

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591891

研究課題名（和文） コレステロール硫酸による着床期子宮内膜の遺伝子発現調節機構

研究課題名（英文） Regulation of gene expression in uterine endometrium
by cholesterol sulfate

研究代表者

百枝 幹雄（MOMOEDA MIKIO）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 50221627

研究成果の概要：

本研究においては着床期子宮内膜において発現するコレステロール硫酸(cholesterol sulfate; CS)の遺伝子発現調節機能に焦点をしばって検討する。特に近年、CSが核内受容体 retinoic acid-related orphan receptor (ROR) のひとつである ROR γ のリガンドであることが報告されたことから、平成 19 年度には、ROR γ の下流遺伝子である Rev-erb α の遺伝子発現に対するCSの影響を検討した。その結果、CSの添加により子宮内膜間質細胞では Rev-erb α の発現が促進された。また、分子間結合を解析するBIACORによりCSとROR γ の分子間結合が確認された。ただし、ROR γ のリガンド結合領域を削除した変異遺伝子導入によっても Rev-erb α の遺伝子発現が促進されること、CSの添加によってROR γ の発現も促進されることなどから、CSによる Rev-erb α の遺伝子の発現促進は、CSがリガンドとしてというよりもむしろ転写因子であるROR γ の発現を促進することによる作用であることが示唆された。そこで、20 年度には ROR γ 応答遺伝子の別の候補である SULF1 の遺伝子発現について検討し、CSがその発現を促進し、wnt/ カテニン経路を介して カテニンの核内への集積を誘導することを明らかにした。また、CS は子宮内膜間質細胞のアポトーシスを誘導し、この誘導は SULF1 を介する作用である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード： 子宮内膜、コレステロール硫酸、遺伝子発現、ROR γ 、転写因子

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

生殖医療においては、卵成熟から排卵、受精に至る過程の解明とその障害に対する治療の急速な進歩により妊娠率が向上する一方、多胎妊娠や卵巣過剰刺激症候群などの副作用を予防することが重要な課題となっている。その予防策として、過剰な排卵誘発の回避と単一胚移植による妊娠が追及されつつある。そのためには良好胚の獲得と同時に、その良好胚を移植した場合の着床率の向上が必要である。このような臨床的問題を解決する基盤として、われわれは着床に関する基礎的研究に取り組んできた。妊卵の子宮内膜への着床はいわゆるインプランテーション・ウィンドウと呼ばれる限られた時期にのみ可能であるが、われわれの研究からこのウィンドウを規定する因子としてコレステロール硫酸 (cholesterol sulfate; CS) が重要な役割を担っている可能性が明らかになりつつある。これまでのわれわれの研究結果の概要は以下の通りである。

1. 子宮内膜において細胞膜構成脂質であるコレステロール硫酸 (cholesterol sulfate; CS) が着床期に一致して一過性に増加し、かつ CS の増加は着床周辺部に著明である。
2. CS はトロホプラストの子宮内膜への侵入能を抑制する。
3. CS は着床に関与すると考えられる蛋白分解酵素の中でもプラスミン活性を特異的に抑制する。
4. CS はプラスミン活性を直接抑制することによって、間接的にマトリックスメタロプロテアーゼの活性をも抑制する。
5. 子宮内膜における CS の合成酵素は硫酸転移酵素ファミリーに属する SULT2B1b である。
6. 実験に用いた家兎における SULT2B1b 遺伝子の核酸配列を同定した。
7. SULT2B1b 遺伝子発現はプロゲステロンによる内分泌学的調節を受けている。

以上の研究成果は各々、国内、国外の学会に発表し、論文に掲載あるいは掲載予定である。これらを総合すると、「着床期子宮内膜

において CS は内分泌学的調節下に増加し、プロテアーゼ抑制作用を介してトロホプラストの侵入能を抑制し、胚の着床部位や範囲を制御する」と考えられる。このような CS の作用は子宮内膜とトロホプラストのインターフェースにおける細胞外作用と言える。

一方、最近 CS は核内受容体 (retinoic acid-related orphan receptor; ROR) のひとつである ROR のリガンドであることが報告された (Francis Bitsch: Analytical Biochemistry 2003)。ROR が CS の特異的受容体であるとの結論は出ていないが、従来、CS は中枢神経系や皮膚、気管支上皮、消化管上皮などに局在が認められており ROR の局在とも共通する機会が多いことや、すでに生殖臓器以外で Rev-erb、ApoCIII、Oxytocin などの遺伝子が ROR の下流遺伝子として報告されていることを考慮すると、CS が ROR を介して細胞内の機能調節に関与している可能性は十分に考えられる。

着床期の子宮内膜に発現する CS が細胞内にシグナルを伝達して遺伝子発現調節機能を有するとすれば、CS はこれまでわれわれが明らかにした細胞外作用とは別の機構でも、着床における子宮内膜やトロホプラストの機能調節に役割を演じている可能性を示唆する。以上の経緯から、われわれは CS の細胞内作用、特に遺伝子発現調節機構に焦点を当てて新たな研究を企画するに至った。

着床においては、子宮内膜の上皮細胞と間質細胞、胚、免疫担当細胞など多様な細胞が関与する複雑な相互作用が起こっている。しかし、今回の研究期間および研究費の範囲内でそのすべての細胞に対して CS による遺伝子発現調節を解析することは、時間的、経済的、人的リソースの観点から実現性が低いと思われる。そこで、本研究においては子宮内膜に対する CS の遺伝子発現調節機能に焦点をしばって検討する。

その理由として、われわれがすでにヒト子宮内膜上皮細胞および間質細胞の細胞培養系において、サブトラクション法を用いて CS 添加によって誘導される遺伝子を検索する実験に着手しており、いくつかの候補遺伝子を同定しているということが挙げられる。また、われわれが子宮内膜においてサブトラクション法により同定したり、あるいはゲノムデータベースなどから推定された CS 応答遺伝子の候補には、細胞増殖、アポトーシスおよびステロイドホルモン応答に関連する遺伝子が含まれており、子宮内膜の機能調節に重要な役割を担っている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

1. 子宮内膜上皮細胞および間質細胞において、実際にCSにより発現制御されている遺伝子を候補遺伝子群の中から特定する。
2. その遺伝子産物の作用による細胞生物学的現象(細胞増殖、アポトーシス、ステロイドホルモン応答遺伝子の発現など)に対するCSの作用を確認する。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントの下に採取されたヒト子宮内膜から、子宮内膜上皮細胞および間質細胞を分離培養あるいは共培養する。これにCSを添加し、サブトラクション法によってCS無添加群に比べて発現増加している遺伝子群のcDNAライブラリーを作成する。これらのクローンのシーケンスを行い、これまで検索された候補遺伝子との比較によってより確実性の高いCS応答遺伝子を同定する。

また、ヒト子宮内膜のcDNAライブラリーに対して、RORを用いたフィルターバインディングクローニング法を用いたクローニングを行い、ROR結合領域を有する遺伝子を抽出する。

以上2つの方法に共通して検索された遺伝子群について、子宮内膜上皮細胞および間質細胞を分離培養へのCS添加によるCS応答性の有無を定量的RT-PCR法により確認する。

インフォームドコンセントの下に採取されたヒト子宮内膜上皮細胞および間質細胞培養系にCSを添加し、細胞数計測、MTTアッセイなどによる細胞増殖への影響とDNAラダー法、TUNEL法を用いたアポトーシスの誘導の確認を行う。その後、アポトーシス関連遺伝子の発現に対するCSの作用を、CSを添加した細胞培養系におけるアポトーシス関連遺伝子のmRNA発現を定量的RT-PCR法により分析することにより検討する。

4. 研究成果

分子間の相互作用を検出するアフィニティーセンサBiAcore3000を用いて、CSとRORの結合を解析した。その結果、結合速度定数ka、解離速度定数Kd、解離定数KDは各々、 7.01×10^3 , 7.62×10^{-3} , $1.09 \times 10^{-6} \text{M}$ であった。同様の条件下ではコレステロールはRORに対する結合を示さなかった。以上より、結合能の観点からもCSがRORのリガンドと

なりうることが示された。

ヒト子宮内膜間質細胞培養系にCSを添加し、非添加群との間でサブトラクション法を行い、CS添加により発現誘導される遺伝子群を検索したところ、約200個のクローンを得た。シーケンスによりそれらの核酸配列を同定し、約20個は既知の遺伝子であった。

その中でも他の組織においてCSの下流遺伝子であると言われているRev-erbの発現について子宮内膜におけるCSの作用を検討した。その結果、RT-PCR、免疫染色、in situ hybridizationにより子宮内膜間質細胞および上皮細胞にはRORおよびRev-erbが発現していることが確認され、さらに $10 \mu\text{M}$ のCSの添加により子宮内膜間質細胞培養系ではRec-erbの発現が促進された。

そこで、Cos1細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、Rev-erbのプロモーター領域に対するCSの転写活性を調べた。その結果、CSの添加、あるいはRORの強制発現などによりRev-erbのプロモーター活性は上昇したが、RORのリガンド結合領域を削除した変異遺伝子導入によってもRev-erbの遺伝子発現が促進されること、CSの添加によってRORの発現も促進されることなどから、CSによるRev-erbの遺伝子の発現促進は、CSがリガンドとしてというよりむしろ転写因子であるRORの発現を促進することによる作用であることが示唆された。

また、ROR応答遺伝子の別の候補であるSULF1の遺伝子発現について検討し、ヒト子宮内膜間質細胞培養系において、CSがその発現を促進することを確認した。SULF1は細胞膜表面や細胞外器質に普遍的に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸基を選択的に脱硫酸化して硫酸基に結合している分泌タンパクWntの局所濃度を上昇させ、wntシグナル活性化に関与していることが知られている。その結果、細胞質内のカテニンが安定的に発現して作用が発揮される。子宮内膜間質培養系にCSを添加することによりカテニンの核内への集積を誘導することを明らかにした。このことから、CSはSULF1/wnt/カテニン経路を活性化しうることが示された。

さらに、SULF1がヘパラン硫酸プロテオグリカンを介したFGFシグナルを抑制して、アポトーシスが誘導されることも知られている。そこで、CSを添加した子宮内膜間質細胞培養系のアポトーシスを解析した。その結果、CS添加によりカスペース3および7の活性が誘導されることが明らかとなった。このことから、CSは子宮内膜間質細胞のアポトーシスを誘導し、この誘導はSULF1を介する作用である可能性が示唆された。

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 5 件)

1: Koizumi M, Momoeda M, Hiroi H, Hosokawa Y, Tsutsumi R, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Expression and regulation of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human endometrium. Fertil Steril. 2009 Feb 23. (査読有)

2: Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Nakazawa F, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. Fertil Steril. 2009 Apr;91(4 Suppl):1614 -7. (査読有)

3: Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Nakazawa F, Koizumi M, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Inhibitory effects of cholesterol sulfate on progesterone production in human granulosa -like tumor cell line, KGN. Endocr J. 2008 Jul;55(3):575 -81. (査読有)

4: Hiroi H, Momoeda M, Nakazawa F, Koizumi M, Tsutsumi R, Hosokawa Y, Osuga Y, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Expression and regulation of periostin/OSF -2 gene in rat uterus and human endometrium. Endocr J. 2008 Mar;55(1):183 -9. (査読有)

5: Ohno T, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Tsutsumi R, Koizumi M, Nakazawa F, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Evidence for the expression of alcohol dehydrogenase class I gene in rat uterus and its up -regulation by progesterone. Endocr J. 2008 Mar;55(1):83 -90. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

百枝 幹雄 (MOMOEDA MIKIO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 50221627

(2) 研究分担者

廣井 久彦 (HIROI HISAHIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 10343138

(3) 連携研究者