

ヒト子宮内膜間質細胞脱落膜化におけるヒストンアセチル化の役割に関する研究

丸山 哲夫

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

このたび私は、平成14年度12月5日に大阪・千里ライフサイエンスセンターで開催された第7回日本生殖内分泌学会におきまして、日本生殖内分泌学会奨励賞をいただきました(受賞演題「子宮内膜間質細胞の insulin-like growth factor binding protein-1 プロモーター領域におけるアセチル化ヒストンの検討」)。対象となった研究は私ひとりの力で成し得たことではなく、諸先生方ならびに良き同僚からのご指導ご協力の賜物であり、この場をお借りして皆様に厚く御礼申し上げます。

本稿では、受賞研究を含めた当該テーマに関する一連の私たちの研究を、抜粋して紹介させていただきます。なお詳細につきましては、受賞後に発表した以下の論文を参考にしていただければ幸いです。

Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S, Yoshimura Y. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 16675-16682.

緒言

近年、転写活性・遺伝子発現調節において、DNAの高次構造に加えてその基本構造単位であるヌクレオソームおよびクロマチンの修飾が重要であることが明らかになってきた。1990年代になってヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferase: HAT) ならびにヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) が種々単離され、蛋白翻訳後修飾として核構造蛋白コアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) のアセチル化・脱アセチル化による転写調節の分子メカニズムが急速に解明されつつある。

真核生物の染色体 DNA 構造はヌクレオソームと呼ば

れる繰り返し構造が螺旋状につながったクロマチンと呼ばれる高次構造をとっており、ヌクレオソームコアは、H2A, H2B, H3, H4それぞれ2分子ずつなるヒストンオクタマーに、146塩基対の DNA が約1.7回転巻き付いた構造をとっている。コアヒストンのN末端のヒストンテールがアセチル化・メチル化・リン酸化などの修飾を受けることにより転写活性が制御される。転写反応を開始するためには、クロマチン構造の局所的な変化が必要となるが、その分子メカニズムのひとつとして、HAT 複合体が DNA 結合性転写活性化因子によって目的遺伝子のプロモーター領域上にリクルートされ、ヌクレオソームヒストンをアセチル化するといわれている。アセチル化は、HAT の基質特異性に依存し、アセチル化される残基の違いによりさまざまな生体の機能発現を規定していると考えられている。

一方、ヒト子宮内膜間質細胞においてエストロゲンのプライミング後プロゲステロンの作用によって引き起こされる脱落膜化現象は、妊娠の成立(着床)・維持にとってきわめて重要である。また子宮内膜の卵巣ステロイド依存的な増殖・分化(脱落膜化)・剥脱というサイクルの反復は、内膜特異的・周期的転写活性・遺伝子発現を反映していると考えられ、こうした子宮内膜の機能発現に、クロマチン修飾を介したエピソード的なメカニズムの関与が強く示唆されるが、現在までに子宮内膜の増殖や分化におけるクロマチン修飾に関する研究は、ほとんどなされていない。われわれは、子宮内膜分化におけるクロマチン修飾、特にヒストンアセチル化の分子メカニズムの解明が、今後の生殖医療や癌治療への応用の基礎的研究として重要であると考え、本研究に着手した。

目的

以下の3点に着目して、卵巣ステロイド依存性の子宮内膜脱落膜化の制御機構をヒストンアセチル化の側面から明らかにすることを目的とした。

1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の脱落膜化に対す

連絡先：丸山哲夫、慶應義塾大学医学部産婦人科学教室、〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
TEL: 03-3353-1211
FAX: 03-3226-1667
E-mail: tetsuo@sc.itc.keio.ac.jp

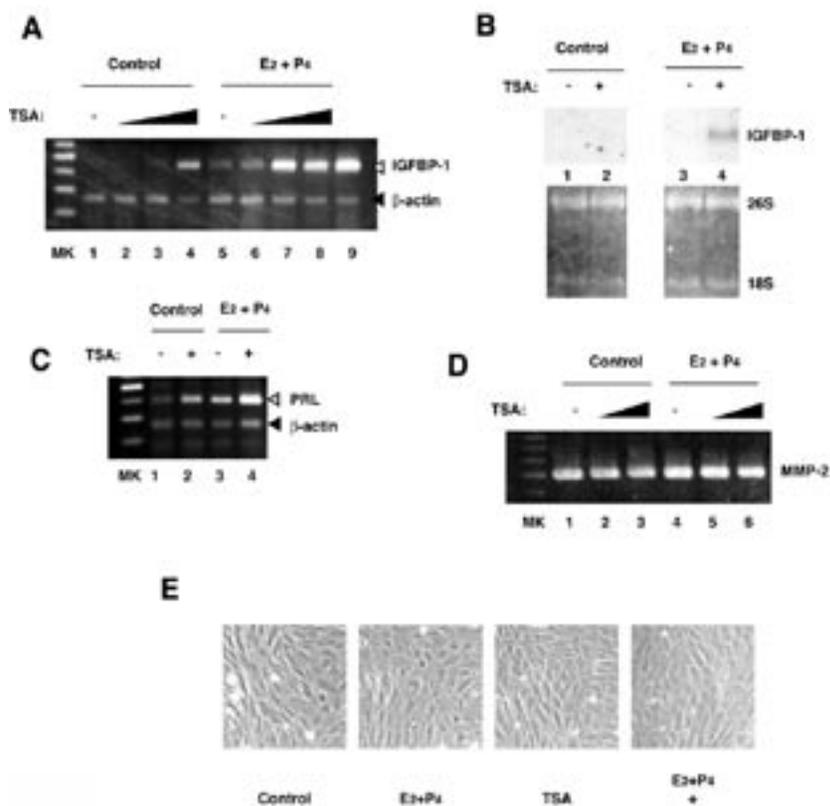


図1 TSAは子宮内膜間質細胞の卵巣ステロイド依存性脱着膜化を促進する。

る効果

2. 脱着膜化に伴ってアセチル化されるヒストンとアセチル化リジン残基部位の同定
3. 脱着膜化特異的マーカーのプロモーター領域におけるヒストンアセチル化状態の検討

方法

婦人科領域の良性疾患により摘出された子宮あるいは内膜生検から子宮内膜を採取し、細切・酵素処理・濾過操作により腺細胞、間質細胞に分離・純化した。生体試料の採取は、慶応義塾大学医学部倫理委員会の承認のもと、患者より informed consent を得て行った。

1) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A (TSA) のヒト子宮内膜間質細胞の脱着膜化への効果の検討

卵巣ステロイドホルモン(17β-estradiol + progesterone : E₂ + P₄), TSA (10~500ng/ml) あるいは両者で48時間処理した内膜間質細胞より RNA を抽出し、脱着膜化マーカーである insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) と prolactin (PRL), その他に

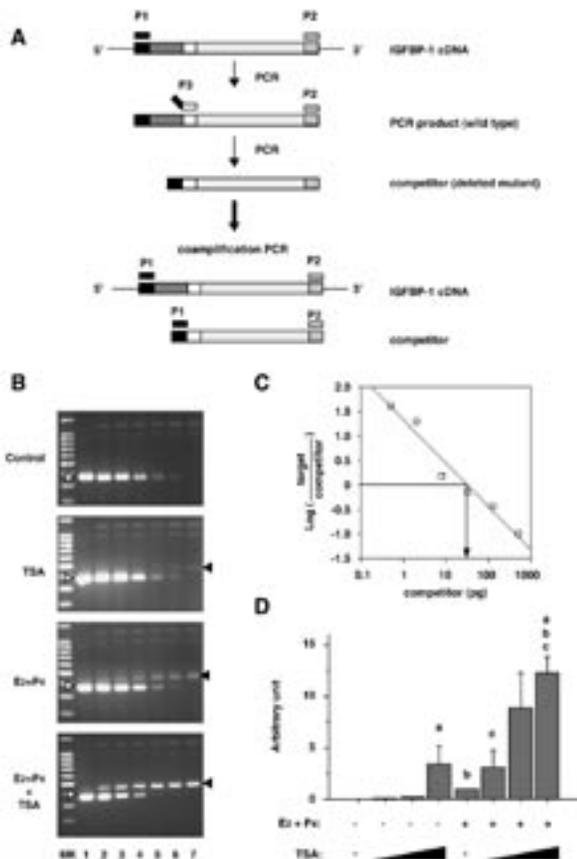


図2 TSAは相乗的かつ用量依存性に卵巣ステロイド依存性IGFBP-1発現を増強する。

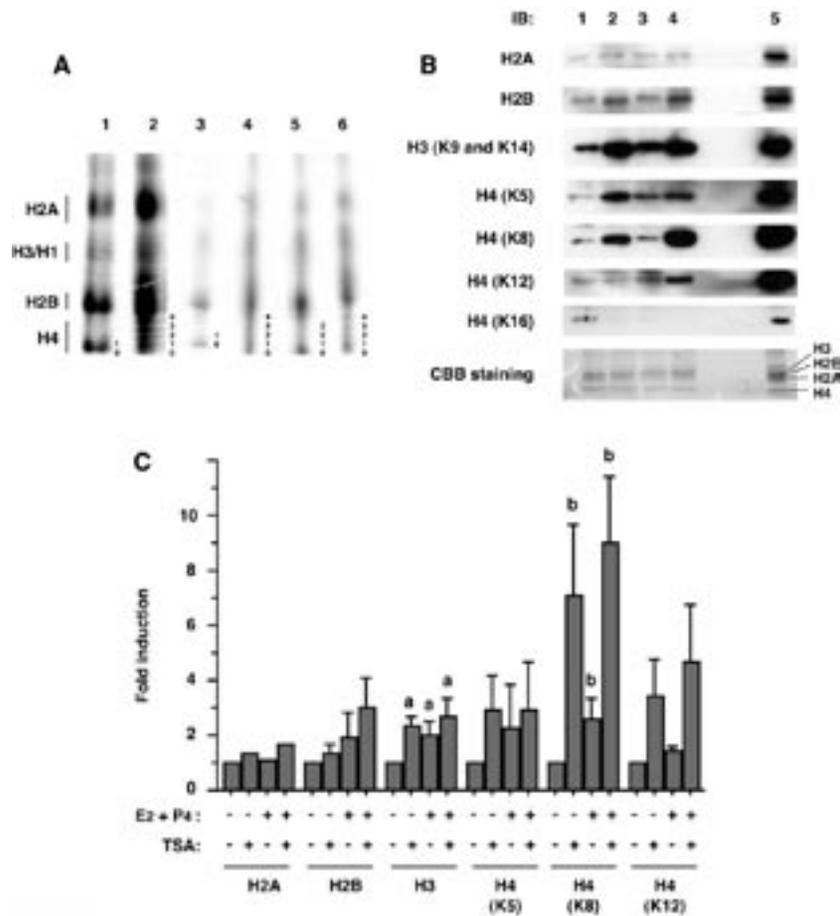


図3 間質細胞のコアヒストンは性ステロイドおよびTSA処理によりアセチル化を受ける。

matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), 内部標準として β -actin の mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。さらに IGFBP-1 mRNA に関しては, Northern Blotting 解析をすると同時に, IGFBP-1 の DNA 断片を用いた competitive RT-PCR により定量化した。腺細胞についても同様に, $E_2 + P_4$, TSA, あるいは両者で処理したのち RNA を抽出し, IGFBP-1 遺伝子発現について RT-PCR を施行した。

2) 脱落膜化に伴ってアセチル化されるヒストンとアセチル化リジン残基部位の同定

$E_2 + P_4$, TSA あるいは両者で8時間処理した間質細胞および HeLa 細胞よりヒストンを抽出し, Acid/Urea/Triton (AUT) ゲルを用いて各コアヒストンを泳動・分離した後, クマシーブリリアントブルー染色を行い, それぞれのアセチル化ヒストンの検出を試みた。加えて, 特異的ヒストンアセチル化抗体を用いた Western blotting を行い, アセチル化部位の同定を行った。

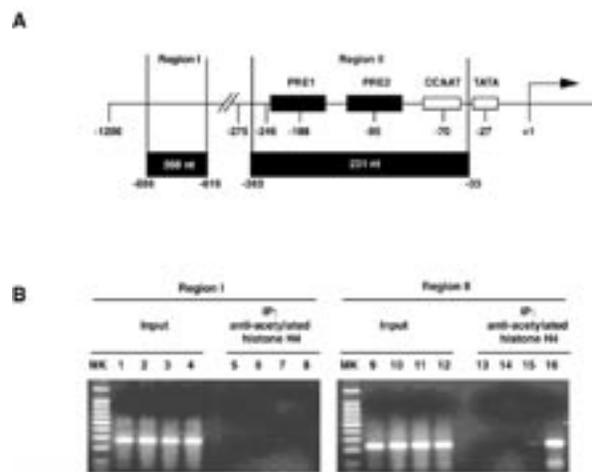


図4 TSA はプロゲステロン作用を通じて卵巣ステロイド依存性ヒストンH4アセチル化を促進する。

3) 脱落膜化特異的マーカー (IGFBP-1) のプロモーター領域におけるヒストンアセチル化状態の検討

アセチル化ヒストンH4に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay; Chromatin Immunopre-

precipitation Assay) により, IGFBP-1プロモーター領域のどの部分のヒストンがアセチル化されているかについて検討を行った. 具体的には, 間質細胞を分離・純化した後, $E_2 + P_4$, TSA あるいは両者の存在下で1時間培養し, ChIP assay に供した. すなわち, ホルマリンにより培養細胞を固定し, DNA とクロマチンをクロスリンキングし, sonication 後にその複合体を抗アセチル化ヒストン H4により免疫沈降した. 続いて, 免疫沈降物を65°C 4時間で処理することにより遊離したDNA に対し, IGFBP-1プロモーター上のプロゲステロン応答類似配列 (PRE) が存在する領域 (領域II) と, それよりも遠位の領域 (領域I) をターゲットにしてPCR による増幅を試みた.

結果・考察

1. RT-PCR 解析では, IGFBP-1 mRNA は卵巣ステロイド添加により発現が誘導され, TSA との同時添加によりその増強を認めた (図1 A). また, TSA500ng/ml の比較的高濃度では単独においてもIGFBP-1 mRNA の発現を認めた (図1 A). これに対して, β -actin mRNA の発現量に変化はなかった (図1 A). Northern blotting においても同様な結果が得られた (図1 B). 他の脱落膜化マーカーであるPRL mRNA でも, TSA との同時添加により卵巣ステロイドによる発現の増加を認めたが (図1 C), MMP-2では発現量に変化は認めなかった (図1 D). 一方, TSA 単独, $E_2 + P_4$, および同時投与のいずれにおいても形態学的変化を認めた (図1 E). Competitive RT-PCR によりその定量性を検討したところ, 卵巣ステロイド依存性のIGFBP-1ならびにPRL の発現誘導は, TSA 添加により濃度依存性かつ相乗的に増強された (図2 A - D). 腺細胞ではいずれの処理によっても形態変化およびIGFBP-1の発現は認めなかった.

2. 子宮内膜間質細胞においてTSA 添加によりどのヒストンがアセチル化されるかについてAUT gel 解析を行い検討した (図3 A). 未処理のHeLa 細胞より

抽出したヒストンでは, ヒストンアセチル化は認めなかった (レーン1). TSA100ng/ml にて8時間処理したHeLa 細胞より抽出したヒストンではアセチル化レベルの上昇を認めた (レーン2). 内膜間質細胞においては, TSA500ng/ml 単独および卵巣ステロイドとの同時添加により, H4のアセチル化レベルの上昇が認められた. さらに, Western blot により, どのリジン残基がアセチル化されているかについての検討を行った (図3 B・C). その結果, ヒストンH3およびH4の8番目のリジン残基が卵巣ステロイドによりアセチル化され, TSA の同時添加によりそのアセチル化は増強された.

3. 図4 Aは, PRE を含むヒトIGFBP-1遺伝子のプロモーター領域をシェーマ化したものである. ChIP アッセイの結果を図4 Bに示す. 領域IIを標的にした場合, 卵巣ステロイド無処理群 (レーン13) およびTSA 単独添加群 (レーン14) では増幅産物は得られなかったが, $E_2 + P_4$ 処理群では増幅産物を認め (レーン15), その量はTSA 同時添加により相乗的に増加した (レーン16). 一方, 領域Iを標的にした場合は, いずれの処置においても明らかなPCR 産物は得られなかった (レーン5~8). 卵巣ステロイド処置により, 間質細胞IGFBP-1プロモーターのプロゲステロン応答領域PRE のヒストンH4がアセチル化され, これはTSA により増強されることが示された.

以上より, TSA は, ヒストンアセチル化によるプロゲステロン作用の増強を通じて, 内膜間質細胞の分化を促進することが示され, 内膜分化にヒストンアセチル化が深く関与していることが明らかとなった.

本研究が, 子宮内膜由来疾患 (子宮内膜症, 子宮内膜癌, 子宮内膜機能不全による着床障害など) に対するヒストンアセチル化を標的にした治療薬の開発の手がかりとなることを願って止まない.

謝辞

本研究への多大な貢献に対し, 酒井のぞみ氏に深甚なる謝意を表します.