

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861481

研究課題名(和文) エピジェネティクスを利用したステロイドホルモン産生細胞分化誘導技術の開発

研究課題名(英文) Development of stem cell differentiation technology into steroidogenic cells with epigenetic regulation

研究代表者

河邊 真也 (Kawabe, Shinya)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60579415

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)：卵巣顆粒膜細胞における転写因子LRH-1の転写調節は、転写因子SF-1および転写共役因子PGC-1により協調的に制御されていることが明らかとなった。卵巣型LRH-1はプロゲステロン合成への寄与が大きく、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の転写制御にはSF-1からLRH-1を介する経路の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that the ovarian granulosa cell specific promoter region of LRH-1 is controlled by the transcription factor SF-1 and PGC-1 in a coordinated fashion. Our results suggest that the expression of genes involved in progesterone biosynthesis is under the control of ovarian LRH-1 via SF-1 in human ovarian granulosa cells.

研究分野：医師薬学

キーワード：LRH-1 SF-1 PGC-1 卵巣顆粒膜細胞 黄体ホルモン 黄体化

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の主要なステロイドホルモン産生器官は生殖腺や副腎であり、これら器官の機能不全によるステロイドホルモン産生異常症は、性分化異常や、死に繋がる重篤な症状を示す。不妊患者の内、黄体機能不全の患者では、黄体ホルモン(プロゲステロン)の分泌不全を呈する。黄体から分泌されるプロゲステロンは受精卵の着床や初期の妊娠維持に必須であることから、体外受精の際、受精卵の着床率の向上・妊娠維持のためにプロゲステロン補充療法が行われている。プロゲステロンの分泌は、排卵後の卵胞に残る莢膜細胞と顆粒膜細胞が分化した黄体により行われるが、この黄体化およびプロゲステロン産生の分子メカニズムの詳細は明らかではない。

転写因子 Liver receptor homolog-1 (LRH-1) は、内分泌器官のみならず肝臓や膵臓といったステロイドホルモンを産生しない組織においても発現しており、LRH-1 の転写は組織特異的に制御されていることが知られている。また LRH-1 は、排卵や黄体の機能維持に必須な転写因子であることも知られている。

これまでに私どもは、外部から LRH-1 遺伝子を安定導入することで幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞への分化誘導技術の開発に成功している。また、卵巣においては、LRH-1 遺伝子の転写開始点が他組織とは異なること、そしてその発現調節は転写因子 Sp1/3 と SF-1 によって調節されていることを明らかにしてきた。本研究は、卵巣型 LRH-1 の転写調節機構の全容を明らかにし、その知見をもとに薬剤処理によりゲノム上のエピジェネティックな変化を誘導し、間葉系幹細胞からプロゲステロン産生細胞を創出する技術開発を目指すものである。

## 2. 研究の目的

黄体機能不全に対する新たな治療法の技術開発を行うことを目的として、卵巣顆粒膜細胞に特異的に発現している卵巣型 LRH-1 の機能解析および LRH-1 の転写調節機構の全容解明を行う。

## 3. 研究の方法

卵巣型 LRH-1 の発現ベクターを作製し、レポーターアッセイによりステロイドホルモン合成酵素遺伝子のプロモーターに対する活性の増強を検討する。また、LRH-1 への siRNA を用いたノックダウンを行い、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現への影響を検討する。

転写活性化領域のエLEMENT検索、レポーターアッセイ、アデノウイルスを用いた過剰発現により、顆粒膜細胞特異的に LRH-1 の遺伝子発現制御を担う転写因子の同定を行う。また、組織あるいは培養細胞から抽出したゲノム DNA をバイサルファイト処理することで、

LRH-1 遺伝子のプロモーター領域のゲノム DNA 上のメチル化の変化を検討する。

## 4. 研究成果

卵巣型 LRH-1、従来の肝臓型 LRH-1 および SF-1 の発現ベクターを作製し、卵巣顆粒膜細胞由来の KGN 細胞を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子である CYP11A1、HSD3B2、StAR のプロモーターに対して、卵巣型 LRH-1 は肝臓型 LRH-1 あるいは SF-1 と同等の転写活性化能を持つことが明らかとなった。KGN 細胞において卵巣型 LRH-1 をノックダウンすると、SF-1 の発現が維持されているにも関わらず、8Br-cAMP により誘導される CYP11A1 と HSD3B2 の発現レベルが著しく減衰することが明らかとなった。次に、SF-1 や LRH-1 など核内受容体の転写共役因子である PGC-1 に着目した。PGC-1 は卵巣においては顆粒膜細胞に局在している。レポーターアッセイを行った結果、SF-1 と PGC-1 を共発現させると卵巣特異的 LRH-1 のプロモーター活性が相乗的に増強されることが明らかとなった。更に、アデノウイルスベクターを用いて KGN 細胞において PGC-1 を過剰発現させたところ、内因性の LRH-1 発現は mRNA およびタンパク質レベルで顕著に亢進された。これらの結果から、卵巣型 LRH-1 は、顆粒膜細胞では SF-1 と PGC-1 によって協調的に制御されていることが明らかとなった。ヒト黄体においては転写因子 SF-1 の発現が減衰することが知られているが、SF-1 により誘導されている LRH-1 の発現がどのように維持されているか明らかではない。そこで、転写因子 Sp1/3 が欠失している SL2 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。Sp1/3 と卵巣型 LRH-1 を共発現させることにより、SF-1 存在下と同等レベルにまで卵巣特異的 LRH-1 プロモーター活性の亢進が認められた。このことから、ヒト黄体においては、LRH-1 が自らの転写活性を正に制御するオートレギュレーションが働いていることが示唆される。SF-1 と LRH-1 は同じファミリーに属する転写因子であり、共にプロゲステロン産生に重要な因子であることが知られている。しかし、卵巣顆粒膜細胞においては、SF-1 は LRH-1 の機能を完全には補完することが出来ず、LRH-1 はプロゲステロン合成への寄与が大きいこと、更に、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の転写制御には SF-1 から LRH-1 を介する経路が存在することが示唆された。

次に、卵巣型 LRH-1 プロモーター領域のエピジェネティックな変化を検討するために、バイサルファイト法によるゲノム DNA のメチル化を検討した。肝臓癌由来の HepG2 細胞、KGN 細胞、ヒト肝臓、ヒト副腎由来のゲノム DNA を用いて検討したところ、卵巣型 LRH-1 のプロモーター領域のゲノム DNA のメチル化に差異は認められなかった。薬剤処理によるプロゲステロン産生細胞への分化誘導技術

開発のための基礎研究として、KGN 細胞を PMA あるいは Mithramycin A で処理した際の LRH-1 の発現レベルを検討した。プロテインキナーゼ C を活性化させるホルボールエステルである PMA は、MEK-ERK 経路を介して転写因子 LRH-1 を活性化させることが報告されている。そこで、PMA を用いて、LRH-1 の活性化を介した LRH-1 遺伝子の発現増強を試みた。その結果、PMA により LRH-1 は、25-100 nM の範囲で濃度依存的に mRNA レベルで発現が増強された。また、抗癌剤の一種である Mithramycin A を細胞へ低濃度処理することによっても、LRH-1 遺伝子の発現が増強された。

次に、卵巣顆粒膜細胞における LRH-1 の転写調節機構の全容解明に向けて、卵巣特異的な遠位エンハンサー領域の同定を試みた。まずは卵巣型 LRH-1 の保存性を検討するために、ラット、マウス、ラビットの卵巣において発現している LRH-1 の転写開始点を決定した。その結果、全ての種においてヒトと同様に卵巣特異的な新規転写開始点が存在することが明らかとなり、卵巣型 LRH-1 は哺乳類に広く保存されていることが強く示唆された。そこで、LRH-1 遺伝子のイントロン領域において哺乳類間で高度に保存されている約 1kb の領域を 7 箇所選別し、各々を領域 A から G とした。この遠位エンハンサー候補領域 A-G と卵巣型 LRH-1 のプロモーター領域とをつなげて、KGN 細胞においてレポーターアッセイを行った。その結果、プロモーター活性を顕著に亢進させる領域として領域 D を同定した。この領域 D は、転写共役因子 PGC-1 に応答してプロモーター活性を更に数倍増強させた。領域 D は約 1.4kb あるため、今後はエンハンサー領域において PGC-1 と共に転写を調節している核内受容体の同定と、その応答配列の同定を行う必要がある。本研究によって、これまで不明であった卵巣における LRH-1 の発現制御機構が明らかとなった。これらの知見をもとにして、将来的には幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導を可能にする薬剤の開発が期待される。

## 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. 水谷哲也, 河邊真也, 石兼 真, 宮本 薫: SF-1/Ad4BP による新たな転写調節メカニズム. 日本生殖内分泌学会雑誌 20, 25-28, 2015. 査読有 .
2. Mizutani, T., Ishikane, S., Kawabe, S., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of genes related to progesterone production. Endocrine Journal 62(9), 757-763, 2015. 査読有 .
3. Mizutani, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. Molecular and Cellular Endocrinology 408, 133-137, 2015. 査読有 . DOI:10.1016/j.mce.2014.11.019
4. Kanno, M., Yazawa, T., Kawabe, S., Imamichi, Y., Usami, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Mizutani, T., Fujieda, S., Miyamoto, K.: Sex-determining region Y-box 2 and GA-binding proteins regulate the transcription of liver receptor homolog-1 in early embryonic cells. BBA - Gene Regulatory Mechanisms 1839(5), 406-414, 2014. 査読有 . DOI:10.1016/j.bbagr.2014.03.016
5. Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Osaki, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Matsumura, T., Kanno, M., Kamiki, Y., Kimura, K., Minamino, N., Miyamoto, K.: C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein ) mediates progesterone production through transcriptional regulation in co-operation with SF-1 (steroidogenic factor-1). Biochem. J. 460, 459-471, 2014. 査読有 . DOI:10.1042/BJ20131522
6. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. BBA - Gene Regulatory Mechanisms 1839(1), 33-42, 2014. 査読有 . DOI:10.1016/j.bbagr.2013.11.005
7. Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K.: Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. The FASEB Journal 27(8), 3198-3208, 2013. 査読有 . DOI:10.1096/fj.12-222745

[学会発表](計 18 件)

1. 今道力敬, 矢澤隆志, 河邊真也, 石兼 真, 向井邦晃, 折坂誠, 水谷哲也, 宮本 薫: ヒトにおける 11-ケトテストステロンの合成と役割. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015, 4, 23-25, ホテルニューオータニ東京(千代田区).
2. 今道力敬, 矢澤隆志, 河邊真也, 石兼 真, 向井邦晃, 折坂誠, 水谷哲也, 宮

- 本薫：11-ケトテストステロンはエストロゲン変換を受けないアンドロゲンとして機能する。第19回日本生殖内分泌学会学術集会。2015, 1, 10, 千里ライフサイエンスセンター（豊中市）。
3. 水谷哲也, **河邊真也**, 石兼真, 今道力敬, 宮本薫：SF-1とC/EBPによるステロイドホルモン産生調節機構。平成26年度日本動物学会中部支部大会。2014, 11, 22-24. のと勤労者プラザ(能登町)。
  4. 水谷哲也, 今道力敬, **河邊真也**, 石兼真, 宮本薫：C/EBPによるCYP11A1の新たな転写調節機構。第32回内分泌代謝学サマーセミナー。2014, 7, 10-12, 富士レークホテル（山梨県）。
  5. Mizutani, T., Imamichi, Y., **Kawabe, S.**, Ishikane, S., Osaki, T., Minamino, N., Miyamoto, K.: Steroidogenic Factor 1 (SF-1) and C/EBP cooperatively regulate progesterone production. 16th International Congress of Endocrinology. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & EXPO 2014. 2014, 6, 21-24, Chicago.
  6. 今道力敬, 矢澤隆志, **河邊真也**, 向井邦晃, 折坂誠, 水谷哲也, 宮本薫：ヒト生殖腺におけるHSD11B2の役割。第87回日本内分泌学会学術総会。2014, 4, 24-26, 福岡国際会議場（福岡市）。
  7. 水谷哲也, 今道力敬, **河邊真也**, 尾崎司, 南野直人, 宮本薫：SF-1複合体構成因子の同定とプロゲステロン産生に対する役割。第87回日本内分泌学会学術総会。2014, 4, 24-26, 福岡国際会議場（福岡市）。
  8. 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 矢澤隆志, 菅野直史, **河邊真也**, 宮本薫：ステロイドホルモン産生細胞におけるGSTAファミリーの転写制御と機能。第18回日本生殖内分泌学会学術集会。2013, 12, 7, シェーンバツハ・サポー（千代田区）。
  9. 今道力敬, 矢澤隆志, **河邊真也**, 向井邦晃, 折坂誠, 水谷哲也, 宮本薫：ヒト生殖腺における新たなアンドロゲン代謝機構。第18回日本生殖内分泌学会学術集会。2013, 12, 7, シェーンバツハ・サポー（千代田区）。
  10. 水谷哲也, 具云峰, 今道力敬, **河邊真也**, 矢澤隆志, 尾崎司, 南野直人, 宮本薫：SF-1複合体構成因子C/EBPのプロゲステロン産生に対する役割。第18回日本生殖内分泌学会学術集会。2013, 12, 7, シェーンバツハ・サポー（千代田区）。
  11. 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, **河邊真也**, 宮本薫：新たなステロイド代謝酵素GSTAファミリーの転写調節機構。第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会。2013, 11, 22-23, 千里ライフサイエンスセンター（豊中市）。
  12. 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 松村健大, **河邊真也**, 菅野真史, 矢澤隆志, 宮本薫：Ferredoxin 1の性腺特異的転写制御機構。第31回内分泌代謝学サマーセミナー。2013, 7, 11-13, ゆふいん山水館（由布市）。
  13. **河邊真也**, 矢澤隆志, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本薫：卵巣顆粒膜細胞におけるSF-1/LRH-1経路を介した転写制御機構。第31回内分泌代謝学サマーセミナー。2013, 7, 11-13, ゆふいん山水館（由布市）。
  14. 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 具云峰, 矢澤隆志, **河邊真也**, 菅野真史, 宮本薫：SF-1によるGlutathione S-transferase (GST) A familyの転写制御機構。第31回内分泌代謝学サマーセミナー。2013, 7, 11-13, ゆふいん山水館（由布市）。
  15. 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 松村健大, 矢澤隆志, **河邊真也**, 菅野直史：卵巣顆粒膜細胞におけるFDX1遺伝子の転写制御。第86回日本内分泌学会学術総会。2013, 4, 25-27, 仙台国際センター（仙台市）。
  16. 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具云峰, 矢澤隆志, 菅野直史, **河邊真也**, 宮本薫：ステロイドホルモン産生細胞におけるAlpha class GSTの転写制御。第86回日本内分泌学会学術総会。2013, 4, 25-27, 仙台国際センター（仙台市）。
  17. **河邊真也**, 矢澤隆志, 菅野直史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本薫：卵巣顆粒膜細胞におけるLRH-1のプロモーター解析。第86回日本内分泌学会学術総会。2013, 4, 25-27, 仙台国際センター（仙台市）。
  18. 矢澤隆志, **河邊真也**, 菅野直史, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本薫：卵巣顆粒膜細胞におけるアンドロゲンによるCox-2の発現制御機構。第86回日本内分泌学会学術総会。2013, 4, 25-27, 仙台国際センター（仙台市）。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河邊 真也 (KAWABE SHINYA)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60579415