

令和元年6月12日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17919

研究課題名(和文) USP15の脂質代謝調節機能が妊娠で果たす役割の解析

研究課題名(英文) Role of USP15 in pregnancy and female reproductive system

研究代表者

坂井 祐介 (Sakai, Yusuke)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：60615722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織学的検索では、脂肪蓄積に一致してUSP15が発情間期の子宮内膜上皮と卵巣の黄体での発現が認められた。子宮内膜上皮細胞株を用いた実験では、USP15はプロゲステロンにより発現が誘導され、脂質蓄積を促進することがわかった。また、子宮内膜上皮細胞株を用いた実験では、USP15が肝細胞成長因子(HGF)による細胞運動を促進することがわかった。更に、USP15欠損細胞株ではHGF刺激後のc-Cblのリン酸化レベルの低下が認められ、USP15はリン酸化Cblの分解を抑制することでHGFシグナル伝達経路を活性化するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HGFシグナル伝達は子宮内膜腺癌の浸潤性や増殖活性の増強に関わるとされている。本研究からUSP15はHGFシグナル伝達経路を促進することがわかったため、子宮内膜腺癌の治療としてUSP15を標的とする抗癌戦略の根拠の1つとなり得る。

子宮や卵巣における脂質蓄積の意義については不明な点が多いが、USP15欠損マウスでは黄体組織がやや萎縮性であったことから、USP15が脂質代謝を通して生殖周期の恒常性の維持に関与している可能性が推測された。脂質代謝異常は不妊の原因の1つとして知られており、生殖器の恒常性と脂質代謝の関連性を調べることは重要であり、本研究はその一端を担うものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry on uterus and ovary of wild type mice revealed that USP15 is expressed in luteal cells and uterine epithelial cells in accordance with lipid accumulation in these cells. In vitro assays using endometrial cell line showed progesterone, not estradiol, induced expression of USP15 and lipid accumulation. These results suggest USP15 promote lipid accumulation under progesterone stimuli. However, the mechanism of USP15-promoted lipid accumulation is still unclear and further analysis are required.

We also investigated the role of USP15 other than lipid metabolism. In this study, scratch assay using endometrial cell line and its USP15-knockout strain was performed. Results demonstrate that USP15 promote cell motility under HGF stimulation. In USP15-knockout cell line expression level of phosphorylated c-Cbl was decreased in comparison with wild type cell line. These results suggest USP15 inhibit degradation of c-Cbl and enhance HGF signal transduction.

研究分野：病理学

キーワード：USP15 細胞内シグナル伝達 生殖器 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

USP15 は脱ユビキチン化酵素であり、ユビキチン化された標的タンパクのユビキチンを分解することで標的タンパクを安定化させる。**USP15** の機能に関する報告は未だ少ないが、**T**リンパ球の機能調節機能、**TGF** 経路の調節を介した腫瘍発育促進機能などが報告されている。

当研究グループでは、**USP15** 欠損マウスでは高脂肪食を給餌しても脂肪肝とならないこと、**USP15** は肝臓以外では、卵巣や子宮内膜上皮細胞で発現していることを見出した。そこで、本研究では、子宮や卵巣における **USP15** の役割を調べることにした。

2. 研究の目的

本研究は、脂質代謝調節機能を有する **USP15** 欠損マウスと野生型マウスにおける卵巣および子宮の組織構造の違いを調べることで **USP15** が生殖器において担う役割を解明すること、**USP15** の発現と脂質蓄積の関係を組織学的に調べることで **USP15** が雌性生殖器においても脂質代謝に関与することを明らかにすること、脂質代謝以外の **USP15** の役割を調べることを目的としている。

3. 研究の方法

マウスの雌性生殖器における USP15 の発現を調べるために、各生殖周期のマウスの卵巣および子宮組織に対して USP15 の免疫染色を行った。脂質蓄積との関連性を調べるために脂肪染色である Oil red O 染色の結果を免疫染色結果と比較した。更に USP15 の雌性生殖器における役割を調べるために、USP15 欠損マウスの子宮・卵巣組織を野生型マウスのものと比較した。

子宮内膜細胞株を用いた実験では、これら細胞をプロゲステロンで刺激して USP15 の発現量の変化を western blot で調べ、脂質の蓄積を Oil red O 染色で調べた。脂質蓄積の程度については USP15 欠損細胞株と野生型細胞株での比較を行った。

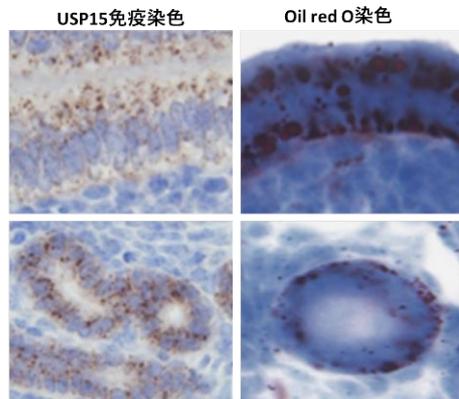
脂質代謝以外の役割については、子宮内膜細胞株を HGF または EGF で刺激しスクラッチアッセイを行って細胞運動性について調べた。HGF 刺激により野生型細胞株と USP15 欠損細胞株で差が認められたため、HGF シグナル伝達を構成する各種因子の発現量およびリン酸化レベルを western blot で調べた。

4. 研究成果

本研究ではユビキチン分解酵素 USP15 の子宮や卵巣における役割や発現制御機構について検索を行った。マウスの子宮および卵巣を用いた組織学的検索では、USP15 が発情間期の子宮内膜上皮と卵巣の黄体に発現すること、これら USP15 の発現が認められた時期に同じ細胞で脂肪滴が認められること(図1)、特に子宮内膜上皮では USP15 が脂肪滴に局在することがわかった。USP15 欠損マウスでは子宮組織に野生型マウスとの差は認められなかったものの、子宮の黄体組織の萎縮が認められた(図2)。

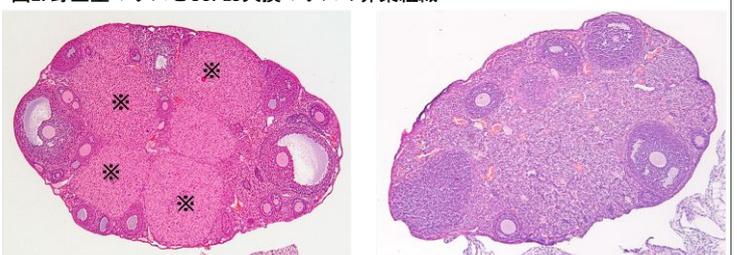
子宮内膜上皮細胞株を用いた実験では、プロゲステロン処理により脂肪滴の形成と共に USP15 タンパク量の増加が認められたが、エストロゲン処理ではこのような変化は認められなかった。更に USP15 をノックアウトした子宮内膜上皮細胞株を作成してプロゲステロン処理を行うと脂肪滴は野生型細胞株よりも小型で少量であった。以上から、USP15 はプロゲステロンにより発現が誘導され、子宮内膜上皮細胞における脂質蓄積を促進することがわかった。しかし、USP15 が脂質蓄積を促進する分子生物学的な機序については不明であり、今後更なる解析が必要と考えられた。

図1. 発情間期の子宮内膜におけるUSP15の発現と脂質の蓄積



発情間期の妊娠期でのみUSP15の発現と脂質蓄積が認められる。

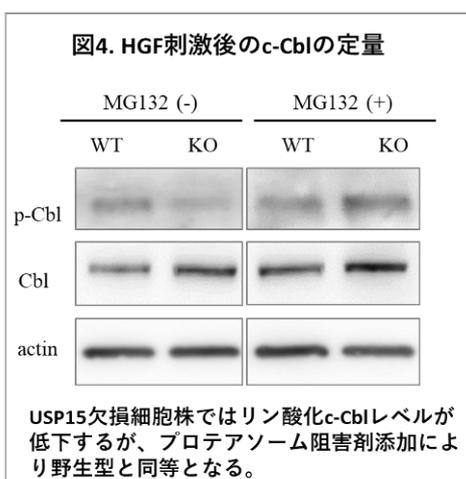
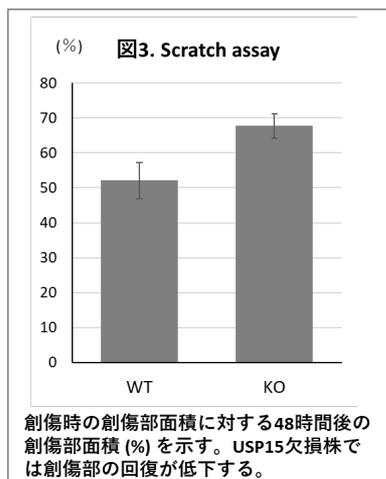
図2. 野生型マウスとUSP15欠損マウスの卵巣組織



USP15欠損マウス(右)では野生型マウスに認められる大型の成熟黄体(左、*)の萎縮が認められる。

脂質蓄積の促進以外の USP15 の役割として子宮内膜上皮の増殖に関連し、子宮内膜腺癌の増殖や浸潤性に関与する上皮成長因子 (EGF) と肝細胞成長因子 (HGF) のシグナル伝達における USP15 の役割を調べた。野生型子宮内膜上皮細胞株と USP15 欠損細胞株を用いたスクラッチアッセイの結果、USP15 は HGF による細胞運動を促進することがわかったが (図3)、EGF 処理時

では細胞運動性や増殖活性に変化は認められなかった。そこで、HGF シグナル伝達経路の種々の因子の発現量を野生型細胞株と USP15 ノックアウト細胞株と比較すると、USP15 ノックアウト細胞株では c-Cbl のリン酸化レベルが減少することがわかった。プロテアソーム阻害剤で処理を行うと c-Cbl のリン酸化レベルは野生型細胞株と同等となったため、c-Cbl のリン酸化レベルの低下は分解の亢進によるものと考えられた。これらの結果より、USP15 はリン酸化 Cbl の分解を抑制することで HGF シグナル伝達経路を活性化するものと考えられた。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。