

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「内分泌かく乱物質」

研究課題「生殖系での低濃度内分泌かく乱物質

関連遺伝子データベースの構築」

研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成17年10月

研究代表者：宮本 薫
(福井大学医学部・教授)

1 研究実施の概要

低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に対しても影響を与える可能性が示唆されているが、それを示す具体的なデータが不足しているのが現状である。私どもは、低濃度のダイオキシンをはじめとする内分泌かく乱物質が女性生殖器系に及ぼす影響を遺伝子発現の変化として捕らえ、それらの遺伝子を同定してデータベースを構築することを目指して本研究をスタートさせた。本研究の全体概要は、大きく3つに大別される。1) 遺伝子発現の網羅的解析法の開発と確立、2) 生殖系での低濃度内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースの構築、3) それらの遺伝子の詳細な発現解析による低濃度内分泌かく乱物質の作用機構の解明、の3点である。

1) 本研究において、まずはじめに取り組んだのは、遺伝子発現の網羅的解析法の開発確立である。様々な遺伝子発現の網羅的解析法の中から、微量サンプルからの解析に適している点などを考慮して、サブトラクションクロニングの一種である RDA (Representational Difference Analysis)法を微量化し、microRDA 法を開発した。本法の特色は、繰り返しサブトラクションを行うことでその効率を高める点と、各サブトラクションサイクルでの PCR 増幅を行う点で、微量サンプルからの解析が可能である。さらにもう一つの網羅的解析法として DNA マイクロアレイを採用し、これら2つの方法を併用して網羅的解析を行った。DNA マイクロアレイを行う際にも、微量サンプルからのプローブ合成を可能とするために、T7-polymerase を利用した微量サンプル mRNA からのプローブ調製法として TALPAT 法を確立した。さらに、これらの方法で得られた生殖系での内分泌かく乱物質感受性候補遺伝子すべてについて、real-time PCRにより、それぞれの遺伝子の内分泌かく乱物質による誘導性もしくは抑制性を検証し、最終的な同定を行った。

2) 上述の網羅的解析法を用いて、in vivo 及び in vitro でのダイオキシン(TCDD)の影響、in vivo でのジェチルステルベステロール(DES)の影響を遺伝子発現の変化として解析した。解析の結果、低濃度ダイオキシン感受性遺伝子群約600遺伝子、DES感受性のラット卵巢遺伝子群約100遺伝子を同定し、DNA データベースを作成しホームページ上で公開した。データベースには、サブトラクションクロニング、DNA マイクロアレイ及び real-timePCRにより同定したすべての遺伝子に関して、それぞれの完全長 cDNA クローンの配列と所在を示す Accession No.、対応する遺伝子の種の違いによる塩基配列及びアミノ酸配列の情報を示す Unigene No.、染色体上の位置、組織分布、関連する遺伝病、3次元構造等の情報を含む LocusLink、さらに human homolog に関する様々な情報を含む GeneCard を有機的に統合した DNA 情報データベースを構築した。さらに、各遺伝子の発現定量のための real-time PCR primer set の配列データ、及び各遺伝子のそれぞれの機能的関連因子を網羅的にピックアップした pathway figure を同時に表示し、これらの遺

公開資料

伝子の発現変化が細胞や組織に与える影響などを考察できるようにしたデータベースを公開している(<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html>)。

データベースは、それぞれ独立した8つの実験から得られたものである。卵巢関連では、1)ホルツマン系ラット妊娠15日目に TCDD1600ng/kg を経口投与し妊娠20日目に卵巢を採取し遺伝子発現の変化を解析したもの(サンプルは国立環境研・遠山先生(現東京大学)との共同研究として提供を受けた)。2)未分化のラット卵巢顆粒膜細胞の初代培養系に TCDD 最終濃度 100pM を加え48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。3) FSH により分化誘導を行ったラット卵巢顆粒膜細胞に TCDD 最終濃度 100pM を加え、同様に48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。4)ヒト卵巢顆粒膜細胞株 KGN 細胞に TCDD 最終濃度 100ng/ml を加え、同様に24-48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。子宮内膜関連としては、5)ヒト子宮内膜上皮細胞株 RL95-2 細胞に TCDD 最終濃度 100ng/ml を加え、同様に24-48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。胎盤関連では、6)ホルツマン系ラット妊娠15日目に TCDD1600ng/kg を経口投与し妊娠20日目に胎盤を採取し遺伝子発現の変化を解析したもの(1の実験の動物から採取)。7)患者の同意を得た上でヒト胎盤から羊膜細胞を採取・初代培養し、TCDD 最終濃度 1nM を加え、48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。8)幼若ラットにジエチルステルベステロール(DES)を24時間ごとに4日間腹腔内投与し、卵巢における遺伝子変化を解析したもの、である。データベースでは、これらの実験で得られた結果を、real-time PCR によって解析を行った全ての遺伝子、誘導が確認された遺伝子、抑制が確認された遺伝子の3群に分けて表示している。

3) 本研究では、上記のデータベースを利用して、生殖系における TCDD や DES の作用とそのメカニズムを解析した。まず、胎盤に対する TCDD の作用では、TCDD の典型的なターゲット遺伝子と思われる CYP1A1 および CYP1B1 がともに強く誘導されており、in vivo の系においても 1600ng/kg の微量の TCDD でも十分に作用を発揮していることが確認された。その上で、極めて特徴的だった点としてグルコース輸送体である GLUT1—GLUT4 までの遺伝子発現が全て強く誘導されていたことが挙げられる。遠山らは、同様の処理をしたラット胎盤でグリコーゲン顆粒の蓄積を認めていること、またグルコース輸送体の遺伝子発現が低酸素状態で誘導されることから、ホルツマン系ラットの胎盤では低濃度のダイオキシン(TCDD)暴露によって低酸素状態が誘起され、その結果グルコース輸送体の遺伝子発現誘導および胎盤でのグリコーゲン顆粒の蓄積が生ずるものと考えられる。さらに興味深い点は、多くのインターフェロン誘導性の遺伝子群が、胎盤で強く誘導されていたことである。同様にヒト羊膜細胞の初代培養系に TCDD を加え遺伝子発現の変化を解析すると、胎盤組織で得られた結果と同様、多くのインターフェロン誘導性の遺伝子群の誘導が観察された。また後述べる TCDD 処理したラット卵巢(胎盤と同時に採取)では、これらインターフェロン誘導性の遺伝子群の発現誘導が観察されなかったことから、これは

胎盤もしくは胎盤由来組織に特有の現象かもしれない。また、胎盤での結果と異なり、羊膜細胞培養系では TCDD 投与によりグルコース輸送体遺伝子群の誘導は見られなかった。羊膜細胞培養は通常の培養条件で行ったため、胎盤とは異なり低酸素状態で誘導されるこれらの遺伝子群は誘導されなかったと思われる。

一方、卵巣に対する TCDD の作用として、特徴的な点は、多くのステロイド合成に関与する遺伝子群に発現抑制が見られた点である。卵巣顆粒膜細胞の分化には FSH による LH 受容体の発現誘導が必須であるが、TCDD はこの発現を低濃度で抑制した。この FSH の作用は cAMP-PKA pathway を介するものと考えられるが、TCDD は cAMP の産生にはほとんど影響を与えず、nuclear run-on assay と mRNA の安定性を検討した結果、転写レベルでの抑制と mRNA の不安定化により発現量の低下が生じていることが示唆された。

強いエストロゲン様作用をもつ内分泌かく乱物質である DES を幼若ラットに投与し、その *in vivo* での卵巣に対する影響をデータベースに基づき解析した。21日令ラットに DES を4日間投与すると未分化の卵巣顆粒膜細胞が異常増殖することから、卵巣に対する DES は主に顆粒膜細胞に作用すると考えられたが、データベースでは DES により抑制される遺伝子群は卵巣夾膜細胞で主に発現している遺伝子群が多く同定されていた。それらの中でも immediate early 遺伝子である NGFI-B(Nurr77)は DES 投与後2時間で、その卵巣夾膜細胞での発現が失われていた。血中の LH および FSH 濃度を測定すると、LH 濃度は DES 投与後10分以内に急速に低下し、その低下は12時間持続していた。下垂体からの LH 分泌は視床下部からの GnRH の刺激に完全に依存しているため、この血中 LH 濃度の急激な低下は、DES による non-genomic な作用により、視床下部からの GnRH 分泌が抑制された結果であることが強く示唆された。DES 投与による NGFI-B の発現抑制も、この血中 LH 濃度の低下と良く一致している。これらの結果と、NGFI-B の発現は LH によって強く誘導されること、下垂体摘除したラットでは NGFI-B の発現が著しく低下していることなどを考え合わせると、DES による卵巣夾膜細胞での NGFI-B の発現抑制は、視床下部一下垂体を介した LH 濃度の低下による間接的な影響であることが示唆された。さらに、卵巣夾膜細胞で主に発現している StAR、SR-BI、P450scc、P450c17などのステロイドホルモン合成関連遺伝子群も同様に DES 投与により比較的早期にその発現が抑制されることから、LH 分泌の低下による間接的な影響を受けていることが示された。そこで、下垂体での LH 分泌の変化の影響を除去するため、下垂体摘除を行った幼若ラットに DES を投与しその影響を解析した。その結果、これらの遺伝子の発現レベルは LH の刺激が無い場合 DES 投与前から著しく低下しているものの、DES 投与によってさらにその発現レベルが抑制されることが明らかとなった。この事は、DES は視床下部を介して間接的に作用すると同時に、卵巣夾膜細胞にも直接作用してステロイド合成関連遺伝子群の発現を抑制していることが強く示唆された。一方、DES により発現誘導される遺伝子群には卵巣顆粒膜細胞で主に発現している遺伝子群が多く見られた。インヒビン α 、 β A、 β B、FSH 受容体な

どの遺伝子群の発現の上昇が確認された。この際血中 FSH は LH とは異なり、DES 投与により早期には変化せず、投与後 24 時間以降徐々に上昇した。一方、下垂体摘除ラットでも、DES 投与によってこれらの遺伝子群の発現誘導が観察されたことから、DES の卵巣顆粒膜細胞に対する影響は直接的な作用であることが示唆された。また、卵巣顆粒膜細胞ではこのほか、転写調節因子 CITED-4 や HIF-2 α などが強く誘導されることが明らかとなった。CITED-4 は、C 末端に ED-rich ドメインを持つ新たに同定された CITED ファミリーの一員であり、核内コアクチベーター CBP/p300 と結合して転写を活性化すると考えられている。本研究で、エストロゲン受容体との相互作用の検討から CITED-4 はエストロゲン受容体の活性を増強することを明らかにした。またエストロゲン受容体の活性を抑制することが知られている DAX-1 は、CITED-4 とは反対に DES 投与により卵巣顆粒膜細胞でその発現が抑制されることが明らかとなった。これらのことは、DES が卵巣顆粒膜細胞に作用しその増殖を促進するとともに、エストロゲン作用そのものをも増強していることを示している。

HIF は低酸素状態で様々な遺伝子群を誘導する転写因子で、特に血管新生にかかわる増殖因子 VEGF の発現を強く誘導する。私共は、in situ hybridization による解析から DES が卵巣顆粒膜細胞での VEGF 遺伝子発現を促進することを初めて明らかにした。VEGF は強力な血管新生因子として知られ、卵巣においても排卵後の血管新生に関与すると考えられてきたが、私共は DES 処理による VEGF の卵巣における発現変化や in situ hybridization の結果から、卵巣においては VEGF が血管新生の促進よりもむしろ卵巣顆粒膜細胞の増殖に関与している可能性を示した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究を始めるにあたっての背景として、低濃度の内分泌かく乱物質が女性生殖器系に対しても影響を与える可能性が示唆されているものの、それを示す具体的なデータが不足していた状況があった。極めて低濃度のダイオキシンがサルの子宮内膜症を増加させるとの報告もあり、その真偽が注目されていた。特にこういった内分泌かく乱物質の作用を遺伝子発現の変化として捕らえ、生殖系で低濃度の内分泌かく乱物質によって誘導（若しくは抑制）される遺伝子全てを網羅した DNA データベースを構築することが、この研究分野の発展を後押しするとともに、社会的な要請ともなっていた。研究開始時点では、まだヒトゲノムの解析が進行中であり遺伝子発現の網羅的解析法も世界的に開発競争が行われていた。私共は、遺伝子発現の網羅的解析法としてサブトラクションクローニング法を確立し、ラット卵巣や卵巣顆粒膜細胞を用いて、ホルモン誘導性（抑制性）の遺伝子群を解析し、多くのゴナドトロピン誘導性のステロイド合成関連遺伝子群や転写因子群のクローニングに成功していた。そこで研究開始時の計画として、このサブトラクションクローニング法を利用して、生殖系の器官ごとあるいは細胞ごとに、低濃度の内分泌かく乱物質に

よって誘導（若しくは抑制）される遺伝子群を同定し、それらをデータベース化するという目標を設定した。また、内分泌かく乱物質の及ぼす影響については種による違いが指摘されており、ヒトにおける内分泌かく乱物質の有効量と作用を明らかにすることが求められていた。一般にヒトの細胞や組織は手に入りにくく、またその量も限られるケースが多いため、網羅的解析法としてさらに一層の微量化が求められた。そこで本研究では網羅的解析法のシステム化と同時に、できる限りのサンプルの微量化を図る事とした。サブトラクションクローニングでは数千単位の遺伝子クローンの単離とそれらの塩基配列の解析が必要なため、研究開始年度にプラズミド自動調製ロボットと高処理能力を持つ DNA シーケンサの導入を行い、サブトラクションクローニングの迅速化を図った。本研究開始後間もなくヒトゲノム解析が完成し、ヒト遺伝子が当初の予測よりも大幅に少ない2万余りである事が明らかとなり、全ての遺伝子を網羅した DNA チップが開発された。そこで、本研究でもサブトラクションクローニングに加え、網羅性に優れた DNA マイクロアレイ解析システムを導入し、2つの方法を併用して網羅的解析を行う事とした。一方、DNA マイクロアレイ解析は優れて統計的な手法であり、擬陽性シグナルの発生は避けられない。そこで、ピックアップした内分泌かく乱物質感受性の候補遺伝子全ての発現を定量するために、2年次に real-time PCR システムを導入する事とした。以降、全ての候補遺伝子について個々に発現量を定量して最終的な確認作業とした。

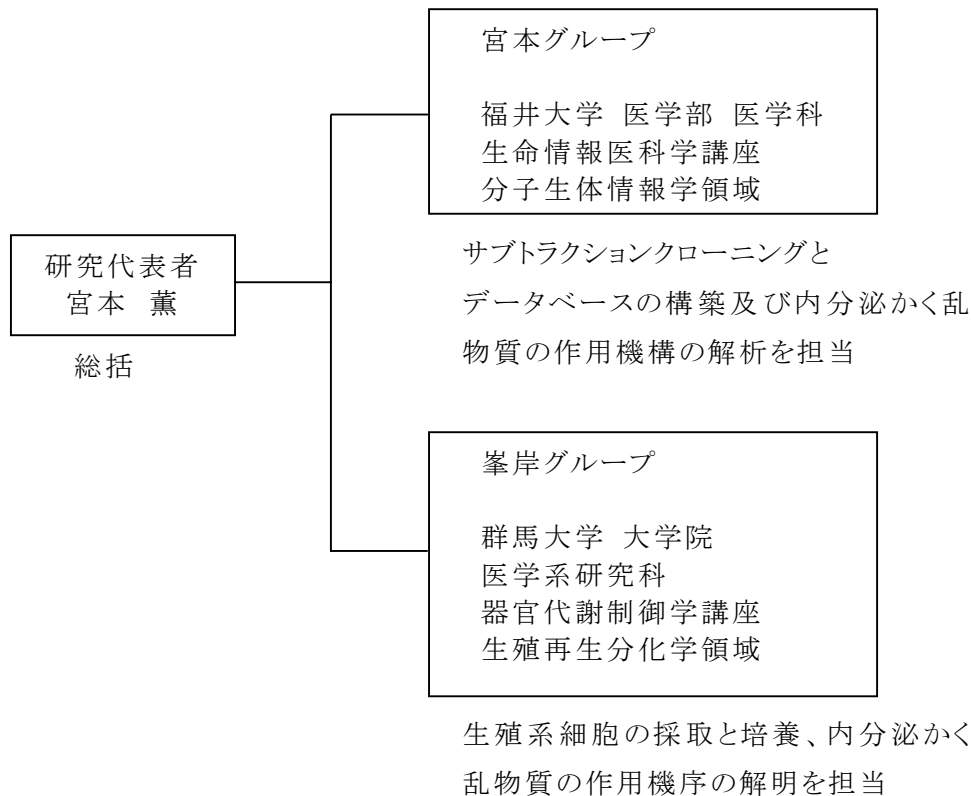
峯岸グループは、研究開始時点でラット卵巢顆粒膜細胞での FSH による LH 受容体の遺伝子発現が低濃度 (10-100pM) のダイオキシン (TCDD) によって阻害される事を発見していた。そこで、まず *in vitro* のラット卵巢顆粒膜細胞培養系を用いて、低濃度のダイオキシンによって誘導若しくは抑制される遺伝子群の解析を行う事とした。一方、*in vivo* での低濃度ダイオキシンの影響を解析するため、研究開始後2年で、国立環境研の遠山先生との共同研究でラット卵巢における *in vivo* での TCDD の影響を解析する事とした。その際、同時に胎盤のサンプルを頂き、同様の解析を行った結果、大変興味深いことに一連のインターフェロン誘導性遺伝子群が強く誘導されている事を発見した。この現象は、同じラットから採取した卵巢では起こっておらず、胎盤若しくは胎児由来組織に特有の現象であることが予想された。しかし、TCDD を用いた *in vivo* の実験は、その毒性が強いことから制約を受けるため、峯岸グループの協力を得てヒト羊膜細胞培養系を用いた *in vitro* の系を確立し、さらに詳細な検討を行う事ができた。

また、国立環境研・遠山先生との共同研究から、内分泌かく乱物質の作用解析には *in vivo* での解析が極めて大切であることを痛感し、私共の研究室でも制約なく実験できる DES を用いた *in vivo* での解析を行う事とした。驚いたことに DES は視床下部に作用して、non-genomic に GnRH 分泌、ひいては下垂体からの LH 分泌を極めて短時間 (10分以内) に抑制する事を発見した。これは、DES の内分泌かく乱作用として初めての発見である。また、DES が多くの卵巢夾膜細胞に主に発現しているステロイド合成関連遺伝子群を強く抑制することも、私共の遺伝子発現解析から判ってきた新しい作用である。また、卵

公開資料

巣顆粒膜細胞では、DES により血管新生因子として知られる VEGF が、顆粒膜細胞の増殖と同時に誘導されることを発見し、VEGF の卵巣における新たな役割を示唆することができた。これら DES 投与による卵巣性遺伝子群の発現変化から、新たなエストロゲン様内分泌かく乱物質の作用とそのメカニズムに関する研究が発展するものと期待される。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 サブトラクションクロニングとデータベースの構築及び内分泌かく乱物質の作用機構の解析(福井大学 宮本グループ)

3.1.1 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子の網羅的解析法の確立

(1)研究実施内容及び成果

内分泌かく乱物質の女性生殖器系への影響は、一般に考えられているよりも低濃度で現れる可能性が示唆されている。しかしながら具体的なデータが不足しているのが現状である。極めて低濃度のダイオキシン(126pg TCDD/kg/day)でサルの子宮内膜症が増加し

公開資料

たとの報告が衝撃を与えたが、それと反するデータもあり結論は得られていない。特に遺伝子発現の変化についての報告が待たれるところであった。私共は、生殖系での低濃度の内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースを構築する事を目指して本研究を開始した。遺伝子発現の網羅的解析法としては、Differential display 法、SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)法、DNA マイクロアレイ法、サブトラクションクローニング法などが報告されているが、それぞれ特色があり一長一短である。私共は以前から取り組んでいたサブトラクションクローニング法を改良し(Mizutani et al. Mol. Endocrinol., 15, 1693-1705, 2001)、微量 RDA (Representational difference Analysis)法として確立した。図1にサブトラクションクローニング法の原理と微量 RDA 法の概要を示す。

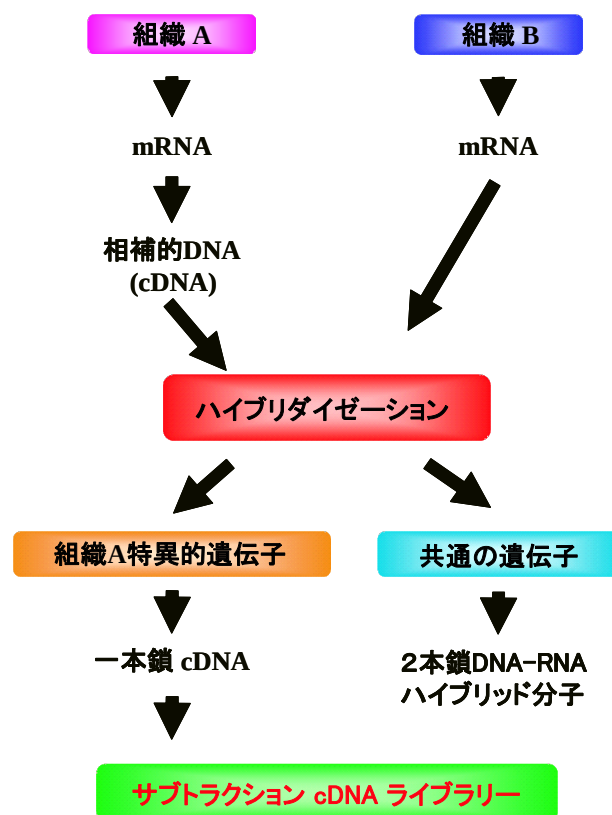


図1(a) サブトラクションクローニングの原理 相補的な DNA 同士 (あるいは、DNA と RNA) は、ハイブリダイゼーションによって2本鎖分子を形成する。共通に発現している遺伝子は2本鎖を形成し、組織Aにだけ発現する遺伝子は1本鎖として残るため、組織A特異的遺伝子を分離できる。

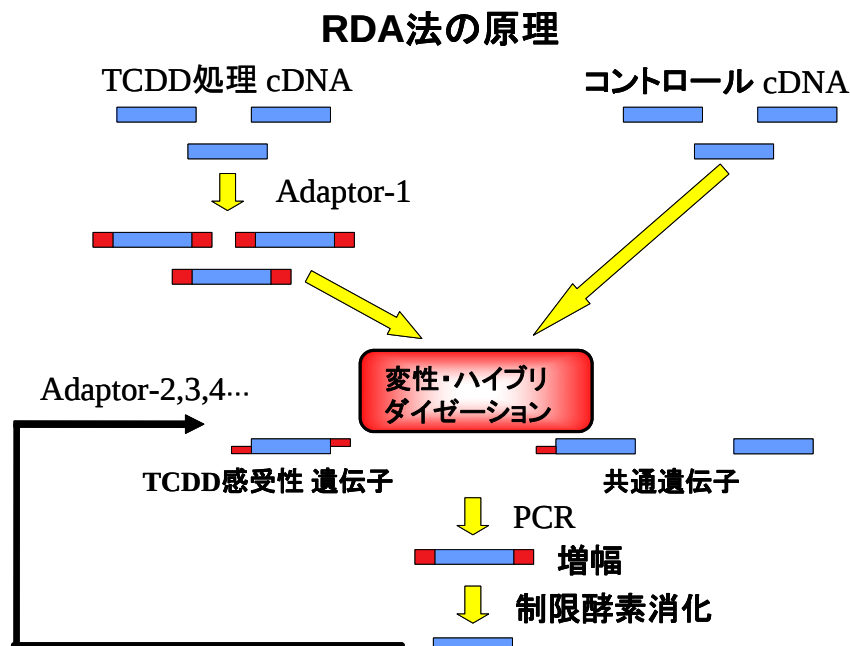


図 1(b) 微量 RDA 法の原理 断片化した cDNA にアダプターを連結し PCR 増幅する点が特徴。テスター特異的 cDNA は、変性・ハイブリダイゼーションの後、両端にアダプターが付加した 2 本鎖 cDNA を形成するため、テスター特異的 cDNA のみを増幅することが可能である。また制限酵素消化・アダプター付加を繰り返すことで、サブトラクション効率を高めることができる。

このようにしてサブトラクトされた cDNA 断片をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌クローンとして 2000 個—3000 個のクローンを単離し、それらの塩基配列を解析する。繰り返しのサブトラクションにより候補遺伝子は濃縮されているため、得られたクローンには数多くの重複が見られる。この段階で数百の候補遺伝子に絞られる。これら数百の候補遺伝子のそれぞれに対し real-time PCR による発現解析を行い、最終的に内分泌かく乱物質感受性遺伝子群を同定する。このようにして、ひとつの実験群で最終的に同定される遺伝子群は数十から百種類前後であった。一例として、Table1 にラット卵巣顆粒膜細胞に 100pM の TCDD 投与による遺伝子発現変化の解析結果を示す(Miyamoto, Environmental Sciences, 11, 47-55, 2004)。

Rat granulosa cell genes that are sensitive to a low dose of TCDD. Candidate TCDD-sensitive genes were qualitatively analyzed by RT-PCR using mRNAs from TCDD (100 pM)-treated and untreated cultured rat granulosa cells.

1, TCDD-inducible genes (9)	Microarray (Color Ratios)		Microarray (Color Ratios)
CYP1B1	5.99	Cyclin G1	2.95
Quinone reductase	5.88	PTB-like protein	2.94
UGT	2.86	gi 15144454	3.86
Mitochondrial genome	6.06	gi 14736324	3.60
Feritin light chain	6.02		
2, TCDD-suppressive genes (43)			
Filamin A	6.85	Plod2	3.88
Catenin α 1	5.34	Fkbp63	5.75
Talin	8.98	Tricarboxylate carrier-like protein	5.64
Disulfide isomerase-related protein (P5)	5.56	Lysyl oxidase	5.55
Calreticulin	11.92	SUP	5.10
Serpinh1	10.96	NAP22	5.10
Oxygen-regulated protein (150kD)	8.32	USF1	4.82
Vascular α -actin	6.70	Vinculin	4.00
Cytoplasmic β -actin	4.71	Cathrin, heavy pypeptide (Hc)	3.98
Fibronectin 1	4.63	Endothelin-converting enzyme	3.87
Xist	4.17	Aldehyde dehydrogenase family 9	3.86
Connexin 43	3.67	Dystroglycan 1	3.54
3 α -HSD	5.25	Glucose-regulated protein, 58kD	3.43
Calnexin	4.67	gi 13879259	10.65
Damage-specific DNA binding protein 1	4.88	gi 15029779	5.14
Peptidylglycine α -amidating monooxygenase	3.74	gi 14268532	4.97
PARG1	3.43	gi 14725995	3.35
α -Glucosidase 2	13.86	2600	8.03
Carboxypeptidase D	9.47	2140	5.92
α -Actin	8.52	2316	4.89
Eker rat-associated intracisternal-A particle element	7.53	1701	3.70
Integrin α 6 subchain	6.35		

本研究の開始後、ヒトゲノム解析が完成し、ヒト遺伝子は2万余りであることが明らかとなった。全てのヒト遺伝子が同定されたことから、これら全てのヒト遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイが開発された(Affymetrix 社、GeneChip)。またラットに関しても解析の進んだ約1万3千の遺伝子を網羅したチップが開発された。そこで本研究にもこのシステムを取り入れ、サブトラクションクローニング(微量 RDA)とDNA マイクロアレイを併用することとした。DNA マイクロアレイのプロープとして数十マイクログラムの cRNA の調製が必要であるが、一般にヒトの細胞や組織は手に入りにくく、またその量も限られるケースが多いため、微量サンプルからのマイクロアレイ用プロープの調製法として TALPAT 法を導入した。TALPAT 法の原理は、T7-polymerase により cDNA から aRNA を合成・増幅し、さらにその aRNA に対してもう一度 cDNA を合成する。合成された2次 cDNA に対してもう一度 T7-polymerase による aRNA 合成・増幅を行うことで、極めて微量のサンプルからでも、十分量のマイクロアレイ用プロープを合成することができる。

このようにサブトラクションクローニング法、DNA マイクロアレイ法ともに微量化を図った結果、細胞数 10-100 個前後を用いて両法での解析が可能となった。また、DNA マイクロアレイ法は、優れて統計的な手法であるため、擬陽性シグナルの発生は避けられない。それをカバーするため、サブトラクションクローニングの際と同様、得られた候補遺伝子全てに対して real-time PCR による発現誘導(若しくは抑制)の確認を行って、最終的な同定とし

た。図2に、本研究で行った生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子群の網羅的解析システムを示す。

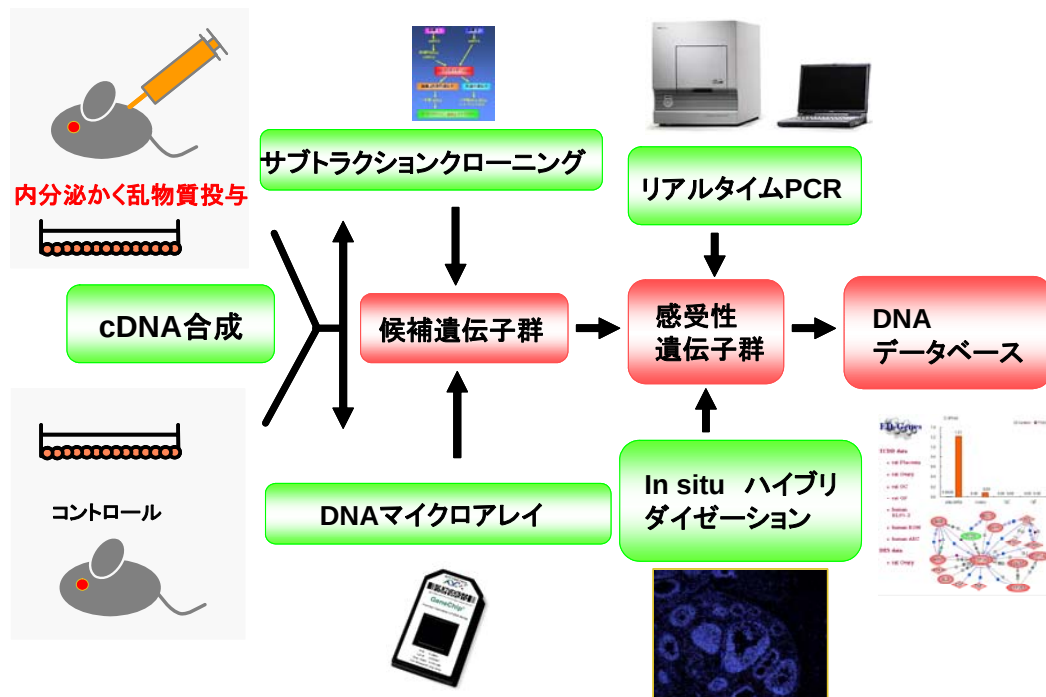


図2 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子群の網羅的解析システム
in vivo 若しくは in vitro で内分泌かく乱物質を投与し、投与群、コントロール群それぞれから cDNA を作製する。作製した cDNA を用い、サブトラクショナルクロニング (微量 RDA) 及び DNA マイクロアレイを行い、候補遺伝子群をピックアップする。得られた候補遺伝子全てに対して、real-time PCR による定量を行い発現誘導若しくは抑制の確認を行う。また、in vivo で得られた興味深い遺伝子群については、さらに in situ hybridization によってその局在を明らかにした。

(2) 研究成果の今後期待される効果

遺伝子発現の網羅的解析は、ヒトゲノム解析の完了などもあって、急速に DNA マイクロアレイに収斂されつつある。しかし、ゲノム解析の進んでいない動物種においては、PCR をベースにしたサブトラクショナルクロニングが最も強力な解析法であることに変わりはない。特に今回私共が開発した微量 RDA 法は細胞 10－100 個からの解析が可能であり、今後微小生物や、極めて微量の検体しか得ることができないサンプルの解析に威力を発揮するものと考えている。

DNA マイクロアレイも最近では aRNA をプローブとするものが主流となってきた。私共

が確立した TALPAT 法では、同じく10－100個ほどの細胞から数十マイクログラムの cRNA を合成することが可能であり、今後、大幅にニーズが増えると予想される、組織切片からの DNA マイクロアレイ用プローブの作製などに威力を発揮するものと予想される。

3.1.2 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースの構築

(1)研究実施内容及び成果

前述した、遺伝子発現の網羅的解析法を用いて、生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子に関するデータベースを構築し、ホームページで公開した

(<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html>)。

使用した内分泌かく乱物質はダイオキシン(TCDD)及びジエチルスチルベステロール(DES)である。データベースは8つの独立した実験群の結果から成り立っている。

1)ホルツマン系ラット妊娠15日目に TCDD1600ng/kg を経口投与し妊娠20日目に卵巣を採取し遺伝子発現の変化を解析したもの(サンプルは国立環境研・遠山先生(現東京大学)との共同研究として提供を受けた)。

2)未分化のラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系に TCDD 最終濃度 100pM を加え48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。

3)FSHにより分化誘導を行ったラット卵巣顆粒膜細胞に TCDD 最終濃度 100pM を加え、同様に48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。

4)ヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN 細胞に TCDD 最終濃度 100ng/ml を加え、同様に24－48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。

5)ヒト子宮内膜上皮細胞株 RL95-2 細胞に TCDD 最終濃度 100ng/ml を加え、同様に24－48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。

6)ホルツマン系ラット妊娠15日目に TCDD1600ng/kg を経口投与し妊娠20日目に胎盤を採取し遺伝子発現の変化を解析したもの(1の実験の動物から採取)。

7)患者の同意を得た上でヒト胎盤から羊膜細胞を採取・初代培養し、TCDD 最終濃度 1nM を加え、48時間後の遺伝子発現変化を解析したもの。

8)幼若ラットにジエチルスチルベステロール(DES)を24時間ごとに4日間腹腔内投与し、卵巣における遺伝子変化を解析したもの。

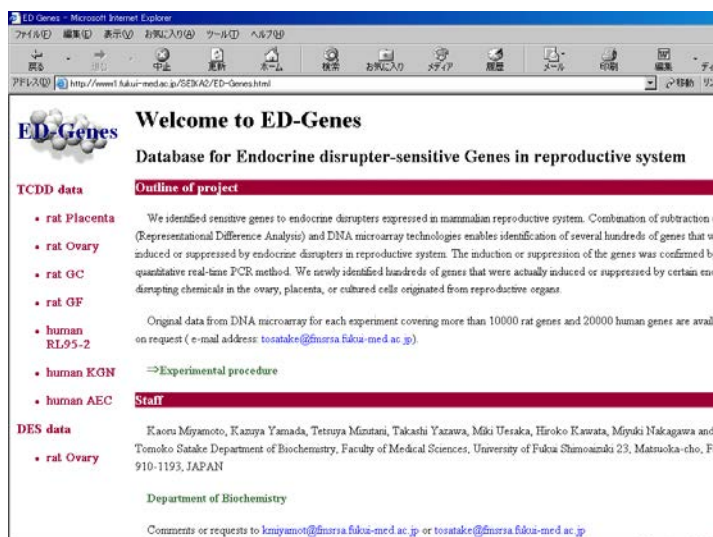
の合計8実験群である。

データベースとしては、それぞれの実験群に対して、得られた候補遺伝子、発現誘導が確認された遺伝子、発現抑制が確認された遺伝子を、それぞれ掲載している。各遺伝子に関しては、それぞれの完全長 cDNA クローンの配列と所在を示す Accession No.、対応する遺伝子の種の違いによる塩基配列及びアミノ酸配列の情報を示す Unigene No.、染色体上の位置、組織分布、関連する遺伝病、3次元構造等の情報を含む LocusLink No.、さらに human homolog に関する様々な情報を含む GeneCard No.が記載され、それぞれの

公開資料

データベースにリンクして情報が得られる形をとっている。

さらに、real-timePCR による発現定量に用いた各遺伝子のプライマーセットの配列を記載し、閲覧者が各遺伝子の発現解析を行うことができるように配慮した。また real-time PCR での結果を、誘導・抑制の比率 (ratio)、発現量を示す Ct 値、マイクロアレイでのデータがある場合は、Array ratio として表示している。また、各遺伝子の別の実験系や、時系列での発現変化を棒グラフとして示している。さらに、各遺伝子のそれぞれの機能的関連因子を網羅的にピックアップした pathway figure を同時に表示し、これらの遺伝子の発現変化が細胞や組織に与える影響などを考察できるようにしている。図3. に生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子に関するデータベースの一例を示す。



F-spondin

Abbrev/Alias : SPON1/ Spondin 1, extracellular matrix protein

•Accession No.: [M88469](#)

•UniGene ID: [Rn.7546](#)

•Additional information: [LocusID:64456](#)

•Human homologue: [GeneCard@:SPON1](#)

Forward Primer	GACCATCCTCAGAGTCCTTTCTATGA
Reverse Primer	CGGGCAATTCTCTCGATGAC

Real time PCR ratio	Ct TCDD	Array ratio
0.22	30.66	ND

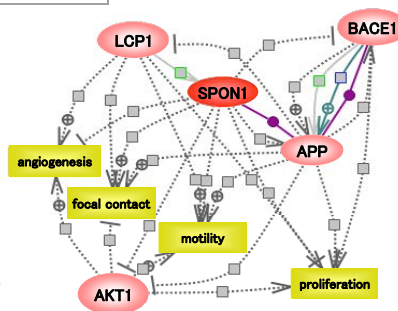
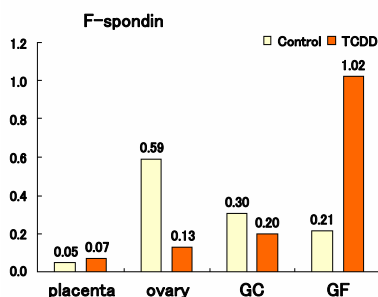


図3. 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子に関するデータベース

(a) ホームページに掲載しているデータベースの入り口(表紙)。

(<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/ED-Genes.html>)

(b) ホームページに記載している遺伝子の一例

各遺伝子には、Accession No.、Unigene No.、LocusLink No.、GeneCard No.が付けられ、各遺伝子データベースにリンクしている。また real-timePCR による発現定量に用いた各遺伝子のプライマーセットの配列が記載され、閲覧者が各遺伝子の発現解析を行うことができるようになっている。さらに、各遺伝子のそれぞれの機能的関連因子を網羅的にピックアップした pathway figure を表示している。

また、データベースでは、Experimental procedure として、各実験群の詳しいプロトコルや、微量 RDA 法や TALPAT 法、real-time PCR の概要を記載している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

私共の構築したデータベースは、極めて小さい規模のものである。それは、低濃度での内分泌かく乱作用が遺伝子レベルで再現性よく確認できたのが、TCDD と DES の場合に限られていたためである。しかも網羅的解析では擬陽性シグナルの発生は避けられないため、真の内分泌かく乱物質感受性遺伝子の同定には、繰り返しの実験と real-time PCR による全ての候補遺伝子の定量が欠かせなかった。そのため、各実験群で同定された遺伝子数は数十から百個前後と、極めて少なくなっている。しかし、これ以降に述べるように、個々の遺伝子に注目して解析を進めると、TCDD や DES の予想していなかった作用が明らかとなってきた。このデータベースに記載された様々な遺伝子に着目し、解析をさらに進めることで、新たな内分泌かく乱物質の作用が明らかになってくるものと期待される。

3.1.3 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースから解析した、生殖系での TCDD の作用

(1) 研究実施内容及び成果

3.1.3.(a) 胎盤及び羊膜細胞に対する低濃度 TCDD の作用

ホルツマン系ラット妊娠15日目に 1600ng/kg の TCDD を投与し、妊娠20日目に胎盤を採取(サンプルは共同研究により、環境研・遠山先生から提供されたものである)解析を行った(Mizutani et al. Endocrine Journal 51, 569-577, 2004)。前述と同様、サブトラクシオンクロニングを中心として解析を行ったが、既知遺伝子に関しては、市販のマイクロアレイを用いサブトラクシオンライブラリーをプローブとして一次スクリーニングを行った。未知遺伝子に関しては、サブトラクシオンライブラリーからそれぞれ任意に300クローンずつをピックアップし、配列解析・相同性検索により未知遺伝子のみを選択して、発現解析に供した。発現解析には Real-time PCR を用い、発現量の差が2倍以上(0.5 以下)であった遺伝子をダイオキシン誘導性あるいは抑制性と同定した。その結果、TCDD の典型的なタ

ーゲット遺伝子と思われる CYP1A1 および CYP1B1 がともに強く誘導されており、in vivo の系においても 1600ng/kg の微量の TCDD でも十分に作用を発揮していることが確認された。その上で、極めて特徴的だった点としてグルコース輸送体である GLUT1—GLUT4 までの遺伝子発現が全て強く誘導されていたことが挙げられる (図4)。遠山らは、同様の処理をしたラット胎盤でグリコーゲン顆粒の蓄積を認めていること、またグルコース輸送体の遺伝子発現が低酸素状態で誘導されることから、ホルツマン系ラットの胎盤では低濃度のダイオキシン(TCDD) 暴露によって低酸素状態が誘起され、その結果グルコース輸送体の遺伝子発現誘導および胎盤でのグリコーゲン顆粒の蓄積が生ずるとした石村らの結論 (Ishimura et al. Toxicol. Appl. Pharmacol., 178, 161-171, 2002) をサポートする結果であった。さらに興味深い点は、多くのインターフェロン誘導性の遺伝子群が、胎盤で強く誘導されていたことである(図4)。

続いて、ヒト羊膜細胞初代培養系での TCDD の影響を解析した。ヒト羊膜細胞は、群馬大学医学部産婦人科で帝王切開を受けた患者の同意を得た上で採取し、10%血清存在下で7-10日間培養しコンフルエントとなった状態で使用した(Igarashi et al., Fertil. Steril., 80, 1065-1066, 2003)。TCDD 最終濃度 1nM を加え48時間後に mRNA を回収して解析を行った。ヒト羊膜細胞においても、CYP1A1 および CYP1B1 の強い誘導が認められ、低濃度の TCDD が羊膜細胞で十分作用を発揮していることが確認された。また、胎盤での結果と異なり、羊膜細胞培養系では TCDD 投与によりグルコース輸送体遺伝子群の誘導は見られなかった。羊膜細胞培養は通常の培養条件で行ったため、胎盤とは異なり低酸素状態で誘導されるこれらの遺伝子群は誘導されなかったものと思われる。一方胎盤での結果と同様、ヒト羊膜細胞でも TCDD 投与によって、多くのインターフェロン誘導性の遺伝子群の著しい誘導が見られた(Table2)。また後で述べる TCDD 処理したラット卵巣(胎盤と同時に採取)では、これらインターフェロン誘導性の遺伝子群の発現誘導が観察されなかったことから、この現象は胎盤もしくは胎盤由来組織に特有の現象の可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

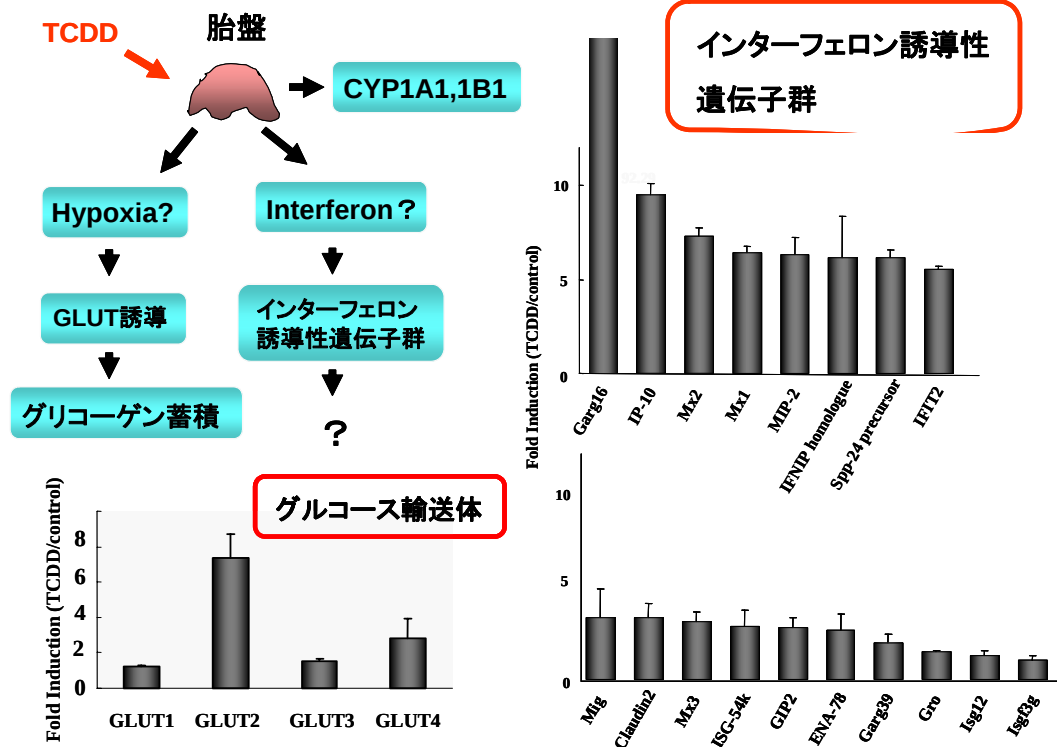


図4 ラット胎盤に対する TCDD の作用

妊娠15日目のホルツマン系ラットに1600ng/kgのTCDDを経口投与し、妊娠20日目に胎盤を採取し、解析した。TCDDの典型的標的遺伝子であるCYP1A1及びCYP1B1が強く誘導され、低濃度のTCDDが実際に胎盤にも作用していることが判る。TCDD投与により、4種類のグルコース輸送体の遺伝子発現が誘導されている。特にGLUT2及びGLUT4は従来胎盤ではほとんど発現していないが、TCDD投与によりこれらの遺伝子発現も強く誘導される。また多くのインターフェロン誘導性の遺伝子群が、TCDD投与により強い発現誘導を受けていた。

ヒト羊膜細胞初代培養系に対するTCDDの影響

グルコース輸送体 (GLUT)		Fold induction (TCDD/control)	
GLUT1		1.33	
GLUT2		undetectable	
GLUT3		0.56	
GLUT4		undetectable	
インターフェロン誘導性遺伝子			
		Fold induction	Fold induction
IFIT1	158.71	IFIT2	2.98
IFITM1	31.45	STAT1	2.853
G1P2	18.72	Sp100	2.28
IFI27	16.84		
SERPINE2	12.36		
IFGF3G	3.78		

Table2. Effects of TCDD on gene expression of glucose transporters and interferon-inducible factors

3.1.3.(b) 卵巣及び卵巣顆粒膜細胞に対する TCDD の作用

ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系に TCDD 最終濃度 100pM を加え 24-48 時間後の遺伝子発現変化を解析した (Miyamoto, Environmental Sciences, 11, 47-55, 2004, Minegishi et al., Mol. Cell. Endocrinol., 202, 123-131, 2003)。この実験系は、未分化の卵巣顆粒膜細胞に対する TCDD の影響を観察している。Table1 にも示したようにダイオキシン誘導性遺伝子として、CYP1B1 をはじめとして 9 遺伝子を同定した。これらの中にはすでにダイオキシン誘導性遺伝子として知られる、CYP1B1, Quinone reductase, UGT などに加えて、ミトコンドリアで転写される遺伝子群や、Feritin, Cyclin G1, などの今までダイオキシン感受性遺伝子として報告されていない遺伝子群も誘導されていることが明らかとなった。さらに、データベースには登録されているものの機能が明らかでない遺伝子 2 種類も同定された。一方、ダイオキシン抑制性遺伝子としては、さらに多く 43 種類の遺伝子群が同定された。これらのほとんどはダイオキシンに対して感受性がある事が初めて示された遺伝子である。Filamin A など細胞骨格や細胞接着に関連した遺伝子が多く含まれることが特徴である。これらの結果は、TCDD が典型的な AhR を介した遺伝子の転写促進だけでなく、直接・間接に細胞の遺伝子発現に影響を与えていることを示している。

一方、分化した卵巣顆粒膜細胞に対する TCDD の作用を検討するため、上述の初代卵巣顆粒膜細胞培養系に FSH 最終濃度 30ng/ml を加え、分化誘導を行ったところ TCDD 最終濃度 100pM を加え、その遺伝子発現に対する影響を解析した。卵巣顆粒膜細胞に FSH を加えると、LH 受容体の発現が誘導されるのをはじめとして、黄体化 (granulo-luteinization) に伴い、プロゲステロン産生に必要なステロイド合成関連遺伝子群が誘導されてくる。それまでは主に卵巣夾膜細胞で発現していた StAR、SR-BI、P450scc などが FSH の作用を受けて発現誘導されてくる。これら多くのステロイド合成関連遺伝子群は、TCDD 投与によりその発現が抑制された (図5)。一方アロマターゼ遺伝子発現も TCDD 投与により抑制を受けていた。

また、in vivo における作用を解析するため、前述の妊娠ラットの卵巣を用いた実験を行った。ホルツマン系ラット妊娠 15 日目に 1600ng/kg の TCDD を投与し、妊娠 20 日目に卵巣を採取 (サンプルは共同研究により、環境研・遠山先生から提供されたものである) 解析を行った。妊娠末期の卵巣を使用しているため、解析結果は主に分化した卵巣顆粒膜細胞もしくは夾膜細胞由来の遺伝子発現変化と考えられる。サブトラクションクローニングからの結果と DNA マイクロアレイからの結果を総合すると、TCDD 感受性候補遺伝子として 342 遺伝子の発現を real-time PCR で検証し、誘導性遺伝子 52 遺伝子、抑制性遺伝子 95 遺伝子を同定した。In vitro での結果と同様、誘導性遺伝子群として、CYP1A1、Glutathione S-transferase、UDP-glucuronosyltransferase、Quinone reductase など典型的な TCDD 感受性遺伝子群の発現が誘導されており、卵巣に対しても in vivo で低濃度の TCDD が十分作用していることが明らかとなった。一方、抑制性の遺伝子群では、immediate early 遺伝子である、cfos、JunB、NGFI-A、NGFI-B などの発現が強く抑制され

ていた。これらの遺伝子群はゴナドトロピンの刺激で早期に誘導される遺伝子群であることから、TCDD の作用が下垂体からのゴナドトロピン分泌に影響を与えた結果とも考えられる。P450c17 遺伝子の夾膜細胞での発現抑制が見られることも、これを支持する結果である。また、SR-BI(Mizutani et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, 499-505, 1997) の発現が抑制されるなど、in vitro と同様ステロイド合成関連遺伝子群に発現抑制の傾向が見られた。以上の結果をまとめて、図6に示した。

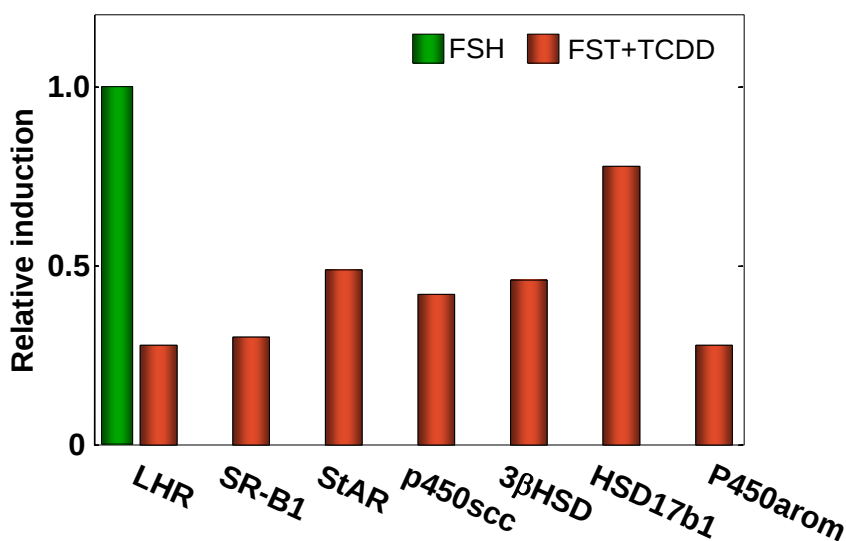


図5 FSH 処理したラット卵巣顆粒膜細胞でのステロイド合成関連遺伝子群及び LH 受容体遺伝子の TCDD による発現変化

ラット卵巣顆粒膜細胞にFSH最終濃度 30ng/mlを加え、顆粒膜細胞の分化を誘導し、さらに TCDD 最終濃度 100pM を加えて、ステロイド合成関連遺伝子群及び LH 受容体遺伝子の発現変化を real-time PCR で解析した。程度の差はあるものの、FSH 処理だけのものに比べ、これらの遺伝子群の発現は抑制されていた。

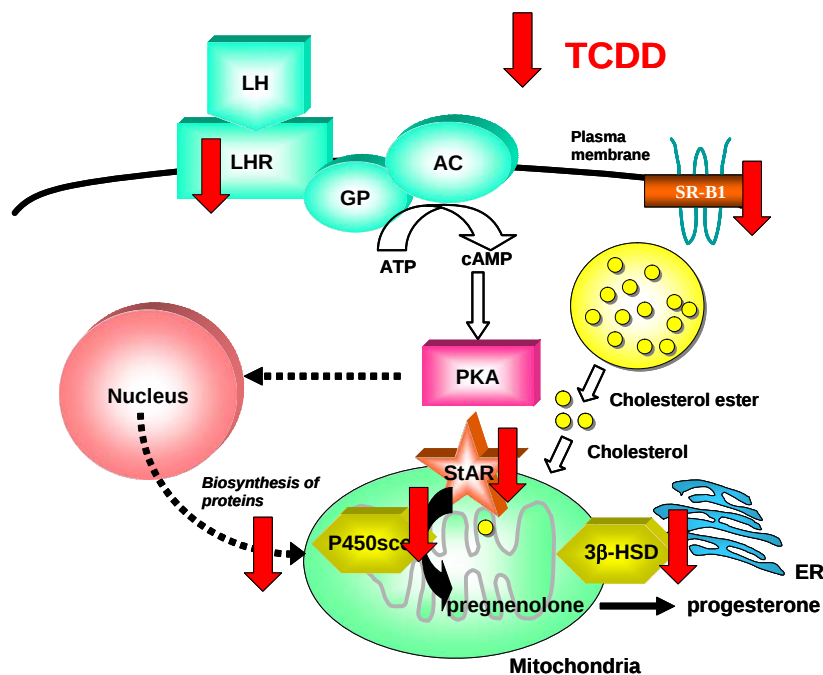


図6 黄体化 (granulo-lutein 化)した卵巢顆粒膜細胞での低濃度 TCDD の作用
 黄体化 (granulo-lutein 化)した卵巢顆粒膜細胞では、LH 受容体が発現し、プロゲステロンを合成するための各遺伝子群の発現が上昇している。TCDD は in vivo、in vitro とも低濃度でこれらの遺伝子群の発現を抑制し、卵巢機能を抑制している可能性が示唆された。

LH 受容体に対する TCDD の抑制効果のメカニズムは峯岸グループによって詳細に検討されているが (T.Hirakawa et al., Arch.Biochem.Biophys., 375, 371-376, 2000, T.Minegishi et al., Mol.Cell.Endocrinol., 202, 123-131, 2003)、これら遺伝子群の発現抑制のメカニズムの解明はこれからの課題である。

3.1.4 生殖系での内分泌かく乱物質感受性遺伝子データベースから解析した、生殖系での DES の作用

(1)研究実施内容及び成果

ジエチルスチルベステロール (DES) は強力なエストロゲン様作用をもつ内分泌かく乱物質のひとつだが、幼若ラットに腹腔内投与すると卵巢では未分化の顆粒膜細胞の増殖が著しく促進されることが観察される。幼若21日令ラットにDESを24時間ごとに投与すると、投与後 72 時間の卵巢では顆粒膜細胞が密に詰まった大きな卵胞が出現し、増殖の指標である BrdU の取り込みが著しく促進していた。このことから、DES が顆粒膜細胞の増殖

公開資料

を著しく促進すると考えられる。またこのようにして増殖した卵巣顆粒膜細胞は LH 受容体をほとんど発現しておらず、未分化の状態を維持しているものと考えられる。そこで私共は、幼若21日令ラットにDESを24時間ごとに4日間投与し、卵巣における遺伝子発現の変化を解析した。サブトラクシオンクローニング及び DNA マイクロアレイ、real-time PCR の解析により、DES により誘導される遺伝子22遺伝子、抑制される遺伝子24遺伝子を同定した。

DES 抑制性の遺伝子群には、immediate early gene である NGFI-B、私共が卵巣でゴナドトロピンにより早期に誘導される遺伝子として同定した GIOT (Gonadotropin-inducible ovarian transcriptional regulator)などが含まれていた。GIOT は主に卵巣夾膜細胞で発現しており LH 刺激により早期に誘導される immediate early gene のひとつである(Mizutani et al., Mol. Endocrinol., 15, 1693-1705, 2000)。NGFI-B の遺伝子発現をさらに詳細に調べてみると、in situ hybridization の結果からやはり NGFI-B は卵巣夾膜細胞に局在しており、DES 投与2時間後にはその夾膜細胞でのシグナルが見られなくなる。Real-time PCR での解析でも、その発現は DES 投与後わずか15分—30分で著減することが明らかとなった(図7)。この変化を血中 LH 濃度の変化と重ねあわせると、極めてよい一致を示した(図7)。血中 LH 濃度は、DES 投与後10分以内に低下し、15分—30分前で前値の10分の1以下にまで減少していた。また、後で述べる下垂体摘除ラットを用いて卵巣での NGFI-B の発現量を測定すると、すでにその発現量は、DES 投与により著減したレベルにまで下がっていることが明らかとなった(図7)。これらの結果から、卵巣夾膜細胞での NGFI-B 及び GIOT の発現抑制は、下垂体からの LH 分泌の著明な減少によってもたらされた間接的な影響である可能性が強く示唆された。また血中 LH 濃度が極めて早く減少していることから、この DES の作用は遺伝子発現を介する通常的作用 (genomic action)ではなく、視床下部での GnRH ニューロンの活動抑制 (non-genomic action)を介した作用である可能性が高い(図8)。DES は下垂体にも直接作用するとも考えられるが、LH 分泌は GnRH-PKC 経路の活性化を介して分泌顆粒の exocytosis によって調節されていると考えられ、DES が直接、かつ速やかにこの経路を阻害する事例は報告されていない。DES の下垂体への作用は、むしろ遺伝子発現を介して下垂体ホルモンの合成を調節することで働いている可能性が高い。以上のことから今回観察された、DES の迅速な LH 分泌抑制作用は、視床下部での GnRH ニューロンの活性を押さえ、その結果下垂体からの LH 分泌刺激が無くなったと考えるのが自然と思われる。

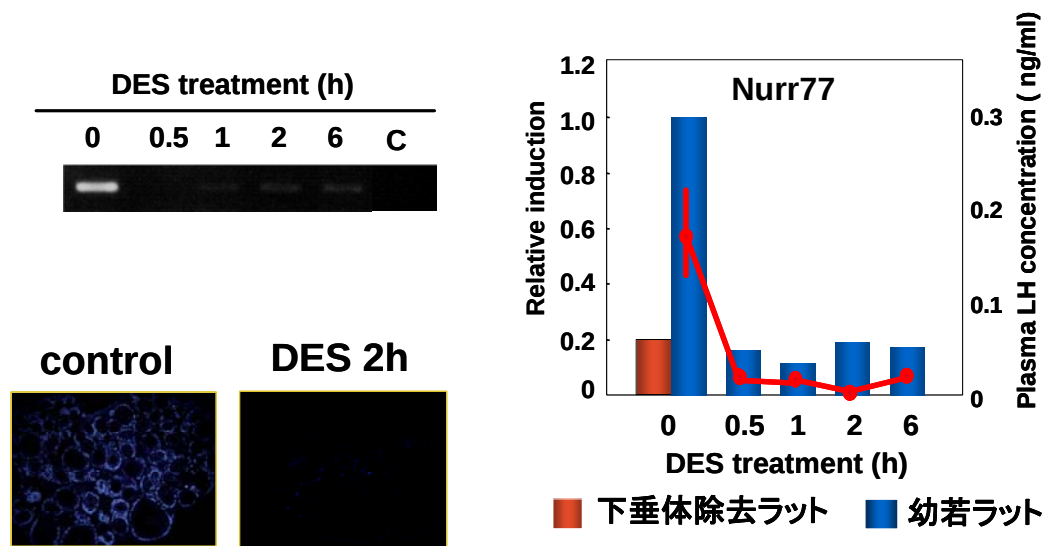


図7 DES 投与による NGFI-B 遺伝子発現と血中 LH 濃度の時間変化

In situ hybridization では NGFI-B は卵巣夾膜細胞に発現しており、DES 投与後2時間のうちにその発現は消失する。Real-time PCR による発現定量では、NGFI-B は DES 投与後15分ー30分でその発現量は著明に減少し、そのレベルは下垂体摘除した卵巣での発現レベルにまで下がっている。ELISA によって血中 LH 濃度を測定すると、その変化は NGFI-B の発現変化と極めてよく一致した。

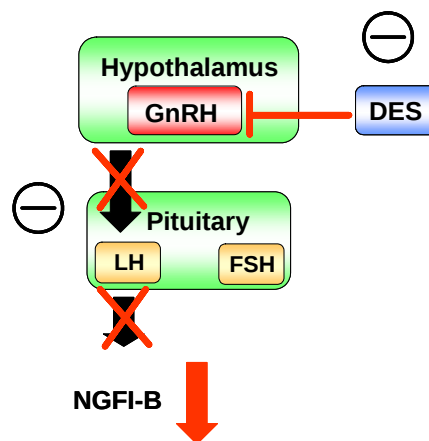


図8 DES の視床下部を介した作用

DES による卵巣での NGFI-B 遺伝子発現の抑制は、視床下部ー下垂体系を介する LH 分泌の抑制による間接的な影響の可能性が示唆される。DES は視床下部の GnRH ニューロンに速やかに直接あるいは間接的に作用して GnRH 分泌を抑制する。GnRH 刺激の消失により速やかに下垂体からの LH 分泌が抑制される。その結果、卵巣夾膜細胞のゴナドトロピン反応性 immediate early gene である NGFI-B 遺伝子の発現が速やかに抑制される。

さらに、DES 抑制性の遺伝子群にはステロイド合成関連の遺伝子である StAR、SR-BI、P450scc、P450c17、さらには LH 受容体遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の DES 投与による発現変化をさらに詳しく調べた(図9)。

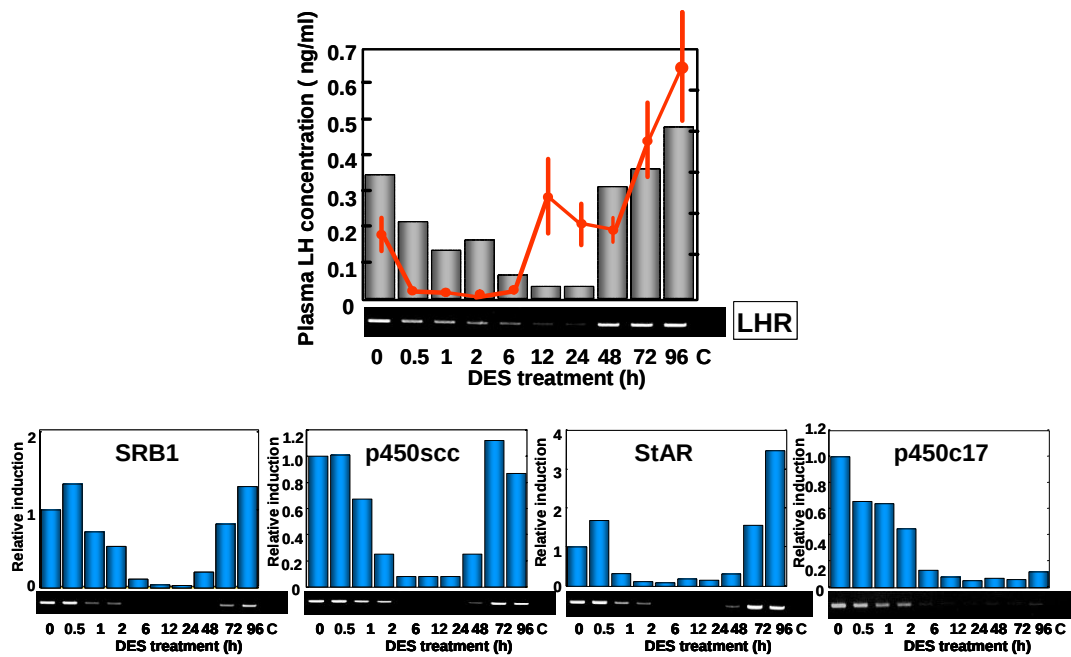


図9 DES投与後の血中 LH 濃度、LH 受容体遺伝子及びステロイド合成関連遺伝子群の遺伝子発現の変化

P450c17 以外の遺伝子発現は、血中 LH 濃度や LH 受容体遺伝子の発現パターンに呼応して変化していることが判る。

DES 投与後の血中 LH 濃度、LH 受容体、SR-BI、StAR、P450scc、P450c17 遺伝子の発現変化を ELISA 及び real-time PCR で定量した。血中 LH 濃度の速やかな減少にすこし遅れて、これら全ての遺伝子の発現が著しく低下した。血中 LH 濃度は DES 投与後速やかに減少するが、12時間以降回復し、48時間以降はむしろ前値に比べ上昇してくる。一方、LH 受容体発現は投与後6時間には著明に減少し、24時間まで低値を持続する。投与後48時間でその発現は回復し以降漸増した。SR-BI、StAR、P450scc の遺伝子発現は、LH 受容体の発現と呼応する形で推移した。一方、P450c17 は DES 投与後漸減し、血中 LH 濃度や LH 受容体発現が回復しても、その遺伝子発現は低値のまま推移した。この結果は、P450c17 を除いて、ステロイド合成関連遺伝子群の発現は血中 LH 濃度と LH 受容体の発現に依存しているように思える。そこで、純粹にこれらの遺伝子発現に対する DES の直接作用を検証するため、下垂体摘除したラットを用いて検討を行った。幼若21日令ラットの下垂体を摘除し7日間飼育した後、同様の DES 処理を行って、

SR-BI、StAR、P450scc、P450c17 遺伝子の発現変化を real-time PCR で定量した(図10)。

(■ :幼若ラット ■ :下垂体除去幼若ラット)

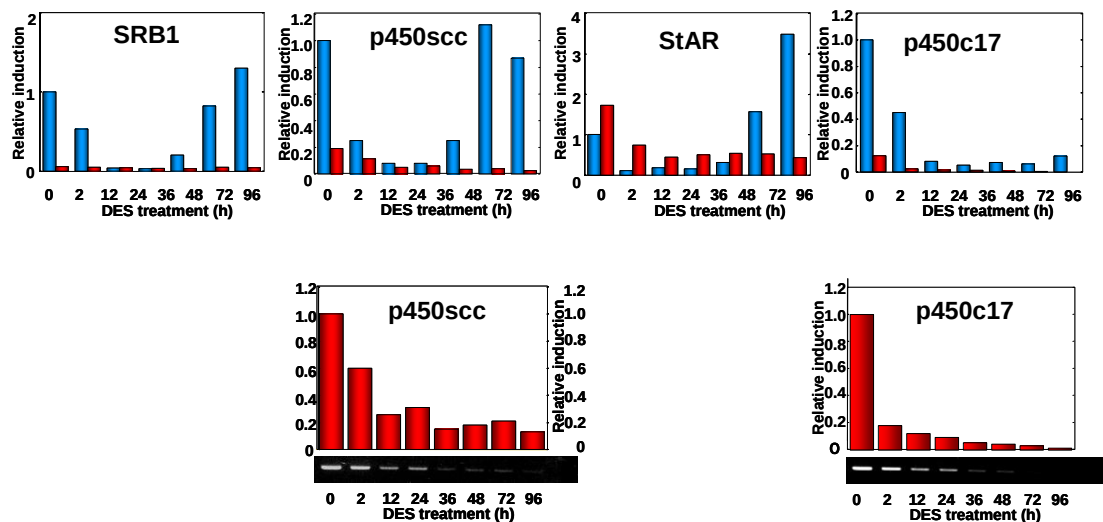


図10 下垂体摘除による、DES 投与後の SR-BI、StAR、P450scc、P450c17 遺伝子発現の変化の比較

無処理及び下垂体摘除したラットに DES を投与し、それぞれの遺伝子発現レベルを real-time PCR で定量した。無処理のラットは青色、下垂体摘除したラットは赤色で示す。P450scc 及び P450c17 の遺伝子発現は、それぞれ下垂体摘除したラットでのデータを拡大して下に示した。下垂体からの LH 刺激による発現促進が大きいものの、DES 自体も直接これらの遺伝子に作用して、その発現を抑制していることが明らかとなった。

下垂体摘除したラットでは、StAR を除いて DES 投与する以前にその発現レベルが著しく低下しており、下垂体からの LH 刺激による遺伝子発現調節の大きさが伺える。一方、これら全ての遺伝子発現は、下垂体摘除ラットでも DES 投与によってさらに抑制されており、DES は直接的にも卵巣夾膜細胞に作用して、ステロイド合成関連遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなった。

これらの結果から想定される、卵巣夾膜細胞での DES の作用を模式的に図11に示した。

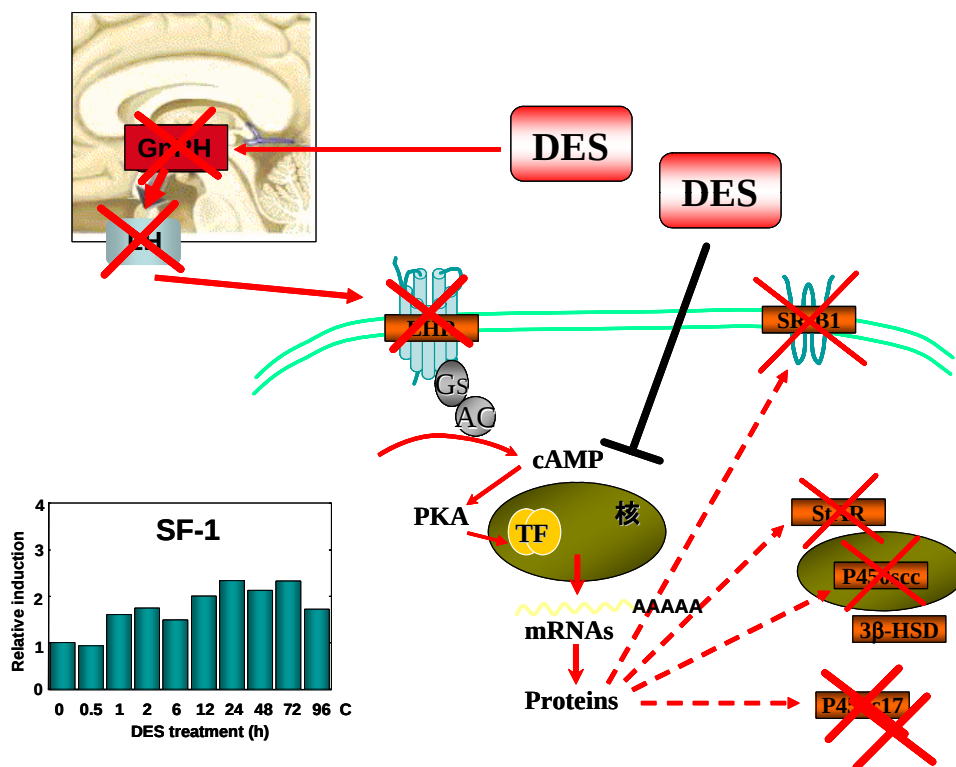


図11 卵巣夾膜細胞におけるDESの作用

DESは、視床下部に作用して(non-genomic action)、速やかにGnRHの分泌及び下垂体からのLH分泌を抑制する。LH刺激が消失した卵巣顆粒膜細胞では、cAMP-PKA pathwayを介した転写促進作用が無くなり、NGFI-BやGIOTなどのimmediate early geneの発現が速やかに消失する。続いて、LH受容体やステロイド合成関連の遺伝子群もその発現が著明に減少する。また一方で、DESは卵巣夾膜細胞に $ER\alpha$ を介して直接作用し、これらの遺伝子の発現を抑制する。この間、ステロイド合成関連遺伝子の転写に必須といわれるSF-1は、ほとんど変動していない。

幼若21日令ラットへのDES投与によって卵巣で、FSHR、inhibin α 、inhibin βA 、inhibin βB など、卵巣顆粒膜細胞で主に発現している遺伝子群がDES誘導性遺伝子として同定された。これらの遺伝子の発現を、血中FSH濃度の変化とともに詳細に検討した結果を図12に示す。

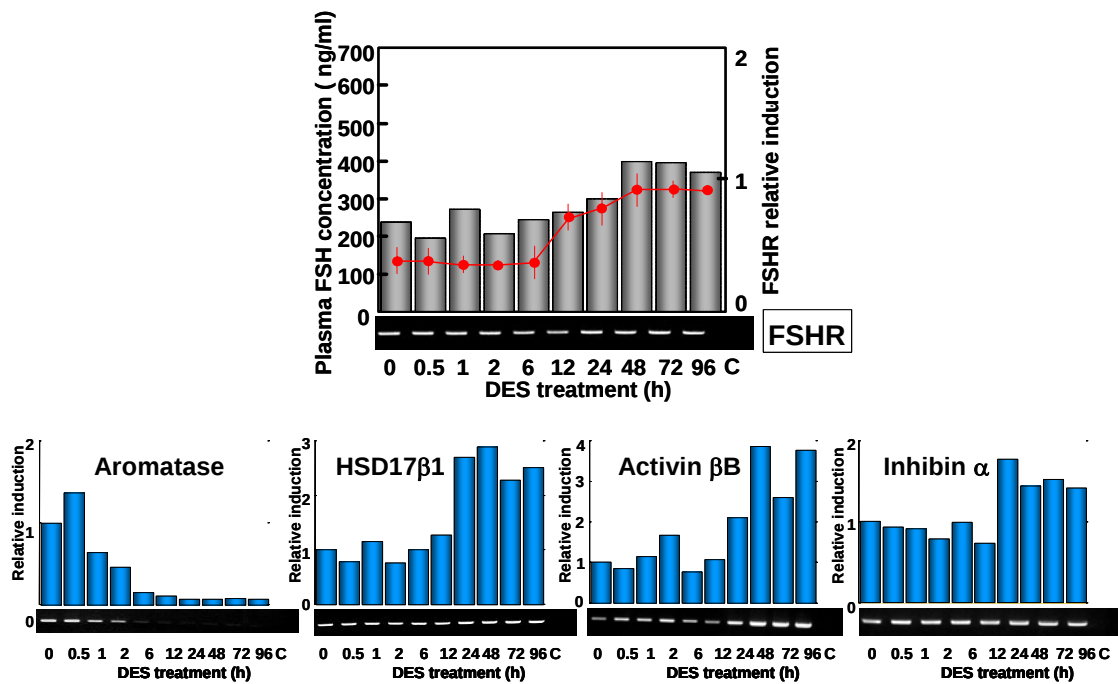


図12 DES投与後の血中FSH濃度と遺伝子発現の変化

血中FSH濃度は、血中LH濃度の変化と異なり、DES投与後漸増する。それとはほぼ同じようにFSH受容体の発現も漸増している。その他の遺伝子もアロマトラーゼを除いて同様の変化が観察される。

LH分泌とは異なり、血中FSH濃度は一過性に減少することはない。これはげっ歯類では下垂体からのFSH分泌は視床下部からのGnRHに依存する割合が低く、むしろインヒビナー・アクチビン系により調節されているためである。既に報告にもあるようにDES投与によりFSH受容体発現は漸増する。アロマトラーゼを除くこれらの遺伝子の発現も、FSH-FSH受容体系を介して誘導されている可能性が考えられる。そこで、同様に下垂体摘除した幼若ラットにDESを投与し、これらの遺伝子の発現を解析した(図13)。

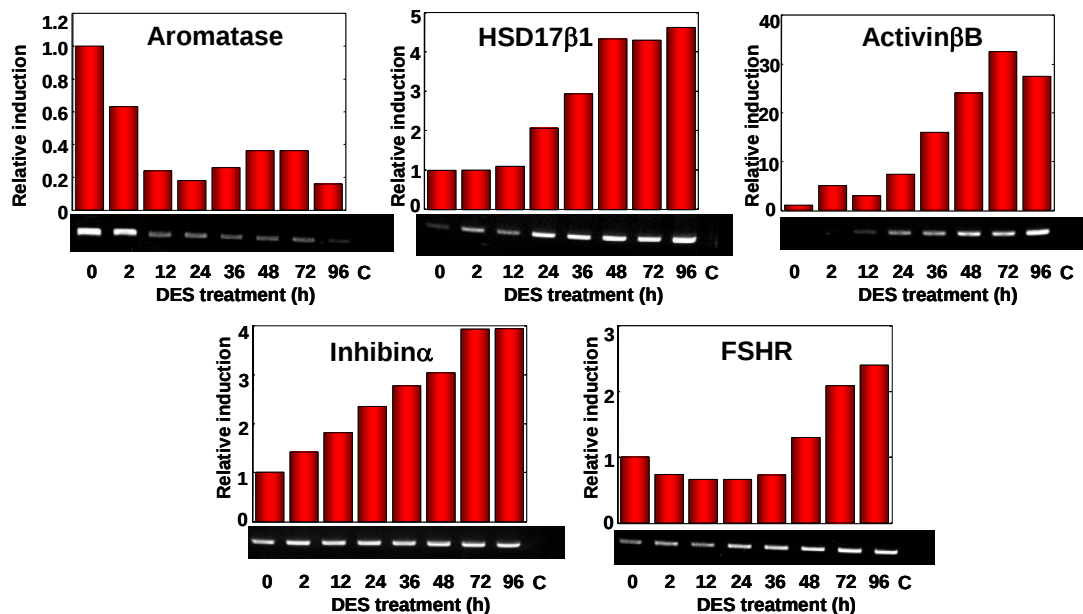


図13 下垂体摘除ラットへの DES 投与後の遺伝子発現の変化

下垂体摘除をしていない無処理のラットへ DES 投与を行った実験結果と一致する結果が得られた。下垂体摘除ラットにおいても、アロマターゼは DES 投与により発現抑制され、それ以外の遺伝子群は発現が誘導された。これらの遺伝子に対する DES の発現誘導は、卵巣顆粒膜細胞に DES が直接的作用した結果と考えられる。

下垂体摘除ラットにおいても、DES 投与によりアロマターゼ遺伝子発現は漸減し、HSD17β1、inhibin α、inhibin β B、FSHR の遺伝子発現は、下垂体摘除していないラットに対する DES 投与の結果と同様に漸増することが明らかとなった。このことは、アロマターゼを含めて、卵巣顆粒膜細胞で主に発現しているこれらの遺伝子の発現が DES の直接作用によって調節されることを示している。

DES の作用は、主にエストロゲン受容体を介するものと考えられている。私共は、in situ hybridization によって、ラット卵巣では ERα は夾膜細胞に、ERβ は顆粒膜細胞に局在していることを明らかにした。今回の網羅的解析で、興味深いことに DES 誘導性遺伝子として Cited4 が、DES 抑制性遺伝子として Dax-1 が同定された。Cited4 は、C 末端に ED-rich ドメインを持つ新たに同定された Cited ファミリーの一員であり、核内コアクチベーター CBP/p300 と結合して転写を活性化すると考えられているがその生理的役割は不明であった。一方 Dax-1 は核内受容体スーパーファミリーに属し、副腎低形成を伴い XY 個体を女性化する原因遺伝子として同定された。同じ核内オーファン受容体 Ad4BP/SF-1 を抑制することが良く知られている。

DES 投与による Cited4 及び Dax-1 の遺伝子発現変化を図14に示す。

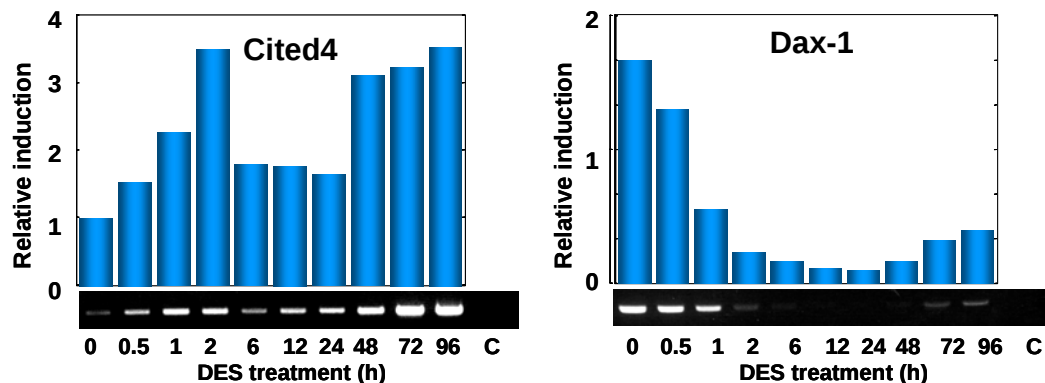


図14 DES 投与による Cited4 及び Dax-1 の遺伝子発現変化

幼若21日令ラットに DES を投与し、これらの遺伝子の発現変化を real-time PCR で定量した。Cited4 は DES 投与後すぐに発現誘導が見られ、一方 Dax-1 は DES の投与後減少し、48時間後にはほとんど発現が見られなくなった。

DES 投与による Cited4 の発現誘導および Dax-1 の発現抑制は、下垂体摘除ラットを用いても同様に観察されることから、DES による直接作用と考えられる。Cited4 は Cited1 及び Cited2 と遺伝子ファミリーを形成しており、これらのファミリーは良く似た共通の構造をしていることから、その機能も重複する点が多いと考えられている。Cited1 及び Cited2 はともに卵巣に発現していることから、DES によるこれらの遺伝子ファミリーの発現変化を解析したところ、Cited4 のみが DES により誘導され、Cited1 及び Cited2 は変化しないことが明らかとなった。また GFP 融合タンパク質を発現させ、Cited ファミリー及び Dax-1 の細胞内局在を検討したところ、Cited4 は細胞質、核の両方に存在していること、Cited1 は細胞質、Cited2 は核に局在することが明らかとなった。また Dax-1 は単独では細胞質に存在しているものの、ER β と共発現させると核に移行することから、ER β とも相互作用して核内で機能していると考えられる。そこで、Cited4 及び Dax-1 がエストロゲン受容体の機能にどのような影響を与えるかを、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いて、ER α 、ER β 及び、Cited4、Dax-1 を共発現させて解析した(図15)。

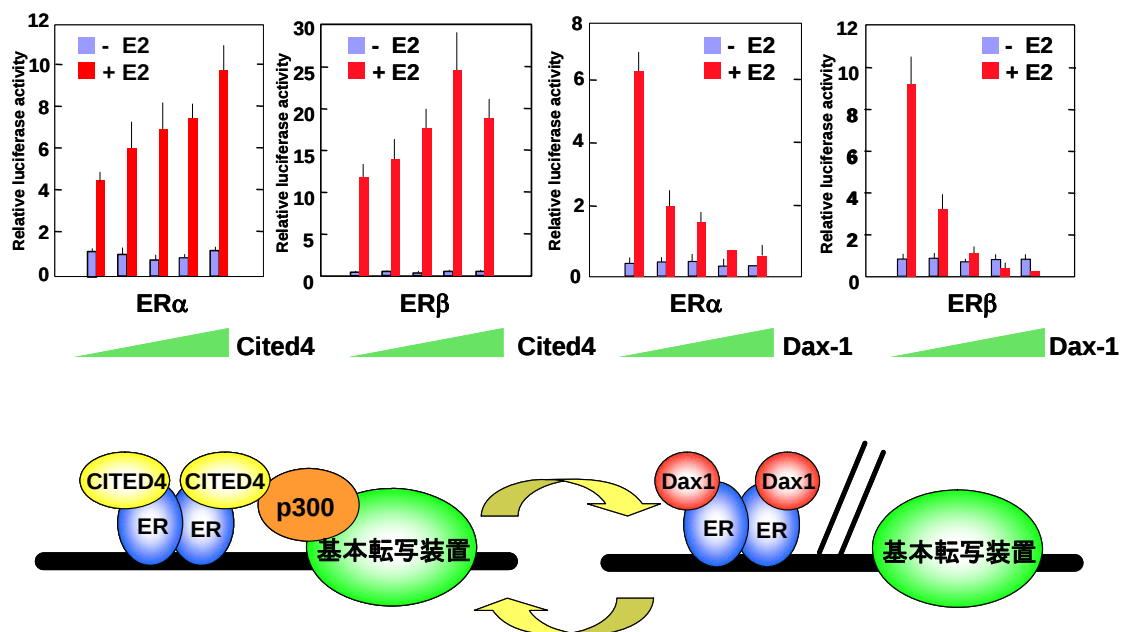


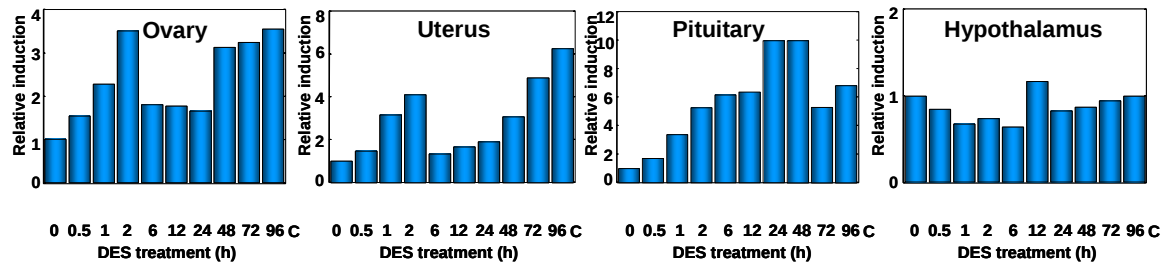
図15 Cited4 はエストロゲン受容体の活性を増強し、Dax-1 はエストロゲン受容体の活性を阻害する。

エストロゲン受容体の活性化により転写促進されるルシフェラーゼレポーターを用いて、ER α 及び ER β のリガンド結合に伴う活性化に対する Cited4 及び Dax-1 の影響を解析した。ER α 及び ER β はともにリガンド結合により活性化され、レポーター活性が上昇する。この際、Cited4 は用量依存的に、リガンド結合に伴う ER α 及び ER β の活性化をさらに促進する。一方、Dax-1 はやはり用量依存的にリガンド結合に伴う ER α 及び ER β の活性化を抑制した。下に、Cited4 及び Dax-1 のエストロゲン受容体に対する作用を模式的に示した。

Cited4 は用量依存的にリガンド結合に伴う ER α 及び ER β の活性化をさらに促進し、Dax-1 は逆にリガンド結合に伴う ER α 及び ER β の活性化を抑制する。このことから、DES は卵巣顆粒膜細胞に作用して、Cited4 の発現を誘導し、逆に Dax-1 の発現を抑制することで、ER β 介すると予想される卵巣顆粒膜細胞での DES の作用を増強しているものと考えられる。実際、エストロゲン感受性の組織である、子宮、下垂体、視床下部では Cited4 が発現しており、そのうち子宮、下垂体では、DES によって Cited4 が発現誘導されている (図16)。

一方、Cited4 はエストロゲン受容体の活性を増強するだけでなく、AP-2 との相互作用を介して細胞増殖に関与する可能性が示唆されている。そこで、私共は NIH3T3 を用いて Cited4 を恒常的に発現する細胞株を樹立し、そのトランスフォーメーション活性を軟寒天培地でのコロニー形成を目安に検証した (図16)。

その結果、Cited4 恒常的発現株に弱いながら形質転換能が認められた。



Cited4を発現させたNIH3T3細胞の軟寒天培地でのコロニー形成能

Cell clone	Colony numbers
pQICX-puro	0
Cited4-1	56.2 ± 7.7
Cited4-4	35.4 ± 8.3

図16 エストロゲン感受性組織での Cited4 の発現変化及び NIH3T3 細胞に対する Cited4 の形質転換能

子宮、下垂体、視床下部では Cited4 が発現しており、そのうち子宮、下垂体では、DES によって Cited4 の遺伝子発現が誘導される。また Cited4 を恒常的に発現する細胞株を確立し、その形質転換能を検証した。

DES 投与による卵巣の変化で最も際立っているのは、顆粒膜細胞の増殖である。この増殖は、下垂体摘除したラットを用いても同様に観察される(図17)。

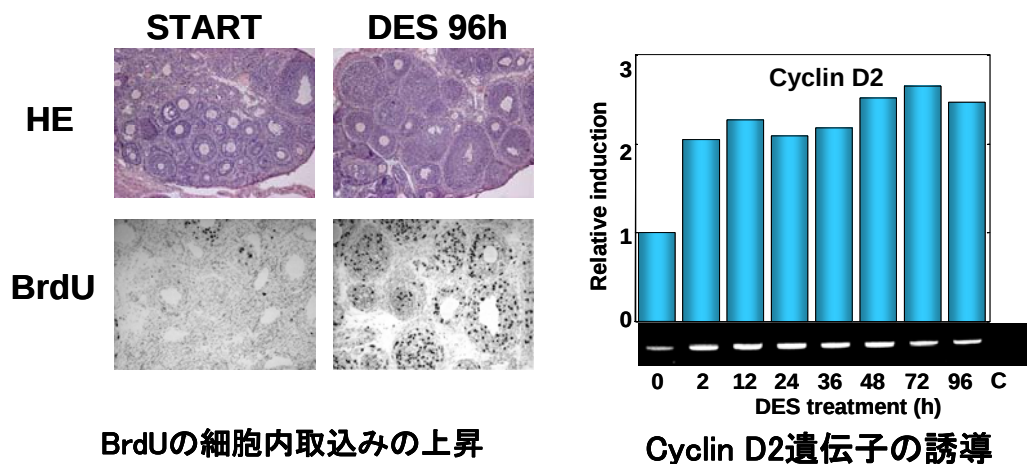


図17 下垂体摘除ラットへの DES 投与による顆粒膜細胞の増殖

下垂体摘除したラットに同様に DES を4日間投与して卵巣を調べると、顆粒膜細胞がぎっしり詰まった pre-antral follicle が多く観察され、顆粒膜細胞への BrdU の取り込みも促進されている。卵巣顆粒膜細胞での増殖に関与していると考えられている cyclinD2 の遺伝子発現も亢進している。

下垂体摘除ラットでは、LH や FSH の影響を受けないため卵巣顆粒膜細胞の分化が進行しない。そのため、DES を投与した下垂体摘除ラットの卵巣では、ほとんど全て未分化な顆粒膜細胞からなる pre-antral follicle が多く観察される。卵巣顆粒膜細胞では細胞増殖の際に主に働いている cyclin は cyclinD2 と考えられている。図17に示すように DES の投与により cyclinD2 の発現も増加しており、DES による顆粒膜細胞の増殖促進作用が確認された。一方、データベースの DES 誘導性遺伝子群として、低酸素誘導性の転写因子 HIF2 α と血管新生促進因子 VEGF が同定された。図18に下垂体摘除ラットにおける DES による HIF2 α 及び VEGF の発現変化を示す。

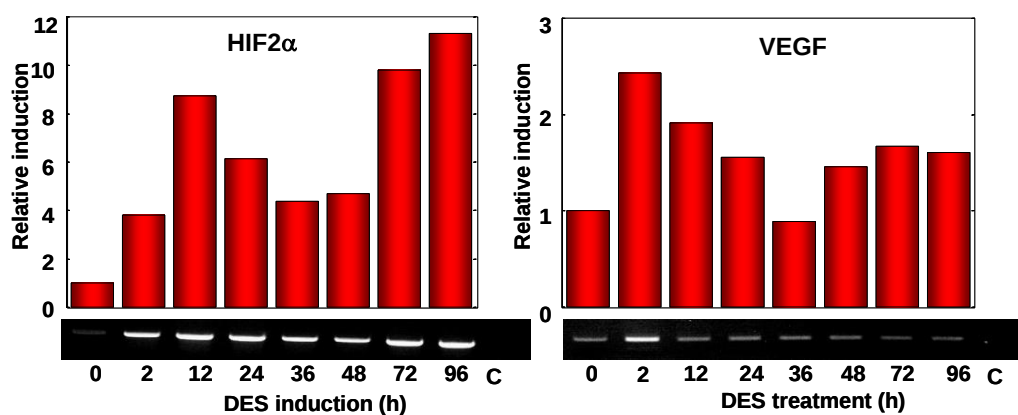


図18 下垂体摘除ラットでの DES 投与による HIF2 α 及び VEGF の発現変化
DES 投与により、どちらも一過性に上昇したのち、48時間後以降再び発現が増加する。

HIF α は低酸素状態において早期に誘導される転写因子であり、構造及び機能の類似した HIF1 α 及び HIF2 α が存在している。HIF α ファミリーは、AhR の核内でのパートナーでもある ARNT (HIF β) とヘテロダイマーを形成して標的遺伝子の転写調節領域に存在する Hypoxia 応答配列 (Hypoxia response element, HRE) に結合しその転写を調節している。HIF α により転写活性化される遺伝子として、エリスロポイエチン、VEGF、グルコーストランスポーター、NO 合成酵素などが知られている。HIF α ファミリーである HIF1 α の卵巣における発現変化を解析すると、HIF2 α とは異なり DES による発現調節を受けず変化しない。このことから、卵巣における VEGF 遺伝子の発現誘導は HIF2 α を介しているものと推測される。

VEGF は強力な血管新生作用を持つ増殖因子であることが知られ、卵巣においても排卵・黄体化に伴う血管新生の亢進に関与していると考えられてきた。一方、DES 投与による卵巣の変化は排卵・黄体化の方向ではなく、卵巣顆粒膜細胞の増殖であるため、従来

考えられてきた VEGF の卵巣における血管新生促進とは別な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで私共は、卵巣において VEGF が血管新生および細胞増殖のどちらの役割を果たしている可能性が高いかを in situ hybridization を用いて解析した。細胞増殖が中心の DES 投与モデルとは別に、排卵・黄体化（血管新生亢進）のモデルとして PMSG-hCG 投与モデルを用いて比較検討を行った。PMSG-hCG 投与モデルでは、幼若 21 日令ラットに PMSG を投与し卵胞発育を誘導し、48 時間後に hCG を投与し排卵を誘発する。PMSG 投与後 48 時間、及び hCG 投与後 4 時間での卵巣を採取し、HIF2 α 、VEGF、HIF α の標的遺伝子として PAI-1、排卵関連遺伝子として PR (Progesterone receptor) (Sekiguchi et al., Endocrinology, 143, 4718– 4729, 2002) の遺伝子発現を in situ hybridization で観察した (図 19)

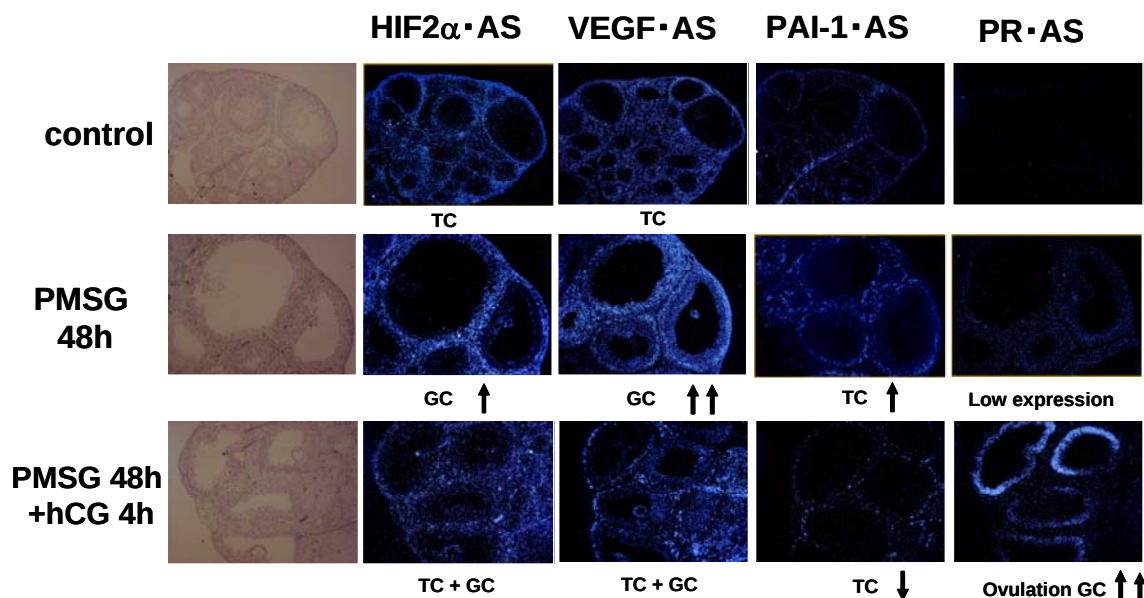


図 19 PMSG 及び hCG 投与後の卵巣における遺伝子発現の局在

幼若 21 日令のラットに PMSG を投与し、さらに投与後 48 時間後に hCG を投与して排卵誘発を行った。PMSG 投与後 48 時間、及び hCG 投与後 4 時間での卵巣を採取し、HIF2 α 、VEGF、HIF α の標的遺伝子として PAI-1、排卵関連遺伝子として PR (Progesterone receptor) の遺伝子発現を in situ hybridization で観察した。HIF2 α 、VEGF、PAI-1 の遺伝子発現は PMSG 投与 48 時間後の成長する卵胞の顆粒膜細胞に強く誘導され、これらの遺伝子が共通の調節を受けていることが示唆される。一方、排卵関連遺伝子である PR は、これらの遺伝子発現とは異なり、hCG 投与後 4 時間の排卵に至ると予想される卵胞の顆粒膜細胞に一過性に発現していた。

これらの遺伝子のうち、HIF2 α 、VEGF、及び HIF α の標的遺伝子である PAI-1 の局在は一致しており、同一の卵胞内の顆粒膜細胞で認められた。またそれらの遺伝子の PMSG による誘導も 48 時間後の組織で同様に認められたことから、これらの遺伝子が共通の調節を受けていることが強く示唆された。即ち、DES 及び PMSG により HIF2 α が卵巣顆

粒膜細胞で発現誘導され、その標的遺伝子である VEGF 及び PAI-1 も同様の発現パターンを示したものと考えられる。一方、排卵関連遺伝子である PR は、これらの遺伝子発現とは異なり、hCG 投与後4時間に、排卵に至ると予想される大卵胞の顆粒膜細胞に一過性に発現しており、排卵との強い相関が認められた。逆に従来排卵に伴う血管新生に寄与していると考えられていた VEGF は、その発現が排卵関連遺伝子の発現と空間的時間的に一致しないことから、卵巣においては別の役割を担っている可能性が示唆された。その発現パターンは、活発に増殖している卵巣顆粒膜細胞が中心であり、DES あるいは PMSG によって引き起こされる卵巣顆粒膜細胞の増殖に関与している可能性が推測される。

図20に、卵巣顆粒膜細胞で予想される DES による VEGF 及び HIF2 α の発現調節機構を模式的に示した。

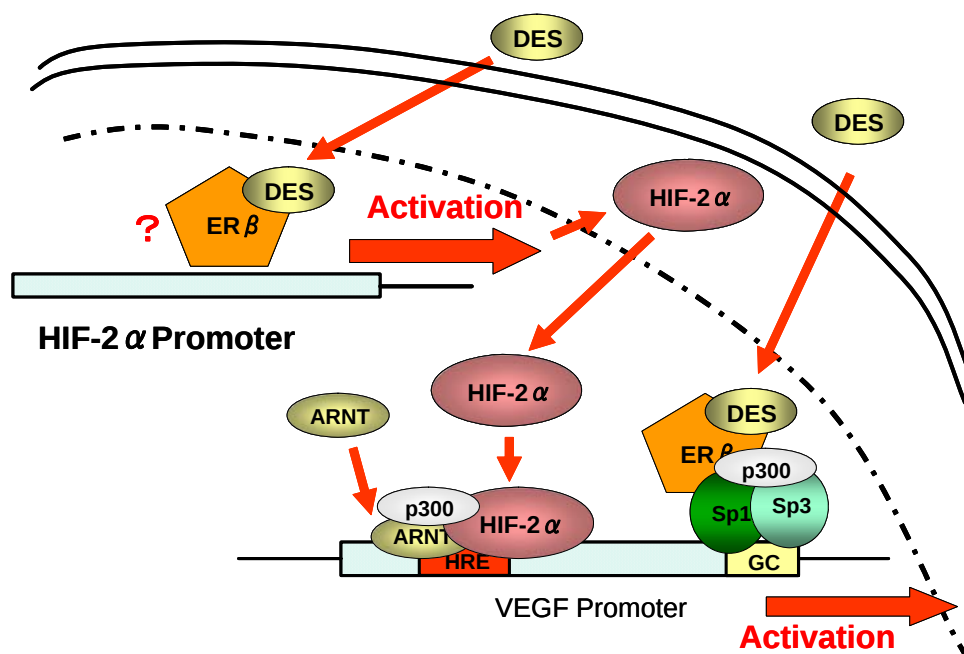


図20 卵巣顆粒膜細胞での、DESによるHIF2 α 及びVEGF遺伝子の発現調節機構

卵巣顆粒膜細胞では、ER β が発現しており DES はこれを介して HIF2 α の転写を調節しているものと考えられる。HIF2 α の転写調節領域には典型的なエストロゲン応答配列は存在せず、その作用様式の解明は今後の課題である。DES により発現誘導された HIF2 α は ARNT とヘテロダイマーを形成し VEGF 遺伝子の転写調節領域に存在する HRE (Hypoxia Response Element)に結合し、VEGF の卵巣顆粒膜細胞での転写を活性化しているものと予想される。また ER β も VEGF の転写調節領域に存在する GC-rich 領域で Spファミリーと会合していると考えられ、DES の結合によりさらにその転写を活性化するものと

予想される。

以上のように、卵巣における DES の作用をデータベースをもとに解析した。これまでの解析を総合すると、卵巣における DES の役割は以下の模式図のように表せる(図21)。

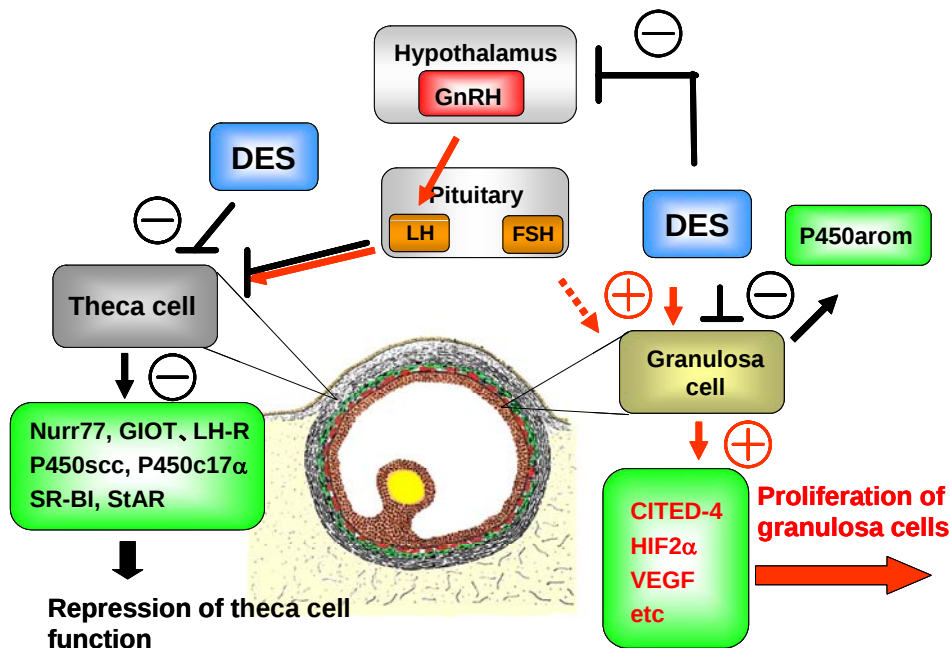


図21 卵巣における DES の作用

DES は視床下部一下垂体系に作用して、下垂体からの LH 分泌を素早く低下させる。その結果、卵巣夾膜細胞では、LH—LH 受容体—cAMP—PKA 経路を介する転写活性化機構が不活化され NGFI-B や GIOT といった immediate early gene の発現が迅速に低下する。さらに夾膜細胞に主に存在している LH 受容体、ステロイド合成関連の遺伝子群もその発現が著明に減少する。一方、DES は直接的にも卵巣夾膜細胞に作用して、これらの遺伝子群の発現をさらに抑制する。そのため、DES の投与により卵巣夾膜細胞の機能は著しく抑制されることが推測される。一方、DES 投与では下垂体からの FSH 分泌は影響を受けず、むしろその分泌は漸増する。これは、げっ歯類においては FSH 分泌は主としてインヒビン—アクチビン系で調節されているため、アクチビン産生に対する DES の影響がむしろポジティブに作用している可能性がある(Omori et al., Endocrinology, 146, 3379-3386, 2005)。卵巣顆粒膜細胞では、DES 投与によりアロマターゼ及び Dax-1 が強い発現抑制を受ける以外は、多くの顆粒膜細胞特異的遺伝子はその発現が増加している。これは、DES 投与による顆粒膜細胞の大幅な増加のせいかも知れない。顆粒膜細胞の増殖に関連する遺伝子として、Cited4、HIF2 α 、VEGF が候補遺伝子として上げられる。

これらの遺伝子の発現誘導が顆粒膜細胞の増殖を引き起こしている可能性が示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

TCDD 投与により、胎盤でのインターフェロン関連遺伝子群の誘導が明らかとなった。これはまったく新しい TCDD の作用である。この作用はヒトの羊膜細胞初代培養系を用いても再現することができた。ヒト羊膜細胞は、TCDD に対する感度が高く、今後ヒト胎盤における TCDD の作用を解析する良いモデルとなることが期待される。また今回の DES の卵巣にたいする *in vivo* での解析から、DES が視床下部一下垂体系に作用して、速やかに LH 分泌を抑制することを明らかにした。これは恐らく non-genomic な作用と思われ、DES の神経系に対する新たな作用として、今後の研究対象となってくることが期待される。

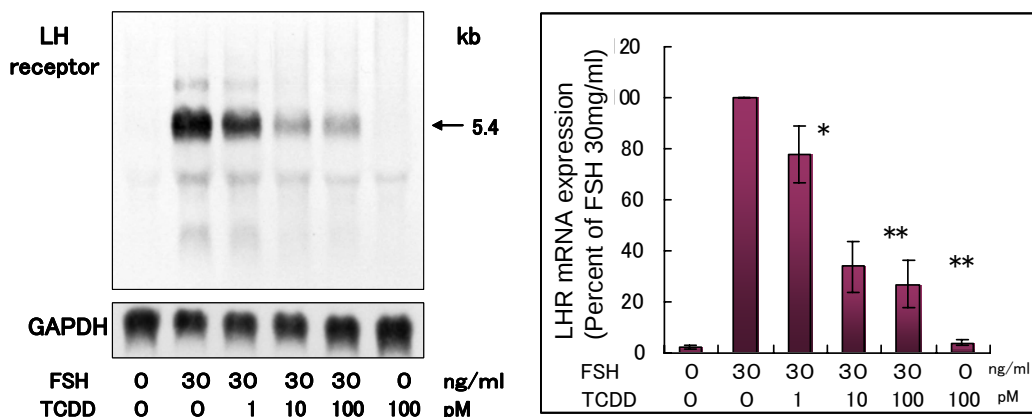
また、DES による HIF2 α 及び VEGF 遺伝子発現の誘導の解析から、卵巣ではこの系が顆粒膜細胞の増殖に関連する可能性を示唆した。これは、VEGF の生体における新たな役割を示唆するもので、今後の研究の展開が期待される。

3.2 生殖系細胞の採取と培養、内分泌かく乱物質の作用機序の解明

(群馬大学 峯岸グループ)

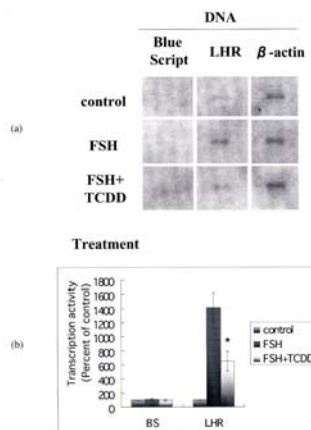
(1) 研究実施内容及び成果

ダイオキシンを代表とする内分泌かく乱物質は、発がん性や免疫毒性等、生体に様々な影響を与えることが報告されているが、中でも生殖機能への影響については当初から強く指摘されていた。ダイオキシンが排卵数を減少させる事実などから、卵巣機能についても強い影響を与えることが推測されているが、一方で卵巣機能への直接作用を検討した知見が乏しいのが現状である。我々は以前よりラット培養顆粒膜細胞を用いて、ゴナドトロピンレセプターの発現調節機構の研究を行ってきた。本研究ではまず、ゴナドトロピン受容体発現に対するダイオキシン(TCDD)の影響を解析した。ラット卵巣顆粒膜細胞の無血清初代培養系に低濃度の TCDD を加えると用量依存的に、LH 受容体の発現量が低下した。

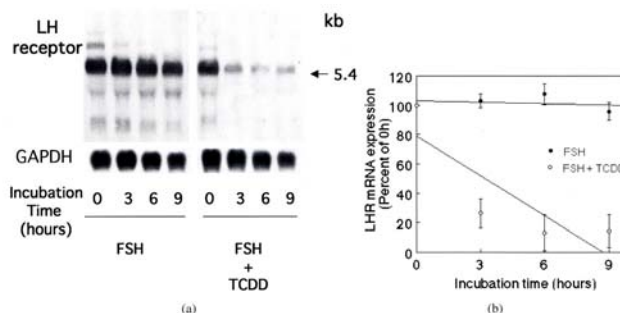


Dose-related effect of TCDD on FSH-induced LH receptor mRNA. (a) Granulosa cells from DES-primed immature rats were cultured alone for 24 h, and were then cultured with 30 ng/ml FSH alone and then FSH (30 ng/ml) with increasing concentration of TCDD for 48 h. LH receptor mRNA level was measured using Northern blot analysis, as described in Materials and Methods. The Northern blot is a representative of three experiments. (b) Autoradiographs of LH receptor (5.4 kb) mRNA were quantified by densitometric scanning. The amount of LH receptor mRNA extracted from cells cultured with FSH alone after 24 h was taken as 100%. Data were normalized for GAPDH mRNA levels in each sample and expressed as a value relative to the control. The absorbency values obtained from this experiment as well as those from the two experiments were standardized in relation to the control values and are represented (mean±SE; n = 3) in the bar graphs. The data shown are mean±SE of three independent experiments. **P < 0.01, *P < 0.05

卵巣顆粒膜細胞での LH 受容体の発現は、一義的には FSH による刺激を必要としている。FSH は、卵巣顆粒膜細胞上の FSH 受容体に結合し主に cAMP—PKA 系を活性化して LH 受容体の転写を活性化しているものと考えられる。一方、IGF-I は、転写された LH 受容体 mRNA の安定性を高めることで、2次的に LH 受容体の遺伝子発現を増強している。我々は次に、この TCDD の LH 受容体遺伝子の発現抑制がどのレベルで起こっているかを検討した。まず、cAMP の産生に対する TCDD の効果を検討したところ、FSH 刺激による cAMP の細胞内レベルは、TCDD 処理をしても変化していないことが明らかとなった。次に転写レベルでの LH 受容体遺伝子に対する TCDD の影響を、nuclear run-on assay を用いて解析した。FSH の投与により核内での LH 受容体遺伝子の転写は促進されるが、この FSH の作用を TCDD は約 50% 抑制していることが明らかとなった。



Stimulation of LH receptor gene transcription by FSH and TCDD. (a) Granulosa cells were cultured in 60-mm dishes containing 5×10^6 cells in 5 ml of serum-free medium. After 24 h in culture, granulosa cells were then incubated in the presence or absence of TCDD (10 pM) for 24 h and nuclear run-on assays were then performed as described in Materials and Methods. (b) Data acquired from the nuclear run-on experiments shows in (a) were quantitated by a fluorimetric analyzer (BAS 2000). Data were normalized for β -actin levels in each sample and are expressed relative to the control value. Transcriptional activities after incubation with FSH and TCDD are expressed relative to the activity affected by FSH alone. The data shown are mean $\pm$ SE of three independent experiments. * $P < 0.05$

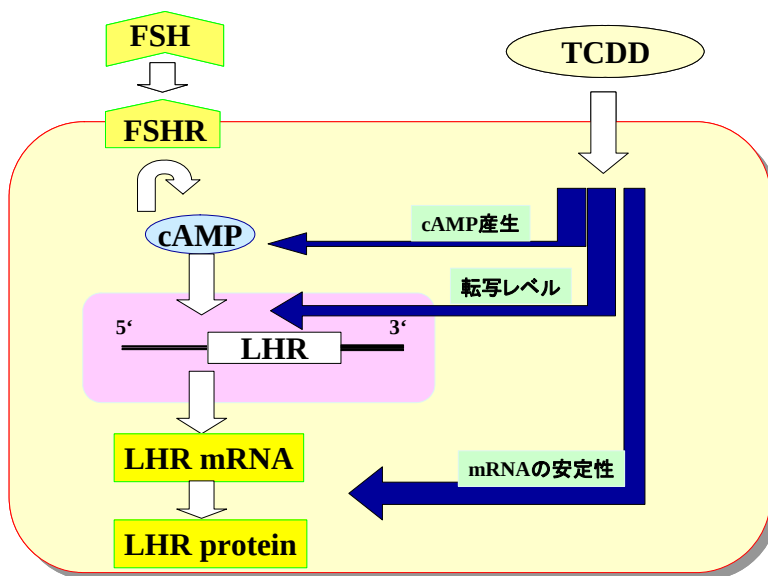


Effect of TCDD on LH receptor mRNA transcription. (a) Granulosa cells were preincubated with FSH alone or FSH and TCDD for 48 h. After this preincubation period, 5 mM actinomycin-D was added to arrest new RNA synthesis. Cells were harvested at 0, 3, 6 and 9 h after the addition of the transcription inhibitor, and LH receptor mRNA level was quantitated by Northern blot analysis. (b) The mRNA levels at time zero were assigned a relative value of 100%, and mRNA levels at all other times are expressed as percentages of this value.

さらに、LH 受容体転写産物の安定性の検討を行った。卵巣顆粒膜細胞を FSH 及び TCDD で処理したのち、5mM の actinomycin-D を加え新たな RNA 合成を抑制し、LH 受容体転写産物の半減期を測定した。

その結果、TCDD 処理を行った検体では、LH 受容体転写産物が3時間以内に著明に減少していることが明らかとなった。

これらのことから、TCDD による LH 受容体発現の抑制は、cAMP 産生のレベルではなく、転写レベル及び、mRNA の安定性(半減期)のレベルで主に調節されていることが明らかとなった。



ダイオキシンが卵巣顆粒膜細胞に作用すると CYP11B が誘導された。このため、エストロゲンの顆粒膜細胞におけるゴナドトロピンレセプター発現に対する作用の検討を進展させた。FSH 存在下にエストロゲン添加を行なうと、LH レセプターの発現が上昇することが判明した。これは、以前より指摘されていた事実であるが、今回は、mRNA レベルでの変化を明らかとし、そのメカニズムを検討している。現在まで、mRNA の代謝が抑制されることによる二次的増加が考えられる。E₂ は、LH-R mRNA の半減期を促進する蛋白の発現を抑制することで、LH-R の蛋白発現を上昇させていることが判明した。

さらに、現在まで我々の研究室では、IGF-1が強い LH レセプター誘導作用を示すことが判明している。このため、IGF-1 の作用と TCDD の作用の比較を行い、IGF-1 と TCDD は LH-R mRNA の産生、代謝において、全く反対の作用を示すことが判明した。

ビスフェノールAがゴナドトロピンレセプター発現に誘導的に働くことも確認できた。ラット顆粒膜細胞を用いた実験では、E₂、ビスフェノール A が FSH の存在下で FSH、LH レセプターの発現を用量依存的に増強した。また、同一実験条件でも、エストロゲンの基質を存在させることで、エストロゲンの添加と同等の効果を観察することができた。このことは、顆粒膜細胞が FSH の存在下で E₂ 産生を活発に行うことを示している。

(2)研究成果の今後期待される効果

E₂ は、LH-R mRNA の半減期を促進する蛋白の発現を抑制することで、LH-R の蛋白発現を上昇させていることが判明した。一方、同一細胞で、ダイオキシンで誘導される因子の中に CYP11B が存在した。これはエストロゲンを代謝する酵素であり、局所でゴナドトロピンレセプター発現に協力的に働くエストロゲンの産生を低下させ、ゴナドトロピンレセプターの減少させることを示している。TCDD の卵巣機能に対する影響のひとつにはエストロゲンを代謝する酵素の発現誘導することにより、エストロゲンを減少させてゴナドトロピンレセプター量を減少させると結論できる。また、TCDD の卵巣における検討の過程で、エストロゲンのレセプターとの結合による TCDD の作用メカニズムも明らかとされ、生理的に生体内で産生されるエストロゲンの局所作用が、より明確になった。現在施行されている排卵誘発法においては、ゴナドトロピン製剤がおもに用いられている。個々の患者のゴナドトロピン製剤に対する感受性はそのレセプターの質と量に依存するので、画一的な製剤の投与は過剰刺激症候群、多胎などの副作用をもたらしている。ゴナドトロピンレセプター発現のメカニズムが明らかになることにより、排卵誘発過程でモニターすべき物質や方法が明らかになるので、安全性の高いゴナドトロピン投与法の開発が期待される。

一方、エストロゲンが顆粒膜細胞のゴナドトロピンレセプター発現に重要な要因であり、ビスフェノール A 等のエストロゲンと構造上類似した物質は、今回の実験結果から考えてもエストロゲンと同様の作用を持つと考えられた。しかし、エストロゲンレセプターに対する親和性の相違に関する詳細、またレセプター結合様式に関しては今後の問題である。エストロゲンが、女性の様々な臓器で重要な働きをもつことから、閉経後に発生する障害に

公開資料

は、現在まで、エストロゲンの補充が行われてきたが、全ての臓器で治療効果が副作用を凌駕するのではないことが報告されている。各臓器におけるエストロゲンとレセプターとの結合様式を解明し製剤を開発することが、臓器特異性のある製剤を用いることを可能とし、他の臓器に対する副作用の軽減となり、閉経後の女性の健康管理に重要な意義を持つ。このため、内分泌攪乱物質の作用メカニズムを明らかにすることが、これらの有用な製剤開発に重要な貢献をすると考える。

4 研究参加者

①宮本グループ（サブトラクションクローニングとデータベースの構築及び内分泌かく乱物質の作用機構の解析の研究）

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
宮本 薫	福井大学 医学部医学科 生命情報医科学講座 分子生体情報学領域	教授	サブトラクションクローニング及びデータベースの構築	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
山田一哉	〃	助教授	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
水谷哲也	〃	助手	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
矢澤隆志	〃	助手	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
稲津哲也	〃	助手	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 15 年 8 月
井上佳子	〃	技術専門職員	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
上坂美紀	〃	研究員	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
関口俊夫	〃	大学院生	〃	平成 12 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
梶谷 宇	〃	大学院生	〃	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 3 月

公開資料

稲岡 齊彦	〃	大学院生	〃	平成 17 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
緒方 広子	〃	CREST 研究員	低濃度の内分泌かく 乱物質による生殖機 能関連遺伝子群のデ ータベースの構築	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
中川 幸	〃	CREST 技術員	〃	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
松浦 かのる	〃	研究 補助員	研究補助	平成 13 年 5 月～ 平成 17 年 10 月
藤井 広美	〃	研究 補助員	実験器具の洗浄 及び研究補助	平成 13 年 2 月～ 平成 17 年 10 月
佐竹 智子	〃	研究 補助員	研究補助	平成 14 年 9 月～ 平成 17 年 10 月
吉田 和世	〃	研究 補助員	〃	平成 13 年 5 月～ 平成 17 年 3 月
福島 愛子	〃	大学院生 (特別研 究学生)	サブトラクションクロ ーニング及びデータベ ースの構築	平成 14 年 4 月～ 平成 14 年 12 月
有馬 武史	〃	大学院生 (特別研 究学生)	〃	平成 15 年 1 月～ 平成 15 年 12 月

公開資料

②峯岸グループ(生殖系細胞の採取と培養、内分泌かく乱物質の作用機序の解明の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
峯岸 敬	群馬大学 大学院医学系 研究科 器官代謝制御 学講座 生殖再生分化 学	教授	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
伊藤理廣	〃	講師	ヒト顆粒膜細胞の収集	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
中村和人	〃	講師	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
篠崎博光	〃	講師	FSH レセプター解析	平成 13 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
土屋 恵	〃	特別 研究員	LH レセプター解析	平成 13 年 4 月～ 平成 15 年 3 月
井上京子	〃	大学院生	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 12 年 11 月～ 平成 15 年 5 月
松田弘子	〃	技官	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 12 年 11 月～ 平成 17 年 10 月
大森由紀	〃	大学院生	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 13 年 6 月～ 平成 17 年 3 月
山下宗一	〃	大学院生	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 13 年 6 月～ 平成 17 年 3 月
鹿沼達哉	〃	助教授	ヒト卵巣組織解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
高木 剛	〃	講師	ヒト卵巣組織解析	平成 14 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
斉藤智子	〃	大学院生	ヒト卵巣組織解析	平成 14 年 6 月～ 平成 17 年 10 月

公開資料

朝比奈 はるか	〃	大学院生	ヒト卵巣組織解析	平成 14 年 6 月～ 平成 17 年 10 月
池田 禎智	〃	大学院生	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
田村友宏	〃	大学院生	ヒト卵巣組織解析	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
岸 裕司	〃	助手	FSH レセプター解析	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
平川隆史	〃	助手	FSH レセプター解析	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
久保田和子	〃	大学院生	ゴナドトロピンレセプター解析	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 10 月
今泉麻希	〃	研究 補助員	研究補助	平成 13 年 8 月～ 平成 13 年 11 月
黒田里香	〃	研究 補助員	〃	平成 13 年 12 月～ 平成 17 年 10 月

5 成果発表等

(1) 論文発表 (国内 17 件、海外 63 件)

【原 著】

1. Minegishi, T., Hirakawa, T., Kishi, H., Abe, K., Ibuki, Y., Miyamoto, K.: Retinoic acid (RA) represses follicle stimulating hormone (FSH)-induced luteinizing hormone (LH) receptor in rat granulosa cells. Arch. Biochem. Biophys. 373 (1), 203-210, 2000.
2. Minegishi, T., Hirakawa, T., Kishi, H., Abe, K., Abe, Y., Mizutani, T., Miyamoto, K. : A role of insulin-like growth factor I for follicle stimulating hormone receptor (FSH-R) expression in Rat granulosa cells. Biol. Reprod.62, 325-333, 2000.
3. Hirakawa, T., Minegishi, T., Abe, K., Kishi, H., Ibuki, Y., Miyamoto, K.: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the expression of luteinizing hormone (LH) receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. Arch. Biochem. Biophys. 375 (2), 371-376, 2000.
4. Hirakawa, T., Minegishi, T., Abe, K., Kishi, H., Inoue, K., Ibuki, Y., Miyamoto, K.: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the expression of FSH receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. Endocrinology 141 (4), 1470-1476, 2000.
5. Minegishi, T., Hirakawa, T., Kishi, H., Abe, K., Tano, M., Abe, Y., Miyamoto, K.: The mechanisms of retinoic acid-induced regulation on the follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) in rat granulosa cells. Biochim. Biophys. Acta. 1495, 203-211, 2000.
6. Abe, K., Minegishi, T., Ibuki, Y., Kojima, M., Kangawa, K.: Expression of adrenomedullin in the human corpus luteum. Fertil. Steril. 74 (1), 141-145, 2000.
7. Minegishi, T., Tsuchiya, M., Hirakawa, T., Abe, K., Inoue, K., Mizutani, T.,

- Miyamoto, K.: Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in rat granulosa cells. *Life Sci.* 67, 1015-1024, 2000.
8. Mizutani, T., Yamada, K., Minegishi, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of rat scavenger receptor class B type I gene. *J. Biol. Chem.* 275 (29), 22512-22519, 2000.
 9. Yamada, K., Mizutani, T., Shou, Z., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Inazu, T., Miyamoto, K.: Cloning and functional expression of an E box-binding protein from rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 64, 1315-1319, 2001.
 10. Miyamoto, K., Morishita, Y., Yamazaki, M., Minamino, N., Kangawa, K., Mizutani, T., Yamada, K., Minegishi, T.: Isolation and characterization of vascular smooth muscle cell growth promoting factor from bovine ovarian follicular fluid, and its cDNA cloning from bovine and human ovary. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 93-100, 2001.
 11. Shimada, N., Yamada, K., Tanaka, T., Kawata, H., Mizutani, T., Miyamoto, K., Matsuzawa, T.: Alterations of gene expression in endoderm differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Mol. Reprod. Dev.* 60, 165-171, 2001.
 12. Sekiguchi, T., Miyamoto, K., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Yoshino, M., Minegishi, T., Takei, Y., Kangawa, K., Minamino, N., Saito, Y., Kojima, M.: Molecular cloning of natriuretic-peptide receptor A from bull frog (*Rana catesbeiana*) brain and its functional expression. *Gene* 273, 251-257, 2001.
 13. Niiya, T., Osawa, H., Onuma, H., Suzuki, Y., Taira, M., Yamada, K., Makino, H.: Activation of mouse phosphodiesterase 3B gene promoter by adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* 505, 136-140, 2001.
 14. Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Okada, T., Minegishi, T., Miyamoto, K.: Cloning and characterization of gonadotropin inducible ovarian transcription factors (GIOT1 and 2) that are novel members of the (Cys)₂-(His)₂-type zinc finger protein family. *Mol. Endocrinol.* 15, 1693-1705, 2001.
 15. Kikkawa, E., Hinata, M., Keng, V. W., Myint, Z., Sato, A., Yamada, K., Tanaka,

- T., Noguchi, T.: Sp family members stimulate the transcription of Hex gene via interactions with GC boxes. *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 885-891, 2001.
16. Minegishi, T., Tsuchiya, M., Nakamura, K., Mizutani, T., Miyamoto, K.: Molecular Cloning, Cellular Distribution and Regulation of Rat Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in the Ovary. *J. Reprod. Dev.* 48 (1), 1-15, 2002.
 17. Inoue, K., Nakamura, K., Abe, K., Hirakawa, T., Tsuchiya, M., Matsuda, H., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Effect of Transforming Growth Factor β on the Expression of Luteinizing Hormone Receptor in Cultured Rat Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* 67, 610-615, 2002.
 18. Satoh, T., Toyoda, M., Hoshino, H., Monden, T., Yamada, M., Shimizu, H., Miyamoto, K., Mori, M. : Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene* 21, 2171-2180, 2002.
 19. Yoshino, M., Mizutani, T., Yamada, K., Tsuchiya, M., Minegishi, T., Yazawa, T., Kawata, H., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol. Reprod.* 66, 1813-1819, 2002.
 20. Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., Miyamoto, K.: Rat zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1), a nuclear factor-YA-interacting nuclear protein, forms a homodimer. *Gene* 290, 107-114, 2002.
 21. Yamada, K., Kawata, H., Matsuura K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Functional analysis and the molecular dissection of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 368-374, 2002.
 22. Sekiguchi, T., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Kawata, H., Yoshino, M., Kajitani, T., Kameda, T., Minegishi, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of the Epi-regulin gene in the rat ovary. *Endocrinol.* 143, 4718-4729,

2002.

23. Onuma, H., Osawa, H., Yamada, K., Ogura, T., Tanabe, F., Granner, D. K., Makino, H.: Identification of the insulin-regulated interaction of phosphodiesterase 3B with 14-3-3 β protein. *Diabetes* 51, 3362-3367, 2002.
24. Shou, Z., Yamada, K., Inazu, T., Kawata, H., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Okada, K., Miyamoto, K.: Genomic structure and analysis of transcriptional regulation of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene. *Gene* 302, 83-94, 2003.
25. Kato, M., Inazu, T., Kawai, Y., Masamura, K., Yoshida, M., Tanaka, N., Miyamoto, K., Miyamori, I.: Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1109-1115, 2003.
26. Yazawa, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kawata, H., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Shou, Z., Miyamoto, K.: Involvement of cAMP response element binding protein (CREB), steroidogenic factor 1 (SF-1) and Dax-1 in the regulation of gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 (GIOT1) gene expression by FSH in ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 144, 1920-1930, 2003.
27. Osawa, H., Niiya, T., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Ogura, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohashi, J., Yamada, K., Liang, S.-J., Manganiello, V. C., Fujita-Yamaguchi, Y., Makino, H.: Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the 5' flanking region of the human phosphodiesterase 3B gene: absence of evidence for major effects of identified polymorphisms on susceptibility to Japanese type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 79, 43-51, 2003.
28. Minegishi, T., Hirakawa, T., Abe, K., Kishi, H., Miyamoto, K.: Effect of IGF-1 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the expression of LH receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 202, 123-131, 2003.

29. Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Analysis of zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 1-interacting proteins: molecular cloning and characterization of a member of the ZHX family, ZHX3. *Biochem. J.* 373, 167-178, 2003.
30. Asai, Y., Yamada, K., Watanabe, T., Keng, V. W., Noguchi, T.: Insulin stimulates expression of pyruvate kinase M gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1272-1277, 2003.
31. Kawata, H., Yamada, K., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor. *Biochem. J.* 373, 747-757, 2003.
32. Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Noguchi, T., Miyamoto, K.: Insulin induces the expression of the SHARP-2/Stra13/DEC1 gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 30719-30724, 2003.
33. Inoue, K., Nakamura, K., Abe, K., Hirakawa, T., Tsuchiya, M., Oomori, Y., Matsuda, H., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Mechanisms of action of TGF-beta on the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid levels rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 69, 1238-1244, 2003.
34. Tsuchiya, M., Inoue, K., Matsuda, H., Nakamura, K., Mizutani, T., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and LH receptor in MA-10 cells. *Life Sci.* 73, 2855-63, 2003.
35. Sato, K., Nakamura, T., Mizuguchi, M., Miura, K., Tada, M., Aizawa, T., Gomi, T., Miyamoto, K., Kawano, K.: Solution structure of epiregulin and the effect of its C-terminal domain for receptor binding affinity. *FEBS Lett.* 553, 232-238, 2003.
36. Kawata, H., Yamada, K., Shou, Z., Mizutani, T., Miyamoto, K.: The mouse zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) family: ZHX2 forms a heterodimer with ZHX3. *Gene* 323, 133-140, 2003.

37. Yazawa, T., Nakayama, Y., Fujimoto, K., Matsuda, Y., Abe, K., Kitano, T., Abe, S., Yamamoto, T. : Abnormal spermatogenesis at low temperatures in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*: possible biological significance of the cessation of spermatocytogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 60-66, 2003.
38. Yamamoto, T., Yazawa, T., Fujimoto, K., Kitano, T., Abe, S. : Low temperature promotes annexin V expression in newt testis. *Zoolog. Sci.* 20, 733-735, 2003.
39. Kajitani, T., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kawata, H., Miyamoto, K.: Cloning and characterization of GCX-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 145(5), 2307-2318, 2004.
40. Yamada, K., Kawata, H., Mizutani, T., Arima, T., Yazawa, T., Matsuura, K., Shou, Z., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Gene expression of basic helix-loop-helix transcription factor, SHARP-2, is regulated by gonadotropins in the rat ovary and MA-10 cells. *Biol. Reprod.* 70, 76-82, 2004.
41. Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Shigematsu, Y., Mayumi, M., Miyamoto, K.: The rat enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene: hepatic expression, genomic structure, and promoter analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 81-90, 2004.
42. Shou, Z., Yamada, K., Kawata, H., Yokoyama, O., Miyamoto, K.: A mechanism of induction of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene expression by interleukin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 885-890, 2004.
43. Miyamoto, K.: Effects of dioxin on gene expression in female reproductive system in the rat. *Environ. Sci.* 11, 47-55, 2004.
44. Minegishi, T., Hirakawa, T., Abe, K., Kishi, H., Miyamoto, K.: Effect of insulin-like growth factor-1 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the

- expression of luteinizing hormone receptors in cultured granulosa cells. *Environ. Sci.* 11, 57-71, 2004.
45. Sato, A., Keng, V. W., Yamamoto, T., Kasamatsu, S., Ban, T., Tanaka, H., Satoh, S., Yamada, K., Noguchi, T.: Identification and characterization of the hematopoietic cell-specific enhancer element of the mouse Hex gene. *J. Biochem. (Tokyo)* 135, 259-268, 2004.
 46. Kawata, H., Yamada, K., Matsuura, K., Shou, Z., Miyamoto, K.: Insulin regulates the expression of the enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene via different pathways in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Horm Metab Res.* 36, 526-30, 2004.
 47. Sekiguchi, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kajitani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Miyamoto, K.: Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 281-291, 2004.
 48. Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., Fujimoto, T.: Human coronavirus 229E binds to CD13 in raft and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* 78, 8701-8708, 2004.
 49. Osawa, H., Yamada, K., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Kawata, H., Nishimiya, T., Niiya, T., Shimizu, I., Nishida, W., Hashiramoto, M., Kanatsuka, A., Fujii, Y., Ohashi, J., Makino, H.: The G/G genotype of resistin SNP-420 increases type 2 diabetes susceptibility by inducing its promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 678-686, 2004.
 50. Mizutani, T., Yoshino, M., Satake, T., Nakagawa, M., Ishimura, R., Tohyama, C., Kokame, K., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)- inducible and -suppressive genes in the rat placenta: induction of interferon- regulated genes with possible inhibitory roles for angiogenesis in the placenta. *Endocrin. J.* 51, 569-567, 2004.
 51. Nakamura, K., Yamashita, S., Omori, Y., Minegishi, T. : A splice variant of the human LH receptor modulates the expression of wild type human LH receptor. *Molecular Endocrinology* 18(6), 1461-1470, 2004.

52. Sumino, H., Ichikawa, S., Abe, M., Endo, Y., Nakajima, Y., Minegishi, T., Ishikawa, O., Kurabayashi, M. : Effects of Aging and Postmenopausal Hypoestrogenism on Skin Elasticity and Bone Mineral Density in Japanese Women. *Endocrine Journal* 51(2), 159-164, 2004.
53. Abe, Y., Minegishi, T., Leung, P.C.K. : Activin Receptor Signaling. *Growth Factor* 22(2), 105-110, 2004.
54. 中村和人、大森由紀、峯岸 敬:特集 卵子とエンドクリン・パラクリン. インヒビン・アクチビン・フォリスタチン系と卵子. *HORMONE FRONTIER GYNECOLOGY* 11(1), 18-22, 2004.
55. 大森由紀、中村和人、峯岸 敬:特集:生殖領域におけるホルモンと受容体の最近の研究. 卵巣におけるゴナドトロピンレセプターの発現調節. *臨床化学* 33(4), 146-153, 2004.
56. Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., Miyamoto, K.: SHARP-2/ Stra13/ DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett.* 579, 1509-1514. 2005.
57. Inazu, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Miyamoto, K.: Cloning, expression, and chromosomal assignment of human pleckstrin 2. *Mol. Biol. Rep.* 32, 35-40, 2005.
58. Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., Miyamoto, K.: SHARP-2/ Stra13/ DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett.* 579, 1509-1514, 2005.
59. Inazu, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Miyamoto, K.: Cloning, expression, and chromosomal assignment of human pleckstrin 2. *Mol. Biol. Rep.* 32, 35-40, 2005.
60. Tajima, K., Yoshii, K., Fukuda, S., Orisaka, M., Miyamoto, K., Amsterdam, A., Kotsuji, F: LH-induced ERK activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology* 146,

2903-2910 , 2005.

61. Omori, Y., Nakamura, K., Yamashita, S., Matsuda, H., Mizutani, T., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Effect of Follicle-stimulating Hormone and Estrogen on the Expression of Betaglycan Messenger Ribonucleic Acid levels in Cultured Rat Granulosa Cells. *Endocrinology*. 146(8), 3379-86, 2005.
62. Osawa, H., Onuma, H., Ochi, M., Murakami, A., Yamauchi, J., Takasuka, T., Tanabe, F., Shimizu, I., Kato, K., Nishida, W., Yamada, K., Tabara, Y., Yasukawa, M., Fujii, Y., Ohashi, J., Miki, T., Makino, H.: Resistin SNP-420 determines its monocytes mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 596-602, 2005.
63. Orisaka, M., Mizutani, T., Tajima, K., Orisaka, S., Shukunami, K., Miyamoto, K., Kotsuji, F.: Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* (in press).

【総 説】

1. 峯岸 敬, 平川隆史, 安部和子, 井上京子: ダイオキシンによる卵巣における内分泌攪乱作用. *産婦人科の実際* 49 (8), 1001-1009, 2000.
2. 山田一哉、野口民夫: 炭水化物による遺伝子発現調節機構. *小児科診療* 64(5), 667-673, 2001.
3. 山田一哉、野口民夫: 転写因子 Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) と糖質・脂質代謝. *日本栄養・食糧学会誌* 55(1), 45-50, 2002.
4. 梶谷 宇、水谷哲也、宮本 薫: 性腺系特異的に発現する新規 HMG-box 蛋白質の解析. *日本生殖内分泌学会雑誌* 8, 35-39, 2003.
5. 峯岸 敬: ギナドトロピンレセプターの機能調節. *日本産科婦人科学会熊本地方部会雑誌* 47, 15-22, 2003.
6. 山下宗一, 平川隆史, 峯岸 敬: 環境ホルモンの卵巣機能への影響. *産婦人科*

の実際 52(13), 2307-2315, 2003.

7. 中村和人, 峯岸 敬. ギナドトロピンレセプター. 産婦人科治療 87(5), 509-515, 2003.
8. Yoshino, M., Mizutani, T., Yamada, K., Arima, T., Yazawa, T., Ogata-Kawata, H., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Miyamoto, K.: Characterization of two FSH inducible genes, a nuclear transcriptional co-activator p120 and a novel serine protease-like protein, in the rat ovarian granulosa cells. Jpn. J. Reprod. Endocrinol. 9, 29-34, 2004.
9. 山田一哉、野口民夫: 糖脂質代謝酵素遺伝子発現の糖反応性エレメント. Diabetes Frontier 15, 189-193, 2004.
10. 山田一哉: 新しい転写因子ファミリー: ZHX. 生体の科学 55, 274, 2004.
11. 峯岸 敬: 4. リサーチレビュー 遺伝(子)情報 ー何がどこまでわかるのかー 2) 生殖にかかわる最近の話題 (2) ギナドトロピンの作用について. 日本産科婦人科学会雑誌 56(9), N-615-619, 2004.
12. Yamada, K., Miyamoto, K.: Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. Front. Biosci. 10, 3151-3171, 2005.
13. 矢澤隆志、梅澤明弘、宮本薫 : 間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 日本生殖内分泌学会雑誌. in press.

【著 書】

1. Minegishi, T. : The Regulation of gonadotropin receptor in the ovary. The Ovary Second Edition (Edited by Peter C.K. Leung and Eli Y. Adashi) pp79-92(p664), Elsevier Academic Press 2004.
2. 松尾壽之、寒川賢治、児島将康、宮田篤郎、中里雅光、伊達紫、宮本 薫、南野直人: 脳とホルモニー情報を伝えるネットワーク 共立出版. 2005.

3. 山田一哉:2. 糖質 「栄養・食糧学データハンドブック」(日本栄養・食糧学会編) 同文書院 (印刷中)
4. 山田一哉、野口民夫:遺伝子発現と栄養.「医師のための臨床栄養学」(岡田正、馬場忠雄、山城雄一郎編)医学書院 (印刷中)

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待、口頭講演 (国内 67 件、海外 5 件)

1. 水谷哲也¹、山田一哉¹、稲津哲也¹、矢澤隆志¹、関口俊男¹、吉野美紀¹、峯岸敬²、宮本 薫¹(¹福井医科大学・生化学²、²群馬大学・産婦人科):ゴナドトロピン誘導性転写因子(GIOT)の発現. 第5回日本生殖内分泌学会. 大阪, 2000, 12, 1.
2. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学,² 科技団・CREST):ダイオキシンと生殖機能. 第53回日産婦栃木地方部会プログラム. 栃木, 2001, 2, 4.
3. 宮本 薫^{1,2}(福井医科大学・¹ 生化学²、² 科技団・CREST):ゴナドトロピンと生殖内分泌(GnRH II、インヒビンから環境ホルモンまで). 第53回静岡 LS セミナー「生命科学の最前線」. 静岡, 2001, 3, 16.
4. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学,² 科技団・CREST):ダイオキシンと生殖機能. 第80回ジャーナルクラブ. 群馬, 2001, 4, 12.
5. 吉野美紀^{1,4}、水谷哲也^{1,4}、山田一哉^{1,4}、矢澤隆志^{1,4}、関口俊男^{1,4}、寿 張飛²、井上佳子^{1,4}、土屋 恵^{3,4}、峯岸 敬^{3,4}、宮本 薫^{1,4}(福井医科大学・医・¹生化学²、²泌尿器科学、³群馬大学・医・産科婦人科学、⁴ 科技団・CREST):ラット卵巣顆粒膜細胞における Egr-1(early growth response protein-1) の発現とその役割. 第19回日本生化学会北陸支部会. 金沢, 2001, 5.
6. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学,² 科技団・CREST):レセプター異常症. 日産婦日母群馬県支部総会. 群馬, 2001, 6, 23.
7. 吉野美紀^{1,4}、水谷哲也^{1,4}、山田一哉^{1,4}、矢澤隆志^{1,4}、関口俊男^{1,4}、寿 張飛²、井上佳子^{1,4}、土屋 恵^{3,4}、峯岸 敬^{3,4}、宮本 薫^{1,4}(福井医科大学・医・¹生化学²、

- ²泌尿器科学、³群馬大学・医・産科婦人科学、⁴科技団・CREST):ラット卵巣顆粒膜細胞における early growth response protein -1(Egr-1) の発現. 第 74 回日本内分泌学会学術総会. 2001, 6, 横浜.
8. 水谷哲也 ^{1,4}、吉野美紀 ^{1,4}、山田一哉 ^{1,4}、矢澤隆志 ^{1,4}、関口俊男 ^{1,4}、寿 張飛 ²、井上佳子 ^{1,4}、土屋 恵 ^{3,4}、峯岸 敬 ^{3,4}、宮本 薫 ^{1,4}(福井医科大学・医・¹生化学 2、²泌尿器科学、³群馬大学・医・産科婦人科学、⁴科技団・CREST):ラット黄体形成ホルモン受容体(LHR)遺伝子の発現調節機構の解析. 第 74 回日本内分泌学会学術総会. 若手研究奨励賞受賞講演. 横浜, 2001, 6.
 9. 山田一哉 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、寿 張飛 ²、矢澤隆志 ^{1,3}、関口俊男 ^{1,3}、吉野美紀 ^{1,3}、稲津哲也 ^{1,3}、宮本 薫 ^{1,3}(福井医科大学・医・¹生化学 2、²泌尿器科学、³科技団・CREST):ラット顆粒膜細胞特異的転写因子の検索. 第 74 回日本内分泌学会学術総会. 横浜, 2001, 6.
 10. 峯岸 敬 ^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学、²科技団・CREST):ダイオキシンと生殖機能. 第 53 回日本産婦人科学会 栃木地方部会. 栃木, 2001, 6.
 11. 峯岸 敬 ^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学、²科技団・CREST):ダイオキシンと生殖機能. 碓氷・安中医師会講演会. 2001, 6.
 12. 宮本 薫 ^{1,2}(福井医科大学・¹生化学 2、²科技団・CREST):ゴナドトロピンと生殖内分泌-GnRH II、インヒビンから環境ホルモンまで-. 群馬大学生体調節研究所シンポジウム. 前橋, 2001, 7.
 13. 峯岸 敬 ^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学、²科技団・CREST):培養顆粒膜細胞における遺伝子発現と性腺刺激ホルモンの作用機構. 第 94 回日本繁殖生物学会大会. 東京, 2001, 9.
 14. 水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、矢澤隆志 ^{1,3}、川田広子 ^{1,3}、関口俊男 ^{1,3}、吉野美紀 ^{1,3}、梶谷 宇 ^{1,3}、寿 張飛 ²、井上佳子 ^{1,3}、宮本 薫 ^{1,3}(福井医科大学・医・¹生化学 2、²泌尿器科学、³科技団・CREST):ホルモン誘導性転写因子 GIOT の機能解析. 第 74 回日本生化学会大会. 京都, 2001, 10.
 15. 矢澤隆志 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、関口俊男 ^{1,3}、吉野美紀 ^{1,3}、寿 張飛 ²、宮本 薫 ^{1,3}(福井医科大学・医・¹生化学 2、²泌尿器科学、³科技団・CREST):ラッ

- ト GIOT1(gonadotropin inducing ovarian transcription factor 1) 遺伝子の転写制御機構の解析. 第 74 回日本生化学会大会. 京都, 2001, 10.
16. 川田広子^{1,3}、山田一哉^{1,3}、寿 張飛²、水谷哲也^{1,3}、矢澤隆志^{1,3}、宮本薫^{1,3}
(福井医科大学・¹ 生化学 2、² 泌尿器科学、³ 科技団・CREST): ZHX1 相互作用蛋白質の解析. 第 74 回日本生化学会大会. 京都, 2001, 10.
17. 関口俊男^{1,3}、水谷哲也^{1,3}、山田一哉^{1,3}、矢澤隆志^{1,3}、寿 張飛²、吉野美紀^{1,3}、
宮本 薫^{1,3}(福井医科大学・医・¹ 生化学 2、² 泌尿器科学、³ 科技団・CREST): ラット Epiregulin 遺伝子のクローニングと転写制御機構の解析. 第 74 回日本生化学会大会. 京都, 2001, 10.
18. Shou, Z.¹, Kawata, H.^{2,3}, Inazu, T.^{2,3}, Mizutani, T.^{2,3}, Okada, K.¹, Yamada, K.^{2,3}, Miyamoto, K.^{2,3} (¹Dept.of Urology, ²Biochemistry, Fukui Med. Univ., ³CREST, JST): Isolation and promoter analysis of the mouse zinc fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene. 第 74 回日本生化学会大会. 京都, 2001, 10.
19. 水谷哲也^{1,4}、吉野美紀^{1,4}、山田一哉^{1,4}、矢澤隆志^{1,4}、川田広子^{1,4}、関口俊男^{1,4}、
梶谷 宇^{1,4}、寿 張飛²、土屋 恵^{3,4}、峯岸 敬^{3,4}、宮本 薫^{1,4}(福井医科大学・
医・¹ 生化学 2、² 泌尿器科学、³ 群馬大学・医・産科婦人科学、⁴ 科技団・CREST):
LH receptor の発現に対する転写因子 Egr-1 の役割. 第6回日本生殖内分泌学会. 学術奨励賞受賞講演. 東京, 2001, 11.
20. 土屋 恵^{1,2}、峯岸 敬^{1,2}、中村和人^{1,2}、井上京子^{1,2}、大森由紀^{1,2}、山下宗一^{1,2}、
松田弘子^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): MA-10 細胞における LH 刺激に対する Steroidogenic Acute Regulatory Protein(StAR)及び LH receptor の発現. 第 6 回日本生殖内分泌学会. 東京, 2001, 11.
21. Miyamoto, K.^{1,2} (¹Dept.of Biochemistry, Fukui Med. Univ., ²CREST, JST): Cloning and identification of genes in reproductive organs affected by low concentrations of endocrine disrupters. Second Canada-Japan Bilateral Workshop on Reproductive Biology and Human Reproduction. Fukui, Japan , 2001, 11.
22. 吉野美紀^{1,4}、水谷哲也^{1,4}、山田一哉^{1,4}、矢澤隆志^{1,4}、関口俊男^{1,4}、寿 張飛²、
井上佳子^{1,4}、土屋 恵^{3,4}、峯岸 敬^{3,4}、宮本 薫^{1,4}(福井医科大学・医・¹ 生化学 2、

- ²泌尿器科学、³群馬大学・医・産科婦人科学、⁴科技団・CREST):ラット卵胞発育過程における転写因子 early growth response gene-1 (Egr-1) の発現と LH レセプター上流域に対するはたらき. 第26回日本比較内分泌学会大会. 東京, 2001, 12.
23. 矢澤隆志 ^{1,3}、中川 幸 ^{1,3}、吉田和世 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、川田広子 ^{1,3}、井上佳子 ^{1,3}、関口俊男 ^{1,3}、吉野美紀 ^{1,3}、梶谷 宇 ^{1,3}、峯岸 敬 ^{2,3}、宮本 薫 ^{1,3} (¹福井医科大学・医・生化学2、²群馬大学・医・産科婦人科学、³科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞において低濃度ダイオキシンによって発現が誘導・抑制される遺伝子群の検索. 環境ホルモン学会第4回研究発表会. 東京, 2001, 12.
24. 川田広子 ^{1,2}、黒田孝一 ³、圓藤吟史 ³、圓藤陽子 ⁴ (¹福井医科大学・医・生化学2、²科技団・CREST、³大阪市立・医・産業医学、⁴関西医大・医・公衆衛生): Dimethylarsinic Acid Targets Tubulin in Mitotic Cells to Induce Abnormal Spindles. 大阪市医学会市長賞授与式. 大阪, 2002, 2.
25. 関口俊男 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、矢澤隆志 ^{1,3}、川田広子 ^{1,3}、寿 張飛 ²、吉野美紀 ^{1,3}、梶谷 宇 ^{1,3}、井上佳子 ^{1,3}、宮本 薫 ^{1,3} (福井医科大学・医・¹生化学2、²泌尿器科学、³科技団・CREST): 卵巣で発現する増殖因子 Epiregulin の転写調節機構の解析. 日本内分泌学会北陸支部会. 福井, 2002, 3.
26. 中村和人 ^{1,2}、大森由紀 ^{1,2}、山下宗一 ^{1,2}、峯岸 敬 ^{1,2} (¹群馬大学・医・産婦人科学、²科技団・CREST): ヒトLHレセプターの dimerization とその生理的意義について. 第54回日本産婦人科学会. 東京, 2002, 4.
27. Minegishi, T. ^{1,2} (¹群馬大学・医・産婦人科学、²科技団・CREST): Regulation of Gonadotropin Receptors by IGF-I and TCDD in Granulosa Cells. Vth Sapporo International Symposium on Ovarian Function. Sapporo, 2002, 5, 17.
28. 矢澤隆志 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、川田広子 ^{1,3}、関口俊男 ^{1,3}、吉野美紀 ^{1,3}、梶谷 宇 ^{1,3}、寿 張飛 ²、峯岸 敬 ^{3,4}、宮本 薫 ^{1,3} (福井医科大学・¹生化学2、²泌尿器科学、³科技団・CREST、⁴群馬大学・産婦人科学): ラット GIOT1 (gonadotropin-inducible ovarian transcription factor) 遺伝子の転写調節機構. 第75回日本内分泌学会学術総会. 大阪, 2002, 6.
29. 関口俊男 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、矢澤隆志 ^{1,3}、川田広子 ^{1,3}、寿 張飛 ²、

- 吉野美紀^{1,3}、梶谷 宇^{1,3}、宮本 薫^{1,3}(福井医科大学・¹生化学 2、²泌尿器科学、³ 科技団・CREST): ラット卵巣顆粒膜細胞において FSH によって誘導される増殖因子 Epregrulin の転写調節機構の解析. 第 75 回日本内分泌学会学術総会. 大阪, 2002, 6.
30. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST): ギナトトロピンレセプターの機能調節. 平成 14 年度日本産科婦人科学会熊本地方部会総会並びに第 180 回学術講演会 熊本, 2002, 7, 13.
31. Miyamoto, K.^{1,2}(福井医科大学・¹生化学 2、² 科技団・CREST): Comprehensive analysis of genes in reproductive organs affected by low concentrations of endocrine disruptors. 5th Scientific Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies "Endocrine disruptors symposium". Malaysia , 2002, 9.
32. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST): 生殖機能とダイオキシン. 第 10 回ホルモン療法を考える神奈川県若手医師の会 横浜, 2002, 9, 13.
33. 宮本 薫^{1,2}(福井医科大学・¹生化学 2、² 科技団・CREST): 内分泌かく乱物質研究のニューアプローチ-遺伝子発現を中心として-第 10 回ホルモン療法を考える神奈川県若手医師の会. 横浜, 2002, 9.
34. 宮本 薫^{1,2}(福井医科大学・¹生化学 2、² 科技団・CREST): 低濃度ダイオキシン (TCDD) の生殖系への影響解析 - 遺伝子発現を中心として -. 第 75 回日本生化学会大会. シンポジウム 内分泌攪乱作用研究の進展. 京都, 2002, 10.
35. Minegishi, T. ^{1,2}, Nakamura, K. ^{1,2}, Hirakawa, T. ¹, Tsuchiya, M. ^{1,2}, Matsuda H. ^{1,2}, Miyamoto, K. ^{2,3}(¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST、³ 福井医科大学・生化学 2): Effect of TCDD on the expression of gonadotropin receptors in cultured rat granulosa cells. The Second Pacific Conference on Reproductive Biology and Environmental Science. Kyoto , 2002, 11.
36. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST): Effect of Activin on the Expression of Gonadotropin Receptor in the Ovary. 中日医学大会 2002 (China-Japan Medical Conference 2002) Beijin, China, 2002, 11, 3

37. 関口俊男^{1,3}、水谷哲也^{1,3}、山田一哉^{1,3}、矢澤隆志^{1,3}、川田広子^{1,3}、寿 張飛²、吉野美紀^{1,3}、梶谷 宇^{1,3}、井上佳子^{1,3}、宮本 薫^{1,3}(福井医科大学・¹生化学 2、²泌尿器科学、³ 科技団・CREST):FSH によりラット卵巢顆粒膜細胞で誘導される成長因子 Epregrulin の転写調節機構の解析. 第 27 回日本比較内分泌学会大会. 岡山, 2002, 11.

38. Yazawa, T.^{1,3}, Nakagawa, M.^{1,3}, Yoshida, K.^{1,3}, Mizutani, T.^{1,3}, Yamada, K.^{1,3}, Kawata, H.^{1,3}, Inoue, Y.^{1,3}, Sekiguchi, T.^{1,3}, Yoshino, M.^{1,3}, Kajitani, T.^{1,3}, Minegishi, T.^{2,3}, Miyamoto, K.^{1,3} (¹Dept.of Biochemistry, Fukui Med. Univ., ²Dept. of Obstetrics and Gynecology, Gunma Univ. School of Medicine, ³CREST, JST): Identification of TCDD-inducible/ suppressive genes in rat ovarian granulosa cells. Environmental Sciences 9 (2-3), つくば, 2002, 12.

39. 梶谷 宇^{1,3}、水谷哲也^{1,3}、山田一哉^{1,3}、矢澤隆志^{1,3}、関口俊男^{1,3}、吉野美紀^{1,3}、川田広子^{1,3}、寿 張飛²、井上佳子^{1,3}、宮本 薫^{1,3}(福井医科大学・¹生化学 2、²泌尿器科学、³ 科技団・CREST):性腺特異的に発現する新規 HMG-Box 転写因子の解析. 第 7 回日本生殖内分泌学会. 学術奨励賞受賞. 大阪, 2002, 12.

40. 水谷哲也^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、中川 幸^{1,2}、吉田和世^{1,2}、吉野美紀^{1,2}、関口俊男^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、川田広子^{1,2}、井上佳子^{1,2}、山田一哉^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(福井医科大学・¹生化学 2、² 科技団・CREST):ラット卵巢顆粒膜細胞の遺伝子発現に及ぼす低濃度ダイオキシンの影響. 第 7 回日本生殖内分泌学会. 大阪, 2002, 12.

41. 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST):ゴナドトロピン受容体と生殖機能. 第 124 回日本不妊学会関西支部集談会 第 26 回関西アンドロロジーカンファレンス 大阪, 2003, 3, 29.

42. 山田一哉^{1,2}、川田広子^{1,2}、寿 張飛³、水谷哲也^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井大学・泌尿器科学):インスリン誘導性転写因子の発現制御機構の解析. 第 21 回日本生化学会北陸支部会. 金沢, 2003, 5.

43. Minegishi, T.^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST):The Regulation of Gonadotropin Receptor . The International Ovarian Conference 東京, 2003, 5, 16.

44. 関口俊男^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、山田一哉^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、川田広子^{1,2}、寿 張飛³、吉野美紀^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、井上佳子^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井医科大学・泌尿器科学): ラット卵巣においてゴナドトロピンによって誘導される成長因子 Epiregulin, Amphiregulin の発現解析. 第 76 回日本内分泌学会学術総会. 横浜, 2003, 5.

45. 水谷哲也^{1,2}、中川 幸^{1,2}、佐竹智子^{1,2}、吉田和世^{1,2}、山田一哉^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、川田広子^{1,2}、吉野美紀^{1,2}、関口俊男^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、井上佳子^{1,2}、石村隆太³、遠山千春³、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 国立環境研究所・環境健康研究領域): 妊娠ラットの胎盤及び卵巣の遺伝子発現に及ぼすダイオキシンの影響. 第 76 回日本内分泌学会学術総会. 横浜, 2003, 5.

46. 山田一哉^{1,2}、川田広子^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、吉野美紀^{1,2}、関口俊男^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST): インスリン誘導性転写因子のクローニングと発現調節. 第 76 回日本内分泌学会学術総会. 横浜, 2003, 5.

47. 関口俊男^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、山田一哉^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、川田広子^{1,2}、寿 張飛³、吉野美紀^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、井上佳子^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井大学・泌尿器科学): ラット卵巣においてゴナドトロピンによって誘導される EGF 様成長因子 Epiregulin, Amphiregulin の発現解析. 第 8 回生殖内分泌学会. 横浜, 2003, 12.

48. 吉野美紀^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、山田一哉^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、川田広子^{1,2}、関口俊男^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、寿 張飛³、井上佳子^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井大学・泌尿器科学): ラット卵巣における p120 の機能解析. 第 8 回生殖内分泌学会. 横浜, 2003, 12.

49. Kajitani, T.^{1,2}, Mizutani, T.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Yazawa, T.^{1,2}, Sekiguchi, T.^{1,2}, Yoshino, M.^{1,2}, Kawata, H.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST): Cloning and characterization of GCX-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells. Fifth Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. 奈良, 2004, 3.

50. 宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST):低濃度ダイオキシンにより影響を受ける生殖系遺伝子群の解析. 科学技術振興事業団(JST) 戦略的創造研究推進事業(CREST) 内分泌かく乱物質 第3回領域シンポジウム. 東京, 2004, 7.
51. 峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学、² 科技団・CREST):卵巣におけるダイオキシンによる内分泌攪乱作用. 科学技術振興事業団(JST) 戦略的創造研究推進事業(CREST) 内分泌かく乱物質 第3回領域シンポジウム. 東京, 2004, 7.
52. 峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学、² 科技団・CREST):ゴナドトロピン作用について. 第56回日本産婦人科学会総会・学術講演会 東京 2004.4.10
53. 峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学、² 科技団・CREST):ゴナドトロピンレセプターの構造と機能. 第49回日本不妊学会学術講演会 第22回日本受精着床学会学術講演会 オルガノン・スポンサードシンポジウム 旭川, 2004, 9, 3.
54. Minegishi, T.^{1,2}, Nakamura, K.^{1,2}, Yamashita, S.^{1,2}, Omori, Y. ^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学、² 科技団・CREST):Structure and Function of Gonadotropin Receptor. Third Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction and Reproductive Biology. Canada, 2004, 11, 29.
55. 峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST):ゴナドトロピン作用について. 第56回日本産科婦人科学会総会・学術講演会. 生涯研修プログラム 5. リサーチレビュー「遺伝(子)情報－何がどこまでわかるのか－」. 東京, 2004, 4.
56. 平川隆史^{1,2}、峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST):ライディッヒ細胞における LH 受容体の MAPK 活性化の機序. 第56回日本産科婦人科学会総会. 東京, 2004, 4.
57. 安部由美子¹、篠崎博光^{1,2}、高木 剛^{1,2}、峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST):羊膜上皮初代培養細胞のアクチビン分泌に対する lipopolysaccharide (LPS) と tumor necrosis factor- α (TNF- α) の作用. 第56回日本産科婦人科学会総会. 東京, 2004, 4.
58. 山田一哉^{1,2}、川田広子^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科

- 技団・CREST): bHLH 型転写因子 SHARP-2 の発現制御機構の解析. 第 22 回日本生化学会北陸支部会. 金沢, 2004, 5.
59. 山田一哉^{1,2}、川田広子^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、関口俊男¹、吉野美紀^{1,2}、梶谷 宇^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): ギナトトロピン誘導性転写因子 SHARP-2 の発現調節. 第 77 回日本内分泌学会学術総会. 京都, 2004, 6.
60. 宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): 幹細胞からのステロイド産生細胞の創生. 第 77 回日本内分泌学会学術総会. シンポジウム 内分泌代謝学と発生・再生医学. 京都, 2004, 6.
61. 平川隆史^{1,2}、峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): ヒト LH 受容体 C 末端に結合し、細胞内輸送を制御する GIPC の機能解析. 第 77 回日本内分泌学会学術総会. 京都, 2004, 6.
62. 峯岸 敬^{1,2}(¹ 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): ギナトトロピンレセプターの構造と機能. 第 49 回日本不妊学会学術講演会 第 22 回日本受精着床学会学術講演会. 旭川, 2004, 9.
63. Kawata, H.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): Regulation of gene expression of a novel insulin-inducible transcription factor, SHARP-2. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜, 2004, 10.
64. Yamada, K.^{1,2}, Hirano, S.³, Kawata, H.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST、³ 福井大学・小児科学): Genomic organization and promoter analysis of the rat enhancer of split- and hairy-related protein-2 (SHARP-2) gene. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜, 2004, 10.
65. 梶谷 宇^{1,2}、山田一哉^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、吉野美紀^{1,2}、関口俊男¹、川田広子^{1,2}、井上佳子^{1,2}、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) プロモーターを用いた性腺系特異的転写因子 Granulosa cell HMG-box protein-1 (GCX-1) の機能解析. 第 9 回日本生殖内分泌学会. 大阪, 2004, 11.
66. 矢澤隆志^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、山田一哉^{1,2}、川田広子^{1,2}、関口俊男¹、吉野美紀^{1,2}、

梶谷 宇^{1,2}、梅澤明弘³、宮本 薫^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST、³ 国立成育医療センター研究所・生殖医療研究部): 骨髄由来の間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第9回日本生殖内分泌学会. 大阪, 2004, 11.

67. Yazawa, T.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2} (¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): Differentiation of steroidogenic cells such as Leydig or adrenocortical cells from adult stem cells of bone marrow stroma. Third Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction and Reproductive Biology. Ottawa, 2004, 11.

68. Minegishi, T.^{1,2}, Nakamura, K.^{1,2}, Yamashita, S.^{1,2}, Omori, Y.^{1,2} (¹ 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): Structure and Function of Gonadotropin Receptor. Third Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction and Reproductive Biology. Ottawa, 2004, 11-12.

69. 山田一哉^{1,2} (¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): bHLH 型転写因子 SHARP-2 の発現制御と機能解析. 第23回日本生化学会北陸支部会. 支部奨励賞(米山賞)受賞講演. 富山, 2005, 5.

70. 矢澤隆志^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、山田一哉^{1,2}、川田広子^{1,2}、関口俊男^{1,2}、上坂美紀^{1,2}、梶谷宇^{1,2}、梅澤明弘³、宮本薫^{1,2} (¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST、³ 国立成育医療センター研究所・生殖医療研究部): 骨髄由来の間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第78回日本内分泌学会学術総会. 東京, 2005, 7.

71. 梶谷宇^{1,2}、山田一哉^{1,2}、水谷哲也^{1,2}、矢澤隆志^{1,2}、吉野美紀^{1,2}、関口俊男^{1,2}、川田広子^{1,2}、井上佳子^{1,2}、宮本薫^{1,2} (¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): 性腺系特異的転写因子 Granulosa cell HMG-box protein-1 (GCX-1) の機能解析. 第78回日本内分泌学会学術総会. 東京, 2005, 7.

72. 水谷哲也^{1,2}、宮本薫^{1,2} (¹ 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): 精巣 Leydig 細胞腫、MA-10 細胞で LH(hCG)によってチロシンリン酸化が誘導されるタンパク質の同定. 第10回日本生殖内分泌学会. 東京, 2005, 11.

②ポスター発表 (国内 27 件, 海外 6 件)

1. 井上京子^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 五十嵐茂雄¹, 平川隆史¹, 土屋 恵^{1,2}, 安部和子¹, 松田弘子^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2} (¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞における FSH 受容体 (FSH-R) に対するエストラジオール・ビスフェノール A の効果. 第 5 回日本生殖内分泌学会. 大阪, 2000, 12, 1.

2. Yamada, K.^{1,3}, Mizutani, T. ^{1,3}, Shou, Z.², Yazawa, T. ^{1,3}, Sekiguchi, T. ^{1,3}, Yoshino, M. ^{1,3}, Inazu, T. ^{1,3}, Miyamoto, K. ^{1,3} (¹Dept.of Biochemistry, ²Urology, Fukui Med. Univ., ³CREST, JST): Molecular cloning of transcription factors expressing in rat granulosa cells. 5th european congress of endocrinology. Turin, Italy , 2001, 6.

3. Inoue, K.^{1,2}, Nakamura, K.^{1,2}, Minegishi, T. ^{1,2} (¹群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST): TGF- β can stabilize LH receptor mRNA in cultured granulosa cells. The Endocrine Society's 83nd Annual Meeting Denver, U.S.A., 2001, 6, 20.

4. Mizutani, T.^{1,4}, Yamada, K. ^{1,4}, Yazawa, T. ^{1,4}, Kawata, H. ^{1,4}, Sekiguchi, T. ^{1,4}, Yoshino, M. ^{1,4}, Kajitani, T.^{1,4}, Shou, Z.², Minegishi, T.^{3,4}, Miyamoto, K. ^{1,4} (¹Dept.of Biochemistry, ²Urology, Fukui Med. Univ., ³Dept. of Obstetrics and Gynecology, Gunma Univ. School of Medicine, ⁴CREST, JST): Cloning and characterization of gonadotropin inducible ovarian transcription factors (GIOT1 and GIOT2) that are novel members of the (Cys)2- (His)2-type zinc finger protein family. Second Canada-Japan Bilateral Workshop on Reproductive Biology and Human Reproduction. Fukui, Japan, 2001, 11.

5. Yazawa, T.^{1,4}, Mizutani, T. ^{1,4}, Yamada, K. ^{1,4}, Kawata, H. ^{1,4}, Sekiguchi, T. ^{1,4}, Yoshino, M. ^{1,4}, Kajitani, T. ^{1,4}, Shou, Z.², Minegishi, T.^{3,4}, Miyamoto, K. ^{1,4} (¹Dept.of Biochemistry, ²Urology, Fukui Med. Univ., ³Dept. of Obstetrics and Gynecology, Gunma Univ. School of Medicine, ⁴CREST, JST): Synergistic actions of SF-1/Ad4bp and CREB cause the acute induction of the GIOT1 (gonadotropin- inducible ovarian transcription factor 1) gene expression via PKA pathway in rat ovarian granulosa cells. Second Canada-Japan Bilateral Workshop on Reproductive Biology and Human Reproduction. Fukui, Japan, 2001, 11.

6. Orisaka, M.², Mizutani, T.^{1,3}, Miyamoto, K.^{1,3}, Kotsuji, F.² (¹Dept.of Biochemistry, ² Dept. of Obstetrics and Gynecology, Fukui Med. Univ., ³CREST, JST): Theca cells enhance the expression of mRNA for aromatase and StAR in granulosa cells at early antral follicles. Second Canada-Japan Bilateral Workshop on Reproductive Biology and Human Reproduction. 2001, 11, Fukui, Japan.

7. Minegishi, T. ^{1,2} (¹ 群馬大学・医・産婦人科学, ² 科技団・CREST): Effect of Activin on the Expression of Gonadotropin Receptor in Granulosa Cells(PS37). 9th World Congress of Gynecological Endocrinology Hong Kong, 2001, 12, 2.

8. 井上京子 ^{1,2}、中村和人 ^{1,2}、五十嵐重雄 ¹、亀田高志 ¹、岸 裕司 ¹、土屋 恵 ^{1,2}、峯岸 敬 ^{1,2} (¹ 群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞における FSH 受容体・フォリスタチンに対する TGF- β の作用. 第 54 回日本産婦人科学会. 東京, 2002, 4.

9. 梶谷 宇 ^{1,3}、水谷哲也 ^{1,3}、山田一哉 ^{1,3}、矢澤隆志 ^{1,3}、関口俊男 ^{1,3}、吉野美紀 ^{1,3}、川田広子 ^{1,3}、寿 張飛 ²、井上佳子 ^{1,3}、宮本 薫 ^{1,3} (福井医科大学・¹生化学 2、² 泌尿器科学、³ 科技団・CREST): 性腺特異的に発現する新規 HMG-Box 転写因子の機能解析. 第 75 回日本生化学会大会. 京都, 2002, 10.

10. 川田広子 ^{1,4}、山田一哉 ^{1,4}、寿 張飛 ²、平野聡子 ³、水谷哲也 ^{1,4}、矢澤隆志 ^{1,4}、吉野美紀 ^{1,4}、関口俊男 ^{1,4}、梶谷 宇 ^{1,4}、宮本 薫 ^{1,4} (福井医科大学・¹生化学 2、² 泌尿器科学、³ 小児科学、⁴ 科技団・CREST): ZHX2 の機能解析. 第 75 回日本生化学会大会. 京都, 2002, 10.

11. 山田一哉 ^{1,4}、川田広子 ^{1,4}、平野聡子 ³、寿 張飛 ²、水谷哲也 ^{1,4}、矢澤隆志 ^{1,4}、吉野美紀 ^{1,4}、関口俊男 ^{1,4}、梶谷 宇 ^{1,4}、野口民夫 ⁵、宮本 薫 ^{1,4} (福井医科大学・¹生化学 2、² 泌尿器科学、³ 小児科学、⁴ 科技団・CREST、⁵ 名古屋大学・生命農学研究科): インスリン誘導性転写因子の cDNA クローニングと発現調節. 第 75 回日本生化学会大会. 京都, 2002, 10.

12. 山下宗一 ^{1,2}、中村和人 ^{1,2}、大森由紀 ^{1,2}、峯岸 敬 ^{1,2} (¹ 群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): exon9 欠損 human-LH receptor と wide type の human-FSH receptor の dimerization. 第 7 回日本生殖内分泌学会. 大阪, 2002, 12, 5.

13. 山下宗一^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 大森由紀^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2} (1 群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): exon9 欠損 human-LH receptor と wild type human-FSH receptor の dimerization. 第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会. 福岡, 2003, 4, 14.
14. 中村和人^{1,2}, 山下宗一^{1,2}, 大森由紀^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2} (1 群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): LH レセプターの機能調節における, internalization の関与について. 第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会. 福岡, 2003, 4, 14.
15. 吉野美紀^{1,2}, 水谷哲也^{1,2}, 山田一哉^{1,2}, 矢澤隆志^{1,2}, 川田広子^{1,2}, 関口俊男^{1,2}, 梶谷 宇^{1,2}, 寿 張飛³, 井上佳子^{1,2}, 宮本 薫^{1,2} (1 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井医科大学・泌尿器科学): ラット卵巣における P120 の発現様式と転写活性の解析. 第 76 回日本内分泌学会学術総会. 横浜, 2003, 5.
16. 山下宗一^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 大森由紀^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2} (1 群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): exon9 欠損 human-LH receptor と wild type human-FSH receptor の dimerization. 第 76 回日本内分泌学会. 横浜, 2003, 5, 9.
17. 吉野美紀^{1,2}, 水谷哲也^{1,2}, 山田一哉^{1,2}, 矢澤隆志^{1,2}, 川田広子^{1,2}, 関口俊男^{1,2}, 梶谷 宇^{1,2}, 寿 張飛³, 井上佳子^{1,2}, 宮本 薫^{1,2} (1 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井医科大学・泌尿器科学): ラット卵巣における核内受容体コアクチベーター p120 の発現様式と転写活性の解析. 第 28 回比較内分泌学会. 富山, 2003, 8.
18. 関口俊男^{1,2}, 水谷哲也^{1,2}, 山田一哉^{1,2}, 矢澤隆志^{1,2}, 川田広子^{1,2}, 寿 張飛³, 吉野美紀^{1,2}, 梶谷 宇^{1,2}, 井上佳子^{1,2}, 宮本 薫^{1,2} (1 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井医科大学・泌尿器科学): ラット卵巣においてゴナドトロピンによって誘導される成長因子 Epieregulin, Amphiregulin の発現解析. 第 28 回比較内分泌学会. 富山, 2003, 8.
19. Kawata, H.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Shou, Z.³, Mizutani, T.^{1,2}, Yazawa, T.^{1,2}, Yoshino, M.^{1,2}, Sekiguchi, T.^{1,2}, Kajitani, T.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2} (1 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井大学・泌尿器科学): ZHX proteins repress transcription of the cdc25C gene. 第 76 回日本生化学会大会. 横浜, 2003, 10.

20. Yamada, K.^{1,2}, Kawata, H.^{1,2}, Shou, Z.³, Hirano, S.⁴, Mizutani, T.^{1,2}, Noguchi, T.⁵, Miyamoto, K.^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 福井大学・泌尿器科学、⁴ 福井大学・小児科学、⁵ 名古屋大学大学院・応用生命科学): Analysis of gene expression of an insulin-inducible transcription factor. 第 76 回日本生化学会大会. 横浜, 2003, 10.

21. 大森由紀^{1,2}, 山下宗一^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・医・産婦人科学、² 科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞培養における Betaglycan の発現に対する FSH と Estradiol の効果. 第 8 回日本生殖内分泌学会. 横浜, 2003, 11, 29.

22. Yoshino, M.^{1,2}, Mizutani, T.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Tsuchiya, M.³, Minegishi, T.³, Yazawa, T.^{1,2}, Kawata, H.^{1,2}, Sekiguchi, T.^{1,2}, Kajitani, T.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST、³ 群馬大学・生殖再生分化学): Early growth response gene-1 (Egr-1) regulates the gene expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. Fifth Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 奈良, 2004, 3.

23. Sekiguchi, T.^{1,2}, Mizutani, T.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2}(¹ 福井大学・分子生体情報学、² 科技団・CREST): Expression of the epieregulin and amphiregulin genes in the rat ovary. Fifth Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 奈良, 2004, 3.

24. 大森由紀^{1,2}, 山下宗一^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞培養における Betaglycan の発現に対する FSH と Estradiol. 第 56 回日本産婦人科学会総会・学術講演会. 東京, 2004, 4, 12.

25. 山下宗一^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 大森由紀^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): Exon9 欠損ヒト LH レセプターと wild-type ヒト LH レセプターの dimerization による, ヒト LH レセプター発現抑制機序の解明. 第 56 回日本産婦人科学会総会・学術講演会. 東京, 2004, 4, 13.

26. 大森由紀^{1,2}, 山下宗一^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2}(¹群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞における betaglycan の発現調節. 第 77 回日本内分泌学会学術総会. 京都, 2004, 6, 26.

27. Yazawa, T.^{1,2}, Yoshino, M.^{1,2}, Kajitani, T.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2} (1 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): Involvement of CITED4/MRG2 in estrogen-dependent proliferation of rat ovarian granulosa cells. The third International Workshop on Biomedical Imaging. Fukui, 2004, 12.
28. 池田禎智^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 大森由紀^{1,2}, 山下宗一^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2} (1 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): ラット顆粒膜細胞における LH receptor の発現に対する Bisphenol A の効果. 第 57 回日本産科婦人科学会学術講演会. 京都, 2005, 4, 4.
29. 久保田和子^{1,2}, 池田禎智^{1,2}, 中村和人^{1,2}, 大森由紀^{1,2}, 山下宗一^{1,2}, 峯岸 敬^{1,2} (1 群馬大学・生殖再生分化学領域、² 科技団・CREST): ラット性周期における, Betaglycan mRNA の卵管における発現レベルの検討. 第 57 回日本産科婦人科学会学術講演会. 京都, 2005, 4, 4.
30. Yazawa, T.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2} (1 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): Differentiation of steroidogenic cells such as Leydig or adrenocortical cells from adult stem cells of bone marrow stroma. The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, USA., 2005, 6.
31. Uesaka-Yoshino, M.^{1,2}, Yazawa, T.^{1,2}, Kajitani, T.^{1,2}, Mizutani, T.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Ogata-Kawata, H.^{1,2}, Inoue, Y.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2} (1 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): The gene expression and function of transcriptional activator CITED4 in rat ovarian granulosa cells. The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, USA., 2005, 6.
32. Kajitani, T.^{1,2}, Yamada, K.^{1,2}, Mizutani, T.^{1,2}, Yazawa, T.^{1,2}, Uesaka-Yoshino, M.^{1,2}, Sekiguchi, T.^{1,2}, Miyamoto, K.^{1,2} (1 福井大学・分子生体情報学領域、² 科技団・CREST): Functional analysis of granulosa cell high-mobility group (HMG)-box protein-1, an HMG-box transcription factor specifically expressed in reproductive tissues, using steroidogenic acute regulatory protein promoter. The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, USA., 2005, 6.
33. 上坂(吉野)美紀^{1,2}, 矢澤隆志^{1,2}, 梶谷宇^{1,2}, 水谷哲也^{1,2}, 山田一哉^{1,2}, 川田広子^{1,2}, 井上佳子^{1,2}, 宮本薫^{1,2} (1 福井医科大学・分子生体情報学、² 科技団・

CREST): ラット卵巣顆膜細胞の増殖における転写調節因子 CITED4 の発現と機能. 第 78 回日本内分泌学会学術総会. 東京, 2005, 7.

(3)特許出願

①国内出願 (3 件)

1. 発明の名称: 転写制御因子 ZHX3

発明者: 宮本 薫、山田一哉

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日: 平成 14 年 12 月 18 日

出願番号: 特願 2002-366512 号

2. 発明の名称: 転写活性化因子

発明者: 宮本 薫、水谷哲也、梶谷 宇

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日: 平成 15 年 1 月 28 日

出願番号: 特願 2003-018343 号

3. 発明の名称: 間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法

発明者: 宮本 薫、矢澤隆志、梅澤明弘

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 3 月 3 日

出願番号: 特願 2004-058406 号

②海外出願 (3 件)

1. 発明の名称: 転写制御因子 ZHX3

発明者: 宮本 薫、山田一哉

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

国際出願番号: PCT/JP03/09164

2. 発明の名称: 転写活性化因子

発明者: 宮本 薫、水谷哲也、梶谷 宇

出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構

国際出願番号: PCT/JP03/09165

3. 発明の名称: 間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法

発 明 者:宮本 薫、矢澤隆志、梅澤明弘
出 願 人:独立行政法人 科学技術振興機構
出 願 日:2005 年 2 月 18 日
国際出願番号:PCT/JP2005/002548

(4)受賞等

①受賞

- 1)水谷哲也:日本内分泌学会若手研究奨励賞 平成 13 年 7 月 1 日
ラット黄体形成ホルモン受容体(LHR)遺伝子の発現調節機構の解析
- 2)水谷哲也:第 6 回日本生殖内分泌学会学術奨励賞 平成 13 年 11 月 16 日
LH-receptor の発現に対する転写因子 Egr-1 の役割
- 3)峯岸 敬:日本医師会医学研究助成費 平成 14 年 11 月
卵巣における内分泌攪乱物質(特にダイオキシンを中心に)の作用機序の解明
- 4)梶谷 宇:第 7 回日本生殖内分泌学会学術奨励賞 平成 14 年 12 月 5 日
性腺特異的に発現する新規 HMG-Box 転写因子の解析
- 5)梶谷 宇:Fifth Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Best Oral Presentation Award. 2004, 3, 30.
Cloning and characterization of GCX-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells.
- 6)山田一哉:第 10 回日本生化学会北陸支部奨励賞(米山賞)
平成 17 年 5 月 28 日
bHLH 型転写因子 SHARP-2 の発現制御と機能解析
- 7)矢澤隆志:日本内分泌学会若手研究奨励賞 平成 17 年 7 月 3 日
骨髄由来の間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製

②新聞報道

- 1) ダイオキシン日常レベルで排卵抑制. 2000 年 11 月 15 日 福井新聞

公開資料

- 2) 生活濃度のダイオキシン 遺伝子が7割減少. 2000年11月16日県民福井
- 3) 環境ホルモンに警鐘. 2000年11月27日 福井新聞
- 4) 論説:注目される福井医大の研究. 2001年1月21日 福井新聞
- 5) 環境ホルモンを丸裸. 2001年2月7日福井新聞
- 6) 不妊症に関与 タンパク質特定. 2001年7月14日福井新聞

③その他

なし

(5)その他特記事項

なし

6 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
なし				

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

7 結び

研究開始当初の目的は、様々な内分泌かく乱物質が生殖系に与える影響を遺伝子発現のレベルで明らかにし、それらに関するデータベースを構築することであった。当時は遺伝子発現の網羅的解析方法の開発途上であったが、当初計画からサブトラクションクローニングとマイクロアレイの組み合わせを計画していた。研究開始後、間もなくヒトゲノムプロジェクトが終了し、全てヒト遺伝子が同定され、それら全てを搭載した DNA チップが登場

公開資料

し網羅的解析法の主流となってきた現状を考えると、正しい選択であったと考える。しかし一方で、これら全ての網羅的解析方法に共通しているのは、擬陽性シグナルの発生が避けられない点であった。このため、数多くの候補遺伝子の発現をひとつずつ定量しなければならず、莫大な労力と費用が掛かる結果となり、当初考えていたよりも解析する実験群を減らさざるを得なかった。それでも TCDD と DES の生殖系に対する影響を遺伝子レベルで明らかにすることができ、データベースの公開にこぎつけることができたことから、当初の目的は達成できたものと考えている。

今後は、得られたデータベースに基づいて、個々の遺伝子の発現や機能を詳しく調べていくことで、予想していなかった TCDD や DES の作用を明らかにすることができると考えている。また、内分泌かく乱物質の研究者にも、同様の視点でこのデータベースを利用していただけたいと考えている。

また、5年間の長期間にわたって多額の研究費の補助をいただいただけでなく、ポストクを含めた様々な人的援助もしていただき、教室の活性化を通して大変有意義な研究期間を過ごすことができました。またこの研究期間に教室で研究し、卒業して学位を取得した上坂美紀君、梶谷宇君、関口俊男君は、それぞれ現在、福井大学医学部、慶応大学医学部、京都大学理学部で一線の研究者として活躍しています。また有意義な共同研究を行うこともでき、私共にとって大きな財産となっています。本研究に対しご支援を賜りました科学技術振興機構に深甚なる感謝を申し上げますとともに、鈴木総括、領域アドバイザーの先生方のご指導に厚く御礼申し上げます。また、岸本技術参事をはじめ、内分泌かく乱物質研究事務所の皆様がたにも本当にお世話になりました。この場を借りまして厚く御礼申し上げます。

