

ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程における Forkhead 転写因子の役割

梶原 健¹⁾, 末永 昭彦²⁾, Jan Brosens³⁾, 石原 理¹⁾

1) 埼玉医科大学産婦人科学教室

2) 埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

3) Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London

はじめに

脱落膜 (deciduas) とは妊娠の成立に伴い変化し、妊娠の終結に伴い胎盤とともに剥脱する子宮内膜組織の一部と定義される。また子宮内膜間質細胞が妊卵の着床に伴い形態学および機能的に分化をする過程を脱落膜化 (decidualization) といい [1, 2], この分化過程は絨毛細胞の浸潤, 胎盤形成に重要な役割を果たしていると考えられている [3]. 脱落膜化の形態学的特徴としては大型で敷石状の配列を示す上皮細胞様形態が挙げられ, 機能的特徴としてはステロイドホルモン受容体の発現, ステロイド代謝, 細胞骨格の再構成, 成長因子, サイトカイン, その受容体の発現の変化等が挙げられる [4-6]. ヒトなどの月経のある種において脱落膜化変化は胚の存在の有無に関係なく, 分泌期中期以降には子宮内膜の機能層において観察され, プロゲステロンの長期投与によっても脱落膜様変化 (偽脱落膜: pseudodecidua) と呼ばれる変化が観察される。またアポトーシスやプロゲステロンの低下 (withdrawal) による脱落膜化変化の喪失により子宮内膜機能層の剥離 (月経) は誘導されると考えられており, 脱落膜化は月経発来にとっても必要な過程であると考えられている。

脱落膜化の維持にはプロゲステロンが無論必要不可欠であるが, この過程の誘導にはcAMPの上昇とPKA経路の活性化・維持が必要であることが明らかとなっている [7-9]. 最近, われわれはヒト子宮内膜間質細胞においてcAMPによる脱落膜化誘導に伴いForkhead転写因子の1つであるFOXO1の発現が誘導されることを明らかにした [10]. 本稿では, その後の検討により筆者らのグループが明らかにしたヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化・月経発来制御に対するフォークヘッド転写因子

およびその標的遺伝子 (Bim) の役割について示す [11].

Forkhead 転写因子

FOXOとはForkhead (もしくはwinged-helix) と呼ばれる特徴的なDNA結合領域を有する転写因子群の1つであり, 哺乳類ではFOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHR-L1), FOXO4 (AFX), FOXO6の4種類が存在し, FOXO6を除く3つのForkhead転写因子は機能的にも高い相同性を有し, 共通の認識配列であるinsulin response sequenceに結合し, 標的遺伝子の発現を制御している。Forkhead転写因子は糖・脂質代謝, 細胞周期の制御, アポトーシス, 寿命・老化等に関連して重要な役割を果たしている [12]. またFOXO転写因子はPI3K/Akt経路におけるリン酸化標的の遺伝子であり, 通常は核内に局在し標的遺伝子のプロモーター領域に結合し, 標的遺伝子の発現を亢進させる。しかしインスリンなどのホルモンのシグナルが受容体を介して細胞内に伝達されると, 下流のPI3K/Akt経路が活性化され, 核内にあるFOXOの3ヶ所のセリン/スレオニン残基がリン酸化を受け [13], その結果14-3-3タンパクに結合しその局在が核から細胞質に変化することによりその転写活性を失うと考えられている (図1)。核内に存在し活性化されたフォークヘッド転写因子は細胞周期を制御す

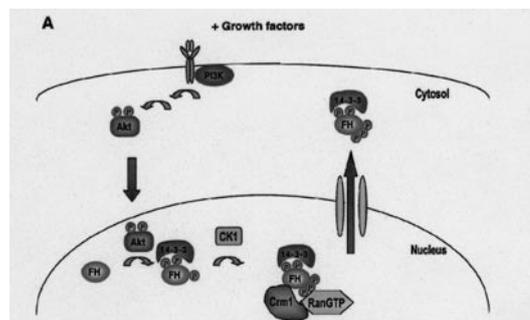


図1 フォークヘッド転写因子の制御機構 (Tran H, et al. Sci STKE. 2003 Mar 4 ; 2003(172): RE5.より引用)

連絡先: 梶原 健, 埼玉医科大学産婦人科学教室
〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38
TEL: 049-276-1347
FAX: 049-294-8305
E-mail: kajihara@saitama-med.ac.jp

るp27kip1 [14, 15], アポトーシス関連遺伝子であるBim, TRAILやFas Ligand [16-19], 酸化ストレス消去酵素であるMn-SODやcatalase [20-22], DNA損傷修復に関与する遺伝子であるGadd45 [23, 24]などの遺伝子群の発現を抑制することにより多彩な機能を発揮する。

ヒト子宮内膜組織におけるForkhead転写因子の発現

これまでに、われわれのグループは分離培養したヒト子宮内膜間質細胞 (HESCs) においてcAMP刺激によりフォークヘッド転写因子の1つであるFOXO1の発現が誘導されることを報告している [10]。今回われわれは脱落膜化刺激として0.5mM 8-br-cAMPと 10^{-6} M MPAを1日または3日間用いてHESCsの脱落膜化を誘導し、非脱落膜化HESCsと脱落膜化HESCsにおける各種フォークヘッド転写因子の発現について検討した (図2A, B)。その結果, 8-br-cAMPの刺激によりFOXO1のmRNAとタンパクは、共に以前の報告 [10] と同様に

誘導された。MPAと8-br-cAMPを同時添加することでFOXO1の発現はさらに増強された。一方MPA単独の刺激でFOXO1の発現は誘導されなかったが、FOXO3aの発現はmRNA, タンパク共に誘導された。しかし8-br-cAMPとMPAを同時添加するとFOXO3aの発現は逆に抑制された。FOXO1 および FOXO3aで並行するmRNAとタンパクの誘導と対照的にFOXO4の発現はmRNAレベルでは認められたが、ウェスタンブロットによる検討では認められなかった。

続いて月経周期各時期の子宮内膜組織 (in vivo) における各種フォークヘッド転写因子の検討を行った。その結果, 分泌中期にはFOXO1 mRNAの発現は増殖期の約4倍に増加しており, その増加したFOXO1 mRNAは分泌後期 (前月経期) まで維持されていた (図2C)。それに対しFOXO3a mRNAは増殖期~分泌期~前月経期に向かい減少していき, FOXO4 mRNAは月経周期において有意な変化はみられなかった (図2C)。免疫組織化学的検討では分泌期中期・後期の子宮内膜間質細胞にFOXO1の強い発現を認め, FOXO3aとFOXO4の発現は免疫組織化学的には子宮内膜組織には観察されなかった (図2D)。すなわち以上をまとめると, in vivo, in vitroのいずれにおいても, 子宮内膜間質細胞において, 脱落膜化に伴いFOXO1の発現が誘導されることが明らかとなった。

子宮内膜組織におけるBimの発現とその制御機構

次に子宮内膜組織におけるフォークヘッド転写因子の役割を明らかにするために、フォークヘッド転写因子の標的遺伝子でありpro-apoptotic因子として知られているBim [16, 17] の発現とその発現の制御機構について検討を試みた。

子宮内膜組織において、BimのmRNAは分泌期後期のみ発現の増加を認め (図3A), 免疫組織化学的にも同時期の子宮内膜に被覆腺上皮細胞とそれに隣接した間質細胞にBimの強い発現を認めた (図3B)。一方HESCsの培養系では、前述したFOXO1の発現と同様に8-br-cAMP刺激によりBimのmRNA, タンパク共にその発現は誘導されたが、MPAと8-br-cAMPによって同時に刺激を行うと、FOXO1の場合とは逆に、Bimの発現はmRNA, タンパク共に抑制された (図3C, D)。しかしこの条件でsiRNA法により選択的にFOXO1の発現を抑制したところ、Bimの発現も抑制され (図3E), HESCsにおいてFOXO1がBimの発現を制御していることが明らかとなった。

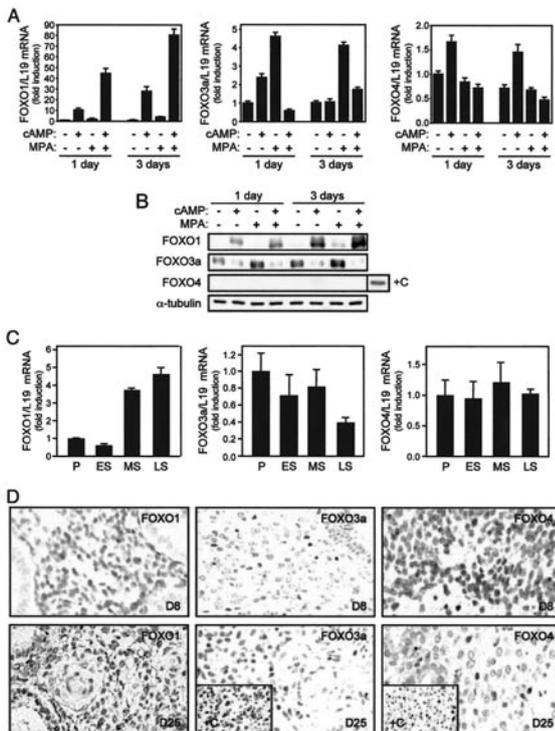


図2 ヒト子宮内膜におけるフォークヘッド転写因子の発現 (A) Real-Time PCR法による培養HESCsにおけるFOXO1, FOXO3a, FOXO4の発現 (B) 培養HESCsにおけるウェスタンブロット法による検討 (C) 子宮内膜組織 (in vivo) におけるReal-Time PCR法による検討 (D) 子宮内膜組織における免疫組織化学的検討 (文献11より引用)

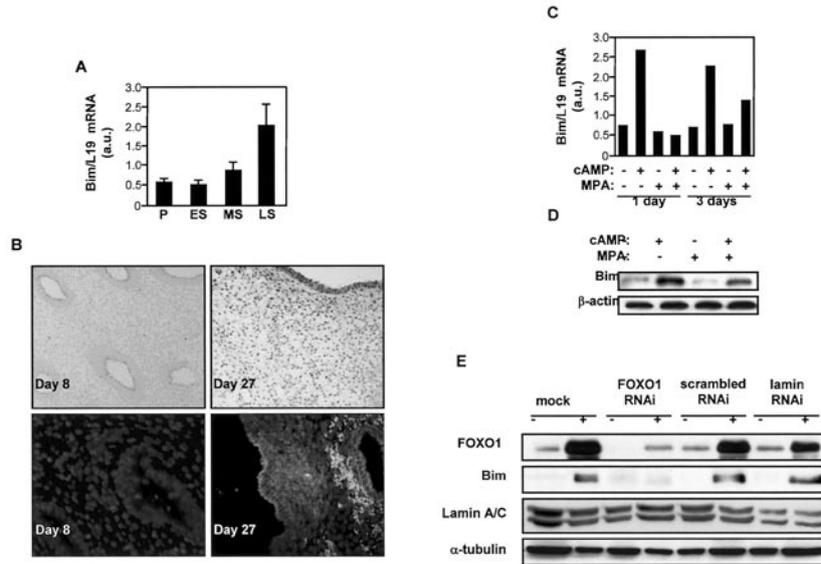


図3 ヒト子宮内膜におけるBimの発現とその制御 (A) Real-Time PCR法によるヒト子宮内膜組織の各性周期におけるBimの発現 (B) 免疫組織化学的に検討したヒト子宮内膜組織におけるBimの発現 (C) Real-Time PCR法により検討した各種刺激を行った培養系HESCsにおけるBim mRNAの発現 (D) 培養系HESCsにおけるウェスタンブロット法による検討 (E) siRNA法によりFOXO1の発現を選択的に抑制し、FOXO1, Bimの発現をウェスタンブロットにより検討 (文献11より引用)

前述したように、PI 3 K/Akt経路やその他の経路によりリン酸化されたフォークヘッド転写因子はその局在を核から細胞質に変化させその転写活性を失うことが知られている (図1)。そこでわれわれは、HESCsにおいて8-br-cAMPによって誘導されたFOXO1はMPAによってその局在を変化させるのではないかと考えた。図4AのようにHESCsにおいて8-br-cAMPによって誘導されたFOXO1の局在は主に核に認められたが、MPAを同時に添加するとFOXO1の局在は細胞質に移動した。次に抽出したタンパクを核と細胞質の分画に分けウェスタンブロットを行ったところ、8-br-cAMP単独の刺激では核にFOXO1を認めたが、8-br-cAMPとMPAを同時添加した場合、細胞質にリン酸化されたFOXO1が観察され、同時にリン酸化されたAktも誘導されていた (図4B)。一方、8-br-cAMPとMPAによって脱落膜化されたHESCsにPI 3 KのinhibitorであるLY294002を添加すると、AktとFOXO1のリン酸化は抑制された (図4C)。以上の結果より、MPAによって変化するFOXO1の局在の変化はPI 3 K/Akt経路を介していることが判明した。

月経発来におけるアポトーシスとFOXO1との関係

次いで月経発来モデルとしてHESCs培養系におけるプロゲステロンwithdrawalモデルを用い、脱落膜化・

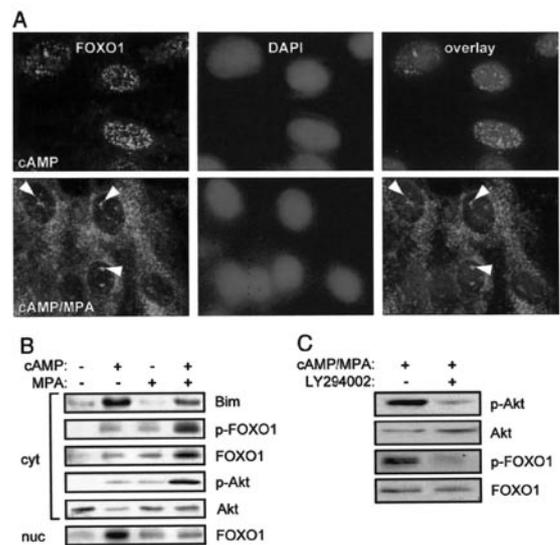


図4 プロゲステロン添加による脱落膜化したHESCsにおけるFOXO1のリン酸化と局在の変化 (A) 共焦点顕微鏡によって観察したFOXO1の局在の変化 (B) 細胞質と核の分画に分けBim, p-FOXO1, FOXO1, p-Akt, Aktの発現をウェスタンブロット法により検討 (C) PI3K inhibitor (LY294002) の影響をウェスタンブロットにより検討した (文献11より引用)

月経発来におけるアポトーシスとFOXO1との関連について検討を行った。8-br-cAMPとMPAを用いて3日間脱落膜化誘導後、その刺激を8-br-cAMP, MPAもしく

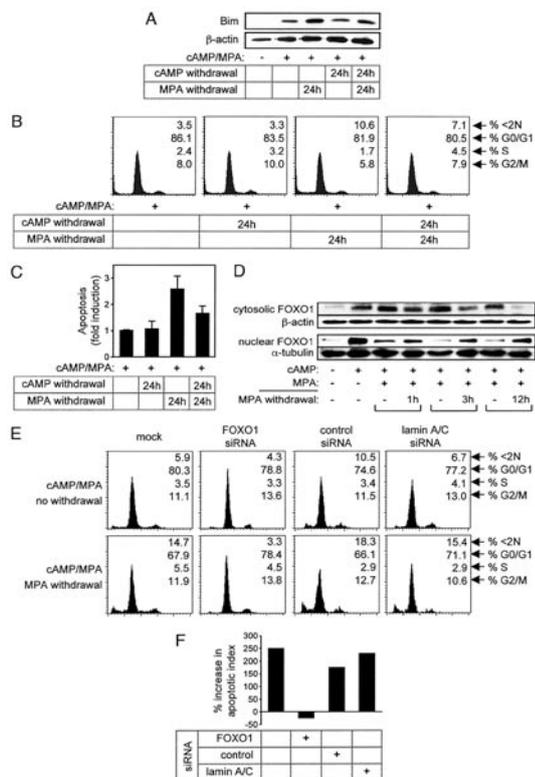


図5 脱落膜化したHESCsからプロゲステロンをwithdrawalすると核内にFOXO1が誘導されその結果アポトーシスが誘導された (A) ウェスタンブロット法により検討した8-br-cAMP, MPAをwithdrawalしたときのBimの発現 (B, C) FACScanによる8-br-cAMP, MPAをwithdrawalした場合のアポトーシスの発現 (D) MPAをwithdrawalした時の核, 細胞質内のFOXO1の発現をウェスタンブロットにより検討 (E, F) siRNA法によりFOXO1の発現を選択的に抑制した後にMPAをwithdrawalしたときのアポトーシスの発現 (文献11より引用)

はその両者を24時間中止 (withdrawal) したものをWithdrawalモデルとして用いて実験を行った。MPAを単独にwithdrawalした場合にpro-apototic因子であるBimの発現が強く誘導されたが、8-br-cAMPとMPAの両者をwithdrawalした場合はBimの発現はわずかに増強したのみであった (図5A)。FACScanを用いたflow cytometryの検討では、MPAを単独でwithdrawalした場合にのみアポトーシス細胞が多く観察されていた (図5B, C)。それに対して8-br-cAMPのみwithdrawalした場合にはアポトーシス細胞の増加は観察されず、8-br-cAMPとMPAの両者をwithdrawalした場合にはアポトーシス細胞はわずかに増加したのみであった。またMPAをwithdrawalすると1~12時間の間に時間依存性にFOXO1は核内に誘導され、それに伴い細胞質内のFOXO1は減少しているのが観察された (図4D)。siRNA法によりFOXO1の発現を選択的に抑制するとMPAのwithdrawalにより誘導されたアポトーシス細胞

の発現が抑制された (図5E, F)。以上のことより脱落膜化したHESCsよりMPAをwithdrawalするとFOXO1が核内に誘導され、そのFOXO1によりproapotic因子であるBimの発現が亢進し、その結果アポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

まとめ

今回の検討によりHESCsでは脱落膜化に伴いフォークヘッド転写因子の1つであるFOXO1が誘導され、プロゲステロンはそのFOXO1の局在を変化させることによりsurvival因子として働き、ヒト子宮内膜の脱落膜化・月経発来に関与していることが明らかとなった。最近、われわれは脱落膜化したHESCsは酸化ストレスに対して強い抵抗性を有し、その耐性獲得メカニズムにFOXO1が関与していることも明らかにした [25]。このようにフォークヘッド転写因子は子宮内膜の脱落膜化機構において多彩な機能を発揮し重要な役割を果たしていると考えられる。今後のさらなる研究により正常の脱落膜化機構へのフォークヘッド転写因の役割を明らかにすることは、流産、PIH, IUGRなどの脱落膜化のdefectとの関与が指摘されている病態の解明の一助になることが期待される。

文献

- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA (2002) The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies : a view of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 187, 1416-1423.
- Finn CA (1998) Menstruation : a nonadaptive consequence of uterine evolution. *Q Rev Biol* 73, 163-173.
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25, 341-373.
- Oliver C, Cowdrey N, Abadia-Molina AC, Olivares EG (1999) Antigen phenotype of cultured deciduas stromal cells of human term deciduas. *J Reprod Immunol* 45, 19-30.
- Popovici RM, Kao LC, Giudice LC (2000) Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 141, 3510-3513.
- Brar AK, Handwerger S, Kessler CA, Aronow BJ (2001) Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol Genomics* 7, 135-148.
- Telgmann R, Maronde E, Tasken K, Gellersen B (1997) Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidua prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 138, 929-937.
- Brosens JJ, Hayashi N, White JO (1999) Progesterone re-

- ceptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 140, 4809-4820.
9. Gellersen B, Brosens JJ (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium : a decidualizing affair. *Endocrinology* 178, 357-372.
 10. Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, Unterman TG, Gellersen B, White JO, Brosens JJ (2002) Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein in differentiating human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* 277, 20825-20832.
 11. Labied S, Kajihara T, Madureira PA, Fusi L, Jones MC, Higham JM, Varshochi R, Francis JM, Zoumpoulidou G, Es-safi A, Fernandez de Mattos S, Lam EW, Brosens JJ (2006) Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol Endocrinol* 20, 35-44.
 12. Accili D, Arden KC (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117, 421-426.
 13. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
 14. Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000) Forkhead transcription factor FKHR-1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27 (KIP1). *Mol Cell Biol* 20, 9138-9148.
 15. Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
 16. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10, 1201-1204.
 17. Sunters A, Fernandez de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC, Lam EW (2003) FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 278, 49795-49805.
 18. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* 277, 47928-47937.
 19. Suhara T, Kim HS, Kirshenbaum LA, Walsh K (2002) Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression : involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol* 22, 680-691.
 20. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.
 21. Nemoto S, Finkel T (2002) Rodex regulation of Forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295, 2450-2452.
 22. Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo J* 23, 4802-4812.
 23. Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ, Jr., DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 proteins. *Science* 296, 530-534.
 24. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
 25. Kajihara T, Jones M, Fusi L, Takano M, Feroze-Zaidi F, Pirianov G, Mehmet H, Ishihara O, Higham JM, Lam EW, Brosens JJ (2006) Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Mol Endocrinol* (in press)