

厚生労働科学研究研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物の  
スクリーニングシステムの構築および核内受容体の同定

(H14-トキシコ-013)

平成 14 (2002) 年度 総括研究報告書

主任研究者 石村 隆太

(独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域 研究員)

平成 15 (2003) 年 4 月 10 日

## 目 次

### I. 総括研究報告書

A. 研究目的	-----	4
B. 研究方法	-----	8
C. 研究結果と考察	-----	12
D. 結論	-----	18
図	-----	19
E. 参考文献	-----	28
F. 健康危機情報	-----	29
G. 研究発表	-----	29
H. 知的所有権の取得状況	-----	29

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物のスクリーニングシステムの構築および核内受容体の同定

主任研究者 石村 隆太 独立行政法人国立環境研究所 研究員

研究要旨

本研究では、ラット胎盤由来の Rcho-1 細胞を用いて化合物の分化に与える影響を解析した。まず Rcho-1 細胞はエストロゲン (E2) に対して不応性かつ E2 受容体 (ER) が発現していないことを明らかにした。すなわち Rcho-1 細胞を用いた系では、ER 非依存的な反応を見出すことになる。プロラクチンファミリーミニアレイヤ、P450 側鎖切断 (P450sc) 酵素のプロモーターを用いたリポーター遺伝子アッセイを利用して、約 30 種の化合物について分化に及ぼす影響を検討した。Diethylstilbestrol (DES)、ICI182,780 (ICI)、フタル酸類や Permethrin は Rcho-1 細胞の分化を抑制することを見出した。これとは逆に、Carbaryl は分化促進作用を有することを明らかにした。その他、Bisphenol A (BPA) の ER 非依存的な作用を検討する上でプロラクチンファミリーのプロモーター解析が有効であること、また ICI や DES の ER 非依存的な作用として核の形態を指標とした解析方法が重要など、今後の研究展開の礎となる現象を得ることができた。

A. 研究目的

近年、医薬品候補化合物などは膨大な数にのぼり、これらのほとんどはエストロジ

エン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体等のいわゆる核内受容体との相互作用が考えられている。特に

エストロゲン (E2) 様あるいは抗 E2 様の作用を有すると考えられている医薬品化合物は、避妊や乳癌治療等を含め多岐にわたり応用性が考えられていることから、その数は多くのぼる。厚生労働行政に関与する内分泌攪乱作用を有する物質をみても、E2 攪乱作用を有すると考えられるものが大半である。これら E2 様の化合物の有害性を見分けるために、ER を介したリポーター遺伝子アッセイシステム等を用いて、簡便に安全性が評価されている。

しかし、これらの化合物は ER を介した作用だけではないことが近年の研究から明らかとなってきた。Diethylstilbestrol (DES) は、従来 ER とのみ相互作用すると考えられていたが、リガンドが不明な核内受容体 (オーファン受容体) である Estrogen receptor related (ERR) に結合し、胎盤の幹細胞である Trophoblast stem (TS) 細胞の分化を変調させることが明らかにされた (Tremblay et al., 2001)。かつて流産防止薬として使用された DES は、実際は流産の増加を促していることが発覚し使用中止となった経緯をもつが、この流産増加の原因が

オーファン受容体を活性化して胎盤細胞の分化を異常にしたことが明らかになったのである。このことから ER と相互作用すると考えられている化合物も、従来の ER との作用を検討するだけでは不十分であり、あらたな核内受容体との相互作用を想定する必要性が示された。

今日、オーファン受容体の研究は、新たな薬剤を発見する可能性があることから、創薬研究の一角をなしている。またトキシコゲノミクス研究においても、各化合物に特有な遺伝子発現プロファイリングを整備するだけでなく、オーファン受容体との相互作用の解析が期待されているであろう。E2 様の作用を有すると考えられている化合物の安全基準を定める上で、既知の受容体だけでなく、オーファン受容体を含めたあらゆる反応系を考慮に入れたメカニズム解析が不可欠である。

本研究は、Rcho-1 細胞を用いて、新たな化合物の同定および新規核内受容体を介した新たな作用メカニズムを明らかにしていく。Rcho-1 細胞はラット胎盤の迷路部から樹立された細胞株である (Faria et al., 1991)。

分化能を有しており未分化細胞から巨核を有する巨細胞に分化を誘導することができる。ラットの胎盤から分泌されるプロラクチンファミリーはRcho-1細胞においても分化依存的に発現が誘導されることが知られている (Hamlin et al., 1994)。その発現様が胎盤の各妊娠ステージのそれと類似していることから、In vivo の性質を反映している細胞株として知られている。DES が ERR の結合により分化に影響を与えることが明らかにされた細胞は、TS 細胞である。TS 細胞は胎盤細胞の全能細胞である (Tanaka et al., 1998)。TS 細胞も同様に培養条件下で巨核細胞に分化し、分化依存的にプロラクチンファミリーを分泌する。このことから Rcho-1 細胞は全能性を有さないものの TS 細胞とほぼ同じ遺伝子サブセットを有していると考えられる。胎盤細胞が生理活性物質の宝庫ともいえる一面を有していること、また TS 細胞を用いて ERR の存在が発見された実績を有すること、また TS 細胞よりも取り扱いが簡便である利点から、Rcho-1 細胞は、新規核内受容体を探索するには最良の細胞株であると考えられる。本研究では

Rcho-1 細胞を用いて、細胞の分化を指標に影響のある化合物を選別していくという独特のスクリーニングシステムを用いる。

本年度では、先ず Rcho-1 細胞の ER の存在について検討した。さらに、分化マーカーであるチトクローム P450 側鎖切断 (P450scc) 酵素のプロモーターを用いた組換え細胞を用いて、様々な化合物を曝露して分化に及ぼす影響について調べた。第二年次では、選定された化合物においてマイクロアレイ法および二次元電気泳動法を用いて特異的に誘導される遺伝子を明らかにする予定である。この遺伝子のプロモーターを利用し、第二次スクリーニングを行う。2 種類のプロモーター作用を検出できる細胞株を用いることにより、多くの化合物を細分類化することが可能である。細分類された各化合物群は、それぞれ個別の核内受容体に結合していると考えられる。第三年次では、各化合物群から代表的な化合物を選定し、アフィニティークロマトグラフィー法や共鳴プラズモン相互作用解析を用いて新規核内受容体の同定を行う。本研究を通し、1) ER 非依存的な新たなスクリーニ

ングシステムが構築される。これは新規受容体との相互作用を測定するものであり、今後増大する化合物の選別に有用である。

2) 化合物と相互作用する新規核内受容体が明らかとなる。今日の核内受容体の研究は、医薬品研究の約半数を占めているとも言われているが、本結果はこれらの分野に対し新たな基礎情報を提供することになる。

## B. 研究方法

### Rcho-1 細胞の培養

Rcho-1 細胞の培養は、基本的に以前の報告 (Faria et al., 1991; Ishimura et al., 2001) に従った。20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) を含む NCTC-135 (Sigma Chemical, St. Louis, MO)、pH7.2 (50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、1mM sodium pyruvate、100U/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin) で、95% air-5% CO<sub>2</sub>、37°Cの湿気条件下で培養した。細胞は2日に1度継代し、100mmのディッシュ (Nunc Brand Products, Roskilde, Denmark) で、10ml のメディアム、10<sup>4</sup>/100mm の細胞密度の subconfluent の条件で維持した。分化を誘導する際には、10<sup>6</sup>/100mm (Nunc ディッシュ) または 1 x から 3.5 x 10<sup>4</sup>/10mm (Falcon 24 ウェルプレート) の細胞密度になるようにまき、この日を分化後 0 日目 (d0) と定めた。

### 化合物の種類および Rcho-1 細胞への曝露

本研究で用いた化合物と、その略称を記す (Fig. 5 参照)。E2, 17 $\beta$ -Estradiol; RA, Retinoic acid; DES, Diethylstilbestrol; Tam,

Tamoxifen; ICI, ICI182,780; DEP, Diethyl phthalate; Dioctyl phthalate, DOP; DBP, Dibutyl phthalate; DINP, Diisononyl phthalate; DPP, Dipentyl phthalate; DCHP, Dicyclohexyl phthalate; BBP, Butyl benzyl phthalate; 2-PP, 2-Phenyl phenol; 3-PP, 3-Phenyl phenol; 4-PP, 4-Phenyl phenol; BPA, Bisphenol A; OP, Octyl phenol; NP, Nonyl phenol; 2,4-D; TCTP, Chlorthal-dimethyl; DCPA, Propanil; PBO, Peperonyl butoxide; Carbaryl; Benomyl; Permethrin; Zear, Zearalenone; Alizarin である。それぞれの化合物は、DMSO に 20 mM になるように融解し、それを 2000 倍希釈になるように培地に添加し最終濃度が 10  $\mu$ M になるようにして曝露をおこなった。但し、E2 については希釈率が同一になるように段階希釈溶液を作成した。またリポータージェンアッセイにおいて E2 だけは最終濃度 10 nM として使用した。

### RT-PCR

Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて Rcho-1 細胞から Total RNA を抽出した。Total RNA 4  $\mu$ g に 400 ユニット

の SuperScript™ II 逆転写酵素 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) と 1.0 µg の Oligo(dT)12-18 Primer を加え 20µl とし、42°C、50min 逆転写反応をおこなった。0.5 µl の cDNA 産物に、1.25unit の Ex Taq™ ポリメラーゼ (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)、1 x Ex Taq™ buffer、0.2 mM dNTP mixture、0.5 µl ずつの 20 pM forward primer と reverse primer を 25 µl の液量として PCR をおこなった。PCR の条件は以下のようにした。Initial denaturation step: 94 °C、5min、次に Denaturation: 94°C、30min、Annealing: 30sec、Extension: 72°C、1min を所定のサイクル行い、Final extension step: 72°C、7分間行なった。それぞれの遺伝子の mRNA 量を判定量化するための至適サイクル数は、ラットの胎盤全 RNA を使用した予備実験によって決定した。PCR 産物は 2%アガロースゲルで分離後、312-nm UV ランプ (ATTO Bioinstruments, Tokyo, Japan) を用いてで画像として取りこんだ。PCR 産物は、pGEM-T Easy vector (Promega Corporation, Madison, WI) にサブクローニングし、ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit

(PE-Biosystems, Foster City, CA) を使用して dideoxynucleotide chain termination 法によって塩基配列を決定した。

#### リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR は LightCycler システム (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いた。0.5 µl の cDNA 産物に、10 µl の 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN, Valencia, CA) と 0.5 µl ずつの 20 pM forward primer と reverse primer を加え、総液量を 20 µl で反応を行なった。

#### プロラクチンファミリーミニアレイ

米国カンザスメディカルセンターの Dr. Soares との共同研究のもと、ミニアレイを行なった。このアレイシステムは同研究室で独自に開発されたものである。現在、ラットでは 20 種近いプロラクチンファミリーの遺伝子が報告されている。それぞれの全長 cDNA を組み込んだ pGEM-T ベクターを、1 スポットあたり 500ng ずつメンブレンに結合させた。Rcho-1 に DMSO (コントロール)、E2、DES、ICI、BPA、NP を 4 日間曝



露し、トータル RNA を回収した。それぞれ 5  $\mu$ g の RNA を用いて  $^{32}$ P dCTP の存在下で逆転写反応させ、産物であるプローブをマイクロスピカラムで精製後、42°Cで一晩メンブレンとのハイブリダイゼーションに供した。2 x SSPE/0.1% SDS で 42°C、30min 洗浄し、その後再び 1 x SSPE/0.1% SDS で 60min 洗浄した。メンブレンを X 線フィルムで 24h 感光させ検出を行なった。

#### ベクターの構築

ラットの胎盤性ラクトジェン-I (PL-I) のプロモーター領域の配列は知られていない。そこで、GenomeWalker (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) を用いて、PL-I の転写開始点から約 600bp の上流領域を得た。この産物を pGEM-T Easy (Takara, Japan) に組み込みシーケンスを解析した。その後、Sall と EcoRI による約 550 bp のフラグメントを、pEGFP (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Ohsaka, Japan) の XhoI と EcoRI サイトに、また Sall による約 560bp フラグメントを、pGL3-Basic Vector (Promega Corpotation, Madison, WI) の XhoI サイトに導入した。

構築されたベクターをそれぞれ pEGFP-PLI および pGL3-PLI と命名した。またラット P450scc のプロモーター領域は既知であり、PCR 法により約 850bp の上流を増幅し、pGEM-T Easy に組み込みシーケンス解析した。その後、XhoI と HindIII による約 850bp のフラグメントを、pEGFP の XhoI、HindIII サイトに、また pGL-Basic Vector の XhoI、HindIII サイトに導入した。構築されたベクターをそれぞれ pEGFP-P450scc および pGL3-P450scc と命名した。

#### トランスフェクション

Rcho-1 細胞へのプラスミドの導入には、Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Valencia, CA) を用いた。

#### リポータージーンアッセイ

pGL3-P450scc を用いたリポータージーンアッセイには、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corpotation, Madison, WI) を用いた。このシステムでは、プロモーター活性依存的にルシフェラーゼを発現する pGL ベクターと、トランスフェクト効

率を補正する目的として SV40 プロモーターの下流にレニラを組み込んだ pRL ベクターを同時に細胞にトランスフェクトする。プロモーター活性により誘導されるルシフェラーゼの発光値を測定し、その後同一サンプルのルシフェラーゼ発光を消光させ、次にレニラの発光値を測定する。ルシフェラーゼ値をレニラ値で補正することにより、トランスフェクトのばらつきに関係なくリポーターの活性を正確に測定することが可能である。未分化 Rcho-1 細胞を、1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  から  $3.5 \times 10^4$  個の細胞数になるように、24 ウェルプレートにまいた。1 ウェルあたり、0.5  $\mu\text{g}$  の pGL3-P450scc と 0.5  $\mu\text{g}$  の pRL-SV40 (Promega Corporation, Madison, WI) を血清非存在下で 1h トランスフェクトした。その後、各種化合物が入ったメディアウムで 6 日間培養した。2 日おきにメディアウム交換を行った。6 日目に、Passive Lysis Buffer を用いて細胞を融解し、Dual-Luciferase Reporter Assay System によりルシフェラーゼとレニラの値を計測した。計測機器として Wallac 1420 ARVOsx (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) を用いた。

一回の測定では、単一化合物サンプルあたり 3 ウェルを使用し、平均値をとった。

#### 核蛍光染色

Rcho-1 細胞を、10  $\mu\text{mol/L}$  の Hoechst33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を含んだ培地で 1h インキュベートし、その後、340 nm の波長で、核の蛍光観察をおこなった。

## C. 研究結果と考察

### Rcho-1 細胞の分化誘導と分化マーカー

Rcho-1 細胞は、TS 細胞と同様に培養条件下で分化が誘導されることを確かめた。細胞密度を高くし、細胞のコンタクトがおきる状態で培養を開始すると、細胞の分化が著しく誘導される。図 1A には、細胞の形態を示した。培養 0 日目 (d0) の未分化状態では球形であるが、d4 および d8 と培養日数が進むに従って、細胞のサイズが拡張し、巨核を有する巨細胞が形成される。PL-I および P450scc は、分化とともに発現量が上昇することが知られており (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto et al., 1995)、分化のマーカーとして利用することができる (図 1B)。これらの遺伝子の発現についてリアルタイム PCR を用いて d0 に対する発現量の増加の倍率について調べた (図 1C)。PL-I は d0 に比べ d8 では約 80 倍に d12 では約 160 倍に発現量が増加した。P450scc は d8 では約 600 倍に、d12 では約 2500 倍に発現量が増加した。これらの結果は、PL-I、P450scc とともに分化マーカーとして利用可能であるが、P450scc の方がより高度に発現誘導される

プロモーターを有していると考えられた。

Rcho-1 細胞には、ER が発現してなく E2 に対しても不応性である

Rcho-1 細胞に ER が発現しているかどうかは不明である。そこで ER の mRNA が発現していないことを、RT-PCR 法により調べた。d0、d4、d8、d12 の Rcho-1 細胞からテンプレート cDNA を調製し、またポジティブコントロールとしてラットの卵巣の cDNA を用いた。ER $\alpha$  mRNA の発現、および ER $\beta$  mRNA の発現は卵巣において認められるが、Rcho-1 細胞では未分化から分化までの各ステージにおいても観察されなかった。このことから、Rcho-1 細胞は ER の mRNA が発現していない細胞株であることが明らかとなった。また Rcho-1 細胞の分化に対する E2 の影響について調べた。d0 に 0.1 nM から 10  $\mu$ M にわたって E2 を 6 日間曝露し、PL-I mRNA の発現を RT-PCR 法により調べた。図 3 に示すように、各用量の E2 によっても Rcho-1 細胞の PL-I mRNA の発現量には変化は認められなかった。このことから Rcho-1 細胞の分化は E2 によって

影響を受けないことを示しており、ER が存在しない結果を支持した。ヒトの胎盤では E2 を合成、分泌していることが知られているが (Siiteri, 1975; Nestler, 1993)、ラットの胎盤ではアンドロジェンは分泌するが E2 が分泌される報告はない (Warshaw et al., 1986; Durkee et al., 1992)。このことから Rcho-1 細胞には E2 合成や ER が存在しない可能性が考えられたが、その予想に合致した結果が得られた。以降の実験では、Rcho-1 細胞に対する E2 様の活性を有すると考えられている化合物の影響を調べるが、観察される影響は少なくとも ER を介していない反応であることになる。

#### E2 様の活性を有すると考えられる化合物の影響

E2 および E2 様の活性を有するといわれる DES、ICI、BPA、NP を用いて Rcho-1 細胞の分化に及ぼす影響を検討した。d0 にこれらの化合物を曝露させ、d4 に細胞を回収してアッセイに用いた。アッセイには、米国カンザスメディカルセンターの Dr. Soares 博士の研究室で独自に作製された胎

盤性プロラクチンファミリー遺伝子のミニアレイシステムを用いた。このミニアレイメンブレンには、3 種の Placental lactogen (PL)、1 種の Proliferin related protein (PRL-RP)、13 種の Prolactin like protein (PLP) を含む胎盤由来のプロラクチンファミリー遺伝子に、Prolactin、Growth hormone (GH) 等の遺伝子を含んだ DNA がスポットされている。これらの胎盤性プロラクチンファミリーは妊娠の進行とともに胎盤において細胞種・時期特異的に分泌されることから栄養膜細胞の分化マーカーとして使用されている。図 4 に示すように、Rcho-1 細胞の d4 では、PL-I、PL-Iv、PL-II、PLP-F、PLP-M が発現していることが観察された。

E2 の曝露ではこれらの発現量には変化がなく、従って分化には影響がないと考えられ、先の結果と一致した。DES では全体的にこれらのプロラクチンファミリー遺伝子の発現量が低下していた。ICI では更に発現量が低下していた。これに対して NP は影響が見られなかった。これらのことから、DES および ICI は Rcho-1 細胞の分化を抑制している可能性が示唆された。また TS 細胞

は DES によって分化を促進されるが、Rcho-1 細胞では全く逆の作用がおこることが示された。また、BPA の曝露では、PL-I、PL-IV、PL-II、PLP-F の発現量には変化がなかったが PLP-M の発現量のみが低下していた。このことは、BPA は Rcho-1 細胞の分化には影響を与えないが、PLP-M のプロモーターに特異的に作用したと考えられた。今後、BPA の ER を介さない新たな作用メカニズムを解析する上で、PLP-M のプロモーター領域は有用な解析ツールになると考えられた。

#### リポーター遺伝子アッセイシステムの構築

多くの化合物の影響を調べるには簡便なアッセイシステムの構築が必要である。そこで我々は分化マーカーである PL-I や P450scc のプロモーターを用いた蛍光タンパクの発現系及びリポーターアッセイシステムの構築について検討した。

先ず PL-I プロモーターについて検討した。PL-I のプロモーター活性に依存して Green Fluorescent Protein (GFP) を発現させ、Rcho-1 の分化を測定する方法を検討した。PL-I の

プロモーター600bp をクローニングし、GFP をコードする pEGFP ベクターに組み込んだ。この pEGFP-PLI を Rcho-1 細胞にトランスフェクトした。しかし、PL-I のプロモーター活性が高くなく分化した細胞でも測定に十分な蛍光を得ることができず、実験系として確立するには不十分であった（データ不掲載）。

そこで、図 1 にも示すように、PL-I のプロモーター活性よりも活性値が高い P450scc のプロモーターを用いてリポーターアッセイシステムを構築することを検討した。リポーターアッセイとしてルシフェラーゼの発光を用いた。約 850bp の P450scc プロモーター領域をクローニングし、pGL3 Basic ベクターに組み込んだ。この pGL3-P450scc を補正用のベクターである pRL とともに Rcho-1 細胞にトランスフェクトし、トランジェントアッセイを行った。図 6 には、d0 にこれらのベクターをトランスフェクトし、d2、d4、d6、d8、d10 に細胞を回収して、ルシフェラーゼの活性を測定したものを示した。ルシフェラーゼ活性は、培養日数の進行とともに上昇し、d6 で

は d0 に比べ約 30 倍に、d10 では約 70 倍に活性値が上昇した。これらの結果からこのアッセイシステムは Rcho-1 細胞の分化状態を数値化することができる有効な系であることが明らかとなった。

#### リポーター遺伝子アッセイシステムを用いた様々な化合物の Rcho-1 細胞の分化に対する影響

pGL3-P450sec を用いたリポーター遺伝子アッセイを行い、様々な化合物の Rcho-1 細胞の分化に与える影響について検討した。図 5 には本研究に用いた化合物を示した。生体分子として E2、RA を用いた。RA は、TS 細胞の分化を誘導することが報告されていることから (Yan et al., 2001)、Rcho-1 細胞においても分化を誘導すると予想され、ポジティブコントロールとして用いた。人工の化合物として、DES、Tam、ICI を用いた。Tam や ICI は抗エストロゲン作用を有し、乳がんの治療薬として期待されている。工業過程で生産される化合物として、フタル酸類である DEP、DBP、DPP、DOP、DINP、DCHP、BBP を、フェニルフェノー

ル類である 2-PP、3-PP、4-PP を、また E2 様の作用を有すると考えられている BPA、OP、NP を用いた。農薬として 2,4-D、TCTP、DCPA、PBO を用いた。殺虫剤として Carbaryl、Benomyl、Permethrin を用いた。また細菌で合成され E2 様作用を有することが知られている Zear や、顔料として利用されている Alizarin を用いた。

図 7 には、リポーター遺伝子アッセイシステムを用いてこれらの化合物が Rcho-1 細胞の分化に与える影響について解析した結果を示した。E2 は影響がないが、RA はコントロール (DMSO) に比べ約 2 倍にルシフェラーゼ値が上昇していた。このことから、RA は Rcho-1 細胞においても分化を著しく誘導することが示された。また DES ではルシフェラーゼ値が低下し、さらに ICI ではそれ以上に低下していた。これらの結果は、プロラクチンファミリーの発現量を検討した図 4 の結果と一致した。Tam は影響が見られなかった。フタル酸類である BBP および DBP、および Permethrin ではルシフェラーゼ値の低下が観察された。フェニルフェノール類では、2-PP は影響が見られなかつ

たが、3-PP および 4-PP ではルシフェラーゼ値が上昇した。また Carbaryl では RA とほぼ同レベルに上昇した。Benomyl は実験毎に結果が異なるが、上昇する傾向を示した。他の化合物に関しては大きな影響は観察されなかった。

フタル酸類については、更に多くの化合物について詳細に検討した (図 8)。BBP および DBP では、DBP がややルシフェラーゼ値の低下を、BBP では更なる低下を示し、図 7 の再現性が確認された。同様に他のフタル酸化合物もルシフェラーゼ値の低下を示したが、これを官能基の大きさ毎に並べるとルシフェラーゼ値の低下と相関関係にあることが示された。DCHP および BBP はそれぞれシクロヘキシル基およびベンジル基と立体的に大きな官能基を有しているが、これらでは最も顕著にルシフェラーゼ値の低下が観察された。これに対し、DEP では僅かにしか低下傾向を示さなかった。更に、これらフタル酸類ではレニラ値が高くなる傾向が観察された。とくに BBP ではレニラ値が 3 倍近い値を見せた。このことは、ベクターがトランスフェクトされた細胞数が

d6 では対照群に比べて多くなっていることを意味している。すなわち、通常トランスフェクトされた細胞は培養日数の経過とともに死滅し減少するが、フタル酸類特に BBP を曝露された細胞では細胞死がおきにくくなっていることを示している。今後、フタル酸類を曝露した Rcho-1 細胞においてアポトーシスを含めた細胞死の変化について検討する予定である。

#### 核蛍光観察による化合物の影響の評価

化合物の影響を形態レベルで簡便に評価することは有効な手段となる。当初、GFP を用いた観察では、プロモーター活性を観察すると同時に細胞の形態を観察することも狙いであった。Rcho-1 細胞は図 1 に示すように形態を大きく変化させる特徴を有している。しかし、培養日数が経過すると細胞間の接触部位が多くなり、細胞一つ一つの形態を観察することが困難になる。そのため、そのままの観察だけでは化合物の影響を評価することも難しくなる。そこで、Rcho-1 細胞の核のサイズが大きくなることに着目し、核を視覚化することを検討した。

d0 から化合物を曝露し、d6 に細胞の核に蛍光物質である Hoechst33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を取り込ませ蛍光観察を行った。図 9 に示すように、対照群 (DMSO) に比べ RA 処理群では、核のサイズが大きくなり分化が進行している像が得られた。従って、これらの観察方法が、化合物の Rcho-1 細胞の分化に与える影響を評価する上で有効な方法になりえると考えられた。

ICI を曝露した Rcho-1 細胞では、特徴のある細胞形態が観察された。図 9 に示すように、ICI 曝露群では、核の形が凹型を示す細胞種が多く観察された。この凹型の核像は、小胞体、ゴルジ体等のオルガネラが増大して核を圧迫している可能性が考えられる。このような影響は DES や Tam でも観察された。ER の無い細胞でこのよう像が観察されたことから、E2 作用あるいは抗 E2 作用を有し応用性が検討されているこれらの物質の非特異的な作用を明らかにする上で、有益な情報を提供する材料になりうると考えられた。



#### D. 結論

我々は今日、多くの医薬品化合物を利用したり、或いは意図せずとしても環境中に放出された有害化合物に接する危険性に満ちた生活を送っている。化合物の安全性については生体影響のメカニズムを明らかにしていく必要がある。本研究では、DES が ERR に結合することが見出された TS 細胞と類似し、培養がより簡易な Rcho-1 細胞を用いて化合物の分化に与える影響を解析した。先ず Rcho-1 細胞には ER が存在せず E2 に対しては不応性であることを明らかにした。さらに、プロラクチンファミリーミニアレイや、P450<sub>scc</sub> プロモーターを利用したリポーター遺伝子アッセイを利用して、約 30 種の化合物について、分化に与える影響について検討した。DES や ICI は、Rcho-1 細胞の分化を抑制することを明らかにし、E2 或いは抗 E2 様の活性を有すると考えられている化合物の新規作用メカニズムの存在を見出した。この他、フタル酸類や殺虫剤である Permethrin も Rcho-1 細胞の分化を抑制することを見出した。これとは逆に、殺虫剤である Carbaryl が分化促進作用を有

することを明らかにした。次年度は、これらの化合物に固有に誘導される遺伝子の同定を行う予定である。この他、BPA の ER 非依存的な作用を検討する上で PLP-M のプロモーター解析が有効であること、また ICI や DES の ER 非依存的な作用として核の形態を指標とした解析方法が重要など、今後の研究展開の礎となる現象を得ることができた。

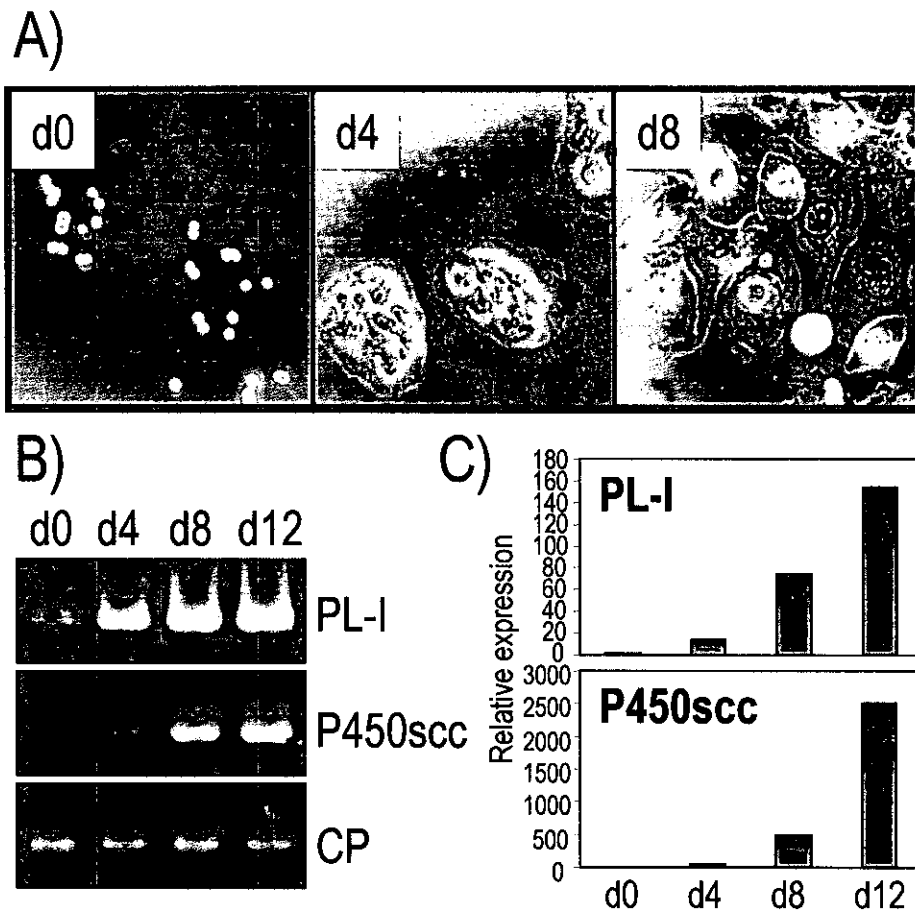


Fig. 1

Rcho-1細胞の分化誘導。A) Rcho-1細胞は、細胞を密に培養することによって未分化細胞(d0)から巨核を有する分化細胞(d8)に誘導される。B) PL-IとP450sccは、Rcho-1細胞の分化とともに発現量が上昇する分化マーカーである。RT-PCR法により、d0からd12にかけて、それぞれの遺伝子の発現変化を調べた。C) PL-IおよびP450sccの発現変化をリアルタイムPCR(Light cycler)により調べた。

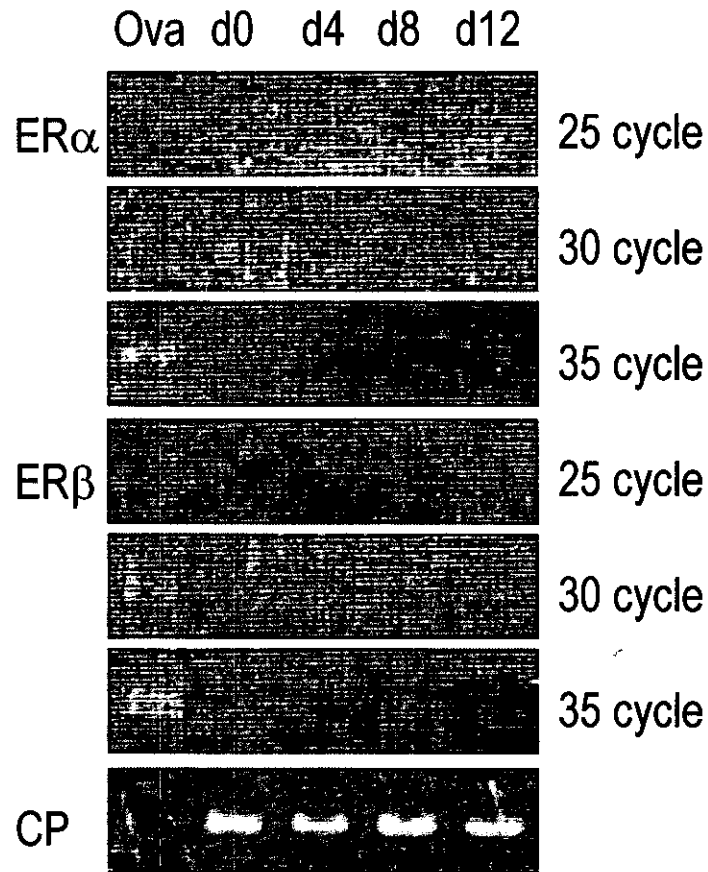


Fig. 2  
 Rcho-1細胞にはER mRNAが発現していない。ER $\alpha$ およびER $\beta$ のmRNA発現をRT-PCR法により調べた。ポジティブコントロールとして、ラットの卵巢(Ova)を用いた。ER $\alpha$ およびER $\beta$ のmRNA発現は、Ovaにおいて認められるが、d0からd12までのRcho-1細胞には発現は認められない。

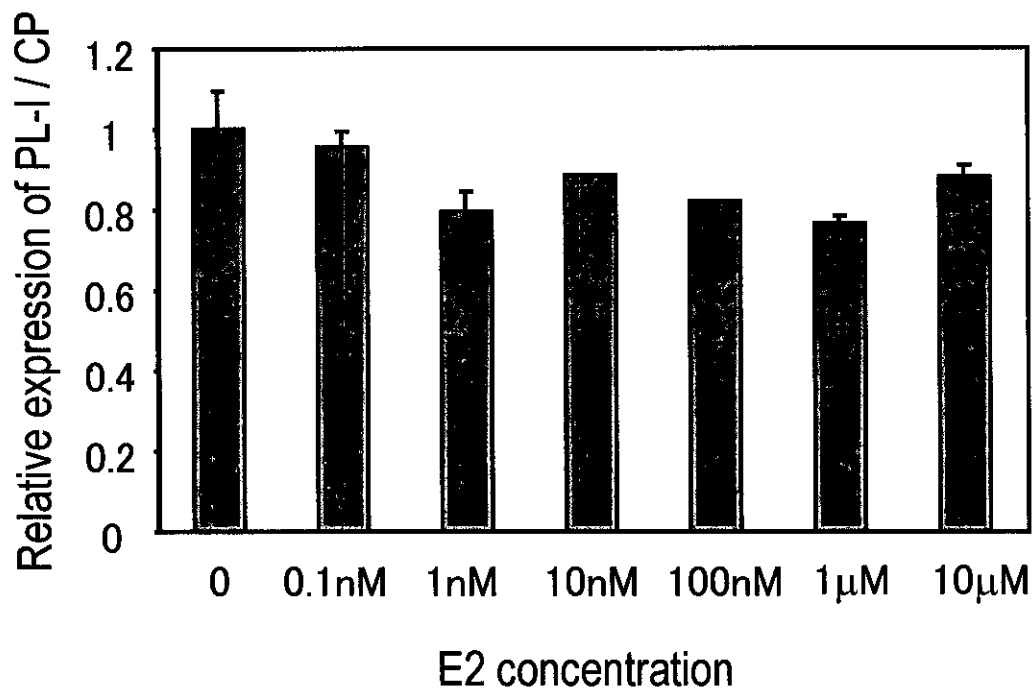


Fig. 3

Rcho-1細胞はE2に対して分化の影響をうけない。未分化Rcho-1細胞に0.1 nMから10 μMまでのE2を6日間曝露し、分化に対する影響をPL-I mRNAを指標にRT-PCR法により調べた。PL-I mRNAの発現量はサイクロフィリン(CP)のmRNA量で補正した。