

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09230

研究課題名(和文) 子宮内膜脱落膜化における C/EBPbによるゲノムワイドヒストン制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms by which C/EBPb induces genome-wide H3K27ac during decidualization of human endometrial stromal cells

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脱落膜化において、C/EBPbは、H3K27acをゲノムワイドに制御することで多くの脱落膜化関連遺伝子の発現調節を行っている。本研究ではその詳細な機序を解明することを目的とした。C/EBPbは epigenetic factorであるPGC-1aの発現を上昇させ、さらにPGC-1aやp300と複合体を形成することで、H3K27acを誘導しているという新たなメカニズムが明らかとなった。PGC-1aの子宮内膜における役割はこれまで不明だったが、エピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献しているという新たな役割を見出した。さらに、PGC1aは脱落膜化における免疫制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により子宮内膜間質細胞における遺伝子発現調節機構の一つが明らかとなった。脱落膜化は着床現象に必須の事象である。よって、本研究により脱落膜化の調節機構のひとつが明らかとなり、未だ詳細が不明であるヒト着床現象の解明につながると考えられる。このことは将来の不妊症治療にもつながるため、社会的意義がある研究である。

研究成果の概要(英文)：C/EBPb regulates the expression of many decidualization-related genes through the genome-wide regulation of H3K27ac modification. In this study, we aimed to elucidate the detailed mechanism by which C/EBPb induces H3K27ac. We found that C/EBPb up-regulates the expression of PGC1a, which is an epigenetic transcription factor. In addition, C/EBPb forms a complex with PGC-1a and p300 to induce H3K27ac. Although the role of PGC-1a in the human endometrium has been unclear, our study demonstrated that PGC-1a contributes to decidualization by inducing epigenomic changes. Furthermore, PGC-1a may be involved in the immune regulation during 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 C/EBPb PGC-1a

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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するために必須の現象である。子宮内膜間質細胞の脱落膜化では、多くの遺伝子の発現変化が起こる。C/EBPβは脱落膜化に必須な転写因子として知られている。我々は、脱落膜化において発現が変化する遺伝子のうち、C/EBPβにより調節を受ける多くの遺伝子を RNA シークエンスを用いることでゲノムワイドに同定した。つまり、C/EBPβは、ゲノムワイドに多くの遺伝子発現を制御することで脱落膜化を調節している重要な転写因子であることを証明していた。また、我々は脱落膜化に伴う遺伝子発現調節を「転写因子による調節」だけでなく「エピジェネティクスによる調節」の視点からの解明に努めてきた。脱落膜化により多くの遺伝子において promoter や enhancer 領域でヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac) が誘導されることを報告してきた。そして、興味深いことに C/EBPβ をノックダウンすることで、多くの遺伝子においてこの H3K27ac 誘導が消失することが分かった。つまり、C/EBPβは、H3K27ac 修飾をゲノムワイドに制御することで、多くの脱落膜化関連遺伝子の発現調節を行っていることが示唆された。しかし、どのように C/EBPβが H3K27ac 修飾を制御しているかは不明なままであった。ところで、H3K27ac は Histone Acetyltransferase (HAT) 活性を持つタンパク質やそれをリクルートさせる cofactor により誘導される。これらは、epigenetic factor と呼ばれ、promoter や enhancer に結合することでヒストン修飾を調節する。よって、脱落膜化において、C/EBPβがこれらの epigenetic factor の発現を制御することで、ゲノムワイドに H3K27ac 修飾状態を調節している可能性があると考えた。Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1) は、promoter や enhancer に結合することで H3K27ac 修飾を誘導する epigenetic factor であるといわれており、脱落膜化においてはその発現が上昇する。よって、C/EBPβは、PGC-1 の発現を制御することでゲノムワイドな H3K27ac を調節していると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、「C/EBPβは PGC-1 遺伝子の発現を増加させることで H3K27ac 修飾を調節している」という仮説を証明することを目的とした。そのために、脱落膜化過程における C/EBPβによる PGC-1 の発現調節機構を明らかにし、その上で、C/EBPβによる H3K27ac 誘導に PGC-1 が実際に関与しているかを証明することとした。

3. 研究の方法

(1) 脱落膜化における C/EBPβによる PGC-1 遺伝子発現調節機構の解明

患者の同意を得た上で、増殖期後期の子宮内膜から間質細胞を分離・培養し以下の実験に供した。脱落膜化の誘導は、子宮内膜間質細胞を cAMP (0.5 mM) で4日間培養することで行った。遺伝子のノックダウンは siRNA を用いた。脱落膜化による PGC-1 enhancer 領域への C/EBPβの結合を ChIP assay で調べた。また、Luciferase assay により enhancer 領域の転写活性を測定した。さらに、ゲノム編集を用いて enhancer 領域を欠失した細胞 (HepG2細胞) を作成、PGC-1 遺伝子発現の変化を調べた。

(2) 脱落膜化マーカー遺伝子における H3K27ac 変化への PGC-1α の関与

脱落膜化マーカー遺伝子 (IGFBP1、PRL) は脱落膜化により promoter や enhancer 領域の H3K27ac が上昇する。PGC-1α がどのようにこれに関与しているかを PGC-1α ノックダウン下で ChIP assay を行い調べた。

(3) PGC-1 α により制御される脱落膜化関連遺伝子の同定

RNAシーケンスにより、PGC-1 α により制御される脱落膜化関連遺伝子をゲノムワイドに同定した。

4. 研究成果

(1) 脱落膜化におけるC/EBP β による

PGC-1 遺伝子発現調節機構の解明

cAMP 刺激により上昇する PGC-1 α 発現は、C/EBP β のノックダウンにより低下した。PGC-1 遺伝子には、第2イントロンに存在する enhancer 領域にC/EBP β の結合配列が存在することを公共のChIP シークエンスデータを参照することで見出した。その領域に、脱落膜化刺激により実際に C/EBP β が結合することをChIP assayを用いて証明した。また、同部位が enhancer 活性を持つことをLuciferase assayで証明した。さらに、ゲノム編集法を用いて PGC-1 の enhancer 領域を欠失させた HepG2 細胞を作成し、enhancer 活性を検討した。

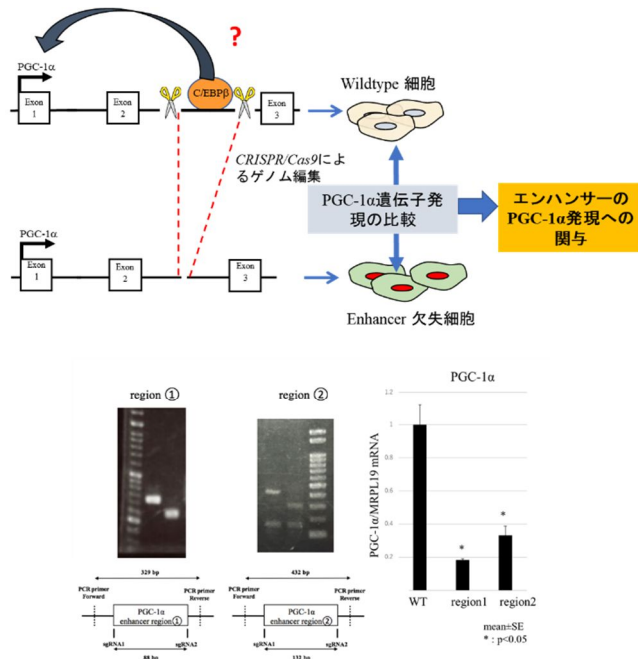


図1：ゲノム編集による内在性のエンハンサー領域の欠失細胞の作製と enhancer 領域の PGC-1 α 発現への関与

enhancer 欠失細胞では PGC-1 α mRNA 発現が減少した

enhancer 領域を欠失させた細胞においては、PGC-1 発現が有意に抑制された(図1)。以上より、脱落膜化における、C/EBP β による PGC-1 発現調節機構の詳細を解明するに至った。

(2) 脱落膜化マーカー遺伝子における H3K27ac 変化への PGC-1 α の関与

まず、脱落膜化マーカーである IGFBP-1 遺伝子と PRL 遺伝子発現調節への PGC-1 α の関与を検討した。PGC-1 α のノックダウンにより cAMP で誘導される IGFBP1、PRL 発現上昇は抑制された。また、cAMP 刺激により、PGC-1 α はこれらの遺伝子の C/EBP β 結合領域に recruit されることがわかった(図2)。さら

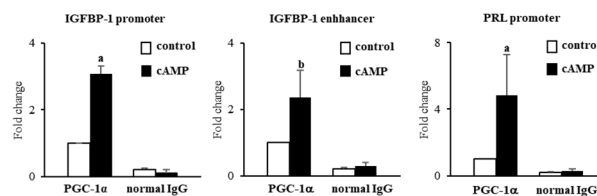
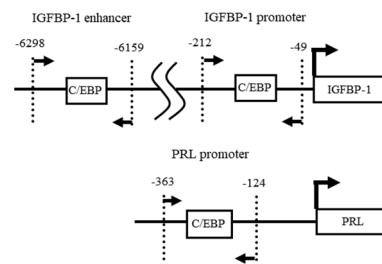


図2：cAMP刺激によりIGFBP-1、PRL遺伝子のC/EBP β 結合領域にPGC-1 α がrecruitされる(ChIP assay)

に、PGC-1 α をノックダウンすることで、cAMP 刺激により誘導される promoter 領域への HAT 因子(p300)の結合や、H3K27ac レベルが低下することがわかった。以上のことから、PGC-1 α は C/EBP β や p300 と転写因子複合体を形成することで脱落膜化マーカー遺伝子発現に関与していることがわかった。

(3) PGC-1 α により制御される脱落膜化関連遺伝子の同定

脱落膜化において、PGC-1 α により発現が制御される遺伝子を RNA シークエンスを用いてゲノムワイドに同定した。多くの遺伝子が同定され、これらの遺伝子の機能を Gene ontology 解析で検討したところ、免疫に関連する遺伝子が多く含まれていることがわかった。よって、脱落膜化における免疫機能調節に PGC-1 α が関与している可能性が示唆された。

(4) まとめ

脱落膜化において、C/EBP β は PGC-1 α の発現を上昇させ、さらに PGC-1 α や p300 と複合体を形成することで、H3K27acを誘導しているという新たなメカニズムが明らかとなった(図3)。PGC-1 α の子宮内膜における役割はこれまで不

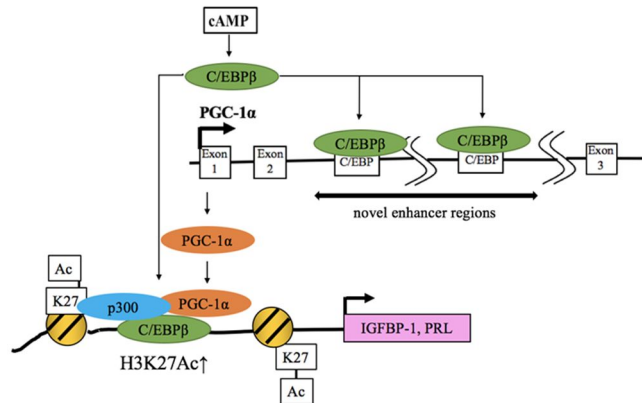


図3 : C/EBP β -PGC-1 α pathwayによる脱落膜化における H3K27ac誘導機構

明だったが、エピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献することという新たな役割を見出した。さらに、PGC1 α は脱落膜化における免疫制御に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamura Isao, Maekawa Ryo, Jozaki Kosuke, Ohkawa Yasuyuki, Takagi Haruka, Doi-Tanaka Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 520
2. 論文標題 Transcription factor C/EBP induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111085 ~ 111085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2020.111085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Isao, Takagi Haruka, Doi-Tanaka Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Shinagawa Masahiro, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 295
2. 論文標題 Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4673 ~ 4683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高木遥香、田村功、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程におけるPGC1Aの機能とその調節機構
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、清水奈都子、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程におけるPGC1 の機能とその調節機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程におけるPGC1 の機能とその調節機構
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Takagi, Isao Tamura, Yuichiro Shirafuta, Ryo Maekawa, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino.
2. 発表標題 The role and regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1) in decidualization of human endometrial stromal cells.
3. 学会等名 The 52th SSR anual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Takagi, Isao Tamura, Yuichiro Shirafuta, Norihiro Sugino.
2. 発表標題 The role and regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1Aa) in decidualization of human endometrial stromal cells.
3. 学会等名 SSR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、清水奈都子、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写共役因子PGC1 はC/EBPB 、p300 と転写複合体を形成しエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献する。
3. 学会等名 第24回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 功、高木遥香、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由美子、前川 亮、竹谷俊明、佐藤 俊、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写因子Wilms tumor 1 (WT1)は子宮内膜間質細胞脱落膜化における脂質蓄積を制御する
3. 学会等名 第25回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Isao Tamura, Ryo Maekawa, Haruka Takagi, Natsuko Shimizu, Yumiko Tanaka-Doi, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Toshiaki Taketani, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
2. 発表標題 C/EBP β a transcription factor, genome-widely regulates gene expression through H3K27ac modifications during decidualization of human endometrial stromal cells (ESCs)
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruka Takagi, Isao Tamura, Natsuko Shimizu, Yumiko Tanaka, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Masahiro Shinagawa, Ryo Maekawa, Toshiaki Taketani, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino.
2. 発表標題 Transcriptional coactivator PGC1 α contributes to decidualization by forming a transcription complex with C/EBP β / p300 and inducing epigenomic changes
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 功、前川 亮、田中 結美子、高木 遥香、白蓋雄一郎、三原由美子、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における転写因子C/EBP β を介したヒストン修飾による遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、清水奈都子、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写共役因子PGC-1 はC/EBP 、 p300と転写複合体を形成しエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献する
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、藤村大志、清水奈都子、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写共役因子PGC-1 はC/EBP 、 p300と転写複合体を形成しエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献する
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、藤村大志、清水奈都子、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写共役因子PGC-1aはC/EBPb、 p300と転写複合体を形成しエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献する
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木遥香、田村功、藤村大志、清水奈都子、田中結美子、白蓋雄一郎、三原由実子、前川亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 転写共役因子PGC-1aはC/EBPb、 p300と転写複合体を形成しエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献する
3. 学会等名 第113回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------