研究フロンティア　（平成24年度学術奨励賞受賞論文）

ヒト子宮内膜間質細胞における脱落膜化関連遺伝子発現のエピジェネティクス調節

田村　　功，杉野　法広

山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学

はじめに

子宮内膜間質細胞（ESC）は，卵巣からのプロゲステロンの影響により脱落膜化間質細胞に分化し，さまざまな遺伝子発現変化を起こし着床に寄与していると考えられている［1，2］．特に，Insulin-like growth factor-binding protein-1（IGFBP-1）とProlactin（PRL）は，脱落膜化により発現が誘導されることが知られており，脱落膜化マーカー遺伝子として認識されている［1］．in vitroの実験系においても，これらの遺伝子発現はcAMPやプロゲステロンなどの脱落膜化刺激により発現が誘導されるが，その遺伝子発現メカニズムについては，未だ十分に解明されていない．これまでIGFBP-1とPRLの遺伝子発現メカニズムに関しては主に転写因子による調節機構やそのシグナル伝達経路が報告されてきた［3-5］．しかし，遺伝子発現は，単に転写因子のみで調節されているのではなく，その受け手側であるDNAプロモーター側の状態によっても調節されている．すなわちヒストン修飾に代表されるエピジェネティクス調節機構がクロマチン構造を変化させ，転写因子のDNA結合を規定している［6］．代表的なヒストン修飾として，ヒストンH3，H4タンパクのアセチル化がある．ヒストンのアセチル化が起こるとクロマチン構造が弛緩するため，転写因子が容易にDNAに接近できる状態になり遺伝子発現が誘導される．一方，ヒストンの脱アセチル化によりクロマチン構造が凝集すれば転写因子の結合が阻害され遺伝子発現が抑制される（図1）．脱落膜化における遺伝子発現調節機構に関しても，転写因子だけでなくDNA側であるpromoter領域の状態も考慮しなければならない［7］．そこで，本研究では，脱落膜化関連遺伝子の発現における転写因子による調節機構の解明に加え，エピジェネティクス調節機構の関与について検討した．

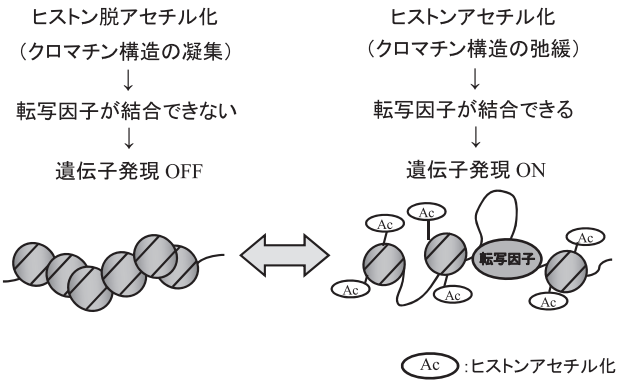

図1　ヒストン修飾によるクロマチン構造の変化
ヒストンアセチル化が起こるとクロマチン構造が弛緩し転写因子が結合できる状態となり，遺伝子発現が誘導される．ヒストン脱アセチル化が起こるとクロマチン構造が凝集し転写因子が結合できない状態となり，遺伝子発現が抑制される．

IGFBP-1，RPL発現における転写因子C/EBPβの関与

今回の実験は山口大学医学部付属病院の倫理審査委員会の承諾を得ている．インフォームドコンセントの下，月経周期が増殖期後期にあたる症例で子宮筋腫または早期子宮頸癌のために子宮全摘術を行った症例から子宮内膜を採取し，ESCの分離培養を行った．脱落膜化刺激としてcAMP（0.5mM）を用いて4日間培養した．脱落膜化はIGFBP-1とPRLのmRNA発現誘導で確認した（図2A）．まずわれわれは，転写因子のうちCCAAT/enhancer-binding protein β（C/EBPβ）に着目した．C/EBPβは分泌期後期の子宮内膜で発現が上昇し［8］，培養したESCでも脱落膜化刺激により発現が上昇する（図2B）．このことから，脱落膜化関連遺伝子の発現調節に関与している可能性があると考えられた．そこで，脱落膜化マーカーであるIGFBP-1，PRL発現へのC/EBPβの関与について検討した．まず，siRNAを用いたC/EBPβのノックダウンによるIGFBP-1，PRL発現への影響を検討した．siRNAのトランスフェクションによ

連絡先：田村　功，山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学
〒755-8505　山口県宇部市南小串1-1-1
TEL：0836-22-2288
FAX：0836-22-2287
E-mail：isao@yamaguchi-u.ac.jp

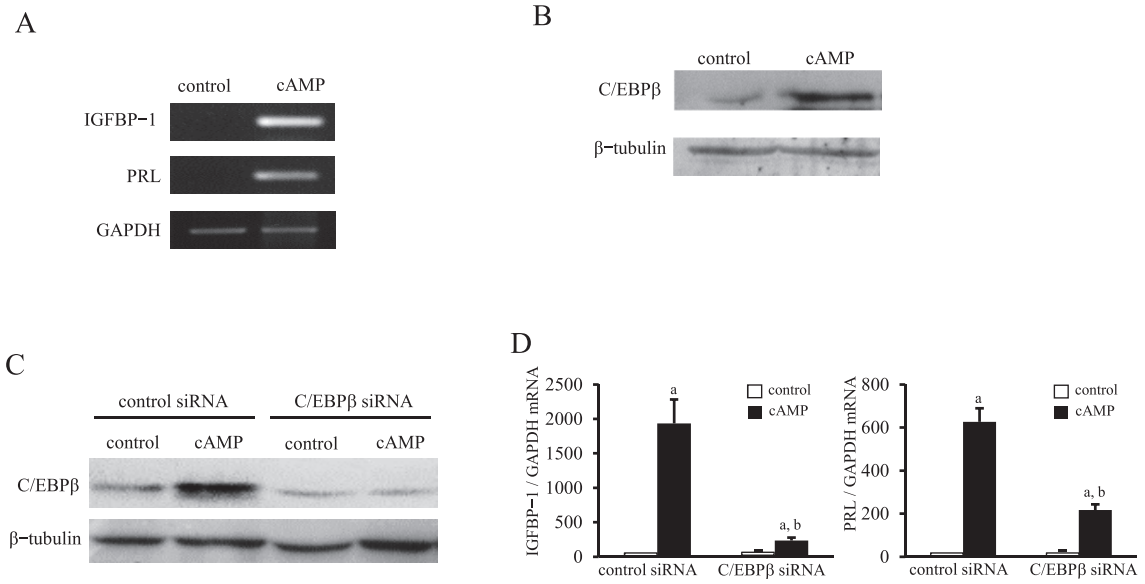

図２　脱落膜化における IGFBP-1，PRL 発現調節への C/EBPβ の関与
A. ESC の脱落膜化による IGFBP-1，PRL mRNA 発現誘導.
B. ESC の脱落膜化による C/EBPβ タンパク発現の増加.
C. siRNA による C/EBPβ タンパクのノックダウン.
D. C/EBPβ のノックダウンによる IGFBP-1，PRL 発現への影響.
a, $P<0.01$ *vs*. control treatment ; b, $P<0.01$ *vs*. cAMP treatment in the control siRNA
脱落膜化による IGFBP-1，PRL 発現誘導には，転写因子 C/EBPβ の promoter 領域への結合が関与している.

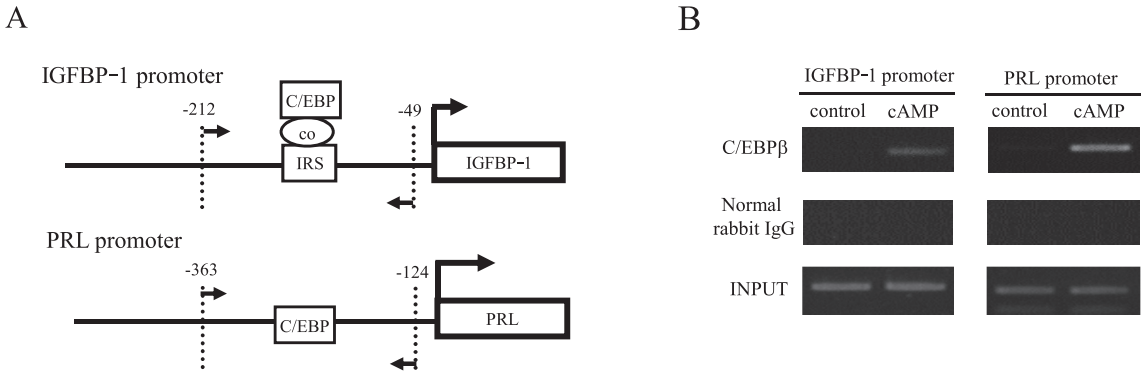

図３　脱落膜化における IGFBP-1，PRL promoter 領域への C/EBPβ の結合
A. IGFBP-1，PRL promoter 領域のシェーマ．ChIP assay ではそれぞれの C/EBPβ 結合領域を挟むように primer を設計した.
B. ESC の脱落膜化による IGFBP-1，PRL promoter 領域への C/EBPβ の結合.
脱落膜化刺激により IGFBP-1，PRL promoter 領域への C/EBPβ 結合が誘導された.

り C/EBPβタンパク発現がノックダウンされたことを確認し（図２C），この細胞を用い脱落膜化を誘導したところ，cAMP による IGFBP-1，PRL 発現増加は有意に抑制された（図２D）．次に，cAMP 刺激により C/EBPβ が実際に IGFBP-1，PRL promoter 領域に結合するかを ChIP assay で検討した．PRL promoter 領域には C/EBPβの response element が存在することが知られているので，そこを挟むように ChIP primer を設計した［９］．一方，IGFBP-1については，promoter に存在する insulin response sequence（IRS）に，何らかの cofactor を介して C/EBPβが結合することが他の細胞種で報告されている［10］．よって，この領域を挟むように ChIP primer を設計した（図３A）．両方の promoter 領域において，脱落膜化前では C/EBPβの結合は認めず，cAMP 刺激により C/EBPβの結合が誘導されることが分かった（図３B）．以上より，脱落膜化による IGFBP-1，PRL 発現誘導には転写因子 C/EBPβの promoter 領域への結合が関与していることが分かった．

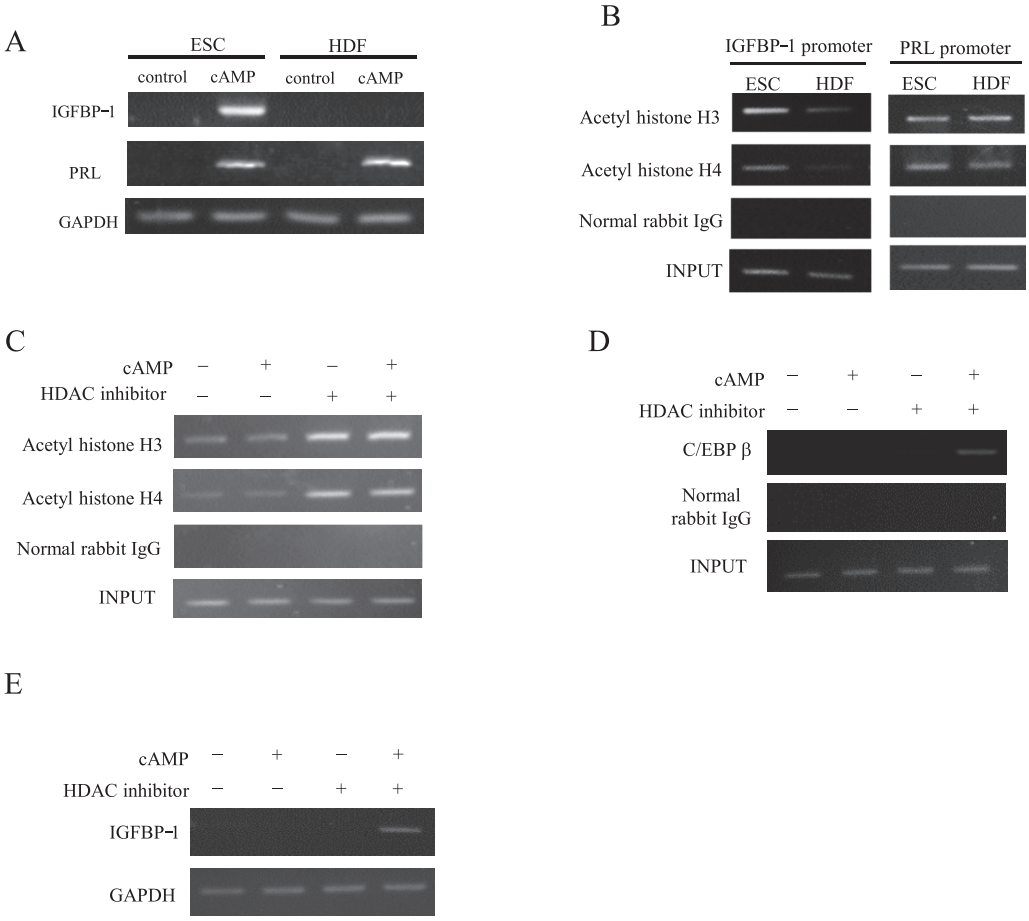

図 4　IGFBP−1，PRL promoter 領域のヒストンアセチル化状態と C/EBPβ 結合との関係
A. ESC と皮膚線維芽細胞（HDF）における，cAMP 刺激による IGFBP−1，PRL 発現誘導の違い.
B. ESC と HDF における IGFBP−1，PRL promoter 領域のヒストンアセチル化状態の違い.
C. HDF におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDAC　inhibitor）による IGFBP−1　promoter 領域のヒストンアセチル化誘導.
D. HDF における HDAC inhibitor と cAMP による IGFBP−1 promoter 領域への C/EBPβ 結合誘導.
E. HDF における HDAC inhibitor と cAMP による IGFBP−1発現誘導.
HDF においては，IGFBP−1 promoter 領域は低アセチル化となっているため，C/EBPβ が結合できない状態となっており，cAMP 刺激を加えても IGFBP−1発現が誘導されない．強制的にヒストンアセチル化を増加させることで，IGFBP−1 promoter 領域への C/EBPβ 結合と IGFBP−1発現が誘導された.

IGFBP−1，PRL　promoter 領域のヒストンアセチル化状態と C/EBPβ 結合の関係

エピジェネティクスの考え方を用いると，C/EBPβが promoter に結合するためには，脱落膜化刺激で C/EBPβ が活性化するだけでなく，その受け手となる DNA 側のクロマチン構造にもリクルートを許すような機序が存在しなければならない．これを検討するために，ESC とヒト皮膚線維芽細胞（human dermal fibroblast：HDF）との間において IGFBP−1，PRL promoter 領域のヒストンアセチル化状態の比較を行った．HDF は，ESC と異なり cAMP により PRL のみが誘導され，IGFBP−1発現が誘導されないという特徴をもった細胞である（図 4 A）．つまり，ESC のように，cAMP 刺激に反応して遺伝子発現が誘導されるような細胞の promoter 領域では，ヒストンアセチル化により転写因子のアクセスを許すようなクロマチン構造をとっている一方，HDF のように cAMP 刺激を加えても全く遺伝子発現が誘導されないような細胞の promoter 領域では，ヒストンアセチル化状態が低く，たとえ活性化した C/EBPβが近づいても promoter に結合できないという仮説を考えた．そこで，cAMP 刺激前の両細胞間のヒストン修飾状態の差を検討することでこの仮説を証明することを試みた．cAMP 刺激前の ESC と HDF とで，アセチルヒストン H3と H4 抗体を用いて検討したところ，両方の細胞が発現することができる PRL の promoter 領域では ESC と HDF ともにアセチル化された状態で，両者に差を認めなかった．一方，ESC のみが発現でき HDF では発現できない

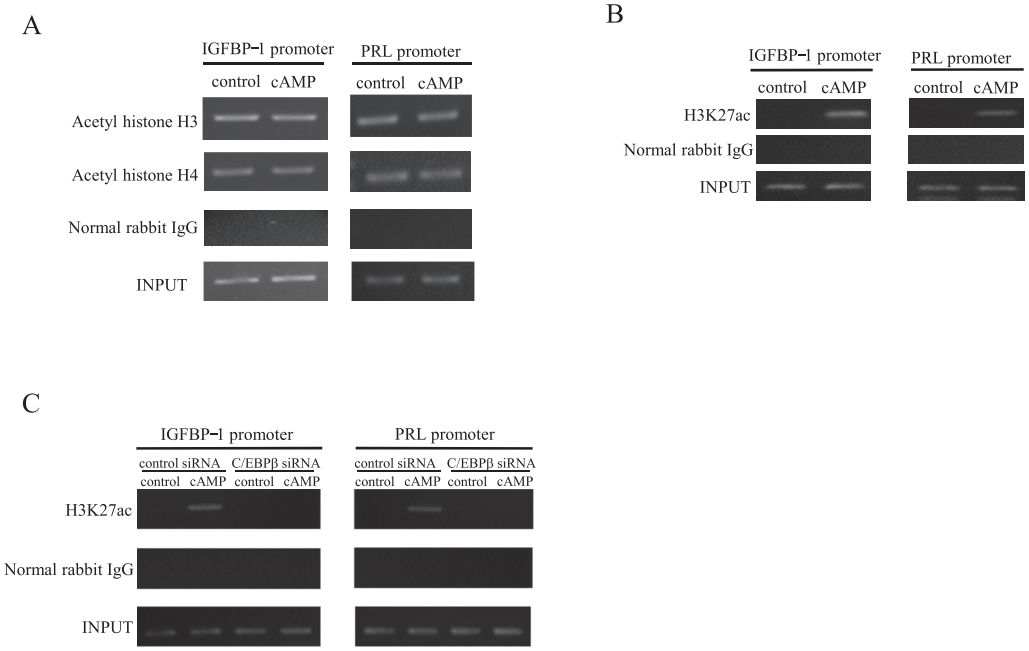

図５　脱落膜化による IGFBP-1，PRL promoter 領域のヒストンアセチル化状態の変化
A. ESC の脱落膜化による IGFBP-1，PRL promoter 領域の H3，H4アセチル化状態への影響.
B. ESC の脱落膜化による IGFBP-1，PRL promoter 領域の H3K27ac の変化.
C. C/EBPβタンパクのノックダウンによる IGFBP-1，PRL promoter 領域の H3K27ac の変化.
ESC の脱落膜化により，IGFBP-1，PRL promoter 領域において，ヒストン H3の27番目のリジン残基のアセチル化（H3K27ac）が誘導された．この誘導は C/EBPβタンパクのノックダウンにより消失した.

IGFBP-1の promoter 領域は，ESC では高アセチル化状態であったが HDF では低アセチル化状態であることが分かった（図４B）．さらに，HDF において，ヒストンアセチル化を誘導する薬剤であるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDAC inhibitor）を用いて，IGFBP-1 promoter 領域のヒストンアセチル化を誘導した（図４C）．その状態で cAMP 刺激を加えると IGFBP-1 promoter 領域に C/EBPβの結合が誘導され（図４D），また同時に IGFBP-1発現も誘導された（図４E）．これらの結果は，cAMP 刺激による IGFBP-1発現誘導には，promoter 領域のヒストンアセチル化により転写因子が結合できる環境がつくられていることが必須であることを示しており，われわれの仮説を証明することができた．以上より，IGFBP-1，PRL promoter 領域のヒストンアセチル化は，脱落膜化刺激により誘導された転写因子が結合できるようなクロマチン構造の形成に関わっていると考えられ，脱落膜化による遺伝子発現誘導に関与している制御機構であることが分かった［11］.

脱落膜化による IGFBP-1，PRL promoter 領域のヒストンアセチル化状態の変化

これまでの検討では，IGFBP-1，PRL promoter 領域に脱落膜化前からヒストンアセチル化が起こっていることが，脱落膜化刺激で活性化された C/EBPβを promoter 内に受け入れるために重要であることを解明した．次にわれわれは，脱落膜化に伴いさらにヒストンアセチル化が増強する機構が存在しないかを検討した．ESC を cAMP で刺激し脱落膜化前後でヒストン H3，H4アセチル化状態を比較した．しかし，IGFBP-1，PRL promoter 領域ともに，ヒストン H3，H4アセチル化状態は脱落膜により上昇しなかった（図５A）．つまり，これらのヒストンアセチル化は，C/EBPβを受け入れるためのクロマチン構造の形成に寄与しているものの，転写の増減とは関連していないと考えられた．近年，ヒストンアセチル化のうちヒストン H3の27番目のリジン残基のアセチル化（H3K27ac）は，RNA polymerase のリクルートに必要な修飾であり，より転写活性化に必要不可欠な修飾として注目されている［12，13］．これまでの検討で用いたアセチルヒストン抗体は，特定のリジン残基（H3-K9，-K14，H4-K5，-K8，-K12，-K16）を認識するものの，H3K27ac を認識しない抗体であった．よって，H3K27ac のみを特異的に認識する抗体を用いて，IGFBP-1，PRL promoter 領域の H3K27ac 状態の変化を脱落膜化前後で検討した．脱落膜化前では両 promoter 領域ともに H3K27ac 修飾が欠如していたが，脱落膜化により

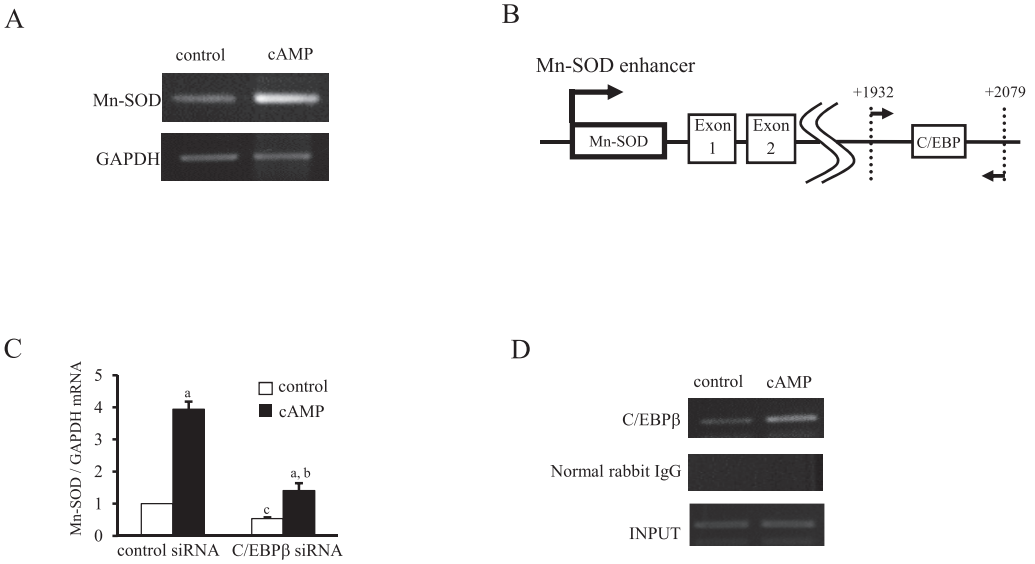

図6　ESCにおけるMn-SOD発現調節へのC/EBPβの関与
A. ESCの脱落膜化によるMn-SOD mRNA発現増加.
B. Mn-SOD enhancer領域のシェーマ．ChIP assayでは，第2イントロンのenhancer領域に存在するC/EBPβ結合領域を挟むようにprimerを設計した.
C. C/EBPβのノックダウンによるMn-SOD発現への影響.
a, $P<0.01$ *vs*. control treatment; b, $P<0.01$ *vs*. cAMP treatment in the control siRNA;
c, $P<0.05$ *vs*. control treatment in the control siRNA
D. ESCの脱落膜化によるMn-SOD enhancer領域へのC/EBPβ結合の増加.
Mn-SOD　enhancer領域には脱落膜化前からC/EBPβ結合が起こっており，恒常的なMn-SOD発現に関与している．脱落膜化刺激によりさらにC/EBPβ結合が増加し，それに伴い発現も増加する.

H3K27acが誘導されることが分かった（図5B）．さらに，このH3K27ac誘導のメカニズムを検討した．われわれが着目しているC/EBPβは，ヒストンのアセチル化を誘導する酵素であるhistone　acetyl　transferase（HAT）活性を持つ様々な転写因子とinteractionすることが知られている［14-16］．つまり，脱落膜化によるIGFBP-1，PRL　promoter領域のH3K27ac誘導は，C/EBPβのpromoterへの結合が契機となり，HATがrecruitされることで開始されるのではないかと考えた．そこで，C/EBPβのpromoterへの結合とH3K27ac誘導との関係性を検討するために，C/EBPβをノックダウンさせた状態でcAMP刺激を行い，H3K27ac誘導の有無を検討した．cAMPによるIGFBP-1，PRL promoter領域のH3K27ac誘導は，C/EBPβをノックダウンすることで完全に消失した（図5C）．以上より，脱落膜化刺激により活性化されたC/EBPβがIGFBP-1，PRL　promoter領域に結合し，それによりH3K27acが誘導されることが分かった．このようにIGFBP-1，PRL遺伝子発現に関して，C/EBPβはpromoter領域のヒストン修飾を変化させ転写を開始させるpioneer　factorとして働き，転写誘導に重要な役割を果たしていると考えられた［17］．

脱落膜化におけるMn-SOD発現の新たな調節機構とエピジェネティクスの関与

次にわれわれは，IGFBP-1やPRLといった脱落膜化後に初めて発現が誘導される遺伝子ではなく，脱落膜化前のESCにおいて恒常的に発現を認め，かつ脱落膜化によって発現が上昇する遺伝子であるmanganese　superoxide　dismutase（Mn-SOD）に着目した（図6A）．脱落膜化過程においては，細胞の機能や代謝亢進に伴い活性酸素が発生する．活性酸素は細胞膜の酸化障害やDNA障害を引き起こし，細胞死を引き起こす．しかし，ESCの脱落膜化では，同時に活性酸素を消去する酵素であるこのMn-SODの発現が増加することで，ミトコンドリア内での活性酸素が消去され，細胞の生命が維持されることをわれわれは報告している［18-26］．この脱落膜化に伴うMn-SOD発現の増加は重要な生命維持機構であるが，詳細な調節機序はこれまでほとんど解明されていなかった．しかし，われわれの報告により，プロゲステロンがWnt5aを介して細胞内cAMP濃度を上昇させ，転写因子CBPやCREBを活性化させ，Mn-SOD遺伝子のpromoter領域に存在するcyclic　AMP　response　element（CRE）を介して発現が上昇するという

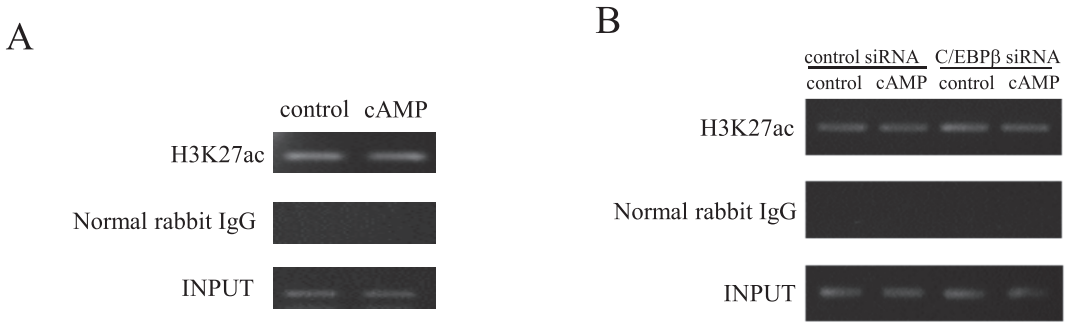

図７　脱落膜化による Mn-SOD enhancer 領域のヒストンアセチル化状態の変化
A. ESC の脱落膜化による Mn-SOD enhancer 領域の H3K27ac の変化.
B. C/EBPβ タンパクのノックダウンによる Mn-SOD enhancer 領域の H3K27ac の変化.
Mn-SOD enhancer 領域においては，脱落膜化前から H3K27ac 修飾を認め，脱落膜化によって変化しなかった．また，C/EBPβ タンパクのノックダウンもこれらに影響を与えなかった.

経路が明らかとなった［27］．また，Mn-SOD 遺伝子にはこの promoter 領域に加え，第２イントロンに存在する enhancer 領域に C/EBPβの response element が存在する（図６B）．よって，C/EBPβは，IGFBP-1や PRL だけでなく，この enhancer 領域を介して Mn-SOD 発現調節に関与している可能性が考えられた．そこで，脱落膜化における Mn-SOD 発現調節への C/EBPβの関与を検討した．まず，C/EBPβのノックダウンによる Mn-SOD 発現への影響を検討した．C/EBPβのノックダウンにより，cAMP による Mn-SOD 発現増加は有意に抑制された．また，cAMP 刺激を加えない脱落膜化前の Mn-SOD 発現も減弱した（図６C）．次に，Mn-SOD enhancer 領域への C/EBPβ結合を ChIP assay で検討したところ，C/EBPβは脱落膜化前から enhancer 領域に結合しており，脱落膜化によりさらに結合量が上昇した（図６D）．以上より，C/EBPβはこの enhancer 領域を介して，脱落膜化前の恒常的な Mn-SOD 発現と，脱落膜化による発現上昇に関与していることが分かった［17］.

さらにわれわれは，Mn-SOD enhancer 領域における H3K27ac の状態について検討した．Mn-SOD enhancer 領域では，脱落膜化前から H3K27ac 修飾を認めた．このことは Mn-SOD は脱落膜化前から恒常的に転写が起こっているという遺伝子発現の結果と一致する．しかし，H3K27ac 修飾は脱落膜化後に上昇しなかった（図７A）．さらに，C/EBPβのノックダウンを行い Mn-SOD enhancer 領域の H3K27ac 修飾状態を検討したが，H3K27ac 修飾はノックダウンの影響を受けなかった（図７B）．以上より，IGFBP-1，PRL promoter 領域とは異なり，Mn-SOD enhancer 領域においては，H3K27ac 修飾の形成には C/EBPβは関与していないことがわかった．おそらく，別の転写因子により H3K27ac 修飾が脱落膜化前から誘導されていると考えられる．そして，脱落膜化後も Mn-SOD enhancer 領域の H3K27ac 修飾は高いレベルで維持され，C/EBPβの結合量依存性に遺伝子発現が増加すると考えらえた［17］.

おわりに

ESC において，IGFBP-1，PRL の promoter 領域はヒストンアセチル化修飾により，脱落膜化刺激により活性化された転写因子 C/EBPβが結合できるようなクロマチン構造の形成に寄与していると考えられた．ここに，脱落膜化により誘導された C/EBPβが結合することで，H3K27ac が誘導され，転写が活性化される．一方，Mn-SOD は同じように C/EBPβにより発現が調節される遺伝子であるが，IGFBP-1や PRL と異なり H3K27ac 修飾の形成に C/EBPβは関与していないことが分かった．このように，同じ転写因子により調節を受けているにもかかわらず，ヒストン修飾調節機構が遺伝子によって異なることは非常に興味深い．ESC の脱落膜化における遺伝子発現は，promoter や enhancer 領域のヒストン修飾調節により巧妙に制御されていることが分かった.

謝　辞

本稿は平成24年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容を中心にまとめたものである．本稿を執筆する機会を与えてくださいました，日本生殖内分泌学会理事長 苛原　稔教授，第17回学術集会会長 吉村泰典教授に感謝申し上げます.

引用文献

1. Gellersen B, Brosens J (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. J Endocrinol 178, 357-372.
2. Popovici RM, Kao LC, Giudice LC (2000) Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. Endocrinology 141, 3510-3513.
3. Kim JJ, Buzzio OL, Li S, Lu Z (2005) Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. Biol Reprod 73, 833-839.
4. Al-Sabbagh M, Fusi L, Higham J, Lee Y, Lei K, Hanyaloglu AC, Lam EW, Christian M, Brosens JJ (2011) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediate decidualization of human endometrial stromal cells in response to cyclic AMP signaling. Endocrinology 152, 730-740.
5. Wang DF, Minoura H, Sugiyama T, Tanaka K, Kawato H, Toyoda N, Sagawa N (2007) Analysis on the promoter region of human decidual prolactin gene in the progesterone-induced decidualization and cAMP-induced decidualization of human endometrial stromal cells. Mol Cell Biochem 300, 239-247.
6. Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. Cell 128, 707-719.
7. Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Tamura H, Sugino N (2011) Differential Effects of Progesterone on COX-2 and Mn-SOD Expressions Are Associated with Histone Acetylation Status of the Promoter Region in Human Endometrial Stromal Cells. J Clin Endocrinol Metab 96, E1073-1082.
8. Plante BJ, Kannan A, Bagchi MK, Yuan L, Young SL (2009) Cyclic regulation of transcription factor C/EBP beta in human endometrium. Reprod Biol Endocrinol 7, 15.
9. Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, Unterman TG, Gellersen B, White JO, Brosens JJ (2002) Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. J Biol Chem 277, 20825-20832.
10. Ghosh AK, Lacson R, Liu P, Cichy SB, Danilkovich A, Guo S, Unterman TG (2001) A nucleoprotein complex containing CCAAT/enhancer-binding protein beta interacts with an insulin response sequence in the insulin-like growth factor-binding protein-1 gene and contributes to insulin-regulated gene expression. J Biol Chem 276, 8507-8515.
11. Tamura I, Asada H, Maekawa R, Tanabe M, Lee L, Taketani T, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N (2012) Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. Endocrinology 153, 5612-5621.
12. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. Nat Genet 40, 897-903.
13. Chen Y, Jorgensen M, Kolde R, Zhao X, Parker B, Valen E, Wen J, Sandelin A (2011) Prediction of RNA Polymerase II recruitment, elongation and stalling from histone modification data. BMC Genomics 12, 544.
14. Mink S, Haenig B, Klempnauer KH (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. Mol Cell Biol 17, 6609-6617.
15. Tie F, Banerjee R, Conrad PA, Scacheri PC, Harte PJ (2012) Histone demethylase UTX and chromatin remodeler BRM bind directly to CBP and modulate acetylation of histone H3 lysine 27. Mol Cell Biol 32, 2323-2334.
16. Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC, Harte PJ (2009) CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. Development 136, 3131-3141.
17. Tamura I, Sato S, Okada M, Tanabe M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N (2014) Importance of C/EBPbeta Binding and Histone Acetylation Status in the Promoter Regions for Induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in Human Endometrial Stromal Cells. Endocrinology 155, 275-286.
18. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Nakamura Y, Kato H (2000) Induction of superoxide dismutase by decidualization in human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod 6, 178-184.
19. Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H (2002) Nuclear factor-kappa B is required for tumor necrosis factor-alpha-induced manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab 87, 3845-3850.
20. Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, Nakamura Y, Ogino K, Uda T, Kato H (1996) Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. Hum Reprod 11, 1073-1078.
21. Sugino N, Nakata M, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H (2000) Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin F (2 alpha) in the decidua of failed pregnancy. Mol Hum Reprod 6, 642-647.
22. Karube-Harada A, Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H (2001) Induction of manganese superoxide dismutase by tumour necrosis factor-alpha in human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod 7, 1065-1072.
23. Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H (2002) Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod 8, 68-74.
24. Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H (2002) Different mechanisms for the induction of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone in human endometrial stromal cells. Hum Reprod 17, 1709-1714.
25. Sugino N, Karube-Harada A, Taketani T, Sakata A, Nakamura Y (2004) Withdrawal of ovarian steroids stimulates

prostaglandin F2alpha production through nuclear factor-kappaB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. J Reprod Dev 50, 215-225.
26. Sugino N (2007) The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. Placenta 28 Suppl A, S133-136.
27. Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N (2010) Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by non-canonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab 95, E291-299.