

## 生殖生理内分泌学部門

### Department of Reproductive Physiology and Endocrinology

当部門は、ヒト・リプロダクションの分子機構を研究すると同時にその異常に基づく疾患の診療および治療を行うことを目的に平成元年度再出発した。平成元年度4月、角沖久夫助手の九州大学医学部産婦人科助手および6月、宇都宮隆史講師の大分県立病院産婦人科第2部長への転出に伴い、教授和氣徳夫、助手岩永知久、宮本新吾、加藤秀則、今村利朗、医員有馬隆博、西田純一、研究生佐々木雅弘の計8名による新体制となった。小所帯ながら非常に活発な研究及び診療が現在進行中である。平成元年度1月から2年度2月までの外来患者総数は6013名、うち新患1636名で、その内訳は、悪性腫瘍-111名、一般婦人科-1108名、不妊-365名、産科-52名であった。一方入院患者総数は360名（悪性腫瘍-119名、婦人科-81名、不妊-45名、産科-115名）で、うち手術患者数200名（悪性腫瘍-58名、一般婦人科-67名、不妊-45名、産科-30名）であり、悪性腫瘍および不妊症患者の診断および治療が当部門の主たる診療業務であることが解る。現在進行中の研究は以下の如くである。

#### A. 微小核融合法を用いた子宮内膜癌および絨毛癌の造腫瘍性抑制に関わる染色体の同定（佐々木、押村、和氣）

PSV2neoにより標識された正常ヒト細胞由来1-22番染色体を単一で保有するマウスA9細胞ライブラリーから任意のクローンを選択し、コルセミド処理による微小核形成後、ヒト・子宮内膜癌細胞HHUAおよびヒト絨毛癌細胞CCIと微小核融合を行った。融合細胞の造腫瘍性を1)ヌードマウス上での腫瘍形成 2)軟寒天培地でのコロニー形成 3)細胞飽和密度 4)血清依存性 5)細胞増殖速度で評価した結果、HHUAでは正常1番染色体、CCIでは7番染色体の単一移入により、腫瘍細胞の造腫瘍性および増殖特性が著しく抑制されることが判明した。HHUAではさらに細胞形態にも著しい変化が観察された。以上の結果からヒト子宮内膜癌、絨毛癌の抑制遺伝子はそれぞれ1番、7番染色体に遺伝子座を有することが推測された。

#### B. 子宮内膜癌抑制遺伝子の解析

##### a. マイクロディセクション法による1番染色体部位特異的DNA断片の単離

（岩永、有馬、今村、和氣）

神奈川県立ガンセンター細胞遺伝子部門との共同研究で、微小核融合法によってヒト1番染色体を導入された子宮内膜癌由来の細胞株HHUAが、その造腫瘍性を失うことが明らかにされた。現在、正常ヒト抹消リンパ球由来の1番染色体をマイクロマニピュレーター操作下に4つの部位にディセクションし、これをマイクロドロップレット中でDNA抽出・EcoR1での切断・PUC18

への組み込み・sequence primers を用いたPCR法によるDNA増幅を行い、1番染色体の特定の部位に特異的なDNA断片の単離を行っている。これらDNA断片を用い、子宮内膜癌に特異的なRFLPsの検出、後述する1番染色体特異的なc-DNAライブラリーのスクリーニング等を行い、1番染色体上に存在すると思われる子宮内膜癌抑制遺伝子の本態に迫って行く。

## **b. ヒト子宮内膜癌抑制遺伝子のクローニング**

(加藤、西田、宮本、和氣)

ヒト1番染色体の子宮内膜癌細胞株(HHUA)への移入は、in vitroでの造腫瘍性を強く抑制する。この事は、内膜癌に対する癌抑制遺伝子の少なくともひとつは、1番染色体上に存在する事を示唆する。この癌抑制にかかわる遺伝子を単離すべく以下の要領で実験を進めている。

1. ヒト1番染色体のみが移入されたマウス線維芽細胞株(A9#1)からm-RNAを抽出し、1st strandのc-DNAを合成する。このc-DNAに対し、親株のA9より抽出したm-RNAを大過剰にhybridizationさせ、残存する一本鎖c-DNAを分離し、2nd strandのc-DNAを合成する。これを真核生物発現ベクターであるpKCRに組み込み、ヒト1番特異的c-DNA発現ライブラリーを作製する。
2. このライブラリーを内膜癌細胞株HHUAに遺伝子導入し、BrdU等を用いて、増殖の抑制された細胞クローンを選別する。これらのクローンより高分子DNAを抽出し2次の遺伝子導入を行う。これを4次まで繰り返す事により、癌抑制にかかわらないc-DNAの脱落を計る。
3. 第4次の増殖抑制細胞クローンの高分子DNAよりゲノムDNAライブラリーを作製する。このライブラリーを、pKCRベクターをプローブとする事によりスクリーニングを行い、陽性のDNAクローンの増殖抑制効果を検討することにより、内膜癌抑制遺伝子(c-DNA)を単離する。現在1の段階まで進行しており、予備実験では、 $6.2 \times 10^4$ コ(理論値上は、 $1.35 \times 10^4$ コあれば1番染色体より発現されるm-RNA全種をカバーできると推定している)のライブラリーをえることができた。現在この効率で、質的に十分な長さをもったc-DNAライブラリーを作製中である。

## **C. 胎盤分化に関わる遺伝子の解析(岩永、和氣)**

マウス受精卵での核抜き、核移植によるこれまでの知見で、Androgenetic conceptusはtrophectoderm優位の増殖を示し、gynogenetic conceptusはinner cell mass優位の増殖を示す。我々は、胎盤の分化に関わる遺伝子群の中には、母親由来の遺伝子がインプリンティングによって不活性化されているものがあるはずという作業仮説の下、マウスにおけるgenomic imprintingのマップと、ヒトとマウスでの染色体の相関を参考に、HCG- $\beta$ 遺伝子その他種々の遺伝子プローブを用いて、胞状奇胎と卵巣奇形腫とのmethylation patternの相違を解析中である。胞状奇胎は雄性発生を、奇形腫は単為発生を原因とするためそれぞれの細胞内の全遺伝子は前者では父親由

来、後者では母親由来となる。これにより、胎盤分化に関わる遺伝子の本態に迫ることを試みる。

#### **D. HPV16E7領域と in vitro のトランスフォーメーションおよび in vivo の腫瘍形成に伴う細胞ゲノムの変化について (加藤、西田純、和氣)**

1. 子宮頸部扁平上皮癌に高率に検出される H P V (human papilloma virus) 16型の初期転写領域である E 7 を選択的に発現するベクターを作製した。このベクターを用いて、ラット初代培養線維芽細胞 (R E F) に対する in vitro での形質転換能を検討した。E 7 単独では R E F に永代増殖能を与えるのみであったが、アデノウイルス 5 型 E 1 B (Ad5E1B) との組み合わせでは軟寒天培地でのコロニー形成を示す一方、AD12E1B とは共同作用を示さなかった。EJras との組み合わせでは、AdE1B で示さなかった同系ラットでの造腫瘍性をも獲得した。HPV16E7がコードする蛋白のアミノ酸配列はアデノウイルス E 1 A と高い相同性をもつにも拘らず、初代培養細胞の形質転換には E 1 A と異なった挙動を示す事が判明した。
2. 上記の E7-EJras で形質転換した 3 クローンの、同系ラットでの腫瘍形成の前後における核型を分析した。その結果、in vivo での腫瘍形成に際しては細胞側ゲノムの変化がおこっており、このような変化をもつクローンが腫瘍形成に際し選択的かつ有利に増殖したものと推測された。HPV16が関与するヒト子宮頸癌の発生においても、細胞側ゲノムの 2 次的変化が重要である事を示唆するものと考えられた。

#### **E. 子宮頸癌細胞における R B 遺伝子発現について (今村、岩永、有馬、和氣)**

網膜芽細胞腫 (R B) 遺伝子は癌抑制遺伝子として知られている。R B 蛋白はヒトパピローマウイルス (H P V) 16型 E 7 蛋白と複合体を形成し、E 7 の細胞内情報伝達に抑制的に作用することが推測されている。E 7 は子宮頸癌の発生に関わる領域とされているため R B 遺伝子の子宮頸癌発生への関与が問題となる。このため、子宮頸癌細胞における R B 遺伝子発現の詳細を解析することにより子宮頸癌癌化機構における R B 遺伝子のはたす役割について明らかにすることを目的とした。H P V 16型、18型 D N A の検出されている子宮頸癌細胞株 5 種類 (SIHA、ME180、C33A、HeLaS3、C4I) 及び子宮頸癌摘出組織をそれぞれゲアニジン処理し、超遠心による塩化セシウム密度勾配法で R N A を抽出した。RBcDNA (約4.7kb) をプローブとしてノーザンブロッティングを行った。対照としては H P V が関与していない絨毛癌細胞株 (C C I)、子宮体癌細胞株 (HHUA) 及び正常子宮頸部組織を同様に処理して用いた。その結果①子宮頸癌細胞と対照との間で泳動された mRNA サイズに差の認められなかったことから、子宮頸癌細胞では全て正常な RBmRNA が発現されていることが判明した。②しかし対照と比較して、子宮頸癌細胞株では R B 遺伝子の mRNA レベルが有意に増大しており、また子宮頸癌摘出組織でも 1 例有意に増大しているものが認められた。以上より、子宮頸癌細胞では転写レベルでの R B 遺伝子発現の欠失はみられないものの、転写レベル以降の R B 遺伝子発現もしくは R B 遺伝子産物の機能変化が

その発現レベルの増大をもたらしたものと考えられた。

#### F. 習慣流産患者におけるHLA遺伝形成の解析 (有馬、岩永、和氣)

習慣流産と夫妻間のHLA型共有との関連について、これまでに数多くの報告がなされてきた。しかしながら、もし夫妻間で、HLA型共有が認められたとしても、メンデルの分離の法則に従うなら、妻とHLAを共有するハプロタイプが、夫から胎児（もしくは胚）へ伝達される確率は $1/2$ である。3回連続して流産するという習慣流産の定義に従うと、その確率は $(1/2)^3 = 1/8$ でしかなくなる。HLA型共有がそれ以上に関与しているとする、メンデルの分離の法則に従わない現象がおこっていないなければならない。

一方、マウスではヒトのHLAに相当する主要組織適合抗原系H-2の遺伝子座近傍にt-complexの遺伝子座が存在する。t/の雄からは90%以上の頻度でt遺伝子とそのF1に伝達する、いわゆるtransmission ratio distortionが観察されている。

我々は、習慣流産夫妻の夫の血液および精子からDNAを抽出し、ポリモルフィズムを示すHLA DQ $\alpha$ とDQ $\beta$ 遺伝子をプローブとして、Southern blot hybridization法を用いて、減数分裂のレベルでtransmission ratio distortionを示すものがあるかどうか解析中である。

#### G. ヒト絨毛細胞、及び子宮内膜細胞への遺伝子導入による不死化細胞株の樹立

(西田純、加藤、和氣)

導入遺伝子としてAd5EIA、Ad12EIA、V-fos、SV40largeT、erbBの各遺伝子を用いた。発現ベクターであるpKCRのEcoRI siteにそれぞれの遺伝子を組み込んだ。現在の所、Ad5EIAを組み込んだpKEA5、erbBを組み込んだpKEA7.7の組換えが終了している。絨毛細胞は、血清密度勾配法にて選別し、馬血清添加の培地で培養した。今後まずpKEA5、pKEA7.7の遺伝子導入を行い、引き続き組換えの終了した遺伝子の遺伝子導入を行う予定である。

#### H. P53の頸癌、内膜癌、絨毛癌への導入とその造腫瘍性の抑制。(西田純、加藤、和氣)

各々の細胞株にpPy53（マウスp53cDNA発現ベクター）を導入し、成長曲線、細胞飽和密度、血清要求性、軟寒天培地でのコロニー形成能、ヌードマウスでの造腫瘍性をパラメーターとし、造腫瘍性の抑制を検討する。細胞株はHela、SiHa、CCI、HHUA、Ishikawaを用いる予定である。現在pPy53の調整が終了した。

#### I. Gene Dosageの造腫瘍性抑制に及ぼす影響 (西田純、和氣)

内膜癌細胞株であるHHUAと正常ヒト胎盤線維芽細胞との細胞融合をPEG法にて行い、得られた融合細胞のそれぞれの親細胞からの1番染色体の量比を、1番染色体上のDNAプローブを用いRFLPにて検出し、その量比の違いにより、造腫瘍性がいかに変化するかをH.と同様の

パラメーターで観察する。現在17クローンの融合細胞を選択し、検討中である。

## J. 子宮内膜癌における癌抑制遺伝子と細胞骨格構築との関連 (宮本、西田真、和氣)

ヒト子宮内膜癌細胞 HHUA に対して一番染色体単一移入細胞では、造腫瘍性が消失されただけでなく、細胞形態そのものが著しく平坦な変化 (フラットリバータント) を示した。このことは、フラットリバータントが引き起こされる過程に細胞骨格構築が大きく変化していることを示唆している。したがって、我々は、二次元電気泳動法、ウエスタンブロット法を用い、ヒト子宮内膜癌細胞 HHUA、及び、一番染色体単一移入細胞における細胞骨格構築でのそれぞれの特徴を抽出し、癌抑制遺伝子と細胞形態の変化との関連を検討している。

## 和 文

1. 山田秀人、和氣徳夫、藤野敬史、相原稔彦、田中信一、田中俊誠、藤本征一郎、石渡有：細胞融合法を用いた子宮内膜癌化機構解明へのアプローチ。日本産科婦人科学会雑誌41、122-128、1989
2. 加藤秀則：Human papilloma virus 16型 E61E7 領域による細胞の in vitro トランスフォーメーション。北海道医誌64巻、318-327、1989
3. 有馬隆博、中村元一、吉満陽孝、濱田政雄、中野仁雄：排卵誘発後の一側性卵管双胎妊娠の一例。日本不妊学会雑誌第34巻、第3号53-56、1989
4. 相原稔彦、田中信一、大久保仁、牧野田知、和氣徳夫、田中俊誠、藤本征一郎：部分奇胎の発生に関する細胞遺伝学的研究。日本産科婦人科学会雑誌42、67-72、1990

## 総 説

1. 和氣徳夫、山田秀人、加藤秀則、藤野敬史、藤本征一郎：II 染色体分析技術の実際。D. 腫瘍細胞の培養と染色体分析、8 子宮内膜癌。臨床病理80、242-251、1989
2. 藤野敬史、和氣徳夫、加藤秀則、藤本征一郎：DNA 診断—分子生物学の臨床応用、4 ヒト癌遺伝子研究の動向と DNA 診断、12) 絨毛癌・胞状奇胎。日本臨床589、695-700、1989
3. 和氣徳夫、藤本征一郎：羊水過多と羊水過少の次回妊娠に対する対応。産婦人科の実際38、383-388、1989

## 英 文

1. Sakai, K., Wake, N., Fujino, T., Yasuda, T., Kato, H., Fujimoto, S., Fujinaga, K.: MTX resistant mechamims in human choriocarcinoma cells. Gynecologic Oncol. 34 : 7-11, 1989
2. Sumioki, H., Shimokawa, H., Miyamoto, S., Uezono, K., Utsunomiya, T., Nakano, H.: Circadian Variations of plasma atrial natriuretic peptide in four types of hypertensive disorder during

- pergnancy. *British. J. Gynecol.* 96 : 922-927, 1989
3. Wake, N., Yamada, H., Fujita, H., Kato, H.: Isolation of clones resistant to 6-thioguanine and G418 from the HHUA endometrial carcinoma cells and their application to cell hybridization. *Cancer Genet. Cylogenet.* 1990 inpress.
  4. Yamada, H., Wake, N., Fujimoto, S., Barret, J. C. Oshimura, H : Multiple chromosomes carrying tumor suppressor activity for uterine endometrial carcimona cell line identified by microcell mediated chromosome transfer. *Oncogene* 1990 inpress.
  5. Iwanaga T, Wakasugi S, Inomoto T, Masahiro U, Ohnishi S, Nishiguchi S, Araki K, Uno M, Miyazaki J, Maeda S, Shimada K, Yamamura K : Liver spicific and high level expression of human amyloid P component gene in transgenic mice. *Dev. Genet.* 10 : 365-371
  6. Shingo Miyamoto, M. D., Hiroshi Shimokawa, M. D., Kazuhiro Sakai, M. D., Naomichi Matsumoto, M. D. and Hitoo Nakano, M. D.: A possible explanation for nocturnal hypertension in preeclampsies. *Clin. Exper. Hyper. In Pregnancy*, B8 (3), 495-506 (1989)
  7. Kiyomi Tsukimori, M. D., Hiroshi Shimokawa, M. D., Shingo Miyamoto, M. D., Keiko Uezono, M. D. and Hitoo Nakano, M. D.: Circadian variations of plasma colloid osmotic pressure during the third trimester in normal and preeclamptic pregnancies. *Clin. Exper. Hyper. In Pregnancy*, B2 (2), 331-342 (1989)
  8. Shingo Miyamoto, M. D., Hiroshi Shimokawa, M. D., Hisao Sumioki, M. D., and Hitoo Nakano, M. D.: Physiological role of endogenous human atrial natriuretic peptide in preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 160 ; 155-159 (1989)