

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791137  
 研究課題名（和文） 卵巣顆粒膜細胞におけるダイオキシン類のシグナル伝達系の解明  
 研究課題名（英文） The mechanism of signaling pathway of dioxins on ovarian granulosa cells  
 研究代表者  
 平川 隆史（HIRAKAWA TAKASHI）  
 群馬大学・ 大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：80375534

研究成果の概要：先行研究で卵巣顆粒膜細胞においてFSH刺激によるゴナドトロピン受容体発現がダイオキシン類の存在下に抑制されることが示されたため、本研究ではその機序の解明を試みた。ダイオキシン類のシグナル伝達に關与するタンパク群の卵巣顆粒膜細胞への遺伝子導入を試みたが、免疫沈降実験によるタンパク質結合や共焦点顕微鏡による細胞内局在の検討を行うのに十分な遺伝子導入は得られなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	300,000	2,900,000

研究分野：生殖内分泌学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：内分泌攪乱物質、卵巣機能、顆粒膜細胞、ゴナドトロピン受容体

#### 1. 研究開始当初の背景

平成17年版国民生活白書によると、年々不妊に悩むカップル数は増加傾向にあり、不妊治療を受けている患者の総数は、1999年の28万4800人から2003年には46万6900人と、この4年間で1.6倍に増加している。この受診率増加の背景として、不妊治療に対する社会認識の変化や晩婚化に伴う生殖年齢の上昇などが考えられるが、ヒトの生殖能の低下に起因している可能性も想定される。生殖能低下の要因として、環境中の化学物質、いわゆる内分泌攪乱物質の関与が注目されている。内分泌攪乱物質が社会的に問題視されたのは、従来の毒物学で観察

されていた急性毒性や発癌性を誘起する濃度より低い濃度において内分泌攪乱作用が発揮された点や、生物における蓄積性が高く、食物連鎖の頂点にある人類において最もその作用が懸念されたことによる。

ダイオキシン類は内分泌攪乱物質の中でも古くからその毒性が認識されていた。ラットへのダイオキシン類の経口投与により排卵数の減少が起こることや、ダイオキシン類を投与したアカゲザルに子宮内膜症の発生頻度が増加することから、内分泌攪乱物質が疾患の発症に關与し、不妊症の一因となりうることを示唆されている。ヒトにおける内分泌攪

乱の可能性を懸念させる要素の一つとして、内分泌攪乱物質が血清、卵胞液、羊水、母乳中から検出されることが挙げられる。しかしながらその量は微量であり、内分泌環境に影響を与えているか否かについては未だ明確な確証は得られていない。

我々は、内分泌攪乱物質の生殖能に対する影響に関して、ラット顆粒膜細胞初代培養のモデルを用いて検討を行ってきた。この先行研究において、卵巣顆粒膜細胞におけるFSH刺激によるゴナドトロピン受容体発現が、ダイオキシン類の存在下に抑制されることが示された。

## 2. 研究の目的

ダイオキシン類は Ah 受容体と呼ばれる受容体に結合することによりその薬理作用を発揮することが知られている。Ah 受容体は通常細胞質に存在しているが、ダイオキシン類が細胞に入り込んだ際結合し、細胞質から核内へ移動する。核内で ARNT と呼ばれるタンパク質と複合体を形成し、標的遺伝子の XRE 配列に結合することにより転写活性を修飾していると考えられている。Ah 受容体の活性化により CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの薬物代謝に関与する酵素群が誘導されることが知られている。

Ah 受容体の活性化が如何に FSH 刺激による FSH 受容体を介するシグナル伝達系路に影響を与えるか、今日まで明瞭な答えは得られていない。本研究の目的は、顆粒膜細胞におけるダイオキシン類のシグナル伝達経路を解明し、その活性化が如何に本来の顆粒膜細胞のシグナル伝達経路を攪乱するか、特に LH 受容体発現を如何に抑制するかを検討することとする。

内分泌攪乱物質による生殖機能への影響に関する検討は、ヒト以外の実験動物での研究が先行している。ヒトに関しての検討は培養細胞を用いた報告が散見される程度で、通常体外受精の採卵の際に採取した黄体化顆粒膜細胞を用いて実験が行われる。この場合、患者の個体差によって実験結果に再現性が乏しくなることやhCG投与後の黄体化顆粒膜細胞だけしか採取できないことが問題となる。そのため、一定のFSH受容体を発現しており、生理的に卵胞期の状態に類似したヒト顆粒膜細胞の細胞株が望まれていた。KGN細胞はヒト顆粒膜細胞腫由来の細胞株であり、若干の内因性のFSH受容体を有しており、顆粒膜細胞固有のシグナル伝達経路を保持している細胞株と考えられている。我々はKGN細胞にFSH受容体を一過性に発現させる方法

を確立した。今回この細胞を用い、ヒト顆粒膜細胞においても同様の実験を行う。

## 3. 研究の方法

(1)ラット卵巣顆粒膜細胞におけるダイオキシン類のシグナル伝達経路の解明  
①ダイオキシン類によるAh受容体-ARNT複合体形成の確認および細胞内局在の検討

まずラット顆粒膜細胞に内因性のAh受容体およびARNTが発現しているか確認するため、細胞よりLysateを抽出し抗Ah受容体抗体、抗ARNT抗体を用いたWestern blot法にてそれぞれのタンパク質の発現状況を検出する。

次にダイオキシン類がAh受容体に結合し、Ah受容体-ARNT複合体が形成されるか否かを検討するため以下の実験を行う。ラット顆粒膜細胞にmycエピトープAh受容体(以下myc-AhR)とFLAGエピトープARNT(以下FLAG-ARNT)を遺伝子導入した後、Ah受容体リガンドである2,3,7,8-TCDD、3-Methylcholanthrene(3MC)および

3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl(PCB)で刺激する。whole cell lysateを抽出し、抗myc抗体を用いてcell lysateを免疫沈降し、沈降物をSDS-PAGEで分離後、抗FLAG抗体を用いFLAG-ARNTが検出されるか検討する。ラット顆粒膜細胞への遺伝子導入はロッシュ社Fugene 6を用いる。

Ah受容体が核内に移行することを証明するため、myc-AhR、FLAG-ARNTを遺伝子導入した顆粒膜細胞を2,3,7,8-TCDD、3MC、PCBで刺激し、myc-AhR、FLAG-ARNTの細胞内局在を抗myc-FITC抗体、抗FLAG-TRITC抗体を用いた共焦点顕微鏡実験にて検出する。Ah受容体活性化前はAh受容体が細胞質に、ARNTが核内に局在し、活性化後Ah受容体、ARNTはともに核内に局在し、両者の信号が重なって観察されることが予想される。

②AHR-ARNT複合体形成後の標的遺伝子誘導の同定

卵巣顆粒膜細胞におけるAh受容体を介するシグナリングで誘導される遺伝子群として、CYP1A1、CYP1B1、Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)の3遺伝子が同定されている。また、肝細胞においてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、NAD(P)H quinone oxidoreductaseなど遺伝子がAh受容体の活性化によって誘導されることが示されている。これらの遺伝子の転写活性に対してAh受容体を介するシグナル伝

達経路が影響を及ぼすか否かを検討するため、それぞれのプロモーター領域の塩基配列を導入したルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、ベクター遺伝子を卵巣顆粒膜細胞に遺伝子導入し、ダイオキシン類投与に伴う Ah 受容体活性化に伴うルシフェラーゼレポーターベクターの転写活性の変化を観察する。ダイオキシン類により転写活性が変化した遺伝子における mRNA およびタンパク質の発現状況が実際に変化しているか否か観察するため、Ah 受容体シグナリングを活性化させ、標的遺伝子の発現状況を観察する。mRNA レベルでの遺伝子発現を Northern blot 法または定量的 RT-PCR 法で、蛋白レベルでの発現を Western blot 法で検討する。

(2) ヒト卵巣顆粒膜細胞 (KGN 細胞) におけるダイオキシン類のシグナル伝達経路の解明

KGN 細胞にヒト FSH 受容体をインビトロジェン社リポフェクタミンを用いたリポフェクション法にて遺伝子導入し、ヒト FSH 受容体を過剰発現させる。ラット顆粒膜細胞の実験で得られた情報を参考にし、FSH 受容体を過剰発現させた KGN 細胞においても同様のアプローチで実験を行う。

(3) ダイオキシン類により誘導された遺伝子産物による LH 受容体の発現抑制の機序の解明

ダイオキシン類による Ah 受容体活性化に伴う LH 受容体 mRNA の発現抑制の機序として、① FSH 受容体活性化から LH 受容体遺伝子の転写までのシグナル伝達系が阻害されること (Protein kinase A の阻害など)、② LH 受容体遺伝子の転写活性の抑制、③ LH 受容体 mRNA の不安定化の 3 通りの可能性が考えられる。我々はラット顆粒膜細胞における

2, 3, 7, 8-TCDD の LH 受容体発現抑制の機序として LH 受容体遺伝子の転写の抑制と LH 受容体 mRNA の不安定化の二つの機序が同時に関与していることを報告した (Arch Biochem Biophys. 375(2): 371-6)。研究 2 年目は Ah 受容体を介するシグナリングが、如何に LH 受容体の転写抑制や mRNA の不安定化に関与するかを検討する。

まず Ah 受容体を介するシグナリングと FSH 受容体を介するシグナリングのクロストークに関与する可能性を有するタンパク質 (仮に X とする) を同定する。方法として X の候補となる下記のタンパク質を遺伝子導入により過剰発現させ、Ah 受容体活性化後の LH 受容体 mRNA 発現抑制が増強されるか否かを評価し、

候補遺伝子がシグナリングのクロストークに関与するか検討する。候補遺伝子として① 2, 3, 7, 8-TCDD により活性化する遺伝子群 (CYP1A1, CYP1B1 など)、② LH 受容体の転写に関与するとされる転写因子 (NGFI-A, SP-1, SP-3 など)、③ LH 受容体 mRNA の安定性に関与するとされるタンパク質 (LRBP-1) などが挙げられる。過剰発現による実験方法で LH 受容体 mRNA 誘導に差が見られなかった場合、RNAi を用いた遺伝子発現抑制によって LH 受容体 mRNA 発現の変化を評価する。具体的な実験手技として以下の方法を用いる。

- LH 受容体 mRNA の定量は RNA probe を用いた Northern blot 法または定量的 RT-PCR 法にて行う。
- LH 受容体転写活性の評価として、LH 受容体プロモーター領域の塩基配列を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子を顆粒膜細胞に導入することによって LH 受容体の転写活性を評価する。ルシフェラーゼアッセイで転写活性の差を検出できない場合、Nuclear Run-on assay によっても転写活性の評価を行う。
- LH 受容体 mRNA の安定性に関する評価は、培養細胞に Actinomycin D を添加することによって翻訳抑制を行い、その後の LH 受容体 mRNA 発現の経時的な変化を Northern blot 法にて観察し、mRNA の安定性を評価する。

#### 4. 研究成果

21 日齢 Wistar ラットに 5 日間 DES 処理し、顆粒膜細胞の初代培養を行った。この培養系に myc エピトープ Ah 受容体 (以下 myc-AhR) と FLAG エピトープ

ARNT (以下 FLAG-ARNT) の遺伝子導入をすることで、細胞内シグナル伝達に関与する蛋白の同定を試みたが、リポフェクション法、CaCl<sub>2</sub>法などでの複数の方法で、いずれの方法をもっても遺伝子導入は低く、免疫沈降実験によるタンパク質結合や共焦点顕微鏡による細胞内局在の検討を行うのに十分な遺伝子導入は得られなかった。

ヒト顆粒膜細胞株である KGN 細胞においても遺伝子導入を試みたが、ラット顆粒膜細胞と同様に導入効率が著しく低く、免疫沈降実験や共焦点顕微鏡での検討に必要な発現レベルに至らなかった。

今後、遺伝子導入効率を高めるべく、遺伝子導入の方法の再検討やエピトープタグの種類や挿入位置を変えたコンストラクトの作成することでの導入効率の改善を検討している。

一方、ラット卵巣顆粒膜細胞では、ダイオキシン反応性のP450としてCYP1B1のみが誘導されていることが判明した。CYP1B1は、エストロゲンを酸化してカテコールエストロゲンに変換する酵素と言われている。カテコールエストロゲンはそれ自身強い変異源性を有することから、子宮内膜癌の発生源の一つであるとする説が有力である。さらに、エストロゲンの代謝が進むことにより、エストロゲンによるFSHレセプター発現に抑制的に作用することが予測される。このことは、ダイオキシンのFSHレセプター発現抑制の間接的メカニズムを示すこととなった。今後さらに、この実験結果の詳細を検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Nakamura K, Aoki H, Hirakawa T, Murata T, Kanuma T, Minegishi T. Compartment syndrome with thrombosis of common iliac artery after gynecologic surgery. *Obstet Gynecol.* 112:486-8, 2008, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 川田亜公子, 山下宗一, 村田知美, 平川隆史, 青木宏, 中村和人, 峯岸敬. 膣壁に発生したMalignant peripheral nerve sheath tumorの一例. 第116回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会・学術集会, 2008. 11. 30, 栃木
- ② 家坂直子, 平川隆史, 村田知美, 青木宏, 中村和人, 鹿沼達哉, 峯岸敬. 肺血栓塞栓症を合併した卵巣癌の抗凝固療法中Heparin-Induced Thrombocytopeniaをきたした1例. 第115回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会および学術集会, 2008. 6. 1, 東京
- ③ 青木宏, 村田知美, 平川隆史, 中村和人, 鹿沼達哉, 峯岸敬. リンパ節転移陽性子宮頸癌に対する後療法としての化学療法併用放射線治療 (CCRT) の検討. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会, 2008. 4. 13, 神奈川
- ④ 中村和人, 青木宏, 平川隆史, 村田知美, 鹿沼達哉, 峯岸敬. 準広汎子宮全摘中に生じたと思われる左下腿コンパートメント症候群の一例. 第114回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会および学術集会, 2007. 10. 1, 群馬

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平川 隆史 (HIRAKAWA TAKASHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80375534