

(様式 3 号)

学 位 論 文 の 要 旨

氏名 品川 征大

〔題名〕

C/EBP β regulates *Vegf* gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats.

(ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う *Vegf* 遺伝子発現は C/EBP β が制御している)

〔要旨〕

(目的) 卵巣の顆粒膜細胞では、黄体形成ホルモン (LH) が一過性に放出される LH サージ後の黄体化に伴い、*Vegf* 遺伝子発現が急速に増加する。*Vegf* は黄体形成過程の急速な血管新生に関わる重要な細胞増殖遺伝子である。この *Vegf* 発現変化における転写調節機構について、その転写調節に関与することが知られている転写因子 HIF1 α と C/EBP β に着目し検討した。

(方法) 3 週齢雌ラットに eCG-hCG 投与による過排卵刺激を行い、hCG 投与前 (0 h) と投与後 4、8、12、24 h の黄体化顆粒膜細胞を回収し、*Vegf* mRNA 発現変化を検討した。続いて 0 h、12 h 後に回収した顆粒膜細胞を用いて、HIF1 α と C/EBP β の蛋白質発現変化、*Vegf* 遺伝子プロモーター領域における HIF1 α と C/EBP β の結合 (ChIP assay)、C/EBP β 結合配列および HIF1 α 結合配列の変異挿入による転写活性の変化 (Luciferase assay) を調べた。また、それぞれの転写因子のノックダウンによる *Vegf* 遺伝子発現の変化も調べた。さらにヒストン修飾変化 (ChIP assay) とクロマチン構造変化 (FAIRE-qPCR) についても検討した。

(結果) *Vegf* mRNA 発現は hCG 投与後より漸増し 12 h でピークとなった。C/EBP β と HIF1 α の蛋白質発現はいずれも 12 h で増加した。C/EBP β の *Vegf* プロモーター領域への結合は 12 h で有意に増加したが、HIF1 α の結合は変化しなかった。C/EBP β 結合配列の欠失により転写活性は抑制されたが、HIF1 α 結合配列の変異挿入は転写活性に変化を与えなかった。また、C/EBP β のノックダウンにより *VEGF* 遺伝子発現は抑制された。*Vegf* プロモーター領域において、転写抑制に働くヒストン修飾 H3K9me3 と H3K27me3 は減少していた。

(結論) ラット顆粒膜細胞の黄体化による *Vegf* 遺伝子発現の増加は、C/EBP β が *Vegf* プロモーター領域に結合することにより調節されていることが判明した。さらに、C/EBP β 結合配列周囲のヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を介した転写調節機構も関与していることが示唆された。

作成要領

1. 要旨は、800 字以内で、1 枚でまとめること。
2. 題名は、和訳を括弧書きで記載すること。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1535 号	氏 名	品川 征大
論文審査担当者	主査教授	中井 彰	
	副査教授	谷澤 章生	
	副査教授	杉野 法広	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
C/EBP β regulates <i>Vegf</i> gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats. (ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う <i>Vegf</i> 遺伝子発現は C/EBP β が制御している)			
学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
C/EBP β regulates <i>Vegf</i> gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats. (ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う <i>Vegf</i> 遺伝子発現は C/EBP β が制御している)			
掲載雑誌名 Scientific Reports			
第9巻 P.714 (2019年1月 掲載 ・掲載予定)			
(論文審査の要旨)			
<p>(目的) 卵巣の顆粒膜細胞では、黄体形成ホルモン (LH) が一過性に放出される LH サージ後の黄体化に伴い、<i>Vegf</i> 遺伝子発現が急速に増加する。<i>Vegf</i> は黄体形成過程の急速な血管新生に関わる重要な細胞増殖遺伝子である。この <i>Vegf</i> 発現変化における転写調節機構について、その転写調節に関与することが知られている転写因子 HIF1α と C/EBPβ に着目し検討した。</p> <p>(方法) 3週齢雌ラットに eCG-hCG 投与による過排卵刺激を行い、hCG 投与前 (0 h) と投与後 4、8、12、24 h の黄体化顆粒膜細胞を回収し、<i>Vegf</i> mRNA発現変化を検討した。続いて 0 h、12 h 後に回収した顆粒膜細胞を用いて、HIF1α と C/EBPβ の蛋白質発現変化、<i>Vegf</i> 遺伝子プロモーター領域における HIF1α と C/EBPβ の結合 (ChIP assay)、C/EBPβ 結合配列および HIF1α 結合配列の変異挿入による転写活性の変化 (Luciferase assay) を調べた。また、それぞれの転写因子のノックダウンによる <i>Vegf</i> 遺伝子発現の変化も調べた。さらにヒストン修飾変化 (ChIP assay) とクロマチン構造変化 (FAIRE-qPCR) についても検討した。</p> <p>(結果) <i>Vegf</i> mRNA 発現は hCG 投与後より漸増し 12 h でピークとなった。C/EBPβ と HIF1α の蛋白質発現はいずれも 12 h で増加した。C/EBPβ の <i>Vegf</i> プロモーター領域への結合は 12 h で有意に増加したが、HIF1α の結合は変化しなかった。C/EBPβ 結合配列の欠失により転写活性は抑制されたが HIF1α 結合配列の変異挿入は転写活性に変化を与えなかった。また、C/EBPβ のノックダウンによりヒト顆粒膜細胞株での <i>VEGF</i> 遺伝子発現は抑制された。さらに、<i>Vegf</i> プロモーター領域において、転写抑制に働くヒストン修飾 H3K9me3 と H3K27me3 は減少していた。</p> <p>(結論) ラット顆粒膜細胞の黄体化による <i>Vegf</i> 遺伝子発現の増加は、C/EBPβ が <i>Vegf</i> プロモーター領域に結合することにより調節されていることが判明した。さらに、C/EBPβ 結合配列周囲のヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を介した転写調節機構も関与していることが示唆された。</p>			
<p>本研究成果は、黄体形成過程の <i>Vegf</i> 遺伝子発現の転写調節機構を明らかにしたものであり、また新規の不妊治療に繋がるものでもあり、学位論文として価値あるものと認めた。</p>			