

驗系がないことにある。

本研究では、ヒト生殖腺形成に関与する遺伝子を明らかにすること、および、それらの発現に影響する化学物質の作用を *in vitro* で検出できるような系を確立することを目的としている。このため、いくつかの細胞において、既知の生殖腺形成関連遺伝子発現の有無を解析した。

② 生殖細胞の分化と維持

性決定とは異なり、生殖腺における生殖細胞の形態変化（＝精子になる過程、卵になる過程）は、全ての生物でおおよそ共通している。ヒト女性の卵は胎生期には700万個程度存在するが、胎生後期には apoptosis によってその数を減らし、出生時には数万のオーダーまで減少している。思春期を過ぎるとこの中から、性周期毎に1個ずつ排卵される。胎生期の apoptosis の機序は不明であるし、全部が死滅しないで一部が生き残る機序も、生き残ったうちの1個ずつが排卵される機序もそのほとんどの部分は不明である。いずれにせよ何らかの物質が最終的に apoptosis にいたる減数分裂を止めていると考えられる。過去に 2-プロモプロパンを扱う作業所で女性が無月経になったという報告があり、この物質が生殖細胞の維持に関わる機構に異常を生じた可能性を考えた。本年度は、このテーマに関する実験的アプローチは行わなかったが、このような病態に対応する疾患として、女性においては早期閉経、男性においては Sertoli cell only の無精子症が考えられるので、本大学の産婦人科、泌尿器科と共同（このような研究においては、各科より病院小倫理委員会へ申請し承認を得ている）で疾患の収集を行うと共に、男女とも生殖細胞の維持に関与することが示唆されている DAZ、DAZH 遺伝子の解析を行った。

③ 生殖細胞の腫瘍化

Y染色体成分をもつ Turner 症候群患者（女性）に性腺腫瘍が好発することが知られており、Y染色体上には性腺を腫

瘍化する遺伝子があるとされている。最近、我々はY染色体のDNA多型によって日本人男性を分類し、男性の系統と個体の精子数との間に関連があること、無精子症になりやすさも男性の系統によって異なることを示した。Y染色体の多様性によってこのような表現型の違いがあり、また、Y染色体上に性腺腫瘍化遺伝子があるならば、男性の系統によって腫瘍化のリスクが違うのではないかという仮説が成り立つ。精巣腫瘍にはいくつかの組織型があるが、Malignant Lymphoma等の造血系細胞に由来する腫瘍やその他の稀にみられる由来不明の腫瘍以外は、生殖細胞が腫瘍化したものである考えられている。ホルモンと関連した腫瘍もあり、その発症には環境因子が大きく関わっているものと考えられる。そこで男性の系統によって腫瘍の頻度や種類に違いがないかどうか検討した。

C. 研究結果

● 生殖腺の形成（性分化）についての研究

今までに試した性腺由来細胞のうちで我々が注目しているのは、ヒト精巣由来の embryonal cell carcinoma から樹立された NT2/D1 細胞株である。本年の研究で NT2/D1 細胞株は、SRY 遺伝子や SOX9 などヒト男性の性決定および分化過程に重要な役割を担う遺伝子群を発現している貴重な細胞株であることが分かった。

一方、我々は MIS 遺伝子が性分化過程での1つの鍵となる遺伝子であるという仮説をもっており、性分化カスケードの中で SRY 遺伝子や SOX9 遺伝子の下流にあたると考えている。そこで、MIS 遺伝子プロモータ領域をレポーター遺伝子の upstream に挿入したプラスミドを作成、NT2/D1 細胞に導入し、内分泌攪乱作用を疑わせる物質の存在下でレポーター遺伝子の活性を測定できるような系の作成を試みている。

● 生殖細胞の腫瘍化についての研究

精巣腫瘍の患者検体を本大学泌尿器科と共同で収集した。Seminoma とそれ以外の性腺由来腫瘍に分類し、発症年齢、転移の有無、予後などと共にY染色体のDNA多型について検討した。まだ、予備的なデータであるが、特定の腫瘍が特定の男性の系統に集中する傾向があるように思われる。

これが事実であれば、それぞれの系統の男性個体から適当な細胞株を樹立し、内分泌攪乱化学物質と疑われる物質に対する反応の差違を調べる方向に研究を進めたい。

D. 考察

本研究の初年度に当たり、研究の方向性をはっきりとさせておきたい。まず、我々は、「ヒト」または（実験生物においても）「ヒトと共通性をもつメカニズム」にこだわって研究を進めたい。

性のシステムは、ヒトにおける社会的性役割や動物の求愛行動まで考えると、それぞれの生物種がそれぞれの種に極めて特殊な固有のシステムを持っている。動物の卵の大きさを見ても、ダチョウの卵から、サケの卵、ヒトの卵まで、皆同じ機能を持ったものであるが、これらの形成が全く同じ機序に支配されていると考えるには無理がある。雌雄同体は動物にも植物にも見られる現象であるが、同じ雌雄同体システムを採用しているからといって、トウモロコシとカタツムリの先祖が共通であると主張する人はいないであろう。

内分泌攪乱化学物質の作用を語るためには、まず、動物（または植物）における「性」というシステムの根本的な理解が必要である。それはすなわち、生物多様性とそれを作りだしてきた「性」に対する理解であって、この点が十分に理解されないまま、さまざまな生物における内分泌攪乱作用がごちゃ混ぜに語られていることに危惧を抱いている。性のシステムは進化の偶然の上に形成されており、表向きは同様の機能を持つ（表現型コピ

ー）ように見えても、その分子的機序は全く異なることがあるという可能性を常に認識している必要がある。

残念なことに、ヒトの性分化についての研究は、この10年間ほとんど進んでいない。さまざまな研究者が、さまざまなアプローチはしてきたが、ヒトの性分化を解明するための十分な方法論がなかった。ゲノム解読が終わろうとしている今、さまざまな分野でプロテオミクスの方法論が発展しつつある。このような方法論を駆使して、ヒトにおける性分化の機構を明らかにしていきたいというのが、我々の目指す一つの方向性である。同時に、性分化機構に影響を及ぼす化学物質について検討していきたい。

一方で、ヒト多様性を基盤にした研究を行うことが、我々のもう一つの方向性である。遺伝学的に「適応度（fitness）」という概念がある。これは子孫を残す率であるが、適応度の高い個体が次世代の子を多く作り、適応度の低い個体はあまり子を残さないとすると、集団としては適応度の高い個体の表現型が進化していく。

ヒトはそういった進化の上で成立してきた種の一つであることは言を待たないし、現在も集団の変化は進行しているはずである。それどころか、ヒトは自らその居住する環境や社会環境を猛烈なスピードで変更してきたゆえ、それに適応する個体も次々と変化してきたことが考えられる。すなわち、時代や社会環境が変われば適応個体も変化していることを認識すべきである。

Y染色体の多様性と男性表現型に関しては、我々が精子形成能力の違いを示した後、世界のさまざまなグループが研究を開始している。精子形成能力が違ってくるのが適応度にどのように影響するかどうか分からないが、少なくとも精子濃度が薄いことが利点であるとは考えにくい。それなら、それを補う別の表現型があるのかも知れないという考えに簡単に行き着く。どのような男性が現在の日本社会

で適応度を高めているのか興味深い問題である。ただ、男性間の表現型の違いをY染色体の違いに求めるためには、常染色体上の遺伝子の影響が十分に少なくなくてはならない。日本人はその成り立ちから約2000年が経過し、常染色体に関して各人の持つ遺伝子はよく混ざりあっているとと思われること、環境が表現型に与える違いが諸外国に比べて比較的少ないであろうことなど、研究に有利な条件があると考えられる。

以上のように、「ヒトにおける生殖腺形成(性分化)、維持のメカニズム」と「ヒト集団における多様性」に重点を置き、次年度以降の内分泌攪乱化学物質の影響についての研究を進めていきたいと考えている。

E. 結論

内分泌攪乱化学物質のヒト生殖細胞に対する影響について①生殖腺の形成(性決定・分化)、②生殖細胞の分化・維持・死滅、③生殖細胞の腫瘍化、の3つの観点からアプローチを行っている。本年は、研究の方向性について述べるとともに、ヒト生殖腺の形成(性分化機構)、生殖細胞の腫瘍化についての予備的データについて報告した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tomomasa, H., Adachi, Y., Iwabuchi, M., Oshio, S., Umeda, T., Iino, Y., Takano, T., Nakahori, Y.: Pericentric inversion of the Y chromosome of infertile male. *Archives of Andrology*. 45: 181-185, 2000.
- ② Lee, J.W., Kotliarova, S.E., Ewis, A.A., Hida, A., Shinka, T., Kuroki, Y., Tokunaga, K., Nakahori, Y.: Y-chromosome

compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266 and DXYS241. *J Hum Genet*. 46: 80-84, 2001.

- ③ Shinka, T., Naroda, T., Tamura, T., Sasahara, K., Nakahori, Y.: A rapid and simple method for sex identification by analysis of a heteroduplex using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *J Hum Genet*. In press.
 - ④ Ewis, A.A., Kondo, K., Juwon, L., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Yokose, T., Mukai, K., Kodama, T., Shinka, T., Monden, Y., Nakahori, Y.: Occupational cancer genetics: Infrequent ras oncogenes point mutations in lung cancer samples of chromate workers. *Amer. J. Industrial Med*. In press.
- ### 2. 学会発表
- ① 中堀豊: ヒトゲノム計画の現状—ヒト多様性解明に向けて、第70回日本衛生学会ワークショップ、2000年3月28日、大阪
 - ② 足立陽一、友政宏、岩渕正之、押尾茂、梅田隆、飯野好明、高野貴子、中堀豊: 不妊を主訴としたY染色体腕間逆位の症例、第122回日本不妊学会関東地方部会、2000年6月24日、山梨
 - ③ 中堀豊: 遺伝医学の現状、221回徳島医学会学術集会、2000年8月6日、徳島
 - ④ 新家利一: ゲノム創薬、遺伝子治療、第221回徳島医学会学術集会、2000年8月6日、徳島
 - ⑤ 中堀豊: 遺伝医学が公衆衛生に果たす役割、第13回中国・四国地区保健婦教育機関協議会教育講演、2000年8月

8日、徳島

- ⑥ 中堀豊：臨床遺伝専門医到達目標について。第3回家族性腫瘍研究会、2000年8月26日、尼崎
- ⑦ 新家利一：ヘテロデュプレックス法を用いたY染色体の分子遺伝学的解析。2000年9月13日、大阪
- ⑧ 近藤妙子、西谷範子、佐藤純子、中村秀喜、中堀豊：健診データからみた喫煙対策に関する検討ー基本健康審査と一般クリニックの比較ー。第59回日本公衆衛生学会総会、2000年10月20日、群馬
- ⑨ 多田敏子、中村秀喜、新家利一、中堀豊：徳島県内の保健・福祉施設の教育体制についてーCare Mac 徳島による調査研究ー。第59回日本公衆衛生学会総会、2000年10月20日、群馬
- ⑩ 中堀豊：Y染色体から見た日本人男性の繁殖戦略。第21回関西アンドロロジーカンファランス特別講演、2000年10月21日、大阪
- ⑪ 新家利一、李周遠、黒木陽子、田村隆教、笹原賢司、中堀豊：DHPLCシステムを用いたY染色体多様性の解析。日本人類遺伝学会第45回、2000年10月27日、福岡
- ⑫ 松木孝澄、坪田悦子、飯田礼子、黒木陽子、中堀豊：Y染色体特異多型マーカーの発見。日本人類遺伝学会第45回、2000年10月27日、福岡
- ⑬ 中堀豊：遺伝相談。第72回徳島周産期症例検討会、2000年11月10日、徳島
- ⑭ 中堀豊：遺伝医学と人権。人権啓発フェスティバル、2000年12月9日、徳島

The study on the effect of the endocrine disrupting chemicals on human sex determination, sexual differentiation and the germ cell maturation control

Yutaka Nakahori, MD

Professor, Department of Public Health, The University of Tokushima

We are trying to elucidate the role of the human Y chromosome and its genes on the human sex determination, sexual differentiation and germ cell maturation control, which is essential to understand the mechanisms of endocrine disrupting chemicals on human beings. An attempt is forwarded to develop the in vitro system analyzing the effect of chemicals that works on the promoter region of MIS (Mullerian inhibiting substance). On the other hand, we previously demonstrated that the Japanese males in different Y chromosome lineage show different sperm concentration. We are attempting to investigate the phenotypical difference of these males and the possible difference of the reaction to ED in each male lineage.

7. PPAR γ を介した内分泌攪乱化学物質の毒性発現メカニズムの解明

研究者 今川 正良 (名古屋市立大学薬学部教授)

研究要旨

エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体と同じ核内受容体スーパーファミリーに属する PPAR γ (ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体) を介した内分泌攪乱化学物質の作用機序を解明する第一段階として、PPAR γ の DNA への結合配列の選択性を決定した。その結果、RXR α が少ない条件下では、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが形成され、エストロゲン受容体が認識する DNA 塩基配列と同じパリンドローム構造を認識することが明らかになった。

また、通常条件では脂肪細胞に分化できないマウス NIH-3T3 細胞に PPAR γ 発現遺伝子を導入し、恒常的に PPAR γ を発現し、リガンド存在下で脂肪細胞に分化する安定細胞株を作製した。本株と非発現細胞との発現遺伝子の差異をサブトラクション法 (遺伝子側) および 2 次元電気泳動-質量分析法 (蛋白質側) により検討した。この細胞株を用いて、数種類の環境化学物質について、脂肪細胞分化への影響を検討した。

研究協力者

山口 良 (名古屋市立大学薬学部助教授)

塚本喜久雄 (名古屋市立大学薬学部講師)

A. 研究目的

近年、脂肪細胞分化に関わる転写因子の解析が進み、転写因子 PPAR γ が同定された (1, 2)。PPAR γ はリガンド結合性の核内受容体スーパーファミリーの一員であり、エストロゲンやアンドロゲン受容体と類似した構造を有する (3)。PPAR 自身もファミリーを形成しており、現在のところ、PPAR α , PPAR γ , PPAR δ が知られている。これらは、リガンドによって活性化されると考えられているが、その機能は大きく異なる。すなわち、PPAR α と PPAR δ が肝臓などで重要であるのに対し、PPAR γ は脂肪細胞の分化過程において特に重要な役割を果たしており、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターといわれている (図 1)。実際、その発現は、前駆脂肪細胞の分化に必須であるとともに、通常では脂肪細胞に分化できないマウス NIH-3T3 細胞が PPAR γ の強制発現により分化能を獲得することが知られている (4)。また、PPAR γ は糖尿病や動脈硬化に密接に関連し、その遺伝子多型の影響も指摘されている (5)。 それでは環境化学物質

(内分泌攪乱化学物質) が、脂肪細胞の分化ひいては肥満を誘発する可能性はあるのか？糖尿病を引き起こす可能性はあるのか？このように、これまで全く指摘されていない内容を課題とし、内分泌攪乱物質の作用メカニズムについて、

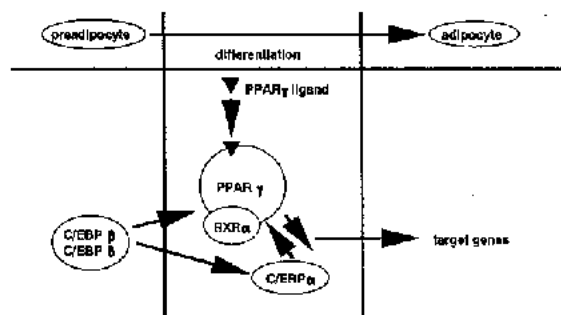


図1. 脂肪細胞分化における PPAR γ の役割

新たな視点から検討することを目的とした。その第一段階として本研究では、以下の 4 つの項目について検討を行った。

- 1) PPAR γ の DNA 結合配列の同定
- 2) PPAR γ を恒常的に発現する培養細胞の構築
- 3) 上記 PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による各種発現遺伝子の差異の検討
- 4) 上記 PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞分化に及ぼす環境化学物質の影響および各種遺伝子発現の変化の検討

B. 研究方法

1) PPAR γ の DNA 結合配列の同定

パキウイルスシステムを用いて、FLAG タグ融合蛋白質として PPAR γ および RXR α を Sf9 細胞内に発現後、抗 FLAG-M2 抗体を用いて精製した。これらを用いて、ランダムセレクション法 (図 2) により PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーおよび PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが結合する DNA 塩基配列の同定を行った。さらに、ゲルシフト法を用いて結合親和性の差異について検討した。

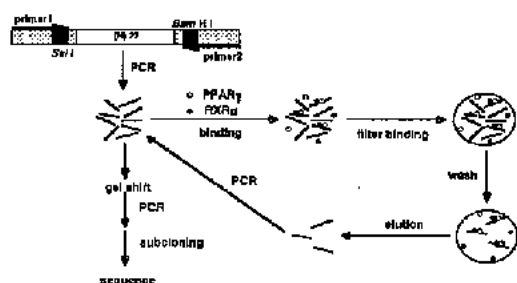


図2. ランダムセレクション法によるDNA結合配列の同定

2) PPAR γ を恒常的に発現する培養細胞の構築

マウス NIH-3T3 細胞は、通常の培養条件下では脂肪細胞に分化しない。この細胞にレトロウイルスを用いて、恒常的に PPAR γ を発現する安定細胞株を構築した。すなわち、PPAR γ 遺伝子を挿入したレトロウイルスベクター pDON-AI をリン酸カルシウム法により PT-67 パッケージング細胞に導入した。一過性に発現したウイルス液を回収し、マウス NIH-3T3 細胞に感染させた。さらに 10 日間培養後、PPAR γ 遺伝子が染色体に組み込まれた安定細胞株を単離した。

3) 上記 PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による各種発現遺伝子の差異の検討

構築した PPAR γ 発現細胞にリガンドである BRL49653 を添加すると、この細胞は脂肪細胞に分化する。その過程において発現の変化す

る遺伝子群を、PCR 法を組み合わせた cDNA サブトラクション法により単離解析した。また、2 次元電気泳動法によりタンパク質の発現パターンの変化を解析した。

4) 上記 PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞分化に及ぼす環境化学物質の影響および各種遺伝子発現の変化の検討

上記 3) において、BRL49653 のかわりに種々の環境化学物質を添加して、分化に対する影響を検討した。また、培養過程における脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現をノザンプロット法により検討した。さらに、一部の化学物質について、上記 3) と同様に 2 次元電気泳動法によりタンパク質の発現パターンの変化を解析した。

C. 研究結果

1) PPAR γ の DNA 結合配列の同定

パキウイルスシステムを用いて、PPAR γ および RXR α を Sf9 細胞内に発現後、抗体を用いて精製した。これらを用いて、ランダムセレクション法により DNA 塩基配列の同定を行った。得られたクローンの塩基配列を決定し、その一覧を図 3 および表 1 に示した。等量の PPAR γ および RXR α 存在下では、得られた全てのクローンの塩基配列は、AGGTCA が 1 塩基のスパーサーの後に繰り返す、DRI (ダイレクトリピート 1) 配列を有しており (図 3A, 表 1)、この結果は従来から報告されている配列と良く一致した (6)。一方、RXR α が非常に少ない条件下においては、AGGTCA が 3 塩基を隔てて回文状に並んだ、Pal3 (パリンδροーム 3) 配列が優先的に得られた (図 3B, 表 1)。すなわち、RXR α の存在量に応じて PPAR γ の結合様式が変化する結果が得られた。最終的に得られたコンセンサス配列を表 2 にまとめた。また、ゲルシフト法による、DNA 結合実験より、DRI には PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーが、また Pal3 には PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが結

A) DR1 motif

TACA AGGTCA A AGTTCA	CACA AGGTCA A AGGTCA CA	TATA AGGTCA A AGGTCA CC
CAAA GGGTCA A AGGTCA GACA	ACAG GGGTCA A AGGTCA CTG	CCCA AGGTCA A AGGTCA TGCA
CTAA AGGTCA A AGGTCA ACGA	GGAG GGGTCA A AGGTCA TGGG	TGAG GGGTCA A AGGTCA TAAG
TCTG AGGTCA A AGGTCA CTAG	GTTA AGGTCA A AGGTCA CCA	AAAG AGGTCA A AGGTCA CC
TCAA AGGTCA A AGGTCA AGAG	CGGG AGGTCA A AGGTCA TAGA	G GGGTCA A AGGTCA TGCG
TCGT AGGTGA A AGGTCA	CCAA AGGTCA A AGGTCA AAGG	ATAG GGGTCA A AGGTCA TCTT
CAAA AGGTCA A AGGTCA AAGT	GGTG AGGTCA A AGGTCA	TTAG GGGTCA A AGGTCA TGA
AGTG GGGTCA A AGGTCA CAGA	G GGGTCA A AGGTCA TGGG	GCTT GGGTCA A AGGTCA
CG GGGTCA A AGGTCA ACCT	TAG GGGTCA A AGGTCA CGCT	GAAA GGGTCA A AGGTCA A
CCAG GGGTCA A AGGTCA ACCC	TAAG GGGTCA A GGGTCA	CATA AGGTCA A AGGTCA CACA
G GGGTCA A AGGTCA C	ACGG GGGTCA A AGGTCA CCGA	G GGGTCA A AGGTCA CATA
GAAA AGGTCA A AGGTCA	CTAG GGGTCA A AGGTCA	CTTG GGGTCA A AGGTCA CAC
AGGTCA A AGTTCA TACT	TTTG GGGTCA A AGGTCA TCTA	CAG GGGTCA A AGGTCA AGTT
CGAG GGGTCA A AGGTGA	GGAG GGGTCA A AGGTCA	CCAC AGGTCA A AGGTCA CC
GGTG GGGTCA A AGGTCA TGCG	ACAG AGGTCA A AGGTCA CC	GGGTCA A AGGTCA ACAA
TCAA AGGTCA A AGGTCA ACCA	CATG GGGTCA A AGGTCA TG	ATTG GGGTCA A AGGTCA GATT
CTAG GGGTCA A AGGTCA CCGG	ACGC GGGTCA A AGGTCA AA	TCAA AGGTCA A AGGTCA TCTT
GCTG GGGTCA A AGGTCA ACTG	TGTG GGGTCA A AGGTCA CACG	TCGG AGGTCA A AGGTCA
AATG GGGTCA A AGGTCA CGCG	AGCG GGGTCA A AGGTCA ACTT	GGGT AGGTCA A AGGTCA
TTGG AGGTCA A AGGTCA TAGT	G AGGTCA A AGGTCA TCCG	ATAG GGGTCA A AGGTCA TCTA
AACG AGGTCA A AGGTCA AATA	ACGG GGGTCA A AGGTCA	TTTG GGGTCA A AGGTCA CGAT
GCAA AGGTCA A AGGTCA TCGG	CCAA AGGTCA A AGGTCA TGG	GGAG GGGTCA A AGGTCA AATT
ACAG AGGTCA A AGGTCA TTCA	G GGGTCA A AGGTCA AGTG	TTCG GGGTCA A AGGTCA TCAG
TGAA AGGTGA A AGGTCA	GTGA AGGTCA A AGGTCA CGTC	TGTA GGGTCA A AGGTCA

B) Pal3 motif

AACT AGGTCA TGG TGACCC ACTT	TAGT AGGTCA GCG TGACCT CAAT
ATTT GGGTCA CTG TGACCT ACT	TAT AGGTCA CGG TGACCC AGTA
ACT GGGTCA CGA TGACCT AGTT	ATGT GGGTCA CGG TCACCC AGAT
AACT AGGTCA TGG TGACCC ATTT	AAGT AGGTCA CAG TGCCCT ACT
AACT AGGTCA TCG TGACCC AGT	AAAT GGGTCA CCA TGACCT AGTT
CAGT AGGTCA CGG TTACCT ACTT	AACT AGGTCA TGG TGCCCC ACTT
AGT AGGGCA CTG TGACCT ACTT	ATGT AGGTAA CAG TGGCCT ACTT
ATAT AGGTCA GAG TGACCC AGTT	AATT GGGTCA CAC TCACCT ACTT
AGT AGGGCA CTG TGACCT ACTT	AAGA AGGTGA CGT TCACCC ACTT
CAGC AGCTGA ATC TACCCCT T	CAGT AGGTCA AAG TCACCT ACAT
AAGT AGGGCA CCA TGACCC AAAT	AACT GGGTCA CTC TGACCT ATAT
AAGT AGGTGA GTG TGACCC AATT	AACT AGGTCA CCG TGACCC TAGT
AAGT GGGTGA ACG TCACCT ACTT	ATGT AGGTCA ACG TAACCT ACTA
TAGT AGGTCA CGT TGACCT ACAT	T AGGTCA CAT TGACCT ACAT

図3. クローニングしたDNA結合塩基配列のアライメント

表1. ランダムセレクション法により単離されたオリゴヌクレオチドのタイプ分け

Receptors	Types selected		
	DR1	Pal3	other motifs
PPAR γ /RXR α			
30ng/30ng	72	0	0
30ng/1ng	6	28	25

表2. コンセンサス配列の決定

