

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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22791515

研究課題名（和文）

抗老化分子 SIRT1 制御を標的とした新規着床機能解明および着床不全治療戦略の開発

研究課題名（英文）

SIRT1 as a therapeutic target of implantation failure

研究代表者

平池 修 (HIRAIKE OSAMU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20529060

研究成果の概要（和文）：

子宮内膜の増殖・分化・脱落膜化はエストロゲン・プロゲステロンによって制御されており、エストロゲンの活性は核内受容体であるエストロゲンレセプター（ER）により制御されている。抗老化因子であり植物エストロゲンによりその活性を制御される SIRT1、SIRT1 を制御する DBC1 の子宮内膜における発現、作用機序、およびこれらタンパクのホルモン依存性について検討し、産婦人科領域における病態意義を見出した。本研究により、SIRT1 が転写因子として細胞接着分子 E-cadherin の発現を直接的に制御することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Background: Sirtuin 1 (SIRT1), originally found as a class III histone deacetylase, is a principal modulator of pathways downstream of calorie restriction, and the activation of SIRT1 ameliorates glucose homeostasis and insulin sensitivity. We examined the role of SIRT1 in the regulation of uterine receptivity using Ishikawa and RL95-2 endometrial carcinoma cell lines.

Methodology/Principal Findings: Exogenous expression of SIRT1 significantly enhanced E-cadherin expression, while small interfering RNA-mediated depletion of endogenous SIRT1 resulted in a significant reduction of E-cadherin expression. A SIRT1 activator resveratrol elevated E-cadherin expression in a dose dependent manner, while SIRT1 repressors nicotinamide and sirtinol exhibited a dose dependent reduction of E-cadherin expression. We also showed that both forced expression of SIRT1 and activation of SIRT1 promote E-cadherin-driven reporter gene constructs, and SIRT1 is localized at E-cadherin promoter containing E-box elements in Ishikawa cells. Using an in vitro model of embryo implantation, we demonstrate that exogenous expression of SIRT1 and stimulation of SIRT1 activity resulted in the Ishikawa cell line becoming receptive to JAR cell spheroid attachment. Furthermore, resveratrol enhanced E-cadherin and Glycodelin protein expression at sites of intercellular contact, suggesting an additive role of resveratrol in promoting implantation.

Conclusions: The initial step of human reproduction depends on the capacity of an embryo to attach and implant into the endometrial wall, and these results revealed the novel mechanism that activation and increased expression of SIRT1 play an important role in uterine receptivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：産婦人科

キーワード：SIRT1、レスベラトロール、E-cadherin、胚受容能、転写因子

1. 研究開始当初の背景

エストロゲンレセプター (ER) はリガンド 17β -estradiol によって核内に移行し、転写因子として働く核内レセプタースーパーファミリーの代表的なもののうちの一つであり、ER α およびER β というサブタイプが存在する。これらはホルモン依存性腫瘍（乳癌、子宮体癌、前立腺癌など）発症に深く関わる遺伝子として重要視されている。ER α 、ER β は N 末端にリガンド非依存的転写活性化能をもつ AF-1 領域および C 末端にリガンド依存的転写活性化能をもつ AF-2 領域を有する核内タンパクであり、リガンドの存在下で各種転写調節因子と相互作用することで、基本転写装置に協調的に作用することが報告されている。本申請者は、ER α の細胞増殖に関連した機能解析をこれまでに行っており、ER α の変異体でタモキシフェン抵抗性腫瘍に見られる ER α D351Y 変異体が転写抑制因子複合体をリクルートしないために野生型 ER α より AF-1 活性を強く示すという報告など、ホルモン依存性腫瘍において ER α に結合する転写共役因子が果たす分子機構の解明において中心的役割を担い、重点的にこれまでに報告してきた。本申請者は、ERと相互作用する BRCA1 の機能解析を検討課題として「平成 16 年度若手研究 B (2 年間、3000 千円) 癌抑制遺伝子 BRCA1 のユビキチン分解標的となる新規タンパクの同定と精製」にて科学研究費補助金の交付を受け、ミスマッチ修復遺伝子 hMSH2 と ER が細胞内で機能的複合体を形成することを報告している。

NAD 依存的脱アセチル化酵素である SIRT1 は、酵母の寿命決定に重要な役割を担う Sir2 タンパク質の哺乳類ホモログで、PGC-1 α 、p53、NF- κ B、histone などを脱アセチル化し、様々な細胞機能（遺伝子発現制御、細胞死、ストレス反応、老化、脂質・糖代謝）を有する。SIRT1 は腫瘍形成にも関与しており、腫瘍細胞の増殖や細胞死抵抗性の獲得などに関わる。実際これまでに、SIRT1 の過剰発現が胃癌などで確認されている。分子標的治療として、糖尿病を改善させるために、SIRT1 の活性を高めた低分子化合物の開発などが行われているように、創薬の標的分子として注目を集めているが、SIRT1 の子宮内膜における分子機構および着床に関連した研究はほとんどなされていない。細胞死抑制因子 Survivin は、子宮内膜腺上皮において分泌期後半からユニークに発現誘導されるが、着床機構への介在は未

だ明らかにされていない。赤ワインに含まれるポリフェノール類であるレスベラトロールは、近年 SIRT1 を介して Survivin の発現量を抑制することが明らかになった。レスベラトロールは植物エストロゲン的一种であり、ER β の転写活性化能を高めることがすでに知られていて我々も確認している。植物エストロゲンは、細胞増殖促進因子である ER α への作用より、一般的に ER β 特異的に作用する傾向があり、ER β の活性を高めることによってその分化促進、細胞増殖抑制作用を促進する。

一方我々は、SIRT1 の抑制因子であり、乳癌抑制候補遺伝子である DBC1 が ER β の転写活性に影響を与えることをすでに明らかにしている。また、ER β のテトラサイクリン誘導型乳癌・大腸癌細胞株を用いた実験によると、ER β を過剰発現させた場合、integrin α 1、 β 1 の発現が亢進し、細胞の接着能力が亢進することが報告されていて、ER β の着床における役割を強く示唆するものである。

本研究は、雌性生殖器官における着床メカニズム・分化制御を分子レベルで解析することを主要な目標とした。植物エストロゲン（レスベラトロール）によって子宮腺上皮細胞における DBC1、SIRT1 および Survivin の発現が誘導されるかどうか、またこれらのタンパクが子宮内膜脱落膜化から胚着床までの一連の過程で子宮内膜腺上皮細胞の分化誘導、胚受容能にいかに関与するかどうかを、細胞接着の連関を中心に検討し明らかにすることを本課題の目標としていた。

2. 研究の目的

子宮内膜の増殖・分化・脱落膜化はエストロゲン・プロゲステロンによって制御されており、エストロゲンの活性は核内受容体である ER により制御されている。抗老化因子であり植物エストロゲンによりその活性を制御すると考えられる SIRT1、SIRT1 を制御する DBC1、および SIRT1 の下流遺伝子である Survivin の子宮内膜における発現および作用機序と、これらタンパクのホルモン依存性について検討することを本研究の主要な目的とする。本申請者は、子宮内膜上皮の増殖および分化メカニズムにおいて ER β の増殖抑制的機能が重要であることをすでにマウスを用いた実験により明らかにしており、ER およびその作用薬が子宮内膜上皮の機能にもたらす影響について更なる視点を切り開いて、最終的にエストロゲンのもつ多様な生理活性についての解明を進めていく

ことを更なる目標としている。

3. 研究の方法

- 1) 子宮内膜における SIRT1 の発現の検討は、定量的リアルタイム PCR、免疫組織化学染色法を用いた。
- 2) SIRT1 の発現制御機構の解明として、ウェスタンブロット法を用いた。
- 3) 細胞接着分子 E-cadherin の発現制御機構の解明として、ウェスタンブロット、蛍光細胞免疫組織化学染色、ルシフェラーゼアッセイ、クロマチン免疫沈降法を用いた。
- 4) 子宮内膜癌細胞株 RL95-2 および Ishikawa と、絨毛細胞癌 JAR を用いた receptive assay を行った。Confluent になった RL95-2 細胞、Ishikawa 細胞は、spheroid 状に塊を形成した JAR 細胞を表面に付着することが可能である。Confluent になった細胞における DBC1、SIRT1 および Survivin の発現を調べ、それらの強制発現を行うこと、およびリガンドによる制御・相互作用を観察することが可能である。

4. 研究成果

- 1) 子宮内膜における SIRT1 および DBC1 の発現量を定量的 PCR で検討したが、増殖期より分泌期の方が高い発現量を示した。
- 2) SIRT1 が、細胞接着分子である E-cadherin の発現を制御する可能性について検討した。SIRT1 の強制発現により E-cadherin の発現が誘導され、siRNA による内在性 SIRT1 のノックダウンにより E-cadherin 発現が減少することが判明した。ルシフェラーゼアッセイにより、この発現誘導は E-cadherin プロモーター上に存在する E-box 領域に依存することがわかり、SIRT1 が E-box に結合する転写促進因子であるという新たな知見を見出した。またクロマチン免疫沈降法により、SIRT1 が E-cadherin プロモーター上に実際に存在することが確認された。
- 3) SIRT1 の活性化をもたらす植物エストロゲン レスベラトロールにより、E-cadherin 発現が誘導されることが判明した。
- 4) 着床現象を模倣している in vitro spheroid attachment assay を用いたところ、SIRT1 発現により子宮内膜細胞の胚受容能が亢進する可能性が示された。また、レスベラトロールにより同様に胚受容能が亢進する可能性が示された一方、SIRT1 のインヒビターでは胚受容能が抑制された。
- 5) レスベラトロールにより、胚着床に関連する Glycodelin の発現が増えることが分かった。

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 5 件)

1: Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Koyama S, Oishi H, Yoshino O, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Tsutsui K, Taketani Y.

Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol* 10; 2012: 14 (査読有)

2: Isono W, Wada-Hiraike O, Shirane A, Fujimoto A, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Alternative strategies to in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment for aged infertile women. *Reprod Med Biol* 11; 2012: 69-72 (査読有)

3: Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Shirane A, Hiraike H, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Ikeda Y, Shoji K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y.

Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function. *Br J Cancer* 104; 2011: 1349-55 (査読有)

4: Isono W, Tsutsumi R, Wada-Hiraike O, Fujimoto A, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Uterine artery pseudoaneurysm after cesarean section: case report and literature review. *J Minim Invasive Gynecol* 17; 2010: 687-691 (査読有)

5: Wada-Hiraike O, Osuga Y, Hiroi H, Fujimoto A, Maruyama M, Yano T, Taketani Y.

Sessile polyps and pedunculated polyps respond differently to oral contraceptives *Gynecol Endocrinol* 27; 2010: 351-355 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1: 平池修、藤本晃久、齋藤泉、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二
腹腔鏡下子宮摘出をした非産褥期子宮内反の一例

第 51 回日本産科婦人科内視鏡学会
2011 年 8 月 4 日 大阪

2: 平池修、大須賀穰、竹村由里、小泉美奈子、甲賀かをり、廣井久彦、藤本晃久、丸山正統、百枝幹雄、久具宏司、矢野哲、武谷雄二
子宮内膜ポリープに対する黄体・卵胞ホルモン混合剤の効果についての検討
第 62 回日本産科婦人科学会 2010 年 4 月 24 日 東京

3: Wada-Hiraike O, Koyama S, Kato S, Yano T, Taketani Y.
Repression of estrogen receptor β function by putative tumor suppressor DBC1
第 92 回 北米内分泌学会 2010 年 6 月 15 日 米国サンディエゴ

〔図書〕(計 3 件)

1: 平池修、矢野哲、武谷雄二
血液・尿化学検査 免疫学的検査 CA125/MUC16
日本臨牀社 (2010 年) 総ページ数 4

2: 平池修、矢野哲、武谷雄二
GnRH 負荷試験
診断と治療社 (2010 年) 総ページ数 9

3: 平池修、甲賀かをり、大須賀穰、矢野哲、武谷雄二
子宮内膜症：特異部位（骨盤外）子宮内膜症の臨床像
秀潤社 (2010 年) 総ページ数 7

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：着床能改善用組成物、及びこれを含む医薬、食品または飲料
発明者：平池修、白根晃
権利者：株式会社東京大学 TLO、平池修、白根晃
種類：
番号：12B11Y001-1
出願年月日：2012 年 2 月 9 日
国内外の別：国内

○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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平池 修 (HIRAIKE OSAMU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20529060

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：