

論文内容の要旨

論文題目 ヒト子宮内膜におけるコレステロール硫酸の遺伝子発現調節

指導教員 百枝幹雄

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月 1 日 入学

医学博士課程

生殖 発達 加齢医学専攻

氏名 中澤史子

【緒言】家兎子宮内膜で着床期特異的にコレステロール硫酸 (CS) の含有量が増加していることが報告されている。CS がヒト子宮内膜において着床期特異的に発現することが示され、その分子学的機構の一つとして cAMP を介したプロゲステロンの誘導作用が明らかとなっている。近年、CS が retinoid-related orphan receptors alpha (ROR α) のリガンドであるという報告がある。今回私はヒト子宮内膜において着床期特異的に増加する CS に着目し、ROR α を介した CS の機能を解析するために、以下の実験を用いた。

- ① ヒト子宮内膜において ROR α の発現確認と CS による ROR α 下流遺伝子である Rev-erb α の遺伝子発現調節の解析。
- ② ヒト子宮内膜で ROR response element (RORE) を有する候補遺伝子 Sulfatase 1 (heparan sulfate 6-O endosulfatase) の遺伝子発現調節とその機能解析。

【方法】

BIAcore 3000 を用いて、CS とその受容体である ROR α の結合性について検討した。患者の同意の下に採取したヒト子宮内膜組織を用い、月経周期に伴う ROR α と Rev-erb α の mRNA 発現量変化、および分離培養した上皮細胞 (EECs)、間質細胞 (ESCs) の ROR α と Rev-erb α の mRNA 発現に対する CS の作用を定量的 RT-PCR 法にて確認し、蛋白発現を western blotting 法で検討した。ROR α 、Rev-erb α の局在は免疫組織染色法、*in situ* hybridization 法により確認した。ROR α とそのリガンド結合領域削除変異体の発現ベクターを用いて Rev-erb α の promoter 領域に関する ルシフェラーゼアッセイ法を行った。

SULF1 の局在を *in situ* hybridization 法により確認し、分離培養した EECs、ESCs の SULF1 mRNA 発現に対する CS の作用を定量的 RT-PCR 法にて検討した。Wnt シグナル伝達因子 β -catenin の蛋白発現量変化と細胞内局在変化を検討するため CS を添加した ESCs の Western blotting 法、組織免疫法を行った。ESCs に CS を添加し、細胞増殖試験と Caspase 3/7 活性を測定しアポトーシス誘導について検討した。

【結果】

1. CS と ROR α の結合能の検討

BIAcore3000 を用い、CS の結合曲線を作成し、BIAevaluation 3.0 software を用いて CS と ROR α との結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 、解離定数 KD を計算し、各々

ka:7.01x10³ (1/Ms) kd:7.62x10⁻³ (1/s) KD:1.09x10⁻⁶ (M) であった。

2. CS の受容体 ROR α の発現確認と下流遺伝子 Rev-erb α の遺伝子発現の検討

ヒト子宮内膜における ROR α 、Rev-erb α の発現を確認するため RT-PCR 法を用いて検討した。子宮内膜間質細胞ならびに上皮細胞にその発現を確認し、Western blotting 法を用いてタンパク質レベルでもその発現を確認した。免疫組織染色法を用いてヒト子宮内膜月経周期における ROR α の局在を確認したところ、各月経周期で子宮内膜間質細胞、管腔ならびに腺管上皮細胞にその発現を確認した。ヒト子宮内膜月経周期 Rev-erb α の局在を確認するため *in situ* hybridization 法を施行した。増殖期初期では Rev-erb α は子宮内膜間質細胞、管腔ならびに腺管上皮細胞にその発現を確認した。増殖期中期、分泌期初期ならびに中期では間質細胞と腺管上皮細胞に発現していた。増殖期後期、分泌期後期では子宮内膜間質細胞にその発現が確認された。各月経周期における ROR α ならびに Rev-erb α の mRNA 発現量を検討したところ、ROR α は分泌期中期でその発現が優位に増加していた。ROR α が優位に増加していた分泌期中期では有意差を認めなかったが、分泌期初期と後期に比べて Rev-erb α の発現は増加傾向にあった。

3. ROR α と下流遺伝子 Rev-erb α に対する CS の作用調節

分離培養した EECs、ESC₁ に CS を 10 μ M 添加後の ROR α mRNA の発現量を検討し

たところ、EECs では優位な変化がみられなかったが、ESCs で CS 添加 1 時間後、3 時間後にその発現量が優位に増加していた。Rev-erb α について同様な検討を行ったところ、EECs では CS 添加後 6 時間、24 時間で Rev-erb α mRNA の発現量優位に減少していた。ESCs では CS 添加 1 時間後、3 時間後にその発現量が優位に増加していた。Western blotting 法を用い、分離培養した ESCs に CS10 μ M、20 μ M を添加後にタンパク質を抽出し ROR α の発現量変化を確認したところ、発現量の増加が確認された。これらのことより CS は ROR α のリガンドとして機能するだけでなく、受容体である ROR α の転写活性を促進していることが示唆された。

4. CS による Rev-erb α のプロモーター活性調節

ルシフェラーゼアッセイ法を用い、CS 添加群と、未添加群を比較した。それぞれの結果より、CS 添加の有無にかかわらず、ROR は Rev-erb α を活性促進させることが明らかとなった。

5. SULF1 の発現確認と局在の検討

in situ hybridization 法を用いてヒト子宮内膜月経周期における SULF1 の局在を確認したところ、各月経周期で子宮内膜間質細胞、上皮細胞にその発現を確認した。月経周期における SULF1 の mRNA の発現量変化は増殖期中期で優位に発現が増加していた。

6. SULF1 に対する CS の作用と SULF1 の機能

分離培養した EECs、ESC_s に CS を 10 μ M 添加後の SULF1 mRNA の発現量を検討したところ、EECs では優位な変化がみられなかったが、ESC_s で CS 添加 3 時間後、6 時間後にその発現量が優位に増加していた。

ESC_s に CS 添加後 24 時間、48 時間後のタンパク質を抽出し Western Blotting 法を行った。CS 添加後 β -catenin のタンパク質量の発現増加が認められた。ESC_s に CS 添加し免疫組織染色を行い β -catenin の細胞核内への集積も確認した。

CS 添加群とアポトーシスを誘導した群の細胞内代謝活性を検討し、その活性促進を確認した。CS 添加により Caspase 3/7 の活性が時間依存的に促進されることが明らかとなった。

【考察】

CS は妊娠中の家兎子宮内膜で着床期特異的に CS の含有量が増加する。また CS の濃度は妊娠初期から後期にかけて徐々に高値を示し、胎盤における産生増加が示唆されているが生理的意義の解明に至っていない。私は、アフィニティセンサーで、CS とその受容体である ROR α の結合性について検討し、CS との結合速度定数、解離速度定数、解離定数を数値化した。CS が ROR α と結合することから、ヒト子宮内膜において *in vitro* で CS による遺伝子発現調節を検討した。ヒト子宮内膜間質細胞、上皮細胞で ROR α の発現を確認し、Rev-erb α も同様にその発現を確認した。ROR α mRNA 発現量は分泌期中期に一致して発

現量の増加が認められた。分泌期中期における Rev-erb α mRNA は増加傾向であった。分離培養した EECs、ESC s に CS を添加した実験では ESC s で CS により ROR α mRNA の発現誘導が認められた。この結果よりリガンドとして機能すると報告されている CS が、その受容体である ROR α の発現を誘導している可能性が示唆された。CS 添加による ROR α のタンパク質の発現量変化について検討したところ、CS は ROR α のタンパク質発現量を増加させた。ルシフェラーゼアッセイ法より ROR α により Rev-erb α が誘導されていることが示された。本研究で、CS を添加した ESC s において Rev-erb α mRNA の発現量は優位に増加することが確認されている。ヒト子宮内膜において着床期特異的に発現する CS が、子宮内膜で局所濃度が上昇し、その受容体である ROR α を誘導して Rev-erb α の転写活性に関与している可能性があると考えられた。

ヒト子宮内膜で CS が ROR α の発現を促進することから、ROR α の下流遺伝子の可能性がある SULF1 についてヒト子宮内膜で初めてその発現を確認した。CS 添加した ESC s では SULF1 の転写活性が促進された。SULF1 が Wnt シグナル活性化、アポトーシスの誘導などの機能を有していることから、私は CS によりヒト子宮内膜間質細胞表面の SULF1 の転写が活性化し、細胞膜表面の Wnt が増加して Wnt シグナル経路が活性化するのではないかという仮説をたてた。CS 添加を行った ESC s の β -catenin のタンパク質は増加していた。本来、間質細胞質で分解されている β -catenin が CS 添加により安定的に発現していることを示した。また CS 添加後、 β -catenin の局在は時間経過的に間質細胞の核内に集積した。

細胞増殖試験や Caspase 活性の結果、CS は細胞内代謝活性を維持したまま、細胞内の Caspase 活性を促進していた。この結果 CS がアポトーシスの誘導をすることが明らかとなった。ヒト子宮内膜において CS が Wnt シグナルの活性やアポトーシスを誘導する事を示した。アポトーシスの誘導経路に関しては SULF1 を介する可能性が示唆された。