

博士論文

**microRNA-200a** による子宮のプロゲステロン・シグナル調節機構

原 口 広 史

## 目次

目次	2
要旨	3
序文	4
方法	17
結果	26
考察	55
まとめ	61
おわりに	61
謝辞	62
引用文献	63
補足資料	73
略語集	75

## 要旨

本来、胚が着床しない子宮頸部と着床する子宮体部の比較により、子宮の着床能の獲得機序を検討した。子宮体部では着床期に上皮細胞の分化と間質細胞の増殖が起こるが子宮頸部では起こらないこと、卵巣ホルモンであるプロゲステロン(P<sub>4</sub>)の影響が子宮頸部では起こらないこと、さらに *microRNA-200a* (*miR-200a*)が子宮頸部で低下していることを示した。さらに *microRNA-200a* (*miR-200a*)が子宮頸部で上昇し、プロゲステロン受容体発現低下と P<sub>4</sub>代謝酵素の発現増加により P<sub>4</sub>シグナルが低下すること、子宮体部で着床期に *miR-200a* が低下することを示した。本研究により、*miR-200a* 低下による P<sub>4</sub>シグナルの活性化のため、子宮体部のみが着床能を獲得することが示唆された。

## 序文

### 着床について

着床とは胚と子宮内膜との間の器質的な結合が成立した状態であり、妊娠の始まりともいえる現象である。胚と子宮内膜との接触がある特定の条件においてのみ着床が成立することから、両者の時間的・空間的に精妙な協調作用が必要とされている[1]。着床については様々な因子の関与が指摘されているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。様々な因子が着床に重要であることがわかってきたが、最も重要なものとして、卵巣より分泌される卵胞ホルモン (エストロゲン ( $E_2$ ))・黄体ホルモン(プロゲステロン ( $P_4$ ))が挙げられる。 $E_2 \cdot P_4$ により、子宮は制御され、着床できるようになることが知られている[1]。その他、Leukaemia inhibitory factor (LIF)[2]などサイトカインや、cyclooxygenase-2 (COX2)[3]などプロスタグランジン、分化・増殖因子、細胞構築や細胞接着に関わる因子などの関与が示されてきている[4]。しかし、未だにその詳細なメカニズムは分かっていない。

### 子宮の構造について

ヒトの子宮は子宮体部、子宮頸部、そして、その両者の中にある子宮峡部に分けられる (図 1) [5]。子宮体部の組織は、内側より、子宮内膜、子宮筋層、子宮漿膜に分けられ (図 1)、子宮内膜が月経周期で変化し、着床の場となる。子宮峡部に続いて位置するのが子宮頸部であり、その上皮は線毛細胞と分泌細胞からなる円柱上皮細胞と、

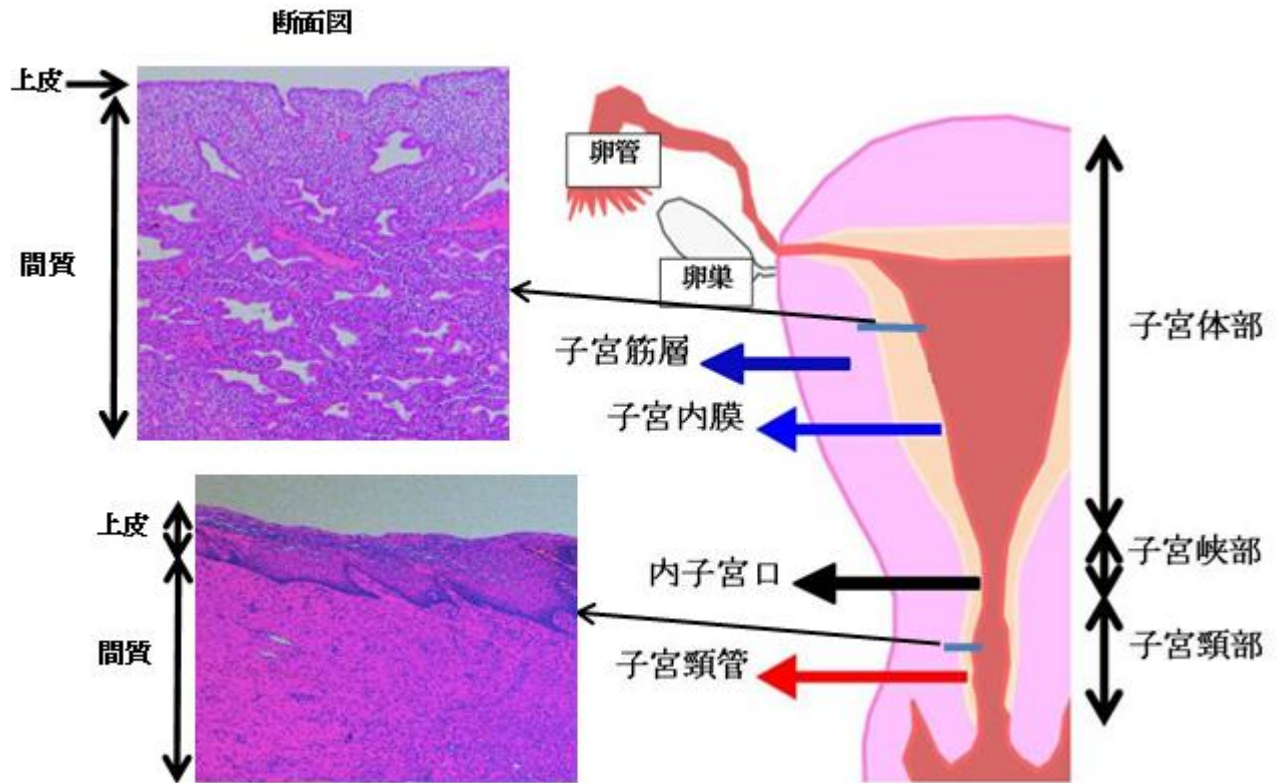


図 1.ヒトの子宮の構造

ヒトの子宮は子宮体部、子宮頸部、その両者の間にある子宮峡部よりなる。子宮体部の組織は、子宮内膜、子宮筋層、子宮漿膜に分けられる。子宮峡部より下方に続くのが、子宮頸部である。子宮頸部上皮は線毛細胞と分泌細胞からなる円柱上皮細胞と重層扁平上皮細胞からなる。なお、断面図は子宮体部 (上)と子宮頸部 (下)の HE 染色を示す。子宮体部の断面図は子宮内膜の上皮、間質を示す。子宮頸部の断面図は重層扁平上皮と間質を示す。

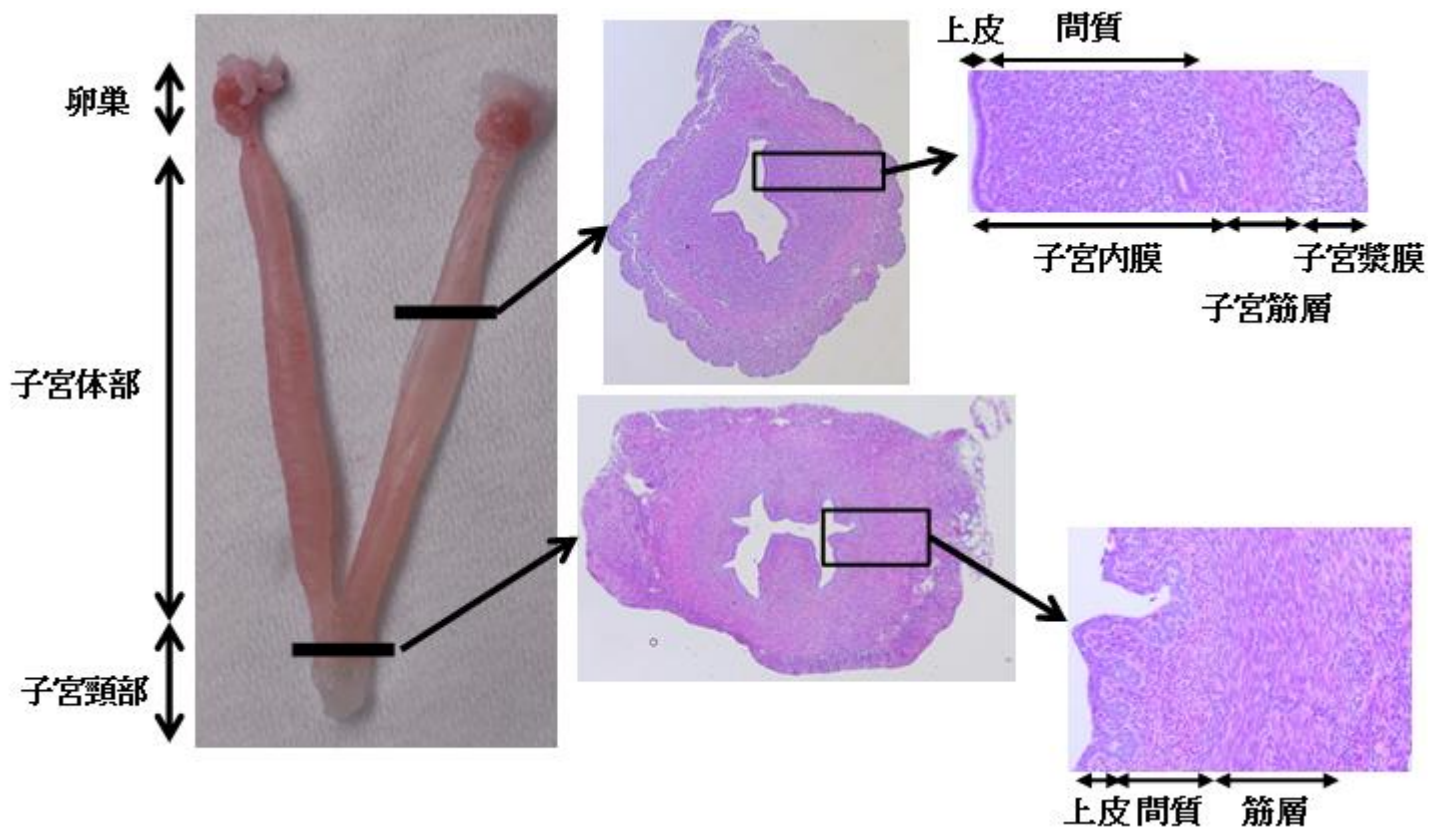


図 2.マウスの子宮の構造 (マクロ像・ミクロ像)

マウスの子宮のマクロ像・ミクロ像を示す。左のマクロ像で、子宮は Y 字型 (双角子宮) を示し、2つの子宮体部と1つの子宮頸部よりなる。子宮体部の組織は、子宮内膜、子宮筋層、子宮漿膜に分けられる。子宮頸部の子宮内腔は H 字型になっている。

腔粘膜と同様の重層扁平上皮細胞からなる。

マウスの子宮は、Y字型になっており、2つの子宮体部と、1つの子宮頸部に分けられる[6] (図 2)。子宮体部はヒトと同様、子宮内膜、子宮筋層、子宮漿膜に分けられる (図 2)。また子宮頸部の上皮は扁平上皮細胞からなる。

### 妊娠初期のマウスとヒトの比較

ヒトの着床研究は倫理的制約から、代替として、動物実験、特にマウスを用いた研究が多くなされている。着床において重要な  $E_2 \cdot P_4$  のホルモン動態と排卵から着床までの期間が、ヒトとマウスで図 3 に示すように類似している[7]。このため、着床の研究ではマウスがよく用いられる。

非妊娠時、ヒトの子宮内膜は約 28 日前後の間隔で周期的に変化し、この周期を月経周期という[5] (図 4)。月経周期は月経期、増殖期、分泌期に分けられ、卵巣より分泌される  $E_2 \cdot P_4$  の作用により、子宮内膜は変化する (図 4)。 $E_2 \cdot P_4$  の分泌は、主に、視床下部より分泌されるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) や、下垂体より分泌される黄体化ホルモン (LH) ・卵胞刺激ホルモン (FSH) により制御されている。着床は排卵後 7 日前後に起こる (図 3・4)。一方、マウスには月経はないものの、非妊娠時、4-5 日間の性周期があり、発情前期、発情期、発情後期、発情休止期の 4 つに分類される[8]。排卵に合わせ、発情期に交尾する。膣栓がついた日を妊娠 1 日目 (Day 1) とすると、Day 4 の深夜から Day 5 に着床する[1] (図 3)。

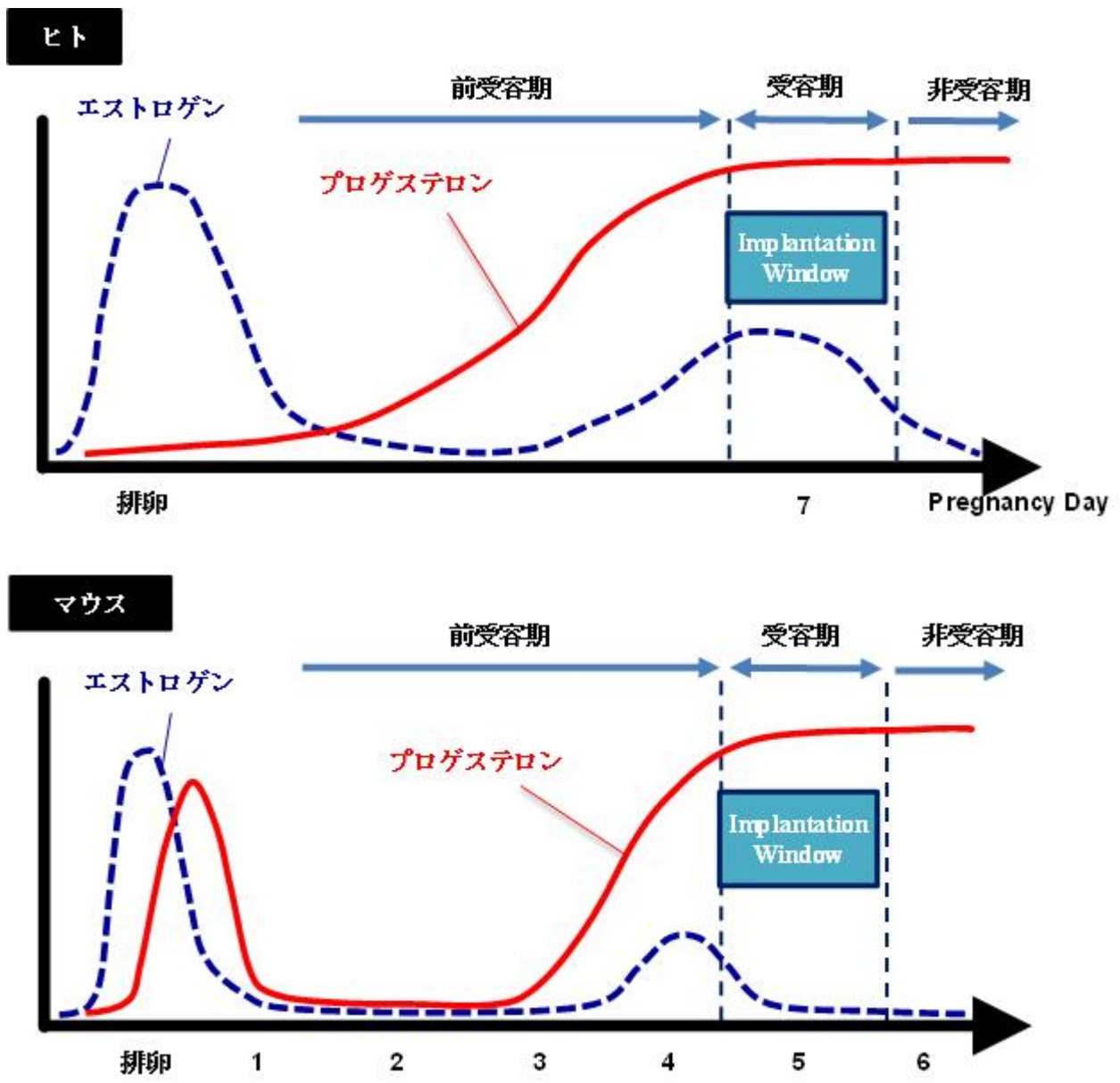


図 3. 妊娠初期におけるヒトとマウスのホルモン動態

(Egashira, M., Hirota, Y. Uterine receptivity and embryo-uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reproductive Medicine and Biology* **12**, 127-132 (2013) [7])  
 妊娠初期におけるヒトとマウスの  $E_2 \cdot P_4$  の動態を示す。 $E_2 \cdot P_4$  ともに妊娠に重要な卵巣ホルモンであり、ヒト・マウスともに前受容期に  $P_4$  が上昇していき、その後  $E_2$  が軽度上昇し、着床できない非受容期に至る。



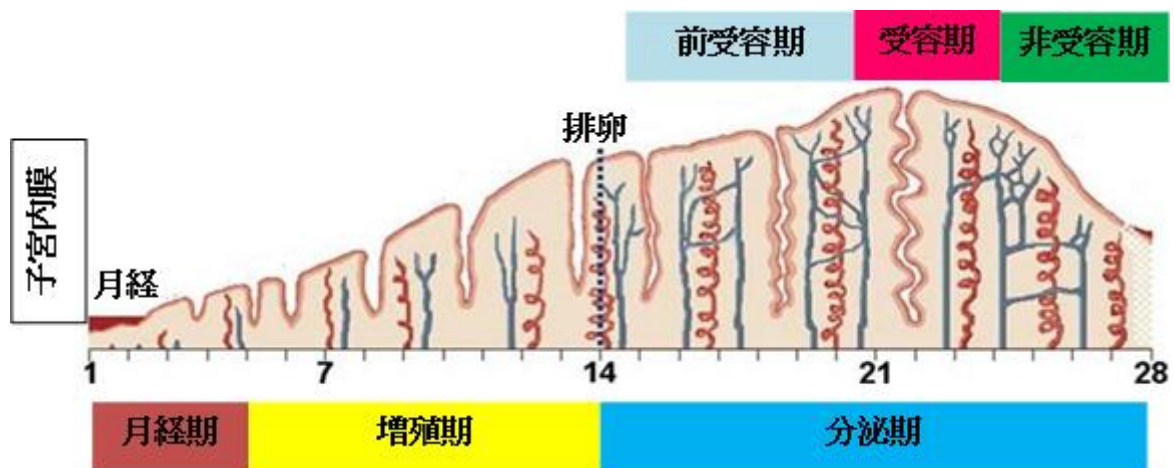


図4. ヒトの月経周期における子宮内膜の変化

(Munro, S.K., et al. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **16**, 297-310 (2010) [9])

ヒトの月経周期の子宮内膜の変化を示す。ヒトの子宮内膜は約28日前後の間隔で周期的に変化し、この周期を月経周期と呼び、月経周期は月経期、増殖期、分泌期に分けられる。卵巣より分泌される  $E_2 \cdot P_4$  の作用により、子宮内膜は変化する。 $E_2$  の作用により、子宮内膜の厚みは増大していき、排卵後、分泌期に入り、さらに  $P_4$  の作用により、子宮内膜の厚みは増す[5]。着床は排卵後7日前後の分泌期に起こる。この着床可能な時期を受容期と呼び、その前を前受容期、受容期を過ぎて着床できない時期を非受容期と呼ぶ。 $E_2 \cdot P_4$  が消退すると、子宮内膜は剥脱し、月経となる[5]。

## マウスの着床

着床の成立には胚と子宮の協調が必要で、胚の活性化[10]と、子宮の着床能獲得の両方が必要である[4] (図 5)。子宮体部が着床能を獲得している期間は限られており、**implantation window** と呼ばれる[4] (図 3)。この期間の前は着床できず、また、この期間を過ぎると着床できない。また、着床前の子宮は卵巣より分泌される  $E_2 \cdot P_4$  によって制御されている[1]。

マウスの着床においては、膣栓を認めた日を **Day 1** とすると、**Day 2** から卵巣からの  $P_4$  産生が増加し (図 3)、 $P_4$  の持続的な影響下に、**Day 4** において子宮体部の増殖能のダイナミックな変化、すなわち上皮細胞の増殖抑制と間質細胞の増殖亢進 (図 8・9) が起こり、子宮が着床能を獲得する[11]。この子宮内膜の増殖能の変化は、その後の胚の活性化に向けて子宮が準備できていることを示す変化である。そして卵巣由来の  $E_2$  が一時的に増加し (図 3)、この刺激によって子宮が反応し胚活性化の局面に入る (図 5)。**Day 4** 夕方に胚の活性化が起こり、**Day 4** 深夜に子宮への接着反応が始まる (図 5)。続いて胚は間質に侵入する一方で、子宮では脱落膜化が進み、着床が成立する。

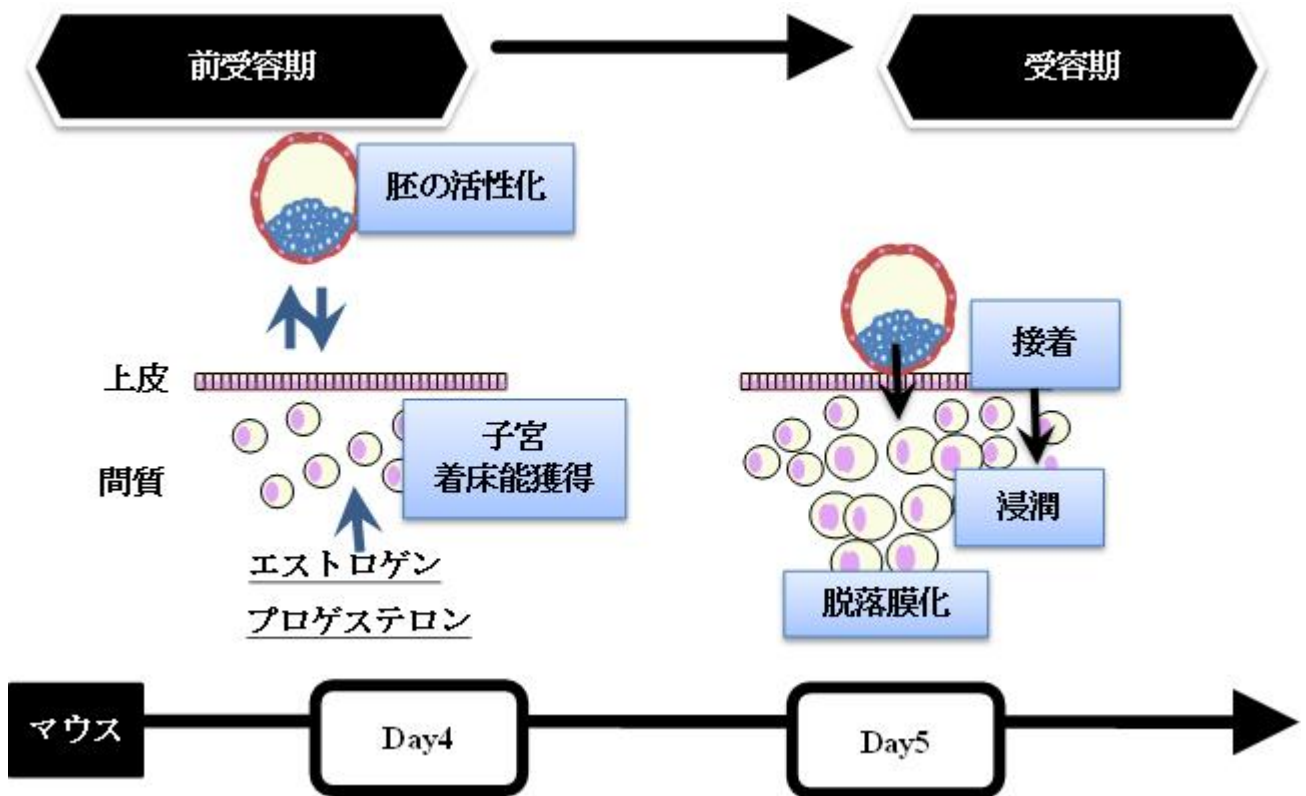


図 5. マウスの着床時の胚と子宮の模式図

(Egashira, M., Hirota, Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reproductive Medicine and Biology* **12**, 127-132 (2013) [7])  
 マウスの着床前後の胚と子宮の模式図を示す。卵管内にいた胚は、妊娠4日目、プロゲステロン優位のホルモン環境下で、子宮に到達する。その後、エストロゲンにより、活性化された胚と子宮の相互作用が起こり、深夜にかけて、胚が子宮上皮に、接着する。続いて胚は間質に侵入し、間質では脱落膜化を起こし、着床が成立する。

## プロゲステロン・シグナリング

P<sub>4</sub> は核内受容体であるプロゲステロン受容体 (PR)を介して作用し、子宮体部の着床能の獲得に必須である[12] [13]。PR はシャペロン複合体を形成することが知られている。FK-506 binding protein 4 (FKBP52)は、そのコシャペロンであり、PR とシャペロン複合体を形成し、P<sub>4</sub>-PR の結合を強化する (図 6) [14]。FKBP52 欠損マウスは P<sub>4</sub>-PR シグナルが低下し、着床障害をきたすマウスである[15]。大量の P<sub>4</sub>を投与することにより、FKBP52 欠損マウスは P<sub>4</sub>-PR シグナルが正常レベル近くまで回復し、着床も正常にする[15] (図 6)。

また、P<sub>4</sub>は、代謝酵素である 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (20 $\alpha$ -HSD)により活性を持たない 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -OHP)に代謝される[16]。子宮におけるプロゲステロン代謝が P<sub>4</sub>シグナリングに影響を与える報告として、子宮筋の *microRNA-200a* (*miR-200a*)がプロゲステロン代謝に関わり、陣痛を誘発するという報告がある[17]。*miR-200a* は、妊娠中と分娩直前の子宮筋層の *microarray* で、分娩直前に上昇することがわかっていた[18]。この報告では、*miR-200a* が Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (Stat5)を抑制することで、代謝酵素である 20 $\alpha$ -HSD が亢進し、P<sub>4</sub>シグナリングが低下することが示された (図 7)。また、この報告では、P<sub>4</sub>の投与により、子宮の *miR-200a* は減少し、PR のアンタゴニストである RU486 の投与では、子宮の *miR-200a* は上昇することがわかった。

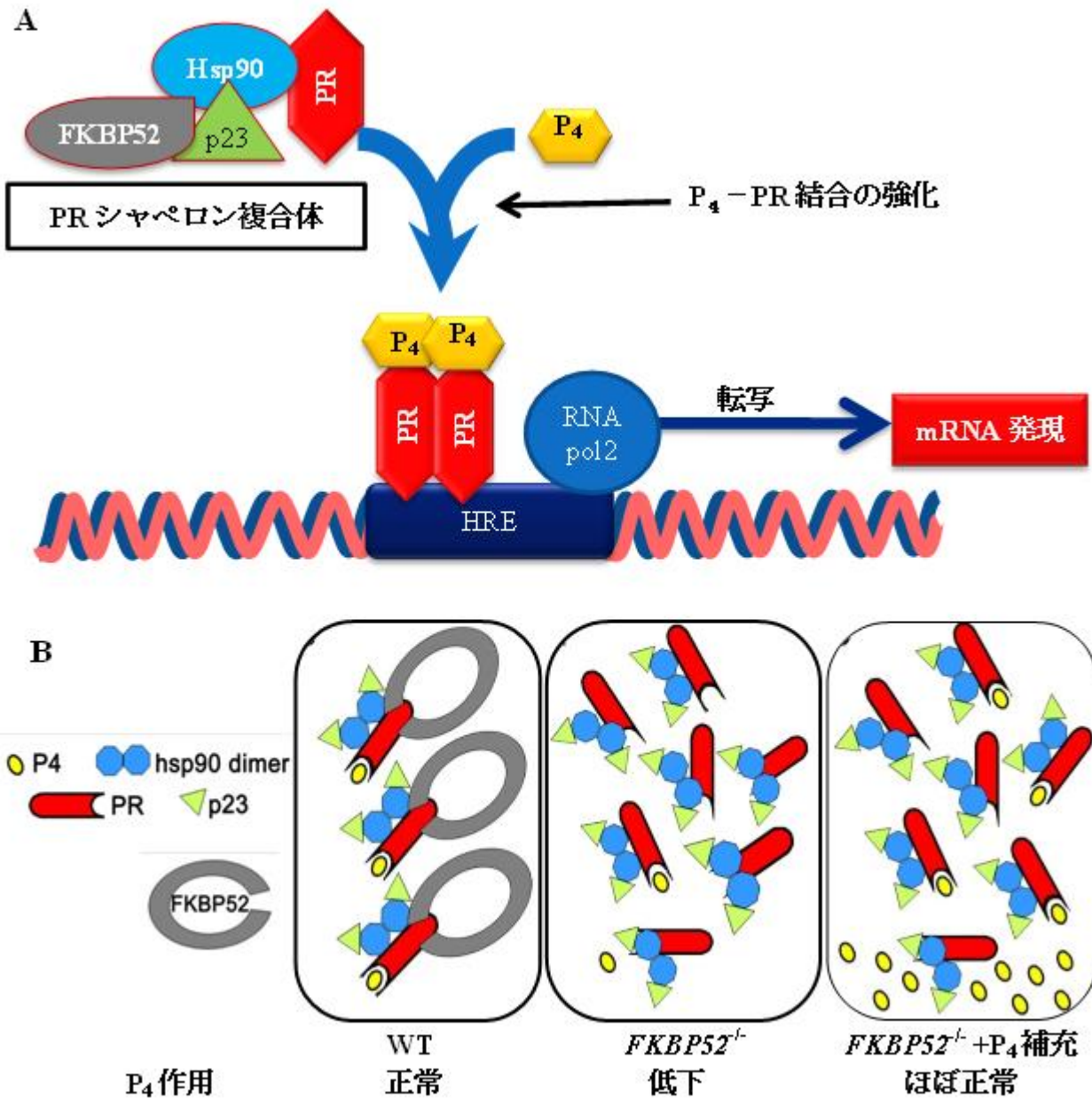


図 6. FKBP52 と  $P_4$ -PR の作用の模式図、FKBP52 欠損マウスの  $P_4$  補充の模式図

(A: Leonhardt, S.A., et al. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* **68**, 761-770 (2003) [19])

A: FK-506 binding protein 4 (FKBP52)と  $P_4$ -PR の作用の模式図を示す。コシャペロンである FKBP52 は、Heat shock protein 90 (Hsp90)、p23 とともに PR とシャペロン複合体を形成し、 $P_4$ -PR の結合を強化する。PR はホルモンレスポンスエレメント (HRE) と結合し、mRNA の発現を誘導する。B: FKBP52 欠損マウス ( $FKBP52^{-/-}$ )での  $P_4$  補充の模式図を示す。野生型マウス (WT)では A に示すような複合体を形成し、 $P_4$ -PR の結合し、作用するが、 $FKBP52^{-/-}$ では  $P_4$ -PR の結合が弱く、作用が低下する。一方、 $FKBP52^{-/-}$ に大量の  $P_4$  を投与すると、 $P_4$ -PR の作用は正常レベルくらいまで回復する。

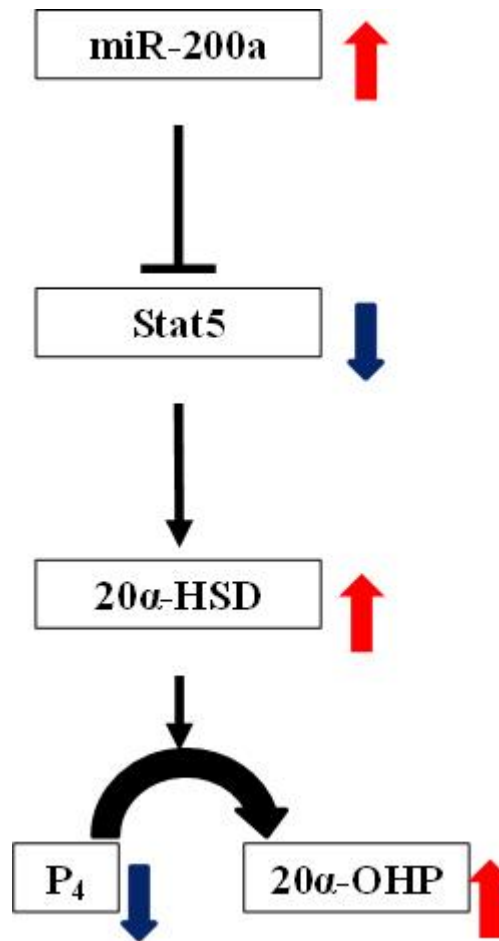


図 7. 分娩時の子宮筋における *miR-200a* と  $P_4$  の作用の模式図

(Williams, K.C., et al. MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7529-7534 (2012) [17])

分娩時の子宮における *miR-200a* と  $P_4$  の作用の模式図を示す。分娩時、*miR-200a* により、Stat5 が抑制され、それにより  $P_4$  の代謝酵素である  $20\alpha$ -HSD が増加する。 $20\alpha$ -HSD の増加により、 $P_4$  は活性を持たない  $20\alpha$ -OHP に代謝されて、 $P_4$  の作用は低下する。

## **miR-200a** について

*miR-200a* はマウスの腎臓より cloning された後、ヒトでもマウスの共通の配列であり、ヒトでは chromosome 1、マウスでは chromosome 4 に存在することがわかった[20]。Ttl10 (Tubulin tyrosine ligase-like family, member 10)遺伝子の近傍に位置し、呼吸器系、腎臓、生殖器系に発現していることがわかっている[21]。この microRNA は、転写抑制因子である ZEB1/2 (Zinc finger E-box-binding homeobox1/2)に作用することで EMT (epithelial-to-mesenchymal transition)に影響し[22] [23] [24]、様々な癌に関わっていることが知られている[25] [26] [27]。一方で、分娩時の子宮筋での報告はある[17]が、生理的作用の報告は少ない。

## **着床と microRNA**

microRNA は機能性の non-coding RNA であり、mRNA から蛋白へと翻訳する過程で配列特異的に転写後調節を行い蛋白合成に影響し[28]、様々な場面で重要となることが知られているが、着床に関わる報告は少ない[29] [30]。着床後の子宮内膜に発現する COX2 の制御に *microRNA-101a* と *microRNA-199a* が関与していることが示されているが[31]、着床前の子宮における microRNA の役割については不明である。

## 研究の目的

本研究の目的は子宮の解剖学的位置関係に着目して着床のメカニズムを明らかにすることである。着床異常の例として、子宮体部以外の部位に受精卵が着床してしまう異所性妊娠（子宮外妊娠）が挙げられる。なかでも子宮頸管妊娠は異所性妊娠の1%以下と非常に少ない[32][33]。また、子宮頸部近くに着床して起こる前置胎盤についても、全出産のうち約0.4%と少ない[34]。このことから、子宮頸部には、子宮体部と比較して着床しにくいメカニズムがあるのではないかと考えられる。本研究では、着床のメカニズムの解明の手掛かりとして、着床可能な子宮体部と着床しない子宮頸部を比較することとした。具体的には着床期の子宮体部と子宮頸部を比較することで、着床に関わる重要な因子を抽出し、プロゲステロン・シグナリングとの関わりを検討した。



## 方法

### マウス

C57BL/6 野生型マウス (WT)、CD1 野生型マウスと *Fkbp52*<sup>-/-</sup>マウスを用いた。

*Fkbp52*<sup>-/-</sup>マウス は David Smith (Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona)の作成したものを使用した。月齢 2~5 ヶ月の WT と *Fkbp52*<sup>-/-</sup>のメスマウスと WT のオスマウスを交配し妊娠マウスとして使用した。なお、膣栓を認めた日を Day 1 とした。PR アンタゴニストである RU486 の投与は、Day 3 の午前 9 時に 8 mg /kg 体重を皮下に投与した。

*Fkbp52*<sup>-/-</sup>のメスマウスに対する P<sub>4</sub> 補充は、1 匹あたり 2 mg を Day 2 と Day 3 に皮下注射した。また、妊娠マウスの検体回収は Day 3 または Day 4 の午前 9 時に行った。着床の評価は Day 5 の 9 時に行い、尾静脈よりシカゴブルーを投与し、着床部位を可視化することで評価した。本研究で用いたすべてのマウスは、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従って東京大学の動物飼育施設（生命科学実験棟および南研究棟産婦人科動物飼育室）で飼育した。本実験は、東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認を受けており、承認番号は医-P11-018 である。

### ヒト検体の採取

子宮組織は、腹腔鏡下あるいは開腹下に切除された子宮より採取した。事前にホルモン療法を受けていない、すなわち、術前の 3 カ月以内に性ステロイドホルモン製剤や GnRH アゴニストを投与されていない患者より組織を得た。また、子宮腺筋症や、

P<sub>4</sub>シグナルに影響のある疾患を有していない患者よりの組織を得た。なお、月経周期については組織学的診断を受けたものを使用した[35]。検体採取に関して東京大学倫理委員会の承認を受けており、承認番号は G3548 である。手術前に患者より書面によるインフォームド・コンセントを得た。

### **In situ hybridization (ISH)**

凍結切片 (12 μm)を2分間37°Cで温め、4%パラホルムアルデヒド液 (in PBS)で4°C、15分固定した。プレハイブリダイゼーション後、<sup>35</sup>Sで標識したcRNAプローブを45°Cで4時間反応させた。洗浄後、Kodak NTB-2 liquid emulsion を使用して1-3週間の autoradiography で検出した。Amphiregulin (*Areg*、プローブの target site は954–1021 塩基(転写開始点を1とする、以下同様))、histidine decarboxylase (*Hdc*、target site は1732–2083 塩基)、Indian hedgehog (*Ihh*、target site は663–2459 塩基)と lactotransferrin (*Ltf*、target site は93–1384 塩基) についてマウス特異的な cRNA プローブを使用した。

### **microRNA の ISH**

microRNA の ISH は他研究室のものを参考に行った[36] [37]。組織固定液 (Genostaff) を用いて固定した組織をパラフィン包埋し6μmの切片を作成した。切片は脱パラフィン後、4%パラホルムアルデヒド液 (in PBS)で15分固定した。PBSで洗浄後、protein K (10μg/ml) で37°C、10分間処理した。PBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒド液 (in

PBS)で15分再固定し、PBSで洗浄後0.2 mol/L 塩酸で10分処理した。PBSで洗浄後、ハイブリ洗浄液 (Genostaff)で15分処理した。digoxigenin (DIG) にて標識したプローブ(18 pmol/ml, miR-200a-AS-LNA: acAtcGttAccAgaCagTgtta) (大文字が LNA 挿入部位、ヒト・マウス共通配列のため同じプローブを使用)をプローブ希釈液(Genostaff)で希釈し、切片と25°Cで overnight 反応させた。ハイブリダイゼーション後、50%ホルムアミド-2×ハイブリ洗浄液 (Genostaff)で25°C30分、3回洗浄した。TBS Tween 20 (TBST; 0.1% Tween20 in TBS)で洗浄後、ブロッキング液 (Genostaff)で15分ブロッキングした。TBSTで洗浄後、anti-DIG-AP conjugate (Roche) と1時間反応させた。TBSTで洗浄後、100 mmol/L 塩化ナトリウム-100 mmol/L Tris-HCl (pH9.5)液で5分処理し、NBT/BCIP solution (Sigma)を用い、室温で4時間から overnight 発色反応させ、メチルグリーン (Wako)にて染色後、顕微鏡で観察した。

## 免疫染色

組織を中性ホルマリンにて固定後にパラフィン包埋し、6 $\mu$ mの切片を作成した。切片は脱パラフィン後、10 mmol/L クエン酸バッファー (pH 6.0)で1時間加熱処理し、抗原賦活化した。PBS洗浄後、3%過酸化水素 / メタノールにて10分処理した。PBS洗浄後、ブロッキング液 (DAKO)にて1時間処理後、1次抗体と overnight 反応させた。抗ヒト・マウス PR 抗体 (1:100, abcam)、抗マウスエストロゲン受容体(ER)抗体 (1:200, abcam)、抗ヒト・マウス Ki67 抗体 (マウス 1:500, ヒト 1:50, Thermo Scientific))、

抗マウス proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (1:500, DAKO)、抗マウス phosphorylated Stat5 (pStat5) 抗体 (1:50, abcam) と抗マウス Stat5 抗体 (1:200, Bioworld Technology)、抗ウサギ IgG 抗体(DAKO)を1次抗体として用いた。TBST で洗浄後、2次抗体として Envision polymer for Rabbit IgG (DAKO) と1時間反応させ、DAB 染色にて発色させ、ヘマトキシリン染色後、封入し顕微鏡で観察した。

### ウェスタンブロッティング

細胞および組織より、proteinase inhibitor cocktail (Sigma) および phosphatase inhibitor cocktail (Sigma) を含む lysis buffer (10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 % Nonidet P-40、1 mM EDTA) を用いて蛋白を抽出した。蛋白 (20 $\mu$ g) を 10 % SDS-PAGE にて電気泳動し、polyvinyl difluoride membrane に転写した。抗マウス PR 抗体 (1:500, abcam)、抗ヒト PR 抗体 (1:500, Cell Signaling Technology)、抗マウス ER 抗体 (1:500, abcam)、抗マウス Ubiquitin 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology)、抗マウス 20 $\alpha$ -HSD 抗体 (1:500, Geula Gibori (University of Illinois at Chicago, Illinois) より提供)、抗マウス pStat5 抗体 (1:500, abcam)、抗マウス Stat5 抗体 (1:500, Bioworld Technology) と抗ヒト・マウス  $\beta$ -actin 抗体 (1:500, Santa Cruz Biotechnonology) を1次抗体として用い、4 $^{\circ}$ C overnight 反応させた。2次抗体として、それぞれ抗 rabbit 抗体 (1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) と抗 goat 抗体 (1:10000, Jackson ImmunoResearch

Laboratories) を用い、室温 60 分反応させた。Western blotting detection reagents (GE Healthcare) を用いて信号を検出した。Actin を loading control として使用した。

### **Ubiquitination Assay**

組織より、proteinase inhibitor cocktail (Sigma) 、 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma) および MG132 (20  $\mu$ M)を含む lysis buffer (10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 % Nonidet P-40、1 mM EDTA) を用いて蛋白を抽出した。抽出した蛋白 300 $\mu$ g に、binding buffer (20 mM HEPES (pH7.9)、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA、5% Glycerol、proteinase inhibitor cocktail)と MG132 (20  $\mu$ M)を加え、抗マウス PR 抗体 (abcam)と免疫沈降を行った。抗マウス PR 抗体・抗マウス Ubiquitin 抗体を用い、ウェスタンブロッティングを行った。

### **Laser Capture Microdissection (LCM)**

PEN (polyethylene naphthalate)スライド (Leica Microsystems)を用いた凍結切片 (20 $\mu$ m)を冷却したアセトンで固定し、0.05% トルイジンブルーで染色、エタノールで脱水した。LMD7000 system (Leica Microsystems)を用いて、切片上の目的の領域を切り出し、回収した。

## 組織・細胞からの RNA 抽出および、quantitative PCR (qPCR)

組織・細胞からの RNA 抽出は、NucleoSpin kit (Macherey-Nagel)を用いて、プロトコルに従って行った。LCMを用いて得られた RNA について、RNA 抽出後、Ovation PicoSL WTA system V2 (NuGEN Technology)を用いて増幅した。抽出された RNA を RT-PCR kit (TOYOBO) を用いて、プロトコルに従って cDNA に逆転写した。SYBR Green (TOYOBO) を用いて real-time quantitative PCR を行った。データ解析は Thermal Cycler Dice Real Time System (TAKARA) を用いて行った。*β-actin (Actb)*を internal standard として標準化し、表 1 の通りのプライマーを用いた。PCR 条件は 95°C15 秒、60°C15 秒、72°C30 秒を 40 サイクル行った。全ての PCR は melting curve を確認した。

microRNA の抽出は NucleoSpin miRNA kit (Macherey-Nagel)を用いて、プロトコルに従って行った。real-time quantitative PCR は Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (Clontech) を用いて行った。データ解析は Thermal Cycler Dice Real Time System (TAKARA) を用いて行った。*U6* を internal standard として標準化した。PCR 条件は *miR-200a (miR-200a)* の塩基配列は UAACACUGUCUGGUAACGAUGU)、*U6* とともに 95°C15 秒、60°C30 秒を 40 サイクル行った。

遺伝子名	5' 末端	3' 末端
<i>Pgr</i>	AGGGCAATGGAAGGGCAGCAT	CCACCGACTGGGGGAGAGCAA
<i>Areg</i>	TCACAGTGCACCTTTGGAAACGAT	TCCGGTGTGGCTTGGCAATGA
<i>Hdc</i>	GCCCATCTGTGCCAGTGAGGGA	GAAAGCGCCGGCTCAAGGGG
<i>Ihh</i>	GAGAACACGGGTGCCGACCG	CAGCGGCCGAATGCTCAGACT
<i>Ltf</i>	GGAGCCTTGAGGTGTCTGAG	CCAGGTGGCACTCCTTGTAT
<i>Stat5b</i>	GAGGTCCTGCACGGGGA	GAGCTGGGTGGCCTTAATGT
<i>20<math>\alpha</math>-HSD</i>	CCATTCCTGTCCTGGGCTTT	GCTCATTCCCTGGCTTCAGA
<i>Actb</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGGAAGGTCTCAAA

表 1. 各プライマーの塩基配列

## 細胞への microRNA mimics の導入

MCF-7 細胞株に対し、導入前の処置として 48 時間の E<sub>2</sub> (10 nM) 処理を行い、Lipofectamine RNAiMax transfection reagent (Invitrogen) を用い、*miR-200a* と control の mirVana miRNA mimics を導入し、48 時間培養した。全ての解析は 3 回行った。

## Luciferase reporter assay

miRanda database (<http://www.microrna.org>) を用いてヒト *PGR* への *miR-200a* の推定結合部位を抽出した。*miR-200a* の推定結合部位 (8871–8895 塩基(転写開始点を 1 とする))を含む *PGR* の 3' 非翻訳領域 (UTR) をプライマー(forward, 5'-TTAACTCGAGTTGT GTTGAAGTTGATGCAATCTTC-3'; reverse, 5'-TTCTAGAATGAGAAAGATTCCCTGCA TCTCTT-3') を用いて増幅した。3'UTR luciferase reporter assay 用に、増幅片は pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega、PGK プロモーターの下流に luciferase を挿入してある vector) に導入した。変異解析用に、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo) を用い、*miR-200a* の推定結合部位を 3 塩基変異 (AGUGUU を AGUCCC に) させた。COS-7 細胞株に reporter のプラスミドと、*miR-200a* または negative control の miRNA mimic を導入し、24 時間培養した。抽出物を luciferase assay に用いた。導入と luciferase assay は 3 回独立して行った。



## 統計学的解析

データはエクセル統計 2008 (Social Survey Research Information)を用いて解析した。

2 群間比較には Student's t test を行い、 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 結果

### マウス子宮体部と子宮頸部で着床期の細胞増殖と細胞分化の状態が異なる

細胞の増殖・分化は、発達と組織の恒常性のバランスにおいて、高度に調節されている[38] [39] [40] [41]。細胞増殖の指標は Ki67 や PCNA などの分子マーカーが存在し、その発現増加が細胞周期の進行、すなわち細胞増殖を意味する。一方で、細胞分化の一般的な指標はほとんどない。上記のマーカーの発現減少、すなわち細胞周期停止が細胞分化と相関することから、しばしば細胞分化の指標として用いられる。マウスにおいて、妊娠 4 日目に、子宮体部の上皮の増殖が細胞増殖のマーカー Ki67 陽性細胞の消失とともに停止し、分化していくのに対し、間質では Ki67 陽性細胞が増え、増殖が亢進することが知られている[1]。そこで、マウスの子宮頸部と子宮体部の Ki67 の免疫染色を、Day 3 と Day 4 で比較検討したところ、子宮体部では、Day 3 で上皮細胞の増殖が見られたのに対し、day 4 で上皮の増殖が消失し、Day 3 にはなかった間質での増殖が亢進した (図 8)。一方、子宮頸部では、Day 3・Day 4 ともに変化なく、上皮での増殖を認め、間質では認めなかった (図 8)。同様のことが、Ki67 とは別の細胞増殖のマーカーである PCNA でも認められた (図 9)。これらの結果から、子宮頸部では着床能が獲得できないこと、上皮細胞の増殖が消失し分化を開始することと間質細胞の増殖が亢進することが子宮体部の着床能の指標となることが示唆された。

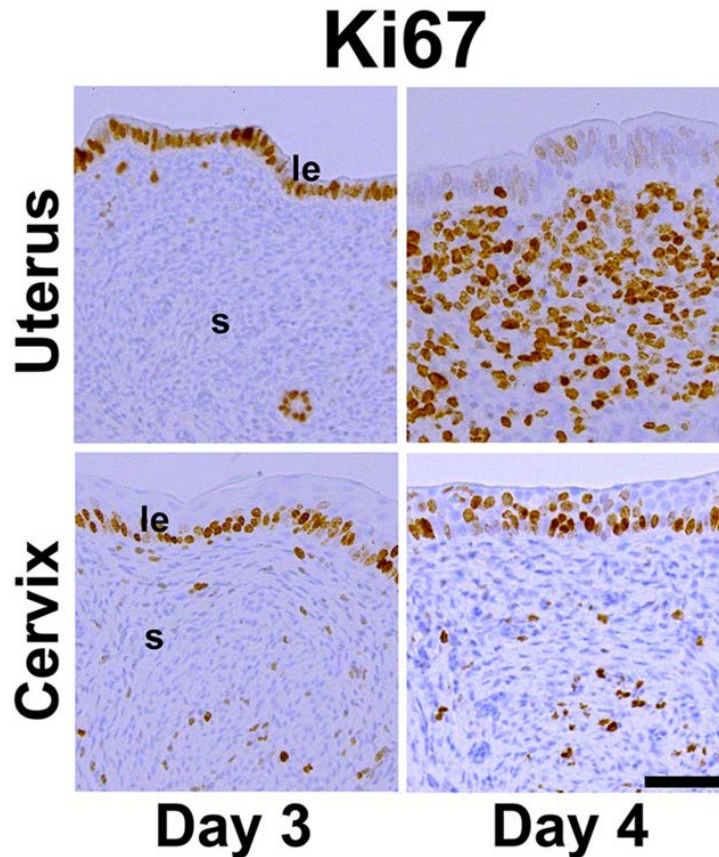


図 8. 着床期に、子宮体部では細胞の分化・増殖が劇的に変化するが、子宮頸部では変化しない

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
 WT マウスの子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の Day 3・4 の Ki67 の免疫染色を示す。子宮体部では劇的な変化、すなわち、Day 4 における上皮の増殖の消失と、間質の増殖亢進を認めるのに対し、子宮頸部では Day 3・4 とともに上皮の増殖がみられ、変化を認めない。各群 10 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 、le は上皮、s は間質を示す。

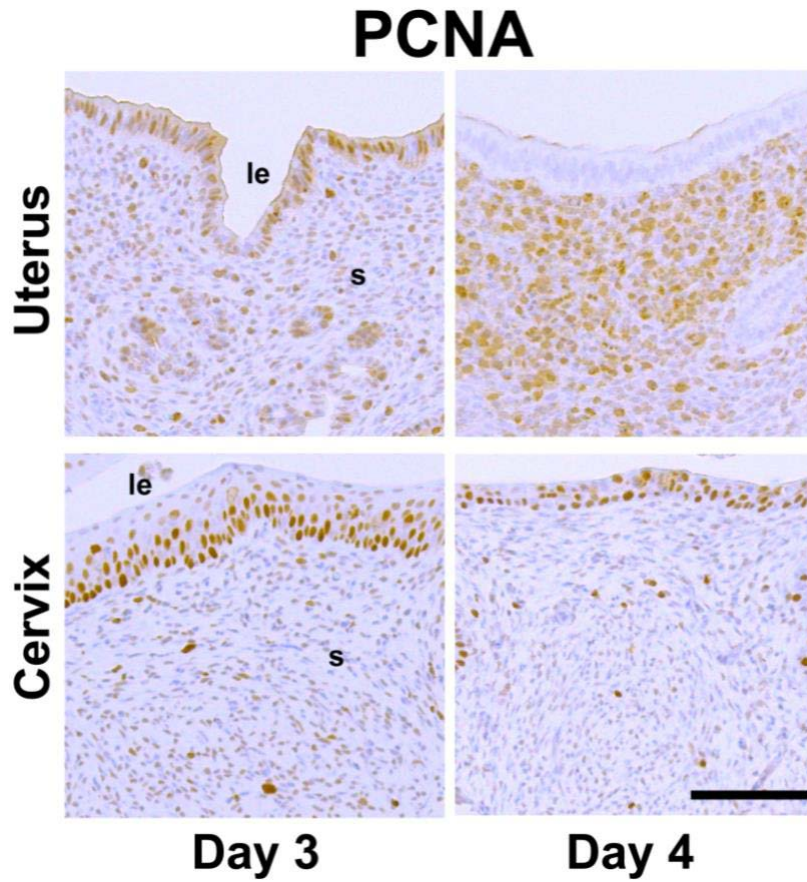


図 9. PCNA の免疫染色においても、着床期に、子宮体部では細胞の分化・増殖が劇的に変化するが、子宮頸部では変化しない

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
 WT マウスの子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の Day 3・4 の PCNA の免疫染色を示す。子宮体部では Day 4 における上皮の増殖の消失と、間質の増殖亢進を認めるのに対し、子宮頸部では Day 3・4 とともに上皮の増殖がみられ、変化を認めない。各群 3 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 、le は上皮、s は間質を示す。

## マウス子宮頸部では P<sub>4</sub> の作用が低下している

細胞の分化・増殖の劇的な変化が起こる Day 4 は、P<sub>4</sub> が優位なホルモン環境になっていることに着目した。子宮体部・頸部での分化・増殖に対する P<sub>4</sub>-PR シグナルを評価するために、PR のアンタゴニストである RU486 の投与実験と、子宮の P<sub>4</sub> 抵抗性を示すマウスモデルで知られる *Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスを用いた実験を行った。RU486 の投与実験では、Day 3 の RU486 投与により、Day 5 において着床が完全に障害され (n=3/3, 100%)、Day 4 の子宮体部では上皮の増殖が持続し、間質の増殖を認めなかった (図 10)。子宮において P<sub>4</sub>-PR シグナルが低下している *Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスの実験では、RU486 投与群と同様に、Day 4 の子宮体部で上皮の増殖は持続し、間質の増殖亢進を認めなかった (図 11)。 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスに P<sub>4</sub> 補充し P<sub>4</sub>-PR シグナルを改善させたところ、WT と同様に、Day 4 の子宮体部の上皮の増殖は消失し、間質の増殖亢進を認めた (図 11)。一方、子宮頸部では、WT、RU486 投与群、*Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスのいずれの群も変化なく、上皮の増殖は持続し、間質の増殖を認めなかった (図 8・10・11)。また、*Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスと同様に、WT に P<sub>4</sub> 補充したところ、子宮体部では、上皮の増殖が消失し、間質での増殖が亢進した一方で、子宮頸部では、変化なく、上皮の増殖は持続し、間質の増殖を認めなかった (図 12)。以上のことから、子宮体部では、P<sub>4</sub>-PR シグナルが作用し着床期の細胞の分化・増殖を制御しているのに対し、子宮頸部では P<sub>4</sub> に対する反応性が低下して子宮体部で起こる細胞の分化・増殖の変化が起こらないことが示唆された。

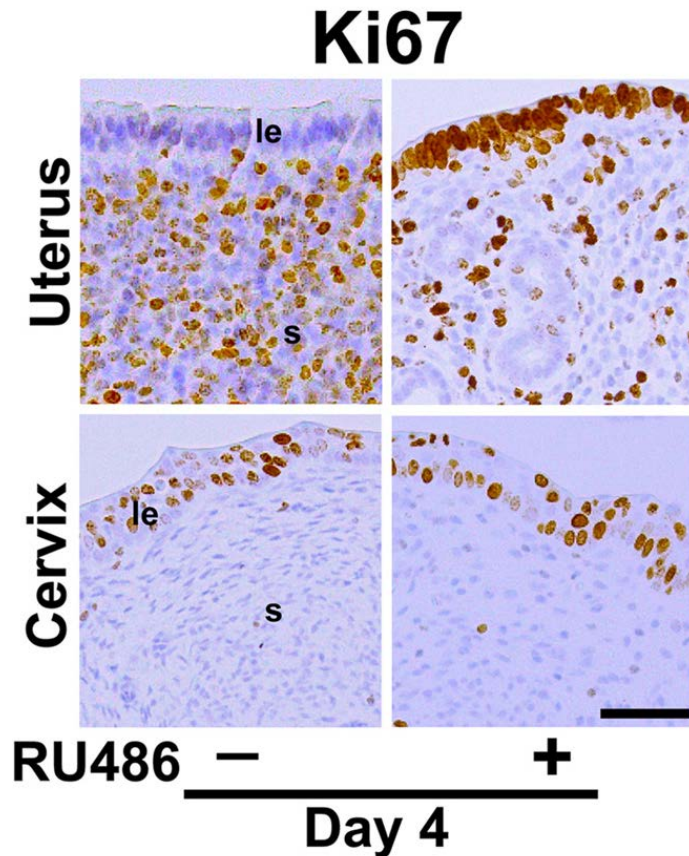


図 10. プロゲステロン受容体アンタゴニストである RU486 による P<sub>4</sub> シグナルの阻害は子宮体部の細胞増殖能を変化させる

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
 PR アンタゴニストである RU486 または oil を投与した WT マウスの子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の Day 4 の Ki67 の免疫染色を示す。RU486 を投与した子宮体部では、上皮の増殖は持続し、間質の増殖を認めなかった。子宮頸部では RU486 投与群と非投与群に変化を認めなかった。各群 3 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 100 μm、le は上皮、s は間質を示す。

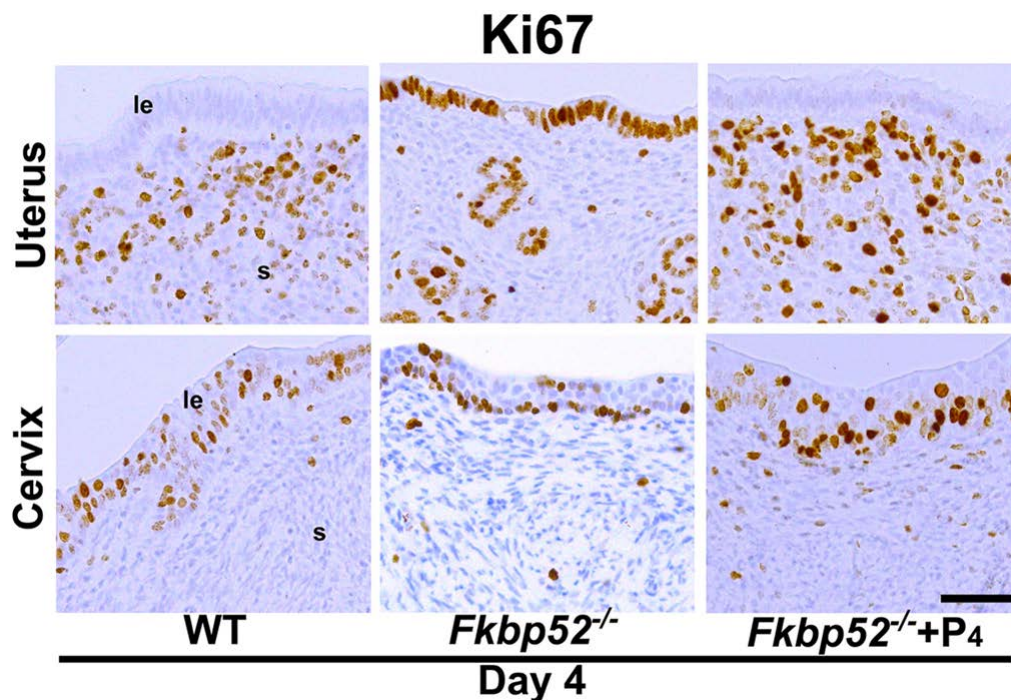
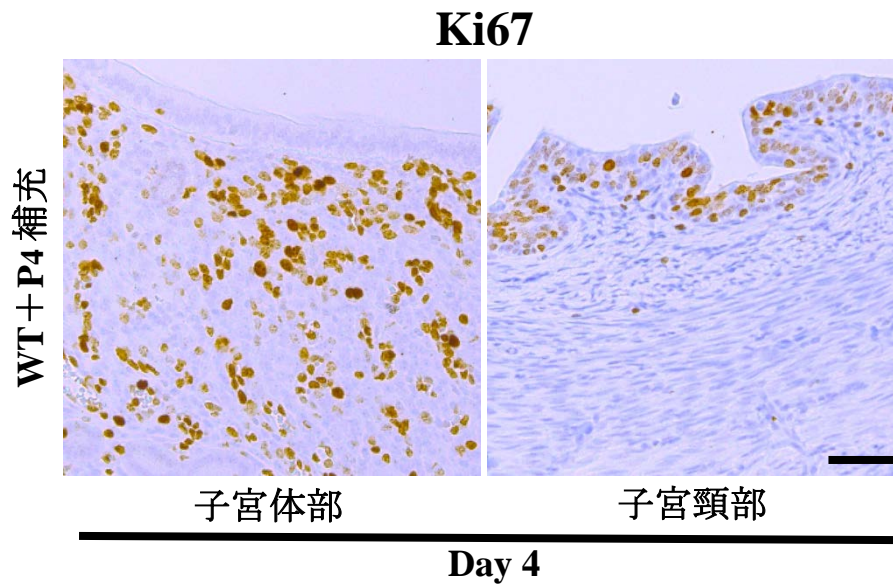


図 11. P<sub>4</sub> シグナルが低下した *Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスでは、子宮体部の細胞増殖能が変化し、P<sub>4</sub> 補充を行うと、細胞増殖能は正常に戻る

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
 WT マウスと、P<sub>4</sub> 補充を行った、または行わなかった *Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウス子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の Day 4 の Ki67 の免疫染色を示す。*Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスの子宮体部では上皮の増殖を認めたのに対し、P<sub>4</sub> 補充を行った *Fkbp52*<sup>-/-</sup> マウスの子宮体部では上皮の増殖は消失し、間質の増殖亢進を認めた。一方、子宮頸部では全ての群で、上皮の増殖を認め、変化がなかった。各群 3 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 100 μm、le は上皮、s は間質を示す。



**図 12. P<sub>4</sub> 補充を行っても、子宮頸部では細胞増殖能は変化しない**

P<sub>4</sub> 補充を行った WT マウスの子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の Day 4 の Ki67 の免疫染色を示す。*Fkbp52*<sup>-/-</sup>マウスの子宮体部では上皮の増殖を認めたのに対し、P<sub>4</sub> 補充を行った *Fkbp52*<sup>-/-</sup>マウスの子宮体部では上皮の増殖は消失し、間質の増殖亢進を認めた。一方、子宮頸部では変化がなかった。図のスケールバーは 200 μm を示す。



## ヒト子宮体部で着床期に細胞の分化・増殖の状態の変化が起こる

ヒトの着床期の子宮体部および子宮頸部の細胞の分化・増殖の状態を検討した。着床の起こる分泌期と、着床前にあたる増殖期について、子宮体部と子宮頸部、および、両者の境界に位置する子宮峡部の Ki67 の免疫染色を行った。増殖期においては、子宮体部・頸部・峡部、いずれも上皮細胞の増殖を認めた (図 13A)。一方、分泌期では、上皮の増殖が子宮頸部・峡部で持続しているのに対し、子宮体部では上皮の増殖が消失し、間質の増殖亢進を認めた (図 13B)。以上の結果から、着床期のヒトの子宮体部・頸部の細胞の分化・増殖の状態はマウスと類似しており、子宮体部では着床期に分化増殖の変化が起こるのに対し、子宮頸部では起こらないことが判明した。

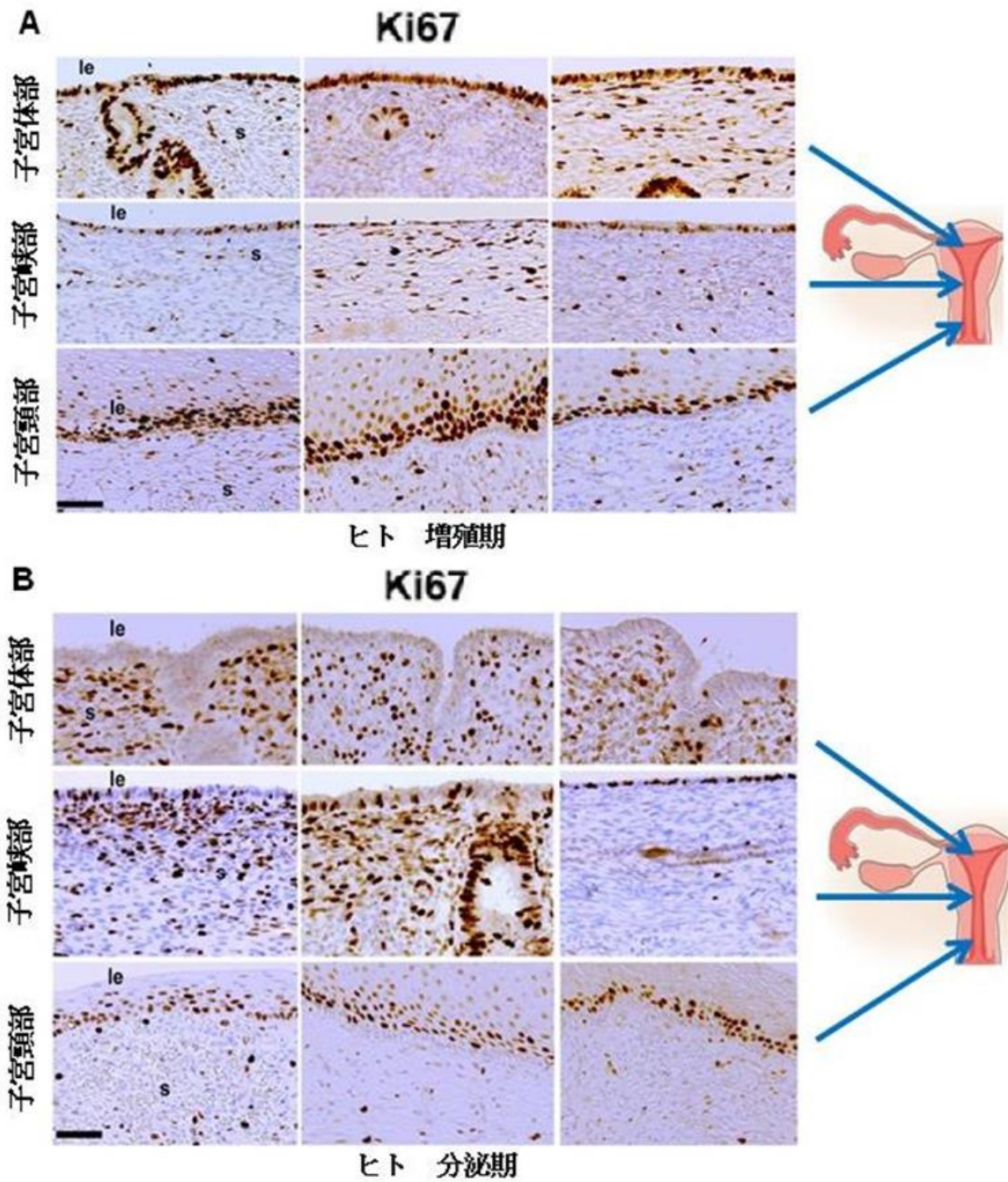


図 13. ヒトもマウス同様、着床期に、子宮体部では細胞の分化・増殖が変化するが、子宮頸部では変化しない

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

ヒトの子宮体部・子宮峡部（子宮体部と子宮頸部の境界域）・子宮頸部の増殖期 (A)・分泌期 (B)の Ki67 の免疫染色を示す。子宮体部では、増殖期は上皮の増殖亢進を認めたのに対し、分泌期は上皮の増殖が消失し、間質の増殖亢進を認めた。一方、子宮峡部および子宮頸部では増殖期でも分泌期でも上皮の増殖亢進を認めた。各群 10 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 100 μm、le は上皮、s は間質を示す。

## マウス子宮頸部では PR と P<sub>4</sub> 応答遺伝子の発現が低下している

子宮頸部での P<sub>4</sub> シグナルの作用低下の原因を調べるため、Day 4 の PR の蛋白発現を検討した。PR のウェスタンブロッティングでは、PR の 2 つの isoform である PR-A、PR-B が、ともに子宮体部に比べ子宮頸部で低下していた (図 14A, B)。また、PR の免疫染色では、子宮体部に比べ、子宮頸部で発現が弱かった (図 14C)。一方、もう 1 つの卵巣ホルモンの受容体である ER $\alpha$  の発現については、子宮体部と子宮頸部で差を認めなかった (図 15)。

次に、P<sub>4</sub>-PR シグナルの下流である P<sub>4</sub> 応答遺伝子について、子宮体部と子宮頸部で検討を行った。LCM を用い子宮体部と子宮頸部の上皮を採取し、子宮体部の上皮の P<sub>4</sub> 応答遺伝子である *Areg*、*Hdc*、*Ihh* について、qPCR を行ったところ、全ての P<sub>4</sub> 応答遺伝子が子宮体部に比べ、子宮頸部で有意に低下していた (図 16A)。このことから、子宮頸部では P<sub>4</sub> の応答性が低下している可能性が示唆された。また、ISH についても qPCR と同様に、P<sub>4</sub> 応答遺伝子が子宮体部に比べ、子宮頸部で発現が低下していた (図 16B)。着床前の子宮は E<sub>2</sub>・P<sub>4</sub> により制御されている[1]が、子宮体部で P<sub>4</sub> シグナルが低下したとき相対的に E<sub>2</sub> の作用が増し、E<sub>2</sub> 応答遺伝子である *Ltf* が増加する[43]。 *Ltf* を子宮体部と子宮頸部で比較したところ、子宮体部に比べ子宮頸部で *Ltf* の発現が亢進していた (図 17)。子宮頸部では PR 発現低下に伴う P<sub>4</sub> 応答遺伝子発現の低下が起こり、相対的に E<sub>2</sub> 応答遺伝子が増加している可能性が示された。

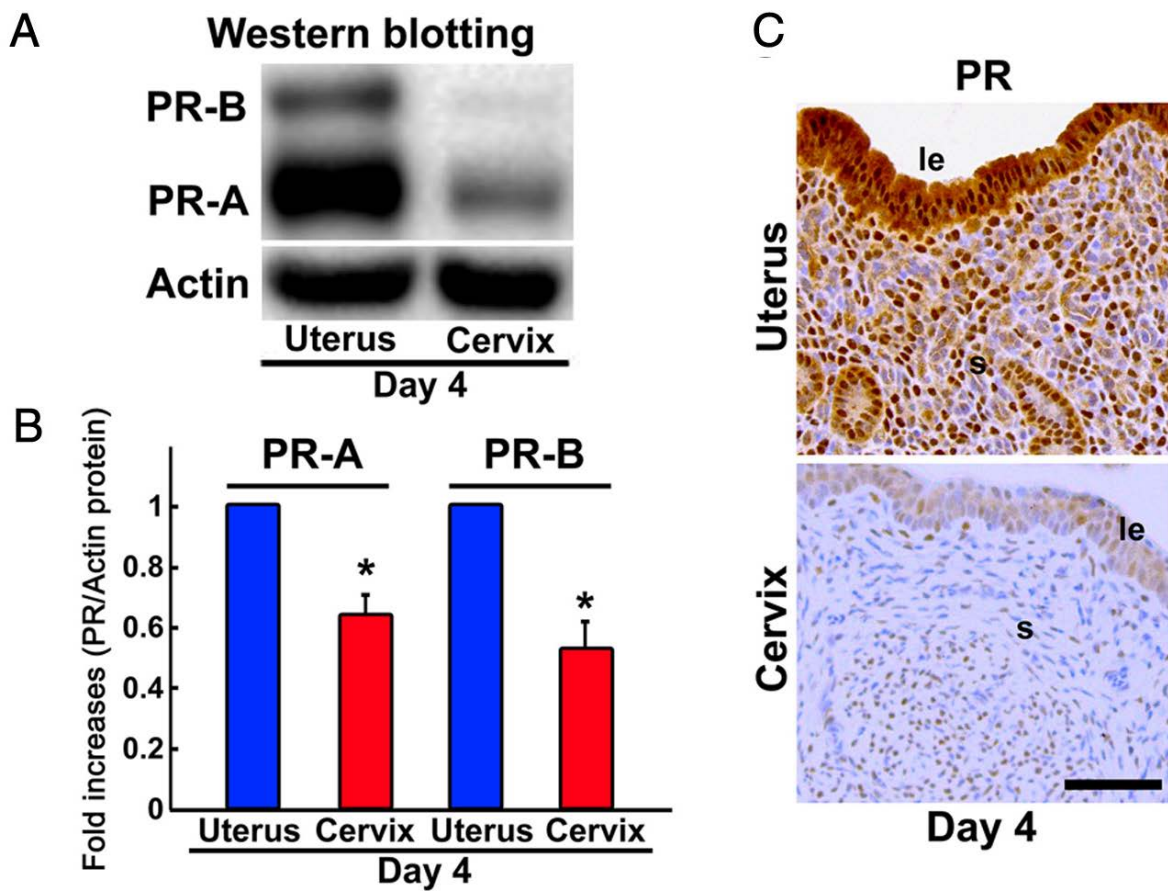


図 14. 着床期の PR の発現は、子宮体部に比べ、子宮頸部で低下している

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A・B: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の PR のウェスタンブロッティングを示す。PR の 2 つの isoform である PR-A、PR-B とともに子宮体部に比べ子宮頸部で低下している。各群 5 検体を用いて行い、Actin で標準化した。代表的な図を示した。数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。C: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の PR の免疫染色を示す。子宮体部に比べ子宮頸部で発現が低下している。各群 5 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 、le は上皮、s は間質を示す。

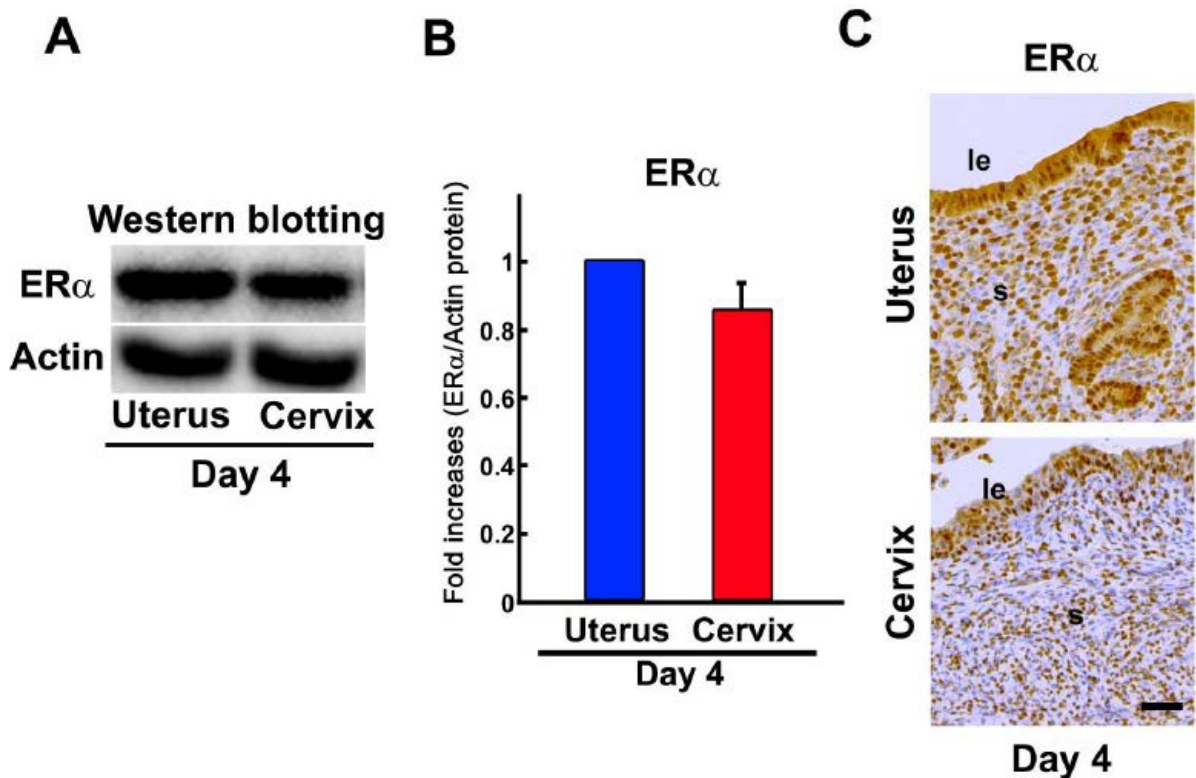


図 15. 着床期の ER $\alpha$  の発現は、子宮体部と子宮頸部では差はない

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A・B: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の ER $\alpha$  のウェスタンブロッティングを示す。子宮体部と子宮頸部で有意な差を認めない。各群 5 検体を用いて行い、Actin で標準化した。代表的な図を示した。数値は平均 $\pm$ 標準誤差である。C: Day 4 の子宮体部・子宮頸部の ER $\alpha$  の免疫染色を示す。各群 5 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 200  $\mu$ m、le は上皮、s は間質を示す。

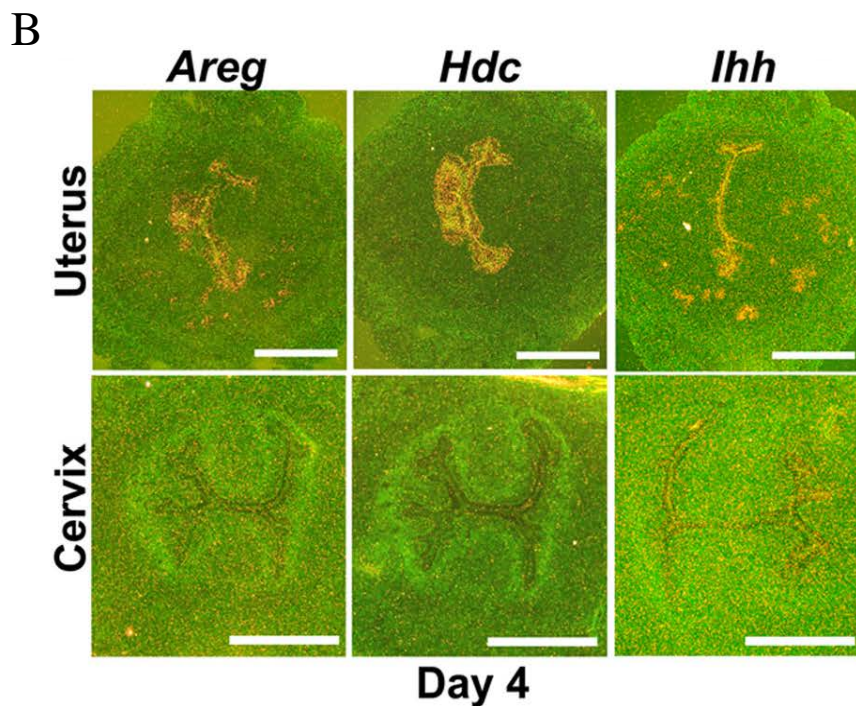
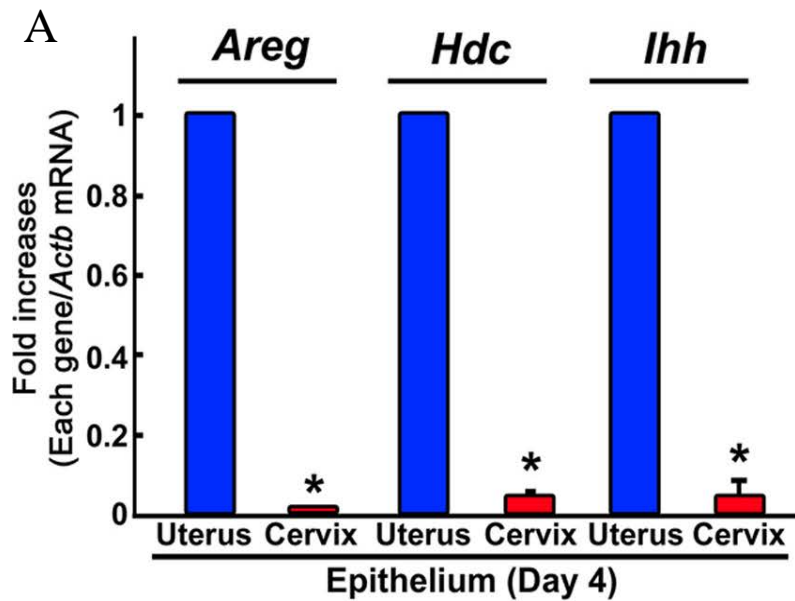


図 16. 着床期の子宮頸部では子宮体部に比べ、P<sub>4</sub>応答遺伝子の発現が低下している (Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
 A: LCM で得られた Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の上皮 (Epithelium) について P<sub>4</sub> 応答遺伝子である *Areg*、*Hdc*、*Ihh* の qPCR を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ、P<sub>4</sub> 応答遺伝子の発現が低下している。各群 3 検体を用いて行い、*Actb* で標準化した。数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す (P < 0.05)。B: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の *Areg*、*Hdc*、*Ihh* の代表的な ISH を示す。図のスケールバーは 500 μm を示す。

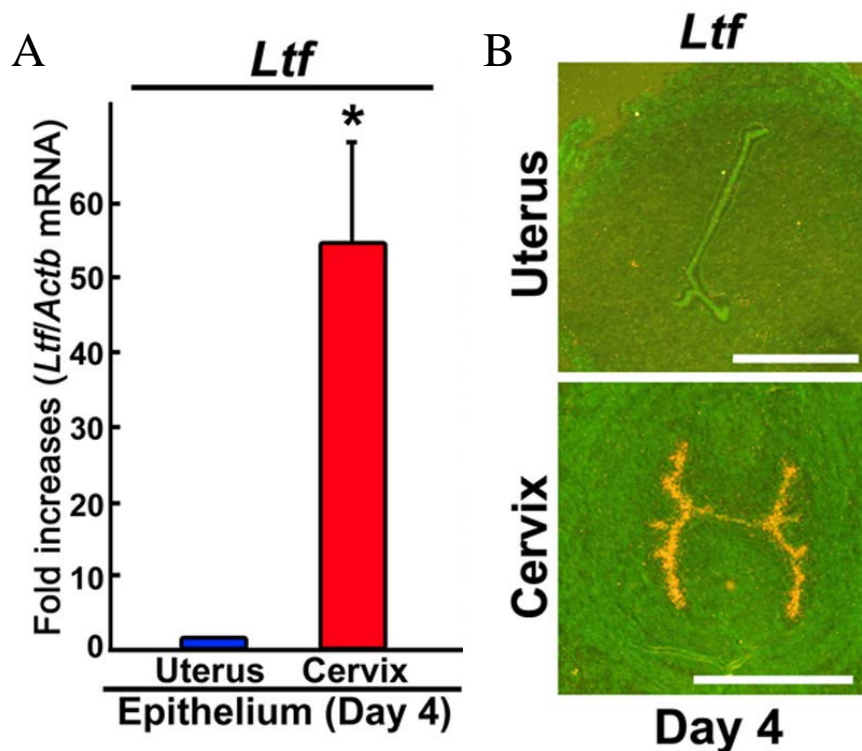


図 17. 着床期の子宮頸部では子宮体部に比べ、 $E_2$  応答遺伝子の発現が上昇している (Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A: LCM で得られた Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の上皮 (Epithelium) について、 $E_2$  応答遺伝子である *Ltf* の qPCR を示す。子宮頸部で子宮体部に比べ、発現が亢進している。各群 3 検体を用いて行い、*Actb* で標準化した。数値は平均 $\pm$ 標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。B: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の *Ltf* の代表的な ISH を示す。図のスケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を示す。

## 子宮頸部では、miR-200a の発現が上昇する

PR の mRNA レベルでの発現を検討した。LCM で得られた子宮体部・頸部の上皮と間質を用い qPCR を行ったところ、蛋白と異なり、mRNA レベルでは、上皮・間質ともに、子宮体部と子宮頸部に有意な差を認めなかった (図 18)。そこで、子宮頸部における PR 蛋白の低下の原因として、蛋白の分解に着目し、Ubiquitination Assay を行ったところ、子宮体部と子宮頸部でユビキチン化 PR に差を認めなかった (図 19)。

次に、子宮頸部における PR 蛋白の低下の原因として、転写後調節に着目した。

microRNA は、mRNA から蛋白へと翻訳する過程で配列特異的に転写後調節を行い蛋白合成に強く影響することが知られている[28]。ヒトとマウスで共通する microRNA のうち、文献・データベースで P<sub>4</sub>-PR シグナルに関連する microRNA について、子宮体部と子宮頸部で qPCR を行ったところ、いくつかの microRNA が子宮頸部で上昇していることがわかった (図 20)。最も子宮体部に比べて子宮頸部で上昇していた miR-200a に着目した (図 20・21)。P<sub>4</sub>シグナルを低下させる microRNA として、子宮筋の miR-200a が分娩時に、P<sub>4</sub>シグナルが低下させるという報告がある[17]。着床期の子宮体部と子宮頸部の miR-200a の発現を qPCR と ISH で検討すると、子宮体部と比較して、子宮頸部で miR-200a の発現が亢進していることが分かった (図 21)。また、マウスと同様に、ヒトの分泌期の ISH においても子宮体部と比較して、子宮頸部で miR-200a の発現が亢進していた (図 22)。



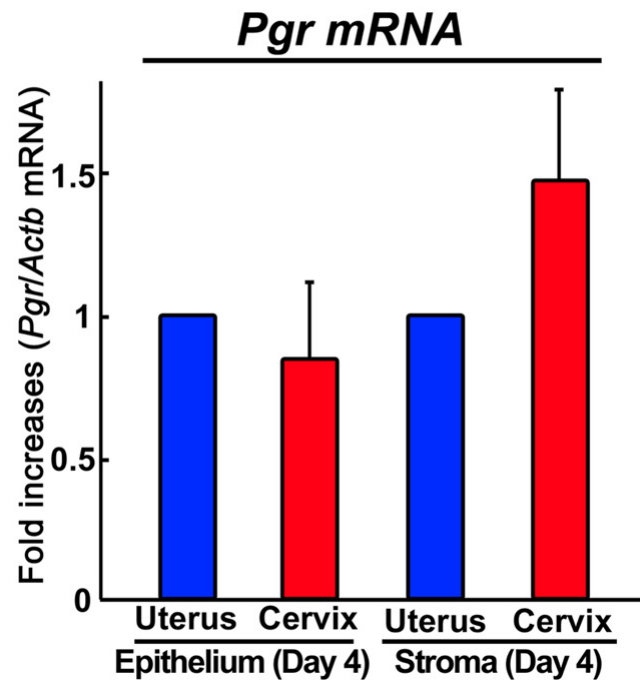


図 18. mRNA レベルでは、子宮体部と子宮頸部で PR の発現に差はない

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
 LCM で得られた Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の上皮 (Epithelium)・間質 (Stroma)について *Pgr* の qPCR を示す。子宮頸部と子宮体部で差を認めない。各群 3 検体を用いて行い、*Actb* で標準化した。数値は平均±標準誤差である。

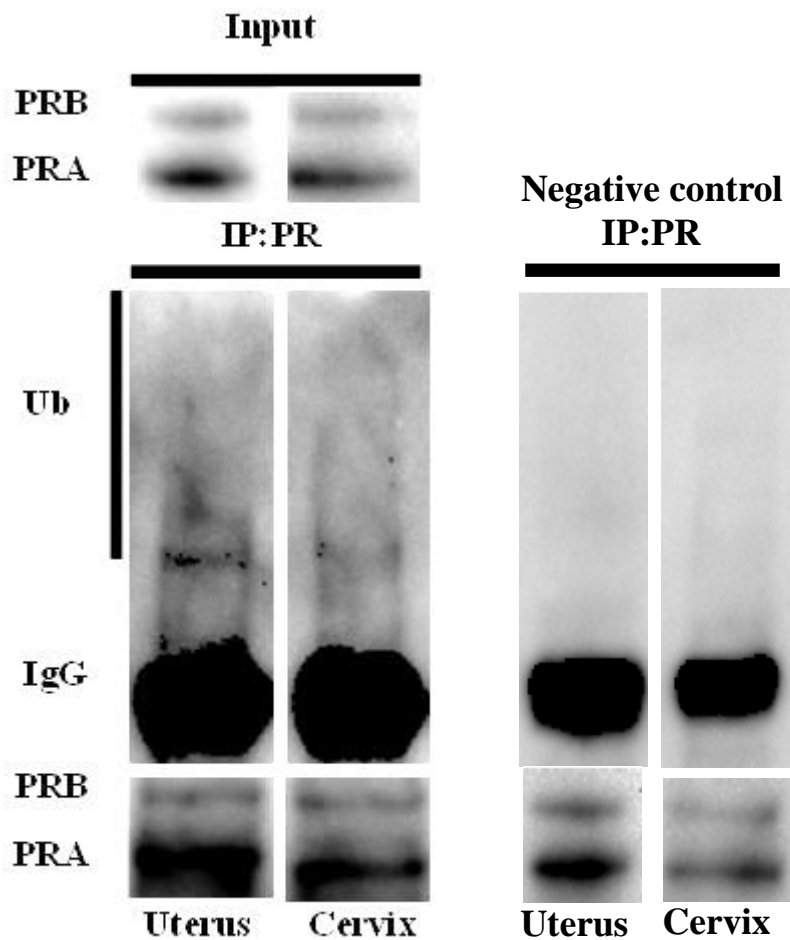


図 19. 子宮体部と子宮頸部でユビキチン化した PR に差はない

Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)のユビキチン化 PR のウェスタンブロッティングを示す。上が免疫沈降 (IP)前の PR、下が PR と免疫沈降を行った後のユビキチンと PR のウェスタンブロッティングを示す。子宮体部と子宮頸部でユビキチン化 PR に差を認めなかった。各群 3 検体を用い、代表的な図を示した。Negative control は MG132 で処理していないものを使用した。

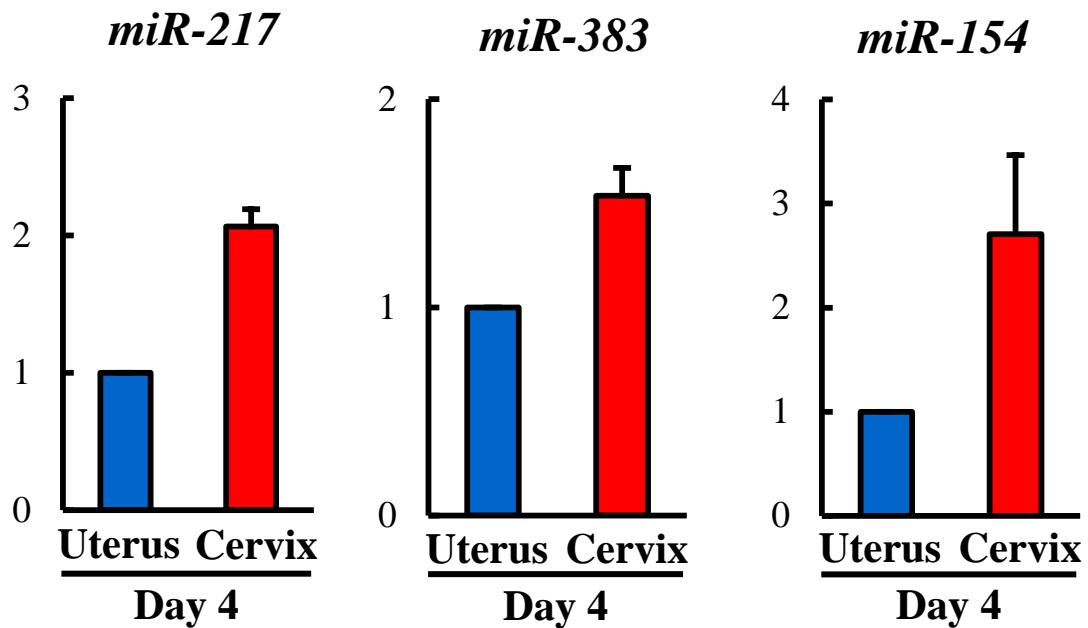


図 20. 着床期に子宮体部に比べ、子宮頸部で、*miR-217*、*miR-383*、*miR-154* の発現が亢進している

Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)について *miR-217*、*miR-383*、*miR-154* の qPCR を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ亢進している。各群 7 検体を用いて行い、*U6* で標準化した。数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

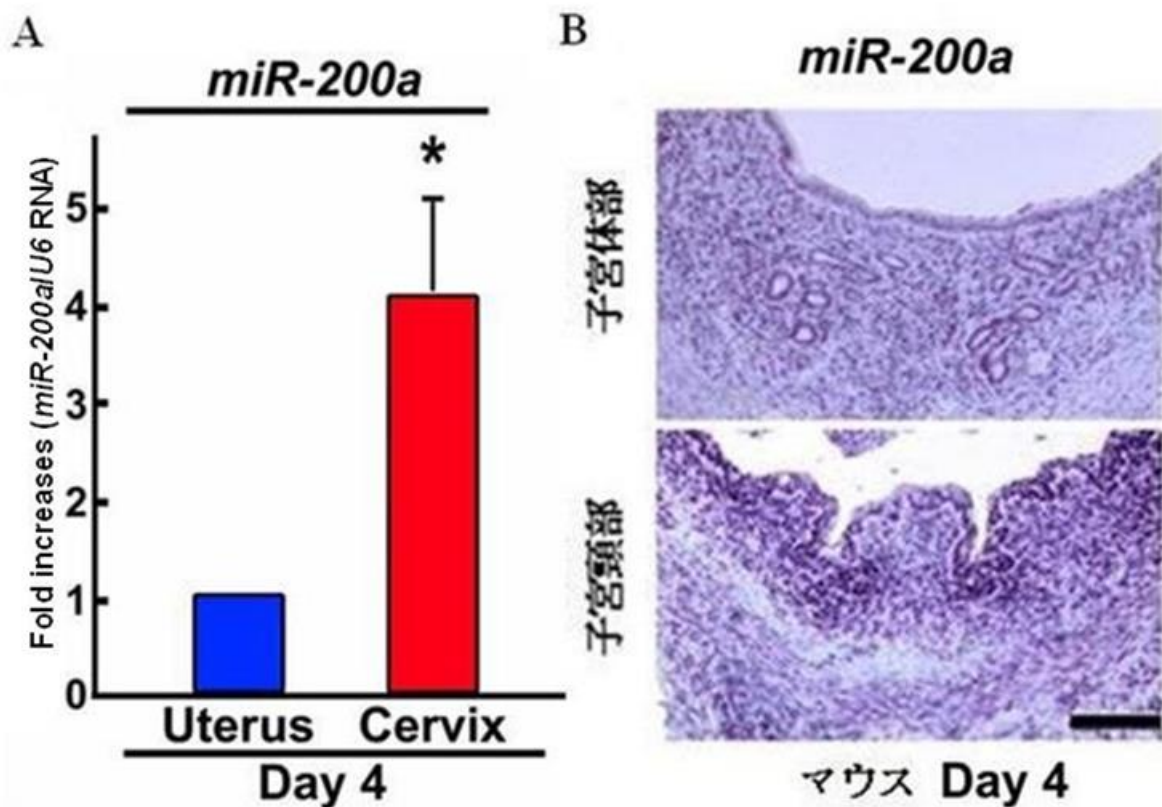


図 21. 着床期の子宮頸部では、子宮体部に比べ、*miR-200a* の発現が亢進している (A: Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)について *miR-200a* の qPCR を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ亢進している。各群 7 検体を用いて行い、*U6* で標準化した。数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

B: Day 4 の子宮体部・子宮頸部の *miR-200a* の代表的な ISH を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ発現が亢進している。図のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

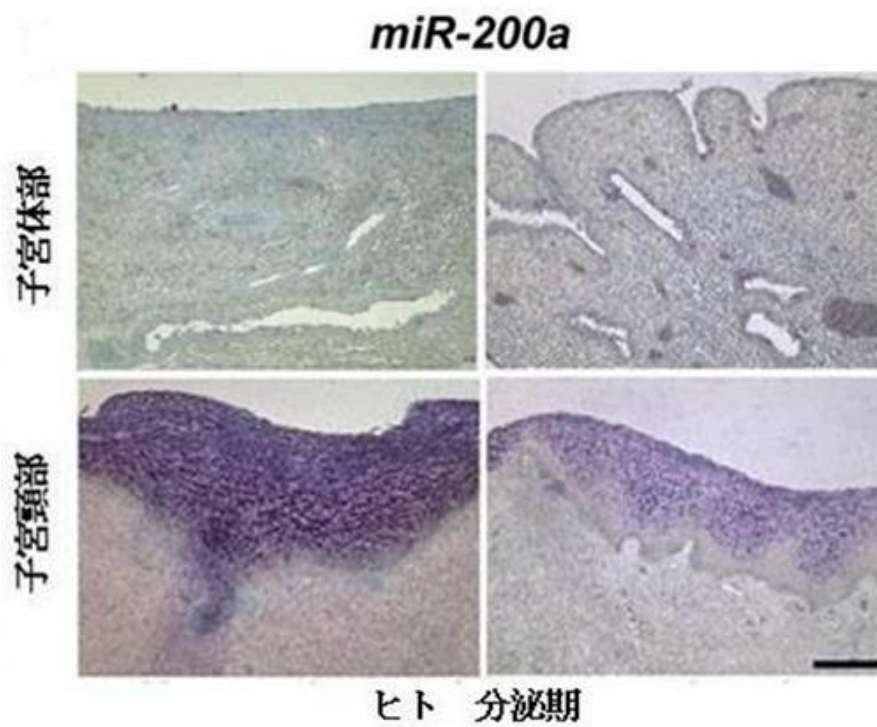
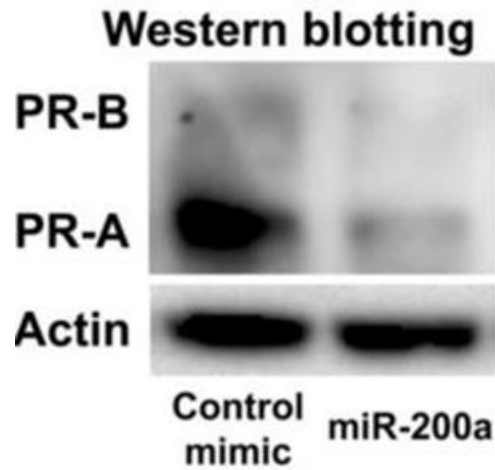


図 22. ヒトの着床期の子宮頸部では、子宮体部に比べ *miR-200a* の発現が亢進している  
 ヒトの分泌期の子宮体部・子宮頸部の *miR-200a* の代表的な ISH を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ発現が亢進している。図のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

## PR は *miR-200a* の直接のターゲットである

*miR-200a* が PR の発現に影響するか検討を行った。PR を発現している MCF-7 細胞株を用い、*miR-200a* を導入したところ、PR-A、PR-B ともに低下したことから (図 23)、*miR-200a* が PR を低下させることが分かった。この *miR-200a* が直接 PR (gene code は *Pgr*) を標的としているか調べるため、luciferase reporter assay を行った。図 24A のように、luciferase の下流にヒト *PGR* 3' UTR の *miR-200a* の推定結合部位 (8871–8895 塩基) を含む reporter のプラスミドと、*miR-200a* または control の miRNA mimic を導入し、luciferase reporter assay を行った。*miR-200a* を導入すると、luciferase 活性は有意に低下したが、control では影響なかった (図 24B)。また、*PGR* に *miR-200a* が結合しないように *miR-200a* の推定結合部位を変異させたものでは、*miR-200a* を導入しても、luciferase 活性は変化しなかった (図 24B)。以上のことから、PR は *miR-200a* の直接の標的であることが示唆された。



**図 23. *miR-200a* は PR の発現を低下させる**

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])  
*miR-200a* または control を導入した MCF-7 細胞株の PR のウェスタンブロッティングを示す。*miR-200a* により PR-A、PR-B とともに低下している。Actin で標準化し、代表的な図を示した。

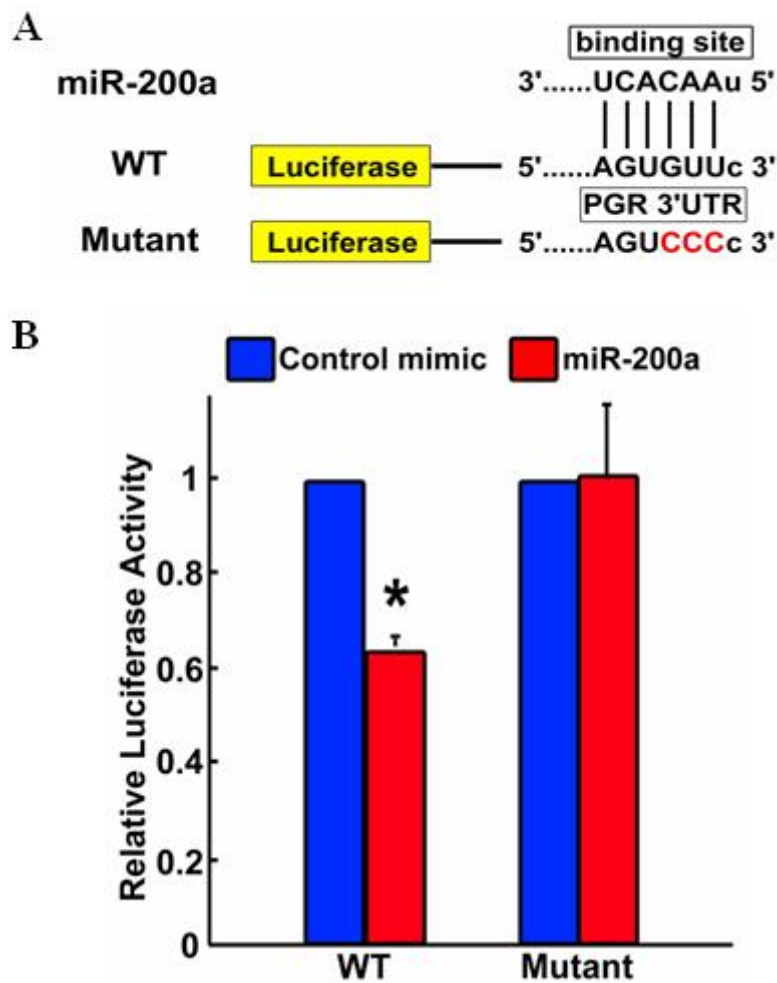


図 24. *miR-200a* は直接 PR の発現を低下させる

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A: WT と Mutant について、簡易化した luciferase とヒト *PGR* の 3' UTR の *miR-200a* の推定結合部位 (8871-8895 塩基)を示す。Mutant は *miR-200a* と *PGR* が結合しないように推定結合部位に変異を加えた。B: COS-7 細胞株に *miR-200a* または control を導入し行った luciferase reporter assay の結果を示す。*miR-200a* により reporter 活性が低下したが、結合部位を変異させたものでは低下しなかった。Control では reporter 活性に変化なかった。実験は独立して 3 回行い、数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )



## マウス子宮頸部での P<sub>4</sub>代謝

分娩時、子宮筋の *miR-200a* が Stat5 を抑制することで、P<sub>4</sub>の代謝酵素である 20 $\alpha$ -HSD を亢進させる[17]ことから、着床期の子宮体部・子宮頸部について、Stat5・20 $\alpha$ -HSD の発現を検討した。Stat5 蛋白の解析については、total Stat5 と活性型である pStat5 を検討した。mRNA レベルで、Day 4 の子宮頸部では子宮体部に比べ、*Stat5b* が低下しているのに対し、20 $\alpha$ -HSD は亢進していた (図 25A・B)。また、蛋白レベルについても、子宮頸部では子宮体部に比べ、total Stat5 と pStat5 とともに低下し、20 $\alpha$ -HSD は亢進していた (図 26・27)。以上のことから、子宮頸部の *miR-200a* は PR の発現を抑制するだけでなく、Stat5 の低下を介し、P<sub>4</sub>代謝酵素である 20 $\alpha$ -HSD を亢進させることで P<sub>4</sub>代謝を促進し、P<sub>4</sub>シグナルを低下させていることが示唆された。

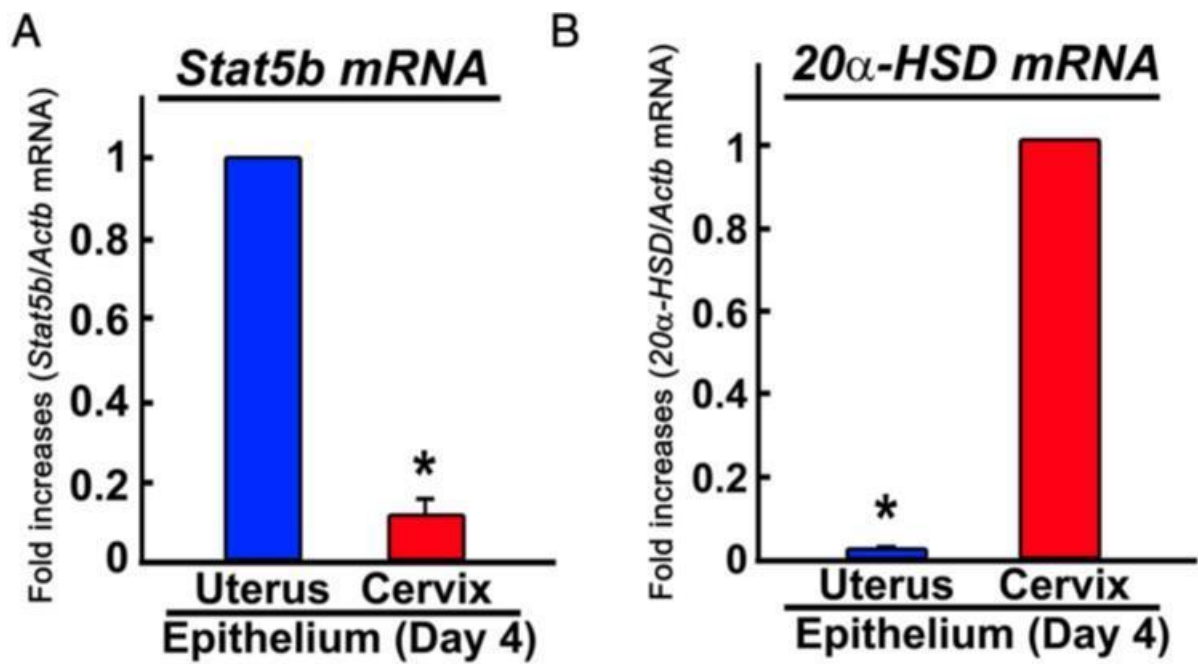


図 25. mRNA レベルで子宮頸部では、子宮体部に比べ、*Stat5* が低下し、*20α-HSD* が上昇している

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A・B: LCM で得られた Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) の上皮 (Epithelium) について *Stat5b* と *20α-HSD* の qPCR を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ、*Stat5b* が低下し、*20α-HSD* は上昇している。各群 3 検体を用いて行い、*Actb* で標準化した。数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

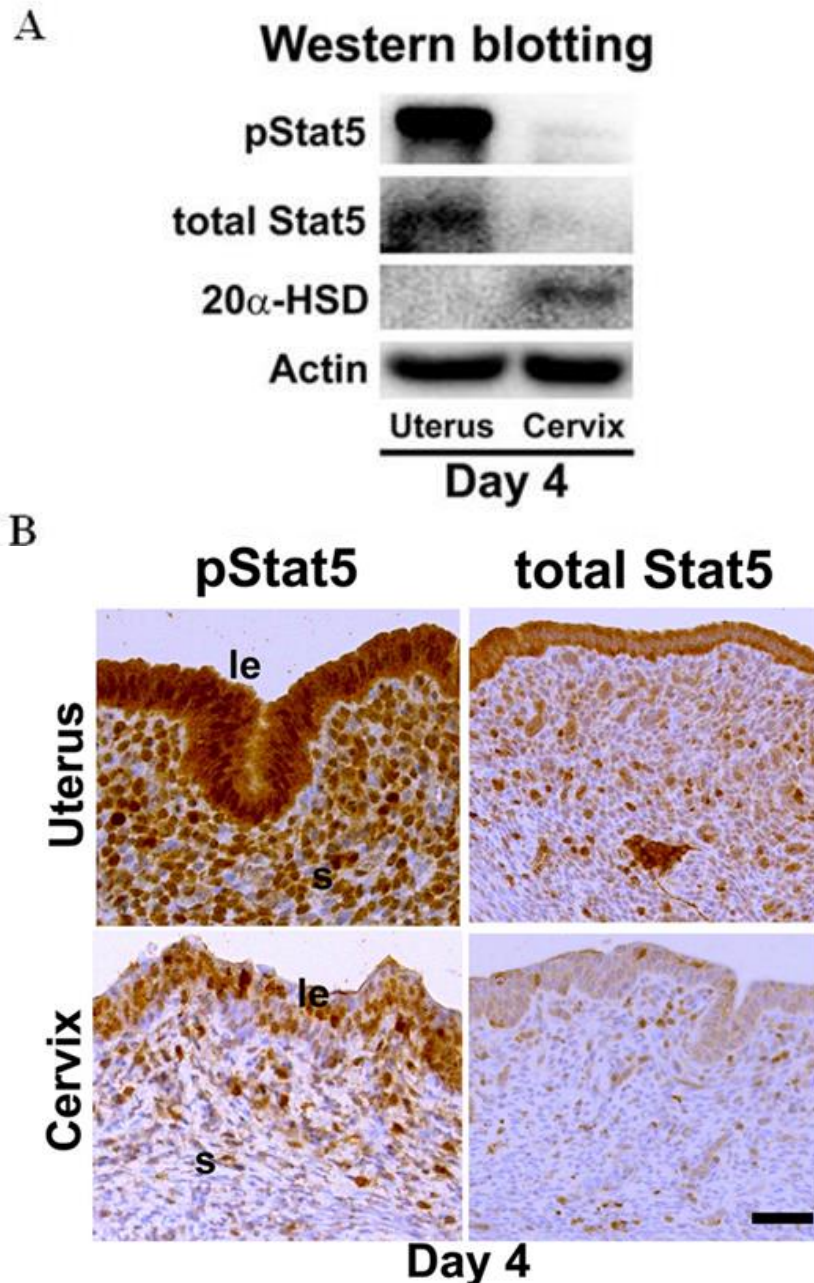


図 26. 蛋白レベルで子宮頸部では、子宮体部に比べ、Stat5 が低下し、20 $\alpha$ -HSD が上昇している

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

A: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)について pStat5、Stat5、20 $\alpha$ -HSD のウェスタンブロッティングを示す。子宮頸部では子宮体部に比べ、Stat5 が低下し、20 $\alpha$ -HSD は亢進している。Actin で標準化し、各群 3 検体を用いて行った。代表的な図を示した。B: Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix)の pStat5、Stat5 の免疫染色を示す。子宮頸部では子宮体部に比べ、pStat5、Stat5 とともに低下していた。各群 3 検体検討し、代表的な図を示した。図のスケールバーは 200  $\mu$ m、le は上皮、s は間質を示す。

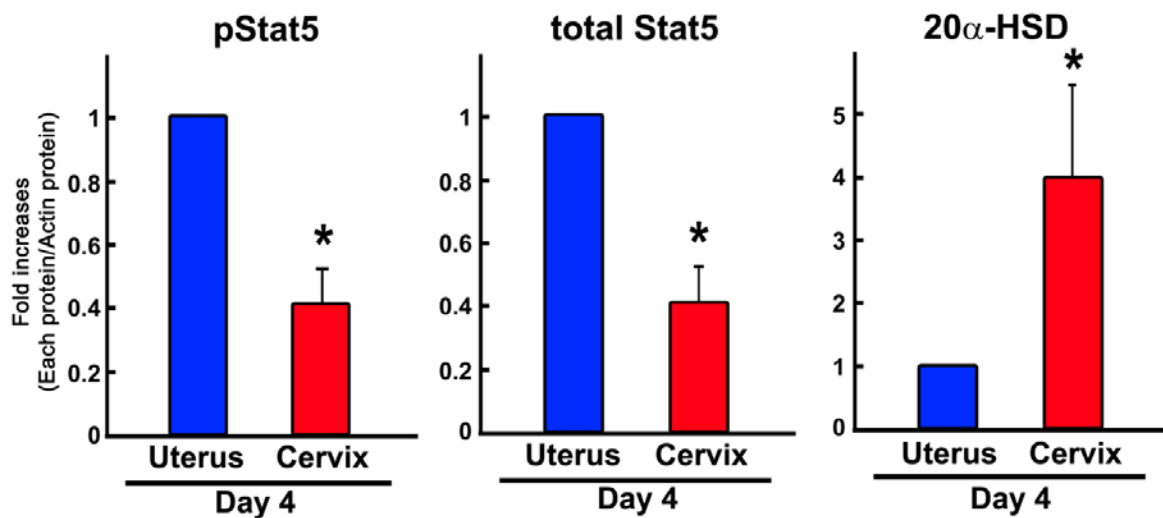


図 27. 蛋白レベルで子宮頸部では、子宮体部に比べ、Stat5 が低下し、20α-HSD が上昇している

(Haraguchi, H., et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* 28, 1108-1117 (2014) [42])

図 26A で示した Day 4 の子宮体部 (Uterus)・子宮頸部 (Cervix) について pStat5、Stat5、20α-HSD のウェスタンブロッティングの定量化したグラフを示す。子宮頸部では子宮体部に比べ、Stat5 が低下し、20α-HSD は亢進している。Actin で標準化し、各群 3 検体を用いて行った。\*は、群間に有意差があることを示す (P < 0.05)。

### 子宮体部の *miR-200a* は着床期に低下する

子宮体部では、 $P_4$ シグナルが着床期の細胞の分化・増殖を制御しているのに対し、子宮頸部では、*miR-200a*の上昇による  $P_4$ -PR シグナルの低下が起こっていることが判明した。そこで、着床期における子宮体部の *miR-200a* の発現を検討した。着床期である Day 4 では、Day 3 に比べ *miR-200a* の発現が低下していた (図 28)。このことから、子宮体部では、着床期に *miR-200a* が低下し、 $P_4$ -PR シグナルが増強され、着床能を獲得している可能性が示唆された。

## miR-200a

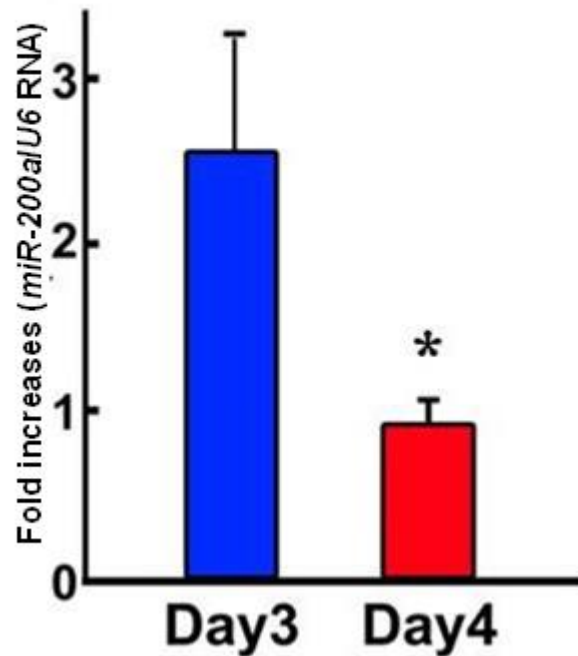


図 28.子宮体部では着床期に *miR-200a* の発現が低下する

Day 3 と Day 4 の子宮体部の *miR-200a* の qPCR を示す。Day4 では Day3 に比べ低下している。各群 7 検体を用いて行い、U6 で標準化した。数値は平均±標準誤差である。\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

## 考察

本研究では、子宮体部では着床期に *miR-200a* が減少することで、 $P_4$  シグナルが亢進し、細胞の分化・増殖の状態が変化し、着床能を獲得するのに対し、子宮頸部では、高発現の *miR-200a* により  $P_4$  シグナルが低下し、着床能を獲得できないことを示した。

本研究では、子宮体部で、着床期に上皮細胞の増殖が消失し分化することと間質細胞の増殖が亢進することが見られたのに対し、着床能をもたない子宮頸部では着床期に上皮細胞の増殖が消失しないで持続していることを示した。文献上、この細胞の分化・増殖の変化を認めないマウスは、すべて着床障害となる[11] [15] [44] [45] [46]。このことから、着床期に上皮の増殖が消失し、間質の増殖が亢進するという変化が、子宮の着床能獲得のマーカーとなる可能性が示唆された。

本研究では、細胞の分化・増殖の変化を制御するものとして  $P_4$  シグナルに着目した。着床期に、 $P_4$  シグナルを担う PR の蛋白発現とその下流である  $P_4$  応答遺伝子の発現が子宮体部に比べ、子宮頸部では低下していたことから、子宮頸部の  $P_4$  シグナル低下は、子宮頸部で着床しない一因であることが示唆された。さらに、本研究では、子宮頸部で亢進している *miR-200a* が  $P_4$  の代謝酵素である  $20\alpha$ -HSD を亢進させ、 $P_4$  代謝を促進させるとともに、*miR-200a* が直接 PR の蛋白の発現を低下させることで  $P_4$  シグナル低下を引き起こしていること、着床期の子宮体部では *miR-200a* が低下することを示した。これらの結果をまとめると、図 29 に示すように、子宮体部では *miR-200a* が低下することで  $P_4$  シグナルが作用し着床能を獲得するのに対し、子宮頸

部では *miR-200a* が  $P_4$  シグナルを低下させ着床能を得られないことが示唆された。本研究により、*miR-200a* の低下が子宮体部の着床能獲得のトリガーとなっている可能性や、*miR-200a* の高発現が着床障害の原因となっている可能性が考えられる。それらを調べるには、着床障害の患者の子宮内膜の *miR-200a* の発現を解析するなど、更なる研究が必要である。子宮内膜症を有する不妊患者では、着床期の子宮で *miR-200a* の発現が上昇しているという報告があり[47]、これは実際のヒトの不妊症と *miR-200a* の関連を示唆するものである。不妊の原因となる子宮内膜症を罹患していない着床障害の患者における着床期の子宮内膜の *miR-200a* の発現の解析を今後検討している。また、子宮での *miR-200a* の機能解析には、*miR-200a* の欠損マウスが有効と考えられるが、現在まで *miR-200a* 欠損マウスの報告はない。同じ *miR-200* ファミリーの *miR-200b* の欠損マウスは下垂体に影響し、*ZEB1* を介し卵巣機能を低下させ、着床以前の排卵の問題で不妊になることが報告された[48]。*miR-200a* も *ZEB1* を制御することから[22][23][24]、全身性の *miR-200a* 欠損マウスは、*miR-200b* 欠損マウスと同様に着床以前の問題で不妊となる可能性があるため、子宮特異的 *miR-200a* 欠損マウスでの作成が必要となるかもしれない。また、妊娠マウスに対し、Day 2 に *miR-200a* の mimic を子宮内に注入したところ、着床数が低下したという報告があることから[49]、*miR-200a* を強制発現させたマウスの作成も子宮での *miR-200a* の機能解析に有効となるかもしれない。



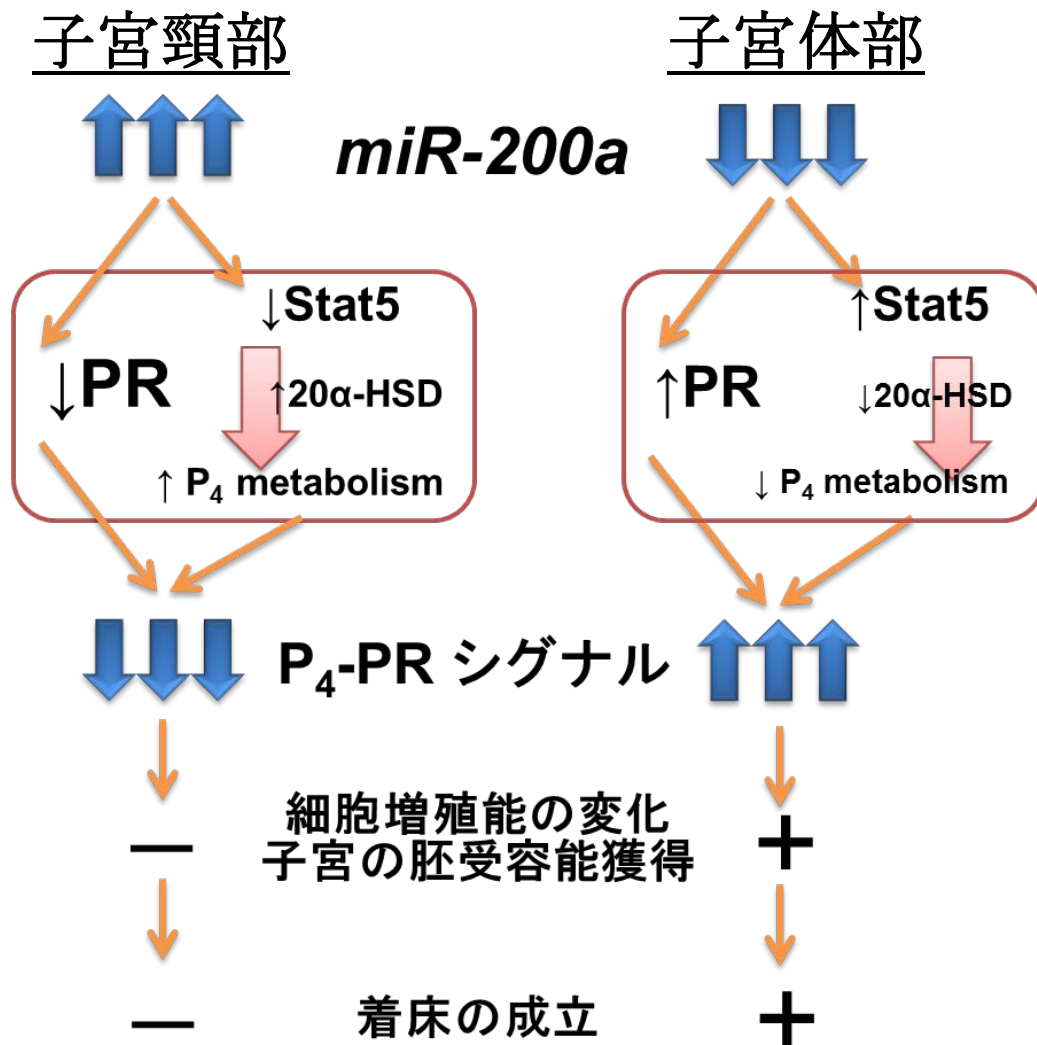


図 29. 子宮体部・頸部における *miR-200a* による P<sub>4</sub>シグナル制御の模式図

本研究では、*miR-200a* が STAT5 に作用することで、 $P_4$ 代謝を促進させ  $P_4$ シグナルを低下させるだけでなく、*miR-200a* が直接 PR の蛋白の発現を低下させることを示した。PR の発現は、 $E_2$ により誘導される報告[50] [51] [52] [53]があるように様々な因子により制御されているが、この *miR-200a* も子宮の PR の発現制御因子のひとつとなっている可能性がある。本研究では、PR 発現が上昇する着床期で *miR-200a* が低下することを示した。マウスでは脱落膜化が進み PR 発現が上昇する Day 8 にかけて[54]、Day 4 に比べ *miR-200a* の発現が低下しているという報告があり[49]、PR と *miR-200a* の発現が関連している可能性が示唆される。*miR-200a* は、様々な組織・細胞で、転写抑制因子である ZEB1/2 の 3'UTR に直接作用することが知られている[22] [23] [24] [18]。分娩時の子宮筋の報告では、*miR-200a* が直接 *Stat5* に作用することが示されたが[17]、*miR-200a* により *Stat5* の発現が mRNA レベルで低下していたことから、*miR-200a* が *Stat5* の転写調節に影響したことが示唆された。それに対し、本研究で行った細胞株に *miR-200a* を導入した検討では PR の mRNA レベルでの発現に変化なく、蛋白レベルでの PR の発現低下が見られたことから、*miR-200a* は PR に対し、転写調節に比べ転写後調節に影響し、蛋白レベルでの PR の発現を低下させた可能性が考えられる。

本研究では、*miR-200a* が子宮体部に比べ、子宮頸部で上昇していることを示した。*miR-200a* は *Ttll10* 遺伝子の近傍に位置し、呼吸器系、腎臓、生殖器系に発現していることがわかっている[21]。しかし、子宮での詳細な発現分布はわかっていない。子宮

頸部で発現が上昇していた原因として、*miR-200a* の発現を制御する因子が重要となってくるがその報告は少ない。卵巣を摘出したマウスの子宮において、 $P_4$  の投与後 24 時間で、*miR-200a* は減少し、PR のアンタゴニストである RU486 の投与後 24 時間では、*miR-200a* は上昇する報告がある[17]。着床において、 $E_2$  と  $P_4$  による子宮の制御は重要であり、 $E_2 \cdot P_4$  投与による時間経過や局在に着目した *miR-200a* の発現解析を行うことが参考となるかもしれない。*miR-200a* の発現を制御する因子の解明は、子宮頸部での *miR-200a* の上昇の機序の解明に繋がる可能性がある。

本研究では、子宮頸部が着床しにくいことに着目し研究を行った。本研究で行った子宮頸部と子宮体部を比較するというモデルは、今回の *miR-200a* のように、着床に機能的に関わる新たな因子を絞り込むのに良いモデルとなり、詳細のわかっていない着床のメカニズムの解明の手がかりとなるかもしれない。子宮頸管妊娠あるいは前置胎盤はまれな疾患ではあるが、時に、生命の危機となる大量出血を引き起こすことがある危険な疾患である。しかし、これまで、子宮頸管妊娠・前置胎盤の原因解明に繋がる、子宮頸部で着床が成立しにくいことの分子メカニズムを研究した報告はほとんどなく、本研究はその重要な手掛かりとなるかもしれない。子宮頸管妊娠・前置胎盤の発症リスクとして、子宮内膜搔爬術や帝王切開術の既往が挙げられている[55] [56] [57]が、本研究を考慮すると、子宮頸部や子宮の手術既往が、子宮頸部での *miR-200a* の低下や  $P_4$  シグナルの増強を招き、子宮頸管妊娠・前置胎盤に至るという可能性が考えられる。その解明には、手術既往のある子宮や、子宮頸管妊娠・前置胎盤におけ

る  $P_4$  シグナルや *miR-200a* の発現を解析するなどさらなる検証が必要である。

*miRNA* は、ほとんどの哺乳動物において時空間的に制御され、様々な生物学的プロセスに影響することが知られている[28]。*miRNA* などエピジェネティックな制御が様々な場面で注目されているが、着床に関しては、胚が着床を契機に DNA のメチル化が促進されることがわかっている[58]。これまで胚の研究は進んでいるのに対し、子宮のエピジェネティックな制御はほとんどわかっていなかった。本研究で、新たに *miR-200a* が着床期の子宮の機能を制御することが示された。着床期の子宮のエピジェネティックな制御に関する研究につながる可能性が期待される。

## まとめ

1. 着床期の子宮体部の細胞の分化・増殖の変化は、 $P_4$ -PR シグナルで調節され、子宮の着床能の指標となることが明らかになった。
2. *miR-200a* が直接作用し PR の発現を低下させることが判明した。
3. 子宮頸部では、高発現の *miR-200a* によって  $P_4$  シグナルが低下し、子宮体部のような着床期の細胞の分化・増殖の変化が起こらず、着床能を獲得できない可能性が示された。
4. 子宮体部では着床期に *miR-200a* が低下して  $P_4$  シグナルが増強され、細胞の分化・増殖の状態が変化し、着床能を獲得することが示唆された。

## おわりに

本研究によって、*miR-200a* による子宮の  $P_4$  シグナルと着床の調節機構が明らかになった。不妊治療において着床障害は未解決の問題である。体外受精における着床に適切な時期での胚移植は、不妊治療の成功確率の上昇に有効であるが、着床可能な時期を確実に診断する方法はない。*miR-200a* が、 $P_4$  シグナル異常があるような着床障害の患者の早期診断のマーカーとなる可能性や、正確な着床期の診断の新たなツールとなる可能性が考えられるため、今後ヒトの不妊治療への応用を考慮に入れてヒト不妊症の臨床検体を用いた研究に発展させていきたいと考えている。

また一方で、P<sub>4</sub>シグナルは早産や子宮腺筋症などの子宮に関係する疾患において異常が認められており、病理学的にも子宮にとって重要なシグナルといえる。*miR-200a*による P<sub>4</sub>シグナルの制御が早産や子宮腺筋症に関与することが推測されるため、これらの疾患の病態への関与についても今後研究を進展させたいと考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました廣田泰先生、大須賀穰教授、藤井知行教授に心よりお礼を申し上げます。

## 引用文献

1. Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T. & Wang, H. Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews* **25**, 341-373 (2004).
2. Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. & Abbondanzo, S.J. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* **359**, 76-79 (1992).
3. Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91**, 197-208 (1997).
4. Cha, J., Sun, X. & Dey, S.K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine* **18**, 1754-1767 (2012).
5. Taketani, Y., Kozuma, S., Fujii, T. & Osuga, Y. *Principles of Obstetrics and Gynecology* **3**, 40 - 93 (2014).
6. Kurita, T. Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differentiation; research in biological diversity* **82**, 117-126 (2011).
7. Egashira, M. & Hirota, Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reproductive Medicine and Biology* **12**, 127-132 (2013).
8. Allen, E. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* **30**, 297-+

- (1922).
9. Munro, S.K., Farquhar, C.M., Mitchell, M.D. & Ponnampalam, A.P. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **16**, 297-310 (2010).
  10. Paria, B.C., Huet-Hudson, Y.M. & Dey, S.K. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10159-10162 (1993).
  11. Daikoku, T., Cha, J., Sun, X., Tranguch, S., Xie, H., Fujita, T., Hirota, Y., Lydon, J., DeMayo, F., Maxson, R. & Dey, S.K. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Developmental cell* **21**, 1014-1025 (2011).
  12. Hirota, Y., Acar, N., Tranguch, S., Burnum, K.E., Xie, H., Kodama, A., Osuga, Y., Ustunel, I., Friedman, D.B., Caprioli, R.M., Daikoku, T. & Dey, S.K. Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15577-15582 (2010).
  13. Hirota, Y., Burnum, K.E., Acar, N., Rabinovich, G.A., Daikoku, T. & Dey, S.K. Galectin-1 markedly reduces the incidence of resorptions in mice missing



- immunophilin FKBP52. *Endocrinology* **153**, 2486-2493 (2012).
14. Barent, R.L., Nair, S.C., Carr, D.C., Ruan, Y., Rimerman, R.A., Fulton, J., Zhang, Y. & Smith, D.F. Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Molecular endocrinology* **12**, 342-354 (1998).
  15. Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T., Prapapanich, V., Cox, M.B., Xie, H., Wang, H., Das, S.K., Smith, D.F. & Dey, S.K. Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14326-14331 (2005).
  16. Penning, T.M. & Drury, J.E. Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of biochemistry and biophysics* **464**, 241-250 (2007).
  17. Williams, K.C., Renthall, N.E., Condon, J.C., Gerard, R.D. & Mendelson, C.R. MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7529-7534 (2012).
  18. Renthall, N.E., Chen, C.C., Williams, K.C., Gerard, R.D., Prange-Kiel, J. & Mendelson, C.R. miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America* **107**, 20828-20833 (2010).

19. Leonhardt, S.A., Boonyaratanakornkit, V. & Edwards, D.P. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* **68**, 761-770 (2003).
20. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. & Tuschl, T. New microRNAs from mouse and human. *Rna* **9**, 175-179 (2003).
21. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M. & Tuschl, T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401-1414 (2007).
22. Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E. & Peter, M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development* **22**, 894-907 (2008).
23. Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas,

- M.A., Khew-Goodall, Y. & Goodall, G.J. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology* **10**, 593-601 (2008).
24. Schliekelman, M.J., Gibbons, D.L., Faca, V.M., Creighton, C.J., Rizvi, Z.H., Zhang, Q., Wong, C.H., Wang, H., Ungewiss, C., Ahn, Y.H., Shin, D.H., Kurie, J.M. & Hanash, S.M. Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cancer research* **71**, 7670-7682 (2011).
25. Hiroki, E., Akahira, J., Suzuki, F., Nagase, S., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H. & Yaegashi, N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer science* **101**, 241-249 (2010).
26. Li, A., Omura, N., Hong, S.M., Vincent, A., Walter, K., Griffith, M., Borges, M. & Goggins, M. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer research* **70**, 5226-5237 (2010).
27. Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D. & Patel, T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* **130**, 2113-2129 (2006).

28. Nilsen, T.W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in genetics : TIG* **23**, 243-249 (2007).
29. Hu, S.J., Ren, G., Liu, J.L., Zhao, Z.A., Yu, Y.S., Su, R.W., Ma, X.H., Ni, H., Lei, W. & Yang, Z.M. MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *The Journal of biological chemistry* **283**, 23473-23484 (2008).
30. Chen, K., Chen, X., He, J., Ding, Y., Geng, Y., Liu, S., Liu, X. & Wang, Y. Mouse Endometrium Temporal and Spatial Expression mRNA and MicroRNA Associated With Embryo Implantation. *Reproductive sciences* **22**, 1399-1408 (2015).
31. Chakrabarty, A., Tranguch, S., Daikoku, T., Jensen, K., Furneaux, H. & Dey, S.K. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15144-15149 (2007).
32. Bouyer, J., Coste, J., Fernandez, H., Pouly, J.L. & Job-Spira, N. Sites of ectopic pregnancy: a 10 year population-based study of 1800 cases. *Human reproduction* **17**, 3224-3230 (2002).
33. Yankowitz, J., Leake, J., Huggins, G., Gazaway, P. & Gates, E. Cervical ectopic pregnancy: review of the literature and report of a case treated by single-dose methotrexate therapy. *Obstetrical & gynecological survey* **45**, 405-414 (1990).
34. Faiz, A.S. & Ananth, C.V. Etiology and risk factors for placenta previa: an overview

- and meta-analysis of observational studies. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* **13**, 175-190 (2003).
35. Noyes, R.W., Hertig, A.T. & Rock, J. Dating the endometrial biopsy. *American journal of obstetrics and gynecology* **122**, 262-263 (1975).
36. Ohno, M., Natsume, A., Kondo, Y., Iwamizu, H., Motomura, K., Toda, H., Ito, M., Kato, T. & Wakabayashi, T. The modulation of microRNAs by type I IFN through the activation of signal transducers and activators of transcription 3 in human glioma. *Molecular cancer research : MCR* **7**, 2022-2030 (2009).
37. Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K. & Kaneda, Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS biology* **10**, e1001314 (2012).
38. Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L. & Wang, D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* **38**, 228-233 (2006).
39. Conti, L., Sipione, S., Magrassi, L., Bonfanti, L., Rigamonti, D., Pettirossi, V., Peschanski, M., Haddad, B., Pelicci, P., Milanesi, G., Pelicci, G. & Cattaneo, E. Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nature neuroscience* **4**, 579-586

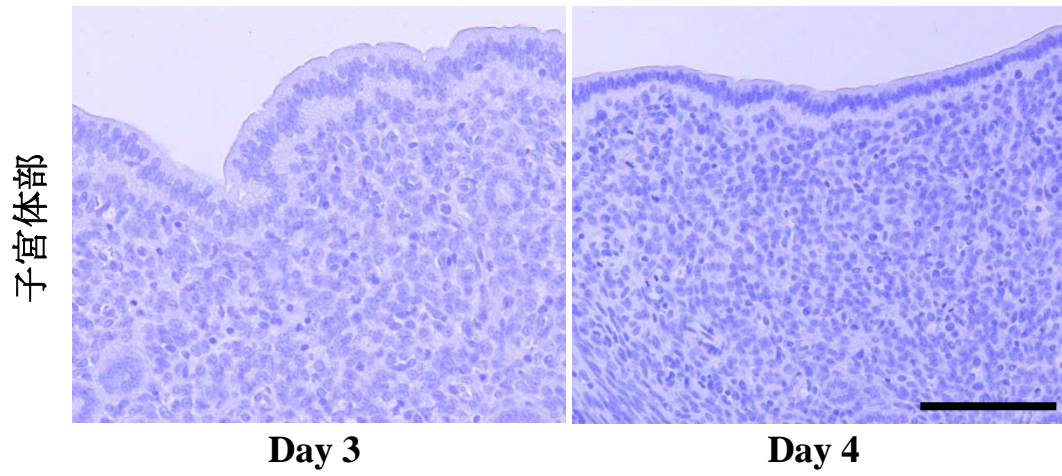
- (2001).
40. Dugan, L.L., Kim, J.S., Zhang, Y., Bart, R.D., Sun, Y., Holtzman, D.M. & Gutmann, D.H. Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *The Journal of biological chemistry* **274**, 25842-25848 (1999).
  41. Garcia, A.J., Vega, M.D. & Boettiger, D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Molecular biology of the cell* **10**, 785-798 (1999).
  42. Haraguchi, H., Saito-Fujita, T., Hirota, Y., Egashira, M., Matsumoto, L., Matsuo, M., Hiraoka, T., Koga, K., Yamauchi, N., Fukayama, M., Bartos, A., Cha, J., Dey, S.K., Fujii, T. & Osuga, Y. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Molecular endocrinology* **28**, 1108-1117 (2014).
  43. Tranguch, S., Wang, H., Daikoku, T., Xie, H., Smith, D.F. & Dey, S.K. FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1824-1834 (2007).
  44. Li, Q., Kannan, A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Cooke, P.S., Yamagishi, H., Srivastava, D., Bagchi, M.K. & Bagchi, I.C. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science* **331**, 912-916 (2011).
  45. Kawagoe, J., Li, Q., Mussi, P., Liao, L., Lydon, J.P., DeMayo, F.J. & Xu, J. Nuclear

- receptor coactivator-6 attenuates uterine estrogen sensitivity to permit embryo implantation. *Developmental cell* **23**, 858-865 (2012).
46. Sun, X., Bartos, A., Whitsett, J.A. & Dey, S.K. Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Molecular endocrinology* **27**, 1492-1501 (2013).
47. Ruan, Y., Qian, W.P., Zhang, C.H., Zhou, L. & Hou, Z.H. [Study on microRNA expression in endometrium of luteal phase and its relationship with infertility of endometriosis]. *Zhonghua fu chan ke za zhi* **48**, 907-910 (2013).
48. Hasuwa, H., Ueda, J., Ikawa, M. & Okabe, M. miR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility. *Science* **341**, 71-73 (2013).
49. Shen, L.J., He, J.L., Yang, D.H., Ding, Y.B., Chen, X.M., Geng, Y.Q., Liu, S.J., Liu, X.Q. & Wang, Y.X. Mmu-microRNA-200a overexpression leads to implantation defect by targeting phosphatase and tensin homolog in mouse uterus. *Reproductive sciences* **20**, 1518-1528 (2013).
50. Katzenellenbogen, B.S. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annual review of physiology* **42**, 17-35 (1980).
51. Janne, O., Kontula, K., Luukkainen, T. & Vihko, R. Oestrogen-induced progesterone receptor in human uterus. *Journal of steroid biochemistry* **6**, 501-509 (1975).
52. Savouret, J.F., Misrahi, M. & Milgrom, E. Molecular action of progesterone. *The*

- International journal of biochemistry* **22**, 579-594 (1990).
53. Okulicz, W.C., Savasta, A.M., Hoberg, L.M. & Longcope, C. Immunofluorescent analysis of estrogen induction of progesterone receptor in the rhesus uterus. *Endocrinology* **125**, 930-934 (1989).
54. Tan, J., Paria, B.C., Dey, S.K. & Das, S.K. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology* **140**, 5310-5321 (1999).
55. Ushakov, F.B., Elchalal, U., Aceman, P.J. & Schenker, J.G. Cervical pregnancy: past and future. *Obstetrical & gynecological survey* **52**, 45-59 (1997).
56. Vela, G. & Tulandi, T. Cervical pregnancy: the importance of early diagnosis and treatment. *Journal of minimally invasive gynecology* **14**, 481-484 (2007).
57. Ananth, C.V., Smulian, J.C. & Vintzileos, A.M. The association of placenta previa with history of cesarean delivery and abortion: a metaanalysis. *American journal of obstetrics and gynecology* **177**, 1071-1078 (1997).
58. Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A. & Meissner, A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* **484**, 339-344 (2012).

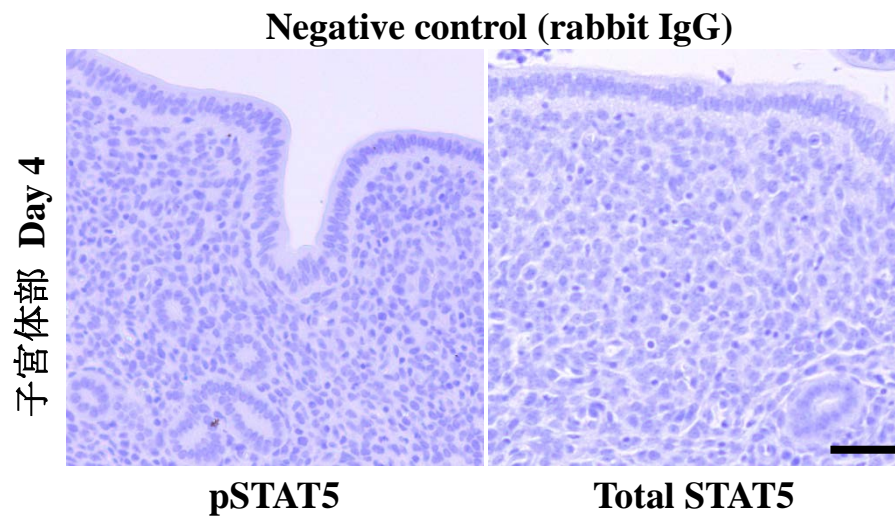


**Negative control (rabbit IgG)**



**補足図 1. Ki67 の免疫染色の Negative control**

WT マウスの子宮体部の Day 3・4 の Ki67 の免疫染色の negative control を示す。図のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。



**補足図 2. pSTAT5 と total STAT5 の免疫染色の Negative control**  
WT マウスの子宮体部の Day 4 の pSTAT5 と total STAT5 の免疫染色の negative control を示す。図のスケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。

## 略語集

20 $\alpha$ -HSD : 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase

20 $\alpha$ -OHP : 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone

Actb :  $\beta$ -actin

Areg : Amphiregulin

COX2 : cyclooxygenase-2

DIG : digoxigenin

E<sub>2</sub> : エストロゲン

EMT : epithelial-to-mesenchymal transition

ER : エストロゲン受容体

FKBP52 : FK-506 binding protein 4

FSH : 卵胞刺激ホルモン

GnRH : ゴナドトロピン放出ホルモン

Hdc : histidine decarboxylase

Hsp90 : Heat shock protein 90

Ihh : Indian hedgehog

ISH : in situ hybridization

LCM : Laser Capture Microdissection

LH : 黄体化ホルモン

LIF : Leukaemia inhibitory factor

Ltf : lactotransferrin

*miR-200a* : *microRNA-200a*

qPCR : quantitative PCR

P<sub>4</sub> : プロゲステロン

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PEN : polyethylene naphthalate

PR : プロゲステロン受容体

pStat5 : phosphorylated Stat5

Stat5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5

Ttl10 : Tubulin tyrosine ligase-like family, member 10

UTR : 非翻訳領域

WT : 野生型マウス

ZEB1/2 : Zinc finger E-box-binding homeobox1/2