

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)

品川 征大

山口大学大学院医学系研究科 情報解析医学系専攻 産科婦人科学分野

2019年1月

目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	5
【結果】	9
【考察】	16
【謝辞】	19
【参考文献】	19

【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。

【研究の背景と目的】

卵巣では排卵を契機に、卵胞とは形態学的に異なる実質器官である黄体が非常に短期間の間に形成される。黄体はプロゲステロンを合成することで、妊娠の成立・維持に貢献している臓器である。このプロゲステロン合成のためには、基質であるコレステロールが黄体細胞に供給される必要がある。また、合成されたプロゲステロンが血中に放出される必要がある。以上より、黄体内には発達した血管網の構築が必要である。排卵を惹起する LH サージの前には血管は内荏膜細胞層のみに限局して見られるが、LH サージ後に内荏膜細胞層と顆粒膜細胞層の間にある基底膜が融解するとともに、血管内皮細胞が無血管領域である顆粒膜細胞層へ侵入・増殖し、非常に短期間で黄体の血管網が構築される (1)。これにより黄体は血管に富んだ臓器となる。この血管網の構築には、既存の血管の血管内皮細胞から血管が形成される血管新生が重要である (2、3)。

これまでに黄体化過程の血管新生に関わる因子は多数特定されており、そのひとつに Vascular endothelial growth factor (VEGF) がある (4)。VEGF は、ラットやマウス、ヒトの黄体で発現しており、黄体形成過程における血管内皮細胞の増殖と血管新生に寄与することが知られている (5)。つまり、*VEGF* は血管新生を介して黄体形成に働く重要な遺伝子と言える (6、7)。LH サージ後の黄体化過程にある顆粒膜細胞では、*VEGF* 遺伝子発現が増加することはすでに示されているが、この *VEGF* 遺伝子発現を制御する詳細な転写調節機構は未だ解明されていない (8)。

VEGF 遺伝子の転写調節に関わる転写因子として、hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF1 α) がよく知られている。HIF1 α は低酸素条件下で発現が誘導され、*VEGF* 遺伝子発現を増加させることが多くの細胞で示されている (9-11)。黄体化過程の顆粒膜細胞でも HIF1 α は増加することが報告されている (10)。しかしこの HIF1 α 増加が *VEGF* 遺伝子発現増加に関与しているかは未だ明らかではなく、黄体化における *VEGF* 遺伝子の転写調節機構は未だ明らかにされていない。

CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) は排卵やそれに引き続いておこる黄体化を制御する転写因子である (12、13)。C/EBP α と C/EBP β のノックアウトマウスでは、

血管新生に関わる遺伝子発現が抑制され、黄体の血管新生が抑制されることが報告されている (12)。これらの知見から我々は黄体化過程の顆粒膜細胞において C/EBP β も VEGF 遺伝子発現を制御している転写因子の候補の一つと考えた。

また、遺伝子発現の調節には、転写因子だけでなくエピジェネティックなメカニズムも関わっている (14-16)。ヒストン修飾はその一つであり、遺伝子プロモーター領域やエンハンサー領域のクロマチン構造を変化させることでプロモーター領域への転写因子の結合に重要な役割を果たしている (17-19)。我々はラット顆粒膜細胞の黄体化過程において、ヒストン修飾やクロマチン構造変化が Steroidogenic acute regulatory protein (*Star*)、aromatase (*Cyp19a1*)、cytochrome P450 cholesterol side-chain enzyme (*Cyp11a1*) の遺伝子発現に関与していることを報告している (13、20、21)。これらの遺伝子と同様に VEGF 遺伝子発現も転写因子のみならずエピジェネティックなメカニズムで調節されている可能性が考えられる。

本研究では、黄体化過程のラット顆粒膜細胞における、*Vegf* 遺伝子発現への HIF1 α と C/EBP β の関与を解明するとともに、エピジェネティックな転写調節機構の関与も明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 検体採取

3 週齢の雌 Sprague Dawley rat (Japan SLC、Hamamatsu、Japan) を用いて、equine chorionic gonadotropin (eCG) (Sigma、St. Louis、MO) を 15 単位皮下注射し、卵胞発育を促した。その 48 時間後に LH サージとして human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma) を 15 単位皮下注射して排卵刺激を行った。hCG 投与前 (0 時間)、投与後 4、8、12、24 時間後の卵巣から黄体化顆粒膜細胞を回収し、後述の実験に供した。本研究は山口大学医学部の施設内動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. 細胞培養

ヒト顆粒膜細胞腫の細胞株である KGN 細胞 (Nikon, Tokyo, Japan) は DMEM/Ham's F-12 メディウムを用いて培養を行った。

3. Quantitative real-time PCR

黄体化顆粒膜細胞から RNeasy Mini (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) を用いて total RNA の抽出を行い、過去の報告通り RT 反応 (22) を行い、Real-time qPCR を施行した (23, 24)。Real-time qPCR 機器は LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を使用した。プライマーセットは表1 に示す。

4. Western blotting 法

Western blotting 法は過去に報告している方法 (18, 25) をもとに、細胞から蛋白質を抽出して SDS-PAGE を行い、メンブレンに転写を行った。その後、C/EBP β 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、HIF1 α 抗体 (Novus Biologicals, USA)、Histone H3 抗体 (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan) を用いて 抗原抗体反応を行った (表2)。Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent と hyperfilm-ECL (GE health care UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いてバンドの検出を行った。ImageJ を用いてバンドの定量を行った。

5. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

ヒストン修飾変化、転写因子の結合を調べるため、過去に報告した方法 (26) に若干の修正を加えて ChIP assay を行った。顆粒膜細胞を回収し、1% ホルムアルデヒドを用いて 10 分間室温でインキュベーションした。0.125 M グリシンを添加し反応を止めた。酵素処理を行いクロマチンの断片化を行った後にクロマチン溶液を調整した。このうち、2% を INPUT DNA として保存した。免疫沈降反応には以下の抗体を使用した: H3K4me3 (Upstate Biotechnology, Lake placid, NY, USA)、H3K9me3 (Abcam, Cambridge, UK, USA)、H3K27me3 (東京工業大学、木村宏先生より供与)、enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) (Cell

Signaling Technology)、C/EBP β 、HIF1 α 、normal rabbit IgG (Cell Signaling Technology) (表2)。免疫沈降産物を溶出した後、65°C で一晩インキュベーションすることで脱クロスリンクを行い、その後DNAを回収した。相対的定量には、Real-time qPCR を用いた。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。プライマーセットは表1 に示す。

6. siRNA を用いたノックダウン

siRNA のトランスフェクションは過去の報告通り行った (27)。Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を使用し、KGN 細胞にトランスフェクションを行った。その 24 時間後に、ジブチル cAMP (0.5 mM) (Sigma) の添加、無添加で、24 時間培養を行った。

7. Luciferase assay

ラット *Vegf* 遺伝子の 5 末端領域の 3 つのコンストラクトを表 1 のプライマーセットを用いて作成した。1) C/EBP β と HIF1 α 結合配列の両方を含む (-1171 bpから+115 bp)、2) C/EBP β 結合配列を欠失させたもの (-976 bpから+115 bp)、3) 4つの HIF1 α 結合配列に変異を加えたもの (-1171 bpから+115 bp)。これらのコンストラクトを pGL3b 基本ベクターに挿入した。レポーター解析を行うために KGN 細胞を 24-well プレート (7×10^4 cells/well) で 24 時間培養し、コンストラクトを 170 ng とインターナルコントロールとして pRL-TK ベクター 30 ng を Lipofectamine 3000 を用いて過去の報告と同様にトランスフェクションを行った (20)。トランスフェクション 24 時間後に ジブチル cAMP (0.5 mM) の添加、無添加で 24 時間処理し、Luciferase 活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて過去の報告のように測定した (20)。C/EBP β ノックダウン条件下の Luciferase assay は過去の報告のように行った (28)。-1171 bp から+115 bp のコンストラクトと siRNA (C/EBP β siRNA または non-targeting siRNA) を同時にトランスフェクションした。その後、KGN 細胞を cAMP 添加、無添加で処理したのちに解析を行った。

8. FAIRE-qPCR

Vegf 遺伝子プロモーター領域のうち C/EBP β 結合領域周囲のクロマチン構造の変化を調べるため、FAIRE-qPCR を過去の報告 (29、30) に若干の修正を加えて行った。顆粒膜細胞を 1% ホルムアルデヒドを用いて 10 分間室温でインキュベーションした。0.125 M グリシンを添加し反応を止めた。10% をINPUT として保存した。続いてソニケーションを行いクロマチンの断片化を行ってクロマチン溶液の調整を行った。DNA を精製し、得られた DNA と INPUT から得られた DNA を Real-time qPCR に供した。ChIP assay で用いたものと同じプライマーセットで Real-time qPCR を行い、FAIRE enrichment を計算した。

9. 統計処理

統計学的有意差の検討は、2 群間の比較検討では t 検定を用いた。多群間の検定では、まず One way ANOVA を行い、その後 Tukey-Kramer 解析による多重比較検討を行った。P < 0.05 を有意差ありとした。全ての検討は SPSS を用いて行った。

【結果】

1. ラット顆粒膜細胞の黄体化過程における *Vegf* mRNA 発現変化

hCG を投与して黄体化を誘導した卵胞から経時的に顆粒膜細胞を回収し、*Vegf* mRNA発現を Real-time qPCR 法を用いて解析した。*Vegf* mRNA 発現は hCG 投与後に増加し、hCG 投与後 12 時間でピークとなった (図1)。

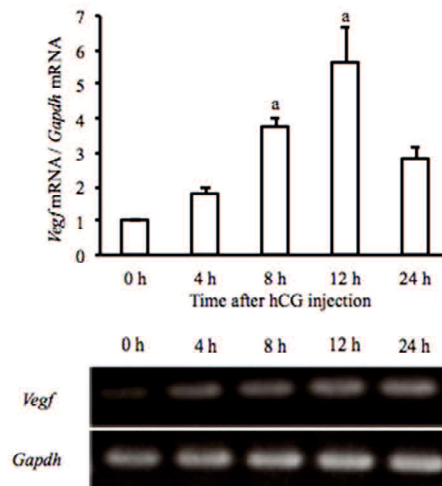


図1. ラット顆粒膜細胞の黄体化過程における *Vegf* mRNA 発現変化

3 週齢幼若雌ラットに eCG を 15 単位、その 48 時間後に hCG 15 単位を皮下投与し、hCG 投与前 (0 時間)、4、8、12、24 時間後の卵巣から顆粒膜細胞を回収し、*Vegf* mRNA の発現変化を real-time RT-PCR 法で検討した。内部コントロール遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を用いて補正した。値は mean \pm SEM (n=6)、a: $P < 0.05$ vs 0 h。2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

2. 黄体化過程のラット顆粒膜細胞における C/EBP β 、HIF1 α の蛋白質発現変化

C/EBP β と HIF1 α の蛋白質発現が hCG 投与後の顆粒膜細胞で上昇するか Western blotting 法を用いて検討した。C/EBP β (図 2A)、HIF1 α (図 2B) 蛋白質発現は hCG 投与前から発現しており、hCG 投与後に有意に増加した。

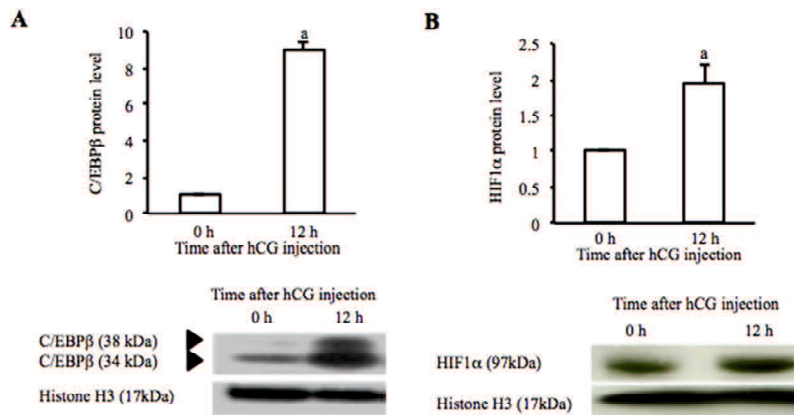


図2. 黄体化過程のラット顆粒膜細胞における C/EBP β 、HIF1 α の蛋白質発現変化

eCG 投与後のラットを用いて、hCG 投与前 (0 h)、hCG 投与 12 時間後 (12 h) の卵巣から顆粒膜細胞を回収した。顆粒膜細胞のライセートを使用し、Western blotting 法を用いて検討した。内部コントロールとして Histone H3 を用いた。ImageJ を用いてバンドの定量を行った。値は mean \pm SEM (n=3)、a: P<0.05 vs 0 h。

3. 顆粒膜細胞における C/EBP β 、HIF1 α の *Vegf* 遺伝子プロモーター領域への結合変化

DNA 塩基配列から転写因子結合領域を予測する JASPAR データベースを用いて *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の転写因子結合配列を検索したところ、C/EBP β (-1115 bp から-1106 bp)、HIF1 α (-913 bp から-906 bp、-714 bp から-707 bp、-434 bp から-423 bp) の転写因子結合配列を同定した (図 3A)。hCG 刺激により *Vegf* 遺伝子プロモーター領域への C/EBP β 、HIF1 α の結合が増加するかを ChIP assay を用いて検討した。ChIP primer は結合配列の周辺に設計した (図 3A、表 1)。*Vegf* 遺伝子プロモーター領域への C/EBP β の結合は hCG 投与後 12 時間で有意に増加した (図 3B)。一方、HIF1 α の結合は増加しなかった (図 3C)。これらの結果から、ラット顆粒膜細胞の黄体化過程において、HIF1 α ではなく C/EBP β がプロモーター領域に結合することで *Vegf* 遺伝子発現を制御していることが示された。

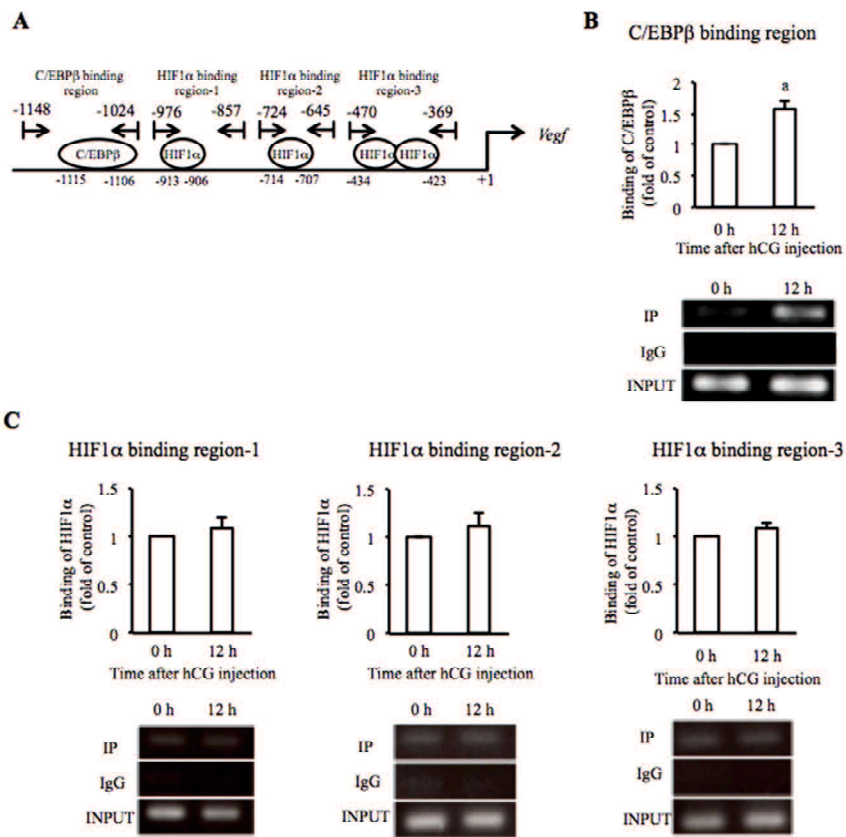


図3. 顆粒膜細胞における C/EBPβ、HIF1α の *Vegf* 遺伝子プロモーター領域への結合変化

A 転写因子結合配列。ChIP assay 用 primer を C/EBPβ 結合領域周囲 (-1148 bp から -1024)、HIF1α 結合領域 (-976 bp から -857 bp ; HIF1α binding region-1、-724 bp から -645 bp ; HIF1α binding region-2、-470 bp から -369 bp ; HIF1α binding region-3) を設計した。*Vegf* 近位プロモーター領域の C/EBPβ (B)、HIF1α (C) の結合を ChIP assay にて解析した。hCG 投与前 (0 h)、hCG 投与 12 時間後 (12 h) の顆粒膜細胞を用いた。Real-time qPCR を用いて測定し、IP/INPUT 比を計算した後、0 h との比をとった (方法参照)。値は mean ± SEM (n=3) で表示した。a: P<0.05 vs 0 h。2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

4. C/EBPβ ノックダウンにおける VEGF mRNA 発現への影響

C/EBPβ 結合領域の *Vegf* 遺伝子発現への関与を詳細に検討するため、siRNA を用いて C/EBPβ のノックダウンを行った。顆粒膜細胞はノックダウン効率が悪いので、黄体化の研究で広く使用されている KGN 細胞 (ヒト顆粒膜細胞腫由来細胞株) を使用した (31)。KGN 細胞は hCG 刺激に反応しないが、hCG のセカンドメッセンジャーである cAMP を投与することで KGN 細胞の黄体化を誘導することが可能である (28、31)。まず cAMP 刺激を行うことでラット顆粒膜細胞の黄体化と同様に *VEGF* mRNA が上昇することを確認した (図 4A)。siRNA を用いて C/EBPβ のノックダウンを行い、C/EBPβ 蛋白質がコントロール細胞、cAMP 刺激細胞ともにノックダウンされていることを確認した (図 4B)。cAMP 刺激で誘導される

VEGF mRNAは C/EBP β のノックダウンにより有意に抑制された。これらの結果から、黄体化過程における *VEGF* 遺伝子発現に C/EBP β が関与していることが示された。

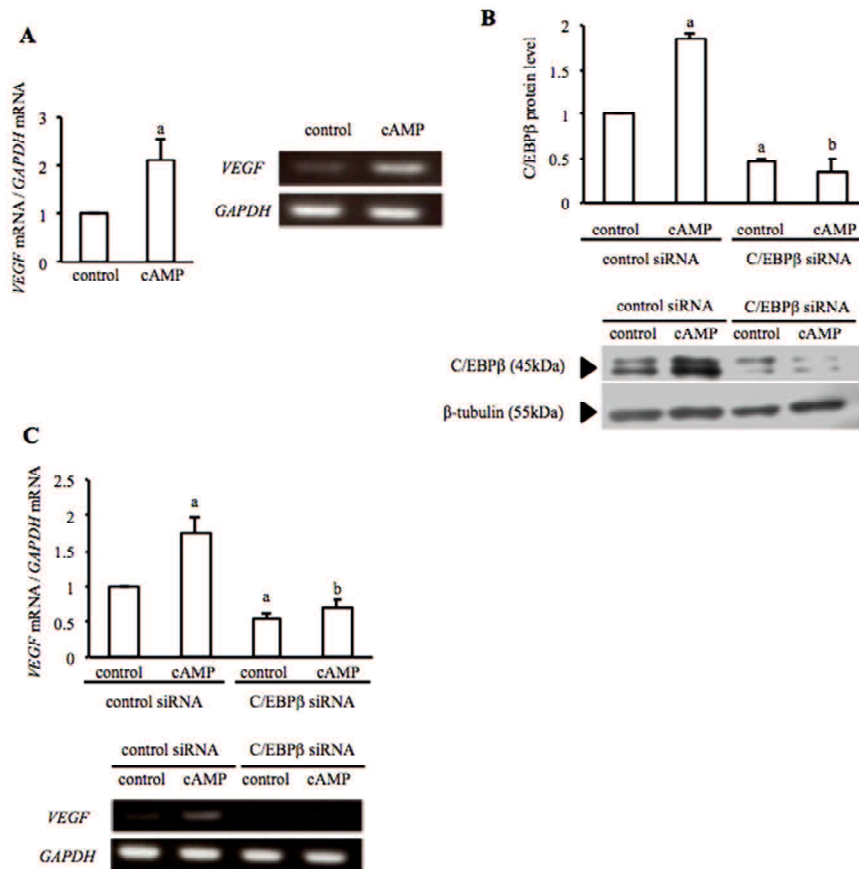


図4. C/EBP β ノックダウンにおける *VEGF* mRNA発現への影響

A. KGN 細胞を cAMP (0.5 mM) の添加、無添加で 24 時間培養した。*VEGF* mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で検討した。内部コントロール遺伝子として *GAPDH* を用いて補正した。値は mean \pm SEM (n=3)、a: P<0.05。2% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

B. KGN細胞にC/EBP β siRNA、コントロール siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションの24 時間後に細胞を cAMP 添加、無添加で 24 時間培養した。細胞ライセートを作成し、C/EBP β 蛋白質発現をウエスタンブロットで確認した。内部コントロールとして β -tubulin を用いた。ImageJ を用いてバンドの定量を行った。値は mean \pm SEM (n=3)、a: P<0.05 vs control treatment、b: P<0.05 vs cAMP treatment in the control siRNA。

C. *VEGF* mRNA発現を real-time RT-PCR 法で検討した。内部コントロール遺伝子として *GAPDH* を用いて補正した。値は mean \pm SEM (n=3)、a: P<0.05 vs control treatment in the control siRNA、b: P<0.05 vs cAMP treatment in the control siRNA。2% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

5. *Vegf* 遺伝子プロモーター領域における C/EBP β 、HIF1 α 結合配列の転写活性

Vegf 遺伝子プロモーターにおける C/EBP β 、HIF1 α 結合領域の転写活性を調べるため、

KGN 細胞に図 5A に示すような *Vegf* プロモーターコンストラクトをトランスフェクションし Luciferase assay を行った (図 5A)。プロモーターコンストラクト (-1171 bp から +115 bp) をトランスフェクションすると、cAMP 刺激により Luciferase 活性は上昇した。C/EBP β 結合配列を欠失させると (-976 bp から +115 bp、 Δ C/EBP β)、cAMP で誘導される Luciferase 活性は抑制された。HIF1 α 結合配列に変異を加えても (-1171 bp から +115 bp、mutation of HREs)、Luciferase 活性に影響を与えなかった。さらにC/EBP β ノックダウン条件下での Luciferase 活性を調べた。-1171 bp から+115 bp のコンストラクトと siRNA の両方を KGN 細胞に同時にトランスフェクションした後に cAMP で刺激を行った。cAMP 刺激で上昇する Luciferase 活性は C/EBP β ノックダウンにより抑制された (図 5B)。以上より、cAMP 刺激下で C/EBP β 結合領域は転写活性を有していること、HIF1 α 結合領域は転写活性を有していないことが示された。

低酸素条件下では HIF1 α の蛋白質発現が増加し、*VEGF* 発現に関与していることが報告されている (9-11)。CoCl₂ 刺激は、HIF1 α 発現を増加させるため、低酸素状態を模した状態とすることができる (32)。よって CoCl₂ 刺激下で HIF1 α の結合配列が転写活性を有しているか検討した。CoCl₂ 刺激により *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の転写活性は上昇したが、HIF1 α 結合配列の変異によりその Luciferase 活性は抑制された (図 6)。これらの結果より、ラット *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の HIF1 α 結合領域は CoCl₂ 刺激では転写活性を有しているが、黄体化刺激に相当する cAMP 刺激では転写活性を有していないことが分かった。

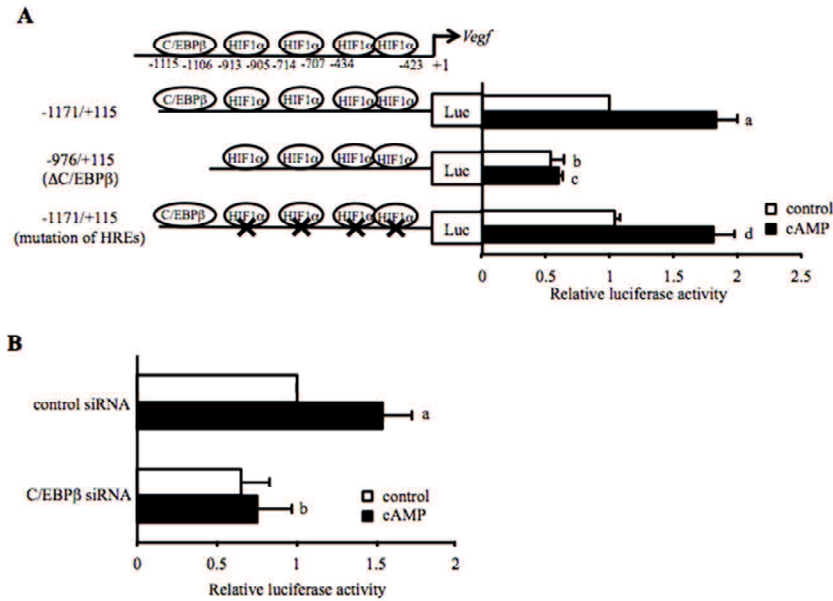


図5. *Vegf* 遺伝子プロモーター領域における C/EBPβ、HIF1α 結合配列の転写活性

A. *Vegf* 遺伝子プロモーター領域のレポーターコンストラクト; -1171/+115、-976/+115 (ΔC/EBPβ)、-1171/+115 (mutation of HREs) を KGN 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に cAMP の添加、無添加で 24 時間培養を行った後、Luciferase 活性の測定を行った。Luciferase 活性は -1171/+115 の control treatment との比で計算した。値は mean ± SEM (n=3)、a: P<0.05 vs -1171/+115 の control treatment、b: P<0.05 vs -1171/+115 の control treatment、c: P<0.05 vs -1171/+115 の cAMP treatment、d: P<0.05 vs -1171/+115 (mutation of HREs) の control treatment。

B. レポーターコンストラクト -1171/+115 と siRNA (C/EBPβ siRNA、control siRNA) とを KGN 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に cAMP の添加、無添加で 24 時間培養し、Luciferase 活性の測定を行った。Luciferase 活性は -1171/+115 の control treatment との比で計算した。値は mean ± SEM (n=3)、a: P<0.05 vs -1171/+115 の control treatment、b: P<0.05 vs control siRNA の cAMP treatment。

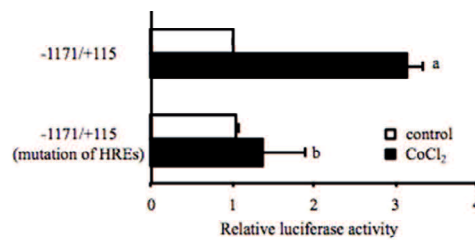


図6. CoCl₂ 刺激による *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の転写活性

Vegf 遺伝子プロモーター領域のレポーターコンストラクト; -1171/+115、-1171/+115 (mutation of HREs) を KGN 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に CoCl₂ の添加、無添加で 24 時間培養を行った後、Luciferase 活性の測定を行った。Luciferase 活性は -1171/+115 の control treatment との比で計算した。値は mean ± SEM (n=3)、a: P<0.05 vs -1171/+115 の control treatment、b: P<0.05 vs -1171/+115 の cAMP treatment。

6. 黄体化過程のラット顆粒膜細胞における *Vegf* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾、クロマチン構造、EZH2 の結合変化

我々はこれまでラット顆粒膜細胞の黄体化における遺伝子発現制御において、転写因子だけでなくエピジェネティックなメカニズムが遺伝子発現を制御していると報告してきた (13、20、21)。よって hCG 刺激が *Vegf* 遺伝子プロモーター領域における C/EBP β 結合領域周囲のヒストン修飾を変化させているかどうか検討した。転写抑制に働く H3K9me3 と H3K27me3 は hCG 投与後 12 時間で有意に低下した。転写促進に働く H3K4me3 は hCG 投与前後で変化を認めなかった (図 7A)。

C/EBP β 結合領域周囲の hCG 投与前後におけるクロマチン構造変化を FAIRE-qPCR を用いて検討した。この領域の FAIRE enrichment 比は hCG 投与後に増加した (図 7B)。これは hCG 刺激により C/EBP β 結合領域周囲のクロマチン構造が弛緩したことを示している。

C/EBP β 結合領域への H3K27me3 を誘導する (33、34) EZH2 の結合が hCG 投与前後で変化するか ChIP assay を用いて検討した。C/EBP β 結合領域への EZH2 の結合は hCG 投与後に有意に抑制された (図 7C)。

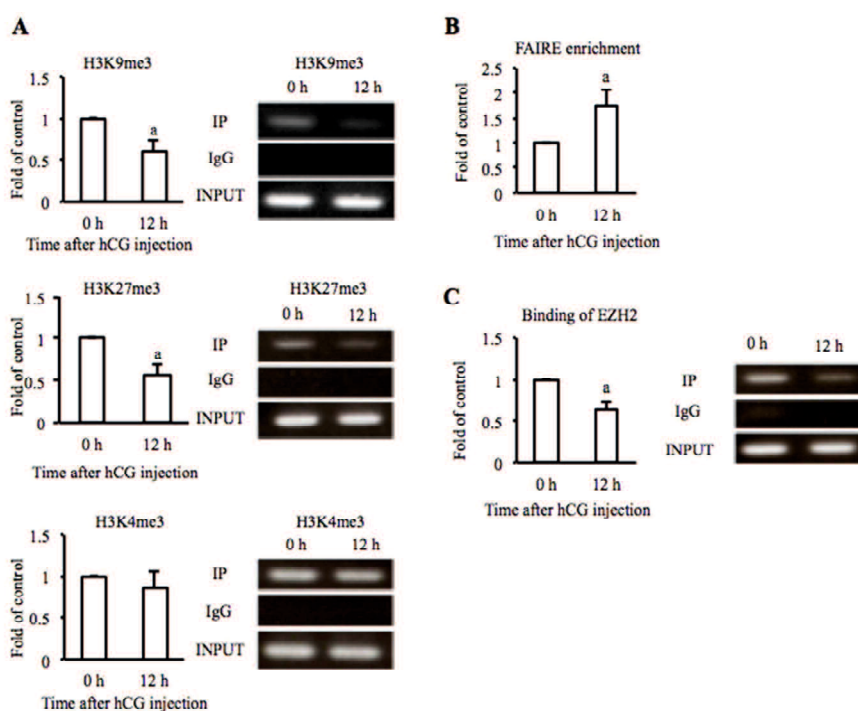


図7. 黄体化過程のラット顆粒膜細胞における *Vegf* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾、クロマチン構造、EZH2 の結合変化

hCG 投与前 (0 h)、hCG 投与 12 時間後 (12 h) の顆粒膜細胞を用いた。A : C/EBP β 結合領域周囲

のH3K4me3、H3K9me3、H3K27me3 の変化を ChIP assay を用いて評価した。Real-time qPCR を用いて測定し、IP/INPUT 比を計算した後、0 時間との比を示した。値は mean \pm SEM (n=3) で表示した。a: P<0.05 vs 0 h。2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

B. C/EBP β 結合領域周囲のクロマチン構造変化を調べるため、FAIRE-qPCR を ChIP assay と同じ primer で行った。Real-time qPCR を用いて測定し、FAIRE enrichment を計算した後、0 時間との比を示した。値は mean \pm SEM (n=3) で表示した。a: P<0.05 vs 0 h。

C. C/EBP β 結合領域への EZH2 の結合を ChIP assay を用いて評価した。qPCR を用いて測定し、IP/INPUT 比を計算した後、0 時間との比を示した。値は mean \pm SEM (n=3) で表示した。a: P<0.05 vs 0 h。2 % アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

【考察】

本研究では、LH サージ後の黄体化過程にあるラット顆粒膜細胞において、*Vegf* 遺伝子発現を制御する転写因子として HIF1 α ではなく C/EBP β が重要であることを示した。C/EBP β は排卵に不可欠な転写因子であり、黄体化過程における顆粒膜細胞で ERK-1/2 シグナルの下流にあることが知られている (12)。これまでに我々は C/EBP β がプロゲステロン産生に関わる遺伝子である *StAR*、*Cyp11a1* 遺伝子を誘導することで、排卵とそれに引き続く黄体化の中心的な役割を担っていることを示してきた (13、20)。本研究では排卵後のラット顆粒膜細胞において *Vegf* 遺伝子が C/EBP β の下流遺伝子の一つであり、C/EBP β は *Vegf* 遺伝子発現を増加させることにより黄体形成過程の血管新生に関与していることが示された。

本報告はラット顆粒膜細胞における *Vegf* 遺伝子発現制御に C/EBP β が関与していることを示した初めての論文である。ラット *Vegf* 遺伝子プロモーター領域には C/EBP β の結合配列が存在し、ヒト、マウスなど種を超えて保存されているが (35)、これまでにこの領域について着目した研究はない。C/EBP β は黄体化過程にあるラット顆粒膜細胞において、*Vegf* 遺伝子プロモーター領域に結合する (図 3B)。加えて、KGN 細胞における C/EBP β 蛋白質のノックダウンにより C/EBP β が cAMP 刺激による *VEGF* 遺伝子発現に関与することを示した (図 4C)。さらに C/EBP β 結合領域が転写活性を有していることを示した (図 5)。これらの結果から、C/EBP β はラット *Vegf* 遺伝子プロモーター上の今回新たに着目した領域に結合することで、*Vegf* 遺伝子発現を制御していることが示された。

HIF1 α は多くの細胞種においてプロモーター領域に結合することにより *VEGF* 遺伝子を制御していることが示されている (36, 37)。HIF1 α 蛋白質は、顆粒膜細胞において黄体化により増加すると報告されている (10, 38-42)。これらの報告は我々の結果と一致する (図 2B)。これまで *VEGF* 発現と HIF1 α 発現は黄体化過程において同様の発現傾向を示すため、黄体化過程では HIF1 α が *VEGF* 発現を調節していると考えられてきた。しかし、黄体化過程において HIF1 α が *VEGF* 遺伝子発現を制御しているという直接的な証拠を示した報告はこれまでにない。我々は、ChIP assay を用いて、ラット *Vegf* 遺伝子プロモーター領域における HIF1 α 結合を調べたが、hCG 投与後に HIF1 α の結合は増加しなかった (図 3C)。加えて、KGN 細胞を用いた実験において、ラット *Vegf* 遺伝子プロモーター領域の HIF1 α 結合領域 (HRE) は cAMP 刺激による転写活性を有していなかった。この結果から、HIF1 α は hCG 投与後の *Vegf* 遺伝子発現には寄与していないことが示唆された。Rico ら (43) は、in vivo において、HRE 欠損マウスにおいても LH 刺激を行うと顆粒膜細胞の *Vegf* 遺伝子が増加することを示している。これは LH サージ後の *Vegf* 遺伝子発現に HIF1 α が関与していないことを示しており、今回の我々の報告を支持する。その一方で、Kim (10) らは、hCG 刺激は HIF1 α を介して *Vegf* 発現を増加させると報告している。彼らは HIF1 α の HRE への結合を抑制する Echinomycin を投与することでマウス顆粒膜細胞の黄体化過程で上昇する *Vegf* mRNA 発現が抑制されたとしている。しかし Echinomycin が HIF1 α 以外の様々な遺伝子の発現に影響を与え、その結果 *Vegf* mRNA 発現が抑制されている可能性を否定できないと我々は考えている。以上より我々は、HIF1 α ではなく、C/EBP β が LH サージ後の黄体化過程におけるラット顆粒膜細胞の *Vegf* 遺伝子発現の重要な調節因子であると結論付けた。

顆粒膜細胞において HIF1 α が *Vegf* mRNA 発現に関与することを示す報告はいくつか存在するが、それらのほとんどは低酸素条件下や CoCl₂ 刺激条件により HIF1 α を誘導した in vitro の研究に基づいている。Martinez-Chequer ら (44) は、サルの顆粒膜細胞において CoCl₂ 刺激により *Vegf* 遺伝子発現が増加することを報告している。Alam ら (45) は、CoCl₂ 刺激がラット顆粒膜細胞において HIF1 α 蛋白質発現を増加させることを報告して

いる。Kim ら (10) は、マウス顆粒膜細胞において CoCl_2 刺激によって誘導される HIF1 α が *Vegf* 遺伝子発現に関与すると報告している。Yalu ら (32) は、ヒト顆粒膜細胞において HIF1 α のノックダウン実験により、 CoCl_2 で誘導される VEGF 遺伝子発現に HIF1 α が関与することを示している。我々の研究でも、 CoCl_2 刺激条件下では HIF1 α は *Vegf* 遺伝子発現に関与することが示された (図 6)。しかし、黄体化刺激に相当する cAMP 刺激下では HIF1 α は *Vegf* 遺伝子発現に関与していなかった (図 5A)。これらの結果から、顆粒膜細胞の in vitro での CoCl_2 刺激下においては、HIF1 α が *Vegf* 遺伝子発現に関与していると考えられる。

ラット顆粒膜細胞の黄体化過程において、*Vegf* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾やクロマチン構造変化といったエピジェネティックな変化も起こっていることを示した。*Vegf* 遺伝子プロモーターの C/EBP β 結合領域への EZH2 の結合減少に伴う H3K9me3 と H3K27me3 の減少が、クロマチン構造を弛緩させることにより、C/EBP β の結合を可能にすることで転写を活性化させていた。この結果は、我々が以前報告した、黄体化で発現が増加する *Cyp11a1* 遺伝子のプロモーター領域での変化と同様である (20)。これらの知見より、エピジェネティックな変化が黄体化過程の顆粒膜細胞における *Vegf* 遺伝子発現に密接に関連していると考えられた。

本研究では、LH サージ後のラット顆粒膜細胞の黄体化過程における *Vegf* 遺伝子発現制御機構の分子メカニズムを明らかにした。HIF1 α ではなく、C/EBP β がラット *Vegf* 遺伝子プロモーター上の新たに発見した領域に結合することで *Vegf* 遺伝子発現を制御していることを見出した。また転写因子に加えて、ヒストン修飾やクロマチン構造変化も *Vegf* 遺伝子発現に関与していることも明らかにした。*Vegf* は血管新生に重要な役割を担う遺伝子であるため、我々の結果は黄体化過程にある顆粒膜細胞における血管新生の制御機構を理解する一助となると考えられる。

【謝辞】

本研究は文部科学省の科学研究費（15K10720, 16K11091, 16K11142, 16K20191, 17K11239, 17K11240 and 18K16772）によって資金提供されている。本論文は Scientific Reports 9: 714 の論文の和訳であり、学位論文として投稿することを許可されている。

【参考文献】

1. Kizuka F, Tokuda N, Takagi K, Adachi Y, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Tamura H, Suzuki T, Owada Y, Sugino N. Involvement of bone marrow-derived vascular progenitor cells in neovascularization during formation of the corpus luteum in mice. *Biol Reprod* 2012; 87:55
2. Fraser HM, Duncan WC. SRB Reproduction, Fertility and Development Award Lecture 2008. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. *Reproduction, Fertility and Development* 2009; 21:377-392
3. Sugino N, Matsuoka A, Taniguchi K, Tamura H. Angiogenesis in the human corpus luteum. *Reproductive Medicine and Biology* 2008; 7:91-103
4. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature medicine* 1998; 4:336-340
5. Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 1990; 127:965-967
6. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American journal of physiology Cell physiology* 2001; 280:C1358-1366
7. Berisha B, Schams D, Rodler D, Pfaffl MW. Angiogenesis in The Ovary - The Most Important Regulatory Event for Follicle and Corpus Luteum Development and Function in Cow - An Overview. *Anat Histol Embryol* 2016; 45:124-130
8. Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Høst T, Borup R, Grøndahl ML. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Human Reproduction* 2014; 29:997-1010
9. Watkins WM, McCollum GW, Savage SR, Capozzi ME, Penn JS, Morrison DG. Hypoxia-induced expression of VEGF splice variants and protein in four retinal cell types. *Exp Eye Res* 2013; 116:240-246
10. Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK. Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology* 2009; 150:3392-3400
11. Loureiro RM, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:77-89
12. Fan HY, Liu Z, Johnson PF, Richards JS. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)-alpha

and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol* 2011; 25:253-268

13. Lee L, Asada H, Kizuka F, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology* 2013; 154:458-470
14. Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, Nakai A, Sugino N. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One* 2013; 8:e66632
15. Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Sugino N. Potential mechanisms of aberrant DNA hypomethylation on the x chromosome in uterine leiomyomas. *The Journal of reproduction and development* 2014; 60:47-54
16. Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2014; 28:1656-1669
17. Dogan N, Wu W, Morrissey CS, Chen KB, Stonestrom A, Long M, Keller CA, Cheng Y, Jain D, Visel A, Pennacchio LA, Weiss MJ, Blobel GA, Hardison RC. Occupancy by key transcription factors is a more accurate predictor of enhancer activity than histone modifications or chromatin accessibility. *Epigenetics Chromatin* 2015; 8:16
18. Tamura I, Sato S, Okada M, Tanabe M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Importance of C/EBPbeta binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2014; 155:275-286
19. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007; 128:707-719
20. Okada M, Lee L, Maekawa R, Sato S, Kajimura T, Shinagawa M, Tamura I, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats. *Endocrinology* 2016; 157:3344-3354
21. Maekawa R, Lee L, Okada M, Asada H, Shinagawa M, Tamura I, Sato S, Tamura H, Sugino N. Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res* 2016; 9:15
22. Tamura I, Asada H, Maekawa R, Tanabe M, Lee L, Taketani T, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2012; 153:5612-5621
23. Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N. Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human

endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:E291-299

24. Tamura I, Shirafuta Y, Jozaki K, Kajimura T, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Sato S, Tamura H, Sugino N. Novel Function of a Transcription Factor WT1 in Regulating Decidualization in Human Endometrial Stromal Cells and Its Molecular Mechanism. *Endocrinology* 2017; 158:3696-3707
25. Nishimoto Y, Murakami A, Sato S, Kajimura T, Nakashima K, Yakabe K, Sueoka K, Sugino N. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas. *Reprod Med Biol* 2018; 17:173-181
26. Maekawa R, Sato S, Okada M, Lee L, Tamura I, Jozaki K, Kajimura T, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Yamamoto S, Sugino N. Tissue-Specific Expression of Estrogen Receptor 1 Is Regulated by DNA Methylation in a T-DMR. *Mol Endocrinol* 2016; 30:335-347
27. Tamura I, Jozaki K, Sato S, Shirafuta Y, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization. *The Journal of biological chemistry* 2018; 293:5270-5280
28. Mizutani T, Ju Y, Imamichi Y, Osaki T, Yazawa T, Kawabe S, Ishikane S, Matsumura T, Kanno M, Kamiki Y, Kimura K, Minamino N, Miyamoto K. C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein beta) mediates progesterone production through transcriptional regulation in co-operation with SF-1 (steroidogenic factor-1). *The Biochemical journal* 2014; 460:459-471
29. Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD. Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc* 2012; 7:256-267
30. Arase M, Tamura Y, Kawasaki N, Isogaya K, Nakaki R, Mizutani A, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K, Koinuma D. Dynamics of chromatin accessibility during TGF-beta-induced EMT of Ras-transformed mammary gland epithelial cells. *Sci Rep* 2017; 7:1166
31. Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 2001; 142:437-445
32. Yalu R, Oyesiji AE, Eisenberg I, Imbar T, Meidan R. HIF1A-dependent increase in endothelin 2 levels in granulosa cells: role of hypoxia, LH/cAMP, and reactive oxygen species. *Reproduction (Cambridge, England)* 2015; 149:11-20
33. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science (New York, NY)* 2002; 298:1039-1043
34. Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 2002; 111:185-196

35. Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Dreszer TR, Fujita PA, Guruvadoo L, Haeussler M, Harte RA, Heitner S, Hickey G, Hinrichs AS, Hubley R, Karolchik D, Learned K, Lee BT, Li CH, Miga KH, Nguyen N, Paten B, Raney BJ, Smit AF, Speir ML, Zweig AS, Haussler D, Kuhn RM, Kent WJ. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res* 2015; 43:D670-681
36. Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269:4355-4359
37. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4604-4613
38. Boonyaprakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh PA, Almond GW. Expression and localization of hypoxia inducible factor-1alpha mRNA in the porcine ovary. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 2005; 69:215-222
39. Nishimura R, Okuda K. Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *The Journal of reproduction and development* 2010; 56:110-116
40. van den Driesche S, Myers M, Gay E, Thong KJ, Duncan WC. HCG up-regulates hypoxia inducible factor-1 alpha in luteinized granulosa cells: implications for the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:455-464
41. Tam KK, Russell DL, Peet DJ, Bracken CP, Rodgers RJ, Thompson JG, Kind KL. Hormonally regulated follicle differentiation and luteinization in the mouse is associated with hypoxia inducible factor activity. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 327:47-55
42. Duncan WC, van den Driesche S, Fraser HM. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology* 2008; 149:3313-3320
43. Rico C, Dodelet-Devillers A, Paquet M, Tsoi M, Lapointe E, Carmeliet P, Boerboom D. HIF1 activity in granulosa cells is required for FSH-regulated Vegfa expression and follicle survival in mice. *Biol Reprod* 2014; 90:135
44. Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod* 2003; 68:1112-1118
45. Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee EJ, Ashcroft M, Hunzicker-Dunn M. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 2009; 150:915-928

