

「内分泌かく乱物質」

平成12年度採択研究代表者

宮本 薫

(福井大学 医学部 医学科 生命情報医科学講座 分子生体情報学 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

低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に対しても影響を与える可能性が示唆されているが、それを示す具体的なデータが不足しているのが現状である。私どもは、低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に及ぼす影響を遺伝子発現の変化として捕らえ、それらの遺伝子を同定してデータベースを構築することを目指している。さらにそれらに基づいて、低濃度内分泌かく乱物質の女性生殖器系に対する作用のメカニズムを分子レベルで明らかにする。

平成16年度は、エストロゲン様作用を持つジエチルスチルベステロール (DES) の *in vivo*での作用を遺伝子発現の変化から解析した。DESの投与により、卵巣顆粒膜細胞の異常増殖が引き起こされる。その際に誘導もしくは抑制される遺伝子を網羅的解析法であるサブトラクションクローニング、DNAマイクロアレイおよびリアルタイムPCRにより同定した。DESによる卵巣顆粒膜細胞増殖のメカニズムを解明するため、これらの中から細胞増殖に関与すると思われる転写因子CITED-4、HIF-2 α などに注目し、その分子機構の解明を行った。

また、これまでの網羅的解析により同定した、主にダイオキシンを中心とした生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子群のデータベース化を行いホームページ上に掲載した。

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

2. 研究実施内容

- 1) ジエチルスチルベステロール (DES) は強力なエストロゲン様作用をもつ内分泌かく乱物質のひとつだが、幼若ラットに腹腔内投与すると、卵巣では未分化の顆粒膜細胞の増殖が著しく促進されること、卵巣夾膜細胞では分化抑制が生じることを見出した。DES投与72時間後の卵巣では顆粒膜細胞が密に詰まった大きな卵胞が出現し、増殖の指標であるBrdUの取り込みからもDESが顆粒膜細胞の増殖を著しく促進していることが明らかとなった。こういった、DESによる卵巣の変化を、サブトラクションクローニング、DNAマイクロアレイ及びリアルタイムPCRによる遺伝子発現変化として解析し、36種類のDES感受性卵巣遺伝子群を同定した。

- 2) 卵巣夾膜細胞ではimmediate early geneであるNGFI-BやLH受容体などの遺伝子発現がDES処理により速やかに消失することを明らかにした。一方これらの遺伝子は下垂体ホルモンであるLHにより誘導されることから、視床下部一下垂体系の抑制を介した間接的な影響とも考えられた。そこで、DES投与による血中ゴナドトロピン濃度の変化を調べた結果、DES投与後10分以内に血中LH濃度が著しく低下することが明らかとなった。これはDESが視床下部一下垂体系に作用しLH分泌を抑制することで、卵巣夾膜細胞での分化を抑制していることが示唆された。DESが卵巣や子宮だけでなく、中枢性にも強い影響を及ぼしていることが初めて明らかとなった。
- 3) 卵巣顆粒膜細胞ではDES処理により細胞増殖が強く誘導される。その際、転写調節因子CITED-4やHIF-2 α などが強く誘導されることが明らかとなった。CITED-4は、C末端にED-richドメインを持つ新たに同定されたCITEDファミリーの一員であり、核内コアクチベーターCBP/p300と結合して転写を活性化すると考えられているがその生理的役割は不明であった。本研究では、CITED-4を線維芽細胞に導入すると形質転換されることなどから、細胞増殖の促進因子であることを明らかにした。また、エストロゲン受容体との相互作用の検討から、CITED-4はエストロゲン受容体の活性を増強していることを明らかにした。またエストロゲン受容体の活性を抑制することが知られているDAX-1は、CITED-4とは反対にDES投与により卵巣顆粒膜細胞でその発現が抑制されることが明らかとなった。これらのことは、DESが卵巣顆粒膜細胞に作用しその増殖を促進するとともに、エストロゲン作用そのものも増強していることを示している。またHIF-2 α は低酸素状態で様々な遺伝子群を誘導する転写因子で、特に血管新生にかかわる増殖因子VEGFの発現を強く誘導する。本研究では細胞増殖に観点からDES処理によるVEGFの卵巣における発現変化を検討し、その結果VEGFが卵巣顆粒膜細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。
- 4) 昨年度に引き続き、遺伝子データベースの整備を行い、その成果をホームページ上に掲載した (<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html>)。ヒトゲノムプロジェクトの完了や遺伝子アノテーションの整理が大きく進んだことにより、本研究で得られたほとんどすべての遺伝子に関して同定することができた。さらに各遺伝子の細胞内での役割を示す情報伝達経路をバイオインフォマティクスを利用して解析した。また全長を含むクローンを所有・配布しているデータベースへのリンクが可能となった。また発現解析用のプローブ等の用途に対して、定量的解析に利用できる各遺伝子のプライマー配列をデータベース上に掲載している。
- 5) 生殖腺分化における内分泌かく乱物質の影響を探る上で、ステロイドホルモン産生細胞の分化メカニズムの解明は欠かせない。本研究では、間葉系幹細胞からアンドロゲン産生細胞、及びグルココルチコイド産生細胞へと分化誘導させる系を初めて確立した。現在、ステロイドホルモン産生細胞の分化メカニズムの解析と、それに及ぼす内分泌かく乱物質の影響を、遺伝子発現変化として解析している。

3. 研究実施体制

宮本グループ

- ① 研究分担グループ長：宮本 薫（福井大学 医学部、教授）
- ② 研究項目：サブトラクシオンクローニングとデータベースの構築を担当
生殖系での低濃度内分泌かく乱物質作用の分子メカニズムの解明

峯岸グループ

- ① 研究分担グループ長：峯岸 敬（群馬大学 医学部、教授）
- ② 研究項目：生殖系細胞の採取と培養を担当
ゴナドトロピン受容体に対する内分泌かく乱物質作用の分子メカニズムの解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Kawata, H., Yamada, K., Matsuura, K., Shou, Z., Miyamoto, K.: Insulin regulates the expression of the enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene via different pathways in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Horm Metab Res.* 36, 526-30, 2004.
- Kajitani, T., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kawata, H., Miyamoto, K.: Cloning and characterization of GCX-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 145, 2307-2318, 2004.
- Sekiguchi, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kajitani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Miyamoto, K.: Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 281-291, 2004.
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., Fujimoto, T.: Human coronavirus 229E binds to CD13 in raft and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* 78, 8701-8708, 2004.
- Osawa, H., Yamada, K., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Kawata, H., Nishimiya, T., Niiya, T., Shimizu, I., Nishida, W., Hashiramoto, M., Kanatsuka, A., Fujii, Y., Ohashi, J., Makino, H.: The G/G genotype of resistin SNP-420 increases type 2 diabetes susceptibility by inducing its promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 678-686, 2004.
- Mizutani, T., Yoshino, M., Satake, T., Nakagawa, M., Ishimura, R., Tohyama, C., Kokame, K., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible and -suppressive genes in

the rat placenta: induction of interferon- regulated genes with possible inhibitory roles for angiogenesis in the placenta. *Endocrin. J.* 51, 569-567, 2004.

- Nakamura, K., Yamashita, S., Omori, Y., Minegishi, T. : A splice variant of the human LH receptor modulates the expression of wild type human LH receptor. *Molecular Endocrinology* 18(6), 1461-1470, 2004.
- Sumino, H., Ichikawa, S., Abe, M., Endo, Y., Nakajima, Y., Minegishi, T., Ishikawa, O., Kurabayashi, M. : Effects of Aging and Postmenopausal Hypoestrogenism on Skin Elasticity and Bone Mineral Density in Japanese Women. *Endocrine Journal* 51(2), 159-164, 2004.
- Abe, Y., Minegishi, T., Leung, P.C.K. : Activin Receptor Signaling. *Growth Factor* 22(2), 105-110, 2004.
- 中村和人、大森由紀、峯岸 敬：特集 卵子とエンドクリン・パラクリン。インヒビ
ン・アクチビン・フォリスタチン系と卵子。HORMONE FRONTIER GYNECOLOGY 11(1),
18-22, 2004.
- 大森由紀、中村和人、峯岸 敬：特集：生殖領域におけるホルモンと受容体の最近の
研究。卵巣におけるゴナドトロピンレセプターの発現調節。臨床化学33(4), 146-153,
2004.
- Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., Miyamoto, K.: SHARP-2/ Stra13/
DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene
expression. *FEBS Lett.* 579, 1509-1514. 2005.
- Inazu, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Miyamoto, K.: Cloning, expression, and
chromosomal assignment of human pleckstrin 2. *Mol. Biol. Rep.* 32, 35-40,
2005.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：3件）