

審査の結果の要旨

氏名 齋藤 真由子

本研究は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 (Progesterone receptor) 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い、下記の結果を得ている。

1. 子宮内膜由来細胞株である Ishikawa 細胞を用いて PR-A および PR-B 安定発現細胞株を2株ずつ作成し、定量的 RT-PCR 法および Western blot 法を用いて安定発現細胞株の樹立を確認した。作成した細胞株を用いて、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、PR-A 安定発現細胞株 2 クローンで 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。(ADAMTS9・BCL6・CST1・FKBP51・IL20RA・KRT6A・PDK4・PION・PRKX・PTGER2・RHOA・SEPP1・TFCP2L1・TIPARP・TRIM22) また、同様に作成した PR-B 安定発現細胞株のマイクロアレイ法を用いた解析では、2 クローンで 1.4 倍以上に発現上昇した遺伝子は 16 遺伝子認められた。
2. 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。さらにプロゲステロンアンタゴニストである RU486 を P4 と同時に添加して qRT-PCR 法を行い、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。
3. その後の実験では、特に 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 Progesterone Responsive Element (PRE) が存在する TRIM22 遺伝子に着目した。qRT-PCR 法を用いて、TRIM22 の P4 添加後のタイムコースを検討したところ、12 時間後に最大ピークを迎えることが示された。次に、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 法を行ったところ、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。また TRIM22 のデキサメタゾン添加による発現誘導を qRT-PCR 法により確認したところ、やはり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。さらに、PR 陽性乳がん細胞株 T47D における P4 応答性を qRT-PCR 法にて検討し、TRIM22 は T47D における発現上昇も示された。

4. データベースサーチにより TRIM22 遺伝子の PRE の位置を予測した。PRE のコンセンサス配列と比して 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。
5. TRIM22 遺伝子 5' 上流域 (PRE 領域)を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、P4 添加により 3 倍程度の転写活性の上昇が示された。一方、PRE 領域に変異を入れた ルシフェラーゼアッセイでは転写活性の上昇が認められなかった。また、TRIM22 遺伝子の PRE 領域のみをクローニングし、その下流に SV40 プロモーターを結合させたプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイでは、P4 添加により 2 倍以上の転写活性の上昇を認め、このプラスミドの TRIM22 遺伝子の PRE 領域に変異を導入したプラスミドでは転写活性の上昇を認めなかった。以上より、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。
6. TRIM22 遺伝子の 5' 上流域に 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ところ、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。

以上、本論文は子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞を用いてプロゲステロン応答性を有する 15 遺伝子を同定し、特に TRIM22 遺伝子においてはデータベースサーチにより PRE の位置を予測した。同部位にレポーターアッセイにて P4 依存性のエンハンサー活性を持つことを明らかにし、クロマチン免疫沈降法を用いて P4 存在下で PR が結合する PRE が存在することを示した。本研究は、子宮におけるプロゲステロン応答遺伝子の転写制御機構を解明すること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。