

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病態の解明さらには診断および治療法の開発を行っている。平成2年6月西田眞医員が九州がんセンターからはまた9月には本多つよし医員が福島県立医大から当部門に新たに参加し、岩永知久助手が9月から National Inst. of Environmental Health Science に留学した。現在9名の小所帯ながら、非常に活発な研究および診療が行われている。当部門の主たる診療内容は悪性腫瘍および不妊の診断・治療である。現在行進中の研究は以下の如くである。

A. ヒト1番染色体 cDNA 発現ライブラリーからの子宮内膜癌増殖抑制遺伝子の単離（加藤、西田純一、本多、和気）

微小核融合による実験結果より、ヒト1番染色体上には、子宮内膜癌の造腫瘍性および増殖を抑制する遺伝子が存在すると考えられる。この遺伝子を同定する目的で、まずヒト1番染色体をもつマウス線維芽細胞株（A9-1）と親株（A9）それぞれより cDNA を作製し、Avidin-Biotin を利用したサブトラクションを行うことにより、1番染色体特異的な cDNA 発現ライブラリーを得た。続いて、1)このライブラリーに対し、正常子宮内膜（E）とヒトの子宮内膜癌細胞株 HHUA（H）より抽出した mRNA それぞれをプローブとし、コロニーハイブリダイゼーションを行い、E に存在し H に存在しないクローンを選別する。このライブラリー全体を HHUA にトランスフェクションし、flat revertant を得、PCR 法により flat revertant 内で発現しているクローンを選別する、の2つのアプローチにより癌抑制遺伝子の単離・同定を試みている。

B. 絨毛癌抑制遺伝子の解析（加藤、和気）

1)上記子宮内膜癌におけると同様の手法により、ヒト7番染色体上の抑制遺伝子の同定を試みている（微小核融合により7番染色体上に絨毛癌抑制遺伝子の存在が示唆される）。

2)また、7番染色体上には ERV3 と呼ばれるレトロウイルス由来と考えられる領域があり、同染色体上にこれと離れて存在する H-plk (Kruppel-related zinc finger Protein をコードする) 遺伝子と融合した形で発現・転写が行われている。この転写産物は絨毛癌の発生母地である胎盤はもとより、固体の発生に重要な役割を演じていると推測され、一方絨毛癌細胞ではその発現の欠落が観察される。この ERV3-H-plk cDNA を上記ライブラリーより単離し、その生物活性を、発癌に焦点をあてて検討を行っている。

C. 子宮内膜癌におけるヘテロ接合性の消失 (今村, 和気)

従来行ってきた染色体分析, 全細胞融合, 微小核融合の結果から, 正常細胞には子宮内膜癌細胞の造腫瘍性を抑制する遺伝子 (癌抑制遺伝子) が存在することおよびその癌抑制遺伝子は複数存在することが示唆された。しかし癌抑制遺伝子の欠失の頻度やその遺伝子座に関しては現在のところ不明である。このため RFLP 解析によりその詳細を検討した。子宮内膜癌手術症例約30例につき, 第1染色体から第22染色体に遺伝子座を有する RFLP プローブ約40種類を用いて解析した。その結果第17染色体短腕及び第18染色体長腕において約30%の症例でヘテロ接合性の消失が認められた。今後更に詳細な遺伝子座の同定を行なう予定である。

D. 子宮頸癌, 子宮内膜癌における正常型ヒト p53遺伝子の生物学的意義

a. 子宮頸癌細胞株への正常ヒト p53遺伝子導入による造腫瘍性の抑制 (西田純一, 加藤, 本多, 和気)

子宮頸癌発生過程に関与するヒトパピローマウイルス (HPV) の E 6 蛋白と, p53蛋白の結合性が知られている。従って正常 p53不活化が子宮頸癌発生に関与している事が推測される。そこで頸癌細胞株 (Hela, Siha, ME180) に正常型ヒト p53遺伝子を導入し, その造腫瘍性が抑制されるのか否かについて検討した。

1) 発現ベクターとして pkcR を選択し, その EcoRI site に正常ヒト p53cDNA の XbaI Fragment (1.8kb) を組み込み, これを使用した。

2) 各導入クローンは継代6代目において細胞増殖速度, 細胞飽和密度には親細胞との間に, 差は認められなかったが, 軟寒天培地でのコロニー形成及びヌードマウスでの造腫瘍性は抑制されていることが観察された。

3) 従って子宮頸癌細胞株において, 正常 p53遺伝子の導入より, 足場非依存性及び造腫瘍性の抑制がもたされる事が判明した。

b. 子宮内膜癌細胞株への正常ヒト p53遺伝子導入による造腫瘍性の抑制 (西田純一, 加藤, 本多, 和気)

大腸癌, 肝小細胞癌をはじめとし, 種々のヒト悪性腫瘍において p53の変異や欠失が見だされ, 正常型 p53を導入する事によりその造腫瘍性が抑制される事が報告されている。そこで子宮内膜癌細胞株 (Hecl, Ishikawa, HOOUA, HWCA) において以下の点を検討した。

1) SSCP 法による点突然変異の解析。

2) 正常型 p53遺伝子導入

研究 D. a と同様のベクターを用いた。細胞株 Hecl においては, 導入クローンは細胞増殖速度の著しい遅延が観察された。

3) on/off アッセイ

steroidにて導入されるプロモーターMMTV下流に正常ヒト p53遺伝子を組み込み、各細胞株への導入を行った。現在解析中である。

c. 婦人科癌の遺伝子治療（西田純一、加藤、本多、和気）

1) 子宮頸癌

研究 D. a により、子宮頸癌細胞株において癌抑制遺伝子 p53を導入する事により造腫瘍性が抑制される事が判明した。従って in vivo に形成された腫瘍に対する、正常 p53 遺伝子の導入を現在検討中である。

2) 子宮内膜癌

研究 D. b により子宮内膜癌細胞株において、正常型 p53 遺伝子導入により、造腫瘍性が抑制される事が判明した。また、1 番染色体上に内膜癌の抑制遺伝子の存在が推測されており、現在加藤らにより、クローニング中である。従って c. 1) と同様に内膜癌においても、この 2 つの遺伝子を腫瘍内に導入する事を検討中である。

E. ヒト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、西田眞、佐々木、加藤、和気）

子宮内膜癌細胞 HHUA への微小核融合法による正常ヒト染色体単一移入細胞は平坦な形態的特徴を示し、特にヒト 1 番染色体単一移入クローンでこの変化は著明である。これら造腫瘍性抑制クローンにおける形態的变化がいかなる分子機構の介在のもとに出現するのかを解析することを目的に HHUA 親細胞および 1, 9, 19 番染色体単一移入 HHUA 細胞（それぞれのクローンの造腫瘍性、増殖特性、形態変化には有意の差が存在する）について蛍光抗体法を用いた免疫細胞染色、ウエスタンブロット法により細胞骨格構築の変化を検討している。現在、1 番染色体の単一移入に伴い、骨格構築蛋白量および細胞内構築パターンは正常細胞へ復する傾向にあるとの結果を得ている。

F. HPV16型 E7領域導入後の癌化過程における細胞骨格構築の変化（西田眞、宮本、加藤、和気）

子宮頸部扁平上皮癌の発生過程には human papilloma virus (HPV) 16 型の初期転写領域である E7 が重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、in vitro では E7 領域のみの遺伝子導入では癌化せず、完全形質転換を生じるためには他の遺伝子発現が必要である。F344 ラット胎児初代培養線維芽細胞 (REF) に E7 単独、E7+アデノウイルス 5 型 E1B、E7+EJras を導入することで、それぞれ永代増殖能のみを獲得した細胞 (E7)、足場非依存性増殖を獲得したが造腫瘍性は示さない細胞 (E7+E1B)、足場非依存性および造腫瘍性を獲得した細胞 (E7+EJras) を作成した。これらの 3 細胞株は E7 による形質転換過程を研究する上で非常

に有用であると考えられる。我々はまず、トランスフォーメーション過程で出現する細胞の形態的変化の分子機構を明らかにする目的で、これら3細胞株について、蛍光抗体を用いた免疫細胞染色法、ウエスタン・ブロット法により細胞骨格構築の変化を検討している。

G. ヒトリプロダクションとジェノミック・インプリンティング (有馬・和気)

1) 父性伝達ゲノムあるいは母性伝達ゲノムはそれぞれ特異的な非遺伝的修飾をうけ、初期胚の細胞分化に重要な影響を及ぼすことが知られている。この修飾の実態はおそらくDNA上に生ずる methylation であろうとされている。一方、胎盤の発生には特に父性伝達ゲノムが重要であるといわれている。この非遺伝的修飾の胎盤形成への関与の実態を明らかにすべく、胎盤で発現の増大する遺伝子 (hCG β) および抑制される遺伝子 (MHC class I および II) について、その伝達様式の相違により胎盤DNAの methylation にいかなる相違が生ずるかを、両親の末梢血、胎盤組織、臍帯血を用い検討している。

2) methylation 開始の時期として生殖細胞形成過程を想定し、ヒト精子のMHCについて、その methylation pattern を検討中である。

3) 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。このためこれらの組織は遺伝子の伝達パターンの相違に基づくDNAメチレーションさらにはその発現抑制を解析するための絶好のモデルである。このため遺伝子の伝達様式が全く異なる2疾患に由来する組織からDNAを抽出し、そのメチレーション・パターンの解析を行っている。

H. HPV 癌化過程におけるRBとp53の関与 (本多, 加藤, 西田純一, 和気)

RB 遺伝子, p53 遺伝子は癌抑制遺伝子と命名されてはいるものの、実際には正常細胞において細胞周期を制御していると考えられる遺伝子である。一方、子宮頸癌の発生にはHPVの関与が指摘されている。特にHPVの初期転写領域E6, E7の産物が、それぞれp53蛋白, RB蛋白と結合することで両蛋白の不活化がおこり細胞制御に乱れが生じることで、発癌にいたると推測される。そこで、E6, E7の産生蛋白とRB, p53遺伝子との関与の実態的に解明すべくRB, p53の antisense DNAを作成し、マウスF1の線維芽細胞へE6+Rb antisense, E7+p53antisenseの組み合わせで遺伝子導入を行い、獲得形質を解析することにより、癌化過程におけるE6, E7の役割の詳細を明らかにする。

I. 絨毛癌, 子宮内膜癌の造腫瘍性抑制遺伝子の同定

a. 絨毛癌の造腫瘍性抑制遺伝子の同定 (佐々木, 押村, 和気)

それぞれ正常ヒト由来の染色体を1本のみ含むマウスA9クローンライブラリーとヒト絨毛癌細胞株CC1とを微小核融合法を用い融合させ、造腫瘍性への影響を調べる。これにより、造

腫瘍性抑制に係わる遺伝子の存在する染色体を同定する。

b. 子宮内膜癌の造腫瘍性抑制遺伝子の同定 (佐々木, 押村, 和気)

正常ヒト線維芽細胞とヒト子宮内膜癌細胞株 HHUA とを細胞融合し, その融合クローンを染色体分析することにより, 特定の染色体の脱落と足場非依存性, あるいは造腫瘍性の再獲得との関連を明らかにする。

業 績 目 録

原著論文

1. Wake,N., Yamada,H., Fujita,H., Kato,H., 1990.
Isolation of clones resistant to 6-thioguanine and G418 from the HHUA endometrial carcinoma cells and their application to cell hybridization.
Cancer Genet. Cytogenet. 49, 117-123.
2. Yamada,H., Wake,N., Fujimoto,S., Barret,J.C. and Oshimura, H.,1990.
Multiple chromosomes carrying tumor suoppressor activity for a uterine endometrial carcinoma cell line identified by microcell-mediated chromosome transfer.
Oncogene 5, 1141-1147.
3. Miyamoto,S., Makino,N., Shimokawa,H., Akazawa,K., Wake,N., Nadano,H., Submitted.
Chacteristics of Sodim Transport Systems in Pregnancy Induced Hypertension. J. Hypertension.
4. Kato,H., Nishida,J., Honda,T., Miyamoto,S., Fujinaga,K. and Wake,N.1991,
chromosome alteratiog contributed to neoplastic progression of trans formed rat Embryonal fibroblast.
Cancer Genetics and Cytogenetics, in press.
5. Nishida,M., Jimi,S., Haji,M., Hayashi,I., Kai,T., and Tasaka,H., in press.
Juvenile granulosa cell tumor in association with a high sepum inhibin level.
Gynecol. Oncol.
6. 加藤秀則, 西田純一, 和気徳夫, in press.
正常型 p53遺伝子導入による子宮癌細胞株の造腫瘍性の抑制。
オンコロジア. 24, 3 : 109-110
7. 西田眞, 前田博敬, 佐藤昌司, 中野仁雄, 投稿中。
出生前診断された Mecke 1 症候群の 3 症例。
8. 本多つよし, 宗像覚, 吾妻達郎, 遠藤力, 星和彦, 佐藤章, in press.

胎胎妊娠において2児が子宮内胎児死亡をおこした1症例.
周産期医学

総 説

1. 和気徳夫, 1990.
Fluorescent in Situ Hybridization について.
オンコロジア, 123.6, 141-142.
2. 和気徳夫, 1990.
胎状奇胎からの絨毛癌化—その機構と研究の現状—.
オンコロジア, 24, 31-39.
3. 宮本新吾, 西田眞, 和気徳夫, in press.
Dr Sugawara らのヒト正常1番染色体に局在する細胞老化制御遺伝子について.
オンコロジア. 24, 2 : 129-130, 1991
4. 宮本新吾, 佐々木雅弘, 西田眞, 和気徳夫, in press.
絨毛癌化の分子機構.
Human Cell. 4, 1 : 38-43, 1991
5. 嶋本富博, 自見昭司, 倉野章比古, 東原潤一郎, 牛島春生, 木下秀一郎, 西田眞, 勝田弥三郎, 林逸郎, 松村真理子, 1990.
子宮内種の臨床的検討.
医療44, 1125-1129.
6. 佐々木雅弘, 押村光雄, 1990.
染色体移入による癌形質の抑制.
実験医学増刊 癌遺伝子研究の親展開 (花房秀三郎監修), 193-196.
7. 加藤秀則, 西田純一, 本多つよし, 佐々木雅弘, 今村俊朗, 和気徳夫 1991, 癌抑制遺伝子産婦人科の実際, in, press.

学会発表

1. 岩永知久, 佐々木雅弘, 加藤秀則, 押村光雄, 和気徳夫 (1990, 5/31-6/3).
シンポジウム「絨毛癌における癌抑制遺伝子の解析」.
第31回日本臨床細胞学会, 長崎.
2. 宮本新吾, 谷口俊一郎, 和気徳夫 (1990, 4/14-4/17).
形質転換過程における染色体変化の意義.
第42回日本産婦人科科学会, 東京.
3. 永田秀昭, 宮本新吾, 坂井和裕, 前田博敬, 下川 浩, 野中仁雄 (1990, 4/14-17. 内因性

- hANP と cGMP の相関からみた順型，混合型妊娠中毒の病態の相違についての検討。
第42回日本産婦人科学会，東京
4. 宮本新吾，谷口俊一郎，貞野宏之，馬場恒男 (1990, 7/3-5).
v-fos 導入による高転移能獲得細胞における転移関連遺伝子の検索。
第49回日本癌学会，札幌.
 5. 加藤秀則，西田純一，今村利朗，有馬隆博，岩永知久，和氣徳夫 (1990, 4/14-17)
HPV16型 E7によるラット初代培養細胞のトランスフォーメーションとその染色体変化。
第42回日本産婦人科学会，東京.
 6. 加藤秀則，西田純一，今村利朗，有馬隆博，岩永知久，和氣徳夫 (1990, 6/9-6/10)
HPV16型 E7によるラット初代培養細胞のトランスフォーメーションとその染色体変化。
第39回日本産婦人科学会九州連合地方部会，第41回日本母性保護協会九州ブロック会，佐賀.
 7. 加藤秀則，西田純一，今村利朗，有馬隆博，岩永知久，和氣徳夫 (1990, 7/3-5)
Human papilloma virus E7領域 (HPV16E7) と EJ-rasi によるラット線維芽細胞の造腫瘍能とその染色体変化。
第49回，日本癌学会，札幌.
 8. 今村利朗，岩永知久，有馬隆博，西田純一，加藤秀則，和氣徳夫 (1990, 4/14-17).
子宮頸癌細胞における RB 遺伝子発現について。
第42回日本産婦人科学会，東京.
 9. 今村利朗，岩永知久，有馬隆博，西田純一，加藤秀則，和氣徳夫 (1990, 7/3-5)
子宮頸癌細胞における RB 遺伝子発現について。
第49回，日本癌学会，札幌.
 10. 有馬隆博，岩永知久，西田純一，今村利朗，加藤秀則，宮本新吾，和氣徳夫 (1990, 6/24).
習慣性流産患者における HLA 遺伝形式の解析。
日本産科婦人科学会大分地方部会・日本母性保護医協会大分県支部総会，大分.
 11. 有馬隆博，岩永知久，今村利朗，本多つよし，宮本新吾，西田 眞，西田純一，加藤秀則，和氣徳夫 (1990, 11/25).
習慣流産と HLA 遺伝子形式の解析
第90回九州医師会医学会，不妊分科会.
 12. 西田純一，加藤秀則，和氣徳夫 (1990, 4/14-17).
HPV16型 E7領域によるラット初代培養細胞のトランスフォーメーション。
第42回日本産科婦人科学会，東京.
 13. 西田純一，加藤秀則，和氣徳夫 (1990, 6/24).
子宮頸癌進行例，再発例に対する動注化学療法.

日本産科婦人科学会大分地方部会・日本母性保護医協会大分県支部総会，大分。

14. 西田純一，加藤秀則，和気徳夫（1990，11/25）
p53導入による癌形質の抑制。
第90回九州医師会医学一般分科会・産科婦人科分科会。
15. 佐々木雅弘，山田秀人，和気徳夫，押村光雄（1990，7/3-7/5）。
正常ヒト7番染色体の移入による人絨毛癌細胞株（CC1）の造腫瘍性および *in vitro* 特性の抑制。
第49回日本癌学会総会，札幌。
16. 佐々木雅弘，和気徳夫，押村光雄（1990，4/14-4/17）。
Identification of a chromosome controls various transformed phenotypes of a choriocarcinoma cell line CC1 by microcell-mediated chromosome transfer.
第42回日本産科婦人科化学会総会，東京
17. 佐々木雅弘，和気徳夫，押村光雄（1990，6/29-7/1）。
Identification of a chromosome controls various transformed phenotypes of a choriocarcinoma cell line CC1 by microcell-mediated chromosome transfer.
第1回国際フローサイトメリーシンポジウム，花巻。