

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09542

研究課題名(和文) 核内Fアクチン形成によるヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化機構の解明

研究課題名(英文) Nuclear F-actin formation is an integral part of decidualization in 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・講師

研究者番号：40610663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化では、遺伝子発現変化とそれに伴う機能変化が起こる。近年、細胞骨格の構成組織であるアクチンは細胞質でなく、核内にも存在することが明らかとなっており、その遺伝子発現制御への役割が着目されている。よって、本研究では脱落膜化における核内Fアクチンの形成とその機序、意義について調べた。脱落膜化過程では、核内Fアクチン形成が誘導され、この核内Fアクチン形成は、細胞増殖関連遺伝子の発現を低下させ、細胞増殖を抑制することで脱落膜化に貢献していた。また、核内Fアクチン形成は、脱落膜化に必須な転写因子であるC/EBP β により制御されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞骨格の構成組織であるアクチンは細胞質でなく、核内にも存在することが明らかとなっており、その遺伝子発現制御への役割が着目されている。特に核内Fアクチンの形成はある一定の細胞・条件下においてのみ報告されているが、脱落膜化のような体細胞の生理学的変化に関わっているという報告はない。よって、本研究により核内Fアクチンが持つ新たな機能の証明につながったと考える。

研究成果の概要(英文)：During decidualization, the actin cytoskeleton is dynamically reorganized for the endometrial stromal cell (ESC)s' morphological and functional changes. Although actin dynamically alters its polymerized state upon external stimuli not only in the cytoplasm, but also in the nucleus, nuclear actin dynamics during decidualization have not been elucidated. We showed that nuclear F-actin was specifically formed during decidualization of human ESCs. RNA-seq analyses revealed that the forced disassembly of nuclear F-actin resulted in the suppression of decidualization, accompanied with the abnormal upregulation of cell proliferation genes, leading to incomplete cell cycle arrest. C/EBP β , an important regulator for decidualization, was identified as a upstream factor regulating nuclear F-actin for decidualization. Taken together, nuclear F-actin regulated by C/EBP β induces cell cycle arrest for establishing the decidualized state of ESCs.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：核内アクチン 脱落膜化 C/EBP β 子宮内膜間質細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化では、ゲノムワイドなエピゲノム変化が起こることで多くの遺伝子発現変化とそれに伴う機能変化が起こることを我々は報告している。近年、細胞骨格の構成組織であるアクチンは細胞質でなく、核内に存在することが明らかとなっており、その遺伝子発現制御への役割が着目されている。特にアクチンが重合・繊維化した核内 F アクチンの形成は、ゲノムワイドなクロマチンの脱凝集と転写活性化に関わっている epigenetic 調節機構の一つであることが明らかになりつつある。よって、脱落膜化過程でも核内 F アクチンが形成され、脱落膜化におけるゲノムワイドな epigenetic 変化とそれに伴う遺伝子発現変化に深く関与している可能性が十分にあると考えられた。

2. 研究の目的

脱落膜化における核内アクチンの構造変化 (F アクチン形成) を詳細に観察すると同時に、F アクチン形成が、脱落膜化におけるエピゲノム変化や遺伝子発現変化・機能変化に関与しているかを解明し、脱落膜化における核内アクチンの重要性を証明することを申請時は目的とした。

3. 研究の方法

(1)レトロウイルスによる核内アクチン可視化子宮内膜間質細胞ラインの樹立

核内アクチン可視化 probe vector をレトロウイルスベクターに乗せ換え、これを初代培養子宮内膜間質細胞にインフェクションすることにより、より純度の高い核内アクチン可視化細胞ラインを樹立する。上記で樹立した細胞ラインを用いて、cAMP (0.5mM) で4日間培養することで脱落膜化を誘導する。タイムラプスイメージングを行い、核内 F アクチン形成過程をリアルタイムで観察する。

(2)核内 F アクチン形成により制御される脱落膜化関連遺伝子・機能の同定

核内 F アクチンの形成は、アクチン R62D 変異体 (アクチンの 62 番目のアルギニン残基をアスパラギン酸残基に置換したものを) を強制発現させることで阻害される。R62D 核内強制発現はレトロウイルス強制発現系を用いて作製する。cAMP によって誘導される脱落膜化が、R62D 強制発現により抑制されるかを脱落膜化マーカー遺伝子発現 (IGFBP-1、PRL) や細胞形態変化が抑制されるかで調べる。さらに、RNA sequence を行うことで、R62D 強制発現により発現が抑制される遺伝子をゲノムワイドに同定する。つまり、これらの遺伝子群が F アクチン形成により発現制御される脱落膜化関連遺伝子群である。この遺伝子群の Gene ontology 解析を行うことで、F アクチン形成により制御されている脱落膜化機能変化を抽出し、その機能解析を行う。

(3)核内 F アクチンを制御する因子の同定

脱落膜化において核内 F アクチン形成を制御する因子を(2)で抽出された F アクチン制御下遺伝子に対する上流解析を行うことで調べる。同定された因子をノックダウンすることで核内 F アクチン形成が阻害されるか調べる。

4. 研究成果

(1) レトロウイルスを用いて核内アクチン可視化 probe を強制発現することにより、核内アクチン可視化細胞ラインを樹立することに成功した。この細胞に cAMP で培養したところ、培養二

日目頃から GFP シグナルが線状に凝集した F アクチン構造が出現し、4 日目には多くの細胞の核内に F アクチンが出現した (図 1)。

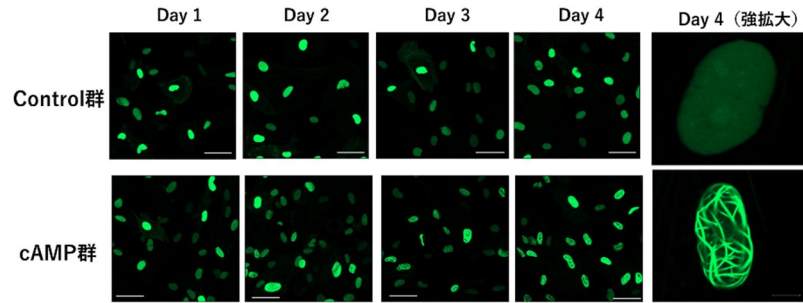


図 1 : 脱落膜化過程における核内 F アクチン形成

(2) 核内Fアクチン形成を阻害するために、アクチン変異体 (R62D) を核内に強制発現したところ、Fアクチン形成の阻害とともに、脱落膜化マーカー遺伝子発現

(IGFBP-1、PRL) が抑制された。以上より、核内Fアクチン形成は脱落膜化における調節機構の一つであることがわかった (図 2)。

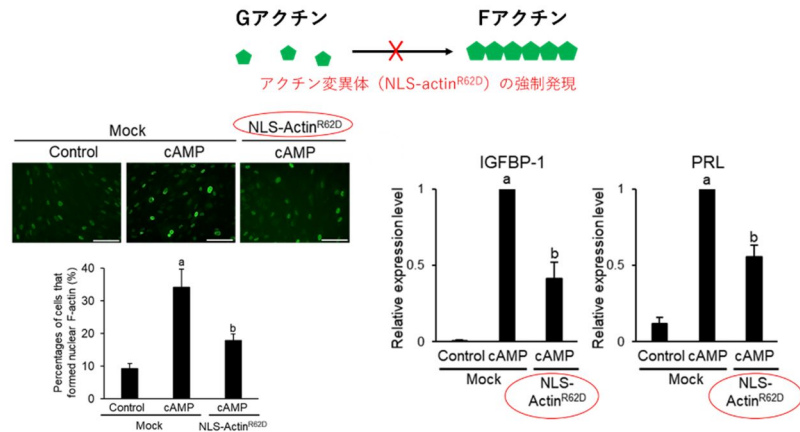


図2 : 核内 F アクチン形成阻害による脱落膜化抑制

(3) RNA sequence を行うことで、R62D 強制発現により発現が抑制される遺伝子をゲノムワイドに同定した。脱落膜化で発現が上昇するべき 709 遺伝子のうち核内 F アクチンがその上昇に関与していた遺伝子は、わずか 63 遺伝子 (8.8%) だった。一方脱落膜化で低下するべき 618 遺伝子のうち、約半分の 304 もの遺伝子が、F アクチンによりその発現低下が制御されていた (図 3) 。

よって、核内Fアクチン形成は、脱落膜化における転写抑制に関与していることがわかった。脱落膜化においては、epigenetic 変化によりゲノムワイドな転写活性化が起きることを我々は報告している。本研究開始時はこの epigenetic 変化による転写活性化に核内 F アクチン形成

が関与していると仮説を立てていたが、RNA sequence の結果からは転写活性化の関与はほとんどないことがわかった。よって、以後の研究では、epigenetic 変化

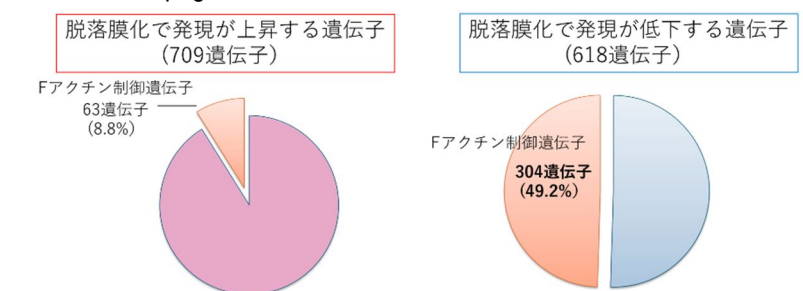


図 3 : 核内Fアクチンの脱落膜化におけるトランスクリプトームへの影響

への核内 F アクチンの関与については解析を行わないこととした。また、核内 F アクチンにより発現抑制される遺伝子は、細胞増殖に関与している遺伝子に集中していた。実際に、核内 F アクチン形成を阻害すると、脱落膜化で誘導されるべき細胞増殖低下が消失した。また、細胞増殖活性を Ki67 の染色で調べたところ、同様の結果であった。脱落膜化とは一種の分化現象であることを考慮すると、核内 F アクチン形成は細胞増殖を抑制することで脱落膜化という分化へのスイッチングを誘導していると考えられた。

(4) 核内Fアクチン形成を制御する因子を上流解析にて検索したところ、転写因子 C/EBPβ が抽出された。C/EBPβ は、脱落膜化を制御する重要な転写因子であることを我々はこれまで報告している。C/EBPβ を siRNA を用いてノックダウンすると、核内 F アクチン形成と細胞増殖低下も阻害

され、脱落膜化も阻害された。以上より、C/EBP β を介した核内Fアクチン形成は脱落膜化の調節機構の一つであることが明らかとなった。

(5)まとめ(図4): 脱落膜化過程では、核内Fアクチン形成が誘導される。この核内Fアクチン形成は、細胞増殖関連遺伝子の発現を低下させ、細胞増殖を抑制することで脱落膜化に貢献していた。また、核内Fアクチン形成は、脱落膜化に必須な転写因子であるC/EBP β により制御されていることが明らかとなった。

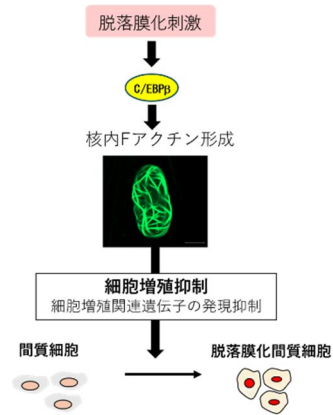


図4：核内Fアクチン形成の脱落膜化における役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Takagi Haruka, Tamura Isao, Fujimura Taishi, Doi-Tanaka Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcriptional coactivator PGC-1 contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBP and p300	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101874 ~ 101874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101874	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Isao, Fujimura Taishi, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Shirafuta Yuichiro, Kajimura Takuya, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 297
2. 論文標題 The essential glucose transporter GLUT1 is epigenetically upregulated by C/EBP and WT1 during decidualization of the endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101150 ~ 101150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田村 功、米田稔秀、高崎ひとみ、城下亜文、藤村大志、白蓋雄一郎、竹谷俊明、杉野法広
2. 発表標題 核内アクチンによるヒト子宮内膜間質細胞脱落膜化の調節機構の解明
3. 学会等名 第68回生殖医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田村 功、米田稔秀、高崎ひとみ、城下亜文、藤村大志、白蓋雄一郎、竹谷俊明、杉野法広
2. 発表標題 核内アクチンによるヒト子宮内膜間質細胞脱落膜化の調節機構の解明
3. 学会等名 第27回生殖内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Isao Tamura, Yoneda Toshihide, Hitomi Takasaki, Amon Shiroshita, Taishi Fujimura, Yuichiro Shirafuta, Norihiro Sugino1
2. 発表標題 Nuclear F-actin formation regulates decidualization of human endometrial stromal cells
3. 学会等名 SRI 70th annual scientific meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田村 功
2. 発表標題 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における遺伝子発現調節機構の解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中結美子、田村 功、藤村大志、白蓋雄一郎、前川 亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 異なる刺激方法により誘導された培養子宮内膜脱落膜化細胞における遺伝子発現の違い及びin vivoにおける脱落膜化細胞との比較
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 功
2. 発表標題 ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における遺伝子発現調節機構の解明
3. 学会等名 第74回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumiko Doi-Tanaka, Isao Tamura, Taishi Fujimura, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Ryo Maekawa, Toshiaki Taketani, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
2. 発表標題 Differential gene expression in decidualized human endometrial stromal cells induced by different stimulation methods and comparison with in vivo decidualization.
3. 学会等名 第74回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Isao Tamura, Taishi Fujimura, Yumiko Doi-Tanaka, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Ryo Maekawa, Toshiaki Taketani, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
2. 発表標題 The essential glucose transporter GLUT1 is epigenetically upregulated by C/EBPb and WT1 during decidualization of human endometrial stromal cells
3. 学会等名 第74回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 功、藤村大志、白蓋雄一郎、前川 亮、佐藤俊、田村博史、杉野法広
2. 発表標題 脱着膜化に不可欠な糖取り込みを制御するGLUT1は転写因子C/EBPbとWT1によりepigeneticに制御される
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤村 大志、田村 功、白蓋雄一郎、前川 亮、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着膜化における脂質蓄積を制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	田中結美子、田村 功、藤村大志、白蓋雄一郎、三原由美子 前川 亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題	異なる刺激方法により誘導された培養子宮内膜脱落膜化細胞における遺伝子発現の違い及びin vivoにおける脱落膜化細胞との比較
3. 学会等名	第26回生殖内分泌学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	田中結美子、田村 功、藤村大志、白蓋雄一郎、三原由美子 前川 亮、竹谷俊明、田村博史、杉野法広
2. 発表標題	異なる刺激方法により誘導された培養子宮内膜脱落膜化細胞における遺伝子発現の違い及びin vivoにおける脱落膜化細胞との比較
3. 学会等名	第40回受精着床学会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Isao Tamura, Taishi Fujimura, Yumiko Doi-Tanaka, Haruka Takagi, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Ryo Maekawa, Toshiaki Taketani, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
2. 発表標題	Novel function of Wilms tumor 1 in the regulation of lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization
3. 学会等名	第73回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	田村 功、藤村 大志、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114回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 田村 功、藤村 大志、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66回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 功、藤村 大志、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94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 功、藤村大志、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 脱落膜化に不可欠な糖取り込みを制御するGLUT1は転写因子C/EBP β とWT1によりepigeneticに制御される
3. 学会等名 第26回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中結美子、田村 功、藤村大志、白蓋雄一郎 三原由美子、竹谷俊明、田村博史、嶋村勝典、高崎彰久、杉野法広
2. 発表標題 不妊症患者における子宮内膜脱落膜化不全について
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	宮本 圭 (Miyamoto Kei) (40740684)	近畿大学・生物理工学部・准教授 (34419)	

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