

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293343

研究課題名(和文) エピゲノム情報の統合解析による子宮内膜の脱落膜化に伴う遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of histone modifications and gene expression during decidualization in human endometrial stromal cells.

研究代表者

杉野 法広 (SUGINO, Norihiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10263782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜間質細胞(ESC)の脱落膜化に伴う遺伝子発現変化におけるヒストン修飾の関与を検討した。ESCをエストロゲンとプロゲステロンで培養し脱落膜化を誘導した時におこる種々のヒストン修飾変化を次世代シーケンサーを用いゲノムワイドに解析した。脱落膜化に伴いゲノム上の多領域において転写活性化に働くH3K27acとH3K4me3の上昇変化を多く認めたと、転写抑制に働くH3K9me3やH3K27me3の変化はほとんどなかった。このヒストン修飾変化によりinsulin signaling pathwayの活性化とグルコースの細胞内取り込みが促進され、脱落膜化に促進的に働いていることが見出された。

研究成果の概要(英文)：Dramatic changes of gene expressions occur in human endometrial stromal cells (ESC) during decidualization. The changes in gene expression are associated with changes of chromatin structure, which are regulated by histone modifications. Here, we investigated genome-wide changes in histone modifications associated with decidualization in human ESC using next-generation sequencing. ESC were incubated with estradiol and medroxyprogesterone acetate to induce decidualization. Decidualization increased H3K27ac and H3K4me3 signals in many genomic regions. RNA-sequence showed that decidualization up-regulated 881 genes, 223 of which had H3K27ac- or H3K4me3-increased regions in the proximal and distal promoter regions. Pathway analysis revealed that up-regulated genes with the H3K27ac- or H3K4me3-increased regions were associated with the insulin signaling, which is involved in glucose uptake that is necessary for ESC to undergo decidualization.

研究分野：医歯薬学

キーワード：子宮内膜 脱落膜化 エピジェネティクス ヒストン修飾 転写調節 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜において、脱落膜化は着床に不可欠な現象である。脱落膜化に関わる様々なタンパクや酵素の遺伝子発現は複雑に調節されている。実際、子宮内膜間質細胞の脱落膜化は黄体からのプロゲステロンにより誘導されるが、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といように、劇的な遺伝子発現の変化がおこる。これまで、子宮内膜間質細胞の脱落膜化における遺伝子発現制御の研究に関しては、個々の遺伝子についてであり、また細胞内シグナル伝達経路や転写因子による発現調節が中心に研究されているほか、トランスクリプトーム解析においてもマイクロアレイを用いた報告のように、限られた遺伝子についてのみ研究であり、DNA 側に焦点を当てたゲノム全域にわたる遺伝子発現制御機構の研究は極めて少ない。近年、遺伝子の発現調節には、遺伝子プロモーター領域に結合する転写因子のほかに、DNA 側の変化としてヒストン修飾等のエピジェネティックな制御が重要であることが注目されている。たとえば遺伝子の転写制御として、ヒストン修飾では、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac) やヒストン H3 の 4 番目のリジンのモノメチル化・トリメチル化 (H3K4me1, H3K4me3) は転写促進に、またヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) は転写抑制に働く。さらにエピジェネティクスによる遺伝子制御は、ヒストン修飾などによる化学的制御に加えて、クロマチン構造変化による制御も重要である。ヒストン修飾の組み合わせにより、クロマチン構造が弛緩すれば(活性化クロマチン構造)、転写因子の結合が容易となり転写が亢進する。一方、クロマチン構造が凝集すれば(不活性化クロマチン構造)、転写因子の結合が阻害され、転写は抑制されて遺伝子発現がオフとなる。我々はすでに、脱落膜化におけるエピジェネティックな調節の関与について、いくつかの研究結果を見出している。DNA メチル化に関与する酵素である DNA methyltransferase 発現が脱落膜化に伴い変化すること、ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) において、プロゲステロンによる cyclooxygenase (COX-2) 発現抑制には、COX-2 プロモーター領域のヒストンアセチル化状態が重要であること、脱落膜化に伴い特異的に発現が誘導される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) は、その発現にプロモーター領域のヒストンアセチル化状態が重要であることを見出している。これらのことは、ヒト ESC における遺伝子発現にはエピジェネティックな調節機構が関与していることを示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子発現調節領域(転写因子が結合するプロモーター/エンハンサー領域)、すなわち DNA 側の変化(エピジェネティックな変化)に焦点を当てたい。子宮内膜間質細胞の脱落膜化による遺伝子発現の変化に伴い、遺伝子発現調節領域のヒストン修飾がどのように変化するのか、またこのヒストン修飾の変化によりクロマチン構造がどのように変化し、さらにプロモーター領域における転写因子の結合にどのように影響を与えるのかというエピゲノム情報を、次世代シーケンサーを用いてゲノム全域にわたり明らかにしたい。脱落膜化に伴う一連の遺伝子発現制御には、このようなエピジェネティックな調節が関与するという新たな知見を示したい。

3. 研究の方法

IRB の承認と患者の同意を得て分離したヒト ESC をエストロゲン[estradiol (10^{-8} M)]とプロゲステロン[medroxyprogesterone acetate (MPA) (10^{-6} M)]で培養し脱落膜化を誘導した。脱落膜化細胞とコントロールの非脱落膜化細胞の両者について、次世代シーケンサーを用い、遺伝子発現を RNA シーケンスで、ヒストン修飾を ChIP シーケンスで、転写因子結合部位を ChIP シーケンスで解析した。また、DNA メチル化を IlluminaHuman BeadsChip450 にてゲノムワイドに解析した。得られた情報をゲノム配列上に配置し総合的に解析した(統合解析)。この結果から、脱落膜化により転写活性が増減している遺伝子領域(プロモーターやエンハンサー領域)を同定し、その領域のヒストン修飾の変化、特定の転写因子の結合変化などエピゲノム情報を得た。さらに、エピゲノム変化のみならぬいくつかの遺伝子にターゲットを絞り、プロモーター領域のヒストン修飾、転写因子の結合について、脱落膜化の過程における時間的変化を調べた。

4. 研究成果

(1)ヒストン修飾変化

ヒト ESC の脱落膜化に伴って、ゲノム上の多くの領域でヒストン修飾変化が起きることが分かった。変化を認めたヒストン修飾は、転写活性化に働く H3K27ac と H3K4me3 に上昇変化を多く認め、転写抑制に働く H3K9me3 や H3K27me3 の変化はほとんどなかった(表 1)。

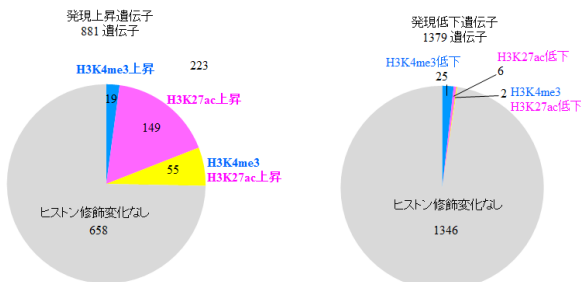
表1 脱落膜化によりヒストン修飾変化を求めた領域と遺伝子の数

ヒストン修飾	増加した領域 (遺伝子)	減少した領域 (遺伝子)
H3K27ac	3705 (1846)	42 (39)
H3K4me3	945 (847)	109 (105)
H3K4me1	3 (3)	6 (7)
H3K27me3	2 (2)	5 (6)

この H3K27ac と H3K4me3 が上昇する領域としては、転写開始点から 3 kb 以上離れた遠位領域にも多く存在した。脱落膜化により発現が増加する遺伝子は 881 遺伝子で、このうち H3K4me3、H3K27ac 修飾上昇を伴って発現が増加する遺伝子は 223 遺伝子で約 1/4 を占めていた(図 1)。

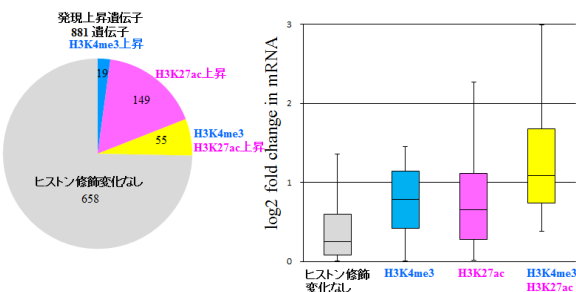
一方、脱落膜化により発現が低下する遺伝子は 1379 遺伝子で、ほとんどがヒストン修飾の変化を伴っていなかった(図 1)。

図1 脱落膜化によるヒストン修飾と遺伝子発現変化



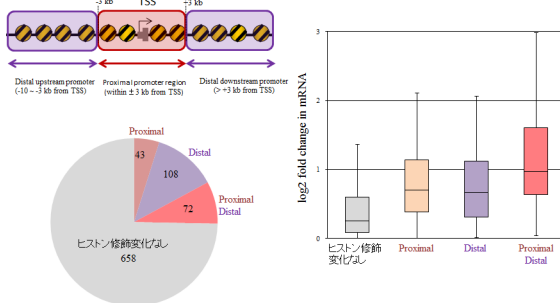
さらに、H3K4me3、H3K27ac 修飾上昇を伴う遺伝子群では、ヒストン修飾変化を伴わない遺伝子に比べ、高度の発現上昇が起こっていた(図 2)。

図2 脱落膜化によるヒストン修飾と遺伝子発現変化



また、これら修飾の増加が近位領域ではなく、遠位領域におこった場合でも、遺伝子発現の増加程度はより高くなった(図 3)。おそらく、ループ形成による enhancer-promoter interaction による転写調節が関与していることが推察された。

図3 ヒストン修飾部位と遺伝子発現変化



(2)ヒストン修飾変化と遺伝子発現

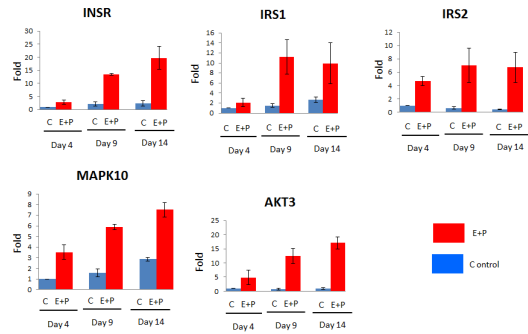
脱落膜化により H3K27ac または H3K4me3 修飾の上昇とともに発現が増加する遺伝子群の特徴をパスウェイ解析で調べたところ、insulin signaling に関連する遺伝子 (IRS1, IRS2, INSR, FOXO1, MAPK10) が多く含まれていた(表 2)。

表2 脱落膜化により H3K27ac または H3K4me3 の増加とともに発現が増加する遺伝子のパスウェイ解析

Pathway	Genes	Benjamini P value	P value
Type II diabetes mellitus	IRS1, IRS2, INSR, PIK3CG, MAPK10, HK2	0.040308	8.23E-04
Insulin signaling pathway	IRS1, IRS2, INSR, PIK3CG, MAPK10, FOXO1, AKT3, PRKAB2, HK2	0.041218	0.001262
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	IRS1, IRS2, INSR, PIK3CG, SGK1, HSD11B1	0.042383	4.33E-04

これら遺伝子について、H3K27ac 修飾の脱落膜化過程における時間的変化を調べたところ、時間経過とともにヒストン修飾が増加した(図 4)。

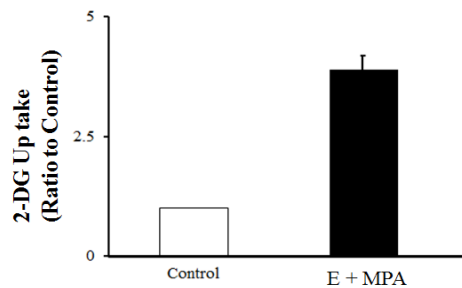
図4 脱落膜化過程における各遺伝子プロモーターの H3K27ac の変化



(3)ヒストン修飾変化に関連する遺伝子の役割

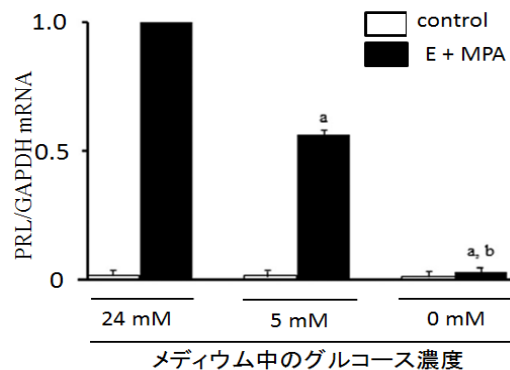
脱落膜化に伴うインスリン経路の活性化の役割としてグルコースの取り込みを調べた。脱落膜化の誘導により、グルコースの取り込み能が上昇した(図 5)。

図5 脱落膜化によるグルコース取り込みの変化



さらに、グルコースの脱落膜化における役割を検討した。低グルコース培養下では、脱落膜化による IGFBP-1 と PRL 発現 (脱落膜化マーカー遺伝子) の増加が抑制された。(図 6)

図6 グルコース濃度が脱落に及ぼす影響



すなわち、脱落膜化によりヒストン修飾を介したインスリン経路関連遺伝子群の活性化が誘導され、これらはグルコースの細胞内への取り込みを促進し、脱落膜化を促進することに関与しており、脱落膜化における糖代謝の重要性が示された。

(4)脱落膜化と DNA メチル化

上記の ESC 培養系で、DNA メチル化の変化をゲノムワイドに解析したが、脱落膜化によりメチル化に変化のあった CG 部位は極めて少数であったため、脱落膜化に伴う遺伝子発現の変化における DNA メチル化の関与はほとんどないと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Maekawa R, Lee L, Sugino N (他 6 名、9 番目) Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res* 9:15, 2016. 査読有

DOI: 10.1186/s13048-016-0225-z

Urahama T, Sugino N, Ohkawa Y. (他 11 名、8, 13 番目) Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics & Chromatin* 9:2, 2016. 査読有

DOI: 10.1186/s13072-016-0051-y

Maekawa R, Yamagata Y, Sugino N (他 9 名、9,12 番目) Tissue-specific expression of Estrogen receptor 1 is regulated by DNA methylation in a T-DMR. *Mol Endocrinol* 30: 335-347, 2016. 査読有

DOI:10.1210/me.2015-1058.

Yamagata Y, Takaki E, Sugino N (他 10 名、1,13 番目) Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res* 8:49, 2015. 査読有

DOI: 10.1186/s13048-015-0179-6

Arai Y, Hayakawa K, Sugino N. (他 16 名、12 番目) Putative epimutagen in maternal peripheral and cord blood samples identified using human induced pluripotent stem cells. *BioMed Res International* 2015 article ID 876047 査読有

URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/876047>

Tanabe M, Yamagata Y, Sugino N (他 7 名、9,10 番目) Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *J Reprod Dev* 61: 35-41, 2015. 査読有

DOI: 10.1262/jrd.2014-105.

Tamura I, Ohkawa Y, Yamagata Y, Sugino N (他 8 名、2,11,13 番目) Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 28: 1656-1669, 2014. 査読有

DOI: 10.1210/me.2014-1117.

Yamagata Y, Nishino K, Sugino N (他 4 名、1,7 番目) Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLOS ONE* 9 (1): e83612, 2014. 査読有

URL:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083612>

Tamura I, Yamagata Y, Sugino N (他 7 名、8,10 番目) Importance of C/EBP β binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGFBP-1, PRL and Mn-SOD by cAMP in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 155, 275-286, 2014. 査読有

DOI: 10.1210/en.2013-1569

Sato S, Yamagata Y, Sugino N (他 6 名、3,9 番目) Potential mechanisms of aberrant DNA hypomethylation on the X chromosome in uterine leiomyomas. *J Reprod Dev* 60: 47-54, 2014. 査読有

DOI:10.1262/jrd.2013-095

Lee L, Yamagata Y, Sugino N (他 7 名、8,10 番目) Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats. *Endocrinology* 154: 458-470, 2013. 査読有

DOI:10.1210/en.2012-1610.

[学会発表](計 30 件)

第 132 回近畿産科婦人科学会学術集会 (2015 / 6/27 兵庫県神戸市、神戸国際会議場)

特別講演:子宮内膜脱落膜化とエピジェネティクス 杉野法広

第 60 回日本生殖医学会 (2015 / 4/27 神奈川県横浜市、パンフィコ横浜)

シンポジウム:着床に伴う脱落膜化とその分子機構 杉野法広

47th Annual Meeting of the Society for the Study on Reproduction 2014/7/18 ~ 7/23 Grand Rapids, USA. Genome-wide analysis of histone modifications associated with decidualization in human endometrial stromal cells.

Tamura I, Maekawa R, Sugino N

[図書](計 2 件)

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

杉野法広 エピジェネティクスキーワード辞典 産婦人科疾患 子宮筋腫と子宮内膜症 羊土社 318 (p220 - 227)、2013

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉野 法広 (SUGINO, Norihiro)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 1 0 2 6 3 7 8 2

(2) 研究分担者

山縣 芳明 (YAMAGATA, Yoshiaki)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号： 3 0 3 6 3 1 2 0

(3) 連携研究者

須山 幹太 (SUYAMA, Mikita)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号： 7 0 4 5 2 3 6 5

大川 泰行 (OOKAWA, Yasuyuki)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号： 80448430