

論文の内容の要旨

論文題目 子宮ならびに子宮内膜由来細胞におけるプロゲステロンを介した 14-3-3 τ の発現と機能解析

氏名 伊藤 正典

[序文]

プロゲステロン (P4) は不妊症、子宮内膜癌、子宮内膜症、月経異常の治療や避妊薬として使用されている。P4 の作用機序の解明は、これら産婦人科疾患の治療法の解明につながる重要な課題である。P4 の作用機序を解明する目的で、廣井らは以前ラットに P4 を投与して、ラット子宮の cDNA を用いた suppression subtractive hybridization (SSH) 法により P4 応答遺伝子の候補をリスト化し、14-3-3 τ 遺伝子が P4 応答遺伝子の候補の 1 つであることを明らかにした。14-3-3 τ 蛋白質は植物・酵母から動物に至るまで高度に保存された分子量約 30 kDa のシャペロン蛋白質である。シャペロン蛋白質は標的蛋白質に作用し、その標的蛋白質の構造を維持・管理し、標的蛋白質の分解調節や細胞内シグナル伝達などその作用を補助する蛋白質である。

本研究では子宮ならびに子宮内膜由来細胞における 14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質の P4 応答性、子宮内膜における 14-3-3 τ 蛋白質の発現局在、14-3-3 τ 蛋白質が PR-B の転写活性に与える影響とその作用機序を解析することにより、子宮内膜の脱落膜化ならびに子宮内膜癌でのプロゲステロンシグナルにおける 14-3-3 τ 蛋白質の意義を明らかにすることを目的とした。

P4 はプロゲステロン受容体 (Progesterone receptor; PR) を介してその作用を発揮し、PR には PR-A と PR-B の 2 つのアイソフォームが存在する。P4 は細胞増殖抑制作用を持ち、その作用は PR-A よりも PR-B の方が強力である。本研究では将来的な細胞増殖抑制実験を視野に入れて、PR-A よりも細胞増殖抑制作用が強い PR-B を主体に実験を行った。

[方法と結果]

1. 成熟雌ラット子宮での P4 またはエストロゲン (E2) 投与による 14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質の発現制御に関する検討

[方法] 7 週齢ラットの両側卵巣を摘出後、内因性の女性ホルモンが消失した 14 日後に P4 2 mg/body または E2 20 μ g/body をラットに注射し、0、6、12、24 時間後に子宮を摘出した。摘出子宮を qRT-PCR、Western blot 法、免疫組織染色で使用した。

[結果] 14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質は P4 投与後 12 時間以降で有意に増加した。抗 14-3-3 τ 抗体を用いた免疫組織染色で P4 投与後 12 時間後に子宮間質細胞に染色が認められた。24 時間後には子宮内膜上皮細胞に染色が認められた。E2 を注射したラットの子宮では 14-3-3 τ mRNA に有意な増加を認めなかった。

2. 分離培養したヒト子宮内膜上皮細胞・間質細胞での P4 添加による 14-3-3 τ mRNA の発現制御に関する検討

[方法] 子宮内膜を上皮細胞と間質細胞に分離し、P4 10^{-7} M を添加した。0、12、24 時間後に細胞を回収し RNA を精製後、qRT-PCR を行った。

[結果] ヒト子宮内膜上皮細胞・間質細胞において、P4 添加後の 12 時間後に 14-3-3 τ mRNA が有意に増加した。

3. 分離培養したヒト子宮内膜間質細胞での脱落膜化刺激による 14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質の発現制御に関する検討

[方法] 分離培養した子宮内膜間質細胞に cAMP (cyclic adenosine monophosphate)、酢酸メドロキシプロゲステロン (Medroxyprogesterone acetate; MPA) を添加することにより、人工的に脱落膜化を誘導できることが知られている。分離培養した子宮内膜間質細胞に cAMP 0.5 mM、MPA 10^{-6} M を添加して 3 日間培養を行った。細胞を回収し、qRT-PCR と Western blot 法で検討した。

[結果] 脱落膜化刺激 (cAMP + MPA) により、14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質の発現促進が認められた。

4. ヒト子宮内膜における 14-3-3 τ 蛋白質の発現局在に関する検討

[方法]抗 14-3-3 τ 抗体を用いて月経周期子宮内膜の免疫組織染色を行った。

[結果]分泌期中期の間質細胞に強い染色を認めた。分泌期早期には内腔上皮細胞に染色を認め、分泌期中期には腺上皮細胞に染色を認めた。

5. 子宮内膜癌由来細胞株 Ishikawa 細胞でのルシフェラーゼアッセイを用いた 14-3-3 τ 蛋白質による PR-B の転写活性の制御に関する検討

[方法]Ishikawa 細胞 (PR negative) に FLAG タグを付加した 14-3-3 τ 発現ベクター (FLAG-14-3-3 τ)、HA (Hemagglutinin) タグを付加した PR-B 発現ベクター (HA-PR-B) を一過性遺伝子導入した。遺伝子導入の 24 時間後にエタノール (EtOH) または P4 10^{-7} M を添加し、24 時間後に細胞を回収し、PR-B の転写活性を検討した。発現ベクターの蛋白質は Western blot 法で確認した。なお、EtOH は P4 の vehicle である。

[結果]EtOH 添加時、HA-PR-B 蛋白質に加えて FLAG-14-3-3 τ 蛋白質を過剰発現させた Ishikawa 細胞では HA-PR-B 蛋白質のみを過剰発現させた Ishikawa 細胞と比較して、PR-B の転写活性が 1.7 倍と有意に上昇した。また、P4 添加時、HA-PR-B 蛋白質に加えて FLAG-14-3-3 τ 蛋白質を過剰発現させた Ishikawa 細胞では HA-PR-B 蛋白質のみを過剰発現させた Ishikawa 細胞と比較して、PR-B の転写活性が 2.5 倍と有意に上昇した。

6. Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞の樹立と P4 添加による 14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質の発現変化に関する検討

[方法]Ishikawa 細胞 (PR negative) にネオマイシン耐性遺伝子を有する pcDNA3 空ベクター、pcDNA3-FLAG-PR-B 発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入し、ネオマイシンで選択した。得られた細胞を qRT-PCR、Western blot 法で検討し、PR-B mRNA ならびに同蛋白質の発現を確認した。以上より Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞と Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞 (control 細胞) を樹立した。Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞に P4 10^{-7} M 添加後、0、12、24 時間後に細胞回収を行った。qRT-PCR と Western blot 法で 14-3-3 τ mRNA ならびに同蛋白質の発現変化を検討した。

[結果]P4 を添加した Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞の 2 クローンでは 14-3-3 τ mRNA ならびに FKBP51 mRNA の有意な発現の上昇を認めなかった (FKBP51 は既知の P4 応答遺伝子であり、P4 投与時の positive control として用いた)。一方、P4 を添加した Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞の 2 クローンでは 14-3-3 τ mRNA ならびに FKBP51 mRNA の有意な発現の上昇を認めた。また、P4 を添加した Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞の 2 クローンで 14-3-3 τ 蛋白質の発現上昇が認められた。

7. Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞、Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞での P4 添加による PR-B 蛋白質、14-3-3 τ 蛋白質の発現局在の変化に関する検討

[方法]Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞、Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞に EtOH または P4 10^{-7} M 添加後の 24 時間後に培養液を除去し、抗 FLAG 抗体、抗 14-3-3 τ 抗体で免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で検討した。

[結果]EtOH 添加時、Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞において PR-B 蛋白質と 14-3-3 τ 蛋白質は細胞質で共局在していた。P4 添加後、PR-B 蛋白質と 14-3-3 τ 蛋白質は核内へ移行し共局在していた。一方、Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞では P4 添加による 14-3-3 τ 蛋白質の細胞質からの局在変化を認めなかった。

8. 免疫沈降法を用いた PR-B 蛋白質と 14-3-3 τ 蛋白質の結合に関する検討

[方法]Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞、Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞に EtOH または P4 10^{-7} M を投与し、24 時間後の細胞から細胞全抽出液を得た。PR-B 蛋白質で免疫沈降した蛋白質を Western blot 法で使用し、抗 14-3-3 τ 抗体で Blot した。

[結果]EtOH 添加時、P4 添加時において、PR-B 蛋白質と 14-3-3 τ 蛋白質の直接結合が認められた。

[考察]

14-3-3 τ 蛋白質は子宮ならびに子宮内膜由来細胞において、P4 により発現促進される P4 応答遺伝子産物であることを明らかにした。機能解析の結果、14-3-3 τ 蛋白質は PR-B の転写活性を上昇させることを明らかにした。転写活性上昇の作用機序を解明するために子宮内膜癌由来細胞株 Ishikawa 細胞を用いて、PR-B 安定発現細胞を樹立した。その細胞質において 14-3-3 τ 蛋白質は PR-B 蛋白質に直接結合し、P4 添加による PR-B 蛋白質の細胞質から核への移動後も PR-B 蛋白質と行動を共にしていることを明らかにした。以上の結果は 14-3-3 τ 蛋白質が P4 の作用発現に関与している可能性を示唆している。将来、子宮ならびに子宮内膜由来細胞における PR-B 蛋白質と 14-3-3 τ 蛋白質の相互関連の意義が完全に解明されることにより、不妊症や子宮内膜癌の治療に結びつく可能性があると考えられる。