OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Progesterone inhibits transcriptional activation of human chorionic gonadotropin - αgene through protein kinase A pathway in trophoblast cells
Author(s)	山本, 敏也
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43226
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【84】

氏名	山本敏也（やまもとしや）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第16638号
学位授与年月日	平成14年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Progesterone inhibits transcriptional activation of human chorionic gonadotropin-α gene through protein kinase A pathway in trophoblast cells （プロゲステロンによるAキナーゼ経路を介した絨毛性ゴナドトロピンα遺伝子転写抑制機構の解析）
論文審査委員	（主査） 教授 村田 雄二 （副査） 教授 奥山 明彦　教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

絨毛性ゴナドトロピン（hCG）は、妊娠の成立・維持に重要なホルモンで、その産生・分泌は、種々の生理活性物質により制御されている。妊娠初期以降、胎盤におけるhCGの産生は低下するが、そのメカニズムは不明である。一方、この時期はプロゲステロンの主な産生部位が黄体から胎盤に移行する時期と一致する。これまでに、プロゲステロンが胎盤におけるhCGの産生を抑制することが報告されている。そこで、プロゲステロンによるhCGα遺伝子転写活性抑制機構を分子生物学的に解析することにより、妊娠中のhCG産生調節機構の一端を明らかとする。

【方法】

ラット絨毛癌細胞株Rcho-1に、5'上流域290bpを含むhCGα promoter-CAT reporter construct（-290hαCAT）を安定導入する。得られた細胞にプロゲステロンを添加し、CAT活性を測定することにより、hCGα転写活性を測定する。次に、プロゲステロンとともにprotein kinase A（PKA）経路を活性化するforskolinを添加しhCGα転写活性上昇の有無を検討する。また、hCGαプロモーター上のプロゲステロン応答領域を同定するために、cyclic response element（CRE）のみをつないだthymidine kinase promoter-CAT reporter construct（CRE-CRE-tk-CAT）およびCREにmutationを入れたhCGα promoter-CAT reporter construct（-290hα（mCRE）CAT）を作製し、プロゲステロン及びforskolinを添加しCAT活性を測定する。次に、プロゲステロン及びforskolin添加後、細胞内cAMP濃度を測定する。さらにプロゲステロンのCRE-binding protein（CREB）のリン酸化に対する効果ならびにPKA catalytic unit及びregulatory unitタンパクの発現に及ぼす影響をウェスタン・ブロット法にて検討する。最後に、細胞質及び核分画におけるPKA活性を測定し、プロゲステロンのPKA活性に及ぼす効果を検討する。

【成績】

-290hαCATを安定導入したRcho-1細胞において、分化に伴うhCGα転写活性の上昇が観察されるが、プロゲステロンはこの上昇を完全に抑制した。この抑制作用は、濃度依存的であり5ng/mlで最大であった。5ng/mlのプロゲステロンは、細胞数に影響を与えなかった。また、プロゲステロン・レセプターの特異的アゴニストであるR5020においてもプロゲステロンと同等のhCGα転写活性の抑制が認められた。Forskolinの添加によりhCGα転写活性の上昇が観察されるが、プロゲステロンはこの上昇も抑制した。CRE-CRE-tk-CATにおいても同様にプロゲステロ

ンは、forskolin による転写活性の上昇を抑制したが、-290hα（mCRE）CAT においては、forskolin による転写活性の上昇も、プロゲステロンによる転写活性の抑制も観察されなかった。また、プロゲステロンは、forskolin による細胞内 cAMP の上昇に影響を与えなかった。Forskolin により、CREB のリン酸化が起こるが、プロゲステロンは、この CREB のリン酸化を抑制した。一方、プロゲステロンは、PKA catalytic subunit 及び regulatory subunit タンパクの発現量に影響を与えなかった。Forskolin により、細胞質及び核分画における PKA 活性の上昇が観察されたが、プロゲステロンは、核分画における PKA 活性の上昇のみを抑制した。

【総括】

プロゲステロンは、絨毛細胞の核内 PKA 活性の上昇を抑制することにより、hCGα遺伝子プロモーター上の CRE に結合する CREB のリン酸化を抑制し、hCGα遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

妊娠の成立・維持に重要な役割を果しているヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）は、妊娠初期に急速に産生量が増加するが、妊娠中期以降、その産生量は減少する。この産生低下に関与する調節因子の一つとしてプロゲステロンがあげられるが、プロゲステロンによる hCG 産生抑制のメカニズムを分子生物学的に解析した報告はこれまでにない。本論文では、ラット絨毛癌細胞株 Rcho-1 細胞を用いて hCGα遺伝子の転写活性抑制メカニズムをはじめて明らかにした。まず、hCGαプロモーター・CAT リポーター遺伝子を Rcho-1 細胞に安定導入した細胞を樹立し、その細胞を用いてプロゲステロンによる hCGαプロモーター活性の抑制を示した。続いて、hCGαプロモーター活性化に関わる細胞内情報伝達経路として最も重要であると考えられている protein kinase A（PKA）経路に注目し、プロゲステロンによる PKA 経路抑制のメカニズムの詳細を明らかにした。すなわち、プロゲステロンは、PKA catalytic subunit の核内移行を抑制することにより、核内 PKA の活性化を抑制する。その結果 hCGαプロモーター上の cAMP response element（CRE）に結合する CRE-binding protein（CREB）のリン酸化が抑制されることにより hCGα遺伝子転写活性が抑制されることを明らかにした。実験方法は論理的であり、かつデータは一貫性のあるもので、プロゲステロンによる hCG 産生抑制メカニズムを理解する上で貴重な情報を提供するものである。これらの知見は、妊娠中期以降の hCG 産生抑制機構の解明につながるもので、hCG が妊娠の成立・維持に果す役割を考えると、本論文のデータは妊娠の成立・維持機構の解明の一助となることが期待される。よって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。