論文の内容の要旨

論文題目　転写因子 SIRT1 および HAND2 の着床機序への関与についての分子的解明

氏名白根　晃

１）緒言および目的

胚は分割を継続しながら子宮内腔に到達し胚盤胞を形成する。胚盤胞と子宮内膜上皮は、相互作用しながら相互の細胞の接着と分化が調整され、最終的に胚盤胞が子宮内膜間質へと侵入することで着床が成立する。ヒトの場合、子宮内膜は排卵後 6 日目前後に着床可能となり、それから約4日間 (implantation window) 受容性を維持する。この期間は子宮内膜からの成長因子、サイトカインや接着因子といった着床特異的タンパクの発現が増加する。また、卵巣から分泌されるエストロゲンと黄体ホルモンは、子宮内膜の増殖と分化制御に重要であり着床に重要な役割を担っている。近年 implantation window において転写因子が着床関連遺伝子の発現制御に重要であることが明らかとなってきており、今回我々は２つの転写因子に着目した。

SIRT1 は NAD 依存性 class III ヒストン脱アセチル化酵素として機能し、核内に局在する転写因子としても作用する。SIRT1 が子宮内膜に発現すること、着床過程に重要な接着分子 E-cadherin の発現が SIRT1 により制御される可能性が示唆されていたことから、SIRT1 と着床との関連について検討した。

HAND2 は basic Helix-Loop-Helix の構造を有する転写因子であり、黄体ホルモンにより子宮内膜間質において発現誘導されることと、HAND2 が、エストロゲンの細胞増殖促進効果に対し抑制的に作用することで子宮内膜の着床能に関与するとの既報を受け、HAND2 のエストロゲン受容体 ER に対する分子制御機構について検討した。

２）材料と方法

ウェスタンブロッティング

SIRT1 機能を賦活化する Resveratrol、AICAR、抑制する Sirtinol、Nicotinamide をヒト子宮内膜癌上皮細胞株の培養液に添加した。内在性 SIRT1 を siRNA 法でノックダウンした。pcDNA Flag SIRT1 をリポフェクション法で強制発現させること、および内在性 SIRT1 の siRNA 法によるノックダウンにより得られた細胞抽出液を、特異的抗体を用いてウェスタンブロッティングで SIRT1 による接着分子 E-cadherin 発現への影響を検討した。

免疫沈降法

内在性 ERα/HAND2 複合体の形成をみるために、MCF-7 細胞の細胞抽出液を用いた。細胞を

回収後、細胞溶解液を各々の特異的抗体を用いて免疫複合体を形成させ、Protein G Sepharose Fast Flow と混和し免疫複合体を精製した。ビーズは前者後者ともに洗浄した後に SDS-PAGE で泳動され、ウェスタンブロッティングに供された。

GST pull down assay

発現ベクターpcDNA3 にサブクローンされた HAND2 を用いて、[^{35}S] methionine 標識タンパクを発現させた。ERα AF-1 および ERα AF-2 を大腸菌内のタンパク発現ベクターに組み込み、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパクとしてタンパク発現誘導を行いアフィニティーカラムとして使用した。GST 融合タンパクと標識タンパクを低温下にインキュベートし、GST 融合タンパクに結合した標識タンパクを SDS-PAGE で泳動し、バンドを解析した。

ルシフェラーゼ活性測定

293T 細胞培地に SIRT1 活性物質を添加し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子、internal control 用ベクター、pM ベクター、発現ベクターをトランスフェクションし、細胞を回収後 Firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率是正のため Renilla luciferase 活性も測定した。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

細胞の可溶性クロマチン画分を 1.5%フォルムアルデヒドで架橋化し、超音波破砕することでクロマチンの断片化を行った。特異的抗体で免疫複合体を形成させ、DNA 飽和した Protein G Sepharose Fast Flow と混和し免疫複合体を精製した。ビーズからタンパク・クロマチン複合体を溶出し、脱架橋化を行い得られた DNA 断片に対し PCR 反応を行った。

In vitro implantation assay

着床モデルとして、絨毛癌細胞株 JAR の細胞塊 spheroid（胚モデル）と子宮内膜癌細胞株 Ishikawa のコンフルエントになった状態での細胞シート（子宮内膜上皮モデル）の共培養系を用いて、SIRT1 発現および SIRT1 調節因子が着床に及ぼす影響について細胞塊接着能を定量化することで検討した。

3）結果

接着分子 E-cadherin の発現は SIRT1 および SIRT1 活性物質により正に制御される

SIRT1 は接着分子 E-cadherin のプロモーター領域に結合することにより、E-cadherin 発現を正に制御することを、クロマチン免疫沈降法およびルシフェラーゼアッセイによって示した。SIRT1 の強制発現により E-cadherin 発現が増加すること、内在性 SIRT1 の siRNA 法によるノックダウンにより E-cadherin 発現が減少することをウェスタンブロッティング法にて示した。同時に SIRT1 活性を促進する Resveratrol および AICAR により E-cadherin 発現は増加し、SIRT1 活性を抑制する Sirtinol および Nicotinamide により E-cadherin 発現が減少することを示した。

In vitro における SIRT1 発現および活性化が着床に及ぼす影響についての検討

着床モデルとして絨毛癌細胞株の細胞塊 spheroid（胚モデル）と子宮内膜癌細胞株のシート（子宮内膜上皮モデル）の共培養系を用いて、SIRT1 発現および活性と着床能（細胞塊の接着数）との相関を検討したところ、両者は正の相関を示した。

HAND2とERαとの相互作用の検討

HAND2はERαと細胞内において内在性複合体を形成することを免疫沈降法で示した。またERαのAF-1領域とHAND2が直接結合することを、GST pull down法にて示した。

ERαのエストロゲン依存性転写活性化能に対するHAND2の転写調節機序の解明

ERαのエストロゲン依存性転写活性化能はHAND2の強制発現により用量依存性に抑制された。HAND2はERαのAF-1活性を抑制したが、ERαのAF-2活性を抑制しなかった。HAND2の強制発現によりERαの発現が減少していたことから、HAND発現によりERαがユビキチン化されることでERαの分解が促進され、結果としてERαのエストロゲン依存性転写活性が抑制されるという新規機序を見出した。

4）考察

本研究で SIRT1 の活性及び発現が接着因子 E-cadherin の活性及び発現を正に制御していること、また、SIRT1 の活性化物質である Resveratrol により濃度依存的に E-cadherin の発現が増えることを示した。更に、SIRT1 の活性及び発現と接着細胞塊に正の相関をみとめた。これらの結果より SIRT1 を活性化させる、または発現を促進すると、細胞接着分子 E-cadherin の発現誘導を介した着床促進効果があるものと考えられた。SIRT1 は脱アセチル化タンパクとして重要な役割を担うことが知られているが、転写因子としての作用があることも知られている。今回我々は、SIRT1 が E-cadherin プロモーター上に存在することで、E-cadherin 発現を調節する新規機能を持つことを明らかにした。これらの分子生物学的機序が着床環境整備に重要である可能性が考えられた。さらに内在性の SIRT1 結合因子や SIRT1 機能調整薬などが着床能を制御し、不妊症の一因と考えられる着床不全の新規の分子標的治療に寄与する可能性が考えられた。

また、本研究では ERα が細胞内で HAND2 と複合体を形成し、HAND2 は ERα AF-1 領域と直接結合すること、HAND2 は ERα のエストロゲン依存性転写活性を抑制していることを明らかにした。また、HAND2 の存在下で ERα のタンパク発現が減少することを示し、HAND の強制発現で ERα のユビキチン化が亢進していたことから、HAND2 はユビキチンープロテアソーム系を誘導することで ERα の分解を促進し、ERα による子宮内膜の増殖作用を抑制し、脱落膜化という分化機能を促進している可能性が示唆された。この結果は、HAND2 の着床促進機能の一端をさらに明らかにしたが、HAND2 が着床のマーカーとしてだけでなく、ERα による子宮内膜の異常増殖を起こす他の病態、すなわち子宮内膜増殖症や子宮内膜癌の病態や病因を考えるうえで

鍵となる可能性を示唆しているものと考えられる。