

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592399

研究課題名(和文)着床部位子宮内膜細胞のヒト絨毛性ゴナドトロピンを介する細胞内情報伝達系の解明

研究課題名(英文) Human chorionic gonadotropin mediated intercellular signalling in human endometrial epithelial cells at implantation site

研究代表者

田村 直顕 (Tamura, Naoaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90402370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜上皮細胞株の一つであるIshikawa細胞にhCGを添加すると、トロフィニンの発現が増加し、MUC1の発現が減少することがELISA法で確認された。この変化は、hCGとIL-1 β を同時に添加することで顕著であった。本系では、ADM、KISS1Rの発現が共通して低下していることがマイクロアレイ法で明らかになった。また、Ishikawa細胞に発現するトロフィニンにはスプライシングバリエントが複数存在することが判明した。生体内ではトロフィニンのバリエントが互いにドミナントネガティブに作用して機能を調整している可能性を示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：Under hCG treatment, expression levels of trophinin was enhanced and MUC1 was decreased in Ishikawa cells, one of endometrial epithelial cell lines. These alternations were more remarkable under hCG and IL-1 β treatment. From the Microarray analysis, gene expression levels of ADM and KISS1R were decreased in Ishikawa cells under hCG treatment. Genetic splicing variants of trophinin existed in Ishikawa cells. This fact suggested that trophinin may coordinate its function by dominant negative manner in vivo.

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：生殖医学

キーワード：着床 ヒト絨毛性ゴナドトロピン 子宮内膜上皮細胞 トロフィニン

1. 研究開始当初の背景

本研究の申請当初の背景は、受精卵の培養、胚盤胞の凍結保存・融解保護など、胚を取り扱う技術が向上し不妊治療は飛躍的に進歩してきた一方で、胚の着床障害による妊娠率の低迷に問題があると考えた。実際、良質な胚を移植した場合でも、必ずしも妊娠に至るわけではなく、本邦の IVF-ET の妊娠率は約 30%にとどまっている。我々はこれまでに、着床時に相動的な接着分子として働くトロフィニンの発現が hCG によって制御されていることを明らかにしたが、同時に MUC1 の発現が減少することも判明したことで、hCG による子宮内膜上皮細胞の細胞内伝達系を解析する実験系が確立された段階であった。

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜局所における hCG の作用の中でも、未だ未解明であるトロフィニンの発現に関わる分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) hCG(100U/ml 24h)、hCG(100U/ml 24h)+IL-1 (25pg/ml 24h)を添加した子宮内膜上皮細胞株 Ishikawa cell の遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法にて解析。

(2) Human kinase siRNAs ライブラリースクリーニングを用いた子宮内膜上皮細胞におけるトロフィニンの発現を制御する遺伝子の解析。Ishikawa cell を対象とし、遺伝子導入は Lipofectamine, Dharmafect1, X-treme を使用。抗トロフィニン抗体(3-11, mouse IgM)による細胞染色後、RNAi 効果をハイスループットマイクロコピー(Eidaq100, 384 wells, Black, clear-bottom plates)にて定量的に評価。

(3) プロテオミクスを用いたトロフィニン細胞内結合蛋白の同定。トロフィニンの細胞内ドメインに相当するトロサイトペプチド (MDIDCLTREELGDDAQWRSFSEIEARAQENADASTNVNFSRGASTRAG/ 合成ペプチド/ 50mers/ C末端システイン)をスルホリンクゲルと結合させ、アフィニティークロマトグラフィーによって子宮内膜組織から抽出した蛋白を吸着させ、トロフィニンペプチドにて溶出し、産物を SDS-PAGE ゲルに泳動し、鍍銀染色にて同定され切り出されたバンドをプロテオミクス解析。

4. 研究成果

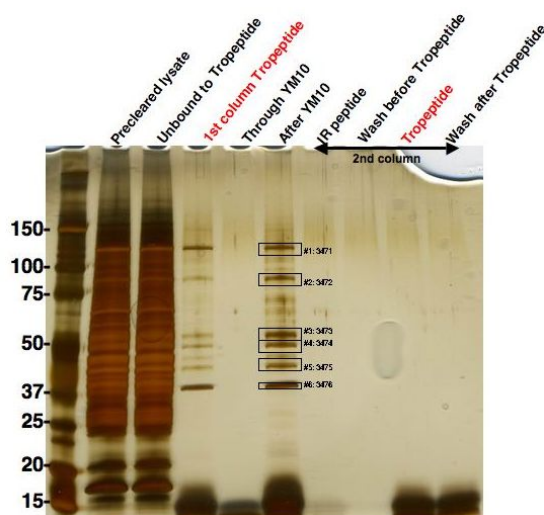
(1) hCG または hCG+IL1 を添加した Ishikawa 細胞における遺伝子発現変化のマイクロアレイ法により解析したところ、ADM, KISS1R の発現が共通して顕著に低下していることが判明した。トロフォブラストにおいては Tastin と Bystin が細胞質内のトロフィニン結合蛋白として知られていたが、子宮内膜上皮細胞においては、Tastin, Bystin 以外のシグナル系により制御されていることが示唆された。ADM, KISS1R 発現系によるトロフィニン発現制御の機序については今後、検討する予定である。

Systematic	No_treat	hCG	fold change	Common
ILMN_1708934	3526.3374	1788.0688	0.507061179	ADM
ILMN_1673521	414.0375	231.88751	0.560064028	KISS1R
ILMN_1755974	1932.8812	1171.8031	0.60624683	ALDOC
ILMN_1809173	286.275	217.6125	0.760151952	LOC729021
ILMN_1803774	196.0875	254.40625	1.29741187	STK16
ILMN_2364928	121.506256	158.10625	1.301219009	APBA2BP
ILMN_1669729	151.68124	200.33125	1.320738478	ERLIN2
ILMN_1666269	622.55	853.21875	1.370522448	CTSZ
Systematic	IL-1b	No_treat	Fold change	Common
ILMN_1708934	2548.3687	3526.3374	0.722667292	ADM
ILMN_1773310	121.078125	160.05939	0.756457494	FUT5
ILMN_2350315	101.57187	127.00313	0.799758793	ST3GAL3
ILMN_1652929	181.2	225.475	0.803636767	POGZ
ILMN_2122176	777.6125	595.9031	1.304931121	C12ORF31
ILMN_1725414	119.03125	90	1.322569444	ABCC6
ILMN_2379080	235.10312	175.92188	1.336406364	NFATC2IP
ILMN_2366445	240.39375	170.9625	1.406119763	KRT80
Systematic	No_treat	hCG&IL-1b	Fold change	Common
ILMN_1708934	3526.3374	1831.0062	0.519237382	ADM
ILMN_1673521	414.0375	280.6906	0.677935211	KISS1R
ILMN_2415634	145.61874	100.77812	0.692068342	TTN
ILMN_1691927	805.2969	566.2438	0.703149112	BTBD1
ILMN_1707695	172.15	229.58124	1.333611618	IFT1
ILMN_1768433	173.25937	239.03125	1.37961514	CCDC71
ILMN_2271379	86.5125	121.67812	1.40648022	SDCCAG3
ILMN_1769540	80.2625	113.93437	1.419521819	FLJ43276

(2) 定量的 RT-PCR によって Ishikawa 細胞に発現するトロフィニンに対するトロフィニン siRNAs によるノックダウン効果を確認した後、この系において、トロフィニン抗体を用いた細胞染色の染色性(タンパクの発現量)をハイスループットマイクロコピーによって定量的に評価したところ、コントロールと siRNAs 遺伝子導入群のトロフィニン発現量に有意な差を認めなかった。siRNAs のリバーストランスフェクション、各種遺伝子導入試薬による調整を試みたが同様の結果であった。Ishikawa 細胞におけるトロフィニン cDNA のシーケンス解析を行ったところ、トロフィニンの細胞外ドメイン内に多数のスプライシングバリエーションが存在することが判明した。トロフィニンの細胞外ドメイン(C末端領域)は繰り返すデカペプチドにより構成され、様々なデカペプチドの欠失パターン

を呈していた。これらの結果から、トロフィニンバリエーションが互いにドミナントネガティブに作用し、トロフィニンの機能を調整している可能性が示唆された。この点、ヒト子宮内膜組織における *in vivo* の解析が必要と考えられる。

(3) プロテオミクスを用いたトロフィニン細胞内結合蛋白の同定。子宮内膜組織から抽出したタンパクの中で、トロサイトペプチドに結合したものがトロフィニンの細胞内ドメイン結合タンパクの候補となる。鍍銀染色にて描出されたトロフィニンペプチドにより溶出されたフラクションのバンドのプロテオミクス解析の結果、以下のタンパクが同定された。



Sample 3471: CARBAMOYL-PHOSPHATE SYNTHASE [AMMONIA], MITOCHONDRIAL

Sample3472: FIBULIN 1

Sample3473:

1st hit: GRANZYME J.

2nd hit: HYALURONAN SYNTHASE 1

Sample3474:

1st hit: ELONGATION FACTOR 1-ALPHA 1

2nd hit: Putative Homeodomain

Transcription Factor 1

Sample3475: ACETYL-COENZYME A DEHYDROGENASE, SHORT CHAIN, ISOFORM CRA_A.

Sample3476: HYDROXYMETHYLGLUTARYL-COALYASE, MITOCHONDRIAL

本法による解析から、トロフィニンと結合しうるタンパクが同定された。今後、タンパク間結合について検討する必要がある。

本研究で示された結果から、子宮内膜上皮細胞におけるトロフィニンの発現調節と細胞内分子伝達系に関わる様々なタンパクを抽出することができた。これらは、hCG の受容体である LH-RH 受容体のシグナルに代表的

な cAMP に関わる分子ではないため、新規同定タンパクのタンパク間相互作用を明らかにすることによって、LH-RH 受容体以外の hCG の標的分子を同定できる可能性が考えられた。また、トロフィニンは多数のバリエーションが存在するため、特に着床時の発現パターンの違いによって、着床機能に差異が生じている可能性があり、今後も継続的に解析する必要があると考えられた。

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9件) 全て査読あり

1. Fukuda MN, Sugihara K. Trophinin in cell adhesion and signal transduction. *Front Biosci.*1(4);342-50,2012.

2. Park SK, Yoon J, Wang L, Shibata TK, Motamedchaboki K, Shim KJ, Chang MS, Lee SH, Tamura N, Hatakeyama S, Nadano D, Sugihara K, Fukuda MN. Enhancement of mouse sperm motility by trophinin-binding peptide. *Reprod Biol Endocrinol.*29;10:101,2012. doi: 10.1186/1477-7827-10-101.

3. Hatakeyama S, Sugihara K, Shibata TK, Nakayama J, Akama TO, Tamura N, Wong SM, Bobkov AA, Takano Y, Ohyama C, Fukuda M, Fukuda MN. Targeted drug delivery to tumor vasculature by a carbohydrate mimetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19587-92. doi: 10.1073/pnas.1105057108

[学会発表](計14件)

1. Tamura N: Trophinin-mediated cell adhesion induces apoptosis of human endometrial epithelial cells through PKC- The 11th Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium. September 2011. Korea.

2. Kanayama N, Tamura N, Itho H, Kashiwagi Y, Todo Y, Suzuki T, Yaguchi C: C1 esterase inhibitor activity in amniotic fluid embolism. SGI 61st Annual Scientific Meeting, March 2014. Italy.

[図書](計0件)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

田村 直顕(TAMURA NAOAKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：90402370

(2)研究分担者

金山 尚裕(KANAYAMA NAOHIRO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：70204550

(3) 研究分担者

杉原 一廣(SUGIHARA KAZUHIRO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265878