東京医科大学病理学講座　講師

黒田雅彦

「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」

研究期間：平成１１年１１月1日～平成１６年１０月３１日

１．研究実施の概要

我々は、これまでに、科学技術振興機構による資金援助をえて、ダイオキシンが減数分裂に与える影響に関し検討を行ってきた。まず我々は、環境化学物質のうちダイオキシン、ビスフェノールA、3-メチルコラントレンをマウスに投与し，これらの化学物質が減数分裂に直接的に影響を及ぼすか否か検討した。その結果、ダイオキシン、ビスフェノールAを投与した精巣には、コントロールに比べアポトーシスに陥った細胞が多く観察された。このようなことから、減数分裂期の染色体の構造異常の有無を検討した。その結果、ビスフェノールA、3-メチルコラントレンは、コントロールに比較し変化は見られなかったが、ダイオキシンを投与した群は、減数分裂第一期において染色体の構造異常の増加が見られた。一方、ダイオキシンによって誘導される染色体異常のタイプが自然発生型の染色体異常と違いが見られないことから、ダイオキシンで誘発される染色体異常は、ダイオキシンによって直接誘発される遺伝損傷によるものではなく、自然発生する遺伝損傷の修復阻害に由来する可能性が考えられた．以上の実験から、ダイオキシンが、減数分裂第一期の染色体修復機構に障害を与える可能性が示された。そこで、我々は減数分裂期に作用する修復機構に関与する分子の同定を行った。その結果、我々は細胞周期を制御するcheckpoint分子であるMad2の発現が、ダイオキシンによって抑制されることを見いだした。Mad2は、mitotic checkpoint proteinとしてAPC complexに結合しG2/M期の制御に重要な役割を果たしている。また最近の報告では、減数分裂において、染色体の分配に重要な役割を果たすことが示されている。一方、ダイオキシンの細胞毒性はbHLH/PAS転写受容体であるArylhydrocarbon receptor (AhR)によって仲介されることが証明されているが、このTCDDによるMad2の発現抑制は、AhRを持たない細胞でも確認された。この事実から、TCDDによるMad2の制御は新規のTCDD情報伝達系が働いていることが推定される。

また、我々は、上記に示したMad2以外の分子も減数分裂期に関与する可能性を考え、ダイオキシンによって誘導される遺伝子群を単離する事により、作用の全体像を把握することを試みた。具体的には、ES細胞にダイオキシンを暴露し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及び抑制される遺伝子の単離を行った。その結果、ダイオキシンによって誘導される遺伝子を19種同定した。それらの遺伝子のうち、特に興味深い遺伝子として、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 fact

or-3)、アレルギーに関与する遺伝子(DIF-1、Dioxin inducible factor-1)を単離することに成功した。

その後の詳細な解析から、DIF-1遺伝子は、IgE-dependent Histamine Releasing Factor（HRF）であることが明らかになった。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事で知られ、さらに、最近では好酸球にも直接作用することが明らかになってきた。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ダイオキシンの汚染との関連が示唆された。また、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確認されている。我々は、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。

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。さらに、興味深いことにDIF-3は、ビスフェノールA、diethylstilbestrol(DES)によっても発現が誘導される。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。

DIF-2/hWAPLは、ダイオキシンによって誘導されるが、我々は、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ている。また、ショウジョウバエにおけるDIF-2ホモログがヘテロクロマチンに関与することから、DIF-2遺伝子とヘテロクロマチンの構造体との関係についても検討を行った結果、ヘテロクロマチンの重要な構成成分であるHP1とDIF-2/hWAPLが、染色体及び間期の細胞において共局在することが明らかになった。また、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*が子宮頚癌において有意に高発現していることを確認したが、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*は軽度異形上皮（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。

一方で、我々はDIF-2/hWAPL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、ダイオキシ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。一方でダイオキシ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、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。さらに、このシステムを用いて、前脂肪細胞にダイオキシン、3-メチルコラントレンを暴露し、染色体テリトリーの変化を計測した。その結果、ダイオキシンを暴露した細胞において、12番染色体と16番染色体の距離が有意に細胞核内で離れることが明らかになった。以上の結果から、ダイオキシンの影響として、染色体テリトリーという新しい概念が明らかになった。

ダイオキシンの人体への影響、特に減数分裂への影響や次世代への作用は、その研究がまだ端緒についたばかりで未解明な部分が多い。しかしながら、我々の研究をはじめとしたこの分野の研究により、染色体テリトリーの問題や核内の高次構造、また、組み換え機構やそれらに対するダイオキシンの影響が徐々に解明されつつある。これらの研究結果から、疾患の発生メカニズムの新たな解明の手がかりを得る可能性も少なくない。この研究のさらなる進展は、ダイオキシンの問題はもちろんのこと、広く一般の医学や細胞生物学に対しても貢献しうる重要な知識を得ることに繋がると確信している。

２．研究構想

【研究背景】

近年、ダイオキシンが、地球上の生命の連続性という生殖細胞を介した世代から世代への遺伝情報に影響を与えることが明らかになってきた。しかし、どのようメカニズムで内分泌かく乱物質が生殖細胞に作用するかは未だ不明である。

卵胞数や精子数の減少の原因は、減数分裂の異常といった直接的な原因の他、ホルモンの作用調節の異常によることが考えられる。我々は、TLS遺伝子ノックアウトマウスの解析を通じて、Rad51、BRCA1,2といった直接的にDNA修復に関与する遺伝子以外にも、TLS遺伝子のようなRNA結合モチーフを持つ核内ホルモ

ンレセプターの活性化因子が減数分裂期の組み換えに関与している事実をつきとめた。この事実は、環境ホルモンが直接的に核内ホルモンレセプターのシグナルを通じて、減数分裂に関与する可能性を示唆する。今回我々は、環境ホルモンの中で特にダイオキシンが相同組み換えに与える影響を検討し、その作用メカニズムの検討、影響を与える分子の同定を行った。

【研究の進め方】

(1) ダイオキシンの減数分裂に対する影響の検討:

ダイオキシンを暴露させたマウスの染色体を観察することにより、ダイオキシンの減数分裂に対する影響を検討する。また、ダイオキシンは世代を超えて異常をきたす可能性が指摘されている。この点から、特に世代間に影響が伝わる可能性のある、染色体の構造異常に関して検討を加える。

(2)ダイオキシンによって減数分裂期に応答する遺伝子の単離:

我々は、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を指摘しているが、一方でダイオキシンは様々な生理活性を持つことが知られている。 そのような観点から研究をスタートするにあたり、ダイオキシンによって誘導される遺伝子群を単離する事により作用の全体像を把握することを試みる。具体的には、ES細胞にダイオキシンを暴露し、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及び抑制される遺伝子の単離を行う。また、現在知られている減数分裂機構に関与する遺伝子のうち、ダイオキシンによって、発現変動を起こす遺伝子の同定も同時に行っていく。また、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、円心密度勾配によりこのパキテン期の細胞は分離することは可能である。このパキテン期の細胞を分離し、この細胞からmRNAを単離し遺伝子ライブラリーを作製し、この遺伝子ライブラリーのEST化を行いクローンのシークエンスおよびDNA chipの作製を行う。

(3)ダイオキシンが相同組み換えを通じて癌化にあたえる影響の検討：

ダイオキシンは、少量でも発癌性や催奇形性を持つことが知られている。催奇形性に関しては、胚にはAhレセプターやエストロゲンレセプターが存在すること

から、ダイオキシンの内分泌かく乱作用によるものと推定される。しかしながら、ダイオキシンと発癌の関係はいまだ未解決の問題である。
一方、体細胞でも、X-線、アルキル化剤活性酸素、などにより、DNAの２重鎖切断が起きた際に相同組み換えがおこる。DNA損傷は発癌へとつながるため、生体内では、DNA修復機構が存在する。発癌とDNAの２重鎖切断の修復異常には深い関係があり、現に乳癌の癌抑制遺伝子といわれるBRAC1、2はDNAの２重鎖切断後の修復に関与している。ここで問題としたいのは、DNAの２重鎖切断が起きた際にダイオキシンが与える影響である。減数分裂に内分泌かく乱物質が影響を与えるはずなら、当然相同組み換えと同じメカニズムであるDNAの２重鎖切断後の修復にダイオキシンが影響を及ぼし、発癌のリスクが高まる可能性が考えられる。このプロジェクトでは、ダイオキシンがDNA２重鎖切断の修復に影響を与えることにより、癌化を促進するか否かのモデルを作成し、ダイオキシンと癌化の関連性を検討する。

【チーム内の分担】

東京医科大学･黒田グループは、ダイオキシンによって応答する遺伝子の単離、減数分裂期特異的ライブラリーを用いダイオキシンによって応答する相同組み換えに関与する遺伝子群の単離た検討、相同組み換え率測定法の確立、ダイオキシンが相同組み換えを通じて癌化にあたえる影響の検討を行った。北海道大学･松田グループは、ダイオキシン、ビスフェノールA、3-メチルコラントレンの減数分裂に対する影響の検討を行った。また、東京大学の石川、秋山グループは、ダイオキシンが相同組み換えを通じて癌化にあたえる影響の検討に関与した。また、かずさDNA研究所･長瀬グループには、減数分裂期特異的ライブラリーの作製を行った。また、研究経過から生まれた新規のグループとして東京医科大学･高山グループがダイオキシンとアレルギー疾患の研究に参加した。

【その後の新展開から生まれた目標】

我々の当初予測したように、ダイオキシンが、減数分裂に影響を与える可能性は示された。特にダイオキシンは、減数分裂期の遺伝子修復機構に作用し影響を与えることが示された。一方、本研究から単離された、DIF-2/hWAPLは、ダイオキシンによって応答する分子であるが、その後の研究から子宮頸癌の癌遺伝子であることが明らかになった。またDIF-2/hWAPLが関与する発癌研究を通じて、通常の染色体テリトリーの構成に重要な働きをしていることが示された。染色体テリトリーの概念は、細胞核において、染色体が固有の位置を占めるという概念で

あるが、この染色体テリトリーにダイオキシンが影響を与える可能性が示された。これは、ダイオキシンの影響として、はじめて示された生体への影響である。染色体テリトリーは、遺伝子の転写や細胞の分化に関与していると考えられるが、ダイオキシンがこの機構に影響を与えるというのは、生体の生命活動にとって重要な問題である。今後さらに染色体テリトリーとダイオキシンの影響を検討していく必要がある。

また、研究過程で、ダイオキシンとDESの両者によって顕著に発現量が増加したものの一つとして、DIF-1遺伝子を我々は同定したが、この分子はその後、IgE-dependent Histamine Releasing Factor（HRF）であることが判明した。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事で知られ、さらに、最近では好酸球にも直接作用することが明らかになってきた。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ダイオキシンの汚染との関連が新たな展開として示された。さらに近年、産婦人科領域の疾患で増加しているもののうち子宮内膜症があげられるが、この子宮内膜症にもHRFが高発現していることが確かめられた。子宮内膜症は、ダイオキシンの暴露と相関が示唆されているが、我々の研究は、その相関を示唆するものである。今後さらに、子宮内膜症とDIF-1/HRFの関連、診断、治療への応用が期待される。

３．研究成果

３．１　ダイオキシン、ビスフェノールA、3-メチルコラントレンの減数分裂に対する影響の検討（松田グループ）

(1)研究内容及び成果

内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の汚染は重要な社会問題となっており、内分泌撹乱作用が疑われているビスフェノールA (BPA) やダイオキシン (TCDD) には遺伝毒性があるとの指摘がある．しかし、それらが事実であるのか、あるいは仮に事実であったとしても実際に内分泌系の作用を介して遺伝毒性が出現するか否かも明らかでない．また、生殖細胞を用いた染色体レベルでの解析は未だほとんど行われておらず、ダイオキシンが減数分裂に与える影響に関しては不明のままである．このような背景から本研究においては、染色体異常を指標として、内分泌撹乱作用が疑われている幾つかの物質によって生殖細胞に誘発される遺伝障害を明らかにし、内分泌攪乱物質の遺伝的リスク評価の基礎情報を提供するとともに、これらが生殖細胞において染色体異常を誘発するメカニズムについて新たな知見を得ることを目的とす

る。我々は、雄マウスにダイオキシン、ビスフェノールA、3-メチルコラントレンを14日間経口投与し､マウス精巣の第１減数分裂中期に誘発される染色体構造異常と対合異常ならびに第２減数分裂中期における染色体の構造異常と不分離について詳細な解析を行った。

まず、ダイオキシン、ビスフェノールAを暴露した精巣を観察すると多数の壊死が観察されたことから、 TUNNEL法によってアポトーシスの頻度を観察した。その結果図１に示すごとくBPAやTCDD投与群に多くのアポトーシスが観察された。

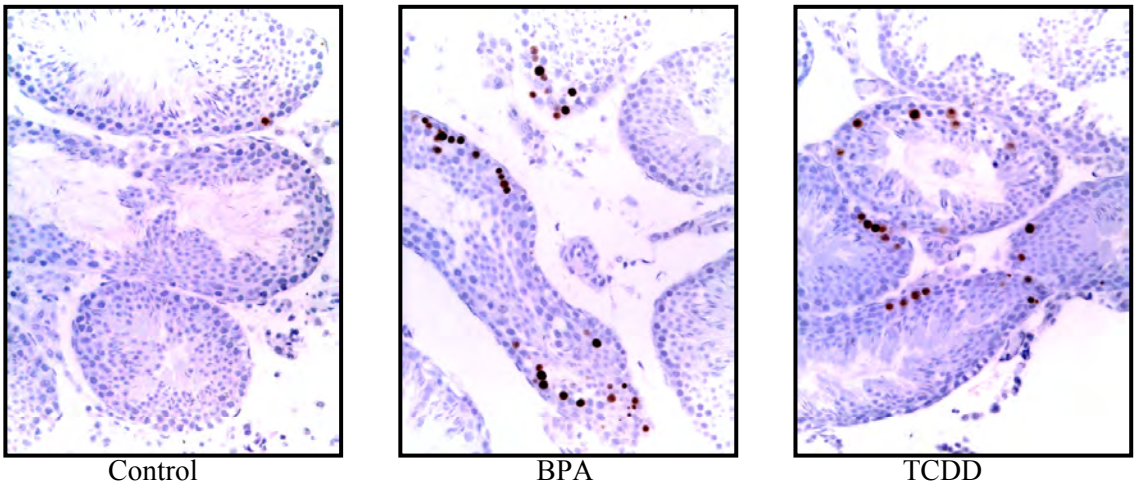


図１　ダイオキシン、ビスフェノールAの精巣への影響-アポトーシスの検討-

さらに精母細胞の第１減数分裂中期に及ぼす影響を検討した。その結果以下の事が明らかになった。

１） 用いた３つの化学物質の全ての処理群において、第１減数分裂中期における染色体対合と対合の早期分離に有意な差は認められなかった.

２） 3-MC 20 mg/kg 処理群とビスフェノール A200 μg/kg および 400 μg/kg 処理群ともに染色体構造異常で有意な差は認められなかった。
TCDD 36 μg/kg 処理群と 100 μg/kg 処理群においては、有意水準を 5% に設定した場合、染色体構造異常の出現頻度に有意な差は見られなかったが、10% 水準では有意となったことから、TCDD が精母細胞の第１減数分裂中期で染色体構造異常を誘発する可能性については否定できなかった（図２、図３）。

３） TCDD 処理群で観察される染色体異常のほとんどは染色体型の異常であり、染色分体型の異常の頻度は低かった.

４） コントロール群で観察される自然発生型の染色体異常も主に染色体型であり、自然発生染色体異常と TCDD 誘発染色体異常のタイプに違いは見られなかった.

５） TCDD 36 μg/kg 処理群と 100 μg/kg 処理群の間で誘発される染色体異常の頻度に差はなく、少なくとも本研究に用いた用量においては用量反応関係は認められなかっ

た.

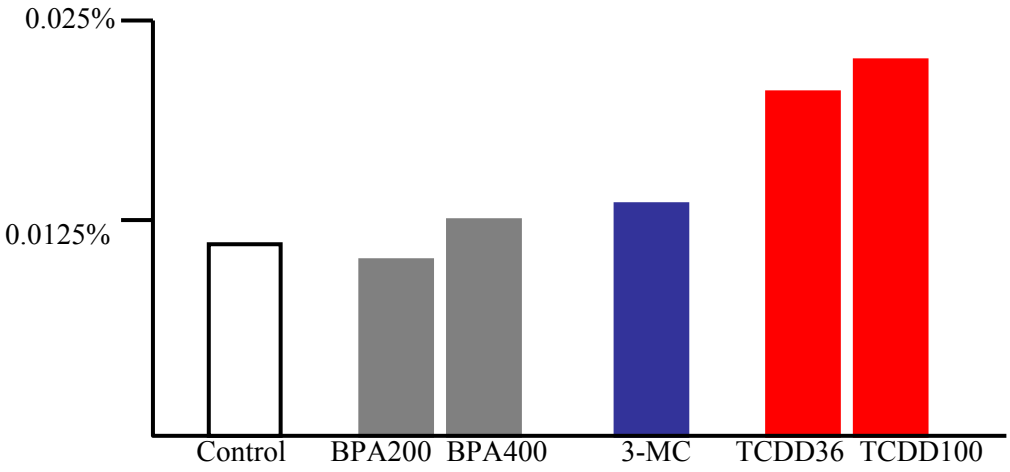


図２　ダイオキシン、ビスフェノールA、3-メチルコラントレンによるマウス精母細胞第１減数分裂中期の染色体構造異常

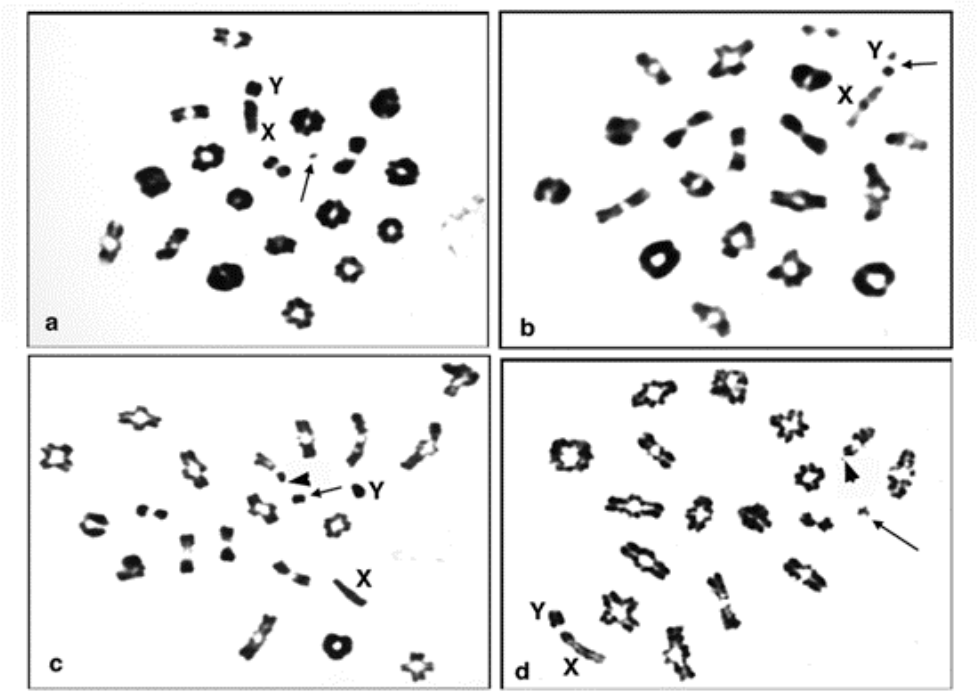


図３　マウス精母細胞の第１減数分裂中期で観察される染色体構造異常．(a) 染色分体型断片．(b) 染色体型ギャップ．Y 染色体に染色体型ギャップが存在する．(c) 染色体型切断．切断部位を矢頭で示した．(d) 染色体型断片．切断部位を矢頭で示した．基本的に TCDD によって誘導される染色体異常のタイプは、自然発生型の染色体異常と違いはない．

(2)研究成果の今後期待される効果

１） 本研究では、TCDD 36 μg/kg処理群と100 μg/kg処理群においてのみ、第１減数分裂中期で染色体構造異常のわずかな増加が観察された. しかし、用いた２つの用量間では誘発される染色体異常の頻度に差はなく、また、染色体異常のタイプが自然発生型の染色体異常と違いが見られないことから、TCDDで誘発される染色体異常は、TCDDによって直接誘発される遺伝損傷によるものではなく、自然発生する遺伝損傷の修復阻害に由来する可能性が考えられる. 我々は、マウス精母細胞の減数分裂期において、クロマチンの動態と修復に関与する遺伝子群の発現がTCDD処理によって誘導されることを検出しており、この結果はTCDDが減数分裂期に生じた遺伝損傷の修復に影響を与える可能性を示唆するものである.

２） 精母細胞では染色体の複製が行われないにも関わらず、第１減数分裂期中期で観察される主な構造異常は染色分体型ではなく染色体型であった。この結果は、両方の姉妹染色分体においてDNAの２重鎖切断が生じていることを示している. このような染色体異常の誘発機構は減数分裂特異的なものであり、本研究で得られた結果は、修復されなかったDNA鎖が存在する染色体領域において、Synaptonemal Complex (SC) 構造を介した染色体対合に基づく物理的な染色体切断が生じている可能性を強く示唆している.

３） Hunt R. A. et al. (Current Biology 13:546-553, 2003) によれば、雌マウスに20 μg/kgのBPAを７日間連続投与することによって、第１卵母細胞の減数分裂中期において分裂装置上での染色体配置の異常（abnormal meiotic metaphase configuration）が有意に誘発されることが報告されている。しかし、染色体異常を指標として行った本実験では、精母細胞に対して200 μg/kgおよび400 μg/kgのBPAを14日間投与しても、染色体異常の有意な増加は認められなかった。今後は、同様の実験を卵母細胞を用いて行うとともに、分裂中期における赤道板上での染色体配置の異常（Hunt R.A. et al. のデータ）とその結果誘発されると考えられる染色体の数的異常が対応するか否か(すなわち直接の要因であるか否か）を明らかにする必要がある。

４） 今後は本研究で用いたこれら３物質の処理群についてさらに例数を増やすとともに、新たに異なる用量の処理群を設定し、内分泌撹乱作用が疑われている物質が減数分裂期のゲノム安定性に及ぼす影響を明らかにする必要が

ある.

３．２　ダイオキシンによって減数分裂期に応答する遺伝子の単離（黒田グループ、長瀬グループ、秋山グループ）

(1)研究内容及び成果

我々は、ダイオキシンが相同組み替え、減数分裂に関与する可能性を指摘しているが、一方でダイオキシンは様々な生理活性を持つことが知られている。そのような観点からダイオキシンによって誘導される遺伝子群を単離する事により、作用の全体像を把握することを試みた。具体的には、ES細胞にダイオキシンを暴露し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及び抑制される遺伝子の単離を行った。その結果、ダイオキシンによって誘導される遺伝子を19種同定した。それらを機能的な面から分類すると①細胞周期に関与する遺伝子群②ヒストンアセチル化酵素活性を持つ遺伝子③ERストレスに関与する遺伝子群④GTPase-activating protein⑤細胞骨格に関与する遺伝子群⑤未知の機能群に分けられた。ダイオキシンによって発現が抑制される遺伝子に関しては現在解析中である。このように非常に多彩な遺伝子群に影響を与えることが示されたと同時に今まで明らかにされていないダイオキシンの作用機序が示唆された。

一方これらの遺伝子のうち減数分裂期に作用する遺伝子を同定するために、まず組織での発現を検討した。その結果、DIF-2(Dioxin inducible factor-2)及びDIF-3(Dioxin inducible factor-3)を単離することに成功した。

DIF-2/hWAPLについて

DIF-2遺伝子は、その構造から、*Drosophila*の*wings apart-like* (*wapl*)遺伝子と相同の構造を持つことから*Drosophila*のWAPLのヒトホモログと考えられた。図4にその構造を示す。

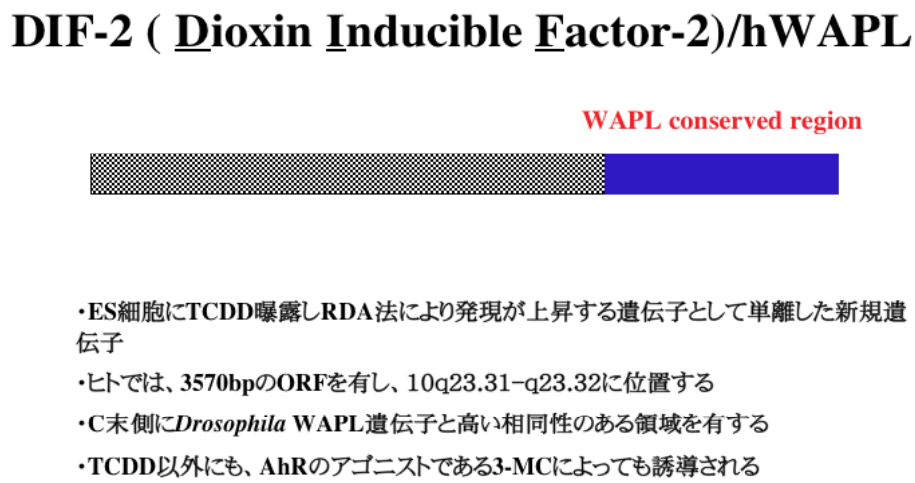


図4 DIF-2/hWAPLの構造と特徴

また作成した抗*DIF-2/hWAPL*抗体で免疫染色を行うと、特にパキテン期の細胞に強い発現がみられた（図5）。さらに、パキテン期の細胞から染色体標本を作製すると、*DIF-2/hWAPL*は、一次精母細胞の時期に染色体の対合を維持するシナプトネマ構造体に局在していた（図6）。この構造体は染色体組み換えに必須であることから、DIF-2/hWAPLは減数分裂/相同組み換え機構に関与することが示唆された。一方、培養細胞における観察では、DIF-2/hWAPLは間期において細胞核に局在し、分裂期では染色体の周囲に局在していた。

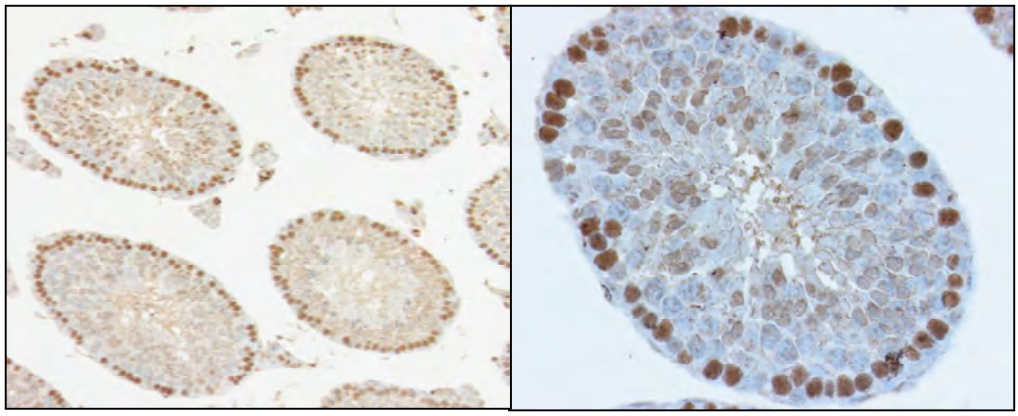


図5 精巣におけるDIF-2/hWAPLの局在

茶色の染色されている部分がDIF-2/hWAPL陽性細胞

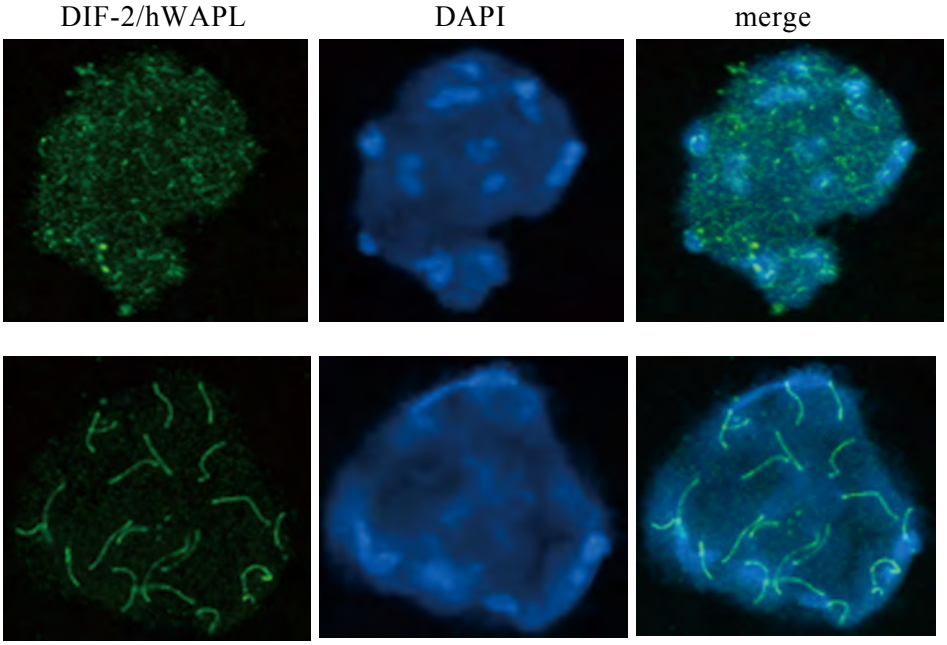


図6　精母細胞染色体における DIF-2/hWAPL の局在

上段がザイゴテン期、下段がパキテン期

次に、我々は*DIF-2/hWAPL*のノックアウトマウスの作製を行った（図7）。その結果、*DIF-2/hWAPL*をホモ接合性に欠失したマウスは、胎児性致死であった。そこで、*DIF-2/hWAPL*をヘテロ接合性に持つマウスを用いて人工受精を行い、受精卵の詳細な解析を行った。その結果、*DIF-2/hWAPL*をホモ接合性に欠失した受精卵は８細胞の段階で成長が停止することが明らかになった(図８)。以上の結果は、発生の段階でDIF-2/hWAPLが必須の分子であることを示している。

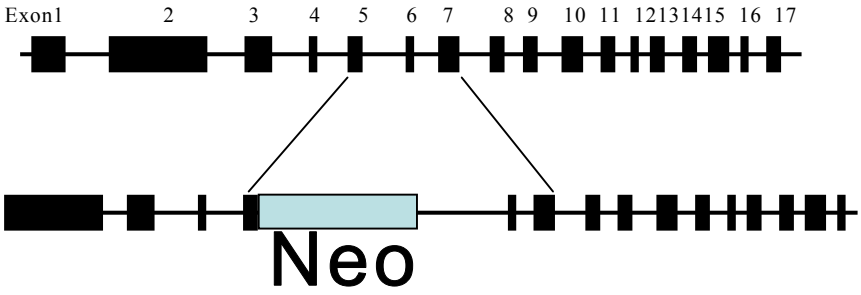


図7 DIF-2/hWAPLノックアウトマウスのmutant alleleを示す

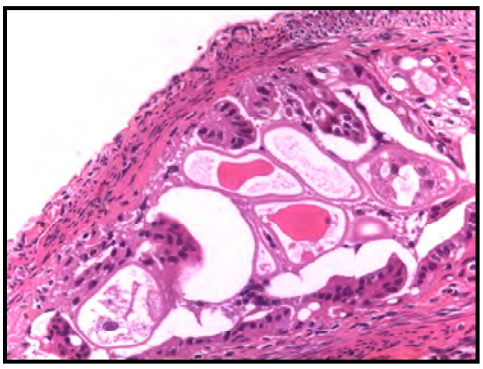


図8　マウス８細胞胚期における細胞死

DIF-2/hWAPL-/+マウスより採取された精子と卵子を人工授精し卵管に移植した後8細胞期の胚を観察した。多くの胚に細胞死が観察された。

一方、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、我々は、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*が子宮頚癌において有意に高発現していることを確認した（図9）。

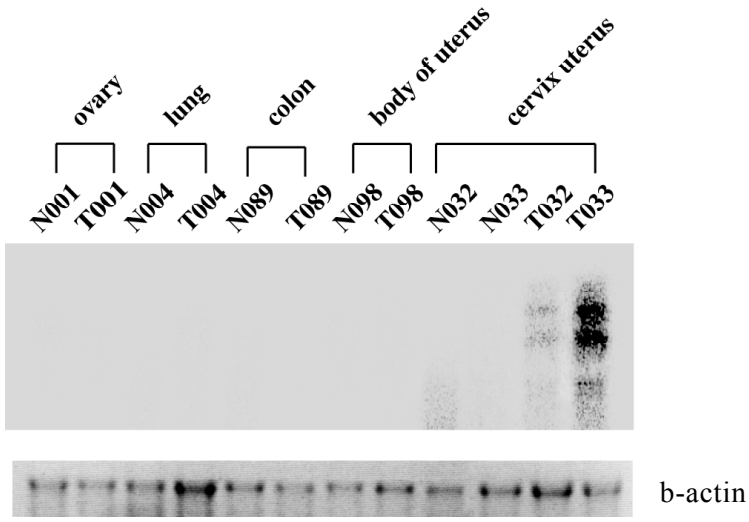


図9 各種癌におけるDIF-2/hWAPLの発現．子宮頸癌にDIF-2/hWAPLの高発現が見られる。

子宮頸部の悪性病変は、形態学的に異形成から上皮内癌、そして進行癌へと進展していく。この中で、　DIF-2/hWAPLは初期の異形成の過程（mild dysplasia、CIN1）から高度異型上皮（severe dysplasia、CIN3）において発現が上昇していくことが確認され、病変の進展に関与することが示唆された（図10）。

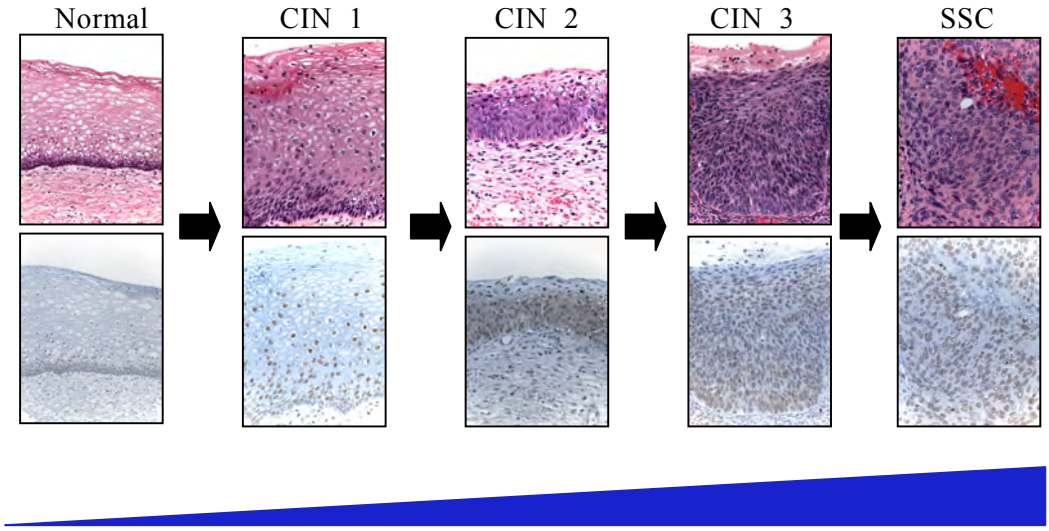


図10 子宮頸部異形成病変から悪性病変におけるDIF-2/hWAPLの発現

また、子宮頸部の悪性病変にはHuman Papilloma Virus (HPV)が重要な役割をはたすが、DIF-2/hWAPLはこのHPVによって誘導されることも明らかにした（図11）。

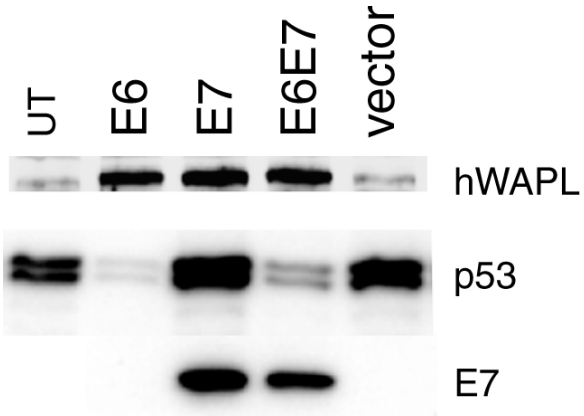


図11 HPV E6、E7によるDIF-2/hWAPLの誘導

ヒト初代培養ケラチノサイトにHPV E6及びE7をレトロウイルスによって導入し DIF-2/hWAPLの発現を検討した。

ダイオキシンに応答する遺伝子がヒト腫瘍ウイルスによっても制御されるというのは、非常に興味深い現象である。特に、子宮頸癌と3-MCの暴露については、その関与が報告されていることから、ダイオキシンと3-MCの汚染と発癌にDIF-2/hWAPLが関与している可能性が考えられる。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*の発現抑制実験を行った結果、細胞増殖

の停止が観察された（図12）。

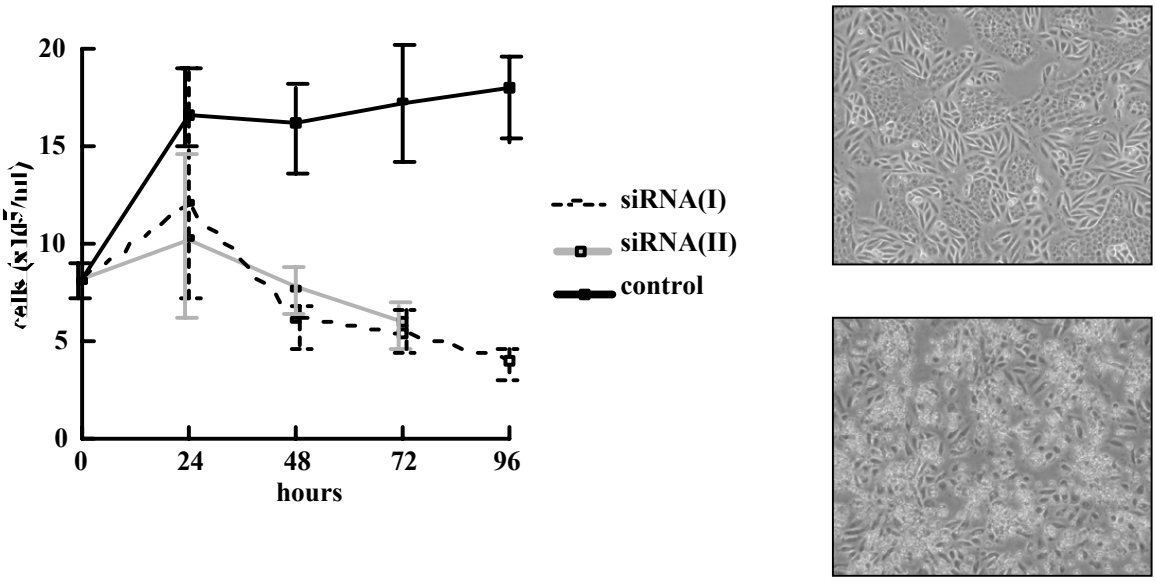


図12 DIF-2/hWAPLsiRNAによる細胞増殖抑制

そのため、子宮頸癌由来の培養細胞をヌードマウスに移植することで発生した腫瘍内に、DIF-2/hWAPL siRNAを導入して、腫瘍増殖抑制能を検討した。その結果、 DIF-2/hWAPL siRNAによる腫瘍の増殖の停止が、in vivoにおいても確認された。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もなりうることを示すものである。

次に、DIF-2/hWAPLの腫瘍化のメカニズムについて検討を行った。まず、我々は、トランスフォーム活性を有するか否かを検討した。具体的には、NIH3T3細胞に DIF-2/hWAPL遺伝子を導入した細胞株を樹立し、フォーカスアッセイを行った。その結果、ベクターのみのコントロール群には、フォーカスが観察できなかったが、DIF-2/hWAPL高発現株は多数のフォーカスを形成した。また、さらにヌードマウスにおける腫瘍形成能を検討した。8週齢のヌードマウスの皮下に10^6個の細胞を移植し腫瘍化能を検討した。その結果コントロール群には腫瘍形成は認められなかったが、DIF-2/hWAPL高発現株は、移植した18匹すべてのマウスに、移植後一週間以内に腫瘍を形成した（図13）。

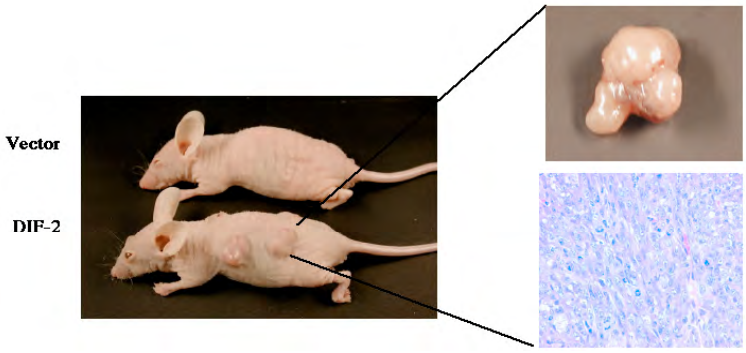


図13 DIF-2/hWAPL遺伝子のトランスフォーム活性の検討。DIF-2/hWAPL高発現細胞株移植後のヌードマウス。上がベクターコントロール。下がDIF-2/hWAPL。右上の写真は、マウスから切除した腫瘍に肉眼所見。下は同腫瘍のHE像を示す。異型性を示す紡錘形の腫瘍細胞が見られる。異型核分裂像も散見される。

さて、HPV感染やダイオキシンによって誘導されるDIF-2/hWAPL遺伝子は、生体にどのような影響を及ぼすのだろうか？この疑問に答えるためにまず、DIF-2/hWAPL遺伝子にGFP遺伝子を結合させた融合遺伝子を作成した。その後HeLa細胞にこのGFP-DIF-2/hWAPL遺伝子を導入しその影響を観察した。その結果、興味深いことに、GFP-DIF-2/hWAPL遺伝子を導入したHeLa細胞の核において、図14に示すようにDNAの配置に異常をきたしている像が観察された。また、これらの細胞中には高頻度に多核化した細胞が観察された。

また、さらにこのようなDNAの局在に異常をきたした細胞が、細胞分裂においてどのような変化を示すのか、Lasar Scaninig Cytometer(LSC)を用いて検討した。具体的には、GFP-DIF-2/hWAPLを遺伝子導入した細胞を3回継代後PI染色を行いDNA含有量を調べた。その結果、図15に示すようにGFP-DIF-2/hWAPL導入細胞中には、8NのDNA含有量を示す細胞がコントロール細胞に比べ有意に増加していた。このような結果から、我々はDIF-2/hWAPLが染色体不安定性を誘導する可能性を考え、さらに、詳細な染色体解析を行った。その結果、DNA二重鎖切断の際高頻度に見られ、微小核形成が、高頻度に観察された。また、複雑な染色体の構造異常が観察された。

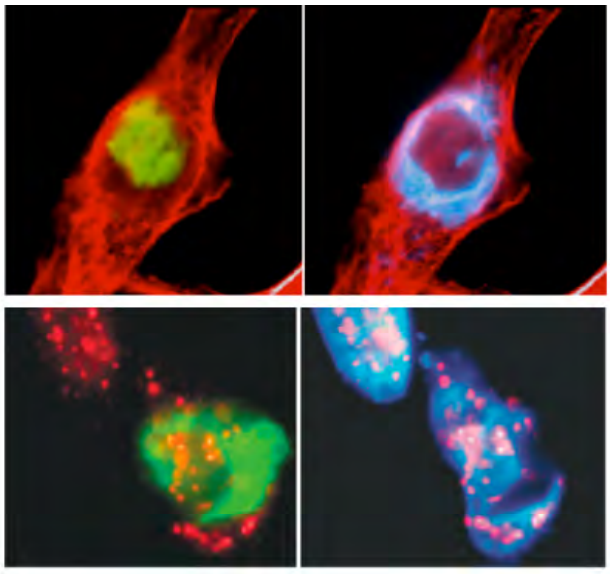


図14 HeLa細胞におけるDIF-2/hWAPL過剰発現の影響。上段及び下段の二つの細胞を示す。上段は緑：GFP-DIF-2、青：DNA、赤：tubulinを示す。核の中心部に存在するDIF-2により、DNAが辺縁に押しやられているのが観察される。下段は緑：GFP-DIF-2、青：DNA、赤：セントロメア(CREST)を示す。上段の細胞と同様にDNAが不規則な形で局在している。

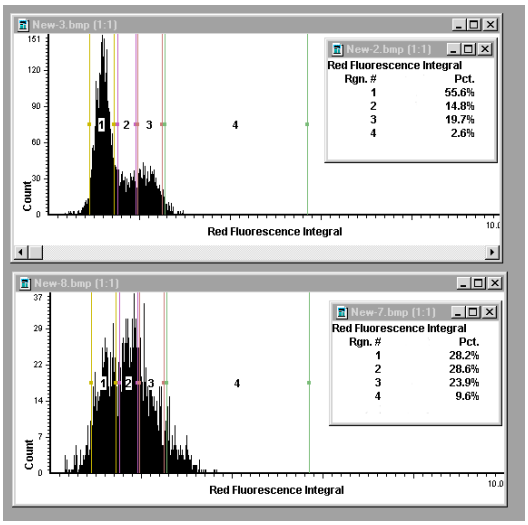


図15 GFP-DIF-2/hWAPL陽性細胞のDNA含有量の解析。PI染色後LSCにて解析を行った。Rgn1は2N、Rgn3は4N、Rgn4は8NのDNA含有量の細胞を示す。上段のコントロール細胞に比べ下段のGFP-DIF-2陽性細胞は明らかにaneuploidyを示す。

DIF-3について

DIF-3(Dioxin inducible factor-3)は、Znフィンガーモチーフを有する転写因子で(図16)、TCDD濃度依存性に発現が誘導される（図17）。さらに、興味深いことにDIF-3は、ビスフェノールA、diethylstilbestrol(DES)によっても発現が誘導される。

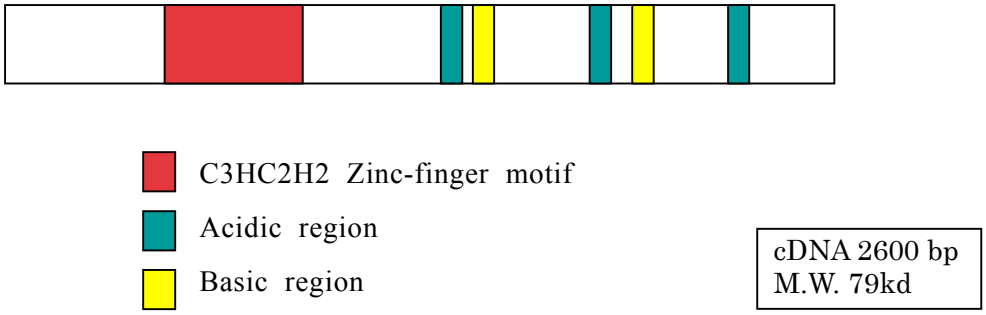


図16 DIF-3遺伝子の構造

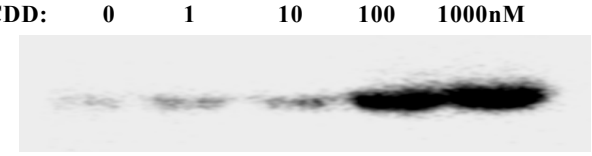


図17 TCDDによるDIF3遺伝子の誘導　濃度依存性にDIF-3の誘導が見られる。

またFISH法を行うとマウスDIF-3は、Chr 11 B5 distal- C proximal（図18）に，ヒトは17番染色体31,841-33,058Kに存在している。

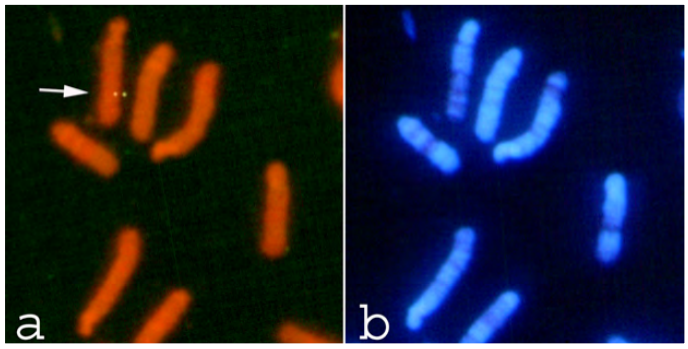


図18 マウス染色体におけるDIF-3遺伝子座　a:DIF-3、b:Hoechst 33258　矢印がChr 11 B5 distal- C proximal

一方、我々はダイオキシンが減数分裂機構におよぼす影響を検討しているが、興味深いことにDIF-3遺伝子は正常細胞において、精巣に強く発現していることがノーザンブロッティングによる解析でわかった（図19）。

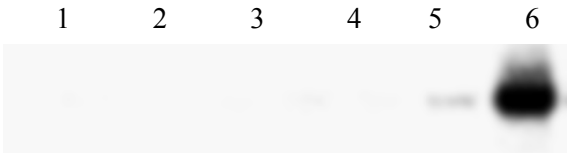


図19 マウス組織におけるDIF-3mRNAの発現

lane 1から順に脳、心臓、肝臓、消化管、骨格筋、腎臓、精巣。Lane 6の精巣にDIF-3 mRNAの強い発現が見られる。

また、蛋白レベルでも、DIF-3遺伝子産物の発現が抗DIF-3抗体を用いたウェスタンブロッティングの解析で示された（図20）。

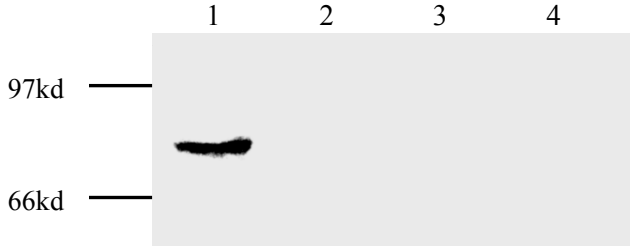


図20 マウス組織におけるDIF-3蛋白質の発現

lane 1から順に精巣、腎臓、肝臓、脾臓。Lane 1の精巣にDIF-3蛋白質の発現が見られる。

以上の結果から、精巣における、DIF-3蛋白質の局在を検討した。特に我々は、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。

また、我々はDIF-3ノックアウトマウスの作製に成功している。今後このマウスを用い、DIF-3の生理学的機能を解析していきたい。

ヒト精巣　　マウス精巣

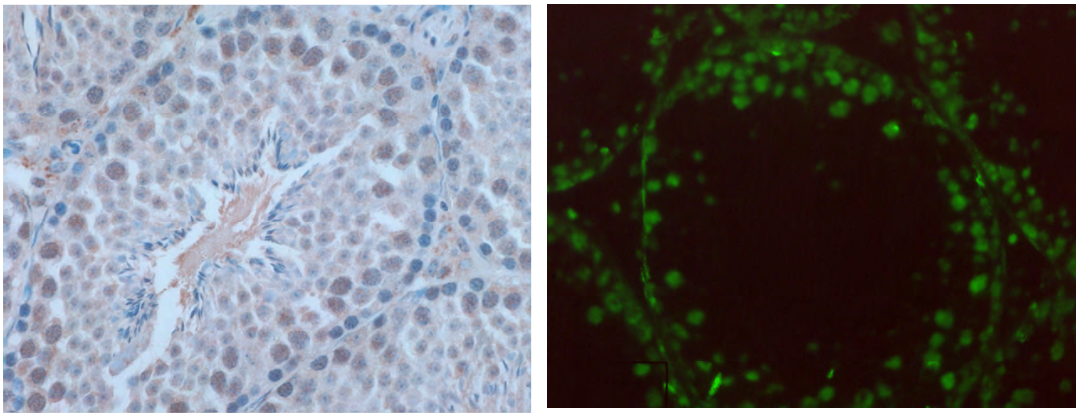


図21 DIF-3抗体を用いた精巣組織における免疫組織化学的検討

左はヒト精巣で茶色に染色されているのが陽性細胞。右はマウス精巣で緑に染色されているのが陽性細胞である。いずれにも、パキテン期の精母細胞にDIF-3遺伝子産物の局在が見られる。

減数分裂期特異的ライブラリーを用いた、cDNA マイクロアレイの作製について

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 相同組み換えに関与する遺伝子が濃縮されている。我々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クエンスを行った。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（図 22)。現在 ES 細胞にダイオキシンを暴露し、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ダイオキシンによる遺伝子の発現変動を検討した。本アレイでは、DIF-2/hWAPL 遺伝子や、DIF-3 遺伝子の変動は、確認されたが、他の新規遺伝子の判定は難しかった。

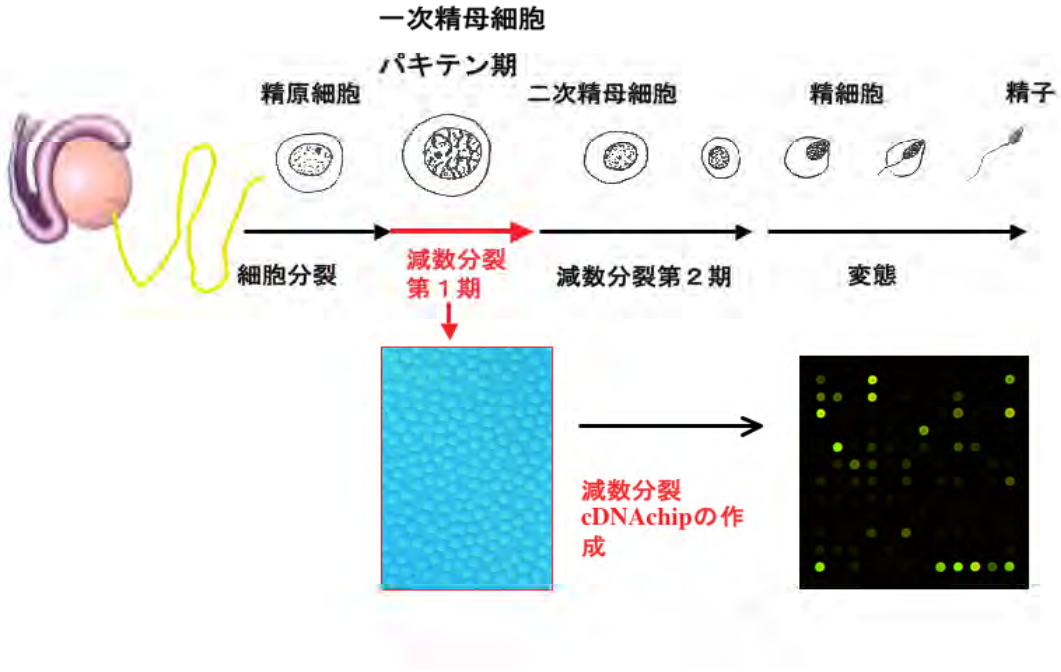


図22 減数分裂特異的cDNAchipの作製

(2)研究成果の今後期待される効果

DIF-2に関しては、図23に示すように、非常に多彩な生物活性を持つ分子であることが示された。

図23 DIF-2/hWAPLの多彩な機能

ダイオキシンはDIF-2/hWAPLの発現を制御することにより、体細胞分裂への影響を与え、その結果、癌遺伝子の機能としてのDIF-2/hWAPL遺伝子が染色体不

安定性を引き起こし、細胞の癌化に関与する。
また、我々の実験結果を考慮すると、DIF-2は生理的には、精子形成における減数分裂第一期のDNA組み替えに重要な役割をはたしていると推定される。現時点ではDIF-2/hWAPL遺伝子の制御異常による精巣の減数分裂への影響を示すデータは、ノックアウトマウスが胎生致死であったため我々はまだ持っていないが、ダイオキシンがDIF-2/hWAPL遺伝子の発現制御に影響を与えることを通じて減数分裂及び相同組み替えに影響を与える可能性はDIF-2/hWAPLの機能を考慮すると充分に予測されうる。

また染色体テリトリーに関しては、新たな研究の分野である。その生理的意義もまだ不明な点が多いが、ダイオキシンの研究がその突破口になる可能性がある。

DIF-3遺伝子に関しては、まだその生理的意義は明らかにされていない。我々はようやく、DIF-3遺伝子ノックアウトマウスの作製に成功している。このマウスの解析が、今後ダイオキシンの影響とDIF-3の関与に関し、有意義な結果をもたらしてくれるものと考えている。

我々の生体内では、自然発生的にDNA組み換え異常が、ある一定の割合で起こることが指摘されている。それらの異常細胞は、通常アポトーシスなどの機構により排除される。今回我々の実験に用いたTCDD或いは3MCの濃度は実際の環境中に存在する濃度をはるかに超えたものではあるが、環境中のダイオキシン類によるDIF-2のわずかな制御異常が、それらの自然発生的なDNA組み換えの頻度をその排除機構の能力を超えたレベルにまで引き上げる可能性もありうる。今後はこれらの可能性も考え研究を行っていきたい。

３．３　内分泌かく乱物質が相同組み換えを通じて癌化にあたえる影響の検討（黒田、石川グループ）

(1)研究内容及び成果

ダイオキシンは、少量でも発癌性や催奇形性を持つことが知られている。催奇形性に関しては、胚にはAhレセプターやエストロゲンレセプターが存在することから、ダイオキシンの内分泌かく乱作用によるものと推定される。しかしながら、ダイオキシンと発癌の関係はいまだ未解決の問題である。

一方、相同組み換えの異常は、直接癌化に関与することが知られている。このことから、まず我々は、相同組み換えに関与する分子が、ダイオキシンによって影響があるかどうか検討した。

その結果、Mad2は、mitotic checkpoint proteinとしてAPC complexに結合しG2/M期の制御に重要な役割を果たしている（図24）。我々は、TCDDによってMad2遺伝子産物の発現が抑制されることを見いだした（図25）。

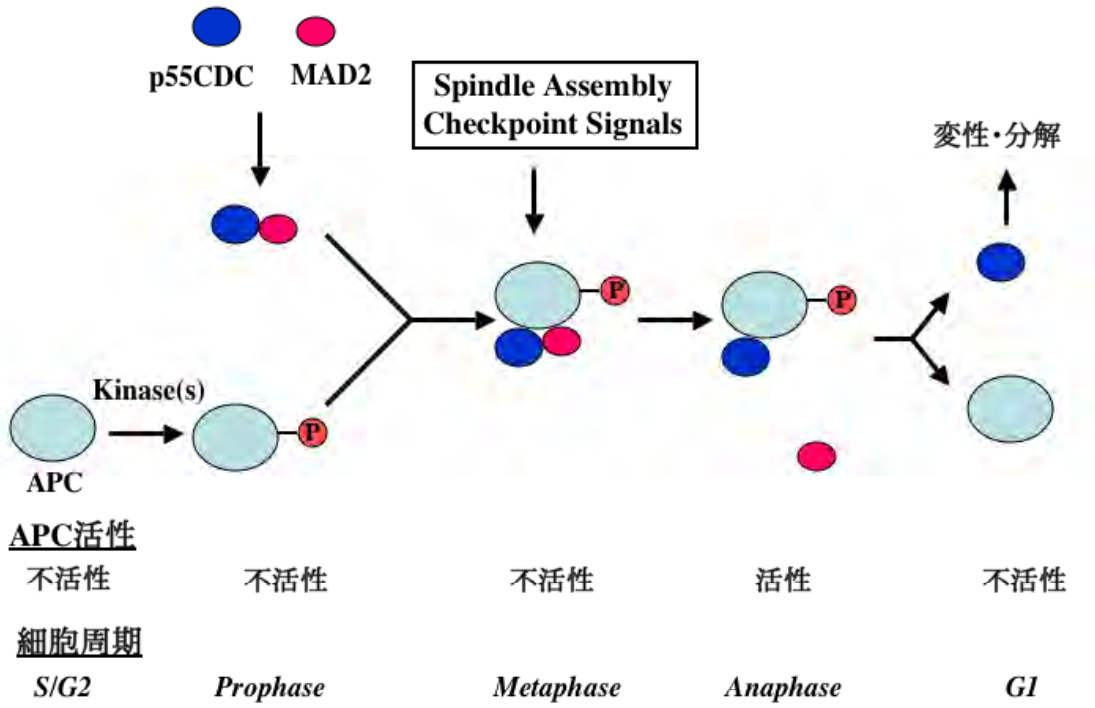


図24 Mad2の細胞分裂G2/M期の役割

図25 TCDDによるMad2蛋白の減少

一方、ダイオキシンの細胞毒性はbHLH/PAS転写受容体である Arylhydrocarbon receptor (AhR)によって仲介されることが証明されているが、このTCDDによるMad2の発現抑制は、AhRを持たない細胞でも観察される（図26）。この事実から、TCDDによるMad2の制御は新規のTCDD情報伝達系が働いていることが推定される。

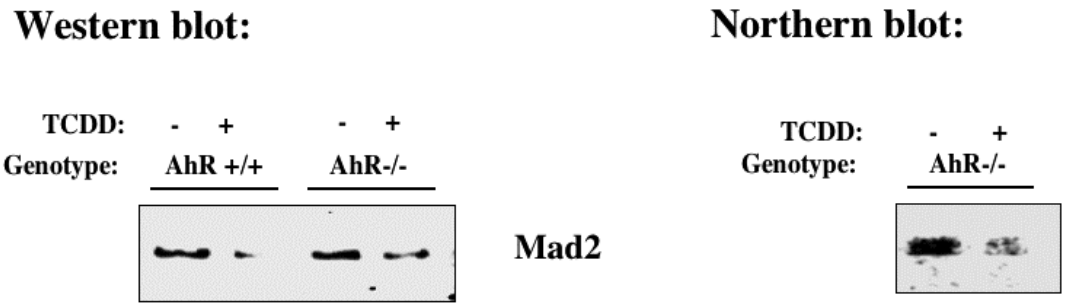
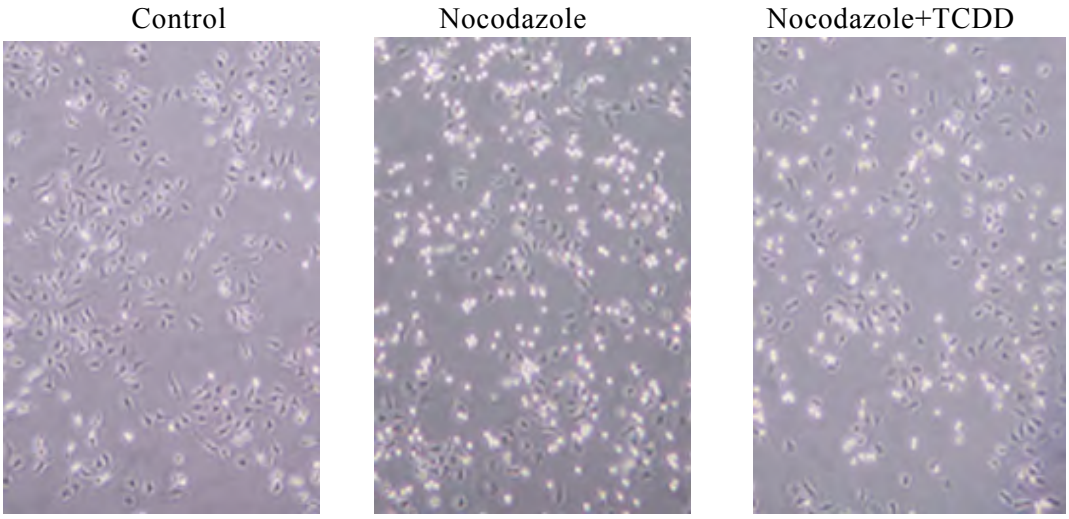


図26 AhRを持たないMEF細胞におけるTCDDによるMad2の抑制 TCDDは、転写レベルでAhRを持たないMEF細胞においてもMad2を抑制する。

またTCDDの発がんの分子機構は明らかではないが、染色体不安定性を示すがん細胞にMAD2遺伝子産物の発現が低下している症例の存在が示されている。この事からTCDDがMad2の減少をもたらし、染色体不安定性を誘導することにより、細胞の発がんに関与している可能性が示唆された。

さらに、この可能性を示すために、TCDDがG2/M期checkpointを不活性化する

かどうか検討した。具体的には、nocodazoleを細胞に処理した際のTCDDの影響を検討した。その結果、TCDDはnocodazoleによるG2/M期checkpointの抑制を減少させることが明らかになった（図27）。



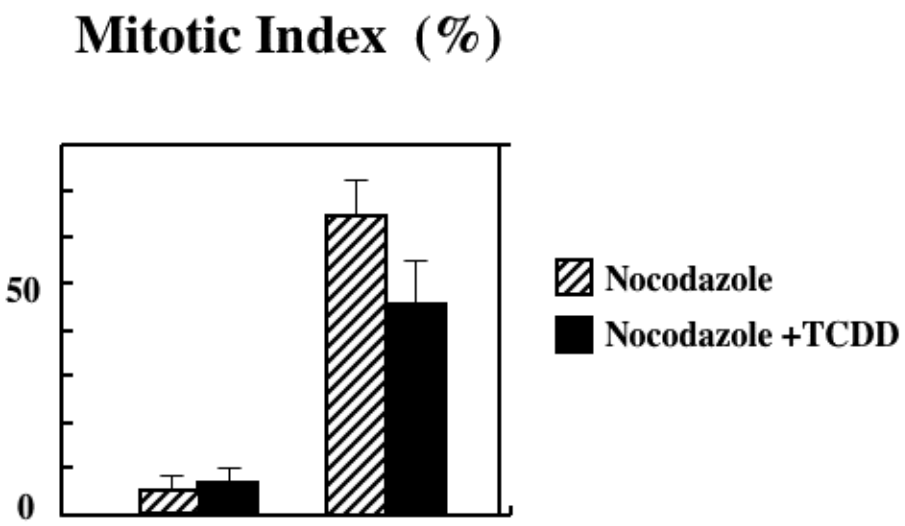


図27 TCDDによるG2/M checkpointの不活性化

上段は細胞像を下段にはmitotic indexを示す。

一方、最近の報告では、減数分裂第二期において、染色体の分配に重要な役割を果たすことが示されている。特に、我々は、精巣において、TCDDによって誘発される染色体異常のタイプが自然発生型の染色体異常と違いが見られないことから、TCDDで誘発される染色体異常は、TCDDによって直接誘発される遺伝損傷によるものではなく、自然発生する遺伝損傷の修復阻害に由来する

可能性を考えている。この事実から、TCDDによるMad2の発現低下が原因となり、染色体分配のcheckpoint機構を不活化することにより、染色体構造異常をもたらしている可能性が考えられた。

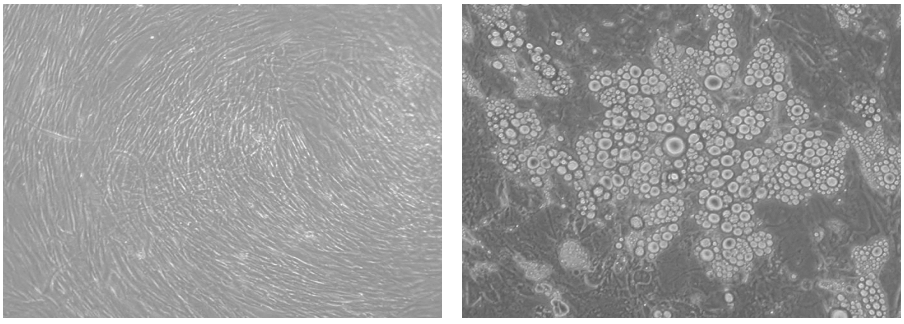
３．４　ダイオキシンと染色体テリトリー（黒田グループ）

(1)研究内容及び成果

現在では、細胞内の染色体はおのおのが特定の領域に存在するという染色体テリトリーの概念が提示されているが、我々は*DIF-2/hWAPL*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、ダイオキシ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。しかし、その現象を詳細に解析するためには、ダイオキシ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ってくる。

一方、ダイオキシンのうち、TCDD、3-MCなどは、強力な脂肪分化抑制作用が知られている。そこで、我々は、まず脂肪分化における染色体テリトリーの変化を検討した。具体的な方法としては、ヒト脂肪前駆細胞初代培養細胞を使い、PPARg ligandにより成熟脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞の分化前及び分化後において、ヒト12番及び16番染色体ペインティングプローブを用いた3D-FISH法により、両染色体テリトリーの核内配置を解析した。

まず、脂肪細胞の分化前と分化後の形態像を示す。



脂肪分化誘導前　　脂肪分化誘導後

図28 ヒト脂肪前駆細胞の形態学的変化

また、染色体テリトリーの測定前に、脂肪前駆初代培養細胞の染色体に構造異常がないかどうか検討した。

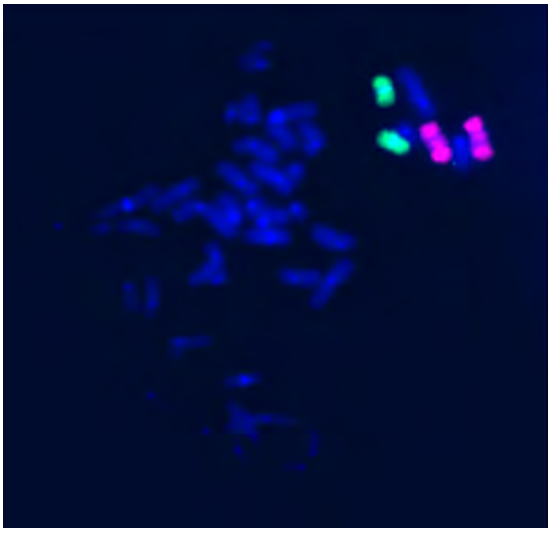
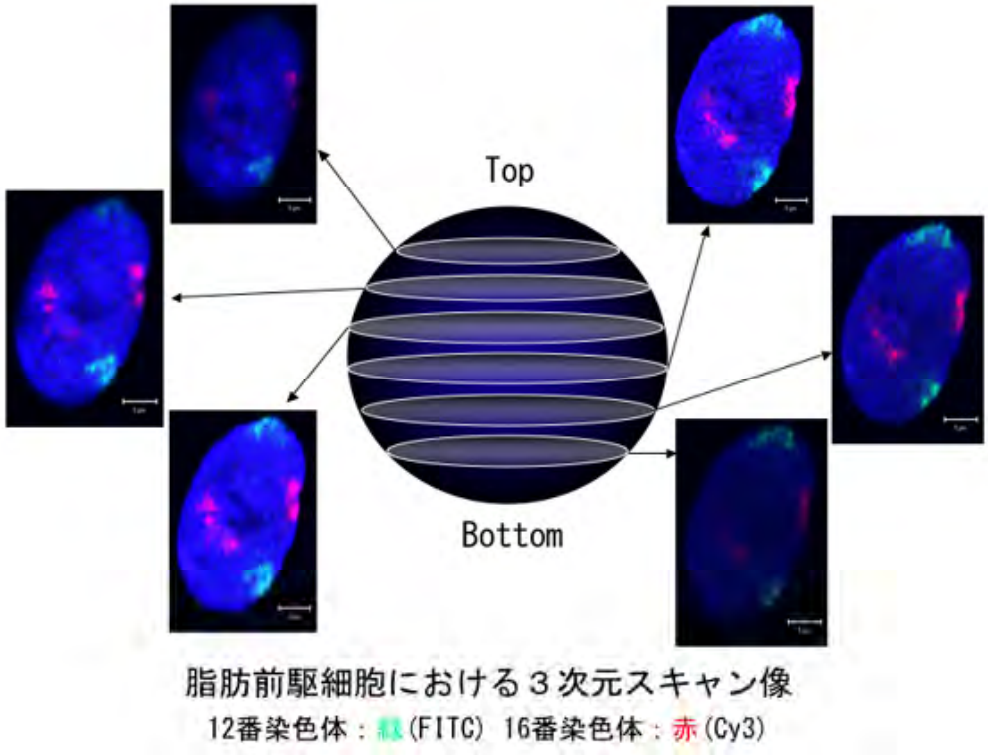


図29脂肪前駆初代培養細胞のmetaphase FISH像脂肪前駆初代培養細胞には、12番および16番染色体の異常は見られず、正常核型を示していた。12番染色体：緑(FITC) 16番染色体：赤(Cy3)

その後、3D-FISHを行った。下図に示すように一つの細胞において共焦点レーザー顕微鏡を用い画像を取得後、コンピューターによって画像を統合し3次元構築を行った（図30、31）。



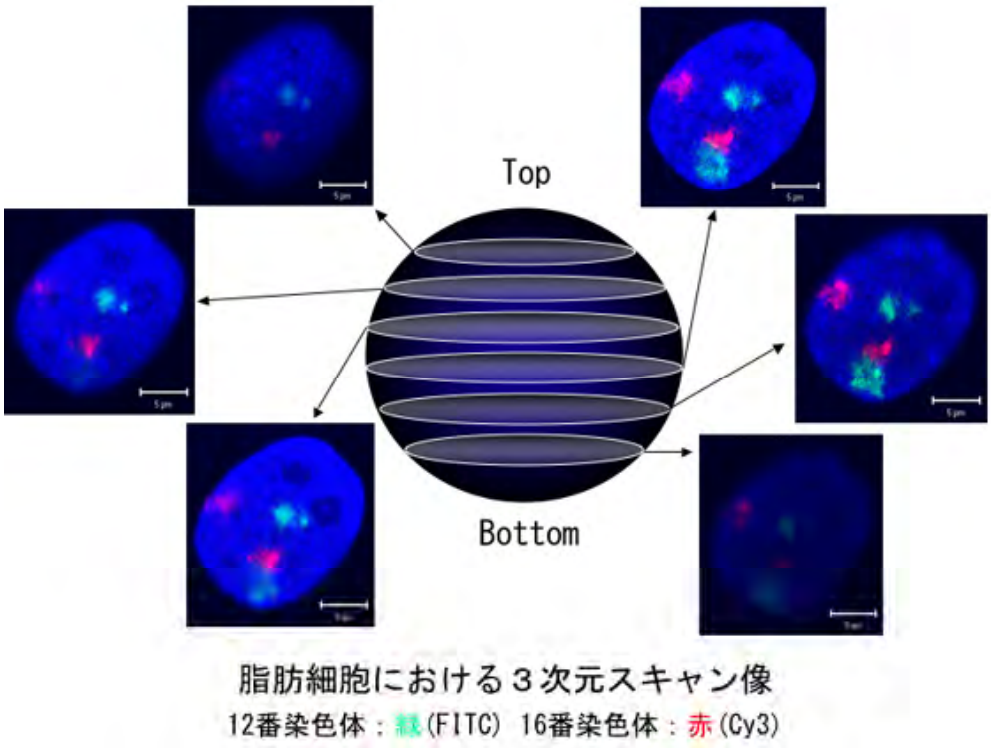


図30 脂肪細胞分化前後における12番染色体と16番染色体

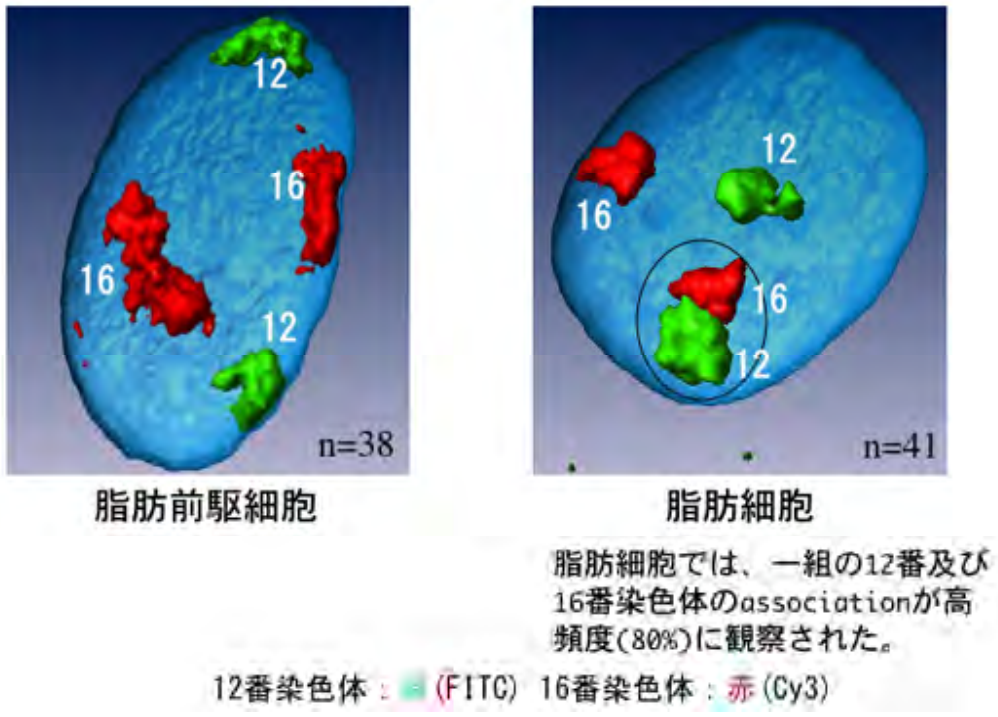


図31 3D-FISH後の３次元画像　脂肪細胞において１２番染色体と16番染色体の近接が観察される。

興味深いことに図31に示すように、脂肪分化後に、12番染色体と16番染色体の近接が観察された。

このよう結果から、次にこの二つの染色体テリトリーが客観的に近接した否かを検討した。とくに、検討に際しては、細胞の不規則な形を標準化することにより染色体テリトリーの座標軸をきめた（図32）。

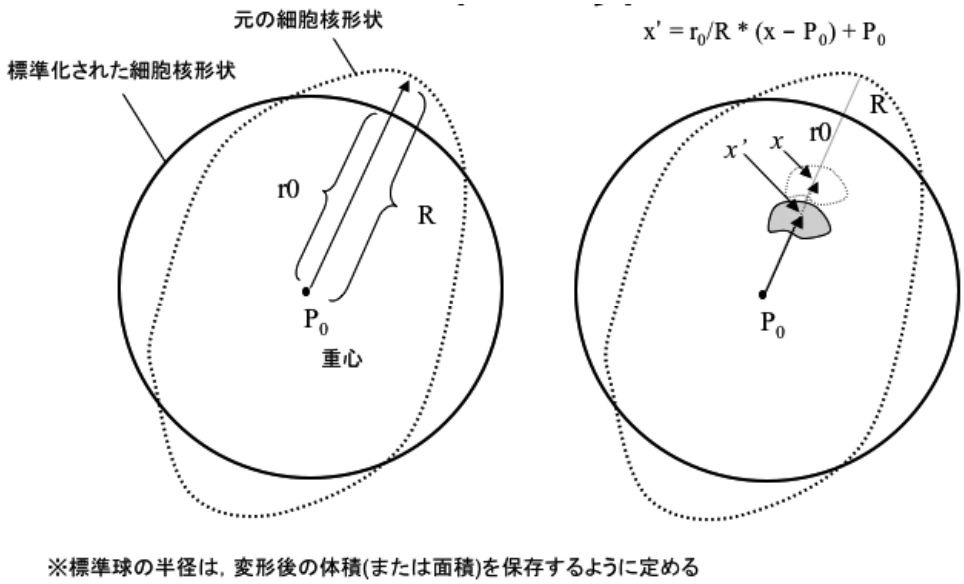
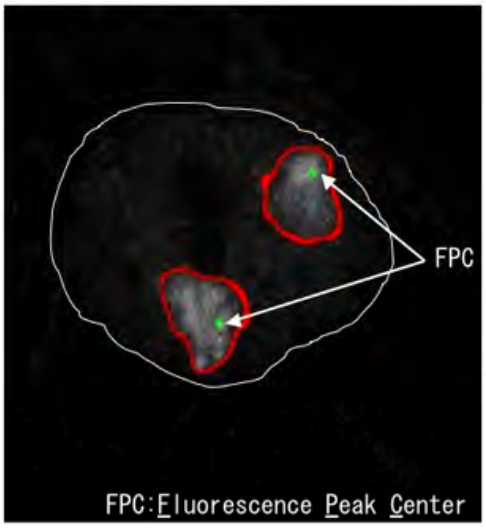


図32核形状の標準化と標準核内における染色体テリトリー配置の算出

また、次に染色体テリトリーを同定する際の染色体テリトリーの代表点をどのように決めるかは、重要な問題であるが、今回の検討に際しては、3D-FISHにおける染色の中で、最も輝度が高い点をそれぞれの染色体の代表点として定義した（図33）。



染色体テリトリーの距離を計測するに当たり、基準となる輝度のピーク点(FPC: Fluorescence Peak Center)を示した。

図33 染色体テリトリーの代表点の定義

また、これらの染色体テリトリーの代表点を自動的に画像抽出する方法としてCExpectation-Maximization (EM)アルゴリズムベースのセグメンテーションアルゴリズムを用いた。それは以下の点に集約される。

a.輝度の分布を成分数3または4の混合正規分布でフィット

b.最も輝度が高い成分へ属する事後確率が90%以上のピクセルを抽出

c.最も体積の大きい２つ(CT抽出の場合)または１つ(細胞核抽出の場合)のクラスタを抽出

d.統計解析時のメモリ節約のため，画像サイズを縮小した

(512X512 → 256X256)

これらの手法を用い二つの染色体の距離を算出すると、大変興味深いことに、脂肪分化の前後で、12番染色体と16番染色体の距離が4 micro mから3 micro mに近づくことが明らかになった（図34）。

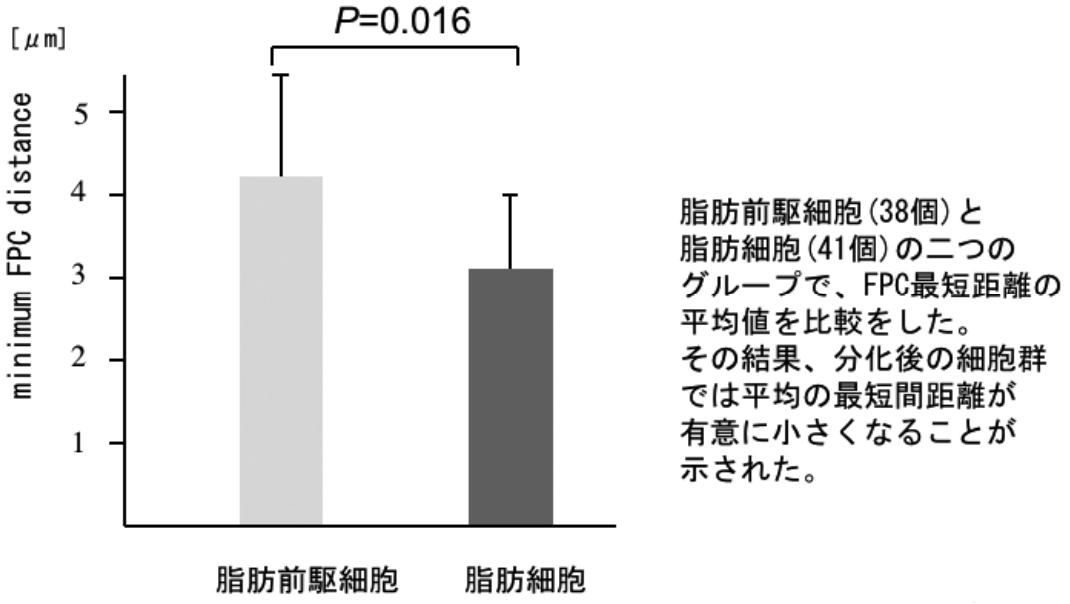


図34 12番と16番染色体テリトリー間の最短距離

一方、12番染色体と16番染色体が相対的に細胞核の中心に移動したことにより、二つの染色体が近づいた可能性もあるため、二つの染色体テリトリーが、脂肪分化の前後で細胞核の中心に移動したか否かを次に検討した。

その結果図35に示すように、統計学的に有意な染色体テリトリーの核内部への移動は認められなかった。

この事から、12番染色体と16番染色体が独立した近づくことが明らかになった。

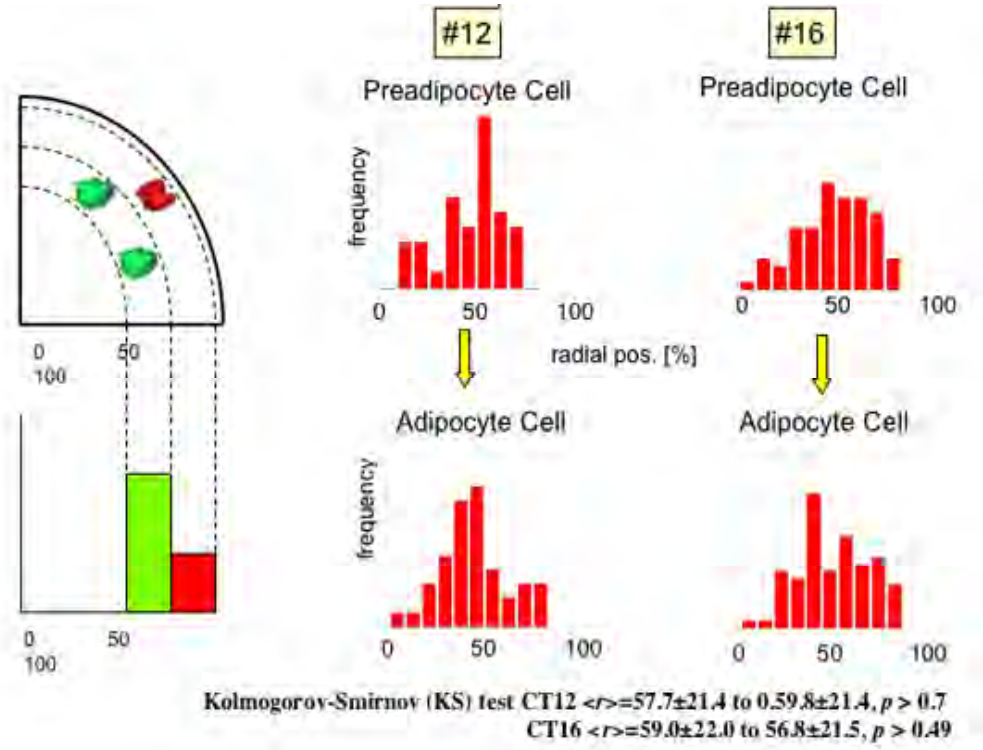


図35 脂肪分化前後での動径分布の変化

これらの研究により、染色体テリトリーの測定手法を完成することができた。そこで、我々は、次にダイオキシン、3-MCによる染色体テリトリーの変化を検討した。具体的には、正常核型を示すヒト初代前脂肪細胞に、TCDD及び3-MCを100nM添加し１週間培養した。その後、12番染色体および１６番染色体の相対的核内配置を3D-FISH法によって画像を取得しExpectation-Maximization (EM)アルゴリズムを用いた画像解析によって、染色体テリトリーの変動を解析した.

その結果、非常に興味深いことに、TCDDを投与した群は統計学的に有意に染色体テリトリーの距離が拡大した（図36）。

TCDDが脂肪分化を抑制し、また脂肪分化によって12番染色体および１６番染色体染色体テリトリーが近づくことを考えると、TCDDが染色体テリトリーを変動させることにより脂肪分化に影響を与える可能性が示された。

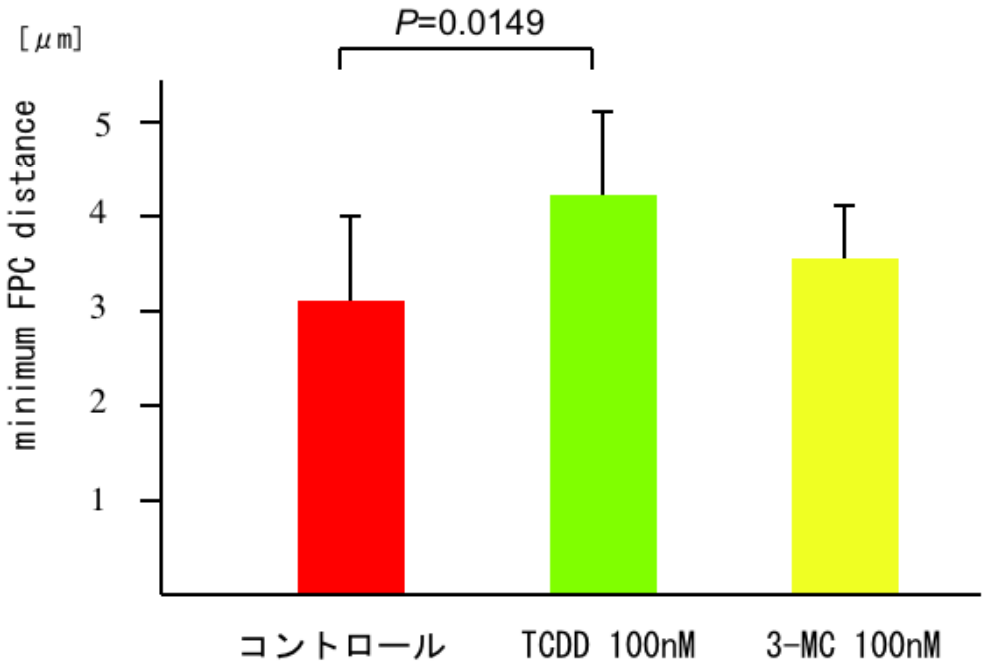


図36 TCDD及び3-MCによる染色体テリトリーの影響

(2)研究成果の今後期待される効果

染色体テリトリーの研究は比較的新しい分野である。現在のところ、遺伝子の発現と染色体テリトリーの相関が注目されているが、我々の研究から、細胞の分化という生理学的なメカニズムに染色体テリトリーが重要な役割を果たしていることが示唆された。

環境ホルモンの人体への影響、特に減数分裂への影響や次世代への作用は、その研究がまだ端緒についたばかりで未解明な部分が多い。しかしながら、我々の研究をはじめとしたこの分野の研究により、染色体テリトリーの問題や核内の高次構造、また、組み換え機構やそれらに対するダイオキシンの影響が徐々に解明される可能性が出てきた。今後は、新たなダイオキシンの作用点として、重要な問題がでてくることが考えられる。

３．５　ダイオキシンと子宮内膜症（黒田グループ、高山グループ）

(1)研究内容及び成果

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(図37)。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事で知られ、さらに、最近では好酸球にも直接作用することが明らかになってきた。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ダイオキシンの汚染との関連が示唆された。

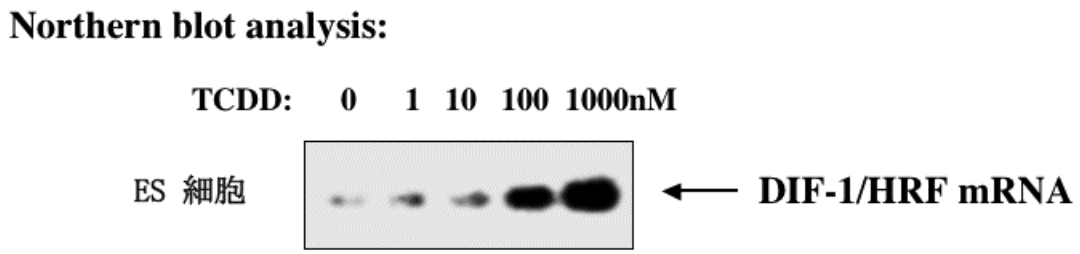


図37 TCDDによるDIF-1 /ヒスタミン遊離因子(HRF)の誘導

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確認されている。我々は、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（図38）。

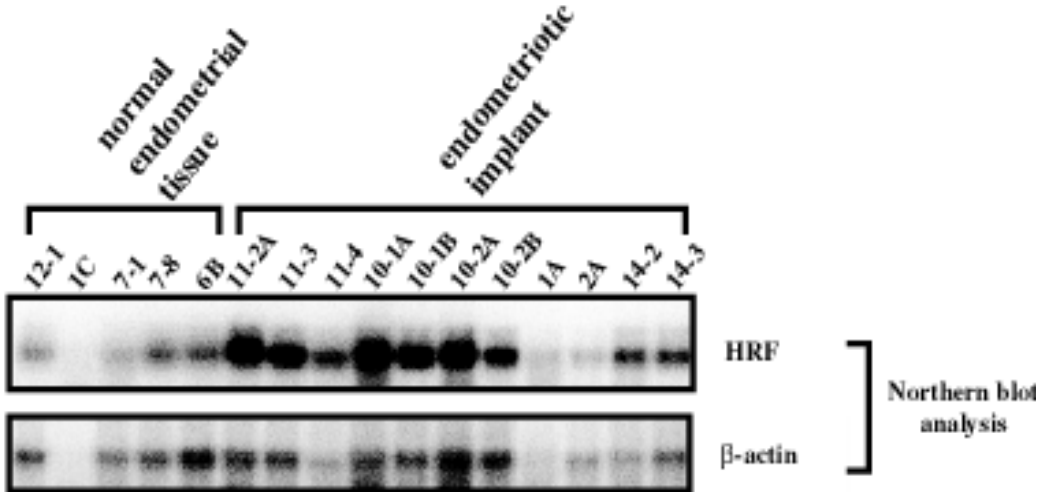


図38　子宮内膜症におけるDIF-1/HRFの発現

さらに、我々は、パラフィン切片で染色可能なDIF-1/HRF特異抗体の作製に成功した。この抗体を用いて検討、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DIF-1/HRFの高発現が確認された。また、子宮内膜症の検体を用いて免疫組織化学的にDIF-1/HRF遺伝子産物の局在を検討すると、異所性子宮内膜にDIF-1/HRF遺伝子産物の高発現が確認された。また、正常子宮組織では、DIF-1/HRFの発現は腺上皮にのみ見られたが、内膜症の異所性子宮組織においては、DIF-1/HRFは腺上皮と間質ともにDIF-1/HRFの発現が確認された（図39）。

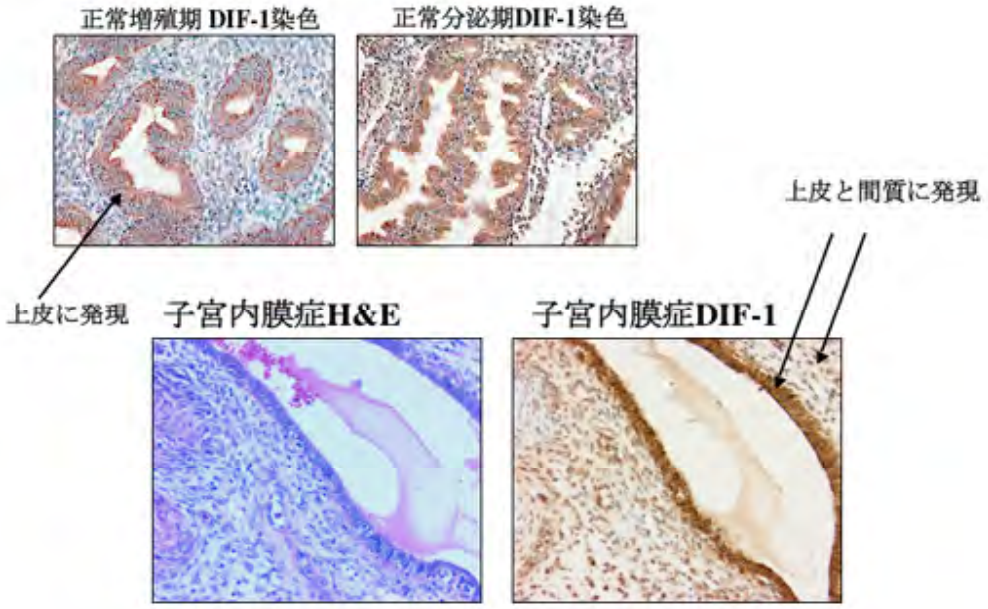


図39 DIF-1/HRFの正常子宮内膜および異所性子宮内膜（子宮内膜症）における局在　茶色にみえるものが、DIF-1/HRF陽性所見である。

一方、近年子宮内膜症患者において、腹膜内での免疫環境の異常が指摘されている。そこでは、特に単球系の異常が指摘されているが、DIF-1/HRF自身が単球の成熟に関与している報告もされており、DIF-1/HRFの子宮内膜症における高発現は、子宮内膜症と免疫異常を考えるうえでも非常に興味深い

　また、現在、子宮内膜症の診断をする分子マーカーはCA125以外実用化されているものは、少なかった。そこで、我々は、このDIF-1/HRFが子宮内膜症の分子マーカーになるか否か検討した。

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（図40）。この結果から、将来的には、ダ

イオキシ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。

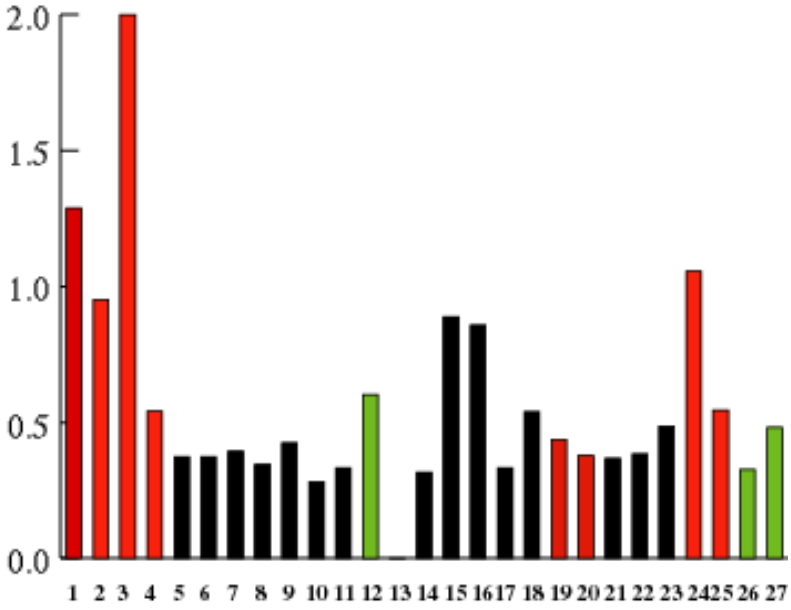


図40 月経血におけるDIF-1/HRFの発現　月経血よりcDNAを合成しreal-time PCR法にて定量的にDIF-1/HRFの発現を検討した。

(2)研究成果の今後期待される効果

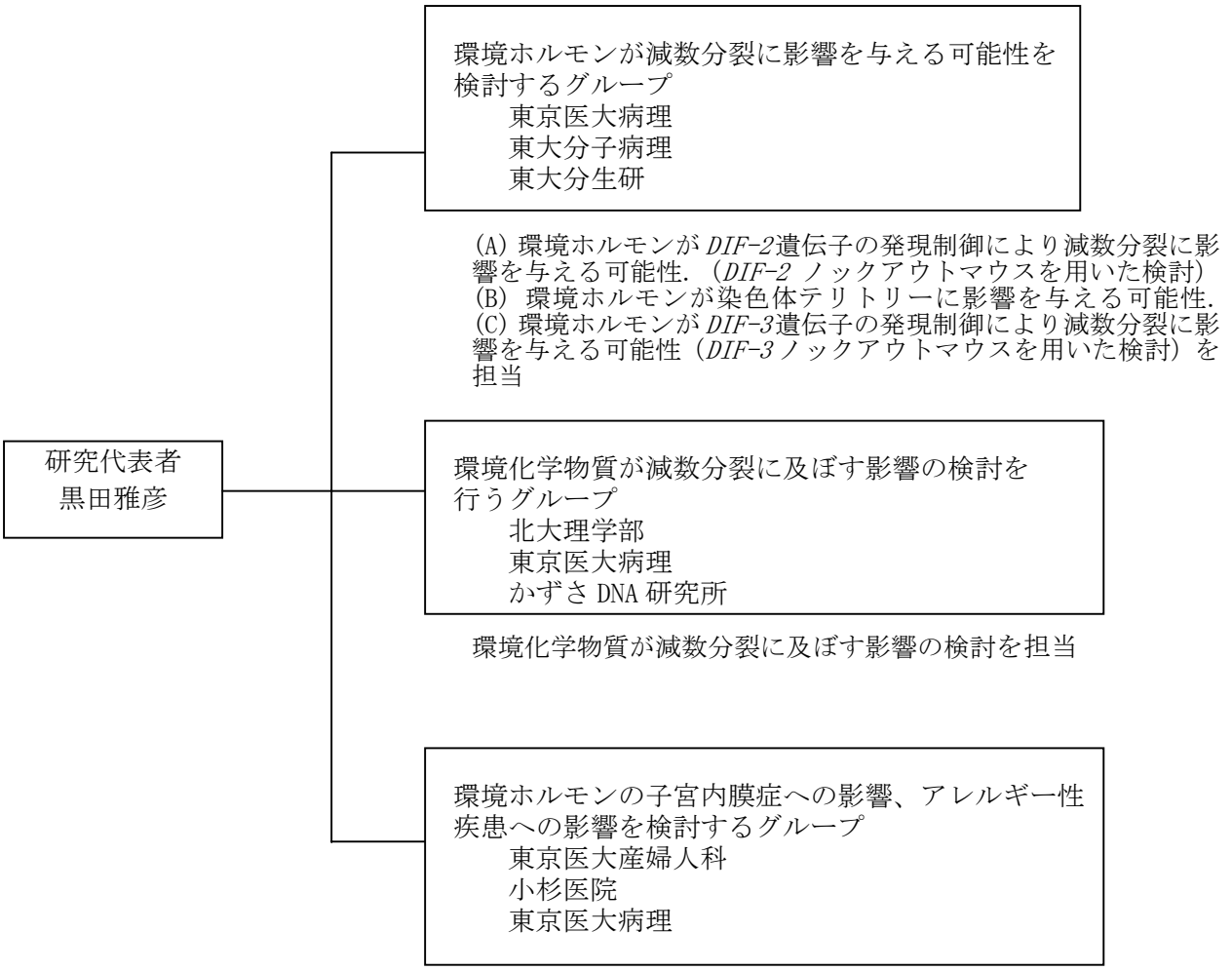
子宮内膜症とダイオキシンの関与は以前より動物実験により指摘されている。我々の結果は、ダイオキシンよって誘導される、DIF-1/HRFが子宮内膜症に高発現することから、子宮内膜症とダイオキシンの関連を間接的に示唆したものである。ダイオキシンの汚染は、ある程度CYP1A1によって可能であるが、我々の少数の解析では、子宮内膜症においては、HRFの発現とダイオキシン汚染の指標となるCYP1A1の発現は相関しなかった。しかし、二つの関与に関しては、今後の詳細な解析がさらに必要と思われる。

一方、子宮内膜症は、近年増加している疾患であり、その早期の確定診断は、未だに精度の高い診断マーカーは存在しない。そのために、現在我々は、DIF-1/HRFを測定するシステムを開発している。本システムが完成すれば、子宮内膜症に罹患している人々にとって、大きな意義を持つものと思われる。また、DIF-1/HRFは、気管支喘息やアトピー性皮膚炎の炎症にも関与している可能性が指摘されている。これらの疾患の治療の標的にもDIF-1/HRFがなる可能性がある。

ダイオキシンの研究が、このような医療の研究に直接むすびつくのは、非常に興味深いことであるが、このプロジェクトが目に見える形で、社会貢献ができる可能性があり、今後もこのDIF-1/HRFの研究も行っていきたい。

４．研究実施体制

(1)体制


研究代表者
黒田雅彦
環境ホルモンが減数分裂に影響を与える可能性を検討するグループ
東京医大病理
東大分子病理
東大分生研
(A) 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.（*DIF-2* ノックアウトマウスを用いた検討）
(B) 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.
(C) 環境ホルモンが *DIF-3*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（*DIF-3* ノックアウトマウスを用いた検討）を担当
環境化学物質が減数分裂に及ぼす影響の検討を行うグループ
北大理学部
東京医大病理
かずさ DNA 研究所
環境化学物質が減数分裂に及ぼす影響の検討を担当
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
東京医大産婦人科
小杉医院
東京医大病理
環境ホルモンの子宮内膜症及びアレルギー性疾患への影響の検討を担当

(2)メンバー表

①ダイオキシンが減数分裂に影響を与える可能性を検討するグループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
黒田　雅彦	東京医大病理	講師	A,B,C	H11.11 月～H16.10 月
及川　恒輔	東京医大病理	CREST 研究員	A,B,C	H12.2 月～H16.10 月
辻本　瑠美	科学技術振興機構	技術員	A,B	H14.4 月～H16.3 月
渡辺　亮子	科学技術振興機構	研究補助員	A	H11.12 月～H16.10 月
海老根　和美	科学技術振興機構	研究補助員		H12.5 月～H14. 1 月
石川　隆俊	大学評価機構	教授		H11.11 月～H14. 9 月
中鶴　陽子	東大分子病理	助手		H11.11 月～H14.3 月
秋山　徹	東大分生研	教授		H11.11 月～H15.3 月
石田尾　武史	東大分生研	大学院生		H11.11 月～H15.3 月
吉田　恵一	東京医大病理	技術員	A,B,C	H15.4 月～H16.10 月
福島　なおみ	科学技術振興機構	研究補助員		H11.12 月～H14. 3 月
篠崎　由妃	科学技術振興機構	研究補助員		H14.4 月～H16.10 月

(A) ダイオキシンが *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（*DIF-2* ノックアウトマウスを用いた検討)、(B) ダイオキシンが染色体テリトリーに影響を与える可能性、(C) ダイオキシンが *DIF-3* 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（*DIF-3* ノックアウトマウスを用いた検討)

②環境化学物質が減数分裂に及ぼす影響の検討を行うグループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
松田　洋一	北大理学部	教授	環境化学物質が減数分裂に及ぼす影響の検討	H11.11 月～H16.10 月
押田　龍夫	北大理学部	研究機関研究員		H11.11 月～H14.3 月
磯部　拓	北大理学部	研究機関研究員		H13.4 月～H14.3 月
山田　和彦	科学技術振興機構	研究補助員		H14.5 月～H15.3 月
安東　潤子	科学技術振興機構	研究補助員		H15.10 月～H16.3 月
東　典子	科学技術振興機構	研究補助員		H16.4 月～H16.9 月
黒田　雅彦	東京医大病理	講師		H11.11 月～H16.10 月
大林　徹也	東京医大病理	CREST 研究員		H12.4 月～H16.2 月
長瀬　隆弘	かずさ DNA 研究所	室長代理		H13.4 月～H16.3
亀田　明美	科学技術振興機構	技術員		H12.4 月～H16.10 月

③ダイオキシ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

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
高山　雅臣	東京医大産婦人科	名誉教授	ダイオキシンの子宮内膜症及びアレルギー性疾患への影響の検討	H13.4 月～H16.10 月
井坂　恵一	東京医大産婦人科	教授		H13.4 月～H16.10 月
小杉　好紀	小杉医院			H13.4 月～H16.3 月
黒田　雅彦	東京医大病理	講師		H11.11 月～H16.10 月

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表

1. Kuroda, M, Oikawa, K, Ohbayashi, T, Yoshida, K, Yamada, K, Mimura, J, Matsuda, Y, Fujii-Kuriyama, Y and Mukai, K: A dioxin sensitive gene, mammalian *WAPL*, is implicated in spermatogenesis. FEBS Lett, in press, 2004.
2. Oshiro, H, Ebihara, Y, Serizawa, H, Shimizu, T, Teshima, S, Kuroda, M and Kudo, M: Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis Associated with Immunohematological Abnormalities. Am J Med, in press, 2004.
3. Kuroda, M, Kiyono, T, Oikawa, K, Yoshida, K and Mukai, K: The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, *hWAPL*, exhibits potential as a therapeutic target. Br J Cancer, in press, 2004.
4. Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A and Mukai K: Effects of 3-Methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene *hWAPL*. Cancer Lett, in press, 2004.
5. Kuroda M, Tanabe H, Yoshida K, Oikawa K, Saito A, Kiyuna T, Mizusawa H and Mukai K: Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. J Cell Sci, 117: 5897-5903, 2004.
6. Oikawa K, Ohbayashi T, Kiyono T, Nishi H, Isaka K, Umezawa A, Kuroda M and Mukai K: Expression of a Novel Human Gene, *Human Wings Apart-Like (hWAPL)*, Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. Cancer Res, 64: 3545-3549, 2004.
7. 黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、石田　剛、向井　清：　キメラ遺伝子と形態形成ー染色体テリトリーの関与ー。病理と臨床、Vol. 22 (2), 175-180, 2004.
8. 黒田雅彦、及川恒輔、向井　清：　診断への応用と展望－骨軟部腫瘍－。病理と臨床、22 (臨時増刊号): 100-106, 2004
9. Shinmura K, Ishida T, Goto T, Kuroda M, Hattori H, Nagai S, Imamura T, Mukai K, Imakiire A: Expression of cyclooxygenase-2 in chondroblastoma: immunohistochemical analysis with special emphasis on local inflammatory reaction. Virchows Arch, 444: 28-35, 2004.
10. 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.
11. Iwaya K, Ogawa H, Kuroda M, Izumi M, Ishida T, Mukai K: Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. Clin Exp Metastasis, 20: 525-529, 2003.
12. Nakagawa M, Akasaka Y, Kanai T, Yamashita T, Kuroda M, Takayama H, Miyazawa N: Extragastrointestinal Stromal Tumor of the Greater Omentum: Case Report and Review of the Literature. Hepatogastroenterology, 50: 691-695, 2003.

13. Oikawa K, Kosugi Y, Ohbayashi T, Kameta A, Isaka K, Takayama M, Kuroda M and Mukai K: Increased expression of IgE-dependent histamine-releasing factor in endometriotic implants. J Pathol, 199: 318-323, 2003.
14. Kuroda M, Oikawa K, Ohbayashi T and Mukai K: Effects of TCDD on Mitosis and Meiosis. Environmental Sciences, 10, Supplement: 069-076, 2003.
15. 黒田雅彦、石田 剛、及川恒輔、向井 清： キメラ遺伝子と組織構築。病理と臨床、Vol. 21(11), 1245-1250, 2003.
16. 黒田雅彦、及川恒輔、大林徹也、吉田恵一、向井 清： 再生医療と生殖医療 －環境ホルモン、内分泌撹乱物質の影響－。病理と臨床、Vol. 21(7), 738-742, 2003.
17. Izumi M, Mochizuki M, Kuroda M, Iwaya K and Mukai K: Angiomyoid proliferative lesion: an unusual stroma-rich variant of Castleman's disease of hyaline-vascular type. Virchows Arch, 441: 400-405, 2002.
18. Ogawa H, Iwaya K, Izumi M, Kuroda M, Serizawa H, Koyanagi Y and Mukai K: Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. Hum Pathol, 33 (8): 806-811, 2002.
19. Domoto H, Hosaka T, Oikawa K, Ohbayashi T, Ishida T, Izumi M, Iwaya K, Toguchida J, Kuroda M and Mukai K: TLS-CHOP target gene DOL54 expression in liposarcomas and malignant fibrous histiocytomas. Pathol Int, 52: 497-500, 2002.
20. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M and Mukai K: Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. Virchows Arch, 440: 589-593, 2002.
21. 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, 290: 984-987, 2002.
22. Kuroda M , Sok J, and Ron D: The TLS-CHOP oncogene and human liposarcoma. In Translocations in Solid Tumors (ed. Cooper C) (Landes Bioscience, Georgetown, TX, 1998).
23. 高橋芳久、黒田雅彦、泉 美貴、小杉雅英、塚本理一郎、小林正之、向井 清：下肢を中心に顕著な多発性を示した類上皮血管腫の一例。病理と臨床、Vol. 20, 1187-1191, 2002.
24. 岩屋啓一、望月 衛、泉 美貴、黒田雅彦、矢島澄鎮、向井 清： 肝嚢胞腺腫より発生したと思われる紡錘形細胞肉腫の１例。診断病理 Vol. 18, 134-136, 2001.
25. 黒田雅彦、石田 剛、向井 清： 脂肪肉腫の最新知見。小児外科、Vol.34, 475-481, 2002.
26. 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, 508: 341-344, 2001.

27. 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 Res, 61: 5707-5709, 2001.
28. Miyazawa, K, Iwaya, K, Kuroda, M, Harada, M, Serizawa, H, Koyanagi, Y, Sato, Y, Mizokami, Y, Matsuoka, T and Mukai, K: Nuclear accumulation of beta-catenin in intestinal-type gastric carcinoma: Correlation with early tumor invasion. Virchows Arch, 437, 508-513, 2000.
29. Kani, Y, Iwaya, K, Kuroda, M, Harada, M, Hirata, F and Mukai, K: A case of cytophagic histiocytic panniculitis associated with exertional rhabdomyolysis. Pathol Int, 50, 858-862, 2000.
30. Kuroda, M, Sok, J, Webb, L, Baechtold, H, Urano, F, Yin, Y, Chung, P, de Rooji, DG, Akhmedov AT, Ashley, T, and Ron, D: Male Sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS-/- mice. EMBO J, 19: 453-462, 2000.
31. 及川恒輔、大林徹也、岩田亮子、黒田雅彦： 内分泌かく乱物質の配偶子成熟への影響。治療学、Vol.34, 481-483, 2000.
32. 大林徹也、及川恒輔、岩田亮子、亀田明美、黒田雅彦： 内分泌攪乱物質が減数分裂、相同組み換えに与える影響。産婦人科の実際、Vol.49, 1129-1132, 2000.
33. 黒田雅彦、及川恒輔、岩田亮子、石田 剛、向井 清： 軟部腫瘍の遺伝子診断。病理と臨床、Vol.18, 653-657, 2000.
34. Baechtold H, Kuroda, M, Sok, J, Ron, D, Lopez, BS, and Akhmedov, AT: Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. J Biol Chem, 274(48): 34337-34342, 1999.
35. Kuroda, M, Wang, X, Sok, J, Yin, Y, Chung, P, Giannotti, J, Jacobs, KA, Fitz, LJ, Murtha-Riel, P, Turner, KJ and Ron, D: Induction of a novel secreted protein by the myxoid liposarcoma oncogene. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 5025-5030, 1999.
36. Kashima, T, Kawaguchi, J, Takeshita, S, Kuroda, M, Takanashi, M, Horiuchi, H, Imamura, T, Ishikawa, Y, Ishida, T, Mori, S, Machinami, R and Kudo, A: Anomalous cadherin expression in osteosarcoma: Possible relationships to metastasis and morphogenesis. Am J Pathol, 155: 1549-1555, 1999.
37. Sok, J, Wang, XZ, Batchvarova, N, Kuroda, M, Harding, H, and Ron, D: CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. Mol Cell Biol, 19: 495-504, 1999.
38. 石田 剛、黒田雅彦： 脂肪肉腫と TLS/FUS-CHOP 融合遺伝子。整形・災害外科、Vol. 42, 1294-1295, 1999.

(2) 口頭発表

①招待、口頭講演

1. 黒田雅彦、吉田恵一、田辺秀之、及川恒輔、向井　清：　ｷﾒﾗ遺伝子形成における染色体ﾃﾘﾄﾘｰの関与。第 63 回日本癌学会総会、ｼﾝﾎﾟｼﾞｳﾑ、福岡市、2004 年 9 月。
2. 及川恒輔、黒田雅彦、吉田恵一、向井　清：　新規遺伝子 *hWAPL* の発現と子宮頸癌との関連。第 63 回日本癌学会総会、ﾜｰｸｼｮｯﾌﾟ、福岡市、2004 年 9 月。
3. 黒田雅彦：　DIF-2/h WAPL と環境化学物質－染色体ﾃﾘﾄﾘｰと減数分裂－。科学技術振興機構・CREST、「内分泌かく乱物質」第 5 回領域ｼﾝﾎﾟｼﾞｳﾑ、東京、2004 年 9 月。
4. 黒田雅彦：　siRNA を用いたガン治療への応用。第 9 回東京医科大学医科学ﾌｫｰﾗﾑ、2004 年 7 月。
5. 黒田雅彦、及川恒輔、石田　剛、松林　純、吉田恵一、服部宏行、今給黎篤弘、向井　清：　病理切片を用いたｷﾒﾗ遺伝子産物の検出と軟部腫瘍診断への応用。第 45 回日本神経病理学会総会、ﾜｰｸｼｮｯﾌﾟ 3、群馬県前橋市、2004 年 5 月。
6. 及川恒輔、黒田雅彦、石田　剛、吉田恵一、向井　清：　ｷﾒﾗ遺伝子を標的にした RNA 干渉法による治療法の開発。第 93 回日本病理学会総会、ﾜｰｸｼｮｯﾌﾟ、札幌市、2004 年 6 月。
7. 堂本英治、及川恒輔、向井保雄、清水　亨、芹沢博美、望月　眞、黒田雅彦、岩屋啓一、向井　清：大腸癌における Arp2/3 複合体の発現と肝転移との関連性。第 93 回日本病理学会総会、札幌市、2004 年 6 月。
8. Takeuchi M, Takeuchi A, Usui Y, Kuroda M, Yoshida K, Usui M: Expression of mRNA associated with Fas-mediated apoptosis signaling is downregulated in Behcet's patients with active uveitis. 2004 ARVO Annual Meeting, Florida, USA, April 27, 2004.
9. 竹内　大、竹内　礼、臼井嘉彦、黒田雅彦、吉田恵一、臼井正彦：　活動性ベーチェット病患者における Fas 依存性ｼｸﾞﾅﾙ関連 mRNA の発現抑制。第 108 回日本眼科学会総会、東京、2004 年 4 月。
10. 黒田雅彦、及川恒輔：　siRNA 発現ﾚﾄﾛｳｲﾙｽﾍﾞｸﾀｰの開発と応用。第 26 回日本分子生物学会年会　ﾊﾞｲｵﾃｸﾉﾛｼﾞｰｾﾐﾅｰ、神戸市、2003 年 12 月
11. 黒田雅彦、及川恒輔、泉　美貴、岩屋啓一、向井　清：　RNA interference を用いた癌の遺伝子治療法の開発。第 152 回東京医科大学医学会総会ｼﾝﾎﾟｼﾞｳﾑ、2003 年 11 月。
12. 加塚祐洋、及川恒輔、大林徹也、西　洋孝、黒田雅彦、井坂恵一：　新規がん遺伝子 DIF-2 遺伝子の単離と解析－子宮頚癌腫瘍発生における関与－。第 25 回四教室合同研究会、埼玉医大、2003 年 8 月。
13. 新井恵吏、松林　純、黒田雅彦、泉　美貴、石田　剛、向井　清、並木一典：多核巨細胞を伴い多彩な組織像を呈した腎癌の一例。第　　回東京医科大学医学会総会、2003 年 6 月。

14. 黒田雅彦、石田　剛、吉田恵一、佐藤　均、及川恒輔、大林徹也、梅澤明弘、向井　清：　キメラ遺伝子と形態形成。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(ﾜｰｸｼｮｯﾌﾟ)
15. 岩屋啓一、向井保雄、上野万里、塩見達志、黒田雅彦、石田　剛、清水　亨、芹澤博美、向井　清：乳癌組織における MCP-1 と Arp2/3 complex の関連。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般口演)
16. 元井　亨、西村訓弘、久光亜弥子、元井紀子、五嶋孝博、園部　宏、久力　権、清水英男、林　一彦、黒田雅彦、丹下　剛、向井　清、深山正久、石田　剛：cDNA アレイを用いた肉腫キメラ遺伝子検出法の構築と EWS 関連腫瘍群への応用。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般口演)
17. 大林徹也、及川恒輔、清野　透、山田和彦、梅原千鶴子、松田洋一、梅澤明弘、向井　清、黒田雅彦：　DIF-2 遺伝子が誘導する染色体不安定性の解析。第２５回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月。(口頭発表)
18. 黒田雅彦：　Dioxin inducible factor-2 (DIF-2)が誘導する染色体不安定性の解析。平成 13 年度　哺乳動物遺伝学研究会、北海道千歳市、2002 年 6 月。
19. 大林徹也、黒田雅彦、及川恒輔、向井　清：　ヒト癌における DIF-2 遺伝子の発現。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
20. 黒田雅彦、石田　剛、泉　美貴、岩屋啓一、向井　清：　軟部肉腫における腫瘍特異的キメラ遺伝子を用いた遺伝子診断。第 148 回東京医科大学医学会総会、2001 年 11 月。
21. 黒田雅彦：　環境ホルモンが減数分裂に影響を与える可能性。第 7 回環境ホルモン学会講演会、東京、2001 年 6 月。(特別講演)
22. 黒田雅彦、岩屋啓一、泉　美貴、向井　清：　ダイオキシンによって誘導される遺伝子の単離。第 147 回東京医科大学医学会総会、2001 年 6 月。
23. 大林徹也、黒田雅彦、及川恒輔、亀田明美、岩田亮子、海老根和美、向井　清：ダイオキシンによって応答する遺伝子の単離。第 90 回日本病理学会総会、東京、2001 年 4 月
24. 向井保雄、岩屋啓一、小川　均、黒田雅彦、向井　清：　Chemokine が誘導する偽足の形成に関与する Arp3 とアクチンの共発現。第 90 回日本病理学会総会、東京、2001 年 4 月。
25. 安楽宣克、永井秀三、高瀬勝己、松岡宏昭、服部宏行、今給黎篤弘、向井清、黒田雅彦：　上腕骨骨頭部に発生し Brodie 骨膿瘍と鑑別を要した好酸球性肉芽腫症の一例。第 607 回関東整形災害外科学会　月例会、東京、2001 年 3 月
26. 黒田雅彦：　粘液型脂肪肉腫の腫瘍発生。第４６回日本病理学会秋期特別総会、Ａ演説、仙台、2000 年 12 月。(特別講演)
27. Kuroda, M: Importance of Training in Molecular Pathology at Academic Institutions.　23th International Congress of the International Academy of Pathology.　Nagoya, Oct. 2000.

28. 高橋芳久、黒田雅彦、小杉雅英、小林正之、岩屋啓一、向井　清：　下肢に多発性に生じた類上皮血管腫の一例。第 119 回東京病理集談会(日本病理学会関東支部交見会)、東京、2000 年 12 月。
29. 黒田雅彦、浦野文彦、向井　清、David Ron：　転写活性化因子 TLS は相同組み換えに関与する。第 89 回日本病理学会総会、シンポジウム、大阪、2000 年 4 月
30. 黒田雅彦、浦野文彦、向井　清、David Ron：　脂肪肉腫特異的転写因子 TLS-CHOP の標的遺伝子の単離及びその機能解析。第 88 回日本病理学会総会、シンポジウム、東京、1999 年 4 月

②ポスター発表

1. 吉田恵一、黒田雅彦、及川恒輔、向井　清：　脂肪分化における発癌性環境化学物質の影響。第 63 回日本癌学会総会、福岡市、2004 年 9 月。
2. 岩屋啓一、及川恒輔、堂本英治、泉　美貴、福嶋敬宜、長尾俊孝、松林　純、芹沢博美、向井保雄、望月　眞、黒田雅彦、向井　清：　乳癌の浸潤形態と Arp2/3 複合体の発現。第 63 回日本癌学会総会、福岡市、2004 年 9 月。
3. 松林　純、黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、木下雅雄、向井　清：　ﾏｲｸﾛｱﾚｲによる乳癌の遺伝子発現解析。第 63 回日本癌学会総会、福岡市、2004 年 9 月。
4. 吉田恵一、田辺秀之、喜友名朝春、齋藤　彰、水沢　博、黒田雅彦、向井　清：粘液型脂肪肉腫発生における染色体テリトリーの関与。第 93 回日本病理学会総会、札幌市、2004 年 6 月。
5. 松林　純、黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、向井　清：　ﾏｲｸﾛｱﾚｲによる乳癌の遺伝子発現解析。第 93 回日本病理学会総会、札幌市、2004 年 6 月。
6. 及川恒輔、大林徹也、吉田恵一、辻本瑠美、梅澤明弘、向井　清、黒田雅彦：新規癌遺伝子 DIF-2 が癌治療の標的分子となる可能性。第 26 回日本分子生物学会年会、神戸市、2003 年 12 月。(ﾎﾟｽﾀｰ)
7. 吉田恵一、田辺秀之、黒田雅彦、石田　剛、齋藤　彰、水沢　博、向井　清：粘液型脂肪肉腫腫瘍発生における染色体テリトリーの関与。第 26 回日本分子生物学会年会、神戸市、2003 年 12 月。
8. 及川恒輔、黒田雅彦、大林徹也、向井　清：　新規癌遺伝子 DIF-2 の siRNA 発現レトロウイルスベクターを用いた抑制。第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、2003 年 9 月。(ﾎﾟｽﾀｰ)
9. 大林徹也、黒田雅彦、及川恒輔、向井　清：　新規癌遺伝子 DIF-2 による腫瘍発生メカニズムの解析。第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、2003 年 9 月。(ﾎﾟｽﾀｰ)
10. 加塚祐洋、及川恒輔、黒田雅彦、西　洋孝、大林徹也、井坂恵一、向井　清：ヒト子宮頚癌細胞における HPV16 型の E6、E7 遺伝子を標的とした siRNA 発現レトロウイルス感染による抗腫瘍効果の検討。第 62 回日本癌学会総会、名古

屋市、2003 年 9 月。(ﾎﾟｽﾀｰ)

11. 吉田恵一、田辺秀之、黒田雅彦、石田　剛、齋藤　彰、喜友名朝春、佐藤　均、水沢　博、向井　清：粘液型脂肪肉腫腫瘍発生における染色体テリトリーの関与。第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、2003 年 9 月。(ﾎﾟｽﾀｰ)
12. 及川恒輔、黒田雅彦、大林徹也、梅澤明弘、向井　清：　新規がん遺伝子 DIF-2 のダイオキシン類による発現制御。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般示説)
13. 石田　剛、黒田雅彦、今村哲夫、向井　清：　結節性硬化症を合併した先天性脊索腫の 1 例。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般示説)
14. 松林　純、石田　剛、向井裕幸、黒田雅彦、泉　美貴、向井　清：　上腕部に発生した Bednar's tumor の 1 例。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般示説)
15. 上野万里、石田　剛、黒田雅彦、向井　清：　下大静脈に鋳型状の腫瘍塞栓を形成し心臓に進展した大腿骨軟骨形成型骨肉腫の一剖検例。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般示説)
16. 新井恵吏、松林　純、黒田雅彦、泉　美貴、石田　剛、向井　清：　多核巨細胞を伴い多彩な組織像を呈した腎癌の一例。第 92 回日本病理学会総会、福岡市、2003 年 4 月。(一般示説)
17. 及川恒輔、大林徹也、辻本瑠美、梅澤明弘、向井　清、黒田雅彦：　新規癌遺伝子 DIF-2 のダイオキシン類による発現制御。第２５回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月。(ポスター発表)
18. 及川恒輔、黒田雅彦、大林徹也、向井　清：　新規癌遺伝子 DIF-2 の発現に対する環境ホルモンの影響。第６１回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月
19. 大林徹也、黒田雅彦、及川恒輔、清野　透、松田洋一、向井　清：　DIF-2 が誘導する染色体不安定性の解析。第６１回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月
20. 新村光太郎、服部宏行、永井秀三、今給黎篤弘、石田　剛、黒田雅彦、向井　清、五嶋孝博、元井　亨：軟骨芽細胞腫における COX2 の発現：炎症反応との関連について。第６１回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月
21. 松林　純、石田　剛、黒田雅彦、向井　清：　上腕部の悪性グロームス腫瘍と考えられる 1 例。第 35 回日本整形外科学会、骨・軟部腫瘍学術総会、宇部市、2002 年 7 月。
22. 服部宏行、石田　剛、黒田雅彦、新村光太郎、松岡宏昭、永井秀三、向井　清、今給黎篤弘：　腕神経叢より発生した低分化型滑膜肉腫の一例。第 35 回日本整形外科学会、骨・軟部腫瘍学術総会、宇部市、2002 年 7 月。
23. 服部宏行、石田　剛、黒田雅彦、新村光太郎、永井秀三、向井　清、今給黎篤弘：　軟部肉腫における checkpoint 制御。第 35 回日本整形外科学会、骨・

軟部腫瘍学術総会、宇部市、2002 年 7 月。

24. 新村光太郎、石田　剛、黒田雅彦、服部宏行、松岡宏昭、永井秀三、向井　清、今給黎篤弘：　Periosteal chondroma および enchondroma 大腿骨同時発生の 1 例。第 35 回日本整形外科学会、骨・軟部腫瘍学術総会、宇部市、2002 年 7 月。
25. 新村光太郎、石田　剛、黒田雅彦、服部宏行、永井秀三、向井　清、今給黎篤弘：　軟骨芽細胞腫における COX2 の発現：炎症反応との関連について。第 35 回日本整形外科学会、骨・軟部腫瘍学術総会、宇部市、2002 年 7 月。
26. 黒田雅彦、喜友名朝春、上條憲一、斉藤　彰、石田　剛、岩屋啓一、泉　美貴、向井　清：　コンピューターを用いた画像診断システムの開発。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
27. 及川恒輔、黒田雅彦、大林徹也、向井　清：　大腸菌 two-hybridsystem を用いた DIF-3 結合因子の同定。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
28. 岩屋啓一、小川　均、松林　純、黒田雅彦、泉　美貴、石田　剛、長尾俊孝、清水　亨、芹沢博美、向井　清：　胃高分化腺癌の組織を構成する CD10 陽性の間質細胞。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
29. 永井　毅、泉　美貴、上野万里、松林　純、黒田雅彦、石田　剛、向井　清：食道原発乳頭腺癌の一剖検例。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
30. 石田　剛、小野彰夫、今給黎篤弘、松林　純、黒田雅彦、泉　美貴、岩屋啓一、向井　清：　濃化異骨症 pycnodysostosis の 1 例。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
31. 松林　純、石田　剛、黒田雅彦、泉　美貴、岩屋啓一、元井　亨、丹下　剛、向井　清：　アミロイド沈着を伴う ancient hematoma：5 例の臨床病理学的検討。第 91 回日本病理学会総会、横浜、2002 年 3 月。
32. 及川恒輔、大林徹也、黒田雅彦、向井　清：　ダイオキシンに誘導されるヒスタミン放出因子と子宮内膜症の関連。第２４回分子生物学会年会、横浜、2001 年 12 月
33. 大林徹也、及川恒輔、黒田雅彦、向井　清：　ダイオキシンによって発現誘導される新規核内因子 DIF-3 の解析。第２４回分子生物学会年会、横浜、2001 年 12 月
34. 及川恒輔、大林徹也、小杉好紀、井坂恵一、高山雅臣、黒田雅彦、向井　清：子宮内膜症におけるダイオキシン標的遺伝子の発現。環境ホルモン学会第４回研究発表会、筑波、2001 年 12 月
35. 大林徹也、及川恒輔、黒田雅彦、向井清：　ダイオキシンによって誘導される新規核内因子 DIF-3 の単離。環境ホルモン学会第４回研究発表会、筑波、2001 年 12 月
36. Ohbayshi T, Oikawa K, Isobe T, Matsuda Y, Mukai K and Kuroda M: Dioxin induces

a nove nuclear factor, DIF-3, implicated in spermatogenesis and over express in human cancer. Cancer and Chromosomal Organization, AACR, October 2001, Palm Desert, CA, USA

37. 及川恒輔、黒田雅彦、大林徹也、岩屋啓一、向井　清：　ダイオキシンによる MAD2 遺伝子の発現抑制。第６０回日本癌学会総会　横浜 2001 年９月
38. 大林徹也、黒田雅彦、及川恒輔、嶋本隆司、大屋敷一馬、向井　清：　t(16;21)-白血病の原因遺伝子 TLS/FUS-ERG の標的遺伝子の単離。第６０回日本癌学会総会、横浜、2001 年９月
39. 山本　豊、伊藤貴章、山本真也、大野芳正、黒田雅彦、向井　清、橘政昭、斉藤賢治、府川愛、有國　尚：　腎細胞癌における同一症例の原発・転移部位別遺伝子発現と蛋白質発現の解析。第６０回日本癌学会総会、横浜、2001 年９月
40. 小川　均、岩屋啓一、泉　美貴、黒田雅彦、向井　清：　大腸腺腫の癌化に伴う間質細胞の CD10 の発現。第６０回日本癌学会総会、横浜、2001 年９月
41. 岩屋啓一、小川　均、向井保雄、泉美貴、黒田雅彦、向井　清：　浸潤癌の間質細胞に発現する CD10。第６０回日本癌学会総会　横浜、2001 年９月
42. 黒田雅彦、及川恒輔、大林徹也、亀田明美、岩田亮子、海老根和美、泉　美貴、岩屋啓一、向井　清：血液系特異的に Cre 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製。第 90 回日本病理学会総会、東京、2001 年 4 月
43. 及川恒輔、黒田雅彦、大林徹也、亀田明美、岩田亮子、海老根和美、向井　清：ダイオキシンによる G2/M 期チェクポイントの制御。第 90 回日本病理学会総会、東京、2001 年 4 月
44. 高橋芳久、黒田雅彦、小杉雅英、塚本理一郎、小林正之、泉　美貴、岩屋啓一、向井　清：　下肢に多発性に生じた類上皮血管腫の一例。第 90 回日本病理学会総会、東京、2001 年 4 月
45. 泉　美貴、黒田雅彦、岩屋啓一、増田　茂、向井　清：　皮膚の正常および上皮系腫瘍における、サイトケラチン発現の免疫組織化学的検討。第 90 回日本病理学会総会　東京、2001 年 4 月
46. Izumi M, Kuroda M, Iwaya K and Mukai K: Clonal evidence of the dysplastic nevus through PGK and HUMARA ASSAY. Annual Meeting United States and Canadian Academy of Pathology, March 2001.
47. 及川恒輔、大林徹也、亀田明美、岩田亮子、海老根和美、向井　清、黒田雅彦：　ダイオキシンによる MAD2 遺伝子産物の制御。第２３回日本分子生物学会年回　神戸、2000 年 12 月。
48. 小川　均、岩屋啓一、原田美貴、黒田雅彦、向井　清：　マウス骨肉腫細胞株の肺転移に関連する Arp2/3 複合体の発現。第５９回日本癌学会総会、横浜、2000 年 10 月
49. 石田　剛、元井　亮、向井裕幸、佐藤　均、横倉　聡、五嶋孝博、黒田雅彦：

t(9,17)転座を認めた骨外性粘液型軟骨肉腫の１例。第 33 回日本整形外科学会、骨・軟部腫瘍学術総会、熊本、2000 年 7 月

50. 服部宏行、駒形正志、永井秀三、西山　誠、笠原尊生、今給黎篤弘、黒田雅彦、向井　清：　短期間に再発を繰り返した Aggressive Osteoblastoma の 1 例。第 33 回日本整形外科学会、骨軟部腫瘍学術総会、熊本、2000 年 7 月
51. 宮沢賢史、岩屋啓一、黒田雅彦、原田美貴、向井　清、芹沢博美、溝上裕士、松岡　健、佐藤雄一：　胃癌における・カテニンの核内蓄積の臨床病理学的意義：早期浸潤との相関。第 89 回日本病理学会総会、大阪、2000 年 4 月
52. 堂本英治、黒田雅彦、保坂泰介、戸口田淳也、向井　清：　悪性線維性組織球腫における DOL54 の発現。第 89 回日本病理学会総会、大阪、2000 年 4 月
53. 原田美貴、黒田雅彦、岩屋啓一、向井　清、望月　衛：　Castleman 病、hyaline-vascular type において濾胞間に増殖する″Myofibroblast-like cells″の免疫組織学的検討。第 89 回日本病理学会総会、大阪、2000 年 4 月
54. 黒田雅彦、浦野文彦、向井　清、David Ron：　コンデイショナルジーンターゲテイング法を用いた粘液型脂肪肉腫マウスモデルの作成。第 58 回日本癌学会総会、広島、1999 年 9 月
55. 堂本英治、黒田雅彦、戸口田淳也、保坂泰介、浦野文彦、向井　清:　Adipogenic tumor における TLS-CHOP 標的遺伝子 DOL54 の発現。第 58 回日本癌学会総会、広島、1999 年 9 月

③プレス発表

(3) 特許出願

①国内

1. 黒田雅彦、及川恒輔、大林徹也、小杉好紀
特許出願番号：　国際出願 PCT/JP2004/000159（2004 年 1 月 13 日出願）
名称：子宮内膜症関連疾患の診断方法(JST)

②海外

１．上記日本出願の外国出願手続き中

(4) 新聞報道等

①新聞報道

1. 黒田雅彦：　子宮頸がんの発病に関する遺伝子発見。日本経済新聞 2004 年 5 月 24 日

(5) その他

1. 黒田雅彦：　ダイオキシンによって誘導される遺伝子の単離。
東京医科大学医学会奨励賞、2001 年 11 月。

7．結び

ダイオキシンが減数分裂に関与する可能性を示すためには、本当に大規模な研究が必要であると痛感致しました。

本プロジェクトでは、その可能性を完全には、動物実験で指摘することはできませんでした。私の私見では、Hunt R. A. et al. (Current Biology 13:546-553, 2003)らの結果には、少々懐疑的で、我々のような染色体の構造異常の図が掲載されていません。ただし、ダイオキシンが、ヒト遺伝子、染色体の修復異常を阻害することは確かであると考えます。この点は、北大の松田先生と追加の実験をし、是非、論文としてまとめたいと考えております。

一方、我々の研究過程でとくに、DIF-2/hWAPLという非常に重要分子を同定できました。この分子は、子宮頸癌のガン遺伝子であり、一方でその研究から、非常に興味深い染色体テリトリーの研究に発展することができました。すでに、DIF-2/hWAPLを標的とした子宮頸癌の治療薬の開発が製薬会社との提携ではじまりました。また、染色体テリトリーの生理的な意義として、我々がはじめて、細胞分化と染色体テリトリーの関与を示すことができました。また、DIF-1/HRFは、驚いたことに子宮内膜症に関与する分子であることがわかりました。子宮内膜症は非常に社会問題になっている疾患であり、すでにある会社でDIF-1/HRFを分子マーカーの開発がはじまっていると聞いております。

全体からみると、当初予測していた、DNA二重鎖切断の検出系などが、うまくいかず苦労しましたが、後半はそれを取り返すだけの成果が上がりはじめたのではないかと感じております。

特に私は教室をもっているわけではなく、他のグループのように大勢に研究員がいるわけではありませんが、実質６人で、JSTの支援を得て、本当に社会貢献できる成果がでたと思っております。

最後になりますが、私のような研究者を、研究代表者に選んでいただき、またサポートして頂いた鈴木先生をはじめアドバイザーの先生方、また、JSTの事務所、本部の方に深い感謝と御礼を申し上げます。