

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791559

研究課題名(和文) ヒト子宮内膜間質細胞におけるプロゲステロンによる遺伝子特異的な調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a gene-specific regulatory mechanism with progesterone in the 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・助教

研究者番号：70464328

研究成果の概要(和文)：TNF- α 刺激により COX-2、Mn-SOD プロモーター領域への NF- κ B の結合が増加した。この作用はプロゲステロンにより COX-2 プロモーターでは抑制されたが、Mn-SOD プロモーターでは抑制されなかった。NF- κ B 結合領域のヒストンは、Mn-SOD の方が COX-2 に比べ低アセチル化状態であった。プロゲステロンによる遺伝子特異的な転写調節機構には COX-2、Mn-SOD プロモーター領域におけるクロマチン構造の違いが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：ChIP assay revealed that TNF α increased NF- κ B binding at both the COX-2 promoter and the Mn-SOD promoter, and that progesterone only inhibited the NF- κ B binding at the COX-2 promoter. The histone acetylation level of the NF- κ B response element of the Mn-SOD promoter was lower than that of the COX-2 promoter. The gene-specific action of progesterone may be due to the difference in chromatin structure at the NF- κ B response elements in the COX-2 promoter and Mn-SOD promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜間質細胞は、サイトカイン、成長因子、プロスタグランジンなど様々な生理活性物質を産生し、さらに、この産生作用が卵巣からの性ステロイドホルモンによって影

響をうけることにより、月経周期でおこる子宮内膜の機能調節に関与している。たとえば、ヒト子宮内膜間質細胞において、プロゲステロンの消退により NF- κ B という転写因子が活性化され、COX-2 発現と prostaglandin

F2・(PGF2・)産生が増加し、子宮内膜の剥脱(月経)が引き起こされる。

着床期にはサイトカインが豊富な子宮内膜環境となる。細胞はサイトカイン刺激により、ミトコンドリア内で活性酸素が産生され、細胞死が引き起こされることが知られているが、子宮内膜間質細胞は、TNF- α などのサイトカインの刺激を受けると、ミトコンドリア内でMn-SODが短時間で増加し活性酸素を消去し細胞生命を維持し子宮内膜の機能維持に働いている。このTNF- α によるMn-SODの誘導にもNF- κ Bという転写因子が関与している。

COX-2とMn-SODは両者とも、プロモーター領域にNF- κ B response elementを持ち、TNF- α の刺激により短時間でその発現が誘導されるacute inflammatory response geneであるが、興味深いことに、TNF- α によるCOX-2 mRNAの誘導はプロゲステロンにより抑制されるが、TNF- α によるMn-SOD mRNAの誘導はプロゲステロンにより抑制されないという結果を我々は見出している。すなわち子宮内膜間質細胞には、プロゲステロンによる遺伝子特異的な調節機構が存在するのである。

黄体期中期の着床期では、プロゲステロン値が高いため、TNF- α -COX-2-PGF2・系が抑制されて、子宮内膜の剥脱に作用するPGF2・が増加しない。一方、TNF- α -Mn-SOD系はプロゲステロンによって影響を受けないので細胞生命維持は保たれることになり、着床期の子宮内膜でおこっている合目的な生理現象と捉えることができる。しかし、このプロゲステロンによる遺伝子特異的な調節機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、TNF- α によるCOX-2とMn-SODの発現増加作用において、プロゲステロンがどのような機序でCOX-2特異的に抑制作用を示すのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)患者の同意を得た上で、増殖期後期の子宮内膜から子宮内膜間質細胞を分離した。まずTNF- α によるCOX-2およびMn-SODの発現

調節に関わる細胞内情報伝達経路を明らかにするため、以下の実験を行った。

① 転写因子の一つであるNF- κ Bは、炎症性反応に対する様々な遺伝子発現についてコントロールすることが知られており、COX-2やMn-SODもその一つであり、またCOX-2、Mn-SODのプロモーター領域には、NF- κ B response elementが存在している。そこで、TNF- α (1 ng/ml)を添加し6時間培養後に細胞の固定・回収を行い、COX-2およびMn-SODプロモーター領域におけるNF- κ B response elementに対するNF- κ Bの結合についてクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)にて測定した。尚、COX-2およびMn-SODプロモーター領域にはそれぞれ2つ、1つのNF- κ B response elementが存在しており、それぞれに対してプライマーを作成し測定した。

② NF- κ BはI- κ Bと結合し細胞質に局在しているが、I- κ Bがリン酸化されることでNF- κ Bは核内へ移行する。そこでTNF- α によるI- κ Bのリン酸化に及ぼす影響を検討するため、TNF- α (1 ng/ml)を添加し培養を行い、経時的なtotal I- κ Bとリン酸化I- κ Bタンパク発現の変化を、ウエスタンブロットティング法を用いて測定した。

(2)プロゲステロンが細胞内情報伝達経路のどこで作用しているかを明らかにするため、以下の実験を行った。

① TNF- α (1 ng/ml)刺激下でmedroxyprogesterone acetate(MPA, 10^{-6} mol/l)を添加し6時間培養後に細胞の固定・回収を行いCOX-2およびMn-SODプロモーター領域におけるNF- κ B response elementに対するNF- κ Bの結合をクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)にて測定した。

② TNF- α (1 ng/ml)刺激下でMPA(10^{-6} mol/l)を添加し培養を行い、経時的なtotal I- κ Bとリン酸化I- κ Bタンパク発現の変化を、ウエスタンブロットティング法を用いて測定した。

(3)COX-2およびMn-SODプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化状態を検討するため、TNF- α (1 ng/ml)刺激下でMPA(10^{-6} mol/l)を添加し6時間培養後に細胞の固定・回収を行い、Anti-acetylated histone H3, H4抗体を用いてクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)にて解析した。

(4)プロゲステロンは、その受容体(progesterone receptor; PR)と結合することにより作用を示し、またPRには核内PR

と膜型 PR が存在することが知られている。ヒト子宮内膜間質細胞における COX-2 発現は 6 時間培養後にプロゲステロンにより抑制が認められたことから、プロゲステロンの作用は classical pathway である核内 PR を介している可能性がある。そこで、プロゲステロンの遺伝子発現抑制効果が PR を介しているかどうか調べるため、核内 PR に対する si-RNA を作成し Lipofection 法にて細胞内に導入した後、TNF- α (1 ng/ml) 刺激下で MPA (10⁻⁶ mol/l) を添加し 6 時間培養後回収し、PR siRNA 導入細胞における COX-2 発現を Real time PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) ① TNF- α 添加により COX-2 および Mn-SOD プロモーター領域における NF- κ B response element に対する NF- κ B の結合は、それぞれ増加した。

② TNF- α 刺激により、リン酸化 I- κ B タンパク発現は 10 分後より誘導され、total I- κ B タンパク発現は 30 分後までに徐々に減少し、その後増加した。

(2) ① TNF- α 添加による NF- κ B response element に対する NF- κ B 結合の増加作用は、プロゲステロンにより COX-2 プロモーターでは抑制されたが、Mn-SOD プロモーターでは抑制されなかった。

② TNF- α 刺激により誘導された経時的な total I- κ B とリン酸化 I- κ B タンパク発現の変化は、プロゲステロンにより影響されなかった。

(3) NF- κ B 結合領域のヒストンは、Mn-SOD プロモーターの方が COX-2 プロモーターに比べ低アセチル化状態であった。また TNF- α やプロゲステロン添加によるアセチル化状態への影響は認めなかった。

(4) PR siRNA 導入細胞において COX-2 発現は TNF- α 刺激にて有意に増加したが MPA を同時に添加しても有意な発現の低下を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① 子宮内膜間質細胞 (ESC) における TNF α の COX-2、Mn-SOD 発現に及ぼす作用とプロゲステロンの影響. 田村功、竹谷俊明、他. 第 27 回日本受精着床学会総会・学術講演会、2009 年 8 月 6 日～7 日、国立京都国際会館 (京都市) .

② Differential modification of progesterone in TNF α -induced COX-2 and Mn-SOD expression in human endometrial stromal cell. I. Tamura, T. Taketani et al. 42th Annual Meeting of the Society for the Study on Reproduction, 18-22 July 2009, amsterdam.

③ Differential modification of progesterone in TNF α -induced cyclooxygenase-2 and manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. I. Tamura, T. Taketani et al. 25th European Society of Human Reproduction and Embryology, 28 June-1 July 2009, pittsburgh.

④ 子宮内膜間質細胞 (ESC) における TNF α の COX-2、Mn-SOD 発現に及ぼす作用とプロゲステロンの遺伝子特異的な影響. 田村功、竹谷俊明、他. 第 61 回日本産科婦人科学会、2009 年 4 月 3 日～5 日、国立京都国際会館 (京都市) .

⑤ 子宮内膜間質細胞 (ESC) における TNF α の COX-2、Mn-SOD 発現に及ぼす作用とプロゲステロンの遺伝子特異的な影響. 田村功、竹谷俊明、他. 第 82 回日本内分泌学会総会・学術講演会、2009 年 4 月 23 日～25 日、群馬県民会館 (前橋市) .

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹谷 俊明 (TAKETANI TOSHIAKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70464328

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし