

平成30年6月6日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20191

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた子宮内膜脱落膜化に関する新規エンハンサー領域の解析

研究課題名(英文) The distal upstream region of insulin-like growth factor binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization

研究代表者

田村 功 (TAMURA, Isao)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40610663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脱落膜化マーカー遺伝子であるIGFBP-1の上流領域にはH3K27acが誘導されていた。よって、この領域がIGFBP-1遺伝子発現に関わるenhancer領域であると考え解析を行った。脱落膜化を誘導したところ、同領域の転写活性が上昇することを確認した。ChIP assayにより、この領域には様々な転写因子が結合することがわかった。さらに、enhancer領域のIGFBP-1遺伝子発現への関与を証明するため、ゲノム編集を行い enhancer欠失細胞を作成した。この細胞ではIGFBP-1発現が低下していた。以上より脱落膜化におけるIGFBP1発現に関する新規enhancer領域が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：IGFBP-1 is a specific decidualization marker and has increased H3K27ac levels in its distal upstream region. Here, using a luciferase reporter gene construct containing this IGFBP-1 upstream region, we tested the hypothesis that it is an IGFBP-1 enhancer. To induce decidualization, we incubated ESCs with cAMP and found that cAMP increased luciferase expression, indicating that decidualization increased the transcriptional activity from the IGFBP-1 upstream region. Furthermore, CRISPR/Cas9-mediated deletion of this region significantly reduced IGFBP-1 expression, confirming its role as an IGFBP-1 enhancer. A ChIP assay revealed that cAMP increased the recruitment of the transcriptional regulators C/EBP and FOXO1 to the IGFBP-1 enhancer in ESCs. These results indicate that the region -4701 to -7501 bp upstream of IGFBP-1 functions as an enhancer for IGFBP-1 expression in ESCs undergoing decidualization.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：子宮内膜 脱落膜化 epigenetics

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜間質細胞(ESC)の脱落膜化は着床に不可欠な現象であり、この過程で様々な遺伝子の発現変化が起こる。我々は、世界に先駆けて、脱落膜化によるゲノムワイドなヒストン修飾変化について ChIP シークエンス解析を行った。脱落膜化において発現が上昇する 881 の遺伝子のうち、約 3 分の 1 もの遺伝子が promoter 領域 (転写開始点付近) または enhancer 領域 (転写開始点より上流、または下流 3~10kb 離れた遠位領域) にヒストン修飾変化を伴っていることを明らかにした。つまり、脱落膜化による遺伝子発現変化にはエピジェネティックな調節機構が密接に関与していると考えられる。このうち、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac) は、転写活性化に働くヒストン修飾であり遺伝子発現レベルと相関することが知られている。実際に、脱落膜化により H3K27ac 修飾が起こる遺伝子は、ヒストン修飾変化を伴わない遺伝子に比べ、より高度の遺伝子発現上昇が起きていた。また、興味深いことに、これらの脱落膜化による H3K27ac 修飾上昇領域の多くは、転写開始点付近ではなく、転写開始点から上流または下流に離れた enhancer 領域に多く存在していた (図 1)。

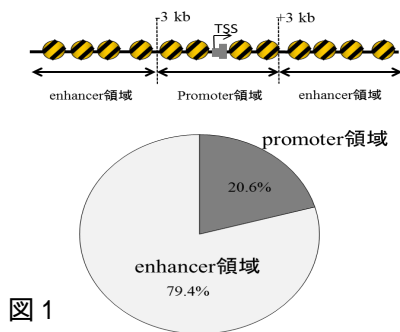


図 1

H3K27ac は、活性化した enhancer 領域の指標として知られていることから、我々が同定した H3K27ac 修飾領域は、脱落膜化における遺伝子発現変化に寄与する新規の enhancer 領域である可能性が考えられた。

近年開発されたゲノム編集という技術は、ゲノム上の任意の DNA 配列を in vivo のまま欠失・置換させることができる画期的な技術である (図 2)。

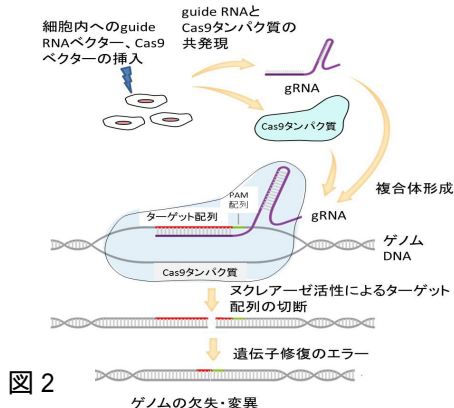


図 2

エクソン配列を変化させることによる遺伝子のノックアウトに主に利用されているが、この技術を応用することで、注目している enhancer 領域の DNA 塩基配列を欠失させた細胞を作成することができる。その細胞内における遺伝子発現を調べることで、enhancer 領域が実際に近傍の遺伝子発現に関与しているかを調べることができる。また、近年の報告では、enhancer は近傍の遺伝子 promoter 領域のみに限らず、広くゲノムの多領域と interaction することで、多くの遺伝子発現に影響を与える可能性があるとされている。よって、ゲノムワイドな解析を加えることで、見出した enhancer によって発現調節を受ける脱落膜化に関連した遺伝子群をゲノムワイドに同定できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) 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、代表的な脱落膜化マーカー遺伝子として認識されている。ChIP シークエンス解析により、IGFBP-1 遺伝子の転写開始点より 5kb 上流の enhancer 領域に脱落膜化により H3K27ac 修飾が上昇する新たな enhancer 領域の候補が存在することを見出した (図 3)。

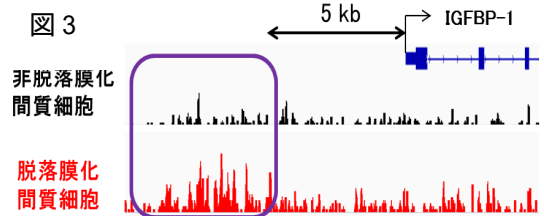


図 3

この領域を欠失した細胞株をゲノム編集により作成し IGFBP-1 発現変化を調べることで、enhancer 活性を証明する。さらに、enhancer 領域の promoter への interaction や結合する転写因子を明らかにすることで、IGFBP-1 発現に関する新たな転写調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

IGFBP-1 上流の enhancer 候補領域を欠失した細胞株をゲノム編集技術により作成する。この細胞に cAMP を用いて脱落膜化刺激を加え IGFBP-1 遺伝子の発現を調べることで、enhancer 領域のもつ IGFBP-1 遺伝子発現への影響を解析する。また、enhancer 領域に結合し発現を調節する転写因子について解析する。

4. 研究成果

(1) IGFBP-1 上流の enhancer 候補領域の転写活性

・ESC に H3K27ac 上昇領域のエンハンサー配列を挿入したベクターをトランスフェクシ

オンした場合、cAMP を投与することでその活性が有意に上昇した。つまり、この領域は脱落膜化刺激に反応する enhancer 領域であることがわかった (図 4)。

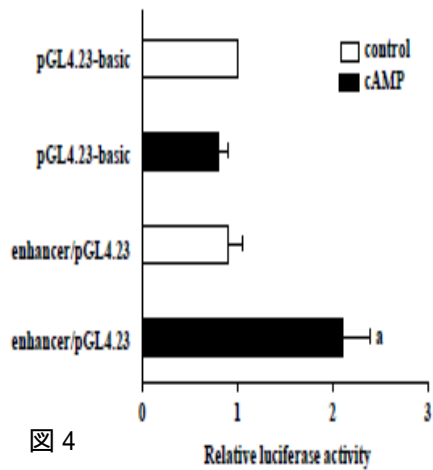


図 4

(2)ゲノム編集による enhancer 領域欠失細胞の作成

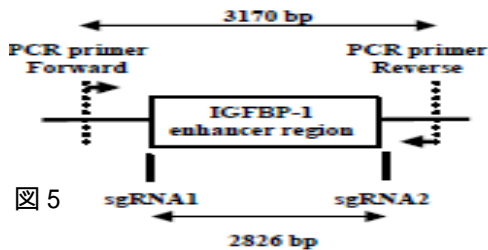


図 5

・K27ac 上昇領域を含む二か所の guide RNA を作成し(図 5)、CRISPR/Cas9 による二か所の切断を起こすことで、enhancer 領域を欠失した細胞を作成することを試みた。ゲノム編集を高率に行うため、脱落膜化 ESC と同様に高い IGFBP-1 発現を持つ HepG2 細胞を用いた。enhancer 領域の欠失は、genotyping により wild type 領域の欠失した clone を選出し、DNA sequence を行い deletion が起きていることを確認した (図 6)。

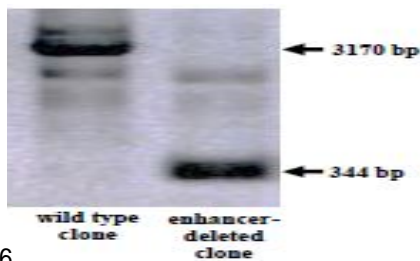


図 6

(3)IGFBP-1 enhancer 領域欠失による遺伝子発現への影響

・wild type clone と enhancer 欠失 clone における IGFBP-1 発現を比較したところ、enhancer 欠失細胞では発現が低いことがわ

かった。つまり、着目した enhancer 領域が実際に IGFBP-1 発現に関与していることを証明することができた (図 7)。

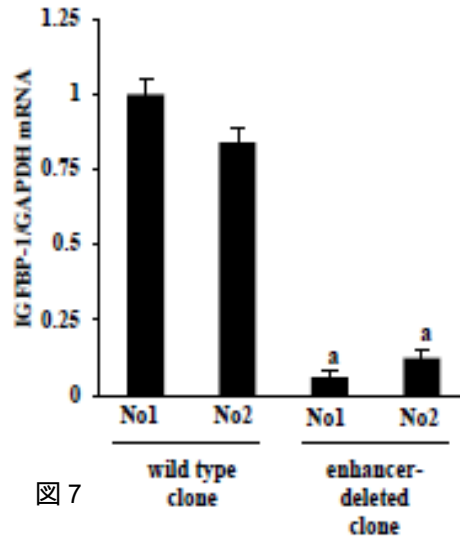


図 7

(4)enhancer 領域に結合する転写因子の同定・この enhancer 領域にはどのような転写因子が結合し IGFBP-1 発現に関与しているかを ESC で検討した。転写因子のうち脱落膜化に重要といわれている C/EBP $\beta$  と FOXO1 に着目し、ChIP assay により検討したところ、脱落膜化によりその結合が上昇することがわかった (図 8)。

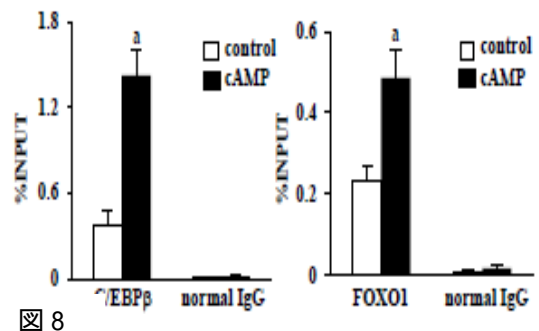


図 8

(5)まとめ

ゲノムワイドエピゲノム解析とゲノム編集により新たに同定した enhancer 領域の IGFBP-1 発現機構への関与を詳細に解明することができた (図 9)。

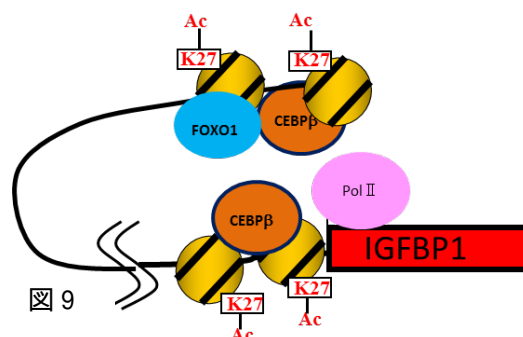


図 9

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1件)

I. Tamura, K. Jozaki. (他8名, 筆頭著者).

The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization. J Biol Chem, 293(14):5270-5280, 2018 査読あり

DOI:10.1074/jbc.RA117.000234

〔学会発表〕(計1件)

田村 功、エピゲノムから見えてきた子宮内膜脱落膜化の分子メカニズム、第62回日本生殖医学会学術講演会、2017年

〔図書〕(計 0件)

〔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  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 功 (TAMURA, Isao)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40610663