

# 自然流産脱落膜組織のエリスロポエチン受容体発現に関する研究

釣谷 充弘 島岡 昌生 土井 裕美 塩田 充 星合 昊

近畿大学医学部産科婦人科学教室

## 抄 録

ヒトの妊娠初期子宮内膜においてエリスロポエチン情報がどのような役割を担っているかを究明する目的で本研究を行った。自然流産に至った妊娠5週から10週の子宮脱落膜組織のエリスロポエチンとエリスロポエチン受容体 mRNA の発現およびエリスロポエチン受容体蛋白の発現をそれぞれ定量 RT-PCR 法と Western blotting により測定した。脱落膜にはエリスロポエチンとエリスロポエチン受容体 mRNA およびエリスロポエチン受容体蛋白を認めた。さらに脱落膜組織におけるエリスロポエチン応答局所を抗エリスロポエチン受容体抗体を用いて免疫組織学的に検索した。検索した各週の脱落膜では脱落膜細胞、栄養膜細胞および血管内皮細胞と子宮腺上皮細胞が陽性反応を示した。これら陽性反応を示した細胞に、空胞変性を示す子宮腺上皮や合体栄養膜に無核部位を認めた。従ってエリスロポエチン情報は脱落膜の胎盤形成へと分化の過程で必要な情報と考えられる。自然流産に至る妊娠はエリスロポエチン情報量が低いことに起因するのかもしれない。3例中1例の7週脱落膜にエリスロポエチン受容体が発現していた発生停止の状態のヒト胚とその付属物を認めた。このことから、胚の生存と発生進展さらに卵黄囊の機能にエリスロポエチン情報が必要と考えられる。結論として、エリスロポエチン情報は初期妊娠維持母体内環境と胚発生に必須の情報であると考えられる。

**Key words:** 自然流産脱落膜, エリスロポエチン mRNA, エリスロポエチン受容体 mRNA, ヒト初期胚, 卵黄囊, 栄養膜細胞

## 緒 言

エリスロポエチン (Epo) は赤血球造血因子でホルモンの一種である。Epo は他の造血因子と異なり、血球細胞で産生されず、腎<sup>1</sup> や肝臓<sup>2</sup> で産生され、血液中に分泌されて骨髄へ行き、骨髄内の赤血球前駆細胞の表面にあるエリスロポエチン受容体 (EpoR) と結合してそれらの細胞を増殖させ、ヘモグロビンを有する赤血球へと導く。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。すなわちマウス胚<sup>3</sup>、ラット脳<sup>4</sup>、ヒトの脳<sup>5</sup>、ヒト脾臓<sup>6</sup>、肺臓<sup>6</sup>、マウス精巣<sup>7</sup>、マウスの子宮と卵巣<sup>8</sup>、マウス卵管<sup>9</sup> などでの産生が報告されている。EpoR はマウス胚<sup>3</sup>、ヒトの血管内皮細胞<sup>10</sup>、ヒトの血管壁平滑筋<sup>11</sup>、マウス脱落膜細胞<sup>3</sup>、およびヒト胎盤栄養膜細胞<sup>12</sup> で発現していることが報告された。これらの腎外の Epo 産生や造血細胞以外での

EpoR の産生部位が多岐に分布していることから、Epo の機能は従来より考えられていたよりも広汎な生理作用に係わっていることが示唆され、これらの非造血組織での Epo-EpoR 情報伝達による Epo の機能を究明することは、非造血臓器における Epo の機能と機能不全に Epo 情報が関与している可能性を推測することに繋がる。Epo-EpoR 情報伝達の発現の有無を証明する為には、組織内における EpoR 発現部位を免疫組織化学的方法で検出し、さらにこの免疫反応性 EpoR が実際に EpoR 蛋白であることの証明が必要である。

本研究は、自然流産による子宮脱落膜組織の Epo とその受容体の mRNA の発現量と EpoR 蛋白発現、さらに Epo 応答部位の局在を分析することで自然流産の運命に至った子宮内膜での Epo-EpoR 系の妊娠維持の役割について考察することを目的としている。自然流産による脱落膜組織での Epo 発現量

表1 自然流産脱落膜におけるエリスロポエチン応答部位

対象	部位
胚	二層性胚の胚盤葉上層及び胚盤葉下層
付属物	羊膜上皮 1次卵黄囊膜
脱落膜	脱落膜細胞 腺上皮細胞 血管中膜平滑筋細胞 血管内皮細胞
絨毛	栄養膜細胞層 栄養膜合体細胞層 胎児血管内皮細胞

は、人工妊娠中絶による発現量よりも少ないこと<sup>13</sup>、Epo 応答細胞の発現は脱落膜細胞、栄養膜細胞に認められた。さらにヒト胚とその付属物と血球成分にも認められた。本研究で Epo-EpoR 系は妊娠母体環境維持と胚発生に寄与していることが示唆された。

### 材料と方法

材料は2005年11月から2006年3月までの進行流産または稽留流産に至った症例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10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

妊娠週数は最終月経と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。

#### 2. 流産子宮内膜の採取

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 に保存 (8°C) 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、残りは免疫組織用に Zamboni 液にて固定した。また保存期間の長いものは Zamboni 液にて固定した。標本が多量に採取出来なかった場合は凍結のみとした。

#### 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) を 1 ml 加え、ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA) を用いて組織破碎 (30分, 4°C) を行い、以降の操作は Invitrogen のプロトコールに従った。分光光度計 DU530 (Beckman) を用いて、抽出した total RNA の濃度を測定し、1 µg/µl に調整した。逆転写には High-Capacity

cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用し、プロトコールに従い cDNA の合成を行った。

#### 4. リアルタイム PCR 法

primer-probe は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) から選択して使用した。用いた primer-probe は Epo (Hs00171267\_m1, probe: 5'-atgggggtgcacgaatgtcctgcct-3') と EpoR (Hs00181092\_m1, probe: 5'-cccaccgcccggctctgaagcagaa-3') である。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) を使用した。なお、Epo, EpoR の primer 配列と 18S rRNA の primer-probe の配列は、Applied Biosystems のものを使用した。

Platinum qPCR Superr Mix-UDG with ROX (Invitrogen) と primer-probe, cDNA を total 10 µl に調製し、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。発現量は同一標本における 18S rRNA mRNA の発現量との比で算出した (図1, 図2)。

#### 5. 蛋白抽出

組織片 0.4 g を液体窒素で凍結し、ST Buffer (10 mM-Tris-HCl (pH 7.4), 320 mM sucrose, cocktail) を 1500 µl 加え、ポリトロンホモジナイザーを用いて3分間冷却しながら破碎した。EpoR 蛋白の陽性対照として 5×10<sup>6</sup> cell の前立腺癌細胞株 (PC3) 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 Optima MAX (Beckman) により超遠心 (48000 rpm, 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、β-actin の検索を行い、膜成分は 10 mM-Tris-HCl を加えて溶解させて EpoR の検索に用いた。

#### 6. Western-blotting 法

抽出した蛋白を sample buffer (0.05M-Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 6% β-mercaptoethanol, 10% glycerol) を用いて 5 µg/µl に調整した。調整した蛋白 100 µg について 10% PAGEL (NPU-10L, アト一株株式会社) を用いて SDS 電気泳動 (200V, 80分) を行った。使用した蛋白量は膜成分 100 µg, 細胞質成分 50 µg である。電気泳動終了後、PVDF 膜 (MILLIPORE) へ 20V, 90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) でプロ

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; 1:200) と抗β-actinラビットポリクローナル抗体 (BioLegend; 1:500) である。TBS溶液で洗浄後、二次抗体として Peroxidase 標識抗ラビット抗体 (Amersham Biosciences; 1:2000) を使用し、enhanced chemiluminescence (ECL) Detection Reagents (Amersham Biosciences) と反応させた。バンドの検出はルミノ・イメージアナライザー (LAS-1000plus, FUJIFILM) で行った。

7. 免疫組織染色

Zamboni 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) で包埋し、液体窒素で凍結した。凍結標本をクリオスタット (Leica, JUNG CM3000) を用いて7~10μm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3 (1:50)、二次抗体は抗ビオチン化ラビット抗体 (Vector; 1:200) を用いた。次いでペルオキダーゼ結合ストレプトアビジン (Dako; 1:300) と反応させた。発色には3mgジアミノベンチジン (DAB, Dojindo) と3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で反応させた。反応後対染色として Delafield Hematoxilin 液 (Delafield, Germany; 1:20) を用いた。

8. 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を統計的有意とした。

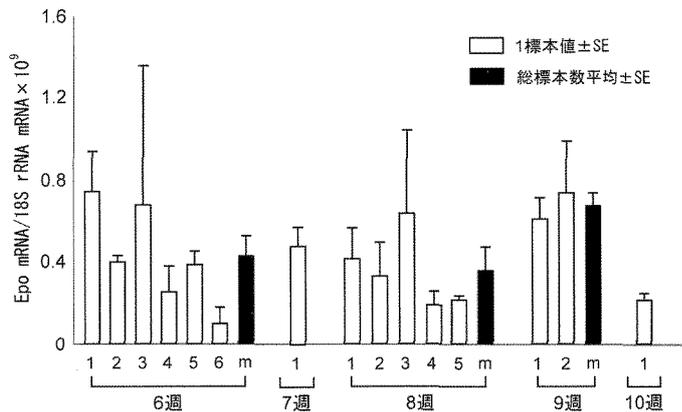


図1 自然流産子宮内膜における Epo mRNA の発現  
標本は週毎に採取個体別で表している。1標本につき独立した3実験群の値の平均として表した。縦軸は“材料と方法”に述べた様に内部標準として18SrRNAmRNAの発現量との比較値として表している。

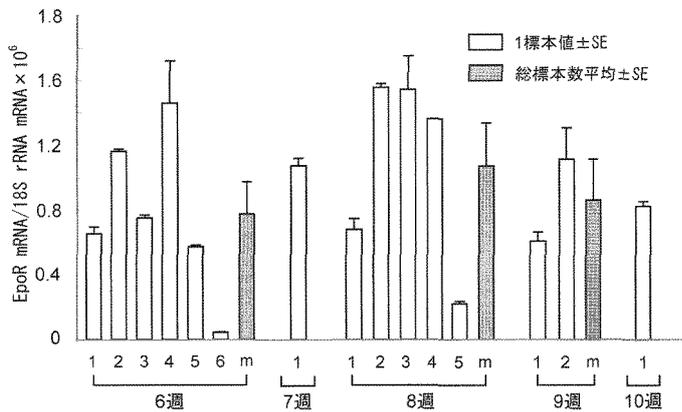


図2 自然流産子宮内膜における EpoR mRNA の発現  
標本は図1で表したものと同一のRNAを使用した。1標本につき独立した3実験群の値の平均値として表した。縦軸は“材料と方法”に述べた様に内部標準として18SrRNAmRNAの発現量との比較値として表している。

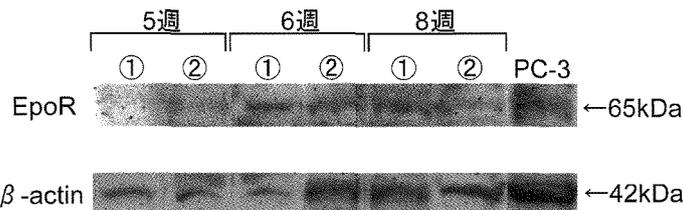


図3 自然流産子宮内膜における EpoR 蛋白の発現  
妊娠5週の①の標本の他は陽性対照である前立腺癌細胞様 (PC-3) 抽出液と同様に65kDaの大きさのEpoR蛋白のバンドを有している。内部標準の対照としてのβ-actinは全例42kDaの大きさの陽性バンドを示した。

## 結 果

### 1. Epo mRNA の発現

Epo mRNA 発現量は同一週数でも標本測定値の差が大きい。複数例採取出来た妊娠6週、8週および9週の子宮脱落膜では、個体差が大きく、各週の間におけるEpo mRNA量の平均値の間に有意差を認めなかった( $p=0.586$ )。妊娠6週から9週のEpo mRNA発現量の平均値は $0.38\sim 0.59$  Epo mRNA/18SrRNAmRNA $\times 10^9$ の範囲であった(図1)。

### 2. EpoR mRNA の発現

EpoR mRNAの発現量は同一週数でも発現量に著しく差がある。さらに妊娠6週、8週および9週の複数例採取出来た標本では、子宮内膜の発現量の平均値に有意差を認めなかった( $p=0.256$ )。EpoR mRNAの発現量は同一標本のEpo mRNAの発現量と比べて $10^3$ 倍高かった(図1, 2)。また妊娠6週から9週のEpoR mRNAの発現量の平均値は $0.70\sim 1.06$  EpoR mRNA/18Sr RNAmRNA $\times 10^6$ の範囲であった(図2)。

### 3. EpoR 蛋白の証明

EpoRは細胞膜上にあるので、妊娠5週から8週の採取標本各2例について膜成分蛋白のWestern-blotting法によりEpoR蛋白を検出した。妊娠5週の1例の他は前立腺癌細胞株PC-3の蛋白抽出液の陽性反応を示している65 kDaのところに検出でき

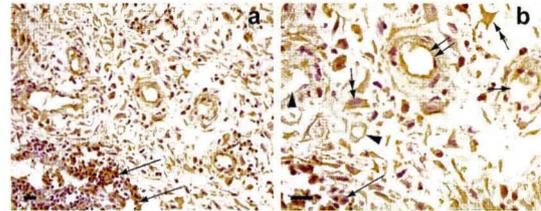


図4 妊娠5週自然流産脱落膜組織内のEpo応答細胞

- リンパ管, 血管が認められ, 細胞間の間隙が広い。脱落膜内のEpoR陽性反応を示している子宮腺上皮細胞(矢印)
- aの強拡大。Epo陽性反応を示している脱落膜細胞(縦二重矢印), 血管内皮細胞(短矢印, 横二重矢印), リンパ管(矢頭), 子宮上皮細胞(長矢印)

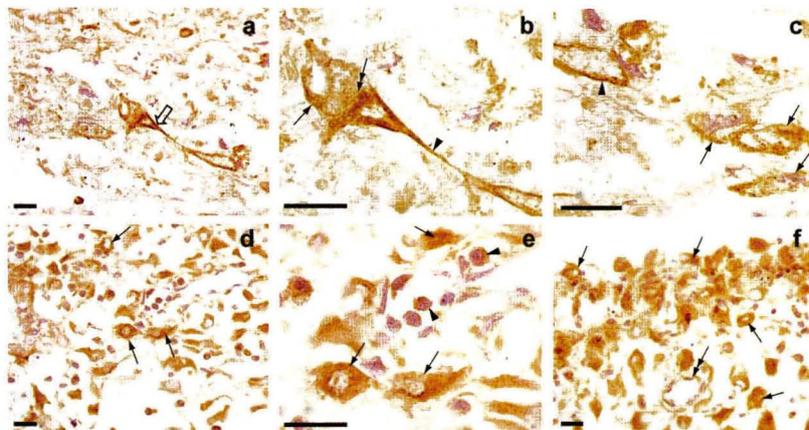


図5 妊娠7週自然流産脱落膜組織内のEpo応答細胞

- 脱落膜内のEpoR陽性反応を示した胚(矢印)
- 胚の強拡大。羊膜細胞(小さい矢印), 2層性胚盤(二重矢印), 1次卵黄囊(矢頭)を示す
- 切断された1次卵黄囊(矢頭)と胚外体腔囊胞(矢印)
- 脱落膜細胞(矢印)
- dの強拡大。核の染色性消失した脱落膜細胞(矢印)と血管内の顆粒性血球細胞(矢印)
- 空胞変性している脱落膜細胞(矢印)と血管内皮細胞(二重矢印)。棒は20 $\mu$ mを示す

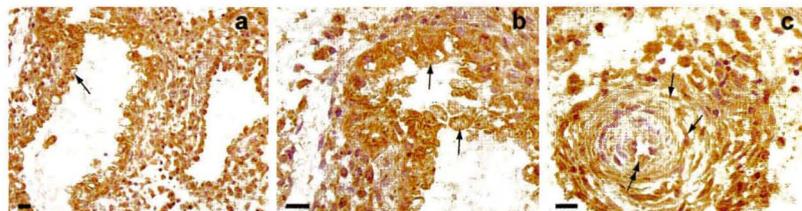


図6 妊娠8週自然流産脱落膜組織内のEpo応答細胞

- 子宮腺上皮細胞(矢印)
- aの強拡大で, 空胞変性を示す上皮細胞(矢印)
- 血管中膜の平滑筋細胞(矢印)と内皮細胞(二重矢印)。棒は20 $\mu$ mを示す

た。また内部標準の  $\beta$ -actin のバンドの強度と比べると、陰性反応を示した妊娠 5 週の標本は  $\beta$ -actin の変性は認められなかったのが標本の RNA が変性していないことを示す。また自然流産脱落膜組織には EpoR 蛋白が発現していた (図 3)。

#### 4. 脱落膜組織内の Epo 応答細胞

妊娠 5 週～10 週の脱落膜組織標本について免疫染色標本を分析した。妊娠 5 週 (図 4) から 7 週 (図 5) では脱落膜の構成は子宮腺、脱落膜細胞、血管内皮細胞および血球などの間質細胞が認められた。妊娠 8 週 (図 6) から 9 週 (図 7) の脱落膜では 7 週の脱落膜の構成に栄養膜細胞の分化が認められ、10 週 (図 8) に至るとさらに栄養膜細胞の細胞層と合体体層が認められた。EpoR 陽性反応を示したのは子宮腺上皮細胞、脱落膜細胞、血管内皮細胞および栄養膜細胞であった。

a. 妊娠 7 週の子宮内膜の組織像は図 5 a-f に代表される様に細胞数の少ない像を示した。その内の 1 標本において、胎生 2～3 週齢に相当する胚を見出した (図 5 a)。周辺には EpoR 陽性反応を示す脱落膜細胞も少なく、血球や線維細胞などの細胞分布も疎である (図 5 a)。胚では胚盤の上層と下層の 2 葉と羊膜上皮細胞さらに 1 次卵黄囊の膜上皮細胞に EpoR 陽性反応を認めた (図 5 b)。さらに下方をた

どると胚外体腔の囊胞上皮に EpoR 陽性を認めた (図 5 c)。胚の認められなかった妊娠 7 週の組織で、EpoR 陽性反応の脱落膜細胞 (図 5 d) のほかに核が染まらず、空胞変性している脱落膜細胞が認められた (図 5 e, f)。さらに好中球やマクロファージ様細胞など顆粒球が散在していた (図 5 e, f)。EpoR 陽性反応の血管内皮細胞を認めた (図 5 f)。

b. 8 週脱落膜では、子宮腺上皮の変性が顕著であった。図 6 の a, b で示す様に子宮腺上皮は EpoR 陽性であるが、上皮細胞が空胞化し、脱落して腺腔内に離脱するのが認められた (図 6 a, b)。EpoR 陽性の小動脈の周辺の平滑筋細胞を認めた (図 6 c)。また、血管内腔の内皮細胞は一部 EpoR 陽性反応、一部 EpoR 陰性反応を示す細胞を認めた (図 6 c)。

c. 妊娠 9 週の脱落膜では大型のマクロファージや好中球が集積しているのが顕著に認められた。これらの血球細胞は EpoR 陽性を示した (図 7 a, b)。

d. 妊娠 10 週で EpoR 陽性を示す栄養膜細胞が顕著に認められた。栄養膜細胞層 (図 8 a, b, c) も合体体層も EpoR 陽性を示したが、一部の合体体層では核が消失して認められなかった (図 8 b, c)。

#### 考 察

本研究では妊娠 5 週から 10 週の自然流産の子宮脱落膜組織が Epo および EpoR の転写を発現していて、EpoR 蛋白も存在していた、従って脱落膜組織内に Epo-EpoR 情報伝達系が存在していることが明らかになった。さらに、脱落膜組織の構成成分である脱落膜細胞、血管内皮細胞、血管中膜平滑筋細胞および栄養膜細胞が抗 EpoR 抗体で陽性反応を示したので、これらの細胞において Epo 情報伝達系が何らかの機能をしていることが推測された。妊娠 6 週から 10 週の脱落膜組織における Epo mRNA の発現量は各個体間の偏差が大きく、週毎の発現量平均

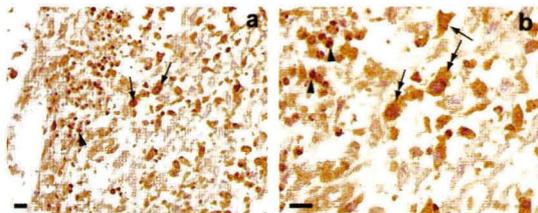


図 7 妊娠 9 週自然流産脱落膜組織内の Epo 応答細胞  
a. 大型のマクロファージ様細胞 (矢印), 好中球 (矢頭)  
b. a の強拡大. マクロファージ様細胞 (二重矢印), 好中球 (矢頭), 脱落膜細胞 (矢印). 棒は 20  $\mu$ m を示す

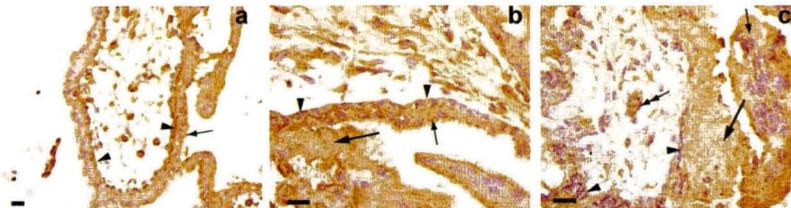


図 8 妊娠 10 週自然流産脱落膜組織内の Epo 応答細胞  
a. 栄養膜細胞層の細胞 (矢印), 栄養膜合体体細胞 (矢印)  
b. 絨毛部の強拡大図. 栄養膜細胞 (矢頭), 合体体層 (小さい矢印), 無核の合体体細胞質 (大きい矢印)  
c. 胎児の血管のある絨毛部の強拡大図. 胎児の血管内皮細胞 (二重矢印), 栄養膜細胞層 (矢頭), 核のある合体体層 (小さい矢印), 無核の合体体層 (大きい矢印)

値を比較すると、妊娠9週の脱落膜組織の発現量は他の週と比べ高値を示したが、統計的に有意差は認めなかった(図1)。この発現量を正常子宮内膜の同週数のEpo mRNAの発現量と比べると有意に低値を示した<sup>13</sup>。一方EpoR mRNAの発現量については、個々の標本間に偏差は存在したが、週数に関係なく発現量は全体を通じて0.80~1.20の発現量を示し、Epo mRNAの発現量の10<sup>3</sup>倍量高かった。EpoおよびEpoR mRNAの自然流産脱落膜組織の発現量についてみると、Epo mRNAは週により発現量に差異が認められる傾向を示したが、EpoR mRNAの発現は妊娠6週から10週を通じて一定量の発現を保持している傾向を認めた。このことは例えEpo産生量が低くてもEpoRは変動が少ないので、血中に循環しているEpoを利用することが可能なのはEpo情報伝達は可能であると考えられる。

Epo応答細胞は自然流産脱落膜組織では子宮腺上皮細胞、脱落膜細胞、血管内皮細胞、および栄養膜細胞などである。これらの細胞の細胞質に抗EpoR抗体陽性反応を認めたが、同時に、退行変性を示している細胞も認めた。妊娠6週から10週での自然流産脱落膜組織におけるEpoの発現量が人工妊娠中絶子宮脱落膜と比べて低値を示し<sup>13</sup>、さらにEpoR発現量は妊娠6週から10週を通じて変動がなかった事実からエリスロポエチン応答細胞のEpo需要に対して供給が少なく、その為に応答細胞に退行変性が誘導されたのではないかと考えられる。

マウスでは着床直後6~8日胚においてマウス胚体と卵黄嚢や羊膜さらに胎盤形成に関する巨大細胞等がEpoとEpoRを発現していた<sup>3</sup>。特に造血器官となる卵黄嚢や胚の神経上皮にEpoRが強発現していたことは、これらの器官形成にEpoが関与していることが示された<sup>3</sup>。また、着床直後妊娠4日のマウス子宮腔内に抗Epo抗体を注入して、子宮腔内のEpo情報を除去すると胚の致死と胎盤形成不全が誘導された<sup>15</sup>。マウスにとってEpo情報は脱落膜形成とマウス胚発生に必須であることが判った様にヒトでも、Epo情報は妊娠維持に必須と考えられる。

妊娠7週の脱落膜組織3例中1例において、細胞分布の少ない部位(図5a)に胚が存在していた。胚の発生は二層性胚(図5b)であった<sup>16</sup>のでこの胚は3週齢前後まで発生して、以後発生停止の状態で子宮脱落膜に生存していたと考えられる。さらに、胚の周辺に好中球やマクロファージ様細胞の集塊を認めたので、これらの細胞は脱落膜内の変性細胞を排除していると考えられる。結論として、妊娠初期の胚発生と胎盤形成を含む妊娠維持の生理にEpo情報が必要であることが判明した。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導ならびに御校閲を賜り、直接の御指導を頂いた安田佳子先生に厚くお礼を申し上げます。

## 文 献

1. Krantz SB (1991) Erythropoietin. *Blood* 77: 419-434
2. Koury S, Bondurant M, Koury M (1998) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71: 524-527
3. Yasuda Y, Nagao M, Okano M, Masuda S, Sasaki R, Konish H, Tanimura T (1993) Localization of Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in Postimplantation Mouse Embryos. *Dev Growth Differ*: 711-722
4. Yu X, Shacka JJ, Eelles JB, Suarez-Quian C, Przegodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin C-h, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KS, Constantin F, Noguchi CT (2002) Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129: 505-516
5. Marti H, Wenger R, Rivas L, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8: 666-676
6. Frandy J, Bunn HF (1993) In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Feb 1*; 81: 617-623
7. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ (1992) Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol F* 474-481
8. Yasuda Y, Musha S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R (1998) Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 273: 25381-25387
9. Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R (2000) The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol I Endocrinol Metab* 278 E 1038-1044
10. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee E, Kessimian N, Noguchi C (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3974-3978
11. Kusano E, Akimoto T, Inoue M, Masunaga Y, Umino T, Ono S, Ando Y, Homma S, Muto S, Komatsu N, Asano Y (1999) Human recombinant erythropoietin inhibits interleukin-1beta-stimulated nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production in cultured rat vascular smooth-muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 14: 597-603
12. Benjo D, Conrad K (1999) Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cell in the human placenta. *Biol. Reprod* 60: 861-870
13. 島岡昌生, 釣谷充弘, 小池英爾, 老木正彰, 塩田 充, 星合 昊 (2008) 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わる研究. *近畿大医誌* 33: 101-108

14. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H (2003) Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 24: 1021-1029
15. Yasuda Y, Sasaki T, Takagawa M, Maeda M, Yasuda M, Atsumi T, Fujita Y, Fuzita H (2007) Erythropoietin contributes to implantation: Ectopic hemoglobin synthesis in decidual cells of mice. *Congenital Anomalies* 47: 22-23
16. Sadler TW (1996) Bilanuan germ die. In langman's medical embryology, 7th ed, pp 46-48