

子宮脱落膜の分化不全による
新しい不妊症メカニズムの解明

東京大学大学院医学系研究科・疾患生命工学センター

分子病態医科学部門

指導教員 宮崎 徹 教授

森 真弓

目次

要旨	・ ・ ・ ・ ・ 2
略語等一覽	・ ・ ・ ・ ・ 3
序文	・ ・ ・ ・ ・ 7
方法	・ ・ ・ ・ ・ 18
結果	・ ・ ・ ・ ・ 29
考察	・ ・ ・ ・ ・ 77
結語	・ ・ ・ ・ ・ 88
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 89
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 90

要旨

母体内で着床後の胚が正常に発生・成長するためには、子宮の機能が極めて重要である。特に、胎盤が形成される前に胚に栄養を送る脱着膜組織は重要であるにも関わらず、未だその機能における分子メカニズムがわかっていない。

私は、death effector domain-containing protein (Dedd) 欠損マウスが呈するメス不妊症の原因が脱着膜分化不全にあることを明らかにし、その分子メカニズムを解明するとともに、女性不妊症において脱着膜の機能分化が原因かつ治療のターゲットの一つになり得る可能性を示した。

略語等一覧

4E-BP1 : eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

Ang-2 : angiopoietin 2

Bmp2 : Bone morphogenetic protein 2

BrdU : bromodeoxyuridine

CDK : Cyclin-dependent kinase

CHX : cycloheximide

COX-2 : cyclooxygenase-2

DED : death effector domain

DEDD : Death effector-domain containing protein

DISC : death-inducing signaling complex

DMEM : Dalbecco's modified Eagle medium

Dprp : decidual prolactin-related protein

E2 : 17 β -estradiol

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EGF : epidermal growth factor

EGFP : enhanced green fluorescence protein

Esr : estrogen receptor α

FADD : Fas-associated death domain

FBS : fetal bovine serum

FOXO1 : forkhead box, class O1

FSC : Forward Scatter

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HB-EGF : heparin-binding EGF-like growth factor

HBSS : Hanks' balanced salt solutions

hCG : human chorionic gonadotropin

HE 染色 : Hematoxylin & eosin 染色

HEK : human embryonic kidney

Hsp90 : heat shock protein 90

Hoxa10 : Homeobox A10

Igfbp-1 : Insulin-like growth factor-binding protein 1

IL-11R α : Interleukin-11 receptor alpha

LIF : leukemia inhibitory factor

MEF : mouse embryonic fibroblast

mTOR : mammalian target of rapamycin

NLS : nuclear localization signal

P4 : progesterone

Pgr : progesterone receptor

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PDZ : primary decidual zone

Plp-j : prolactin-like protein J

PMSG : pregnant mare serum gonadotropin

Prlr : prolactin receptor

Ptgs-2 : prostaglandin-endoperoxide synthase 2

rRNA : ribosomal RNA

S6K1 : ribosomal protein S6 kinase-1

SDZ : secondary decidual zone

SEM : standard error or the mean

SNPs : single nucleotide polymorphisms

SSC : Side Scatter

TGC : trophoblastic giant cell

TIMP-3 : tissue inhibitor of metalloproteinase 3

TNF α : tumor necrosis factor alpha

VEGF : vascular endothelial growth factor

遺伝子・遺伝子産物の表記は以下の通りとした。ただし、一般的な通称・略称でこれに従うと誤解を招くおそれのある場合は、ことわりなくその通称・略称を記した部分がある。また、ヒト及びマウスの両方を指す単語は、ヒトを優先した表記にした。

HUMAN GENE

HUMAN PROTEIN

Murine Gene

Murine Protein

序文

子宮脱落膜の妊娠維持における重要な意義

現在、生殖年齢で不妊症を経験する女性は、10～15% もいるとされている。

明らかな原因として卵管や卵巣の形態・機能的異常、そして子宮内膜症が背景にみとめられる場合があるが、原因がまったく不明な例も少なくない。私は、女性不妊症の原因になりうる要因として脱落膜 (decidua) に注目した。脱落膜は、胎盤が形成されるまでの間に、着床胚に対して栄養源や成長因子を供給し、また胎児と母体間で免疫的拒絶が起きるのを防ぐバリアの働きをする、非常に重要な子宮組織である。実際、近年になって、着床時及び着床後の脱落膜形成が不妊の原因となりうることも、他の研究者の間でも注目されるようになってきた [1-3]。マウスでは、交尾後に妊娠 Day 4.5 で着床が起きた直後に、胚の周囲組織が増殖しながら脱落膜に分化し、Day 8.5 から胎盤形成が始まるまで、初期の妊娠維持に重要な役割を果たす。特に着床後初期の Day 4.5 から 6.5 にかけては、胚がある中心部から子宮外部に向かって遠心的に、脱落膜化が急速に進行する。最も分化が早く始まった中心部付近が *primary decidua* と呼ばれ、その周囲の未分化間質細胞に接する血管の豊富な領域が *secondary decidua* と呼ばれる (図 1)。これらを合わせた脱落膜組織にグリコーゲンや脂質などの栄養が蓄

えられ、胚側へ輸送するのが脱落膜の機能の一つであると考えられている。もう一つの機能は、母体と胎児という異個体間で免疫拒絶を防ぐための免疫バランスの場となっていることである。胚側由来の細胞である trophoblastic cell (栄養膜細胞) が、将来胎盤形成に関与する前に、子宮側へ異常浸潤しないよう堰き止める物理的バリアの役割も果たすとされている。この脱落膜を構成する脱落膜細胞の特徴は、グリコーゲンや脂質などの栄養を細胞内に蓄積すること、プロラクチンやそのファミリータンパク質をはじめとする多種多様なマーカーを発現すること、さらに、4n、8n を中心として最大 64n 程度まで DNA コピー数が増えた多核細胞になることである [2]。このような脱落膜細胞分化は、ヒト子宮内膜あるいはマウス子宮間質細胞を単離培養し、エストロゲン・プロゲステロンを加えることにより、in vitro で誘導できる [4]。マウスでは 7 日間の誘導中に、(1) 細胞の増殖、(2) 分化マーカーの発現、(3) 多核化を伴う成熟という三つの段階を経る。脱落膜分化のメカニズムやその不妊症との関係に関しては、*Homeobox A10 (Hoxa10)* の欠損マウス [5、6] や、*Interleukin-11 receptor alpha (Il-11R α)* 欠損マウス [7、8] 等においてそれらの欠損分子の関与が示されてきた。またさらに、細胞周期の制御が子宮間質細胞の増殖や脱落膜分化・多核化において重要であるという見方が出てきている。特に、Cyclin D3 依存的に活性化する Cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) と Cdk6 のはたらきやそのタイミ

ングが、この増殖・多核化というそれぞれの段階の調節に重要であることを示唆する報告がある [9]。

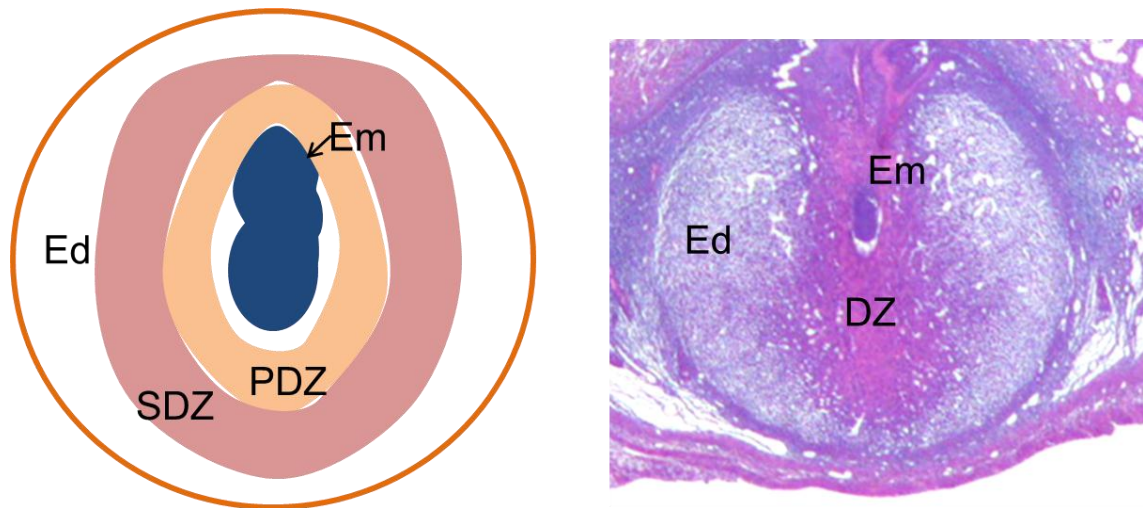


図 1. マウス子宮脱落膜組織の模式図と組織像

左：着床した子宮組織の胚と脱落膜の位置関係を表した模式図。Em : Embryo (胚)、PDZ : primary decidua zone、SDZ : secondary decidua zone、Ed : Edematous region (浮腫化領域)。右：妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位矢状断面の HE 染色像。DZ : decidua zone (脱落膜)。

Death effector domain-containing protein (DEDD) について

Death effector domain (DED) は、プログラム細胞死・アポトーシスに働く Caspase-8 及び Caspase-10 や、デスレセプターである Fas (CD95) と Caspase を繋ぐアダプター分子である Fas-associated death domain (FADD) などに含まれるドメインである。これらのタンパク質は、アポトーシス誘導刺激時に互いの DED 同士を介して会合することにより death-inducing signaling complex (DISC)

を形成し、アポトーシスが開始する [10]。

Death effector domain-containing protein (DEDD) は、DED タンパク質ファミリーの新たなメンバーとして 1998 年に発見されそのアポトーシスへの関与が注目された細胞内タンパク質である [11-14]。アポトーシスに関連するとされる death effector domain (DED) を 1 箇所持つほかに核移行シグナルを 3 箇所持ち、Histone-like な DNA 結合領域も持つとされていた (図 2) [12]。しかし、DEDD が転写因子として機能する報告はない。Marcus らは *in vitro* で DEDD の過剰発現がアポトーシスを誘導すると報告している [11、12]。HEK293T 細胞で過剰発現させた DEDD は、核小体に局在し、弱いながらも Caspase-6 を介したアポトーシスを誘導する。また、Caspase-8 や Caspase-10 と結合するようである。

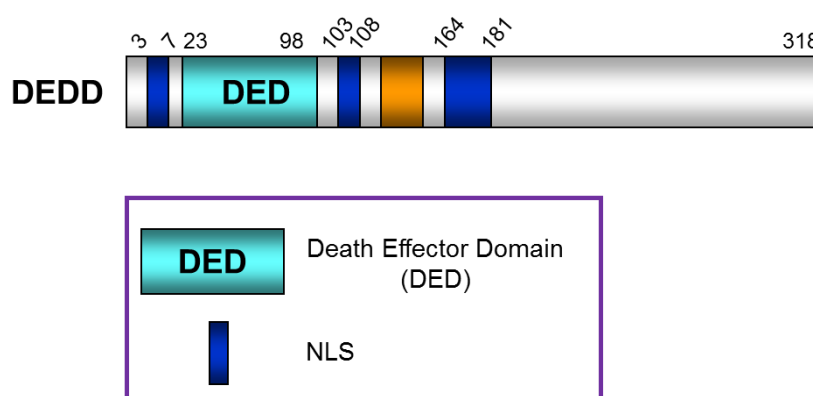


図 2. DEDD 分子の構造模式図

ヒト DEDD 分子の 318 アミノ酸からなるタンパク質構造を模式的に表した。特有のモチーフとして、水色で表した death effector domain (DED) と 3 箇所の nuclear localization signal (NLS) 配列を持つ。中央の黄色い部分は、proline-rich 領域。また、C 末端領域は Histone と相同な配列を持つ。

そこで当研究室で *Dedd* 欠損 (*Dedd*^{-/-}) マウスを作製し、アポトーシスへの影響を調べた。ところが、Marcus らの過剰発現実験の結果に反し、mouse embryonic fibroblast (MEF) 細胞において、CD95 や腫瘍壊死因子 TNF α などによるアポトーシス誘導に差は見られなかった (unpublished data)。また、生体内でアポトーシスが盛んに起こる胸腺においても、胸腺細胞数やアポトーシスに変化はなかった。これまでに、アポトーシスの抑制や亢進に関する表現型は *Dedd*^{-/-} マウスで見つかっていない。

Dedd がおこなう細胞周期制御による細胞・体のサイズ調節機構

一方、*Dedd*^{-/-} マウスの表現型解析から、*Dedd* 分子は細胞周期や細胞・体のサイズの調節に関与することが明らかとなった [15, 16]。まず、*Dedd*^{-/-} マウスは体の大きさが野生型に比べて 20 ~ 25% 小さい (図 3)。そして *Dedd*^{-/-} MEF 細胞も野生型より小さく (図 3)、また BrdU 取り込み実験では細胞周期の G2 ~ M 期が短縮していた。細胞周期の進行と細胞の大きさは、協調的に厳密な制御を受けている [17]。細胞周期の G1 ~ S 期では phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の活性化が、その下流の ribosomal protein S6 kinase-1 (S6K1) や eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) を介して細胞の大きさを規定している [18, 19]。

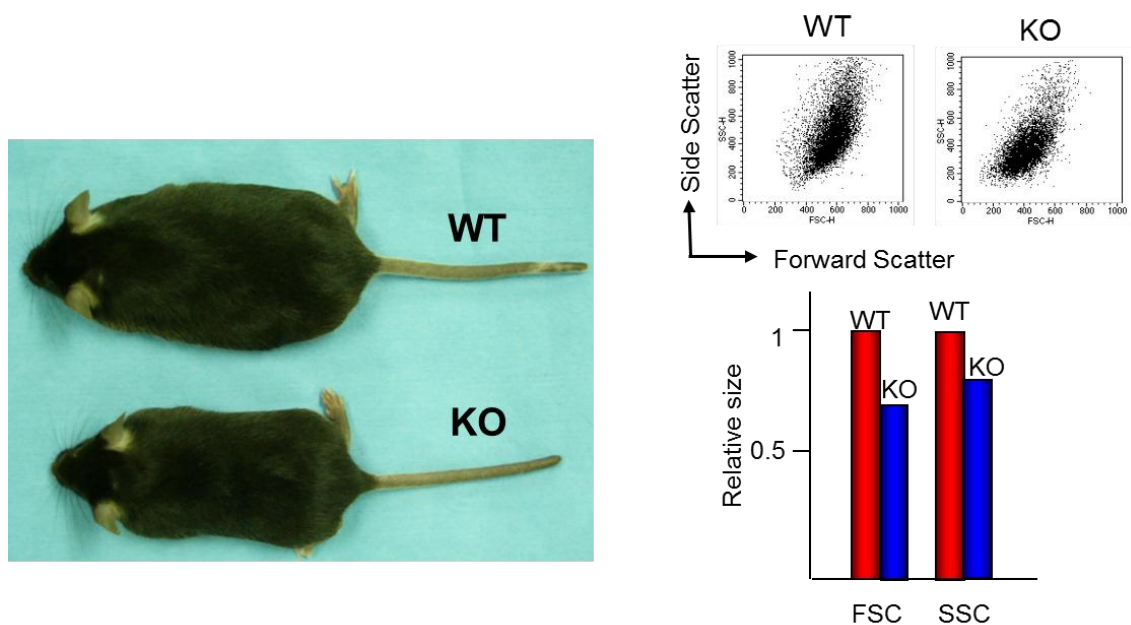


図 3. *Dedd*^{-/-} マウスと野生型マウスの体・細胞サイズの比較

左:野生型 (*Dedd*^{+/+}) マウス (WT) と *Dedd*^{-/-} (KO) マウスの体のサイズの比較。
 右: *Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} MEF 細胞の、フローサイトメトリーによる細胞サイズ比較。Forward Scatter (FSC) と Side Scatter (SSC) の mean signal intensity を下のグラフに示した。

一方、G2 期も細胞の大きさに深く関わっている。G2 期から M 期にかけて活性化し、細胞分裂の進行に関与する Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) は、細胞周期の速さを決める重要な因子の一つである。

前述のように *Dedd*^{-/-} MEF 細胞は G2 / M 期の長さや細胞の大きさに異常が見られたことから、*Dedd* が Cdk1 の活性制御に関与していることが予想された。

そこで、*Dedd* と Cyclin B1、Cdk1 との結合性やその影響を検討した。その結果、*Dedd* は Cyclin B1 を介して Cyclin B1 / Cdk1 複合体に結合し、Cdk1 のキナー

ゼ活性を抑制することがわかった [15、16]。Cyclin B1 / Cdk1 複合体は細胞周期の M 期に入るとき活性化されるが、Dedd が G2 期から M 期にかけて発現しこの複合体と結合することによって、M 期特異的に Cdk1 の活性化を抑制し、結果的に細胞周期が負に制御される [15]。これにより、M 期が進行する前に細胞内では ribosomal RNA (rRNA) が新生され、十分な量のタンパク質が翻訳・合成されて細胞が正常な大きさになった後に初めて、細胞分裂が起きる仕組みとなっている (図 4) [15、16]。

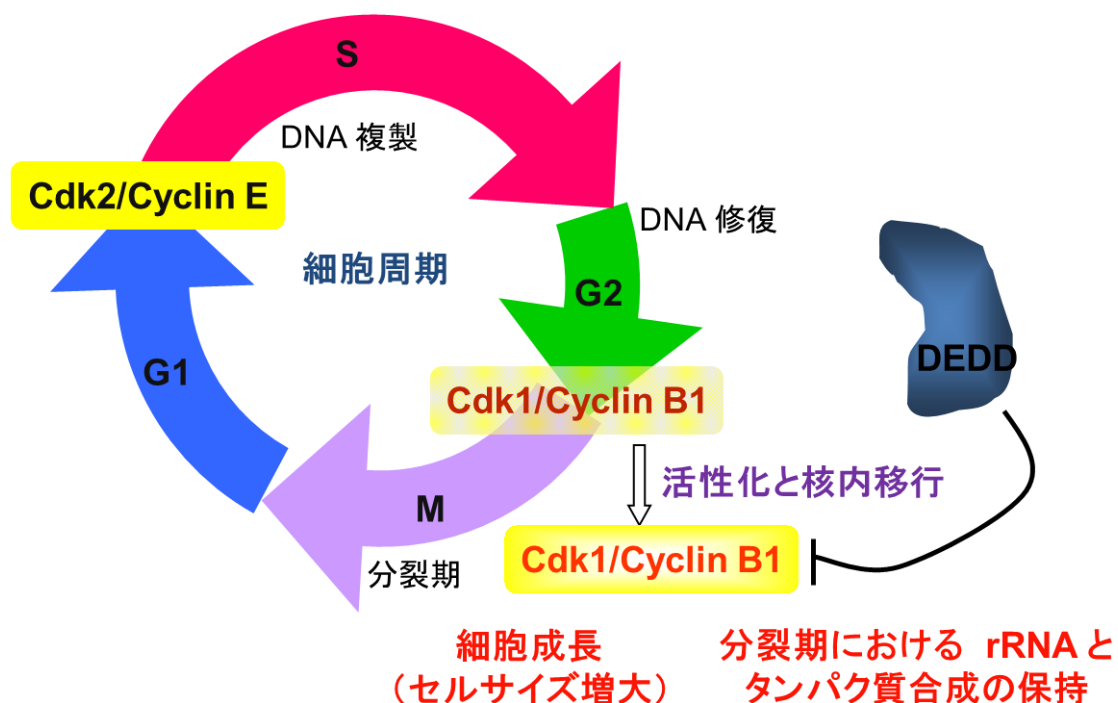


図 4. Dedd による G2 ～ M 期における細胞周期の調節

Dedd は G2 期から M 期にかけて発現が上昇し、Cyclin B1/Cdk1 複合体と結合してそのキナーゼ活性を阻害する。これによって細胞周期を負に調節し、細胞分裂前の rRNA 転写やタンパク質合成が進行して細胞サイズが増大するまで分裂を抑制する。

Dedd によるグルコース代謝調節機構

このように Dedd は細胞周期に密接に関与するが、より最近になって、Dedd がインスリン・PI3K シグナル下流の S6k1 [20] や Akt [21] 分子へも作用することがわかった。Dedd は、Cdk1 活性抑制によって、S6k1 の活性を間接的に維持する [20]。これは、Cdk1 が S6k1 をリン酸化して不活化するはたらきを、抑制することによる (図 5)。興味深いことに、*S6k1*^{-/-} マウスは細胞や体のサイズが小さい、という *Dedd*^{-/-} とよく似た表現型を示す。これは、mTOR シグナル下流で活性化した S6k1 が、タンパク質合成装置であるリボソームタンパク質の転写を促進するため、細胞内のタンパク質含有量が増加し、細胞サイズを増大させるはたらきに関与すると考えられる [22]。

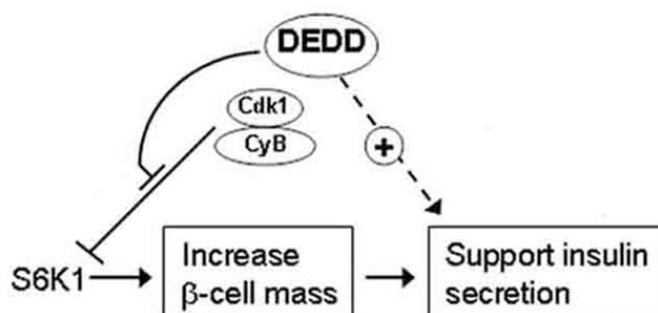


図 5. Dedd による S6k1 活性の制御

MEF 細胞や膵 β 細胞において、Dedd は S6k1 及び Cyclin B1-Cdk1 複合体と結合し、Cdk1 のキナーゼ活性を阻害することにより、Cdk1 による S6k1 の抑制的リン酸化を減少させる。すなわち Dedd は S6k1 の活性化にはたらき、膵臓 β 細胞のサイズ増大や、インスリン産生の促進に寄与する。

また、Dedd は PI3K-mTOR 経路において、S6k1 の上流にも作用する。Dedd は mTOR 上流で、PI3K によって活性化される Akt に結合してこれを安定化し、タンパク質レベルの制御でインスリン感受性に関与する (図 6) [21]。Dedd^{-/-} MEF 細胞や、Dedd^{-/-} マウスの筋組織・脂肪組織では Akt の総タンパク質量が野生型に比べて減少している。また、Akt の下流で Akt によるリン酸化標的である mTOR のリン酸化レベルも減少している。すなわち Dedd は、インスリンシグナル経路において、Akt に作用することによってインスリン感受性を維持する役割を果たしている。このため Dedd^{-/-} マウスにグルコース負荷を与えると、耐糖能障害を示す。また、インスリンの分泌量や、筋組織における糖取り込みの減少も観察された。

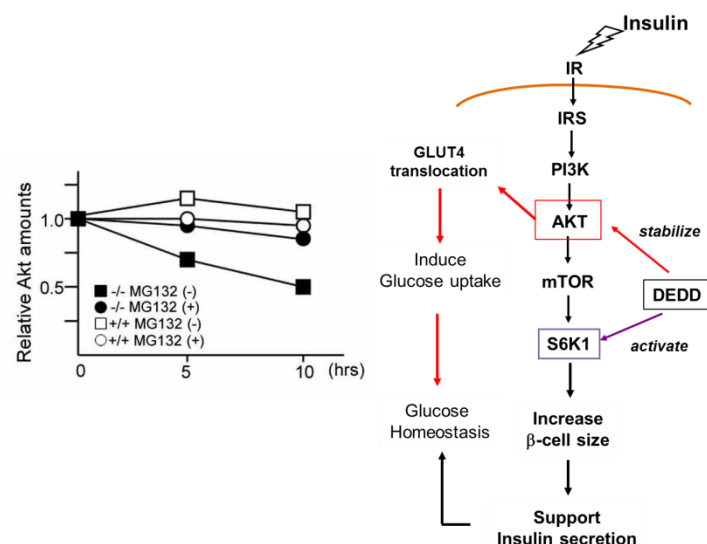


図 6. Dedd による Akt タンパク質の安定化とインスリンシグナルへの影響
 左: Dedd^{-/-} 細胞では Akt 半減期が Dedd^{+/+} より短い。MG132: プロテアソームインヒビター。右: Dedd は S6k1 だけでなく Akt と結合してそのタンパク質安定化にはたらき、二つの方向からインスリン感受性増強に寄与する。

以上のように *Dedd* は、多様な細胞内分子に作用して細胞の増殖や代謝調節に関与する多機能分子であることがわかる。

本研究の目的

本研究においては、*Dedd*^{-/-} マウスがメス不妊になることに注目し、そのメカニズムを解析することによって新たな *Dedd* 分子の機能を明らかにした。*S6k1*^{-/-} マウスは細胞・体のサイズや耐糖能に関しては *Dedd*^{-/-} と同様の表現型を示すが、メスが不妊という点は一致しない [23]。*Dedd*^{-/-} マウスとよく似た不妊傾向を示す他の不妊モデルマウス [5-8] と病態を比較することにより、*Dedd* が子宮脱落膜の形成や機能に関与する可能性を見出した。他のモデルマウスでは、着床後の脱落膜組織が形成されないか、形成されても異常な形態を示す。これらのマウスの子宮内において、着床した胚は妊娠 Day 9.5 までにほとんどが死亡してしまう。妊娠 Day 4.5 ~ 5.5 で着床は見られるものの、Day 5.5 ~ 9.5 までの間に胚が死んでしまうという現象は、子宮脱落膜に不妊の原因があることを強く示唆する。

本研究では、まず *Dedd*^{-/-} マウス子宮内の胚の着床及び着床後の致死について解析した。また、*in vitro* 及び *in vivo* で *Dedd*^{-/-} マウスの脱落膜細胞分化について *Dedd*^{+/+} マウスと比較解析した。さらに、*Dedd*^{-/-} マウスの脱落膜化不全を

もたらず分子メカニズムを解明することを目的とし、研究した。

方法

マウス及びヒトサンプル

Dedd^{-/-} マウスは 17 世代以上 C57BL/6 と掛け合わせたものを用いた。メスマウスは 8 ～ 24 週齢の生殖適齢期のものを用いた。プラグを以て妊娠を確認した日を Day 0.5 とした。偽妊娠マウスを作出するため、精管結紮した ICR オスマウス（日本クレア）と交尾させた。すべてのマウスは SPF 環境で飼育し、実験使用にあたっては当研究科の定める規則に法った。ヒト子宮内膜由来の RNA 及び cDNA サンプルは、共同研究者の大須賀穰先生よりご供与いただいたものである。ヒトサンプル取扱いに関しては、東京大学の倫理規則に法り、インフォームドコンセントを得たうえで使用した。倫理委員会の承認番号は、324-(2)。

試薬及び抗体

使用した抗体は以下の通りである。一次抗体：抗 COX-2 抗体 (polyclonal, Cell Signaling Technology)、抗 TIMP-3 抗体 (W-18, Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗 Akt (pan) 抗体 (11E7, Cell Signaling Technology)、抗 Ki67 抗体 (SP6, Thermo Scientific)、抗リン酸化 Akt 抗体 (Thr308) (244F9, Cell Signaling Technology)、

抗 Cyclin D3 抗体 (C-16, Santa Cruz Biotechnology Inc.) (免疫染色に使用)、抗 Cyclin D3 抗体 (DCS-22, Thermo Scientific) (免疫沈降及びウェスタンブロットに使用)、抗 Cdk4 抗体 (DCS-35, Thermo Scientific)、抗 Cdk6 抗体 (DCS-83, Thermo scientific)、抗 β -actin 抗体 (ACTN05 [C4], Abcam)、anti-HA high-affinity antibody (3F10, Roche)、抗 FLAG 抗体 (M2, Sigma-Aldrich)。二次抗体とその他の試薬 : Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen)、Alexa Fluor 546-conjugated anti-goat IgG antibody (Invitrogen)、Alexa Fluor 546-conjugated anti-rat IgG antibody (Invitrogen)、Hoechst 33258 及び Hoechst 33324 (Invitrogen)、Protein Block Serum-Free (Dako Cytomation)、normal goat serum (Wako)、Mayer's hematoxylin (Muto Pure Chemicals Co. Ltd.)、eosin Y solution (Sigma-Aldrich)、HRP-conjugated anti-mouse IgG (Pierce)、HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Pierce)。

排卵と受精の観察

過排卵を誘発するため、メスマウス腹腔に pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) を 5 IU 投与し、その 48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG) を 5 IU 投与してオスマウスとメイティングさせた。プラグを確認したマウスの卵管から Day 0.5 の卵を M2 メディウムにより流し出した。検鏡により排卵数及び受精卵数を形態的に判定した。

組織学的観察及び免疫組織染色

子宮組織を 4% PFA により灌流固定したのち、パラフィン包埋切片 (5 μm) を作製した。HE 染色はまず、キシレンにより脱パラフィン処理した切片をエタノール系列で水性とし、Mayer's Hematoxylin (武藤化学) で 1 分間染色後、水道水流水にて色出しした。さらにエタノールにて脱水し、Eosin Y 溶液 (Sigma) で 2~3 分間染色後、エタノールで洗浄した。免疫染色は、脱パラフィン処理した切片をエタノール系列で水性とし、10 mM クエン酸バッファー (pH 6.0) にて 10 分間煮沸した後、Protein Block Serum-Free または 5% normal goat serum / TBST により室温で 10~30 分間ブロッキングした。一次抗体を 4 °C で 16 時間反応させ、蛍光標識した二次抗体及び Hoechst 33258 で染色像を得た。TIMP-3 染色領域及び浮腫性領域は、ImageJ software (NIH) により定量した。同様に、胚組織の存在する部分の面積を測定した。胚のサイズは、各切片の厚みを乗じて総切片数の和をとり、積分法によって算出した。

In situ hybridization

マウス *Dedd* mRNA の 81 ~ 513 塩基配列に相当する 433 bp DNA フラグメントを pGEMT-Easy vector (Promega) にクローニングし、sense 及び antisense

RNA プローブを作製した。同様に、*Cyclin D3* は 1082 ～ 1512 に相当する 431 bp を、*Akt-1* は 1851 ～ 2544 に相当する 694 bp を用いた。パラフィン包埋切片 (6 μ m) をキシレン処理により脱パラフィン化し、エタノール系列により水性として PBS 中に平衡化させた。切片を 4% パラホルムアルデヒド / PBS により 15 分間固定し、8 g/ml プロテアーゼ K により 37 °C で 30 分間処理し、再度 4% パラホルムアルデヒド固定と PBS 洗浄をおこなった後、0.2 N HCl で 10 分処理した。PBS 洗浄後、0.1 M トリエタノールアミン-HCl (pH 8.0), 0.25% 無水酢酸を用いて、10 分間アセチル化反応をおこない、エタノール系列で脱水した。プローブ 300 ng/ml を 60 °C で 16 時間ハイブリダイゼーションさせた後、5 × SSC を用いて 60 °C で 20 分間、50% ホルムアミド / 2 × SSC を用いて 60 °C で 20 分間洗浄した。その後、50 μ g/ml RNase A を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA 中にて 37 °C で 30 分間反応させた。切片を 2 × SSC を用いて 60 °C で 20 分間 2 回、0.2 × SSC を用いて 60 °C で 20 分間 2 回、TBST で 1 回洗浄した。0.5% blocking reagent (Roche) / TBST で 30 分間ブロッキングした。RNA プローブを、AP 標識抗 DIG 抗体 (Roche) 及び基質 NBT-BCIP 溶液 (Sigma) を用いて検出した。カウンター染色には Kernechtrot 染色溶液 (Muto Pure Chemicals Co. Ltd.) を用いた。

子宮間質細胞の初代培養

マウス子宮間質細胞の単離と培養は、引用文献 [4] を参照した。まず、去勢オスマウスを掛け合わせて偽妊娠にしたメスを Day 3.5 で開腹し、子宮を取り出して 1 ～ 2 mm の長さに切り分け、HBSS (Invitrogen) ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ なし, フェノールレッドなし, 100 U/ml ペニシリン + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Pen Strep ; Invitrogen), 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンフォテリシン B (Sigma-Aldrich)) により洗浄した。さらに組織を、6 mg/ml ディスパーゼ (Invitrogen) と 25 mg/ml パンクレアチン (Sigma-Aldrich) を含む HBSS 3 ml を用いて 4 °C で 1 時間、室温で 1 時間、37 °C で 10 分間消化した後、0.5 mg/ml コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) を用いて 37 °C で 30 分間処理した。これを 70 μm のナイロンフィルターに通し、 5×10^5 cells/25 cm^2 の割合でまいた。接着した細胞は、phenol red-free DMEM and Ham's F-12 nutrient mixture (DMEM/F-12 , 1:1) (Invitrogen) (+ 1% charcoal-stripped FBS (Invitrogen), ペニシリン, ストレプトマイシン, アンフォテリシン B, 17 β -エストラジオール (E2, 10 nM) (Sigma-Aldrich), プロゲステロン (P4, 1 μM) (Sigma-Aldrich), HB-EGF (30 ng/ml) (Sigma-Aldrich)) を用いて 7 日間培養した。ヒト子宮内膜細胞の単離と分化誘導は引用文献 [24] を参照した。同様に、phenol red-free DMEM/F-12 (+ 5% charcoal-stripped FBS, ペニシリン, ストレプトマイシン, アンフォテリシン B, E2 (10 ng/ml), P4 (100 ng/ml)) を用い

て 12 日間培養した。

セルサイクル及び多核化の解析

セルサイクルは Click-iT EdU Flow Cytometry Assay kits (Invitrogen) を用いて解析した。子宮間質細胞の培養日 Day 1、3、7 においてそれぞれ 2 時間、10 μ M の 5-ethynil-2'-deoxyuridine (EdU ; チミジン類似ヌクレオチド誘導体) を取り込ませた。トリプシン処理して 4% PFA により細胞を固定し、サポニンで膜透過処理を施した。取り込まれた EdU は、Alexa Fluor 488 で標識されたアルキル化試薬により検出した。DNA 量は Hoechst 33342 染色 (次項参照) により検出した。フローサイトメトリーにて 10,000 個以上の細胞を解析した。多核化の計測は、細胞を 4-well チャンバーにて培養し、4% PFA で固定した後 Hoechst による染色を施した後、多核細胞を蛍光顕微鏡下で数えた。それぞれ 600 個以上の細胞を、3 名の盲検により数えた。

フローサイトメトリー (DNA 定量)

In vitro 脱落膜化細胞を Hoechst 33342 (1:1000) / PBS により 37 °C で 30 分間染色し、LSR II flow cytometer (BD) を用いて DNA 量を解析した。それぞれ 10,000 個以上の細胞を解析した。Day 4.5 の着床部位は間質細胞の初代培養と同

様な条件でコラゲナーゼ処理し、シングルセルにして Hoechst 33342 で染色した。FSC^{high}、SSC^{high} の領域を脱落膜細胞としてゲーティングし、少なくとも 1,000 個以上の細胞を解析した。

脱落膜化細胞における Akt 及び Cyclin D3 の過剰発現

Dedd^{-/-} マウス由来の脱落膜化細胞に、Day 2 において Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて pCruz-HA-Akt-1、pFLAG-Cyclin D3、mock expression vector (pCAG-EGFP) をトランスフェクションした。トランスフェクション試薬のみ添加した細胞を対照とした。Day 5 において、細胞を 4% PFA で固定し、0.25% Triton X-100 により膜透過処理を施した。抗 HA 抗体と蛍光標識抗ラット IgG 二次抗体、又は Cy3 標識抗 FLAG 抗体により染色した後、Hoechst で核染色をおこなった。蛍光顕微鏡下で、HA 染色ポジティブまたは FLAG 染色ポジティブ細胞中の多核化細胞数を数えた。

タンパク質分解実験

In vitro 脱落膜化細胞に対して、Day 3 においてメディウム中に 50 μ M cycloheximide (Sigma-Aldrich) を加え、10 μ M MG132 (Sigma-Aldrich) 添加の有無に分けて 0, 30, 60, 90 分後の各時点でサンプリングした。細胞は lysis buffer (1%

NP-40 (Roche), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, Complete Mini (Roche)) に溶解し、ウェスタンブロットに用いた。

免疫共沈降実験 (immunocoprecipitation, IP)

HEK293T 細胞に、エレクトロポレーションにより pCAG-Dedd-HA、pFLAG-Cyclin D3、pFLAG-Cdk4、pFLAG-Cdk6 をトランスフェクションした。細胞を lysis buffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, Complete Mini (Roche)) に溶解し、タンパク質 100 µg 分に 1% BSA を加えて抗 HA 抗体アガロース (Roche) 又は抗 FLAG 抗体アガロース (Sigma) に 4 °C で 16 時間反応させた。沈殿物を洗浄バッファー (0.5% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)) で 10 回洗浄し、2 × SDS-PAGE サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% グリセロール, 0.004% ブロモフェノールブルー, 10% 2-メルカプトエタノール) 中で煮沸した。抗 FLAG 抗体又は抗 HA 抗体でウェスタンブロットすることにより、共沈降したタンパク質を検出した。内在性の Dedd と Cyclin D3、Cdk4、Cdk6 の結合を調べるため、Day 5.5 の子宮着床部位を lysis buffer 中にホモジェナイズした後、タンパク質 100 µg 分を用いて、protein G beads にコー

トした抗 Cyclin D3、抗 Cdk4、抗 Cdk6 抗体と反応させた。共沈降物は、当研究室で以前作成された抗 Dedd ポリクローナル抗体 (rabbit) を用いて検出した [15]。

定量的及び半定量的 RT-PCR

QPCR は、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 及び ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いておこなった。データは $\Delta\Delta C_t$ 法により、 *β -actin* の C_t 値をもとに標準化した。用いたプライマーの配列は表 1 に示した。半定量的 PCR (図 12D) に関しては、表 2 にプライマー配列を示した。

統計解析

統計学的解析は、すべて 2-tailed Student's t test を用いた。標準偏差及び分散値を計算し、等分散性を F test により確認した。 P 値が 0.05 未満のときを有意とした。

表 1: QPCR のプライマー配列

プライマー名	配列 (5'-3')
For β -actin	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG
Rev β -actin	ACCAGAGGCATACAGGGACA
For Dedd	TCTGGAGGAAACATCAATTCG
Rev Dedd	GCTGGCCGCTTACTACACAT
For human GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACA
Rev human GAPDH	GCCCAATACGACCAAATCC
For human DEDD	AGCCCTCAGTGATCCCAGAAC
Rev human DEDD	GGCAACACACCACAGGATAG
For Il-11	CGCCGTTTACAGCTCTTGA
Rev Il-11	CAGGGGGATCACAGGTTG
For Timp-3	CACGGAAGCCTCTGAAAGTC
Rev Timp-3	TCCCACCTCTCCACAAAGTT
For Prl-r	AATCCCTGGTATGGCAGACTT
Rev Prl-r	TTCAGGGTTCATGTGCAAAA
For Plp-j	TTCTGGAGGGAGCAAAAGC
Rev Plp-j	CCACCTGTCAGGCTCGTTAT
For Dprp	TGCCATTGAGTCAACCTCAC
Rev Dprp	AGCTTTCTCCCACAGAAGCA
For Igfbp-1	CTGCCAAACTGCAACAAGAA
Rev Igfbp-1	TCCATGGGTAGACACACCAG
For HOXA10	CCTTCAGAAAACAGTAAAGCTTCG
Rev HOXA10	AAGGGCAGCGTTTCTTCC
For Bmp2	GATGCGGTGGACCACACA
Rev Bmp2	GGGCACTTCCACCACAA
For Cyclin D3	GGAAGATGCTGGCATACTGG
Rev Cyclin D3	GGTAGCGATCCAGGTAGTTCA
For Esr1	GCTCCTAACTTGCTCCTGGAC
Rev Esr2	CAGCAACATGTCAAAGATCTCC
For Pgr	TGCACCTGATCTAATCCTAAATGA
Rev Pgr	GATTGGCACAGCGAGTAGAA
For Ptgs-2	GATGCTCTTCCGAGCTGTG
Rev Ptgs-2	GGATTGGAACAGCAAGGATTT
For Angiopoietin-2	CACACTGACCTTCCCCAACT
Rev Angiopoietin-2	CCCACGTCCATGTCACAGTA

表 2：半定量的 RT-PCR のプライマー配列

プライマー名	配列 (5'-3')
For β -actin	GTGGCTACAGCTTCACCACCACAG
Rev β -actin	AGTAATCTCCTTCTGCATCCTGTC
For Lif	ATTGTGCCCTTACTGCTGCT
Rev Lif	CCACACGGTACTTGTTGCAC
For Vegfa	GGTTCCAGAAGGGAGAGGAG
Rev Vegfa	GCATTCACATCTGCTGTGCT

結果

メス *Dedd*^{-/-} マウスは不妊である

Dedd 欠損マウスは、遺伝子型 *-/-* のメスと、どの遺伝子型のオスを掛け合わせてもまったく子供を産まない。この不妊の表現型は、計 3 系統の ES 細胞に由来する全ての *Dedd*^{-/-} メスマウスについて同様であった。この原因が卵・受精卵の側にあるのか母体側にあるのかを調べるため、さまざまな遺伝子型の組み合わせでメイティング実験をおこなった (表 3)。遺伝子型 *+/+* 及び *+/-* のメスマウスは、どの遺伝子型のオスと掛け合わせても平均 4 ~ 5 匹以上の仔を出産した。遺伝子型 *+/-* のメスマウスは、*+/+* のオスと掛け合わせると *+/+* と *+/-* の仔を 1 : 1 の割合で産み、*-/-* のオスと掛け合わせると *+/-* と *-/-* の仔を 1.5 : 1 の割合で産んだ。遺伝子型 *+/-* 同士の交配では 3 : 5 : 2 というメンデル側におおよそ従った割合で各遺伝子型の仔が産まれた。遺伝子型 *-/-* の仔が少なく見えるのは、産まれた数そのものが少ないのではなく、ジェノタイピング時までに体のサイズで競争的に排除されたためであることが観察される (data not shown)。また、オスの *Dedd*^{-/-} マウスは正常な生殖能力を有した。以上のことから、原因はメス生殖機能にあると考えられた。これを支持する結果は、受精卵の交換移植実験から得られた。遺伝子型 *+/+* の受精卵を遺伝子型 *-/-* の子宮に

移植しても出産にいたらなかったが、遺伝子型 $-/-$ の受精卵を $Dedd^{+/+}$ マウスの雌雄から作出し、遺伝子型 $+/+$ の子宮に移植すると正常な仔を出産した。

表 3：メイティング実験

オス及びメスの各 *Dedd* 遺伝子型のマウスを掛け合わせ、繁殖効率を調べた。
SUM：産仔数の総数、*n*：メイティング総数（プラグを確認したもの）、出産率：
SUM/*n*。

遺伝子型		出産児の遺伝子型			SUM	<i>n</i>	出産率
メス	オス	+/+	+/-	-/-			
+/+	+/-	13 (46%)	15 (54%)	0 (0%)	28	6	4.67
+/+	-/-	0 (0%)	87 (100%)	0 (0%)	87	18	4.83
+/-	+/+	24 (51%)	23 (49%)	0 (0%)	47	10	4.70
+/-	+/-	108 (30%)	183 (51%)	66 (19%)	357	65	5.49
+/-	-/-	0 (0%)	47 (64%)	27 (36%)	74	17	4.35
-/-	+/+	0	0	0	0	23	0.00
-/-	+/-	0	0	0	0	37	0.00
-/-	-/-	0	0	0	0	12	0.00

メス生殖機能について調べるため、まず子宮に注目した。非妊娠、及び妊娠した *Dedd*^{+/+} マウスの子宮組織において *Dedd* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR (QPCR) により調べると、着床直後に発現が上昇し、Day 5.5 で非妊娠時の約 4 倍の値でピークを示した (図 7A)。この時期は、脱落膜細胞が増殖して脱落膜組織が最も急速に拡張する時期である。この遺伝子発現の増加は、in vitro でマウス及びヒトの細胞を脱落膜に分化誘導した時も同様に観察された (図 7B、C)。偽妊娠した *Dedd*^{+/+} マウスの子宮間質細胞を in vitro で脱落膜分化誘導すると、Day 1 ~ 7 にかけて *Dedd* の発現が 3 倍に上昇した。また、in vitro で脱落膜化したヒト子宮内膜細胞についても同様に、未分化内膜細胞 (Pre) と比較して Day 12 の脱落膜化細胞は、2 倍から 5 倍に *DEDD* 遺伝子の発現が上昇した。したがって、着床後の脱落膜の分化において *DEDD* が何らかの関与をする可能性が強く示唆されたのである。

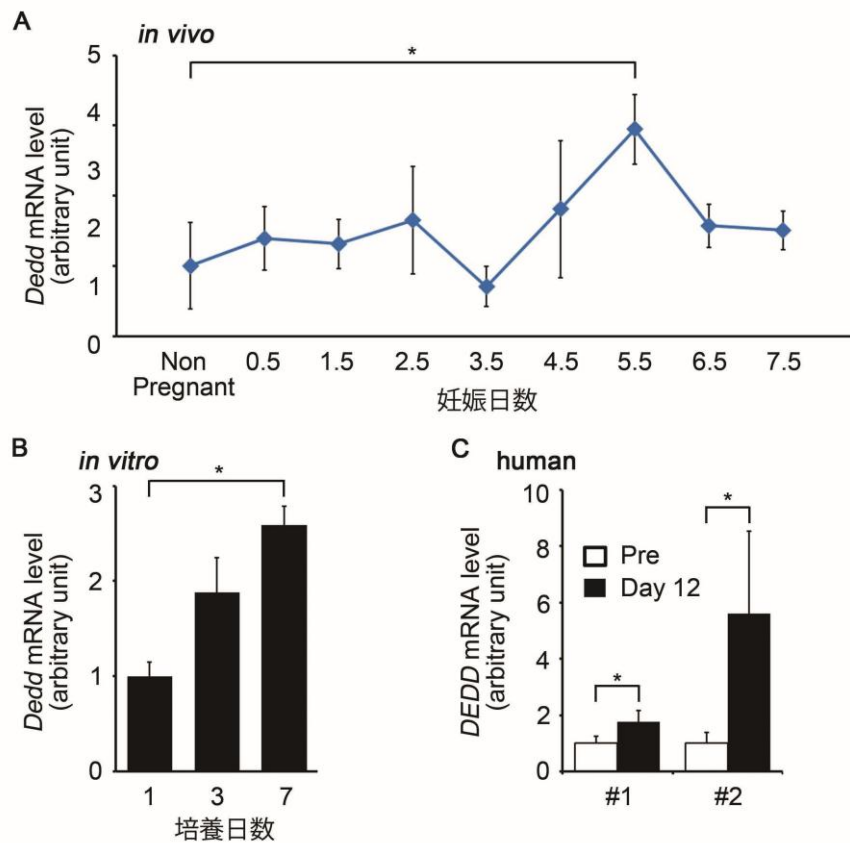


図 7. *DEDD* mRNA の子宮及び脱落膜細胞における発現変化

(A) 野生型 (*Dedd*^{+/+}) マウス子宮、(B) *in vitro* で脱落膜化したマウスの子宮間質細胞、(C) *in vitro* で脱落膜化したヒト子宮内膜細胞について、QPCR で *Dedd* (*DEDD*) の発現量を定量した。マウス試料は β -*actin*、ヒト検体は *GAPDH* で標準化した。相対値は、非妊娠子宮 (A)、初代培養 day 1 (B)、未分化内膜細胞 (C) をそれぞれ 1 とした。Pre: 未分化内膜細胞、Day 12: 分化誘導開始から 12 日目の内膜細胞。(A)、(B) は異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。(C) においては、2 名の検体からそれぞれトリPLICATEでおこなった実験結果を示した。Error bars: SEM、*: $P < 0.05$ 。

次に、*Dedd^{-/-}* マウスの子宮で着床が正常に起こるかどうかを調べた。妊娠 Day 4.5 の子宮について、blue dye (1% Chicago blue solution) injection により着床部位の存在を調べる方法を用いた [25]。その結果、*Dedd^{-/-}* と *Dedd^{+/+}* マウスで着床胚数は差がなかった (*Dedd^{-/-}* : 6.8 ± 0.73 , *Dedd^{+/+}* : 7.4 ± 0.40 , $n = 5$)。さらに、着床位置やスペーシングも、*Dedd^{-/-}* は正常で *Dedd^{+/+}* と違いが見られなかった (図 8A)。Day 4.5 の子宮切片を HE 染色し、*Dedd^{-/-}* 子宮で正常な着床が起こっていることを確認した (図 8B)。この時点では、浮腫化した領域のサイズや脱落膜組織の面積に差はなかった (図 8B)。さらに着床マーカーである COX-2 を染色し [26]、*Dedd^{-/-}* と *Dedd^{+/+}* 子宮で正常な着床が起きている証拠を得た (図 28)。同様に、*Ptgs-2/Cox-2* の mRNA 発現量も、*Dedd^{+/+}* と *Dedd^{-/-}* 子宮着床部位で差がなかった (図 8C)。

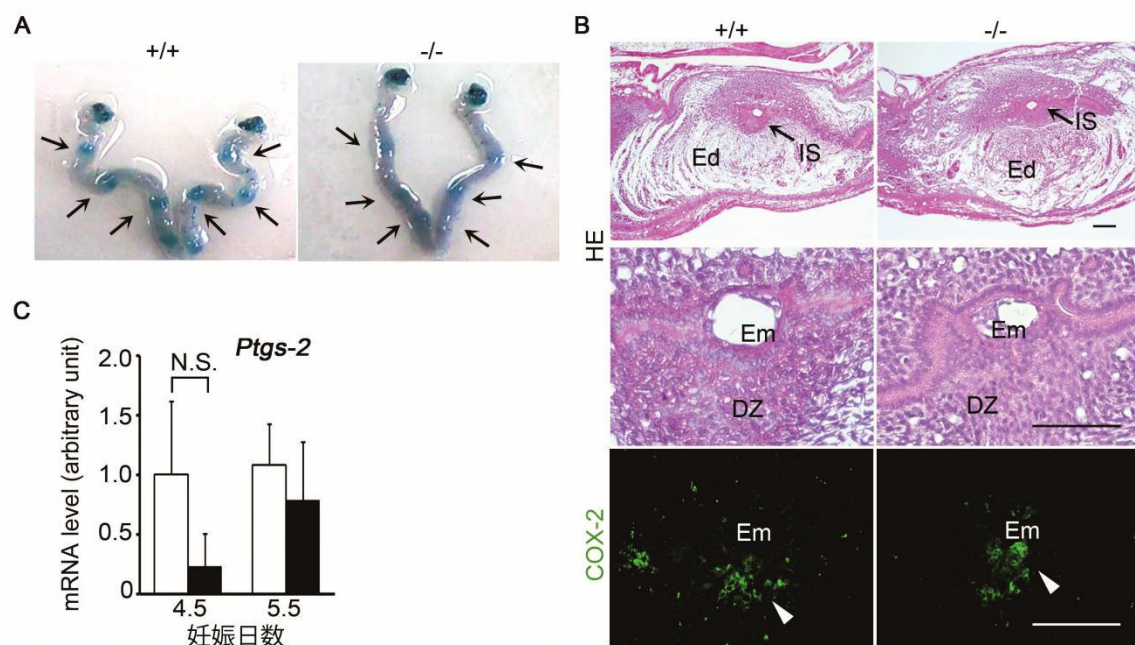


図 8. 着床についての解剖学的・組織学的解析

(A) 着床胚のスペーシング・配置を blue dye injection により調べた。色素を静注して 5 分後、着床部位が青く染まる。(B) Day 4.5 における子宮の組織学的解析。 $+/+$: *Dedd*^{+/+}、 $-/-$: *Dedd*^{-/-}。上 : HE 染色、下 : COX-2 免疫染色。IS : implantation site (着床部位)、Em : Embryo (胚)、DZ : decidual zone (脱落膜)、Ed : edematous region (浮腫化領域 (脱落膜外側の白い領域))。COX-2 染色領域を矢頭で示した。Scale bars : 200 μ m。(C) 妊娠 Day 4.5 ~ 5.5 の子宮着床部位から total RNA を抽出し、*Ptgs-2* (*Cox-2*) mRNA の発現を QPCR によって定量した。値は β -actin によって標準化し、Day 4.5 の *Dedd*^{+/+} を 1 として示した。異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。Error bars : SEM。

以上の通り、 $Dedd^{+/+}$ と $Dedd^{-/-}$ のメスマウスの妊娠子宮を組織学的に調べると着床時までは着床率も含めて差がなかったものの、着床直後に、Day 5.5 から Day 8.5 にかけて、胚生存率が $Dedd^{-/-}$ 子宮で急激に減少した (図 9)。その後 Day 9.5 までに、 $Dedd^{-/-}$ 子宮ではほとんど全ての胚が胎盤形成前に死んでいた。この Day 5.5 から Day 8.5 にかけて胚発生の様子を比較するために、各着床部位の胚のサイズを計測したところ、 $Dedd^{-/-}$ 子宮内の胚は $Dedd^{+/+}$ のものに比べて平均サイズが有意に小さく、妊娠日数を経るにつれてその差が顕著になった (表 4)。したがって、 $Dedd^{-/-}$ 子宮では胚の着床は正常に起こるが、その後の発生に障害があり、胎盤が形成される Day 9.5 までに死んだといえる。表 3 のメイトイニング実験から胚側に不妊の原因はみとめられないこと、及び胚が死ぬ時期が着床から胎盤形成までの間であることから、 $Dedd^{-/-}$ マウスのメス不妊の原因は脱落膜にあると考えた。

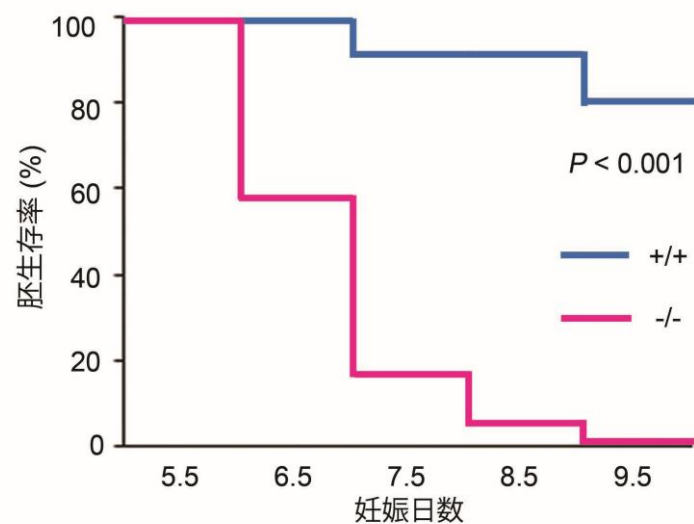


図 9. 妊娠子宮内の胚生存率を、総着床部位数を母数とした Kaplan-Meier 方により算出した。胚のサイズにかかわらず、正常発生組織が見られるものを「生存」と判断し、吸収痕や死細胞塊が見られるものを「死亡」とした。*Dedd*^{+/+} : *n* = 75 (合計胚数)、*Dedd*^{-/-} : *n* = 44 (合計胚数)、log-rank, $\chi^2 = 13.2$ 。

表 4: $DEDD^{+/+}$ 及び $DEDD^{-/-}$ 子宮における胚サイズの比較

$DEDD^{+/+}$ (+/+) メスマウス及び $DEDD^{-/-}$ (-/-) メスマウスを +/+ オスマウスと掛け合わせ、胚はすべて +/+ もしくは +/- となるようにした。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.001$ 。

母体の遺伝子型		胚サイズ (mm^3)	n
Day 5.5	+/+	0.0059 ± 0.0014	9
	-/-	$0.0039 \pm 0.0012^*$	9
Day 6.5	+/+	0.17 ± 0.014	5
	-/-	$0.044 \pm 0.0096^{**}$	12
Day 7.5	+/+	0.51 ± 0.070	19
	-/-	$0.25 \pm 0.099^*$	11
Day 8.5	+/+	> 5.00	11
	-/-	1.00 ± 0.33	7

次に、性ホルモンの影響を調べるために妊娠中の血中 17 β -エストラジオール・プロゲステロン 濃度を調べた (図 10A、B)。母体側に不妊の原因がある場合、子宮だけでなく卵巣の機能は評価しなければならない。また、これらの性ホルモンのうち特にプロゲステロンは、脱落膜の形成に必須のホルモンである [2]。そこで、妊娠 Day 0.5 ~ 7.5 までのマウス血清中のエストラジオール・プロゲステロン濃度を追って測定した。これらについてはどの時点でも有意な差がみられなかった。着床直前に黄体機能が亢進して起こるプロゲステロン濃度の急激な上昇が *Dedd*^{+/+}、*Dedd*^{-/-} マウスの両方で観察された。従って、*Dedd*^{-/-} メスマウスの卵巣機能は正常であることが示された。

また、ホルモン受容体である *Esr1* と *Pgr* の子宮における mRNA 発現量を *Dedd*^{-/-} と *Dedd*^{+/+} について比較した (図 10C)。これらについても、どの時点においても有意差はなかった。妊娠初期にばらつきが大きく出たものの、着床時の子宮では発現量のマウス間でのばらつき・差は小さく、妊娠 Day 6.5 以降の *Esr1* 発現上昇は *Dedd*^{+/+}、*Dedd*^{-/-} マウスの両方で観察された。従って、性ホルモン量だけでなく、その応答因子であるホルモンレセプターの発現誘導も、妊娠時の *Dedd*^{-/-} 子宮で正常に起こっていると言える。

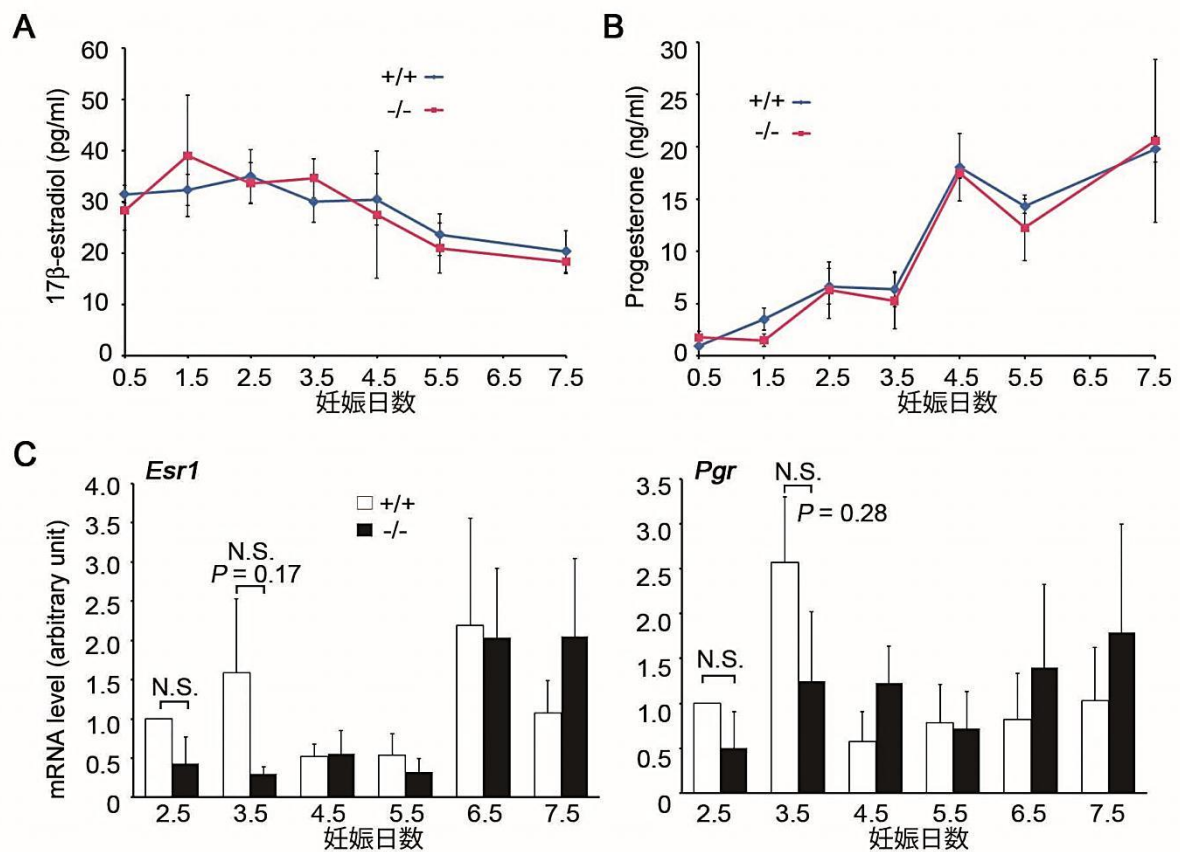


図 10. 性ホルモン濃度及びホルモン受容体発現の比較

(A) (B) 妊娠中の血清におけるホルモン濃度を Day 0.5 ~ 7.5 において測定した。

A : 17 β -エストラジオール、B : プロゲステロン。Error bar : SEM。

(C) *Esr1* (estrogen receptor α) 及び *Pgr* (progesterone receptor) の妊娠時子宮における mRNA 発現量を、QPCR により解析した。異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。Error bars : SEM。

着床前に子宮組織の形態は、図 11 に示す通り *Dedd*^{+/+} マウスと *Dedd*^{-/-} マウスで違いがみられなかった。妊娠 Day 1.5 において、*Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} マウスの両方で、子宮内腔上皮細胞の増殖が顕著に見られた (図 11A)。これは、後述の性ホルモン応答の結果である。また、妊娠 Day 3.5 において、*Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} マウスの両方で、間質細胞の増殖と浮腫、及びそれによってもたらされる子宮内腔の狭小化が起こっていた (図 11B)。これらについても同様に、後述する性ホルモン応答の結果である。以上のように、*Dedd*^{-/-} マウスでは妊娠初期の着床前においては子宮の形態に異常はみとめられず、図 10 で示した性ホルモン濃度の上昇によってもたらされて、正常な妊娠子宮形態の変化がおこなわれたと言える。ここまでで、子宮の着床準備が整われた。

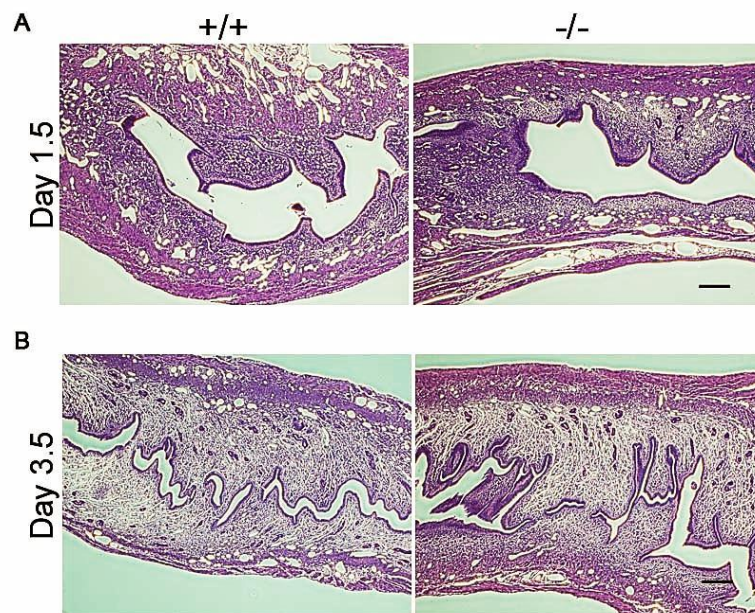


図 11. 着床前子宮組織の形態観察

(A) 自然交配したメスマウスの、妊娠 Day 1.5 子宮の HE 染色像。(B) Day 3.5 子宮の HE 染色像。Scale bars : 200 μ m。

また、図 10B で示したホルモン受容体の働きを確認するため、人工的な実験系 [27] でホルモン応答性を調べた。卵巣除去した *Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} マウスにエストラジオール・プロゲステロンを投与し、子宮上皮細胞・間質細胞の増殖や、*Vegf* 及び *Lif* の発現誘導がともに起こることが示された (図 12)。これらの遺伝子は、自然妊娠時にもホルモンに応答して発現が誘導されるもので、かつ着床や妊娠維持に必須の因子である [28、29]。

Dedd^{-/-} マウスでは、妊娠時・非妊娠時における卵巣の組織像とその形態、自然排卵サイクルや自然排卵数、PMSG 投与による過排卵応答性の排卵数、子宮内での自然受精はすべて正常であった (data not shown)。

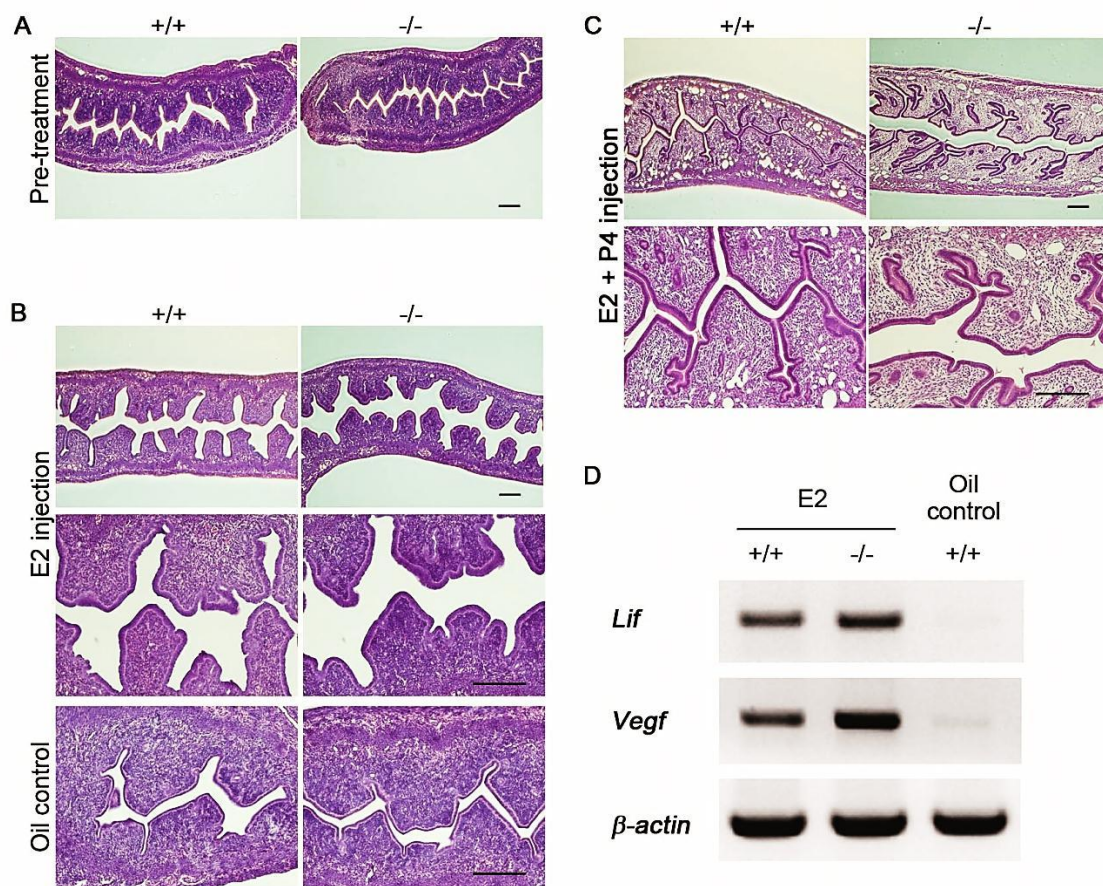


図 12. 子宮の性ホルモン応答性

卵巣除去した *Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} メスマウスに、エストラジオール (E2) 単独、もしくは E2 とプロゲステロン (P4) を皮下投与し、ホルモンに対する応答性を比較した。(A-C) ホルモン刺激時の子宮の HE 染色像。(A) 刺激前コントロール、(B) E2 または vehicle (mineral oil) 投与後 24 時間、(C) E2 を 3 日間投与した後、E2 と P4 を 3 日間投与した。(D) E2 に応答して発現が増強するとされる *Lif* と *Vegf* の mRNA を RT-PCR により比較した。検体は、E2 刺激後 2 時間の子宮。Scale bars : 200 μ m。

***Dedd*^{-/-} 子宮は脱落膜化不全であり着床部位組織が変質・崩壊している**

脱落膜の形成・状態を調べるため、妊娠 Day 5.5 の子宮組織像を *Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} で比較した。まず、HE 染色像において、脱落膜組織が *Dedd*^{-/-} マウスにおいて縮小していた (図 13A)。脱落膜マーカーの一つである tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3) [30] で免疫染色すると、*Dedd*^{-/-} 子宮において TIMP-3 で染まる領域が縮小していた。これを定量的に示すため、TIMP-3 の染色領域の面積を画像上で計測し、平均値を *Dedd*^{+/+} のものと比較することによって *Dedd*^{-/-} 子宮における脱落膜領域の縮小を示した (図 13A、下図)。

またさらに、脱落膜の周囲にある子宮組織が浮腫化している様子を比較した。図 13A の HE 染色像からも *Dedd*^{-/-} 子宮において脱落膜外部では非血管性の細胞同士がより集積したように見える。これを定量化して比較するため、低倍率画像における浮腫様領域 (図 13A で白色に見える部分) を、TIMP-3 と同様に面積測定した。その結果を図 13A 下右図に示す。*Dedd*^{-/-} では、着床後に、脱落膜領域だけでなく、脱落膜周囲の浮腫化領域も縮小していた。着床前にホルモンに応答して子宮形態変化が起きた (図 11) のとは対照的な結果となった。

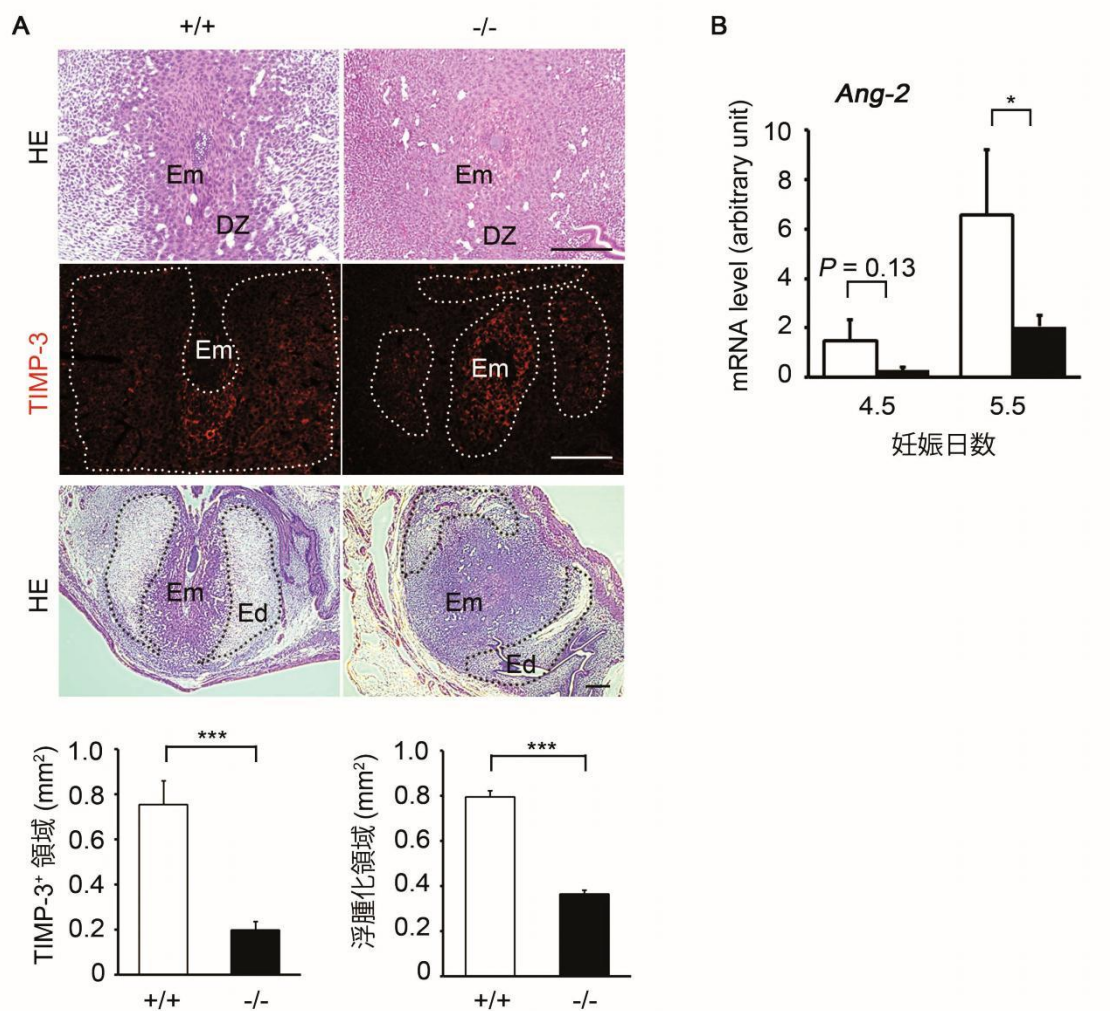


図 13. 免疫組織染色による脱落膜組織の比較

(A) Day 5.5 の着床部位を、HE 染色または抗 TIMP-3 抗体により免疫染色した。脱落膜組織である TIMP-3 染色領域及びその周囲の浮腫化領域を画像上で面積定量した結果を示した。各々 3 箇所に着床部位について、それぞれ 10 枚以上の異なる部位の切片染色画像を無作為に選択して計測をおこなった。染色領域を点線で示す。Scale bars : 200 μ m、Error bars : SEM、*** : $P < 0.001$ 。(B) 妊娠 Day 4.5 から 5.5 にかけて着床部位における、血管透過性因子 *Angiopoietin-2* (*Ang-2*) の mRNA を QPCR によって定量した。値は β -actin によって標準化し、Day 4.5 の *Dedd*^{+/+} を 1 として示した。異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。Error bars : SEM、* : $P < 0.05$ 。

この脱落膜縮小を支持する結果は、さまざまな脱落膜マーカーの遺伝子発現が *Dedd*^{-/-} 子宮着床部位において *Dedd*^{+/+} より減少していることによって示された (図 14)。これらの脱落膜マーカーのうち、プロゲステロンに応答して発現が誘導されるものは *Bone morphogenetic protein 2 (Bmp2)* と *Hoxa10* があるが、*Bmp2* のみが *Dedd*^{-/-} で有意に減少し、その上流である転写因子 *Hoxa10* は減少がみられなかった [6、31]。

脱落膜領域に加えて、その周囲の浮腫化領域にも、*Dedd*^{-/-} における有意な縮小がみられたため (図 13A)、脱落膜マーカーに加えて血管透過性因子についても QPCR をおこなった。脱落膜組織から放出される血管透過性因子 *Angiopoietin-2* について定量すると、*Dedd*^{-/-} で減少していた (図 13B)。おそらくホルモン応答と無関係に浮腫化が減少するのは、この血管透過性因子 *Angiopoietin-2* が減少しているためだと考えられる。

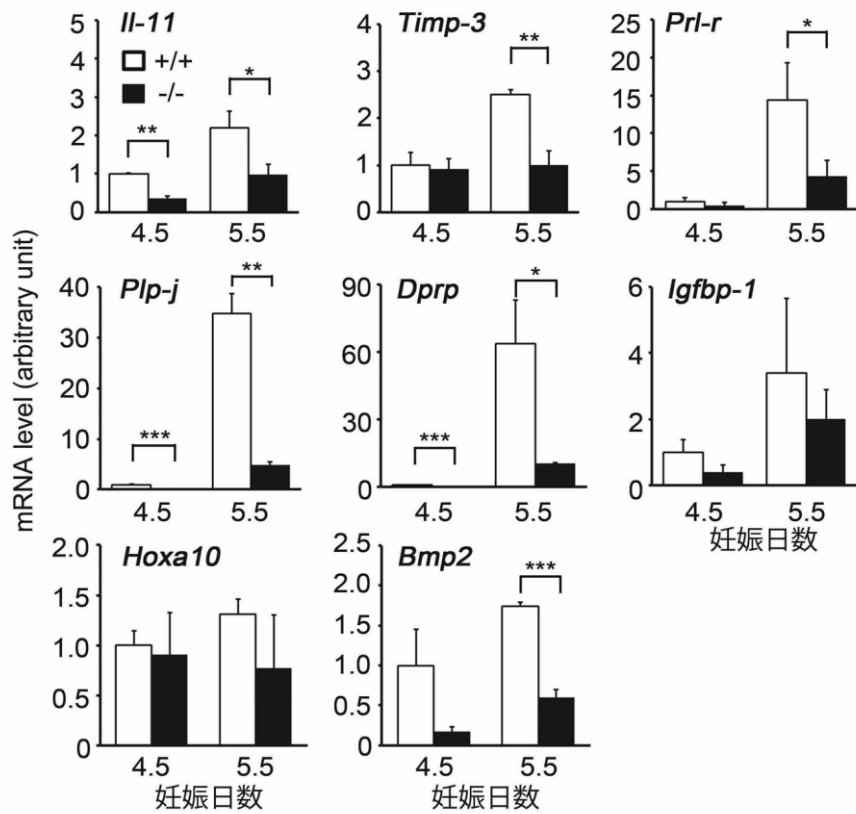


図 14. 着床部位における脱落膜マーカーの遺伝子発現の比較

妊娠 Day 4.5 ~ 5.5 の子宮着床部位から total RNA を抽出し、脱落膜で高発現するとされる遺伝子の mRNA を QPCR によって定量した。値は β -actin によって標準化し、Day 4.5 の *Dedd*^{+/+} を 1 として示した。*Prl-r* : prolactin receptor、*Plp-j* : prolactin-like protein J、*Dprp* : decidual prolactin-related protein、*Igfbp-1* : IGF-binding protein 1。異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。Error bars : SEM、* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.001$ 。

このような、*Dedd*^{-/-} マウス子宮における脱落膜分化不全の結果、妊娠 Day 7.5 には着床部位の壊死が目立って見られた。HE 染色像で確認すると、脱落膜細胞の大部分は細胞質が縮んでおり、その周囲組織にまで出血が及んでいた (図 15A)。さらに妊娠 Day 8.5 になると、脱落膜と胚との間に存在する Reichert's membrane に支えられる組織も、*Dedd*^{-/-} 子宮では変質していた (図 15A)。脱落膜組織や Reichert's membrane の形態が維持されなくなった結果、胚側由来の細胞である trophoblastic giant cells (TGC、栄養膜巨細胞) が胚側から子宮組織側へ向かって異常に浸潤していた (図 15B)。着床した胚と母体の子宮組織をつなぐ脱落膜を中心としたこれらの組織の変質・崩壊と、図 9 で示した胚の死亡は同時に起きており、着床後の子宮環境の悪化が胚の発生に影響を及ぼしている可能性と、胚が妊娠早期 (Day 6.5 ~) に死に始めることが図 15A のような現象を二次的に引き起こす可能性の両方が考えられる。

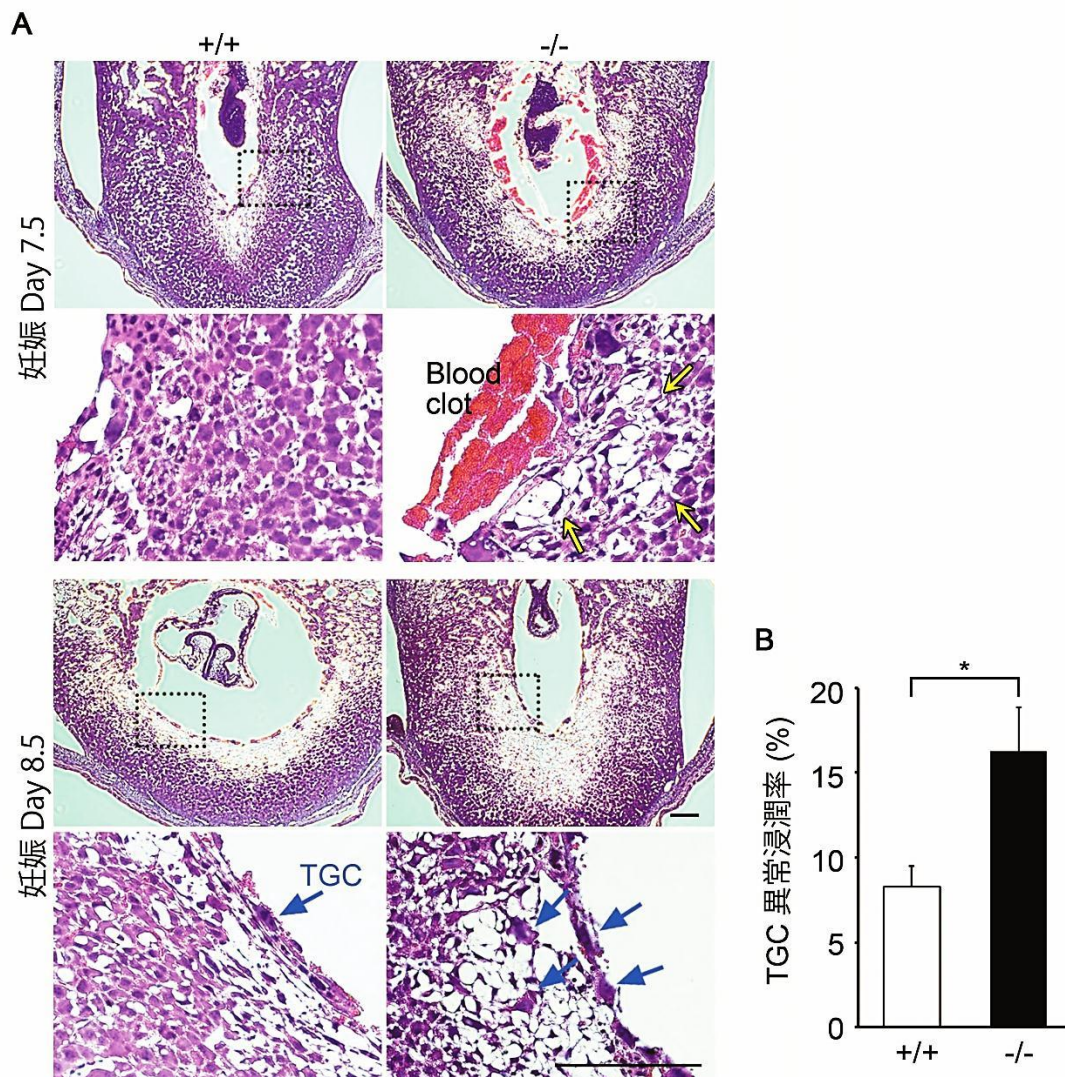


図 15. *Dedd*^{-/-} マウス子宮において着床後、後期の組織像の変化
(A) 妊娠 Day 7.5 から Day 8.5 までの子宮組織切片を HE 染色した。上図で囲った部分の拡大図が下図に示してある。Day 7.5 の黄色矢印は、*Dedd*^{-/-} 子宮において細胞質が縮小した脱落膜細胞を示す。TGC は青矢印で示した。Scale bars : 200 μ m。
(B) *Dedd*^{-/-} 子宮組織への TGC の異常な浸潤を定量化して示した。反子宮間膜側領域における TGC 浸潤数を HE 染色切片の検鏡により計測した。3箇所異なる着床部位について、各々 10 枚以上の異なる部位の切片を無作為に選んだ。グラフは、異常な浸潤像を示す TGC 数の、正常な部位も含めた総 TGC 数に対する割合の平均値を示した。Error bars : SEM、* : P < 0.05。

***Dedd*^{-/-} 子宮脱落膜細胞の多核化不全**

次に、脱落膜細胞の分化について *in vitro* でその割合を調べた。マウス子宮間質細胞は、*in vitro* 脱落膜分化誘導によって、増殖・分化マーカー発現・成熟に伴う多核化を順に呈する。よって、多核化率を脱落膜細胞へ成熟した指標として解析した。

Dedd^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} 由来の子宮間質細胞をそれぞれ E2、P4、HB-EGF 存在下で培養し、Day 1、Day 3 及び Day 7 における多核化率を調べた (図 16)。検鏡下で多核化していた細胞の割合は、Day 3 と Day 7 において *Dedd*^{-/-} 由来の細胞の方が *Dedd*^{+/+} に比べておよそ 50% 低下していた。これは、受精卵の状態や生死と無関係に、同一条件下である *in vitro* の系で、脱落膜細胞への分化成熟能が *Dedd*^{-/-} 子宮間質細胞において低下していることをあらわす。

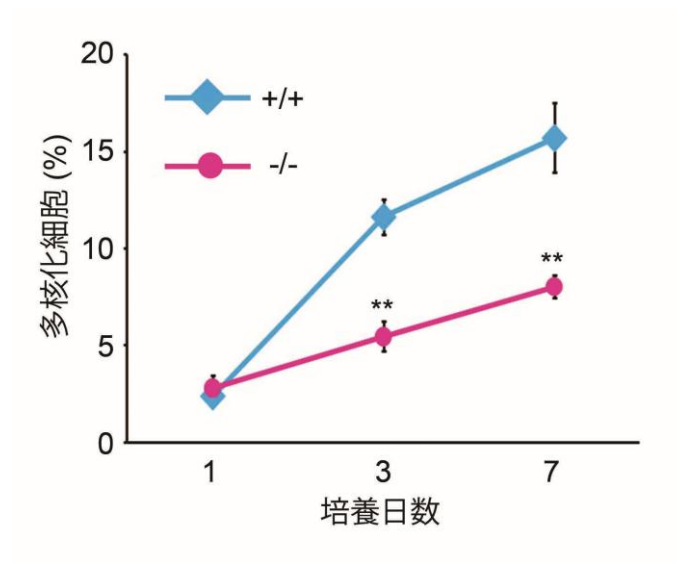


図 16. 脱落膜の多核化についての比較

In vitro で子宮間質細胞を脱落膜に分化誘導し、Hoechst 染色により核を計測した。検鏡下で各々 600 個の細胞について核を数え、3 人による盲検結果を平均した。Error bars : SEM、** : $P < 0.01$ 。

さらに、DNA 染色後、フローサイトメトリーで客観的な定量解析をおこなった。脱落膜分化に伴って、*Dedd*^{+/+} 細胞では DNA コピー数が 8n 以上の細胞数が出現し、4n 及び 8n 以上の DNA 量を持つ細胞数が増加した。一方、*Dedd*^{-/-} においては、これらの高 DNA 量細胞が有意に *Dedd*^{+/+} より少ないことが明らかとなった (図 17A)。同様な結果は、妊娠 Day 4.5 の子宮から得た間質・脱落膜組織の細胞を DNA 染色し、フローサイトメトリーで解析することによっても見られた (図 17B)。*Dedd*^{+/+} 子宮から得た細胞に、脱落膜細胞の特徴であるサイズの大きさをゲーティングをかけると、少なくとも 16n の DNA コピーを持つ細胞が観察された。これに対し、*Dedd*^{-/-} 子宮細胞ではヒストグラムの裾がわずかに伸びるものの、8n 以上のピークは検出されなかった。各 DNA 量の細胞の割合をグラフにあらわすと (図 17B 下図)、*Dedd*^{-/-} 細胞には 2n のものが有意に多く、反対に 4n、8n のものが有意に少なかった。

以上の結果から、*Dedd*^{-/-} 子宮における脱落膜の分化不全は、多核化をともなう成熟が起こらないことによるものであると考えられる。

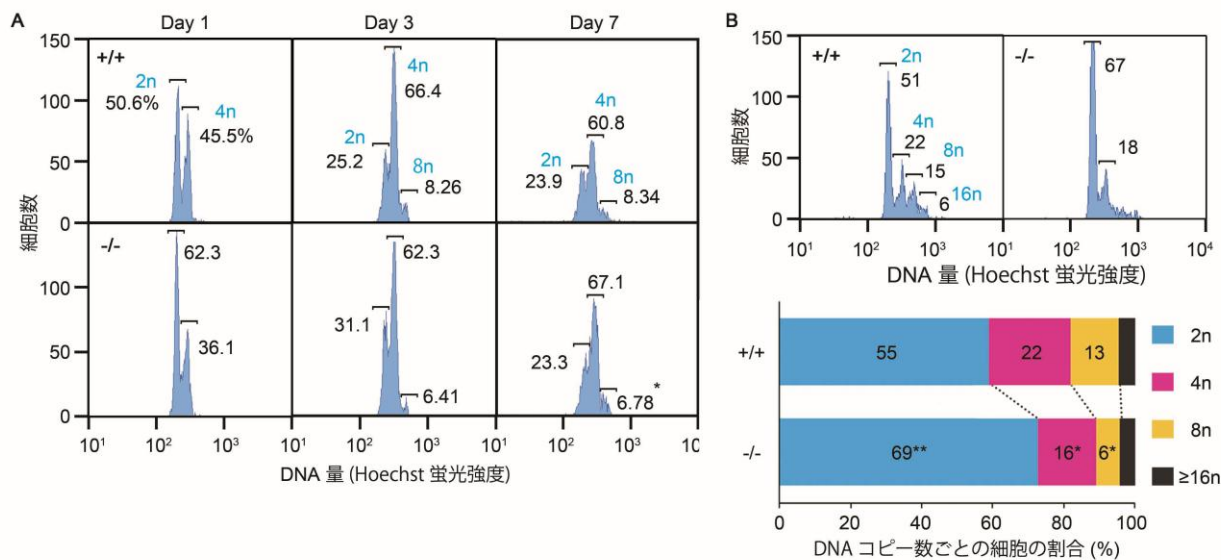


図 17. 脱落膜細胞の DNA 定量

(A) In vitro で脱落膜に分化誘導中の細胞を、Day 1、3、7 で各々トリプシナイズし、Hoechst 染色後にフローサイトメーターで 2n、4n、8n のピークをそれぞれ定量した。(B) 妊娠 Day 4.5 の子宮を、*Dedd*^{-/-}、*Dedd*^{+/+} マウスからそれぞれ取り出し、3 箇所に着床部位を各々コラゲナーゼ処理して細胞を単離した。Hoechst 染色後、フローサイトメーターで解析した。代表的なヒストグラムデータを示す。2n、4n、8n、及び 16n 以上の倍数体それぞれの割合平均値を下にグラフで表した。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 。

一方、子宮間質細胞の増殖能に関しては、*Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} で差が見られなかった。まず、妊娠 Day 4.5 における単離した間質細胞数は、各着床部位においてそれぞれ、*Dedd*^{+/+} : $(1.21 \pm 0.075) \times 10^6$ 、*Dedd*^{-/-} : $(1.08 \pm 0.15) \times 10^6$ ($n = 3$) であった。また、細胞増殖の指標として、in vitro で脱落膜誘導中の細胞の 5-ethynil-2'-deoxyuridine (EdU ; チミジン類似ヌクレオチド誘導体) 取り込みを調べると、*Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} の細胞では差が見られなかった (図 18A)。また、妊娠 Day 5.5 の着床部位において、増殖中の細胞核を染色する Ki67 の組織染色像からは、*Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} で差が見られなかった (図 18B)。ここで、図 18A のチミジン誘導体取り込みの結果を見ると、*Dedd*^{+/+} でも *Dedd*^{-/-} でも、脱落膜分化誘導にともなって増殖が同程度に抑えられていることがわかる。すなわち、*Dedd*^{-/-} 子宮間質細胞では脱落膜分化・多核化能のみが低下しているのであって、分化誘導初期の最初の段階である増殖が、それらに影響しているわけではない。

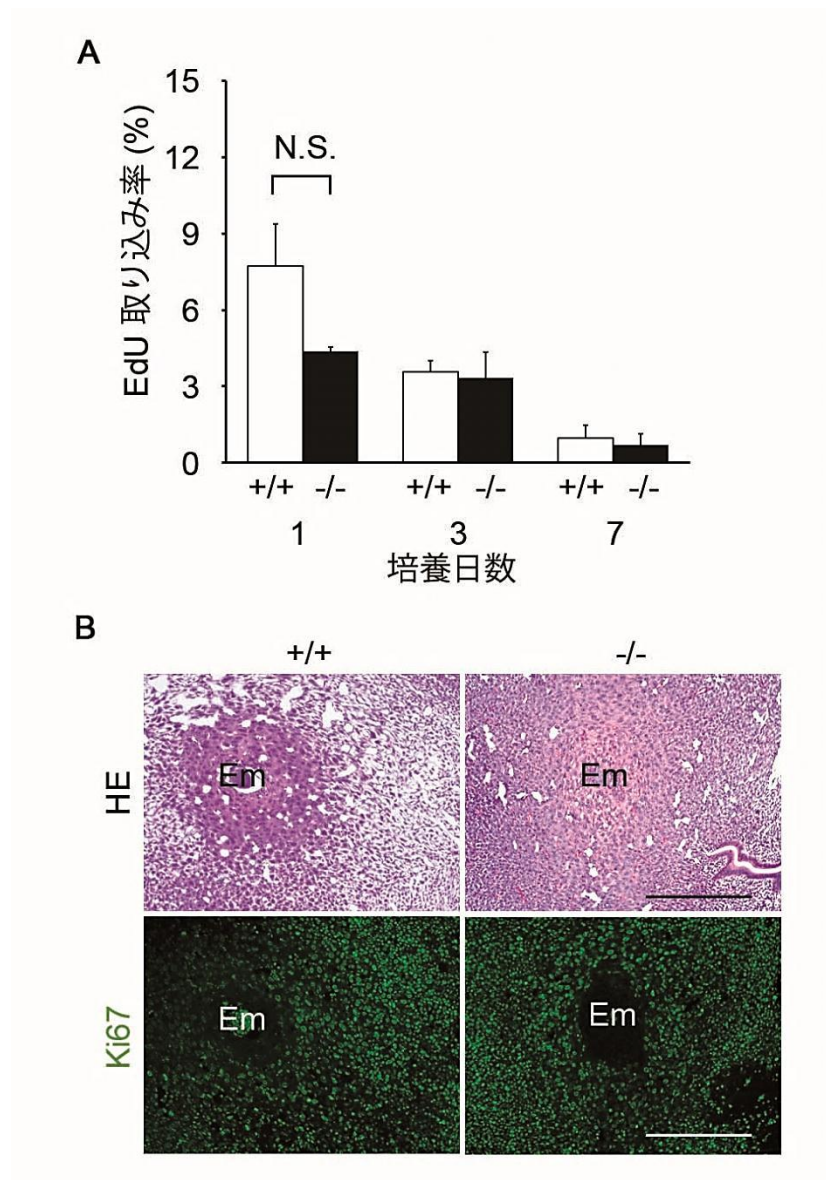


図 18. *Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} 子宮の細胞増殖能の比較

(A) In vitro で脱落膜分化誘導中の子宮間質細胞に、EdU を 2 時間取り込ませた。細胞を採取して EdU を染色し、フローサイトメトリーにより取り込んだ細胞の割合を解析した。異なる 3 回の実験結果を平均した。Error bars : SEM。 (B) 妊娠 Day 5.5 における着色部位の子宮切片を、抗 Ki67 抗体で染色した。G1 後期から M 期にかけて細胞の核に発現するタンパク質である Ki67 が、細胞周期が動いている、増殖中の細胞の指標となる。Em : Embryo (胚)、Scale bars : 200 μm。

以上の解析から推定されることは、*Dedd*^{-/-} マウス子宮において、脱落膜の分化・多核化が不完全であることが、妊娠初期の胚を育成すべきはずであった子宮環境を悪化させ、その結果、着床後早期の胚が成長せず死に至るため、仔が産まれない、すなわち不妊になるということである。

では、なぜ *Dedd* がないと脱落膜が成熟分化しにくいのか。分子レベルでの *Dedd* の脱落膜分化への関与とそのメカニズムを、以下のように明らかにした。

***Dedd*^{-/-} 子宮における Akt 発現量の減少及び、Akt 過剰発現による *Dedd*^{-/-} 脱落膜細胞多核化の改善**

まず、インスリンシグナル下流の Akt に着目した。*Dedd* は Akt 分子に結合してタンパク質レベルで安定化することにより、インスリン感受性に寄与する。この Akt は既に、ヒト脱落膜細胞に発現して脱落膜分化に関与することが報告されていた [32]。序文に記した通り、Akt 発現量は、*Dedd*^{-/-} マウスのさまざまな組織において、タンパク質レベルで安定化されにくいために減少している [21]。妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位においても、*Dedd*^{+/+} に比べて *Dedd*^{-/-} 子宮の方が Akt タンパク質の発現量が低いことが、ウェスタンブロットの結果からわかった (図 19A)。同様な結果は、*in vitro* で脱落膜分化誘導中の細胞を用いたウェスタンブロットからも得られた (図 19B)。Akt の活性体である Thr308 リ

ン酸化 Akt も、*Dedd*^{-/-} 子宮では Akt の総タンパク質量低下にともなって減少していた (図 13A、p-Akt)。他の組織や MEF で見られたのと同様に [21]、*Akt-1* と *Akt-2* の mRNA 発現量には *Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} で差がなかった (図 19C)。

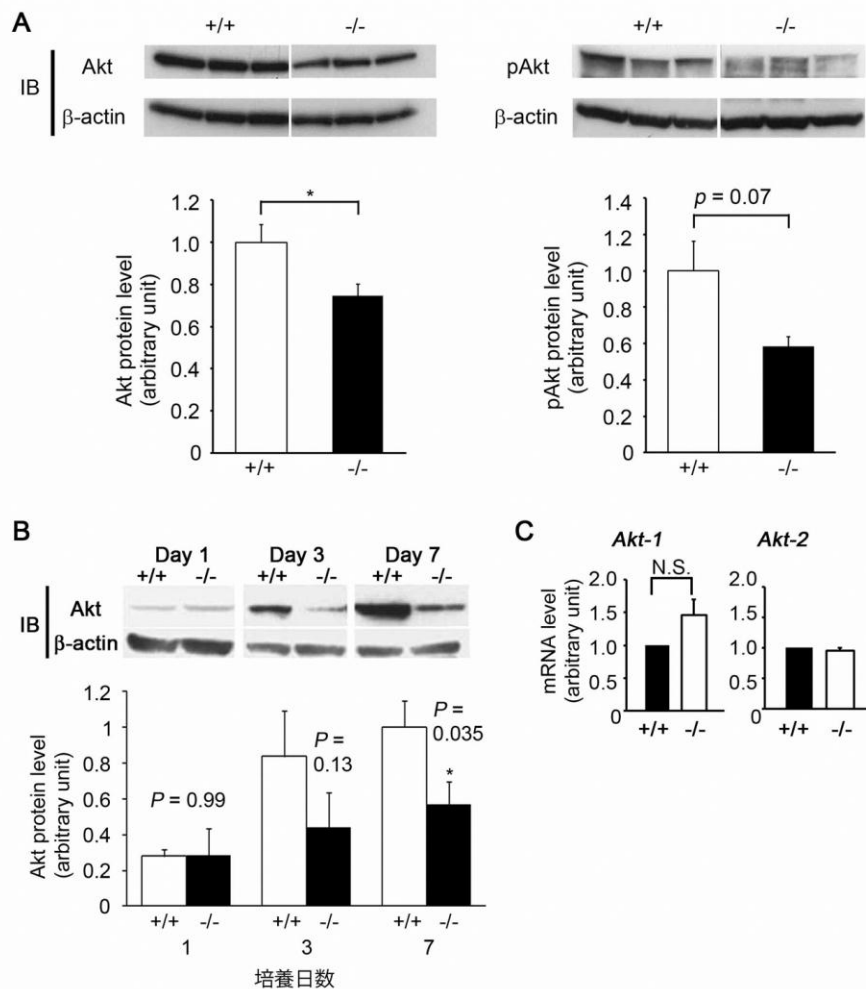


図 19. 子宮と脱落膜細胞における Akt の発現量

(A) 妊娠 Day 5.5 における *Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} 子宮着床部位のタンパク質 (20 μ g/lane) を用いて、total Akt (左) とリン酸化 Akt (Thr308、右) についてウェスタンブロットをおこなった。 β -actin で標準化してバンド定量をおこなった結果をグラフに示す。*Dedd*^{+/+} 子宮の発現量を 1 としたときの相対値を表したものである。異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。Error bars : SEM, *: P < 0.05。(B) 子宮間質細胞を in vitro で脱落膜分化誘導中に回収し、タンパク質 (20 μ g/lane) を用いて、total Akt についてウェスタンブロットをおこなった。3 回の実験のうち、代表的なデータを示す。NIH Image J を用いてバンド定量をおこなった結果をグラフに示す。*Dedd*^{+/+} の Day 7 における発現量を 1 としたときの相対値を表した。Error bars : SEM。(C) 妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位から total RNA を抽出し、*Akt-1* 及び *Akt-2* の mRNA 発現量を QPCR により定量した。値はそれぞれ、*Dedd*^{+/+} の値を 1 とし、 β -actin で標準化した。用いた試料は (A) と同様である。Error bars : SEM。

次に、Akt の発現量そのものが脱落膜の多核化に寄与するのかどうかについて調べるため、in vitro で分化誘導中に *Akt-1* 発現ベクターを導入すると、*Dedd*^{-/-} 由来細胞の多核化が大きく改善された (図 20)。脱落膜分化誘導 2 日目に HA-*Akt-1* または *EGFP* 発現ベクターをトランスフェクションした。5 日目に抗 HA 抗体で免疫染色及び核染色し、HA ポジティブのもののうち多核化した細胞の割合を数えた。また、蛍光顕微鏡下で緑色に光る *EGFP* ポジティブの細胞のうち多核化した割合を数えて調べた。その結果、コントロールベクターをトランスフェクションした細胞 (*EGFP*) では、トランスフェクション試薬のみ (*None*) の細胞と多核化の割合に変化がなかったが、HA-*Akt-1* をトランスフェクションした細胞 (HA-*Akt-1*) では、多核化が 2.5 倍に改善した。このことから、*Dedd* による Akt タンパク質の安定化・発現量維持が、脱落膜の多核化に大きく寄与すると考えられる。

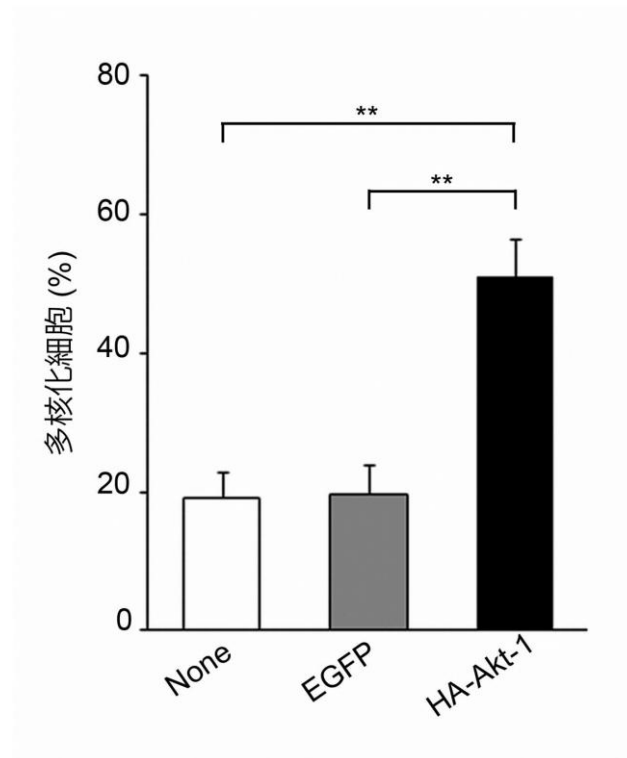


図 20. 脱落膜細胞多核化における Akt 過剰発現の影響

In vitro 脱落膜誘導中の *Dedd*^{-/-} マウス由来子宮間質細胞に対して、培養 2 日目に HA-Akt-1 またはコントロールの EGFP 発現ベクターをトランスフェクションした。5 日目に抗 HA 抗体と Hoechst で染色し、多核化した細胞の割合を HA ポジティブのものと EGFP ポジティブのものとで比較した。4 回の異なる実験で、各々 100 個以上の染色細胞について顕微鏡下で数えた。Error bars : SEM、** : P < 0.01。

Dedd は Cyclin D3 と相互作用してそのタンパク質安定化にはたらく

次に私は、細胞周期に直接関与して脱落膜の多核化にはたらく細胞内因子に着目した。一般的に多核化する細胞としてよく知られる megakaryocyte (巨核球) においては、G1 / S 期にはたらく Cyclin A / CDK2、Cyclin E / CDK2、及び Cyclin D3 / CDK2 の発現や活性が多核化に伴って上昇する [33] 一方、CDK1 の発現が抑制されて M 期遅延・細胞質分裂阻止が起こると考えられている [34]。Dedd は Cyclin B1 / Cdk1 複合体に抑制的な作用をする [15、16] ことから、M 期を遅延させることが、細胞質分裂なき DNA 複製・核分裂による多核化を誘導すると考えた。まず、Cdk1 が脱落膜細胞でも Dedd によって制御され得るかどうかを検討した。In vitro で脱落膜分化誘導中の子宮間質細胞において、QPCR で *Cdk1* の発現を定量した結果、分化誘導に伴い、Day 1 ~ 7 にかけて変化がないかまたは減少が見られた (図 21A)。このとき *Cdk1* のそれぞれの時点における発現量やその変化の様子は、*Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} 細胞で有意な差はなかった。ここで、図 18A の in vitro 細胞増殖率の結果から、脱落膜分化誘導に伴って増殖が低下するため、Cdk1 の活性は低下することが予想される。*Cdk1* の発現そのものも分化誘導に伴って増えることはなく、多核化に重要な役割を果たす可能性は低い。そうであれば、Dedd が Cdk1 に結合して活性を抑制する機構からは多核化の説明がつかない。従って、脱落膜においては通常の細胞増殖時と異な

り、Cdk1 の発現・活性制御が独立なメカニズムで起こることが予想され、Dedd による Cdk1 活性制御が直接多核化に関与するとは考えにくい。

一方、Das らによれば、Cdk4 や Cdk6 と複合体を形成する Cyclin D3 が、脱落膜の多核化に必須の因子である [9、35、36]。そこで、抗 Cyclin D3 抗体を用いて妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位を免疫染色した。Cyclin D3 は主に細胞核内に検出される。Dedd^{-/-} マウスでは、Cyclin D3 染色ポジティブな細胞数が減少していた (図 21B)。各切片で Cyclin D3 染色細胞を数えると、Dedd^{-/-} 子宮組織では 3 倍以上の減少が見られた (図 21C)。

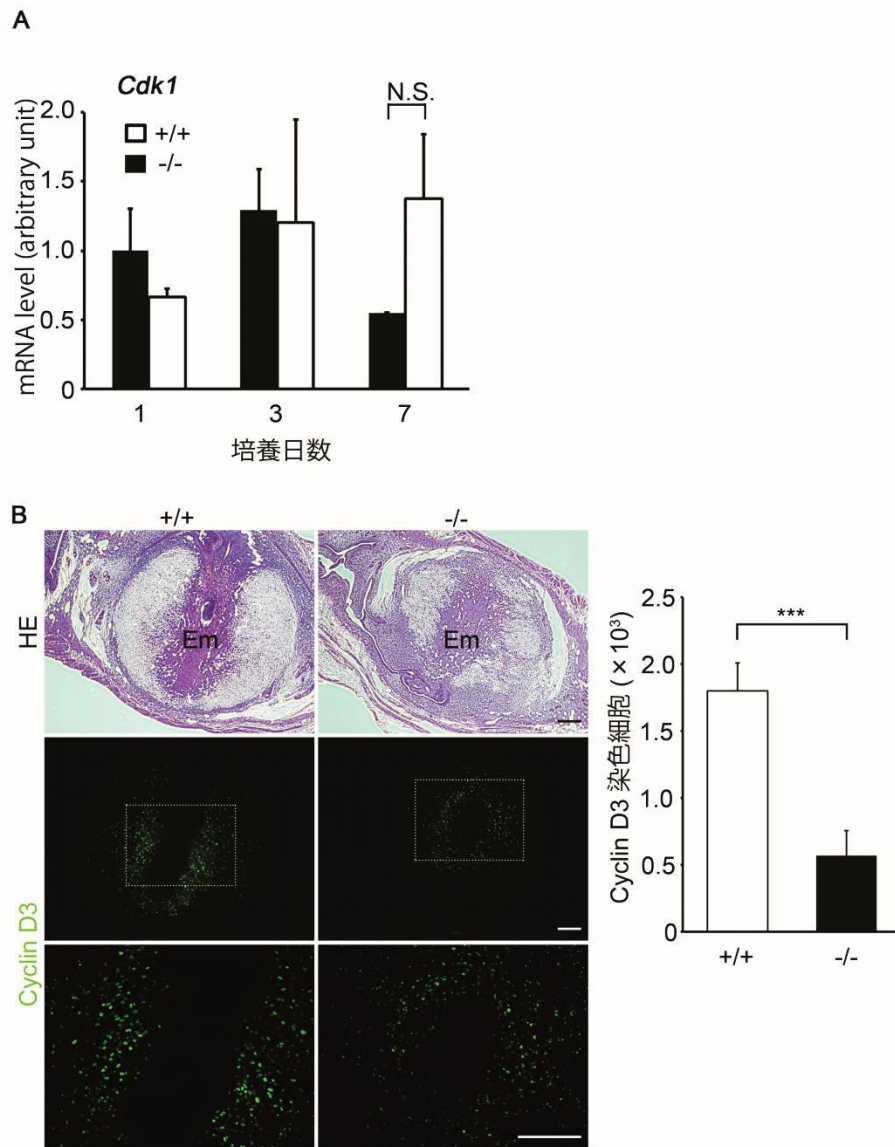


図 21. 子宮着床部位における Cyclin D3 発現細胞数

(A) In vitro 脱落膜分化誘導中の子宮間質細胞から total RNA を抽出し、*Cdk1* の mRNA 発現量を QPCR により定量した。値は *Dedd*^{+/+} の Day 1 を 1 とし、 β -actin で標準化した。異なる 3 匹のマウス子宮に由来する試料を用いた。Error bars : SEM。 (B) *Dedd*^{+/+} 及び *Dedd*^{-/-} マウスの妊娠 Day 5.5 における子宮着床部位の切片を、Cyclin D3 について免疫染色した。上 : HE 染色。中 : 免疫染色。下 : 中央の点線領域の拡大。Scale bars : 200 μ m。 (C) 子宮着床部位の 1 切片あたりの Cyclin D3 ポジティブ細胞数を、*Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} で比較した。3 箇所着床部位について、各々 4 枚以上の異なる部位の切片染色像を無作為に選び、それぞれの平均値をグラフに表した。Error bars : SEM、*** : $P < 0.001$ 。

この結果は、子宮タンパク質を用いた Cyclin D3 のウェスタンブロットでも確認された (図 22A)。妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位において、*Dedd*^{-/-} では *Dedd*^{+/+} に比べておよそ半分に Cyclin D3 発現量が低下していた。しかし、同じ妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位において、*Cyclin D3* の mRNA レベルには *Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} の間で差がなかった (図 22B)。また、in vitro 脱落膜分化誘導細胞においても同様に *Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} の間で比較し、差がないことを確認した (data not shown)。これらの結果は、Cyclin D3 が遺伝子発現のレベルではなく、タンパク質レベルで制御を受けることを示唆する。すなわち、Cyclin D3 に関しても Akt の場合と同様に、*Dedd* によるタンパク質安定化作用があることが予想された。

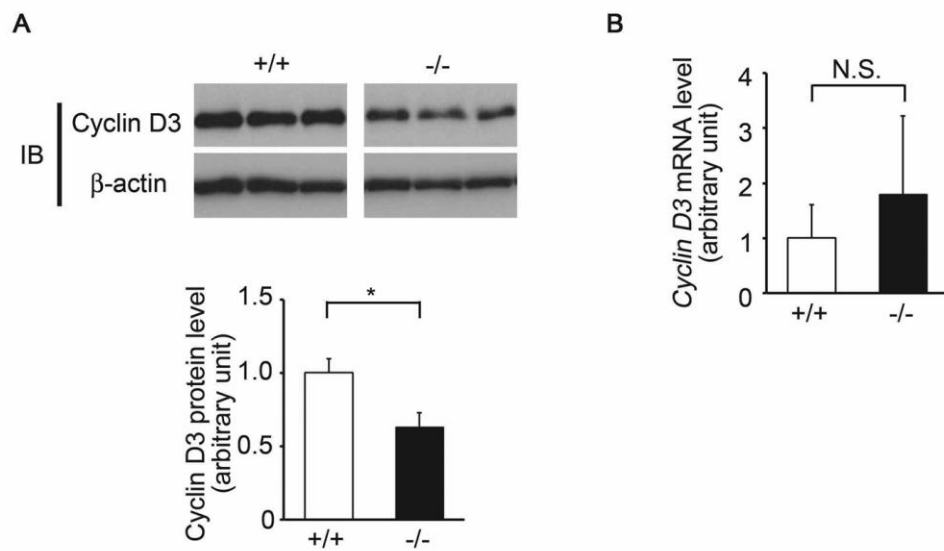


図 22. 妊娠子宮における Cyclin D3 のタンパク質及び mRNA 発現
 (A) $Dedd^{+/+}$ 及び $Dedd^{-/-}$ の妊娠 Day 5.5 子宮着床部位のタンパク質を抽出し、Cyclin D3 のウェスタンブロットをおこなった (20 μ g/lane)。それぞれ 3 匹の異なるマウスから得られた結果をバンド定量し、グラフに示した。Error bars : SEM、* : $P < 0.05$ 。(B) Cyclin D3 の mRNA 発現量について、妊娠 Day 5.5 の子宮着床部位から得た total RNA をもとに QPCR で定量した ($n = 3$)。

この仮説を確かめるために、in vitro 脱落膜分化誘導中の細胞において、Cyclin D3 タンパク質の半減期を調べ、*Dedd*^{+/+} と *Dedd*^{-/-} で比較した。子宮間質細胞を in vitro で脱落膜分化誘導開始後、Day 3 で 50 μ M の cycloheximide (CHX) を加えることによってタンパク質合成を停止させた。0 分後を 100% として、30、60、90 分後にそれぞれ細胞からタンパク質を回収して Cyclin D3 のウェスタンブロットをおこなったところ、*Dedd*^{-/-} 由来細胞では Cyclin D3 のタンパク質量が約 60 分で半減していた (図 23)。90 分後には、Cyclin D3 タンパク質量は *Dedd*^{-/-} 細胞で *Dedd*^{+/+} に比べて 3 倍以上減少していた。CHX 添加時にプロテアソームインヒビターである MG132 を 10 μ M 加えると、*Dedd*^{-/-} 細胞における Cyclin D3 の減少が抑えられ、90 分後においても *Dedd*^{+/+} の CHX 処理細胞と同程度までタンパク質量が回復した (図 23)。*Dedd*^{+/+} 細胞では CHX 処理後 90 分以内に Cyclin D3 タンパク質量がほとんど減少しないため、MG132 を加えても変化が見られなかった。以上の結果から、Dedd が Cyclin D3 に対して、タンパク質レベルでの安定化にはたらくことが示唆された。

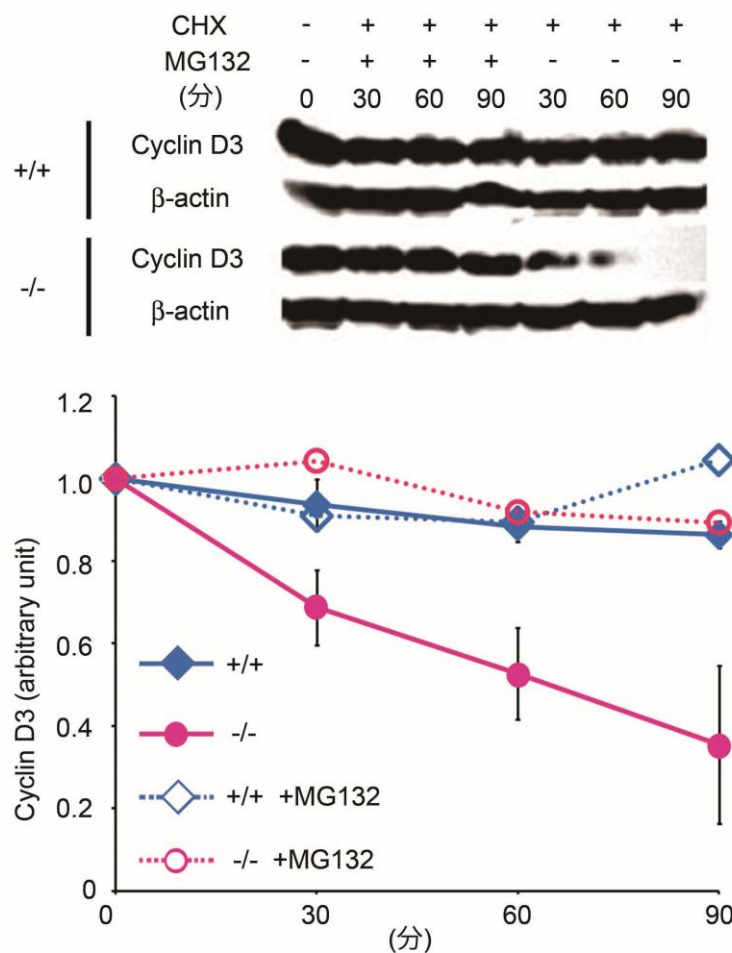


図 23. In vitro 系での Cyclin D3 タンパク質量半減期の評価

子宮間質細胞を in vitro で脱落膜分化誘導開始後、Day 3 で 50 μ M の cycloheximide (CHX) を加えた。0 分後を 100% として、30、60、90 分後にそれぞれ細胞からタンパク質を回収して Cyclin D3 のウェスタンブロットをおこなった (20 μ g/lane)。バンド定量は β -actin ブロットを用いて標準化した。プロテアソームインヒビターである MG132 (10 μ M) を加えた場合も同様に示した。3 回の独立した実験の結果からグラフを作成し、代表的なブロット像を上にした。Error bars : SEM。

従って、Dedd の欠損によって Cyclin D3 の安定性が低下することが明らかとなった。そこで、Akt の場合と同様に、Cyclin D3 を過剰発現させると脱落膜の多核化が改善するかどうかを調べた。Dedd^{-/-} 子宮間質細胞を脱落膜分化誘導中に Day 2 において FLAG-Cyclin D3 発現ベクターをトランスフェクションすると、Day 5 において脱落膜細胞の多核化率が約 2 倍に増加した (図 24)。すなわち、Dedd^{-/-} 子宮において、多核化不全が起こる理由の一つに、Cyclin D3 タンパク質の不安定化が関与すると考えられる。

Dedd は子宮脱落膜細胞において、Akt 及び Cyclin D3 をそれぞれタンパク質レベルで安定化させ、これらの因子を介して脱落膜多核化に寄与することがわかった。

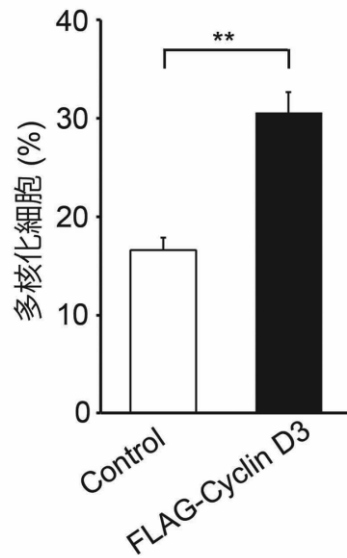


図 24. 脱落膜細胞の、Cyclin D3 過剰発現による多核化改善

In vitro 脱落膜分化誘導中の *Dedd*^{-/-} 細胞に、Day 2 において、FLAG タグを付加した *Cyclin D3* の発現ベクターをトランスフェクションした。Day 5 に細胞を抗 FLAG 抗体と Hoechst で染色し、100 個以上の FLAG ポジティブ細胞を数えて多核化を評価した。4 回の異なる実験結果の平均値を示す。Error bars : SEM、** : $P < 0.01$ 。

以上で示唆された *Dedd* による *Cyclin D3*、及び *Akt* への安定化作用が *in vivo* でも存在するかどうかを検討するため、まず *in situ hybridization* をおこなって、子宮組織におけるこれら三つの分子の発現局在を調べた。*Dedd*^{+/+} 子宮の妊娠 Day 5.5 について調べると、secondary decidual からその周囲の間質領域において、*Dedd*、*Cyclin D3*、*Akt-1* すべての発現が確認された (図 25、左)。特に、*Dedd* の発現は間質領域よりも secondary decidual の方が強くなっている様子が観察された。一方、primary decidual や着床した胚には、これらすべての遺伝子発現が見られなかった。また、妊娠 Day 7.5 において同様に調べると、大部分の脱落膜領域でこれらの 3 種類の遺伝子発現が低下していたが、子宮間膜側の一部及び反子宮間膜側の一部において、*Dedd*、*Cyclin D3*、*Akt-1* すべての発現が確認された (図 25、右)。このように、*in vivo* で子宮脱落膜組織に *Dedd*、*Cyclin D3*、*Akt-1* の発現が時空間的に共局在していることが示された。

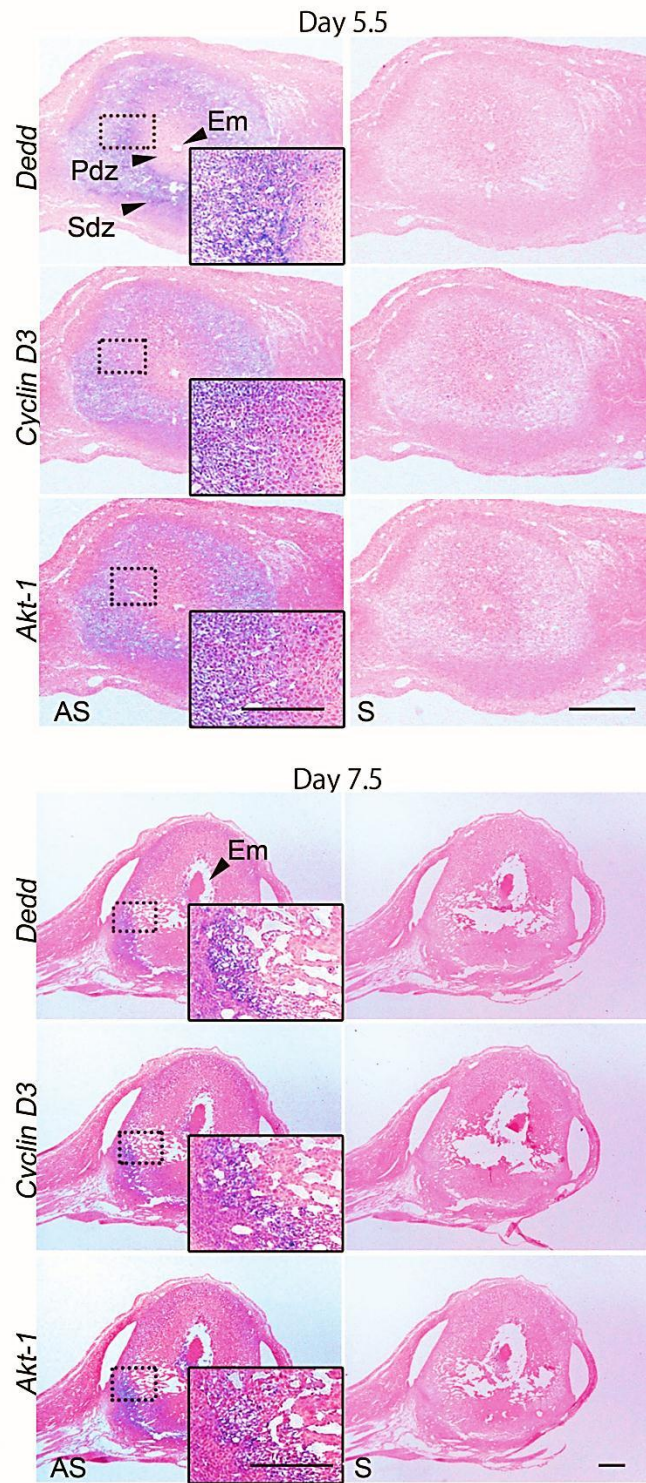


図 25. 子宮における *Dedd*、*Cyclin D3*、*Akt-1* の in situ hybridization
Dedd、*Cyclin D3*、及び *Akt-1* の、妊娠 Day 5.5 及び 7.5 においての *Dedd*^{+/+} マウス子宮を用いた in situ mRNA 発現解析をおこなった。下図は高倍率像。AS : antisense プローブ、S : sense コントロールプローブ、PdZ : primary decidual zone (一次脱落膜)、Sdz : secondary decidual zone (二次脱落膜)。Scale bars : 500 μ m。

ではところで、Cyclin D3 に対して Dedd は、Akt の場合と同様に直接結合することによって安定化させるのか。このことは、in vitro の免疫共沈降実験によって示された。HA タグを付加した Dedd と、FLAG タグを付加した Cyclin D3、または Cdk4、Cdk6 を HEK293T 細胞に過剰発現させた。HA-Dedd と FLAG-Cyclin D3、FLAG-Cdk4、FLAG-Cdk6 各々の結合を、抗 HA 抗体及び抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降することにより検出した。その結果、HA-Dedd と FLAG-Cyclin D3、HA-Dedd と FLAG-Cdk4、HA-Dedd と FLAG-Cdk6 のすべての組み合わせで、特異的な結合が検出された (図 26)。Dedd は、以前示された Cyclin B1 / Cdk1 や S6k1、Akt と同様に、Cyclin D3 と in vitro で相互作用し、結合すると言える。また、Dedd は Cyclin D3 だけでなく、これと複合体を形成する Cdk4 や Cdk6 とともに直接結合しうることがこの実験により明らかになった。すなわち子宮においては、Dedd が Akt だけでなく、Cyclin D3 / Cdk4、Cyclin D3 / Cdk6 とそれぞれ複合体を形成することが予想される。

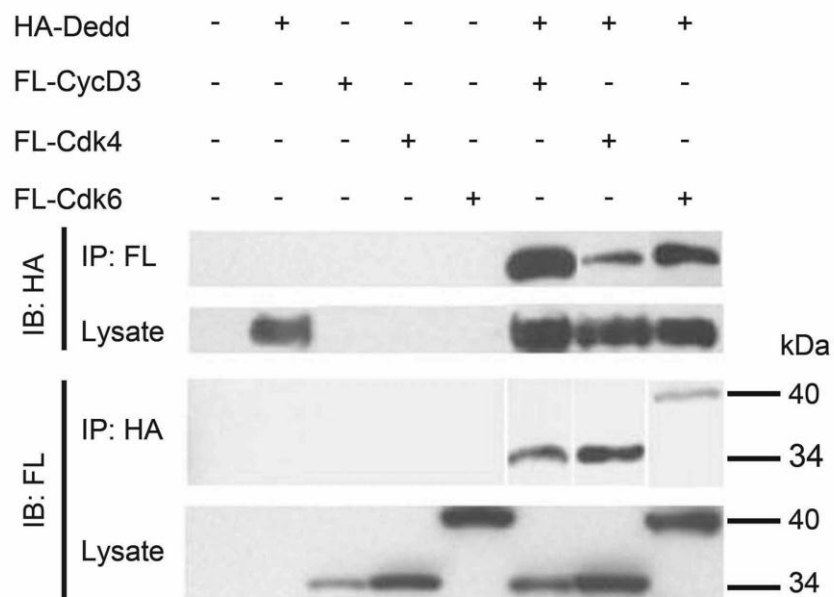


図 26. Dedd と Cyclin D3 複合体構成分子の in vitro 結合実験
HA タグを付加した Dedd と、FLAG タグを付加した Cyclin D3、または Cdk4、Cdk6 を HEK293T 細胞に過剰発現させた。HA-Dedd と FLAG-Cyclin D3、FLAG-Cdk4、FLAG-Cdk6 各々の結合を、抗 HA 抗体及び抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降することにより検出した。

そこでさらに、in vivo でも Dedd と Cyclin D3 / Cdk4、Cyclin D3 / Cdk6 との結合が見られるかどうかを検討した。妊娠 Day 5.5 の *Dedd*^{+/+} 子宮着床部位からタンパク質を抽出し、Cyclin D3、Cdk4、もしくは Cdk6 で免疫沈降して子宮内在性 Dedd タンパク質をウェスタンブロットにより検出した (図 27)。その結果、Cyclin D3、Cdk4、Cdk6 いずれの免疫沈降産物からも、Dedd タンパク質の共沈降が検出された。従って、以前の報告から示された、Dedd の Cyclin B1 を介した Cyclin B1 /Cdk1 複合体との結合とは少し異なった様式で、Dedd が Cyclin D3 / Cdk4 及び Cyclin D3 / Cdk6 それぞれの複合体に結合する可能性が考えられる。これらの Cyclin D3-Cdk 複合体は、脱落膜の分化や多核化に非常に重要であるといわれている [16]。すなわち Dedd は、Cyclin D3-Cdk 複合体と結合することによって、脱落膜細胞の多核化に必須な細胞周期調節に関与していると推察できる。

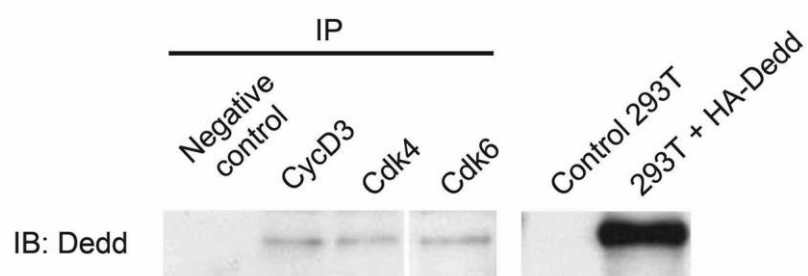


図 27. 子宮内在性 Dedd タンパク質の免疫共沈降実験

Dedd^{+/+} マウス子宮の妊娠 Day 5.5 着床部位タンパク質抽出物を用いて、それぞれ Cyclin D3、Cdk4、Cdk6 抗体によって免疫沈降をおこない、抗 Dedd 抗体のウェスタンブロットにより各々の分子と Dedd との結合性を調べた。HEK293T に HA-Dedd をトランスフェクションしたライセートをコントロールとした。

考察

Dedd 欠損マウスの、子宮脱落膜分化に原因を有する不妊症メカニズムの解明

この研究によって、Dedd が初期の妊娠維持に必須のタンパク質であることが明らかになった。Dedd は脱落膜細胞に発現し、脱落膜細胞の Akt タンパク質安定性に寄与する。また同時に、脱落膜細胞核内の Cyclin D3 タンパク質安定性にも寄与する。これらのはたらきが、脱落膜の分化・成熟時における細胞の多核化に深く関与している。一方で *Dedd*^{-/-} マウス脱落膜細胞は、(1) 増殖、(2) 分化、(3) 多核化のうち、(1) 増殖に関しては低下が見られない。従って *Dedd*^{-/-} マウスの子宮では、Akt や Cyclin D3 のタンパク質安定性が低下し、脱落膜の(2) 分化や(3) 多核化が十分に起こらず、その後脱落膜組織が変質・崩壊してしまう。そのため、胎盤形成前に胚発生のための栄養供給や物理的な足場保持などが不可能になり、胚が死にいたるため完全な不妊になると考えられる。

Dedd は全身の臓器で ubiquitous に発現しており、そのため *Dedd*^{-/-} マウスは、全身の細胞周期が短く細胞サイズが小さい [15、16、20]。また、Akt シグナルが減弱されるため、グルコース負荷を与えると若干ではあるものの耐糖能の低下を示す [21]。これらの表現型が、直接メス不妊の原因に関与するかどうかは議論すべきである。

しかしながら、*Dedd*^{-/-} と同様なメカニズムで細胞・体のサイズが小さく、インスリン応答の減弱を示す *S6k1*^{-/-} マウスのメスは、不妊ではない [23]。これについては、*S6k1*^{-/-} マウスは成獣になると体のサイズが野生型に近づき、膵β細胞のみにサイズの表現型が見られるようになるからだと考えている。*Dedd*^{-/-} マウスでは、生涯に渡って、全身の細胞で *S6k1* の活性が低下していると考えられる。*S6k1*^{-/-} マウス成獣では子宮の機能がほぼ正常で、インスリン分泌能のみ障害される状態で不妊ではないことから、逆に言えば、*Dedd*^{-/-} マウスの不妊はインスリン分泌能に影響を受けないとも言える。

また、*Akt-1*^{-/-} マウスは胚側が原因の胎盤形成不全のため発達不良になりやすいが、成獣 *Akt-1*^{-/-} マウスは不妊ではない [37]。これについては後に述べる。

さらに、*Dedd*^{-/-} マウスの **small phenotype** (体のサイズが小さいこと) は、妊娠そのものには影響を及ぼさない程度である。例えば 20 週齢の *Dedd*^{-/-} マウスは、10 週齢の *Dedd*^{+/+} マウスよりは体が大きくなっている。従って、上述の表現型そのものは、*Dedd*^{-/-} マウスの不妊の表現型に影響を及ぼさないと思倣することができる。

細胞の多核化機構とその意義について

ところで、脱落膜細胞以外にも、生体内では多核化する細胞が存在する。巨

核球や栄養膜巨細胞、肝実質細胞などが細胞周期依存的に多核化する細胞であり、破骨細胞や心筋細胞は細胞周期非依存的に融合などによって多核細胞化する。*Dedd*^{-/-} マウスではこれまでに、それらの細胞や臓器機能で目立った表現型は発見されていない。これはおそらく、脱落膜とは多核化のメカニズムが異なるのが主な理由であろう。実際、巨核球では Cyclin D3 と複合体を形成するのは CDK4 や CDK6 ではなく、CDK2 である [33]。また、マウスにおいては、*Dedd* の遺伝子ファミリーである *Dedd2* の存在が発見されている [13]。しかし *Dedd* と *Dedd2* 間の相同性はアミノ酸レベルで 48.5% と低い。さらに、当研究室で作製した *Dedd2*^{-/-} マウス及び *Dedd*^{-/-}/*Dedd2*^{-/-} マウスは、それぞれ *Dedd*^{+/+} マウス及び *Dedd*^{-/-} マウスと表現型が変わらない (unpublished data)。従って、*Dedd2* が *Dedd*^{-/-} マウスの脱落膜以外の多核細胞において、代償的な機能を果たすとは考えにくい。

多核化、染色体の倍数増加という現象の意義は、細胞内での代謝率亢進・遺伝子発現量の向上などであると考えられている [38、39]。細胞質分裂というエネルギーを使わずして、その分をコピー数の増えた DNA からの転写・翻訳に充てるわけである。しかしながら、*Dedd* が必須の役割を果たす脱落膜の多核化に関しては、それが脱落膜自体の機能にどう関与するのかが現在までほとんど明確に述べられていない。Das らの最近の報告によれば、脱落膜の多核化細胞

は、未熟な非多核化細胞に比べてミトコンドリアによる ATP 産生が増加している [40]。しかし彼らはミトコンドリアの機能を阻害すると多核化率が低下すると述べており、多核化の結果として代謝が亢進する証拠はないようである。一方で本研究により発見した、*Dedd*^{-/-} マウスのメスが完全な不妊であること、それが脱落膜細胞の増殖ではなく多核化の低下によるものであることは、初期妊娠時の胚発生のために子宮側で脱落膜の多核化が大きな意味を持つことを示唆している。

Akt 安定化による *Dedd* の脱落膜分化・多核化への関与

Dedd^{-/-} メスマウス不妊の原因の一つは、子宮着床部位における Akt 発現タンパク質量の減少にあることを示してきた。近年の他の研究によれば、Akt は脱落膜化や脱落膜細胞の生死の制御に関与するようである。ヒト脱落膜細胞は分化にともなって Akt 発現量が増加するとともに、*in vitro* ではそのリン酸化される割合が性ホルモン依存的に減少する [41]。しかし *in vivo* では脱落膜における Akt のリン酸化は非常に多く起こっている [32]。また、脱落膜細胞はアポトーシスに対して PI3K-Akt 経路が活性化すると抵抗性になる [42]。さらに、子宮コンディショナル *p53*^{-/-} マウスの脱落膜多核化には Akt のリン酸化が重要であるという報告もある [43]。インスリン標的ではない子宮内で、インスリンに

類似したシグナルが脱落膜における Akt の活性化を調節し、脱落膜分化・多核化に関与している可能性がある。

Dedd は Akt-1 から Akt-3 のすべてのアイソフォームと、heat shock protein 90 (Hsp90) との会合をともなって直接結合することにより、Akt タンパク質の安定化に寄与する [21]。Dedd 欠損細胞では、Akt のタンパク質量が減少し、当然ながらそのリン酸化 Akt の総量も減少する。代償的な Akt 活性化は起こっていないことは、図 19A からわかる。図 20 で示したように、Akt を単独で過剰発現させただけで、脱落膜細胞の多核化が亢進した。このことは、Akt が直接脱落膜多核化機構に関与することを強く示唆するが、具体的なそのメカニズムは不明である。Akt は FOXO1 などの転写因子を介してさまざまな遺伝子発現の制御をおこなうため、マイクロアレイなどによって Akt 下流の重要な因子を探索するのが一つの方法であると考えている。この点に注目して脱落膜多核化メカニズムを追究するならば、Das らのおこなった *in vitro* 脱落膜多核化細胞におけるマイクロアレイの結果を参考に、多核化細胞で特異的に発現が増加あるいは減少している遺伝子に注目すべきであろう [40]。

なお、*in vivo* でも Akt シグナル下流のタンパク質発現が脱落膜分化に関与すると推測している。図 14 で調べたすべての脱落膜マーカーの発現が、Dedd^{+/+} マウスに比較して Dedd^{-/-} マウスで同程度に低下しているわけではない。妊娠

Day 4.5 では着床後まもないためデータにばらつきがあるとしても、妊娠 Day 5.5 において、プロラクチンファミリーである *Prl-r* や *Plp-j*、*Dprp* には大きな差があるのに対して *Igfbp-1* や *Hoxa10* には減少傾向のみで有意な差がない。さらに、プロゲステロンに応答して発現が誘導される *Hoxa10* と *Bmp2* のうち、*Bmp2* にのみ有意な低下が見られた (図 14)。このことは、*Dedd* によって安定化される Akt の下流にある特定の転写因子が、脱落膜マーカーの発現に関与することを示唆すると考えている。

Cyclin D3 安定化による *Dedd* の脱落膜多核化への関与

Dedd によって安定化される Akt はそれ自体多様なシグナル制御を受け、多種多様な機能を果たす。その中でも、活性化 Akt は GSK-3 β をリン酸化して不活性化し、それによって Cyclin D1 のタンパク質安定化及び核内への移行を促進する [44]。また、ある種のがん細胞で PI3K シグナルの Akt 下流にある mTOR を薬剤で阻害すると、Cyclin D3 の半減期が短縮するという報告もある [45]。これらの事実から推察されるのは、*Dedd* 欠損脱落膜細胞において、Akt の減少が直接 Cyclin D3 の活性や安定性に影響するかもしれないということである。すなわち、Akt は直接多核化に作用するのではなく、Cyclin D3 の安定化や活性維持を介して作用する可能性が出てくる。しかしながら、脱落膜細胞にお

いて、Akt による Cyclin D3 の直接的な安定化や活性化が起こるかどうかは、未だ示されていない。その上、子宮着床部位のウェスタンブロットでは、Cyclin D3 と Akt の発現量は必ずしも相関しない (data not shown)。本研究により Dedd は直接 Cyclin D3 と結合することが示されたため、私は Akt とは別経路でこれが脱落膜多核化に作用すると考えている。これらのタンパク質分子は、脱落膜が多核化するのに必要な時、Dedd-Akt 相互作用は細胞質において存在し、Dedd-Cyclin D3-Cdk 複合体は核内移行して、各々機能すると考えている。Akt が一般的に細胞質に発現するタンパク質であるのに対し、Cyclin D3 は一般的に核内移行して機能し、また脱落膜においても核内での発現が確認できる (図 21B)。これらに関する詳細な分子メカニズムは今後のさらなる研究が必要である。

Dedd、Akt、Cyclin D3 それぞれの不妊メカニズムへの寄与

ところで、*Cyclin D3*^{-/-} マウスは、*Dedd*^{-/-} マウスのような完全な不妊とはならない [36、46]。このことは、脱落膜の多核化だけでなく、他にも *Dedd*^{-/-} マウスの不妊の大きな要因があることを示唆している。例えば、子宮着床部位において脱落膜外部の間質が *Dedd*^{-/-} マウスで浮腫化しにくくなっていることや (図 8)、Day 7.5 以降では脱落膜組織が変質して細胞死が *Dedd*^{-/-} 子宮で亢進しているように見えることも (図 15A)、*Dedd*^{-/-} メスマウスの完全不妊の原因とな

っている可能性を表すと考えている。これらの現象は、Akt タンパク質量の減少と関係する可能性がある。なぜならば、一般的に Akt シグナルの下流には、転写因子を介したさまざまな遺伝子発現によって、血管新生や血管透過性の向上、アポトーシス抵抗性の細胞生存が誘導されるからである [47-49]。図 8 で見られた着床後の *Dedd*^{-/-} 子宮における血管透過性の減少は、Akt 発現量の減少によるものである可能性もある。また、ラット子宮におけるエストロゲン投与後の *Vegf* 遺伝子の発現上昇も、PI3K-Akt シグナル依存性であるとする報告もある [50]。図 15A で見られた妊娠中期の脱落膜組織の崩壊は、細胞質の縮小している部分に関して言えば、*Dedd*^{-/-} 子宮でアポトーシスが亢進している可能性もある。ただしこれが Akt の減少による影響なのか、胚が死に始めていることによる二次的な影響なのかは、現時点では明確な結論は出ない。

一方で、Akt-1 から Akt-3 それぞれのアイソフォーム欠損マウスでは、不妊はほとんど起こらないようである。ただし、*Akt-1*^{-/-} マウスのみ、卵巣における卵胞成熟異常が報告されてはいる [51、52] が、前述のように *Dedd*^{-/-} と同じような不妊を呈するわけではない。よって、各々の Akt アイソフォームは子宮の機能においては **redundant** であると考えられる。*Dedd*^{-/-} マウスではすべてのアイソフォームが減少するため [21]、子宮で脱落膜分化不全という大きな影響が出るのであろう。本研究の実験において、Akt-1 を単独で *Dedd*^{-/-} 細胞に強制発

現させた場合でも多核化は改善した。残念なことに、*Akt-1/2/3* トリプル KO マウスや *Akt-1/2* double KO マウスは、胎生致死あるいは新生児期に死亡率が高く、メス不妊かどうかを調べることはできない [53]。コンディショナル KO によって *Akt* の複数のアイソフォームが子宮で欠損しているマウスを作製すれば、着床時の血管透過性向上や脱落膜の多核化における *Akt* の重要性が明らかとなるであろう。今回、*Dedd*^{-/-} マウスを用いて、すべての *Akt* アイソフォーム及び *Cyclin D3* をノックダウンしたのと同様の状態になり、顕著な不妊の表現型となったことはそれ自体、包括的な不妊メカニズムを解明する研究上、非常に有意義だったのである。

ヒト不妊症への応用

DEDD はマウス脱落膜細胞やヒト脱落膜細胞において、分化にともなって発現が上昇する。マウスとヒト間で DEDD は、アミノ酸レベルで 98.7%、cDNA 塩基配列で 94.1% の相同性がある。非常によく保存されていて重要な分子であることは言うまでもないが、そのタンパク質の機能としても、AKT や *Cyclin D3* との相互作用・メカニズムまでも保存されているかどうかは、今後新たに解析する必要がある。

着床不全による女性不妊症の 3 割は、胚側に原因が存在する [54]。残りの 7

割は子宮側の問題で、詳細はよくわかっていないとされている。このような不妊症や、習慣流産の患者も含めて、脱落膜の分化に關与する *DEDD* に注目した診断や原因治療は、検討すべきであるとする。特に、*DEDD* 遺伝子の SNPs 解析をおこなえば、一部の不妊症患者で特異なものが見つかる可能性がある。それが *DEDD* の機能そのものに關与するかもしれないし、脱落膜分化時の *DEDD* 発現上昇 (図 8C) に關与するかもしれない。いずれにしても、*DEDD* のはたらきがなければそれが女性不妊の原因となるであろう。

総括

Dedd は、Akt と Cyclin D3 にそれぞれ直接結合してタンパク質レベルの安定性を維持し、各々の経路で脱落膜細胞の分化・多核化に寄与することが明らかとなった (図 28)。*Dedd*^{-/-} マウスでは Akt と Cyclin D3 のタンパク質発現レベルがともに低下することにより、脱落膜が十分に成熟せず、胚の発生を支持する機能が不十分となって不妊の表現型を呈すると考えられる。

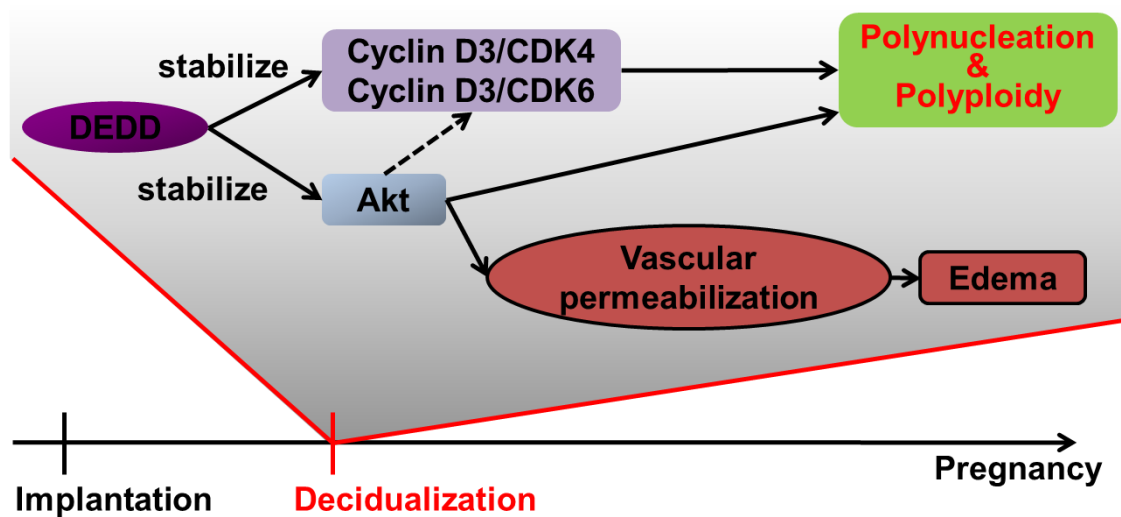


図 28. 初期妊娠維持における Dedd の機能のまとめ

Dedd は着床後、脱落膜細胞に発現して Akt や Cyclin D3、Cdk4、Cdk6 らと結合し、それらのタンパク質安定化作用によって脱落膜分化・多核化を促進する。Akt 経路では、その下流に血管透過性因子の発現があるため、脱落膜周囲組織の浮腫化拡大にもはたらくと考えられる。

結語

本研究によって示されたのは、DEDD が胎盤形成前、初期の妊娠維持に非常に重要な因子であるということである。さらに、Dedd の新たな機能解析から得られた、子宮脱落膜化に原因を有する女性不妊症の病態がありうるという新発見が得られた。今後、特に原因不明とされてきた女性不妊症患者を中心に、子宮における妊娠時の DEDD 発現制御や遺伝子レベルの変異について解析すれば、診断・治療応用のターゲットとしても有用となるであろう。

謝辞

本研究全般についてご指導受け賜りました東京大学大学院医学系研究科・分子病態医科学 宮崎徹教授に深く感謝致します。

また、本研究の遂行にあたり諸々のご指導をいただいた東京大学大学院医学系研究科・分子病態医科学 新井郷子先生、同 中島克彦先生に深く感謝致します。

本研究の実験及び議論に関わっていただいた、東京大学医学部産婦人科・生殖内分泌学 武谷雄二教授、同 藤井知行先生、同・分子細胞生殖医学 大須賀穰先生、同 甲賀かをり先生、同 児玉亜子先生、東京大学大学院医学系研究科・代謝生理化学 栗原裕基教授、同 栗原由紀子先生には多大なご協力と有意義な討論ができましたことに感謝を述べたいと思います。

引用文献

1. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7(3):185-199. (2006)
2. Dey SK, *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 25(3):341-373. (2004)
3. Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction.* 137(6):889-899. (2009)
4. Tan Y, *et al.* HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation. *Dev Biol.* 265(1):181-195. (2004)
5. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature.* 374(6521):460-463. (1995)
6. Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL, Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol.* 13(6):1005-1017. (1999)
7. Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med.* 4(3):303-308. (1998)
8. Bilinski P, Roopenian D, Gossler A. Maternal IL-11R α function is required for

- normal decidua and fetoplacental development in mice. *Genes Dev.* 12(14):2234-43. (1998)
9. Tan J, Raja S, Davis MK, Tawfik O, Dey SK, Das SK. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mech Dev.* 111(1-2):99-113. (2002)
 10. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol.* 4(5):404-9. (2003)
 11. Stegh AH, *et al.* DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.* 17(20):5974-86. (1998)
 12. Schickling O, Stegh AH, Byrd J, Peter ME. Nuclear localization of DEDD leads to caspase-6 activation through its death effector domain and inhibition of RNA polymerase I dependent transcription. *Cell Death Differ.* 8(12):1157-68. (2001)
 13. Alcivar A, Hu S, Tang J, Yang X. DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene.* 22(2):291-7. (2003)
 14. Lee JC, *et al.* DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis. *J Cell Biol.* 158(6):1051-66. (2002)
 15. Arai S, *et al.* Death-effector domain-containing protein DEDD is an inhibitor of

- mitotic Cdk1/cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(7):2289-2294. (2007)
16. Miyazaki T, Arai S. Two distinct controls of mitotic cdk1/cyclin B1 activity requisite for cell growth prior to cell division. *Cell Cycle*. 6(12):1419-1425. (2007)
17. Montagne J. Genetic and molecular mechanisms of cell size control. *Mol Cell Biol Res Commun*. (4):195-202. (2000)
18. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 103(2):253-62. (2000)
19. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 24(1):200-16. (2004)
20. Kurabe N, *et al*. The death effector domain-containing DEDD supports S6K1 activity via preventing Cdk1-dependent inhibitory phosphorylation. *J Biol Chem*. 284(8):5050-5055. (2009)
21. Kurabe N, *et al*. The death effector domain-containing DEDD forms a complex with Akt and Hsp90, and supports their stability. *Biochem Biophys Res Commun*. 391(4):1708-1713. (2010)
22. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*.

- 16(12):1472-87. (2002)
23. Pende M, *et al.* Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*. 408(6815):994-997. (2000)
24. Kodama A, *et al.* Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. *Human Reprod*. 25(3):751-756. (2010)
25. Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the mouse receptive uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(21):10159-10162. (1993)
26. Lim H, *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 91(2):197-208. (1997)
27. Lydon JP, *et al.* Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*. 9(18):2266-78. (1995)
28. Sherwin JR, *et al.* Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol*. 18(9):2185-95. (2004)
29. Hastings JM, Licence DR, Burton G.J, Charnock-Jones DS, Smith SK. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17beta-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology*.

- 144(1):326-34. (2003)
30. Bany BM, Schultz GA. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 expression in the mouse uterus during implantation and artificially induced decidualization. *Mol Reprod Dev.* 59(2):159-167. (2001)
31. Lee KY, *et al.* Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol Cell Biol.* 27(15):5468-5478. (2007)
32. Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y. Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod.* 21(5):1122-8. (2006)
33. Datta NS, Williams JL, Long MW. Differential modulation of G1-S-phase cyclin-dependent kinase 2/cyclin complexes occurs during the acquisition of a polyploid DNA content. *Cell Growth Differ.* 9(8):639-50. (1998)
34. Datta NS, Williams JL, Caldwell J, Curry AM, Ashcraft EK, Long MW. Novel alterations in CDK1/cyclin B1 kinase complex formation occur during the acquisition of a polyploid DNA content. *Mol Biol Cell.* 7(2):209-23. (1996)
35. Das SK. Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10. *Mol Reprod Dev.* 77(5):387-396. (2010)
36. 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(1):91-101. (1999)
37. Yang ZZ, *et al.* Protein kinase B α /Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem.* 278(34):32124-32131. (2003)
38. Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol.* 190(1):7-20. (2002)
39. Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell.* 105(3):297-306. (2001)
40. Ma X, *et al.* Decidual cell polyploidization necessitates mitochondrial activity. *PLoS One.* 6(10):e26774. (2011)
41. Yoshino O, *et al.* Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 9(5):265-9. (2003)
42. Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology.* 142(9):4086-94. (2001)
43. 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(3):803-815. (2010)

44. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12(22):3499-3511. (1998)
45. García-Morales P, Hernando E, Carrasco-García E, Menéndez-Gutierrez MP, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Cyclin D3 is down-regulated by rapamycin in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5(9):2172-2181. (2006)
46. Sicinska E, *et al.* Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell.* 4(6):451-461. (2003)
47. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 88(4):435-437. (1997)
48. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 376(6541):599-602. (1995)
49. Franke TF. Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci Signal.* 1(24):pe29. (2008)
50. Kazi AA, Koos RD. Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology.* 148(5):2363-74. (2007)

51. Brown C, *et al.* Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKBalpha/Akt. *Biol Reprod.* 82(2):246-256. (2010)
52. Easton RM, *et al.* Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol.* 25(5):1869-1878. (2005)
53. Peng XD, *et al.* Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17(11):1352-1365. (2003)
54. Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol.* 39(1-2):117-131. (1998)