

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861482

研究課題名(和文) 卵巣顆粒膜細胞の分化におけるエピゲノム制御機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of gene expression during the differentiation of ovarian granulosa cells

研究代表者

今道 力敬 (Imamichi, Yoshitaka)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00570194

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)：本研究では、卵巣顆粒膜細胞において転写因子SF-1およびLRH-1によって転写制御される遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、SF-1およびLRH-1に転写誘導される遺伝子として新たにhydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2 (HSD11B2)を見出した。ヒト卵巣におけるHSD11B2の機能について検証したところ、HSD11B2はアンドロゲンのひとつである11-ketotestosterone合成に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In present study, we performed comprehensive analysis of gene expressions induced by the transcription factors SF-1 and LRH-1 in ovarian granulosa cells. As the result, we found hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2 (HSD11B2) as a novel SF-1-target gene in human ovarian granulosa cells. Our results indicated that HSD11B2 participates in the production of the 11-oxygenated androgen, 11-ketotestosterone in human ovary.

研究分野：内分泌学

キーワード：卵巣 SF-1 LRH-1 HSD11B2

1. 研究開始当初の背景

卵巣顆粒膜細胞は、その前駆細胞あるいは幹細胞から分化し、卵巣において多様な機能を果たす。その分化異常は、卵巣機能不全をはじめとして様々な病態を惹き起こす。その病態の一因として、ステロイドホルモン産生異常が関与するが、その詳細については不明な点が多い。そのため、ステロイドホルモン合成に重要となる顆粒膜細胞の分化メカニズムをさらに詳細に解明する必要がある。Preovulatory follicle では、LH サージによってダイナミックに遺伝子発現が変化することで、排卵・黄体化が引き起こされる。これらの遺伝子発現の変化に関して、近年多くの報告があるが、その制御メカニズムについては、ほとんど明らかではない。特に、顆粒膜細胞の分化におけるヒストン修飾や DNA メチル化を介したクロマチン構造変換などのエピゲノムの変化に関する知見は限定的である。

卵巣、精巣および副腎といったステロイド産生組織においては、核内受容体である NR5A ファミリー (SF-1 および LRH-1) がステロイドホルモン合成関連遺伝子群の転写制御を行うことが明らかとなっている。卵巣では、核内受容体 NR5A ファミリーに属する転写因子 steroidogenic factor-1 (SF-1) および liver receptor homolog-1 (LRH-1) が、ステロイドホルモン合成遺伝子の転写制御を行っている。SF-1 および LRH-1 の顆粒膜細胞特異的ノックアウトマウスは、排卵障害や黄体形成不全の表現型を示すことが報告されており、顆粒膜細胞の分化に必須の転写因子であると考えられる。現在のところ、SF-1 および LRH-1 が、顆粒膜細胞の分化過程におけるエピゲノムの変化にどのように関与するかについての知見は乏しい。そこで本研究では、卵巣顆粒膜細胞の分化における SF-1 および LRH-1 の役割の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、1) SF-1 および LRH-1 に転写制御され顆粒膜細胞分化に関連する遺伝子の網羅的解析、2) 顆粒膜細胞の分化過程における遺伝子転写制御機構の解明を行い、SF-1 および LRH-1 によるエピゲノム制御を介した顆粒膜細胞の分化メカニズムの解明を目指した。卵巣顆粒膜細胞では、FSH 刺激により LH 受容体をはじめ卵巣成熟に必要とされる様々な遺伝子が発現し黄体化細胞へと分化する。この卵巣顆粒膜細胞分化過程においては、転写因子群あるいは転写共役因子群により引き起こされるエピゲノム変化が生じていると考えられる。それらの異常はステロイドホルモン産生異常を引き起こすと考えられる。本研究は、ステロイドホルモン産生異常症の責任遺伝子の同定に繋が

り、その原因究明と治療法の開発にも貢献することが期待される。

3. 研究の方法

1) ヒト卵巣顆粒膜細胞における SF-1 および LRH-1 標的遺伝子の網羅的解析

ヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞にアデノウイルスを用いて SF-1 および LRH-1 を導入し、発現変化する遺伝子群をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。

2) ヒト卵巣顆粒膜細胞における SF-1 新規標的遺伝子 HSD11B2 の転写調節機構の解析

HSD11B2 の転写調節機構については、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) およびヒト卵巣顆粒膜由来 KGN 細胞を用いたレポーターアッセイにより解析した。また HSD11B2 転写開始点周辺領域の DNA メチル化状態の変化をバイサルファイトシーケンシングによって調べた。

3) ヒト卵巣における HSD11B2 の機能解析

KGN 細胞への SF-1 導入に伴う 11-ケトテストステロン産生量の変化について検討した。また、ヒト HSD11B2 の 11-ケトテストステロン合成への直接的関与を明らかにするために、ヒト副腎由来 H295R 細胞へ HSD11B2 を強発現させ、培地中の 11-ケトテストステロン濃度を測定した。ヒト性腺において HSD11B2 が発現しているのかどうか RT-PCR および Western blotting を用いて解析した。さらに、男女血中テストステロンおよび 11-ケトテストステロン濃度を測定した。アロマトラーゼとエストロゲン受容体を共発現する MCF-7 細胞を用いることで、11-ケトテストステロンがアロマトラーゼによりエストロゲンへと変換されるかどうか、レポーターアッセイにより検討した。

4. 研究成果

1) 卵巣顆粒膜細胞における SF-1 および LRH-1 の新規標的遺伝子の同定

ヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞にアデノウイルスを用いて SF-1 および LRH-1 を導入し、発現変化する遺伝子群をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。さらに、RT-PCR ならびに Western blotting により解析した。その結果、SF-1 および LRH-1 により発現誘導される遺伝子として hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2 (HSD11B2) を見出した (図 1A)。HSD11B2 は哺乳類において、糖質コルチコイドの不活性化に関与する酵素として知られていた。一方、卵巣においては、HSD11B2 が SF-1 および LRH-1 に誘導されることで、卵巣分化の際に何かしらの役割を持つと考えられる。そこで、HSD11B2 の転写制御機構

およびヒト卵巣における機能について解析した。

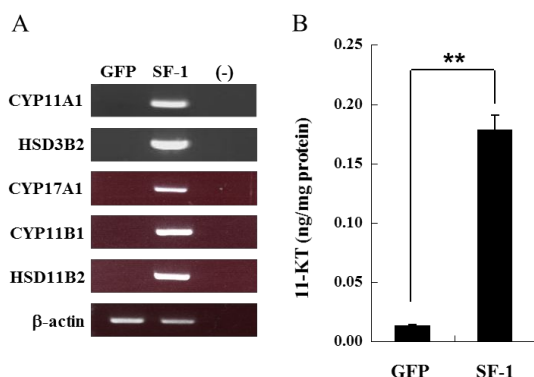


図 1. KGN 細胞における SF-1 導入による HSD11B2 遺伝子の発現誘導 (A) と 11-ケトテストステロン産生促進 (B)。

2) HSD11B2 遺伝子の転写制御機構

続いて、HSD11B2 遺伝子の転写制御機構について解析した。HSD11B2 遺伝子の転写開始点の周辺領域には CpG アイランドが存在するが、KGN 細胞への SF-1 導入は、この領域の CpG アイランドの DNA メチル化修飾に影響を与えなかった。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果より、HSD11B2 転写開始点より上流約 1200 bp の領域に SF-1 に転写活性化される領域が存在することが示唆された。

3) ヒト卵巣における HSD11B2 の役割解明

KGN 細胞へ SF-1 を導入すると、11-ケトテストステロン合成遺伝子群の発現がすべて上昇した (図 1A)。さらに 11-ケトテストステロン産生を促進した (図 1B)。そこで、ヒト生殖腺における 11-ケトテストステロン合成酵素 (CYP11B1 と HSD11B2) の発現を調べたところ、両者は共に精巣と卵巣で発現していた。さらに、ヒト血中におけるテストステロンと 11-ケトテストステロン濃度を測定したところ、男性血中のテストステロン濃度は女性の 10 倍以上存在するのに対し、11-ケトテストステロン濃度には男女間で有意な差を認めなかった。レポーターアッセイの結果、11-ケトテストステロンとテストステロンのアンドロゲン受容体に対する活性化能はほぼ同様であった。一方、アロマトラーゼを発現する MCF-7 細胞において、テストステロンはエストロゲン受容体を活性化したが、11-ケトテストステロンにはエストロゲン受容体の活性化能を全く認めなかった (図 2)。このことから、11-ケトテストステロンは、アロマトラーゼによるエストロゲンへの変換を受けないアンドロゲンであると予想された。

本研究結果により、ヒト性腺において HSD11B2 は、11-ケトテストステロン合成に関与することが明らかとなった。

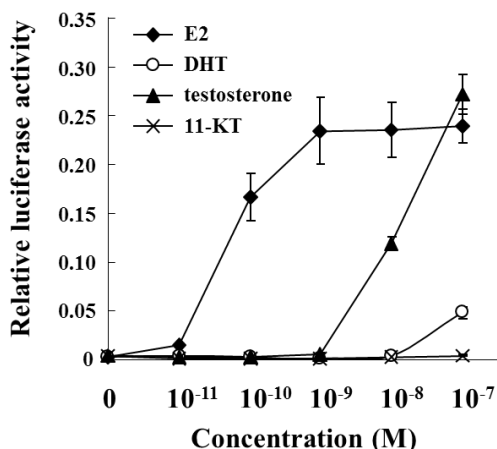


図 2. MCF-7 細胞におけるアロマトラーゼを介した各種アンドロゲンによるエストロゲン受容体の活性化

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 11 件)

1. Yazawa, T., Imamichi, Y., Miyamoto, K., Khan, MR., Uwada, J., Taniguchi, T. : Overviews of stem cells for gonadal and adrenal steroidogenic cells, American Journal of Life Sciences, 査読有, 3, 58-64, 2015.
DOI:10.11648/j.ajls.s.2015030302.21.
2. Kawabe, S., Mizutani, T., Ishikane, S., Martinez, M.E., Kiyono, Y., Miura, K., Hosoda, H., Imamichi, Y., Kangawa, K., Miyamoto, K., Yoshida, Y. : Establishment and characterization of a novel orthotopic mouse model for human uterine sarcoma with different metastatic potentials. Cancer Letters, 査読有, 366(2), 182-190, 2015.
DOI:10.1016/j.canlet.2015.06.018.
3. Yazawa, T., Imamichi, Y., Miyamoto, K., Khan, MR., Uwada, J., Umezawa, A., Taniguchi, T. : Regulation of steroidogenesis, development, and cell differentiation by steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. Zoological Science, 査読有, 32(4), 323-330, 2015.
DOI:10.2108/zs140237.
4. 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, 査読有, 408, 133-137, 2015.
DOI:10.1016/j.mce.2014.11.019.

5. 矢澤隆志, **今道力敬**, 梅澤明弘, 宮本薫: ES/iPS 細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化. 産科と婦人科, 査読無, 81(3),351-356,2014.
URL: <http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=ae4sanke&ye=2014&vo=81&issue=3&UserID=202.243.28.168>.
6. Yazawa, T., **Imamichi, Y.**, Miyamoto, K. Umezawa, A., Taniguchi, T. : Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. World J. Stem Cells, 査読有, 6(2), 203-212, 2014.
DOI:10.4252/wjsc.v6.i2.203.
7. 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. Biochem. Biophys. Acta., 査読有, 1839(5), 406-414,2014.
DOI:10.1016/j.bbagr.2014.03.016.
8. 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 β (CCAAT/enhancer-binding protein β) mediates progesterone production through transcriptional regulation in co-operation with SF-1 (steroidogenic factor-1). Biochemical Journal, 査読有 460, 459-471, 2014.
DOI:10.1042/BJ20131522.
9. **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, 査読有, 1839(1), 33-42, 2014.
DOI:10.1016/j.bbagr.2013.11.005.
10. 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, 査読有, 27(8), 3198-3208, 2013.
DOI:10.1096/fj.12-222745.
11. **Imamichi, Y.**, Yokoyama, Y. : Purification and characterization of a lectin from the starfish *Asterias amurensis*. Fisheries Science, 査読有, 79, 1007-1013, 2013.
DOI:10.1007/s12562-013-0667-9.
- 〔学会発表〕(計 30 件)
1. **今道力敬**, 矢澤隆志: ヒトにおける 11-ケトテストステロンの産生とその役割. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)2015,12,5-12,神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市).
 2. **今道力敬**, 矢澤隆志, 結城幸一, 柏木仁, 宮本 薫, 牛首文隆: ヒト生殖腺における 11-ケトテストステロンの合成とその機能. 第 66 回日本薬理学会北部会 2015,9,1, 富山国際会議場 (富山県・富山市).
 3. 石兼 真, 細田洋司, 野尻 崇, 徳留 健, 水谷哲也, 河邊真也, **今道力敬**, 宮本薫, 宮里幹也, 寒川賢治: 血管内皮細胞におけるアンジオテンシン シグナルは癌転移を増悪させる. 第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー. 2015,7,9-11, 柳川藩主立花邸 (福岡県・柳川市).
 4. 石兼 真, 水谷哲也, 細田洋司, 徳留 健, 野尻 崇, 三浦浩一, 木村 亨, 河邊真也, **今道力敬**, 宮里幹也, 寒川賢治, 宮本薫: 心房性ナトリウム利尿ペプチドのアンジオテンシン II 誘発メラノーマ肺転移増悪に対する抑制作用. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, ホテルニューオオタニ東京 (東京都).
 5. 水谷哲也, 河邊真也, 石兼 真, 松村健大, **今道力敬**, 南野直人, 宮本 薫: 卵巣における CNP 分子型の同定とその遺伝子発現調節. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, ホテルニューオオタニ東京 (東京都).
 6. 矢澤隆志, **今道力敬**, 宮本 薫, 梅澤明弘, 谷口隆信: ライディッヒ細胞における Cox-2 発現制御とプロスタグランジン産生. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, ホテルニューオオタニ東京 (東京都).
 7. **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, ホテルニューオオタニ東京 (東京都).
 8. 石兼 真, 水谷哲也, 細田洋司, 徳留 健, 野尻 崇, 三浦浩一, 木村 亨, 秋武義治, 河邊真也, **今道力敬**, 宮里幹也, 寒川賢治, 宮本 薫: 心房性ナトリウム利尿ペプチドのアンジオテンシン II によるメラノーマ血行性肺転移増悪化に対する抑制作用. 日本薬学会第 135 年会 2015,3,25-28, 神戸学院大学ほか (兵庫県・神戸市).
 9. 石兼 真, 水谷哲也, 細田洋司, 徳留 健, 野尻 崇, 三浦浩一, 木村 亨, 秋武義治, 河邊真也, **今道力敬**, 宮里幹也, 寒川賢治, 宮本 薫: 心房性ナトリウム利尿ペプチドはアンジオテンシン II により増悪

- するメラノーマ血行性肺転移を抑制する. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015,3,18-20, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).
10. **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 (大阪府・豊中市).
 11. **今道力敬**, 矢澤隆志, 宮本 薫: 哺乳類卵巣における 11-ketotestosterone の合成とその役割. 若手研究者のナイトセッション. 平成 26 年度日本動物学会中部支部大会. 2014,11,22-24, 金沢大学環日本海域環境研究センター臨海実験施設 (石川県・鳳珠郡能登町).
 12. 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, (石川県・鳳珠郡能登町).
 13. 矢澤隆志, **今道力敬**, 宮本 薫, 谷口隆信: ライディッヒ細胞におけるプロスタグランジン産生と Cox-2 の発現制御機構. 日本動物学会第 85 回仙台大会. 2014,9,11-13, 東北大学 (宮城県・仙台市).
 14. Ishikane, S., Mizutani, T., Hosoda, H., Tokudome, T., Nojiri, T., Kimura, T., Miura, K., Kawabe, S., **Imamichi, Y.**, Miyazato, M., Kangawa, K., Miyamoto, K. : Atrial natriuretic peptide attenuates pulmonary metastasis enhanced by angiotensin II through regulation of tumor-cell adhesion to vascular endothelial cells. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014. 2014,9,10-12, ホテルグランヴィア京都 (京都府・京都市).
 15. 矢澤隆志, 菅野真史, **今道力敬**, 宮本 薫, 谷口隆信: 初期胚特異的な LRH-1 の転写調節機構. 第 51 回日本生化学会北海道支部例会. 2014,7,18, (北海道・札幌市).
 16. 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・山梨県南都留郡富士河口湖町).
 17. 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, USA)
 18. **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 (福岡県・福岡市).
 19. 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 (福岡県・福岡市).
 20. 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, シェーンバッハ・サボー (東京都千代田区).
 21. **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, シェーンバッハ・サボー (東京都千代田区).
 22. 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, シェーンバッハ・サボー (東京都千代田区).
 23. 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 (大阪府・豊中市).
 24. 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 (大分県・由布市).
 25. **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 (大分県・由布市).
 26. 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

- (大分県・由布市).
27. **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 (宮城県・仙台市).
 28. 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 (宮城県・仙台市).
 29. 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 (宮城県・仙台市).
 30. [一般演題 (口頭発表)] 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 (宮城県・仙台市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今道 力敬 (Imamichi Yoshitaka)
旭川医科大学・薬理学講座・助教
研究者番号: 00570194