

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16772

研究課題名(和文) 卵巣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

研究課題名(英文) C/EBP β regulates Vegf gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats

研究代表者

品川 征大 (SHINAGAWA, Masahiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50814472

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)：排卵とそれに伴う黄体化は妊娠の成立・維持に不可欠な現象である。また、黄体形成には血管新生が不可欠であり、この血管新生を調節する因子がVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)である。本研究ではLHサーージ後のラット顆粒膜細胞の黄体化過程におけるVegf遺伝子発現は、HIF1ではなく、C/EBPにより調節されていること、また転写因子に加えて、ヒストン修飾やクロマチン構造変化も関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、我々はラット顆粒膜細胞におけるVegf遺伝子発現制御にC/EBP β が関与していることを初めて示した。Vegfは血管新生に重要な役割を担う遺伝子であるため、我々の結果は黄体化過程にある顆粒膜細胞における血管新生の制御機構を理解する一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ovulation and associated luteinization are essential for the establishment and maintenance of pregnancy. Angiogenesis is required for the corpus luteum formation, and the factors that regulate angiogenesis are Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf). We found that C/EBP β , but not HIF1, regulates Vegf gene expression by binding to the novel binding site in the rat Vegf promoter region. In addition to transcription factors, histone modifications and chromatin structure of the Vegf promoter region are involved in the regulation of Vegf expression.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵巣顆粒膜細胞 血管新生 VEGF C/EBP Epigenetics

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

排卵とそれに伴う黄体化は妊娠の成立・維持に不可欠な現象である。また、黄体形成には血管新生が不可欠である。LH サージ前は内茨膜細胞層に血管は限局して見られるが、LH サージ後に基底膜が融解するとともに血管内皮細胞が増殖し、血管は無血管領域である顆粒膜細胞層へ侵入し、非常に短時間で血管新生を完成させる。この血管新生を調節する因子が Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) である。実際に soluble VEGF receptor を用いて VEGF の作用をブロックすると、黄体の血管新生が阻害され、黄体は形成されない。本研究開始時点で、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は明らかではなかった。他の細胞、組織における *Vegf* 遺伝子の転写調節に関わる転写因子として、Hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) がよく知られているが、顆粒膜細胞における黄体化過程での *Vegf* 遺伝子の転写調節を HIF1 α が担っているかについての報告はない。一方で、排卵過程における血管新生に関わる *Abcb1b*, *Ap1n* などの遺伝子は、転写因子である CCAAT/Enhancer-binding protein β (C/EBP β) の制御を受けていることが C/EBP β ノックアウトマウスの研究から明らかとなっている (Mol Endocrinol, 2011)。さらに近年では遺伝子発現は転写因子のみならず、転写因子の受け手側である遺伝子プロモーター領域の変化、すなわちヒストン修飾やそれに伴うクロマチン構造変化といったエピジェネティックな調節機構によって制御されていることが明らかとなっている。実際に我々は LH サージ後のプロゲステロン合成に関与する *StAR* や *Cyp19*, *Cyp11a1* 遺伝子の発現調節にエピジェネティックな転写調節機構が関与していることを報告している (Endocrinology, 2013, 2016)。我々は研究開始前に顆粒膜細胞において *Vegf* 遺伝子が LH サージを契機とし、排卵までの短時間に急速に増加することを確認した(図 1)。そこで本研究では、LH サージ後の卵巣顆粒膜細胞の黄体化に伴う *Vegf* 遺伝子発現にどのような転写因子が関与するかを明らかにし、さらに、転写因子に加えて遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾やクロマチン構造変化といったエピジェネティックな調節機構が *Vegf* 遺伝子の転写調節に関与するかを明らかにすることを目的とした。

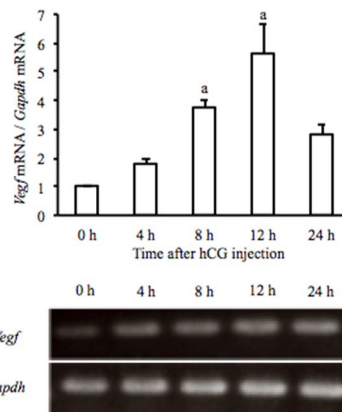


図 1 *Vegf* mRNA 発現変化

2. 研究の目的

本研究では、黄体化過程のラット顆粒膜細胞における、*Vegf* 遺伝子発現への HIF1 α と C/EBP β の関与を解明するとともに、エピジェネティックな転写調節機構の関与も明らかにすることを目的とした。

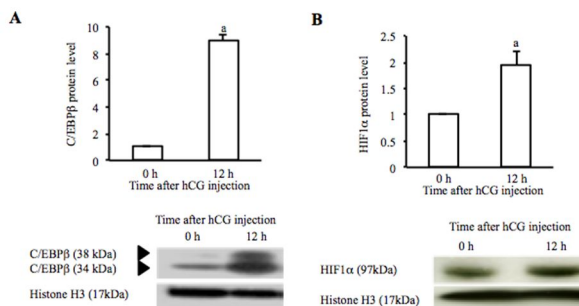


図 2 C/EBP β 、HIF1 α の蛋白発現変化

3. 研究の方法

3 週齢雌ラットに eCG-hCG 投与による過排卵刺激を行い、hCG 投与前 (0 h) と投与後 12 h の黄体化顆粒膜細胞を回収し、HIF1 α と C/EBP β の蛋白発現変化、*Vegf* 遺伝子プロモーター領域における HIF1 α と C/EBP β の結合 (ChIP assay)、C/EBP β 結合配列および HIF1 α 結合配列の変異挿入による転写活性の変化 (Luciferase assay) を調べた。また、それぞれの転写因子のノックダウンによる *Vegf* 遺伝子発現の変化も調べた。さらにヒストン修飾変化 (ChIP assay) とクロマチン構造変化 (FAIRE-qPCR) についても検討した。

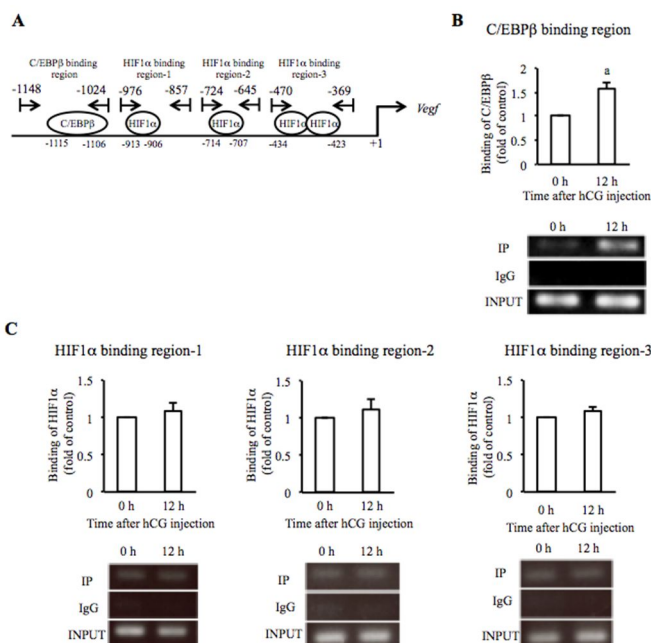


図 3 C/EBP β 、HIF1 α の *Vegf* 遺伝子プロモーター領域への結合変化

4. 研究成果

C/EBP β と HIF1 α の蛋白発現が hCG 投与後の顆粒膜細胞で上昇するか Western blotting 法を用いて検討した。C/EBP β (図 2A)、HIF1 α (図 2B) 蛋白発現は hCG 投与前から発現して

おり、hCG 投与後に有意に増加した。

顆粒膜細胞における C/EBPβ、HIF1α の *Vegf* 遺伝子プロモーター領域への結合変化を ChIP assay を用いて検討した。まず JASPAR データベースを用いて C/EBPβ、HIF1α の転写因子結合配列を同定した (図 3A)。*Vegf* 遺伝子プロモーター領域への C/EBPβ の結合は、hCG 投与後 12 時間で有意に増加した (図 3B)。一方、HIF1α の結合は増加しなかった (図 3C)。これらの結果から、ラット顆粒膜細胞の黄体化過程において、HIF1α ではなく C/EBPβ がプロモーター領域に結合することで *Vegf* 遺伝子発現を制御していることが示された。

C/EBPβ 結合領域の *Vegf* 遺伝子発現への関与を詳細に検討するため、siRNA を用いて C/EBPβ ノックダウンを行った。顆粒膜細胞はノックダウン効率が悪いいため、KGN 細胞 (ヒト顆粒膜細胞腫由来細胞株) を使用した。KGN 細胞は hCG 刺激に反応しないため、hCG のセカンドメッセンジャーである cAMP を使用し、cAMP 刺激で *VEGF* mRNA が上昇することを確認した (図 4A)。siRNA を用いて C/EBPβ のノックダウンを行い、C/EBPβ 蛋白がコントロール細胞、cAMP 刺激細胞ともにノックダウンされていることを確認した (図 4B)。cAMP 刺激で誘導される *VEGF* mRNA は C/EBPβ ノックダウンにより有意に抑制された (図 4C)。

Vegf 遺伝子プロモーター領域における C/EBPβ、HIF1α 結合領域の転写活性を調べるため、KGN 細胞に図 5A に示す *Vegf* プロモーターコンストラクトを導入し、Luciferase assay を行った (図 5A)。プロモーターコンストラクト (-1171 bp から +115 bp) をトランスフェクションすると、cAMP 刺激により Luciferase 活性は上昇した。C/EBPβ 結合配列を欠失させると (-976 bp から +115 bp、C/EBPβ)、cAMP で誘導される Luciferase 活性は抑制された。HIF1α 結合配列に変異を加えても (-1171 bp から +115 bp、mutation of HREs)、Luciferase 活性に影響を与えなかった。さらに C/EBPβ ノックダウン条件下での Luciferase 活性を調べた。-1171 bp から +115 bp のコンストラクトと siRNA の両方を KGN 細胞に同時にトランスフェクションした後に cAMP で刺激を行った。cAMP 刺激で上昇する Luciferase 活性は C/EBPβ ノックダウンにより抑制された (図 5B)。以上より、cAMP 刺激下で C/EBPβ 結合領域は転写活性を有していること、HIF1α 結合領域は転写活性を有していないことが示された。さらに CoCl₂ 刺激により *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の転写活性は上昇したが、HIF1α 結合配列の変異によりその Luciferase 活性は抑制された (図 6)。

続いてヒストン修飾変化とクロマチン構造変化について検討した。転写抑制に働く H3K9me3 と H3K27me3 は hCG 投与後 12 時間で有意に低下した。転写促進に働く H3K4me3 は hCG 投与前後

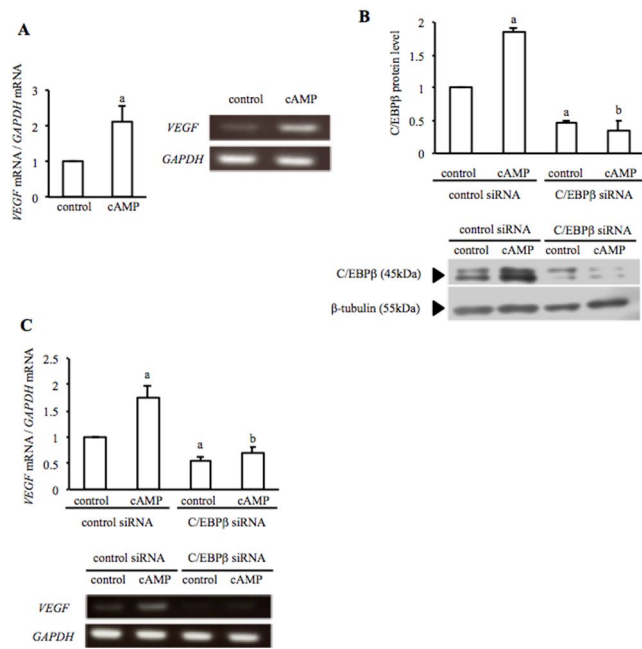


図 4 C/EBPβ ノックダウンによる *VEGF* mRNA 発現への影響

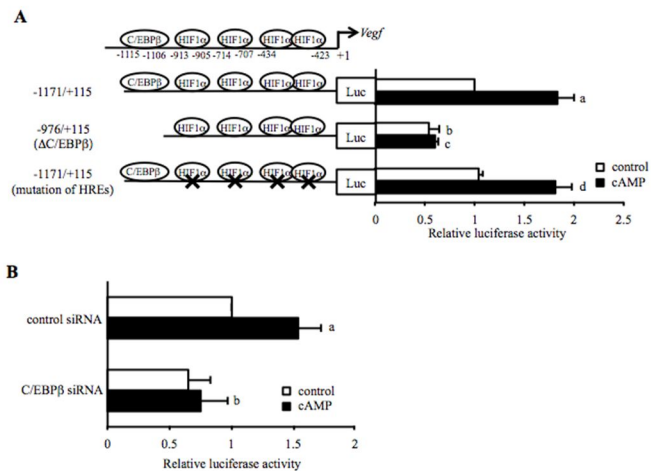


図 5 C/EBPβ、HIF1α 結合配列の転写活性

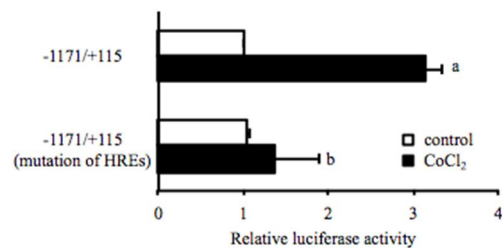


図 6 CoCl₂ 刺激による *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の転写活性

で変化を認めなかった (図 7A)。C/EBP β 結合領域周囲の hCG 投与前後におけるクロマチン構造変化を FAIRE-qPCR を用いて検討した。この領域の FAIRE enrichment 比は hCG 投与後に増加した (図 7B)。これは hCG 刺激により C/EBP β 結合領域周囲のクロマチン構造が弛緩したことを示している。C/EBP β 結合領域への H3K27me3 を誘導する EZH2 の結合が hCG 投与前後で変化するか ChIP assay を用いて検討した。C/EBP β 結合領域への EZH2 の結合は hCG 投与後に有意に抑制された (図 7C)。

これらの結果より我々は、LH サージ後のラット顆粒膜細胞の黄体化過程における *Vegf* 遺伝子発現は、HIF1 α ではなく、C/EBP β がラット *Vegf* 遺伝子プロモーター上の新たに発見した領域に結合することで *Vegf* 遺伝子発現を制御していることを明らかにした。また転写因子に加えて、ヒストン修飾やクロマチン構造変化も *Vegf* 遺伝子発現に関与していることも明らかにした。

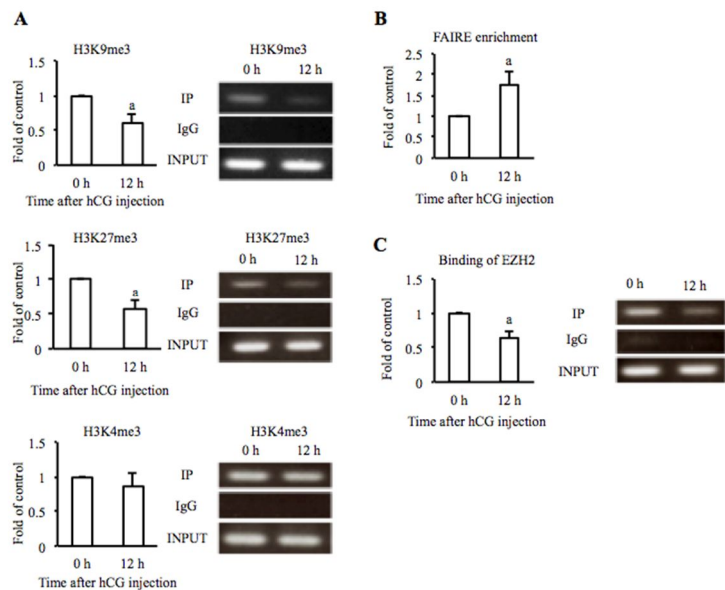


図 7 *Vegf* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾、クロマチン構造、EZH2 の結合変化

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Shinagawa Masahiro, Tamura Isao, Maekawa Ryo, Sato Shun, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Okada - Matsumoto Maki, Taketani Toshiaki, Asada Hiromi, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 C/EBP regulates Vegf gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1,10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-36566-y | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 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 M. Shinagawa, I. Tamura, R. Maekawa, Y. Shirafuta, M. Okada, T. Taketani, H. Asada, H. Tamura, N. Sugino |
| 2. 発表標題 C/EBP , but not Hif1 , regulates Vegf gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation after the LH surge in female rats |
| 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 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 品川征大、田村功、前川亮、高木遥香、白蓋雄一郎、三原由実子、佐藤俊、竹谷俊明、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遺伝子発現はHIF1aではなくC/EBPbが調節している |
| 3. 学会等名 第23回日本生殖内分泌学会学術総会 |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|