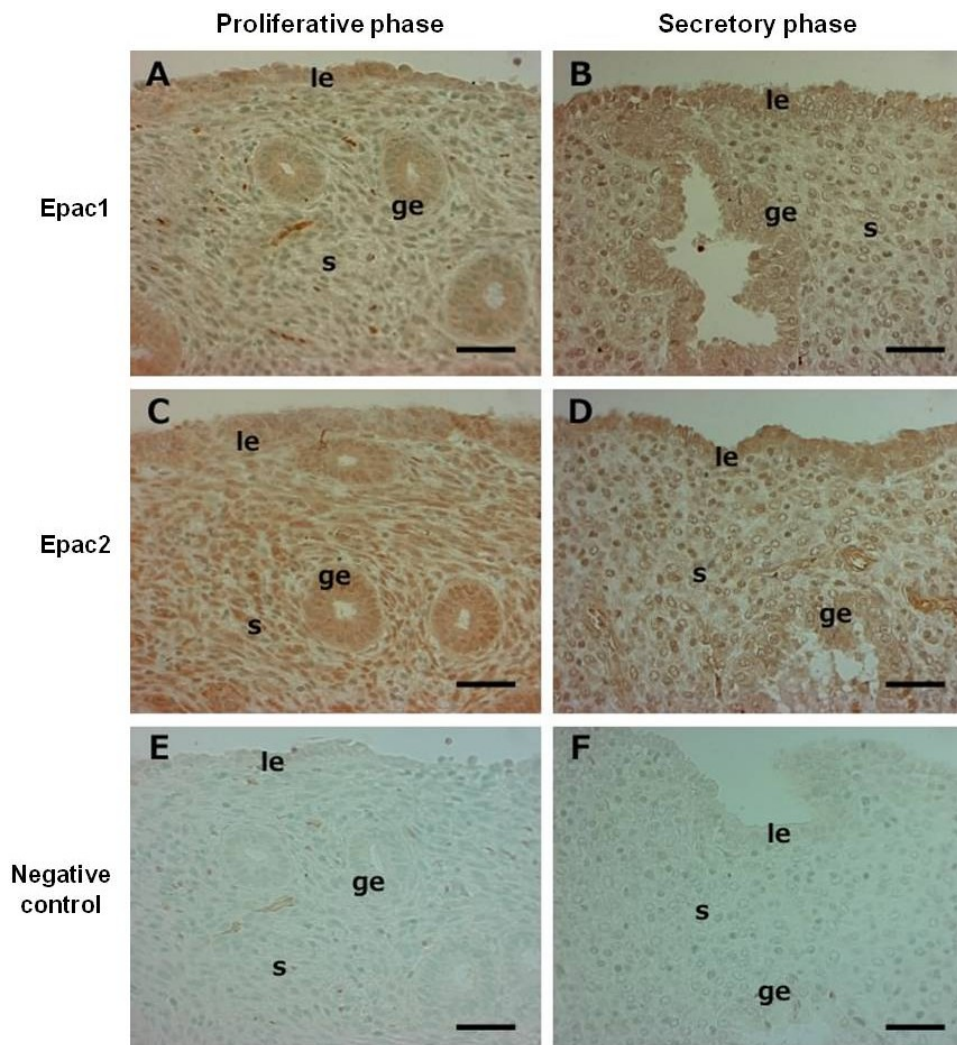


Figure 2. Epac1 and Epac2 are expressed in human endometrium

Sections of proliferative (A, C, E) and secretory (B, D, F) phase human endometrium were immunostained with anti-Epac1 (A, B; brown staining) or anti-Epac2 (C, D; brown staining) antibody, or rabbit IgG (E, F; negative control) and counterstained with methyl green to visualize nuclei. Representative pictures from proliferative (n=6) and secretory (n=4) phases are shown. le: luminal epithelial cells, ge: glandular epithelial cells, s: stromal cells. Scale bars: 50 μ m.

2-2. ESCs の脱落膜化に対する Epac 選択的 cAMP アナログの効果

緒言で述べたように、ヒト ESCs の脱落膜化には PKA を介した cAMP シグナル伝達経路が重要であることが報告されている¹⁶⁾。そこで、この cAMP/PKA シグナルの活性化に伴う脱落膜化機構に Epac が関与するのか検討した。初代培養 ESCs と以前、当研究室で樹立した ESCs 株 (EtsTs) に、PKA 選択的 cAMP アナログ (Phe) または Epac 選択的 cAMP アナログ (CPT) をそれぞれ 200 μ M ずつ単独処置、または Phe (200 μ M) と CPT (10、50、200 μ M) を共処置 (Phe/CPT) した。48 時間培養後に脱落膜マーカーとして知られている *PRL*、*IGFBP1* と *FOXO1* の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した (Fig. 3)。初代培養 ESCs 及び EtsTs 共に Phe 単独処置群では、未処置の対照群に比べ *PRL*、*IGFBP1* 及び *FOXO1* mRNA 発現レベルが上昇したが、CPT 単独処置群ではこれらの発現は変化しなかった。しかし、Phe/CPT 群では Phe 単独処置群と比べて、*PRL* と *IGFBP1* の mRNA 発現量がさらに増加した。一方、*FOXO1* mRNA 発現レベルは、Phe/CPT 群と Phe 単独処置群の間で差はなかった。これらの Phe 誘導性の *IGFBP1* と *PRL* mRNA 発現に対する CPT の促進効果は、cAMP 誘導性の脱落膜化に Epac が関与していることを示している。

2-3. *In vitro* 脱落膜化に対する Epac1、Epac2 及び Rap1 発現抑制の効果

脱落膜化における Epac シグナル経路の関与をさらに調べるために、内因性の Epac1、Epac2、Epac 経路の下流シグナル伝達因子として知られている Rap1 の発現を siRNA を用いて抑制した後、各 cAMP アナログを処置し、脱落膜化マーカーの発現を調べた (Fig. 4)。Epac1、Epac2 または Rap1 の特異的 siRNA を導入した後、それぞれのタンパク質量が減少することを確認した (Fig. 4 A)。Phe 単独処置及び、Phe/CPT 共処置後の *IGFBP1* と *PRL* mRNA 発現レベルは対照群 (Cont siRNA 導入群) と比べ、Epac1、Epac2 または Rap1 ノックダウンにより抑制された (Fig. 4 B, C)。一方、*FOXO1* mRNA 発現は、Epac1 または Rap1 をノックダウンしても変化しなかったが、Epac2 ノックダウンにより抑制された (Fig. 4 D)。なお、Epac1、Epac2 及び Rap1 をノックダウンしても細胞の生存率には影響しなかった (Fig. 4 E)。

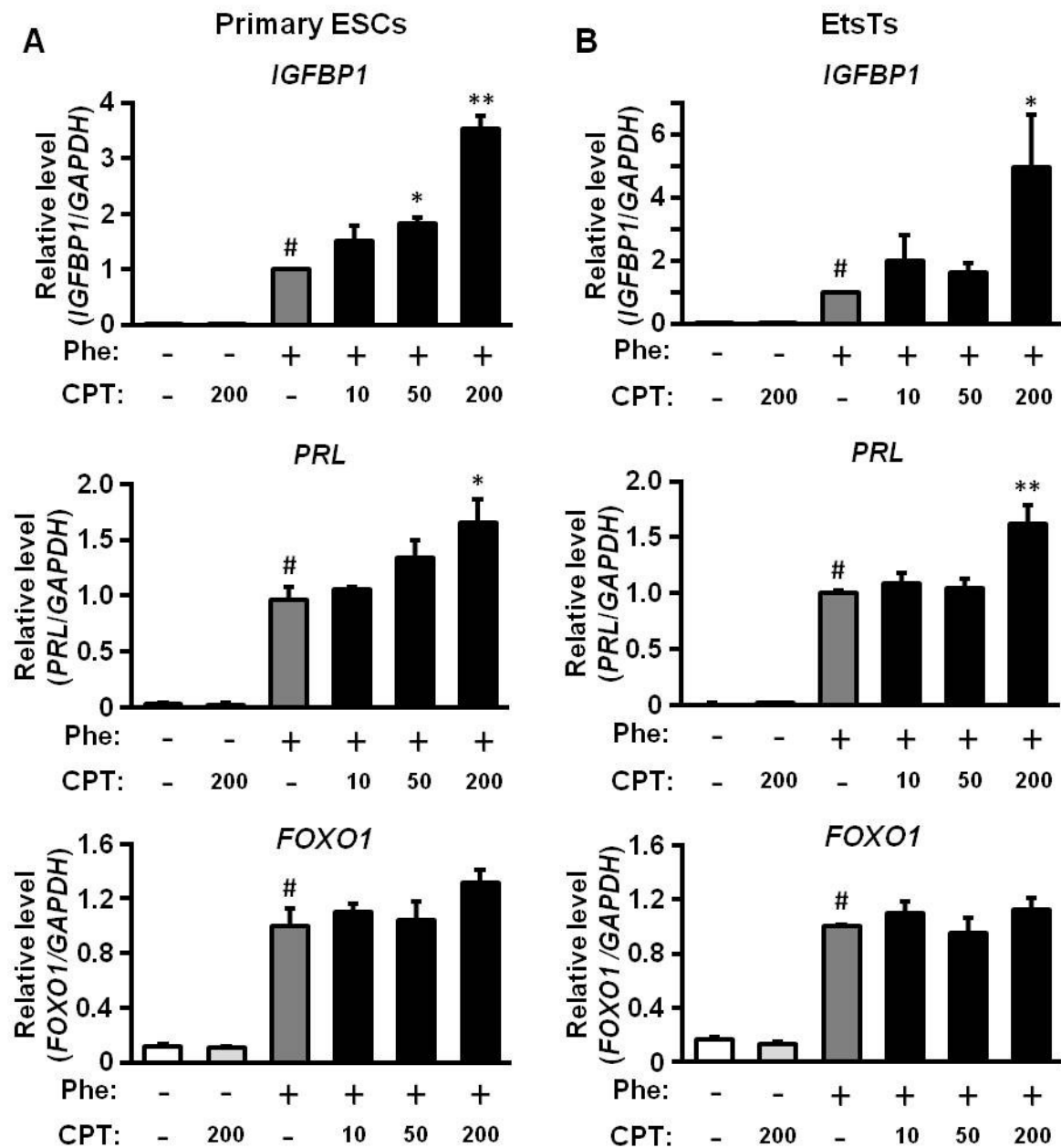


Figure 3. Epac-selective cAMP analog enhances PKA-mediated *IGFBP1* or *PRL* mRNA expression in primary ESCs and immortalized (EtsTs)

Primary ESCs (A) and EtsTs (B) were cultured in medium with or without PKA-selective cAMP analog Phe (200 μ M), the Epac-selective cAMP analog CPT (200 μ M), or a combination of Phe (200 μ M) and CPT (10, 50, or 200 μ M) for 48 h. Total RNA was amplified by real-time RT-PCR to determine *IGFBP1*, *PRL* or *FOXO1* mRNA levels. *GAPDH* served as an internal control. The data from four independent experiments are presented. Values represent mean \pm SEM and are relative to the value for treatment with Phe alone. * p <0.05, ** p <0.01 vs. Phe; # p <0.01 vs. Cont.

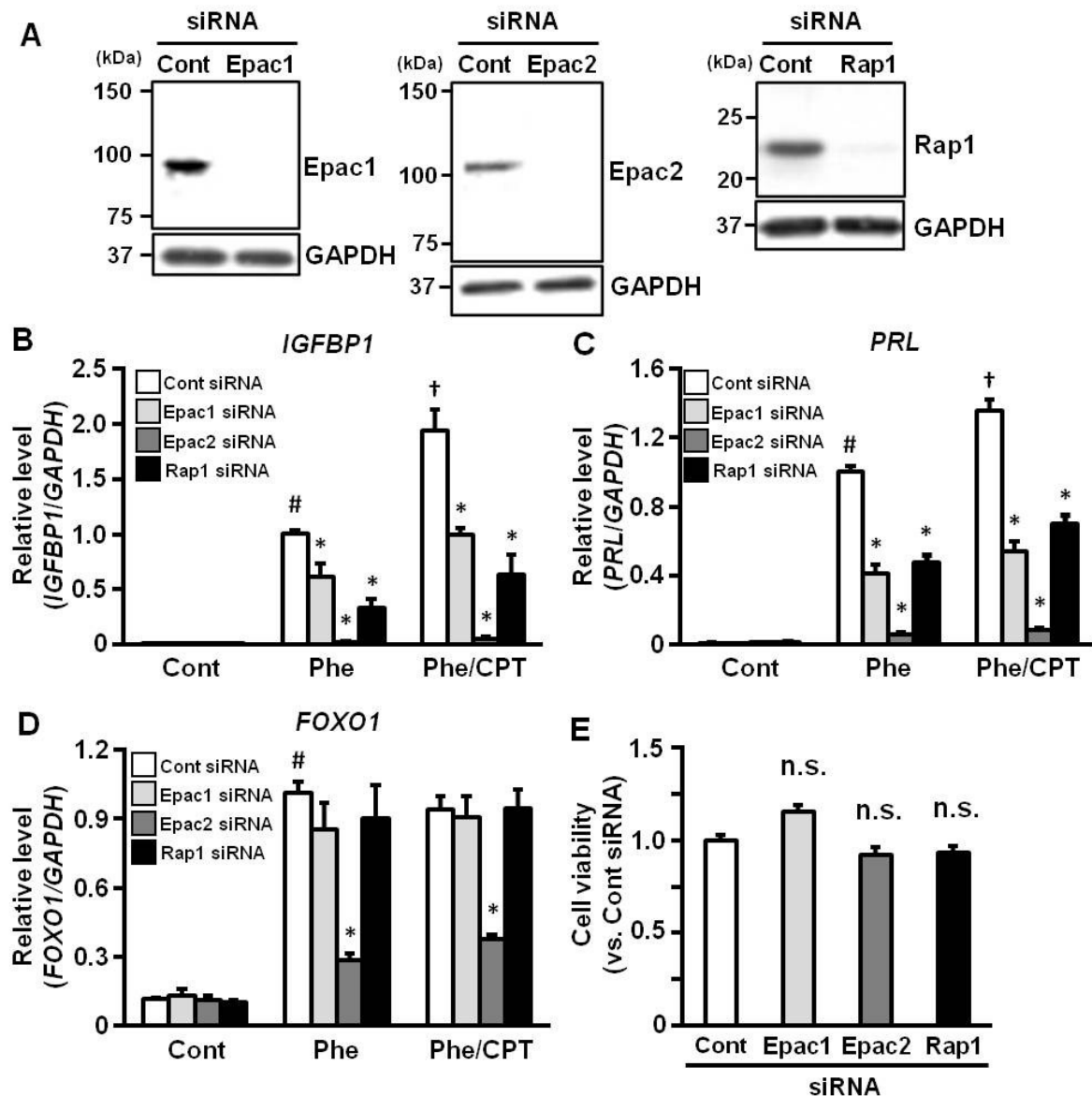


Figure 4. Epac1, Epac2 or Rap1 knock-down inhibits cAMP analogs-induced decidual markers expression in ESCs

A: ESCs were treated for 24 h with the non-targeting control (Cont), Epac1, Epac2 or Rap1 siRNA and treated with Phe (200 μ M), or a combination of Phe and CPT (200 μ M) for 48 h. Epac1, Epac2 and Rap1 expression levels were determined using immunoblotting. Blots were stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control. B-D: Total RNA was amplified by real-time RT-PCR to determine *IGFBP1* (B), *PRL* (C) or *FOXO1* (D) mRNA levels. *GAPDH* served as an internal control. The data from six independent experiments are presented and expressed as mean \pm SEM relative to the value for treatment with Phe alone. * $p < 0.01$ vs. Cont siRNA; # $p < 0.01$ vs. Cont; † $p < 0.01$ vs. Phe. (E) ESCs were treated with siRNA for 24 h and cultured for another 24 h. Cell viability was evaluated using the WST-8 assay. The data from three independent experiments are expressed as mean \pm SEM relative to control levels. n.s., not significant (vs. Cont siRNA).

2-4. ESCs における Rap1 の活性化に対する Epac の関与

Fig. 4 B, C において Rap1 ノックダウンにより *IGFBP1*, *PRL* mRNA が抑制されることを示した。しかしながら、Rap1 が ESCs において CPT の処置により活性化されるのかは不明である。ESCs に Phe または CPT を処置した後、活性型 (GTP 結合型) Rap1 量をプルダウンアッセイにて解析した。その結果、ESCs に CPT を処置しても活性型 Rap1 量は増加しなかった (Fig. 5 A)。また、Phe 処置も活性型 Rap1 レベルに影響しなかった。次に、予め Phe を 48 時間処置し、脱落膜化を進行させた ESCs に Phe、CPT または、アデニル酸シクラーゼ活性化薬である Forskolin を処置し、Rap1 の活性化状態を調べた。Phe を前処置した細胞にさらに Phe を処置しても Rap1 の活性化量は変化しなかったが、CPT を処置した細胞では Rap1 の活性化量が上昇した (Fig. 5 B)。

また、Forskolin の処置により細胞内 cAMP 濃度を増加させても明らかな活性型 Rap1 量の増加がみられた (Fig. 5 B)。また、脱落膜化が進行した ESCs の Rap1 の活性化に対する Epac1 と Epac2 ノックダウンの効果について検討した。対照群 (Cont siRNA) に比べ、Epac1 と Epac2 ノックダウン群では、CPT による活性型 Rap1 の上昇レベルは低かった (Fig. 5 C)。これらの結果から、脱落膜化過程の ESCs では、cAMP 上昇により Epac を介した Rap1 の活性化が起こることが示唆された。

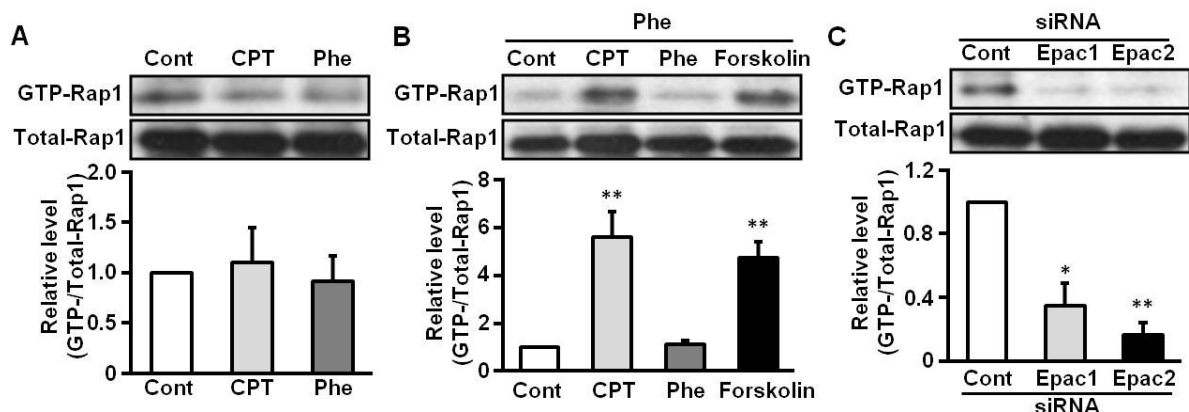


Figure 5. Rap1 is activated by Epac1 and Epac2 in Phe-pretreated ESCs

A, B: ESCs were cultured in the absence (A) or presence (B) of Phe (200 μ M) for 48 h, and then incubated with CPT (200 μ M), Phe (200 μ M) or Forskolin (10 μ M) for 20 min. C: ESCs pretreated with Phe (200 μ M) for 48 h were cultured with non-targeting control (Cont), Epac1 or Epac2 siRNA for 24 h. ESCs were then incubated with Phe for another 24 h and treated with CPT (200 μ M) for 20 min. Cell lysates were incubated with a GST-RalGDS-Rap1 binding domain fusion protein and pulled down with glutathione agarose to determine GTP-Rap1 levels. The upper panels (in A-C) show representative immunoblots of GTP-Rap1 and total Rap1. The graphs show GTP-Rap1 levels normalized to total Rap1 levels from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Cont (in B) and vs. Cont siRNA (in C). Data are presented as ratios of Cont (A, B) or Cont siRNA (C); values represent mean \pm SEM.

2-5. 卵巣ステロイドによる脱落膜化誘導に対する Epac 選択的 cAMP アナログの効果

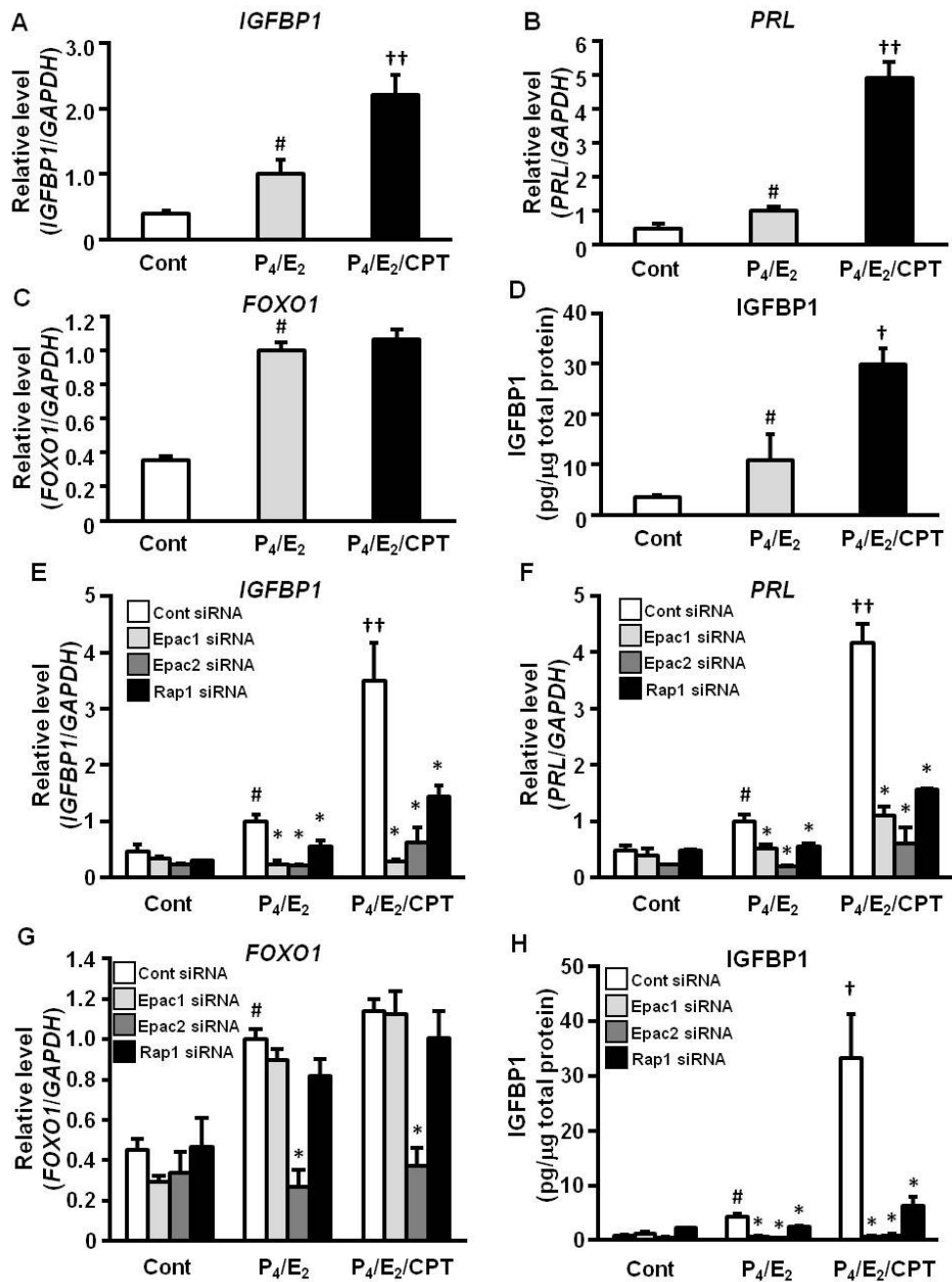
前述した結果より、cAMP シグナルの活性化を介した脱落膜化機構に、Epac1、Epac2 並びに Rap1 が関与していることが示された。そこで、生理的な脱落膜化刺激因子と考えられている P₄/E₂ を処置した場合の Epac の関与を検討した。ESCs に P₄ と E₂ を 8 日間処置 (P₄/E₂ 群) すると、*IGFBP1*、*PRL* 及び *FOXO1* mRNA 発現レベルが上昇した。また、P₄/E₂ に加えて CPT をさらに処置 (P₄/E₂/CPT 群) すると、*IGFBP1* と *PRL* mRNA 発現レベルが P₄/E₂ 群と比べて有意に亢進した (Fig. 6 A, B, C)。また、培養メディアウム中の *IGFBP1* 分泌レベルも同様に P₄/E₂ 群で亢進し、P₄/E₂/CPT 群ではさらに上昇した (Fig. 6 D)。

さらに、卵巣ステロイド誘導性の脱落膜化に対する Epac1、Epac2、Rap1 ノックダウンの効果調べた。Epac1、Epac2 並びに Rap1 ノックダウンは、P₄/E₂ または P₄/E₂/CPT 誘導性の *IGFBP1* と *PRL* mRNA (Fig. 6 E, F) と *IGFBP1* 分泌 (Fig. 6 H) を有意に抑制した (Fig. 6 E, F, H)。また、Epac2 ノックダウンは *FOXO1* mRNA 発現も抑制した (Fig. 6 G)。さらに、脱落膜化特有の敷石状の形態への変化と Epac1、Epac2 と Rap1 の関係について検討を行った。Cont siRNA 導入群では、P₄/E₂ 処置により、よく知られているように ESCs は線維芽細胞様の形態から敷石状の脱落膜細胞へと分化した (Fig. 6 I-a, b)。この処置に加えて CPT を処置すると、この脱落膜細胞への形態変化がより顕著にみられた (Fig. 6 I-c)。一方、Epac1 または Rap1 発現を抑制すると P₄/E₂ または P₄/E₂/CPT 処置によるこの形態変化が阻害され、線維芽細胞様の未分化な形態のままだった (Fig. 6 I-d, e, f, j, k, l)。また、Epac2 をノックダウンした ESCs では、卵巣ステロイド処置の有無に関わらず、敷石状の脱落膜細胞とは明らかに異なる大きく扁平状の形態を示した (Fig. 6 I-g, h, i)。

2-6. Epac による PRL 転写調節機構の解明

Epac シグナルの活性化が卵巣ステロイド並びに、cAMP アナログによる *PRL*、*IGFBP1* mRNA 発現を促進することを示したが、その詳細な発現調節機構については不明である。そこで、Epac シグナルが PKA シグナルの下流因子である cAMP responsive element binding protein (CREB)¹⁶⁾ の活性化 (リン酸化) を起こすのか否かについて調べた。ESCs に Phe を処置すると CREB のリン酸化レベルが上昇したが、CPT では変化しなかった (Fig. 7 A)。また、Phe/CPT 処置も Phe 単独処置と同等のレベルであった。さらに Phe による CREB のリン酸化は Epac1、Epac2 及び Rap1 をノックダウンしても変化しなかった (Fig. 7 B)。この結果は、Phe/CPT による *PRL* 発現の増強と、Epac1、Epac2 並びに Rap1 ノックダウンによる Phe 誘導性の *PRL* 発現の抑制に、PKA/CREB シグナル経路が関与していないことを示した。一方、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β は、*PRL* と *IGFBP1* の共通の転写因子として知られる²⁷⁾。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞において Epac 選択的 cAMP アナログの処置により C/EBPβ 発現量が増加することが報告されている²⁸⁾。そこで、ESCs での Epac

による PRL の転写活性の促進に C/EBP β が関与しているのかについてレポーターアッセイで検討した。dPRL-332 において、Phe 単独処置で転写活性レベルが上昇し、Phe/CPT 共処置によりさらに増加した。また、Forskolin 処置は Phe/CPT 共処置と同等の転写活性レベルを示した。これらの転写活性レベルは、C/EBP β の結合部位を欠損させた dPRL-mut β 、dPRL-mut δ で著しく低下した。さらに、dPRL-mut β 、dPRL-mut δ では、Phe/CPT 共処置時に見られた転写活性の増強が見られず、Phe 処置と同じレベルであった。また、C/EBP β の結同部位を 2 つ変異させた dPRL-mut β δ では dPRL の転写活性レベルはさらに減少した (Fig. 7 C)。この結果は、Epac が C/EBP β を介して PKA 誘導性の PRL mRNA 発現を増強していることを示している。



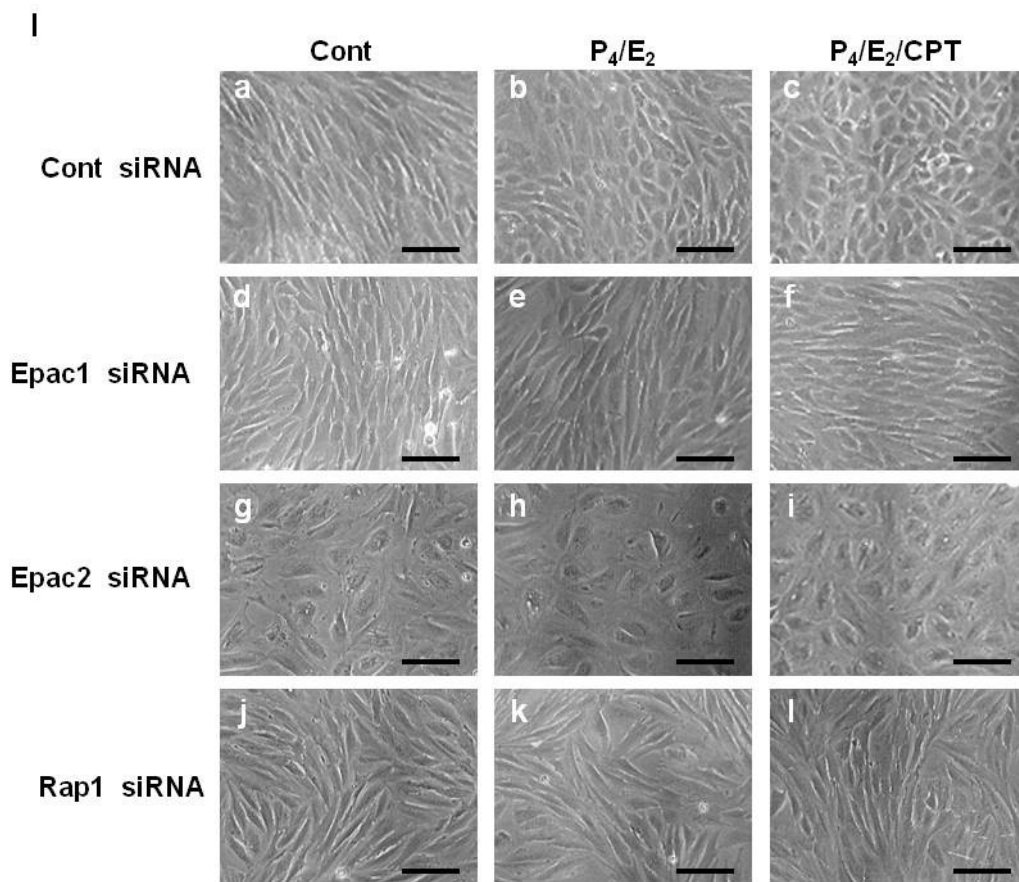


Figure 6. Epac1, Epac2 or Rap1 knock-down inhibits ovarian steroid-induced functional and morphological decidualization

A-D: ESCs were cultured in the absence (Cont) or presence of the ovarian steroids, progesterone (P_4 , 1 μ M) and estradiol (E_2 , 10 nM), or a combination of P_4 , E_2 and CPT (200 μ M) for 8 days. Culture medium was replaced with fresh medium on alternate days. E-J: ESCs were treated for 24 h with non-targeting control (Cont), Epac1, Epac2 or Rap1 siRNA, and then with ovarian steroids (P_4/E_2) or a combination of steroids and CPT ($P_4/E_2/CPT$) for 8 days. A-C, E-G: *IGFBP1* (A, E), *PRL* (B, F) or *FOXO1* (C, G) mRNA level was determined by real-time RT-PCR amplification of total RNA and normalized to the *GAPDH* level. (D, H) IGFBP1 protein level in the culture medium was determined by ELISA and normalized to total cell protein. I: Representative micrographs of ESCs transfected with siRNA and treated with P_4/E_2 or $P_4/E_2/CPT$ for 8 days. Scale bars: 100 μ m. A-H: Data from four independent experiments are presented. Values represent mean \pm SEM and are relative to the value for treatment with P_4/E_2 . # $p < 0.01$ vs. Cont; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. P_4/E_2 ; * $p < 0.01$ vs. Cont siRNA.

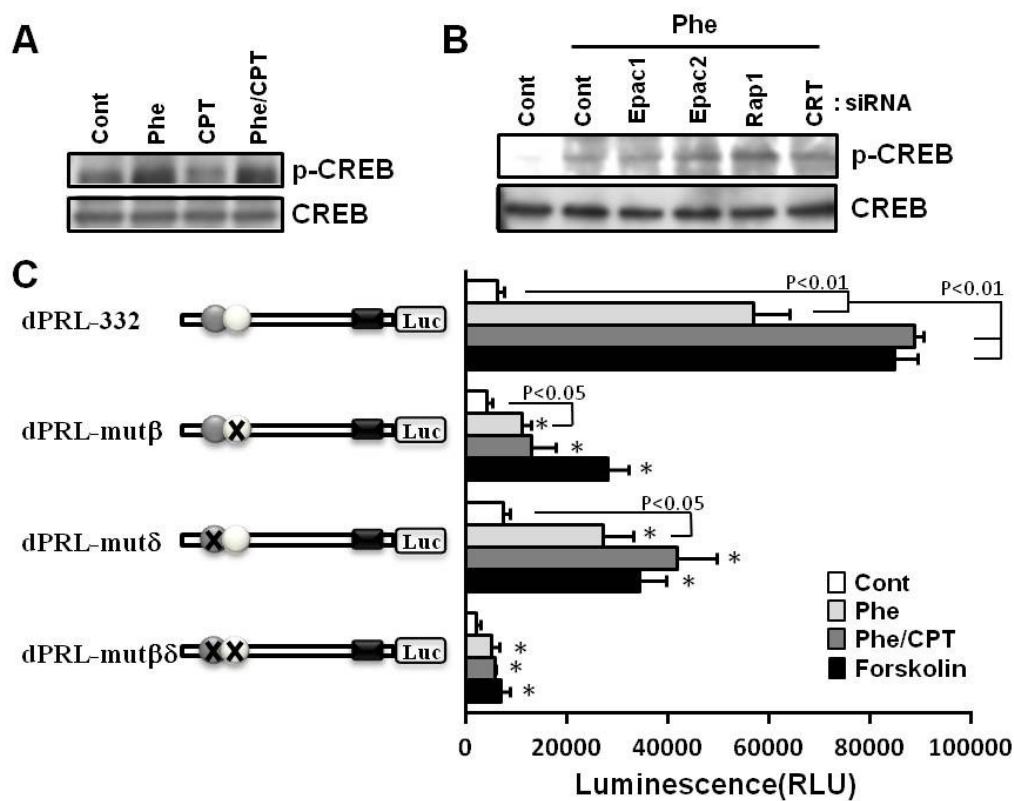


Figure 7. Epac-mediated C/EBP β promotes transcriptional activity of PRL

A. ESCs were treated for 30 min with Phe (200 μ M) and/or CPT (200 μ M). B. ESCs were treated with the non-targeting control (Cont), Epac1, Epac2, Rap1 or CRT siRNA for 24 h, and then treated with Phe (200 μ M). Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-p-CREB antibody. The same blot was stripped and re-probed with anti-CREB antibody. Data from two independent experiments are presented. C. ESCs were transfected with dPRL-332, -mut β , -mut δ or -mut $\beta\delta$ pNL vector (1 μ g) and then treated with Phe (200 μ M) and/or CPT (200 μ M) for 48 h and measured the luciferase activity. Data from four independent experiments are presented. Values represent mean \pm SEM. * p <0.01 vs. dPRL-332.

第3節 考察

ヒトにおいて Epac1 は様々な臓器でユビキタスに発現しており、Epac2 は、脳や心臓、膵臓、副腎などで発現している^{17,18)}。しかしながら、子宮における Epac の発現やその局在性については不明である。本研究では、Epac1、Epac2 が共に増殖期と分泌期の内膜の腺上皮細胞と間質細胞に発現していることを示した。また、分泌期では Epac1、Epac2 は子宮内膜細胞の核膜に存在していた。この生理的意義については更に検討が必要である。

ESCs では、卵巣ステロイドなどの刺激により、細胞内 cAMP 濃度が上昇し、PKA シグナル伝達経路の活性化が起こることによって脱落膜化するものと考えられている。しかし、cAMP シグナル仲介因子である Epac が脱落膜化に関与するの否かについては不明であった。本研究では、*in vitro* 脱落膜化モデルを用いて Epac 選択的 cAMP アナログ (CPT) と PKA 選択的 cAMP アナログ (Phe) の作用を検討した。ESCs 株及び初代培養 ESCs に Phe を処置し、PKA シグナルを活性化すると、脱落膜化マーカーである *IGFBP1*、*PRL* 及び *FOXO1* の mRNA 発現が上昇した。しかし、CPT を単独処置してもこれらの発現は変化しなかった。興味深いことに、Phe と CPT を共処置すると *IGFBP1* と *PRL* の mRNA 発現は、Phe 単独処置と比べてさらに上昇した。*FOXO1* の mRNA 発現は Phe 単独処置と比べて変化がなかった。さらに、Epac1、Epac2 をノックダウンすると cAMP アナログ処置後の *IGFBP1* と *PRL* mRNA 発現が減少したことから、Epac が、cAMP シグナルを介する *IGFBP1* と *PRL* の発現機構に関与していることが示唆された。Epac シグナルの下流因子として知られている Rap1 は、脱落膜化刺激 (Phe) を加えていない未分化の ESCs では CPT を処置しても活性化せず、Phe の処置により脱落膜化を進行させた時に CPT を処置することで活性化した。同様に Phe を処置して脱落膜化をある程度進行させた ESCs の Epac1 または、Epac2 発現をノックダウンすると、CPT 処置による Rap1 の活性化が抑制された。Rap1 の発現をノックダウンすると、Epac1、Epac2 のノックダウン時と同様に cAMP アナログ処置による *IGFBP1*、*PRL* の mRNA 発現が減少した。これらの結果は、ESCs においても Epac1 と Epac2 による Rap1 活性化機構が保持されていることを意味する。ヒト膵がん細胞では、Rap1 は PKA と Epac の両シグナルにより活性化されることが報告されている²⁹⁾。ラット甲状腺細胞株では、細胞接着や細胞骨格の調節因子であるラディキシンが PKA と Epac の足場タンパク質として複合体を形成し、Rap1 を活性化するという報告がある³⁰⁾。本研究は、ESCs においても Epac を介する Rap1 シグナルには、PKA 経路の活性化が必要であることを示した。

脱落膜化過程において P₄ の作用は cAMP/PKA シグナルを介していることが示されてきた。その機構として Matsuoka らは ESCs において P₄ が Wnt5a を介して cAMP シグナルを活性化させることを報告している³¹⁾。本研究において、CPT が卵巣ステロイド誘導性の *IGFBP1* や *PRL* mRNA 発現を促進したこと、Epac1、Epac2 及び Rap1

のノックダウンが卵巣ステロイド誘導性の *IGFBP1* と *PRL* mRNA 発現を抑制したことから、生理的な脱落膜化に *Epac* が関わるという仮説が強く示唆された。一方、*FOXO1* mRNA 発現は、*Epac2* ノックダウンでは減少したが、*Epac1*、*Rap1* のノックダウンでは変化しなかった。この違いについては不明であるが、*FOXO1* mRNA 発現は *Rap1* に依存しないこと、*Epac2* は *Rap1* に依存しない機能を有していることが考えられる。

Epac による *IGFBP1* と *PRL* の mRNA 発現促進作用メカニズムについては不明であるが、*Epac* 選択的 cAMP アナログ処置によりこれらの mRNA 発現量が増加したことから、*Epac* は転写レベルで *PRL* と *IGFBP1* の mRNA 発現を調節していることが考えられる。興味深いことに、*PRL* と *IGFBP1* の共通の転写因子として知られる C/EBP β ²⁷⁾は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞において *Epac* 選択的 cAMP アナログの処置により発現量が増加することが報告されている²⁸⁾。さらに、マウス樹状細胞において、*Epac* は C/EBP β をリン酸化し、IL23 subunit p19 のプロモーター活性を誘導する³²⁾。本研究において、*PRL* のプロモーター領域に存在する C/EBP β の結合配列を変異させると、CPT による Phe 誘導性 *PRL* 転写活性の増強が消失した。さらに、PKA シグナルの下流因子である CREB の活性化に CPT 処置や、*Epac* ノックダウンが影響しなかった。これらは、ESCs において *Epac* シグナルが PKA/CREB 経路に作用するのではなく、C/EBP β を介して *PRL* の発現を増加させることを示している。

さらに *Epac* 選択的 cAMP アナログが卵巣ステロイド誘導性の形態変化をさらに促進し、*Epac1*、*Epac2*、*Rap1* ノックダウンはこの形態変化を阻害することを明らかにした。この結果は *Epac* が *PRL* や *IGFBP1* の発現といった機能的分化だけではなく、形態的分化に関与していることを示している。また、*Epac1*、*Rap1* ノックダウンとは異なり、*Epac2* ノックダウン時のみ、脱落膜化刺激の有無に関わらず大きく扁平状の形態へと変化した。この結果は *Epac2* が *Rap1* に依存しない機能を持っている可能性を示唆する。

Petersen らは、マウス線維芽細胞の分化における PKA と *Epac* シグナルの協調的な役割について報告している³³⁾。すなわち、この細胞では、PKA シグナル経路と *Epac* シグナル経路をそれぞれ単独に活性化しても脂肪細胞へと分化しないが、PKA と *Epac* の両シグナル経路を同時に活性化することにより分化が進行する。このことは、cAMP シグナルを介する分化機構にこの2つのシグナルが必須であることを意味している。本研究においても、CPT 単独処置では脱落膜化マーカーの発現は変化せず、Phe と共処置すると発現が増強した。*Epac1*、*Epac2* 及び *Rap1* のノックダウンでは、Phe 単独処置による *IGFBP1* と *PRL* mRNA 発現も減少した。また、*Rap1* は脱落膜化した ESCs でのみ活性化した。これらのことから、cAMP を介した ESCs の脱落膜化過程において、*Epac/Rap1* シグナル伝達経路は PKA シグナル伝達経路と協調して機能的かつ形態的な脱落膜化を調節していることが示唆された。

第4節 小括

本章では、ヒト子宮内膜における Epac の発現と培養 ESCs の脱落膜化における Epac の関与について検討を行い、以下の新知見を得た (本研究結果は、*Placenta*, **34**, 212-221, 2013³⁴⁾並びに *Endocrinology*, **155**, 240-248, 2014³⁵⁾に報告した)。

- (1) 増殖期と分泌期の子宮内膜において、Epac1 は管腔上皮細胞、腺上皮細胞、間質細胞に発現している。また、Epac2 も同様に管腔上皮細胞、腺上皮細胞、間質細胞に局在している。
- (2) EtsTs 及び ESCs において、PKA 選択的 cAMP アナログ (Phe) の単独処置は、脱落膜化マーカーである *IGFBP1*、*PRL*、*FOXO1* の mRNA 発現を上昇させる。一方、Epac 選択的 cAMP アナログ (CPT) の単独処置は効果がないが、CPT と Phe を共処置すると、*IGFBP1*、*PRL* の mRNA 発現は Phe 単独処置群に比べ有意に上昇する。
- (3) ESCs において、Epac1、Epac2 または Rap1 をそれぞれノックダウンすると Phe 単独処置、Phe と CPT の共処置より誘起される *IGFBP1*、*PRL* の mRNA 発現が減少する。*FOXO1* の mRNA 発現は Epac2 ノックダウン時のみ減少する。
- (4) 未分化の ESCs では、CPT を処置しても Rap1 は活性化されないが、脱落膜化進行中の ESCs では CPT の処置により Rap1 が活性化する。また、Epac1 または Epac2 をノックダウンすると、この Rap1 の活性化は抑制される。
- (5) ESCs において、生理的な脱落膜化刺激となる卵巣ステロイドホルモン (P_4/E_2) の処置による *IGFBP1*、*PRL* の mRNA 発現は、CPT の共処置によりさらに上昇する。Epac1、Epac2、Rap1 ノックダウンは P_4/E_2 または CPT 共処置による *IGFBP1*、*PRL* mRNA 発現を抑制する。さらに、 P_4/E_2 による脱落膜細胞への形態的分化は CPT 共処置によりさらに促進する。この形態変化を Epac1、Epac2 並びに Rap1 ノックダウンは阻害する。
- (6) Epac シグナル経路は CREB のリン酸化には影響せず、C/EBP β を介して *PRL* 発現を促進する。

第2章 ヒト ESCs の脱落膜化に対する新規 Epac2 下流因子の同定と役割

第1章では、ヒト ESCs の脱落膜化には Epac1、Epac2 と、その下流因子である Rap1 が PKA を介した cAMP シグナルに協調的に機能していることを示唆した。また、Epac2 発現抑制は、Epac1 と Rap1 発現抑制とは異なり、脱落膜時に亢進する *FOXO1* の mRNA 発現を抑制すること、特徴的な細胞形態への変化を示した。このことから、Epac2 は Epac1 とは異なり、かつ、Rap1 を介さない作用を有することが推察された。そこで、本章では Epac2 により調節される下流因子の同定、さらに同定した因子と脱落膜化との関連をヒト ESCs の *in vitro* 脱落膜化モデルを用いて検討した。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ESCs の単離と培養

ヒト ESCs の単離及び培養は第1章、第1節、1-1 と同様の方法で行った。

1-2. siRNA 処置

第1章、第1節、1-4 と同様にヒト ESCs (3×10^4 個/well) に 30 pmol の Epac1、Epac2、Rap1 (各配列は第1章、第1節、1-4 と同様)、calreticulin (CRT) (5'-GCA GAC AAG CCA GGA UGC ACG CUU U-3', 5'-AAA GCG UGC AUC CUG GCU UGU CUG C-3', Invitrogen) 特異的 siRNA、また、対照群として非標的コントロール siRNA (Qiagen) を導入した。

1-3. 液体クロマトグラフィータンデムマスペクトロメトリー (LC-MS/MS) 解析

上記 1-2 の方法で Control または Epac2 siRNA を処置した細胞のライセート (20 µg タンパク質を含む) を SDS-PAGE にて分離した後、クマシーブリリアントブルー (CBB) にてゲル中のタンパク質を染色した。Epac2 ノックダウン細胞のライセートにおいて、約 50 kDa 付近にその存在量が少ないバンドが見られた。このバンドを切り出し、トリプシンで消化した後、LC-MS/MS にて解析し、Mascot search engine にてバンド内に含まれるタンパク質を同定した (Japan Bio services)。

1-4. ウェスタンブロット解析

第1章、第1節、1-5 と同様の方法でサンプルを調製した。1次抗体は、抗 Epac1 抗体、抗 Epac2 抗体または抗 Rap1 抗体、抗 GAPDH 抗体 (第1章、第1節、1-5 と同様)、抗 CRT 抗体 (1:2000、Cell Signaling Technology)、抗 p21 抗体 (1:2000、Cell Signaling Technology)、抗 p53 抗体 (1:2000、Cell Signaling Technology) を用いた。得られたバンドをデンシトメトリー解析により数値化し、目的のバンドの数値を、内部標準である GAPDH のバンドの数値で補正することにより、各サンプル間のタンパク質量の比

を求めた。

1-5.リアルタイム RT-PCR 解析

トータル RNA の抽出は ISOGEN (Nippon Gene) を用い、添付のプロトコールに従って行った。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、第 1 章、第 1 節、1-6 と同様の方法、条件にて解析した。また、*PRL*、*IGFBP1*、*GAPDH* は第 1 章、第 1 節、1-6 と同様のプライマーを用いた。CRT のプライマーの配列は以下に示す通りである

CRT	S	5'-GACCTCTGGCAGGTCAAGTC-3'
	AS	5'-TCAGCGTATGCCTCATCGT-3'

1-6. IGFBP1 の ELISA 解析

第 1 章、第 1 節、1-7 と同様に培養メディウム中の IGFBP1 タンパク質量は human IGFBP1 DuoSet kit (R&D Systems) の使用法に従ったサンドイッチ ELISA 法にて定量した。

1-7. 増殖アッセイ

第 1 章、第 1 節、1-8 と同様に ESCs に CRT siRNA を 24 時間処置した。さらに 24 時間培養した後、WST-8 (Dojinndo) を加え 37 °C で 20 分間培養した。マイクロプレートリーダー (TECAN、Wako) にて培養液の吸光波長 450 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度から、細胞の生存率を相対値で表した。

1-8. 老化関連βガラクトシダーゼ (SA-β-Gal) 染色

1-2 の方法で Control、Epac2 または CRT siRNA を処置した ESCs に 4 % パラホルムアルデヒドを 10 分間加えて固定した後、PBS で 2 回洗浄を行った。SA-β-Gal 染色液 (PBS (pH 6.0)、5 mM フェロシアン化カリウム、5 mM フェリシアン化カリウム、1 mM MgCl₂、1 mg/ml X-gal) にて一晩 37 °C でインキュベーションした。その後、水にて洗浄した。

1-9. 統計処理

ウエスタンブロット、リアルタイム RT-PCR、ELISA の結果は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には、Tukey-Kramer 多重比較を行い、危険率 5 % (p < 0.05) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. Epac2 下流因子の同定

Epac2 の標的因子を同定するために、Control または Epac2 siRNA を処置したサンプルを SDS-PAGE で分離した後、CBB で全タンパク質を染色したところ、50 kDa 付近に Control 群と比べ、Epac2 ノックダウン群で発現が減少するバンドを確認した。このバンドを LC-MS/MS 法にて解析した結果、候補として 12 個の因子を確認した (Table. 1)。これら候補のうち Calreticulin (CRT) はヒト子宮内膜に発現していることが報告されているが³⁶⁾、子宮機能との関連は不明である。そこで、まず Epac2 ノックダウンにより CRT が減少するのかイムノブロットにて再確認した。Epac2 ノックダウンは CRT タンパク質、mRNA 発現共に減少させた (Fig. 8 A, C)。しかしながら、Epac1 と Rap1 の発現抑制は CRT 発現に影響を与えなかった (Fig. 8 B)。また、cAMP アナログも CRT 発現に影響を与えなかった (Fig. 8 A-C)。これらの結果から、CRT の発現が Epac2 により調節されることが示唆された。

	Protein name	Gene ID	MW	Mascot Score*	Accession No.
1	Vimentin	VIM	54	538	P08670
2	Tubulin beta-2C chain	TUBB2C	50	348	P68371
3	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	50	323	P68363
4	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	50	302	Q71U36
5	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	57	253	P30101
6	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	56	244	P43490
7	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	57	242	P78371
8	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	58	234	P14618
9	Calreticulin	CALR	48	213	P27797
10	Annexin A11	ANXA11	54	194	P50995
11	Polymerase I and transcript release factor	PTRF	43	158	Q6NZI2
12	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	60	124	P25705

*The score was obtained from LC-MS/MS based on dateabase search with MASCOT server

Table 1. The candidates of Epac2 downstream factors identified by proteomic analysis

2-2. 脱落膜マーカー発現に対するカルレティキュリン (CRT) 発現抑制の効果

Epac2 下流因子として同定した CRT の脱落膜化における役割を調べるために、脱落膜マーカーである *PRL*、*IGFBP1* の mRNA 発現に対する CRT 発現抑制の効果について検討した。CRT 特異的 siRNA の処置により内因性の CRT タンパク質量が減少することを確認した (Fig. 9 A)。なお、CRT ノックダウンは Epac1、Rap1 発現には影響を与えなかった。Phe または Phe/CPT 処置による *PRL* と *IGFBP1* の mRNA 発現上昇は、CRT ノックダウンにより有意に抑制された (Fig. 9 B, C)。さらに、IGFBP1 分泌も同様に CRT ノックダウンにより抑制された (Fig. 9 D)。なお、CRT ノックダウンは ESCs の生存率に影響を及ぼさなかった (Fig. 9 E)。

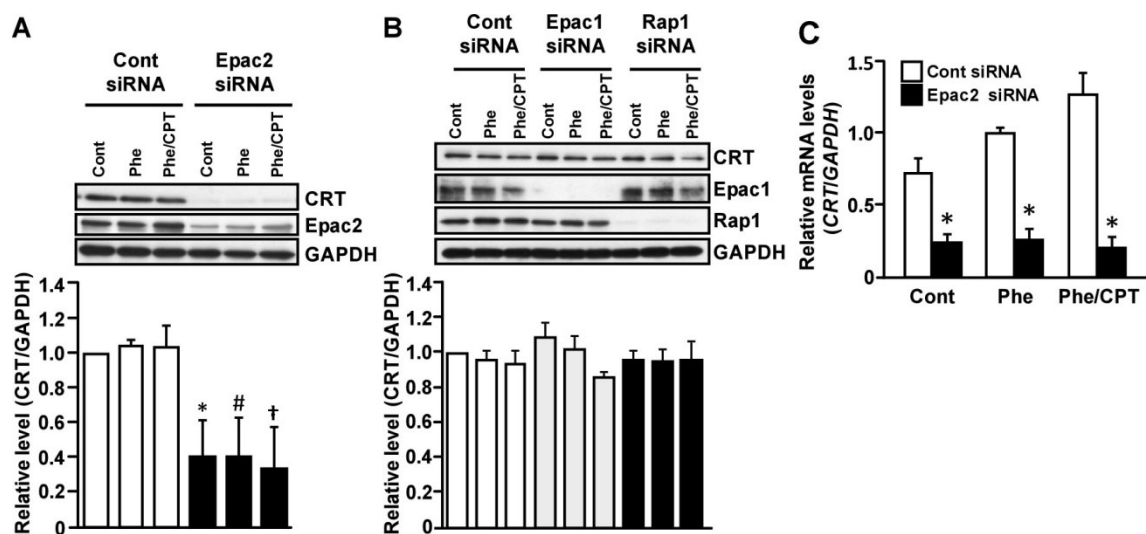


Figure 8. CRT expression is down-regulated by knock-down of Epac2, but not Epac1 or Rap1

ESCs were treated for 24 h with non-targeting control (Cont), Epac1, Epac2 or Rap1 siRNA, and cultured in fresh medium for an additional 24 h. ESCs were then treated with Phe (200 μ M) or a combination of CPT (200 μ M) and Phe for 48 h. A, B. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-CRT or Epac2 antibody. The same blot was stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control. The upper panels in each figure show representative immunoblots. The lower graphs show the relative levels of CRT normalized to GAPDH levels from three independent experiments. C. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine *CRT* mRNA levels. *GAPDH* was used as an internal control. The data from four independent experiments are presented. * $p < 0.01$ vs. Cont.

2-3. 卵巣ステロイド誘導性の脱落膜化に対する CRT 発現抑制の効果

cAMP アナログによる脱落膜マーカーの発現上昇を CRT ノックダウンは抑制したことから、生理的な脱落膜化誘導因子である P_4 と E_2 による脱落膜化と CRT との関係について検討した。 E_2 単独処置は *PRL* と *IGFBP1* の mRNA 発現に影響を与えなかったが、 P_4/E_2 または $P_4/E_2/CPT$ 処置はこれらの発現を増加した。 P_4/E_2 または $P_4/E_2/CPT$ 処置によるこれらの発現誘導は、CRT ノックダウンにより有意に抑制された (Fig. 10 A, B)。また、*IGFBP1* 分泌も同様に CRT ノックダウンにより抑制された (Fig. 10 C)。さらに、脱落膜細胞への形態変化に対する CRT 発現抑制の効果について検討を行った。 P_4/E_2 処置により線維芽細胞様の形態から敷石状の脱落膜細胞へと形態変化し (Fig. 10 D-c)、CPT を共処置するとこの形態変化がさらに促進した (Fig. 10 D-d)。CRT ノックダウンはこれら形態変化を阻害した (Fig. 10 D-g, h)。

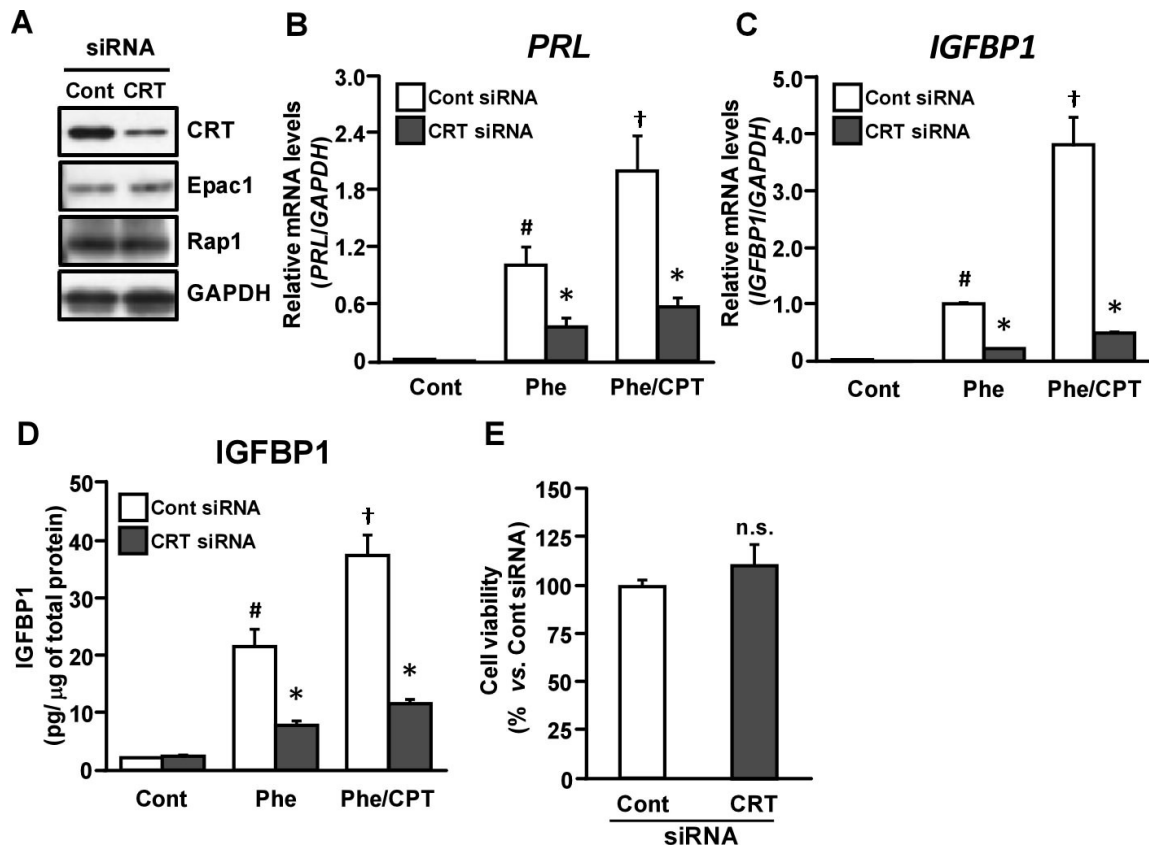


Figure 9. CRT knock-down inhibits the expression of decidual markers

ESCs were treated for 24 h with non-targeting control (Cont) or CRT siRNA and cultured for an additional 24 h. ESCs were then treated with Phe (200 μ M) or a combination of CPT (200 μ M) and Phe for 48 h. A. The expression of CRT, Epac1, or Rap1 was determined using immunoblotting. The same blot was stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control. B, C. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine *PRL* (B) and *IGFBP1* (C) mRNA levels. *GAPDH* was used as an internal control. D. IGFBP1 protein levels in the culture media were determined by ELISA. The amount of IGFBP1 in the media was normalized to the amount of total cellular protein. The data from four independent experiments are presented. * $p < 0.01$ vs. Cont, # $p < 0.01$ vs. Cont, † $p < 0.01$ vs. Phe. E. Cell viability was evaluated using the WST-8 assay. ESCs were treated with control or CRT siRNA for 24 h and cultured for an additional 24 h. The data from three independent experiments are expressed relative to control levels. Values represent the mean \pm SEM. n.s., not significant.

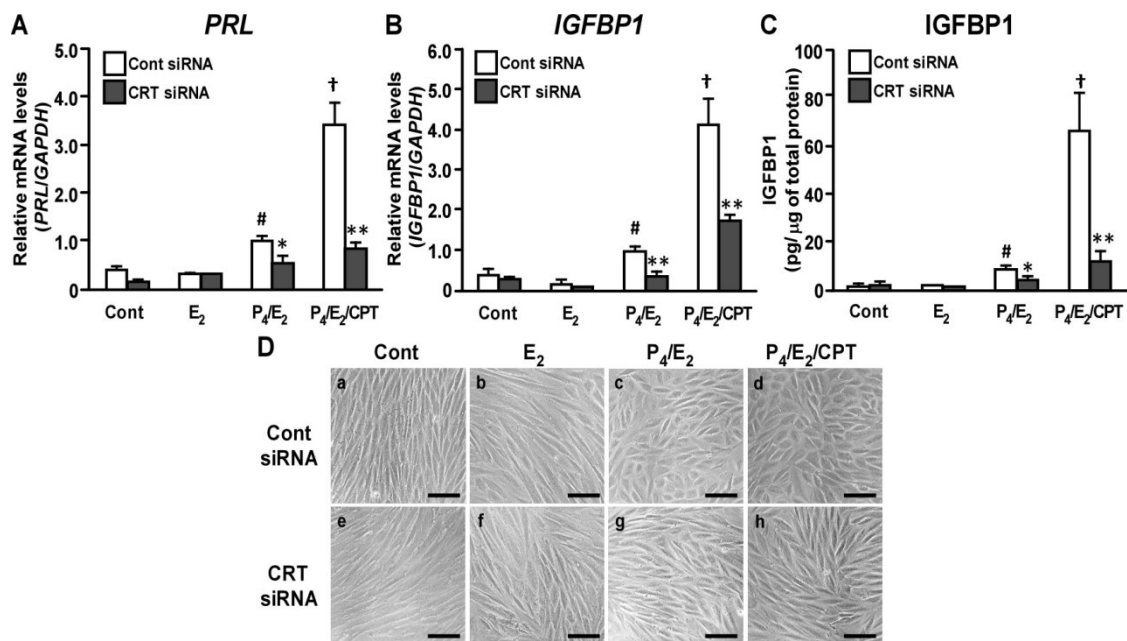


Figure 10. CRT knock-down inhibits ovarian steroid-induced decidualization of ESCs

ESCs were treated for 24 h with non-targeting control (Cont) or CRT siRNA, and then treated with ovarian steroids, progesterone (P₄, 1 μM) and estradiol (E₂, 10 nM), or a combination of ovarian steroids and CPT (200 μM) for 8 days. Culture medium was replaced with fresh medium on alternate days. A, B. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine *PRL* (A) and *IGFBP1* (B) mRNA levels. *GAPDH* was used as an internal control. C. IGFBP1 protein levels in the culture medium were determined by ELISA. The amount of IGFBP1 in the media was normalized to the amount of total cell protein. The data from four independent experiments are presented as the ratios of P₄/E₂, and are the mean ± SEM. #p<0.01 vs. Cont, †p<0.05, ††p<0.01 vs. P₄/E₂, *p<0.01 vs. Cont. D. Representative image of ESCs transfected with siRNA and treated with E₂, P₄/E₂, or P₄/E₂/CPT for 8 days. Scale bars = 100 μm.

2-4. ESCs の老化に対する Epac2、CRT 発現抑制の効果

Epac2 の発現を抑制した ESCs は、老化細胞に類似した大きく扁平状の形態を示した (Fig. 6 J-g, h, i)。また、CRT 欠損マウスの線維芽細胞は細胞老化が起こることが報告されている³⁷⁾。そこで、ESCs において Epac2 または CRT ノックダウンと細胞老化との関係について調べた。細胞老化マーカーである senescence-associated β galactosidase (SA-β-Gal) 活性に対する Epac2 と CRT ノックダウンの効果について検討したところ、対照群 (Control siRNA) と比べて、Epac2 や CRT ノックダウン群では SA-β-Gal 活性を示す緑色に染色された細胞が多く見られた (Fig. 11 A, B)。さらに、子宮特異的 p53 ノックアウトマウスは、脱落膜において SA-β-Gal 活性と p21 発現が上昇しており、細胞老化が起こることが知られている⁹⁾。そこで、これら老化関連因子である p21 と p53 の発現を調べたところ、Epac2 や CRT ノックダウンは p21 発現を上昇させ、p53 発現を減少させた (Fig. 11 C, D)。

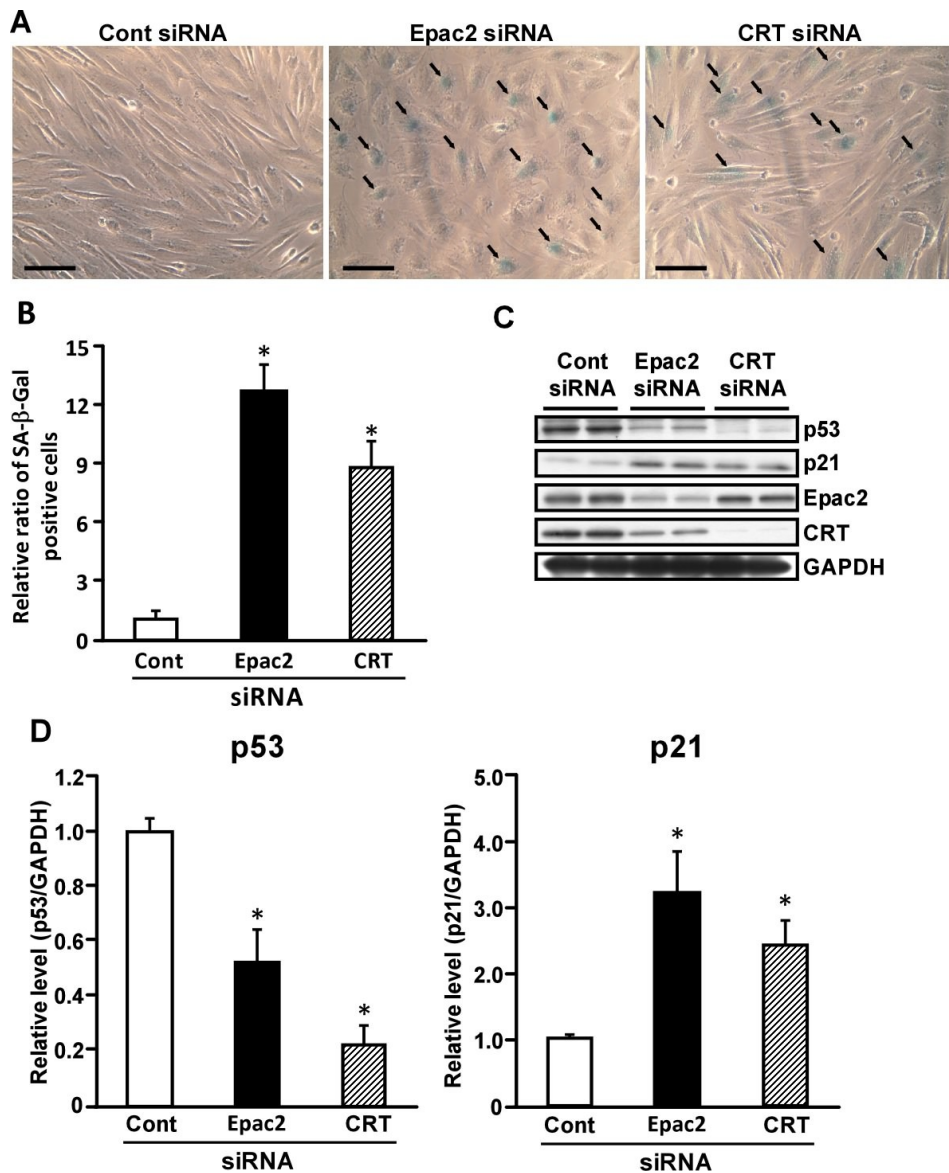


Figure 11. Knock-down of Epac2 or CRT in ESCs is associated with senescence

ESCs were treated for 24 h with non-targeting control (Cont), Epac2 or CRT siRNA, and then cultured for 72 h. A, B. ESCs were stained with SA-β-Gal (A). Scale bars = 100 μm. The graph shows the relative levels of SA-β-Gal positive cells. The data from three independent experiments are presented as ratios and show the mean ± SEM (B). * $p < 0.01$ vs. Cont. C, D. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-p53, p21, CRT or Epac2 antibody. The same blot was stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control (C). The graphs show the relative levels of p53 or p21 normalized to GAPDH levels (D). The data (mean ± SEM) from three independent experiments are presented as ratios. * $p < 0.01$ vs. Cont.

第3節 考察

本研究では、ESCsにおいて脱落膜化に重要な Epac2 の発現を抑制した際に著しく発現が低下するタンパク質として CRT を同定した。CRT は、小胞体シャペロンタンパク質として知られているが、タンパク質のフォールディング調節だけでなく、細胞内のカルシウムレベルの調節、細胞接着、アポトーシス、免疫反応、創傷治癒調節などその機能は多岐にわたる³⁸⁻⁴²⁾。ESCsにおける CRT の発現は、Epac1 や Rap1 をノックダウンしても変化せず、また、PKA 選択的 cAMP アナログや Epac 選択的 cAMP アナログを ESCs に処置しても変化しなかった。これは、CRT の発現が Epac または PKA を介した cAMP シグナル経路の活性化の有無に関わらず、Epac2 によって調節されていることを示している。さらに、Epac2 ノックダウンは CRT mRNA 発現も抑制したことから、Epac2 は転写レベルで CRT の発現を調節していると考えられる。CRT 遺伝子のプロモーター領域には endoplasmic reticulum (ER) stress response elements (ESRE) があり ER ストレスに応答して発現が上昇する⁴³⁾。ヒト肝がん細胞において、FOXO1 が 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78) の発現上昇を介して ER ストレスを誘起することが報告されている⁴⁴⁾。ER ストレスは activating transcription factor 6 (ATF6) や X-box binding protein 1 (XBP1) の発現を上昇させることが知られており、ESRE に結合し、転写を促進する^{45,46)}。前章での FOXO1 の mRNA 発現は Epac2 ノックダウンによって減少するが、Epac1 や Rap1 ノックダウンでは変化しない結果から Epac2 が FOXO1 を介して CRT の発現を調節している可能性が考えられる。

増殖期と分泌期ヒト子宮内膜組織では、CRT は間質、腺細胞に発現している³⁶⁾。また、オナガザル (ボンネットモンキー) では、CRT 発現が着床部位の子宮で高いことや⁴⁷⁾、マウスでは着床周辺部位で発現が上昇し、CRT のアンチセンス DNA を子宮内に投与すると着床が阻害されることが報告されている⁴⁸⁾。ホメオボックス遺伝子である Hoxa10 は、子宮内膜の発達や胞胚受容能に関する転写因子である⁴⁹⁾。Hoxa10 欠損マウスは着床と脱落膜化が阻害されて不妊となるが、興味深いことに、Hoxa10 欠損マウスの子宮内膜間質細胞において CRT 発現が減少していることが明らかとなっている⁴⁹⁾。これらの知見は CRT が着床に重要であることを示しているが、CRT の脱落膜化における役割と Epac2 との関連については報告がない。そこで、さらに培養ヒト ESCs の脱落膜化における CRT ノックダウンの効果を調べた。CRT のノックダウンは Phe や Phe/CPT により誘導される PRL、IGFBP-1 mRNA 発現だけでなく、卵巣ステロイドより誘導される PRL と IGFBP-1 mRNA 発現と形態変化を抑制した。これらの結果は、ヒト ESCs において Epac2 により調節される CRT 発現が機能的かつ形態的な脱落膜化に重要であることを示唆している。

CRT は、小胞体の Ca^{2+} の貯蔵と放出を調節するため、脱落膜化過程において細胞内 Ca^{2+} 恒常性の維持に関与していることが考えられる。 Ca^{2+} は脱落膜化の調節に重要であるとされており、ヒト ESCs において、nonvoltage-gated Ca^{2+} entry channel である

TRPC1 は脱落膜化過程で増加し、Ca²⁺流入を介して PRL、IGFBP-1 及び FOXO1 発現を調節することが報告されている⁵⁰⁾。本研究においても、CRT ノックダウンにより ESCs 内の Ca²⁺の恒常性が破綻し、脱落膜化を阻害している可能性も考えられる。

さらに Epac2 または CRT のノックダウンが SA-β-Gal 活性と p21 発現を上昇し、p53 発現を減少させることを見出した。これらの結果は、Epac2 と CRT が細胞老化に関与していることを推察させる。老化マウスでは p53 の活性が減少する⁵¹⁾。また、子宮特異的な p53 欠損 (KO) マウスの脱落膜では SA-β-Gal 活性と p21 発現が上昇し、脱落膜化の阻害と早産が起こる⁹⁾。さらに、p53 KO マウスと p21 KO マウスの交配により p53 KO マウスで上昇する p21 発現をノックアウトすると、脱落膜組織の細胞老化と早産は回復する⁵²⁾。即ち、脱落膜の老化は脱落膜化の不全を引き起こすことを意味している。これらの知見は、Epac2 または CRT ノックダウンにより p53 発現は減少し、一方、p21 発現は上昇することを示した我々の結果と一致している。CRT KO マウス線維芽細胞では p53 のユビキチン化に関与する Mdm2 が誘導されることにより、p53 の発現が低下することや、ヘテロまたはホモ CRT 欠損マウスの胚では p53 発現が減少することが報告されている⁵³⁾。CRT は GC-rich の mRNA 配列に結合する RNA 結合タンパク質として知られており、p21 mRNA の 5'領域に結合し、翻訳を阻害する³⁷⁾。それ故、CRT KO マウス線維芽細胞では p21 が増加し、細胞が老化することが明らかになっている。

本研究では脱落膜化に重要である Epac2 により発現が調節される因子として CRT を同定し、ヒト ESCs の機能的かつ形態的な脱落膜細胞への分化に Epac2 を介した CRT 発現が必須であることを初めて明らかにした。また、Epac2 と CRT が ESCs の細胞老化を抑制していることが推察される。

第4節 小括

本章では、ESCs における Epac2 の下流因子を同定し、脱落膜化への関与について培養 ESCs を用いて検討を行い、以下の新知見を得た (本研究結果は、*Endocrinology*, **155**, 240-248, 2014³⁵)に報告した)。

- (1) ESCs において、Epac2 の発現抑制時に発現量が低下する因子として Calreticulin (CRT) を新たに同定した。しかしながら、PKA または Epac シグナルの活性化は構成的な CRT 発現量には影響を与えない。なお、Epac1、Rap1 の発現抑制は CRT 発現に影響を与えない。
- (2) ESCs において、PKA 選択的 cAMP アナログ (Phe) 単独または Epac 選択的 cAMP アナログ (CPT) との共処置による *PRL*、*IGFBP1* mRNA 発現及び IGFBP1 分泌は CRT ノックダウンにより抑制される。
- (3) ESCs において、生理的な脱落膜化刺激である卵巣ステロイドホルモン (P_4/E_2) または CPT との共処置による *IGFBP1* と *PRL* の mRNA 発現および IGFBP1 分泌は CRT ノックダウンにより抑制される。さらに、 P_4/E_2 または CPT との共処置による脱落膜細胞への形態的分化は CRT ノックダウンにより阻害される。
- (4) Epac2 または CRT 発現抑制は、老化マーカーである SA- β -Gal 活性と p21 発現を増加させ、p53 発現を減少させる。

第3章 早期妊娠ラットの子宮内における Epac の発現と役割

ラットはヒトと同じく胎盤を形成する哺乳類であり、脱落膜を形成する共通点を有しているが、脱落膜形成機構は異なり、ヒトでは着床の有無に関わらず月経周期内において脱落膜が形成されるのに対して、ラットは発情周期内において脱落膜化が誘起されず、胚の着床など物理的な刺激により脱落膜が形成される^{1,2)}。しかしながら、どちらも卵巣ステロイドにより調節される点や、ヒト子宮で発現している着床調節因子がラットにおいても多く保存されていることから、ラットは妊娠制御メカニズムを研究するモデル動物として汎用されている。第1章、第2章から、ヒト ESCs において Epac とその下流因子が脱落膜化に重要であることを明らかにした。そこで、本章では、ラットの着床周辺期における Epac と下流因子の発現を調べるとともに、*in vitro* 脱落膜化モデルも用いて Epac シグナルの着床周辺期における役割について解析した。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. 妊娠動物の作成

動物は動物繁殖研究所より供給された 8 週齢の Wister-今道系雌性成熟ラット及び 10 週齢の同系雄性ラットを用いた。動物は 1 日 12 時間の定時照明下、恒温 (24 °C)、恒湿 (55±5 %) で飼育し、飼料と水は自由に与えた。本実験計画は、本学動物実験委員会の承認の下実施された (審査番号 P13-64, P13-67)。雌性ラットの発情周期を膣垢像により確認し、発情前期に雄性ラットを同居させ、その翌日の膣垢像中の精子の存在をもって妊娠を確認した。また、その日を妊娠 1 日目 (Day 1) とした。なお、妊娠 7 日目以降の摘出子宮は、着床部位と着床部位間に分けた。

1-2. 子宮組織切片の調製及び免疫染色

摘出した子宮は直ちに 4 % パラホルムアルデヒドに約 10 時間浸し、固定した後、第1章、第1節、1-2 と同様に脱水処理を行い、パラフィン包埋ブロックを作成した。パラフィン包埋切片は第1章、第1節、1-2 と同様の方法で抗 Epac1 抗体 (#ab21235、6.7 µg/ml、Abcam)、抗 Epac2 抗体 (clone H-220、2 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology)、抗 Rap1 抗体 (sc-65、2 µg/ml、Santa Cruz Biotechnology)、抗 CRT 抗体 (2891、1:100、Cell Signaling Technology)、抗 cyclin D3 抗体 (DCS-22、30 µg/ml、Sigma-Aldrich)、抗 p-CREB 抗体 (87G3、1:100、Cell Signaling Technology) を用いて染色した。

1-3. ウェスタンブロット解析

摘出した子宮は、細胞溶解液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM EDTA、150 mM NaCl、0.1 % Tween-20、5 µg/ml アプロチニン、5 µg/mg ロイペプチン、0.1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、0.1 % 2-メルカプトエタノール) でホモジナイズ後、不溶性

組織を除去するため、遠心分離 (1,3000 rpm、15 分、4°C) した。その上清をサンプルとし、Bradford 法に基づいた定量試薬を用いて各サンプルのタンパク質濃度を測定した。ウエスタンブロット解析は第 1 章、第 1 節、1-5 と同様の操作を行った。1 次抗体には抗 Epac1 抗体 (0.3 µg/ml)、抗 Epac2 抗体 (0.1 µg/ml)、抗 Rap1 抗体 (0.1 µg/ml)、抗 CRT 抗体 (1:200)を用いた。これらのバンドを確認後、ストリッピング液を用いて脱抗体を行い、内部標準としてβ-actin 量を確認するために、抗β-actin 抗体 (1:5000、Sigma-Aldrich) で再度ウエスタンブロットを行った。得たバンドをデンシトメトリーにより数値化し、目的バンド値を、β-actin 値で補正することにより、各サンプル間のタンパク質量の比を求めた。

1-4. 着床遅延モデルの作成

交配後、妊娠 4 日目に卵巣切除術 (OVX) を行い、P₄ と E₂ の影響を抑制し、その後、P₄ を連日投与すると、受精卵は着床せずに子宮管腔内に浮遊したままとなる (着床遅延)。そこに E₂ を投与すると着床が誘起される。そこで妊娠 4 日目に OVX を行い、妊娠 4 日目から 10 日目まで P₄ (3 mg/rat) を連日皮下投与することにより、着床遅延を誘起させた。また、妊娠 8 日目に E₂ (500 ng/rat) を投与して、着床を誘起した。OVX 後に卵巣ステロイドを処置しない群 (OVX)、OVX 後に P₄ を妊娠 4 日目から 10 日目まで投与した群 (P₄)、OVX 後 P₄ を 6 日間投与に加え、妊娠 8 日目に E₂ を投与して着床を誘起した群 (P₄/E₂) の子宮を妊娠 10 日目に摘出し、免疫染色またはウエスタンブロット解析を行った。

1-5. 非妊娠ラットへの卵巣ステロイド投与

非妊娠ラットにて OVX を行い、術後 2 週間目から P₄ (3 mg/rat) を 3 日間連日投与し、E₂ (500 ng/rat) を単回投与した。また、3 日間の P₄ 連日投与群と E₂ 単回投与群も設けた。投与 3 日目から 24 時間後に子宮を摘出し、ウエスタンブロットで解析した。

1-6. 人為的脱落膜化誘導モデル

発情前期の雌性ラットと精管結紮した雄性ラットを交配させ、偽妊娠を誘起した。子宮にゴマ油等を注入することにより人為的に脱落膜化を誘起させることができる。偽妊娠 5 日目に片子宮角にゴマ油 (100 µl) を子宮管腔内に注入した。もう片方の子宮角は何も処置しないコントロールとした。ゴマ油を注入してから 48 時間後に子宮を摘出し、免疫染色、ウエスタンブロット解析を行った。

1-7. ESCs の単離と培養

非妊娠ラットから子宮を摘出した後、子宮管腔から切開し、2 mm 程度の大きさに細かく切断した。この子宮片を 100 µg/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、200 µg/ml ネオマイシン、0.5 µg/ml アムホテシリン B を含む Ca²⁺/Mg²⁺フリー

Hank's balanced salt solution (HBSS) 培養液で洗浄し、6 mg/ml ディスパーゼと 25 mg/ml パンクレアチン含有 HBSS 液に浸して 4 °C で 1 時間、室温で 1 時間、さらに 37 °C で 10 分間消化した。この操作により上皮細胞を剥離し、除去した。残った子宮組織片を、37 °C で 0.5 mg/ml タイプ I コラゲナーゼ溶液に 30 分間浸し、消化した。この消化液を 70 μm のふるいに通し、ESCs を単離した。ESCs は 50 μg/ml ペニシリン、50 μg/ml ストレプトマイシン、100 μg/ml ネオマイシン、0.5 μg/ml アムホテシリン B を含む DMEM/F12 培養液にて培養した。なお、単離した細胞は、ビメンチン染色陽性、サイトケラチン染色陰性の ESCs であることを確認している。*In vitro* 脱落膜化は、100 nM medroxyprogesterone acetate (MPA) と 0.5 mM dibutylyl cyclic AMP (db-cAMP) の共処置 48 時間により誘導した。また、0.2 mM Phe と 0.2 mM CPT の単独または共処置 48 時間後、解析を行った。

1-8. リアルタイム RT-PCR 解析

トータル RNA の抽出は ISOGEN (Nippon Gene) を用い、添付のプロトコールに従って行った。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、第 1 章、第 1 節、1-6 と同様の方法、条件で解析した。使用したプライマーの配列は以下に示す通りである。

<i>PRL</i>	S	5'-CATGCTTTCTCACTACATCCAT-3'
	AS	5'-CTTCAGGAGTAGCTAGGGAAGA-3'
<i>DTPRP</i>	S	5'-ATCCAGCGAGCTGAAGTCAT-3'
	AS	5'-ATGCCTATACATGCGTGCAA-3'
<i>GAPDH</i>	S	5'-AAAGCTGTGGCGTGATGG-3'
	AS	5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'

1-9. siRNA 処置

ラット ESCs (3×10^4 個/well) に第 1 章、第 1 節、1-4 と同様の方法で 30 pmol の Epac1 (5'-AUU GAG AUU CUU CUG CUC CUU GAG G-3', 5'-CCU CAA GGA GCA GAA GAA UCU CAA U-3', Invitrogen)、Epac2 (5'-UGU UCU UUA AGU CUG ACU GUA UUC G-3', 5'-CGA AUA CAG UCA GAC UUA AAG AAC A-3', Invitrogen)、Rap1 (5'-CUG CAA AGU CAA AGA UCA A-3', Santa Cruz Biotechnology)、CRT (5'-GGA UAA AGG GUU GCA GAC AAG CCA A-3', 5'-UUG GCU UGU CUG CAA CCC UUU AUC C-3', Invitrogen) 特異的 siRNA、また、非標的コントロール siRNA (Qiagen) を導入した。

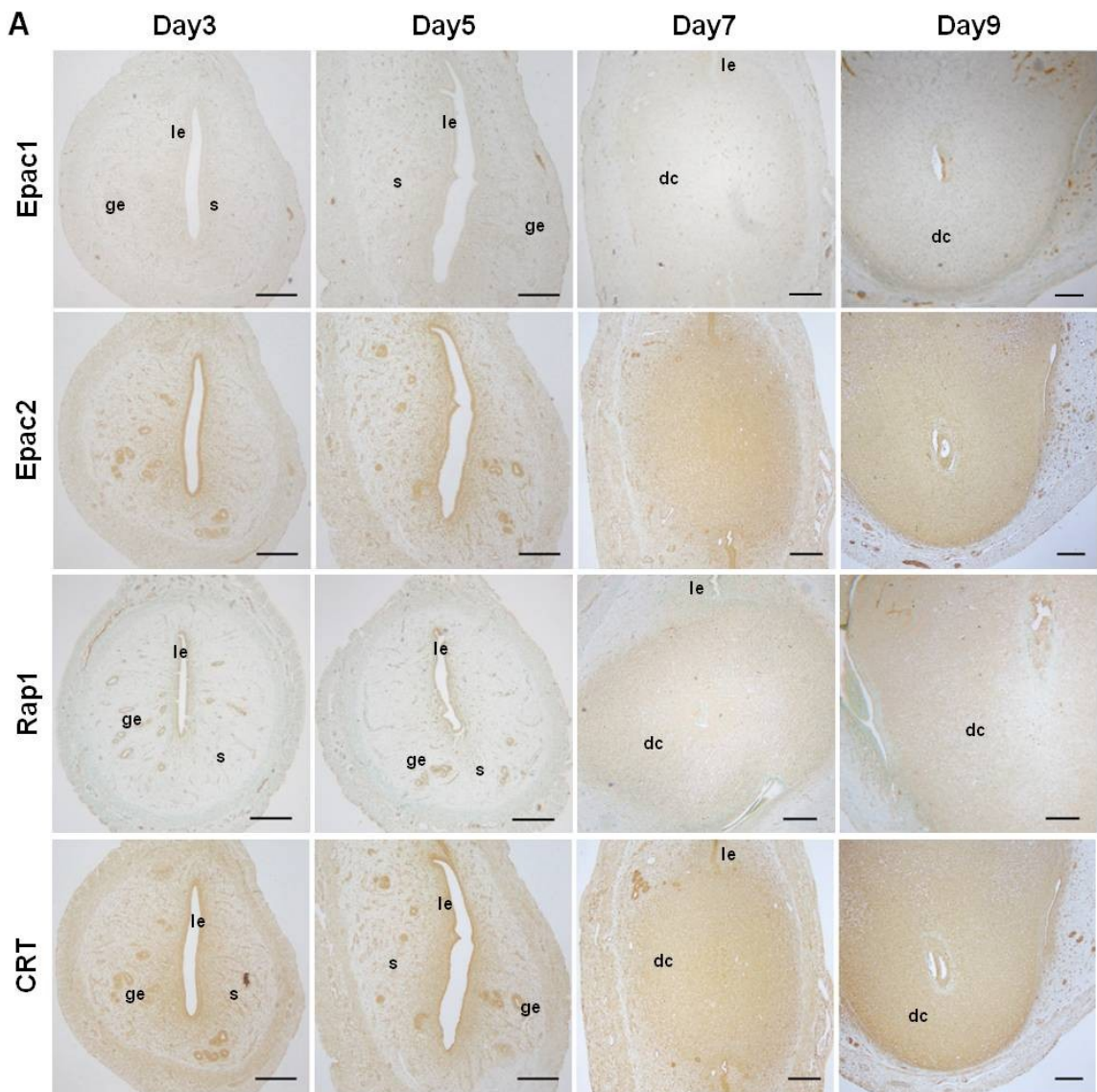
1-10. 統計処理

ウエスタンブロット、リアルタイム RT-PCR の結果は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には、Tukey-Kramer 多重比較を行い、危険率 5 % ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. 着床周辺期の子宮における Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現

着床前である妊娠3、5日目と着床後の妊娠7、9日目のラット子宮における Epac1 と Epac2、そして、第1、2章において Epac 下流因子として同定した Rap1 と CRT 発現を免疫染色とウエスタンブロット解析で調べた。Epac1 は、妊娠3、5日目において腺上皮、管腔上皮細胞でわずかに発現しており、7、9日目では脱落膜細胞で発現がみられた (Fig. 12 A)。Epac2 は、妊娠3、5日目では腺上皮、管腔上皮で発現がみられた。7、9日目では脱落膜細胞で強い染色がみられた。Rap1、CRT 共に、Epac2 と同様に、着床前では腺上皮、管腔上皮で発現がみられ、着床後は脱落膜細胞で強い染色がみられた。さらに、Fig. 12 B に示したように、子宮内の Epac1 発現量は妊娠7日目で発現が増加し、Epac2、Rap1、CRT は7、9日目で発現が上昇することが明らかとなった。



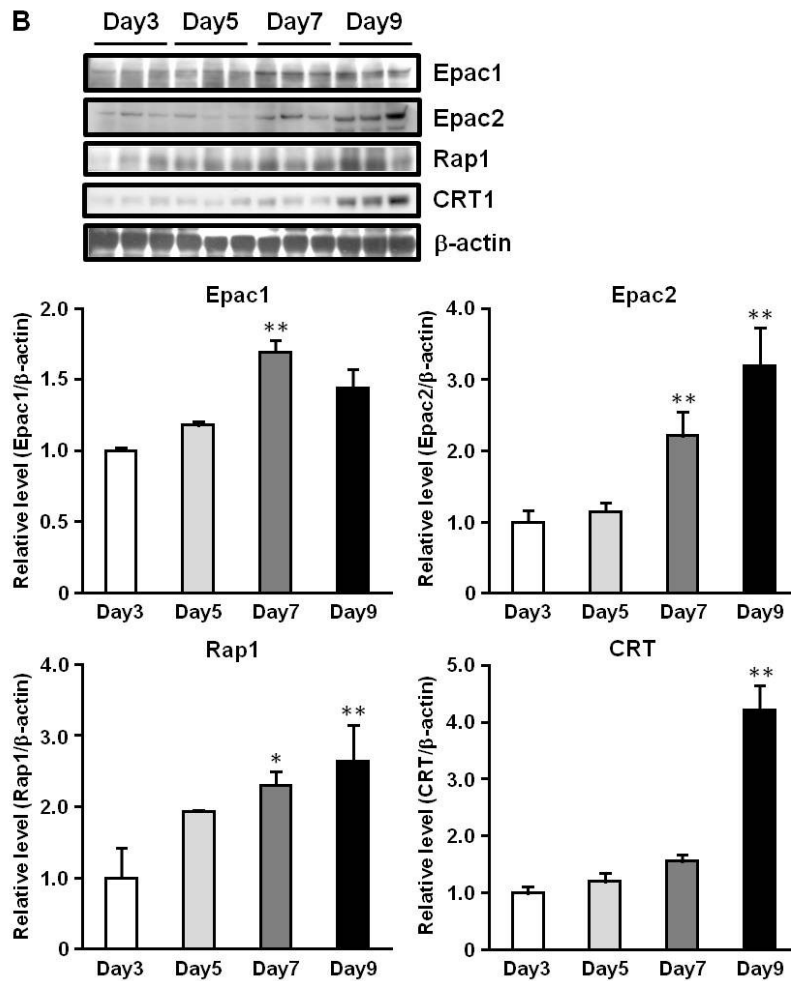


Figure 12. Epac1, Epac2, Rap1 and CRT expressions are increased in decidual cells of rat uterus

A. Immunostaining of Epac1, Epac2, Rap1 and CRT was performed using uterine cross sections of days 3, 5, 7 and 9 of pregnancy. The sections were counterstained with methyl green. le: luminal epithelial cells, ge: glandular epithelial cells, s: stromal cells, dc: decidual cells. Scale bars = 250 μ m. B. Uterine samples (30 μ g protein) were subjected to immunoblot analysis using an anti-Epac1, Epac2, Rap1, CRT or β -actin antibody. The graphs show the relative levels of Epac1, Epac2, Rap1 and CRT normalized to β -actin levels from three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. Day3.

2-2. 着床遅延子宮内における着床前後の Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現

ラット子宮内における Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現の上昇は、胚の着床と脱落膜化によるものか着床遅延モデルを用いて検討した。OVX 対照群 (Control) と OVX ラットに P_4 を投与した群 (P_4) の子宮内における Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT は腺上皮と管腔上皮細胞にて発現がみられた (Fig. 13)。しかしながら、 P_4 投与動物に E_2 を投与して着床を誘起した群 (P_4/E_2) では脱落膜細胞で強い発現がみられた (Fig. 13)。なお、脱落膜細胞で発現が亢進する cyclin D3⁵⁴ を免疫組織染色により調べ、 E_2 と P_4 の処置による脱落膜化の誘導を確認した。

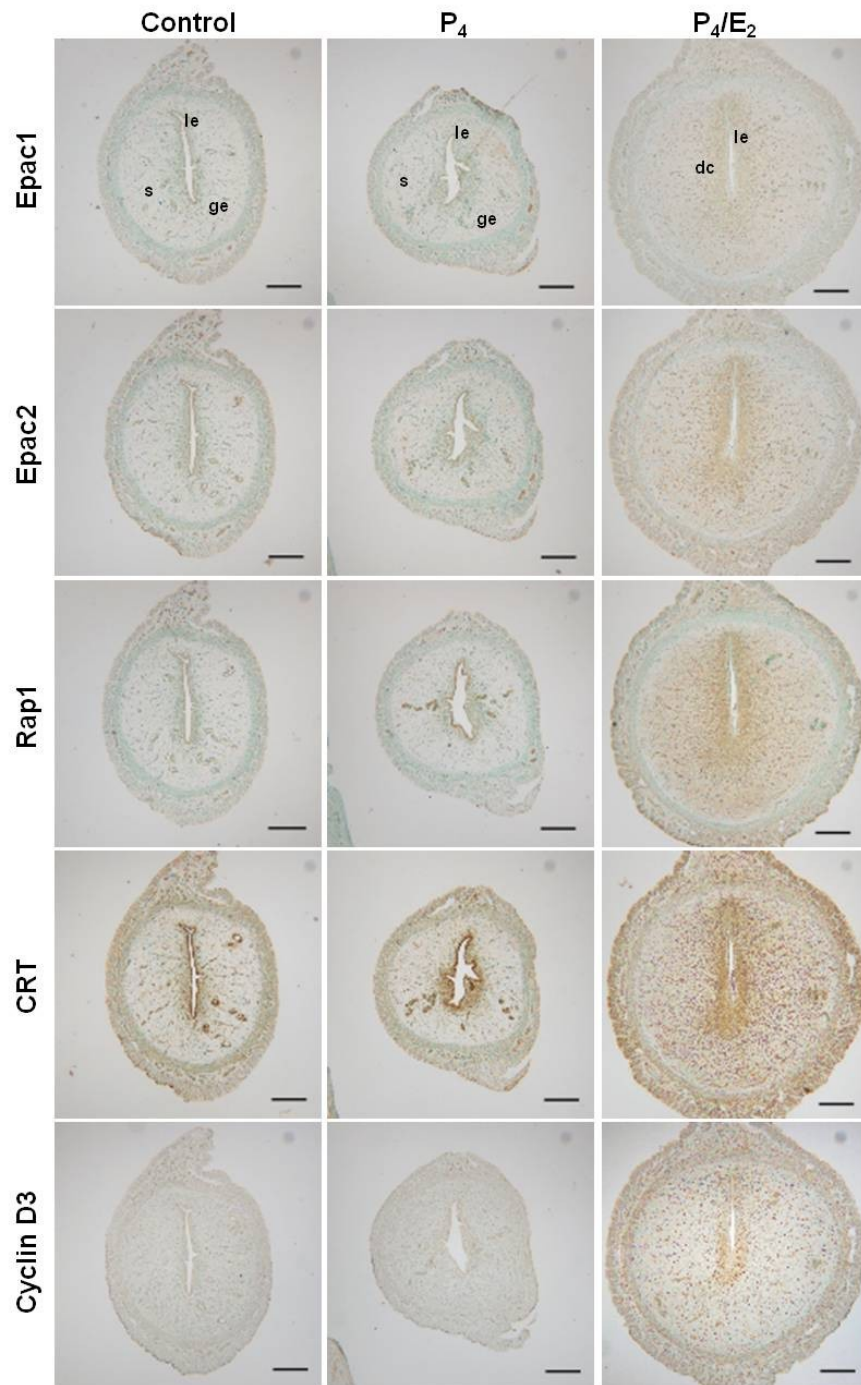


Figure 13. Expressions of Epac1, Epac2, Rap1 and CRT are increased in the delayed implanting uterus after the initiation of implantation

Pregnant rats were ovariectomized on day 4 and injected with or without P₄ (3 mg/rat) daily from days 4 to 9 of pregnancy. In order to initiate implantation in P₄-primed delayed implanting rats, E₂ (500 ng/day/rat) was injected on day 8. Immunostaining of Epac1, Epac2, Rap1, CRT or cyclin D3 was performed using uterine sections of rats on day 10 of ovariectomized (Control), P₄-treated or delayed implantation (P₄/E₂) rats. The sections were counterstained with methyl green. le: luminal epithelial cells, ge: glandular epithelial cells, s: stromal cells, dc: decidual cells. Scale bars = 250 μm.

2-3. Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現に対する卵巣ステロイドの効果

通常の妊娠時並びに着床遅延状態から E₂ 投与により着床を誘導した子宮の脱落膜細胞において Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現の上昇が見られたが、卵巣ステロイドとの直接的な関係は不明である。そこで OVX した非妊娠ラット、すなわち内因性の卵巣ステロイドがない状態で、P₄ と E₂ の単独または共処置し、Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現に対する影響をウエスタンブロットにて解析した。子宮内の Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現は卵巣ステロイド処置による影響を受けなかった (Fig. 14)。

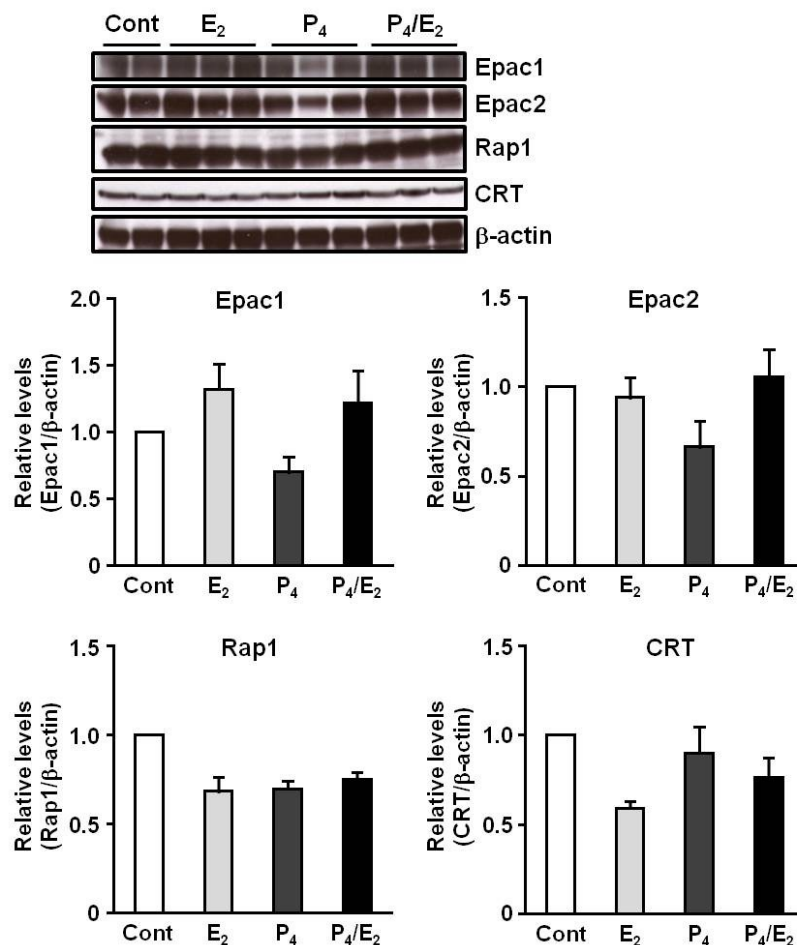


Figure 14. The expressions of Epac1, Epac2, Rap1 and CRT are unaffected by ovarian steroids

Ovariectomized rats were given injection of P₄ (3 mg/rat) daily for three days and/or a single injection of E₂ (500 ng/rat) on the third day. Rats were sacrificed 24 h after E₂ injection. Uterine lysates (30 μg protein) were subjected to immunoblot analysis using an anti-Epac1, Epac2, Rap1, CRT or β-actin antibody. The lower graphs show the relative levels normalized to β-actin levels from three independent experiments.

2-4. 偽妊娠ラットの人為的脱落膜化における Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現

脱落膜細胞でみられた Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT の発現と脱落膜化との関係を調べるため、人為的脱落膜化モデルを用いて検討した。偽妊娠 5 日目に子宮内にゴマ

油を投与して、脱落膜化を誘起すると Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現は脱落膜化がみられた部位で上昇した (Fig. 15 A)。また、ウェスタンブロット解析でも同様にゴマ油投与でこれらの発現の上昇がみられた (Fig. 15 B)。

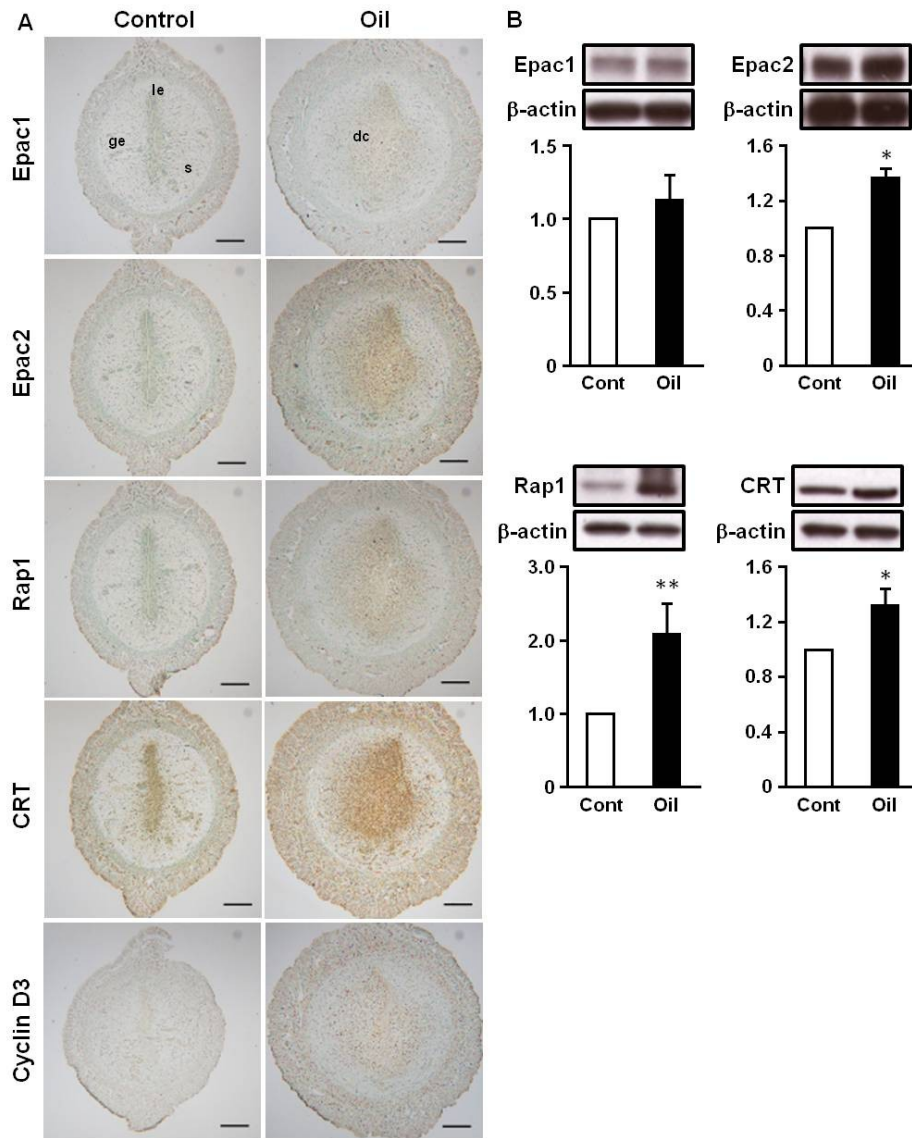


Figure 15. Expressions of Epac1, Epac2, Rap1 and CRT are elevated in artificially induced deciduoma

A. Female rats were mated vasectomized males and infused with 100 μ l of sesame oil into the lumen of one uterine horn on day 5. The uteri were dissected at 48 h after the oil infusion. Immunostaining of Epac1, Epac2, Rap1, CRT or Cyclin D3 was performed using uterine sections of pseudopregnant rats. The sections were counterstained with methyl green. le: luminal epithelial cells, ge: glandular epithelial cells, s: stromal cells, dc: decidual cells. Scale bars = 250 μ m. B-D. Uterine samples (30 μ g protein each) were subjected to immunoblot analysis using an anti-Epac1 (B), Epac2 (C), Rap1 (D), CRT (E) or β -actin antibody. The lower graphs show the relative levels normalized to β -actin levels from three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 vs. Cont.

2-5. ラット脱落膜化に対する cAMP/PKA シグナルの関与

ラット子宮において、脱落膜形成時期に cAMP が上昇することが報告されている⁵⁵⁾。また、*in vitro* ラット ESCs において cAMP 濃度の上昇により PKA が活性化する⁵⁶⁾。しかしながら、子宮内における cAMP/PKA シグナルの活性化状態については不明である。そこで、主要な cAMP/PKA シグナルの下流因子である CREB 活性化 (リン酸化) 状態を検討した。妊娠 3、5 日目 (Fig. 16 A a, b) と比べて、妊娠 7、9 日目の脱落膜細胞の核で p-CREB の強い染色がみられた (Fig. 16 A c-f)。

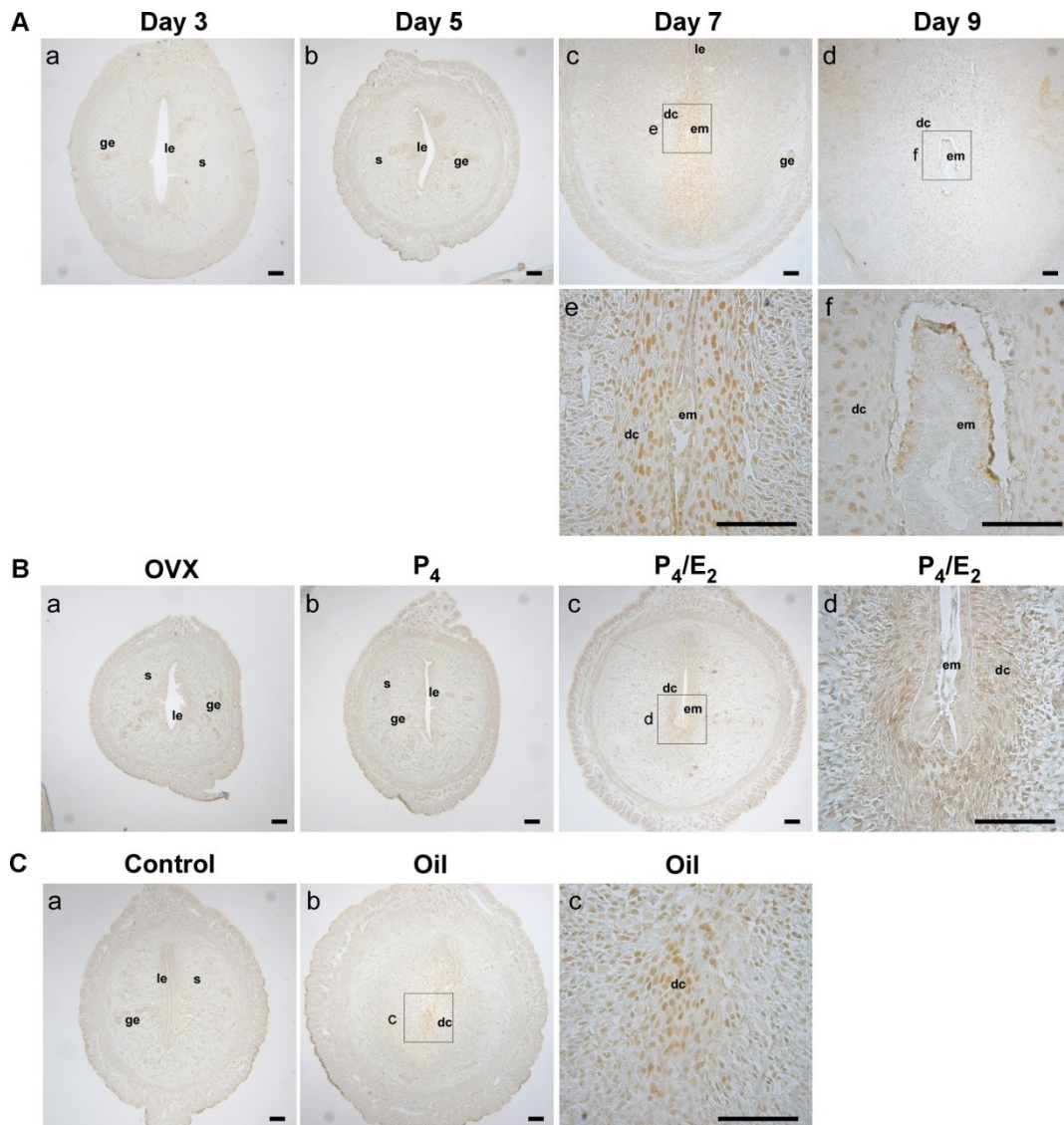


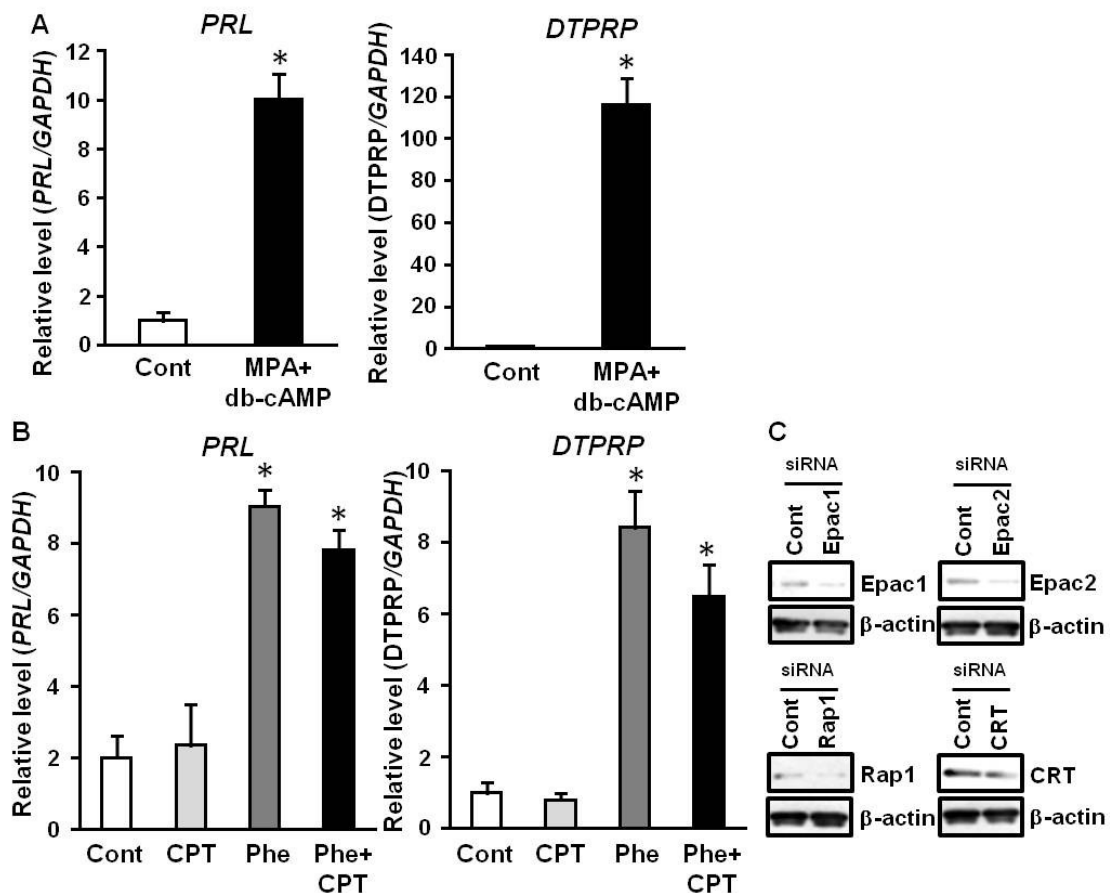
Figure 16. The expression of p-CREB is increased in decidual cells of rat

A. localization of p-CREB in the peri-implantation uterus. Magnified pictures of c and d (e and f). B. localization of p-CREB in ovariectomized (Control), P₄-treated delayed implantation and P₄/E₂-treated implanting uterus. Magnified pictures of c (d). C. localization of p-CREB in artificially induced decidualoma. Magnified pictures of b (c). The sections were counterstained with methyl green. le: luminal epithelial cells, ge: glandular epithelial cells, s: stromal cells, dc: decidual cells, em: embryo. Scale bars = 100 μm.

着床遅延モデルにおいて、Control、P₄ 群では腺上皮と管腔上皮で発現がみられた (Fig. 16 B a, b)。着床が誘起された P₄/E₂ 群では、p-CREB は脱落膜細胞の核に局在していた (Fig. 16 B c, d)。さらに、偽妊娠子宮においても Control 群と比べて、人為的に誘起した群では脱落膜細胞の核で多く発現していた (Fig. 16 C a-c)。

2-6. ESCs の *in vitro* 脱落膜化に対する Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT の役割

脱落膜細胞において Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現が上昇することが示されたが、脱落膜化における役割については不明である。そこで、培養ラット ESCs を用いて検討を行った。ラット ESCs に脱落膜化刺激として MPA と db-cAMP を共処置すると、ラットの脱落膜マーカーである *prolactin (PRL)*⁵⁷⁾ と *decidual/trophoblast prolactin-related protein (DTPRP)*⁵⁸⁾ の mRNA 発現が上昇した (Fig. 17 A)。さらに、脱落膜化に対する PKA と Epac シグナルの関与を調べるために、PKA 選択的 cAMP アナログ (Phe) または Epac 選択的 cAMP アナログ (CPT) を用いて検討した。PRL、DTPRP 発現は、Phe 単独処置により増加したが、CPT 処置では変化しなかった (Fig. 17 B)。一方、siRNA を用いた Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT の発現抑制 (Fig. 17 C) は、MPA と db-cAMP の共処置による PRL、DTPRP 発現上昇を有意に抑制した (Fig. 17 D)。



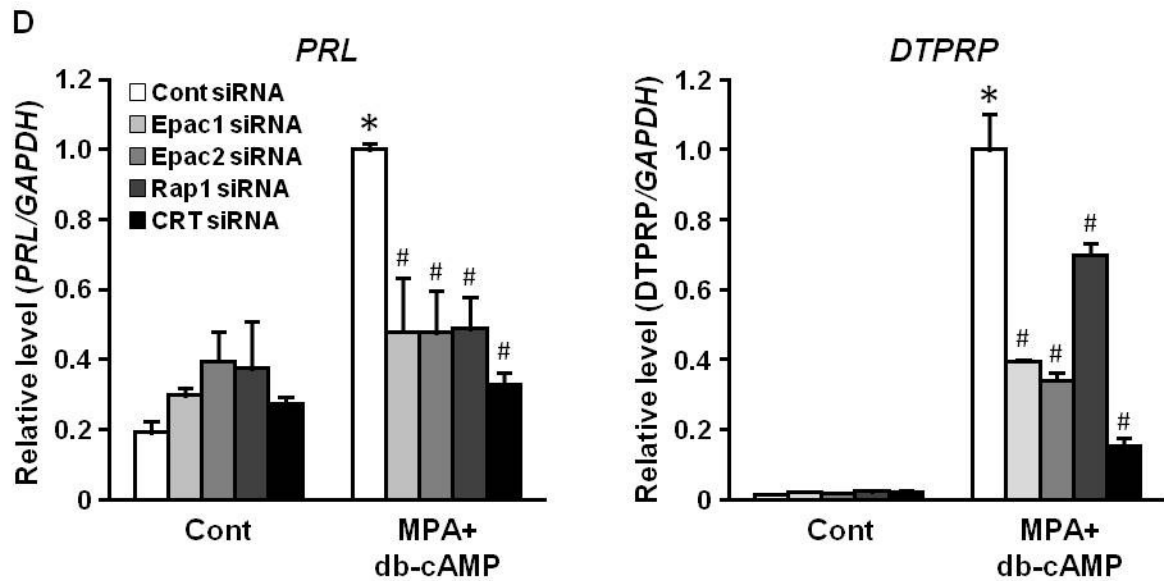


Figure 17. Knock-down of Epac1, Epac2, Rap1 or CRT inhibits *in vitro* decidualization

A, B. Rat ESCs were treated for 48 h with MPA (100 nM) and db-cAMP (500 μ M) (A), or CPT and/or Phe (B). Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine *PRL* and *DTPRP* mRNA levels. *GAPDH* was used as an internal control. C, D. Rat ESCs were treated for 24 h with non-targeting control (Cont) or Epac1, Epac2, Rap1 or CRT siRNA and cultured for an additional 24 h. Rat ESCs were then treated with MPA and db-cAMP for 48 h. The expression of Epac1, Epac2, Rap1 or CRT was determined using immunoblotting (C). The same blot was stripped and re-probed with anti- β -actin antibody as a loading control. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine *PRL* and *DTPRP* mRNA levels (D). *GAPDH* was used as an internal control. The data from three independent experiments are presented. * $p < 0.01$ vs. Cont, # $p < 0.01$ vs. Cont siRNA. Values represent the mean \pm SEM.

第3節 考察

本章では、ラットの妊娠子宮における Epac とその関連因子の発現並びに役割について検討した。ラットにおいて Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT は、妊娠 3、5 日目の子宮内膜腺上皮、管腔上皮細胞に発現し、妊娠 7、9 日目では脱落膜細胞で有意に上昇していた。胚の発達と着床は P₄ と E₂ の協調的な作用により調節されている。齧歯類において、P₄ 濃度は妊娠 1 日目から 4 日目にかけて増加する⁵⁹⁾。そこで脱落膜細胞における Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現の上昇が卵巣ステロイドによるものか否か調べた。着床遅延モデルを用いた検討において、卵巣摘出したラット (Control) における Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT の発現レベルは、P₄ を処置しても変わらなかったが、E₂ により着床を誘起 (P₄/E₂) すると着床部位の脱落膜細胞でこれらの発現が上昇した。一方、卵巣摘出した非妊娠ラットに P₄ と E₂ を単独または共処置しても、子宮内の Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現は変化しなかった。この結果は、卵巣ステロイドが Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT 発現に直接関与していないことを示唆している。偽妊娠ラットにゴマ油を注入して誘導した脱落膜では Epac1、Epac2、Rap1、CRT の発現が上昇した。このことから、Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT の発現上昇は、脱落膜の形成と密接に関わっていることが推察される。

齧歯類やヒトにおいて脱落膜化に重要な因子としてプロスタグランジン (PG) E₂ がある^{13,60)}。PGE₂ はシクロオキシゲナーゼ (COX) により産生された PGH₂ からプロスタグランジン合成酵素 (mPGES) の作用により産生される⁶¹⁾。PGE₂ はラット子宮内膜間質細胞において cAMP 濃度を上昇させ、PKA を介して脱落膜化を促進する⁵⁶⁾。さらに、PGE₂ 受容体には EP1 から EP4 の 4 つのサブタイプが存在し、EP2、EP3、EP4 は子宮に発現している⁶²⁾。また、EP2、EP4 は G_s タンパク質、EP3 は G_i タンパク質共役型受容体であり、細胞内の cAMP 濃度を調節している⁶²⁾。偽妊娠ラットにおいて、EP2 は子宮内膜管腔上皮細胞、EP3 は間質細胞、EP4 は上皮と間質細胞に発現している。また EP2 と EP3 の発現は偽妊娠 5 日目で最大となる。PGE₂ は間質細胞の EP3 と EP4 に作用し脱落膜化を調節していることが報告されている⁶³⁾。また、PGE₂ は主に、COX2 と mPGES1 の働きにより産生され、EP2 を介して脱落膜化を促進することも報告されている⁶¹⁾。これらのことから齧歯類においても脱落膜化には cAMP シグナルの活性化が重要であるといえる。しかしながら、ラット脱落膜における cAMP/PKA シグナルの関与の詳細は不明である。我々は、PKA シグナルの下流因子である CREB のリン酸化 (p-CREB) を指標に cAMP/PKA シグナルの子宮内活性化部位を調べた。p-CREB は、着床前は上皮細胞に局在していたが、着床後は脱落膜細胞の核に高発現していた。これは、脱落膜化過程で間質細胞において cAMP 濃度が上昇し、PKA シグナルが活性化していることを示している。また、p-CREB の発現上昇と同時期に脱落膜細胞において Epac の発現も上昇していることから、脱落膜化過程において cAMP/Epac シグナルも脱落膜化に関与している可能性が考えられる。

本研究において、ラット ESCs の脱落膜マーカーである *PRL* と *DTPRP* の mRNA 発現は MPA と db-cAMP または Phe 刺激により有意に上昇したが、CPT 処置では変化しなかった。これは、脱落膜マーカーの発現は主に PKA に依存していることを示している。しかし、MPA と db-cAMP 処置によるこれらの発現上昇は Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT のノックダウンにより抑制された。我々は第 1 章、第 2 章で、ヒト ESCs への CPT 処置は、卵巣ステロイドまたは Phe 刺激による *IGFBP1* と *PRL* の mRNA 発現(ヒト ESCs の脱落膜マーカー)および形態的脱落膜化を促進すること、さらに Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT のノックダウンは Phe 単独処置による *IGFBP1* と *PRL* の mRNA 発現を抑制することを報告している。これは PKA と Epac が協調して脱落膜化を調節していることを示している。他にも PKA と Epac が協調して働くシグナル経路が報告されている。足場タンパク質であるラディキシンは PKA と Epac と結合し Rap1 を活性化する³⁰⁾。また、マウス線維芽細胞において、PKA と Epac の相乗作用により分化を促進することが報告されている³³⁾。本研究においてもラットの脱落膜化は Epac シグナルと PKA シグナルが協調して脱落膜化を調節していると考えられる。

著者は第 1 章でヒト ESCs において Epac が C/EBP β を介して *PRL* 発現調節をしていることを確認した。マウス線維芽細胞とヒト臍帯静脈血管内皮細胞において Epac が Rap1 を介して転写因子である C/EBP β の発現を上昇することが報告されている²⁸⁾。また、マウス樹状細胞において PGE₂ が EP4 を介して cAMP/Epac シグナルを活性化させ、C/EBP β をリン酸化することでサイトカイン発現を促進する³²⁾。また、ヒト ESCs において C/EBP β の発現抑制は脱落膜化を阻害する⁶⁴⁾。さらに、C/EBP β 欠損マウスは、不妊になることが知られている⁶⁵⁾。Mantena らは、着床遅延モデルマウスにおいて、P₄ と E₂ 処置により着床を誘起させると、E₂ 処置しない P₄ 投与群と比べて、発現が上昇する因子として C/EBP β を同定した。さらに、C/EBP β は P₄ と E₂ によって発現が制御されており、ラット ESCs の増殖と脱落膜化を調節していることを示した⁶⁶⁾。ラット ESCs においても脱落膜細胞で上昇する Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT が C/EBP β の発現や活性化を介して脱落膜化に関与している可能性が考えられる。

以上、本章では、ラット子宮において脱落膜化時に Epac1、Epac2、Rap1、CRT 発現が上昇することを明らかにした。これらの発現は P₄ や E₂ による直接的な調節を受けず、脱落膜化刺激により誘導された。さらにラット ESCs において、Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT のノックダウンは PKA 活性化による *PRL*、*DTPRP* mRNA 発現上昇を有意に抑制した。このことから、ラット ESCs において PKA シグナルと Epac シグナルが協調して脱落膜化を調節していることが示唆された。

第4節 小括

本章では、ラットの着床周辺期子宮における Epac とその下流因子の発現、脱落膜化における役割について検討した結果、以下の知見を得た (本研究結果は、Reproduction in press 2014⁶⁷⁾に報告した)。

- (1) 妊娠子宮における Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現は着床後の妊娠 7、9 日目に脱落膜細胞にて増加する。
- (2) 着床遅延モデルを用いた解析より、Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現は、着床の誘起とともに脱落膜細胞にて亢進する。
- (3) 卵巣摘出非妊娠ラットへの P₄ 及び E₂ の投与は Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現に対して影響を与えない。
- (4) 人為的脱落膜化誘導モデルを用いた検討より、ゴマ油投与による脱落膜腫において Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現亢進がみられる。
- (5) cAMP/PKA シグナルの下流因子である CREB のリン酸化体 (p-CREB) は、脱落膜細胞の核において高発現している。また、卵巣ステロイドによる影響は受けない。
- (6) ラット ESCs の *in vitro* 脱落膜化モデルにおいて、Epac1、Epac2、Rap1、CRT 発現抑制は、MPA と db-cAMP 共処置による PRL と DTPRP の mRNA 発現上昇を有意に抑制する。

第4章 ヒト子宮内膜腺の成熟における Epac2/CRT の役割

緒言で述べたように妊娠の成立には ESCs の脱落膜化と内膜腺の成熟が必須である。腺上皮細胞では脱落膜化を促進する COX2 による PGE₂ 産生や着床を促進する LIF の発現亢進が起こる。COX2 と LIF の発現、PGE₂ の産生調節に cAMP シグナルが促進的に関わっていることは知られているが、Epac との関連についての報告はない。ヒト子宮内膜組織において、Epac2 は間質細胞だけではなく腺上皮細胞にも発現していることを確認している。また、CRT はヒト子宮内膜腺上皮細胞にて発現していることが報告されている³⁶⁾が、その機能における Epac2 や CRT の関与は不明である。そこで、腺上皮細胞における LIF 発現、COX2 を介した PGE₂ の分泌と Epac2、CRT の関係について解析を行った。

第1節 実験材料及び実験方法

1-1. ヒト子宮内間腺上皮細胞株 (EM1) の培養

EM1 は、金沢大学の京哲博士より提供していただいた。EM1 は、10 % (v/v) CS-FBS 及び抗生物質 (50 µg/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシン、100 µg/ml ネオマイシン、GIBCO)、抗真菌薬 (0.5 µg/ml アムホテシリン B、GIBCO) を含む DMEM/F-12 培養液で培養した。EM1 は、15 µM Forskolin、200 µM Phe 及び 200 µM CPT を 48 時間処置した後、解析に供した。

1-2. siRNA 処置

第1章、第1節、1-4 と同様に EM1 (3×10⁴ 個/well) に 30 pmol の Epac2 (配列は第1章、第1節、1-4 と同様)、CRT (配列は第2章、第1節、1-2 と同様) 特異的 siRNA、また、対照群として非標的コントロール siRNA (Qiagen) を導入した。

1-3. ウェスタンブロット解析

第1章、第1節、1-5 と同様の方法でサンプルを調整し、解析を行った。1次抗体には抗 Epac2 抗体、抗 GAPDH 抗体(第1章、第1節、1-5 と同様)、抗 CRT 抗体、抗 p21 抗体、抗 p53 抗体 (第2章、第1節、1-4 と同様)を使用した。得られたバンドをデンシトメトリーにより数値化し、目的バンド値を、GAPDH 値で補正することにより、各サンプル間のタンパク質量の比を求めた。

1-4. リアルタイム RT-PCR 解析

トータル RNA の抽出は第1章、第1節、1-4 と同様である。抽出したトータル RNA (100 ng) を用いて、第1章、第1節、1-6 と同様の方法、条件にて解析した。また、

CRT、*GAPDH*は第2章、第1節、1-5と同様のプライマーを用いた。*LIF*、*COX2*のプライマーの配列は以下に示す通りである

<i>LIF</i>	S	5'-TGAAGTGCAGCCCATAATGA-3'
	AS	5'-TTCCAGTGCAGAACCAACAG-3'
<i>COX2</i>	S	5'-CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG-3'
	AS	5'-TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC-3'

1-5. PGE₂ の ELISA 解析

培養メディアウムは、遠心分離 (4 °C、10000 rpm、10 分間) し、その上清をサンプルとした。PGE₂ 量は Prostaglandin E₂ Express EIA kit (Cayman Chemical Company) の使用法に従ったサンドイッチ ELISA 法にて定量した。

1-6. SA-β-Gal 染色

1-2 の方法で Control、Epac2 または CRT siRNA を処置し、4 % パラホルムアルデヒドを 10 分間加えて固定した後、第2章、第1節、1-8と同様の方法で染色した。

1-7. 統計処理

ウエスタンブロット、リアルタイム RT-PCR、ELISA の結果は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には、Tukey-Kramer 多重比較を行い、危険率 5 % (p < 0.05) をもって統計学的に有意差があるものと判定した。

第2節 実験結果

2-1. CRT 発現に対する Epac2 ノックダウンの効果

前章までの検討から、ESCs の Epac2 発現を抑制すると CRT 発現が減少すること、また、ヒト子宮内膜腺上皮細胞に Epac2 が発現していることを確認している。CRT もヒト子宮内膜腺上皮細胞に発現している報告があることから、EM1 における CRT 発現と Epac2 との関係について検討した。Epac2 ノックダウンは、CRT タンパク質発現を抑制した (Fig.18 A)。さらに、Epac2 ノックダウンは、CRT mRNA 発現も抑制した (Fig. 18 B)。

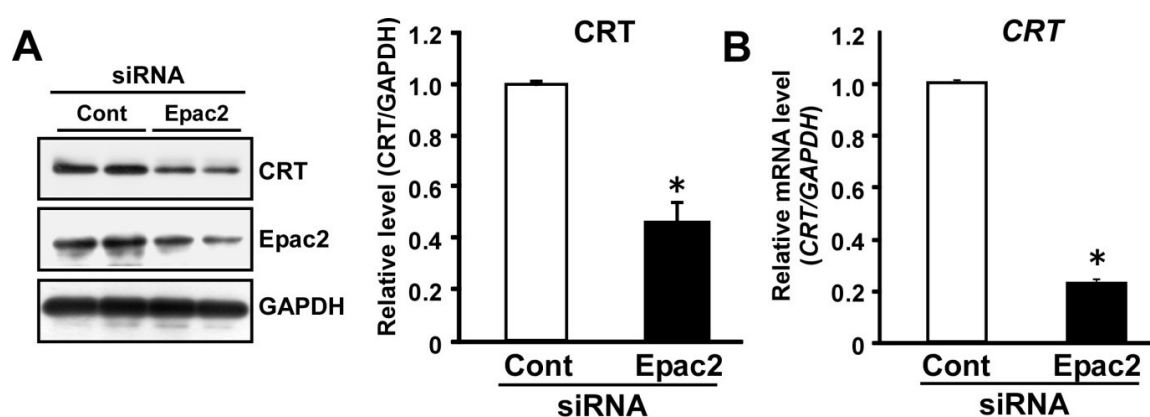


Figure 18. Knock-down of Epac2 down-regulates CRT expression in EM1

EM1 was treated for 24 h with non-targeting control (Cont) or Epac2 siRNA, and cultured in fresh medium for an additional 24 h. A. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-CRT or Epac2 antibody. The same blot was stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control. The graph show the relative levels of CRT normalized to GAPDH levels from three independent experiments. B. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine CRT mRNA levels. GAPDH mRNA was used as an internal control. The data from three independent experiments are presented. * $p < 0.01$ vs. Cont siRNA.

2-2. 着床関連因子の発現に対する Epac2 と CRT 発現抑制の効果

着床関連因子である LIF、COX2 の発現は cAMP シグナルの活性化により増加することが報告されている^{68,69}。そこで、EM1 において cAMP 誘導性の LIF、COX2 mRNA 発現と PGE₂ 分泌に対する Epac2、CRT ノックダウンの効果について検討した。Epac2 または CRT siRNA 処置は Epac2 と CRT タンパク質発現が減少することを確認した (Fig. 19 A)。これらのノックダウンは Forskolin による LIF と COX2 の mRNA 発現上昇を有意に抑制した (Fig. 19 B, C)。さらに、Forskolin により増加する PGE₂ 分泌も抑制した (Fig. 19 D)。

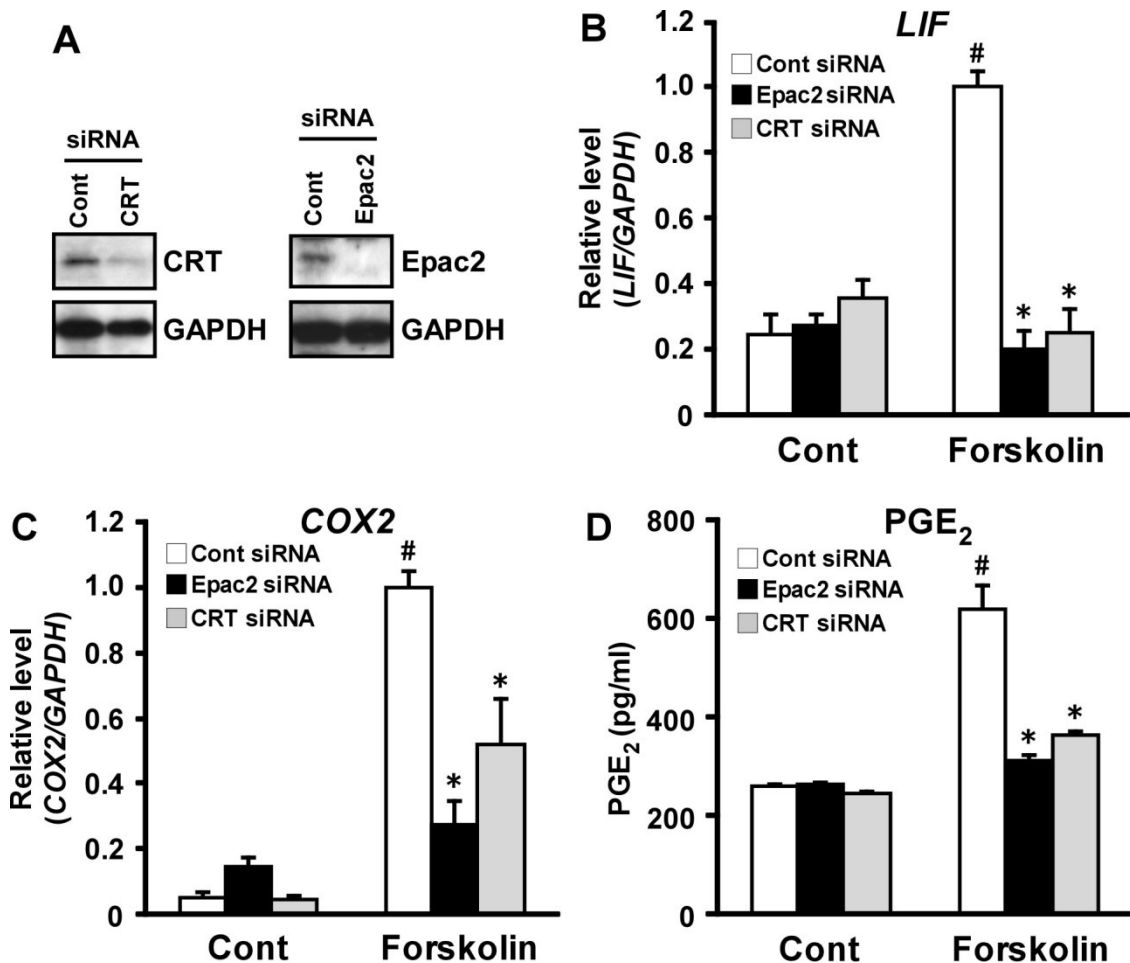


Figure 19. Epac2 knock-down or CRT knock-down inhibits the expression of implantation-related factors in EM1

EM1 was treated for 24 h with non-targeting control (Cont), Epac2 or CRT siRNA and cultured for an additional 24 h. EM1 was then treated with Forskolin (15 μ M) for 48 h. A. stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control. B, C. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine LIF (B) and *COX2* (C) mRNA levels. *GAPDH* was used as an internal control. D. PGE₂ levels in the culture media were determined by ELISA. The data from three independent experiments are presented. * $p < 0.01$ vs. Cont siRNA, # $p < 0.01$ vs. Cont. Values represent the mean \pm SEM.

2-3. PKA または Epac 誘導性の着床関連因子発現に対する Epac2、CRT 発現抑制の効果

PKA または Epac 選択的 cAMP アナログ (Phe または CPT) による *LIF*、*COX2* mRNA 発現と PGE₂ 分泌に与える影響を検討した。*LIF* と *COX2* mRNA 発現は Phe で上昇したが、CPT では変化しなかった。さらに、Phe と CPT を共処置しても Phe 単独処置と差はなかった (Fig. 20 A, B)。また、PGE₂ 産生についても同様な結果が得られた (Fig. 20 C)。しかしながら、Epac2 または CRT ノックダウンは Phe または Phe/CPT による *LIF* や *COX2* の mRNA 発現及び PGE₂ 分泌を有意に抑制した (Fig. 20 A-C)。

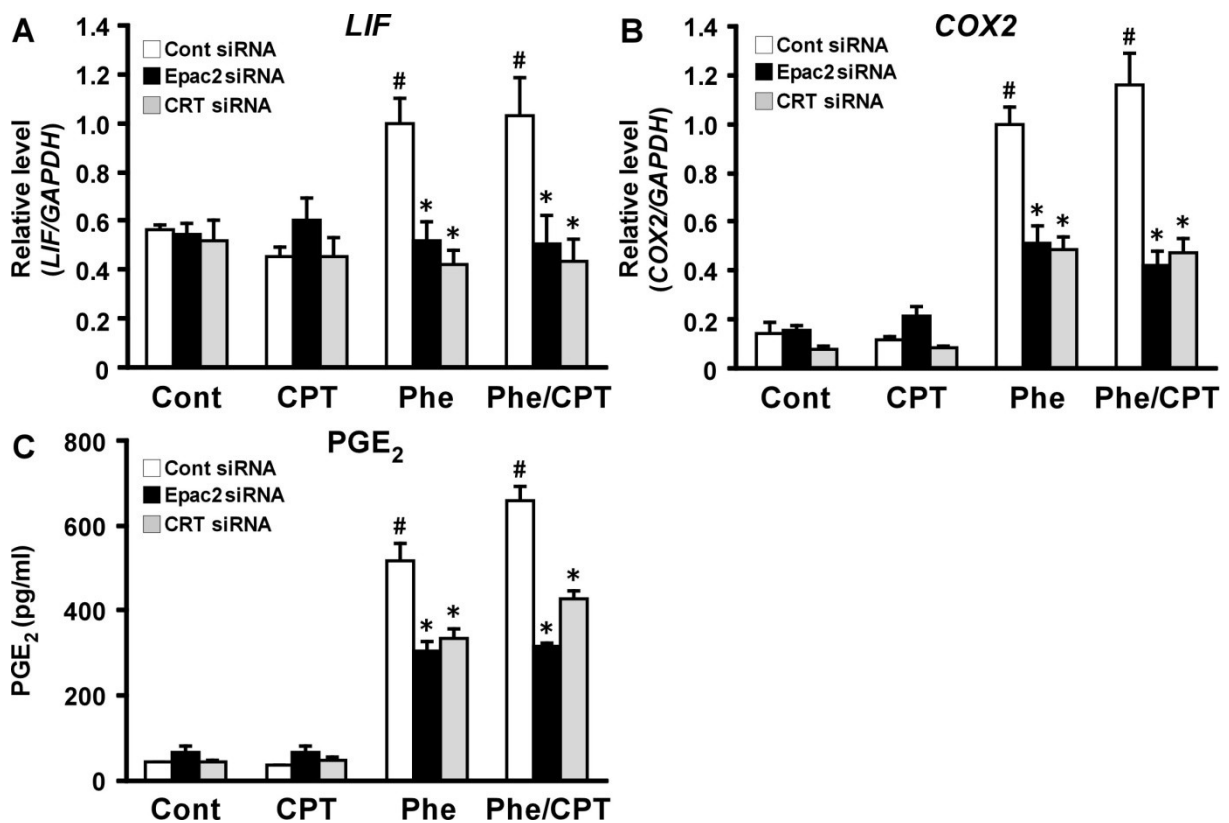


Figure 20. Epac2 or CRT knock-down inhibits implantation-related factors expression induced by PKA but not Epac in EM1

EM1 was treated for 24 h with non-targeting control (Cont), Epac2 or CRT siRNA and cultured for an additional 24 h. EM1 was then treated with Phe (200 μ M) and/or CPT (200 μ M) for 48 h. A, B. Total RNA was subjected to real-time RT-PCR analysis to determine *LIF* (A) and *COX2* mRNA levels (B). *GAPDH* was used as an internal control. C. PGE₂ level in the culture media was determined by ELISA. The data from three independent experiments are presented. *p < 0.01 vs. Cont siRNA, #p < 0.01 vs. Cont. Values represent the mean \pm SEM.

2-4. 細胞老化に対する Epac2 と CRT の発現抑制の効果

第2章において、Epac2 または CRT の発現を抑制した ESCs では細胞老化様のフェノタイプを示すことを明らかにした。そこで EM1 においても Epac2 と CRT が細胞老化に関与しているか細胞老化マーカーである SA- β -Gal 活性、p21 と p53 発現を指標に検討した。Control 群と比べ、SA- β -Gal 染色陽性細胞数は Epac2 または CRT ノックダウンにより増加した (Fig. 21 A, B)。さらに、Epac2 または CRT ノックダウンは ESCs と同様に p21 発現を増加し、p53 発現を抑制した (Fig. 21 C-E)。

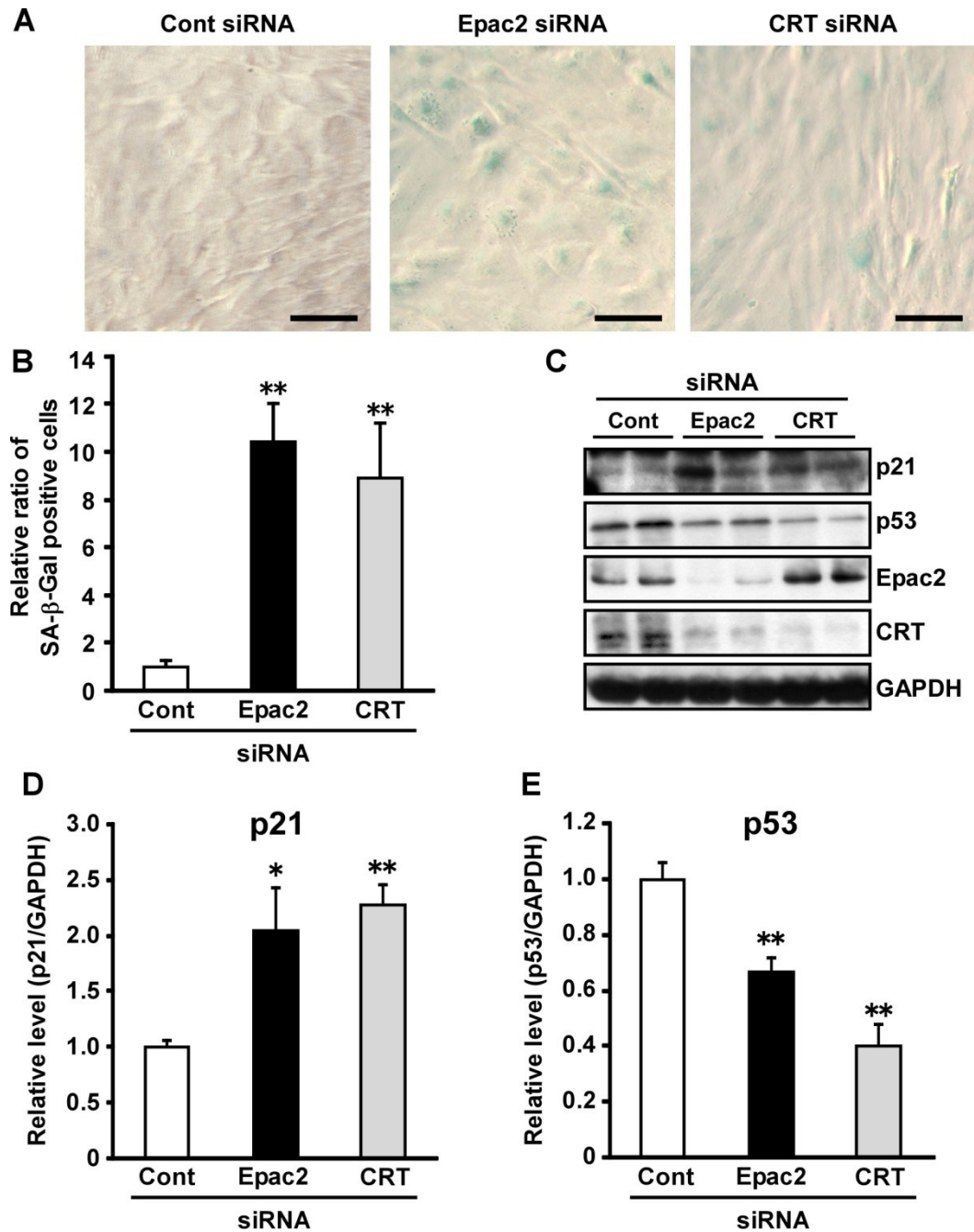


Figure 21. Knock-down of Epac2 or CRT is associated with senescence of EM1

EM1 was treated for 24 h with non-targeting control (Cont), Epac2 or CRT siRNA, and then cultured for 72 h. A, B. ESCs were stained with SA-β-Gal (A). Scale bars = 100 μm. The graph shows the relative levels of SA-β-Gal positive cells. The data from three independent experiments are presented as ratios and show the mean ± SEM (B). C, D, E. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with anti-p21, p53, Epac2 or CRT antibody. The same blot was stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody as a loading control (C). The graphs show the relative levels of p21 or p53 normalized to GAPDH levels (D, E). The data (mean ± SEM) from three independent experiments are presented as ratios. **p<0.01, *p<0.05 vs. Cont.

第3節 考察

本章では、ヒト子宮内膜腺細胞における着床関連因子 *LIF*、*COX2* mRNA 発現と PGE_2 分泌に *Epac2* とその下流にある *CRT* が関与していることを明らかにした。

Epac2 をノックダウンすると *CRT* タンパク質及び mRNA 発現が減少した。これは *CRT* が転写レベルで *Epac2* により調節されていること示している。この結果は、第2章における ESCs の *CRT* が *Epac2* 発現抑制により減少する結果と一致する。子宮内膜腺細胞において、*LIF*、*COX2* 及び PGE_2 産生は、胞胚の着床時期である着床ウインドウ時に亢進する⁷⁰⁻⁷²⁾。緒言でも述べた通り、これら着床関連因子は欠損させると着床が起こらないことから、妊娠に必須の因子である^{5,7)}。さらに、これら着床関連因子は cAMP シグナルにより発現が正に調節されているが^{68,69)}、*Epac* との関連についての報告はない。そこで EM1 の着床関連因子の産生と *Epac2* や *CRT* との関連について検討した。*Epac2*、*CRT* ノックダウンは Forskolin により誘導された *LIF* や *COX2* の mRNA 発現と PGE_2 分泌を抑制した。さらに、Phe 処置によりこれらの因子の発現・分泌は上昇するが、CPT 処置は影響を与えなかった。これらの結果は、cAMP シグナルを介した *LIF*、*COX2* mRNA 発現及び PGE_2 産生には主に PKA の活性化が重要であることを示している。しかしながら、*Epac2*、*CRT* ノックダウンは Phe 単独処置による着床関連因子の産生を抑制したことから、*Epac2*、*CRT* が PKA シグナルとクロストークして *LIF*、*COX2* 発現と PGE_2 分泌の調節に関与していることが推察される。著者らは、ESCs において、PKA シグナル誘導性の脱落膜マーカーの発現を *Epac* ノックダウンが抑制することを明らかにしている³⁴⁾。*Epac* シグナルが PKA 誘導性の *PRL* mRNA 発現を増強する機構として、C/EBP β を介した転写調節を第1章で示した。マウス ESCs において、*COX2* 発現は C/EBP β を介して促進されることが報告されている⁷³⁾。EM1 においても *Epac2* ノックダウンは C/EBP β を介して *COX2* 発現を抑制し、 PGE_2 産生を抑制している可能性が考えられる。また、*LIF* は p53 により発現が調節されている⁷⁴⁾。本検討においても、*Epac2* と *CRT* ノックダウンは p53 発現を減少させたことより、*LIF* mRNA 発現も低下させたことが推察できる。また、*CRT* は、小胞体の Ca^{2+} の貯蔵と放出を調節し、細胞内 Ca^{2+} 恒常性の維持に関与している³⁸⁾。 Ca^{2+} は妊娠の成立に重要であることが知られている。マウス子宮内膜腺細胞において large-conductance calcium-activated potassium channel (BKca) は Ca^{2+} 恒常性と転写因子である NF- κ B を活性化することで胞胚の着床に作用する。BKca の発現抑制は *LIF* 発現を抑制し、子宮内膜の受容能を低下させることで着床を阻害する⁷⁵⁾。マウス子宮内膜上皮細胞に存在する epithelial Na^+ channel (ENaC) は、活性化されることで Na^+ 流入を介した Ca^{2+} 流入を誘起し、*COX2*/ PGE_2 の産生を促進させる。ENaC の発現抑制は胚の着床数を減少させる⁷⁶⁾。さらに、カルシウム結合タンパク質である S100A11 の発現抑制は、 Ca^{2+} 恒常性の破綻により子宮内膜の受容能の低下と着床数の減少を起こす⁷⁷⁾。これらの知見は、腺細胞での *CRT* ノックダウンが EM1 内のカルシウム恒常性を破綻させ、着床関連因子の発現を阻害したことを推察させる。

さらに本章では Epac2 または CRT のノックダウンが SA- β -Gal 活性と p21 発現を上昇させ、p53 発現を減少させた。これらの結果は、ESCs と同様の結果であり、EM1 においても Epac2 と CRT が細胞老化に関連していることを推察させる。よって、Epac2 と CRT は腺細胞の異常な老化を抑制することで腺機能を維持していると考えられるが、その詳細な機構については不明であり、さらに検討が必要である。

本研究は子宮内膜腺上皮細胞株において、Epac2 により CRT の発現が調節されること、腺細胞の着床関連因子の産生と細胞老化に Epac2 を介した CRT 発現が必須であることを初めて明らかにした。

第4節 小括

本章では、内膜腺上皮細胞における Epac2 の下流因子の同定及び、着床関連因子発現への関与について、検討を行い、以下の新知見を得た (本研究結果は、Fertility and Sterility に投稿中である)。

- (1) EM1 において、Epac2 発現抑制時に発現量が低下する因子として CRT を同定した。
- (2) EM1 において、Forskolin または Phe 単独処置による *LIF* と *COX2* の mRNA 発現及び PGE₂ 分泌は Epac2 や CRT ノックダウンにより抑制される。しかしながら、CPT 処置ではこれらの因子発現は変化しない。
- (3) Epac2 または CRT 発現抑制は、老化マーカーである SA-β-Gal 活性と p21 発現を増加させ、p53 発現を減少させる。

総括

本研究は、Epac とその下流因子のヒト ESCs の脱落膜化と子宮内膜腺の成熟における役割、さらにラット子宮の着床周辺期における役割を明らかにすることを目的として検討し、以下の新知見を得た (Fig. 22)。

第 1 章では、ヒト ESCs の脱落膜化における Epac の関与について検討した。増殖期と分泌期のヒト子宮内膜組織における Epac1 と Epac2 は、間質、腺上皮、管腔上皮細胞に発現していた。初代培養 ESCs を用いた検討において、CPT 単独処置は脱落膜マーカー (*PRL*、*IGFBP1*、*FOXO1*) の mRNA 発現に影響しなかったが、CPT は Phe または卵巣ステロイド誘導性の *PRL*、*IGFBP1* mRNA 発現をさらに増加した。Epac1、Epac2 または Rap1 のノックダウンは、Phe、卵巣ステロイド処置または CPT との共処置における *PRL* と *IGFBP1* の mRNA 発現上昇を有意に抑制した。また、Epac2 ノックダウンは *FOXO1* mRNA 発現も抑制した。さらに ESCs の形態を調べたところ、卵巣ステロイド処置は線維芽細胞様の形態から敷石状の脱落膜細胞様の形態へと変化させ、CPT と卵巣ステロイドの共処置はこの形態変化をさらに促進させた。Epac1、Epac2 または Rap1 のノックダウンはこの形態変化を阻害した。さらに、ESCs における Rap1 の活性化を調べたところ、未分化の ESCs に CPT を処置しても Rap1 は活性化されなかったが、Phe を前処置した ESCs では CPT 処置により Rap1 が活性化され、この活性化は Epac1 または Epac2 ノックダウンにより抑制された。一方、Phe 処置は CREB を活性化させたが、CPT は影響を与えなかった。また、Phe による CREB の活性化は Epac1、Epac2 または Rap1 のノックダウンによっても影響されなかった。そこで Epac シグナルによる *PRL* の転写活性機構を明らかにするため、C/EBP β に着目してレポーターアッセイで解析したところ、Phe と CPT との共処置で上昇する *PRL* 転写活性が、C/EBP β の結合配列の変異で消失した。これらのことから、ヒト ESCs において、Epac/Rap1 シグナルが PKA/CREB シグナルではなく、一部 C/EBP β を介して PKA シグナルと協調して脱落膜化を調節していることが明らかとなった。

第 2 章では、ヒト ESCs の脱落膜化における Epac2 の新規下流因子を同定し、脱落膜化への関与についてさらに解析した。Epac2 ノックダウンにより発現が減少する因子として CRT を同定した。CRT は Epac1 や Rap1 ノックダウンでは影響を受けず、Epac2 特異的な下流因子であった。しかしながら、Phe または CPT 処置をしても CRT 発現量に変化はなかった。CRT ノックダウンは Phe、卵巣ステロイドまたは CPT との共処置による脱落膜マーカー (*PRL* と *IGFBP1*) の mRNA 発現を抑制した。さらに、

卵巣ステロイドまたは CPT との共処置による脱落膜細胞への形態変化を CRT ノックダウンは阻害した。また、Epac2 や CRT 発現抑制は、SA- β -Gal 活性と p21 発現を増加させ、p53 発現を減少したことから、ESCs の老化を誘起したと考えられる。これらの結果から、ヒト ESCs の機能的かつ形態的な脱落膜細胞への分化に Epac2 を介した CRT 発現が必須であること、また、Epac2 と CRT が ESCs の老化に関与することを明らかにした。

第 3 章では、着床周辺期のラットの妊娠子宮における Epac 及びその関連因子の発現と役割について検討した。Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT は妊娠 3、5 日目では管腔、腺上皮細胞に局在していたが、着床後の妊娠 7、9 日目において脱落膜細胞で強い発現がみられた。また、ゴマ油処置による人為的脱落膜化モデルを用いた検討においても、脱落膜細胞で Epac1、Epac2、Rap1 並びに CRT の発現がみられた。着床遅延モデルを用いた検討では、妊娠 4 日目に OVX した群と OVX 群に P₄ を投与した群と比べて、P₄ と E₂ を投与して着床を誘起した群では、脱落膜細胞で Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現が上昇した。また、非妊娠ラットに P₄ と E₂ をそれぞれ単独または共処置しても Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現は変化しなかった。このことから、Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT 発現は卵巣ステロイドによる直接的な調節ではなく、着床による脱落膜化の際に発現が上昇することが明らかとなった。また、脱落膜化部位において cAMP/PKA シグナルの活性化を示唆する CREB の強いリン酸化が観察された。さらに、培養 ESCs において、脱落膜マーカー (*PRL* と *DTPRP*) の mRNA 発現は、CPT 処置で影響しなかったものの、Phe 処置で上昇した。Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT ノックダウンは、MPA と db-cAMP 共処置による *PRL* と *DTPRP* の mRNA 発現を有意に抑制した。以上の結果から、Epac1、Epac2、Rap1 及び CRT はラットにおける脱落膜化に関与していることを明らかにした。

第 4 章では、ヒト子宮内膜腺の成熟における Epac2 と CRT の役割を EM1 を用いて解析した。Epac2 ノックダウンは CRT 発現を減少させたことより、EM1 においても CRT 発現が Epac2 により調節されていることが示された。腺機能への関与を調べるために着床関連因子 (*LIF*、*COX2* 及び PGE₂) と Epac2 や CRT との関連を検討したところ、*LIF* と *COX2* の mRNA 発現と PGE₂ 分泌は Phe 処置で上昇し、CPT 処置では影響しなかった。また、Forskolin または Phe 処置による *LIF* と *COX2* の mRNA 発現と PGE₂ 分泌の増加は、Epac2 または CRT ノックダウンにより抑制された。さらに、Epac2 または CRT をノックダウンした EM1 は、SA- β -Gal 活性と p21 発現を増加し、p53 発現を減少することから、細胞老化を誘起したと考えられる。これらの結果から、ヒト内膜腺細胞における着床関連因子の産生調節と細胞老化に Epac2 を介した CRT 発現が

必須であることを明らかにした。

以上、本研究より、増殖期と分泌期のヒト子宮内膜組織において、間質と腺上皮細胞に Epac が発現していることが明らかとなった。さらにヒト ESCs において、Epac シグナルの活性化や Epac とその下流因子の発現抑制が機能的かつ形態的な脱落膜化に影響を与えることから、Epac は脱落膜化と密接に関連していることを見出した。また、着床後のラット子宮の脱落膜細胞にて Epac とその下流因子の発現が上昇し、その発現抑制は脱落膜化を阻害したことから、脱落膜の形成機構に Epac は必須の因子といえる。一方、腺上皮細胞における着床関連因子の発現を Epac2 ノックダウンが抑制することから、腺細胞の成熟にも Epac2 が重要であることを明らかにした。さらに、Epac2 と CRT は間質、腺上皮細胞の老化に影響したことから、これらは妊娠に向けたヒト子宮内膜の成熟機構の調節と維持に重要な因子であると考えられる。以上、申請者は妊娠成立の新しい分子機構として Epac の意義を明らかにした。これら知見は不妊症のメカニズムの解明に繋がる可能性があり、生殖補助医療への応用が期待される。

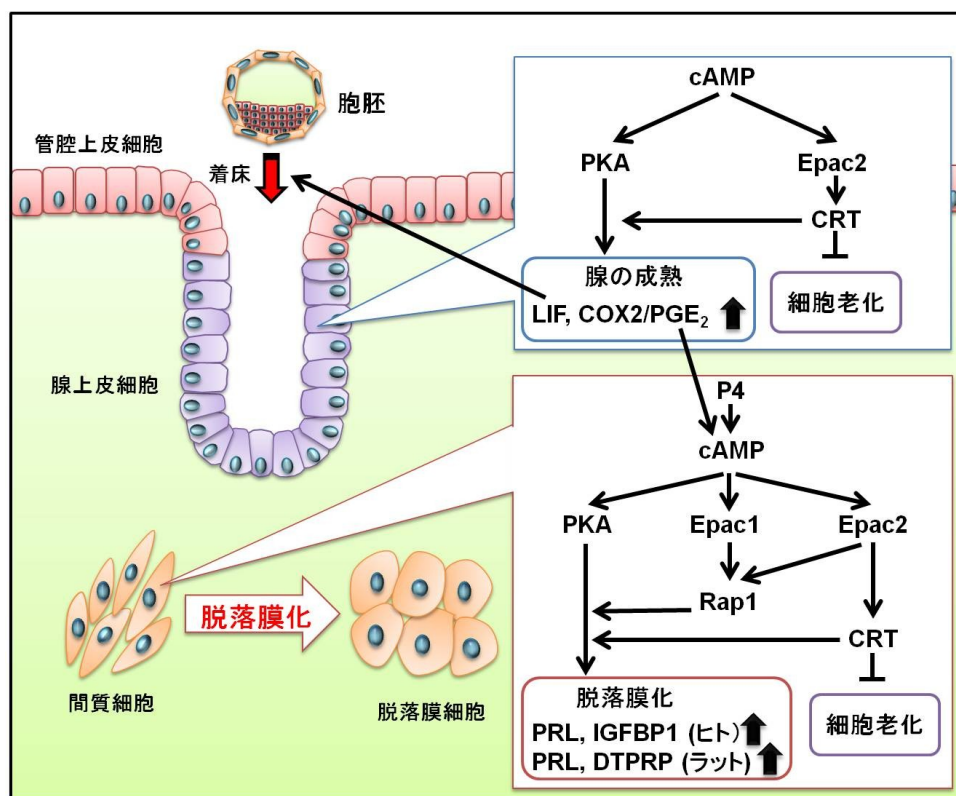


Figure 22. Diagram illustrating the role of Epac-mediated cAMP signaling on the maturation of endometrium

謝辞

稿を終わるに当たり、本研究の遂行に際し、始終御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御高閲を賜りました立川 英一教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行並びに論文作成に際し、始終、直接御指導、御鞭撻を頂きました田村 和広准教授、吉江 幹浩助教、沓掛 真彦助教に深く感謝致します。本研究の遂行に際し、ヒト子宮組織の採取においてご指導、ご協力をいただきました東京医科大学・産科婦人科教室の井坂 恵一教授、西 洋孝講師に深く感謝いたします。また、御世話になりました内分泌・神経薬理学教室の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究を陰ながら支えて下さいました父・泰男、祖母・一美に対してここに改めて感謝の意を表します。

参考文献

1. Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest* **120**, 1004-1015 (2010)
2. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazlebas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. embryo implantation. *Dev Biol* **223**, 217-237 (2000)
3. Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, Clark I, Paiva P, Kovacs G, Salamonsen LA. Interleukin-11, IL-11 receptoralpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* **69**, 53-64 (2006)
4. Menkhorst E, Salamonsen L, Robb L, Dimitriadis E. IL11 antagonist inhibits uterine stromal differentiation, causing pregnancy failure in mice. *Biol Reprod* **80**, 920-927 (2009)
5. Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM, Dey SK. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem* **277**, 29260-29267 (2002)
6. Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* **13**, 1561-1574 (1999)
7. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* **359**, 76-79 (1992)
8. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* **141**, 4365-4372 (2000)
9. Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, Dey SK. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest* **120**, 803-815 (2010)
10. Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* **135**, 751-754 (1979)
11. Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC. Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 1235-1241 (1992)
12. Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, Unterman TG, Gellersen B, White JO, Brosens JJ. Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* **277**, 20825-20832 (2002)

13. Frank GR, Brar AK, Cedars MI, Handwerger S. Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* **134**, 258-263 (1994)
14. Tseng L, Gao JG, Chen R, Zhu HH, Mazella J, Powell DR. Effect of progestin, antiprogestin, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* **47**, 441-450 (1992)
15. Tang B, Gurbide E. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **47**, 115-121 (1993)
16. Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* **178**, 357-372 (2003)
17. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477 (1998)
18. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279 (1998)
19. Enyeart JA, Enyeart JJ. Metabolites of an Epac-selective cAMP analog induce cortisol synthesis by adrenocortical cells through a cAMP-independent pathway. *PLoS One* **4**, e6088 (2009)
20. Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* **31**, 680-686 (2006)
21. Sehrawat S, Cullere X, Patel S, Italiano J Jr, Mayadas TN. Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Mol Biol Cell* **19**, 1261-1270 (2008)
22. Enyeart JA, Enyeart JJ. Metabolites of an Epac-selective cAMP analog induce cortisol synthesis by adrenocortical cells through a cAMP-independent pathway. *PLoS One* **4**, e6088 (2009)
23. Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, Minami K, Sunaga Y, Takahashi H, Yokoi N, Iwasaki M, Miki T, Seino S. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* **325**, 607-610 (2009)
24. Yoshie M, Kaneyama K, Kusama K, Higuma C, Nishi H, Isaka K, Tamura K. Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Hum Reprod* **25**, 2229-2238 (2010)
25. Satyaswaroop PG, Bressler RS, de la Pena MM, Gurbide E. Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metab* **48**, 639-641 (1979)
26. Tamura K, Yoshie M, Hara T, Isaka K, Kogo H. Involvement of stathmin in proliferation and differentiation of immortalized human endometrial stromal cells. *J Reprod Dev* **53**, 525-533 (2007)
27. Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* **55**, 795-810 (2008)

28. Yarwood SJ, Borland G, Sands WA, Palmer TM. Identification of CCAAT/enhancer-binding proteins as exchange protein activated by cAMP-activated transcription factors that mediate the induction of the SOCS-3 gene. *J Biol Chem* **283**, 6843-6853 (2008)
29. Li J, O'Connor KL, Cheng X, Mei FC, Uchida T, Townsend CM Jr, Evers BM. Cyclic adenosine 5'-monophosphate-stimulated neurotensin secretion is mediated through Rap1 downstream of both Epac and protein kinase A signaling pathways. *Mol Endocrinol* **21**, 159-171 (2007)
30. Hochbaum D, Barila G, Ribeiro-Neto F, Altschuler DL. Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP Compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. *J Biol Chem* **286**, 859-866 (2011)
31. Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N. Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 291-299 (2010)
32. Kocieda VP, Adhikary S, Emig F, Yen JH, Toscano MG, Ganea D. Prostaglandin E2-induced IL-23p19 subunit is regulated by cAMP-responsive elementbinding protein and C/ATT enhancer-binding protein beta in bone marrowderived dendritic cells. *J Biol Chem* **287**, 36922-36935 (2012)
33. Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, Døskeland SO, Kristiansen K. Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* **28**, 3804-3816 (2008)
34. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, Sakurai T, Bai H, Imakawa K, Nishi H, Isaka K, Nagai T, Nagao T, Tachikawa E. Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac). *Placenta* **34**, 212-221 (2013)
35. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Nakayama T, Nishi H, Isaka K, Tachikawa E. The role of Exchange protein directly activated by cyclic AMP 2-mediated calreticulin expression in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **155**, 240-248 (2014)
36. Parmar T, Gadkar-Sable S, Savardekar L, Katkam R, Dharma S, Meherji P, Puri CP, Sachdeva G. Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril* **92**, 1091-1103 (2009)
37. Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, Smith JR, Timchenko NA. Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J* **23**, 406-417 (2004)
38. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **417**, 651-666 (2009)
39. Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M. Alteration of integrin-dependent adhesion and signaling in EMT-like MDCK cells established through overexpression of calreticulin. *J Cell Biochem* **112**, 2518-2528

(2011)

40. Tarr JM, Young PJ, Morse R, Shaw DJ, Haigh R, Petrov PG, Johnson SJ, Winyard PG, Eggleton P. A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J Mol Biol* **401**, 799-812 (2010)
41. Senovilla L, Vitale I, Martins I, Tailler M, Pailletet C, Michaud M, Galluzzi L, Adjemian S, Kepp O, Niso-Santano M, Shen S, Mariño G, Criollo A, Boilève A, Job B, Ladoire S, Ghiringhelli F, Sistigu A, Yamazaki T, Rello-Varona S, Locher C, Poirier-Colame V, Talbot M, Valent A, Berardinelli F, Antoccia A, Ciccocanti F, Fimia GM, Piacentini M, Fueyo A, Messina NL, Li M, Chan CJ, Sigl V, Pourcher G, Ruckenstein C, Carmona-Gutierrez D, Lazar V, Penninger JM, Madeo F, López-Otín C, Smyth MJ, Zitvogel L, Castedo M, Kroemer G. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* **337**, 1678-1684 (2012)
42. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, Michalak M, Murphy-Ullrich JE. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* **24**, 665-683 (2010)
43. Yamazaki T, Muramoto M, Nishimura S, Kita Y. Suppressive effects of FR167653, an inhibitor of p38 mitogen-activated kinase, on calreticulin mRNA expression induced by endoplasmic reticulum stresses. *Eur J Pharmacol* **484**, 147-156 (2004)
44. Kamagate A, Kim DH, Zhang T, Slusher S, Gramignoli R, Strom SC, Bertera S, Ringquist S, Dong HH. FoxO1 links hepatic insulin action to endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* **151**, 3521-3535 (2010)
45. Schardt JA, Eyholzer M, Timchenko NA, Mueller BU, Pabst T. Unfolded protein response suppresses CEBPA by induction of calreticulin in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med* **14**, 1509-1519 (2010)
46. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891 (2001)
47. Parmar T, Nimbkar-Joshi S, Katkam RR, Gadkar-Sable S, Chaudhari U, Manjramkar DD, Savardekar L, Jacob S, Puri CP, Sachdeva G. Differential expression of calreticulin, a reticuloplasm in primate endometrium. *Hum Reprod* **24**, 2205-2216 (2009)
48. Cheng SQ, He JL, Dong YL, Liu XQ, Ding YB, Gao RF, Tan Y, Ye Q, Tian ZL, Wang YX. Characterization of calreticulin expression in mouse endometrium during embryo implantation. *Biol Res* **42**, 505-516 (2009)
49. Daikoku T, Tranguch S, Friedman DB, Das SK, Smith DF, Dey SK. Proteomic analysis identifies immunophilin FK506 binding protein 4 (FKBP52) as a downstream target of Hoxa10 in the periimplantation mouse uterus. *Mol Endocrinol* **19**, 683-697 (2005)
50. Kawarabayashi Y, Hai L, Honda A, Horiuchi S, Tsujioka H, Ichikawa J, Inoue R. Critical role of TRPC1-mediated Ca²⁺ entry in decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* **26**, 846-858 (2012)

51. Feng Z, Hu W, Teresky AK, Hernando E, Cordon-Cardo C, Levine AJ. Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16633-16638 (2007)
52. Hirota Y, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18073-18078 (2011)
53. Mesaeli N, Phillipson C. Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin-deficient cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1862-1870 (2004)
54. Das SK, Lim H, Paria BC & Dey SK. Cyclin D3 in the mouse uterus is associated with the decidualization process during early pregnancy. *J Mol Endocrinol* **22**, 91-101 (1999)
55. Vilar-Rojas C, Castro-Osuna G & Hicks JJ. Cyclic AMP and cyclic GMP in the implantation site of the rat. *Int J Fertil* **27**, 56-59 (1982)
56. Yee GM & Kennedy TG. Prostaglandin E2, cAMP and cAMP-dependent protein kinase isozymes during decidualization of rat endometrial stromal cells in vitro. *Prostaglandins* **46**, 117-138 (1993)
57. Soares MJ. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 51 (2004)
58. Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SC & Soares MJ. Decidual prolactin-related protein. Identification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem* **268**, 3136-3142 (1993)
59. Cross JC, Werb Z & Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the developmental puzzle. *Science* **266**, 1508-1518 (1994)
60. Kennedy TG. Prostaglandin E2, adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and changes in endometrial vascular permeability in rat uteri sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* **29**, 1069-1076 (1983)
61. Pakrasi PL, Jain AK. Cyclooxygenase-2 derived PGE2 and PGI2 play an important role via EP2 and PPARdelta receptors in early steps of oil induced decidualization in mice. *Placenta* **29**, 523-530 (2008)
62. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* **282**, 11613-11617 (2007)
63. Papay KD, Kennedy TG. Characterization of temporal and cell-specific changes in transcripts for prostaglandin E2 receptors in pseudopregnant rat endometrium. *Biol Reprod* **62**, 1515-1525 (2000)
64. Wang W, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK. Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBP beta involves cyclin E-cdk2 and STAT3. *Mol Endocrinol* **26**, 2016-2030 (2012)
65. Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* **11**, 2153-2162 (1997)
66. Mantena SR, Kannan A, Cheon YP, Li Q, Johnson PF, Bagchi IC, Bagchi MK. C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1870-1875 (2006)

67. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Daikoku T, Takarada T, Tachikawa E. Possible roles of the cAMP-mediators Epac and Rap1 in decidualization of rat uterus. *Reproduction* in press (2014)
68. Kutsukake M, Tamura K, Yoshie M, Tachikawa E. Knockdown of IGF-binding protein 7 inhibits transformation of the endometrial gland in an in vitro model. *Mol Reprod Dev* **77**, 265-272 (2010)
69. Zhou XL, Lei ZM, Rao CV. Treatment of human endometrial gland epithelial cells with chorionic gonadotropin/luteinizing hormone increases the expression of the cyclooxygenase-2 gene. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3364-3377 (1999)
70. Senturk LM, Arici A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol* **39**, 144-151 (1998)
71. Marions L, Danielsson KG. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* **5**, 961-965 (1999)
72. Milne SA, Perchick GB, Boddy SC, Jabbour HN. Expression, localization, and signaling of PGE(2) and EP2/EP4 receptors in human nonpregnant endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4453-4459 (2001)
73. Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Okamura K, Bulun SE. Induction of cyclooxygenase-2 in human endometrial stromal cells by malignant endometrial epithelial cells: evidence for the involvement of extracellularly regulated kinases and CCAAT/enhancer binding proteins. *J Mol Endocrture* **29**, 721-724 (2007)
74. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* **29**, 721-724 (2007)
75. Zhang RJ, Zou LB, Zhang D, Tan YJ, Wang TT, Liu AX, Qu F, Meng Y, Ding GL, Lu YC, Lv PP, Sheng JZ, Huang HF. Functional expression of large-conductance calcium-activated potassium channels in human endometrium: a novel mechanism involved in endometrial receptivity and embryo implantation. *J Clin Endocrinol Metab* **7**, 543-553 (2011)
76. Ruan YC, Guo JH, Liu X, Zhang R, Tsang LL, Dong JD, Chen H, Yu MK, Jiang X, Zhang XH, Fok KL, Chung YW, Huang H, Zhou WL, Chan HC. Activation of the epithelial Na⁺ channel triggers prostaglandin E₂ release and production required for embryo implantation. *Nat Med* **18**, 1112-1117 (2012)
77. Liu XM, Ding GL, Jiang Y, Pan HJ, Zhang D, Wang TT, Zhang RJ, Shu J, Sheng JZ, Huang HF. Down-regulation of S100A11, a calcium-binding protein, in human endometrium may cause reproductive failure. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 3672-3683 (2012)