

学位論文（博士）

Transcriptional coactivator PGC-1 α contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBP β and p300

(転写共役因子 PGC-1 α は C/EBP β 、p300 と転写複合体を形成しエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献する)

氏名 高木遥香

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 産科婦人科学講座

2022 年 5 月

目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	6
【結果】	12
【考察】	23
【結語】	28
【謝辞】	28
【参考文献】	28

【要旨】

転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) は、IGF-binding protein-1 (IGFBP-1) や prolactin (PRL) 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域において、転写活性マーカーである Histone-H3 lysine-27 アセチル化(H3K27ac)を誘導するパイオニア因子であり、ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化に貢献することを我々はこれまでに報告している。パイオニア因子の一部はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有するコファクターと複合体を形成することで機能する。我々は、C/EBP β と共役する HAT タンパクとして p300 を同定しているが、それ以外のコファクターについては不明である。Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α) は H3K27ac を制御することが知られている転写共役因子である。PGC-1 α は ESC でも発現しているが、脱落膜化における PGC-1 α の機能は不明である。そこで、PGC-1 α が C/EBP β の転写共役因子として働き、脱落膜化過程において H3K27ac 誘導に関与しているのではないかと考え検討した。脱落膜化を誘導するために ESC を cAMP 存在下で培養した。cAMP による IGFBP-1 および PRL の発現上昇は PGC-1 α のノックダウンにより抑制された。また、cAMP は IGFBP-1 および PRL のプロモーターとエンハンサー領域に存在する C/EBP β 結合部位への PGC-1 α と p300 のリクルートを増加させた。さらに、PGC-1 α をノックダウンすると C/EBP β と p300 の結合、および H3K27ac レベルが低下したことから、PGC-1 α はこれらの領域で C/EBP β および p300 とヒストン修飾複合体を形成することで H3K27ac 誘導に関与していることが示された。さらに PGC-1 α の発現制御機構を調べるために、C/EBP β を上流因子として着目した。PGC-1 α のエンハンサー領域への C/EBP β の結合は cAMP で増加した。また、これらのエンハンサーをゲノム編集により欠失させた細胞では PGC-1 α の発現が減少したことから、C/EBP β は我々が見出したエンハンサー領域に結合することで PGC-1 α の発現を上昇させると考えられた。以上より、PGC-1 α は C/EBP β の新規エンハンサーへの結合によって発現誘導されること、また、C/EBP β と p300 と共にヒス

トン修飾複合体を形成して、IGFBP-1 および PRL のプロモーターとエンハンサーにエピゲノム変化を引き起こすことで脱落膜化に貢献していることがわかった。

【研究の背景と目的】

ヒト子宮内膜間質細胞 (Endometrial Stromal Cell; ESC) は、月経周期において、ステロイドホルモンの変化に応じて周期的な変化を起こす。その変化の一つである脱落膜化は、プロゲステロンの作用により ESC が脱落膜化細胞に分化する現象であり、着床や妊娠成立に重要な変化である(1-3)。脱落膜化過程では、様々な転写因子の活性化により、多くの遺伝子の発現が上昇することが知られている(4-6)。我々は、これまでのゲノムワイド解析の結果から、ヒト ESC では、脱落膜化過程において多くの遺伝子が発現上昇または発現低下することを明らかにしている(4,7)。一方、遺伝子発現はクロマチン構造の変化を伴い、ヒストン修飾などのエピジェネティックな機構によって制御される(8-10)。Histone-H3 lysine-27 アセチル化 (H3K27ac) は、転写を活性化するヒストン修飾の一つであり、活性化されたプロモーター領域やエンハンサー領域に多く存在することが知られている(11)。脱落膜化過程においてゲノム全体でこの H3K27ac レベルが上昇すること、また、多くの遺伝子の発現上昇には H3K27ac レベルの上昇を伴うことを我々は報告している(4,7,12)。

一般に、これらのエピゲノム変化によるクロマチン構造変化は、パイオニア因子という転写因子がプロモーターに結合してクロマチン構造変化を開始させることで起こる(13,14)。我々は、脱落膜化のマーカー遺伝子である IGF-binding protein-1 (IGFBP-1) や prolactin (PRL) のパイオニア因子が CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) であることを報告した(15-17)。さらに、C/EBP β は、これらのマーカー遺伝子だけでなく、脱落膜化過程において、ゲノムワイドに、H3K27ac の増加と遺伝子発現上昇にも関与していることも報告している(4)。すなわち C/EBP β は、脱落膜化においてパイオニア因子として働き、それによって引き起こされるゲノムワイドなエピゲノム変化が、脱落膜化に重要

であると考えられる。

さて、パイオニア因子がヒストンアセチル化やクロマチンリモデリングを誘導する際には、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (Histone acetyltransferase; HAT) 活性を持つコファクターと複合体を形成し、プロモーター領域に結合する必要がある (18,19)。p300 は、C/EBP β とヒストン修飾複合体を形成する HAT タンパクの 1 つである (20)。我々は、p300 が IGFBP-1 のエンハンサー領域で C/EBP β と共に H3K27ac を誘導する HAT タンパクであることを報告した (21)。しかし、ヒストン修飾複合体は、パイオニア因子や HAT タンパク以外にもいくつかのコファクターを含んでおり、これらのコファクターも転写の促進に必須である (22-24)。従って、脱落膜化過程における H3K27ac の誘導に関与する C/EBP β のコファクターを同定することは重要であると考えられた。

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α) は、生殖器を含む様々な臓器で、ミトコンドリア生合成、熱生成、代謝、脂肪酸酸化など様々な生理機能を制御する転写共役因子である (25-31)。PGC-1 α は、ヒト ESC にも発現しており、その発現は脱落膜化とともに増加することが知られている (32)。しかし、子宮内膜における PGC-1 α の生理的な役割は不明である。また、PGC-1 α 自身は HAT 活性を持たないが、p300 などの HAT 活性を持つコファクターをリクルートすることでヒストン修飾複合体の一つとなり、ヒストンアセチル化誘導に貢献することが知られている (33-36)。しかし、PGC-1 α は DNA 結合ドメインを持たないので、プロモーターやエンハンサー領域に直接結合できないため、その機能を発揮するためには、C/EBP β などの他の転写因子と結合する必要がある (37-39)。これらのことから、PGC-1 α は C/EBP β のコファクターとして働き、脱落膜化過程においてヒストンアセチル化誘導に関与しているのではないかと考えた。

本研究では、PGC-1 α が C/EBP β および p300 とヒストン修飾複合体を形成し、IGFBP-1 のプロモーターおよびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域で H3K27ac を誘導する転写共役因子であることを明らかにした。さらに、PGC-1 α の脱落膜化過程における

詳細な発現上昇機構についても明らかにした。

【方法】

1. 試薬

DMEM、L-グルタミン、1 x トリプシン-EDTA、ストレプトマイシン、ペニシリンは Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biological Industries Ltd. (Beit Haemek, Israel) から購入した。コラゲナーゼ、ジブチル-cAMP (db-cAMP) は、Sigma Chemical Co Ltd. (St Louis, MO, USA)から購入した。組織フラスコは、Becton Dickinson Co Ltd. (Franklin Lakes, NJ) から購入した。

2. ESC の分離

ヒト子宮内膜組織は、子宮筋腫または早期子宮頸癌の手術を受けた 40~45 歳の月経周期が正常な患者から子宮摘出時に採取した。手術時にホルモン療法を受けていない患者を対象とした。すべての患者からインフォームドコンセントを得るとともに、山口大学医学部附属病院の施設審査委員会からの承認を得ている。ESC の分離に使用した子宮内膜サンプルは、組織学的に増殖期後期であると診断されたものである。組織サンプルは、4 mM グルタミン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、50 IU/ml ペニシリンを含む Phenol Red-free DMEM で洗浄し、 <1 mm³の断片に細切した。ESC は、過去の報告通り単離した(9)。組織を細切し、0.2%のコラゲナーゼで 37°C、2 時間振盪水浴で酵素処理して、70 μ m のナイロンメッシュで濾過した。濾液中の間質細胞は培養液で 3 回洗浄し、トリパンブルー色素排除法で生細胞数を計数した。細胞は、グルタミン、抗生物質、10% dextran-coated charcoal-stripped FBS を含む Phenol Red-free DMEM で 37°C、95%O₂、5%CO₂ の環境下で培養した。増殖した細胞を 1 x トリプシン-EDTA で処理し、6 ウェルプレートに再培養した。1 回目の継代後、80%コンフルエントになった時点で、cAMP 刺激を開始した。

3. 細胞培養

HepG2 細胞は、グルタミン、抗生物質、および 10%FBS を含む Phenol Red-free DMEM 中、37 °C、95%O₂ および 5%CO₂ の環境下で培養した。コンフルエントになった細胞を 1 x トリプシン-EDTA で処理し、6 ウェルプレートに再培養し、後述のリアルタイム RT-PCR およびゲノム編集に使用した。脱落膜化を誘導するために、ESC を cAMP (0.5 mM) を含む培養液 (グルタミン、抗生物質、2%FBS を含む Phenol Red-free DMEM) で 4 日間培養した。その後、この細胞を後述の実験に使用した。正常な月経周期では、プロゲステロンが ESC の脱落膜化を誘導する。cAMP はプロゲステロンのセカンドメッセンジャーであり(40)、プロゲステロンよりも短時間で脱落膜化を誘導するため、in vitro の脱落膜化刺激として広く用いられてきた(15)。そこで、本研究では、cAMP を脱落膜化刺激として用いた。本研究で用いた cAMP の濃度 (0.5 mM) および培養期間 (4 日間) は、我々の以前の報告 (40) に基づくものである。RNA-sequence を除き、各実験に少なくとも 3 個体の細胞を用いた。

4. 免疫組織染色

増殖期後期、分泌期後期および妊娠初期の脱落膜の組織を、過去の報告と同様に免疫染色した(17)。子宮内膜組織はホルマリンで固定し、パラフィンに包埋して 5 μm 切片にした。切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的にエタノールで脱水し、PGC-1α に対するウサギポリクローナル抗体 (Abcam plc, Cambridge, UK) を用いて Histofine simple stain MAX-PO(R) (Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) で染色し、3, 3'-diaminobenzidine-4 HCl (Nakalai Tesque Co. Ltd., Tokyo, Japan) 中で反応させた。0.01% H₂O₂ を含む 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) で 3 分間インキュベートして内因性ペルオキシダーゼ活性をブロッキングし、Meyer のヘマトキシリンで対比染色した。対照切片は Normal rabbit IgG でインキュベートした。

5. リアルタイム RT-PCR

RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて培養細胞から Total RNA を抽出した。逆転写反応およびリアルタイム RT-PCR は過去の報告と同じ方法で行った(41-43)。内部標準として MRPL19 を使用した。

6. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、過去に報告している方法で行った(44,45)。細胞から蛋白質を抽出して SDS-PAGE を行い、メンブレンに転写した。その後、PGC-1 α 抗体(Calbiochem®, LaJolla, CA, USA)、C/EBP β 抗体(Santa Cruz Biotechnology)および β -tubulin 抗体(Sigma)を用いて、抗原抗体反応を行った。ECL-Western blotting detection system (Amersham, Aylesburg, UK) と hyperfilm-ECL (Amersham) を用いてバンドの検出を行い、ImageJ を用いて定量した。

7. 共免疫沈降法

PGC-1 α 、C/EBP β 、p300 を含む共免疫沈降法は、Capturem™ IP & Co-IP Kit (TaKaRa) を用いて、説明書に従って実施した。細胞溶解液の 10%はインプットとして保存した。免疫沈降は、PGC-1 α 抗体 (Calbiochem®)、C/EBP β 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、p300 抗体 (Abcam) および Normal rabbit IgG 抗体 (Invitrogen) を用いて抗原抗体反応を行なった。これらの抗体で上記のようにウェスタンブロッティングし、ImageJ を用いてバンドを定量した。

8. siRNA を用いたノックダウン

PGC-1 α ON-TARGET plus SMART pool、C/EBP β ON-TARGET plus SMART pool、ON-TARGET plus Non-Targeting pool siRNA は Dharmacon (Lafayette, CO, USA) から購入

した。50%コンフルエントにある ESC を、我々が以前に報告したようにトランスフェクションした (16)。5 時間後に培養液を交換した。トランスフェクション 48 時間後、細胞を cAMP の存在下または非存在下で 4 日間培養した後、後述の実験に使用した。

9. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

ヒストン修飾変化および転写因子の結合を調べるため、過去の報告の通り ChIP assay kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) を用いて ChIP assay を行った(16,21)。細胞は、1%ホルムアルデヒドを培養液中に添加し、37°Cで 10 分間インキュベートすることで架橋した。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。上清の 5%は INPUT として保管した。免疫沈降反応には以下の抗体を使用した：PGC-1 α 抗体(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、C/EBP β 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、p300 抗体 (Abcam)、H3K27ac 抗体(東京工業大学、木村宏先生より供与) (46) および Normal mouse または rabbit IgG 抗体(Invitrogen)。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、リアルタイム PCR を用いた。IP DNA と INPUT DNA サンプルの比率 (%INPUT) は、以前に報告したように計算した (21)。

10. RNA-sequence による全トランスクリプトーム解析

ESC に、PGC-1 α に対する siRNA または control siRNA をトランスフェクションした。siRNA のトランスフェクションから 48 時間後に、ESC を cAMP 存在下または非存在下で 4 日間培養した。3 つのサンプル(control siRNA による無刺激、control siRNA による cAMP 刺激、PGC-1 α siRNA による cAMP 刺激) から抽出したトータル RNA を、以前に報告したように RNA-sequence を行った (4, 7, 47)。遺伝子発現値は、「Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads」(RPKM) として算出した。RPKM の値に 1 を加えて計算

し、2つのサンプル間で遺伝子発現量が1.5倍以上異なるものを発現上昇または発現低下遺伝子と定義した。

11. Luciferase assay

ヒトゲノム DNA から2つの PGC-1 α エンハンサー領域をそれぞれ PCR で増幅した。この PCR 産物を pGL4.23-basic ベクター (Promega, Madison, WI, USA) に挿入した。このコンストラクトをエンハンサー/pGL4.23 と名付けた。ESC を24 ウェルプレート上で24時間培養し、Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いてレポーターベクター (pGL4.23-basic またはエンハンサー/pGL4.23) およびコントロールとして pRL-TK ベクター (Promega) のトランスフェクションを行った。24時間のトランスフェクションの後、細胞を cAMP の存在下または非存在下で4日間培養した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

12. CRISPR/Cas9 システムによる PGC-1 α エンハンサー領域の欠失

pCAGmCherry-gRNA (Addgene plasmid # 87110)は Juan Carlos Izpisua Belmonte 博士 (The Salk Institute) から、pCas9_GFP は Kiran Musunuru (Addgene plasmid # 44719) から譲渡を受けた。single guide RNA (sgRNA) 発現ベクターを構築するために、各20 bp の標的配列を pCAGmCherry-gRNA Vector に挿入した。本研究で使用した標的配列は、sgRNA1; AGAAGGGAATTCTGGGTGGTGG、sgRNA2; GCATTTACACATCCAAACAGG、sgRNA3; TCTGCTGTCAATGAGTCTTTTGG、sgRNA4; GCAAACTGGTTTCTGATCCCTGGGである (図 6C)。下線は PAM 配列。50%コンフルエントで、Cas9 および2つの sgRNA を、Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて HepG2 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48時間後、細胞をトリプシン処理し、希釈して6ウェルプレートで培養した。10日後、個々のコロニーを単離し、24ウェルプレート

で培養し、最終的には6ウェルプレートでコンフルエントになるように培養した。エンハンサー欠失を確認するために、各クローンのゲノムDNAをPCR増幅によって分析した。20 ngのゲノムDNAを用い、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa, Ohtsu, Japan)で増幅した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動し、QIAquick ゲル抽出キット (QIAGEN)を用いて精製した。PCR産物をpGEM-T easy vector (Promega, Tokyo, Japan)にクローニングし、BigDye terminators (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いたABI自動シーケンサーで塩基配列を確認した。代表的なクローンとして、3個の野生型クローン、3個のエンハンサー1欠失型クローン、3個のエンハンサー2欠失型クローンを使用した。PGC-1 α mRNAの発現を各クローンにおいて解析し、3クローンの平均値として表した。

13. 統計解析

統計学的有意差の検討は、一元配置分散分析で判定した。その後、Tukey-Kramer検定を用いて、群間比較を行なった。2群間の差の解析には、対応のないt検定を用いた。すべての統計解析は、SPSS for Windows version 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行った。P<0.05で有意差ありとみなした。

【結果】

1. ヒト子宮内膜組織および ESC における PGC-1 α の発現と PGC-1 α の発現に対する cAMP の影響

ヒト子宮内膜組織における PGC-1 α の発現を免疫組織化学的に検討した。PGC-1 α は、増殖期子宮内膜間質細胞でも発現しているが（図 1A）、分泌期後期子宮内膜の間質細胞や妊娠初期の脱落膜細胞では、その発現はさらに増加していた。また、初代培養ヒト ESC における PGC-1 α の発現をリアルタイム RT-PCR とウェスタンブロッティングで調べた。脱落膜化刺激である cAMP を用いて ESC を培養したところ、脱落膜化マーカー遺伝子である IGFBP-1 および PRL mRNA の誘導とともに PGC-1 α の mRNA とタンパク質発現レベルが増加した（図 1B）。

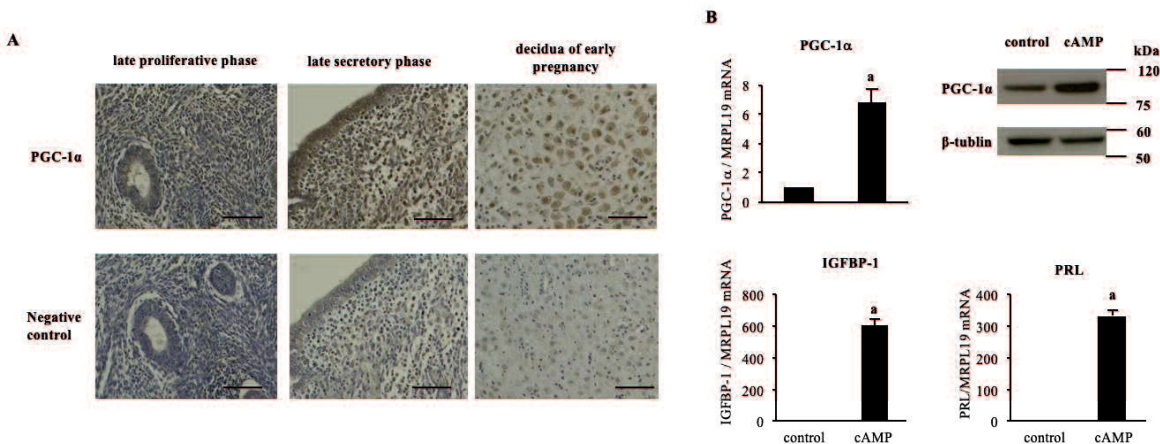


図 1 ヒト子宮内膜組織および ESC における PGC-1 α の発現と PGC-1 α の発現に対する cAMP の影響

A. 増殖期後期および分泌期後期子宮内膜と妊娠初期脱落膜における PGC-1 α の免疫組織染色。下段の写真は各サンプルにおけるネガティブコントロール。スケールバー、50 μ m。B. ESC を cAMP (0.5 mM) 存在下、または非存在下で 4 日間培養した。mRNA の発現は、リアルタイム RT-PCR で解析した。PGC-1 α 、IGFBP-1、PRL の値は、MRPL19 の値に対して標準化し、コントロールサンプルとの比で示した。値は、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. control。また、全細胞ライセートを調製し、ウェスタンブロッティングに供して、PGC-1 α タンパク質の発現を検討した。 β -tubulin を内部標準として使用した。

2. cAMP による IGFBP-1 と PRL の遺伝子発現への PGC-1 α の関与

IGFBP-1 および PRL の mRNA 発現に対する PGC-1 α の関与を調べるために、PGC-1 α を siRNA でノックダウンした。cAMP による PGC-1 α タンパク質発現の増加は、siRNA により抑制されることを確認した (図 2A)。PGC-1 α をノックダウンすると、cAMP で誘導される IGFBP-1 および PRL の発現が有意に抑制された (図 2B)。

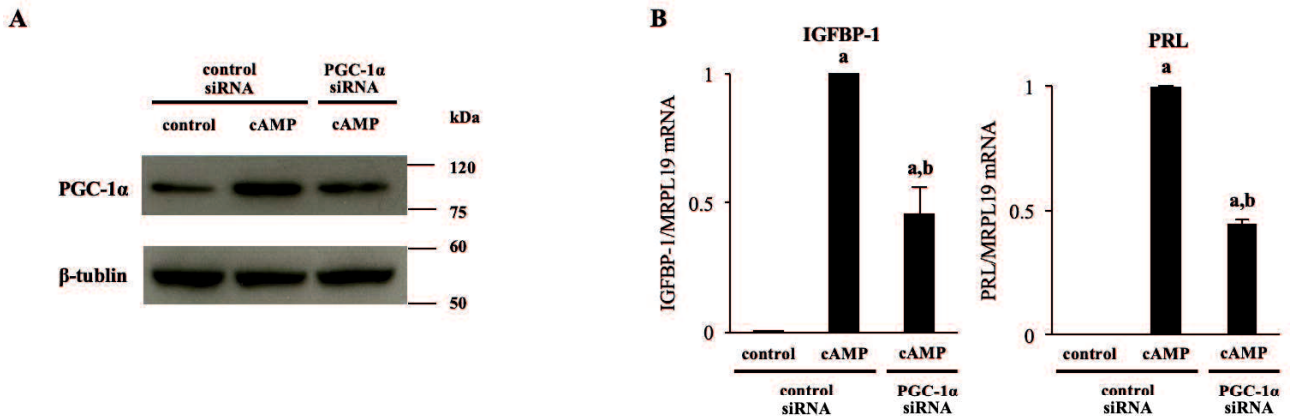


図 2 cAMP による IGFBP-1 と PRL の遺伝子発現への PGC-1 α の関与

A. ESC に PGC-1 α に対する siRNA を、または control siRNA をトランスフェクションした。siRNA のトランスフェクションから 48 時間後、ESC を cAMP 存在下、または非存在下で 4 日間培養した。全細胞ライセートを調製し、ウェスタンブロッティングを行い、PGC-1 α タンパク質発現のノックダウンを検討した。 β -tubulin を内部標準として使用した。B. mRNA 発現は、リアルタイム RT-PCR によって解析した。IGFBP-1 および PRL の値は、MRPL19 の値に対して標準化し、control siRNA における cAMP 刺激サンプルとの比として表した。値は、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. control siRNA での無刺激; b: $P < 0.01$ vs. control siRNA での cAMP 刺激。

3. cAMP による PGC-1 α と p300 の IGFBP-1 プロモーターおよびエンハンサー領域、PRL プロモーター領域へのリクルート

IGFBP-1 と PRL のプロモーター領域は、C/EBP β 結合領域を含む多くの転写因子結合領域が存在するため、転写調節領域として重要である (図 3A) (10,17,48-51)。さらに我々は、IGFBP-1 のエンハンサー領域を転写開始点から約 6,000 bp 上流に同定している (図 3A) (21)。脱落膜化過程において、C/EBP β はこれらのプロモーターやエンハンサー領域に結合し、IGFBP-1 や PRL の発現を上昇させることが知られている (10,17,21,52)。PGC-1 α は

DNA 結合ドメインを持たないが、C/EBP β と相互作用することでプロモーターやエンハンサー領域に結合できる (38,39)。これらのことから PGC-1 α は転写共役因子として C/EBP β と相互作用することで、IGFBP-1 や PRL のプロモーターやエンハンサー領域の C/EBP β 結合領域にリクルートされるのではないかと考えた。そこでまず、C/EBP β と PGC-1 α の相互作用の有無を確かめるために共免疫沈降を行ったところ、PGC-1 α は非脱落膜化 ESC と脱落膜化 ESC の両方で C/EBP β と結合していることを確認することができた (図 3B)。そこで次に IGFBP-1 のプロモーター領域およびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域への PGC-1 α のリクルートを調べるために、我々が以前に同定した C/EBP β 結合領域をカバーするように ChIP プライマーを作成し (図 3A)、ChIP assay を行なった (10, 17, 21, 48)。cAMP 刺激により、これらの C/EBP β 結合領域への PGC-1 α のリクルートが有意に増加することがわかった (図 3C)。我々はこれまで、cAMP 刺激によって IGFBP-1 のプロモーターやエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域の H3K27ac レベルが増加することを報告している (17,21)。そこで、これらの領域で PGC-1 α と共に働く HATタンパクを調べることにした。p300 は HAT 活性を持ち H3K27ac を誘導する転写共活性化因子であり (54,55)、PGC-1 α と C/EBP β とも相互作用することが知られている (56-58)。よって、p300 をその候補と考えた。まず共免疫沈降法を行うことで、p300 が PGC-1 α および C/EBP β の両方と結合することを確認した (図 3B)。さらに、cAMP 刺激によって IGFBP-1 のプロモーターやエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域への p300 のリクルートは有意に増加した(図 3D)。

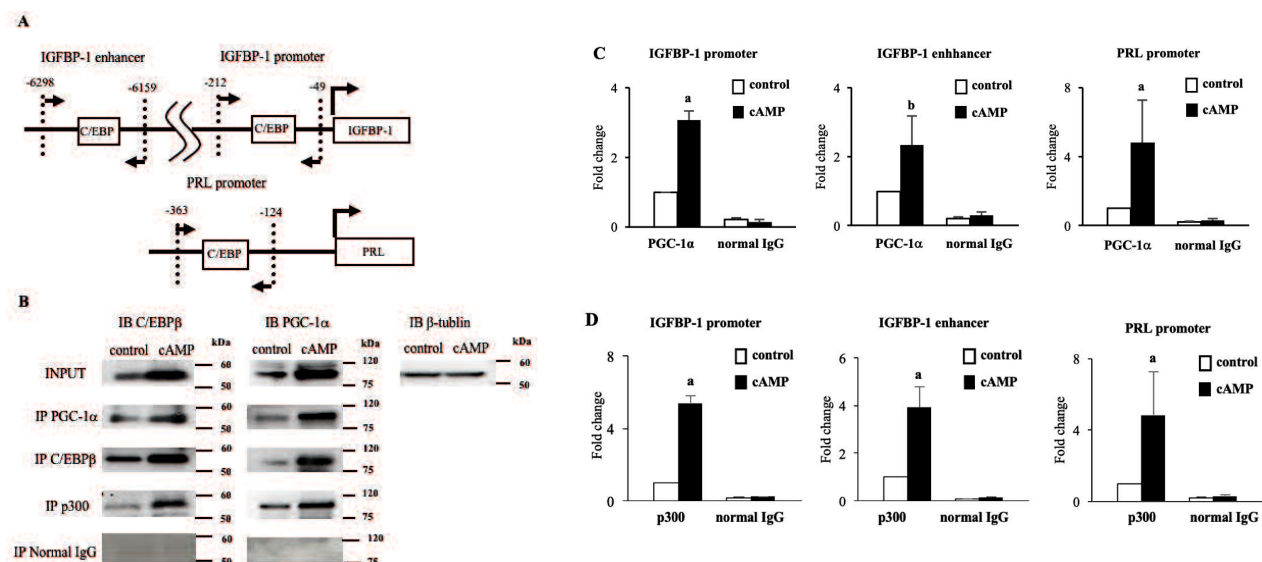


図 3 cAMP による PGC-1 α と p300 の IGFBP-1 のプロモーターおよびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域へのリクルート

A. IGFBP-1 のプロモーター領域とエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域における C/EBP β 結合部位の位置を示している。IGFBP-1 プロモーターは-49～-212 bp、IGFBP-1 エンハンサーは-6159～-6298 bp、PRL プロモーターは-124～-363 bp。この 3 領域を PCR で増幅し、ChIP assay に用いた。B. PGC-1 α 、C/EBP β および p300 の共免疫沈降。ESC を cAMP 存在下、または非存在下で 4 日間培養した。全細胞ライセートを調製し、PGC-1 α 、C/EBP β および p300 抗体を用いた免疫沈降 (IP) に供した。イムノブロット (IB) は、抗 PGC-1 α または C/EBP β 抗体で行った。 β -tubulin を内部標準として使用した。C, D. IGFBP-1 のプロモーター領域とエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域への PGC-1 α と p300 のリクルートを ChIP assay により解析した。プライマーは C/EBP β 結合部位を含むように設計し、リアルタイム PCR により解析した。値はコントロールサンプルとの比として表した。データは、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. control; b: $P < 0.05$ vs. control。

4. IGFBP-1 のプロモーターおよびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域の H3K27ac に対する PGC-1 α の関与

PGC-1 α と p300 は、IGFBP-1 のプロモーター領域とエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域の C/EBP β 結合部位に共局在していたことから、PGC-1 α はこれらの領域で C/EBP β と結合して、p300 のリクルートや H3K27ac の増加に関与していると仮説を立てた。この仮説を検証するために、PGC-1 α をノックダウンすることで p300 のリクルートと H3K27ac に変化があるかどうかを調べた。PGC-1 α をノックダウンすることで、cAMP に

よって誘導される p300 のリクルートと H3K27ac の増加は有意に抑制された (図 4A および 4B)。また、C/EBP β をノックダウンすることで、cAMP による PGC-1 α および p300 のリクルートも有意に抑制された (図 4C および 4D)。さらに、PGC-1 α がこれらの領域への C/EBP β の結合を制御しているのかも調べた。cAMP により増加する C/EBP β の結合も、PGC-1 α のノックダウンにより抑制された (図 4E)。PGC-1 α をノックダウンしても、cAMP による C/EBP β タンパク質発現の増加には影響しなかった (図 4F)。以上より、PGC-1 α はパイオニア因子である C/EBP β と、そして HAT 活性を有する p300 とヒストン修飾複合体としてプロモーターに結合し、クロマチンリモデリングの開始を司る重要な転写共役因子であると考えられた。

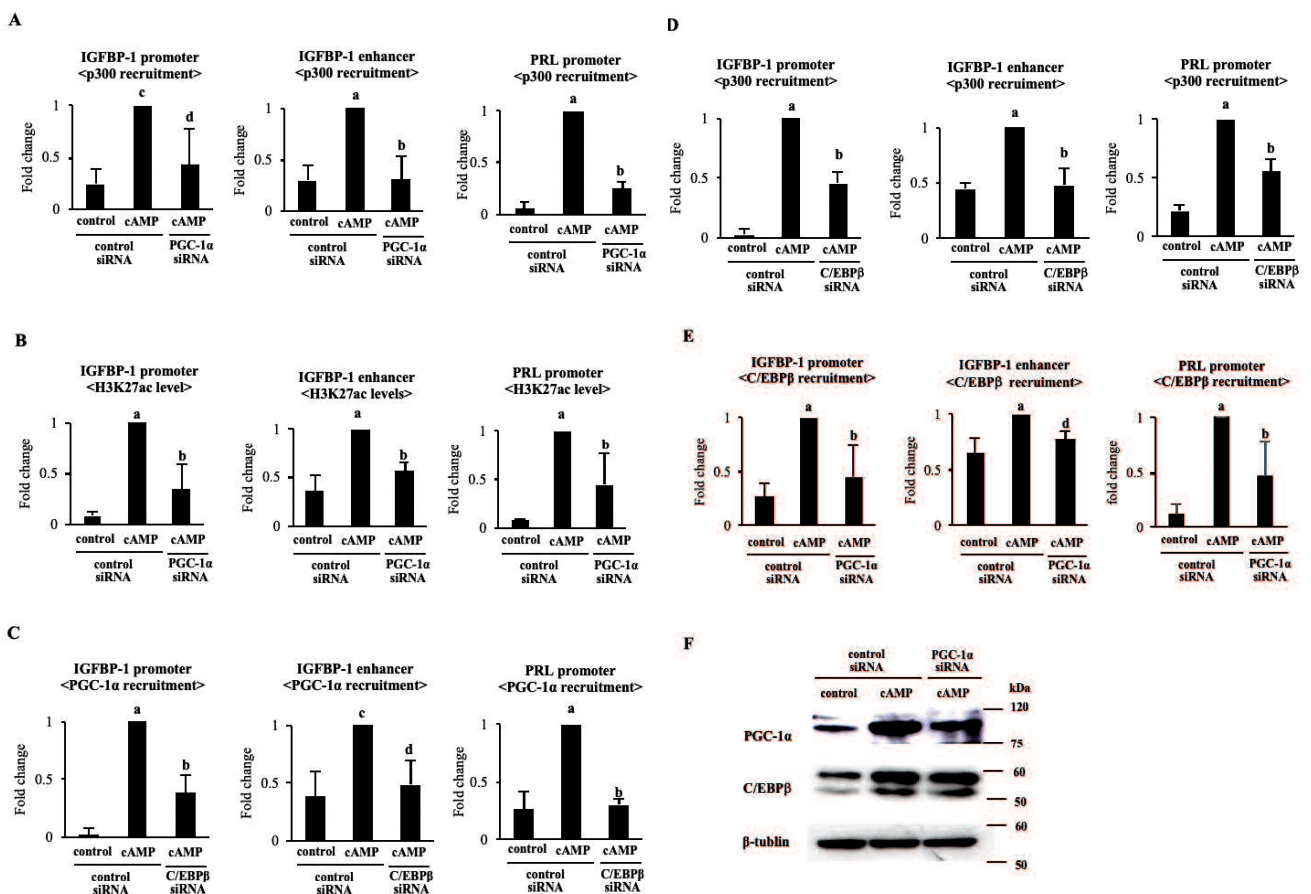


図 4 IGFBP-1 のプロモーター領域およびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域の H3K27ac に対する PGC-1 α の関与

ESC に PGC-1 α 、C/EBP β を標的とした siRNA、または control siRNA をトランスフェクションした。siRNA のトランスフェクションから 48 時間後、ESC を cAMP 存在下、または非存在下で 4 日

間培養した。IGFBP-1 のプロモーター領域およびエンハンサー領域、 PRL のプロモーター領域における p300 のリクルート (A, D)、H3K27ac (B)、PGC-1 α のリクルート (C) および C/EBP β の結合 (E) について ChIP assay を行い、リアルタイム PCR で解析した。値は、control siRNA における cAMP 刺激サンプルとの比として表した。データは、3つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。 a: P<0.01 vs. control siRNA における無刺激； b: P<0.01 vs. control siRNA における cAMP 刺激； c: P<0.05 vs. control siRNA における無刺激； d: P<0.05 vs. control siRNA における cAMP 刺激。 F. 全細胞ライセートを調製し、ウェスタンブロッティングを行い、PGC-1 α ノックダウンによる C/EBP β タンパク質発現における影響を調べた。 β -tubulin を内部標準として使用した。

5. cAMP による PGC-1 α の遺伝子発現上昇への C/EBP β の関与

cAMP による PGC-1 α の発現上昇が脱落膜化に重要であることがわかったため、その詳細な発現上昇機構を検討した。C/EBP β は、脱落膜化過程において多くの遺伝子発現を制御していることから、PGC-1 α の調節因子としても C/EBP β に着目した (4,17,48,59)。C/EBP β はマウスの肝臓や脂肪細胞などにおいて PGC-1 α の発現を制御していることが報告されている (60,61)。そこで、C/EBP β のノックダウンによる PGC-1 α 発現への影響を検討した。cAMP による C/EBP β 発現増加は siRNA により抑制されることを確認した (図 5A)。C/EBP β をノックダウンすると、cAMP による PGC-1 α mRNA およびタンパク質の発現増加が抑制された (図 5B)。cAMP による PGC-1 α の発現上昇が C/EBP β を介していることがわかったため、PGC-1 α 遺伝子周辺のゲノム領域に C/EBP β の結合候補領域が存在するかどうかを調べた。まず、ENCODE プロジェクトにより提供されている HepG2 細胞における C/EBP β 結合の ChIP-sequence のデータを調べた (62)。HepG2 細胞は、PGC-1 α を発現しているヒト不死化肝癌細胞株である (63)。HepG2 細胞が、脱落膜化 ESC と同様に PGC-1 α mRNA を高発現していることがわかったため (図 5C)、HepG2 細胞における PGC-1 α 遺伝子周辺の C/EBP β 結合領域を調べた。その結果、PGC-1 α 遺伝子の第 2 イントロン、転写開始点から約 8,000 bp (region1) および約 25,000 bp (region2) 下流領域に C/EBP β 結合シグナルを認めた。さらにこの領域内の C/EBP β の結合配列を JASPAR データベース

(<http://jaspar.binf.ku.dk/>) で検索・同定し、その領域を挟むように ChIP プライマーを設計した (図 5D)。cAMP 刺激によってこれら 2つの領域への C/EBP β の結合が有意に増加することがわかった(図 5E)。次に、これらの領域が実際にエンハンサー活性を有するかどうかを調べるために、ルシフェラーゼアッセイを行った。コントロールベクター (pGL4.23) のみをトランスフェクションした細胞において cAMP によるルシフェラーゼ活性の上昇が認められなかったのに対し、PGC-1 α エンハンサー領域の配列を含むベクター (enhancer 1 or 2 /pGL4.23) をトランスフェクションした場合は、ルシフェラーゼ活性は cAMP 刺激により上昇していた (図 5F)。以上より、C/EBP β 結合部位を含むこれらの PGC-1 α エンハンサー領域は、脱落膜化刺激による転写活性を有することが明らかとなった。

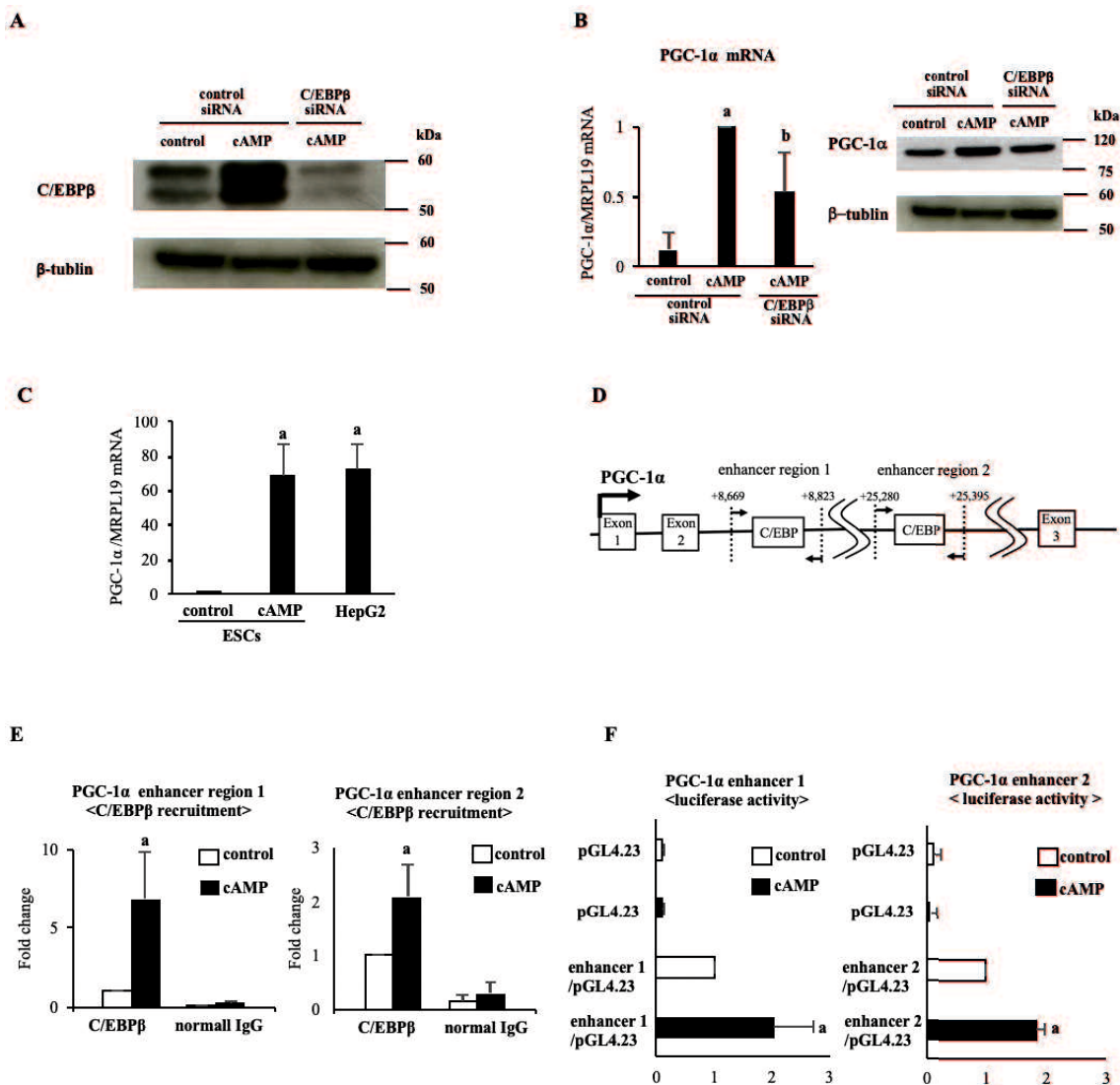


図 5 cAMP による PGC-1 α の遺伝子発現上昇への C/EBP β の関与

A. ESC に C/EBP β に対する siRNA または control 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 48 時間後に、ESC を cAMP 存在下、または非存在下で 4 日間培養した。全細胞ライセートを調製し、ウェスタンブロッティングを行い、C/EBP β タンパク質発現のノックダウンを検討した。 β -tubulin を内部標準として使用した。B. PGC-1 α mRNA の発現は、リアルタイム RT-PCR によって分析した。PGC-1 α の値は、MRPL19 の値に対して標準化し、control siRNA における cAMP 刺激サンプルとの比として表した。値は、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. control siRNA における無刺激；b: $P < 0.05$ vs. control siRNA における cAMP 刺激。また、全細胞ライセートを調製し、ウェスタンブロッティングを行い、PGC-1 α タンパク質発現のノックダウンを検討した。 β -tubulin を内部標準として使用した。C. 非脱落膜化 ESC (control)、脱落膜化 ESC (cAMP) および HepG2 細胞間の PGC-1 α mRNA の発現の比較。PGC-1 α mRNA の発現は、リアルタイム RT-PCR によって分析した。PGC-1 α の値は、MRPL19 の値に対して標準化し、ESC のコントロールとの比として表した。値は、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. ESC の control。D. PGC-1 α のエンハンサー領域における C/EBP β 結合部位の位置。+8,669~+8,823 bp と +25,280~+25,395 bp の 2 つの PGC-1 α エンハンサー領域を PCR で増幅した。E. 各エンハンサー領域への C/EBP β の結合を CHIP assay により調べた。相対的な結合レベルは、リアルタイム PCR で解析した。値はコントロールサンプルとの比で表した。データは、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. control。F. ESC における PGC-1 α エンハンサー領域のエンハンサー活性に対する cAMP の効果。2 つの PGC-1 α エンハンサー領域をそれぞれ pGL4.23 (enhancer1 or 2/pGL4.23) に導入した。ESC にレポーターベクター (pGL4.23 or enhancer 1 or 2 /pGL4.23) と、標準化コントロールとして pRL-TK ベクターをトランスフェクションし、5 時間後より、細胞を cAMP 存在下、または非存在下で 4 日間培養した。ルシフェラーゼ活性の値は、コントロールサンプルとの比で表した。値は、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: $P < 0.01$ vs. enhancer/pGL4.23 を有する無刺激。

6. ゲノム編集による PGC-1 α エンハンサー欠失が PGC-1 α mRNA 発現に与える影響

さらに、PGC-1 α エンハンサー領域が実際に PGC-1 α の発現に関与するかどうかを検証するために、ゲノム編集によってこれらのエンハンサー領域を欠失させた細胞を作製することにした。ESC はトランスフェクションの効率が低く、single cell culture が困難であるためゲノム編集に用いることができなかった。PGC-1 α を高発現し (図 5C)、ゲノム編集に関する実験に広く用いられている HepG2 細胞を用いてゲノム編集を行なった (21,64)。2 つの PGC-1 α エンハンサー領域の C/EBP β 結合部位を囲むように、それぞれ small guide RNA

(sgRNA) を設計した (図 6A)。HepG2 細胞に CRISPR/Cas9 と sgRNA をトランスフェクションし、ゲノム編集を誘導した。各クローンのエンハンサー領域の欠失を PCR とシーケンスによって調べ、目的の領域が欠失していることを確認した (図 6B、6C)。両アレルで同じ欠失を持つクローンを解析に用いた。PGC-1 α mRNA のレベルを、野生型クローンとエンハンサー欠失型クローンの中で比較した。region1 および region2 欠失型クローンは、いずれも PGC-1 α mRNA の発現が野生型クローンに比べて有意に低いことがわかった (図 6D)。これらの結果から、C/EBP β 結合部位を含む PGC-1 α エンハンサー領域が PGC-1 α の発現に関与していることがわかった。

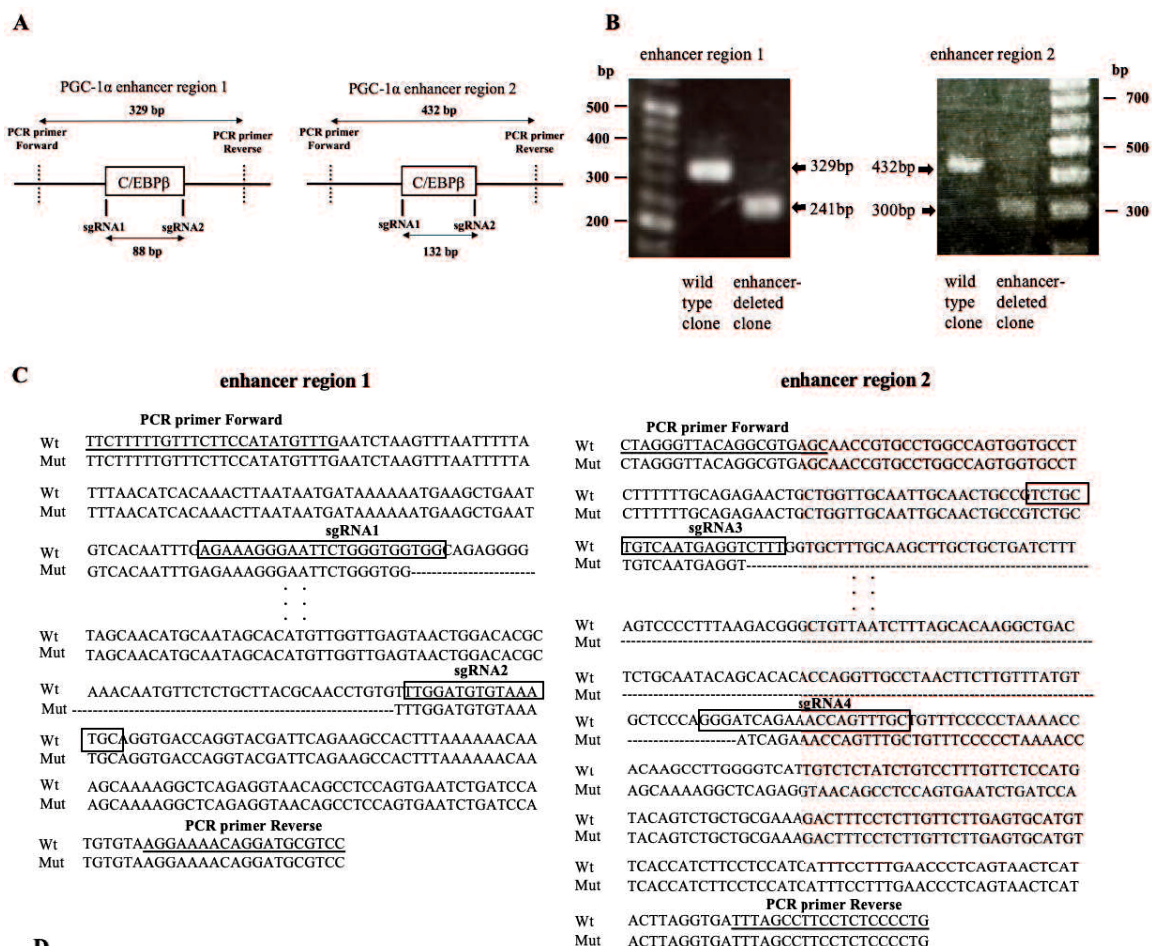


図6 ゲノム編集による PGC-1 α エンハンサー欠失が PGC-1 α mRNA 発現に与える影響

A. 縦線は、PGC-1 α エンハンサー領域の C/EBP β 結合部位を挟む sgRNA1 および sgRNA2 の位置を示す。sgRNA を囲む PCR プライマーを用いて、各クローンのゲノム DNA を増幅させた。 B. 代表的なクローンのゲノム DNA からの PCR 増幅産物。region1 (左) については、野生型クローンでは 329 bp の PCR 産物が生じた。88 bp の欠失に成功し、region1 欠失型クローンでは 241 bp の小さな PCR 産物が生じた。region2 (右) については、野生型クローンでは 432 bp の PCR 産物が観察された。132 bp の欠失に成功し、region2 欠失型クローンでは 300 bp の小さな PCR 産物が生じた。 C. エンハンサー欠失クローン (Mut) のゲノム DNA から増幅した欠失領域周辺の DNA 配列結果 (左: region1、右: region2)。欠失した 88 bp と 132 bp の領域は破線で示した。各 sgRNA の配列は枠で囲んである (sgRNA1~sgRNA4)。ゲノム PCR 用のプライマーは下線で示した。 D. PGC-1 α mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。PGC-1 α の値は、MRPL19 の値に対して標準化し、野生型クローンとの比として表した。各クローンの値および平均 \pm SD を示す。

7. 脱落膜化過程における PGC-1 α の機能

最後に、PGC-1 α によって制御されている脱落膜化関連遺伝子とその機能を同定することを試みた。そのために、3つのグループ (control siRNA による無刺激、control siRNA による cAMP 刺激、PGC-1 α siRNA による cAMP 刺激) の細胞からトータル RNA を抽出し、RNA-sequence を行った。cAMP 刺激によって 2,702 遺伝子の発現が上昇し、そのうち 840 遺伝子 (31.1%) は PGC-1 α のノックダウンで抑制された。すなわちこれらの遺伝子が脱落膜化過程で PGC-1 α により発現上昇が制御される遺伝子である。これら 840 遺伝子の特徴を探るために Gene ontology 解析を行なったところ、PGC-1 α により発現が上昇する遺伝子には、免疫調節に関連する term が多く抽出された (表 1、太字)。RNA-sequence の結果を検証するために、免疫調節に関連する 6 つの PGC-1 α 制御下遺伝子 (CCR7、PDGFD、TNFRSF21、PTGES、CD34、BMP2) を選び、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。cAMP 刺激によってそれらの発現は増加し、PGC-1 α のノックダウンによって発現は抑制されることが確認できた (図 7A)。さらに、これらの免疫調節関連遺伝子が C/EBP β の制御下にもあるかどうかを検討した。C/EBP β をノックダウンすることで、cAMP 刺激による発現上昇が抑制された (図 7B)。これらの結果から、C/EBP β -PGC-1 α

経路は、脱落膜化の誘導に加え、脱落膜化過程における免疫調節に関与している可能性が示唆された。一方、cAMP は 2,819 遺伝子の発現を抑制し、そのうち 361 遺伝子 (12.8%) は PGC-1 α ノックダウンにより抑制された。これらの遺伝子について Gene ontology 解析を行った結果、有意な term はなかった。

表 1 PGC-1 α により発現が増加した遺伝子に関連する Gene ontology term

GO term	Genes	p value
positive regulation of leukocyte migration	CCR7, ELANE, PDGFD, PF4V1, LGALS9	0.002147176
response to inorganic substance	KCNMB3, CCR7, MT1M, PTGES, NTRK1, PDGFD, AREG, KCNIP2, PPARGC1A	0.002321063
positive regulation of protein kinase activity	BMP2, CCR7, FAM20A, NTRK1, ELANE, LPAR3, PDGFD, GNG3, PILRB	0.002351827
positive regulation of kinase activity	BMP2, CCR7, FAM20A, NTRK1, ELANE, LPAR3, PDGFD, GNG3, PILRB	0.003647399
response to lipopolysaccharide	TNFRSF21, CCR7, PTGES, ELANE, PF4V1, PPARGC1A, LGALS9	0.003974241
response to alkaloid	BCHE, NTRK1, OXT, PPARGC1A, NPFF	0.004512357
response to nitrogen compound	CCR7, GPR21, BCHE, ID1, NTRK1, OXT, IGFBP1, PDGFD, GNG3, AREG, PPARGC1A, NPFF	0.004752558
response to molecule of bacterial origin	TNFRSF21, CCR7, PTGES, ELANE, PF4V1, PPARGC1A, LGALS9	0.00494838
acute inflammatory response to antigenic stimulus	CCR7, ELANE, NPFF	0.005315934
response to oxygen-containing compound	TNFRSF21, OXT, ELANE, PF4V1, PPARGC1A, LGALS9, CCR7, GPR21, PTGES, ID1, BCHE, NTRK1, IGFBP1, AREG, PDGFD, GNG3	0.005517742
response to organonitrogen compound	GPR21, BCHE, ID1, NTRK1, OXT, IGFBP1, PDGFD, GNG3, AREG, PPARGC1A, NPFF	0.005746502
connective tissue development	BMP2, CD34, ID4, PDGFD, FRZB, PPARGC1A	0.006497689
regulation of cytokine secretion	TNFRSF21, CRTAM, CCR7, CD34, LGALS9	0.006706016
cell-cell signaling	KCNMB3, BMP2, OXT, LPAR3, GRIA4, FRZB, KCNIP2, CCL27, GPR21, BCHE, CD34, NTRK1, WIF1, IGFBP1, AREG, NPFF	0.007520157
regulation of leukocyte migration	CCR7, ELANE, PDGFD, PF4V1, LGALS9	0.007683221
leukocyte mediated cytotoxicity	CRTAM, RAET1G, ELANE, LGALS9	0.007971374
regulation of cell proliferation	TNFRSF21, BMP2, ELANE, VWCE, FRZB, PF4V1, PPARGC1A, LGALS9, OGN, PTGES, ID1, BCHE, NTRK1, ID4, AREG, PDGFD	0.009207078
cytokine secretion	TNFRSF21, CRTAM, CCR7, CD34, LGALS9	0.009317959
response to lipid	TNFRSF21, CCR7, BCHE, PTGES, OXT, ELANE, PAQR6, AREG, PF4V1, PPARGC1A, LGALS9	0.010269201
trans-synaptic signaling	KCNMB3, GPR21, BCHE, NTRK1, OXT, LPAR3, GRIA4, KCNIP2, NPFF	0.010382114

上位 20 位を表に示している。免疫に関連する term を太字で示した。

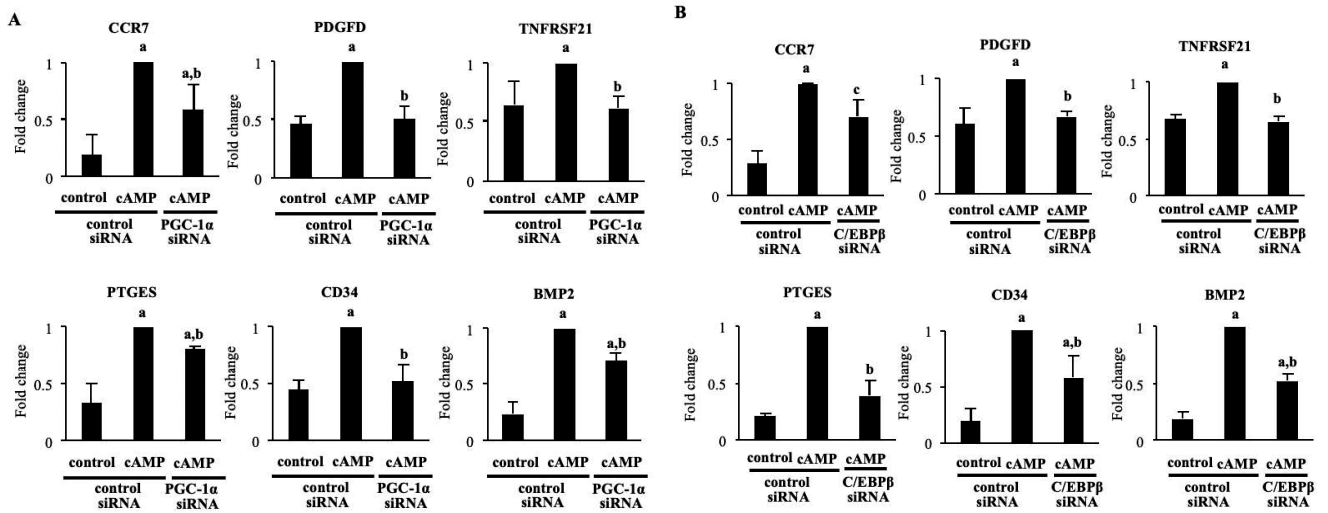


図7 リアルタイム RT-PCR による RNA sequence データの検証

PGC-1 α (A)、C/EBP β (B)、または control siRNA で ESC をトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後に、ESC を cAMP 存在下、または非存在下で 4 日間培養した。mRNA の発現はリアルタイム RT-PCR で解析した。PGC-1 α 制御下遺伝子の値は、MRPL19 の値で標準化し、control siRNA における cAMP 刺激サンプルとの比として表した。値は、3 つの異なるインキュベーションの平均 \pm SD である。a: P<0.01 vs. control siRNA における無刺激; b: P<0.01 vs. control siRNA における cAMP 刺激。

【考察】

PGC-1 α は、肝臓、筋肉や脂肪組織において、ミトコンドリア合成、熱発生、糖代謝、脂肪酸酸化に關与する転写共役因子としてよく知られている(25-28)。また、PGC-1 α は卵巣や精巣などの生殖器においても生理的な役割を担っている(29-31)。ヒトの子宮内膜では PGC-1 α が発現していることが報告されているが(32)、その生理的な機能については不明であった。本研究では、PGC-1 α が C/EBP β や p300 とヒストン修飾複合体を形成する転写共役因子として働き、IGFBP-1 や PRL のエピゲノム変化を誘導し、脱落膜化に貢獻することを明らかにした。さらに、PGC-1 α の発現調節については、C/EBP β が PGC-1 α 遺伝子の新規エンハンサー領域に結合することでその発現を上昇させるという、新たな発現制御機構を明らかにした(図8)。

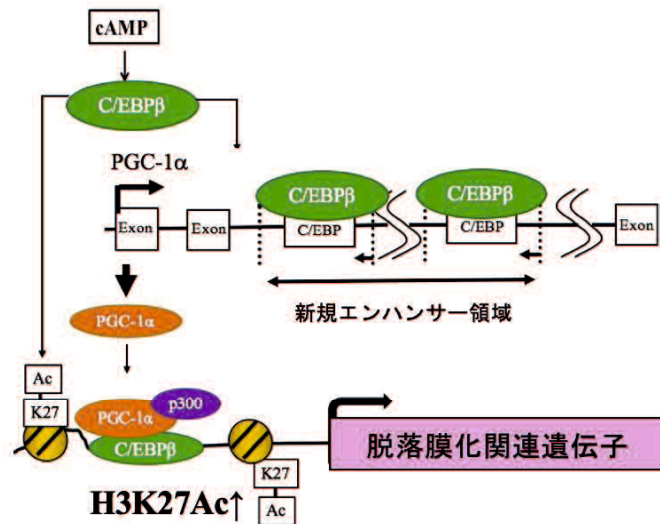


図 8 PGC-1αの役割とその制御機構

PGC-1αは C/EBPβの新規エンハンサー領域への結合により、脱落膜化過程で上昇する。PGC-1αは C/EBPβおよび p300 とヒストン修飾複合体を形成し、IGFBP-1 のプロモーターおよびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域で H3K27ac を増加させることで脱落膜化に貢献している。

IGFBP-1 と PRL は、その発現が脱落膜化過程において上昇するため、脱落膜化のマーカ遺伝子として知られている (10,15,65)。我々や他の研究者は、C/EBPβ、WT1、FOXO1 など、IGFBP-1 と PRL のプロモーター領域に結合するいくつかの転写因子を以前に同定している(10,17,48,50-52)。しかし、IGFBP-1 や PRL 発現の制御に PGC-1αが関与していることを示す報告はない。本研究では、PGC-1αは IGFBP-1 と PRL のプロモーターおよびエンハンサー領域に結合することで発現を制御していることを初めて見出した。しかし、PGC-1αは DNA 結合ドメインを持たないため、他の転写因子と相互作用することでプロモーターやエンハンサーに結合する必要がある(39,66-68)。我々はその候補として C/EBPβに着目した。実際、共免疫沈降法により、PGC-1αが C/EBPβ と相互作用することを示した。さらに、C/EBPβをノックダウンすると、PGC-1αのリクルートが抑制されることも明らかにした。以上より、cAMP 刺激により IGFBP-1 のプロモーターおよびエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域の C/EBPβ 結合部位に PGC-1αがリクルートされ、C/EBPβ と相互作用することにより、IGFBP-1 と PRL の遺伝子発現を上昇させるこ

とが示された。このことは、ヒト癌細胞株において、PGC-1 α が C/EBP β と相互作用して標的遺伝子を活性化するという報告からも支持される(37,38)。

我々は、IGFBP-1 のプロモーター領域やエンハンサー領域、PRL のプロモーター領域における H3K27 のアセチル化には、C/EBP β の結合が重要であることを既に報告している(17,21)。C/EBP β はこれらの領域のクロマチンリモデリングを開始させるパイオニア因子として働いているが、パイオニア因子がクロマチンリモデリングを誘導するためには、HAT 活性を有するコファクターとヒストン修飾複合体を形成する必要がある。我々は以前、p300 が IGFBP-1 エンハンサー領域で C/EBP β と相互作用して H3K27ac を誘導する HAT タンパクであることを報告した(21)。本研究では、エンハンサー領域だけでなく IGFBP-1 や PRL のプロモーター領域でも p300 のリクルートが増加するという新しい知見を見出した。したがって、p300 がこれら 3 つの領域における H3K27ac の増加に関与し、脱落膜化マーカー遺伝子の発現を調整する重要な HAT タンパクであることがわかった。さらに、PGC-1 α をノックダウンすることで、cAMP によるこれら 3 つの領域への p300 の結合および H3K27ac レベルを抑制されたことから、PGC-1 α は p300 をヒストン修飾複合体にリクルートして H3K27ac の誘導に貢献している転写共役因子であることを見出した。ヒストン修飾複合体は、パイオニア因子と HAT タンパクだけでなく、他のコファクターも含んでおり(69)、これらのコファクター自身は HAT 活性を持たないが、ヒストン修飾複合体への HAT タンパクのリクルートを制御することにより、ヒストンのアセチル化誘導に関与していると報告されている(70)。実際に、PGC-1 α は p300 とヒストン修飾複合体を形成し(33,34)、腎臓や肝臓の細胞でヒストンアセチル化の誘導に関与することが報告されている(35,36)。我々の共免疫沈降法の結果からも、p300 が PGC-1 α および C/EBP β の両方と相互作用していることがわかった。以上より、PGC-1 α は C/EBP β および p300 とヒストン修飾複合体を形成する転写共役因子であり、脱落膜化における IGFBP-1 および PRL の H3K27ac の増加に関与していることが示された。さらに興味深い点は、PGC-1 α の

ノックダウンによって、IGFBP-1のプロモーター領域とエンハンサー領域、PRLのプロモーター領域における C/EBP β の結合も低下したことである。PGC-1 α のノックダウンでは C/EBP β タンパク質の発現量は変化しなかったことから、PGC-1 α のノックダウンによってこれらの領域への C/EBP β の結合自体が抑制されたと考えられた。つまり、PGC-1 α は、パイオニア因子自体がゲノム上に結合するのにも貢献しているのではないかと推測された。すなわち、パイオニア因子がゲノム上に結合してクロマチン構造を開くためには、ヒストン修飾複合体を形成するすべてのコファクターが必要不可欠であると考えられる。

PGC-1 α は脱落膜化における重要な転写因子であるため(図8)、脱落膜化における PGC-1 α の詳細な発現調節機構を検討した。その結果、脱落膜化過程において C/EBP β が PGC-1 α の発現を上昇させることが明らかとなった。これまで、PGC-1 α の発現調節における C/EBP β の関与は、マウス細胞でのみ観察されており、C/EBP β は PGC-1 α の近位プロモーター領域に結合している(60,61)。PGC-1 α の近位プロモーター領域にはいくつかの転写因子結合部位が同定されているが(71)、その領域以外は PGC-1 α の発現制御との関連性についての報告はない。近年、エンハンサープロモーター相互作用のような長距離クロマチン相互作用が遺伝子発現を制御することから、転写開始点の近くだけでなく遠位のエンハンサー領域も転写の重要な結合領域として考えられている(72,73)。公共の ChIP-sequence データを利用して PGC-1 α 遺伝子周辺を調べると、エンハンサー領域(転写開始点から約 8,000 bp と 25,000 bp 下流)に 2つの C/EBP β 結合部位が存在することがわかった。一方、プロモーター領域では C/EBP β 結合シグナルは認めなかった。これらのことから、ヒトの細胞では、マウスと異なり、主にエンハンサー領域への C/EBP β の結合を介して PGC-1 α の発現を調節していることが示唆された。そこで、エンハンサー領域に着目し、脱落膜化過程において C/EBP β がエンハンサー領域に結合していること、またルシフェラーゼアッセイでこれらの領域が脱落膜化刺激に伴い転写活性を持つことを明らかにした。しかし、これまでに存在したアッセイでは、実際のエンハンサー活性については検証することがで

きなかった。例えば、レポーターアッセイでは、導入したエンハンサー領域の DNA 配列が転写活性を持つことは確認できるが、標的遺伝子が *in vivo* でこのエンハンサーによって活性化されるかどうかは証明できない。そこで CRISPR/Cas9 System を用いたゲノム編集によりエンハンサー領域を欠失させた細胞株を樹立し、その遺伝子発現を調べることで着目したエンハンサー領域の遺伝子発現への関与を証明することとした。我々はこの方法により、IGFBP-1 や WT1 遺伝子の遠位エンハンサーが遺伝子発現調節に関与することを実証してきた(16,48)。今回同様の手法を用いて、着目したエンハンサー領域が PGC-1 α の発現に関与していることを証明した。よって、この領域は C/EBP β 結合部位を含む新規 PGC-1 α エンハンサーであることが示された。ただ、本研究では HepG2 細胞を用いているため、HepG2 細胞における PGC-1 α の制御が、脱落膜化 ESC におけるそれとは異なる可能性があることも無視することはできない。

最後に、脱落膜化過程における PGC-1 α の細胞機能への影響についても検討した。PGC-1 α は、840 もの遺伝子の発現を上昇させることから、PGC-1 α は脱落膜化に不可欠な転写因子であり、これらの PGC-1 α による発現上昇遺伝子は、主に免疫調節に関連していると考えられた (表 1)。子宮内膜では、脱落膜化過程において免疫細胞の変化により免疫環境が著しく変化する(74-76)。他組織では、PGC-1 α が免疫調節に関与しているという報告はあるが(77,78)、PGC-1 α が子宮内膜の免疫調節に関与しているかどうかは不明である。PGC-1 α によって制御される遺伝子のうち、CCR7 は制御性 T 細胞の脱落膜への移動を制御しており(79)、CD34 は、脱落膜ナチュラルキラー細胞の前駆細胞のマーカーの一つであると報告されている(80)。興味深いことに、PGC-1 α によって発現が上昇するこれらの免疫調節関連遺伝子は、C/EBP β の制御下にあることも確認された。これらの結果から、C/EBP β -PGC-1 α 経路が脱落膜化の免疫調節に関与している可能性が示唆された。

【結語】 PGC-1 α はヒト子宮内膜において、C/EBP β および p300 とヒストン修飾複合体を形成し、IGFBP-1 および PRL のエピゲノム変化を誘導することで脱落膜化に貢献することが明らかとなった。さらに、PGC-1 α が新規エンハンサー領域への C/EBP β の結合によって発現上昇すること、また、ヒト ESC の脱落膜化において C/EBP β -PGC-1 α 経路が重要な役割を果たすことを明らかにした。

【謝辞】

この研究は、日本学術振興会科研費（課題番号 16K20191, 17K11239, 18K09230, 20K09645, 20K18191, 20H03825）の資金提供を受けて行われた。抗 H3K27ac 抗体の寄贈を受けた木村浩博士（東京工業大学、日本、東京）に感謝する。本論文は Journal of Biological Chemistry, 2022 Mar 28;298(5)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. Salker, M., Teklenburg, G., Molokhia, M., Lavery, S., Trew, G., Aojanepong, T., Mardon, H. J., Lokugamage, A. U., Rai, R., Landles, C., Roelen, B. A., Quenby, S., Kuijk, E. W., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Regan, L., Macklon, N. S., and Brosens, J. J. (2010) Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One*. **5**, e10287
2. Zhang, Q., and Yan, J. (2016) Update of Wnt signaling in implantation and decidualization. *Reprod Med Biol*. **15**, 95-105
3. Fukui, Y., Hirota, Y., Matsuo, M., Gebriel, M., Akaeda, S., Hiraoka, T., and Osuga, Y. (2019) Uterine receptivity, embryo attachment, and embryo invasion: Multistep processes in embryo implantation. *Reprod Med Biol*. **18**, 234-240
4. Tamura, I., Maekawa, R., Jozaki, K., Ohkawa, Y., Takagi, H., Doi-Tanaka, Y., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Taketani, T., Sato, S., Tamura, H., and Sugino, N. (2021) Transcription factor C/EBP β induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Cell Endocrinol*. **520**, 111085
5. Kohlmeier, A., Sison, C. A. M., Yilmaz, B. D., Coon, V. J., Dyson, M. T., and Bulun, S. E. (2020) GATA2 and Progesterone Receptor Interaction in Endometrial Stromal Cells Undergoing

Decidualization. *Endocrinology*. **161**

6. Vasquez, Y. M., Mazur, E. C., Li, X., Kommagani, R., Jiang, L., Chen, R., Lanz, R. B., Kovanci, E., Gibbons, W. E., and DeMayo, F. J. (2015) FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization. *Mol Endocrinol*. **29**, 421-433
7. Tamura, I., Ohkawa, Y., Sato, T., Suyama, M., Jozaki, K., Okada, M., Lee, L., Maekawa, R., Asada, H., Sato, S., Yamagata, Y., Tamura, H., and Sugino, N. (2014) Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. **28**, 1656-1669
8. Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*. **128**, 707-719
9. Tamura, I., Taketani, T., Lee, L., Kizuka, F., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Tamura, H., and Sugino, N. (2011) Differential Effects of Progesterone on COX-2 and Mn-SOD Expressions Are Associated with Histone Acetylation Status of the Promoter Region in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. **96**, E1073-1082
10. Tamura, I., Asada, H., Maekawa, R., Tanabe, M., Lee, L., Taketani, T., Yamagata, Y., Tamura, H., and Sugino, N. (2012) Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. **153**, 5612-5621
11. Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Peng, W., Zhang, M. Q., and Zhao, K. (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet*. **40**, 897-903
12. Maekawa, R., Tamura, I., Shinagawa, M., Mihara, Y., Sato, S., Okada, M., Taketani, T., Tamura, H., and Sugino, N. (2019) Genome-wide DNA methylation analysis revealed stable DNA methylation status during decidualization in human endometrial stromal cells. *BMC Genomics*. **20**, 324
13. Cirillo, L. A., Lin, F. R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., and Zaret, K. S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell*. **9**, 279-289
14. Fakhouri, T. H., Stevenson, J., Chisholm, A. D., and Mango, S. E. (2010) Dynamic chromatin organization during foregut development mediated by the organ selector gene PHA-4/FoxA. *PLoS Genet*. **6**
15. Gellersen, B., and Brosens, J. (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol*. **178**, 357-372
16. Tamura, I., Takagi, H., Doi-Tanaka, Y., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Shinagawa, M., Maekawa, R., Taketani, T., Sato, S., Tamura, H., and Sugino, N. (2020) Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization. *J Biol Chem*. **295**, 4673-4683
17. Tamura, I., Sato, S., Okada, M., Tanabe, M., Lee, L., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y., Tamura, H., and Sugino, N. (2014) 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*. **155**, 275-286
18. Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**, 435-459
 19. Fuglerud, B. M., Ledsaak, M., Rogne, M., Eskeland, R., and Gabrielsen, O. S. (2018) The pioneer factor activity of c-Myb involves recruitment of p300 and induction of histone acetylation followed by acetylation-induced chromatin dissociation. *Epigenetics Chromatin*. **11**, 35
 20. Cesena, T. I., Cardinaux, J. R., Kwok, R., and Schwartz, J. (2007) CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem*. **282**, 956-967
 21. Tamura, I., Jozaki, K., Sato, S., Shirafuta, Y., Shinagawa, M., Maekawa, R., Taketani, T., Asada, H., Tamura, H., and Sugino, N. (2018) The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization. *J Biol Chem*. **293**, 5270-5280
 22. Spruce, C., Dlamini, S., Ananda, G., Bronkema, N., Tian, H., Paigen, K., Carter, G. W., and Baker, C. L. (2020) HELLS and PRDM9 form a pioneer complex to open chromatin at meiotic recombination hot spots. *Genes Dev*. **34**, 398-412
 23. Thomas, L. R., Wang, Q., Grieb, B. C., Phan, J., Foshage, A. M., Sun, Q., Olejniczak, E. T., Clark, T., Dey, S., Lorey, S., Alicie, B., Howard, G. C., Cawthon, B., Ess, K. C., Eischen, C. M., Zhao, Z., Fesik, S. W., and Tansey, W. P. (2015) Interaction with WDR5 promotes target gene recognition and tumorigenesis by MYC. *Mol Cell*. **58**, 440-452
 24. Gerlach, J. M., Furrer, M., Gallant, M., Birkel, D., Baluapuri, A., Wolf, E., and Gallant, P. (2017) PAF1 complex component Leo1 helps recruit Drosophila Myc to promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**, E9224-E9232
 25. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. **98**, 115-124
 26. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. **92**, 829-839
 27. Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., Fang, F., and Chang, Y. (2010) Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*. **5**, e11707
 28. Schreiber, S. N., Emter, R., Hock, M. B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E. J., and Kralli, A. (2004) The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 6472-6477
 29. Yazawa, T., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Orisaka,

- M., Umezawa, A., and Miyamoto, K. (2010) PPAR-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Mol Endocrinol.* **24**, 485-496
30. Liu, X., Ye, J., Wang, L., Li, Z., Zhang, Y., Sun, J., Du, C., Wang, C., and Xu, S. (2017) Protective Effects of PGC-1alpha Against Lead-Induced Oxidative Stress and Energy Metabolism Dysfunction in Testis Sertoli Cells. *Biol Trace Elem Res.* **175**, 440-448
31. Nishigaki, A., Kido, T., Kida, N., Kakita-Kobayashi, M., Tsubokura, H., Hisamatsu, Y., and Okada, H. (2020) Resveratrol protects mitochondrial quantity by activating SIRT1/PGC-1alpha expression during ovarian hypoxia. *Reprod Med Biol.* **19**, 189-197
32. Bombail, V., MacPherson, S., Critchley, H. O., and Saunders, P. T. (2008) Estrogen receptor related beta is expressed in human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *Hum Reprod.* **23**, 2782-2790
33. Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B. M. (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* **286**, 1368-1371
34. Wallberg, A. E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B. M., and Roeder, R. G. (2003) Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol Cell.* **12**, 1137-1149
35. Wang, L., Li, Y., Hu, P., and Teng, C. T. (2008) PGC-1alpha induces dynamic protein interactions on the ERRalpha gene multi-hormone response element nucleosome in kidney cells. *Biochem J.* **416**, 407-419
36. Lee, H. J., Su, Y., Lui, W. Y., Chau, G. Y., Yin, P. H., Lee, H. C., and Chi, C. W. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1alpha) upregulated E-cadherin expression in HepG2 cells. *FEBS Lett.* **582**, 627-634
37. Du, Q., Tan, Z., Shi, F., Tang, M., Xie, L., Zhao, L., Li, Y., Hu, J., Zhou, M., Bode, A., Luo, X., and Cao, Y. (2019) PGC1alpha/CEBPB/CPT1A axis promotes radiation resistance of nasopharyngeal carcinoma through activating fatty acid oxidation. *Cancer Sci.* **110**, 2050-2062
38. Wu, H., Liu, B., Chen, Z., Li, G., and Zhang, Z. (2020) MSC-induced lncRNA HCP5 drove fatty acid oxidation through miR-3619-5p/AMPK/PGC1alpha/CEBPB axis to promote stemness and chemoresistance of gastric cancer. *Cell Death Dis.* **11**, 233
39. Rodgers, J. T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z., and Puigserver, P. (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett.* **582**, 46-53
40. Matsuoka, A., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Taniguchi, K., Asada, H., Taketani, T., Tamura, H., and Sugino, N. (2010) 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.* **95**, E291-299
41. Mihara, Y., Maekawa, R., Sato, S., Shimizu, N., Doi-Tanaka, Y., Takagi, H., Shirafuta, Y., Shinagawa,

- M., Tamura, I., Taketani, T., Tamura, H., Abe, T., Asai, Y., and Sugino, N. (2020) An Integrated Genomic Approach Identifies HOXC8 as an Upstream Regulator in Ovarian Endometrioma. *J Clin Endocrinol Metab.* **105**
42. Maekawa, R., Sato, S., Okada, M., Lee, L., Tamura, I., Jozaki, K., Kajimura, T., Asada, H., Yamagata, Y., Tamura, H., Yamamoto, S., and Sugino, N. (2016) Tissue-Specific Expression of Estrogen Receptor 1 Is Regulated by DNA Methylation in a T-DMR. *Mol Endocrinol.* **30**, 335-347
43. Okada, M., Lee, L., Maekawa, R., Sato, S., Kajimura, T., Shinagawa, M., Tamura, I., Taketani, T., Asada, H., Tamura, H., and Sugino, N. (2016) Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats. *Endocrinology.* **157**, 3344-3354
44. Shinagawa, M., Tamura, I., Maekawa, R., Sato, S., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Okada-Matsumoto, M., Taketani, T., Asada, H., Tamura, H., and Sugino, N. (2019) C/EBPbeta regulates Vegf gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats. *Sci Rep.* **9**, 714
45. Lee, L., Asada, H., Kizuka, F., Tamura, I., Maekawa, R., Taketani, T., Sato, S., Yamagata, Y., Tamura, H., and Sugino, N. (2013) Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology.* **154**, 458-470
46. Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N., and Nozaki, N. (2008) The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct.* **33**, 61-73
47. Watanabe, K., Yamamoto, S., Sakaguti, S., Isayama, K., Oka, M., Nagano, H., and Mizukami, Y. (2018) A novel somatic mutation of SIN3A detected in breast cancer by whole-exome sequencing enhances cell proliferation through ERalpha expression. *Sci Rep.* **8**, 16000
48. Tamura, I., Shirafuta, Y., Jozaki, K., Kajimura, T., Shinagawa, M., Maekawa, R., Taketani, T., Asada, H., Sato, S., Tamura, H., and Sugino, N. (2017) Novel Function of a Transcription Factor WT1 in Regulating Decidualization in Human Endometrial Stromal Cells and Its Molecular Mechanism. *Endocrinology.* **158**, 3696-3707
49. Jozaki, K., Tamura, I., Takagi, H., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Shinagawa, M., Maekawa, R., Taketani, T., Asada, H., Sato, S., Tamura, H., and Sugino, N. (2019) Glucose regulates the histone acetylation of gene promoters in decidualizing stromal cells. *Reproduction.* **157**, 457-464
50. Kim, J. J., Taylor, H. S., Akbas, G. E., Foucher, I., Trembleau, A., Jaffe, R. C., Fazleabas, A. T., and Unterman, T. G. (2003) Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by FKHR and HOXA10 in primate endometrial cells. *Biol Reprod.* **68**, 24-30
51. Gao, J., Mazella, J., Suwanichkul, A., Powell, D. R., and Tseng, L. (1999) Activation of the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter by progesterone receptor in decidualized human endometrial stromal cells. *Mol Cell Endocrinol.* **153**, 11-17

52. Tang, M., Mazella, J., Zhu, H. H., and Tseng, L. (2005) Ligand activated relaxin receptor increases the transcription of IGFBP-1 and prolactin in human decidual and endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* **11**, 237-243
53. Pohnke, Y., Kempf, R., and Gellersen, B. (1999) CCAAT/enhancer-binding proteins are mediators in the protein kinase A-dependent activation of the decidual prolactin promoter. *J Biol Chem.* **274**, 24808-24818
54. Tie, F., Banerjee, R., Conrad, P. A., Scacheri, P. C., and Harte, P. J. (2012) Histone demethylase UTX and chromatin remodeler BRM bind directly to CBP and modulate acetylation of histone H3 lysine 27. *Mol Cell Biol.* **32**, 2323-2334
55. Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C. A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M. O., Scacheri, P. C., and Harte, P. J. (2009) CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development.* **136**, 3131-3141
56. Wang, S., Dougherty, E. J., and Danner, R. L. (2016) PPARgamma signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. *Pharmacol Res.* **111**, 76-85
57. Mink, S., Haenig, B., and Klempnauer, K. H. (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol.* **17**, 6609-6617
58. Finck, B. N., and Kelly, D. P. (2006) PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* **116**, 615-622
59. Wang, W., Taylor, R. N., Bagchi, I. C., and Bagchi, M. K. (2012) Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBPbeta involves cyclin E-cdk2 and STAT3. *Mol Endocrinol.* **26**, 2016-2030
60. Wang, H., Peiris, T. H., Mowery, A., Le Lay, J., Gao, Y., and Greenbaum, L. E. (2008) CCAAT/enhancer binding protein-beta is a transcriptional regulator of peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the regenerating liver. *Mol Endocrinol.* **22**, 1596-1605
61. Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D. G., and Lomax, M. A. (2007) C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem.* **282**, 24660-24669
62. Kim, J. J., Buzzio, O. L., Li, S., and Lu, Z. (2005) Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol Reprod.* **73**, 833-839
63. Dankel, S. N., Hoang, T., Flageng, M. H., Sagen, J. V., and Mellgren, G. (2010) cAMP-mediated regulation of HNF-4alpha depends on the level of coactivator PGC-1alpha. *Biochim Biophys Acta.* **1803**, 1013-1019
64. Hu, W., Guo, G., Chi, Y., and Li, F. (2019) Construction of Traf3 knockout liver cancer cell line using CRISPR/Cas9 system. *J Cell Biochem.* **120**, 14908-14915
65. Sultana, S., Kajihara, T., Mizuno, Y., Sato, T., Oguro, T., Kimura, M., Akita, M., and Ishihara, O.

- (2017) Overexpression of microRNA-542-3p attenuates the differentiating capacity of endometriotic stromal cells. *Reprod Med Biol.* **16**, 170-178
66. Charos, A. E., Reed, B. D., Raha, D., Szekely, A. M., Weissman, S. M., and Snyder, M. (2012) A highly integrated and complex PPARGC1A transcription factor binding network in HepG2 cells. *Genome Res.* **22**, 1668-1679
67. Olmos, Y., Sanchez-Gomez, F. J., Wild, B., Garcia-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., and Monsalve, M. (2013) SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1alpha complex. *Antioxid Redox Signal.* **19**, 1507-1521
68. Misra, J., Kim, D. K., Choi, W., Koo, S. H., Lee, C. H., Back, S. H., Kaufman, R. J., and Choi, H. S. (2013) Transcriptional cross talk between orphan nuclear receptor ERRgamma and transmembrane transcription factor ATF6alpha coordinates endoplasmic reticulum stress response. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6960-6974
69. Lai, A. Y., and Wade, P. A. (2011) Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nat Rev Cancer.* **11**, 588-596
70. Kabani, M., Michot, K., Boschiero, C., and Werner, M. (2005) Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochem Biophys Res Commun.* **332**, 398-403
71. Fernandez-Marcos, P. J., and Auwerx, J. (2011) Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr.* **93**, 884S-890
72. Li, G., Ruan, X., Auerbach, R. K., Sandhu, K. S., Zheng, M., Wang, P., Poh, H. M., Goh, Y., Lim, J., Zhang, J., Sim, H. S., Peh, S. Q., Mulawadi, F. H., Ong, C. T., Orlov, Y. L., Hong, S., Zhang, Z., Landt, S., Raha, D., Euskirchen, G., Wei, C. L., Ge, W., Wang, H., Davis, C., Fisher-Aylor, K. I., Mortazavi, A., Gerstein, M., Gingeras, T., Wold, B., Sun, Y., Fullwood, M. J., Cheung, E., Liu, E., Sung, W. K., Snyder, M., and Ruan, Y. (2012) Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell.* **148**, 84-98
73. Zhang, Y., Wong, C. H., Birnbaum, R. Y., Li, G., Favaro, R., Ngan, C. Y., Lim, J., Tai, E., Poh, H. M., Wong, E., Mulawadi, F. H., Sung, W. K., Nicolis, S., Ahituv, N., Ruan, Y., and Wei, C. L. (2013) Chromatin connectivity maps reveal dynamic promoter-enhancer long-range associations. *Nature.* **504**, 306-310
74. Zhu, H., Hou, C. C., Luo, L. F., Hu, Y. J., and Yang, W. X. (2014) Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions. *Gene.* **551**, 1-14
75. Ticconi, C., Pietropolli, A., Di Simone, N., Piccione, E., and Fazleabas, A. (2019) Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci.* **20**
76. Agostinis, C., Mangogna, A., Bossi, F., Ricci, G., Kishore, U., and Bulla, R. (2019) Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front Immunol.* **10**, 2387

77. Bengsch, B., Johnson, A. L., Kurachi, M., Odorizzi, P. M., Pauken, K. E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L. M., Paley, M. A., Delgoffe, G. M., and Wherry, E. J. (2016) Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity*. **45**, 358-373
78. Eisele, P. S., Furrer, R., Beer, M., and Handschin, C. (2015) The PGC-1 coactivators promote an anti-inflammatory environment in skeletal muscle in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. **464**, 692-697
79. Teles, A., Schumacher, A., Kuhnle, M. C., Linzke, N., Thuere, C., Reichardt, P., Tadokoro, C. E., Hammerling, G. J., and Zenclussen, A. C. (2013) Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Front Immunol*. **4**, 158
80. Vacca, P., Vitale, C., Montaldo, E., Conte, R., Cantoni, C., Fulcheri, E., Darretta, V., Moretta, L., and Mingari, M. C. (2011) CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**, 2402-2407