

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

化学物質の胎盤ホルモン産生系・代謝系への影響に関する研究

平成14年度 総合研究報告書

主任研究者 中西 剛

平成15（2002）年3月

目 次

総括研究報告書.....	2
研究要旨.....	2
A. 研究目的.....	2
B. 研究方法.....	3
C. 研究成果.....	4
C-1. ヒト絨毛細胞への影響.....	4
C-2. ラット絨毛細胞株の内分泌機能に対する内分泌攪乱物質の影響.....	5
C-3. ヒト絨毛細胞株とラット絨毛細胞株における ER の発現.....	7
D. 考察.....	7
E. 結論.....	9
F. 健康危険情報.....	10
G. 研究発表.....	10
H. 知的財産権の出願・登録.....	10
研究成果の刊行物に関する一覧表.....	11

総括研究報告書

化学物質の胎盤ホルモン産生系・代謝系への影響に関する研究

主任研究者 中西 剛 大阪大学大学院薬学研究科 助手

研究要旨

本研究では、ヒトと齧歯類の胎盤由来細胞を用いてジエチルスチルベステロール（DES）などの発生毒性を誘発する既知の医薬品やその他のエストロゲン様化学物質等が、ヒトとラットの胎盤ホルモン産生系および代謝酵素系に与える影響について検討し、胎盤の内分泌機能のなかでも、発生毒性に重要な候補を絞りこむことで、それが *in vivo* にどのように反映されるかについて考察することを試みた。

ステロイドホルモン合成・代謝系に対する影響を検討したところ、ラットおよびヒトの胎盤の P450scc に対しては、DES を始め、 $17\beta$  エストラジオール (E2)、エチニルエストラジオール (EE) において発現を上昇させることが明らかとなった。しかし  $3\beta$ -HSD については、ヒトでは DES で発現が上昇することが確認されたが、ラットでは特に影響が認められなかった。また、ラットおよびヒトにしか存在しないそれぞれの内分泌機能についても、各化学物質により影響が認められた。さらにラット胎盤の  $3\beta$ -HSD については、E2 や EE では発現は上昇するが、DES では影響が認められないなど、エストロゲンレセプター (ER) を介した作用が予想されるエストロゲン様化学物質についても、同じ細胞に対して作用が異なることが確認された。そこでラット絨毛細胞株とヒト絨毛細胞株の ER の発現について蛋白レベルで検討を行ったところ、どちらの細胞とも ER $\alpha$  および  $\beta$  を発現していたが、ラット絨毛細胞株の ER $\alpha$  は、66kDa の full-length type であったのに対し、ヒト絨毛細胞株では、46kDa の truncated type が発現していた。ヒトとラットの胎盤において、種間で感受性に相違が認められたり、また同じ細胞でもエストロゲン様化学物質によって作用が異なるのは、これらの ER の発現様式が関与しているのかもしれない。

A. 研究目的

近年、野生生物の生殖異常が数多く観察され、それらの一因として環境中の化学物質関与の可能性が指摘されている。これらの生殖・発生異常は問題は、Colborn らによる著書「奪われし未来」などで取りあげられた野生生物における暴露影響に端を発しており、ヒトにおいても同様の影響が懸念されている。これらの化学物質の多くはホルモン様作用を持つ種々の天然または人工化学物質であり、

分子的に生体内のホルモンとは異なる物質である。このように外来性の化学物質が生体内のホルモンのような作用を示す、いわゆる内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の問題がヒトにおいても懸念されるのは、エストロゲンやアンドロジェンは種を越えて保存された分子であり、その受容体分子機構も類似しているため、野生動物への影響はヒトに対する影響を反映していると考えられるからである。一方で、人類はそれ以前に内分泌攪乱物質問

題に直面していた。1970 年代初頭までのおよそ 25 年間にわたり米国や南米を中心に処方されてきた合成エストロジェンである DES は、流産防止から早産防止に至るまでほとんど万能薬としてしようされてきたが、1970 年代になって初めて DES 投与妊婦から生まれ、思春期を迎えた女兒から腫瘍の明細胞腺癌が数例報告された。これ以降、DES を使用した妊婦から生まれた女兒は、成人すると様々な生殖上の障害を示すことが最近明らかとなっており、DES を投与された妊婦から得られたデータは、今日のヒトの発生段階における内分泌攪乱物質研究の重要な知見となっている。

内分泌攪乱物質問題が提唱される以前の毒性といえば、致死性、催奇形性、発癌性といったものであったが、これらの化学物質の中には極微量であっても、発達途上の胎児-新生児-乳幼児に対して、生理的および組織学的に不可逆的な変化を引き起こす第 4 の毒性を考えられねばならなくなったことから、この問題が人類を含めた生物界にとっていかに深刻な問題であるかを伺わせる。これら化学物質の *in vivo* 生殖・発生毒性評価には、現在のところ、主に齧歯類を初めとする実験動物が用いられている。発生毒性については、化学物質が成体のみに作用する他の毒性試験とは異なり母児複合体に作用し、多様な作用部位が存在すると考えられるため、一般的に他の毒性試験よりもヒトへの外挿が困難である。その原因の一つとして、胎盤の種差があげられる。胎盤は、母体から発育に必要な栄養素などを供給したり、外来異物に対する暴露を阻止するのみならず、外来異物の代謝や胎児の器官形成に必要不可欠な種々のホルモンを供給する第 2 の視床下部-下垂体-性腺複合体としての機能を有していることから、発生毒性における標的臓器となる可能性がある。しかしながら、ヒトの胎盤は、齧歯類などの

実験動物とは構造、内分泌機能ともに大きく異なる。例えば、胎児循環血中の男性ホルモンを女性ホルモンに変換するアロマターゼ (CYP19) がヒト胎盤中には存在するが、齧歯類には存在しない。さらに齧歯類の胎盤では、糖蛋白ホルモンの  $\alpha$  鎖を合成できないため、様々な糖蛋白ホルモン等も産生できない。したがって、実験動物では毒性が認められなかったにも関わらず、ヒトにおいては毒性を示すような医薬品などの化学物質においては上記のことを考慮したうえでその毒性を再検討する必要があると考えられる。

そこで本研究では、ヒトと齧歯類の胎盤由来細胞を用いて DES をはじめとする医薬品等のホルモン様化学物質が、ヒトとラットの胎盤ホルモン産生系および代謝酵素系に与える影響について検討し、胎盤の内分泌機能のなかでも、発生毒性に重要な候補を絞りこむことで、それが *in vivo* にどのように反映されるかについて考察してみたい。

## B. 研究方法

### <細胞培養>

Rcho-1 細胞は、20%ウシ胎児血清 (FCS)、を含有した NCTC-135 培地で、JEG-3 細胞は、10% FCS を含有 MEM 培地で、JAR 細胞は、10% FCS 含有 RPMI1640 培地で、Bewo 細胞と MCF-7 細胞は、10% FCS 含有した DMEM 培地で、いずれも 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で通常培養した。化学物質処理時においては、Rcho-1 細胞は、20%活性炭処理 FCS の培地で、その他の細胞については 5%活性炭処理 FCS の培地で、それぞれ培養を行った。また各化学物質の処理は、細胞毒性を与えない最大濃度で行い、作用時間は 48 時間に設定した。

### <定量的PCR>

細胞から Total RNA を抽出し、混合 oligo dT primer と逆転写酵素を用いて、single strand cDNA を合成した。この cDNA 濃度を鋳型として、forward primer、reverse primer および QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) を加え混和し、Light Cycler (Roche)を用いて、95℃で 15 分間熱変性させた後、95℃・15 秒、最適アニリング温度・30 秒、72℃・最適時間を 1 サイクルとして、40-45 サイクル行い、目的遺伝子の cDNA を増幅させ、定量した。また内部標準として  $\beta$ -actin を同様に定量し、補正を行った。

### <Western Blot 解析>

各細胞から回収した細胞溶解液を 50  $\mu$ g / lane で 10% acrylamide gel に展開し、nitro membrane にトランスファーした。メンブランをブロッキング後、ウサギ抗 ER $\alpha$  抗体、およびウサギ抗 ER $\beta$  抗体と反応させた。さらに、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体と 1 時間反応させ、ECL 検出試薬を用いて X 線フィルムに露光して検出した。

## C. 研究成果

### C-1. ヒト絨毛細胞への影響

ヒトにおいて胎盤は、胎児の成長と性分化に特に重要な蛋白ホルモンとステロイドホルモンを同時に産生、分泌する第二の視床下部-下垂体-性腺複合体としての機能を有する。例えば、胎盤において特に重要なステロイドホルモンは、プロゲステロン (P4) とエストロジェンである。一般にこれらは、原料となるコレステロールを各代謝酵素が分解していくことにより生成される (Fig.1)。妊娠初期の P4 は妊娠黄体が主産

生の場合であるが、徐々に絨毛組織から分泌され始め、最終月経より 50 日目以降では胎盤が主要な産生臓器となり、luteoplacental shift が完了する。一方で、胎盤は、妊娠期における主要なエストロジェン供給臓器であり、妊娠経過と共に母体血中のエストロジェン濃度は顕著に増加し、妊娠末期には非妊娠時の約 100 倍にも達する。またこの他にも胎盤は、P4 産生を刺激する性腺刺激ホルモンのヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) などの蛋白ホルモンも産生する。このように胎盤は、胎児の発育に重要な内分泌臓器として機能しており、化学物質のこのような機能への影響は胎児に少なからず影響を与える可能性が考えられる。

そこで我々は、DES をはじめとする内分泌攪乱物質 (Table I) が、胎盤のステロイドホルモン合成・代謝系に与える影響をヒトとラット絨毛細胞株を用いて、リアルタイム PCR 法により遺伝子レベルでの検討を行った。

### C-1. 1. P450scc への影響

各化学物質の P450scc への影響を検討した結果を Fig.2 に示す。P450scc は、ER に強い親和性を示す、E2、EE、DES で発現が上昇した。また ER を介した作用ではないものの、P4 においても発現の上昇が確認された。一方で、ブチルベンジルフタル酸 (BBP) では、発現を抑制する傾向が認められた。

### C-1. 2. 3 $\beta$ -HSD I への影響

各化学物質の 3 $\beta$ -HSD I への影響を検討した結果を Fig.3 に示す。3 $\beta$ -HSD I は、DES によってその発現が約 2 倍に上昇した。また同じエストロジェン作用を有する E2、EE、や DDT によって若干の上昇作用が認められた。また ER を介した作用ではないものの、

P4 においても発現の若干の上昇が確認された。

#### C-1. 3. スルファターゼへの影響

ヒトの胎盤におけるエストロゲン合成は、CYP17 が存在しないためコレステロールからの直接的な合成ではなく、母体および胎児から供給されるデヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHAS) を再び取り込み、アンドロジェンの合成を経てエストロゲンに変換される (Fig.1)。その際に、DHAS からアンドロジェン前駆体であるデヒドロエピアンドロステロン (DHA) への変換は、スルファターゼによって行われる (Fig.1)。そこで次に、各化学物質がスルファターゼの発現に与える影響について検討を行った。その結果、P450scc の結果と同様に E2、EE、DES で発現が上昇した (Fig.4)。また ER を介した作用ではないものの、P4 においても発現の上昇が確認された (Fig.4)。またエストロゲン作用を有するものの、ノニルフェノール (NP) やオクチルフェノール (OP)、DDT、BBP では、若干の発現抑制が確認された (Fig.4)。

#### C-1. 4. $17\beta$ -HSD I への影響

E2 などへの変換に必要である  $17\beta$ -HSD I に対する種々の化学物質の影響について検討を行った。Fig.5 示すように、NP、OP のみその発現誘導が認められた。

#### C-1. 5. アロマターゼへの影響

胎盤のアロマターゼは、馬などの有蹄類や霊長類のみに存在している内分泌機能であり、齧歯類などの実験動物の胎盤には存在しない。したがって、胎盤のアロマターゼへの影響は、

化学物質の発生毒性における種差を考慮する上で、非常に重要な知見であると言える。そこで次に、各化学物質が与えるアロマターゼへの影響について検討を行った。その結果、E2、DES、EE、P4 によりその発現量が顕著に増大した (Fig.6)。また、DDT と OP によってもその発現が上昇した (Fig.6)。

#### C-1. 6. hCG $\beta$ への影響

hCG は分子量 39000 の糖蛋白ホルモンであり、妊娠初期から黄体の維持に必要な P4 産生を刺激する性腺刺激ホルモンとして非常に重要なホルモンである。また hCG は、 $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類のサブユニットの非共有結合により形成されるヘテロダイマーである。このうち  $\alpha$  サブユニットは脳下垂体由来の甲状腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモンと共通であり、各々組織で異なる  $\beta$  サブユニットと共に各々の細胞特異的な制御を受ける。そこで次に hCG  $\beta$  の発現における各化学物質の影響について検討を行った。その結果、E2、DES、EE、P4 により hCG  $\beta$  発現が顕著に誘導された (Fig.7)。また、DDT によってもその発現が上昇した (Fig.7)。

#### C-2. ラット絨毛細胞株の内分泌機能に対する内分泌攪乱物質の影響

齧歯類においても胎盤は、胎児の成長と性分化に特に重要な蛋白ホルモンとステロイドホルモンを同時に産生、分泌する第二の視床下部-下垂体-性腺複合体としての機能を有する。しかしながら、齧歯類の胎盤とヒトの胎盤では、構造的にも機能的にも大きく異なる。齧歯類の胎盤では、ステロイド生合成系酵素の中でもコレステロールからアンドロジェンまでの合成酵素は発現しているが、先述の通りアンド

ロジェンをエストロジェンに変換するアロマトラーゼは発現していない (Fig.8)。おそらく齧歯類では、胎盤で合成されたアンドロジェンが母体の卵巣に供給されることでエストロジェンが産生され、再び胎盤を経由して胎児にも供給されるものと考えられている。また齧歯類では胎盤から性腺刺激ホルモン (CG) は産生されないため、齧歯類における黄体からの P4 産生は、胎盤から産生されるプロラクチン様蛋白ホルモンによって刺激される。したがって、ヒトの胎盤には存在するが齧歯類の胎盤には存在しない内分泌機能に影響を与えるような化学物質の毒性評価は、齧歯類を用いた動物実験では網羅できない可能性があり、また逆にヒトの胎盤には存在しないが齧歯類の胎盤には存在する内分泌機能に影響を与える内分泌攪乱物質の場合には、その毒性を過大評価する可能性がある。そこで本項では、DES をはじめとする化学物質の発生毒性における感受性の種差についてより詳細な知見を得る目的で、ラット絨毛細胞株 Rcho-1 を用いて先に検討した DES をはじめとする化学物質が、ラット胎盤に与える影響について、リアルタイム PCR による解析を行った。

#### C-2. 1. P450scc への影響

各化学物質の P450scc への影響を検討した結果を Fig.9A に示す。その結果、E2、EE は P450scc の発現を有意に上昇させた。DES においても、P450scc の発現上昇傾向は認められたが、E2 や EE 程ではなかった。

#### C-2. 2. $3\beta$ -HSD I への影響

各化学物質の  $3\beta$ -HSD I への影響を検討した結果を Fig.9B に示す。その結果、E2、

EE は P450scc の結果と同様の  $3\beta$ -HSD I 発現を有意に上昇させた。しかしながら、DES においては、 $3\beta$ -HSD I の発現上昇は認められなかった。

#### C-2. 3. CYP17 の影響

ヒトの胎盤においては CYP17 が存在しないため、コレステロールからアンドロジェンをできないが、齧歯類では CYP17 が存在するためコレステロールからアンドロジェンの合成が可能である (Fig.8)。そこで次に、各化学物質が CYP17 の発現に与える影響について検討を行った。その結果、E2、EE においては若干の発現上昇が確認されたが、DES では発現上昇は確認されず、むしろ抑制傾向が認められた (Fig.9C)。

#### C-2. 4. $17\beta$ -HSD への影響

Rcho-1 細胞におけるステロイドホルモン産生の最終段階の酵素  $17\beta$ -HSD に対する各化学物質の影響を検討した。特に、齧歯類胎盤に存在する isotype II および VII について検討を行った。その結果、E2、DES、EE により type II は顕著に発現が誘導されたが、type VII にはいずれも影響しなかった (Fig.10)。

#### C-2. 5. 蛋白ホルモンへの影響

先述の通りヒトの胎盤においては、hCG が妊娠初期から黄体の維持に必要な P4 産生を刺激する性腺刺激ホルモンとして非常に重要なホルモンであるが、齧歯類の胎盤においてはこのような糖蛋白ホルモンが存在しないため、単純蛋白ホルモンであるプロラクチンファミリーがその代役をになっている Rcho-1 細胞において発現が確認されており、胎盤

で重要な役割を担っているプロラクチンファミリーの PL-II とプロラクチン様タンパク質 A (PLP-A) に対する各化学物質の影響を mRNA レベルで検討を行った。その結果、PL-II においては E2、EE により発現が誘導されたが、DES による影響はなかった (Fig.11A)。一方、PLP-A に関しては、いずれの化合物によってもわずかに発現の上昇傾向が認められた (Fig.11B)。

### C-3. ヒト絨毛細胞株とラット絨毛細胞株における ER の発現

エストロジェンは、核内レセプタースーパーファミリーに属する ER を介してその作用を発揮する。ER は、これまでに  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類が存在することが報告されている。どちらのレセプターも E2 に対して高い結合能と特異性を有しており、エストロジェン応答配列を介した転写活性も有しているものの、ER  $\alpha$  と  $\beta$  のリガンド特異性は、各種エストロジェン様物質に必ず同一でないことも判明している。したがって、これまでに確認してきたエストロジェン様化学物質のヒト胎盤に対する作用が、化学物質によって異なる原因としては、ER に対する作用の相違に起因する可能性が考えられる。また ER  $\alpha$  と  $\beta$  は、組織によってその分布が異なっていることも報告されている。一方で、これまでに用いてきた Rcho-1 細胞や JEG-3 細胞をはじめとするヒトの胎盤細胞については ER の存在を確認した報告はあるものの、そのサブタイプについての詳細な報告はない。そこで次に、これまで確認されてきたエストロジェン様化学物質の作用の相違についてより詳細な知見を得るために、各細胞に存在する ER について Western Blot 法を用いて蛋白レベルで解析

を行った。

その結果、Rcho-1 においては ER  $\alpha$ 、 $\beta$  ともに発現していることが明らかとなった (Fig.12)。また ER  $\beta$  に関しては、ヒト胎盤細胞株である JEG-3 と同様の 2 つのバンドが検出されたが、ポジティブコントロールである MCF-7 では 3 つのバンドが確認された。これらのバンドは、mRNA のスプライシングバリエーションに起因する truncated type であると考えられる。一方、ER  $\alpha$  の発現は、Rcho-1 細胞においては、MCF-7 同様 66kDa の full-length type の存在が確認されたが、JEG-3 細胞においては 46kDa の truncated type しか存在しなかった。そこで次にこの発現パターンが JEG-3 細胞に特有のものであるかを検討するために、他のヒト胎盤細胞株である JAR 細胞と BeWo 細胞についても検討を行った。その結果、JAR 細胞と BeWo 細胞においては共に JEG-3 細胞同様、46kDa の truncated type ER  $\alpha$  しか発現していなかった (Fig.13)。したがって、ラットの胎盤とヒトの胎盤ではエストロジェン様化学物質に対する感受性が異なる可能性が示唆された。

### D. 考察

今回の検討では、DES をはじめとするエストロジェン様化学物質を中心に、化学物質の胎盤への影響について、ヒトとラットの絨毛細胞株を用いて検討を行った。その結果、それぞれのステロイドホルモン合成・代謝系に影響を与えるものがあり、その作用はヒトおよびラットの胎盤のみ存在する機能にも影響を与えることが明らかとなった。また Rcho-1 細胞の CYP17 においては、E2 と EE で上昇作用が認められたのに対し、DES では抑制傾向が認められたことから、ER に親和性の



あるエストロゲン様化学物質の中でも、その影響が正反対になるような内分泌機能も存在することが明らかとなった。さらに DES の 3 $\beta$ -HSD に対する作用は、Rcho-1 細胞においては特に影響を与えなかったが、JEG-3 細胞においては上昇作用が認められたことから、同じ内分泌機能に対してもその感受性に種差があることが明らかとなった。

このような作用の違いの原因としては、各細胞における ER の発現パターンが影響している可能性が考えられる。ER には  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 つのサブタイプが存在し、どちらのレセプターも E2 に対して高い結合能と特異性を有しており、エストロゲン応答配列を介した転写活性も有しているものの、ER  $\alpha$  と  $\beta$  のリガンド特異性は、各種エストロゲン様物質に必ず同一でないことがいくつか報告されている。ER  $\alpha$  および  $\beta$  は、DNA 結合ドメイン (DBD) を介してゲノム上のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合して作用するほか、転写因子 AP-1 を介して AP-1 応答配列にも作用することが知られているが、この AP-1 を介した転写活性化がエストロゲン様化学物質によって異なることが Paech らにより報告されている。すなわち、ER  $\alpha$  を介した AP-1 活性化には E2 やエストロゲン様化学物質による差は認められないものの、ER  $\beta$  を介した AP-1 活性化においては、E2 ではアンタゴニストとして働くのに対し、ERE を介した転写ではアンタゴニストとして働くエストロゲン様化学物質がアゴニストとして働くのである。ER の発現は組織によってその分布が異なることが報告されているが、今回用いたラットおよびヒト絨毛細胞株においては、どちらの ER (ヒト絨毛細胞株においては ER  $\alpha$  は truncated type) も発現していたこと

(Fig.12, 13) から、エストロゲン様化学物質による感受性の違いは、ER の発現に起因する可能性が考えられる。

しかし興味深いことに、今回検討したすべてのヒト絨毛細胞株において ER  $\alpha$  は、ヒト乳癌細胞株やラットの絨毛細胞株で発現している 66kDa の full-length type ではなく、46kDa の truncated type しか発現していなかった。これは、組織によって exon I の splicing が異なるためであると考えられているが、ヒト胎盤において発現している 46kDa の hER  $\alpha$  46 に関する機能についてはほとんど報告がない。truncated type の ER には、DBD やリガンド結合ドメイン (LBD) は保存されていることは明らかとなっており、ERE に対する結合能は hER  $\alpha$  に比べ hER  $\alpha$  46 の方が強いことが報告されている。しかし、最近ヒト血管内皮細胞の ER を介した内皮型 NO 合成酵素の誘導においては、full-length type の ER は ERE を介した転写を促進するのに対し、truncated type ではほとんど転写活性化はみられず、逆に full-length type の ER の転写活性化を dominant-negative に抑制することが報告された。したがって、ラットとヒトの胎盤でエストロゲン様化学物質に対する反応が異なるのは、ER  $\alpha$  のタイプが異なっていることも原因の一つと考えられる。

ヒトにおける検討においては、E2、DES、EE などのエストロゲン以外の化学物質では、P4 で JEG-3 細胞の 17 $\beta$ -HSD I 以外の 4 つの酵素および hCG  $\beta$  の mRNA 発現量が上昇した。ヒト胎盤初代培養細胞株を用いた検討で、E2 や P4 により P450scc、3 $\beta$ -HSD I、17 $\beta$ -HSD I の発現が上昇するという報告があり、今回の結果はこれまでの報告と合

致する。NP、OP では  $17\beta$ -HSD I が上昇、STS が減少し、OP ではアロマトーゼ e も上昇した。DDT では、 $3\beta$ -HSD I、アロマトーゼ、hCG  $\beta$  が上昇 STS が減少した。BBP では P450scc、STS がそれぞれ減少した。biphenol A、 $\text{CdCl}_2$  では特に変化は認められなかった。これらの結果から、ステロイドホルモン合成酵素およびペプチドホルモンが内分泌攪乱物質の標的となり得ることが明らかとなった。今回検討を行った P4、Cd 以外の物質は ER への結合能は有するが、その結合能に応じた作用の強度というわけではなかった。これは、ER を介した転写制御には結合能だけが関わっているわけではないという数多くの報告と合致する。

一方、Rcho-1 細胞において、ER に結合能があることが報告されている E2、EE により発現の上昇が認められたのは、P450scc、 $3\beta$ -HSD I、CYP17、 $17\beta$ -HSD II、PL-II の 5 つの分子である。このことから、EE は E2 と同様の作用を示すことが明らかとなった。齧歯類のこれら分子のプロモーター領域などに関する詳細な報告はほとんどないことから、現時点では E2 の作用が ER を介してどのように作用したのか、またどの ER を介した作用であるかは不明である。一方、DES 処理により発現の上昇が認められたのは、P450scc、 $17\beta$ -HSD II の二つだけである。DES の ER に対する結合力はリガンドである E2 よりも強いにもかかわらず、E2 程の作用は示さなかった。したがって DES は、齧歯類胎盤の妊娠維持に重要なホルモン産生には、あまり影響を与えないのかもしれない。しかしながら、DES には様々な内分泌攪乱作用を有していると考えられていることから、E2 とは異なった作用点が存在する可能性が十分

に考えられる。Tremblay らは、DES が ERR  $\beta$  (estrogen receptor related receptor  $\beta$ ) から共役因子を遊離させ、その転写活性化を阻害することや、E2 投与では影響ないが、DES 投与により ERR  $\beta$  欠損マウスにおいても認められた現象である胎盤の labyrinth zone の欠損減少や trophoblast giant cell の蓄積などといった胎盤の過形成を引き起こすことが報告されていることを報告している。DES と E2 に異なる作用点が存在することは、今回の検討と合致しており、ヒトにおいても胎盤形成になんらかの影響が出ている可能性が考えられる。

今後はこれらの知見をもとに、これら化学物質による胎盤機能の修飾が、*in vivo* において胎児にどのような影響を与えるのか等について検討を行っていきたいと考えている。

## E. 結論

- (1) DES をはじめとするエストロゲン様化学物質および、その他の化学物質により、ラットおよびヒトの絨毛細胞株の内分泌機能が修飾されることが明らかとなった。
- (2) ER を介した作用を示すと考えられるエストロゲン様化学物質においても、内分泌機能によっては全く逆の作用を示すものが存在した。
- (3) ヒトとラットの絨毛細胞株では、同じ内分泌機能でも化合物によっては種間で全く逆の作用を示したり、一方のみにしか作用が認められないものが存在した。
- (4) ヒトおよびラットの絨毛細胞株とも ER  $\alpha$  および  $\beta$  を有していた。したがってエストロゲン様化学物質間で作用が異なるのは、異なったホルモンレセプター

を介した作用に起因する可能性が示唆された。

- (5) ヒトとラットの絨毛細胞株では、ER $\alpha$ のスプライシングアイソフォームの発現が異なっていた。したがって、ヒトとラットの絨毛細胞株間で同じ化学物質に対する感受性が異なるのは、ER $\alpha$ の発現様式に起因する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

現段階においては、特に早急に報告すべき健康危険情報はない。

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

Trialkyltin compounds enhance hCG secretion and aromatase (CYP19) activity in human placental choriocarcinoma cells., Nakanishi T, Kohroki J, Suzuki S, Ishizaki J, Hiromori Y, Takasuga S, Itoh N, Watanabe Y, Utoguchi N, Tanaka K, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2830-2837, 2002.

##### G-2. 学会発表

- 1) 有機スズ化合物のヒト胎盤機能修飾に関する検討, 広森洋平, 中西 剛, 伊藤徳夫, 田中慶一, 第13回日本微量元素学会(千葉), 平成14年7月.
- 2) ヒト胎盤のhCG産生とアロマターゼ活性に与える有機スズ化合物の影響, 広森洋平, 中西 剛, 伊藤徳夫, 田中慶一, 第5回日本内分泌攪乱化学物質学会(広島), 平成14年11月.

#### H. 知的財産権の出願・登録

現段階においては、特に知的財産権の出願・登録はない。

別添 6

研究成果の刊行物に関する一覧表

1. Trialkyltin compounds enhance hCG secretion and aromatase (CYP19) activity in human placental choriocarcinoma cells., Nakanishi T, Kohroki J, Suzuki S, Ishizaki J, Hiromori Y, Takasuga S, Itoh N, Watanabe Y, Utoguchi N, Tanaka K, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2830-2837, 2002.

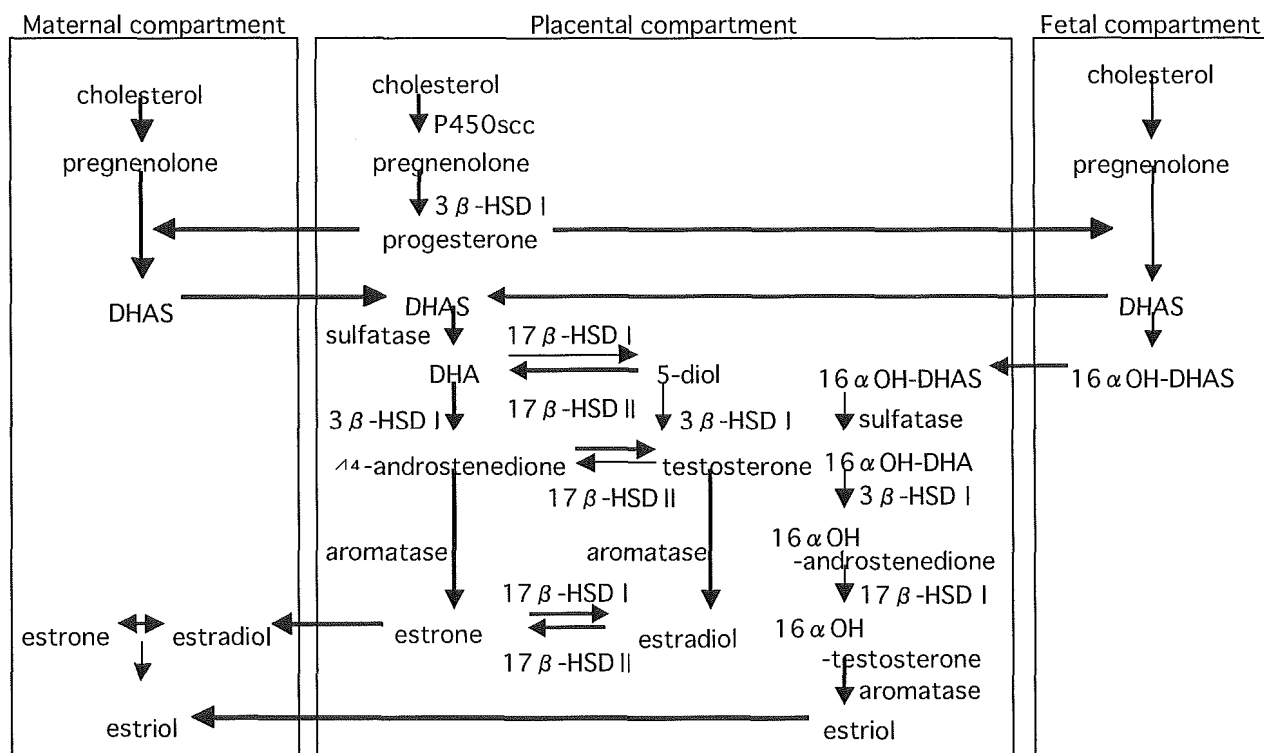


Fig. 1. Estrogen biosynthesis in the humfetoplacental unit

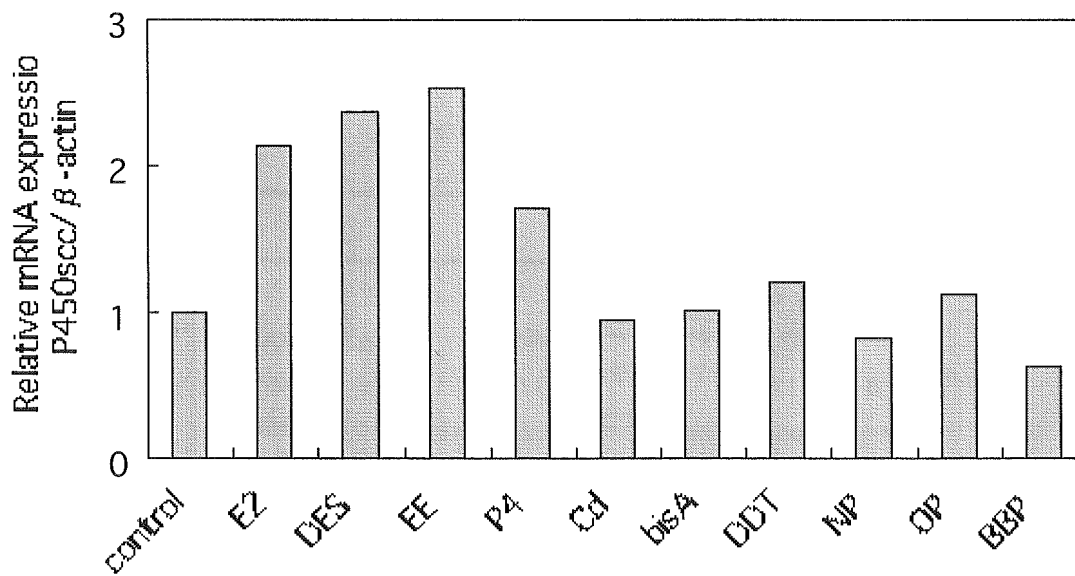


Fig. 2. Effects of EDs on P450scc mRNA expression in JEG-3 cells. Total RNA were isolated from JEG-3 cells with E2, DES, EE, P4, NP ( $3 \times 10^{-6}$  M), Cd ( $10^{-6}$  M), bisA, DDT, OP, and BBP ( $10^{-5}$  M) for 48 hrs. P450scc mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR.

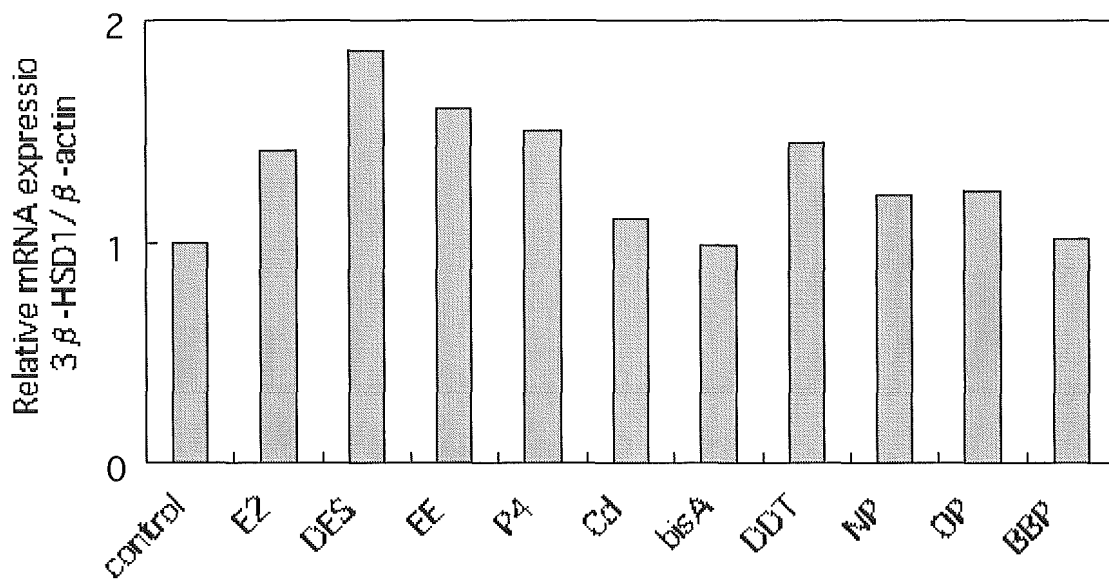


Fig. 3. Effects of EDs on 3β-HSD I mRNA expression in JEG-3 cells. Total RNA were isolated from JEG-3 cells with E2, DES, EE, P4, NP ( $3 \times 10^{-6}$  M), Cd ( $10^{-6}$  M), bisA, DDT, OP, and BBP ( $10^{-5}$  M) for 48 hrs. 3β-HSD I mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR.

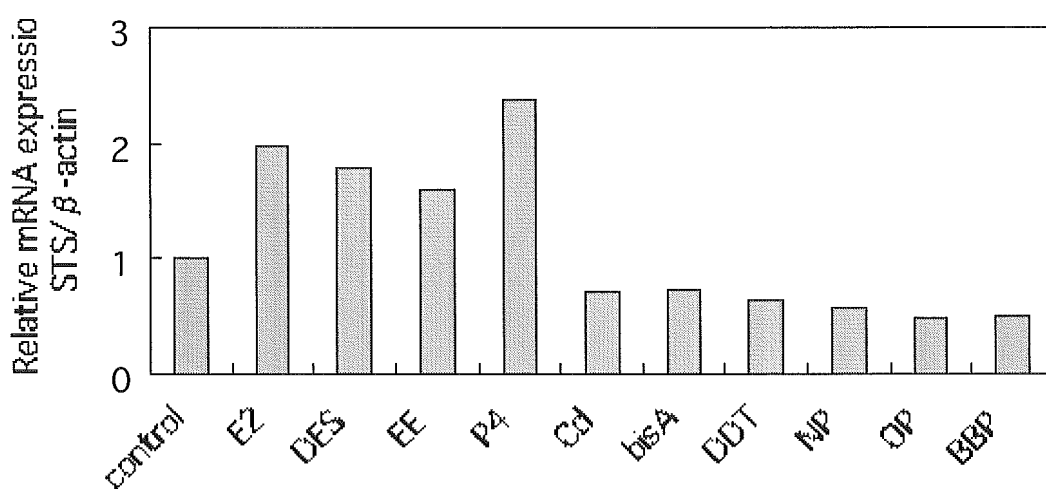


Fig. 4. Effects of EDs on STS mRNA expression in JEG-3 cells. Total RNA were isolated from JEG-3 cells with E2, DES, EE, P4 ,NP ( $3 \times 10^{-6}$  M), Cd ( $10^{-6}$  M), bisA, DDT, OP, and BBP ( $10^{-5}$  M) for 48 hrs. STS mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR.



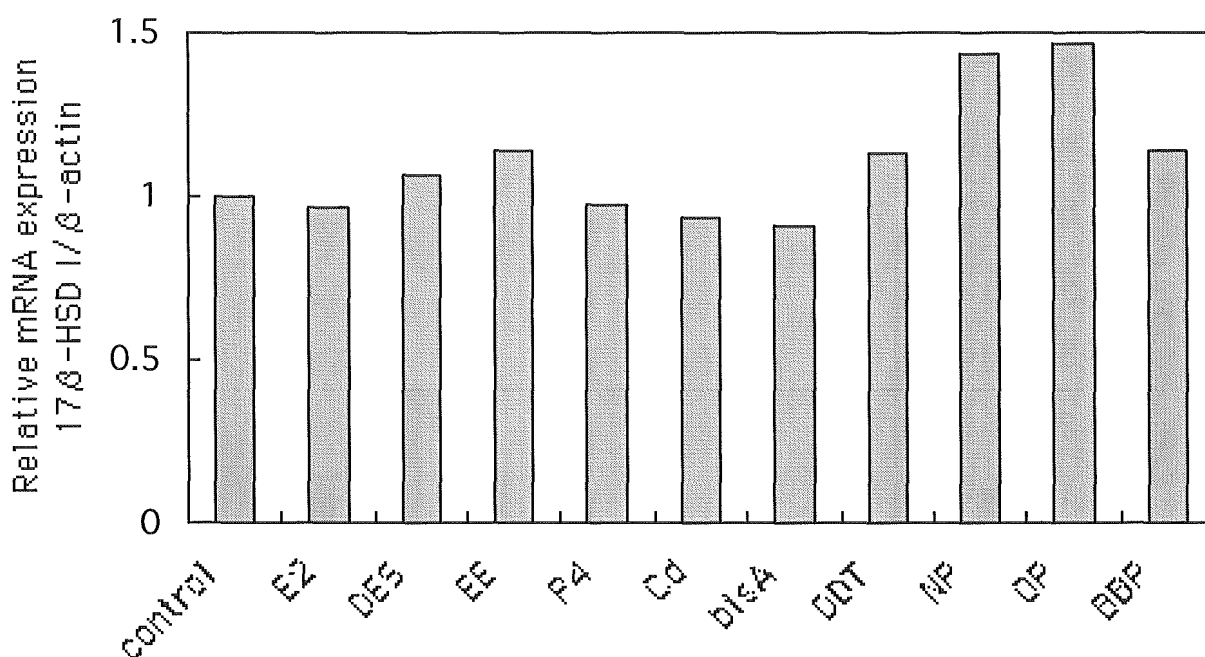


Fig. 5. Effects of EDs on  $17\beta$ -HSD I mRNA expression in JEG-3 cells. Total RNA were isolated from JEG-3 cells with E2, DES, EE, P4, NP ( $3 \times 10^{-6}$  M), Cd ( $10^{-6}$  M), bisA, DDT, OP, and BBP ( $10^{-5}$  M) for 48 hrs.  $17\beta$ -HSD I mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR

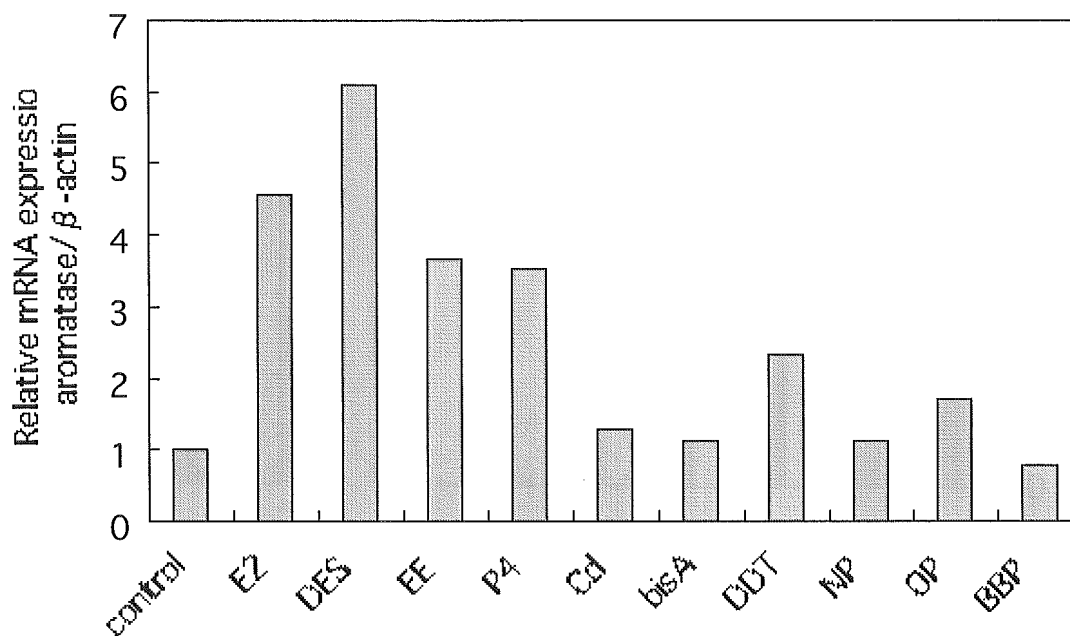


Fig. 6. Effects of EDs on aromatase mRNA expression in JEG-3 cells. Total RNA were isolated from JEG-3 cells with E2, DES, EE, P4, NP ( $3 \times 10^{-6}$  M), Cd ( $10^{-6}$  M), bisA, DDT, OP, and BBP ( $10^{-5}$  M) for 48 hrs. Aromatase mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR.

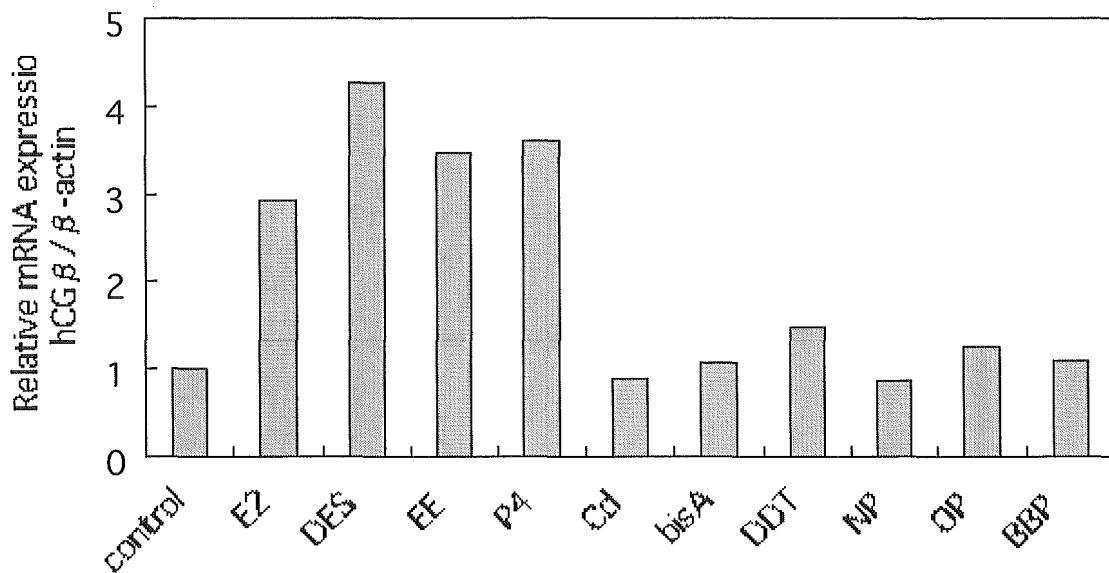


Fig. 7. Effects of EDs on hCG $\beta$  mRNA expression in JEG-3 cells. Total RNA were isolated from JEG-3 cells with E2, DES, EE, P4, NP ( $3 \times 10^{-6}$  M), Cd ( $10^{-6}$  M), bisA, DDT, OP, and BBP ( $10^{-5}$  M) for 48 hrs. hCG $\beta$  mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR.

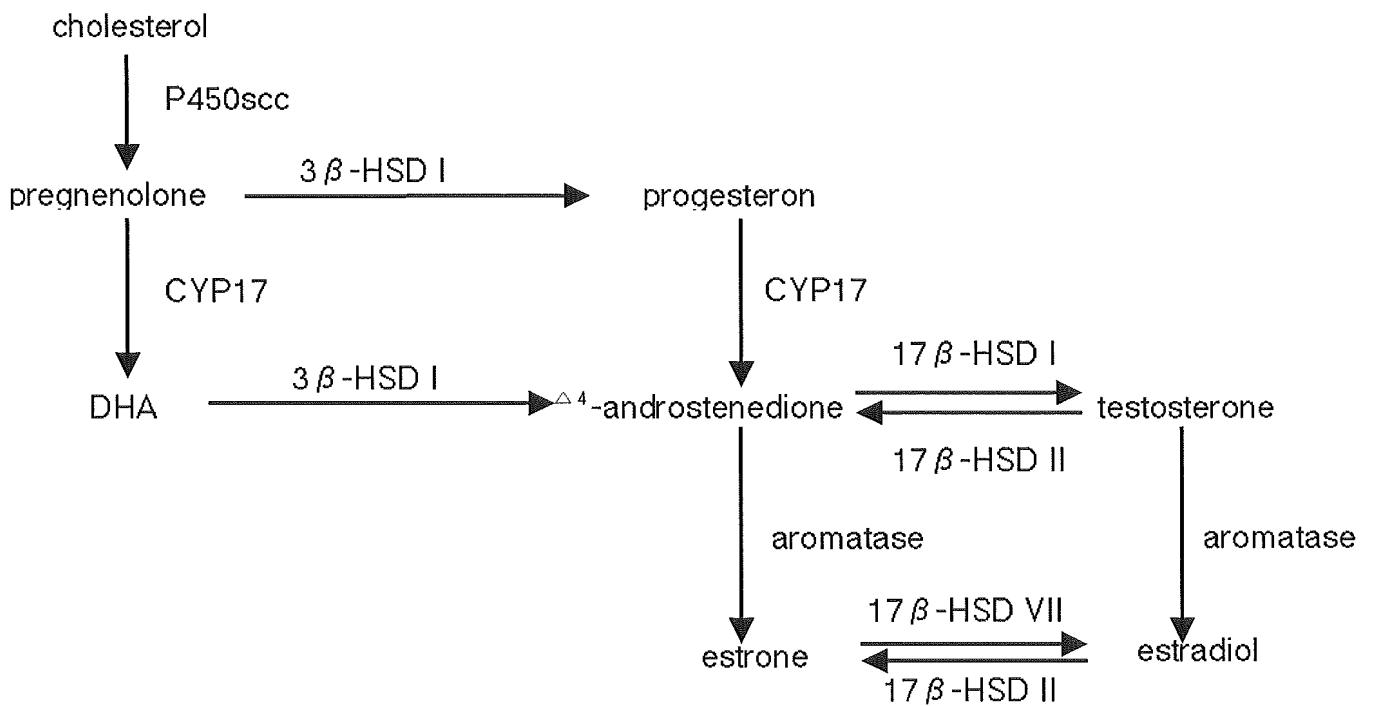


Fig. 8. Estrogen biosynthesis pathway in rodents. Rodent placenta has five steroidogenic enzymes, P450scc, 3β-HSD I, CYP17, 17β-HSD II, and 17β-HSD VII.