

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診療および治療を行うことを目的としている。

現在、和気徳夫教授を中心として、助手加藤秀則、宮本新吾、今村利朗、医員有馬隆博、西田眞、佐々木雅弘、本多つよし、三輪勝洋、儀間朝直の10名と、生医研生化学部門で研修中の西田純一、海外留学者として岩永知久を加え総勢12名である。平成元年より年々人員が増加し、診療は言うまでもなく研究分野でも大きく展開している。

A. ヒト1番染色体発現ライブラリー (S1) を用いたヒト子宮内膜癌増殖抑制遺伝子の単離 (加藤、儀間、本多、西田純一)

ヒト1番染色体が微小核融合によって移入されたマウス A9細胞由来 cDNA を親株の A9細胞 cDNA との間でサブトラクションを行い S1 を作製した。Yamada ら (1990) の研究により、ヒト1番染色体の単一移入でヒト子宮内膜癌 HHUA 株の増殖が、また、当教室の佐々木らの研究により同 Ishikawa 株の増殖が抑制される (unpublished) ことが判明している。従って① S1 を HHUA にトランスフェクションし、増殖の抑制されたクローンよりプラスミド塩基配列をプライマーとした PCR またはプラスミドレスキューにより cDNA を回収する、② HHUA および、正常ヒト子宮内膜より mRNA を精製し、これらをプローブとし S1 をスクリーニングする (+/- ハイブリダイゼーション) ことにより HHUA で発現の抑制された cDNA クローンを得、この cDNA の HHUA における増殖抑制効果を検討する、の2つのアプローチでヒト子宮内膜癌増殖抑制遺伝子の単離を試みている。現在のところ①のアプローチで4つの、②で1つのクローンが得られており、これら5クローンについて塩基配列決定等の作業を進めている。この中の1クローンはサイトカインのひとつであると推定される。

B. HPV16E6E7に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS) を用いた子宮頸癌の遺伝子治療に対する基礎的検討 (加藤、宮本、今村、西田眞、三輪)

ヒト子宮頸癌の発生にはいくつかの型のヒトパピローマウイルス (HPV) E6E7遺伝子が関与していることは周知の通りである。HPV E6E7の発現を抑制することにより癌増殖特性の抑制を図り、最終的にはヒト子宮頸癌の遺伝子治療への発展を目的とし、いくつかの検討を行っている。現在までの所、ホスホチオエート型 (PS) に残基を置換した AS を、E6、E7それぞれの開始コドンより15塩基に対し製作し、HPV16E6E7を発現する子宮頸癌細胞株 Siha に投与したところ、一過性ではあるが、³H-Thymidine の取り込みと増殖速度の抑制が観察された。この

抑制機構に関して、E6E7蛋白の発現解析、ASの細胞内移行および安定性を検討し、より長期に渡る増殖抑制の方法を検索中である。また今年度より今村を中心として、生体内腫瘍組織へのASの確実な delivery system の検討を、レトロウイルスベクターなどの担体の問題、AS塩基のより安定な化学修飾の2つの側面から開始している。

C. 子宮内膜癌における p53, DCC, nm23等の癌抑制遺伝子の構造異常の解析（本多，加藤，儀間，西田純一，今村，和気）

1. p53に関しては、臨床進行期別に分類した摘出子宮内膜癌よりDNAを抽出。

Exon2からExon11までのExon領域をすべてカバーする型で8組のPCR primerを作成。PCR-SSCP法を用いて変異の有無をスクリーニングした後、変異を有する領域のシーケンスを決定する。現在のところ、23例中3例に変異がスクリーニングされ、そのシーケンスを決定中である。変異が見つかった3例はいずれも臨床進行期がⅣ期であり、子宮内膜癌においてp53は、浸潤・転移などのprogressionに重要な役割をはたしていることが推測された。

2. DCC (deleted colorectal carcinoma) は大腸癌でその構造異常が発見され、癌抑制遺伝子として同定された。塩基配列より、産物である蛋白は細胞の接着因子に関連する機能をもつであろうと推測されている。したがって細胞の癌化過程において足場非依存性増殖ないしは転移という特性に関与している可能性があり、興味のもたれるところである。方法としては、子宮内膜癌細胞株 (HHUA, HOOUA, HOUA, HWUA, Hec1, SNGM) よりtotalRNAを抽出。RT-PCRによる増幅後、southern blot hybridizationまたはSSCP法を用いて発現異常、突然変異の有無等を解析している。

3. nm23は、マウスメラノーマ細胞株において高転移能を有する株と低転移能を有する株のDNAのdifferential hybridizationにより発見された転移抑制遺伝子であり、癌細胞が転移能を獲得する際にこの遺伝子がコードする蛋白の発現量の低下が重要な役割を担っていると考えられている。最近になり、発現量の低下はnm23遺伝子を有するalleleの欠失による場合があることが大腸癌で明らかにされ、正常細胞DNAと癌細胞DNAのRFLPを比較することで癌細胞の転移能、ひいては患者の予後を予測しうることが報告された。子宮内膜癌においても同様の現象があるか否か十分に検討の余地はあるものと思われる。nm23のExonの一部をprobeとしSouthern blot hybridizationあるいは、in situ hybridizationを行い、子宮内膜癌におけるnm23の変異の有無と予後との相関について検討を行っている。

D. ヒト7番染色体発現ライブラリー (S7) を用いたヒト絨毛癌造腫瘍性抑制遺伝子の単離（儀間，加藤，本多，西田純一，佐々木）

ヒト7番染色体の単一移入により、ヒト絨毛癌細胞株CC1の造腫瘍性が抑制されるという知見が当教室と鳥取大押村教授との共同研究により得られている。前記Aと同様にS7を作製し、

CC1に遺伝子導入し、concanavalinAによる selection を行い造腫瘍性の抑制されたクローンを得た。前記Aの①と同じ手法によりいくつかの cDNA クローンを得、これらについて解析を進めている。

E. 子宮内膜癌発生機構の遺伝子解析 (今村, 有馬, 佐々木, 和気)

子宮内膜癌発生過程には複数の癌遺伝子, 癌抑制遺伝子の関与が示唆されている。しかし癌抑制遺伝子の欠失の頻度や詳細な遺伝子座に関しては未だ解明されていない。このため制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析により, ヘテロ接合性の消失している染色体領域およびその頻度について検討した。また ras 系癌遺伝子, Int-2癌遺伝子に関して発癌過程への関与を検討した。子宮内膜癌手術症例42例について癌組織および正常組織を採取してそれぞれ高分子量 DNA を抽出し, 第1染色体から第22染色体に遺伝子座を有する RFLP プローブを用いてヘテロ接合性の消失の検討を行った。また K-ras 遺伝子, Ha-ras 遺伝子, N-ras 遺伝子のコドン12, 13, 61を含む領域を PCR を用いて増幅しオリゴヌクレオチドプローブによるドットハイブリダイゼーションを行い点突然変異の有無を検討した。Int-2遺伝子増幅はサザンハイブリダイゼーションにより検討した。その結果以下の事が判明した。(1) 第17染色体短腕 (17p13), 第18染色体長腕 (18q21) において高頻度のヘテロ接合性の消失が観察され, p53遺伝子, DCC 遺伝子の関与が示唆された。(2) 若年発癌の2症例では対立遺伝子欠損の頻度 (allelic loss frequency) は90%に達しており, 特異な発癌機構を有することが示唆された。(3) K-ras 遺伝子の点突然変異が17%の症例で観察された。Int-2遺伝子の増幅は認められなかった。以上の事より, 子宮内膜癌発生過程には p53遺伝子, DCC 遺伝子, K-ras 遺伝子の少なくとも3遺伝子変化の関与が示された。また, 子宮内膜癌には複数の癌化機構が関与することが示唆された。現在さらに症例数および RFLP プローブの種類を増やし, より詳細な検討を行っている。

F. 絨毛癌, 子宮内膜癌, 胚性癌腫細胞の造腫瘍性抑制に関わる染色体の同定

a. 絨毛癌の造腫瘍性抑制遺伝子の同定 (佐々木, 今村, 有馬, 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。

c. マウス EC 細胞の分化に関する染色体の検索 (佐々木, 押村, 和気)

EC細胞 (胚性癌腫細胞) は, ES細胞 (胚幹細胞) に類似してあらゆる体細胞に分化をとげる能力, いわゆる多分化能があり, その分化には, 未分化細胞を一定の方向への分化を促進,

あるいは抑制するような遺伝子が関与していると考えられる。自発的には殆ど分化することの無いマウス EC 細胞株 F9 に、ヒト線維芽細胞由来の正常染色体を単一移入し、得られたクローンの性質を調べることにより、細胞分化に関与する遺伝子の存在する染色体の同定を試みている。

G. 絨毛癌の発生起源に関する検討（有馬，今村，佐々木，和気）

絨毛癌は、胞状奇胎や種々のタイプの妊娠に続発することは臨床的によく知られた事実である。しかし、本腫瘍における責任妊娠を決定する方法として、臨床的にはもっぱら妊娠歴にたよってきた。我々は本腫瘍の発生起源について、腫瘍組織、患者および、夫の末梢血より DNA を抽出し、種々の RFLP プローブを利用し、サザンブロットハイブリダイゼーション法にて解析を行った。うち 1 例は、2 回の正常妊娠後、胞状奇胎の妊娠歴を有し、臨床的には胞状奇胎由来の絨毛癌と考えられていた。しかし RFLP 解析では、正常妊娠由来であることが判明し、絨毛癌の従来考えられていた発生機構とは異なるものが存在すると思われ注目される。また妊娠の既往がない症例では、絨毛癌組織の DNA で患者の片方のアレルのみがみられ、第 1 減数分裂終了後の未受精卵に由来する非妊娠性絨毛癌である事が確認された。現在まで非妊娠性絨毛癌の診断方法がなかったため非常に有用な方法と考えられた。現在さらに症例数を増やし検討中である。

H. 睾丸性女性化症のアンドロゲン受容体遺伝子の点突然変異に関する検討（有馬，今村，佐々木，和気）

睾丸性女性化症（TF）は、遺伝的には 46XY 男性型であるにもかかわらず、表現型が全く女性である劣性遺伝病である。その原因の 1 つとして、アンドロゲンレセプター（AR）の異常が指摘されている。我々は TF の 2 家系の AR について PCR-SSCP 解析法を利用し点突然変異の領域を同定した。いずれも、ステロイド結合ドメインの点突然変異で、このアミノ酸置換により AR へのアンドロゲン結合活性を低下させ、TF を引き起こしたものと推察された。現在さらに症例の追加および個々の家系調査を行い、遺伝的背景について解析中である。

I. 胎盤発生過程における Genomic Imprinting の関与に関する研究（有馬，今村，和気）

Genomic Imprinting とは、両親間のゲノムが各々特異的な非遺伝的修飾をうけることを意味する。胎盤発生過程には、父親由来のゲノムが重要な役割を果たすことが、マウスの実験で知られている。一方、非遺伝的な修飾の実体には、DNA のメチル化が大きく関与していると考えられている。我々は、胎盤組織で発現の増大する hCG 遺伝子の promoter 領域、逆に発現が抑制される HLA 遺伝子領域に関して、両親間のゲノムで構成されるヒト正常絨毛（初期，末期）と父親由来のゲノムのみで構成される胞状奇胎、さらに精子，単為発生を原因とする卵巣

皮様のう腫間でメチル化の程度を比較検討中である。(さらに、最近マウスでは Imprinting gene として IGF II receptor や IGF II について、報告されている。我々は human において検討中である。)

J. 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, 三輪, 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の特徴を示し、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, ウェスタンブロット法により細胞骨格構築の変化を検討した。その結果, 1 番染色体を単一移入した HHUA 細胞のみ正常子宮内膜細胞と同様にアクチンストレスファイバー形成を示した。さらにアクチンおよび細胞接着斑に局在するピンキュリンの発現量は, 親細胞の約 7 倍以上に増加していた。このことから癌抑制のカテゴリーの一つとして考えられている老化に伴い細胞骨格構築は正常に復するが, その発現量は著明に増加することが明らかとなった。さらに, 老化によらない癌抑制と細胞骨格との関連を検討する目的で, Brdu Hoechst 33258 を用いて子宮内膜癌細胞 HHUA より平坦な細胞 (Flat Revertant) を選択した。この Flat Revertant 細胞は, ノードマウスでの造腫瘍性および足場非依存性増殖能を消失していたが, 永代増殖能は有し, さらに正常子宮内膜細胞と同様にアクチンストレスファイバーを形成していた。現在, この Flat Revertant 細胞についてアクチンストレスファイバー形成に関与するアクチンおよびアクチン関連蛋白の発現変化について検討している。

K. 活性型 K-ras に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS) を用いた子宮内膜癌の遺伝子治療に対する基礎的検討 (宮本, 加藤, 今村, 西田眞, 三輪, 和気)

ヒト子宮内膜癌においては K-ras 遺伝子の点突然変異が 20% 程度の頻度で観察されている。そこで, ヒト子宮内膜癌への遺伝子治療の応用を目的として, まず, 活性型 K-ras に対する 13 残基のアンチセンス (ホスホチオエート型) を作製し, K-ras の 12 番目のコドンに点突然変異を有する子宮内膜癌細胞株 HHUA に対して, 作製した AS を添加した。その結果, 一過性ではあるが ^3H -Thymidine の取り込みと増殖速度の抑制が観察された。現在, この抑制機構について K-ras 蛋白の発現変化および AS の細胞内移行, その安定性について検討中である。

L. 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。F 344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变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、免疫沈降法により細胞骨格構築の変化を検討した。その結果、各細胞間でアクチン総量に変化は認めなかったが、アクチンストレスファイバーはREFとE7のみに認め、E7+E1Bではファイバーの配列がやや乱れ、E7+EJrasではストレスファイバーは完全に消失していた。さらに、アクチン関連蛋白であるヴィンキュリン、インテグリンファミリーのひとつであるファイブロネクチンレセプターにも量的変化が認められた。現在、HPVの自然宿主であるヒトケラチノサイトについてもHPV感染による細胞骨格構築の変化について検討を行っている。

M. 子宮頸癌、子宮体癌発生における癌抑制遺伝子の関与についての検討 (三輪, 吉河, 宮本, 今村, 西田眞, 和気)

1) 子宮頸癌発生においては、HPV が80-85%の率で感染しており、残りの15-20%については、HPV 関与がないと報告されている。このため HPV 陰性例について癌抑制遺伝子である p 53, RB 遺伝子の変化の有無を解析している。症例は、前癌状態である異型上皮例から子宮頸癌進行例で HPV 陰性例についてはその予後調査も同時に行う。

2) 子宮体癌発生において、癌抑制遺伝子である p53の変化の有無を免疫組織染色で検討している。これらの症例では同時に p53遺伝子解析を PCR-SSCP 法で同時に行っているため、遺伝子変化とその産物の異常発現との関わりを明らかにすることが可能である。

原著論文

1. Kato,H., Nishida,J., Honda,T., Miyamoto,S., Fujinaga,K. and Wake,N., 1992.

Chromosome alterations contributed to neoplastic progression of transformed rat embryonal fibroblasts.

Cancer Genet. Cytogenet, 58, 28-34.

2. Miyamoto,S., Makino,N., Shimokawa,H., Akazawa,S., Wake,N., Nakano,H., 1992.

The characteristics of erythrocyte sodium transport systems in normal pregnancy and

- pregnancy induced hypertension.
J.Hypertension, 10, 367-372.
3. Imamura,T., Arima,T., Kato,H., Miyamoto,S., Sasazuki,T., Wake,N., 1992.
Chromosomal deletions and K-ras gene mutations in human endometrial carcinomas.
Int. J. Cancer, 51, 1-6.
 4. Sasaki,M., Oshimura,M., Wake,N., 1991.
Cell hybrids between human endometrial carcinoma cells and normal fibroblasts
recover tumorigenic potential by the loss of chromosome4.
Genes, chromosome and Cancer, in press.
 5. Miyamoto,S., Nishida,M., Sasaki,M., Oshimura,M., Kato,H., Wake,N., 1991.
Introduction of a single chromosome 1 into human endometrial carcinoma cells
viamicrocell fusion induces the cytoskeletal changes.
J.Cell. Biol, submitted.
 6. Sasaki,M., Yamada,H., Wake,N., Oshimura,M., 1991.
Suppression of transformed phenotypes of a human choriocarcinoma cell line CCI by a
single chromosome 7 transfer via micro cell fusion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, submitted.

総 説

1. 杉尾賢二, 和気徳夫, 佐々木雅弘, 有馬隆博, 1991.
染色体遺伝学の進歩と臨床応用.
日本臨床, 49, 2816-2821.
2. 和気徳夫, 1991.
胞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, 2, 66-74.
3. 和気徳夫, 佐々木雅弘, 有馬隆博, 1991.
細胞遺伝学よりみた絨毛の発生について.
産婦人科の実際, 40, 印刷中.
4. 加藤秀則, 西田純一, 和気徳夫, 1991.
正常型 p53遺伝子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.
5. 加藤秀則, 西田純一, 本多つよし, 佐々木雅弘, 今村利朗, 和気徳夫, 1991.
癌抑制遺伝子.
産婦人科の実際, 40 (9), 1285-1290.

6. 宮本新吾, 西田 眞, 和氣徳夫, 1991.
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.
Oncologia, 24 (2), 129-130.
7. 宮本新吾, 佐々木雅弘, 西田 眞, 和氣徳夫, 1991.
絨毛癌化とその分子機構.
HUMAN CELL, 4 (1), 38, 43.
8. 西田純一, 加藤秀則, 和氣徳夫, 1991.
アンチセンス DNA の遺伝子治療への応用.
オンコロジヤ, 24, 6, 43.
9. 西田 眞, 和氣徳夫, 1991.
子宮頸癌進行症例に対する治療.
モダン・クリニカルポイント産婦人科, 金原出版, 印刷中.
10. 有馬隆博, 宮本新吾, 和氣徳夫, 1992.
子宮内膜症と流産.
臨床婦人科産科, 46, 1, 60-61.

学会発表

第43回 日本産科婦人科学会学術講演会 (3月・京都)

宮本新吾, 西田 眞, 加藤秀則, 和氣徳夫

: 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

加藤秀則, 西田純一, 本多つよし, 有馬隆博, 西田 眞, 宮本新吾, 笹月健彦, 和氣徳夫

: 正常 p53遺伝子導入による子宮内膜癌細胞株の造腫瘍性の抑制

今村利朗, 森 敏尚, 谷口一郎, 自見昭司, 笹月健彦, 和氣徳夫

: 子宮内膜癌におけるヘテロ接合性の消失

西田純一, 加藤秀則, 本多つよし, 有馬隆博, 西田 眞, 宮本新吾, 笹月健彦, 和氣徳夫

: 正常 p53遺伝子導入による子宮頸癌細胞株の造腫瘍性の抑制

西田 眞, 宮本新吾, 加藤秀則, 佐々木雅弘, 押村光雄, 和氣徳夫

: 子宮内膜癌細胞株における正常ヒト単一染色体移入にともなう細胞骨格蛋白・細胞接着蛋白の変化

佐々木雅弘, 和氣徳夫, 押村光雄

: 細胞融合法によるヒト子宮内膜癌細胞株 (HHVA) の造腫瘍性抑制に係わる染色体の検索

第40回 日本産科婦人科学会九州連合地方部会 (5月・宮崎)

西田 眞, 加藤秀則, 宮本新吾, 有馬隆博, 西田純一, 本多つよし, 和氣徳夫

：子宮頸癌に対する初回治療としてのシスプラチン動注療法の効果

第9回 絨毛性疾患懇話会（5月・富山）

シンポジウム

和気徳夫：細胞遺伝学からみた奇胎絨毛の発生

有馬隆博，和気徳夫：胎盤発生過程における Genomic Imprinting の関与について

第50回 日本癌学会総会（9月・東京）

宮本新吾，西田 眞，佐々木雅弘，加藤秀則，押村光雄，和気徳夫

：子宮内膜癌細胞株における正常ヒト染色体単一移入にともなう細胞骨格タンパクの変化

加藤秀則，西田純一，本多つよし，笹月健彦，和気徳夫

：正常型 p53 遺伝子導入による子宮内膜癌細胞株の造腫瘍性の抑制

今村利朗，笹月健彦，和気徳夫

：子宮内膜がん発生機序の遺伝子解析

白沢専二，今村利朗，利谷幸治，柳川右千夫，和気徳夫，笹月健彦

：大腸がん細胞株の染色体，遺伝子解析

西田純一，加藤秀則，本多つよし，笹月健彦，和気徳夫

：正常型 p53 遺伝子導入による子宮頸癌細胞株の造腫瘍性の抑制

西田 眞，宮本新吾，加藤秀則，和気徳夫

：ラット胎児線維芽細胞の多段階的形質転換過程における細胞骨格の変化

佐々木雅弘，和気徳夫，押村光雄

：正常 1，18 番染色体移入による 2 種のヒト子宮内膜がん細胞株（HHUA, Ishikawa）の造腫瘍性抑制とその in vitro 特性