

マウス子宮内膜細胞における Kallikrein の発現制御の解析

Analysis of Kallikrein expression in the mouse endometrium

徳森 萌美・御輿 真穂・竹内 栄・高橋 純夫

Megumi Tokumori, Maho Ogoshi, Sakae Takeuchi, Sumio Takahashi

岡山大学大学院自然科学研究科生体統御学グループ

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

はじめに

哺乳類の子宮内膜は、上皮細胞と間質細胞で構成されており、発情周期に伴い増殖や分化が制御されている。この制御は子宮内膜内で産生されている成長因子が担っており[1-2]、成長因子の発現制御には卵巣から放出される性ステロイドホルモンが関与していることが知られている[3]。そこで、性ステロイドホルモンに制御され、子宮内膜細胞の増殖の制御機構に関わっていると考えられる Kallikrein (Klk) に注目した。

Klk は 15 個の機能的な遺伝子によってファミリーを形成しており、セリンプロテアーゼ活性を持つ分泌性のタンパク質をコードしている。特にマウス (*Mus musculus*) においては、Klk ファミリーの 1 つである Klk1 が遺伝子重複を起こし、14 個の機能的遺伝子を含む 24 個の遺伝子を生み出した(図 1)。体内の各組織には Klk ファミリーのうちのいずれかが発現している[4]。なかでも顎下腺には様々な Klk が発現しており[5]、腺房に mRNA 発現が確認される(図 2)。さらに Kallikrein 遺伝子は性ステロイドホルモンを含む様々なホルモンによって発現を制御されていることが知られている[6]。

Kallikrein は血圧降下を引き起こす因子として発見され、今日では血管新生、ペプチドの活性化、insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) の分解など多様な生理作用をもち、さらには生殖器官系のガンの形成や進行にも関与していると考えられている[7-9]。

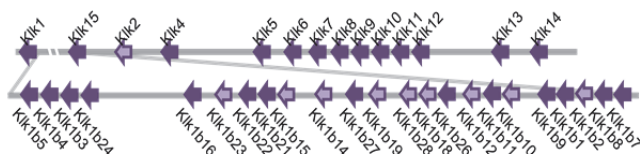


図 1 マウスの Kallikrein ファミリー遺伝子座の模式図。マウスには Klk1 から 15(ただし Klk 3 を除く)の 14 個の機能的な遺伝子を持つ。白く抜けている矢印で示された遺伝子は偽遺伝子である。

そこで我々は Klk ファミリーのうち、マウスの子宮において発現している Klk の性ステロイドホルモンによる発現制御を解析した。

材料と方法

実験動物

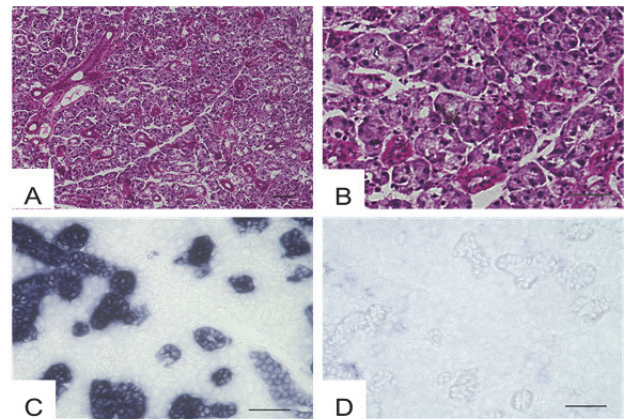


図 2 マウス顎下腺における *Klk 1* mRNA 発現の局在。ヘマトキシリン-エオシン染色(A,B)と *in situ* hybridization(C, D)。C : DIG で標識した *Klk 1* アンチセンス RNA プローブ。D : センス RNA プローブ。Bar=50 μ m。

Jcl : ICR 系統雌マウス(8-9 週齢)を用いた。雌マウスの発情周期を知るために膣スメア検定を行った。爪楊枝の先に脱脂綿を巻きつけて湿らせ、その爪楊枝を雌マウスの膣口に挿入して膣上皮細胞を掻き取った。掻き取った膣上皮細胞の形態を光学顕微鏡で観察し、球形有核上皮組織と白血球を持つものを発情間期、角質化無核上皮細胞を持つものを発情期とした。なお、実験は岡山大学動物実験規則に基づき実施した。

子宮内膜細胞の培養とホルモン投与

Jcl : ICR 系雌マウス(19-21 日齢)を用いた。子宮から子宮内膜上皮細胞と間質細胞を単離し、上皮細胞は無血清培養を行った[10]。単離した上皮細胞と間質細胞は poly-L-lysine でコートした培養皿に蒔き、Dulbecco 改変 Eagle 培地と Ham F12 培地の 1:1 混合の培養液で培養した。

Estradiol-17 β (E2)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入し、培養細胞に 12 時間作用させた。

RNA 抽出と逆転写

TriPure Isolation Reagent (Roche)を用いて行った。採取した組織は液体窒素で急速凍結し、乳鉢で粉碎したあと 1ml の TriPure に加え、シリッジでホモジェナイズを行った。細胞は培養液を抜き、TriPure を加え

た後、1.5ml チューブに移しホモジェナイズを行った。ホモジェナイズ後はシングルステップ法により RNA を抽出した。RNA は Thermoscript Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA)により逆転写した。

PCR 増幅

Klk1 の特異的プライマー(FP, CAGCAAAGCCA TCCCTCAC; RP, ATGATGTGATACCTTGGAGA)を用いて Blend Taq (TOYOBO)により RT-PCR 法により増幅した。内部標準としてリボソームタンパク質 L19(*Rpl19*, FP, AAATCGCCAATGCCAACTC; RP, TCTTAGACCTGCGAGCCTCA)を用いた。アニーリング温度はそれぞれ 54°C(*Klk1*), 60°C(*Rpl19*)で行った。

統計処理

データは平均値と標準誤差で表わし、T 検定により検定した。

結果

マウスの発情周期における *Klk 1* mRNA の発現の変化

雌マウスのスメア観察を行い、発情期と発情間期の時期にサンプリングを行った。サンプリングした子宮から RNA を抽出し、RT-PCR によって *Klk1* mRNA 発現を解析した。*Klk1* mRNA 発現は発情間期に比べ、発情期において有意に増加した(図 3)。

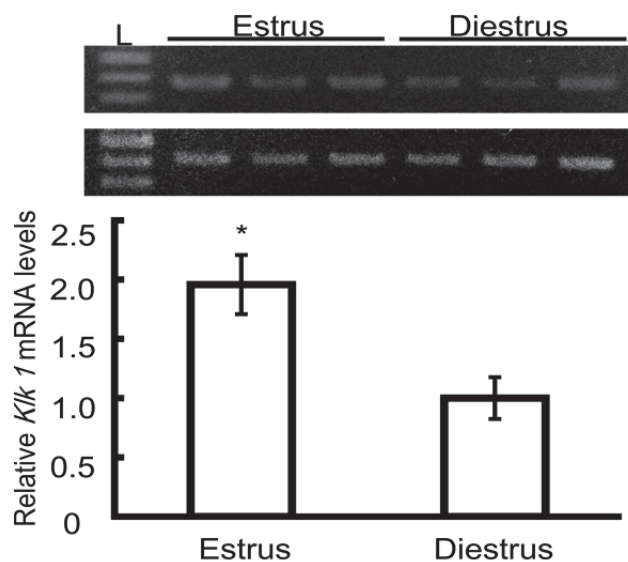


図 3 発情周期による *Klk1* mRNA 発現の変化。発情期(Estrus)と発情間期(Diestrus)。各 mRNA は、半定量 RT-PCR 法により測定し、*Rpl19* mRNA を内部標準とした。*: $p < 0.05$, 発情間期と比較して有意の差。

マウス子宮内膜細胞における E2 による *Klk1* mRNA 発現に及ぼす効果

子宮内膜の上皮細胞と間質細胞に E2(10^{-9} M)を投与し、12 時間後の *Klk1* mRNA の発現を半定量

RT-PCR 法により解析した。子宮内膜上皮細胞、間質細胞の両細胞において、E2 により *Klk1* mRNA の発現が増加した(図 4)。

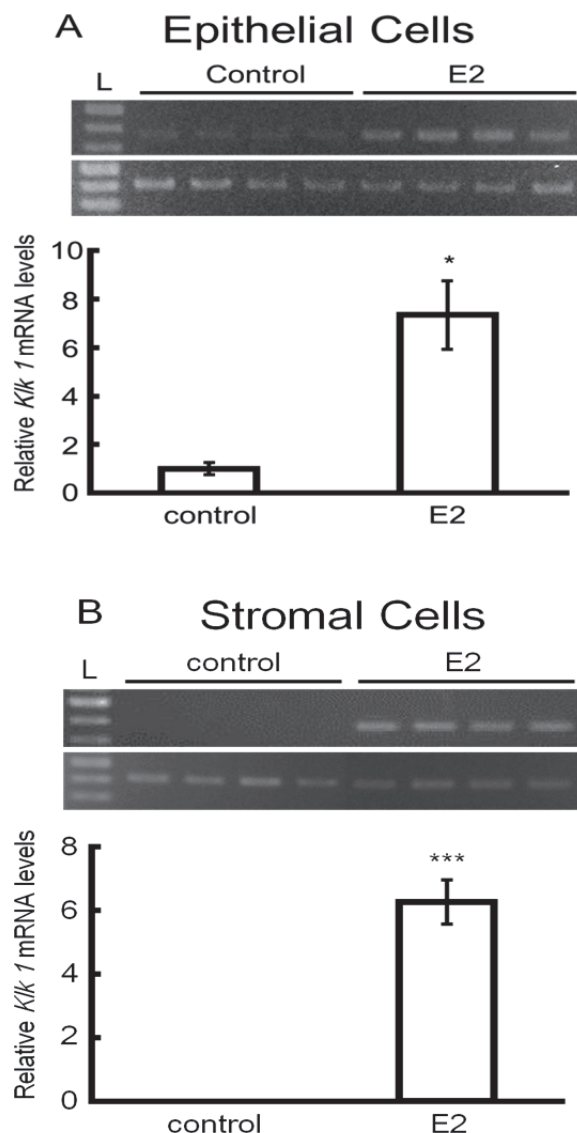


図 4 マウス子宮内膜の上皮細胞(A)と間質細胞(B)における E2 投与による *Klk1* mRNA 発現の変化。各 mRNA は、半定量 RT-PCR 法により測定し、*Rpl19* mRNA を内部標準とした。*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$, 対照群と比較して有意の差。

考察

Klk1 は様々なホルモンにより発現が制御されることが知られている。本研究において、マウスの子宮における *Klk1* は E2 により発現が促進されることが明らかとなった。発情期において、発情間期と比べて *Klk1* mRNA の発現が増加していたのは、発情間期終盤から発情前期にかけて急激に増加する E2 の影響によるものであることが考えられる。また *Klk1* は子宮内膜の上皮細胞、間質細胞の両細胞において E2 への応答を示したことから、*Klk1* は両細胞で共通の生理作用を担っていることが示唆された。

KLK1の基質としてはIGFBP3やIV型コラーゲンなどが明らかになっている[9]。IGFBP3は、insulin-like growth factor 1 (IGF1)の結合タンパク質であり、IGF1による子宮内膜細胞の増殖を抑制する[10]。子宮内膜細胞へのE2投与によって*Igf1* mRNAは増加し[10]、産生が高まったIGF1が子宮内膜細胞の増殖を促進する[1]。E2投与により同様に産生が高まったKlk1はIGFBP3の分解を促進すると考えられる。このように子宮内膜で発現するKlk1は、子宮内膜における細胞増殖の制御に関与していることが推察される。しかしながら子宮内膜細胞におけるKlk1の詳しい発現制御機構や発現細胞は明らかとなっておらず、生理作用も不明なため、さらに研究を進めていく必要がある。

要約

マウス子宮におけるKlk1の発現制御について解析をした。Klk1はE2によりmRNA発現が促進されることが明らかになった。この発現制御によりKlk1が子宮内膜細胞の細胞増殖のメカニズムに関与していることが示唆された。

参考文献

- [1] Inoue A., Takeuchi S., Takahashi S. (2005) Insulin-like growth factor-1 stimulated DNA replication in mouse endometrial stromal cells, *J Reprod Dev* 51: 305-313
- [2] Zhu L., Pollard J. W. (2007) Estradiol-17 β regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 15847-15851
- [3] Huet-Hudson Y. M., Andrews G. K., Dey S. K. (1989) Cell type-specific localization of c-Myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period, *Endocrinology*, 125: 1683-1690
- [4] Lundwall A., Brattsand M. (2008), Kallikrein-related peptidases, *Cell Mol Life Sci*, 65: 2019-2038
- [5] Komatsu N., Takata M., Otsuki N., Toyama T., Ohka R., Takehara K., Saijoh K. (2003) Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages, *J Invest Dermatol* 121: 542-549
- [6] Lawrence M. G., Lai J., Clements J. A. (2010) Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended Kallikrein locus, *Endocr Rev*, 31: 407-446
- [7] Bhoola K. D., Figueroa C. D., Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases, *Pharmacol Rev*, 44: 1-80
- [8] Paliouras M., Borgono C., Diamandis E. P. (2007) Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family, *Cancer Lett*, 249: 61-79
- [9] Rajapakse S., Yamano N., Ogiwara K., Hirata K., Takahashi S., Takahashi T., (2007) Estrogen-dependent expression of the tissue Kallikrein gene (*Klk 1*) in the mouse uterus and its implications for endometrial tissue growth, *Mol Reprod Dev*, 74: 1053-1063
- [10] Maekawa T., Takeuchi S., Kanayama M., Takahashi S. (2009) Estradiol, progesterone, and transforming growth factor α regulate insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) expression in mouse endometrial cells, *Zool Sci*, 26: 131-138