

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861495

研究課題名(和文) 子宮内膜の脱落膜化におけるMn-SOD発現に関する新たな転写調節経路・機構の解明

研究課題名(英文) Induction of Mn-SOD by cAMP is associated with histone acetylation status of the C/EBPb binding site of their promoters in human endometrial stromal cells.

研究代表者

田村 功 (TAMURA, Isao)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40610663

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)：子宮内膜間質細胞において、新たに同定したMn-SODのC/EBPb結合領域は、活性化ヒストン修飾が常におこっており、転写因子が結合しやすい状態をつくっていると考えられた。ここに脱落膜化刺激が加わると、さらに活性化されたC/EBPbが結合し、それに応じてMn-SOD発現がさらに上昇する。Mn-SODは活性酸素の消去というより細胞の生命維持機構を担う重要な遺伝子であり、その発現は恒常的に、かつ速やかに誘導されなければならない遺伝子であることを考慮すると、epigeneticsにより、生体にとって合目的な遺伝子発現がおこるように調節されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study showed the new molecular mechanisms by which C/EBPb up-regulates the expression of Mn-SOD in human endometrial stromal cell (ESC). The enhancer region of Mn-SOD gene show high histone acetylation status, which may contribute to form the loose chromatin structure so that C/EBPb can easily access to the DNA binding site. In human ESC, Mn-SOD gene expression is regulated by epigenetic mechanisms.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：子宮内膜 脱落膜化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜間質細胞は、黄体からのプロゲステロンの影響により脱落膜化間質細胞に分化し、様々な遺伝子発現変化を起こし着床に寄与している。特に、Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1)と Prolactin (PRL)は、脱落膜化により発現が誘導されることが知られており、脱落膜化マーカー遺伝子として認識されている。また、そのほかの注目すべき遺伝子として活性酸素消去酵素遺伝子がある。脱落膜化過程において、細胞の機能や代謝亢進に伴い活性酸素が発生する。活性酸素は細胞膜の酸化障害や DNA 障害を引き起こし細胞死を引き起こす。しかし、子宮内膜間質細胞の脱落膜化では、同時に活性酸素を消去する酵素である Mn-SOD の発現が増加する。これにより、ミトコンドリア内の活性酸素が消去され、細胞の生命が維持されることを我々は報告している (図 1)。この脱落膜化に伴う Mn-SOD 発現の増加は重要な生命維持機構であるが、詳細な調節機序はこれまでほとんど解明されていなかった。

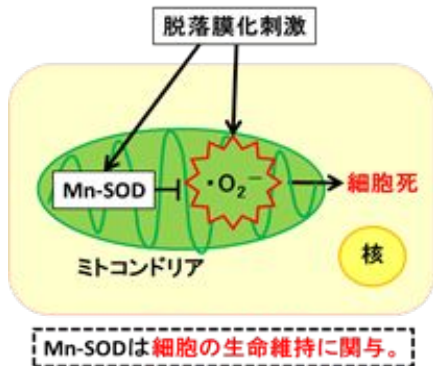


図 1 ; Mn-SOD の脱落膜化における役割

2. 研究の目的

脱落膜化による Mn-SOD 遺伝子発現調節に関する新たな転写活性経路の同定に加え、エピジェネティックな調節機構が Mn-SOD の転写調節に関与しているかを検討することを目的とした。Mn-SOD 遺伝子の第 2 イントロンには C/EBPβ や NF-κB などの転写因子の response element が多く存在する enhancer 領域が存在する (図 2)。

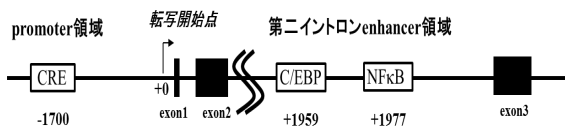


図 2 : Mn-SOD 遺伝子の第 2 イントロンに存在する enhancer 領域

この領域は、サイトカイン刺激による Mn-SOD 発現調節に関与している重要な領域といわれている。我々は、これまでに、子宮内膜間質細胞における TNFαによる Mn-SOD 発現上昇にはこの enhancer 領域が重要な役割を果たしていることを報告している。そこで、この領域に結合配列が存在する転写因子 C/EBPβに着目した。C/EBPβは子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程において発現が上昇する転写因子であり、C/EBPβが第 2 イントロン領域を介して Mn-SOD 発現調節に関与している可能性が充分考えられる。

近年、遺伝子発現調節には、ヒストン修飾が関与していることが明らかとなっている。ヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のアセチル化は転写促進に働くとされている。これらの修飾がクロマチン構造を変化させることで、転写因子の DNA への結合が変化し、転写調節を行っていると考えられている (図 3)。

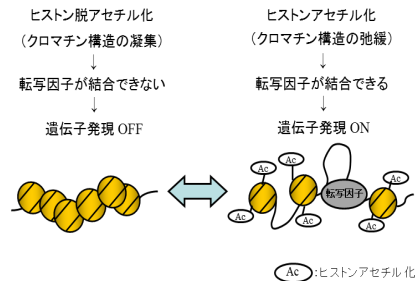


図 3 ; ヒストン修飾とクロマチン構造変換

実際に、我々は、IGFBP-1 と PRL (脱落膜化マーカー) 遺伝子発現にはヒストン修飾などのエピジェネティックな調節機構が関与していることを見出した。さらに、今回注目した第 2 イントロンの enhancer 領域内に存在する NF-κB 結合領域に関しても、この領域のヒストン修飾が、Mn-SOD 発現に関与していることも報告している。以上より、脱落膜化による Mn-SOD 発現調節にも第 2 イントロンが enhancer 領域として転写活性化機構に関与し、さらにエピジェネティックな調節機構を介して Mn-SOD 遺伝子発現に関与している可能性が高いと考えられる。本研究では、Mn-SOD 遺伝子発現調節に関する新たな転写活性化経路と転写因子の同定に加え、脱落膜化に伴う enhancer 領域のクロマチン構造変化と転写因子の DNA への結合の関連についても着目し、詳細な転写調節機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 患者の同意を得た上で、増殖期後期の子宮内膜から ESC を分離・培養し cAMP (0.5mM) で 4 日間培養し脱落膜化を誘導した。Mn-SOD

に加え、IGFBP-1 と PRL mRNA 発現を RT-PCR にて、C/EBPβ 蛋白発現を western blotting 法にて解析した。

(2) Mn-SOD enhancer 領域の転写活性を Luciferase assay で解析した。

(3) IGFBP-1、PRL promoter 領域、Mn-SOD enhancer 領域への C/EBPβ 結合を ChIP assay で解析した。

(4) siRNA を用いて C/EBPβ をノックダウンし、IGFBP-1、PRL、Mn-SOD mRNA 発現への影響を検討した。

(5) IGFBP-1、PRL promoter 領域、Mn-SOD enhancer 領域のヒストン H3K27 のアセチル化修飾状態 (H3K27ac) を ChIP assay で解析した。

4. 研究成果

(1) cAMP 刺激により、IGFBP-1、PRL 遺伝子発現誘導とともに Mn-SOD mRNA と C/EBPβ タンパク発現が上昇した。

(2) Mn-SOD 遺伝子の second intron 領域 (+1931bp ~ +2079bp) に、cAMP による新たな転写活性化領域を同定した。

(3) cAMP 刺激により Mn-SOD enhancer 領域、IGFBP-1、PRL promoter 領域への C/EBPβ 結合が増加した。

(4) C/EBPβ のノックダウンにより、cAMP 刺激による IGFBP-1、PRL、Mn-SOD 発現上昇が有意に抑制された。

(5) 非脱落膜化細胞 (control) における C/EBPβ 結合と H3K27ac 修飾は Mn-SOD enhancer 領域において有意に高かった。cAMP により IGFBP-1、PRL promoter 領域の H3K27ac が Mn-SOD enhancer 領域と同じレベルまで誘導された。

以上の結果より、ESC において、新たに同定した Mn-SOD の C/EBPβ 結合領域は、活性化ヒストン修飾が常におこっており、転写因子が結合しやすい状態をつくっていると考えられる。ここに脱落膜化刺激が加わると、さらに活性化された C/EBPβ が結合し、それに応じて Mn-SOD 発現がさらに上昇する。Mn-SOD は活性酸素の消去というより細胞の生命維持機構を担う重要な遺伝子であり、その発現は恒常的に、かつ速やかに誘導されなければならない遺伝子であることを考慮すると、epigenetics により、生体にとって合目的な遺伝子発現がおこるように調節されていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tamura I, Sato S, Okada M, Tanabe M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Importance of C/EBPβ binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in human

endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 査読有 2014, 155(1):275-86. doi: 10.1210/en.2013-1569.

〔学会発表〕(計 5 件)

田村 功、ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) における脱落膜化関連遺伝子発現のエピジェネティクス調節、日本受精着床学会・学術講演会、2013 年 8 月 8 日~8 月 9 日、別府国際コンベンションセンター (別府市)

Isao Tamura, Maki Okada, Manabu Tanabe, Lifa Lee, Norihiro Sugino, Induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP is associated with histone acetylation status of the C/EBPβ binding site of their promoters in human endometrial stromal cells. Annual meeting of the society for the study on reproduction. 2013 年 7 月 22 日~7 月 25 日、モントリオール (カナダ)

田村 功、岡田真紀、李 理華、前川 亮、浅田裕美、佐藤 俊、山縣芳明、田村博史、杉野法広、子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化によって上昇する遺伝子発現における C/EBPβ を介したエピジェネティクス調節機構、日本エピジェネティクス研究会、2013 年 5 月 30 日~5 月 31 日、奈良県新公会堂 (奈良市)

田村 功、田邊 学、李 理華、前川 亮、浅田裕美、山縣芳明、田村博史、杉野法広、ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化によって誘導される manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 遺伝子発現に關与する新たな転写調節経路、日本産婦人科学会、2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日、ロイトン札幌 (札幌市)

田村 功、田邊 学、李 理華、前川 亮、浅田裕美、山縣芳明、田村博史、杉野法広、ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化によって誘導される manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 遺伝子発現に關与する新たな転写調節経路、日本内分泌学会、2013 年 4 月 25 日~4 月 27 日、仙台国際センター (仙台市)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 功 (TAMURA, Isao)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40610663

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし