

博士論文

子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞における  
プロゲステロン応答遺伝子の探索と同定

齋藤 真由子

子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞における  
プロゲステロン応答遺伝子の探索と同定

所属 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員 藤井 知行 教授

齋藤 真由子

# 目次

略語一覧	4
要旨	5
序文	6
目的	20
方法	21
1. Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞株の樹立	21
2. Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞を用いた P4 応答遺伝子の探索	27
3. Database 上での PRE の探索	30
4. レポーターアッセイを用いた PR 応答遺伝子転写制御機構の探索	31
5. クロマチン免疫沈降法を用いた PR 応答遺伝子転写制御機構の探索	32
6. 統計学的検定について	34
結果	35
1. Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞株の樹立確認	35
2. Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞を用いた P4 応答遺伝子の同定	38
3. TRIM22 に関する検討	44
4. Database 上での PRE の探索	48

5. レポーターアッセイによる TRIM22 PRE 領域の	
P4 依存性エンハンサー活性の検討	50
6. クロマチン免疫沈降法による PR の PRE への結合の検討	53
考察	55
謝辞	65
引用文献	66

## 略語一覽

ATCC	American Type Culture Collection
BUS	B upstream segment
CHX	Cycloheximide
dcc	dextran-coated charcoal
DEX	Dexamethazone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNG	Dienogest
DRSP	Drospirenon
E2	Estrogen
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FKBP51	FK506-binding protein 51 kDa
FSH	Follicle stimulating hormone
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HRP	Horseradish peroxidase
IGFBP-1	Insulin-like growth factor-binding protein-1
IP	Immunoprecipitation
LH	Luteinizing hormone
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MPA	Medroxyprogesterone acetate
P4	Progesterone
PBS	Phosphate buffered saline
PR	Progesterone receptor
PRBS	Progesterone receptor binding site
PRE	Progesterone responsive element
pRL	promoter-renilla luciferase
PVDF	Poly vinylidene difluoride
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris buffered saline with tween 20

## 要旨

子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞を用いて Progesterone Receptor (PR) 安定発現細胞株を作成した。PR を介した応答遺伝子群をマイクロアレイ法を用いて網羅的に探索し、プロゲステロン応答遺伝子の候補を 15 遺伝子同定した。

15 遺伝子のうち特に TRIM22 遺伝子に着目し、データベースサーチにより Progesterone Responsive Element (PRE) の位置を予測した。同部位にプロゲステロン存在下で PR が結合することをクロマチン免疫沈降法で確認した。また、レポーターアッセイを用いて、同部位が PR を介した P4 依存性のエンハンサー活性を持つことを確認した。以上の結果から、TRIM22 遺伝子が子宮においてプロゲステロン応答性を有し、プロゲステロンの作用に関与する可能性を示した。

## 序文

### はじめに

プロゲステロン (Progesterone; P4) は、代表的な女性ホルモンの一つであり、乳腺の発達や子宮内膜の分泌期様変化などを引き起こすことで知られている。不妊症、子宮内膜癌、月経異常の治療や避妊薬としても使用されており、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。

### プロゲステロンの歴史

P4 は主に成人女性の卵巣黄体から分泌される女性ホルモンである。妊娠後期の胎盤からも分泌され、微量ではあるが副腎皮質からの分泌も知られている。P4 発見の契機は、1903 年 Fraenkel が家兎の妊娠中の黄体を除去すると流産が起こることにより、黄体には妊娠を維持する内分泌機能を有するという学説を唱えたことによる [1]。1928 年に Corner と Allen は、黄体より抽出した物質を黄体除去した妊娠家兎に投与すると妊娠が継続することを見出した。彼らはこの物質を妊娠維持に関係するホルモン (Gestation-promoting hormone) という意味から、プロゲスチンと名付けた [1]。1934 年に Butenand は、プロゲスチンを純化し、それをプロゲステロンと命名した。1951 年には、経口避妊薬として繁用されているプロゲステロン作用を持つ物質であるノルエチス

テロンが合成された [1]。P4 はエストロゲン (Estrogen; E2) やアンドロゲンと異なり、女性・男性というフェノタイプの獲得にとって決定的な因子ではなく、P4 が欠落しても個体の維持や性徴には何ら影響を及ぼさない [1]。しかし、P4 なくしては妊娠の成立・維持は不可能であり、プロゲステロンは胎生動物の生命の誕生に不可欠なホルモンである。

現代では一般的にプロゲステロン作用を持つ物質を総称してプロゲスチンと呼ぶが、長年にわたり薬剤としても 200 種類以上ものプロゲスチンが開発されてきている。プロゲスチンの中にはアンドロゲン活性やエストロゲン活性を持つものもある一方で、抗アンドロゲン作用・抗エストロゲン作用を持つものも存在し、その作用は多岐にわたりかつ、複雑さを極める。プロゲステロンは錠剤として経口投与されると、腸管からの吸収後に肝臓で大部分が急速に代謝され、ほとんど効果を発揮しない。そのため、体外受精・胚移植において P4 を補充する目的で使用される場合には経膣投与されることが多い。一方、経口剤としては人工的に合成されたプロゲスチンが使用されており、子宮内膜癌、子宮内膜症、月経異常の治療や避妊薬として用いられる。代表的なプロゲスチンとしては、酢酸メドロキシプロゲステロン酢酸エステル (Medroxyprogesterone acetate; MPA) とジエノゲスト (Dienogest; DNG)、ドロスピレノン (Drospirenon; DRSP) が挙げられ、MPA は子宮内膜癌の治療に、DNG は子宮内膜症の治療に、DRSP は月経困難症の治療に用いられる [2]。



## プロゲステロンの構造と分泌様式

プロゲステロンの国際純正応用化学連合名は **Pregn-4-ene-3, 20-dione** であり、**P4** と略される。プロゲステロンは前駆体であるプレグネノロンから産生され、3 つのシクロヘキサン環と 1 つのシクロペンタン環から成る 4 縮合環炭素構造からなるステロイド骨格を持つ。4 位の二重結合、3 位と 20 位の酸素原子の存在のためにこの名称となった (図 1A)。血中の LDL コレステロールから、**P450scc** を介してプレグネノロンが産生され、**P450c17** を介して **17-OH プレグネノロン** となり、**3 $\beta$ -HSD** を介して **17-OH プロゲステロン** となる。最終的には肝臓で代謝され、プレグナンジオールとなり尿中に排泄される。また、同じステロイドホルモンの合成経路でエストロゲンやテストステロン・コルチゾールも合成されることとなる (図 1B)。

プロゲステロン分泌をつかさどる主な内分泌器官は卵巣であり、卵巣からの分泌を制御しているのは下垂体前葉から分泌される **LH (Luteinizing hormone)** および **FSH (Follicle stimulating hormone)** である。また、下垂体からの **LH/FSH** の分泌を制御しているのは視床下部からの **GnRH (Gonadotropin releasing hormone)** であり、これは **E2** による **feedback** 機構により調節されている (図 1C)。プロゲステロンの分泌は月経周期において周期的な変化を示し (図 2A)、卵巣からの **E2** 分泌がピークに達すると、下垂体前葉からの **LH** 分泌の急上昇が起こり、排卵が惹起され、同時に卵胞の

黄体化がおこる。黄体化した卵巣の夾膜細胞と顆粒膜細胞から P4 の分泌が始まる。

わずかではあるが、卵胞期には卵胞からも産生されることが知られている [3]。



## 黄体機能不全

黄体は、卵巣実質にて卵胞の発育・成熟・排卵という現象を経て形成され、P4 と E2 を分泌しているが、その過程に異常があればホルモン分泌に異常をきたすこととなる。黄体機能不全の原因として明らかなものとしては高プロラクチン血症があり、原因の約 30 % を占めるといわれている。黄体機能不全をきたしても身体症状としては高温相が 10 日以下に短縮する程度であるが、挙児希望のある場合は不妊症・習慣流産の原因となることが分かっている。黄体機能不全に伴う不妊症の診断がつけば、治療として排卵誘発剤による卵胞発育促進や hCG による黄体賦活療法もしくはプロゲステロン製剤による黄体ホルモン補充療法 (luteal phase support) が行われる [4]。

## プロゲステロンの生物学的作用

プロゲステロンの生物学的作用については複数知られている。プロゲステロンは乳腺の発達や体温上昇に関わり、血糖値を正常にして体脂肪を減少し、利尿作用がある。他に、エストロゲンやアンドロゲンのバランスを調整する役目をもつとされるが、なかでも主要な生理作用は子宮を標的臓器とした作用であり、妊娠の成立・維持、子宮内膜の脱落膜化、子宮内膜癌・子宮内膜症の増殖の抑制、子宮筋のオキシトシンに対する感受性低下などである。プロゲステロンが女性の精神的なバランスや睡眠・片頭痛などと

関連が深いといわれている点も興味深い [5]。

子宮内膜の脱落膜化とは、子宮内膜の構成成分である間質細胞が形態学および機能的に変化し、大型で敷石状の配列を呈し、様々な生理活性物質の産生能を有する細胞に分化することである。妊娠の成立過程において、卵子と精子が受精後に 5 日間程度経過した受精卵は胚盤胞と呼ばれ、脱落膜化した子宮内膜に進入し、胎生動物の生命の起点となる（着床）。脱落膜化の生理学的意義は、様々な生理活性物質の産生や細胞間相互作用を通じて、着床とそれに続く絨毛の発育・侵入および胎盤の形成・維持ならびに機能発現を制御することにある。子宮内膜への胚の着床には胚の発育と子宮内膜の変化が同調する必要があり、特に子宮内膜には“implantation window”と呼ばれる一定の胚受容期間が存在し、子宮はこの限られた時期にのみ胚を受け入れ着床が成立する [6]。月経周期は、月経期、増殖期（卵胞期）、分泌期（黄体期）に分けられるが、この“implantation window”は分泌期中期に位置し、排卵後 5~7 日目にあたるとされる（図 2B）。排卵後、卵巣から分泌される P4 の増加により、E2 でプライミングされたヒト子宮内膜は、着床と妊娠の維持に必要な組織の再構築、すなわち、らせん血管の増生、分泌腺の変化、免疫細胞の流入を示し、それに引き続いて分泌期中期以降では間質細胞の脱落膜様変化を認める。分泌期中期の子宮内膜上皮細胞でも、形態学および機能的変化が起こり、この時期に特異的な蛋白質が分泌される。脱落膜化を誘導する物質として P4 が臨床的にも実験的にも必須であ

ることが証明されており、いくつかの脱落膜化に特異的な遺伝子、IGFBP-1 (Insulin-like growth factor binding protein 1) や BMP-7、FOXO1 などの発現誘導はプロゲステロン受容体 (Progesterone receptor; PR) の直接的な転写調節によって起こることが知られている [7]。

PR は子宮内膜上皮細胞と間質細胞で発現様式が異なり、上皮細胞での PR 発現は増殖期から排卵期に最も多く、分泌期は増殖期と比較して PR の発現が減弱している。他方、間質細胞では増殖期から PR の発現は増加し始めるが、その発現は分泌期中期つまり着床時期においても保たれている。この時期に卵巣で産生される P4 はピークとなる。また、ヒト子宮内膜には複数の転写共役因子が存在し、それらが PR に作用することにより遺伝子の調節に関与している。

また、乳がんにおいては、癌組織の ER (+) PR (+) の有無により、治療戦略が異なることもよく知られている。ER(+) の場合は、抗エストロゲン薬であるタモキシフェンや LH-RH アゴニスト・アロマトラーゼ阻害剤などを用いた内分泌療法が選択される。

### プロゲステロンの分子的作用機序

P4 は PR を介してその作用を発揮する。PR は核内受容体スーパーファミリーに属しており、リガンド依存性転写因子である [8]。P4 は血中から細胞に入ると、細胞内に存在する PR に結合して複合体を形成する。この複合体は核内の DNA 上のプロ

ゲステロン応答配列 (Progesterone responsive element; PRE) に結合し、応答遺伝子の発現調節を行うことでその作用を示す (図 3A)。

この作用機序においてはエストロゲンとプロゲステロンは同様であるが、現在までに知られているエストロゲン応答遺伝子は多数ある。Efp (Estrogen-responsive finger protein)、PRL (prolactin)、pS2、c-fos、cox7RP、FOXP1 など 1 次応答遺伝子だけで 100 近い遺伝子が報告されており、2 次応答遺伝子なども含むと、全身で多数の遺伝子発現がエストロゲンにより調整されている。また、PR もエストロゲン応答遺伝子であることが知られている。

一方、現在までに知られているプロゲステロン応答遺伝子は多くなく、FKBP51 (FK506-binding protein 51kDa)、Calcitonin、CRH (Corticotrophin-releasing hormone)、IGFBP-1、PTGER2 (Prostaglandin E receptor 2) などいくつかの遺伝子が報告されているのみで、その作用機序につき徐々に解明がなされているところである [9-13]。

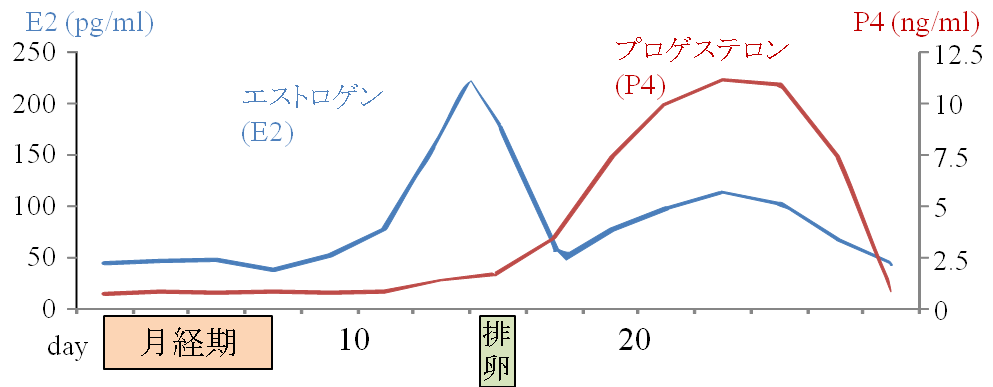
PR には PR-A と PR-B の 2 つのアイソフォームが存在する。PR-A は分子量 81 kDa、PR-B は分子量 116 kDa である (図 3 B)。これらのアイソフォームは同一遺伝子の異なるプロモーターから転写される。PR-A は、完全長である PR-B の N 末端に位置する 164 個のアミノ酸が欠損したアイソフォーム (splicing variant) である。遺伝子のヒトとマウスでの相同性は PR-A は 75 %、PR-B は 73 % と高く、全身に発現していることも同様であり、ほぼ同じ機能を担っていると考えられている。過去の動物実

験を用いた報告によると、PR-A 欠損マウスの雌では排卵・脱落膜化・着床が障害され、不妊を呈する [14] (表 1)。一方、PR-B 欠損マウスの雌では排卵・脱落膜化・着床に障害は生じず、不妊を呈さないものの、乳腺の発育障害が起こることが知られている [15] (表 1)。



図 2

A



B

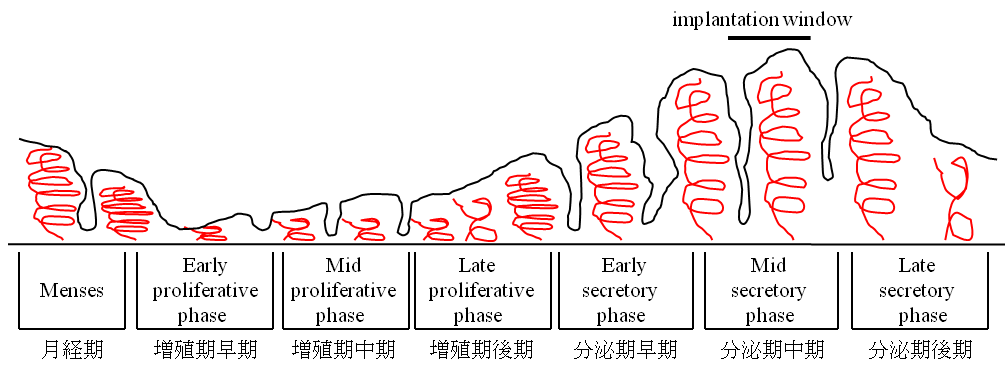


図 2 A ヒト月経周期におけるホルモン合成の変化

プロゲステロンならびにエストロゲンの分泌は月経周期において周期的な変化を示す。

B ヒト月経周期における子宮内膜の変化

月経周期は、月経期、増殖期(卵胞期)、分泌期(黄体期)に分けられるが、この“implantation window”は分泌期中期に位置し、排卵後5～7日目にあたる。

図 3

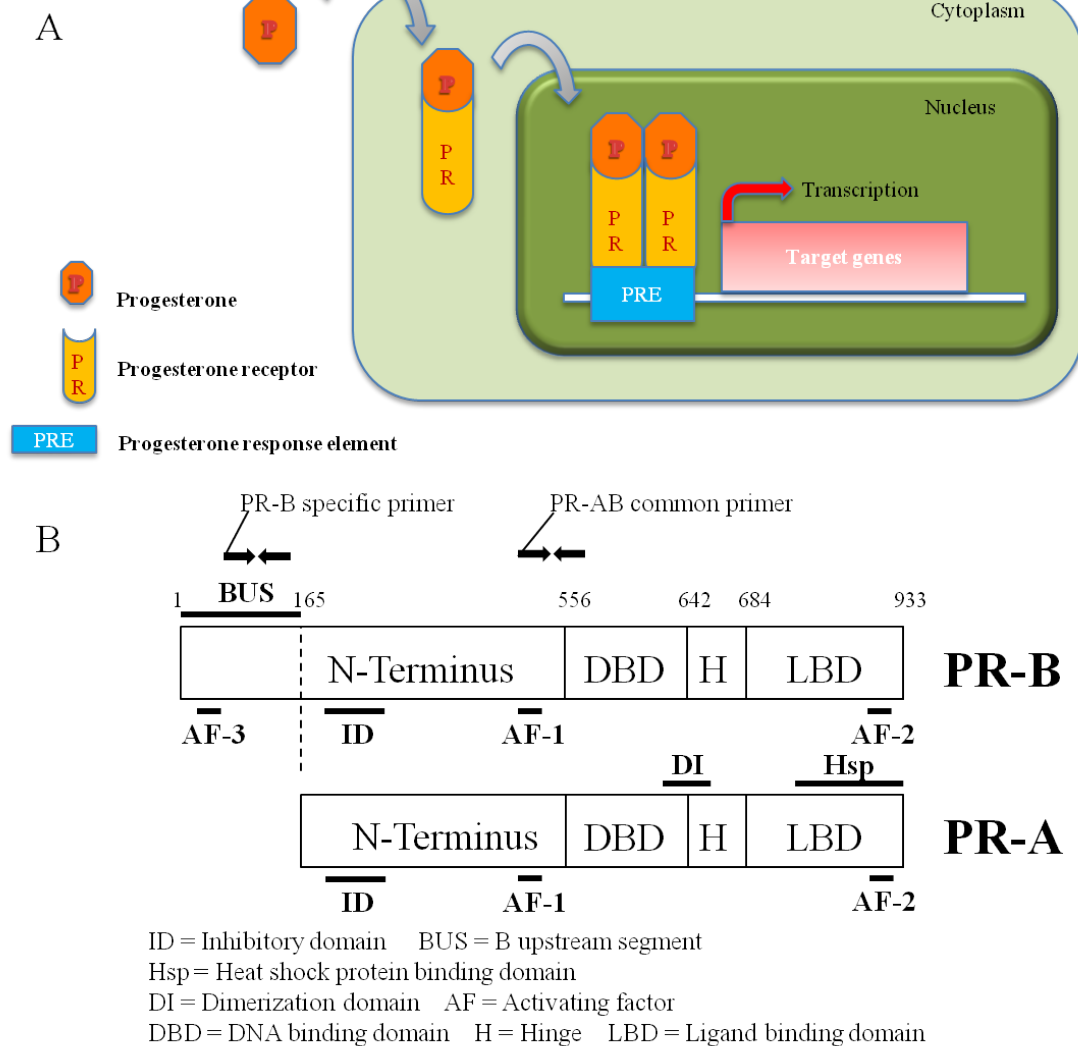


図 3 A プログステロン受容体を介したプロゲステロンの作用機序  
P4 は血中から細胞に入ると、細胞内に存在する PR に結合して複合体を形成する。この複合体は核内の DNA 上のプロゲステロン応答配列に結合し、応答遺伝子の発現調節を行うことでその作用を示す。

B プログステロン受容体の構造  
PR には PR-A と PR-B の 2 つのアイソフォームが存在し、PR-A は分子量 81 kDa、PR-B は分子量 116 kDa である。これらのアイソフォームは同一遺伝子の異なるプロモーターから転写される。PR-A は、完全長である PR-B の N 末端に位置する 164 個のアミノ酸が欠損したアイソフォーム (splicing variant) である。また、PR-A と PR-B の共通部分を認識する特異的なプライマーとして PR-AB common primer を、PR-B の B upstream segment (BUS) を認識する特異的なプライマーとして PR-B specific primer を作成し、定量的 RT-PCR に用いた。

表 1 プロゲステロン受容体ノックアウトマウスの表現型

	乳腺	子宮
<b>PR-A KO mouse</b>	明らかな形態、機能の変化を認めない。	子宮内膜間質細胞の脱落膜化が阻害されることによる着床障害により、不妊を呈する。 受精卵の受容能に関与する上皮の調整に破綻をもたらす [14]。
<b>PR-B KO mouse</b>	乳腺の管形成・腺房形成が減少する [15]。	明らかな形態、機能の変化を認めない。

### ***Ishikawa* 細胞について**

*Ishikawa* 細胞は、1985 年に筑波大学の西田氏によって作成された、子宮内膜腺癌由来の細胞株である。39 歳の子宮がん患者の女性からえた細胞であり、単層シート状に配列して増殖し、容易に重積する [16]。*Ishikawa* 細胞からはエストロゲンレセプター・プロゲステロンレセプターが共に陽性に検出されるが、培養開始後継代回数が増えることにより、発現減少してしまうことがわかっている。今回使用した *Ishikawa* 細胞では、内因性のプロゲステロンレセプターの存在を qPCR 法にて確認できたものの、やはり発現減少していた。そのため、この細胞株のみでは機能解析を行うのに十分ではないと判断し、プロゲステロンレセプターの安定発現細胞株の樹立を行うこととした。

## 目的

プロゲステロンは、妊娠の成立・維持にとって重要なホルモンであるが、エストロゲンやアンドロゲンなどのその他の性ステロイドホルモンに比して、その作用メカニズムはいまだ未知の点が多く、PR を介した生体内での分子生物学的な遺伝子制御機構（プロゲステロン応答遺伝子とその制御機構）は十分には解明されていない。

そこで、子宮におけるプロゲステロン応答遺伝子とその制御機構を解明することを目的に、子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞を用いて PR を介した応答遺伝子群を網羅的に探索し、その転写制御機構についての研究を行った。

特に本研究では、将来的な不妊治療への取り組みを視野に入れて、妊娠に重要な役割を担っていると考えられる PR-A を主体に実験を行った。

## 方法

### 1. Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株の樹立

#### 1-1 細胞培養

子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞を ATCC (American Type Culture Collection) から購入した。10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) および 100 U/ml Penicillin G 0.1 mg/ml Streptomycin sulfate (Life technologies, Tokyo, Japan) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Sigma, Tokyo, Japan) を培地として使用した。5% CO<sub>2</sub>、37 °C にて培養した。Ishikawa 細胞を直径 10 cm の細胞培養用ディッシュ (ASAHI GLASS, Tokyo, Japan) に細胞数を  $1 \times 10^6$  /well として 24 時間培養した。細胞数のカウントは Burker-turk 細胞数計測盤 (ERMA, Tokyo) を用いた。

#### 1-2 一過性遺伝子導入

OPTI-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium 1x (Life technologies) に培養液を交換し、ネオマイシン耐性遺伝子を保有する pcDNA3 ベクター、pcDNA3-FLAG-PR-A 発現ベクターのそれぞれを、FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Roche Diagnostics,

Mannheim, Germany) を用いたリポフェクション法による一過性遺伝子導入により Ishikawa 細胞に過剰発現させた。一過性遺伝子導入開始から 24 時間後にネオマイシン (Geneticin Disulfate Solution; G418) (Life technologies) 800 µg/ml の濃度で 10% FBS を含む DMEM/F12 で培養した。ネオマイシンを含む培養液中で直径 10 cm の細胞培養用ディッシュ上に発育してきたコロニーを採取し、24 well プレート、6 well プレート、直径 10 cm の細胞培養用ディッシュの順に発育させた。上記の実験により、Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株と Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞株 (vector 細胞株=> negative control) の候補を得た。作成した細胞株を継代し、凍結保存した。

同様にして、Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞株も作成した。

### 1-3 qRT-PCR 法による PR-A mRNA の発現量の確認

上記により得られた細胞を、直径 10 cm の細胞培養用ディッシュで培養し、ISOGEN (NIPPON Gene, Tokyo, Japan) 1ml を用いて細胞回収を行った。プロトコールに従い Total RNA を抽出し、500 ng の Total RNA より PrimeScript<sup>®</sup> Reverse Transcriptase (TaKaRa Bio, Tokyo, Japan) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に KAPA SYBR Fast PCR Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) ならびに StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems (Life technologies) を用いて、

定量的 RT-PCR 法 (quantitative real-time polymerase chain reaction; qRT-PCR) を行った。前述の通り、PR-A は、PR-B の N 末端を一部欠いた配列であるため、PR-B を認識せず PR-A のみを認識する primer は作成不可能である。そのため、PR-A と PR-B の共通部分を認識する特異的なプライマーとして PR-AB common primer を、PR-B の B upstream segment (BUS) を認識する特異的なプライマーとして PR-B specific primer を作成して使用した (図 3B)。また、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロール遺伝子として補正のために用いた。

#### 1-4 免疫沈降 (Immunoprecipitation; IP) を用いた Western blot 法による PR-A の発現量の確認

qRT-PCR 法で PR-A mRNA の発現が確認された Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞と Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞を、直径 15 cm の細胞培養ディッシュ (Thermo Scientific, Kanagawa, Japan) で培養した。その後、発育細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 含有の RIPA buffer (25 mM Tris・HCl pH 7.6、150 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS) を用いて回収し、細胞全抽出液 (Whole cell extract) を得た。

得られた細胞全抽出液に ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2-Agarose beads from mouse (Sigma) を加えて 6 時間、4°C で攪拌した。次に、得られた beads を RIPA buffer で 4 回洗浄



後、3 x FLAG peptide (Sigma) を加えて 30 分、4°C で攪拌・溶出した。最後に、12000 rpm で 30 秒遠心し、得られた上清を Western blot 法に使用した。

上清を 10% ゲルを用いた SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) にて展開し、PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore, MA, USA) に Western blot 法にて転写した。その後、5% スキムミルク溶液でブロッキングした後、マウス由来の抗 FLAG 抗体 (1000 倍希釈, 室温, 反応時間 2 時間, Sigma) を一次抗体として用い、西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase; HRP) でラベル化した抗マウス抗体 (10000 倍希釈, 室温, 反応時間 1 時間, Santa Cruz Biotechnology) を二次抗体として用いた。なお、一次抗体の希釈液として、5% スキムミルク溶液を、二次抗体の希釈液として TBS-T (Tris buffered saline with 0.01% tween 20) をそれぞれ用いた。ECL Plus Western Blotting Detection Systems (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いた HRP 反応によって抗原を X 線フィルム (FUJIFILM Medical, Tokyo, Japan) に感光させ、X 線自動現像機 TCX-101 (KONICA MINOLTA) を用いて現像した。

上記の実験により、Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞 (vector 細胞) および Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を樹立した。

## 1-5 Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞での PR-A 機能の確認 : Progesterone

### (P4) 添加による FKBP51 の発現変化に関する検討

今回の検討では、P4 応答のポジティブコントロールとして既知の P4 応答遺伝子である FKBP51 を、内在性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。Ishikawa 由来 pcDNA3 形質転換細胞 (vector 細胞)、Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞をそれぞれ 6 well プレートで発育させた。この時の培養液は 10% FBS を含む phenol red DMEM/F12 + G418 (800  $\mu\text{g/ml}$ ) を使用した。P4 添加の 3 日前に培養液を 10% dextran-coated charcoal (dcc)- FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 に交換し、P4 ( $10^{-7}$  M) (Nacalai tesque) を添加後 0、12、24 時間後に、ISOGEN 500  $\mu\text{l}$  を用いて RNA 回収を行った。逆転写反応で cDNA を合成し、FKBP51、ならびに GAPDH の特異的なプライマーを用いて qRT-PCR 法を行った (表 2)。

表 2 qRT-PCR に使用したプライマー

Gene	Accession No.	Primer sequence (5'-3')
ADAMTS9	NM_182920	F-GGTGAAATACCGATCCTGCCA R-GTAGCCGTTGAAAGCCTCACA
BCL6	NM_001706	F-ACTGGGTGGCAGCTCGCATCG R-GCTAGCTAGCTGCAGTAGC
CST1	NM_001898	F-TTCTGGCTGTTTCATGGAAGG R-AATGATGAGTGGGTACAGCG
FKBP51	NM_001145775	F-CTGCAGAGATGTGGCATTCACT R-TCCAGAGCTTTGTCAATTCCAA
GAPDH	NM_002046	F-CCCACTCCTCCACCTTTGAC R-TGAGGTCCACCACCCTGTTG
IL20RA	NM_014432	F-AGTTCCCTGTGTCTCTGGTGGTT R-GTAGGACATTCTTCATGTTGATGGA
KRT6A	NM_005554	F-ATCAACCGCATGATCCAGAG R-GCTTGTCTTTGGCCTCCTTG
PDK4	NM_002612	F-AGCGGCTGCATCGATGCGCAT R-TGCAGGCACCCGAGCTGAC
PION	NM_017439	F-CCCATGGTAACCCTTTTTCC R-GCATCCACATTGTCATGTCC
PR-AB (common)	NM_000926.4	F-AGAGCACTGGATGCTGTTGCT R-TGGCTTAGGGCTTGGCTTT
PR-B (specific)	NM_000926.1	F-GCCAGACCTCGGACACCTT R-CAGGGCCGAGGGAAGAGTAG
PRKX	NM_005044	F-AGCTGTTCCGCAGAGAAAAC R-TGTGTCCCAGTCATTCTCAGG
PTGER2	NM_000956	F-GTGCTGACAAGGCACTTCAT R-GTCACTGTTTGGGGTTTCAA
RHOA	NM_021205	F-GAGAAGCCGGTGCCTGAAGA R-CTTTGGCTGTAGCTGGGAGT
SEPP1	NM_005410	F-AATGTGGAAACTGCTCTCTCAC R-GGTGCTGATGTCCATGATTG
TFCP2L1	NM_014553	F-GTGTACCACGCCATCTTCCT R-TGTGCTGAGGACAAAACAGG
TIPARP	NM_015508	F-CACACCAGATCACTTCCAGA R-CAGCTCAAACACGAGGTCAA
TRIM22	NM_006074	F-CAATGTCACAAACCACGGAGCA R-GGAAGAGATGGTCTCAGTAGAGAT

## 2. Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞を用いた P4 応答遺伝子の探索

### 2-1 Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞を用いた P4 添加による Microarray 解析

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12、5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養し、72 時間後に P4 (10<sup>-7</sup> M)、または P4 の vehicle としてエタノール (Ethanol; EtOH) を添加し、12 時間後の細胞から RNA を回収して、マイクロアレイ法 (Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array) により発現が上昇した遺伝子を網羅的に探索した。EtOH 添加群に比較して、P4 添加群で発現応答が 1.75 倍以上に上昇している 15 遺伝子を Progesterone 応答遺伝子の候補とした。

同様に PR-B 安定発現細胞株でもマイクロアレイ法を行った。

### 2-2 qRT-PCR 法を用いた P4 応答候補遺伝子の発現変化に関する検討

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を 10% FBS を含む DMEM/F12+G418 (800 µg/ml) を使用して培養した。P4 添加の 3 日前に培養液を 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 に交換し、P4 (10<sup>-7</sup> M) を添加後 0、12、24 時間後に、RNA を抽出して cDNA を合成し、qRT-PCR 法に用いた。Microarray 法にて同定された 15 遺伝子に関して、primer3plus

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) を用いて特異的 primer を作成した (表 2)。

なお、既知の P4 応答遺伝子として FKBP51、ならびに内在性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。

### 2-3 プロゲステロンアンタゴニスト (RU486) を用いた P4 応答候補遺伝子の発現変化に関する検討

RU486 は PR-A および PR-B の両者を阻害するアンタゴニストとして知られている [17]。プロゲステロンの作用を抑制した際に候補遺伝子の発現も抑制されるかどうかを検討するため、RU486 の添加実験も行った。

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を、10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 72 時間培養し、vehicle として EtOH、P4 ( $10^{-7}$  M)、P4 ( $10^{-7}$  M) + RU486 ( $10^{-7}$  M) (Life technologies, Tokyo, Japan)、P4 ( $5 \times 10^{-7}$  M)、P4 ( $5 \times 10^{-7}$  M) + RU486 ( $10^{-7}$  M) をそれぞれ添加して、24 時間後に RNA を回収、qRT-PCR 法を行った。

#### 2-4 P4 応答候補遺伝子 TRIM22 の P4 添加後の時間経過的発現変化に関する検討

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を、6 well dish に 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 72 時間培養し、EtOH および P4 ( $10^{-7}$  M) を添加して、0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後にそれぞれ RNA を回収、qRT-PCR 法を行った。

#### 2-5 シクロヘキシミド添加時の TRIM22 発現変化に関する検討

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を、10 cm dish に 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 72 時間培養し、cycloheximide (CHX) (Funakoshi, Tokyo, Japan) 添加 2 時間後に EtOH および P4 ( $10^{-7}$  M) を添加し、12 時間後にそれぞれ RNA を回収、qRT-PCR 法を行った。

#### 2-6 デキサメサゾン添加時の TRIM22 発現変化に関する検討

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を、10 cm dish に 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 72 時間培養し、EtOH または P4 ( $10^{-7}$  M) または Dexamethazone (DEX) ( $10^{-7}$  M) 添加後 12 時間後にそれぞれ RNA を回収、

qRT-PCR 法を行った。

## 2-7 PR 陽性乳がん細胞株 T47D を用いた TRIM22 発現解析

T47D 細胞は ATCC にて購入して、10 cm dish に 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 72 時間培養し、EtOH または P4 ( $10^{-7}$  M) 添加後 24 時間後にそれぞれ RNA を回収、qRT-PCR 法を行った。

## 3 Database 上での PRE の探索

転写因子の結合部位を予測するプロモーター配列解析データベース TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/index.html>) を用いて、P4 応答遺伝子の一つである TRIM22 の exon 1 上流にプロゲステロン応答配列 (PRE) コンセンサス配列があるかどうかを調べた。

## 4 レポーターアッセイを用いた PR 応答遺伝子転写制御機構の探索

### 4-1 細胞培養

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を 10 % dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 24 well プレートに細胞数を  $3 \times 10^4$  /well として、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C で 24 時間培養した。

### 4-2 一過性遺伝子導入

pGL3-LUC vector にそれぞれの遺伝子群のプロモーター/エンハンサー領域と PRE 領域を含む DNA 配列を遺伝子挿入したものを用いた。ベクターは、pGL3-Basic (Promega) と pGL3-Promoter (SV40プロモーターを含む) (Promega) の2種類を用いた。OPTI-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium 1x (Life technologies) に培養液を交換し、P4 応答遺伝子ベクターとマウス乳癌ウイルス (Mouse mammary tumor virus; MMTV) (プロゲステロン応答配列を複数有するプロモーター) ルシフェラーゼアッセイ用ベクターを、FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Roche Diagnostics) を用いて一過性遺伝子導入した。TRIM22 の 5' 上流域からエクソン 1 を含んだ部位 (-656 ~+677) を、Luciferase vector である pGL3-Basic へ挿入したもの (TRIM22-Luc)、



および Database 上で発現誘導に重要な部位と推測された領域 (PRE の可能性がある部位) (-25~-12) を Luciferase vector pGL3-Basic に挿入したもの (TRIM22 PRE-Luc)、PRE を、SV40 をもつ Luciferase vector である pGL3-Promotor に挿入したもの (TRIM22 PRE + Promotor) を作成した。また、それぞれについて PRE に図のように Mutation を組み込んだ配列のものも作成した。ウミシイタケルシフェラーゼ (promoter-Renilla Luciferase; pRL) 発現ベクターで測定値を補正した。ルシフェラーゼ アッセイキットとして、Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。遺伝子導入の 24 時間後に培養液中に EtOH または P4 ( $10^{-7}$  M) を添加し、その 24 時間後に細胞を回収、ルミノメーター Mithras LB 940 (BERTHOLD, Calmbacher, Germany) で測定した。

## 5 クロマチン免疫沈降法を用いた PR 応答遺伝子転写制御機構の探索

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞を、15 cm dish 2 枚 に 10% dcc-FBS を含む phenol red-free DMEM/F12 で 72 時間培養し、EtOH または P4  $10^{-7}$  M 添加後 2 時間後に 37% ホルムアルデヒドにて室温 5 分間クロスリンク処理し、1.5 M のグリシンを加えてさらに 5 分間処理して反応を停止した。冷却 PBS で 2 回洗浄後、細胞に protease inhibitor cocktail 500  $\mu$ l (Nacalai tesque) を加え、セルスクレーパーで回収し、15000 rpm にて 3 分遠心した。沈殿したペレットに 200  $\mu$ l の SDS lysis buffer を加

えて氷上に 10 分静置してから、密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor ultrasonicator (Cosmo-Bio, Tokyo, Japan) を用いて、破碎 30 秒、休止 1 分のサイクルで 9 サイクル (12.5 分間) 氷水で冷却しながら超音波処理 (power high) を行った。15 krpm 10 分間 4 °C で遠心し、その上清を冷却した CHIP dilution buffer で希釈し、50% Protein G Sepharose (Amersham) を加えてローテーターにて 4 時間 4 °C で攪拌した。さらに 10 krpm 10 秒 4 °C にて遠心した上清に、normal rabbit IgG (Santa Cruz)、抗 FLAG 抗体 (Sigma) もしくは抗 PR 抗体 (Santa Cruz) を加えてローテーターにて一晩 4 °C で攪拌した。Protein G Sepharose ビーズを加え、4 °C にてローテーターで 2 時間攪拌した。Sepharose ビーズを回収し、RIPA buffer / LiCl wash solution / TE buffer にて洗浄、200 µl CHIP dilution buffer にて 65 °C over night 処理し、1 µl proteinase K (10 mg/ml) を加えて攪拌し、55 °C にて 1 時間インキュベートし、1 µl Glycogen (20 mg/ml) を加えてさらに攪拌し、遠心した上清を回収した。回収した上清に 210 µl フェノール/CIAA (: chloroform isoamyl alcohol) を加えて攪拌し、15 krpm 3 分室温にて遠心し、上清に 800 µl 100 % EtOH を加え、2 時間静置した。その後 15 krpm 30 分遠心し、得られた DNA の沈殿を TE buffer にて溶解した。

PRE に限局した反応を解析するための primer を設計し、得られた DNA を用いて、qRT-PCR 法を行った。設計した primer 配列は、Forward:

CAGGCAAGCTGTATAACTG、Reverse:CGGTGTAAACCAGATTCACTCACC を用いた。

## 6 統計学的検定について

各群の比較については t-test 法を用いて統計学的検定を行った。統計学的検定は JMP 8(SAS Institute, USA) により行った。各実験をおこなった回数はそれぞれの結果に n=〇 と示し、エラーバーは各群の平均±標準誤差で示すこととした。

## 結果

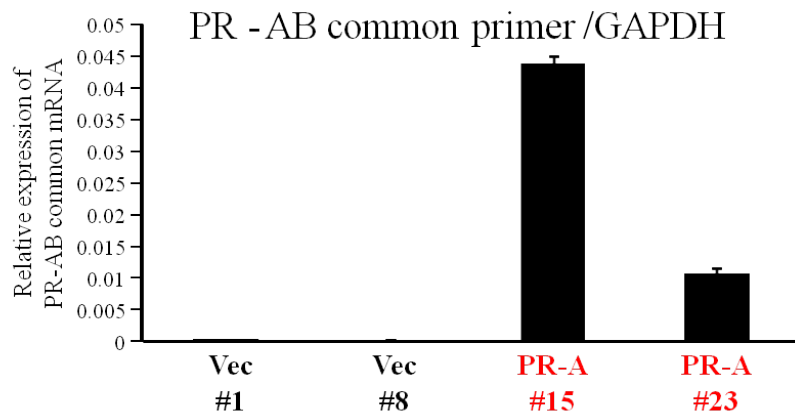
### 1. Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株の樹立確認

細胞から抽出した RNA から逆転写 PCR を行って、cDNA を作成し、qRT-PCR 法にて PR-AB common primer (PR-A と PR-B の共通部分を認識する特異的 primer)で vector 細胞株と比して発現上昇のあることを確認した (n=3 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 4A)。

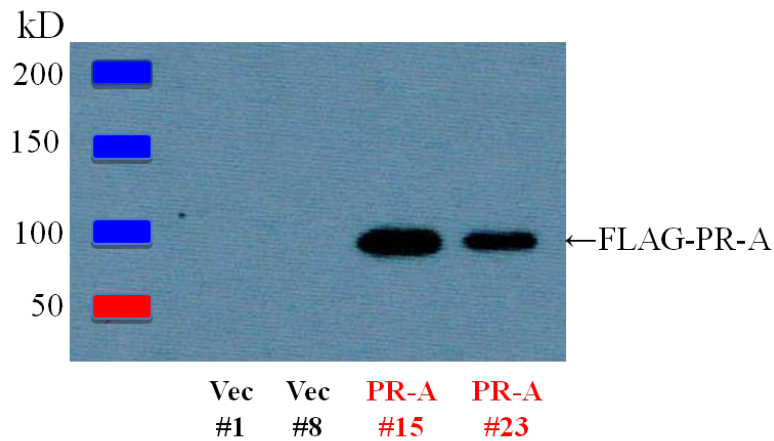
また、IP Western blot 法にて FLAG タグを付加した Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株の樹立を確認した (図 4B)。

さらに、各細胞株に対し P4 添加した 12 時間及び 24 時間後に、vector 細胞株では P4 応答遺伝子の一つである FKBP51 の発現に変化が見られなかったのに対して、PR-A 安定発現細胞株においては、12 時間及び 24 時間後においてそれぞれ発現上昇を確認することができた (n=3 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 5)。

図 4  
A



B

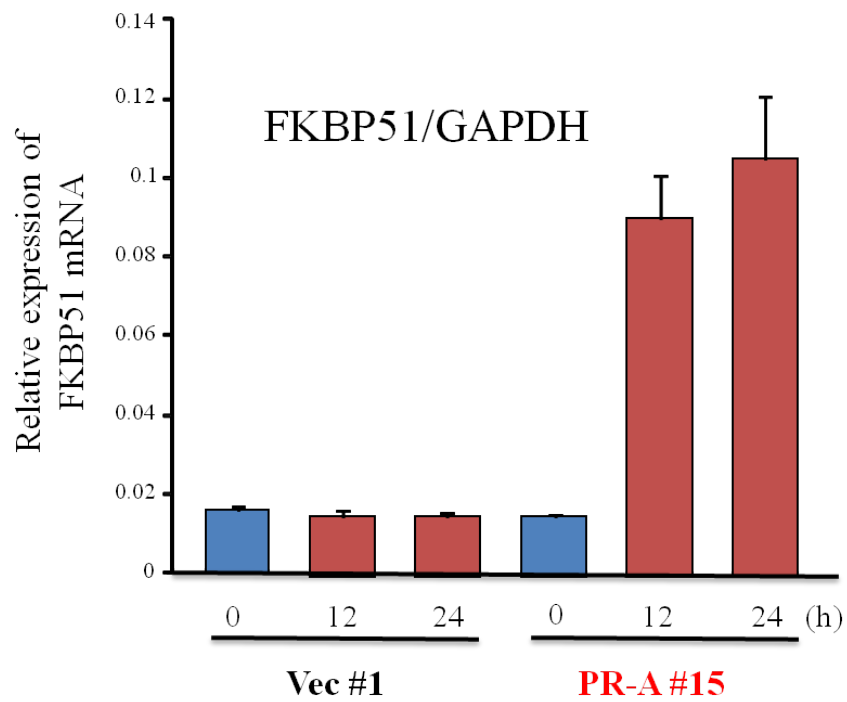


Vec : Ishikawa 由来 Vector (pcDNA3) 細胞株  
PR-A : Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株

図 4 Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株の樹立

- A PR-AB common primer (PR-A と PR-B の共通部分を認識する特異的 primer)を用いた qRT-PCR 法により Ishikawa-PR-A 細胞株 (PR-A #15 ならびに PR-A #23)では vector 細胞株と比して発現上昇のあることを確認した。  
(n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)
- B FLAG タグ付き PR-A を Ishikawa 細胞に安定発現させた細胞の蛋白抽出液にて Ishikawa-PR-A 安定発現細胞株の樹立を IP Western Blot 法にて確認した。  
抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、抗 FLAG 抗体を用いて blot し、バンドを確認した。

図 5



Vec : Ishikawa 由来 Vector (pcDNA3) 細胞株  
PR-A : Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株

図 5 作成した Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株の P4 応答性  
Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株 #15 に P4 ( $10^{-7}$  M) 添加し、  
12 h / 24 h 後に回収した RNA を用いて qRT-PCR 法により P4 応答遺伝子である  
FKBP51 の発現を確認した。  
(n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

## 2. Ishikawa 由来 PR 安定発現細胞を用いた P4 応答遺伝子の同定

マイクロアレイ法を用いて発現上昇した遺伝子につき解析した。Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株 2 クローン (#15 および #23) の両方で 1.4 倍以上に上昇した遺伝子は、71 遺伝子存在した (表 3A)。また、その中でも 1.75 倍以上に上昇した遺伝子 15 個について、P4 応答遺伝子の候補遺伝子としてあげることとした (図 6A)。

また、同様に作成した Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞のマイクロアレイ法を用いた解析では、2 株(#54 および #55)で 1.4 倍以上に発現上昇した遺伝子は 16 遺伝子認め (表 3B)、発現上昇したすべての遺伝子のうち 1.4 倍以上に上昇した遺伝子について (図 6B) に示した。

PR-A 安定発現細胞株で同定した 15 遺伝子につき、qRT-PCR 法を用いて P4 応答性の確認を行った。15 遺伝子いずれも、P4 添加 0 時間に比して有意に 12 時間後および 24 時間後での発現上昇していることが確認できた (n=3 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 7)。

さらにプロゲステロンアンタゴニストである RU486 を P4 と同時に添加することで、P4 による発現上昇を抑えられることができるかどうかを qRT-PCR 法により確認した。15 遺伝子のうち 10 遺伝子について、RU486 による P4 応答の抑制を確認した

(n=3 数值は各群の平均±標準誤差で示す) (図 8)。



表 3

**A** Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株 #15 と #23 で EtOH 添加群に対し P4 添加群 (12 h 後) に 1.4 倍に上昇した遺伝子 71 個

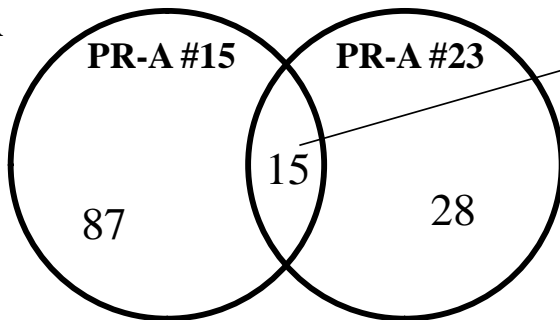
<i>ADAMTS8</i>	<i>C13orf15</i>	<i>FAM174B</i>	<i>IL20RA</i>	<i>MATN1</i>	<i>PIAS3</i>	<i>RD3</i>	<i>TFCP2L1</i>
<i>ADAMTS9</i>	<i>C14orf19</i>	<i>FAM70A</i>	<i>KCNG1</i>	<i>MFSD2A</i>	<i>PION</i>	<i>RHOA</i>	<i>TIPARP</i>
<i>AMOT</i>	<i>CDR2L</i>	<i>FKBP5</i>	<i>KRT5</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>PITPNC1</i>	<i>SCNN1A</i>	<i>TMEM37</i>
<i>ANK3</i>	<i>CNKSR3</i>	<i>FRK</i>	<i>KRT6A</i>	<i>NRXN3</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>SEPP1</i>	<i>TMEM63C</i>
<i>ATP12A</i>	<i>CPNE4</i>	<i>FZD8</i>	<i>KRT6B</i>	<i>NT5DC3</i>	<i>PRKX</i>	<i>SGPP2</i>	<i>TRIM22</i>
<i>ATP1A1</i>	<i>CPT1A</i>	<i>GMPT</i>	<i>KRT6C</i>	<i>PART1</i>	<i>PRR15L</i>	<i>SLC39A14</i>	<i>SC22D3</i>
<i>B3GALT1</i>	<i>CST1</i>	<i>HEY1</i>	<i>LOC644714</i>	<i>PDK4</i>	<i>PTGER2</i>	<i>ST3GAL4</i>	<i>VDR</i>
<i>BCL6</i>	<i>EGFLAM</i>	<i>HHIP</i>	<i>MAOA</i>	<i>PDLIM1</i>	<i>PXT1</i>	<i>ST3GAL6</i>	<i>ZNF479</i>
<i>BOC</i>	<i>EPHA7</i>	<i>HOMER2</i>	<i>MAT2A</i>	<i>PEG10</i>	<i>RASGRF2</i>	<i>TEDDM1</i>	

**B** Ishikawa 由来 PR-B 安定発現細胞株 #54 と #55 で EtOH 添加群に対し P4 添加群 (12 h 後) に 1.4 倍に上昇した遺伝子 16 個

<i>ARMCX6</i>	<i>BCL6</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CALB1</i>	<i>FKBP51</i>	<i>GJB6</i>	<i>HSPA1A</i>	<i>KIT</i>
<i>NAPEPLD</i>	<i>OR13C4</i>	<i>PDK4</i>	<i>SLC2A14</i>	<i>SLFN11</i>	<i>TAGLN3</i>	<i>ZDHHC14</i>	<i>ZKSCAN3</i>

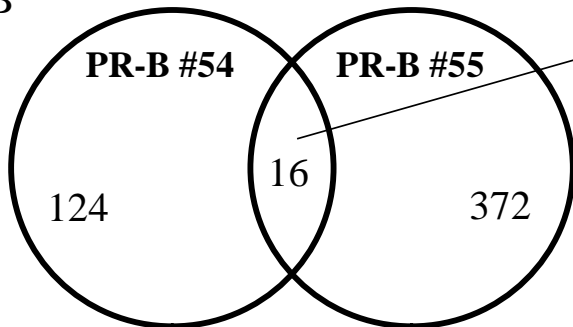
図 6

A



- ADAMTS9 : A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9
- BCL6 : B-Cell Lymphoma 6
- CST1 : Cystatin 1
- FKBP5 : FK506 binding protein 5
- IL20RA : Interleukin 20 Receptor, Alpha
- KRT6A : Keratin 6A
- PDK4 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isoenzyme 4
- PION : Pigeon
- PRKX : Protein kinase, x-linked
- PTGER2 : Prostaglandin E Receptor 2
- RHOU : Ras Homolog Gene Family, Member U
- SEPP1 : Selenoprotein P, plasma 1
- TFCP2L1 : Transcription Factor CP2-Like 1
- TIPARP : TCDD-Inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase
- TRIM22 : Tripartite Motif-containing Protein 22

B



- ARMCX6 : ARMADILLO REPEAT CONTAINING, X-LINKED 6
- BCL6 : B-CELL LYMPHOMA 6
- BIRC3 : BACULOVIRAL IAP REPEAT-CONTAINING PROTEIN 3
- CALB1 : CALBINDIN 1
- FKBP51 : FK506-BINDING PROTEIN 5
- GJB6 : GAP JUNCTION PROTEIN, BETA-6
- HSPA1A : HEAT-SHOCK 70-KD PROTEIN 1A
- KIT : V-KIT HARDY-ZUCKERMAN 4 FELINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
- NAPEPLD : N-ACYL PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-HYDROLYZING PHOSPHOLIPASE D
- OR13C4
- PDK4 : PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE, ISOENZYME 4
- SLC2A14 : SOLUTE CARRIER FAMILY 2 (FACILITATED GLUCOSE TRANSPORTER), MEMBER 14
- SLFN11 : SCHLAFEN FAMILY, MEMBER 11
- TAGLN3 : TRANSGELIN 3
- ZDHC14
- ZKSCAN3 : ZINC FINGER PROTEIN WITH KRAB AND SCAN DOMAINS 3

図 6 マイクロアレイ法によるプロゲステロン応答遺伝子の候補

- A Ishikawa-PRA 株で Microarray 法にて EtOH 添加群に対し P4 ( $10^{-7}$  M) 添加群 (12 h 後) に 1.75 倍以上に上昇した遺伝子
- B Ishikawa-PRB 株で Microarray 法にて EtOH 添加群に対し P4 ( $10^{-7}$  M) 添加群 (12 h 後) に 1.4 倍以上に上昇した遺伝子

7

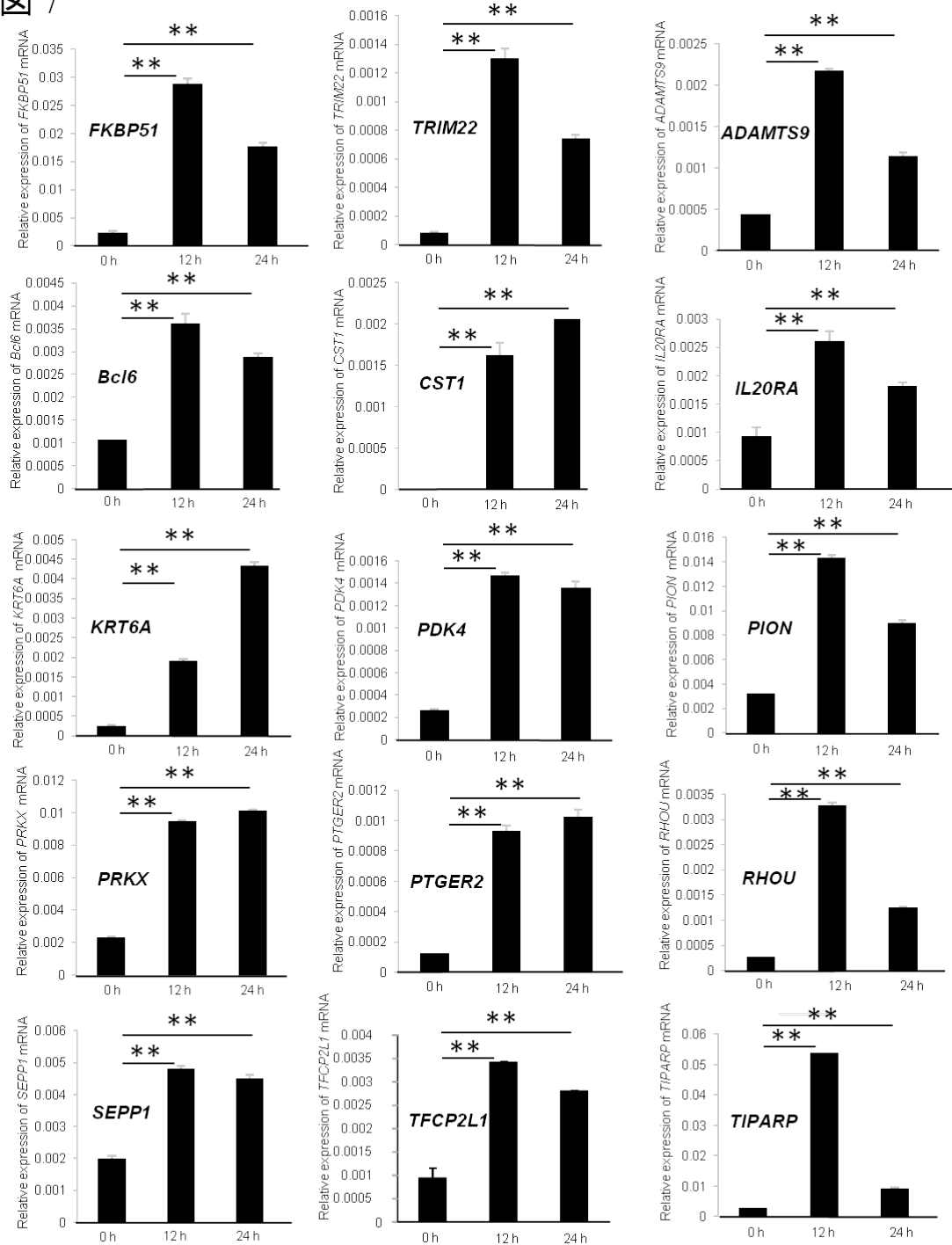


図7 qRT-PCR法を用いたP4応答候補遺伝子の発現変化  
 マイクロアレイ法によりP4応答性が確認された15遺伝子に関してqRT-PCR法により、\*\* P<0.01  
 P4添加12時間後、24時間後での発現応答を検討した。(n=3バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

図 8

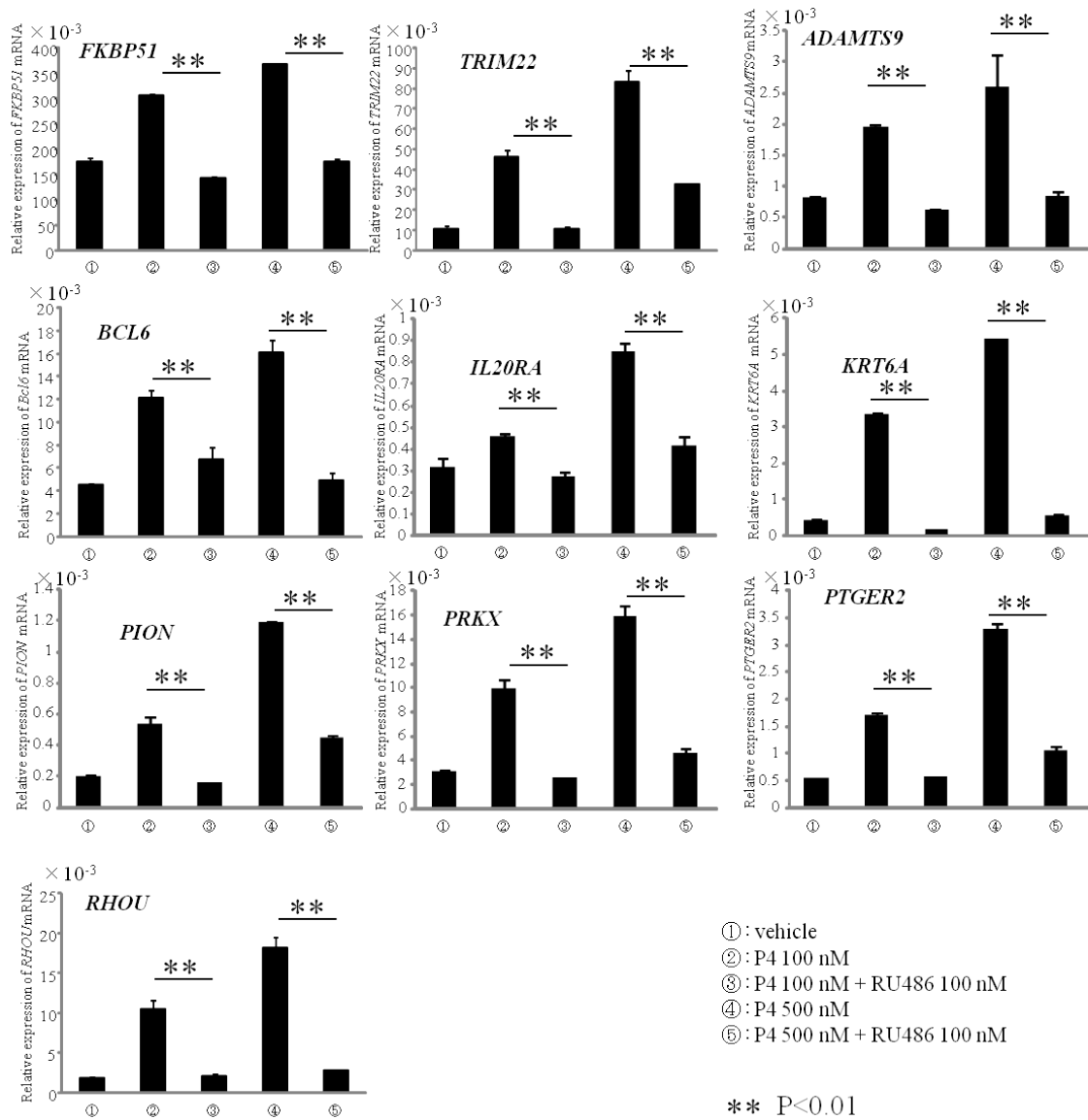


図 8 プロゲステロンアンタゴニスト(RU486)を用いた P4 応答候補遺伝子の発現変化  
 プロゲステロンアンタゴニストであるRU486をP4と同時に添加することで、P4による発現上昇を抑えられることができるかどうかをqRT-PCR法により確認した。  
 15 遺伝子のうち 10 遺伝子について、RU486によるP4 応答の抑制を確認できた。  
 (n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

### 3. TRIM22 に関する検討

これまで解析した 15 遺伝子のうち、P4 応答性が顕著であり、さらにデータベース上で遺伝子近傍に PRE が存在する遺伝子を探索した。そこで exon1 の 5' 上流域にプロゲステロン応答部位の可能性がある TRIM22 に着目しさらなる検討を加えることとした。

qRT-PCR 法を用いて、TRIM22 の P4 添加後の時間経過的発現変化を検討したところ、1 時間後から上昇を始め、12 時間後に最大ピークを迎えることが分かった (n=3 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 9)。

次に、P4 によるプロゲステロン応答遺伝子である TRIM22 に対する発現誘導が、P4 による転写活性の上昇によるものかどうかを確認するために、蛋白質合成(翻訳過程)の阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて qRT-PCR 法を行った。その結果、シクロヘキシミド添加によって TRIM22 発現上昇が抑えられないことから、TRIM22 は P4 の直接的な応答遺伝子であることが示唆された (n=3 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 10A)。

次に TRIM22 のデキサメタゾン添加による発現誘導を qRT-PCR 法により確認した。その結果、デキサメタゾン添加においても発現上昇を認めることから、TRIM22 はグルココルチコイド応答性も確認されたが、プロゲステロン応答性に比すと誘導の程度

は低かった (n=3 数値は各群の平均+-標準誤差で示す) (図 10B)。

さらに、Ishikawa 細胞株以外の PR 陽性細胞株における P4 応答性をみるために、PR 陽性乳がん細胞株 T47D における P4 応答性を確認した。その結果、Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株で発現上昇が見られた TRIM22 は、T47D 細胞においても発現上昇が見られた (n=3 数値は各群の平均+-標準誤差で示す) (図 10C)。

図 9

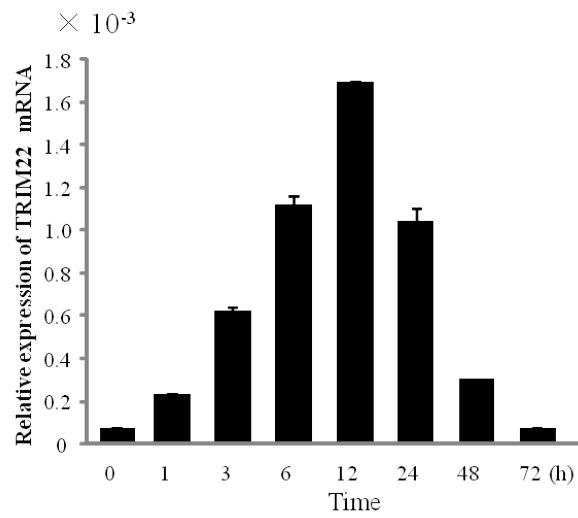
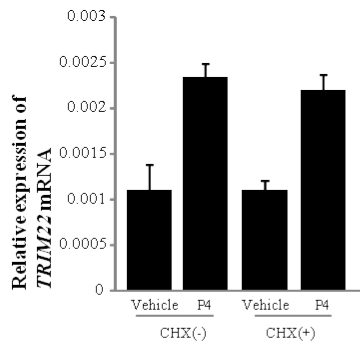


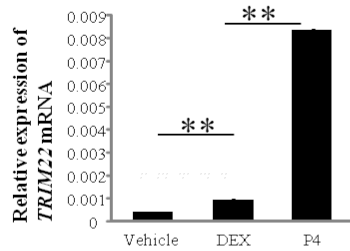
図 9 P4 応答候補遺伝子 TRIM22 の P4 ( $10^{-7}$  M) 添加後の時間経過的発現変化  
Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株 #15 に P4 添加後 72 時間までの TRIM22 の経時的発現変化を示している。TRIM22 は P4 ( $10^{-7}$  M) 添加後 12 時間で発現量がピークとなった。(n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

図 10

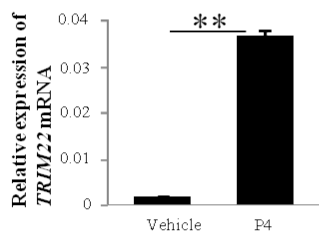
A



B



C



\*\* P<0.01

図 10 qRT-PCR 法による TRIM22 遺伝子の発現変化

A CHX 添加時の TRIM22 発現変化

シクロヘキシミド (CHX) を Ishikawa-PR-A#15 に添加し、2 時間後に P4 ( $10^{-7}$  M) を添加し、12 時間後に回収し、TRIM22 の発現量変化を確認した。CHX による TRIM22 の P4 応答性の影響を認めなかった。(n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

B DEX 添加時の TRIM22 発現変化

デキサメタゾン (DEX) ( $10^{-7}$  M) および P4 ( $10^{-7}$  M) を Ishikawa-PR-A#15 に添加し、12 時間後に回収し、TRIM22 の発現量変化を確認した。TRIM22 は DEX 応答性も確認されたが、プロゲステロン応答性に比すと応答性は弱かった。(n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

C T47D 細胞での TRIM22 発現変化

PR 陽性乳がん細胞株 T47D における P4 応答性を確認した。T47D 細胞に P4 ( $10^{-7}$  M) を添加した 24 h 後に回収した mRNA で TRIM22 は発現上昇が見られた。(n=3 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)



#### 4. Database 上での PRE の探索

これまでの結果から P4 による発現誘導実験において、TRIM22 がプロゲステロン応答遺伝子であることが強く示唆された。次に TRIM22 遺伝子近傍に P4 とプロゲステロンレセプターの複合体の結合領域 (Progesterone Receptor Binding Site ; PRBS) があるかどうかを検討した。TRANSFAC によって、TRIM22 の Exon1 上流に PRBS の存在が推定された。その PRBS 上に PRE (Progesterone Responsive Element) のコンセンサス配列 (GNACANNNTGTNC) と比して 1base ミスマッチ配列が、Exon1 から 5' 上流 11 bp の部位にあり、この部位が PRE である可能性が示唆された (図 11)。

図 11

Chromosome 11

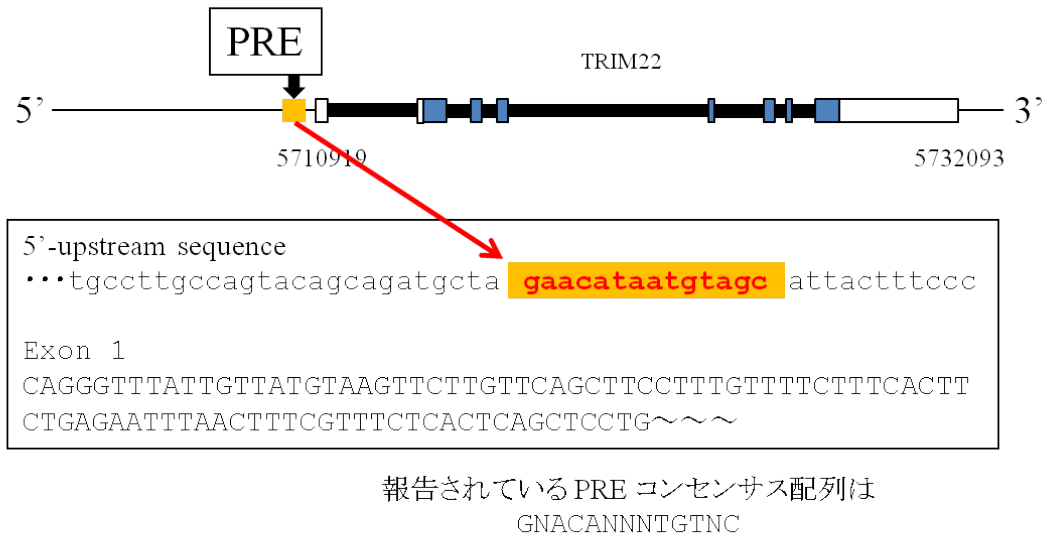


図 11 TRIM22 のプロゲステロン応答部位の探索 データベースサーチを行い、Progesterone Receptor Binding Site (PRBS) を調べた。TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/index.html>) を用いて、TRIM22 の Exon 1 上流に PRBS の存在が推定された。その PRBS 上に PRE (Progesterone Responsive Element) のコンセンサス配列 (GNACANNNTGTNC) と比して 1base ミスマッチ配列が、Exon 1 から 5' 上流 11 bp の部位にあり、この部位が PRE である可能性が示唆された。

## 5. レポーターアッセイによる TRIM22 PRE 領域の P4 依存性エンハンサー活性の検討

TRIM22 遺伝子上流の P4 による発現誘導に重要な位置の確認のためにレポーターアッセイを行った。pGL3-Basic 及び pGL3-Promoter を negative control、MMTV-Luc を positive control とした。Positive control である MMTV-Luc では P4 添加により 100 倍程度に活性上昇し、negative control では上昇していなかった。まず、TRIM22-Luc においては、P4 添加により 3 倍程度の転写活性の上昇が見られた。変異を入れた TRIM22 Mut-Luc では転写活性の上昇が認められなかった (n=4 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 12 A・B)。一方、TRIM22 PRE + Promotor では、P4 添加により 2 倍以上に発現上昇を認め、TRIM22 PRE-Mut + Promotor では発現上昇を認めなかった (n=4 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 13 A・B)。

図 12

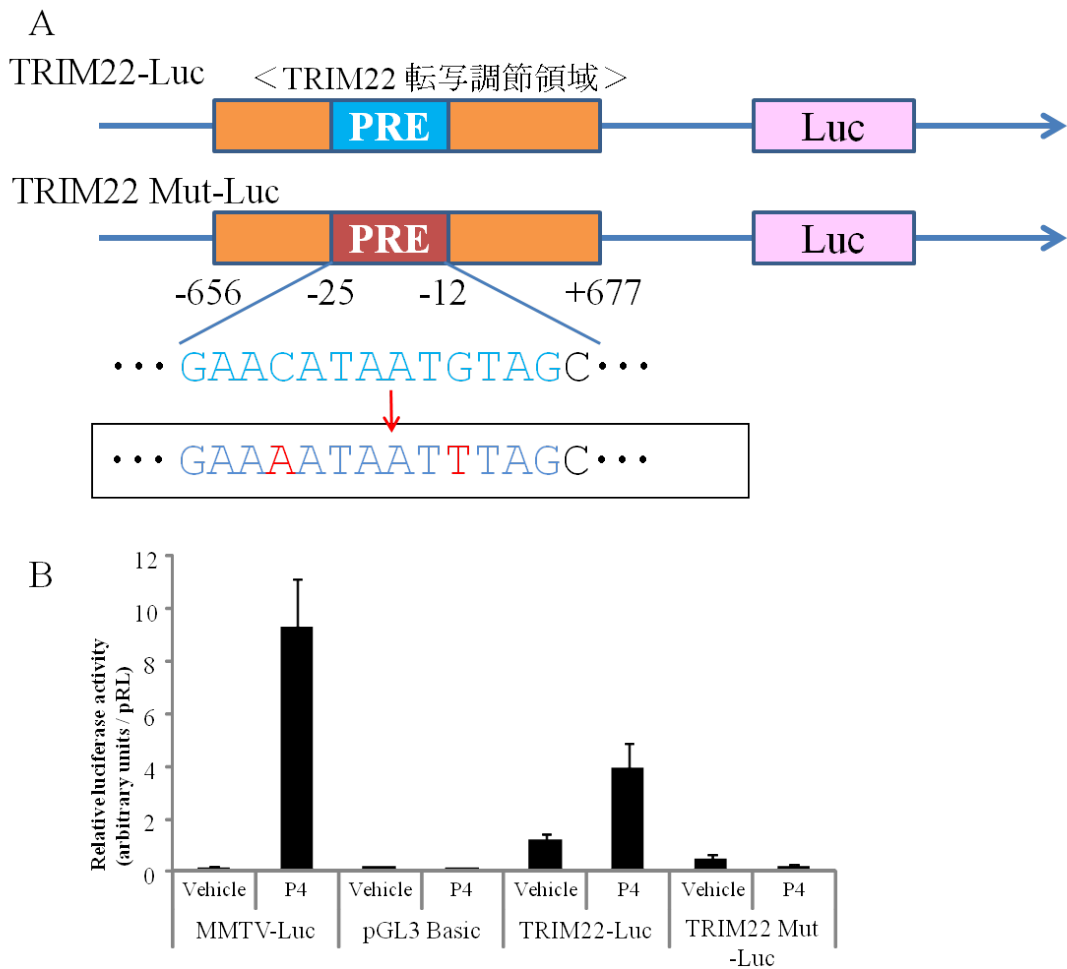


図 12 レポーターアッセイによる発現誘導に重要な位置の確認

A TRIM22 転写調節領域を組み込んだルシフェラーゼベクターの作成

TRIM22 の PRE 領域を含んだ TRIM22 遺伝子 5' からエクソン1 領域 (-656 から +677) を pGL3-Basic ベクターに挿入した(上段)。

さらに PRE コンセンサス配列を有する -25 から -12 の部位に 2 bp のミスマッチ配列となる変異配列を挿入したルシフェラーゼベクターも作成した(下段)。

B ルシフェラーゼアッセイ

TRIM22 5' 上流域は P4 による転写活性化を有する pGL3-Basic を negative control、MMTV-luc を positive control とした。Positive control である MMTV-luc では P4 添加により 100 倍程度に活性上昇し、negative control では上昇していなかった。TRIM22-Luc においては、P4 添加により 3 倍程度の転写活性の上昇が見られた。変異を入れた TRIM22 Mut-Luc では転写活性の上昇が認められなかった。

(n=4 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

図 13

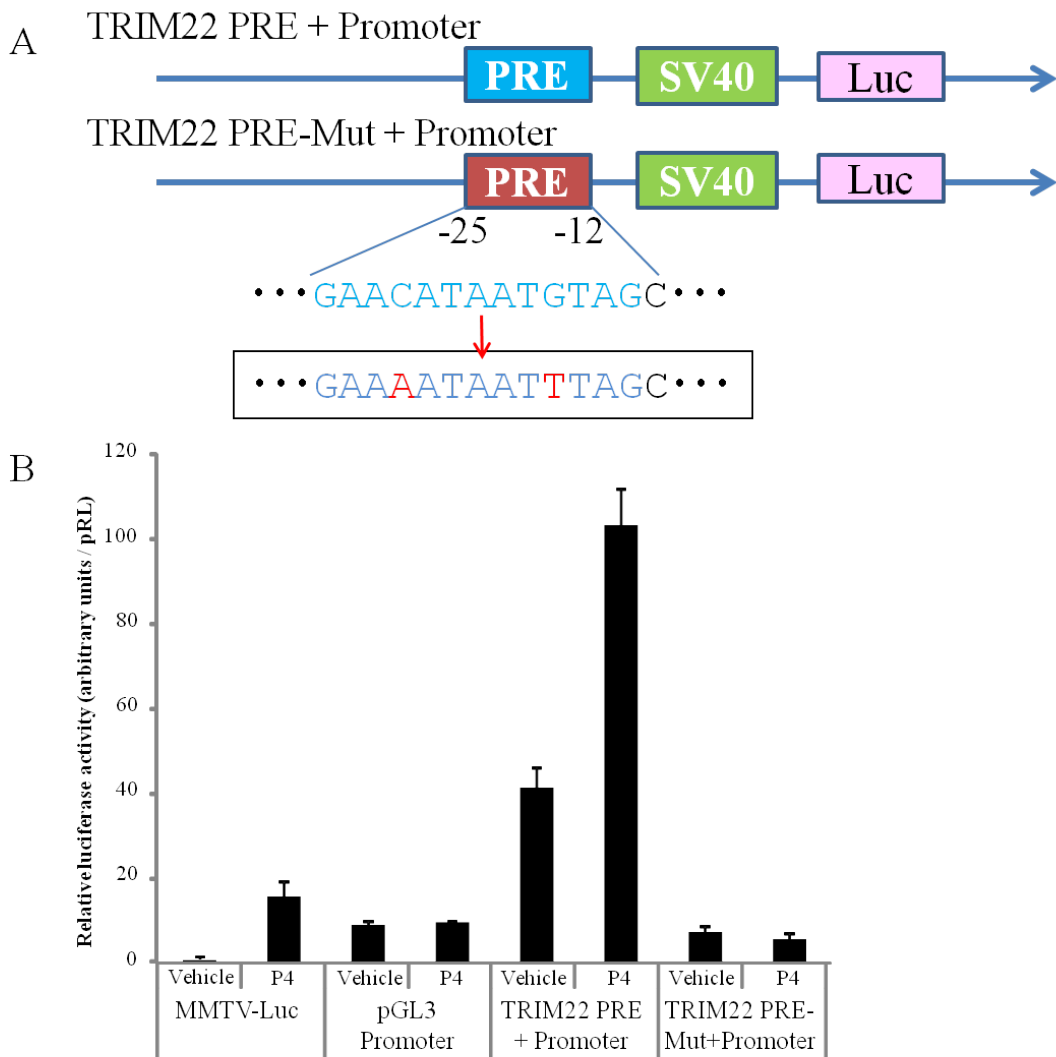


図 13 TRIM22 遺伝子直上の PRE コンセンサス配列 (-23から-12) はエンハンサー活性を有する

A TRIM22 直上の PRE 配列を組み込んだルシフェラーゼベクターの作成  
pGL3-Promoter ベクターに TRIM22 の PRE 領域 (-25から-12) を組み込んだルシフェラーゼベクター(上段)ならびに PRE 領域に 2 bp ミスマッチ配列の変異を挿入したルシフェラーゼベクターを作成した。

B ルシフェラーゼアッセイ  
pGL3-Promoter を negative control、MMTV-luc を positive control とした。  
Positive control である MMTV-luc では P4 添加により 100 倍程度に活性上昇し、negative control では上昇していなかった。TRIM22-Luc においては、P4 ( $10^{-7}$  M) 添加により 2 倍程度の転写活性の上昇が見られ、同部位にエンハンサー活性を有すると考えられた。変異を入れた TRIM22 Mut-Luc では転写活性の上昇が認められなかった。  
(n=4 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

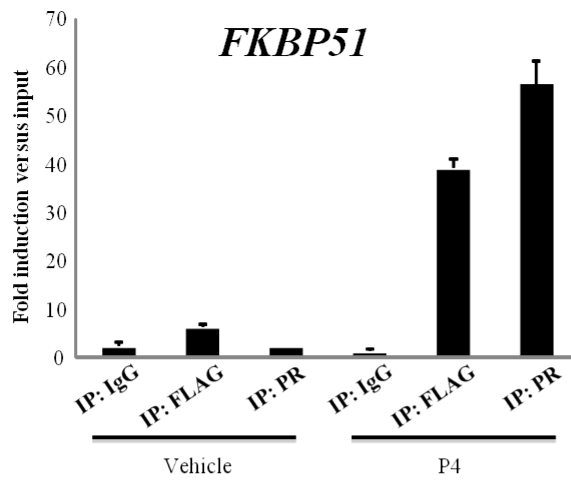
## 6. クロマチン免疫沈降法による PR の PRE への結合の検討

TRIM22 遺伝子の 5' 上流に PRE コンセンサス配列が見つかったことから、この部位に PR が結合するかどうかを調べるために、クロマチン免疫沈降法を行った。

Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株 #15 を用い、抗 FLAG 抗体および抗 PR 抗体にて免疫沈降を行い、TRIM22 の PRE に限局して作成したプライマーを用いて qRT-PCR 法で確認した (n=4 数値は各群の平均±標準誤差で示す) (図 14 A・B)。

このことより、推定している PRE 領域を含む DNA 断片が沈降していることから、同部位に PRE が存在することが示唆された。

図 14  
A



B

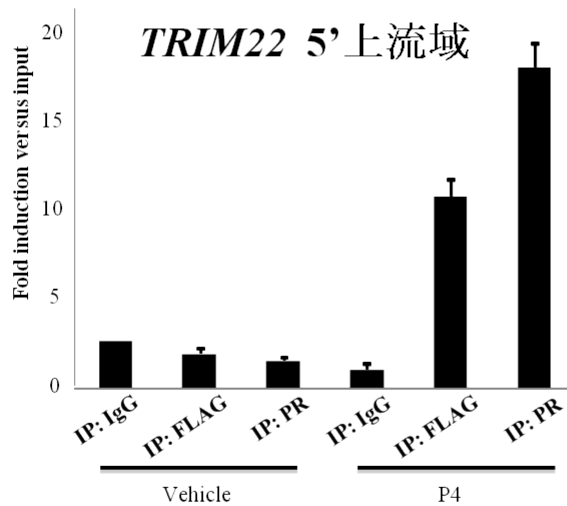


図 14 クロマチン免疫沈降法による TRIM22 遺伝子 PRE 候補領域と PR の結合の確認

A FKBP51 の PRE 領域を用いた ChIP アッセイの結果

Ishikawa 細胞に FLAG タグを付加した PRA を発現させた Ishikawa-PRA #15 株に Vehicle ならびに P4 添加した細胞を用いて、ChIP アッセイを行った。抗 FLAG 抗体ならびに抗 PR 抗体を用いた免疫沈降により FKBP51 の PRE 領域において P4 添加に伴う PRE への PR のリクルートが確認された。(n=4 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

B TRIM22 の 5' 上流域 PRE を用いた ChIP アッセイの結果

TRIM22 の 5' 上流域においても FKBP51 の PRE 領域と同様に TRIM22 PRE 候補領域において P4 添加に伴う PRE への PR のリクルートが確認された。(n=4 バーは各群の平均±標準誤差で示す。)

## 考察

本研究では、妊娠の成立・維持にとって非常に重要なホルモンとされているプロゲステロンの、生体内でのプロゲステロンレセプターを介した分子生物学的な遺伝子制御機構を解明することを目的とした。子宮内膜由来細胞株である Ishikawa 細胞株を標準細胞株として用いたマイクロアレイ法により、プロゲステロン応答遺伝子の候補遺伝子を 15 個抽出した (図 7)。これらの遺伝子は、全てプロゲステロン応答性を有しており、これら 15 遺伝子について詳細な機能を調べることで、子宮におけるプロゲステロン応答遺伝子の役割・作用機序にどのような関わりを持っているかを考察した。

今回特に詳細に解析した TRIM22 は、TRIM (Tripartite Motif-containing Protein) family に属し、442 アミノ酸の蛋白質をコードする遺伝子である。またの名を STIMULATED TRANS-ACTING FACTOR, 50-KD (; STAF50) という。11p15.4 に存在し、ほぼすべての臓器に高発現している。TRIM family とは、N 末端より RING (Really Interesting New Gene) ドメイン、B-BOX ドメイン、Coiled-coil ドメインを含む蛋白質群であり、ヒトでは 70 種類近くある。E3 ユビキチンリガーゼ活性を持ち、E2 enzyme UbcH5B を用いて自身をユビキチン化することができる。癌や白血病に関連する TRIM Family として、PML (白血病) や EFP (乳癌) や TRIM32 (頭頸部癌) などが報告されている [18]。2001 年にはレイモンドらによって TRIM22 を含めた TRIM



family が同定された [19]。ヒトでは TRIM22 は、11 番染色体の中で TRIM5α/6/34 とクラスターを形成するが、TRIM22 は真獣類哺乳動物が進化して以降のジュラ紀から白亜紀ころに登場したと推定されており、哺乳類でも犬は TRIM22 遺伝子を持っているが、牛やマウスは TRIM22 遺伝子を持っていない [20]。そのため、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスは作成されていない。

TRIM22 遺伝子の機能として、Efp / TRIM25 とともにインターフェロンで誘導され抗ウイルス作用を持つ遺伝子として知られている。HIV 感染細胞においてインターフェロンの抗ウイルス作用に関与するとの報告がなされて以降 [20]、HIV のみならず EMCV (encephalomyocarditis virus)、HBV (hepatitis B virus)、HCV (hepatitis C virus)、Influenza A Virus の感染との関係も次々報告されている [21-24]。

またイントロン 1 に p53 応答部位が同定されており、p53 の標的遺伝子として細胞の分化増殖にも影響を及ぼしていると考えられている [25]。

以上、乳がん細胞株において既知のプロゲステロン応答遺伝子であった TRIM22 に特に着目して詳細に述べたが、それ以外の 14 遺伝子については、位置・発現部位・機能・ノックアウトマウスの報告の有無と表現型・疾患との関連について表 4 にまとめた。以下にそれらの機能を中心に簡単に述べる。

ADAMTS9 は、ADAMTS ファミリーの一つである。ADAMTS ファミリーはヒトでは 19

個同定されているプロテアーゼ蛋白質群である。結合組織の形成や血液凝固に関わっており、プロコラーゲンやフォン・ビルブラント因子の処理に必要で、アグリカン・バーシカン・ブレビカンなどの分解活性をもつことが知られている。II型糖尿病との関連も指摘されており [26]、小胞体からゴルジ体への蛋白輸送にもかかわるとされる [27]。

BCL6 がコードするタンパク質は、ジンクフィンガー構造を持つ転写因子であり、N 末端 POZ/ BTB ドメインを含む。転写の配列特異的リプレッサーとして機能し、いくつかの遺伝子応答を調節することが示されている [28]。BCL6 遺伝子はヒトの B 細胞リンパ腫の染色体転座よりクローニングされた遺伝子である。免疫系細胞においては、胚中心 B 細胞に強発現しており、B 細胞による胚中心形成に必須であるが、胚中心 B 細胞でその発現を誘導する刺激物質などは分かっていない。BCL6 は、胚中心 B 細胞における p53 の発現を抑制する [29]。

CST1 は、Cystatin SN をコードする。シスタチンスーパーファミリーは、複数のシスタチン様配列を含むタンパク質を包含し、メンバーうちのいくつかは、活性型のシステインプロテアーゼ阻害作用を持つ [30]。Cystatin SN は、ヒトでは唾液・涙・尿・精液中に分布しシステイン蛋白阻害作用を示す。

FKBP51 は、T リンパ球・胸腺には高発現しており [31]、プロゲステロン受容体複合体や Hsp90 に結合することが知られている [32]。既知のプロゲステロン応答遺伝子であり [9]、本研究においてポジティブコントロールとして用いた。

IL20RA がコードするタンパク質は、インターロイキン 20 (IL20) サイトカインのレセプターである。IL20 は表皮生成の機能をもつと考えられている。IL20 の受容体は、IL20RA と IL20 受容体  $\beta$  (IL20RB) とからなるヘテロ二量体受容体を形成する。IL20RA と IL20RB は強く皮膚に発現しており、両遺伝子は乾癬の患者において発現亢進していることが知られている [33]。また、IL20RA が STAT3 活性を上昇させ、IL26 との相互作用をもつことも知られている [34]。

KRT6A は、2 型ケラチン遺伝子クラスターにある遺伝子のうちの一つで、最も豊富に発現しているアイソフォームである [35]。KRT6A の遺伝子変異は、先天性爪肥厚という常染色体優性遺伝疾患と関連があると考えられている [36]。

PDK4 は、PDK / BCKDK 蛋白質キナーゼファミリーの一つであり、ミトコンドリアに局在する。この遺伝子の発現は、グルココルチコイド、レチノイン酸及びインシュリンによって調節される。PDK4 は代謝を抑制する方向に働き、グルコースのアセチル CoA への変換を減少させることによりクエン酸サイクルや ATP への変換を妨げる [37]。また、複数の細胞株において低酸素状態がオーファン受容体 ERR $\gamma$  を誘導し、その結果 PDK4 の発現誘導をすることも知られている [38]。

PION は、選択的に  $\gamma$ -セクレターゼとその基質の相互作用をおこすメカニズムに関与し、神経毒性アミロイド  $\beta$  の蓄積を引き起こすため、アルツハイマー病の治療標的の可能性も示されている [39]。

PRKX は、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼをコードしている [40]。常染色体優性多発性嚢胞腎疾患で、PRKX の異常発現が報告されている [41]。

PTGER2 はノックアウトマウスが不妊になり、血圧低下を起こすことが報告され [42]、また、ノックアウトマウスの実験から PTGER2 による PGE2 受容体は脊髄炎症性痛覚刺激において重要なシグナル伝達要素であるということも報告されている [43]。

RHOU は、脳・骨格筋・胎盤に高発現し、肝臓・肺・心臓に中等度発現、腸・脾臓・腎臓・小腸には発現が低いことを示している [44]。また Wnt1 の過剰発現では RHOU の発現が上昇することも報告されている。

SEPP1 は、セレノプロテインファミリーの一員で、その一次構造中にセレンがセレノシステインとして組み込まれる [45]。セレンの欠乏症は中国の克山病として知られ、小児の心筋症を引き起こす。特発性肺線維症の患者から樹立した細胞株にて SEPP1 の発現上昇確認された [46]。SEPP1 をノックダウンすることで、脂質水酸化化合物を増大させ、筋線維芽細胞の活性を抑制した。そのため、Kabuyama らは、SEPP1 は酸化ストレスに対する抗アポトーシス因子として機能すると結論づけている。

TFCP2L1 は、479 アミノ酸をコードし、そのタンパク質は 55kD の分子量を持ち、p450scc の転写調節因子としてクローニングされた [47・48]。また、マウスの TFCP2L1 である CRTR1 も p450scc の転写抑制に働くことが確認されている [49]。

TIPARP は、頭頸部扁平上皮癌で特異的に発現上昇する遺伝子として、2003 年に

Katoh らにより同定された [50]。3 つのドメイン (WWE domain, PARP domain, TPH domain) を持ち、TPH domain の N 端には CCCH 型のジンクフィンガーを持つ。

今回プロゲステロン応答遺伝子として同定した 15 遺伝子のうち、私は特に TRIM22 に注目してプロゲステロン応答性について解析を進めた。図 7 と図 9 に示すように P4 添加にて TRIM22 mRNA の発現量が増加し、図 8 に示すように P4 と RU486 同時添加で TRIM22 mRNA の発現量増加が抑制される点、および図 10A に示すように CHX 添加にて P4 による TRIM22 mRNA の発現量増加が変化しなかったことから、TRIM22 は P4 の直接の応答遺伝子であると考えられた。核内受容体の中では PR はグルココルチコイド受容体 (GR) と同様の応答配列を認識して結合すると考えられている。図 10B は P4 と同様にデキサメタゾンが TRIM22 の転写を促進することが示されており、同部位が GRE として機能する可能性が示唆された。

これまで TRIM22 は乳がん細胞株 T47D でプロゲステロン応答性が報告されているが [51]、私は今回初めて子宮内膜由来細胞株を用いて TRIM22 の P4 応答性を示した。

また、データベースサーチにより PRE の位置を予測し、同部位に PR を介した P4 依存性のエンハンサー活性を持つことがレポーターアッセイにて示唆された (図 12・13)。図 13 において、TRIM22 PRE+Promoter の Vehicle 群でも negative control に

比べて上昇傾向にあることについては、何らかの培養液中に存在する内在性リガンド (ステロイドホルモンなど) に影響を受けている可能性が考えられた。

同部位に P4 存在下で PR が結合する PRE が存在することを、クロマチン免疫沈降法を用いてはじめて示した (図 14)。

以上の今回の検討から TRIM22 が子宮におけるプロゲステロン応答遺伝子であることが示されたが、子宮内における TRIM22 の機能についてはまだ不明である。排卵後からプロゲステロンが分泌され、妊娠に至ると胎盤から更にプロゲステロンが産生される。妊娠中では本来は異物である胎児組織が着床し成長するために、免疫寛容の状態となる。前述のように TRIM22 は抗ウイルス作用を持つことが知られており、免疫寛容状態となっている妊娠中に抗ウイルス作用を持つ TRIM22 の発現が促進されることは合目的的と考えられる。

また、プロゲステロンの分泌量が少ない状態が続くと子宮内膜癌のリスクが高くなることが知られている。子宮内膜癌と p53 遺伝子との関連も報告されており [52]、p53 の標的遺伝子でもある TRIM22 と子宮内膜癌との関連についての検討も今後の検討課題として興味深いと思われる。

今後の研究手法を検討するにあたり、前述の通り TRIM22 は代表的な実験動物であるマウスに存在しないため、ヒト由来細胞を用いた実験が主体となると考えられる。

本研究において注意しなければならない点としては、TRIM22 のタンパクレベルでの

実験を行っていない点である。mRNA 発現量としても他の遺伝子と比較すると発現量は少ないため、今後 TRIM22 の生理的な意義を研究するにあたり、タンパクレベルでの実験は必要と考えられるため、今後の検討課題である。

本研究では、子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞におけるプロゲステロン応答遺伝子の網羅的探索と同定を行った。TRIM22 をはじめとする 15 遺伝子を候補遺伝子として同定し、TRIM22 に関してはプロゲステロン応答の調節機構についての解析も行って、5' 上流域に PRE と考えられる部分を発見した。

今後の展望としては、TRIM22 遺伝子の機能解析を行い、子宮での TRIM22 の新たな生理的機能制御機構の発見を目指すことがあげられる。生体内でプロゲステロンが高値となる期間(卵胞期より黄体期、特に妊娠中)での多岐にわたる生理的変化のうち、TRIM22 がどういった役割を担っているのかを検討していく必要があるだろう。

また、TRIM22 以外の 14 遺伝子のプロゲステロン応答の調節機構の解析や、それぞれの遺伝子とプロゲステロンの生理作用との関連、妊娠や子宮内膜癌との関連を検討することが必要であろうと考えられる。

表 4-1

遺伝子名	位置	発現部位	機能	KOマウス	疾患との関連
ADAMTS9 (A Disintegrin-like And Metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9)	3p14.1	卵巣・脾臓・心臓・肺・前立腺など [53] (ヒト・マウス)	結合組織の形成や血液凝固に関わっており、プロローゲンやフォン・ビルブランド因子の処理に必要。卵巣でhCGにより発現上昇する。小胞体からゴルジ体への蛋白輸送にもかかわるとされる [27]	有: 胎生致死となる [54]	II型糖尿病 [26]
BCL6 (B-Cell Lymphoma 6) <ZNF51> <LAZ3>	3q27.3	マウスを臓器において広い範囲にその発現が認められている	ジンプフィンガー構造を持つ転写因子であり、N末端POZ/BTBドメインを含む。転写の抑制特異的リプレッサーとして機能し、いくつもの遺伝子発現を調節することが示されている [28]。胚中心B細胞におけるp53の発現を抑制する [29]。乳腺の管腔細胞でプロゲステロン誘導により発現上昇し、プロラクチンにより発現抑制される	有: 主に心臓と肺に著しい好酸球浸潤を呈することから、BCL6はTh2型炎症に関与する [55]	B細胞リンパ腫 [29]
CST1 (Cystatin 1)	20p11.21	糸では唾液・涙・尿・精液中に分布し、特に顎下腺で最も発現が高く、耳下腺・涙腺・胆嚢では低く、気管ではさらに発現量が低い [56]	Cystatin SN をコードする。複数のシスタチン機配列を含むタンパク質を包含し、メンバーうちのいくつかは、活性型のシステインプロテアーゼ阻害作用を持つ [30]。老化のマーカーとしても注目されている	報告なし	—
FKBP51 (FK506 binding protein 51)	6p21.31	全身のあらゆる組織に発現を認める。特にTリンパ球・胸腺には高発現 [31]	プロゲステロン受容体複合体やHsp90に結合する [32]	報告なし	—
IL20RA (Interleukin 20 Receptor, Alpha)	6q23.3	皮膚に強発現し、乳腺にも発現を認めるが、子宮頸癌での遺伝子発現は少ない ( <a href="http://www.isbm.org/database/index.html">http://www.isbm.org/database/index.html</a> )	インターロイキン20 (IL20) サイトカインのレセプターで、IL20は表皮生成の機能をもつと考えられている。IL20の受容体は、IL20RAとIL20受容体β (IL20RB) とからなるヘテロ二量体受容体を形成する。IL20RAとIL20RBは強く皮膚に発現している [33]。また、IL20RAがSTAT3活性を上昇させ、IL26との相互作用をもつことも知られている [34]	報告なし	皮膚 [33]
KRT6A (Keratin 6A)	12q13.13	手のひらと足の裏の表皮、爪床の上皮細胞、糸状乳頭の上、口腔の粘膜と食道、毛包で高発現が見られる。胎盤でも高発現しており、比較的子宮にも発現が見られるが、卵巣では発現量は低い。KRT6Aは、2型ケラチン遺伝子クラスターにある遺伝子のうちの一つで、最も豊富に発現しているアイソフォームである [35]	不明	有: 複数の外胚葉の異常を伴うとされており、KRT6A欠損マウスでは口腔粘膜の変化を呈する程度であったが、KRT6Bとの二重欠損マウスでは重度の歯齦の萎縮と舌上皮の異常により1週間程度で致死する [57]	先天性爪肥厚 [56]
PK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isoenzyme 4)	7q21.3	ミトコンドリアに局在し、グルコシルコイド、レチノイン酸及びビインシュリンによって発現調節される。心臓・脾臓など比較的広範囲に発現を認めるが、子宮頸癌の発現は少ないと報告されている ( <a href="http://www.isbm.org/database/index.html">http://www.isbm.org/database/index.html</a> )	PK4 / BCKDK 蛋白質キナーゼファミリーの一つであり代謝を抑制する方向に働き、グルコースのアセチルCoAへの変換を減少させることによりクエン酸サイクルやATPへの変換を妨げる [37]。また、複数の細胞株において低酸素状態がオープン受容体ERRαを誘導し、その結果PK4の発現誘導をすることも知られている [38]	報告なし	—



表 4-2

遺伝子名	位置	発現部位	機能	KOマウス	疾患との関連
PION <PIGEON> <GSAP>	7q11.23	広範囲に発現しており、子宮卵巣にも高発現をみる ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ds/track?acc=GSM1000000&amp;org=NCBI&amp;track=Gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ds/track?acc=GSM1000000&amp;org=NCBI&amp;track=Gene</a> )	選択的にγ-セクレターゼとその基質の相互作用をおこすメカニズムに関与し、神経毒性アミロイドβの蓄積を引き起こす [39]	報告なし	アルツハイマー病 [39]
PRKX (Protein Kinase X-linked)	Xp22.33	腎臓をはじめ広範囲に発現が見られる	セリン/スレオニン・プロテインキナーゼをコードしている [40]	報告なし	常染色体優性多発性嚢胞腎疾患 [41]
PTGER2 (Prostaglandin E Receptor 2)	14q22.1	マウス組織のノーザンブロット法にて特に子宮に顕著に発現しており、ほかには膵臓・心臓・胃・回腸でごくわずかに発現を認めるのみである [58]	子宮頸がん(扁平上皮癌・腺癌ともに)でPGE2合成が亢進している [59]	有; 不妊になり、血圧低下を認す [42] また、ノックアウトマウスの実験からPTGER2によるPGE2受容体は脊髄炎症性痛覚刺激において重要なシグナル伝達要素であるということも報告されている [43]	—
RHOU (Ras Homolog Gene Family, Member U) <WRCH1>	1q42.13	脳・骨格筋・筋管に高発現し、肝臓・膵臓・心臓に中等度発現、膵臓・腎臓・小腸には発現が低い [44]	Wnt1の過剰発現ではRHOUの発現が上昇する	報告なし	—
SEPP1 (Selenoprotein P, Plasma, 1)	5p12	SEPP1をノックダウンすることで、脂質水酸化化合物を増大させ、筋線維芽細胞の活性を抑制した	セレンプロテインファミリーの一員で、その一次構造中にセレンがセレンステインとして組み込まれる [45] 酸化ストレスに対する抗アポトーシス因子である	報告なし	セレンの欠乏症は中国の克山病として知られ、小児の心筋症を引き起こす。特発性肺線維症の患者から樹立した細胞株にてSEPP1の発現上昇確認された [46]
TFCP2L1 (Transcription Factor CP2-like 1) <LBP9> <CRTR1>	2q14.2	腎臓・気管・胃腸・唾液腺に高発現し、子宮卵巣にも多くはないが発現は見られる	479アミノ酸をコードし、そのタンパク質は55kDの分子量を持ち、p450cccの転写調節因子としてクローニングされた [47-48] また、マウスのTFCP2L1であるCRTR1もp450cccの転写抑制に働く [49]	報告なし	報告なし
TIPARP (TCDD-Inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase)	3q25.31	ほぼすべての臓器に高発現 頭頸部扁平上皮癌で特異的に発現上昇する遺伝子として、2003年にKatohらにより同定された [50]	3つのドメイン(WWE domain, PARP domain, TPH domain)を持ち、TPH domainのN端にはCCCH型のジンクフィンガーを持つ	報告なし	頭頸部扁平上皮癌

## 謝辞

本研究に際し、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医学部産科婦人科学教室主任教授 藤井知行先生に心より感謝の意を表します。また、終始直接の研究指導を賜りました、ひろいウイメンズクリニック院長（前東京大学医学部産科婦人科学教室助教）廣井久彦先生、聖路加国際病院副院長（前東京大学医学部産科婦人科学教室講師）百枝幹雄先生、東京大学抗加齢医学講座特任講師 浦野友彦先生、東京大学抗加齢医学講座特任教授 井上聡先生に深く感謝いたします。

## 引用文献

- [1] 武谷雄二:プロゲステロンの特集にあたって;*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*. **17(2)**; 10-13: 2010
- [2] 北脇城:プロゲステロン製剤;*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*. **18(2)**; 19-22: 2011
- [3] 金岡毅:CHART 産婦人科 第3版;26-35:2001
- [4] 杉野法広:黄体機能不全;*産科と婦人科増刊号***75suppl.**;29-35:2008
- [5] 武谷雄二:月経の話 歴史・行動・メカニズム 中公新書 15-32:2012
- [6] 武谷雄二:受精と着床;新女性医学体系 **14**;151-163 : 2000
- [7] Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takemura Y, Yano T, Taketani Y.: Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. ; *Hum Reprod.* ;**25(3)**:751-6. 2010
- [8] 平田修二:プロゲステロン受容体の構造と機能 *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*. **8(4)**; 27-35: 2001
- [9] Hubler TR, Denny WB, Valentine DL, Cheung-Flynn J, Smith DF, Scammell JG. : The FK506-Binding Immunophilin FKBP51 is transcriptionally regulated by progestin

and attenuates progestin responsiveness; *Endocrinology*. **144**; 2380-2387: 2003

[10] Zhu LJ, Cullinan-Bove K, Polihronis M, Bagchi MK, Bagchi IC. : Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology*. **139(9)**:3923-34. 1998

[11] Ghizzoni L, Mastorakos G, Vottero A, Barreca A, Furlini M, Cesarone A, Ferrari B, Chrousos GP, Bernasconi S. : Corticotropin-releasing hormone (CRH) inhibits steroid biosynthesis by cultured human granulosa-lutein cells in a CRH and interleukin-1 receptor-mediated fashion. *Endocrinology*. **138(11)**:4806-11. 1997

[12] Gao J, Mazella J, Tang M, Tseng L. : Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* ;**14(12)**:1954-61. 2000

[13] Tsuchiya S, Tanaka S, Sugimoto Y, Katsuyama M, Ikegami R, Ichikawa A.: Identification and characterization of a novel progesterone receptor-binding element in the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2 gene. *Genes Cells.* ;**8(9)**:747-58. 2003

[14] Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. : Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities; *Gene Dev.* **9**; 2266-2278: 1995

- [15] Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. : Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform; *Science*, **289**; 1751-1754: 2000
- [16] Nishida M, Kasahara K, Kaneko M, Iwasaki H, Hayashi K. : Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors ; *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.*;**37(7)**:1103-11. 1985
- [17] DeMarzo AM, Oñate SA, Nordeen SK, Edwards DP. : Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptor. ; *Biochemistry.* ; **31(43)**:10491-501. 1992
- [18] Hatakeyama S.: TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer*; **11(11)**:792-804. 2011
- [19] Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A.: The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.*; **20(9)**:2140-51. 2001
- [20] Tissot C, Mehti N.: Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem.*; **270(25)**:14891-8. 1995
- [21] Eldin P, Papon L, Oteiza A, Brocchi E, Lawson TG, Mehti N.; TRIM22 E3 ubiquitin ligase activity is required to mediate antiviral activity against

encephalomyocarditis virus.:*J Gen Virol.*;**90(Pt 3)**:536-45. 2009

[22] Gao B, Duan Z, Xu W, Xiong S.: Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain.*Hepatology.*;**50(2)**:424-33. 2009

[23] Folkers ME, Delker DA, Maxwell CI, Nelson CA, Schwartz JJ, Nix DA, Hagedorn CH.: ENCODE tiling array analysis identifies differentially expressed annotated and novel 5' capped RNAs in hepatitis C infected liver. *PLoS One.* ; **6(2)**:e14697. 2011

[24] Di Pietro A, Kajaste-Rudnitski A, Oteiza A, Nicora L, Towers GJ, Mehti N, Vicenzi E.: TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation. *J Virol.* ; **87(8)**:4523-33. 2013

[25] Hattlmann CJ, Kelly JN, Barr SD.: TRIM22: A Diverse and Dynamic Antiviral Protein. *Mol Biol Int.*; **2012**:153415. 2012

[26] Boesgaard TW, Gjesing AP, Grarup N, Rutanen J, Jansson PA, Hribal ML, Sesti G, Fritsche A, Stefan N, Staiger H, Häring H, Smith U, Laakso M, Pedersen O, Hansen T; EUGENE2 Consortium.: Variant near ADAMTS9 known to associate with type 2 diabetes is related to insulin resistance in offspring of type 2 diabetes patients. *PLoS One.* ; **4(9)**:e7236.2009

[27] Yoshina S, Sakaki K, Yonezumi-Hayashi A, Gengyo-Ando K, Inoue H, Iino Y,

Mitani S.: Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi. *Mol Biol Cell.* ; **23(9)**:1728-41. 2012

[28] Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. : BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.*; **13(2)**:199-212. 2000

[29] Phan RT, Dalla-Favera R.: The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.*; **432(7017)**:635-9. 2004

[30] Saitoh E, Kim HS, Smithies O, Maeda N.: Human cysteine-proteinase inhibitors: nucleotide sequence analysis of three members of the cystatin gene family. *Gene.*; **61(3)**:329-38. 1987

[31] Baughman G, Wiederrecht GJ, Chang F, Martin MM, Bourgeois S.: Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate calcineurin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* ; **232(2)**:437-43. 1997

[32] Nair SC, Rimerman RA, Toran EJ, Chen S, Prapapanich V, Butts RN, Smith DF.: Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Mol Cell Biol.*; **17(2)**:594-603. 1997

[33] Blumberg H, Conklin D, Xu WF, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Eagan M, Foster D, Haldeman BA, Hammond A, Haugen H, Jelinek L, Kelly JD, Madden K,

- Maurer MF, Parrish-Novak J, Prunkard D, Sexson S, Sprecher C, Waggie K, West J, Whitmore TE, Yao L, Kuechle MK, Dale BA, Chandrasekher YA.: Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell.*; **104(1)**:9-19. 2001
- [34] Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shah NK, Smirnov SV, Anantha S, Dickensheets H, Dumoutier L, Renauld JC, Zdanov A, Donnelly RP, Kotenko SV. : Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol.*; **172(4)**:2006-10. 2004
- [35] Takahashi K, Paladini RD, Coulombe PA.: Cloning and characterization of multiple human genes and cDNAs encoding highly related type II keratin 6 isoforms. *J Biol Chem.*; **270(31)**:18581-92. 1995
- [36] Terrinoni A, Smith FJ, Didona B, Canzona F, Paradisi M, Huber M, Hohl D, David A, Verloes A, Leigh IM, Munro CS, Melino G, McLean WH.: Novel and recurrent mutations in the genes encoding keratins K6a, K16 and K17 in 13 cases of pachyonychia congenita. *J Invest Dermatol.*; **117(6)**:1391-6. 2001
- [37] Rowles J, Scherer SW, Xi T, Majer M, Nickle DC, Rommens JM, Popov KM, Harris RA, Riebow NL, Xia J, Tsui LC, Bogardus C, Prochazka M.: Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem.*; **271(37)**:22376-82. 1996



- [38] Lee JH, Kim EJ, Kim DK, Lee JM, Park SB, Lee IK, Harris RA, Lee MO, Choi HS.: Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERR $\gamma$ . *PLoS One.* : **7(9)**:e46324. 2012
- [39] He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer WJ, Hendrick J, Bettayeb K, Flajolet M, Gorelick F, Wennogle LP, Greengard P.: Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* ; **467(7311)**:95-8. 2010
- [40] Klink A, Schiebel K, Winkelmann M, Rao E, Horsthemke B, Lüdecke HJ, Claussen U, Scherer G, Rappold G.: The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability. *Hum Mol Genet.*; **4(5)**:869-78. 1995
- [41] Li X, Li HP, Amsler K, Hyink D, Wilson PD, Burrow CR.: PRKX, a phylogenetically and functionally distinct cAMP-dependent protein kinase, activates renal epithelial cell migration and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **99(14)**:9260-5. 2002
- [42] Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH.: Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest.* ; **103(11)**:1539-45. 1999
- [43] Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, Pahl A, Brune K,

- Narumiya S, Müller U, Zeilhofer HU.: Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest.* ; **115(3)**:673-9. 2005
- [44] Tao W, Pennica D, Xu L, Kalejta RF, Levine AJ.: Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev.* : **15(14)**:1796-807. 2001
- [45] Hill KE, Dasouki M, Phillips JA 3rd, Burk RF.: Human selenoprotein P gene maps to 5q31. *Genomics.*; **36(3)**:550-1. 1996
- [46] Kabuyama Y, Oshima K, Kitamura T, Homma M, Yamaki J, Munakata M, Homma Y.: Involvement of selenoprotein P in the regulation of redox balance and myofibroblast viability in idiopathic pulmonary fibrosis. *Genes Cells.* ; **12(11)**:1235-44. 2007
- [47] Huang N, Miller WL.: LBP proteins modulate SF1-independent expression of P450scc in human placental JEG-3 cells. *Mol Endocrinol.*; **19(2)**:409-20. 2005
- [48] Huang N, Miller WL.: Cloning of factors related to HIV-inducible LBP proteins that regulate steroidogenic factor-1-independent human placental transcription of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc. *J Biol Chem.*; **275(4)**:2852-8. 2000
- [49] Rodda S, Sharma S, Scherer M, Chapman G, Rathjen P.: CRTR-1, a developmentally regulated transcriptional repressor related to the CP2 family of transcription factors. *J Biol Chem.* : **276(5)**:3324-32. 2001
- [50] Katoh M, Katoh M.: Identification and characterization of human TIPARP gene

within the CCNL amplicon at human chromosome 3q25.31. *Int J Oncol.* ; **23(2)**:541-7.

2003

[51] Sivaramakrishnan G, Sun Y, Tan SK, Lin VC.: Dynamic localization of tripartite motif-containing 22 in nuclear and nucleolar bodies.; *Exp Cell Res.* ; **315(8)**:1521-32.

2009

[52] González-Rodilla I, Verna V, Muñoz AB, Estévez J, Boix M, Schneider J.: Expression of the apoptosis-related genes Bcl-2 and p53 in clinical samples from endometrial carcinoma patients.; *Anticancer Res.*; **31(12)**:4191-3. 2011

[53] Somerville RP, Longpre JM, Jungers KA, Engle JM, Ross M, Evanko S, Wight TN, Leduc R, Apte SS.: Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem.*;

**278(11)** :9503-13. 2003

[54] Silver DL, Hou L, Somerville R, Young ME, Apte SS, Pavan WJ.: The secreted metalloprotease ADAMTS20 is required for melanoblast survival. *PLoS Genet.* ;

**4(2)**:e1000003.2008

[55] Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C,

Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS, Rothman P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R.: The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type

inflammation. *Nat Genet.* ; **16(2)**:161-70. 1997

[56] Dickinson DP, Thiesse M, Hicks MJ.: Expression of type 2 cystatin genes  
CST1-CST5 in adult human tissues and the developing submandibular gland. *DNA Cell  
Biol.*; **21(1)**:47-65. 2002

[57] Wojcik SM, Longley MA, Roop DR.: Discovery of a novel murine keratin 6 (K6)  
isoform explains the absence of hair and nail defects in mice deficient for K6a and K6b.  
*J Cell Biol.*; **154(3)**:619-30. 2001

[58] Sugimoto Y, Narumiya S.:Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.*; **282(16)**:11613-7.  
2007

[59] Sales KJ, Katz AA, Davis M, Hinz S, Soeters RP, Hofmeyr MD, Millar RP, Jabbour  
HN.: Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) synthesis are up-regulated in  
carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell  
function via EP2/EP4 receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* ; **86(5)**:2243-9. 2001

