

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861328

研究課題名(和文) 卵巣黄体化に関するエピジェネティクス制御機構の細胞内分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms controlling epigenetic regulation of luteinization in granulosa cells

研究代表者

李 理華 (LEE, Lifa)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90610668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：黄体化顆粒膜細胞では、hCG刺激後に種々のヒストン修飾酵素遺伝子発現が変化していた。その中の1つのEZH2は、StAR、Cyp19a1遺伝子プロモーター領域においてhCG刺激後にDNA結合が変化しており、両遺伝子発現制御に関与していると考えられる。また顆粒膜細胞培養において、hCG投与後のStAR mRNA発現の上昇は、ERKキナーゼ阻害剤によって抑制され、更にStARプロモーター領域のヒストンアセチル化修飾も同時に変化していた。これらの結果は、hCG刺激後のStAR遺伝子発現は、ERKシグナルを介しており、更にそのシグナルはヒストン修飾を変化させることで遺伝子発現制御を行っている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Histone modification related genes were significantly altered after hCG injection in Granulosa cells (GCs). EZH2, one of those genes, was actually altered the DNA bindings to StAR or Cyp19a1 promoter region after hCG injection, which may regulate these gene expressions. GCs isolated after eCG injection were incubated with hCG for 4 h to induce luteinization. StAR mRNA levels were significantly increased by hCG accompanied by the increase in H3K4me3 of the StAR promoter region. StAR mRNA expression was inhibited by the ERK inhibitor with the significant decrease of H3K4me3. These results suggest that hCG increases StAR gene expression through the ERK-mediated signaling which is also associated with histone modification of the promoter region.

研究分野：産婦人科

キーワード：エピジェネティクス 生殖内分泌

1. 研究開始当初の背景

排卵とそれに伴う黄体化は妊娠成立にとって不可欠な現象である。排卵期の LH サージにより、卵胞内の顆粒膜細胞では、排卵までの短時間の間に急速にプロゲステロン合成が進む。このプロゲステロンは卵胞破裂に必要な各種因子を活性化するため排卵に不可欠である。プロゲステロン合成に関わる遺伝子の代表的なものに、Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)があり、その遺伝子発現は LH サージ後短時間で急速に増加する。一方で、LH サージ前に高い発現を示す Aromatase (Cyp19a1)は、LH サージ後急速に減少する。このように顆粒膜細胞における両遺伝子の発現は LH サージを契機にエストロゲン合成からプロゲステロン合成に急速にシフトするように調節されている。我々はこのような短時間での巧妙に制御されたステロイド合成関連蛋白酵素の遺伝子発現調節に、遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾とそれによるクロマチン構造変化が関わっていることを過去の研究により見出した。すなわち、StAR や Cyp19a1 遺伝子のプロモーター領域では、LH サージ後にヒストンのアセチル化やメチル化が変化し、転写活性化や不活性化のヒストン修飾となり、クロマチン構造を変化させることで、DNA への転写因子の結合が変化し、転写が促進もしくは抑制されていた。このように LH サージにより各遺伝子のヒストン修飾が変化し転写調節に関与していることが分かったが、これらヒストン修飾変化は LH サージ後に一体どのように調節されているのか、またどのようなヒストン修飾酵素が StAR、Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域にリクルートされ、その領域のヒストン修飾変化に関与しているのかについては全く分かっていない。

2. 研究の目的

LH サージによる顆粒膜細胞の黄体化によって変化する StAR、Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾変化に、どのようなヒストン修飾酵素がその調節に関わっているのかを検討し、また LH サージ後にこれらヒストン修飾がどのような細胞内シグナル伝達を介して調節されているかを検討することで、LH サージによる、エピジェネティクスで調節される遺伝子発現の制御機構の詳細な細胞内分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3 週齢幼若雌ラットを用いて eCG、hCG で過排卵刺激を行い、hCG 投与前と、投与 4h、12h 後の卵巣から排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞を回収した。

各サンプルより total RNA を抽出し、realtime PCR array を用いて 0h と 4h、または 0h と 12h の 2 群間でそれぞれ有意差をもって発現上昇、または発現低下

を示すヒストン修飾酵素関連遺伝子を抽出した。realtime PCR array は、84 種類のヒストン修飾酵素関連遺伝子のプライマーセットとハウスキーピング遺伝子のプライマーセットが搭載された 96 well プレートを用いた。

の結果から得られた LH サージにより発現が変化するヒストン修飾酵素の中で、StAR、Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域で、過去の実験で既に変化することが分かっているヒストン修飾 (H3K27 トリメチル) を媒介する酵素 EZH2 を抽出した。黄体化顆粒膜細胞と EZH2 抗体を用いて ChIP assay を行い、実際に StAR や Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域にリクルートされているかを検討した。

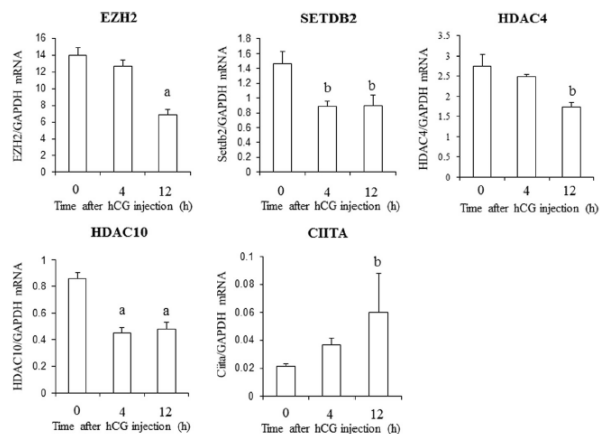
(2) LH サージ以下には EGF 受容体を介した ERK シグナルが存在しており、その卵巣特異的なノックアウトマウスでは、LH サージ後の StAR の発現上昇と、Cyp19a1 の発現低下が起こらないことが報告されている。我々はこの ERK シグナルに注目した。

eCG 刺激後の卵巣から回収したラット顆粒膜細胞を用いた培養系に hCG を添加し、StAR、Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域でヒストン修飾が変化するかを ChIP assay を用いて確認した。

同培養系において、hCG 刺激後に ERK キナーゼの選択的阻害である UO126 を投与し、で見られたヒストン修飾変化が抑制されるかを検討した。

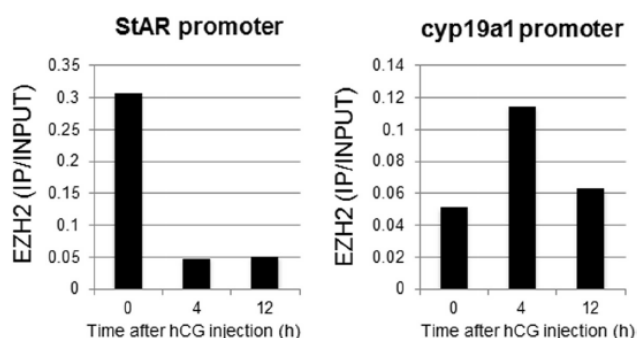
4. 研究成果

PCR array において、84 遺伝子中ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化に関わる 5 酵素が (HDAC4, HDAC10, EZH2, SETDB2, CIITA) が hCG 投与後に有意に発現上昇、または低下していた。一方で DNA メチル化酵素は変化なかった。さらにこれら遺伝子において、0、4、12h の 3 群間で validation 解析を行ったところ、PCR array で得られた結果とほぼ同様の結果となった(図 1)。



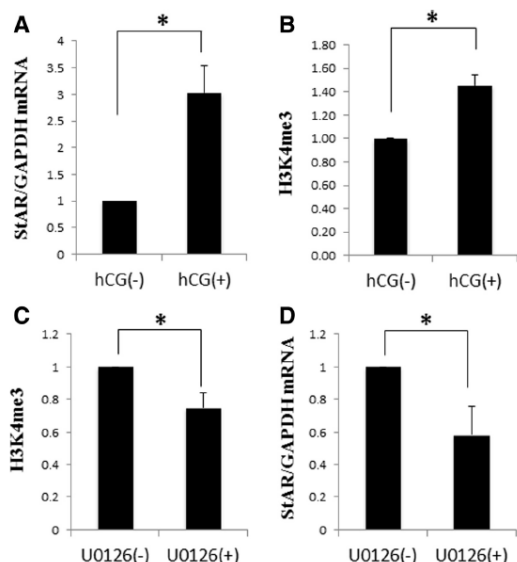
(図 1) ヒストン修飾酵素の mRNA 発現

これら酵素の中で、EZH2 は転写抑制系に働くとして知られる H3K27 のメチル化酵素として知られている。以前我々が行った StAR, Cyp19a1 遺伝子のヒストン修飾解析では、hCG 投与後に両遺伝子プロモーター上の H3K27 トリメチルが変化することを見出し、今回この EZH2 に注目してこのヒストン修飾酵素が実際に両遺伝子プロモーター上で、hCG 投与後にリクルートされるか、またそれが変化するかを ChIP assay を用いて検討した。StAR 遺伝子上では 4、12h で EZH2 のプロモーター上の結合が低下しており、また、Cyp19a1 では 4h でその結合が上昇していた。この変化は H3K27 トリメチルの変化と矛盾しない結果となった(図 2)。



(図 2)StAR, Cyp19a1 プロモーターにおける EZH2 結合の変化

次に培養した顆粒膜細胞に hCG を投与すると、転写促進系に働く H3K4 のトリメチル化が変化し、それに伴い StAR mRNA も発現が上昇することがわかった。これに ERK キナーゼの選択的阻害剤である UO126 を投与したところ、H3K4 のトリメチル化は抑制され、StAR mRNA 発現も抑制された(図 3)。



(図 3)顆粒膜細胞培養において、hCG 投与で StAR mRNA 発現は上昇し、また StAR プロモーター領域の H3K4 トリメチルは上昇する。この変化は ERK キナーゼ阻害剤(UO126)の投与で抑制される。

この結果より、StAR 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾制御に ERK シグナルが関与していることが示された。

以上の結果より、卵巣顆粒膜細胞では LH サージ後に様々なヒストン修飾酵素が変化し、排卵に必要な種々の遺伝子を制御しており、それには ERK シグナルを介している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ryo Maekawa, Lifa Lee, Maki Okada, Hiromi Asada, Masahiro Shinagawa, Isao Tamura, SHun Sato, Hiroshi Tamura and Norihiro Sugino

Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *Journal of Ovarian Research* (2016)9:15, 1-9, 査読あり

doi:10.1186/s13048-016-0225z

〔学会発表〕(計 3 件)

前川 亮、卵巣顆粒膜細胞の黄体化に伴う性ステロイド合成関連遺伝子発現変化のエピジェネティクス制御機構、第 67 回日本産科婦人科学会、2015 年 4 月 9~12 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

李 理華、ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴うヒストン修飾酵素遺伝子の発現変化、第 67 回中国四産科婦人科学会、2014 年 9 月 13~14 日、ANA クラウンプラザホテル宇部(山口県宇部市)

李 理華、ラット黄体化顆粒膜細胞において、LH サージはヒストン修飾酵素制遺伝子を変化させる、第 66 回日本産科婦人科学会、2014 年 4 月 18~20 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔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

李 理華 (LEE, Lifa)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90610668

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し