

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15597

研究課題名(和文) 早産におけるプロゲステロンの標的遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of Progesterone target gene in preterm birth

研究代表者

金谷 真由子 (Kanatani, Mayuko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60748862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロゲステロン(P)はその受容体(PR)を介して作用する。陣痛時には、子宮のPR応答性低下がおこる。早期に陣痛発来する自然早産では、「子宮のPR応答性の早期減弱」が病因に關与する可能性があり、PRの標的遺伝子が正常産子宮と比べ低下していると推測される。我々は早産におけるPRの標的遺伝子を探索した。ヒト子宮内膜細胞由来のIshikawa細胞を用いて、Pを添加し、発現が上昇した15遺伝子のうち、PRに制御されるTRIM22を新規PR標的遺伝子として同定した。正常産と早産の脱落膜細胞を分離培養し、P添加で変化する遺伝子をRNA-seqで抽出し、早産特異的に変化する遺伝子は385遺伝子存在した。

研究成果の概要(英文)：Progesterone (P4) acts via the Progesterone receptor (PR). In pregnant women, P4 increases throughout pregnancy and remains high during labor and delivery. Given that levels of P4 do not decline before parturition, human parturition is involved in a functional PR withdrawal. It is speculated that preterm birth associated with the early decline of functional PR response, in the preterm uterus, the expression of PR target genes are decreased compared with normal delivery. To find the PR target genes related with preterm birth, we experimented as follows; (1) Using Ishikawa cells derived from human endometrium, Fifteen genes were identified as P4 responsive genes. Out of these 15 genes, we proposed that TRIM22 is a direct target gene of PR. (2) We cultured the decidual cells from normal and preterm delivery, the gene expression profile to response of P4 was analyzed by RNA-sequencing. As a result, the 385 genes were the specific genes in the decidua cells of preterm delivery.

研究分野：生殖生理学

キーワード：早産 プロゲステロン プロゲステロン受容体 脱落膜 子宮 標的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

世界では毎年 1500 万件の早産とそれに伴う 300 万件の死産が起こり、年 110 万件の新生児死亡のうち 30%が早産に起因しているというデータは、早産の制御に向けた取り組みの重要性を示している。現在の早産に対する治療は子宮収縮抑制剤や抗生剤などの対症的な治療法に限定されている。早産に対する新たな視点からの基礎研究の展開が喫緊の課題である。欧米では近年、早産のハイリスク群に対する予防的治療薬として、黄体ホルモン（プロゲステロン；P）の有効性が明らかとなっている。ハイリスク群である子宮頸管短縮や反復早産の症例ではPの有効性であるが、同じハイリスク群である双胎の症例ではPで早産を予防できない。リスク因子によるPの有効性の違い、2~4割のP無効症例の存在から、本研究者らは、「早産においてPに対する子宮の反応性が低下した状態が存在する」という、「早産とP抵抗性」という新しいコンセプトを世界に先駆けて提案した (Hirota Y, et al. Nat Med 2010、図1)。

Pは核内受容体であるP受容体 (PR) を介して、排卵、着床、脱落膜化、妊娠維持に関わる遺伝子の転写を活性化するが、妊娠に重要なPの作用経路は未だ不明である。ヒトでは妊娠初期は卵巣、中期から後期は胎盤がPの供給源となり、P濃度が分娩まで徐々に増加する。ヒトでは分娩前のP低下は起こらないが、機能的なP作用の低下、つまりP応答遺伝子発現抑制が起こる。ヒトにPRアンタゴニスト RU486 を投与すると子宮頸管熟化（子宮頸部組織の軟化）と子宮収縮が誘発され分娩に至ることから、P-PRシグナル減弱がヒト分娩を誘導していると考えられる。早産においては、早期にP-PRシグナル減弱が起こっていると推測される。

2. 研究の目的

早産とP応答性の関係を解析するために、(1)子宮内膜間質細胞におけるPRの新たな下流遺伝子を探索し、その制御メカニズムを解析する。

(2)ヒト胎盤（卵膜）から分離培養した子宮内膜間質細胞（脱落膜細胞）を用いて、Pによって誘導される遺伝子をRNA-seq解析で、網羅的に検討する。分娩および早産におけるPRの標的遺伝子のダイナミックな変化や、早産発症の鍵となるP-PRの標的遺伝子を見出したいと考えている。

3. 研究の方法

(1)培養細胞系列におけるPによる新たなPR標的遺伝子の同定と機能解析

(2)分娩および早産におけるPRの標的遺伝子の同定および機能解析、を行う。(1)では、ヒト子宮内膜間質細胞由来のIshikawa細胞に、PRを恒常的に発現させ、Pによって誘導される遺伝子をマイクロアレイ解析で検討する。(2)では、ヒト早産および正期産の胎盤（卵膜）から分離培養した子宮内膜間質細胞（脱落膜細胞）を用いて、Pによって誘導される

遺伝子をマイクロアレイ解析で、網羅的に検討する。P-PRのターゲットとなる遺伝子のうち、早産検体で低下している遺伝子を同定する。抽出した遺伝子について、ヒト子宮内膜初代培養細胞を用いて機能解析を行う。このように、ヒト早産の臨床検体、安定した培養細胞系列、2つのツールを用いて、早産子宮のP-PR機能低下と原因遺伝子を検証する。

4. 研究成果

(1)Flag-PR-AベクターをIshikawa細胞にトランスフェクションし、恒常的にPR-Aを発現するIshikawa細胞を2ライン確立した (PR-A細胞)。何も発現しないベクターのみをトランスフェクションしたIshikawa細胞をコントロールとし、PR-A細胞において、Pを添加すると、応答遺伝子の一つであるFKBP51が増加することも確認できた。PR-A細胞を用いて、Pを添加するものと添加しない物で24時間おいた後、細胞を回収、RNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。独立した2ラインのPR-A細胞の両方で、Pによって1.75倍以上の誘導がみられた遺伝子は15遺伝子だった (図1)。この15遺伝子をqPCRによって、発現定量したところ、どの遺伝子もP添加後12時間、24時間ともに発現が誘導された。その中で発現誘導率が高い(20倍)TRIM22の遺伝子のみが、遺伝子上流にPR結合領域が推測されたことから、PによるTRIM22の発現誘導についてさらに詳細に解析を行った。TRIM22は、PR-A細胞においてP添加後12時間後に最も発現が上昇すること、

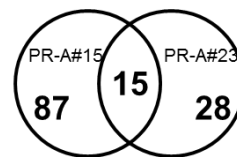


図1. 2つの細胞ラインにおいて発現が上昇した遺伝子数

PRのアンタゴニスト (RU486) でその発現が減少すること、タンパク合成阻害剤によっても発現誘導は変化しないことから、PRの直接的なターゲット

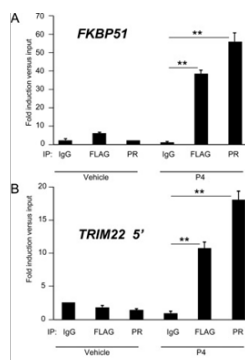


図2. PR-A細胞にPを添加すると、FKBP51およびTRIM22のPR結合領域でのChIPアッセイで、結合が上昇する。

遺伝子であることが推測された。さらに、TRIM22の遺伝子上流のPR結合配列に対するレポーター解析によって、Pによる転写活性は3.4倍誘導され、その結合領域のChIPアッセイでは、PによるPRの結合上昇が認められた (図2)。このことから、子宮

内膜細胞における新たなPRの直接的なターゲット遺伝子TRIM22を同定できた。TRIM22は、転写活性化因子、またタンパク発現を調節することに関与していることなどが今までに示されている。また、早産に関わってい

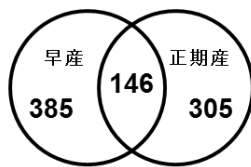


図3. 早産と正期産において発現変化があった遺伝子数

る P53 のターゲット遺伝子ともいわれているため、今後は早産モデルマウスやヒトの早産の検体において、発現や機能を解析する必要がある。

(2) 早産と正期産の脱落膜細胞における、RNA-seq 解析を行い、P 添加なしに対して、P 添加ありの遺伝子発現変化を解析した。早産検体について、1.5 倍変化があった遺伝子は 531 あった。正期産に関しては、451 遺伝子変化があった。そのうち、両方の群で変化があった遺伝子は 146 あり、早産特異的な遺伝子は 385 あった (図3)。今後は、両方の群で変化があったもののうち、逆の変化があるもの、および、早産特異的な遺伝子に着目して、機能解析を行う必要がある。

#### <引用文献>

Saito-Kanatani M, Urano T, Hiroi H, Momoeda M, Ito M, Fujii T, Inoue S. Identification of TRIM22 as a progesterone-responsive gene in Ishikawa endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015,154,217-25. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.08.024.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

Deng W, Cha J, Yuan J, Haraguchi H, Bartos A, Leishman E, Viollet B, Bradshaw H, Hirota Y, Dey SK. p53 coordinates decidua Sestrin2-AMPK-mTORC1 signaling to govern parturition timing, *J Clin Invest*, 査読有, 2016, in press.

Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey SK., Furukawa KS, Fujii T, Osuga Y. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight*. 査読有 2016, e87591. DOI: 10.1172/jci.insight.87591.

Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Effects of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 DOI: jc20161515

Saito-Kanatani M, Urano T, Hiroi H, Momoeda M, Ito M, Fujii T, Inoue S. Identification of TRIM22 as a progesterone-responsive gene in Ishikawa endometrial cancer cells. *J*

*Steroid Biochem Mol Biol.* 2015,154,217-25. DOI:

10.1016/j.jsbmb.2015.08.024.

Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2016,15,161-9. DOI: 10.1016/j.mce.2016.03.032.

Taguchi A, Koga K, Kawana K, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Yoshida M, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016,75,486-492. DOI:10.1111/aji.12489.

Takamura M, Koga K, Izumi G, Hirata T, Harada M, Hirota Y, Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Simultaneous Detection and Evaluation of Four Subsets of CD4+ T Lymphocyte in Lesions and Peripheral Blood in Endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2015,74,480-486. DOI: 10.1111/aji.12426.

Harada M, Nose E, Takahashi N, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol. Endocrinol.* 2015,31,783-787. DOI:10.3109/09513590.2015.1062862.

Cha J, Burnum-Johnson K.E, Bartos A, Li Y, Baker ES, Tilton S.C, Webb-Robertson B.J, Piehowski P.D, Monroe M.E, Jegga A.G, Murata S, Hirota Y, Dey S.K. Muscle Segment Homeobox Genes Direct Embryonic Diapause by Limiting Inflammation in the Uterus. *J. Biol. Chem.* 2015,290,15337-15349. DOI: 10.1074/jbc.M115.655001.

松尾光徳、廣田泰、プロテオミクスを用いた妊娠成立・維持機構の研究 *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*, 2015, 22, 11-17  
Izumi G, Koga K, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Ogawa K, Inoue S, Fujii T, Osuga Y. Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines, matrix metalloproteinases, and activin A in human endometrial stromal cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2015,73, 501-506, DOI: 10.1111/aji.12359.

Miyashita M, Koga K, Izumi G, Makabe T,

Hasegawa A, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Fujii T, Osuga Y. Drospirenone induces decidualization in human eutopic endometrial stromal cells and reduces DNA synthesis of human endometriotic stromal cells. *Fertil. Steril.* 2015,104, 217-224.e2.D01:10.1016/j.fertnstert.2015.03.023.

Hiraoka T, Saito-Fujita T, Hirota Y. How does Progesterone Support Embryo Implantation? *J. Mamm. Ova Res.* 2015,32, 87-94.D01:10.1274/jmor32.87

矢野倫子、田口歩、齋藤真由子、中澤直子：急速に増大した仙尾部未熟奇形種のため妊娠 22 週で子宮内胎児死亡となった 1 例：東京産科婦人科学会誌、64 巻、2015、30-33

平岡毅大、廣田泰：着床における黄体ホルモンの作用：産科と婦人科、82 巻 7 号、2015、740-745、

藤田知子、廣田泰：子宮内膜における着床制御因子 プロゲステロン・シグナルを中心に：HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY、22 巻 3 号、2015、176-179

江頭真宏、廣田泰：種差からみた着床 ヒトとの共通点と相違点：HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY、22 巻 3 号、2015、183-189

〔学会発表〕(計 6 件)

Mahiro Egashira, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Hirofumi Haraguchi, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii. The presence of cellular senescence and its possible roles in the postpartum uterus. IFFS/JSRM International Meeting 2015 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2015.4.26

Hirofumi Haraguchi, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Kaori Koga, Sudhansu K. Dey, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii. MicroRNA controls receptivity to the embryo by regulating progesterone signaling in the cervix and uterus. IFFS/JSRM International Meeting 2015 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2015.4.26

Leona Matsumoto, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Hirofumi Haraguchi, Mahiro Egashira, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Kaori Koga, Sudhansu K. Dey, Tomoyuki Fujii, Yutaka Osuga. Crucial role of hypoxia inducible factor 2 in the pregnant uterus.

31st ESHRE Annual Meeting (ESHRE 2015):Lisbon (Portugal) 2015.6.15

Takehiro Hiraoka, Yasushi Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Tomoki Tanaka, Mitsunori Matsuo, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Hirofumi Haraguchi, Katsuko S. Furukawa, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii.

Endometrial regeneration in the mouse model of decellularized matrix transplantation.

第 38 回日本分子生物学会年会 (BMB 2015) (兵庫県神戸市) 2015.12.2

Yasushi Hirota, Hirofumi Haraguchi, Tomoko Saito-Fujita, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Sudhansu K. Dey, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii.

MicroRNA-200a impairs progesterone signaling in the cervix, disturbing embryo implantation.

International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells (京都府京都市) 2016.2.18

Takehiro Hiraoka, Yasushi Hirota. Endometrial regeneration in the mouse model of decellularized matrix transplantation.

International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells (京都府京都市) 2016.2.18

〔図書〕(計 1 件)

\*Yasushi Hirota. Springer Uterine Endometrial Function. 2016, in press.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金谷 真由子 (KANATANI, Mayuko)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60748862

### (2) 研究分担者

廣田 泰 (HIROTA, Yasushi)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40598653