

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09632
研究課題名（和文）ヒト胎盤分化成熟機構の解明：分化状態を再現したモデル細胞から分化関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）The study of human trophoblast differentiation: epigenetic transcription regulation of aromatase gene

研究代表者
石原 直恵（琴村直恵）（Ishihara, Naoe）

藤田医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50571791
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アロマターゼ遺伝子の発現は、ヒト胎盤栄養膜細胞の分化過程で上昇することが知られている。我々は未分化栄養膜細胞のモデル細胞株（JEG-3）をエピジェネティック阻害剤で処理することにより、アロマターゼ遺伝子の発現が誘導されることを見出した。この分子機構を明らかにする目的で、阻害剤処理したJEG-3細胞のクロマチン構造を検討し、アロマターゼ遺伝子の発現に関わるエピジェネティックな変化を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
胎盤栄養膜細胞のモデル細胞を用いて、アロマターゼ（エストロゲン合成酵素）の遺伝子発現がエピジェネティックに制御される機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：During human placental trophoblast differentiation, the aromatase gene expression is significantly upregulated. To study the transcription mechanism of the aromatase gene in trophoblast cells, we used undifferentiated trophoblast model cell line (JEG-3). We found that a universal methyltransferase inhibitor treatment induces aromatase gene expression and changes chromatin structure in JEG-3 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：胎盤 栄養膜細胞 分化 アロマターゼ 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

胎盤は胎児の生育に必須の器官であり、胎児と母体間の選択的な物質輸送、胎盤性ホルモンの分泌、胎児の感染防御などの役割を担っている。胎盤の機能は、胎盤の主要構成細胞である栄養膜細胞が、未分化栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞や絨毛外栄養膜細胞に適切に分化することで維持される。アロマターゼ遺伝子は、エストロゲン合成酵素をコードしており、ヒト胎盤では、栄養膜細胞の分化に伴い発現が上昇することが知られている。胎盤で産生されたアロマターゼは、胎児由来のアンドロゲンをエストロゲンに変換することにより胎児の男性化を抑制することが報告されている¹⁾。栄養膜細胞の分化に伴うアロマターゼ遺伝子の発現の増加は顕著であり、遺伝子発現に関与するクロマチン構造の変化が予想されたが、これまで明らかではなかった。我々は、予備実験で、非特異的メチル化酵素阻害剤処理により JEG-3 細胞のアロマターゼ遺伝子の発現が顕著に上昇することを見出し、この薬剤を用いればアロマターゼ遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

JEG-3 細胞株を用いて、ヒト胎盤の主要構成細胞である栄養膜細胞が分化する過程の、アロマターゼ遺伝子の発現とクロマチン構造の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および解析法

JEG-3 細胞を阻害剤添加または無添加の状態に培養した。培養後の細胞を回収し、アロマターゼ遺伝子の発現の変化は、RT-PCR 法で、クロマチン構造の変化は、ChIP 法、及び、共同研究者が開発したクロマチン構造解析法（局所クロマチン分画法）²⁾で検討した。

(2) 阻害剤

エピジェネティック阻害剤は、① 非特異的メチル化酵素阻害剤、② EZH2（ヒストン H3K27 のメチル化酵素）阻害剤、③ CBP/p300（ヒストンアセチル化酵素）阻害剤を用いた。

4. 研究成果

(1) 非特異的メチル化酵素阻害剤処理による検討

非特異的メチル化酵素阻害剤（DZNep）で処理した JEG-3 細胞のクロマチン構造を検討した。DZNep 処理により、アロマターゼ遺伝子のプロモーター領域で転写に抑制的に働くヒストンメチル化修飾（H3K27me3）が減少する一方、転写活性化に働くヒストン修飾（H3K27ac）とその修飾に関わる酵素（CBP）の局在が増加していることを確認した（図 1 ①）。この結果は、DZNep 処理により、アロマターゼ遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造が、遺伝子発現にポジティブに働く状態に変化していることを示しており、予備実験で確認したアロマターゼ遺伝子の発現の上昇と整合性がある。

(2) EZH2 阻害剤処理による検討

DZNep 処理で認められたヒストン H3K27 のメチル化修飾の減少がアロマターゼ遺伝子の発現に関与しているか明らかにするために、EZH2 阻害剤のアロマターゼ遺伝子に対する効果を検討した。EZH2 阻害剤処理によりアロマターゼ遺伝子プロモーター領域の H3K27me3 は顕著に減少したが H3K27ac と CBP の局在は変化せず、アロマターゼ遺伝子の発現の上昇も認められなかった (図1 ②)。また、DZNep 処理はアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造をオープンにするが、EZH2 阻害剤処理では変化が認められないことが局所クロマチン分画法を用いた解析により明らかになった。これらの結果より、DZNep は EZH2 以外のメチル化酵素を阻害しアロマターゼ遺伝子の発現を上昇させている可能性が示唆された。

(3) CBP/p300 阻害剤処理による検討

DZNep 処理で変化が認められた H3K27ac と CBP の局在がアロマターゼ遺伝子の発現に関与しているか明らかにするために、CBP/p300 阻害剤のアロマターゼ遺伝子に対する効果を検討した。CBP/p300 阻害剤処理により、CBP の局在は変化しなかったが、その活性が阻害されることにより H3K27ac のレベルとアロマターゼ遺伝子の発現が顕著に減少した (図1 ③)。

以上の結果は、エピジェネティック阻害剤 DZNep が JEG-3 細胞におけるアロマターゼ遺伝子の発現を正に制御し、その分子メカニズムに CBP が関与していることを示している。

現在、これまでの結果をまとめて学術誌に投稿準備を行っている。

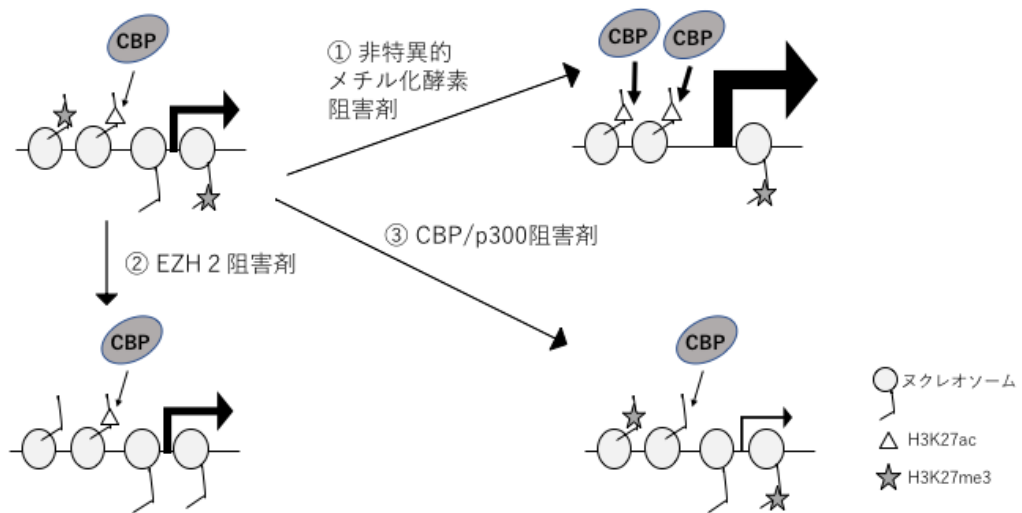


図1. エピジェネティック阻害剤処理によるJEG-3細胞のアロマターゼ遺伝子の発現とクロマチン構造の変化

<引用文献>

1. Shozu M, Akasofu K, Harada T, Kubota Y. A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, doi: 10.1210/jcem-72-3-560
2. Ishihara S, Sasagawa Y, Kameda T, Yamashita H, Umeda M, Kotomura N, Abe M, Shimono Y, Nikaido I. Local states of chromatin compaction at transcription start sites control transcription levels. *Nucleic Acids Res.* 2021, doi:10.1093/nar/gkab587.

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 Kotomura Naoe, Harada Nobuhiro, Shimono Yohei, Ishihara Satoru	4. 巻 27
2. 論文標題 Transcriptional regulation of CYP19 by cohesin-mediated chromosome tethering in human granulosa cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101086 ~ 101086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101086	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 Ishihara Satoru, Sasagawa Yohei, Kameda Takeru, Yamashita Hayato, Umeda Mana, Kotomura Naoe, Abe Masayuki, Shimono Yohei, Nikaido Itoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Local states of chromatin compaction at transcription start sites control transcription levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8007 ~ 8023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab587	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0件

〔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
研究分担者	石原 悟 (Ishihara Satoru) (00300723)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	下野 洋平 (Shimono Yohei) (90594630)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

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