

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893112

研究課題名(和文)LHRのエピジェネティックな発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of the luteinizing hormone receptor

## 研究代表者

中村 智子(Nakamura, Tomoko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40732681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：良質な卵を得るためには卵胞内で卵を支持する顆粒膜細胞の正常な発育が必須である。顆粒膜細胞は卵胞の発育とともに黄体形成ホルモンレセプター(LHR)を発現するようになることで黄体形成ホルモン感受性を獲得し排卵に至る。本研究はLHR発現のエピジェネティックな制御機構の解明を目的とした。エピジェネティクスとはDNAの配列変化によらない遺伝子発現の制御を指す。本研究では、LHRプロモーター領域のヒストン修飾及びDNAメチル化につき検討し、特にH4K8と3K9のアセチル化及び2,4,5,9番目のCpG配列のメチル化が、LHR発現上昇に大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The normal growth of the granulosa cells is essential for obtaining a high-quality egg with a high potential to be fertilized. Granulosa cells, which support the growth of eggs, begins and increases its expression of the luteinizing hormone receptor (LHR) as the ovarian follicle grows. Here we studied the epigenetic regulation of LHR expression. Epigenetics is the regulation of gene expression which do not involve changes in the underlying DNA sequence. Such regulations include histone modification and DNA methylation. In this study, we studied histone modifications and DNA methylations of the LHR promoter region. Our results show that histone acetylation of H4K8 and H3K9, and DNA methylation of the 2nd,4th 5th and 9th CpG sites are important in elevating LHR expression.

研究分野：不妊生殖

キーワード：エピジェネティック制御

### 1. 研究開始当初の背景

生殖医療技術は急速に発展しているが、「いかに妊孕性の高い良質な卵を得るか」は大きな課題として残っている。生体内では卵は周囲の顆粒膜細胞とともに卵胞を形成する。卵と顆粒膜細胞は相互に作用しながら互いに発育し、正常な顆粒膜細胞の発育は受精可能な卵への成熟に極めて重要である。顆粒膜細胞の発育過程の中でも、黄体形成ホルモンレセプター (LHR) の発現は緻密に制御されている。卵巣内で「眠っていた」原始卵胞は発育を開始すると、1次卵胞、2次卵胞、成熟卵胞を経て排卵に至り、黄体となる。発育初期の卵胞の顆粒膜細胞は LHR を発現していないが、2次卵胞以降に発育した顆粒膜細胞は LHR 発現を開始し、その後卵胞発育とともに発現は増強し、最終的には LH サージに反応して排卵に至る。一方で、卵胞発育過程において LHR の発現が早すぎると卵胞発育が障害される可能性があり、LHR の不適切な発現は、不妊の一因となる多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の病態に関与している可能性が示唆されている。

エピジェネティクス (ヒストン修飾と DNA メチル化) とは、DNA の配列変化によらない遺伝子発現の制御を指す。ヒストンの修飾パターンによりクロマチン構造が変化することで、転写因子の結合が変化し遺伝子発現が制御されることが分かっている。また、脊椎動物のゲノム DNA のメチル化は、シトシン塩基の次にグアニン塩基が続く CpG 配列中のシトシン塩基に付加される。遺伝子のプロモーター領域にはこの CpG 配列が多くみられ、これら CpG 配列のメチル化修飾により転写因子の結合が変化し遺伝子の転写活性が制御されることが知られている。これまでに、LHR の発現はエピジェネティックな制御を受けると、ヒト癌細胞株では報告されている。また、LHR プロモーター領域の DNA メチル化率が「PCOS の罹患しやすさ」に関与するとの報告もある。しかし最も重要な、ヒト非黄体化顆粒膜細胞での LHR プロモーター領域のエピジェネティックな制御に関しては未だ報告がない。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト非黄体化顆粒膜細胞における LHR のエピジェネティックな発現制御機構の解明を目的としており、最終的には PCOS の病態解明を目指すとともに、体外卵胞培養系の開発の一助とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

黄体化前のヒト顆粒膜細胞を検体として得ることは非常に困難である。そのため、顆粒膜細胞における実験の多くは、癌化した顆粒膜細胞株 (KGN など) や、黄体化後の顆粒膜細胞を用いている。しかし癌化や黄体化により、顆粒膜細胞の性質や反応は著しく変化

していることが予想される。一方で我々のグループは、これまでにヒト不死化非黄体化顆粒膜細胞株 (HGrC1) を樹立して報告している (Bayasula et al., 2012 Endocrinology)。この HGrC1 を用いることで安定した実験系を組むことができた。また、HGrC1 と照合することで不死化細胞株での実験の妥当性を検証し LHR 発現に関するデータをより実際の生体内におけるものに近づけるために、生体から採卵の際に得られる黄体化顆粒膜細胞初代培養細胞 (primary) も用いて実験を行った。体外受精を受ける患者から得た黄体化顆粒膜細胞を検体として使用するために必要な学内倫理委員会の承認は得ている。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA) と DNA 脱メチル化剤 5-Azacytidine C (5-AzaC) の添加により、LHR プロモーター領域に何らかのエピジェネティックな作用が及び、LHR 発現が制御されると考えられた。これまでに、LHR 発現を誘導すると報告されている卵胞刺激ホルモン (FSH) や estradiol (E2) も合わせ、TSA や 5-AzaC の添加による LHR 発現の変化とヒストン修飾・DNA メチル化の関連を解析した。

ヒストン修飾 (アセチル化、メチル化) はクロマチン免疫沈降 (ChIP assay) にて評価した。すなわち、まず培養細胞をホルマリン固定することで DNA に結合したタンパク質を固定化した。培養細胞より DNA を採取し、酵素法にて切断した。例えば histone 3 の 14 番目のアセチル化リジン (H3K14ac) に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、アセチル化された H3K14 が結合した DNA 断片を抽出した。これをテンプレートとして LHR プロモーター領域を real-time PCR にて定量し、免疫沈降にて抽出していない元の DNA 断片をテンプレートとした場合の定量に対する割合を計算した。同様に他のヒストン修飾を検証するため、H4K16, H4K8, H3K9, H4K5, H4K12 のアセチル化抗体、H3K9, H3K4 のメチル化抗体を用いて ChIP assay を行った。

DNA メチル化に関してはヒト LHR プロモーター領域に確認されている 13 個の CpG 配列



Zhang, Y et al. 2005. Mol. Cell Biol.

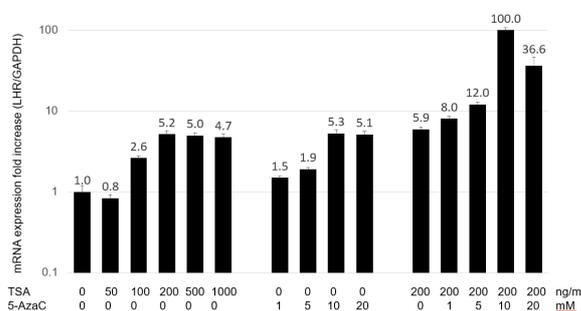
に着目した。培養細胞から genomic DNA を回収し、bisulfite 処理を行った。Bisulfite 処理により、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。Bisulfite 処理した DNA を用いて TA cloning にて大腸菌の形

質転換を行った。HGrC1 はポリクローナルな細胞株であるため、各サンプルで培養した大腸菌は少なくとも 30 前後のコロニーを検討した。各コロニーから得られたプラスミドをテンプレートとして、LHR プロモーター領域にかかるプライマーで PCR を行った。得られた PCR 産物を sequence し、シトシンの変換の有無により、それぞれの CpG 配列のメチル化の有無を確認した。

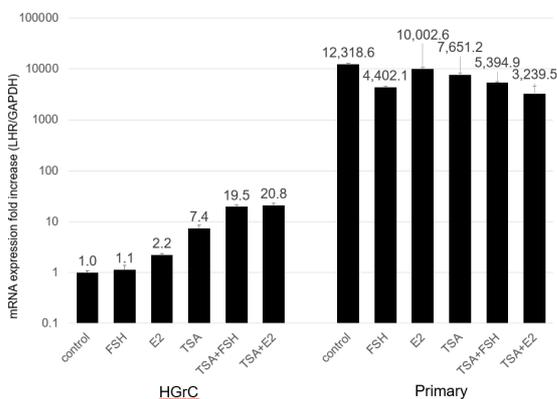
さらにこれらの実験結果を踏まえて特に LHR 発現に関与すると考えられた CpG 配列を検討した。その部位の遺伝子配列に特異的に結合する転写因子を調べ、ChIP assay にて、TSA 及び 5AzaC 添加によってその結合がどのように変化しているか評価した。

#### 4. 研究成果

(1)まず HGrC1 における TSA と 5AzaC 添加による LHR 発現の変化を調べた。TSA、5AzaC とともにそれぞれ濃度依存性に LHR 発現を上昇させた。さらに、TSA と 5AzaC を共に添加することにより LHR 発現は相加的に上昇した。

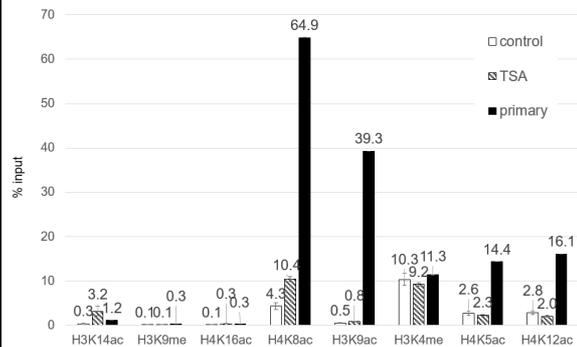


(2)LHR は FSH や E2 によって誘導されることが知られている。HGrC1 においては、FSH も E2 もそれぞれ単独での添加では LHR 発現は誘導されなかった。しかしながら、TSA とともに添加することで初めて、LHR の発現が上昇した。これは、LHR 発現が FSH や E2 への反応性を獲得する前にエピジェネティックな制御段階が存在する可能性を示唆するものである。一方で primary は HGrC1 の 1 万倍以上の LHR 発現レベルを示し、どの薬剤を添加しても著変は見られなかった。黄体化が完了し

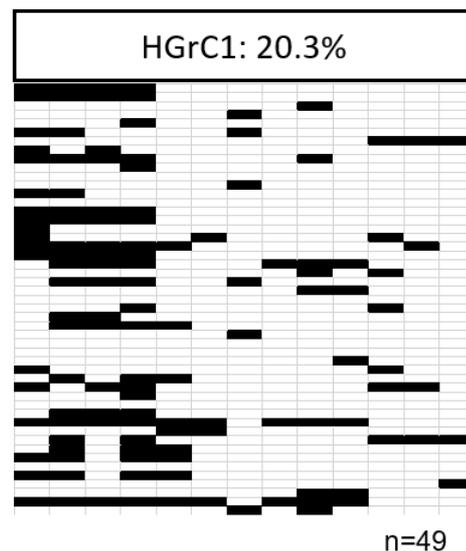


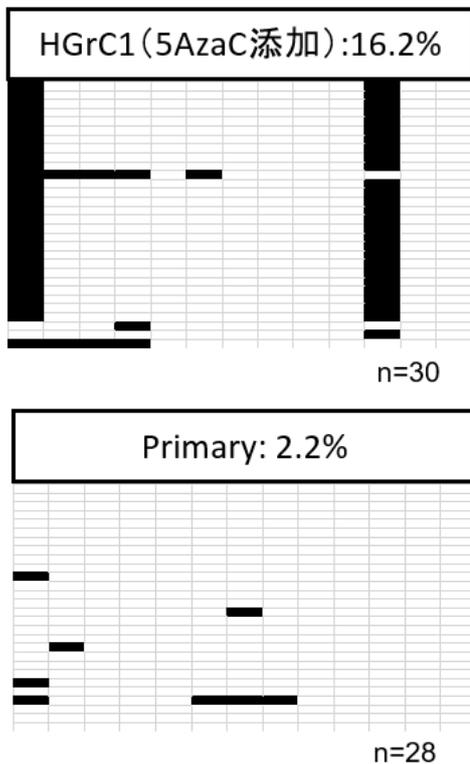
た primary では LHR の発現抑制は外れて発現はプラトーに達したためさらなる刺激には反応しなかった可能性が考えられた。

(2)ヒストン修飾では、HGrC1 に TSA を添加することで、H4K8 と H3K9 では各々%input が 4.3%から 10.4%へ、0.5%から 0.8%へ上昇した。同じく primary では、各々64.9%と 39.3%とさらに高値だった。H4K8 と H3K9 は、一般的にアセチル化によってクロマチン構造は緩み、その結果転写因子が結合しやすくなることで、遺伝子発現は亢進されることが知られており、今回得られた結果は既報と合致する結果であった。

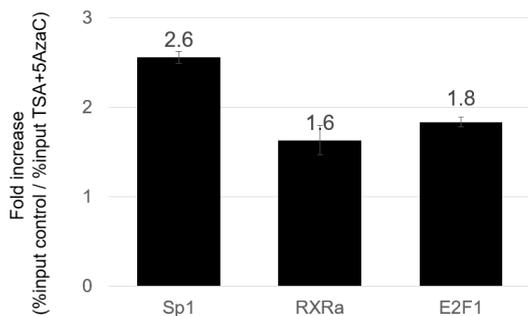


(3)DNA メチル化では、HGrC1、5-AzaC を添加した HGrC1、primary においてそれぞれ 49、30、28 個の大腸菌コロニーに関して LHR プロモーター領域の 13 個の CpG 配列を調べた。CpG 配列は、HGrC1 では 20.3%がメチル化されていた。5-AzaC 添加により 16.2%へ全体のメチル化率は低下した。TSA の添加ではメチル化率に変化は見られなかった。一方で primary ではメチル化率は 2.2%と少なかった。





次に、13個のCpG配列の内訳を検討すると、特に2、4、5、9番目のCpG配列においてHGrC1では5-AzaC添加によってメチル化率が低下し、primaryではほとんどメチル化を認めなかった。これらの部位の遺伝子配列に特異的に結合する転写因子、Sp1、RXRα、E2F1についてLHRプロモーター領域への結合をChIP assayにて評価した。特にSp1はLHR発現において特に重要な転写因子であることが報告されている。HGrC1ではTSAと5-AzaCの添加により結合率が各々2.6倍、1.6倍、1.8倍に上昇した。



これらの結果により、ヒト非黄体化顆粒膜細胞では、LHRプロモーター領域はヒストン修飾やDNAメチル化などのエピジェネティックな制御を受けて、LHR発現が制御されている可能性が示唆された。また、HGrC1において、FSHとE2のそれぞれ単独の添加ではLHR発現は変わらなかった一方で、各々において

TSAを共に添加することで初めてLHR発現が増加し、相加的な効果を示した。HGrC1は初期の胞状卵胞に由来する顆粒膜細胞であるが、このことは初期の胞状卵胞の顆粒膜細胞において、FSHやE2への反応性を獲得するにはエピジェネティックな制御段階が不可欠である可能性を示唆している。LHR発現のエピジェネティックな制御において特に、LHRプロモーター領域のH4K8とH3K9のアセチル化および2、4、5、9番目のCpG配列のメチル化が大きく関与している可能性が示された。さらにヒストン修飾やDNAメチル化により、LHRプロモーター領域に結合する転写因子は増加していることが認められた。本研究の結果は、LHR遺伝子発現制御へのエピジェネティック制御の重要性を示した。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

中村智子、岩瀬明、清水顕、邨瀬智彦、石田千晴、加藤奈緒、森正彦、大須賀智子、近藤美佳、中原辰夫、後藤真紀、吉川史隆、Epigenetic regulation of luteinizing hormone receptor in human granulosa cells、IFFS/JSRM International Meeting、2015年4月26日~29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

中村智子、岩瀬明、清水顕、邨瀬智彦、石田千晴、加藤奈緒、森正彦、大須賀智子、近藤美佳、中原辰夫、後藤真紀、吉川史隆、ヒト顆粒膜細胞における黄体形成ホルモンレセプターの発現制御、第67回日本産科婦人科学会学術講演会、2015年4月9日~12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

中村智子、岩瀬明、清水顕、邨瀬智彦、石田千晴、加藤奈緒、齋藤愛、森正彦、大須賀智子、近藤美佳、中原辰夫、後藤真紀、吉川史隆、ヒト顆粒膜細胞における黄体形成ホルモンレセプターの発現制御、第59回日本生殖医学会学術講演会、2014年12月4日~5日、京王プラザホテル(東京都新宿)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 智子 (Nakamura, Tomoko)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40732681

### (2) 研究分担者

なし