

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

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：16K20194

研究課題名(和文) 脱落膜化における転写因子C/EBP のmiRNAを介した遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of miRNAs regulated by transcription factor C/EBPb in decidualization

研究代表者

城崎 幸介 (JOZAKI, Kosuke)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80721323

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)：子宮内膜間質細胞の脱落膜化は、胚の着床・妊娠の成立には必須の現象である。脱落膜化においては、多くの遺伝子の発現が変化する。本研究は、脱落膜化で転写因子C/EBPbにより発現を制御されているmiRNAを次世代シーケンサーにより検出した。その結果、hsa-miR-29cとhsa-miR-1182が検索された。これら2つのマイクロRNAは脱落膜化で変化する多くの遺伝子の発現を制御している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify novel miRNA regulated by transcriptional factor C/EBPb in human endometrial stromal cells (ESCs) during decidualization using RNA sequencing. As a result, hsa-miR-29c and has-miR-1182 were extracted. Two miRNAs may play important roles in expression of many genes during decidualization.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：脱落膜化 miRNA 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト子宮内膜において、脱落膜化は胚が着床し妊娠を維持するために必須の現象であり、子宮内膜間質細胞 (以下 ESCs) においては形態的、機能的な変化が起こる。この過程では、多くの遺伝子の発現が新たに誘導されたり、発現レベルが増加したり、逆に抑制されたりするなど劇的な遺伝子発現の変化が起こるが、その遺伝子の発現制御機構に関しては未だ不明な点も多い。遺伝子発現は、単に転写因子のみで調節されるのではなく、転写因子の受け手側である遺伝子プロモーター領域 (DNA) のヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな調節機構によっても制御されている。エピジェネティックな機構には、ヒストン修飾、DNA メチル化、そして micro-RNA (以下 miRNA) による調節がある。

脱落膜化において重要な役割を果たしている転写因子には、C/EBPb (CCAAT/enhancer-binding protein b)、FOXO1、STAT5、HOXA10 などが挙げられるが、我々は、その中でも特に、C/EBPb に注目している。というのは、申請者が、ESCs について、C/EBPb のノックダウン実験を行い、脱落膜化に伴う遺伝子発現変化への C/EBPb の関与を次世代シーケンサーを用いて検討した結果、C/EBPb が多くの遺伝子の発現変化に関与していることが明らかとなったからである (図 1, 図 2)。

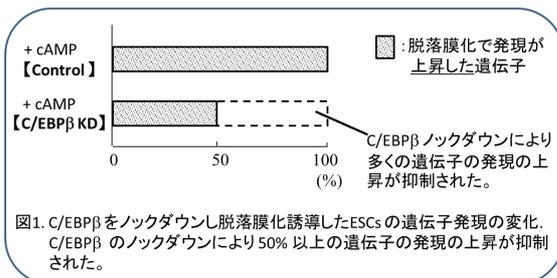


図1. C/EBPb をノックダウンし脱落膜化誘導した ESCs の遺伝子発現の変化。C/EBPb のノックダウンにより 50% 以上の遺伝子の発現の上昇が抑制された。

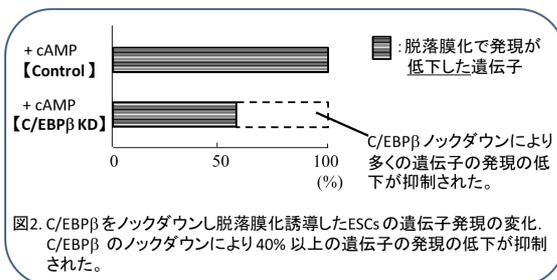


図2. C/EBPb をノックダウンし脱落膜化誘導した ESCs の遺伝子発現の変化。C/EBPb のノックダウンにより 40% 以上の遺伝子の発現の低下が抑制された。

そして、その制御は、C/EBPb が直接、転写因子として DNA に直接結合し、制御している遺伝子は少数で、H3K27ac などヒストン修飾を含むエピジェネティックな変化を介して発現を制御している遺伝子が多く存在することが明らかとなった。脱落膜化における C/EBPb のノックダウン実験 miRNA の発現を制御することにより、下流遺伝子の発現を制御している可能性を見出した。つまり、脱落膜化で C/EBPb により発現制御を受ける脱落膜化関連遺伝子の中に、C/EBPb に直接制御を受けているのではなく、miRNA を介して、

発現を調節されている遺伝子が存在することを示唆している。これまで脱落膜化において、転写因子の制御下にある miRNA の存在を示した報告はない。

### 2. 研究の目的

近年のトランスクリプトーム解析技術の発達により、タンパク質をコードしていないノンコーディング RNA が細胞内において膨大に転写されていることが明らかとなり、その中の miRNA は、生体中の様々な現象や疾患に関与する重要な分子であることが判明している。miRNA は、標的遺伝子の mRNA の 3' UTR の相補的配列部位に結合し、遺伝子翻訳を中断させたり、mRNA を分解に導くことで、転写後の段階で発現を抑制する。本研究では、脱落膜化におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構について、転写因子 C/EBPb が発現を制御している miRNA を明らかにする。

### 3. 研究の方法

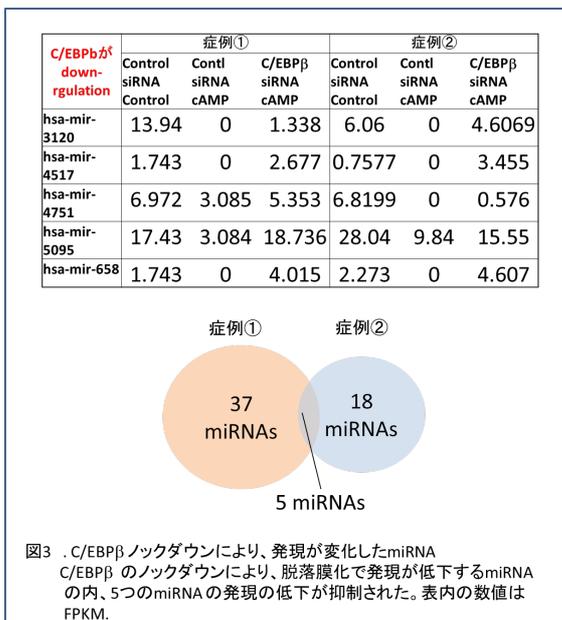
(1) IRB の承認と患者の同意を得て、増殖期後期の子宮内膜から ESCs を分離・培養した。その ESCs に対し、C/EBPb をノックダウンするための C/EBPb siRNA と、対照群として Control siRNA を導入した。両者の細胞を cAMP (0.5 mM) で 4 日間培養し、脱落膜化を誘導し、IGFBP-1 と PRL の mRNA 発現を RT-PCR により検出することにより脱落膜化を確認した。また、実際に C/EBPb がノックダウンされているかをウェスタンブロット法により確認した。その後、細胞よりトータル RNA を抽出し、次世代シーケンサー HiSeq1000 (イルミナ社) を使用し、RNA-sequence によりゲノムワイドに miRNA を含む mRNA 発現解析を行った。具体的には、cAMP 刺激により発現が 1.5 倍以上上昇した miRNA のうち、C/EBPb ノックダウンによってその発現の上昇が 2/3 以下に抑制された miRNA と、また、cAMP 刺激により発現が 2/3 以上低下した miRNA のうち、C/EBPb ノックダウンによってその発現の低下が 1.5 倍以上抑制された miRNA を C/EBPb が脱落膜化において発現に関与している遺伝子とした。また、個体差を考慮し 2 検体で検討した。

(2) miRNA の発現確認のために、C/EBPb をノックダウンし、脱落膜化刺激をした ESCs について、(1) で抽出した miRNA の発現をリアルタイム RT-PCR により確認した。確認のために (1) に供した個体とは異なる 3 個体をリアルタイム RT-PCR に供した。

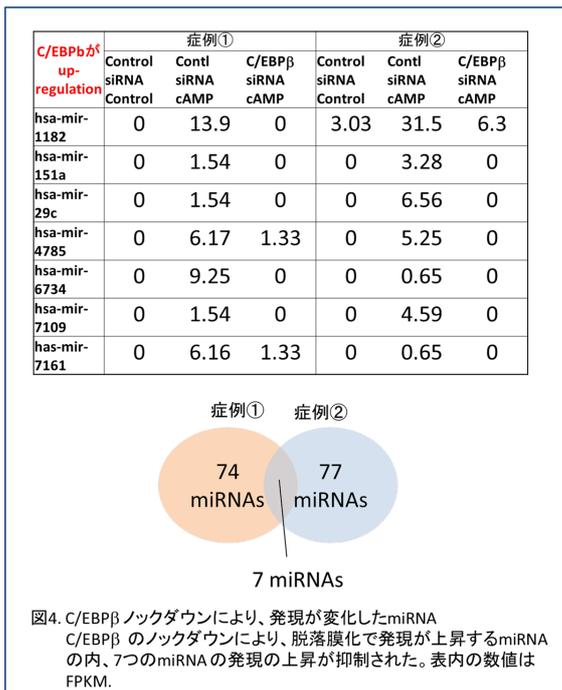
### 4. 研究成果

(1) ESCs について、C/EBPb をノックダウン次世代シーケンサーによる解析を行った結果、症例 では、脱落膜化により、37 個の miRNA の発現が低下し、C/EBPb ノックダウンにより、その低下が抑制された。また、症例 では、18 個の miRNA の発現が低下し、

C/EBPb ノックダウンにより、その低下が抑制された (図3)。2つの症例において、同じ発現動態を示した miRNA は5つであった。

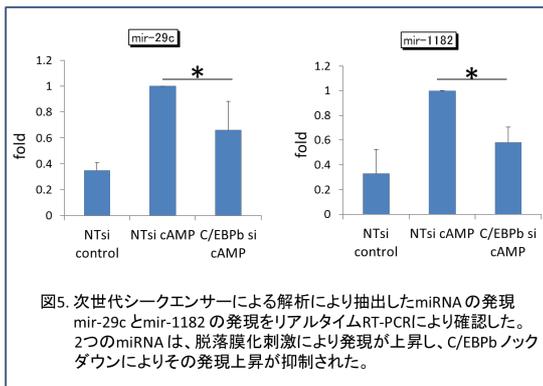


また、74 個の miRNA の発現が上昇し、C/EBPb ノックダウンにより、その上昇が抑制された。また、症例 ①では、77 個の miRNA の発現が上昇し、C/EBPb ノックダウンにより、その上昇が抑制された (図4)。2つの症例において、同じ発現動態を示した miRNA は7つであった。



(2)(1)で抽出された、脱落膜化により発現が低下し、C/EBPb ノックダウンで、その発現の低下が抑制された5つの miRNA と、脱落膜化により発現が上昇し、C/EBPb ノックダウンで、その発現の上昇が抑制された7つの miRNA について、確認のためにリアルタイム RT-PCR

を実施した。その結果、脱落膜化により発現が低下し、C/EBPb ノックダウンで、その発現の低下が抑制された5つの miRNA について、リアルタイム RT-PCR によりバリデーションが取れた miRNA はなかった。一方、脱落膜化により発現が上昇し、C/EBPb ノックダウンで、その発現の上昇が抑制された7つの miRNA について、リアルタイム RT-PCR によりバリデーションが取れた (図5)。



以上、今回の研究ではヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化において、転写因子 C/EBPb により発現制御を受けている miRNA を検索した。バリデーションが取れた hsa-mir-29c と hsa-mir-1182 は、脱落膜化で変化する遺伝子の発現を制御している可能性がある。特に、hsa-mir-29c はこれまでも、子宮内膜症患者の子宮内膜において、発現が過剰に上昇することで、プロゲステロン応答能が低下している可能性も指摘されており、子宮内膜の脱落膜化にも重要な役割を担っている可能性が考えられた。

### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

城崎 幸介 (JOZAKI, Kosuke)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80721323

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし