

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 伊藤 正典

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プロゲステロン (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。本研究では P4 応答遺伝子候補 14-3-3 $\tau$  遺伝子に着目し、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シグナルを明らかにするために P4 を介した 14-3-3 $\tau$  の発現と機能解析を行い、下記の結果を得ている。

1. 成熟雌ラット子宮での P4 投与により、14-3-3 $\tau$  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。免疫組織染色では P4 投与後 12 時間後に子宮間質細胞に染色が認められ、24 時間後には子宮内膜上皮細胞に染色が認められた。エストロゲンを注射したラットの子宮では 14-3-3 $\tau$  mRNA に有意な増加を認めなかった。ラット子宮において 14-3-3 $\tau$  遺伝子が P4 応答遺伝子であることが示された。
2. 分離培養した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 $\tau$  mRNA が有意に増加した。14-3-3 $\tau$  遺伝子がヒト子宮内膜上皮細胞・間質細胞において、P4 応答遺伝子であることが示された。
3. 分離培養したヒト子宮内膜間質細胞において、脱落膜化刺激 [cAMP (cyclic adenosine monophosphate)+酢酸メドロキシプロゲステロン (Medroxyprogesterone acetate; MPA)] により、14-3-3 $\tau$  mRNA ならびに同蛋白質の発現促進が認められた。14-3-3 $\tau$  遺伝子は脱落膜化刺激に応答する遺伝子であることが示された。
4. 抗 14-3-3 $\tau$  抗体を用いて月経周期子宮内膜の免疫組織染色を行い、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。14-3-3 $\tau$  遺伝子が P4 応答遺伝子かつ脱落膜化刺激にも応答する遺伝子であることが示された。
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 $\tau$  蛋白質による PR-B の転写活性の制御について検討した結果、14-3-3 $\tau$  蛋白質は Progesterone receptor (PR-B) に対して、coactivator として働くことが示された。
6. Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞の樹立し、P4 の添加により 14-3-3 $\tau$  mRNA ならびに同蛋白質の発現促進を認めた。14-3-3 $\tau$  遺伝子は Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞において、P4 応答遺伝子であることが示された。
7. 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 $\tau$  蛋白質の発現局在の変化について検討した結果、P4 投与前、PR-B 蛋白質と 14-3-3 $\tau$  蛋白質は細胞質で共局在していたが、P4 添加後 PR-B 蛋白質と 14-3-3 $\tau$  蛋白質は核内へ移行し共局在していること

が示された。

8. 免疫沈降法を用いた PR-B 蛋白質と 14-3-3 $\tau$  蛋白質の結合について検討した結果、Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞において、P4 投与時・P4 非投与時 14-3-3 $\tau$  蛋白質と PP-B 蛋白質が直接結合していることが示された。

以上、本論文は 14-3-3 $\tau$  遺伝子の P4 応答性とプロゲステロンシグナルに 14-3-3 $\tau$  遺伝子が関与している可能性を初めて明らかにした。プロゲステロンの作用機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。