

総説

新規分泌型Ly-6 ドメインタンパク質1の牛妊娠子宮・胎盤における発現と機能に関する研究

マハムド モハメド アブデルハミド アハメド アワド

要約

牛の着床、妊娠維持の過程は多様な分子が関与し、それらが複合的に関わる複雑な機序をとることから、未解明の課題が山積する研究領域である。最近、新規に同定されたLy-6スーパーファミリー分子であるSOLD1の着床、胎盤機能維持における役割について検証した。定量的遺伝子発現解析並びにin situ hybridizationにより、SOLD1の着床期および妊娠各期における発現動態を検索した。SOLD1は着床界面の2種類の栄養膜細胞のいずれにも顕著に発現した。その後、発現強度は低下するものの妊娠各期を通し、栄養膜細胞に発現すること、絨毛叢間充織や子宮腺周囲の間質への蓄積を認めた。また、培養細胞系を用いた細胞機能の検証から、SOLD1は細胞の浸潤能並びに走化能を促進することが明らかとなった。これらの結果は、SOLD1は着床界面の栄養膜細胞並びに胎盤節に特異的に発現し、着床の開始や胎盤節形成に伴う組織改編、再構築に関わると共に、着床や胎盤構築時の細胞移動の誘因となることを示唆している。

キーワード：SOLD1, Ly-6スーパーファミリー, 着床, 栄養膜細胞, 子宮内膜

Ly-6 ドメインタンパク質1 (Secreted Protein of Ly-6 Domain 1, SOLD1) とは、牛の着床時期における子宮・胎盤組織の遺伝子発現の網羅的解析から [1], Ushizawaら [2] により同定、命名されたウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体 (Ly6/urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR) タンパク質・スーパーファミリーの一種である。Ly-6/uPARスーパーファミリーは、GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) メインにより細胞膜にアンカーされる膜型と細胞間質に存在する分泌型の2種に大別出来る。膜型にはCD59 (complement regulatory protein), PLAUR (plasminogen activator, urokinase receptor), LY6D (lymphocyte antigen 6 complex, and locus D) などが含まれ、分泌型にはSLURP1 (secreted LY6/PLAUR domain containing 1), LYNX1およびSLURP2 (Ly6/neurotoxin 1), ACRV1およびSP10 (acrosomal vesicle protein 1), PATE (prostate and testis expression secreted TFP/Ly-6/uPAR protein), Sslp-1 (secreted seminal vesicle Ly6 protein) など多様な分子が知られている [3-9]。それらの機能は未

だ不明の点が多く有るが、CD59は免疫機能、PLAURは細胞外マトリックス分解機能、SLURP1はアポトーシス、また、雄生殖腺で検出される分泌型の物質は精子形成と深く関連しているなど、多様な細胞機能に関わることが知られている [1, 9-11]。SLURP1やLYNX1は生体内でnAChR (nicotinic cholinergic receptor) を介して細胞機能を調節することが明らかである [12-14]。しかし、新規分子であるSOLD1は、これらの発現動態と異なり雌生殖腺の子宮・胎盤に発現し、主として栄養膜二核細胞 (binucleate cell, BNC) で産生、分泌され、発育する胎子胎膜に特異的に結合、集積する特徴をもつ分子である [2, 15]。

牛における着床機構には、多様な分子が複雑に関与しており、着床誘導の機序は不明の点が多い。牛胎盤は結合上皮絨毛性胎盤 (synepitheliochorial placenta) であり、着床時期には牛受精卵は大きく伸長し、伸長胚の最外層の栄養膜細胞が子宮上皮細胞と接着、最終的には一部の栄養膜BNCが子宮内膜上皮細胞と融合、子宮内膜上に点在する特異領域である子宮小丘に対応して、胎膜上に胎盤節の形成が始まる。この胎子と母

体の接点での細胞融合や胎盤形成には、胎盤性ラクトジェン、妊娠関連糖タンパク質、ステロイドホルモン、プロスタグランジンなど多様な分子が関与することが明らかである [16, 17]。また、同領域には、受精胚から分泌されるインターフェロン・タウ、抗黄体退行因子、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、トランスフォーミング成長因子 β 、シクロオキシゲナーゼ2などの発現、分泌が知られている。これら各種の物質が着床や胎盤形成に必須であることは疑い無く、その調節の不調が早期胚死滅の一因である [17-20]。それ故、異なる起源の子宮内膜と受精胚由来の細胞系が互いに寄り添い、接着を始め、一体化した器官、組織を形成する機序の解明は、牛における着床機構のみならず妊娠成立・維持の機序を明らかにする糸口である。妊娠期間を通して胎盤での母体側と胎児側の相互作用は、同種移植片 (Allograft) としての免疫学的寛容状態を維持しており、その分子機構は不明の点が多い。すなわち、起源が異なる細胞の接着面における誘因とその調節制御は複雑であり、その機序を分子的に明らかにすることは、動物種を問わず妊娠成立、維持機構の解明に大きく寄与する。

SOLD1は、牛の着床界面に発現、変動する膨大な遺伝子の解析から抽出された分子でその機能は、ほとんど明らかでない。SOLD1の機能解析は、Ly-6 スーパーファミリーで知られている多様な機能から類推して、着床界面と言う複雑な機能調節機構への新しい観点を提供すると考えられる。

本研究では、牛子宮・胎盤に発現する新規分子SOLD1の両組織間での相互作用に焦点を絞り、1. 異なる妊娠時期におけるSOLD1分子の子宮・胎盤での発現動態、2. 細胞培養系を用いたSOLD1の機能解析について紹介する。

1. 異なる妊娠時期におけるSOLD1分子の子宮・胎盤での発現

妊娠期間を、着床直後早期 (妊娠35日)、妊娠初期 (約60-90日)、中期 (約120-180日)、後期 (約220-260日) に大別し、子宮・胎盤でのSOLD1の遺伝子発現を定量的RT-PCR並びにin situ hybridization (ISH) により解析すると、着床直後では胎児胎膜での顕著な発現を認めた。一方、子宮内膜での発現は著しく低値であった (図1および2)。この時期の胎膜での発現は、他の妊娠期間に比べ顕著な発現であり、着床時期における栄養膜細胞由来のSOLD1の役割が特異的であることが窺えた。胎膜側と子宮内膜における発現差の傾向は、どの妊娠時期においても子宮内膜側が低値であったが、どの妊娠期においても、胎膜および子宮

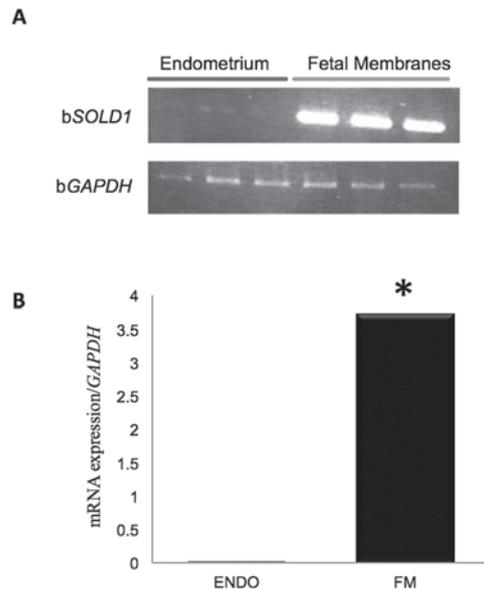


図1 着床時期におけるSOLD1遺伝子発現動態

- A) 妊娠35日の子宮内膜および胎膜におけるRT-PCRにより検出したSOLD1mRNAの発現。基準としてGAPDHを用いた。
 B) 定量的RT-PCRにより測定した妊娠35日の子宮内膜および胎膜におけるSOLD1mRNAの発現。測定値はGAPDHを用いて標準化した。Means \pm SEM. *: $P < 0.05$ で優位差あり。END: 妊娠35日の子宮内膜、FM: 妊娠35日の胎児胎膜。

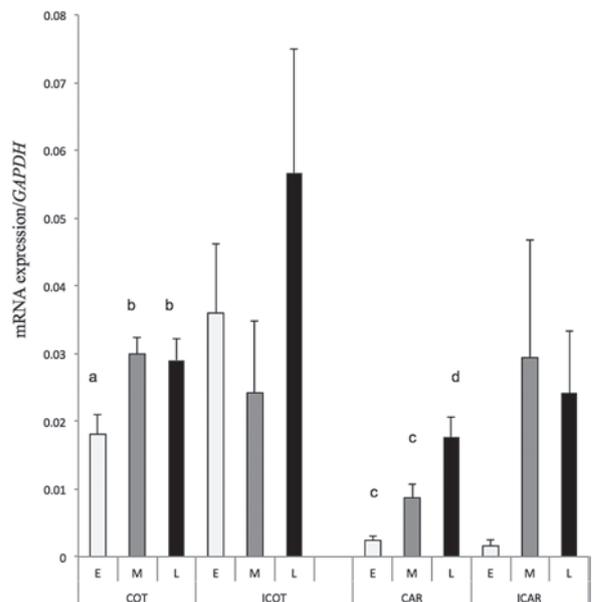


図2 妊娠各期における胎児胎膜並びに子宮内膜組織におけるSOLD1遺伝子の発現動態

子宮内膜および胎膜におけるSOLD1mRNA発現は定量的RT-PCRにより測定した。S発現値はGAPDHを用いて標準化した。COT: 絨毛叢, ICOT: 絨毛叢間, CAR: 子宮小丘, ICAR: 子宮小丘間。E: 妊娠64-75日 (白帯), M: 妊娠120-174日 (灰帯), L: 妊娠245-259日 (黒帯)。Mean \pm SEM. 異なるアルファベット (a-bあるいはc-d) は統計学的有意差 ($P < 0.05$) を表す。

内膜の両側に発現を確認した。胎膜での発現は、絨毛叢形成（すなわち胎盤節形成）の有無にかかわらず、妊娠期間を通して大きな変動を認めなかった。母体側の子宮組織においては、妊娠期の進行に伴うSOLD1発現の高進を認めた（図2）。SOLD1遺伝子の胎盤での発現をISHにより検証すると、同遺伝子は主として単核細胞およびBNCからなる栄養膜細胞に発現すること、母体側組織にはほとんど発現しないことが確認できた。また、子宮小丘間では、子宮内膜上皮細胞および子宮腺周囲の間質細胞に妊娠期を問わず発現を認めた（図3、表1および2）。

SOLD1タンパク質は、主として胎盤節の間充織および胎盤節間での子宮内膜上皮細胞に認めた（図4）。

表1 牛胎盤節におけるSOLD1 mRNAの発現部位

妊娠期間	絨毛叢			子宮小丘	
	TMC	BNC	MCV	CE	CS
初期	*	ND	ND	ND	ND
中期	*	ND	ND	ND	ND
後期	*	*	ND	ND	ND

TMC, 単核栄養膜細胞; BNC, 二核栄養膜細胞; CE, 内膜上皮細胞; CS, 内膜間質細胞; MCV, 胎盤節の間充織; *はmRNAが検出されたことを示す; NDはmRNAが検出限界以下であることを示す。

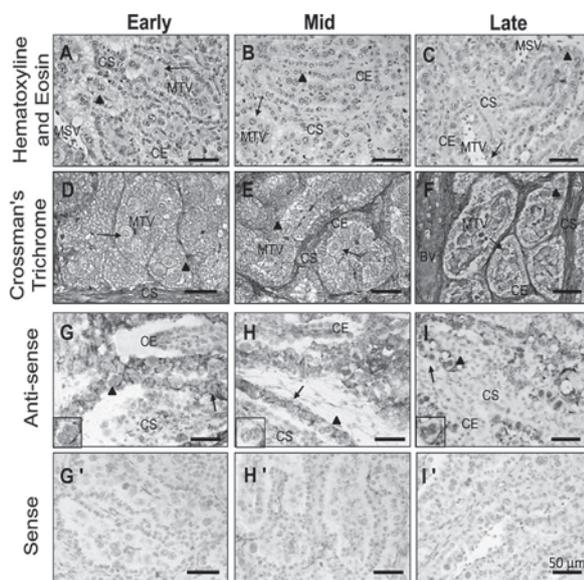


図3 妊娠胎盤節におけるSOLD1遺伝子の発現領域

A-C: H.E染色, D-F: Crossman's Trichrome染色, G-I: SOLD1 アンチセンスプローブ, G'-I': SOLD1 センスプローブ. Early: 妊娠初期, Mid: 妊娠中期, Late: 妊娠後期, これらの試料は図2と同じ. TMC: 栄養膜単核細胞 (矢印), BNC: 栄養膜二核細胞 (矢頭), CE: 小丘上皮, CS: 小丘間質, MSV: 二次絨毛の間充織, MTV: 三次絨毛の間充織, BV: 血管, G-Iにおける挿入拡大図はBNCを示す. 指標バンドは50マイクロメートル.

これら遺伝子およびタンパク質発現の動態は、先に報告されているUshizawaら [2] の結果と概ね一致するものであり、SOLD1分子は栄養膜細胞や一部の子宮内膜上皮および間質細胞で産生され、主として間充織並びに子宮内膜上皮細胞に集積される。それ故、その生理的役割は、胎盤および子宮内膜の細胞外マトリックスの改変並びに着床界面および胎盤節における細胞接着に関わると推測された。

栄養膜細胞は単核およびBNCから構成されているが、BNCがSOLD1産生の主体細胞であることは疑いが無い。この時期におけるBNCのSOLD1タンパク質の分泌、集積動態は特異的であり、栄養膜細胞は、一般的な上皮細胞のように頂上側 (apical) に分泌する

表2 妊娠牛の子宮内膜組織におけるSOLD1 mRNAの発現部位

妊娠期間	上皮細胞		間質細胞	
	内腔	腺	上皮	腺周囲
初期	**	ND	*	**
中期	**	ND	*	**
後期	**	ND	*	**

(*), 弱陽性; (**), 強陽性; ND, 検出限界以下

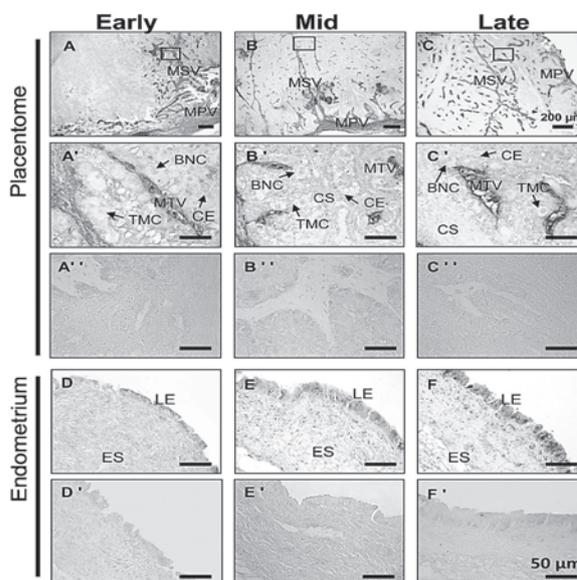


図4 妊娠胎盤節における免疫組織化学的SOLD1タンパク質の検出動態

A-C, A'-C'およびA''-C'': 胎盤節, D-FおよびD'-F': 子宮内膜小丘間組織, A-C, A'-C'およびD-F: 抗SOLD1抗体染色, A''-C''およびD'-F': 正常ウサギ血清. A'-C': A-Cの高倍率像. MPV: 一次絨毛の間充織. 指標バンドはA-Cでは200マイクロメートル, A'-C', A''-C'', D-FおよびD'-F'では50マイクロメートル.

だけでなく、基底側 (basal) にも同分子を分泌、絨毛叢の間充織に集積する。着床時期に焦点を充てると栄養膜細胞は子宮内膜側に進行しBNCが内膜上皮細胞と融合する [2]。これらの証拠や一般的な着床現象の状態から、SOLD1は、胎盤絨毛叢形成の構造的な裏打ち物質としての役割だけでなく、間充織における組織構造の再構築並びに栄養膜細胞の子宮内膜側への進行を誘導する役割を担っていると言える。

SOLD1は、着床期に比較して低値であるものの、妊娠期のいずれの時期の胎盤節においても発現を認め、この分子の胎盤形成・発達と機能維持に関わる作用機作が問われる。すなわち、胎盤節は着床開始時に絨毛叢を形成し、その物理的大きさと機能を分娩直前まで拡大してゆく。そのためには胎盤節内での組織改編および再構築を主導する分子が必要である。これまで明らかにされているMMPやEMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) などの機能に加え、SOLD1の役割の重要性が窺える [18, 21, 22]。SOLD1は間充織などに多量に蓄積されることから、胎盤節や子宮内膜においてカテプシンやTKDP (trophoblast Kunitz domain protein) などのプロテアーゼやMMPにより活性化され組織改編の原動力になることが窺える。Ly-6スーパーファミリー分子は免疫機能調節作用を持つことが知られていることから、SOLD1は母体と胎子側の接着界面での調節機能を有していることが窺える [23-26]。

2. 細胞培養系を用いたSOLD1機能の解析

SOLD1分子の細胞の移動や浸潤を誘導する機能を検証するために、細胞培養系は優れたモデルを提供することは言うまでもない。検証モデルを構築するには、適正な細胞系を選択する必要がある。既に確立されている13系の栄養膜細胞系を検証し [25, 27], SOLD1の発現量を基準として高および低発現量を示す異なる2細胞系 (BT-C, BT-K) を選択した (図5)。両系のSOLD1遺伝子レベルでの発現はタンパク質発現を伴っていることを確認した。それらの細胞系を用い細胞浸潤能 (invasion assay) および細胞走化能 (migration assay) を検証すると、いずれの細胞系も浸潤能並びに走化能を併せ持つことが判明した。2系を比較すると内因性SOLD1を高発現するBT-K細胞は高い浸潤能を持つが走化能はBT-Cと差がなかった (図6および7)。SOLD1分子をBT-K細胞培養系へ添加すると、添加SOLD1により細胞走化能が高進した。また、両細胞系にSOLD1抗体を添加することにより、浸潤能および走化能を検証すると、いずれの細胞でも用量依存的にその両機能が抑制された。これらの結果は、

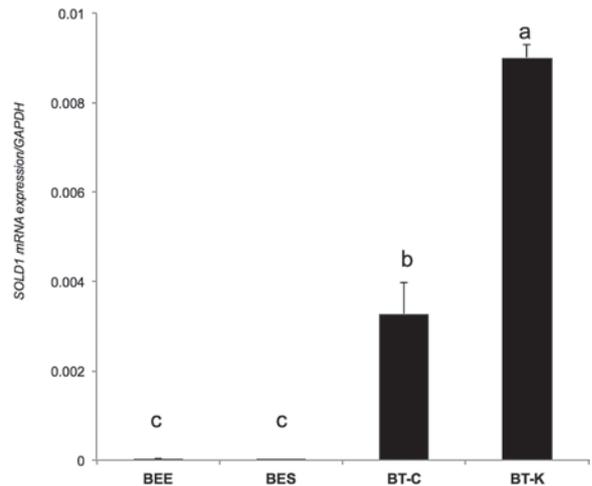


図5 選択した培養細胞系におけるSOLD1mRNAの発現強度

BT-C, BT-K: 選択した栄養膜細胞系, BEE: 牛子宮内膜上皮細胞系, BES: 牛子宮内膜間質細胞系, 発現量は定量的RT-PCRにより測定。GAPDHを基準として発現量を表示。Mean±SE. 異なるアルファベットは統計学的有意差を示す (P<0.05)。

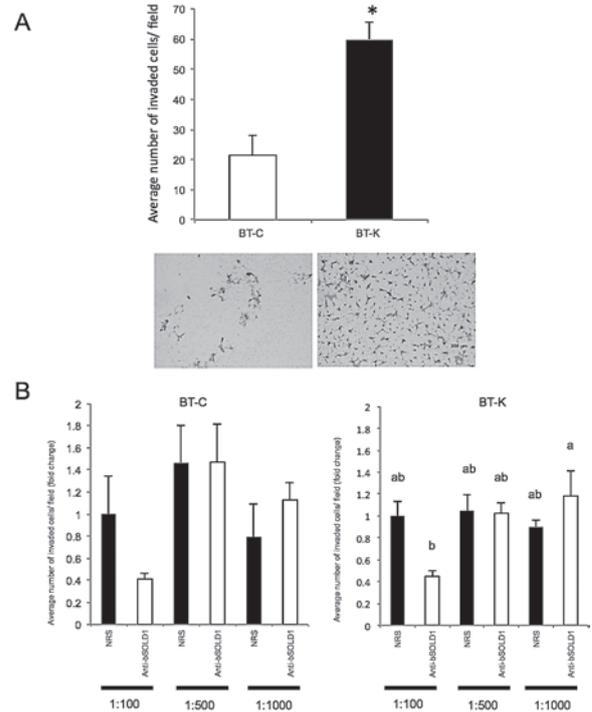


図6 栄養膜細胞系 (BT-C, BT-K) の細胞浸潤能

A) 上段: BT-CおよびBT-K細胞系のMatrigel浸潤能を用いた細胞浸潤能の測定。下段: Matrigelに浸潤した細胞像 (H.E.染色)。サイズ標識: 200マイクロメートル (抜けている)。*: 統計学的有意差 (P<0.05)。

B) 細胞浸潤能に及ぼすSOLD1抗体の影響 (希釈濃度1:100, 1:500, 1:1000)。浸潤能は正常ウサギ血清 (1:100希釈) を基準として倍率強度で示した。Mean±SE, n=3. 異なるアルファベットは統計学的有意差を示す (P<0.05)。

細胞の浸潤性と走化性に対するSOLD1の機作が異なることを示唆している。その機構はほとんど不明であるが、SOLD1が着床介面での栄養膜細胞の子宮内膜

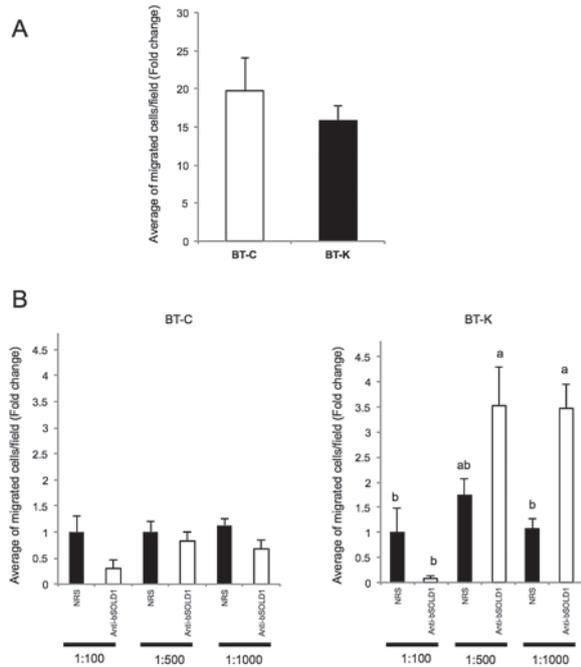


図7 栄養膜細胞系 (BT-C, BT-K) の細胞走化能

A) BT-C, BT-K細胞固有の走化能。
B) 細胞走化能に及ぼすSOLD1抗体の影響 (希釈濃度1:100, 1:500, 1:1000)。浸潤能は正常ウサギ血清 (1:100希釈) を基準として倍率強度で示した。Mean±SE, n=3。異なるアルファベットは統計学的有意差を示す (P< 0.05)。

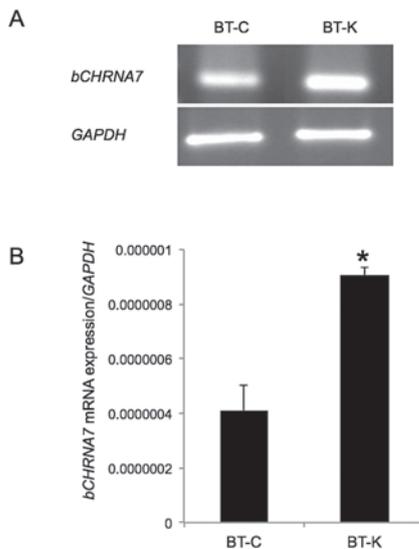


図8 培養栄養膜細胞系のCHRNA7 mRNAの発現動態
A) 牛CHRNA7 mRNAの発現はRT-PCRで検証し、GAPDHを基準にして表した。
B) 定量的RT-PCRによる牛CHRNA7 mRNAの発現。GAPDHを基準にして表した。Mean±SE, n=3。
* : 統計学的有意差を示す (P<0.05)。

側への進行に深く関与することを示している。Ly-6スーパーファミリー分子であるSLURP-1はnAChRを介して細胞の走化能を調節するとの報告が有る [3, 12, 13, 28]。BT細胞系でのnAChR遺伝子であるbCHRNA7 (bovine acetylcholine receptor subunit alpha-7) は両細胞系で発現しており (図8), SOLD1においても本受容体を介した細胞の浸潤や走化能の調節が窺える。

これらの結果は、起源の異なる細胞群すなわち栄養膜細胞並びに子宮内膜細胞が、着床介面並びに胎盤節内において、相互に作用し、妊娠成立・維持過程における生理機能バランスを整え、その調節の首尾あるいは不首尾が妊娠成立の可否をもたらすことが類推される。また、この局面において、両側の細胞それぞれがSOLD1を産生・分泌していることから同分子の胎盤および子宮内膜における機能調節の重要性を示唆している。すなわち、着床介面では栄養膜細胞の産生するSOLD1は、BNC自身の走化、浸潤を促進すると共に、細胞外に分泌、細胞外マトリックスに蓄えた同分子による細胞移動の誘因として作用する。また、妊娠の進行に伴い発達する胎盤節領域では、子宮内膜並びに胎膜組織の組織改編および再構築に他のプロテアーゼなどの酵素系と協同して作用すると推察される (図9)。これらの新知見は、新規Ly-6スーパーファミリー分子、SOLD1を中心とした牛の受胎や子宮内膜機能研究への新展開を提示するものである。

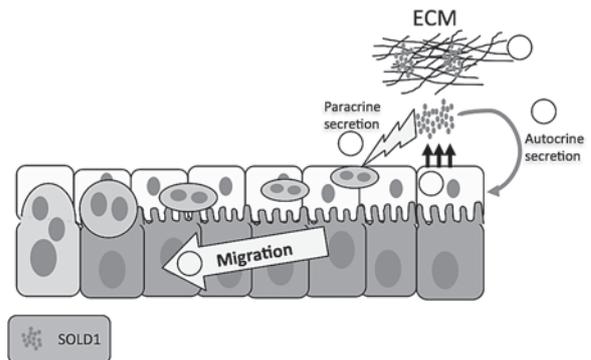


図9 着床介面並びに胎盤形成初期におけるSOLD1の分泌と作用機作の仮説

- ① 単核栄養膜細胞がSOLD1を産生・分泌。
- ② 分泌されたSOLD1が栄養膜細胞や子宮内膜が産生する分子により活性化、オートクラインあるいはパラクラインに因子として細胞に作用する。
- ③ 栄養膜細胞の浸潤および走化や誘導される。その結果、BNCと子宮内膜上皮細胞の融合や子宮内膜組織の改編、再構築が生じる。
- ④ 分泌されたSOLD1は絨毛間充織や子宮内膜の細胞外マトリックスに集積される。蓄積されたSOLD1は胎膜および子宮内膜組織で産生されるサイトカインやプロテアーゼにより分解、活性化される。

(注) 本稿は，作成の都合上，著者本人でなく共同研究者が，本人の学位論文を抽出，要約，作成したものです。

引用文献

- [1] Ushizawa K, Herath CB, Kaneyama K, Shiojima S, Hirasawa A, Takahashi T, Imai K, Ochiai K, Tokunaga T, Tsunoda Y, et al : cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 77 (2004)
- [2] Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K : Characterization and expression analysis of SOLD1, a novel member of the retrotransposon-derived Ly-6 superfamily, in bovine placental villi. *PLoS One*, 4, e5814 (2009)
- [3] Bera TK, Maitra R, Iavarone C, Salvatore G, Kumar V, Vincent JJ, Sathyanarayana BK, Duray P, Lee BK, Pastan I : PATE, a gene expressed in prostate cancer, normal prostate, and testis, identified by a functional genomic approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3058-3063 (2002)
- [4] Kong HK, Park JH : Characterization and function of human Ly-6/uPAR molecules. *BMB Rep*, 45, 595-603 (2012)
- [5] Levitin F, Weiss M, Hahn Y, Stern O, Papke RL, Matusik R, Nandana SR, Ziv R, Pichinuk E, Salame S, et al : PATE gene clusters code for multiple, secreted TFP/Ly-6/uPAR proteins that are expressed in reproductive and neuron-rich tissues and possess neuro-modulatory activity. *J Biol Chem*, 283, 16928-16939 (2008)
- [6] Li SH, Lee RK, Lin MH, Hwu YM, Lu CH, Chen YJ, Chen HC, Chang WH, Chang WC : SSSLP-1, a secreted Ly-6 protein purified from mouse seminal vesicle fluid. *Reproduction*, 132, 493-500 (2006)
- [7] Ploug M, Kjalke M, Ronne E, Weidle U, Hoyer-Hansen G, Dano K : Localization of the disulfide bonds in the NH₂-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type plasminogen activator. A domain structure belonging to a novel superfamily of glycolipid-anchored membrane proteins. *J Biol Chem*, 268, 17539-17546 (1993)
- [8] Soler-Garcia AA, Maitra R, Kumar V, Ise T, Nagata S, Beers R, Bera TK, Pastan I : The PATE gene is expressed in the accessory tissues of the human male genital tract and encodes a secreted sperm-associated protein. *Reproduction*, 129, 515-524 (2005)
- [9] Southan C, Cutler P, Birrell H, Connell J, Fantom KG, Sims M, Shaikh N, Schneider K : The characterisation of novel secreted Ly-6 proteins from rat urine by the combined use of two-dimensional gel electrophoresis, microbore high performance liquid chromatography and expressed sequence tag data. *Proteomics*, 2, 187-196 (2002)
- [10] Brakenhoff RH, Gerretsen M, Knippels EM, van Dijk M, van Essen H, Weghuis DO, Sinke RJ, Snow GB, van Dongen GA : The human E48 antigen, highly homologous to the murine Ly-6 antigen ThB, is a GPI-anchored molecule apparently involved in keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 129, 1677-1689 (1995)
- [11] Casey JR, Petranka JG, Kottra J, Fleenor DE, Rosse WF : The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood*, 84, 1151-1156 (1994)
- [12] Arredondo J, Chernyavsky AI, Webber RJ, Grando SA : Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 125, 1236-1241 (2005)
- [13] Chimienti F, Hogg RC, Plantard L, Lehmann C, Brakch N, Fischer J, Huber M, Bertrand D, Hohl D : Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet*, 12, 3017-3024 (2003)
- [14] Miwa JM, Ibanez-Tallon I, Crabtree GW, Sanchez R, Sali A, Role LW, Heintz N : lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*, 23, 105-114 (1999)
- [15] Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K : Cloning and expression of SOLD1 in ovine and caprine placenta, and their expected roles during the development

- of placentomes. *BMC Dev Biol*, 10, 9 (2010)
- [16] Guillomot M : Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*, 49, 39-51 (1995)
- [17] Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC : Implantation mechanisms : insights from the sheep. *Reproduction*, 128, 657-668 (2004)
- [18] Hashizume K : Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *J Reprod Dev*, 53, 1-11 (2007)
- [19] Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW : Progesterone and placental hormone actions on the uterus : insights from domestic animals. *Biol Reprod*, 71, 2-10 (2004)
- [20] Wooding FB : The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *J Reprod Fertil Suppl*, 31, 31-39 (1982)
- [21] Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K : Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its expected roles in the bovine endometrium during gestation. *Domest Anim Endocrinol*, 42, 63-73 (2012)
- [22] Sawicki G, Radomski MW, Winkler-Lowen B, Krzymien A, Guilbert LJ : Polarized release of matrix metalloproteinase-2 and -9 from cultured human placental syncytiotrophoblasts. *Biol Reprod*, 63, 1390-1395 (2000)
- [23] Koshi K, Suzuki Y, Nakaya Y, Imai K, Hosoe M, Takahashi T, Kizaki K, Miyazawa T, Hashizume K : Bovine trophoblastic cell differentiation and binucleation involves enhanced endogenous retrovirus element expression. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 41 (2012)
- [24] Song G, Bailey DW, Dunlap KA, Burghardt RC, Spencer TE, Bazer FW, Johnson GA : Cathepsin B, cathepsin L, and cystatin C in the porcine uterus and placenta : potential roles in endometrial/placental remodeling and in fluid-phase transport of proteins secreted by uterine epithelia across placental areolae. *Biol Reprod*, 82, 854-864 (2010)
- [25] Suzuki Y, Koshi K, Imai K, Takahashi T, Kizaki K, Hashizume K : Bone morphogenetic protein 4 accelerates the establishment of bovine trophoblastic cell lines. *Reproduction*, 142, 733-743 (2011)
- [26] Takahashi T, Yamada O, Soares MJ, Hashizume K : Bovine prolactin-related protein-I is anchored to the extracellular matrix through interactions with type IV collagen. *J Endocrinol*, 196, 225-234 (2008)
- [27] Shimada A, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hashizume K : Isolation and characterization of a bovine blastocyst-derived trophoblastic cell line, BT-1 : development of a culture system in the absence of feeder cell. *Placenta*, 22, 652-662 (2001)
- [28] Chernyavsky AI, Kalantari-Dehaghi M, Phillips C, Marchenko S, Grando SA : Novel cholinergic peptides SLURP-1 and -2 regulate epithelialization of cutaneous and oral wounds. *Wound Repair Regen*, 20, 103-113 (2012)