

「内分泌かく乱物質」

平成 11 年度採択研究代表者

黒田 雅彦

(東京医科大学医学部 講師)

「内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組み換えに与える影響」

1. 研究実施の概要

我々は、現在までの研究により、ダイオキシンが相同組み換え、減数分裂に関与する可能性のある遺伝子の発現制御に影響を与えることを見いだした。今年度は特に、DIF-2(Dioxin Inducible Factor-2)に関し検討を行った。その結果、DIF-2が精巣における減数分裂の第一分裂に関与していること、またヘテロクロマチンの構成に異常をもたらし、直接的に染色体不安定性を誘導していくことが明らかになった。この事実は、環境ホルモンが直接的に相同組み換え、減数分裂に関与する可能性を示唆するものである。本研究において我々は、環境ホルモンが相同組み換え、減数分裂に与える影響を検討し、さらにその影響の大きさ、程度をモニタリングするシステムを開発することを目指していく。

2. 研究実施内容

[研究項目 1: 減数分裂期に環境ホルモンによって誘導される新規遺伝子の単離]

我々は、環境ホルモンが相同組み換え、減数分裂に関与する可能性を指摘しているが、cDNA Representational Difference Analysis 法 (RDA 法) によってダイオキシンによって誘導される遺伝子のうち、染色体分配に 関与する遺伝子(DIF-2、Dioxin inducible factor-2)、特に精子に発現がみられる遺伝子(DIF-3、Dioxin inducible factor-3)を昨年度同定した。構造的には、DIF-2 は、C 末端側に *Drosophila* の染色体分配に関与する遺伝子と相同の構造を有する。このような背景から、精子形成における DIF-2 の機能を解明するため精巣染色体標本において、DIF-2 の局在を検討した。その結果、減数分裂の第一分裂の染色体組み換えに必須の構造体であるシナプトネマ構造体に DIF-2 の局在が観察された。

一方、DIF-3はZnフィンガーモチーフを有する核内因子で、TCDD濃度依存的に発現が誘導されることが昨年度の研究で明らかになった。また、正常組織では、精子に非常に強い発現が認められる。今年度の研究においては、パラフィン切片に応用できる抗体の作製に成功した。DIF-3 抗体を用いた検索では、細精管の細胞の中でも特にパキテン期の精母細胞に強い発現が見られた。精原細胞や精細胞、精子またセルトリ細胞には強い染色は見られなかった。また、精子染色体標本においてDIF-3の局在を検討すると、パキテン期の染色体に顆粒状の染色像が確認された。直接的にシナプトネマ構造体には染色されていないが局在、発現時期を考えると DIF-3 も減数分裂

期に重要な役割を果たしていることが示唆される。現在、DIF-3 の生理的機能、環境ホルモン暴露による精子形成の影響を DIF-3 の発現との関連で検討している。

[研究項目 2:DIF-2 遺伝子の高発現が生体に及ぼす影響]

我々は、DIF-2 遺伝子がダイオキシンによって誘導されることを示したが、次にこの誘導がどのような影響を細胞に与えるか検討した。まず、ダイオキシンが発がんに関与することが指摘されているため、各種癌組織において DIF-2 の発現を検討した。その結果、子宮頸癌において有意に高発現していることが確かめられた。さらに、子宮頸癌で DIF-2 が発現していることから、Human Papilloma Virus(HPV)との関連を検討したが DIF-2 が HPV の癌関連蛋白質である E6 及び E7 によって誘導されることが明らかになった(本研究は国立がんセンター清野透先生との共同研究である)。さらに DIF-2 のトランスフォーム活性を検討したところ、NIH3T3 細胞においてコロニー形成能を示し(図1)、さらに DIF-2 高発現細胞は、ヌードマウスに腫瘍を形成した(図 2)。また、HeLa 細胞に DIF-2 を高発現させることにより、核内における染色体の位置情報に支障を来すことが明らかになった(図 3)。

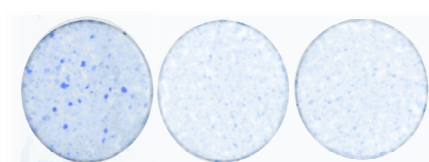


図1 左から DIF-2 を高発現させた NIH3T3 細胞、vector コントロール、NIH3T3 の親株。

DIF-2 高発現細胞のみコロニーの形成が見られ



図 2 上がコントロール、下が DIF-2 高発現細胞を皮下に移植したマウス。DIF-2 高発現細胞を移植したマウスの皮下には、腫瘍形成が認められる。

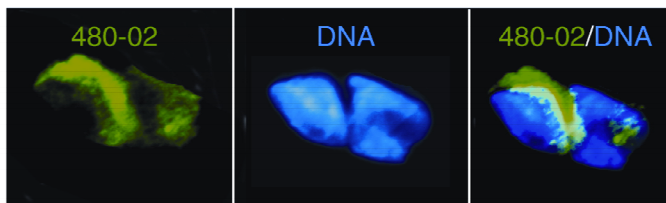


図 3 NIH3T3 細胞に DIF-2 を高発現させ、抗 DIF-2 抗体 480-02 にて DIF-2 の核内での局在を検討した。また Hoechst にて DNA を染色した。下図の如く、DIF-2 により DNA の位置の偏在化が確認された。

これらの細胞を FACS にて細胞周期を検討するとこれらの細胞はいずれも良好に増殖しているにもかかわらず pre-G1 DNA 断片が増加し、G2-M 細胞は激減していた。以上の結果より、DIF-2 の高発現は、細胞の染色体の位置異常を引き起こしその結果染色体不安定性を誘導し、細胞をガン化させることが示唆された。現在のところ、ダイオキシンによる DIF-2 の誘導は ES 細胞、SaOS2、SiHa の各細胞株で確認しているが、長期的な暴露がどのような変化を引き起こすのか非常に興味深い。また、減数分裂への影響を含め現在検討中である。

「研究項目 3: 減数分裂期特異的ライブラリーを用いた、環境ホルモンに応答する相同組み換えに関与する遺伝子群の単離と cDNA マイクロアレイの作製」

生体内では、減数分裂、DNA の相同組み換えは、生殖細胞および DNA に放射線などの傷害によって二重鎖切断が生じたときに応じる。精子形成においては、第一減数分裂、第二減数分裂

をへて成熟した精子となる。その際染色体の組み換え、交差は第一減数分裂におこる。この時期の細胞はパキテン期とよばれるが、遠心密度勾配によりこのパキテン期の細胞を分離することが可能である。これまでに、松田らのグループはこのパキテン期の細胞から mRNA を単離し遺伝子ライブラリーを作製している。このライブラリーには減数分裂期の DNA 相同組み換えに關与する遺伝子が濃縮されている。今年度はこの遺伝子ライブラリーの EST 化を行いクローンのシーケンスを行った。現在約 500 遺伝子の解析を終了しているが、そのうち約 30%は現在までに減数分裂期に報告のない遺伝子であった。今年度はこれらの 500 遺伝子をガラスアレイ上にスポットを行い cDNA マイクロアレイを作製した。現在 ES 細胞に環境ホルモンを暴露し、暴露していないコントロールの細胞と遺伝子の発現を cDNA マイクロアレイを用い競合的ハイブリダイゼーションを行い、減数分裂期における環境ホルモンによる遺伝子の発現変動を検討している。

[研究項目 4:GFP-I-Sce1 を用いた環境ホルモンモニタリングシステムの開発]

我々は、環境ホルモンが相同組み替え、減数分裂に關与する可能性を指摘しているが、相同組み替え率を客観的に評価するのは非常に難しい。我々は、相同的な DNA の組み換えが起きると GFP(Green Fluorescent Protein)が検出されることで相同組み換え率をアッセイする方法の確立を目指している(平成 11 年度報告書参照)。具体的には、このカセットを ES 細胞などの 2 倍体の染色体をもつ細胞に導入し、環境ホルモン存在下での相同組み換え率を測定することを検討していた。この検出系には、ほ乳類では存在しない塩基配列を認識する DNA2重鎖切断酵素が必要である。そのような酵素として、酵母のミトコンドリアがコードする I-Sce1 がある。酵母のミトコンドリアの コドン usage は一般の生物と異なるが、この点を克服し今年度、この酵素 I-Sce1 の一般のコドン usage に改変した cDNA 合成に成功し、検出系の立ち上げが可能になった。現在、I-Sce-1 を導入した際の GFP の陽性率など基礎的なデータの採取を終えている。

[研究項目 5:環境ホルモンと子宮内膜症]

ダイオキシンによって発現量が増加したものの一つとして、IgE-dependent Histamine Releasing Factor(HRF)を同定した。HRFはIgE依存的に好塩基球からヒスタミンやIL-4、IL-13を遊離させる作用を持つ。一般的には炎症の後期反応において炎症反応を悪化すると考えられている。従って、近年増加しているアレルギー疾患と環境ホルモンの汚染との関連が示唆された。また子宮内膜症は、近年増加している疾患であるがまた一方でダイオキシンの関与が動物実験で報告されている。我々は、

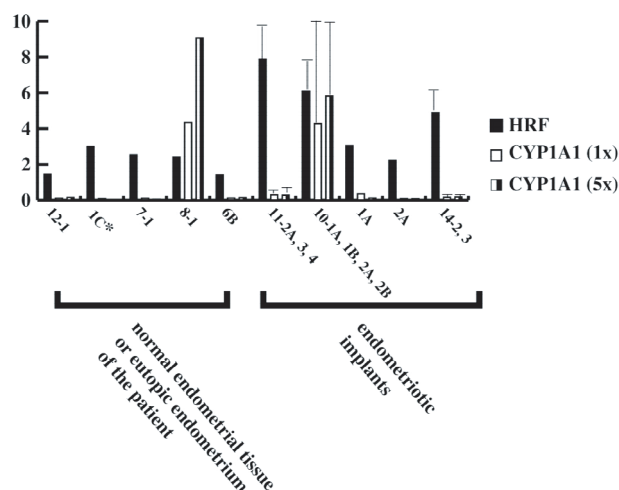


図4 子宮内膜症における HRF の発現とダイオキシン類の影響との検討。HRF はノーザンブロット、CYP1A1 は RT-PCR 法で定量した。RT-PCR では定量性を確認するためテンプレートの量を 1x と 5x の二種類で行った。

この HRF が子宮内膜症で高発現していることを明らかにした。パラフィン切片で染色可能な HRF 特異抗体および、cRNA プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションでは子宮内膜腺上皮に HRF の高発現が確認された。現在までの詳細な検討では、子宮内膜症においては、HRF の発現とダイオキシン汚染の指標となる CYP1A1 の発現は相関しない (図4)。

また、月経血中の HRF を測定することが可能かどうか検討した。その結果、月経血中でも Real-time PCR法による HRF mRNA の定量化が可能であり、その発現は内膜症の有無と相関が見られた。この結果から、将来的には、環境ホルモンのモニタリングが月経血を用いても可能になることが期待される。

3. 研究実施体制

(1) 減数分裂期に環境ホルモンによって誘導される新規遺伝子の解析グループ

- ① 黒田雅彦(東京医科大学医学部 第一病理学教室 講師)
- ② 研究項目 1: 減数分裂期に環境ホルモンによって誘導される新規遺伝子の単離
研究項目 2: DIF-2 遺伝子の高発現が生体に及ぼす影響

(2) 減数分裂に対する影響を検討するグループ

- ① 黒田雅彦(東京医科大学医学部 第一病理学教室 講師)
- ② 研究項目 3: 減数分裂期特異的ライブラリーを用いた環境ホルモンに応答する相同組み換えに関与する遺伝子群の単離と cDNA マイクロアレイの作製
研究項目 4: GFP-I-Sce1 を用いた環境ホルモンモニタリングシステムの開発

(3) 環境ホルモンとアレルギー疾患の関与を検討するグループ

- ① 黒田雅彦(東京医科大学医学部 第一病理学教室 講師)
- ② 研究項目 5:環境ホルモンと子宮内膜症

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Oikawa K, Ohbayashi T, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Teshima S, Rokutan K, Mukai K, Kuroda M: Dioxin Stimulates Synthesis and Secretion of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 290:984-987
- Ohbayashi T, Oikawa K, Iwata R, Kameta A, Evine K, Isobe T, Matsuda Y, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Kuroda M, Mukai K: Dioxin induces a novel nuclear factor, DIF-3, that is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett* 2001, 508:341-344
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Iwata, R., Kameta, A, Evine, K., Iwaya, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kuroda, M., Mukai, K. Dioxin suppresses the checkpoint protein, MAD2, by an AhR-independent pathway. *Cancer Research*, 61, 5707-5709, 2001

(2) 特許出願

なし