

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組換えに与える影響」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 黒田 雅彦（東京医科大学 病理学講座 講師）

主たる研究参加者

松田 洋一（北海道大学 先端科学技術共同研究センター 教授）  
高山 雅臣（東京医科大学 産婦人科 名誉教授(平成13年4月～)）  
石川 隆俊（大学評価機構 教授(～平成14年9月)）  
秋山 徹（東京大学 分子生物学研究所 教授(～平成15年3月)）  
長瀬 隆弘（かずさDNA研究所 室長代理(平成13年4月～16年3月)）

3. 研究内容及び成果：

近年、DNA修復に直接的に関与する分子以外にも、TLS(Translocated in Liposarcoma)遺伝子の様な、RNA結合モチーフを持つ核内受容体活性化因子が減数分裂に関与している事が明らかになって来た。この事は、核内受容体リガンドとして作用する内分泌かく乱物質が、減数分裂に直接的影響を与え得る事を示唆している。減数分裂に対する影響は、世代間に影響が伝わる染色体構造異常をもたらす可能性があり、内分泌かく乱物質問題に新たな視点を導入するものである。減数分裂には相同組換えが伴うが、DNA二重鎖切断時にも損傷修復機構としての相同組換えが起こる事が知られている。修復機構異常と発癌には深い関係があり、乳癌抑制遺伝子として知られるBRAC1、2は二重鎖切断修復に関与している事が知られている。内分泌かく乱物質が減数分裂に影響を与えるならば、相同組換えという同一機構を採用している、二重鎖切断後修復に影響を及ぼし、発癌リスクが高まる可能性が示唆される。

これらの背景から、本研究では 内分泌かく乱物質が減数分裂・相同組換えに与える影響を解析し、 内分泌かく乱物質が影響を与える分子を同定して、 新規視点(減数分裂・相同組換え)から作用機構を解明する事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

- (1) 内分泌かく乱物質が減数分裂に与える影響(松田グループ)

ダイオキシン(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin/TCDD)は、マウス精母細胞の第一減数分裂中期に、染色体構造異常を誘発する事を明らかにした。TCDDは減数分裂期にクロマチン動態/修復関連遺伝子の発現を誘導する事から、染色体構造異常はTCDDのDNA損傷修復阻害作用に起因する可能性が示唆された。

- (2) 減数分裂期に内分泌かく乱物質に応答する遺伝子の単離(黒田/長瀬/秋山グループ)

TCDD曝露ES細胞から、cDNA Representational Difference Analysis (RDA法)を用いて、誘導/抑制性遺

伝子を多数同定した。誘導性遺伝子19種の内、減数分裂期に作用する遺伝子としてDIF (Dioxin inducible factor) -2及びDIF-3を単離した。

- 1) DIF-2/hWAPL遺伝子

DIF-2はDrosophila の wapl (wings apart-like) 遺伝子と相同の構造を持つ事を明らかにした。DIF-2はDrosophila WAPLのヒトホモログと考えられる。DIF-2/hWAPL蛋白は、パキテン期細胞で強く発現している事、一次精母細胞期に染色体対合維持に関与するシナプトネマ構造体に局在している事、を明らかにした。シナプトネマ構造体は染色体組換えに必須の構造体であり、DIF-2/hWAPLが減数分裂/相同組換えに関与する可能性が示唆された。DIF-2/hWAPLは、欠損すると受精卵8細胞期(マウス)で成長が停止して胎生致死になる事、発生に必須の分子である事、を明らかにした。GFP/DIF-2遺伝子導入 HeLa 細胞核では、染色体構造異常、DNA配置異常、多核化が高頻度に認められる事を明らかにした。DIF-2/hWAPLが染色体不安定化を誘導す

る可能性が示唆された。

DIF-2/hWAPLは、子宮頸癌で高発現している事、形態学的に異形成、上皮内癌、進行癌と進展して行く過程の異形成から高度異型上皮への過程で発現が上昇して行く事、悪性病変に重要な役割を果たしている Human Papilloma Virus (HPV)で発現が誘導される事、を明らかにした。RNA 干渉法 (RNAi) でDIF-2/hWAPL発現を抑制すると癌細胞増殖が停止する事、in vivoでも同様の効果が得られる事、を明らかにした。子宮頸癌治療法開発の分子標的としての有効性が示唆された。

#### 2) DIF-3遺伝子

DIF-3は、Znフィンガーモチーフを有する転写因子である事、TCDDで濃度依存的に発現が誘導される事、BPA、DES (diethylstilbestrol)でも発現が誘導される事、ヒトでは17番染色体に存在する事、精巣で強く発現している事、パキテン期精母細胞で強く発現している事、精原細胞、精細胞、精子、セルトリ細胞では発現していない事、を明らかにした。パキテン期染色体に顆粒状の染色像が認められ、減数分裂期に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 3) 内分泌かく乱物質の減数分裂への影響を評価するためのcDNAマイクロアレイの開発

減数分裂/相合同組換え関連遺伝子が濃縮されていると考えられる、パキテン期細胞遺伝子ライブラリーを作成した。解析した遺伝子の約30%は、これまでに減数分裂期との関連性が報告されていない遺伝子であった。約5百の遺伝子を搭載したDNAマイクロアレイを作成した。

#### (3) 内分泌かく乱物質が相合同組換えを通じて癌化に与える影響 (黒田/石川グループ)

TCDDは細胞周期制御に重要な役割を果たしているMad2遺伝子 (G2/M期制御)の発現を抑制する事、この抑制はダイオキシン受容体 (AhR) 非依存性である事、を明らかにした。TCDDによるMad2発現低下が染色体分配チェックポイントの不活化、染色体構造異常・不安定化を通して細胞を癌化させる可能性がある事、染色体構造異常は自然発生損傷の修復阻害に起因する可能性が高い事、AhR以外の新規情報伝達系が関与している可能性が高い事、が示唆された。

#### (4) 内分泌かく乱物質と染色体テリトリー (黒田グループ)

「細胞内の染色体は各々が特定の領域に存在する」という染色体テリトリーの概念が提唱されているが、テリトリーを確定するためには客観的測定法の開発が必要である。ヒト脂肪前駆細胞初代培養系を用いて、共焦点レーザー顕微鏡画像を三次元構築し、テリトリー代表点をセグメンテーションアルゴリズムで自動抽出する、新規な染色体テリトリー測定法を開発した。TCDDは染色体テリトリー間距離を拡大させる事を明らかにした。脂肪細胞分化に伴い12番、16番染色体は近接する事から、TCDDが染色体テリトリー変動を通して脂肪細胞分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。DIF-2/hWAPL 遺伝子過剰発現が、細胞周期間期の染色体テリトリーに影響を及ぼす事を明らかにした。内分泌かく乱物質が、DIF-2/hWAPL 遺伝子発現制御を通して、染色体テリトリーに影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### (5) 内分泌かく乱物質と子宮内膜症との関連性 (黒田/高山グループ)

TCDD 暴露で発現が増加する遺伝子として DIF-1 を単離し、IgE-dependent Histamine Releasing Factor (HRF)と同一遺伝子である事を明らかにした。HRFは、好塩基球からIgE 依存的にヒスタミン、IL-4、IL-13等を遊離させ、炎症反応後期の炎症悪化に関与すると考えられている。近年増加しているアレルギー性疾患とTCDD暴露の関連性が示唆された。

子宮内膜症は近年増加している疾患であり、動物実験ではTCDDの関与が確認されている。DIF-1/HRFは、正常子宮組織では腺上皮でのみ高発現している事、異所性子宮組織 (子宮内膜症)では腺上皮と共に間質でも高発現している事、を明らかにした。DIF-1/HRFの単球成熟への関与が報告されており、子宮内膜症患者の腹膜内免疫環境異常、特に単球系異常との関係から、子宮内膜症と免疫異常との関連性が示唆された。子宮内膜症の早期確定診断が望まれている。診断マーカーとして唯一 CA125が実用化されているが精度が不十分であり、未だ高精度の診断マーカーは開発されていない。月経血中DIF-1/HRF mRNA、蛋白質定量が可能である事、発現量と内膜症の有無とに相関が認められる事、を明らかにした。DIF-1/HRF 遺伝子、

蛋白質を利用したモニタリング法の臨床応用への可能性が示唆された。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

「内分泌かく乱物質の作用には減数分裂 / 相同組換え過程を介する経路が存在する可能性が有る」という独創的な着想から出発した研究である。AhRを介さないTCDDの作用機構として、細胞周期に関与するMad2を介する新規な情報伝達系の存在を示唆した事、染色体テリトリーへの影響をその研究手法の確立をも含めて明らかにした事、等々の新規で重要な成果を挙げている。これらは、TCDDの毒性研究に新たな視点を導入し、今後の内分泌かく乱物質研究に新たな道を拓いたばかりで無く、主として遺伝子発現との関連で注目されている染色体テリトリー概念が細胞分化という生理学的機構にも重要な役割を果たしている可能性を示唆するものであり、基礎生物学的にも極めてインパクトの高い重要な成果として高く評価される。今後のさらなる進展を期待したい。

TCDDで発現誘導される遺伝子が子宮内膜症、子宮頸癌で高発現している事を明らかにしているが、免疫異常、発癌との関連でも注目される成果であり、臨床的にも重要な成果と言えよう。内分泌かく乱物質の免疫系への影響、発癌との関連性を明らかにする為にも、他の物質を用いた検討も期待したい。

研究成果は論文(国内誌11報、国際誌24報)、学会(国内81件、国際学会4件)発表されている。論文数が少なくやや不満足との評価もあるが、採択後に体制を整えた比較的小規模の研究チームで、多くの研究員を動員出来なかった事情を勘案すれば、比較的良好な結果といえよう。子宮内膜症診断関連の特許を1件(日本及び外国出願)出願しており、実用化への展開を期待したい。

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

前項で既述の通り、内分泌かく乱物質研究に新たな道を拓く重要な成果を挙げており、高く評価される。内分泌かく乱物質の作用機構の一つとして染色体テリトリーに対する作用を提唱しているが、これは名和田チーム(平成10年度採択課題 / 核内受容体・共役因子複合体と内分泌かく乱物質)が男性ホルモン受容体(AR)を中心に展開してきた研究の成果(核内受容体コンパートメント仮説 / 抗アンドロゲン物質の作用の本質は機能的核内受容体コンパートメント形成阻害にある)と一部オーバーラップしており、同じ結論を互いに補強し合うものとして重要な成果といえよう。

新たに単離した遺伝子(DIF-1、2、3)は子宮内膜症、子宮頸癌、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等の診断・治療の分子標的としても興味深く、ユニークで基礎生物学的にも、臨床応用的にも重要な成果と言えよう。子宮内膜症は近年増加している疾患であり、その早期確定診断が望まれているが、未だ精度の高い診断法は確立されていない。月経血を用いた高精度診断法の確立は、技術的インパクトのみならず、臨床的、社会的意義が極めて大きい。また、製薬企業との連携で子宮頸癌治療薬等の研究開発が開始されているとの事であり、合わせて早期の成果達成を期待したい。

##### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

研究代表者は2001年11月、東京医科大学医学会奨励賞を受賞した。