

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791838

研究課題名(和文) 妊娠子宮における核カテプシンLの機能と核移行メカニズムの解析

研究課題名(英文) The function of the nuclear cathepsin L and the analysis of nucleocytoplasmic transport mechanism in pregnant uterine decidua

研究代表者

中村 織江 (NAKAMURA, Orie)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：40399613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜脱落膜化に際し、プロゲステロンにより一部の核膜孔構成分子の発現が増加し、核膜孔の構造変化が誘導される。同様にプロゲステロン依存性に発現増加するカテプシンLとCTLA-2の一部は核膜孔を通過して核に移行し、両分子の結合により核内でのプロテアーゼ活性を担保されたカテプシンLは転写因子CDP/Cuxの短アイソフォームを生成することで細胞周期制御分子の発現を促進、細胞分裂を加速させる。同時に、アクチン伸長に関与する分子Arpc2の核移行が起きることで核内構造にも変化が生じ、クロマチンリモデリングと脱落膜化に必要な分子を効率よく転写するメカニズムが存在しているようだ。

研究成果の概要(英文)：During the process of decidualization, progesterone induces the expression of a number of nuclear pore complex proteins, which in turn cause structural changes in the nuclear pores. Cathepsin L and CTLA-2 alpha, proteins which are similarly regulated by progesterone, are then imported into the nucleus. Cathepsin L binds to CTLA-2alpha in the nucleus and acts as a protease, promoting the expression of cell-cycle proteins by generating short isoforms of the transcription factor CDP/Cux, resulting in accelerated cell division.

Simultaneously, the nuclear transport of Arpc2 may also give rise to changes in the nuclear structure. Arpc2 participates in actin polymerization, which leads to chromatin remodeling and the transcription of decidualization-inducing factors.

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

キーワード：脱落膜 カテプシンL Arpc2 核アクチン

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初において、マウス妊娠子宮脱落膜におけるシステインプロテアーゼ カテプシン L とその活性調節因子である Cytotoxic T lymphocyte associated protein (CTLA)-2 に関しては以下のことが明らかであった。

(1) ヒトを含めた多くのほ乳類の妊娠子宮内膜および胎盤において、カテプシン L を含むカテプシン群が高発現している。

(2) 妊娠 5 日のマウスにおいて、腹腔にカテプシン L の合成インヒビターを投与すると脱落膜化が阻害され、着床が失敗したとの報告がある。

(3) 近年、ある種の腫瘍や組織において、カテプシン L がリソソームだけではなく核にも存在し、核内プロテアーゼとして機能していることが示された。

(4) マウス CTLA-2 はマウスカテプシン L のプロ領域に高い相同性を持ち、カテプシン L と特異的に結合することでプロテアーゼ活性を抑制することが *in vitro* の実験で確認されている。

(5) CTLA-2 のホモログタンパクである CTLA-2 mRNA がマウス妊娠子宮において高発現していることが報告されている。

また未発表データとして研究代表者は以前お研究から以下の知見を得ていた。

(6) CTLA-2 はプロゲステロン依存性に妊娠子宮脱落膜で高い発現が観察されるが、胎子胎盤での発現はほとんど観察されない。

(7) 脱落膜ライセートを用いてカテプシン L 活性を測定した場合、カテプシン L の至適 pH である酸性ではなく、中性下での活性が高かった。

(8) 子宮内膜間質細胞初代培養系を用いて、CTLA-2 をノックダウンするとカテプシン L のタンパク発現量は変化しないにもかかわらず、中性下での活性低下が観察された。

以上(1)~(8)の知見により、本来はリソソーム酵素であるカテプシン L が調節因子の CTLA-2 と共に異なるオルガネラ(例えば細胞核)において機能を持ち、それが妊娠維持に寄与しているのではないかとの着想を得て研究を行った。

2. 研究の目的

多くのほ乳類の生殖様式は胎生である。受精卵が母体子宮に着床し成長するために、子宮内膜間質細胞は線維芽細胞から大型で高い分泌能を持つ脱落膜細胞への分化、すなわ

ち脱落膜化を起こす必要があり、脱落膜化の失敗は着床不全や妊娠初期流産の一原因とされている。このように、脱落膜化は妊娠初期の重要なイベントであるが、そのメカニズムの詳細は不明な点も多い。

本研究では、種を越えた多くのほ乳類が持つリソソームタンパクであるカテプシン L に焦点を当て、その調節因子である CTLA-2 と共に脱落膜細胞特異的な局在の変化や核における未知の機能を解析することで、脱落膜化メカニズムに対する新しい知見を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

研究は以下の手法を用いて行った。

(1) 妊娠マウスからの組織採取

8-10 週齢の ICR メスマウスは同種のオスと交配し、膣栓確認日を妊娠 0.5 日とした。

子宮組織採取は妊娠 4.5 日、7.5 日、10.5 日、12.5 日、15.5 日で行った。

妊娠 7.5 日の子宮は間膜腺と基底脱落膜領域に分けて採取した。

妊娠 10.5 日以降は間膜腺、基底脱落膜、トロホプラストに分けて採取した。

(2) 子宮内膜間質細胞初代培養

精管結紮オスと交配し、膣栓確認日を妊娠 0.5 日として、妊娠 4.5 日マウスより子宮を採取。

ディスパーゼとトリプシンを用いた酵素処理により細胞を単離し、培養ディッシュへの接着性の差を利用して間質細胞のみ選別した。

24 時間の前培養の後に 1 μ M のプロゲステロンを添加した。

ノックダウン及び過剰発現の場合は、プロゲステロン添加と同時に遺伝子導入処理を行った。

細胞は 5%CO₂、37°C 湿潤条件で培養した。

(3) タンパク抽出

回収した細胞及び組織からのタンパク抽出は 0.5% Triton x-100 添加 50mM tris-HCl (pH7.4)で行った。

核フラクション抽出はミリポア社 S-PEK Kit を用いた。

(4) プロテオーム解析

プロテオーム解析用のタンパクは 7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 2% SDS バッファーを用いて行った。

核フラクションを用いる場合は、S-PEK Kit で抽出した核フラクション中のタンパクをアセトン法または TCA 法で沈殿し、それを二次元電気泳動用のバッファーで再溶解したものをを用いた。

2 次元電気泳動後に銀染色によりタンパク発現変動を確認し、変化が見られたス

ポットを切り出し、in gel digestion 法によりゲル中のタンパクをペプチド消化した。
得られたペプチドを質量分析装置にて解析し、データベース上で分子を同定した。

(5) 過剰発現用ベクター構築

核特異的に Arpc2 を過剰発現させるために核移行シグナルを付けたベクター、CMV-NLS-Arpc2-HA を構築した。
過剰発現の確認は Arpc2 および HA 抗体を用いた細胞免疫化学で行った。

(6) 遺伝子過剰発現

遺伝子の過剰発現は QIAGEN 社 Attractene Transfection Reagent を用いて行った。

(7) 遺伝子ノックダウン

遺伝子ノックダウンは RNAi の手法を用いた。siRNA は siDirect から購入し、導入試薬は Polyplus transfection 社 INTERFERin を使用した。

4. 研究成果

計画に基づく研究を行った結果、以下の結果を得た。

(1) CTLA-2 およびカテプシン L の細胞質-核輸送に関する研究。

プロゲステロン刺激により、脱落膜において核膜孔構成タンパクの nucleoporin p62 (Nup62) および nucleoporin p153 (Nup153) 発現が有意に増加した。

子宮内膜間質細胞初代培養系において、プロゲステロン存在下で Nup153 をノックダウンすると核カテプシン L および核 CTLA-2 発現量の減少が見られた。

Nup153 のノックダウンにより、核だけではなく細胞全体の CTLA-2 発現が低下した。

以上より、脱落膜化に際して、核膜孔の形態が変化し、それに伴って分子輸送に変化が見られることが示唆された。また、Nup153 ノックダウンの結果からは核膜孔構成分子が CTLA-2 の転写調節に関与している可能性も示唆された。核膜孔構成分子が細胞分化により構成を変化させ、核膜孔の形状を変化させているとの報告は近年増えている。また、核膜孔構成分子のうち核の内側に位置するものは転写複合体と共に遺伝子の転写に関与するとの報告もある。脱落膜化に際しても同様の現象が観察されたことは、生殖研究のみならず幅広い分野において重要な知見であると考えられる。

(2) 核 CTLA-2 および核カテプシン L と子宮内膜脱落膜化に関する研究。

核カテプシン L のターゲット分子として報告されている転写因子 CDP/Cux はプロゲステロン刺激の有無によりそのアイソフォームパターンを変化させた。プロゲステロン刺激無しの状態（非妊娠）では転写開始点の異なる 75kDa のアイソフォーム (p75) が CDP/Cux 全発現量の半分以上の割合を占めたが、プロゲステロン刺激を与えると CDP/Cux タンパク総量が増加すると共に、200kDa の全長から切り出された 90kDa および 110kDa のアイソフォーム (p90, p110) の割合が増加し p75 が占める割合は減少した。

子宮内膜間質細胞初代培養系において、プロゲステロン存在下で CTLA-2 をノックダウンすると、p90, p110 は減少し、プロゲステロン非刺激時の p75 の割合が高いアイソフォームパターンに変化した。

CDP/Cux p90, p110 が特定のサイクリン発現の増加により G1-S 期を短縮させ細胞周期を加速させるという知見に基づき、妊娠子宮脱落膜及びプロゲステロン刺激子宮内膜間質細胞における細胞周期関連タンパクを解析した結果、プロゲステロン刺激により G1-S 期サイクリンであるサイクリン E およびサイクリン D の発現が増加した。

RNAi により CTLA-2 をノックダウンすると、サイクリン E のみ発現低下が観察された。

以上より、脱落膜化に伴い一部が核に移行した CTLA-2 およびカテプシン L は協調して転写因子 CDP/Cux の分解に関与し、生成されたショートアイソフォームにより G1-S 期サイクリンの発現が増加していることが示唆された。このことは脱落膜化に伴う細胞増殖メカニズムを説明しうる新しい知見である。

(3) 核カテプシン L 関連分子 actin related protein 2/3 complex, subunit 2 (Arpc2) に関する研究。

CTLA-2 およびカテプシン L ノックダウン子宮内膜間質細胞核ライセートを用いたプロテオーム解析から、核カテプシン L に関連があると考えられる分子を同定した。

プロゲステロン刺激子宮内膜間質細胞において、核 Arpc2 発現が増加した。

子宮内膜間質細胞初代培養系において、核移行シグナルを持つ NLS-Arpc2 を一過性に過剰発現させると、プロゲステロン非刺激状態にもかかわらずプロゲステロンレセプターや脱落膜プロラクチンといった脱落膜化に必須の分子の発現増加が

観察された。

核カテプシンLとArpc2の関係の詳細は不明であるが、脱落膜細胞における核Arpc2の増加は核アクチンを中心とした核内構造(nuclear architect)研究としても大変興味深いものである。核骨格の変化がクロマチンリモデリングに影響し、転写に関与しているという報告は、主に酵母やカエル卵を用いた研究での報告はあるが、ほ乳類では少ない。本研究で得られた知見は、当該分野を進展させるための有効なツールとしての可能性も秘めていると考えられる。

(4) マウス子宮内膜間質細胞株の樹立

より複雑な研究を効果的に遂行するために、新規細胞株の樹立を試み、成功した。エストロゲンおよびプロゲステロン応答性を失わず、脱落膜化能を持つ子宮内膜間質細胞株はほとんど存在せず、マウスでは皆無である。脱落膜化はステロイドホルモンの添加で容易に誘導できる分化モデルでもあり、本細胞株の樹立は生殖研究だけでなく、発生・再生分野においても有効に活用されるものとする。

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 2 件)

(1) 中村織江

妊娠子宮脱落膜CTLA-2 およびカテプシンLの細胞質-核輸送メカニズムと核における機能解析・大阪府立母子保健総合医療センター雑誌、査読無、27(1.2), 2011, pp.53-54

(2) Sugita S, Yamada Y, Horie S, Nakamura O, Ishidoh K, Yamamoto Y, Yamaguchi S, Mochizuki M. Induction of T regulatory cells by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2alpha on corneal endothelial cells. Ophthalmol. Vis.Sci. 査読有 52(5), 2011, doi: 10.1167/iov.10-6322.

[学会発表](計 2 件)

(1) 中村織江

「プロゲステロン刺激によって脱落膜化する子宮内膜間質細胞株の樹立」
第27回 日本生殖免疫学会総会・学術集会、
2012.12.8
大阪

(2) 中村織江

「核カテプシンLは調節因子CTLA-2 と結合することで転写因子 CDP/Cux cleavage を変化させている」

第84回 日本生化学会大会、2011.9.24
京都 国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 織江 (NAKAMURA, Orie)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：4039913