

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）一般

研究期間：2010～2012

課題番号：22380152

研究課題名（和文）ウシ子宮内膜細胞におけるサーカディアン振動の発生解析と機能解明

研究課題名（英文） Generation of clock oscillators in bovine endometrial cells and their functions

研究代表者

服部 眞彰（HATTORI MASA-AKI）

九州大学・農学研究院・資源生物科学部門

研究者番号：60175536

研究成果の概要（和文）：

発情や黄体・妊娠による子宮環境の時空間的变化を子宮固有の時計機構から解析した。上皮細胞・間質細胞でも Rev-erb α 発現の減衰に伴って、PG 合成の律速酵素遺伝子 Ptgs2 発現が増加し、Rev-erb α のアンタゴニストにより、Ptgs2 の発現が劇的な増加が認められた。また、時計遺伝子 Bmal1 のノックダウンにより Ptgs2 発現の減少が認められた。妊娠あるいは発情回帰のキーとなるプロスタグランジン F2 α の生成が、時計機構によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study was performed to evaluate the roles of circadian clockwork in bovine uterus stromal and epithelial cells during the stages of estrous cycle and pregnancy, compared to the rat uterus cells. To analyze clock-controlled genes, we used siRNA against a core clock gene Bmal1 and an agonist or an antagonist to Rev-erb α . In the Bmal1-knockdowned stromal cells, Rev-erb α and Ptgs2 expression were decreased. However, the Ptgs2 gene was increased with Rev-erb α antagonist SR8278, but not its agonist heme, in both cell types. These results strongly suggest that the synthesis of prostaglandin is controlled under circadian clockwork.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：獣医畜産

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：子宮内膜細胞、細胞時計、代謝・内分泌制御

1. 研究開始当初の背景

生体の概日リズムを統御する中枢は、視床下部の前部に位置する視交叉上核にある。目より入力した信号は視神経を介して視交叉上核に伝達されると、ペースメーカーが駆動し、

神経シグナルや内分泌シグナルを介して生体の概日調節が見られる。その周期性は、コア時計遺伝子の転写—翻訳によって形成されるコアループフィードバックループによって調節されている。この時計機構は、生

体を構成するほぼ全ての器官や組織に内在し、個々の組織の末梢時計はそれぞれの生理機能に最も適した固有の時間位相を示すという概念が提示されている。いまや、時計機構は生理、代謝、行動だけではなく、生殖、発生、病態、成長、運動まで深く関わるものが考えられるようになった。

2. 研究の目的

発情や黄体・妊娠による子宮環境の時空間的变化を子宮固有の時計機構から明らかにするために、ウシ子宮内膜の上皮細胞と間質細胞を分離して培養できるというアドバンテージを生かして解析する。その戦略は、時計機構の入力系評価システムの構築、ペースメーカー振動に影響する入力系因子の評価、ペースメーカー振動に連動する出力系遺伝子群の評価などを通して、ステロイドホルモンの標的が異なる上皮細胞と間質細胞におけるサーカディアン振動の発生解析と機能解明する。

3. 研究の方法

ウシ子宮内膜の上皮細胞および間質細胞でのペースメーカーの発振機構と機能を解明するために、入力系、ペースメーカー、出力系の3成分に分けて解析する。上皮細胞および間質細胞でのペースメーカーを高い精度でモニターする。入力系評価システムの構築、ペースメーカー振動に影響する入力系因子の評価と検索、ならびにペースメーカー振動に呼応して振動的に発現する出力系遺伝子群の評価と検索を行って、さらに出力系の検証のために、コア時計遺伝子をターゲットにしたRNA干渉による影響を調べる。

4. 研究成果

(1) プロモーターベクターの設計と細胞への導入と振動解析

3連結のE-box (CACGTG)、ウシ *Bmal1* のプロモーター領域、あるいはマウス *Per1* プロモーター領域を組み込んだベクターを間質細胞に導入し、ステロイドホルモン (P4, E2)、甲状腺ホルモン (T3) あるいはフォルスコリンを添加して、プロモーター活性の振動をリアルタイムで計測した。同期化後5時間以内に活性のピークが見られたが、その後の振動は認められず、子宮内膜細胞における時計遺伝子の振動的な発現は微弱であることが推測された。

(2) ウシ子宮内膜上皮細胞における時計遺伝子の発現：エストラジオールの影響

ベクターを用いた時計遺伝子の発現は利点がないことが考えられたので、細胞の同期

化後、経時的にRNAを分離して、RT-qPCRにより遺伝子の発現を測定した (図1)。エ

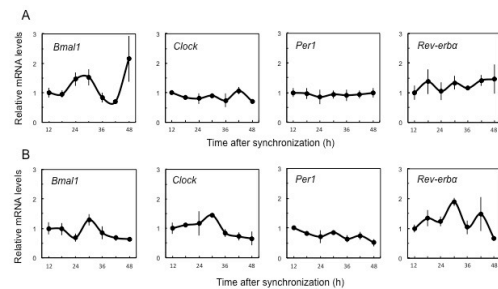


図1.ウシ子宮内膜上皮細胞における時計遺伝子の発現
A:エストラジオール (-)、B:エストラジオール (+)
ストロジェンのターゲットである上皮細胞での時計遺伝子の振動的発現は、エストラジオールの存在に関わらず認められなかった (Cosinor $p>0.05$)。しかし、時計遺伝子 *Rev-erba* は同期化後24時間にピークとなって、急激な減少が認められた。その他の時計遺伝子には顕著な変化は認められなかった。

(3) ウシ子宮内膜間質細胞における時計遺伝子の発現：プロジェステロンの影響

プロジェステロンのターゲットである間質細胞での時計遺伝子の振動的発現は、プロジェステロンの存在に関わらず認められなかった (Cosinor $p>0.05$) (図2)。しかし、プロジェステロンの添加によって、時計遺伝子 *Clock*、*Per1*、*Rev-erba* の発現が、同期化後24時間以降で有意な増加が認められた。

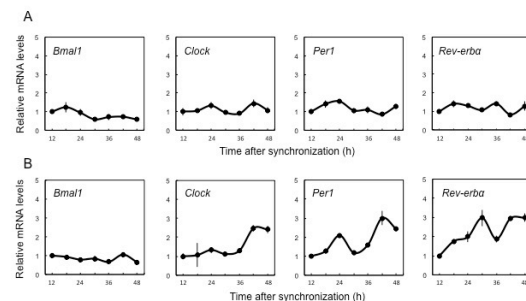


図2.ウシ子宮内膜間質細胞における時計遺伝子の発現
A:プロジェステロン (-)、B:プロジェステロン (+)

(4) プロスタグランジン合成酵素 *Ptgs2* 遺伝子の発現

細胞の同期化後のプロスタグランジン合成酵素 *Ptgs2* の発現を調べた。エストラジオールを添加した上皮細胞では、同期化後36時間以降、*Ptgs2* 発現の有意な増加が認められたが、エストラジオールが存在しなければ低レベルで推移した (図3)。一方、間質細胞では、プロジェステロンを添加することによって、*Ptgs2* 発現は低レベルであるのに対し、プロジェステロンが存在しなければ、逆に *Ptgs2* 発現は高いことが認められた。この変化は、時計遺伝子 *Rev-erba* の発現と逆相関であることを示した。

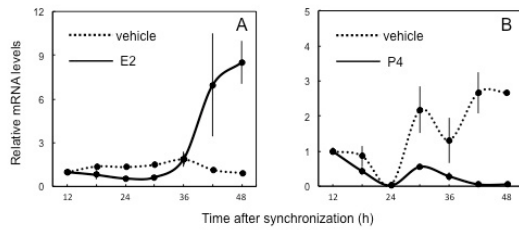


図3. プロスタグランジン合成酵素遺伝子 Ptgs2 の発現変化. A: 上皮細胞, B: 間質細胞

(5) Bmal1-siRNA を用いた時計遺伝子のダウンレギュレーション

Bmal1 の mRNA をターゲットにした RNA 干渉を行なった。間質細胞に Bmal1-siRNA を導入して、時計遺伝子 Bmal1 および Rev-erba の発現を解析した。対照としては no silencing RNA を導入した。間質細胞の Bmal1 をノックダウンさせると、その下流遺伝子の Rev-erba の発現が減少し、また、プロスタグランジン F2α 合成の律速酵素の Ptgs2 の発現も有意な減少が認められた (図 4 A)。一方、上皮細胞に Bmal1-siRNA を導入すると、Bmal1 の発現は有意に低下したが、その下流遺伝子の Rev-erba には変化が認められなかった。また、Ptgs2 の発現も変化が認められなかった (図 4 B)。このことから、ウシでは間質細胞の時計は機能的に駆動しているが、上皮細胞では時計の振動は弱いことが示唆された。一方、ラットの卵巣顆粒膜細胞では Bmal1-siRNA の導入によって、Bmal1、Rev-erba、Per2、Dbp などの時計遺伝子の発現は有意に低下し、また Ptgs2 も有意な低下、さらにプロスタグランジン E2 も低下した。この違いから Ptgs2 のプロモーター領域を検索すると、ラットでは E-box は複数存在するが、ウシでは 1 カ所 E-box が存在することが認められた。このことは動物の生殖様式の違いを反映するものと考えられ、注目される。

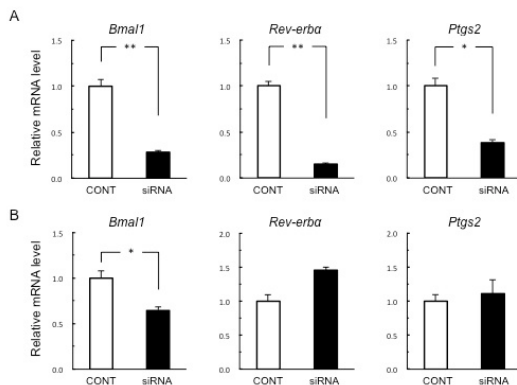


図4. Bmal1-siRNA を用いた上皮細胞の時計遺伝子のダウンレギュレーション。

(6) Rev-erba のアゴニストおよびアンタゴニストを用いた Ptgs2 発現解析

上皮細胞および間質細胞における Rev-erba の発現とプロスタグランジン F2α の生成に逆相関が認められること、ならびにウシの Ptgs2 遺伝子のプロモーター領域には Rev-erba が結合する配列 RRE (TGACCT, TCCAGT) が 2 カ所存在することの 2 点から、Ptgs2 の発現制御は Rev-erba がカギを握ることが推測された。そこで、Rev-erba のアゴニスト (Heme) およびアンタゴニスト (SR8278) を用いて、Ptgs2 の発現を解析した。Heme を添加した場合、上皮細胞および

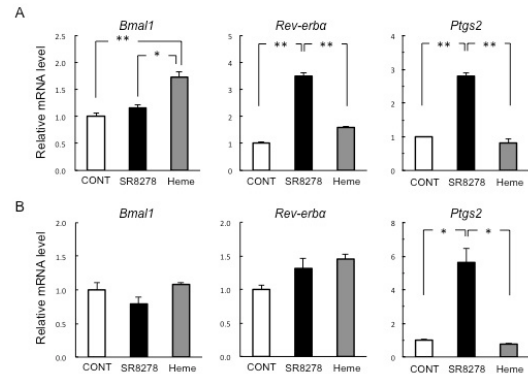


図5. Rev-erba のアゴニストおよびアンタゴニストを用いた Ptgs2 発現解析. A: 間質細胞, B: 上皮細胞

間質細胞でも Ptgs の発現には全く変化が認められず、Rev-erba による Ptgs の発現促進は否定され、上述の結果と一致するものである。一方、SR8278 添加によって、Ptgs の発現は両細胞ともに 3~6 倍の増加が認められた (図 5)。このことは、Rev-erba が Ptgs2 の発現を抑制的に機能することが結論づけられた。

以上の結果から、ウシ子宮内膜での時計駆動は、間質細胞と上皮細胞で異なることが考えられた。間質細胞では時計の駆動は活発であるが、上皮細胞では微弱であることが初めて明らかになった。以上の成果は、これまで妊娠と発情回帰を支配するプロスタグランジン F2α の生成に関して全く未解明であったが、ステロイドホルモンの支配を受けて時計遺伝子 Rev-erba によって制御されるという、新たな扉を開くことになる成果である (図 6)。

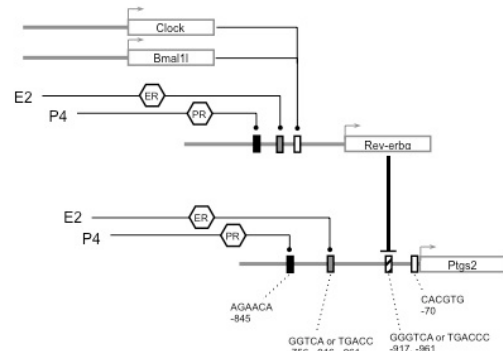


図 6. 間質細胞と上皮細胞における時計遺伝子 Rev-erb α による Ptgs2 遺伝子の発現制御モデル。実線は抑制、点線は促進を示す。Rev-erb α はそのリガンドと結合して Ptgs2 の発現を抑制するが、Bmal1 と Clock のヘテロダイマーが E-box に結合して発現を促進する。上皮細胞では E-box への効果が弱い、間質細胞では比較的強いことが考えられる。

以上の研究成果は、国際誌に投稿するように準備を進めている。

(7) ラットを用いたパイロット研究

ウシの妊娠と時計の関係をさらに追究するために、ラット子宮内膜間質細胞において時計によって制御される遺伝子 (Clock-Controlled Genes) の網羅的解析を行なった。この成果は、Frontier in Endocrinology (Circadian Clock and Pregnancy)に掲載されている。この情報は、GenBank でも登録を進めており、近々に WEB 上で閲覧できる。

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 7 件)

① TASAKI H, ZHAO L, ISAYAMA K, CHEN H, YAMAUCHI N, SHIGEYOSHI Y, HASHIMOTO S, HATTORI M-A: Profiling of circadian genes expressed in the uterus endometrial stromal cells of pregnant rats by DNA microarray coupled with RNA interference. *Frontiers in Endocrinology — Systems and Translational Endocrinology (Special issue: Circadian Clock and Pregnancy)* 4: 82 (2013)

② CHEN H, ZHAU J, KUMAZAWA M, YAMAUCHI N, SHIGEYOSHI Y, HASHIMOTO S, HATTORI M-A: Down-regulation of core clock gene *Bmal1* attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells. *American Journal of Physiology — Cell Physiology (Special issue: Cellular Circadian Rhythms)* 304: C1131-C1140 (2013)

③ CHEN H, ZHAU J, CHU G, KITO G, YAMAUCHI N, SHIGEYOSHI Y, HASHIMOTO S, HATTORI M-A: FSH induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via a gap junction protein Cx43 dependent pathway. *American Journal of Physiology — Endocrinology and Metabolism* 304: E566-E575 (2013)

④ CHEN H, CHU G, ZHAU J, YAMAUCHI N, SHIGEYOSHI Y, HASHIMOTO S, HATTORI M-A: Rev-erb α regulates circadian

rhythms and *StAR* expression in rat granulosa cells as identified by the agonist GSK4112. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420: 374-379 (2012)

⑤ CHU G, MISAWA I, CHEN H, YAMAUCHI N, SHIGEYOSHI Y, HASHIMOTO S, HATTORI M-A: Contribution of FSH and triiodothyronine to the development of circadian clocks during granulosa cell maturation. *American Journal of Physiology — Endocrinology and Metabolism* 302: E645-E653 (2012).

⑥ CHU G, YOSHIDA K, NARAHARA S, UCHIKAWA M, KAWAMURA M, YAMAUCHI N, XI YM, SHIGEYOSHI Y, HASHIMOTO S, HATTORI M-A: Alteration of circadian clockworks during differentiation and apoptosis of rat ovarian cells. *Chronobiology International* 28: 477-487 (2011)

⑦ UCHIKAWA M, KAWAMURA M, YAMAUCHI N, HATTORI M-A: Down-regulation of circadian clock gene *period 2* in uterine endometrial stromal cells of pregnant rats during desidualization. *Chronobiology International* 28: 1-9 (2011)

[学会発表] (計 8 件)

① 諫山慧士朗・陳華濤・山内伸彦・服部眞彰：子宮内膜のプロスタグランジン分泌制御における時計遺伝子の重要性 リスクサイエンス研究フォーラム 九州大学 (2013)

② 諫山慧士朗・田崎広天・山内伸彦・服部眞彰：ウシ子宮内膜の間質細胞と上皮細胞における細胞時計の特徴と卵巣ステロイドホルモンの影響 日本畜産学会 名古屋大学 (2012)

③ 諫山慧士朗・田崎広天・山内伸彦・服部眞彰：ウシ子宮内膜間質細胞および上皮細胞におけるペースメーカーの振動 日本繁殖生物学会 岩手大学 (2011)

④ 諫山慧士朗・西村翔・合原崇文・山内伸彦・服部眞彰：ウシ子宮内膜間質細胞におけるペースメーカーの計測法開発とホルモン応答 日本繁殖生物学会 北里大学 (2010)

⑤ MISAWA I, ISAYAMA K, YASUO S, HATTORI M-A: Maternal feeding schedule has a great effect on clock gene expression in the rat fetal liver. The 9th International Joint Symposium between Korea and Japan. Chun Cheon, Korea (2012).

⑥ ISAYAMA K, CHEN H, YAMAUCHI N, HATTORI M-A: Circadian rhythms of clock genes and clock-controlled genes in the endometrial stroma cells prepared from the pregnant rat uterus. The 9th International Joint

Symposium between Korea and Japan. Chun Cheon, Korea (2012).

⑦CHEN H, HATTORI M-A: Pivotal role of circadian clock gene *Bmal1* in rat luteinizing granulosa cells. The 9th International Joint Symposium between Korea and Japan. Chun Cheon, Korea (2012).

⑧CHU G, KAWAMURA M, MISAWA I, YAMAUCHI N, HATTORI M-A: Circadian oscillations of clock genes during differentiation and apoptosis of rat ovarian cells. The 44th Ann Meet Soc Study Reprod, Oregon, *Biol Reprod, Suppl* (2011).

〔図書〕(計 2件)

①HATTORI M-A, CHU G, YOSHIDA K, UCHIKAWA M, NARAHARA S, HIRATA M, HE PJ, YAMAUCHI N: Circadian pacemaker in ovary and uterus during differentiation and apoptosis. In “*Circadian Rhythms*” (Golovkin L, Maliszkewicz A eds), pp. 209-245, NOVA Science Publishers, New York (2012).

②HATTORI M-A: Hormonal regulation of circadian pacemaker in ovary and uterus. In “*Update on Mechanisms of Hormone Action — Focus on Metabolism, Growth and Regulations*” (Aimaretti G, Marzullo P, Prodam F eds), pp. 217-232, InTech, Rijeka, Croatia (2011).

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/asweb/chi ku1/lrp-top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部真彰 (HATTORI MASA-AKI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：60175536

(2) 研究分担者

山内伸彦 (YAMAUCHI NOBUHIKO)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00363325

宗 知紀 (SOU TOMOKI)

九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：90221340

(3) 連携研究者

加藤幸雄 (KATO YUKIO)
明治大学大学院・農学部・教授
研究者番号：