慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | Involvement of Histone Acetylation in Ovarian Steroid-induced Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. |
| Sub Title | 卵巣性ステロイドホルモンにより誘導される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 |
| Author | 酒井, のぞみ |
| Publisher | 慶應医学会 |
| Publication year | 2004 |
| Jtitle | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.43- |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 号外 |
| Genre | Journal Article |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041202-0043 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Involvement of Histone Acetylation in Ovarian Steroid-induced Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells.

（卵巣性ステロイドホルモンにより誘導される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）

酒　井　　の　ぞ　み

## 内容の要旨

ヒストンアセチル化酵素（histone acetyltansferase：HAT）と脱アセチル化酵素（histone deacetylase：HDAC）は、核構造蛋白コアヒストン（H2A，H2B，H3，H4）のアセチル化・脱アセチル化を介して転写活性の制御を行っている。一方、脱落膜化現象は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に続いてプロゲステロンの作用によって引き起こされ、妊娠の成立（着床）・維持にとってきわめて重要である。増殖・分化（脱落膜化）・剥脱を繰り返す子宮内膜では、特異的かつ周期的なエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が強く示唆される。本研究では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。

ヒト子宮内膜組織より腺細胞ならびに間質細胞を分離した後、特異的HDAC阻害剤（trichostatin A；TSA）、卵巣ステロイド（17β-estradiol+progesterone；$E_2$+$P_4$）の存在下または非存在下にて培養した後RNAを抽出し、脱落膜化マーカーであるinsulin-like growth factor binding protein 1（IGFBP-1）およびprolactin（PRL）、その他にmatrix metalloproteinase-2（MMP-2）のmRNAの発現をRT-PCR、Competitive RT-PCR、Northern blotにて解析した。ヒストンを抽出し、ヒストンのアセチル化状態とそのアセチル化部位を、AUT gel解析ならびにアセチル化ヒストン抗体を用いたWestern blotにより解析した。さらに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 Immunoprecipitation Assay）によりIGFBP-1プロモーター領域のヒストンのアセチル化状態の検討を行った。IGFBP-1およびPRL mRNAは$E_2$+$P_4$添加により発現が誘導され、TSA（10～500ng/ml）との同時添加により濃度依存性かつ相乗的にその増強を認めた。MMP-2では発現量に変化は認めなかった。TSA単独、$E_2$+$P_4$、同時投与のいずれにおいても脱落膜化様形態変化を認めた。一方、腺細胞ではいずれの処置によってもIGFBP-1の発現誘導および形態変化は認められなかった。AUT gel解析ならびにWestern blotにおいてH3およびH4が$E_2$+$P_4$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の増強が認められた。ChIP assayでは$E_2$+$P_4$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のヒストンH4がアセチル化され、それはTSAにより増強されることが示された。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間質細胞の分化を促進することが示された。以上のことより、子宮内膜脱落膜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。

## 論文審査の要旨

ヒト子宮内膜は、卵巣ステロイド反応性に脱落膜化と称される分化を遂げ、妊娠維持に機能する。本研究では、ヒト子宮内膜間質の初代培養細胞を用いて、世代継承に重要なこの過程における、遺伝子転写機構を担うヒストンアセチル化の関与について基礎的解析を行うと同時に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACI）の分化誘導剤への臨床応用の可能性につき検討を行った。その結果、特異的HDACI（trichostatin A；TSA）を培養子宮内膜間質細胞に添加することで人為的にアセチル化を起こしうることを示し、アセチル化ヒストン特異抗体を用いた解析において、アセチル化の標的となるヒストンとそのリジン残基も同定した。また、TSAによる脱落膜化誘導を形態学的変化および脱落膜化に伴い発現上昇する蛋白IGFBP-1およびプロラクチンの発現誘導の２点において示した。さらにChIPアッセイを用いることで、卵巣ステロイドによりIGFBP-1プロモーターの一部であるプロゲステロン応答領域のヒストンH4がアセチル化されるという分子機序を明らかにし、この効果がTSAにより増強されることを示した。

審査ではまず、脱落膜化について質問がなされた。これに対し、脱落膜化は組織形態変化にとどまらない、細胞レベルでの間質細胞に限局した形態的・機能的分化を意味し、妊娠維持に必須である旨回答された。次に、HDACIとしてTSAを用いた理由について質問がなされたが、TSAが他のHDACIより低濃度（nMレベル）で効果を及ぼす点、反応が可逆的である点等から基礎研究で頻用される代表的なHDACIであるため選択したものと回答された。また、間質細胞と腺細胞の鑑別方法について質疑がなされた。これに対し、純度の高い間質細胞を得るために確立した分離・純化行程について説明がなされ、蛍光免疫染色による判定で純度は95%以上であったと回答された。さらに、ヒストンアセチル化解析に用いられたAUTゲル、ChIPアッセイについての方法論に関しても質疑応答が行われた。Western blotにおいて使用したアセチル化リジン特異抗体について、ペプチド免疫源由来の抗体を使用する際の非特異反応への考慮につき助言がなされた。HDACIの新規分化療法剤としての臨床応用として、内膜機能不全不妊症の他に子宮内膜症・子宮内膜癌を標的とする場合の検討すべき課題、細胞レベルから組織レベルに解析をステップアップするための組織培養、さらにヒストンアセチル化酵素の候補として考察に挙げたSRC-1とCBP/p300の実際の検討なども行うべきである旨助言が与えられた。

本研究は、上記検討課題は残るものの、初代培養を用い子宮内膜脱落膜化の分子機序にヒストンアセチル化が深く関与していることを初めて明らかにした点で、今後の臨床応用も含め価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　吉村　泰典
　　医化学　末松　　誠　　病理学　岡田　保典
発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：北島　政樹、末松　誠
　　審査委員長：末松　誠

試問日：平成16年10月12日