

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07470

研究課題名(和文) マウス子宮におけるKallikrein 1の発現と生理作用の解析

研究課題名(英文) Kallikrein 1 expression and its roles in the mouse uterus

研究代表者

高橋 純夫 (Takahashi, Sumio)

岡山大学・自然科学研究科・特命教授

研究者番号：90144807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：セリンプロテアーゼKallikrein 1(Klk1)はマウス子宮内膜上皮細胞や間質細胞に発現し、エストロゲンにより発現が高まり、分泌されることが分かった。エストロゲン受容体は、Klk1遺伝子のプロモーター領域内のエストロゲン応答領域もしくはAP1サイトに結合し、転写を促進することが分かった。細部外マトリックスに貯留されているIGFBP3が、放出されたKlk1によって分解され、結合していたIGF1を遊離し、細胞増殖を促進することが示唆された。Klk1は、fibronectinやcollagen type IVも分解するので、子宮内膜の組織構造の改変に関わると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Klk1は細胞増殖やガンの発症に関与することが推察されていたが、その関与の実態は不明であった。本研究により組織内でKlk1が分泌され、IGFBP3を分解し、IGF1作用を高めることが示され、KLKと細胞増殖をむすぶ機構を明らかにすることができた。Klkと発ガンの関係は依然不明であるが、エストロゲン受容体による制御機構が明らかになったので、本研究結果は、Klk1の転写制御機構とガン発症の関係を明らかにする端緒となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Serine protease Kallikrein1 (Klk1) was expressed in mouse endometrial epithelial cells and stromal cells. Klk1 synthesis and release from the endometrial cells were enhanced by estrogen treatment. Klk1 transcription was regulated by binding of estrogen receptor on the putative estrogen response element and/or putative AP1 sites in the promoter region. We previously reported that klk1 degraded insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), fibronectin and collagen type IV. Elevated Klk1 production and release may enhance the IGF1 release from IGFBP3, resulting in the proliferation of endometrial cells. These findings suggest that Klk1 was involved in the proliferation of endometrial cells and the remodeling of endometrium.

研究分野：内分泌学

キーワード：Kallikrein 1 エストロゲン 子宮 マウス セリンプロテアーゼ 細胞増殖 インスリン様成長因子 結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織 kallikrein (Klk)は、セリンプロテアーゼである。Klk は、乳がんや子宮がんが発現が高まり、細胞増殖や発ガンとの関連が示唆されているが、その機構は未解明である。マウスでは 14 の Klk 遺伝子が知られている。我々は、マウス子宮において、Klk の一つである Klk1 がエストロゲンにより発現すること、ならびに Klk1 が *in vitro* 系においてインスリン様成長因子 (IGF) 結合タンパク質 3 (IGFBP3) を分解することを発見した (Rajapakse et al., 2007)。しかしながら、Klk1 遺伝子のエストロゲンによる転写制御機構や、Klk1 の発現細胞、Klk1 が分泌されるかどうか、また分泌された Klk1 が IGFBP3 を分解するかどうかは未解明であった。

2. 研究の目的

Klk1 は、マウス子宮においてエストロゲンにより産生が高まる。その一方、子宮においてインスリン様成長因子 1 (IGF1) もエストロゲンにより産生が高まる。IGF1 は、子宮内膜細胞の増殖を促進することが分かっている。Klk1 は、IGFBP3 を分解するので、遊離の IGF1 を増加することが出来ると考えられる。すなわち、子宮において、エストロゲンは IGF1 の産生を高めるとともに、Klk1 の産生を高め、IGF1 作用を高めるとする仮説を考えた。本研究は、本仮説を検証することを目的とした。まず、(1) 子宮内膜における Klk1 産生細胞を同定する。さらに、(2) 子宮細胞から Klk1 が分泌されることを調べ、分泌された Klk1 が IGFBP3 を分解することを確かめる。ついで、(3) エストロゲンによる Klk1 遺伝子の転写制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス子宮における Klk1 発現細胞の解析

マウス Klk1 遺伝子の riboprobe を作成し、*in situ hybridization* 法による Klk1 mRNA 発現細胞を同定する。ついで、抗 Klk1 抗体を用いて、Klk1 産生細胞を免疫組織化学的に明らかにする。

(2) マウス子宮における Klk1 分泌と作用の解析

卵巣摘出マウスに Estradiol (E2) を投与し、子宮における Klk1 mRNA 発現を調べる。ついで、マウス子宮内膜間質細胞を単離し培養をおこなう。培養液中の Klk1 の発現を Western blot により解析する。さらに、培養液中の IGFBP3 も Western blot により解析し、Klk1 産生を高めたときの IGFBP3 量の変化を調べて、Klk1 による IGFBP3 分解を解析する。

Klk1 と IGFBP3 の両遺伝子を発現ベクター-pCDNA3 に挿入し、CHO-K1 細胞にトランスフェクションし、培養液中の IGFBP3 を Western blot により解析する。

(3) エストロゲンによる Klk1 遺伝子の転写制御機構の解析

マウス Klk1 遺伝子プロモーターの機能解析を、luciferase レポーター遺伝子を用いて解析する。マウス Klk1 遺伝子の転写開始点から 5' 上流側の DNA 断片を luciferase レポーター遺伝子に結合して、最少プロモーター領域ならび、エストロゲン応答領域を解析する。ついで、エストロゲン受容体 α の結合領域を、chromatin immunoprecipitation (Chip) と PCR により解析する。

4. 研究成果

(1) マウス子宮における Klk1 発現細胞の解析

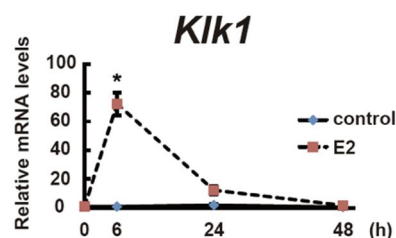
Klk1 mRNA 発現細胞の解析

マウス Klk1 riboprobe を用いて *in situ hybridization* により解析したところ、E2 無投与の対処群では、シグナルは検出できなかったが、E2 投与(6時間)により、子宮内膜上皮細胞と、上皮細胞に近い間質細胞層に Klk1 mRNA のシグナルを検出できた。さらに、抗 Klk1 抗体で免疫染色したところ、Klk1 mRNA シグナルを検出できた子宮内膜上皮細胞と間質細胞に陽性反応を検出できた。マウス子宮においては、エストロゲン投与により Klk1 mRNA が増加すること、ならびに単離した子宮内膜上皮細胞および間質細胞におい手 Klk1 mRNA が増加することを明らかにしている。今回の結果は、マウス子宮において Klk1 発現細胞の局在を明らかにした。

(2) マウス子宮における Klk1 分泌と作用の解析

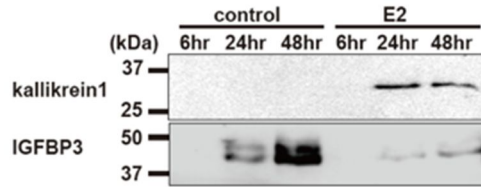
卵巣摘出したマウスに E2(250 ng) を投与すると、子宮においては E2 投与により Klk1 mRNA は増加した(図 1)。

図 1



マウス子宮内膜間質細胞を培養し, E2 (10^{-9} M) を投与し, 6, 24, 48 時間後に培養液を回収し, Kik1 と IGFBP3 の発現を Western blot 法により検出した (図 2)。Kik1 は, E2 投与 24 時間, 48 時間で検出できた。また, IGFBP3 は, E2 無投与の対照群では, 24 時間, 48 時間では培養液中に検出できたが, E2 投与では減少していることが分かった。このことから, E2 により, Kik1 は子宮内膜間質細胞から分泌されること, また, IGFBP3 の分泌は, E2 により減少することが分かった。

図 2



CHO-K1 細胞に IGFBP3 と Kik1 を発現させ, 培養液中の IGFBP3 を Western blot で解析したところ, IGFBP3 と Kik1 を共発現させたときは, IGFBP3 のみの発現に比べて, 培養液中の IGFBP3 量が減少していることが示された (図 3)。このことから, Kik1 が培養液中で, IGFBP3 を分解する可能性が示唆された。

図 3

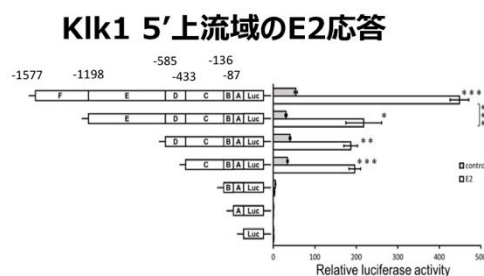


(3) エストロゲンによる Kik1 遺伝子の転写制御機構の解析

マウス Kik1 遺伝子のプロモーター解析

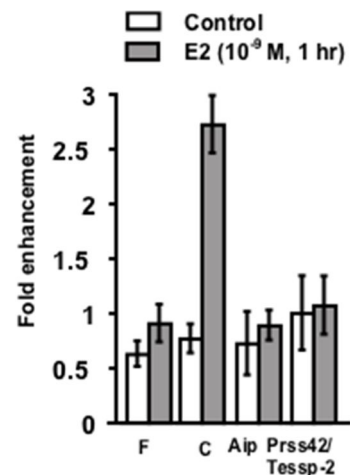
E2 により Kik1 mRNA の発現が促進されたので, Kik1 遺伝子のプロモーター解析を行った。マウス Kik1 の転写開始点を +1 として, 転写開始点から 5' 上流側の DNA を Luciferase 遺伝子の 5' 上流側に挿入したレポーター遺伝子を作成し, HepG2 細胞にトランスフェクションしてプロモーター解析を行った。最少プロモーター領域を解析したところ, 最少プロモーター領域の 5' 上流端は -136/-87 にあることが分かった。ついで, E2 応答領域の解析を, 欠失プロモーターコンストラクトを用いて行った (図 4)。C 領域内に, E2 によりプロモーター活性を高める領域があることが示唆された。

図 4



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
 Kik1 -433/-136 領域 (C) に E2 応答領域があり, -1577/+24 ではさらにプロモーター活性が高まる。

図 5



エストロゲン受容体結合領域の解析

マウスエストロゲン受容体 ($ER\alpha$) の結合領域が C 領域内に存在するかどうかを, Chip アッセイにより解析した (図 5)。Kik1 遺伝子プロモーター領域の C, F 領域と, Aip および Prss42/Tessp-2 の各遺伝子のプロモーター領域を調べた。E2 (10^{-9} M) 投与後 1 時間で, C 領域の $ER\alpha$ の結合が有意に増加していた。なお, C 領域内には, エストロゲン応答領域 (ERE) ならびに AP1 サイトのコンセンサス配列が存在していた。したがって, $ER\alpha$ は, それらの領域に結合して, Kik1 遺伝子の転写を高めることが示唆された。

(4) まとめ

本研究により、マウス子宮では、Klk1 は子宮内膜上皮細胞や間質細胞に発現し、エストロゲンにより発現が高まることを明らかにした。Klk1 は、子宮内膜細胞から分泌されることが分かった。IGFBP3 は、エストロゲンによって分泌が低下することが分かったが、細胞外マトリックスに貯留されている IGFBP3 が、放出された Klk1 によって分解され、結合していた IGF1 を解離させ、IGF1 作用を高めることが示唆された。Klk1 は、fibronectin, collagen type IV も分解するので、エストロゲンに誘導された Klk1 は、子宮内膜のこれらの細胞外マトリックスも分解し、IGF1 による細胞増殖に伴う組織構造の改変に関わると考えられる。

Klk は細胞増殖やガンの発症に関与することが推察されていたが、その関与の実態は不明であった。本研究により組織内で Klk1 が分泌され、IGFBP3 を分解し、IGF1 作用を高めることが示唆され、Klk と細胞増殖をむすぶ機構を明らかにすることができた。Klk と発ガンの関係は依然不明であるが、エストロゲン受容体による制御機構が明らかになったので、本研究は、Klk1 の転写制御機構とガン発症の関係を明らかにする研究の端緒となるものと考えられる。

引用文献

Rajakpse, S., Yamano, N., Ogiwara, K., Hirata, K., Takahashi, S., Takahashi, T.
Estrogen-dependent expression of the tissue kallikrein gene (Klk1) in the mouse uterus and its implications for endometrial tissue growth *Molecular Reproduction and Development* 74: 1053-1063 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ojima, F. Saito, Y. Tsuchiya, Y. Ogoshi, M. Fukamachi, H. Inagaki, K. Otsuka, F. Takeuchi, S. Takahashi, S.	4. 巻 375
2. 論文標題 Runx3 regulates folliculogenesis and steroidogenesis in granulosa cells of immature mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 743-754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-018-2947-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎拓弥, 上河内香奈, 徳森萌美, 相澤清香, 御輿真穂, 竹内 栄, 木村 敦, 高橋純夫
2. 発表標題 マウス子宮におけるKallikrein 1 遺伝子の発現制御機構の解析
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会及びシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 純夫, 藤岡 竜矢, 小島 史也, 相澤 清香, 御輿 真穂, 竹内 栄
2. 発表標題 マウス卵巣におけるアロマターゼ遺伝子の発現制御
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎拓弥・上河内香奈・徳森萌美・相澤清香・御輿真穂・竹内 栄・高橋純夫
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるKallikrein 1とIGFBP3の役割
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎拓弥・相澤清香・御輿真穂・竹内 栄・高橋純夫
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるインスリン様成長因子システムの解析
3. 学会等名 日本動物学会第69回中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上河内香奈・徳森萌美・松原美咲・吉田すみれ・相澤清香・御輿真穂・竹内 栄・高橋純夫
2. 発表標題 マウス子宮におけるエストロゲンによるセリンプロテアーゼKallikrein 1の発現制御
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学大学院自然科学研究科（理学部生物学科）分子内分泌学研究室 https://sites.google.com/view/molecular-endocrinology-lab 岡山大学理学部生物学科分子内分泌研究室 https://sites.google.com/view/molecular-endocrinology-lab

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	相澤 清香 (Aizawa Sayaka) (90754375)	岡山大学・自然科学研究科・助教 (15301)	