

正常妊娠子宮内膜におけるエリスロポエチン情報発現に関する研究

島岡 昌生 釣谷 充弘 小池 英爾 老木 正彰¹ 塩田 充
星 合 昊

近畿大学医学部産科婦人科学教室 ¹老木レディースクリニック

抄 録

ヒト正常妊娠におけるエリスロポエチン情報発現ならびに妊娠過程における役割を調べる目的で、人工妊娠中絶術後の子宮脱落膜組織を用いてエリスロポエチン mRNA、エリスロポエチン受容体 mRNA およびエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ mRNA の発現量を5週から8週の子宮脱落膜組織で測定した。免疫組織化学的にこれらの蛋白の組織内局在も調べた。標本取得には近畿大学医学部倫理委員会のガイドラインに従った。エリスロポエチン mRNA、エリスロポエチン受容体 mRNA およびアロマターゼ mRNA はそれぞれの標本間で発現量の偏りがみとめられたが、各週の発現量の平均値を比較すると、6週の脱落膜組織に3つの mRNA が有意に高値を示した。更にこの時期の脱落膜組織を検索したところ、特に栄養膜細胞の血管壁への侵入と、栄養膜が2細胞層に分化していく過程でエリスロポエチンとエリスロポエチン受容体蛋白およびアロマターゼの分布が共存していることを見出した。アロマターゼの分布はその場でのエストロゲン合成を示唆する。更にエリスロポエチンは分泌型の蛋白であるので脱落膜から初期胚着床部位に移動する可能性も考えられる。本研究では、妊娠6週を前後する週における妊娠維持、特に胎盤形成に関与する栄養膜細胞の分化過程にエリスロポエチンとエストロゲンの関与が示唆された。

Key words: エリスロポエチン mRNA, エリスロポエチン受容体 mRNA, アロマターゼ mRNA, 妊娠6週, 脱落膜細胞, 栄養膜細胞

緒 言

エリスロポエチン (Epo) は赤血球産生に必須のサイトカインで、通常は成人の腎臓の皮質の間質細胞¹で産生され、血中に分泌されて骨髓へ行き、骨髓の未分化赤血球である赤血球前駆細胞や未熟な血球芽細胞にあるエリスロポエチン受容体 (EpoR) と結合して、Epo-EpoR 情報伝達により、未分化赤血球を細胞死から保護し、その増殖と赤血球への分化を促進して血液中に放出する²。Epo は胎児期では胎児肝臓で産生される。また、腎摘出後の患者では肝臓で産生されていることも知られている³。

エリスロポエチンの機能はEpoあるいはEpoR遺伝子欠損マウスにおいて、成人型血球形成⁴以外にも、脳⁵や心臓⁶の器官形成にとって不可欠のものであることが証明された。ところが、これらの欠損

マウスは胎生13~14日で致死となるので、胎生後期以降成人においてどのような機能にEpoが関与しているかについてはノックアウトマウスで究明することは出来ない。近年になって、Epoは赤血球造血に関する腎・肝以外の器官や組織で産生されていることが報告され、Epo-EpoR 情報系は我々の体において多様な生理作用に関与していることが示唆される様になった。

子宮については非妊娠のマウス正常子宮腔内に抗Epo抗体を注入すると、子宮内膜の血管形成が阻害されること、さらに子宮内膜血管形成にはエストロゲンが関与していること、そしてマウス発情期の子宮内膜ではエストロゲン分泌量によってEpoが誘導され、そのEpoが血管形成にも関与していること等が明らかにされた⁷。Epoの分泌は腎・肝では低酸素になると低酸素誘導因子 hypoxia-inducible fac-

tor (HIF-1 α) を介して Epo 遺伝子が増強されるが⁸, マウスでは子宮や卵管でエストロジオールに依存して HIF-1 α が誘導され, それによって Epo 遺伝子が増強され分泌されることが明らかとなった^{9,10}.

妊娠子宮内膜での Epo の役割は, 妊娠マウスの子宮腔内に抗 Epo 抗体を挿入すると胚の脳形成障害¹¹を誘発したり, また, 胚が発生せず脱落膜の発育が阻止されることから¹², マウスの妊娠維持に Epo-EpoR 伝達系は必須のものであることが明らかとなった. このことに鑑み, 本研究ではヒトでの臨床材料を用いて妊娠週齢の異なった時期の人工妊娠中絶によって採取された子宮内膜における Epo と EpoR の mRNA およびエストロゲン合成酵素のアロマトラーゼの mRNA の発現を調べ, ヒトではどのような妊娠生理に関与しているかを明らかにすることを目的として研究を行った. 妊娠 6 週由来の子宮内膜では, これら 3 遺伝子の転写が高かったことから, 妊娠維持, 胎児発生にエリスロポエチン情報伝達がヒトにおいても重要なものであることが本研究で示唆された.

材料と方法

材料は2005年11月から2006年3月まで, および2007年8月から2007年9月までの人工妊娠中絶術後の子宮脱落膜を用いた. 被験者の同意を得て獲得した5週から8週までの子宮脱落膜20検体を対象とした.

1. 妊娠週数の算出

妊娠週数は経腔超音波像より算出した. 胎囊のみ確認できる場合は胎囊径より算出した. 胎囊径が短くても, 胎児心拍が確認できる場合は6週とした. 胎児が確認できる場合は胎児の頭殿長より算出した. 例えば, 5週の胎囊径は16~20 mm, 6週の胎囊径は21~26 mm, 7週の頭殿長は12~14 mm, 8週の頭殿長は15~19 mm である.

2. 妊娠子宮内膜の採取

術後標本をペニシリン・ストレプトマイシン入り培養液 DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A., D5796) に 8°C で保存した. 採取された標本を 0.25 mM リン酸緩衝液・0.9% NaCl 添加 (PBS) に入れ, ピンセットで採取標本から血液塊や異物を除去した. 一部を液体窒素により凍結標本として, 他の一部を免疫組織用に Zamboni 液にて固定した.

3. 総 RNA の抽出と cDNA の合成

液体窒素により凍結した組織 0.1 g に, TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A., 15596-026) を 1 ml 加え, ポリトロンホモジナイザー

(KINEMATICA, Littau, Switzerland, PT3100) を用いて組織破碎を 4°C で 30 分間行い, 以降の操作は invitrogen のプロトコールに従った. 分光光度計 (Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A., DU530) を用いて, 抽出した総 RNA の濃度を測定し, 1 μ g/ μ l に調整した. 逆転写酵素は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster city, U.S.A., 4374966) を使用し, プロトコールに従い cDNA の合成を行った.

4. 定量的 RT-PCR 法

primer-probe は TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) から選択し, 使用した. 用いた primer-probe は, 以下のものである.

Epo (Hs00171267_m1, prpbe 5'-atgggggtgcacgaatgtctctgcct-3'), EpoR (Hs00181092_m1, prpbe 5'-cccaccgccgggctctgaagcagaa-3'), CYP19A1 (Aromatase, Hs00240671_m1, prpbe 5'-tgttattgtgagagagacataaag-3'). また, 個体間の mRNA 量の補正には 18S rRNA を用い, primer-probe には TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents (Applied Biosystems, 4308329) を使用した. なお, Epo, EpoR, CYP19A1 の primer 配列と 18S rRNA の primer-probe の配列は, Applied Biosystems から情報公開が行われていない.

Applied Biosystems のプロトコールに従い, Platinum® qPCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen) と primer-probe, cDNA を総量 10 μ l に調整し, Fast Real Time PCR 7900HT Fast (Applied Biosystems) で PCR 反応を行った. 反応条件は, ① UDG incubation (50°C・2分) ② DNA polymerase 活性 (95°C・10分) ③ PCR (denature; 95°C・15秒, Anneal/Extend; 60°C・1分, 50cycle) である. それぞれの mRNA の発現量は, 各標本の内部標準である 18S rRNA mRNA 発現量との比較値として表した (図 1, 2, 6). 1 標本の資料で独立した 3 回の定量を行い, 各 1 標本についてそれぞれの平均と標準誤差を求め表示した (図 1, 2).

5. 蛋白抽出

液体窒素で凍結した組織片 0.4 g に, ST 緩衝液 (10 mM-Tris-HCl (pH 7.4), 320 mM sucrose, cocktail) を 1500 μ l 加え, ポリトロンホモジナイザーを用いて 3 分間冷却しながら粉碎した. エリスロポエチン受容体蛋白の陽性対照として, 前立腺癌細胞株 (PC3) 5×10^6 cell を超音波破碎した. 検体及び PC3 の lysate を遠心分離 (3000 rpm, 10分, 4°C) し, 上清を遠心チューブに移し, 卓上型超遠心機 (Beckman Coulter, Optima MAX) により超遠心 (48000rpm, 30分, 4°C) を行い, 膜成分を沈殿させ

た。上清（細胞質成分）を遠心チューブに回収し、膜成分には10 mM-Tris-HClを加えて溶解させた。膜成分はEpo 検出に用い、細胞質成分は β -actin 検出に用いた。

6. 蛋白定量

Protein assay kit (BIO RAD, Hercules, U.S.A. 500-0006) とマイクロプレートリーダー (BIO RAD, 170-6850) を用いて全ての検体の細胞質成分及び膜成分の総蛋白量を測定した。手順はBIO RAD 社のプロトコールに従った。

7. エストラジオール (E2) の測定

蛋白溶液（細胞質成分）550 μ l をRIA 法によって測定した。最終濃度は、細胞質内の蛋白量で補正する方がより正確と考えて組織の総蛋白量を測定し、その量で補正した。従ってE2/総蛋白 (pg/mg) で表示した。

8. Western blot 法

抽出した蛋白をトリス・HCl 緩衝液 (0.05 M-Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 6 % β -mercaptoethanol, 10% glycerol TB) を用いて5 μ g/ μ l に調整した。調整した蛋白について10% PAGEL[®] (アトー株式会社, Tokyo, Japan, NPU-10L) を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (200V, 80分) を行った。使用した蛋白量は膜成分100 μ g, 細胞質成分50 μ g である。電気泳動終了後, poly vinylidene difluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE, Billerica, U.S.A., IPVH00010) へ20V, 60分, 室温条件下で転写を行った。PVDF 膜は2 % 仔牛血清アルブミン (BSA)-TBS でブロッキング後, 各一次抗体と16時間, 4°Cで反応した。使用した一次抗体は, 抗EpoR ラビットポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A., sc-5624; 1:200) と抗 β -actin ラビットポリクローナル抗体 (BioLegend, San Diego, U.S.A.; 1:500) である。TB に0.9% NaCl 添加緩衝液 (TBS) で洗浄後, 二次抗体として Peroxidase 標識抗ラビット抗体 (Amersham Biosciences, Piscataway, U.S.A., W338085; 1:2000) を使用し, ECLTM Detection Reagents (Amersham Biosciences, W325452) と反応させた。反応の検出にはルミノ・イメージアナライザー (FUJIFILM, Tokyo, Japan, LAS-1000plus) を使用した。

9. 免疫組織染色

Zamboni 液で固定した標本は12~24時間後に25 % 蔗糖添加 PBS によって凍結保護を行った。PBS にて蔗糖を十分に洗浄後, OCT 液 (Sakura Finetek, Torrance, U.S.A., 4583) に包埋, 液体窒素で凍結した。凍結標本をクリオスタット (Leica, Nussloch,

Germany, JUNG CM3000) 7~10 μ m の厚さの切片とした。一次抗体は抗エリスロポエチン受容体抗体¹³ (1:50), 二次抗体は抗ビオチン化ラビット抗体 (Vector, Burlingame, U.S.A.; 1:200) を用い, 次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dako, Glostrup, Denmark; 1:300) でアビジン-ビオチン結合を行い, 発色には3 mgDAB (Dojindo, Kumamoto, Japan) と3 % H₂O₂ で反応させた。反応後対染色として Delafield Hematoxylin 液 (Merck, Darmstadt, Germany; 1:20) を用いた。

二重免疫染色: 抗体は抗マウスエリスロポエチン (R+D, Temecula, U.S.A., 1:50) と抗ラビットアロマターゼ (abcom, Tokyo, Japan; 1:100) を用いた。二次抗体は夫々FITC 標識抗ラビット抗体 (Molecular probe 488; invitrogen, Eugene, U.S.A.) と TexaoRed 標識抗マウス抗体 (Molecular probe 862) を用いた。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (BioRad 社 Radiance2100) を用いた。

10. 統計的処理

平均値で出した数値は Student's t-test で検定した。p<0.05以下を統計的有意とした。

結 果

1) エリスロポエチン mRNA の発現

妊娠5週から8週までの子宮内膜では, エリスロポエチン mRNA が発現している (図1)。各週毎の発現量には差があり, 各週の内膜ではEpo mRNA に個人差があるが, 週毎の発現量の平均値を比較すると, 6週の子宮内膜の発現量が他の週における発現量と比較して有意に高値を示した (p<0.05)。このことは5週から8週の子宮内膜はエリスロポエチン産生能力があり, かつ6週の子宮内膜ではエリスロポエチンの産生量が一番高いことが推測される。

2) エリスロポエチン受容体 mRNA の発現

妊娠5週から8週までの子宮内膜におけるエリスロポエチン受容体 mRNA の発現を調べたところ, 全ての週で発現が認められた (図2)。EpoR mRNA の発現量はEpo mRNA の発現量の10³ 倍高い。同一週内において個人差が認められたが, 6週の子宮内膜が5週および7週と比べて有意に発現量が高い (p<0.05)。

従って6週の子宮内膜ではEpo-EpoR 情報伝達系の機能が他週よりも高いことを示唆する。

3) エリスロポエチン受容体蛋白の発現

各週齢の子宮内膜におけるエリスロポエチン受容体蛋白の発現を Western blotting 法で検出した。エリスロポエチン受容体蛋白の発現バンドは, 5週と7週において2例中1例を除く5~8週の標本にお

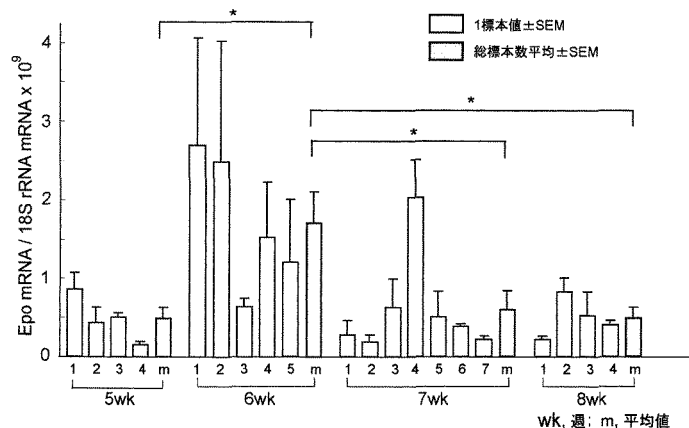


図1 各妊娠時期における正常子宮脱膜のエリスロポエチン mRNA の発現
 平均値 a, b, c, d 間に有意差あり。
 a, b, $p < 0.05$, b, c, $p < 0.05$, c, d, $p < 0.05$ (Student's t-test による)。
 wk, 週; m, 平均値

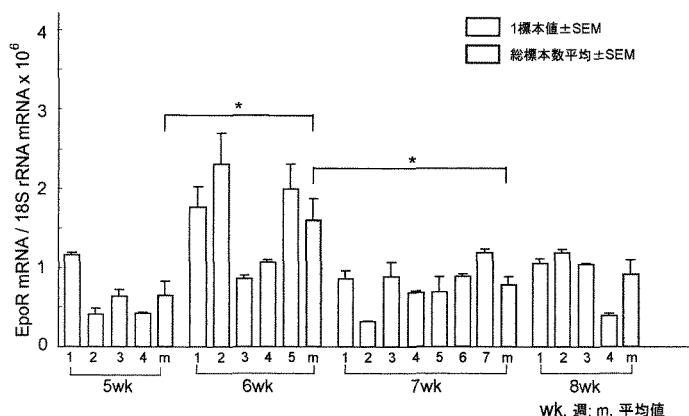


図2 各妊娠時期における正常子宮脱膜のエリスロポエチン受容体 mRNA の発現
 平均値 a, b, c 間に有意差あり。
 a, b, $p < 0.05$, b, c, $p < 0.05$ (Student's t-test による)。
 wk, 週; m, 平均値

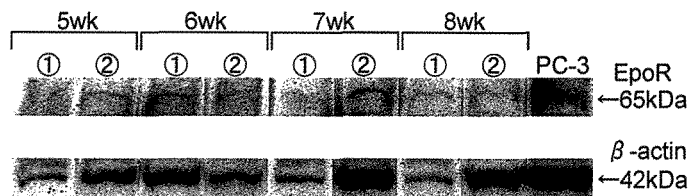


図3 各妊娠時期における正常子宮脱膜のエリスロポエチン受容体蛋白の発現
 EpoR 陽性対照である前立腺癌 (PC-3) 抽出液と同様に、全例において65 kDa の大きさの EpoR 蛋白のバンドを認めた。β-actin も全例に認められ、標本の変性は認められなかった。
 wk, 週

いて、種々の濃淡を示して認められた。個々の試料の内部標準である β-actin のバンドを全標本に検出した。(図3)。

4) 妊娠子宮脱膜組織における Epo 反応部位の証明

週数 5～10週までの臨床材料から各 2 例を抽出し、抗 EpoR 抗体による免疫染色を施した。脱膜細胞、栄養膜細胞、血管内皮細胞等が陽性反応を示した。特に顕著に認められたのは、6 週の栄養膜細胞の血管壁侵入像 (図 4 a) で栄養膜細胞層の細胞が陽性反応を示した (図 4 b)。さらに 7 週になると栄養膜細胞層の細胞と栄養膜合体細胞層の細胞 (図 4 c) に陽性反応を示しているのを認めた (図 4

d)。また、出来上がった絨毛内の胎児組織由来の血管内皮細胞が (図 4 e) 陽性反応を示した (図 4 d)。更に週数が加わると、陽性反応を示す栄養膜合体細胞の増殖が顕著となった (図 4 f)。

5) 妊娠子宮内膜におけるアロマターゼ mRNA の発現

アロマターゼ mRNA の発現は、検査した全ての子宮内膜で認められたが、極端に低いものから高いものまで発現量の差が大であった (図 5)。アロマターゼはプロゲステロンやテストステロンから E2 に変換する酵素である。従って、アロマターゼ mRNA が妊娠子宮内膜に発現していることは、子宮内膜が E2 を産生していることを意味する。子宮内のアロマ

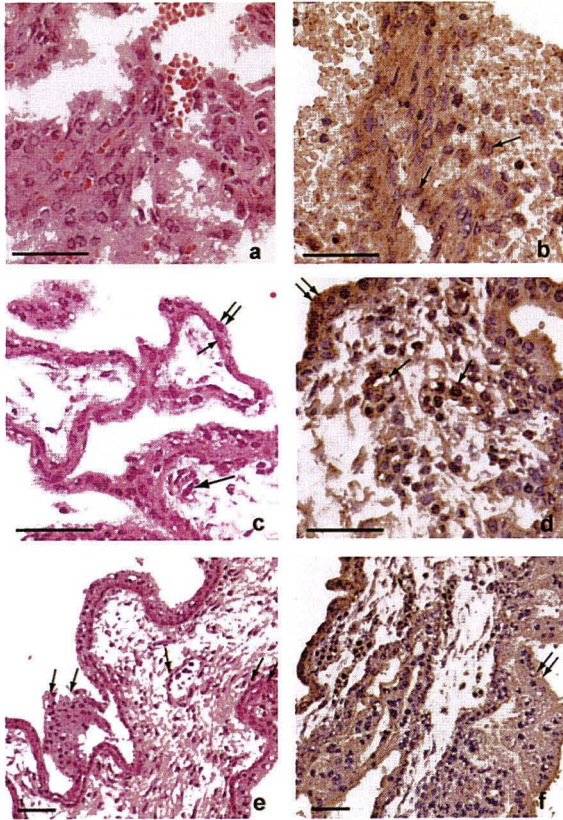


図4 妊娠6週の子宮脱膜組織におけるEpo反応部位
図a, c, eはH・E染色標本, 図b, d, fは抗EpoR抗体で染色した標本.
a. 多数の細胞性栄養膜細胞と血管侵入による赤血球の流失.
b. 抗EpoR陽性反応を示す細胞性栄養膜細胞(矢印).
c. 細胞性栄養膜(矢印)と合体体栄養膜細胞(二重矢印)と胎児血管(大矢印).
d. 抗EpoR陽性反応を示す合体体栄養膜細胞(二重矢印)と胎児血管内皮細胞(矢印).
e. 合体体栄養膜細胞層(二重矢印)と胎児血管(矢印).
f. 抗EpoR陽性反応を示す合体体栄養膜細胞層(二重矢印).
a~d, e~fはそれぞれ同一倍率で, 棒は50 μ mを示す.

ターゼは血中で運搬されて来る androstenedione からE2を産生している¹³.

6) エストラジオール(E2)含量

各週の子宮内膜から2標本を選び, そのE2量を測定した(表1). 各週数の標本の数値の差が大きいが, 5週から8週に週齢が上がるに従い, E2の量が上昇している傾向が認められる. E2値は細胞質成分の蛋白含有量で補正した.

7) Epo mRNAとEpoRおよびaromatase mRNAとの関連性

表1 正常子宮脱膜細胞組織におけるエストラジオール(E2)の含有量

標本	E2 濃度 (pg/ml)	蛋白濃度 (mg/ml)	E2/総蛋白 (pg/mg)
5wk-1	2730	3.8	718
5wk-2	410	3.5	117
6wk-1	1060	3.8	279
6wk-2	10100	4.0	2525
7wk-1	4870	4.6	1059
7wk-2	2420	3.8	637
8wk-1	11800	4.1	2878
8wk-2	3050	3.0	1017

wk, 週

Epo mRNAの発現量と標本週数を考慮に入れて, 三群に分類した. 数週が少なくEpo mRNAが低発現(0.16~0.86)のもの(A), 6週を中心にEpo mRNAが高値(1.20~2.70)を示したもの(B), 数週が多くEpo mRNAが低発現(0.21~0.82)のもの(C), とに群分けしEpoR mRNAとaromatase mRNAの発現量も並記した(図6). A, BおよびC群のそれぞれの平均値を比較すると, B群の平均値はA群およびC群と比べ, 有意に高値を示した. ($p < 0.01$, 図6). 従ってEpo, EpoRおよびaromataseのmRNAが, 6週を中心に高発現を示すことが分かる. この結果は, 6週を中心にEpo-EpoRの機能が高まっていることを示唆する. また, aromatase mRNAが高いことは, この妊娠週数の子宮内膜でE2の合成が高まっていることを示唆する.

8) 正常妊娠子宮内膜におけるEpoとaromataseの共発現

5週, 6週および7週の脱膜組織に二重染色を施した. 5週では脱膜細胞, 栄養膜細胞にEpoとaromataseが共存していた. 6週から7週になると栄養膜細胞に, 特に顕著な共存像が認められた. 6週の脱膜膜での所見を示す.

aromataseは細胞性栄養膜細胞に強く発現している(図7a). Epoも細胞性栄養膜細胞に発現している(図7b). 合一させると, aromataseとEpoが共存しているのが判明した(図7c). また, 栄養膜合体体層へと分化する部位にaromataseが強発現している(図7c). 細胞性栄養膜細胞の集合部を見ると, aromataseは栄養膜細胞に発現し, 細胞によって発現に強弱が認められる(図7d). Epoも同様に発現に強弱をもって細胞性栄養膜細胞に認められた(図7e). 合一させると細胞性栄養膜細胞に共発現している. 特に強発現を示す細胞は侵入している細胞性栄養膜細胞である. aromataseは栄養膜細胞

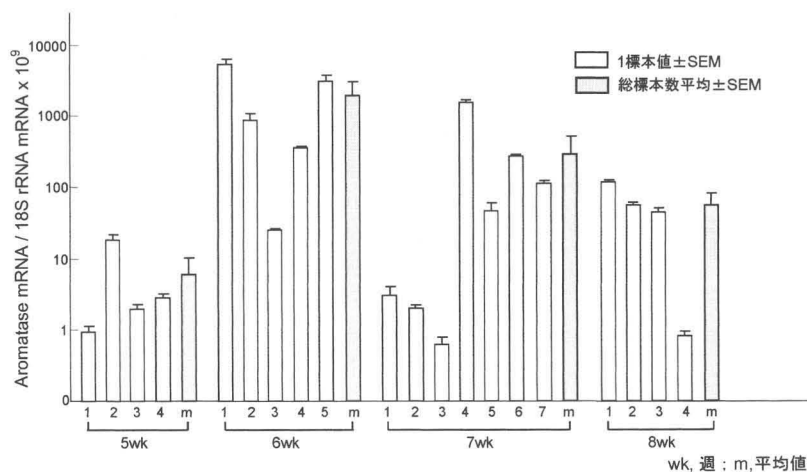


図5 各妊娠時期における正常子宮脱落膜のアロマトラーゼ mRNA の発現
縦軸は対数値. 各棒上の数字は SE を表す. 偏値が大きく, 有意差はなかった.

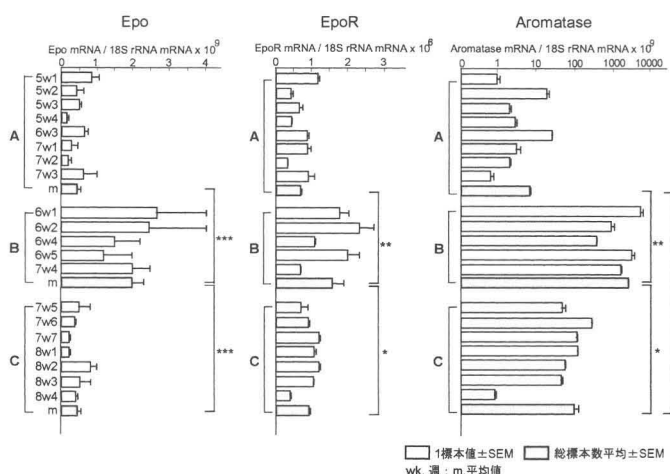


図6 正常子宮脱落膜のエリスロポエチン mRNA, エリスロポエチン受容体 mRNA, アロマトラーゼ mRNA の群分けによる発現量の比較
Aromatase の各棒上の数字は SE を示す. 横軸は対数軸である. 平均値の間に有意差を認めた. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Student's t-test による).

表層の表面に単独で強発現している (図7 f).

考 察

Epo mRNA と EpoR mRNA が人工妊娠中絶により得られた5週から8週の正常子宮脱落膜組織に発現し, また EpoR 蛋白も存在していることが明らかとなった. この時期の脱落膜組織の Epo 情報は自分分泌によるものか, あるいは傍分泌, ホルモン作用によって機能しているかは本実験からは決定出来ない. 重要なことは6週を中心とした脱落膜組織において他週と比べて有意に両 mRNA が高値を示したことである. この事実はこの妊娠6週に胎児を取り巻く環境, 脱落膜反応あるいは胎盤形成に係る過程に Epo 機能を上昇させる事象が起こっていることが推測される.

アロマトラーゼはテストステロンやアンドロゲンを E2 に変換する酵素であるが, アロマトラーゼ mRNA が正常子宮脱落膜組織に発現していることは, E₂ が in situ に産生されていることを示し, 基質は血中の androstenedione である¹⁴と考えられる. アロマ

ターゼと Epo は二重免疫染色により脱落膜細胞や栄養膜細胞に共存していた (図7). 子宮内膜では Epo は E2 によって分泌が上昇することがマウスで報告されている⁷. 本研究では脱落膜内の Epo 量を測定していないが, Epo mRNA, EpoR mRNA およびアロマトラーゼ mRNA が6週を中心とする週齢の脱落膜に3 mRNA とともに他週の発現量よりも有意に高値を示した (図6). 従って, この週数の脱落膜には Epo の分泌が他週と比べて有意に上昇していることが推測される. また, 6週を中心とする脱落膜内のアロマトラーゼ mRNA 発現量は他週の発現量と比べると有意に高値を示した. このことから, アロマトラーゼが Epo mRNA 発現の増強を誘発するには相当のアロマトラーゼが必要であることが示唆される. Epo は EpoR を発現している細胞の EpoR と結合してその細胞をアポトーシス死から保護して, JAK2-STAT5 経路を介して細胞増殖する^{15,16}. 6週の脱落膜での顕著な事象は栄養膜細胞の増殖とそれらの母体血管壁への侵入である (図4, 図7). EpoR (図4), Epo および aromatase (図7) は細胞性栄

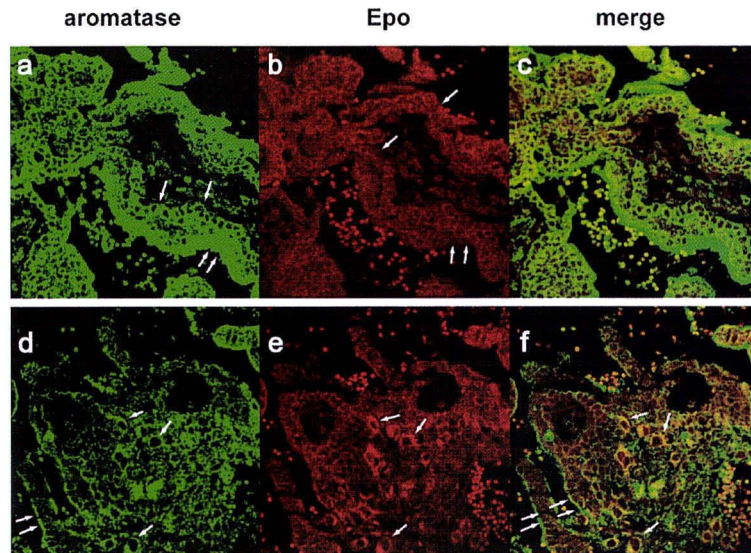


図7 6週正常子宮脱落膜のエリスロポエチンとアロマトラーゼの共存
 a. 細胞性栄養膜細胞 (矢印) の表面と合体栄養膜細胞表面 (二重矢印) に強くアロマトラーゼの発現が認められる。
 b. a と同様の部位にエリスロポエチンが認められる。
 c. アロマトラーゼとエリスロポエチンの共存が認められる。
 d, e, f は絨毛の横断と縦断を含む図を示す。
 d. アロマトラーゼを強く発現する細胞性栄養膜細胞 (矢印) と合体栄養膜細胞表面 (二重矢印)。
 e. エリスロポエチンを強く発現する細胞性栄養膜細胞 (矢印)。
 f. アロマトラーゼとエリスロポエチンの共存する細胞 (矢印)。アロマトラーゼの強発現する合体栄養膜細胞表面 (二重矢印)。
 倍率は×40。

養膜細胞に共存していた。このことは細胞性栄養膜の増殖と侵入さらに細胞性から合体栄養膜細胞への過程の誘導に Epo が関与して細胞性栄養膜の増殖を促しているのではないかと考えられる。この胎盤形成の初期の過程に Epo 情報が血管壁や栄養膜の細胞をアポトーシス死から救っている可能性も考えられる。結論として Epo 情報はヒトの妊娠過程で栄養膜細胞の分化に関与している可能性がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接の御指導、御校閲を賜りました近畿大学安田佳子先生に深謝致します。

文 献

1. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1998) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71: 524-527
2. Krantz SB (1991) Erythropoietin. *Blood* 77: 419-434
3. Fried W (1972) The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood* 40: 671-677
4. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin receptor. *Cell* 6: 83: 59-67
5. Yu X, Shacka JJ, Eeles JB, Suarez-Quian C, Przgodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin C-h, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KS, Constantin F and Noguchi CT (2002) Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129: 505-516
6. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML (1999) Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126: 3597-3605
7. Yasuda Y, Musha S, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R (1998) Estrogen-development production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 273: 25381-25387
8. Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med* 131: 207-214
9. Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R (2000) Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1248
10. Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M and Sasaki R (2000) The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-development manner. *Am J Physiol. Endocrinol Metab*, 278: E1038-E1044
11. Yasuda Y, Matuo T, Nagao M (2004) Blockade of erythropoietin signal at the early postimplantation period inhibits the development of decidua and embryo in mice. *Cong Anom* 44: 9-17
12. Yasuda Y, Sasaki T, Takagawa M, Maeda M,

- Yasuda M, Atsumi T, Fujita H (2007) Erythropoietin contributes to implantation: ectopic hemoglobin synthesis in decidual cells of mice. *Cong Anom* 47: 22-33
13. Yasuda Y, Nagao M, Okano M, Masuda S, Sasaki R, Konishi H, Tanimura T (1993) Localization of erythropoietin and erythropoietin-receptor in poetinplantation mouse embryos. *Develop. Growth & Differ* 35: 711-722
14. Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ, Shimada K and Inoue M (2000) In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology* 141: 3852-3861
15. Ihle JN (1995) Cytokine receptor signaling. *Nature* 377: 591-594
16. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF (1993) Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81: 2223-2236