

「内分泌かく乱物質」  
平成12年度採択研究代表者

宮本 薫

(福井医科大学 教授)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

内分泌攪乱物質の女性生殖器系への影響は、一般に考えられているよりもずっと低濃度で現れる可能性が示唆されている。しかしながら具体的なデータが不足しているのが現状である。そこで私どもは低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖腺に与える影響の全体像を明らかにするための第一段階として、卵巣顆粒膜細胞に低濃度のダイオキシンを加え、遺伝子発現の変化を解析した。卵胞の発達と成熟には卵胞内に存在する卵巣顆粒膜細胞の増殖分化が不可欠である。卵巣顆粒膜細胞の増殖分化は細胞膜上のFSH受容体およびLH受容体を介して行われる。ラット卵巣顆粒膜細胞でのこれらの受容体の遺伝子発現が、低濃度の(10pM)ダイオキシン(TCDD)によって著しく抑制されることを明らかにした。ゴナドトロピン受容体は卵胞の発達と成熟に必須であることから、低濃度のダイオキシンが卵巣機能の抑制に働くことが強く示唆された。

またラット卵巣顆粒膜細胞に低濃度のダイオキシン(TCDD)を加え、遺伝子発現の変化をサブトラクショナルクロニングにより解析した(図参照)。ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系に低濃度(10pM)のTCDDを加え、サブトラクショナルcDNAライブラリーを作成した。TCDD抑制性及び誘導性遺伝子群をそれぞれ含む別個のライブラリーを作成し、それぞれ1500クローンずつを単離して塩基配列解析用のプラズミドの調製、およびPCRによりインサートのみを増幅してDNAマイクロアレイ用サンプルの調製を行い解析を進めている。

### 2. 研究実施内容

#### 1) ダイオキシンによる卵巣LH受容体およびFSH受容体遺伝子発現の抑制

卵胞の発達と成熟には卵胞内に存在する卵巣顆粒膜細胞の増殖分化が不可欠である。卵巣顆粒膜細胞の増殖分化は細胞膜上のFSH受容体およびLH受容体を介して行われる。

ラット卵巣顆粒膜細胞でのこれらの受容体の遺伝子発現が、低濃度の(10pM)ダイオキシン(TCDD)によって著しく抑制されることを明らかにした。ラット

卵巣顆粒膜細胞におけるLH受容体の発現は、卵巣顆粒膜細胞初代培養系にFSHを添加する事で著しく誘導される。このFSHによるLH受容体の発現誘導が低濃度（1pM - 100pM）のダイオキシン(TCDD)によって用量依存的に抑制された。LH受容体の発現は、脳下垂体前葉からの排卵性LHサージに反応するために必須である事から、低濃度のダイオキシンが実際の生殖機能に対して影響を与えていることが示された。低濃度のダイオキシンによるLH受容体遺伝子発現の抑制のメカニズムはまだ明らかではないが、LH受容体遺伝子発現にはIGF-Iも重要な役割を果たしている事から、ダイオキシンのIGF-I作用に対する干渉効果の可能性も今後の検討課題である。さらに低濃度のダイオキシンは、FSH受容体遺伝子発現もまた抑制する。卵巣顆粒膜細胞でのFSH受容体の遺伝子発現は、FSH自身の処理によってアップレギュレートされているが、ダイオキシンはこのアップレギュレーションの作用を用量依存的に抑制した。核ランオンアッセイにより、これら受容体の遺伝子発現抑制はそれぞれの遺伝子mRNAの不安定化によってもたらされる事が明らかとなった。これらゴナドトロピン受容体は卵胞の発達と成熟に必須であることから、これらの結果は低濃度のダイオキシンが卵巣機能を抑制する方向に働くことを強く示唆している。

## 2) ラット卵巣顆粒膜細胞の遺伝子発現に対する低濃度のダイオキシン(TCDD)の影響の解析

ラット卵巣顆粒膜細胞に低濃度のダイオキシン(TCDD)を加え、遺伝子発現の変化をサブトラクションクローニングにより解析した。ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系に低濃度(10pM)のTCDDを加え、サブトラクションcDNAライブラリーを作成した。

TCDD抑制性及び誘導性遺伝子群をそれぞれ含む別個のプラズミドライブラリーを作成し、それぞれ1500クローンずつを単離して塩基配列解析用のプラズミドの調製、およびPCRによりインサートのみを増幅してDNAマイクロアレイ用サンプルの調製を行った。現在その一部について塩基配列の解析およびノーザンプロットによる発現解析を行っている。予備的な結果として、ラット卵巣顆粒膜細胞ではダイオキシン反応性のP450としてCYP1B1のみが誘導されていることが判明した。CYP1B1はエストロゲンを酸化してカテコールエストロゲンに変換する酵素と言われている。カテコールエストロゲンはそれ自身強い変異源性を有することから、子宮内膜癌の発生原因の一つであるとする説が有力である。この結果は、卵巣において低濃度のダイオキシンによってCYP1B1が強く誘導されると、卵巣顆粒膜細胞で生産されたエストロゲンがカテコールエストロゲンに変換され、卵巣及び子宮に作用してそれらの組織の腫瘍化につながる可能性を示唆している。低濃度のダイオキシンが卵巣ゴナドトロピン受容体遺伝子発現の抑制な

どの生殖機能だけでなく、卵巣および子宮の腫瘍化にも関係する事を示す興味深い結果である。今後、CYP1B1の卵巣での役割の解明を、群馬大学産婦人科教室との共同研究を通して追求したい。

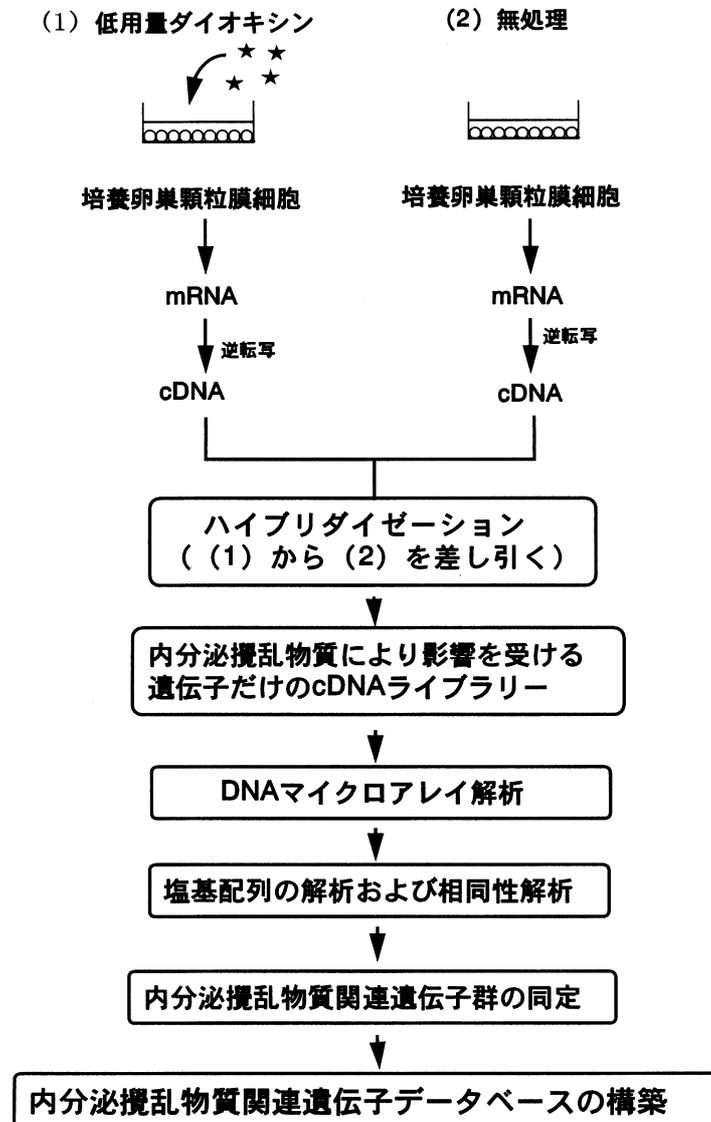


図 1

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

Yamada, K., Mizutani, T., Shou, Z., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Inazu, T., Miyamoto, K. : Cloning and functional expression of an E box-binding protein from rat granulosa cells. Biol. Reprod. 64, 1315-1319( 2001 )