

「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 第一病理学講座 講師)

「内分泌かく乱物質が減数分裂、相同組換えに与える影響」

1. 研究実施の概要

我々は、現在までの研究により、相同組み換えや減数分裂に関与する可能性のある新規遺伝子 *DIF-2*, *DIF-3* (Dioxin Inducible Factor-2, 3) を含むいくつかの遺伝子が、ダイオキシンによって発現制御を受けることを新規に同定している。今年度は、昨年度に引き続き、*DIF-2* に関し詳細な検討を行った。その結果、*DIF-2* が *Drosophila WAPL* 遺伝子のヒトホモログであり、子宮頸癌に高発現することを明らかにした。また、*DIF-2* が染色体テリトリーに形成に関与する可能を見いだした。さらに、昨年度作製した *DIF-2* 遺伝子、*DIF-3* 遺伝子をそれぞれ欠失したマウスは、胎生致死であることが明らかになった。これらのマウスの詳細な解析は、環境ホルモンが *DIF-2*, *DIF-3* を通じて直接的に相同組み換え、減数分裂に関与する分子メカニズムを明らかにするであろう。

一方、ダイオキシンに発現制御を受ける遺伝子の一つとして新規に同定した *DIF-1/IgE-dependent Histamine Releasing Factor (HRF)* は、子宮内膜症との関連が示唆され、現在、本分子を用いた計測系の開発に成功した。

2. 研究実施内容

「研究項目1：環境ホルモンが *DIF-2* 遺伝子の発現制御により減数分裂に影響を与える可能性」

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、現在までの研究により、ダイオキシンによって誘導される遺伝子の一つとして、染色体の構成に関与する遺伝子 *DIF-2* の単離に成功した。*DIF-2* 遺伝子は、*Drosophila WAPL* 遺伝子のヒトホモログである。これまでに、*DIF-2/hWAPL* が精子形成のパキテン期に強く発現し、精子形成の第一期減数分裂のシナプトネマ構造体に局在することを確認したが、今年度は、*DIF-2/hWAPL* ノックアウトマウスの解析を行った。その結果ホモ接合性の *DIF-2/hWAPL* 欠失マウス (*DIF-2/-*) は胎生致死であることが示された。さらに詳細な解析の結果、*DIF-2/hWAPL* を欠失したマウスは着床前に死に至ることが明らかになった。このことから、*DIF-2/hWAPL* 遺伝子をヘテロ接合性を持つマウス (*DIF-2+/-*) を交配し、人工受精を行い、胚成熟を検討した結果、*DIF-2/-* は、桑実胚において apoptosis に陥ることが明らかになった。現在この apoptosis の原因の解析、環境ホルモン暴露かでの変化

を検討している。

「研究項目2：DIF-2/hWAPLと子宮頸部悪性病変の発生」

我々は、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/hWAPLの発現を検討した。その結果、DIF-2/hWAPLが子宮頸癌において有意に高発現していることを確認したが、今年度さらに、子宮頸癌の前癌状態である、異型性上皮（dysplasia）においてのDIF-2/hWAPLの発現を検討した。その結果DIF-2/hWAPLは軽度異型上皮（mild dysplasia）から高度異型上皮（severe dysplasia）において、発現が上昇することが確認された。また、子宮頸癌由来の培養細胞を用いて、RNA干渉法によるDIF-2/hWAPLの発現抑制を行った結果、細胞増殖の停止が観察された。これは、DIF-2/hWAPLが子宮頸癌の分子標的治療の効果的な標的となりうることを示すものである。また、DIF-2/hWAPLは3-Methylcholanthrene (3-mc)によっても誘導されることが確認された。一方、現在子宮頸癌と3-mcの暴露が指摘されている。今後、さらに子宮頸癌におけるDIF-2/hWAPLの異常発現と3-mcの暴露の相関についても検討していく。

「研究項目3：環境ホルモンが染色体テリトリーに影響を与える可能性」

昨年度、我々はDIF-2遺伝子の過剰発現が、細胞周期の間期における染色体の位置すなわち染色体テリトリーに影響を及ぼすことを見出した。この事実は、環境ホルモンが染色体テリトリーに影響を及ぼす可能性を示している。一方で環境ホルモンの染色体テリトリーに対する影響を客観的に定量する実験系の開発が必要になる。このことから、今年度Expectation-Maximization (EM) アルゴリズムと呼ばれる統計的手法を改良した独自手法を応用し、染色体領域を自動的に抽出する技術を開発した。（図1参照、左の連続したレーザー顕微鏡の画像を右の立体画像に自動的に変換する。12番染色体を赤で16番染色体を緑で示す。）

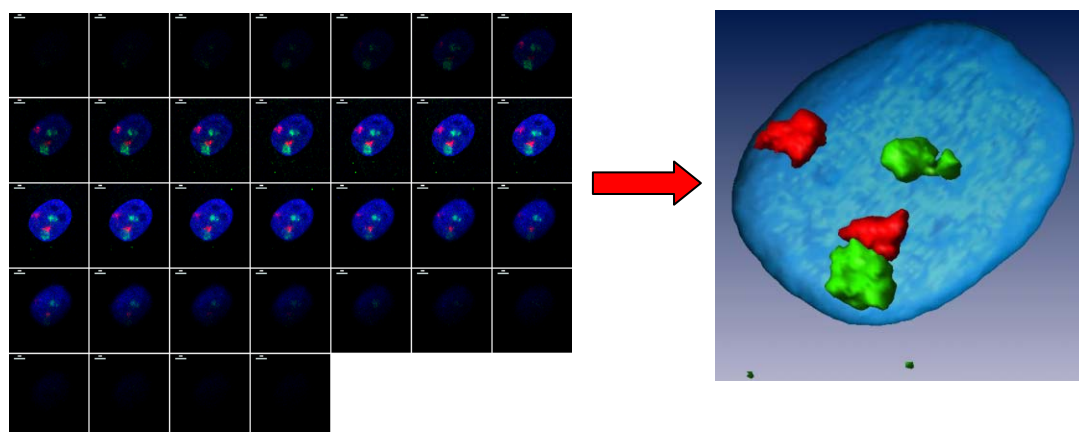


図1

2次元位置データは、確率的な揺らぎを持っているため、信頼性のある標準位置デー

タを構築するためには、複数の2次元位置データから統計的に補完処理を行って、3次元位置を再構成しなければならない。我々は、細胞核内にもうけた基準点と染色体との相対位置を統計解析することにより、信頼性の高い標準的「細胞核座標系」を構成することに成功した。（図2参照。）

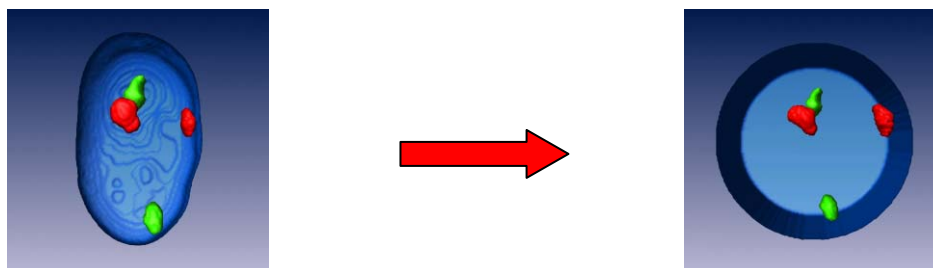


図2

「研究項目4：環境ホルモンが減数分裂に影響を与える可能性」

我々は、環境化学物質が減数分裂に与える影響を検討しているが、今年度、直接的に環境化学物質のうち、TCDDと3-mcをマウスに経口投与し、精巣での影響を検討した。興味深いことに、TCDDによって誘導され、減数分裂期に特異的に発現する*DIF-2/hWAPL*は、TCDD高濃度の暴露で、精巣において発現が減少した。また、精巣において3-mc、TCDDの暴露によってアポトーシスの増加が確認された。現在、これらのマウスから染色体標本作製し、染色体異常を観察している。

[研究項目5:環境ホルモンと子宮内膜症]

我々の研究過程で、ダイオキシンによって誘導される分子として、*DIF-1/IgE-dependent Histamine Releasing Factor (HRF)* を同定した。*DIF-1/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。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る。また、環境ホルモンによる関与が疑われる子宮内膜症での*DIF-1/HRF*の高発現が確認された。さらに、*DIF-1/HRF*特異的抗体を2種類作製し、血清中および月経血中からELISA法によって、*DIF-1/HRF*の検出に成功した。また、光学ビーズを用い、さらに微量検体からの*DIF-1/HRF*の検出系の開発に成功した。今後はさらに、環境ホルモンの暴露との相関の検討を行っていく。

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研究分担グループ長名（所属、役職）

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

研究項目1：環境ホルモンが*DIF-2*遺伝子の発現制御により減数分裂に影響を与える可能性

研究項目2：*DIF-2/hWAPL*と子宮頸部悪性病変の発生

研究項目3：環境ホルモンが染色体テリトリーに影響を与える可能性

(2) 環境ホルモンが相同組み換え、染色体分配に関与する可能性を検討するグループ

①研究分担グループ長名（所属、役職）

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

研究項目4：環境ホルモンが減数分裂に影響を与える可能性

(3) 環境ホルモンの子宮内膜症への影響、アレルギー性疾患への影響を検討するグループ

①研究分担グループ長名（所属、役職）

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

研究項目5:環境ホルモンと子宮内膜症

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M and Mukai K: Expression of a novel human gene, *hWAPL*, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Research*, 64: 3545-9 2004.
- Hattori H, Kuroda M, Ishida T, Shinmura K, Nagai S, Mukai K, Imakiire A: Human DNA damage checkpoints and their relevance to soft tissue sarcoma. *Pathol Int*, 54: 26-31, 2003.

（2）特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）