

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11239

研究課題名(和文) 脱落膜化によって活性化されるマスター遺伝子を中心とした転写ネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the transcriptional network centered on the master gene activated by decidualization of human endometrial stromal cells

研究代表者

竹谷 俊明 (TAKETANI, Toshiaki)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70464328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜間質細胞の脱落膜化は、着床の成立や妊娠初期の妊娠維持には不可欠である。この過程で多くの遺伝子発現変化やエピゲノム修飾変化が起こることを我々は報告している。本研究では、これらのダイナミックな遺伝子発現変化を統括する転写因子であるマスター遺伝子を同定することを目的とした。ゲノムワイド解析によるビッグデータを基盤として、マスター遺伝子候補を絞り込んだところC/EBPbが抽出された。C/EBPbのノックダウンにより、脱落膜化で変化する多くの遺伝子発現変化やエピゲノム変化が抑制された。以上より、転写因子C/EBPbは脱落膜化を制御するマスター遺伝子の一つであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子C/EBPbの脱落膜化におけるマスター遺伝子としての重要性をゲノムワイドな視点から追及することができた。さらに、C/EBPbは脱落膜化における遺伝子発現のみならず、ヒストン修飾変化の多くも司っていることが分かった。脱落膜化におけるゲノムワイドエピゲノム変化については、我々が世界に先駆けて証明した事象であり、この制御機構を証明するに至ったことは非常に価値があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Human endometrial stromal cells (ESCs) undergo decidualization, which is crucial for embryo implantation and maintenance of pregnancy. We previously reported that a number of genes are up- or down-regulated during decidualization and that epigenetic changes (increase of H3K27ac) occur throughout the genome during decidualization of ESCs. In this study, we aimed to identify a master transcription regulator of decidualization, which is an up-stream transcription factor that regulates genome-wide gene expressions and epigenome status. Based on genome-wide expression data, we focused on C/EBPb as a candidate master regulator. RNA-seq analysis with C/EBPb knockdown revealed that 53.4% of up- or downregulated genes by decidualization were under the regulation of C/EBPb. ChIP-seq analysis showed that C/EBPb regulates almost all the increase of H3K27ac (99.3%) during decidualization. Taken together, our study showed that C/EBPb is one of master regulator for decidualization.

研究分野：生殖医学

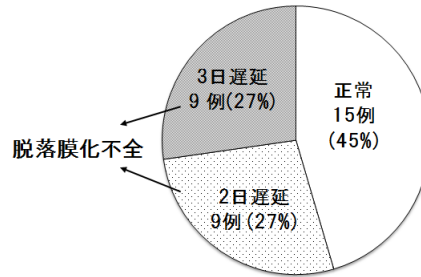
キーワード：脱落膜化 子宮内膜間質細胞 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜の脱落膜化は、着床の成立や妊娠初期の妊娠維持には不可欠である。健康な女性において、約 22%もの周期が妊娠と認識されずに early pregnancy loss (着床後に妊娠継続できない状態) に陥っていると報告されている。すなわち、着床後に何らかの原因によって多くの妊娠継続が障害されている。我々が排卵後 11 日目の子宮内膜日付診を行ったところ、形態的に脱落膜化の重度の遅延を示している症例(脱落膜化不全)が実際に 27%の頻度で存在した (図 1)。

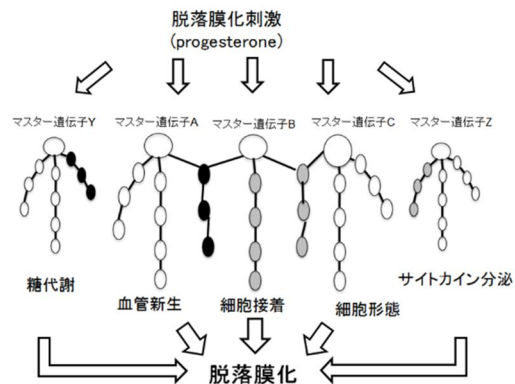
図 1. 排卵後 11 日目に行った子宮内膜日付診の結果



50%以上の症例が組織学的に脱落膜化が遅延し、27%は重度の遅延を呈していた。

脱落膜化不全により early pregnancy loss が引き起こされていることを示唆している。近年、脱落膜化不全は流産の増加に繋がるという報告も多く、着床後の妊娠成立・維持における脱落膜化の重要性が注目されている。子宮内膜間質細胞 (Endometrial stromal cell; ESC) の脱落膜化には、様々な遺伝子の発現変化が関与している。実際、次世代シーケンサーを用いた我々の解析では、脱落膜化の過程で約 2200 以上の遺伝子において、その発現が新たに誘導されたり、発現レベルが増加したり、また逆に発現が抑制されるなど、劇的な遺伝子発現の変化が起こっていた。また、これに伴い、プロモーターやエンハンサー領域のエピゲノム、特に H3K27ac 修飾がゲノムワイドに変化することを既に見出していた。この脱落膜化による遺伝子発現変化により、子宮内膜において、免疫、血管新生、細胞接着、細胞形態、糖代謝などの着床・妊娠維持に係る様々な機能が調節されている。近年、遺伝子発現調節に関しては、iPS 細胞の作製やダイレクト・リプログラミングで報告されているように、細胞の特異性や機能分化は、遺伝子発現調節のカギとなるマスター遺伝子によって規定されている。つまり、主に転写因子である少数の

図 2 マスター遺伝子による転写制御ネットワーク



マスター遺伝子が下流の遺伝子の発現変化やエピゲノム変化を引き起こすことによって、細胞の機能分化を調節しているのである (図 2)。申請時に、脱落膜化によって発現変化する約 2200 以上の遺伝子のデータをもとに上流ネットワーク解析を行い、いくつかのマスター遺伝子候補を絞り込んでいた。我々は、子宮内膜間質細胞では、脱落膜化に伴って転写因子であるマスター遺伝子が下流の遺伝子の発現を調節するという転写制御ネットワークが活性化されること、そして、このネットワークが複数存在して機能することにより、脱落膜化という細胞分化が誘導されていると考えている (図 2)。マスター遺伝子による転写制御ネットワーク機構は、遺伝子発現・細胞機能分化の中心的機構である。これまで、脱落膜化に重要な役割を果たすとされている転写因子は複数報告されているものの、脱落膜化のマスター遺伝子は未だ証明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析によるビッグデータを基盤として、まず、脱落膜化で活性化されるマスター遺伝子候補を絞り込む。次に、このマスター遺伝子をノックダウンや、強制発現することでマスター遺伝子を中心としたエピゲノムも含めた転

写制御ネットワーク機構の全容を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 候補マスター転写因子によるトランスクリプトームの変化

ESC に候補マスター転写因子の SiRNA を用いて発現をノックダウンさせた後、細胞を cAMP で 4 日間培養し脱落膜化を誘導する。ゲノムワイド遺伝子発現を RNA シークエンスにより調べる。SiRNA によるノックダウンによって mRNA 発現が変化する遺伝子は、直接または間接的に、転写因子の下流に存在して働く遺伝子として同定できる。これらの遺伝子群を Gene Ontology 解析にかけ、この遺伝子群の機能を解析する。

#### (2) 遺伝子導入による脱落膜化細胞の作製

レトロウイルスを用いた強制発現系により、候補マスター転写因子を ESC に遺伝子導入する。これにより、脱落膜化細胞に分化させることができるかを脱落膜化マーカー遺伝子発現誘導が起こるかで検討する。

#### (3) マスター転写因子による脱落膜化ゲノムワイドエピゲノムの変化の検討

候補マスター遺伝子をノックダウンすることで、脱落膜化でおこるべきエピゲノム変化が抑制されるかをゲノムワイドに ChIP シークエンスにより調べる。これにより、マスター転写因子は、エピゲノム変化の観点からも脱落膜化を制御する転写因子であるかを検討する。

### 4. 研究成果

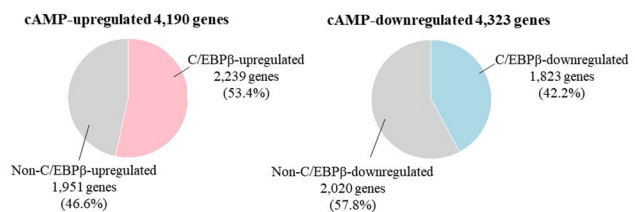
(1) まず、候補マスター遺伝子のうち、C/EBPβ に着目して研究を行った。

C/EBPβ をノックダウンした細胞においては、脱落膜化で上昇あるいは低下する遺伝子のうち、約 50% の発現変化が消失した (図 3)。つまり、C/EBPβ は脱落膜化で起こる多くの遺伝子発現変化を制御する転写因子であることが分かった。また、これらの遺伝子群を Gene

Ontology 解析にかけ、この遺伝子群の機能を解析したところ、脱落膜化で変化することが知られている血管新生、炎症反応、代謝、免疫反応、細胞増殖抑制といった機能に關与する遺伝子であることが分かった。つまり、C/EBPβ は脱落膜化を制御するマスター遺伝子の一つであると考えられた。尚、別の候補マスター遺伝子については、それぞれ強制発現用のレトロウイルスベクターを作製し、非脱落膜化 ESC に遺伝子導入を行った。しかし、脱落膜化の指標となる脱落膜化マーカー遺伝子発現の誘導は起こらなかった。よって、これらの候補遺伝子の詳細な検討は行わなかった。

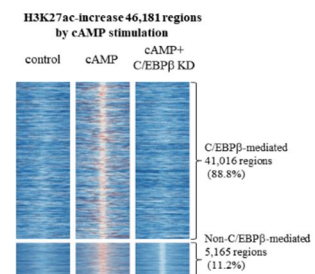
(2) 次に、脱落膜化におけるゲノムワイドエピゲノム変化への C/EBPβ の関与を検討した。C/EBPβ をノックダウンした細胞においては、脱落膜化でヒストンアセチル化 (H3K27ac) 修飾が誘導される 46181 領域のうち、約 90%

図3：C/EBPβによる脱落膜化におけるゲノムワイド遺伝子発現制御



脱落膜化において、C/EBPβは多くの遺伝子の発現を制御する。

図4：C/EBPβによる脱落膜化におけるゲノムワイドH3K27ac制御



脱落膜化において、C/EBPβはゲノムワイドなH3K27ac上昇を制御する。

にあたる 41016 領域でその変化が消失した（図 4）。つまり、C/EBP $\beta$ は脱落膜化でおこるゲノムワイドエピゲノム変化の多くを制御する転写因子であることが分かった。

以上の結果より、当初の研究計画と多少異なるが、転写因子 C/EBP $\beta$ の脱落膜化におけるマスター遺伝子としての重要性をゲノムワイドな視点から追及することができた。さらに、C/EBP $\beta$ は脱落膜化における遺伝子発現のみならず、ヒストン修飾変化の多くも司っていることが分かった。脱落膜化におけるゲノムワイドエピゲノム変化については、我々が世界に先がけて証明した事象であり、この制御機構を証明するに至ったことは非常に価値があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村功、高木遥香、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、前川亮、竹谷俊明、浅田裕美、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写因子Wilms' tumor suppressor gene(WT1)によるヒト子宮内膜間質細胞(ESC)の脱落膜化における新たな転写調節機構
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 品川征大、田村功、前川亮、白蓋雄一郎、竹谷俊明、浅田裕美、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴うVegf遺伝子発現の転写調節機構の解明
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 I.Tamura, H.Takagi, Y.Shirafuta, Y.Mihara, M.Shinagawa, R.Maekawa, T.Taketani, H.Asada, H.Tamura, N.Sugino
2. 発表標題 Novel function of a transcription factor WT1 in regulating decidualization in human endometrial stromal cells and its molecular mechanism
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----