

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「生殖系での低濃度内分泌かく乱物質関連遺伝子データベースの構築」

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

宮本 薫 (福井大学医学部 教授)

主たる研究参加者

峯岸 敬 (群馬大学大学院医学系研究科 教授)

3. 研究内容及び成果

極めて低濃度のダイオキシンがサルに子宮内膜症を引起すとの報告もあり、低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に影響を与える可能性が示唆されているが、それを示す具体的データが不足しているのが現状である。内分泌かく乱物質の生殖系への影響を体系的・網羅的に理解するためには、通常毒性学的研究に加え、トキシコジェノミクスの観点からの解析も必要である。内分泌かく乱物質の作用を遺伝子発現の変化として捉え、低濃度の内分泌かく乱物質によって発現が変動する遺伝子群を網羅的に収載したデータベースを構築・公開する事は、この分野の研究の進展を後押しすると共に、レギュラトリー・サイエンスの基盤として社会的にも貢献するものと期待される。

内分泌かく乱物質の影響については種差が指摘されており、ヒトでの用量-作用の関係を明らかにする必要がある。そのためにはヒト試料を用いた解析が求められるが、遺伝子発現変動は臓器・組織・細胞毎に異なる可能性があり、解析手法の微量化が必須の要件となる。

これらの背景から、本研究では①遺伝子発現変動の網羅的解析手法を開発する、②生殖系での低濃度内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースを構築し公開する、③それらの遺伝子の詳細な発現解析によって低濃度内分泌かく乱物質の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) データベース構築、内分泌かく乱物質の作用機構解析(宮本グループ)

1) 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子の網羅的解析法の確立

サブトラクションクローニング法を改良し、cDNAにアダプターを連結してPCR増幅する事を特徴とする、微量RDA(Representational Difference Analysis)法を確立した。両端にアダプターが付加したテスター特異的cDNAのみが増幅され、制限酵素消化・アダプター付加の繰り返しでサブトラクション効率を高める事ができる。RDA法及びDNAマイクロアレイ法の微量化を図り、細胞数10~100個で解析可能な手法を確立した。

2) 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースの構築

前述の方法で解析し、real-time PCRで確認して、低濃度ダイオキシン(TCDD)感受性遺伝子

群約600遺伝子、ジエチルスチルベストロール (DES) 感受性遺伝子群約100遺伝子を同定した。生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子としてデータベース (DB) を構築し、公開した。

(<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html>)

DBは次の8独立実験群の解析結果を基に構築した。①ホルツマン系ラット妊娠15日目に TCDD1.6  $\mu$ g/kg投与、妊娠20日目の卵巣、②前述の胎盤、③未分化ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系にTCDD100pM添加、48時間後、④FSHで分化誘導したラット卵巣顆粒膜細胞にTCDD100pM添加、48時間後、⑤ヒト卵巣顆粒膜細胞株KGN細胞にTCDD100ng/ml添加、24～48時間後、⑥ヒト子宮内膜上皮細胞株 RL95-2細胞にTCDD100ng/ml添加、24～48時間後、⑦ヒト胎盤羊膜細胞初代培養系にTCDD1nM添加、48時間後、⑧幼若ラットにDESを24時間毎に4日間腹腔内投与した卵巣、の遺伝子発現変化を解析した。

DBは次の情報を含む。①Accession No. (完全長cDNA配列と所在)、②Unigene No. (塩基配列、アミノ酸配列の種差)、③LocusLink No. (染色体上の位置、組織分布、関連する遺伝病、3次元構造)、④Gene Card No. (Human homolog)、⑤real-time PCR用プライマー配列、誘導・抑制比率、Ct値 (発現量)、発現変化棒グラフ、⑥各遺伝子の機能的関連因子を網羅的に示す pathway figure。

### 3) 生殖系でのTCDDの作用

①ラット胎盤: グルコース輸送体GLUT1-GLUT4遺伝子、インターフェロン誘導性遺伝子群の発現が強く誘導される事を明らかにした。ホルツマン系ラット胎盤ではTCDD暴露で低酸素状態が誘起され、その結果として、グルコース輸送体遺伝子発現の誘導、胎盤でのグリコーゲン顆粒蓄積が起こる事が示唆された。②ラット未分化卵巣顆粒膜細胞: 誘導性9遺伝子を同定し、ミトコンドリアで転写される遺伝子群、Ferritin、Cyclin G1等が誘導性である事を明らかにした。抑制性43遺伝子を同定し、Filamin A等の細胞骨格、細胞接着関連遺伝子群が多く含まれる事を明らかにした。③分化卵巣顆粒膜細胞 (FSHで分化誘導): 卵胞刺激ホルモン (FSH) は黄体形成ホルモン受容体 (LHR)、プロゲステロン合成酵素遺伝子群の発現を誘導するが、TCDDがこれらを抑制する事を明らかにした。FSH はcAMP-PKA経路を介して作用するが、TCDDはcAMP産生には影響せず、転写抑制とmRNA不安定化に起因する発現量低下である事が示唆された。④妊娠ラット卵巣: 誘導性52遺伝子、抑制性95遺伝子を同定し、ゴナドトロピン刺激で早期に誘導される遺伝子群 (immediate early gene) が強く抑制される事を明らかにした。下垂体からのゴナドトロピン分泌に影響を及ぼす可能性が示唆された。⑤ヒト羊膜細胞初代培養系: インターフェロン誘導性遺伝子群の発現が強く誘導される事を明らかにした。卵巣では認められず、胎盤/胎盤由来組織特有の現象である可能性が示唆された。

### 4) 生殖系でのDESの作用

卵巣でのDESの作用を明らかにした。DESは視床下部-下垂体系に作用し、下垂体からのLH分泌を素早く低下させる。その結果、夾膜細胞では、LH-LHR/cAMP-PKA経路を介する転写活性化機構が不活化され、NGF-1、GIOT (Gonadotropin-inducible ovarian transcriptional regulator) 等のimmediate early gene の迅速な発現低下及びLHR、ステロイド合成酵素関連遺

伝子群の著しい発現低下を来す。一方女性ホルモン受容体( $ER\alpha$ )を介して、直接的にも夾膜細胞に作用し、これらの遺伝子群発現をさらに抑制し、夾膜細胞機能を著しく抑制する。顆粒膜細胞では、顆粒膜細胞特異的遺伝子群の発現を増加させる。DESの作用は遺伝子発現を介する作用ではなく、視床下部でのGnRHニューロン活動抑制(non-genomic action)を介した作用である可能性が強い事が示唆された。DESの神経系に及ぼす新たな作用として注目される。

顆粒膜細胞での遺伝子発現増加は、DESのVEGF等の発現誘導に基づく、大幅な細胞増殖に起因する可能性が示唆された。VEGFは強力な血管新生因子であり、排卵後の血管新生に関与すると考えられてきたが、卵巣では血管新生よりも顆粒膜細胞増殖に関与する可能性が強い事が示唆された。

#### (2) 生殖系細胞の採取・培養、内分泌かく乱物質の作用機構解析(峯岸グループ)

ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系で、TCDDが用量依存的にLHR発現を低下させる事を明らかにした。IGF-1は強いLHR誘導作用を有するが、LHR mRNAの安定化を通して二次的に発現を増強している事、TCDDのLHR発現抑制はcAMP産生レベルではなく、転写及びmRNA安定化レベルで作用している事、を明らかにした。FSH存在下で女性ホルモン(E2)はLHR発現を促進するが、LHR mRNA代謝を促進する蛋白の発現抑制を通してLHR発現を増強している事を明らかにした。IGF-1とTCDDはLHR産生・代謝において全く逆の反応を示す事、E2、ビスフェノールAがFSH存在下でFSH受容体、LHR発現を増強する事、顆粒膜細胞がFSH存在下にE2を活発に生産している事、を明らかにした。TCDDの卵巣機能への影響の一つとして、E2代謝酵素発現を誘導してE2を減少させ、ゴナドトロピン受容体減少を引起す事が示唆された。

#### 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

低濃度のダイオキシン(TCDD)やジエチルスチルベストロール(DES)の曝露により、雌性生殖器で発現が変動する遺伝子群を解析し、データベース(DB)を構築・公開した。TCDDの胎盤でのインターフェロン関連遺伝子群の発現誘導、DESの黄体形成ホルモン(LH)分泌抑制作用等を明らかにした。DESの卵巣に対する作用の解析から、視床下部-下垂体系に作用して速やかにLH分泌を抑制する事を明らかにした。これはノンジェノミックな作用と考えられ、DESの神経系に対する新たな作用として今後の展開を期待したい。

本研究では、内分泌かく乱作用を遺伝子発現の変動として捉え、その概要を明らかにする事が期待されたが、信頼性の高いDBを構築・公開し、目標を達成した事を評価したい。また、中間評価の段階で、研究目標をステップアップし、同定した誘導・抑制性遺伝子の機能解析、生物学的意味付けにまで踏み込む事が求められたが、見事にその期待に応え幾多の成果を挙げた事を高く評価したい。

研究成果は質の高い国際誌を中心に多数(国際誌63報、国内誌17報)発表されている。学会発表も活発に行われ(国際学会5件、国内学会67件)、若手研究員を初めとして学会賞等受賞7

件に及んでいる。また、転写因子関連2案件、間葉系幹細胞の分化関連1案件の特許出願を行っている。これらの特許は何れも外国出願されており、積極的な姿勢を評価したい。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

信頼性の高いDBを構築・公開する、という簡明ながら困難なプロジェクトを効果的に遂行し、所定の目標を達成した事を高く評価する。国外のプロジェクトではこうした成果発表は少なくないが、国内のプロジェクトでは希である。初歩的にもせよ、それらに匹敵する努力・成果が我国のプロジェクトで実施・達成された意義は大きい。DB構築と併行して実施された、作用機構解明等の基礎研究の成果とも合わせて高く評価したい。

DBに掲載された遺伝子群が、内分泌かく乱作用として一次的に機能しているのか、副次的なものなのかは不明であり、さらなる検討を必要とするが、DBとして公開されることにより、多数の研究者の共通基盤知識として利用され、研究の促進に大きく貢献するものと期待される。今後、共同研究等を通して、TCDD、DES以外の化合物の研究成果も加わり、一大DBとして進化・発展し、世界中からの利用が拡大する事を期待したい。そのためには、データの充実とともに、インターネット検索で上位にヒットするような工夫も必要となろう。

独自に開発・改良した微量解析法は、汎用性が高く、技術的インパクトの高い方法であり、ライフサイエンス関連分野の研究者にとって有用な方法となろう。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

共同研究者の受賞は以下の通りである。

- ・水谷哲也 日本内分泌学会若手研究奨励賞(平成13年7月)
- ・水谷哲也 第6回日本生殖内分泌学会学術奨励賞(平成13年11月)
- ・峯岸 敬 日本医師会医学研究助成賞(平成14年11月)
- ・梶谷 宇 第7回日本生殖内分泌学会学術奨励賞(平成14年12月)
- ・梶谷 宇 First Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Best Oral Presentation Award (2004年3月)
- ・山田一哉 第10回日本生化学会北陸支部奨励賞(米山賞) (平成17年5月)
- ・矢澤隆志 日本内分泌学会若手研究奨励賞(平成17年7月)

研究期間中に学位を取得した上坂美紀、梶谷 宇、関口俊男の各氏は、現在それぞれ福井大学医学部、慶応大学医学部、京都大学理学部で一線の研究者として活躍中である。