

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861330

研究課題名(和文)子宮内膜における転写因子によるヒストン修飾を介した新たな遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulation by C/EBPb via changes of histone modification in decidualization.

研究代表者

城崎 幸介 (JOZAKI, Kosuke)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80721323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜間質細胞の脱落膜化における転写因子C/EBPbの遺伝子発現制御機構を解明するため、RNAシーケンスとChIPシーケンスによりゲノムワイドな解析を行った。その結果、脱落膜化過程では、C/EBPbにより2251遺伝子の発現が上方制御され、1862遺伝子の発現が下方制御されていた。上方制御されていた2251遺伝子のうち478遺伝子が、転写活性化修飾であるH3K27acの増加が認められた。478遺伝子のうちC/EBPbが結合していたのは10遺伝子のみであった。脱落膜化におけるC/EBPbによる遺伝子発現制御のひとつに、ヒストン修飾の変化を介した間接的な機構が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We investigated the regulation mechanism of gene expression downstream of C/EBPb in decidualization by Genome-wide analysis including RNA sequencing and ChIP sequencing. To investigate the genes regulated by C/EBPb, we induced decidualization in ESCs with or without inhibition of C/EBPb then compared the expression profiles between the ESCs. The result showed 2251 genes were upregulated and 1862 genes were downregulated by C/EBPb. Gene ontology analysis for both upregulated and downregulated genes showed the terms such as negative regulation of cell proliferation, regulation of DNA binding. We next investigated the genes which obtained H3K27ac by C/EBPb in upregulated 2251 genes. Of the 2251 genes, 478 genes acquired H3K27ac. In the 478 genes, 10 genes were the genes which obtained C/EBPb binding in decidualization. These results indicate that C/EBPb directly and indirectly regulates downstream genes, and the indirect regulation of C/EBPb, in part, includes histone acetylation.

研究分野：産科婦人科

キーワード：脱落膜化 ヒストン修飾 ゲノムワイド解析 転写因子 発現制御 オントロジー

1. 研究開始当初の背景

ヒト子宮内膜において、脱落膜化は胚が着床するために必須の現象である。子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化は黄体からのプロゲステロンにより cAMP を介して誘導されるが、この過程で多くの遺伝子において、その発現が新たに誘導されたり、発現レベルが増加したり、また逆に発現が抑制されるなど、劇的な遺伝子発現の変化が起こる。これまでの脱落膜化における遺伝子発現制御に関する研究の多くは、転写因子側からの研究が重点的に進められてきた。特に、転写因子 C/EBPb (CCAAT/enhancer-binding protein b) は、ESC の脱落膜化過程において、脱落膜化マーカー遺伝子である Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) と Prolactin (PRL) を含む多くの遺伝子発現を調節していることから、脱落膜化において重要な転写因子として機能していることが知られている。しかし、遺伝子発現は、単に転写因子のみで調節されているのではなく、その受け手側であるクロマチンの状態によっても調節されている。すなわちヒストン修飾に代表されるエピジェネティクス調節機構がクロマチン構造を変化させ、転写因子の DNA 結合を規定することによっても遺伝子の発現は制御されている。

これまでに我々は、ESC において IGFBP-1 と PRL のプロモーター領域のヒストンアセチル化状態が、C/EBPb の DNA 結合と遺伝子発現に重要であることを報告してきた。また脱落膜化によりこれらのプロモーター領域の H3K27ac 修飾レベルが増強すること、さらにこのヒストン修飾の増強には C/EBPb のリクルートが関与していることを見出している。すなわち、子宮内膜間質細胞脱落膜化における遺伝子発現調節は、C/EBPb が様々な遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾を変化させていることが強く示唆される。

脱落膜化に伴う遺伝子発現制御の研究に関して、これまでは特定の遺伝子について焦点が当てられてきたが、近年、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析により、特定の遺伝子に限らず、ゲノム全域の転写因子結合領域やヒストン修飾状態が明らかになってきている。我々はすでに、ESC の脱落膜化において、遺伝子発現とともにヒストン修飾がゲノムワイドで変化するという事実を ChIP-sequence 法と RNA-sequence 法により明らかにし、報告してきた ()。

2. 研究の目的

本研究では脱落膜化過程で発現が変化する遺伝子について、脱落膜化により、プロモーター領域のヒストン修飾がどのように変化するか、さらに、このヒストン修飾変化と遺伝子発現変化に転写因子 C/EBPb がどのように関与しているのかを次世代シーケンサーを用いて、ゲノムワイドに解析する。すなわち、脱落膜化における C/EBPb の遺伝子

発現制御機構を遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の観点から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脱落膜化において C/EBPb により発現が制御されている遺伝子の抽出
IRB の承認と患者の同意を得て、増殖期後期の子宮内膜から ESC を分離・培養した。その ESC に対し、C/EBPb をノックダウンするための C/EBPb siRNA と、対照群として Control siRNA を導入した。両者の細胞を cAMP (0.5 mM) で 4 日間培養し、脱落膜化を誘導し、IGFBP-1 と PRL の mRNA 発現を RT-PCR により検出することにより脱落膜化を確認した。また、実際に C/EBPb がノックダウンされているかをウェスタンブロット法により確認した。その後、細胞よりトータル RNA を抽出し、次世代シーケンサー HiSeq1000 (イルミナ社) を使用し、RNA-sequence によりゲノムワイドに mRNA 発現解析を行った。cAMP 刺激により発現が上昇した遺伝子のうち、C/EBPb ノックダウンによって発現の上昇が抑制された遺伝子と、また、cAMP 刺激により発現が低下した遺伝子のうち、C/EBPb ノックダウンによって発現の低下が抑制された遺伝子を C/EBPb が脱落膜化において発現に関与している遺伝子とした。

(2) 脱落膜化におけるヒストン修飾 (H3K27ac) 変化に C/EBPb が関与する遺伝子の同定

(1) と同様に、C/EBPb をノックダウンした ESC とコントロールの ESC について、cAMP により脱落膜化を誘導した。それらの ESC について、ホルマリンで固定後、DNA を断片化させ、ヒストン修飾 (H3K27ac) 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、ChIP-DNA を作製した。この DNA について次世代シーケンサーによりシーケンスし、コントロール ESC で H3K27ac が変化し、C/EBPb をノックダウンした ESC では H3K27ac の変化が起こらない遺伝子を同定した。H3K27ac の変化は、遺伝子の転写開始点より上流 10 kbp、転写終了点より下流 10 kbp の領域について調べた。さらに、これらの遺伝子について、遺伝子オントロジー解析を施行した。また、C/EBPb の下流で発現が変化し、かつ、ヒストン修飾も変化する遺伝子のオントロジー解析も施行した。

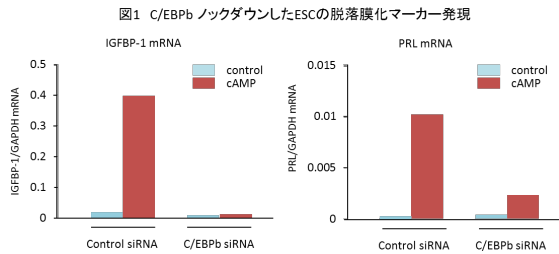
(3) 脱落膜化における転写因子 C/EBPb が結合する遺伝子の同定

cAMP 刺激により脱落膜化を誘導した細胞をホルマリンで固定後、DNA を断片化させ、C/EBPb 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、ChIP-DNA を作製した。この DNA について次世代シーケンサーによりシーケンスを行い、C/EBPb が脱落膜化により新たに DNA に結合する遺伝子を同定した。さらに、C/EBPb の下流で発現が変化し、かつ、C/EBPb が結合する遺伝子のオントロジー解析を施

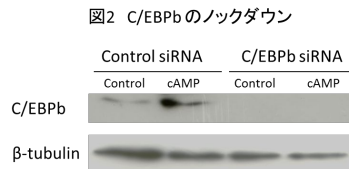
行した。

4. 研究成果

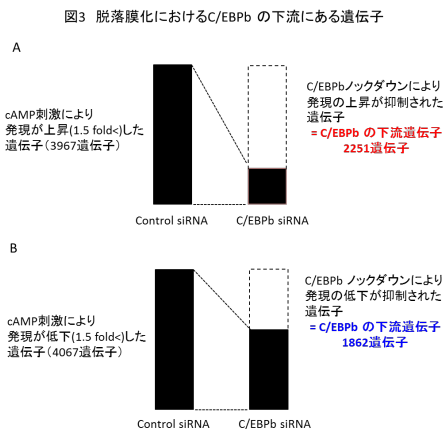
(1) 脱落膜化において C/EBPb により発現が制御されている遺伝子
cAMP 刺激による脱落膜化誘導において、上昇する IGFBP-1 および PRL の発現は C/EBPb ノックダウン ESC では抑制された (図 1)。



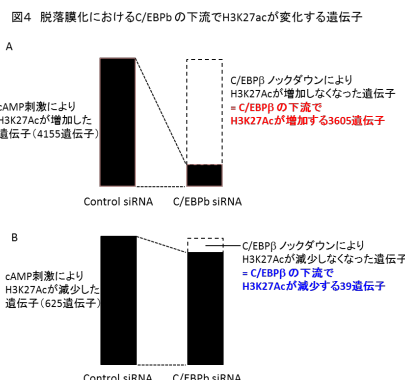
また、C/EBPb タンパクは、siRNA によりノックダウンされていた (図 2)。



C/EBPb の下流で発現が上昇する遺伝子は、2251 遺伝子 (図 3 -A)、発現が低下する遺伝子は 1862 遺伝子であった (図 3 -B)。



(2) 脱落膜化におけるヒストン修飾 (H3K27ac) 変化に C/EBPb が関与する遺伝子
cAMP 刺激による脱落膜化誘導において、C/EBPb の下流で H3K27ac 修飾が増加する遺伝子は 3605 遺伝子 (図 4 -A)、減少する遺伝子は 39 遺伝子であった (図 4 -B)。



C/EBPb の下流で H3K27ac 修飾が増加する 3605 遺伝子のオントロジー解析では、代謝やタンパク局在・輸送に関与している遺伝子が有意に抽出された (Table 1)。

Table 1. C/EBPb の下流で H3K27ac 修飾が増加する 3605 遺伝子のオントロジー解析

Gene ontology term	gene count	p-value
primary metabolic process	1851	8.14E-16
macromolecule localization	548	4.86E-06
intracellular transport	388	1.26E-05
establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	40	0.00199
tricarboxylic acid metabolic process	18	0.0158
cotranslational protein targeting to membrane	37	0.0162

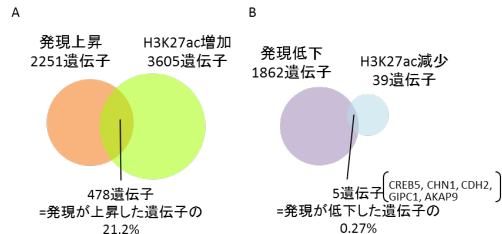
また、C/EBPb の下流で H3K27ac 修飾が減少する 39 遺伝子のオントロジー解析では、細胞の形態調節に関与する遺伝子が有意に抽出された (Table 2)。

Table 2. C/EBPb の下流で H3K27ac 修飾が増加する 3605 遺伝子のオントロジー解析

Gene ontology term	gene count	p-value
cell morphogenesis	5	0.0084644
cellular component morphogenesis	5	0.0122853
cell morphogenesis involved in differentiation	4	0.0179582
cell projection morphogenesis	4	0.018153
cell part morphogenesis	4	0.0203738
cell motion	5	0.0222973

また、C/EBPb の下流で発現が上昇しかつ H3K27ac が増加する遺伝子は 478 遺伝子であり (図 5 -A)、タンパク修飾・輸送に関わる遺伝子が有意に多かった (Table 3)。また、発現が低下し、かつ、H3K27ac が減少する遺伝子は 5 遺伝子のみであった (図 5 -B)。

図 5 C/EBPb の下流で発現が上昇し H3K27ac が増加する遺伝子と C/EBPb の下流で発現が低下し H3K27ac が減少する遺伝子



また、C/EBPb の下流で発現が上昇し、かつ、H3K27ac が増加する 478 遺伝子のオントロジー解析においては、タンパクの輸送・修飾に関与する遺伝子や、細胞周期に関与する遺伝子が有意に抽出された (Table 3)。

Table 3. C/EBPb の下流で発現が上昇し、かつ、H3K27ac 修飾が増加する 478 遺伝子のオントロジー解析

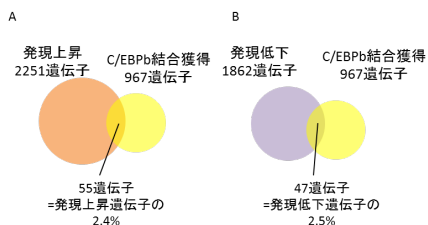
Gene ontology term	gene count	p-value
protein targeting to membrane	5	0.007561
response to organic substance	29	0.00777
regulation of growth	17	0.007959
intracellular protein transport	18	0.008605
protein maturation	9	0.008878
cellular protein localization	19	0.009964
cellular macromolecule localization	19	0.010603
positive regulation of cell cycle	6	0.011428
post-Golgi vesicle-mediated transport	6	0.012268
positive regulation of epithelial cell proliferation	5	0.016132
regulation of protein kinase cascade	13	0.016645
protein maturation by peptide bond cleavage	7	0.016849
protein processing	8	0.017802
protein transport	28	0.026409
regulation of cell cycle	15	0.028246
establishment of protein localization	28	0.02875

(3) 脱落膜化における転写因子 C/EBPb が結合する遺伝子

cAMP 刺激による脱落膜化誘導で、C/EBPb が結合したのは 967 遺伝子であった。C/EBPb の下流で発現が上昇しかつ C/EBPb 結合を獲得するのは 55 遺伝子であった (図 6 -A)。また、

発現が低下し、かつ、C/EBPb 結合を獲得するのは 47 遺伝子であった (図 6 -B)。

図6 C/EBPb 下流で発現が上昇する2251遺伝子と低下する1862遺伝子のうち、C/EBPb が結合する遺伝子



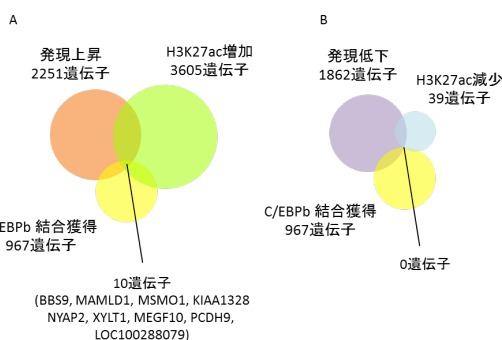
C/EBPb の下流で発現が上昇し、かつ、C/EBPb が直接結合する 55 遺伝子のオントロジー解析では、同種親和性細胞接着に関連した遺伝子が有意に抽出された (Table 4)。

Table 4. C/EBPb の下流で発現が上昇し、かつ、C/EBPb が直接結合する55遺伝子のオントロジー解析

Gene ontology term	gene count	p-value
cell projection morphogenesis	4	0.013764389
negative regulation of cell communication	4	0.014219633
cell part morphogenesis	4	0.015475551
homophilic cell adhesion	3	0.029848985
cell morphogenesis	4	0.036409547
cell projection organization	4	0.039573926
calcium-dependent cell-cell adhesion	2	0.046573684
cellular component morphogenesis	4	0.047787071

さらに、C/EBPb 下流で発現が上昇し、H3K27ac 増加と C/EBPb 結合を獲得する遺伝子は 10 遺伝子であった (図 7 -A)。また、C/EBPb 下流で発現が低下し、H3K27ac 減少と C/EBPb 結合を獲得する遺伝子は認められなかった (図 7 -B)。

図7 C/EBPb の下流で発現が変化した遺伝子のうち、H3K27ac の変化があり、C/EBPb の結合を獲得する遺伝子



cAMP 刺激による ESC の脱落膜化の誘導において、C/EBPb は多くの遺伝子の発現制御に関与していることが明らかとなった。また、C/EBPb の関与により発現が制御されている遺伝子の中に、ATF2 や SRC などヒストン修飾に関与している遺伝子が存在していた。このことは、脱落膜化における C/EBPb による遺伝子発現制御のメカニズムのひとつとして、エピジェネティックな変化を介し、下流にある遺伝子の発現を調整している可能性を示していると考えられる。

< 引用文献 >

Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S,

Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2014 Oct;28(10):1656-69.

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ohtsuka Y, Higashimoto K, Oka T, Yatsuki H, Jozaki K (他 8 名、5 番目) Identification of consensus motifs associated with mitotic recombination and clinical characteristics in patients with paternal uniparental isodisomy of chromosome 11. *Hum Mol Genet.* 2016 Apr 1;25(7):1406-19. 査読有 DOI: 10.1093/hmg/ddw023.

Maekawa R, Sato S, Okada M, Jozaki K, Kajimura T, Yamamoto S, Sugino N. (他 5 名、6 番目) Tissue-Specific Expression of Estrogen Receptor 1 Is Regulated by DNA Methylation in a T-DMR. *Mol Endocrinol.* 2016 Mar; 30(3):335-47. 査読有 DOI: 10.1210/me.2015-1058.

Yamagata Y, Takaki E, Jozaki K, Sugino N. (他 9 名、5 番目) Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res.* 2015 Jul 31;8:49. 査読有 DOI: 10.1186/s13048-015-0179-6.

Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Higashimoto K, Jozaki K, Soejima H. Fibroadenoma in Beckwith-Wiedemann syndrome with paternal uniparental disomy of chromosome 11p15.5. *Pediatr Int.* 2014 Dec;56(6):931-4. 査読有 DOI: 10.1111/ped.12406.

Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K. (他 19 名、3 番目) Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med.* 2014 Dec;16(12):903-12. 査読有 DOI: 10.1038/gim.2014.46.

Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2014 Oct;28(10):1656-69. 査読有 DOI: 10.1210/me.2014-1117.

〔学会発表〕(計 3 件)

第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2016/5/20 千里ライフサイエンスセンター 大阪府豊中市) 次

世代シーケンサーを用いたゲノム
ワイド解析による転写因子 C/EBP β
の脱落膜化過程での役割の検討 城
崎幸介

第 68 回日本産科婦人科学会学術集会
(2016/4/23 東京国際フォーラム
東京都千代田区) 次世代シーケン
サーを用いたゲノムワイド解析によ
る転写因子 C/EBP β の脱落膜化過程
での役割の検討 前川亮、城崎幸介
第 20 回日本生殖内分泌学会学術集
会 (2016/1/9 神戸国際会議場 兵
庫県神戸市) ヒト子宮内膜間質細胞
の脱落膜化におけるコア転写因子
C/EBP β の転写制御ネットワーク
前川 亮、城崎幸介

〔図書〕(計 1 件)

Sugino N, Tamura I, Maekawa R,
Jozaki K. Decidualization and
epigenetic regulation. Uterine
Endometrial Function, edited by
Kanzaki H, Springer, in press
2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城崎 幸介 (JOZAKI, Kosuke)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80721323