



胞株の樹立を確認した。

作成した PR-A 及び PR-B 安定発現細胞株を用いて、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た。PR-A 安定発現細胞株 2 クローンの両方で 1.4 倍以上に上昇した遺伝子は、複数個存在したが、その中でも 1.75 倍以上に上昇した遺伝子 数個について、P4 応答遺伝子の候補遺伝子としてあげることとした。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 複数個認められた。

PR-A 安定発現細胞株で同定した遺伝子につき、qRT-PCR 法を用いて P4 応答性の確認を行った。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、複数の候補遺伝子のうちいくつかの遺伝子について、RU486 による P4 応答の抑制を確認した。

その後の実験では、同定されたプロゲステロン応答遺伝子の候補遺伝子の中で、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) が存在する遺伝子を探索した。そこでプロゲステロン応答部位の可能性のある遺伝子 A に着目しさらなる検討を加えることとした。qRT-PCR 法を用いて、遺伝子 A の P4 添加後のタイムコースを検討したところ、1 時間後から上昇を始め、12 時間後に最大ピークを迎えることが分かった。次に、遺伝子 A に対する発現誘導が、P4 による転写活性の上昇によるものかどうかを確認するために、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。その結果、シクロヘキシミド添加によって遺伝子 A の発現上昇が抑えられないことから、遺伝子 A は P4 の直接的な応答遺伝子であることが示唆された。また遺伝子 A 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、デキサメタゾン添加においても発現上昇を認めることから、遺伝子 A はグルココルチコイド応答性も確認されたが、プロゲステロン応答性に比すと誘導の程度は低かった。さらに、Ishikawa 細胞株以外の PR 陽性細胞株における P4 応答性をみるために、PR 陽性乳がん細胞株 T47D における P4 応答性を確認した。その結果、遺伝子 A は T47D においても発現上昇が見られた。

これまでの結果から P4 による発現誘導実験において、遺伝子 A がプロゲステロン応答遺伝子であることが強く示唆されたため、データベースサーチにより遺伝子 A

の Progesterone Responsive Element (PRE) の位置を予測した。PRE のコンセンサス配列 (GNACANNNTGTNC) と類似した配列が、ある配列部位 B にあり、この部位が PRE である可能性が示唆された。

遺伝子 A の P4 による発現誘導に重要な位置の確認のためにレポーターアッセイを行った。遺伝子 A のある配列部位 B を用いたルシフェラーゼアッセイにおいては、P4 添加により転写活性の上昇が見られた。一方、配列部位 B 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。一方、遺伝子 A 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 添加により転写活性の上昇を認め、このプラスミドの遺伝子 A 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。

次に遺伝子 A の配列部位 B 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。Ishikawa 由来 PR-A 安定発現細胞株を用い、抗 PR 抗体にてクロマチン免疫沈降を行った。その結果、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。

以上の結果から、遺伝子 A が子宮においてプロゲステロン応答性を有し、プロゲステロンの作用に関与する可能性を示した。

本研究では、子宮内膜由来細胞株 Ishikawa 細胞におけるプロゲステロン応答遺伝子の同定を行った。遺伝子 A をはじめとする複数個の遺伝子を同定し、私は特に遺伝子 A に注目してプロゲステロン応答性について解析を進めた。データベースサーチにより PRE の位置を予測し、同部位に PR を介した P4 依存性のエンハンサー活性を持つことがレポーターアッセイにて示唆された。また、同部位に P4 存在下で PR が結合する PRE が存在することを、クロマチン免疫沈降法を用いてはじめて示した。

今後の課題としては、遺伝子 A 以外の候補遺伝子についてもプロゲステロン応答の調節機構の解析をおこなうことや、それぞれの遺伝子とプロゲステロンの生理作用との関連、妊娠や子宮内膜癌との関連を検討することが必要であろうと考えられる。