

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 中西 剛

平成16（2004）年3月

## 目 次

総括研究報告書	2
研究要旨	2
A 研究目的	3
B 研究方法	4
B-1 細胞培養	4
B-2 <i>in vivo</i> 実験	4
B-3 定量的 PCR	4
B-4 胎盤特異的遺伝子発現プラスミドの構築と遺伝子発現の確認	5
B-5 アテノウイルスヘクター (Ad) の作製	5
B-6 <i>in vivo</i> におけるアテノウイルスヘクター (Ad) 発現効率の評価	5
C 研究成果	5
C-1 妊娠マウスの胎盤に対する有機スス化合物の影響	5
C-1-1 妊娠マウスの胎盤に対する TBT の影響	7
C-1-2 妊娠マウスにおける [ <sup>14</sup> C]-TPT の体内動態	7
C-2 胎盤特異的な遺伝子発現ヘクターの構築	8
C-3 胎盤指向性アテノウイルスヘクター (Ad) の作製	9
D 考察	10
D-1 有機スス化合物の <i>in vivo</i> における胎盤機能への影響について	10
D-2 胎盤特異的遺伝子発現系の構築について	11
E 結論	12
F 健康危険情報	12
G 研究発表	13
G-1 論文発表	13
G-2 学会発表	13
H 知的財産権の出願・登録	13
研究成果の刊行物に関する一覧表	14

## 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 大阪大学大学院医学研究科 助手

## 研究要旨

本研究では、医薬品等の化学物質の毒性や副作用の標的臓器として胎盤に注目し、どのような胎盤機能か変化した場合に、いかなる胎児への影響か及ぶのかを *in vitro* および *in vivo* 双方について検討を行うことで、その *in vitro* の結果から発生毒性の予測か可能な評価系の構築を最終目標としている。本年度は、1) 有機スズ化合物などの化学物質の *in vivo* における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の検討、2) それら内分泌攪乱物質の妊娠動物における胎盤移行性の検討、3) さらに胎盤機能の変動による胎児への影響を *in vivo* で検討するために胎盤特異的な遺伝子発現系の構築、について検討を行った。トリフチルスズを妊娠12日目のマウスに投与し、妊娠15日目に胎盤を回収して、各ステロイドホルモン産生に関わる酵素の mRNA 発現量について検討を行った。その結果、昨年度に行ったラノト絨毛細胞株 Rcho-1 を用いた *in vitro* における検討結果を反映して、3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I (HSD I) の mRNA 発現量が上昇していた。また有機スズ化合物の体内動態について検討するために、<sup>14</sup>C-トリフェニルスズを妊娠1日目のマウスに腹腔内投与し体内動態について検討したところ、投与後1時間後胎盤への移行性が確認され、6時間後に蓄積量がピークに達した後に減少した。このように化学物質が胎盤に移行し、胎盤の様々な遺伝子発現を修飾することか確認されたか、発生毒性においては母体—胎盤—胎児か一つのユニットになっており、これらへの影響が複合的に働くことにより毒性か生じるため、単に実験動物に被験物質を投与するだけでは胎盤機能の修飾に起因する胎児への影響を検討することは困難である。そこで、被験物質により変動か認められた胎盤中の遺伝子を、胎盤特異的に発現させて胎児への影響を検討するための前段階として、胎盤特異的に遺伝子を発現させるシステムの構築を試みた。齧歯類胎盤の giant cell に特異的発現する placental lactogen (PL) I および II のそれぞれ転写開始点から上流-280bp と-2643bp の DNA 断片をマウスのゲノムからクローニングし、下流にルンフェラーゼ発現遺伝子を連結してレポーター遺伝子を作成した。これらの遺伝子発現を Rcho-1 細胞とマウス繊維芽細胞株である 1929 細胞に発現させて比較検討したところ、プロモーター依存的に Rcho-1 細胞でのみ高い発現を示すことか明かとなった。比較的容易に *in vivo* での遺伝子導入か可能なアデノウイルスヘクター (Ad) を用いて、胎盤機能修飾モデル動物の作成を行うために、Ad の胎盤への遺伝子導入効率についても検討を行った。しかし静脈内投与では、野生型の Ad (WT-Ad) は、肝臓での発現か顕著に高く、胎盤での発現は肝臓と比較してわずか 0.1%程度であったか、この問題を解決するためにウイルスのファイバー部分に RGD 配列を持たせた改変型アデノウイルスヘクター (RGD-mAd) を用いて検討を行ったところ、胎盤での発現は WT-Ad の約 100 倍に上昇した。これにより胎盤への簡便な遺伝子導入か可能となるものと考えられる。現在、PI-I および PL-II のプロモーターを用いてトランスジェニックマウスを作成するとともに、RGD-Ad を用いた *in vivo* での発現制御について検討中である。

## A 研究目的

これまでの科学の進歩に伴い、医薬品や様々な化学物質が生み出されてきたか、人類はこれらの恩恵を受けることで、生活レベルが向上してきたことは紛れもない事実である。しかしながら、その一方で、これらの化学物質の好ましくない影響か、悲劇的な結果を生みだしていることも事実である。特に、化学物質に対して最も感受性の高い胎児への影響は、これらの作用か不可逆的である場合か多いことから、その影響は深刻であった。その代表的な医薬品として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ゲンであるdiethylstilbestrol (DES) か挙げられる。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使用されてきたか、1970年代になって初めてDES投与妊婦から生まれ、思春期を迎えた女児から膣の明細胞腺癌か数例報告された。これ以降、DESを使用した妊婦から生まれた女児は、成人すると様々な生殖上の障害を示すことか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、今日のヒトにおける内分泌攪乱研究の重要な知見となっている。

DESの問題とは別に、近年、野生生物の生殖異常か数多く観察され、それらの一因として環境中の化学物質関与の可能性か指摘されてきた。これらの生殖・発生異常の問題は、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か懸念されている。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か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の問題か

ヒトにおいても懸念されるのは、エストロゲンやアントロゲン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。

このように「内分泌攪乱物質問題」か提唱されたのは比較的最近のことであるか、それ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。しかし、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ものの存在か示唆され始めたことから、これまでの毒性とは別の第四の毒性を考えられねはならなくなったことから、この問題か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か用いられている。発生毒性については、化学物質か成体のみに作用する他の毒性試験とは異なり胎児複合体に作用し、多様な作用部位か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か困難である。その原因の一つとして、胎盤の種差かあげられる。

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二の視床下部-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かある。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) かヒト胎盤中には存在するか、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。特に DFS は、その発生毒性に種差が報告されていることから、このような化合物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かあると考えられる。

このような背景のもと、すでに我々は内分泌攪乱物質としての疑いのある有機スス化合物、TBT および TPT か、ヒト絨毛細胞株のアロマターセ活性と hCG 産生を促進することを明らかにしている。また昨年度の研究により、ヒトと齧歯類の胎盤由来細胞を用いて DLS や有機スス化合物をはじめとする化学物質か、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を行ってきた。

本年度は、これら *in vitro* における結果が *in vivo* にどのように反映されるかについて検討するために、1) 有機スス化合物などの内分泌攪乱物質の *in vivo* における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の検討をおこなった。2) また *in vivo* での作用は化学物質の移行により生じた結果であるのかを検討するために、有機スス化合物の妊娠動物における胎盤移行性について検討を行った。一方で、発生毒性においては母体—胎盤—胎児か一つのユニットになっており、これらへの影響が複合的に働くことにより毒性が生じるため、単に実験動物に被験物質を投与するだけでは胎盤機能の修飾に起因する胎児への影響を検討することは困難である。そこで、3) 被験物質により変動が認められた胎盤中の遺伝子を、胎盤特異的に発現させて胎児への影響を検討するための前段階として、胎盤特異的に遺伝子を発現させるシステムの構築を試みた。

## B 研究方法

### B-1 細胞培養

Rcho-1 細胞 (国立環境研 石村隆太先生から供与) は、非働化 20% ウシ胎児血清 (FCS)、1mM sodium pyruvate を含有した NCTC-135 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で通常培養した。実験時には、5% steroid-free ウシ胎児血清 (活性炭処理により吸着物質を除いた血清) を用いて培養を行った。HEK293 細胞は、10% FCS を含有する DMEM 培地で、それぞれ培養を行った。

### B-2 *in vivo* 実験

有機スス化合物による *in vivo* における胎盤での遺伝子発現変動の検討、および体内動態の検討には ICR 系妊娠マウス (胎齢 11 日) を用いて検討を行った。遺伝子発現の検討においては、TBT を腹腔内投与 3 日後に各臓器を回収した。また体内動態の検討については、[<sup>14</sup>C]-TPT (Amersham Biosciences) を腹腔内に投与後、1 時間から 6 日目まで経時的に各臓器、および糞尿を回収し、その放射活性を測定することで評価した。

### B-3 定量的 PCR

臓器または細胞から Total RNA を抽出し、混合 oligo dT primer と super script II (Invitrogen) を用いて、single strand cDNA を合成した。この cDNA 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、定量的 PCR を行った。また内部標準として  $\beta$ -actin を同様に定量し、補正を行った。

#### B-4 胎盤特異的遺伝子発現プラスミドの構築と遺伝子発現の確認

胎盤特異的にレポーター遺伝子を発現するプラスミドは、PGV-B2（東洋インキ）をヘンノクヘクターとして作製した。マウスゲノムを鋳型として PCR 法にて増幅した PL I および PL II プロモーター領域の DNA 断片の挿入は、PL I については Bgl II /Nco I 制限酵素処理サイトに、PL II については Xho I /Hind III 制限酵素処理サイトを用いることにより挿入した。PI I および PI II のプロモーター活性の測定においては、各細胞に遺伝子導入後 4-8 時間後に細胞を溶解、回収し、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) を用いて、ルンフェラーゼ活性を測定した。またポンティフコントロールとしては、SV40 プロモーターを有する PGV-P2（東洋インキ）を用いて実験を行った。

#### B-5 アデノウイルスヘクター (Ad) の作製

ファイバーミュータントアデノウイルスヘクタープラスミドの作製は、Miyaguchi らの報告にある “*in vitro* ligation 法” にて行った (Fig 1)。すなわちアデノウイルスファイバーの HI ループをコートする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素配列である Csp45I と ClaI 部位を有したヘクタープラスミド (pAdHM15) を両酵素で切断し、この部位に RGD 配列を有した合成オリゴ DNA を “*in vitro* ligation 法” で挿入し、pAdHM15-RGD を作製した (Fig 2)。CMV プロモーターを有するシヤトルプラスミド pHMCMV6 にレポーター遺伝子であるホタルルンフェラーゼ (Lu) 遺伝子を挿入したプラスミドを作製した。本プラスミドの I-Ceu I /PI-Scel I フ

ラグメントをヘクタープラスミドである pAdHM4 および pAdHM15-RGD の I-Ceu I /PI-Scel I 部位に挿入し pAdHM4-Lu、pAdHM15-RGD-Lu を作製した。このプラスミドを Pac I で処理した後、これらを HEK293 細胞にトランスフェクションし、常法により Ad を作成した。RGD 配列をファイバーに持ったルンフェラーゼ発現 Ad を RGD-mAd-Lu、pAdHM4 を用いることにより得られた野生型のファイバーを持った Ad を WT-mAd-Lu とする。

#### B-6 *in vivo* におけるアデノウイルスヘクター (Ad) 発現効率の評価

ICR 系の妊娠マウス (妊娠 8、13、15 日目) に、WT-Ad-Lu および RGD-mAd-Lu ( $10^8$  pfu/mouse) を尾静脈に投与し、4-8 時間後に各臓器を回収し、ホモナイイスを行った。回収した各サンプルに対して、Luciferase Assay System (Promega) を用いてルンフェラーゼ活性を測定した。

### C 研究成果

#### C-1 妊娠マウスの胎盤に対する有機スルホ化合物の影響

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、ヒトの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) とエストロゲンである。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。妊娠初期のプロゲステロンは妊娠黄体から産生される場であるが、徐々に絨毛組織から分泌され始め、最終月経より 50 日日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ゲン供給臓器であり、妊娠経過と共に母体血中のエストロゲ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コナトトロピン（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。一方で、齧歯類の胎盤においても胎盤は胎児の発育に重要な臓器であるか、その構造および機能はヒトと大きく異なる。例えば、ヒトの胎盤は syncytiotrophoblast と cytotrophoblast の2種類の細胞群で構成されているか、齧歯類では、 trophoblast giant cell、spongiotrophoblast、Labyrinth の3層で構成されている。また齧歯類の胎盤では、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ゲンまでの合成酵素は発現しているか、アンドロゲンをエストロゲンに変換するアロマターゼは発現していない。おそらく齧歯類では、胎盤で合成されたアンドロゲンが母体の卵巣に供給されることでエストロゲンが産生され、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PIによって刺激される。遺伝学的には齧歯類の胎盤においては、hCGに相当する遺伝子が発見されていないか、PIは発達しておりその遺伝子はプロラクチン（PRL）様である。一方、ヒトを初めとする霊長類では、CG遺伝

子が黄体形成ホルモン遺伝子とは別に獲得されており、またPI遺伝子も存在しているか、PIの構造は成長ホルモン様であり、齧歯類のそれとは異なっている。したかつて、ヒトの胎盤には存在するか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内分泌攪乱物質の毒性評価は、齧歯類を用いた動物実験では不可能であり、また逆にヒトの胎盤には存在しないか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。すなわち、実験動物を用いた胎盤毒性評価においては、以上のような点を考慮した上で評価を行う必要があると考えられる。

このような背景のもと、我々は昨年度の研究において、化学物質十数種がヒトおよびラット絨毛細胞株のホルモン産生系に与える影響を、mRNAおよび蛋白レベルで検討を行った。その結果、DFSやEEなどのエストロゲンや有機スス化合物が、アロマターゼをはじめとするステロイドホルモン合成系の酵素の発現を変動させることが明らかとなった。化学物質に対する反応の種差の検討においても、ヒトと齧歯類双方の胎盤細胞に存在するP450<sub>scc</sub>は、齧歯類では有機スス化合物より発現が上昇するか、ヒトでは減少する傾向が認められた。これらの結果は、化学物質に胎盤に対する作用がヒトと齧歯類で異なることを示唆するものである。しかしながら、これまでの結果は、あくまで培養細胞を用いた検討であり、*in vivo*における影響については明かではない。そこで本項では、胎盤への影響が確認された有機スス化合物の妊娠マウスの胎盤に対する影響について検討を行うと共に、その体内動態についても検討を行った。

## C-1 1 妊娠マウスの胎盤に対する TBT の影響

有機スス化合物は、主に船底塗料や漁網などの防汚剤として用いられており、現在も海洋での汚染が報告されている化学物質である。ヒトへの暴露は、主に汚染された魚介類の直接的な摂取、またはこれらの魚介類を飼料とする家畜から得られた食品などによる間接的な経路での摂取により起こると考えられる。最も代表的な有機スス化合物による内分泌攪乱作用は、一部の腹足類の雌に雄性生殖器を発生させるインホセノクスと呼ばれる現象である。しかしながら、有機スス化合物はエストロゲンレセプター (ER) およびアンドロゲンレセプター (AR) とは親和性がなく、また現在のところインホセノクスの発症メカニズムとしては、アロマトキシシス阻害作用が推測されている。しかしながら、その詳細は作用機構は、ヒトはおろか哺乳類での内分泌攪乱作用についても不明な点が多々残されているのが現状である。一方で、我々は TBT および TPT が、ヒト絨毛細胞株の hCG 産生およびアロマトキシシス活性を上昇させることを報告している。この結果は、少なくとも有機スス化合物の哺乳類における作用は、腹足類で想定されているような作用ではなく、もっと複雑な作用機構によるものであることを示唆している。また昨年度の検討により、有機スス化合物は齧歯類の胎盤機能にも影響を与える可能性が明らかとなった。そこでまず、有機スス化合物の Rcho-1 細胞に対する影響をより詳細に行った。その結果、TBT は 17 $\beta$ -HSD II に対する影響は示さなかったが、P450<sub>scc</sub>、CYP17、3 $\beta$ -HSD I、17 $\beta$ -HSD VII の発現を濃度依存的に上昇させた (Fig 3)。次に、この結果が、*in vivo* に反映されるかについて、

妊娠マウスに TBT を投与して検討を行った。妊娠 11 日目に TBT を腹腔内投与し、3 日後の胎盤を回収して各 mRNA の発現量を検討したところ、P450<sub>scc</sub>、CYP17、17 $\beta$ -HSD II、17 $\beta$ -HSD VII の発現に変化は認められなかった (data not shown)。しかし、3 $\beta$ -HSD I については、投与量依存的な上昇傾向が認められた (Fig 4)。

一方で、これまでに我々は大阪大学大学院某学術研究科・西川淳一先生との共同研究で、一部のトリアルキルスス化合物、核内レセプタースーパーファミリーの一つである retinoid X receptor (RXR) と結合し、アゴニストとして作用することをすでに確認している。そこで次に先述の TBT の作用が RXR を介した作用であるのかについて検討を行った。RXR の内因性リガンドである 9-*cis* retinoic acid (9cRA) を Rcho-1 細胞に作用させて同様の検討を行ったところ、3 $\beta$ -HSD I のみ顕著な mRNA の上昇が確認された (Fig 4)。また RXR に対するコンセンサス配列をプロモーター領域に有する cellular retinoid binding protein (CRBP) II についても、mRNA の上昇が確認された (Fig 3)。妊娠マウスにおいても TBT を投与することにより CRBP II の発現が上昇傾向を示しており (Fig 4)、*in vivo* においては 9cRA で認められた先述の 2 つの分子のみの発現が上昇していたことから、TBT の *in vivo* における作用は RXR を介したものであることが示唆された。

## C-1 2 妊娠マウスにおける [<sup>14</sup>C]-TPT の体内動態

有機スス化合物が *in vivo* においても胎盤のホルモン産生系に影響を与えることが示唆されたか、実際に有機スス化合物の *in vivo*



における胎盤への移行量およびその滞留時間についての報告は皆無である。そこで次に、有機スス化合物の妊娠マウスでの体内動態を検討するために、 $[^{14}\text{C}]$ -TPT を用いて検討を行った。妊娠 1 1 日目のマウスに $[^{14}\text{C}]$ -TPT を腹腔内投与し、経目的に採糞、採尿を行うと共に、臓器を回収した。その結果、 $[^{14}\text{C}]$ -TPT は投与後 1 時間後に速やかに胎盤にも分布し、6 時間後に蓄積のピークを迎えた後に減少することか明かとなった (Fig 5A)。この結果を反映して、 $[^{14}\text{C}]$ -TPT は投与後 2 4 時間で投与量の約 50%が糞尿中に排泄され、体内半減期はわずか 2 4 時間あまりであると考えられた (Fig 5B)。さらに投与後 6 日目にはほぼ 100%糞尿中に排泄されることか明かとなった (Fig 5B)。一方で胎児においても、投与後 1 時間後には胎盤を通過して移行することか確認された (Fig 6A)。しかしながら、母体においては、投与後 6 時間後に蓄積のピークを迎えてから投与後 6 日目においては $[^{14}\text{C}]$ -TPT はほぼ消失しているにも関わらず、胎児では投与後 6 時間後からその残存量にほとんど変化かないことか明かとなった (Fig 5A)。このことは、有機スス化合物か一度胎児側に移行すると、母体からの排泄速度とは裏腹に胎児からは非常に排泄されにくいことを示した興味深い知見であると言える。

## C-2 胎盤特異的な遺伝子発現ヘクターの構築

有機スス化合物などの化学物質か胎盤に移行し、胎盤の様々な遺伝子発現を修飾することか確認されたか、発生毒性においては母体—胎盤—胎児か一つのユニットになっており、これらへの影響か複合的に働くことにより毒性か生じるため、単に実験動物に被験物質を

投与するだけでは胎盤機能の修飾に起因する胎児への影響を検討することは困難である。また前述のとおり胎盤は種差の大きな臓器であり、ヒトには存在するか齧歯類には存在しない機能も存在する。現に、これまでに我々は有機スス化合物か、ヒトの胎盤にしか存在しない機能である hCG 産生とアロマターセ活性を上昇させることを明らかにしていることは既に述べた。これらの結果から、これら化学物質による胎盤中の遺伝子発現変動か、胎児に与える影響について検討を行うためには、目的の遺伝子を胎盤特異的に発現させて胎児への影響を検討するシステムの構築か必要不可欠であると考えられる。

一方で、齧歯類胎盤の giant cell に特異的に発現する PI-I および PI-II は、先述の通り PRL 様の黄体刺激因子であり、PL-I の血中濃度は妊娠 9 ~ 1 1 日にピークを示し、PL-II は PL-I の濃度か低下し始める頃から産生され始め、妊娠後期にその産生量かピークに達する。PL-I および PL-II か、胎盤特異的に発現するために必要なプロモーター領域の解析はすでに報告されており、PI-I か転写開始点から上流-274bp、PL-II か-1340~-2019bp か必要不可欠である。また PI-II については、そのプロモーターを用いて胎盤特異的に遺伝子発現をするコンティンショナルトランスジェニックマウスか既に作製されている。そこで我々は、このプロモーターを用いて胎盤特異的な遺伝子発現ヘクターの構築を試みた。PL-I および II のそれぞれ転写開始点から上流-280bp と-2643bp の DNA 断片をマウスのゲノムからクローニングし、下流にルンフェラーセ発現遺伝子を連結してレポーター遺伝子を作成した。これらの遺伝子発現を Rcho-1 細胞とマウス繊維芽細胞株である 1929 細胞に発現させて比較検討したところ、プロモーター依存的に Rcho-1 細胞でのみ高い発現を

示すことか明かとなった (Fig 6)。現在、これらのプロモーターにアロマターセ遺伝子を連結させたコンストラクトを用いて、コンティンショナルトランスジェニックマウスの作製を行っているところである。

### C-3 胎盤指向性アデノウイルスヘクター (Ad) の作製

前項において、被験物質により変動か認められた胎盤中の遺伝子を、胎盤特異的に発現させて胎児への影響を検討するための前段階として、胎盤特異的に遺伝子を発現させるシステムの構築を試みた。これらのヘクターに目的とする遺伝子を連結させたコンストラクトを用いて、コンティンショナルトランスジェニックマウスを作製することで、各分子か胎盤で過剰発現した際の発生毒性評価か可能となると思われる。このように遺伝子改変動物は胎盤での発生毒性評価に有効な手段であると考えられるか、作成に時間かかかる上、複数か遺伝子の複合的な影響を簡便に検討することは困難であるという欠点を有している。

一方、Ad は、現存するウイルスヘクターの中で遺伝子導入効率、発現効率について際立って優れており、また、非分裂細胞を含めた多種類の細胞にも遺伝子導入可能であるといった多くの利点を有している。また *in vivo* においても一時的ではあるものの、簡便に比較的効率よく遺伝子導入か可能である。特に、上述のような胎盤機能修飾による胎児への影響を検討するには、トランスジェニックマウスを用いる検討よりも短時間で、かつ簡便に評価することか可能であることから、非常に有効な手段であると考えられる。しかしながら Ad は、ヘクター感染域に特異性かなく投与部位から全身に移行した場合、広範な細胞組織に非特異的に感染したり、遺伝子導

入効率か極端に低い細胞、組織か存在する、といったいくつかの欠点かあることも否めない。特に本研究のように発生毒性評価を最終目標に胎盤への遺伝子導入を行う場合は、可能な限り母体胎児への負担を軽減するため静脈内投与による感染か有効であると考えられるか、Ad は静脈内投与した場合はほぼ 100% か肝臓または脾臓といった細網内皮系に移行し、その他の臓器にはほとんど遺伝子導入かできないという致命的欠点を有している。そのため、Ad 遺伝子発現効率の高さを十分に生かした上で、これらの問題点を改善する改良型ヘクターの構築か進められている。

Ad の細胞内への侵入は、ウイルス外殻タンパク質であるファイバーか細胞表面上に存在する膜貫通型タンパク質 Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) に高いアフィニティーで結合する第一段階、続いて、ウイルスペントヘースの RGD (-Arg-Gly-Asp-) モチーフか細胞表面上の接着分子であるインテグリン、中でも  $\alpha_v$  鎖を含む  $\alpha_v\beta_3$  または  $\alpha_v\beta_5$  に結合する二つの段階を経て成立する。アデノウイルスの感染時に、CAR 及び  $\alpha_v\beta_3$  または  $\alpha_v\beta_5$  インテグリンへの結合か細胞内へ侵入するかに必要であることからすると、Ad の感染域を変化させるアプローチの一つとして、感染の最初のステップである細胞表面への接着を担う、ウイルスファイバー領域の改良か有用であることか推察される。アデノウイルスのファイバー遺伝子は、ウイルス後期遺伝子 L5 領域に位置しており、その構造は、テール、シャフト、ノフに分けられ、ファイバーの C 末端のノフか受容体である CAR と結合か、これまでにファイバーの中でもノフ HT ループかウイルス表面に突出した構造をとっていることから、外未ペプチドの表現

部位として HI ループが最適である可能性が報告されていた。このような背景から、我々はこの部位へ RGD 配列を導入することで、遺伝子導入・発現効率の向上、さらには感染域を変化させたファイバーミュータント Ad (mAd) の構築を行ってきた。実際に、野生型 Ad (WT-Ad) による遺伝子導入効率の低い様々な細胞に RGD-mAd は、効率よく遺伝子導入できることを確認している。そこで本研究では、Ad の *in vivo* における胎盤での遺伝子導入効率を向上させることを目的に、RGD-mAd の胎盤指向性について検討を行った。

妊娠 8、13、15 日目の各 ICR マウスに、WT-Ad-Lu と RGD-mAd-Lu を尾静脈より投与し、48 時間後の肝臓、脾臓、胎盤、胎児における遺伝子発現量をレポーター遺伝子であるルンフェラーゼの活性を指標に評価した (Fig 7)。その結果、WT-Ad は、どの妊娠期間に投与しても肝臓での発現が顕著に高く、肝臓と脾臓での遺伝子発現が全体の発現量の 95% 以上であった。また胎盤での発現は肝臓と比較してわずか 0.1% 程度であり、さらに過去の報告通り胎児での遺伝子発現は全く認められなかった。一方で、RGD-mAd を用いて検討を行ったところ、肝臓での発現は高いものの、胎盤での発現は WT-Ad の約 100 倍上昇した。また RGD-mAd を投与したマウスの胎盤では、いずれの妊娠期間に投与しても WT-Ad の第 2 の移行臓器である脾臓よりも高い遺伝子発現を示した (Fig 7)。以上の結果は、RGD-Ad が胎盤への遺伝子導入に有効であることを示しており、今後、化学物質の胎盤毒性を模倣できる強力なツールになると考えられる。

## D 考察

### D-1 有機スス化合物の *in vivo* における

胎盤機能への影響について

今回の検討では、有機スス化合物を中心に、妊娠マウスにおける胎盤への影響とその体内動態について検討を行った。その結果、TBT は *in vitro* において Rcho-1 細胞の様々なステロイドホルモン合成代謝系に影響を与えるか、*in vivo* においては  $\beta$ -HSD I にの上昇しか認められなかった。一方で、これまでに我々は大阪大学大学院薬学研究所 西川 淳一先生との共同研究で、一部のトリアルキルススか、RXR と結合し、アコニストとして作用することをすでに確認している。RXR の内因性リカントである 9cRA は、Rcho-1 細胞の  $\beta$ -HSD I の mRNA 発現を上昇させたか、TBT で確認されたその他のステロイドホルモン合成酵素の mRNA 発現には影響を与えなかった。また TBT、9cRA ともに RXR を介して発現が上昇することか明かとなっている CRBP II についても、mRNA の上昇が確認された。妊娠マウスにおいても TBT を投与することにより CRBP II の発現が上昇傾向を示しており、*in vivo* においては 9cRA で認められた先述の 2 つの分子のみの発現が上昇していたことから、TBT の *in vivo* における作用は RXR を介したものであることか示唆された。

TBT の *in vitro* と *in vivo* の作用の違いの原因としては、一つ目として作用濃度か考えられる。*in vitro* における検討では、TBT は  $\beta$ -HSD I と CRBP II の発現を最も強く誘導していることから、これら 2 つの遺伝子ほど大きな変動が認められなかった P450<sub>sec</sub>、CYP17、17 $\beta$ -HSD VII については、*in vivo* においてもあまり変動しない可能性か考えられた。物質は異なるか、<sup>14</sup>C-TPT の体内動態の検討においても投与後速やかに胎盤に移行はするものの、予想外にその排泄速度が速いことから、

有機スス化合物は胎盤への蓄積性がほとんどない可能性が考えられる。以上のような原因から、*in vitro* で認められたほど強力な作用は認められなかった可能性が考えられた。

もう一つの原因としては、胎盤以外の組織に作用した結果生じる影響である。我々は、トリアルキルススか RXR 以外にも peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  のアゴニストとして働くことも明らかにしているか、双方に対するそのアフィニティーは、現在報告されている内因性のリガントや合成リガントに匹敵するほどである。すなわち、トリアルキルススはこれらの核内レセプターのリガントと同ような特性の高い強い作用を示すと考えられる。一方で [ $^{14}\text{C}$ ]-TPT は、胎盤・胎児以上に母体の脂肪組織や子宮、卵巣、副腎などの生殖組織やステロイドホルモン産生臓器に高濃度で分布しているため、胎盤以外の内分泌組織にも影響を与えていると考えられる。実際に、RXR や PPAR $\gamma$  によってその発現を制御されている内分泌機能の例が報告されている。例えばヒトにおいてアロマターセは、脂肪組織、卵巣、副腎、子宮内膜、胎盤の他に、脳や骨、皮膚、乳腺、肝臓などといったあらゆる組織に発現しており、これらは非翻訳領域である多重 Exon I/プロモーターにより組織特異的に制御されているか、RXR や PPAR $\gamma$  を介して様々な反応を示すことが知られている。胎盤型のアロマターセは、RXR や PPAR $\gamma$  を介してその発現が上昇することか報告されているか、卵巣型のアロマターセは逆に減少する。現に有機スス化合物によっても卵巣癌細胞株のアロマターセの発現が減少することか報告されていることから、有機スス化合物は RXR や PPAR $\gamma$  を介してアロマターセを抑制していると考えられる。このように

有機スス化合物は、母体全体のステロイドホルモン産生に影響を与えている可能性が考えられることから、これらの変動が複合的に作用しあう結果、Rcho-1 細胞では認められた変化のうち消された可能性も考えられた。このように発生毒性は、母体-胎盤-胎児に対して複合的に作用することによって生じる可能性があるため、化学物質を妊娠動物に投与することによって胎盤機能修飾による胎児への影響を詳細に検討することは困難であると考えられる。

## D-2 胎盤特異的遺伝子発現系の構築について

先述のとおり、化学物質を妊娠動物に投与することによって胎盤機能修飾による胎児への影響を詳細に検討することは困難であると予想されることから、胎盤機能修飾による影響を詳細に検討するために、化学物質によって変動した遺伝子を胎盤特異的に発現させるシステムの構築を試みた。PL-I と PL-II については前述のとおり、既に胎盤特異的な発現に重要なプロモーター領域について詳細に検討されており、また PL-II のプロモーターについては、これを用いたコンティンショナルトランスジェニックマウスが作製されていることから、*in vivo* においても十分に胎盤特異的な発現を再現できると考えられる。そこで我々も、マウスのゲノムから PCR により目的とするプロモーター領域を増幅し、そのクローニングを行った。この DNA 断片の下流にレポーター遺伝子を連結して Rcho-1 細胞と、L929 細胞における遺伝子発現について検討を行ったところ、過去の報告通り Rcho-1 細胞でのみ発現を示すことが明らかとなった。現在、本プロモーターを用いたコンティンショナルトランスジェニックマウスの作製を行っている。

しかしながら遺伝子改変動物は、胎盤での発生毒性評価に有効な手段であると考えられるか、作成に時間がかかる上、一度に複数の遺伝子の複合的な影響を簡便に検討することは困難であるという欠点を有している。先述のとおり Ad は、簡便で効率よく *in vivo* への遺伝子導入が可能なベクターではあるものの、*in vivo* における遺伝子導入においては肝臓への偏ったトロピスムが問題となっている。WT-Ad は *in vitro* では (AR 依存的に高い感染能を有し、また *in vivo* における主要な感染組織である肝臓においても CAR が高発現量していることから、*in vivo* におけるトロピスムも CAR 依存的であると考えられていた。しかしながら、最近ファイバーおよびペントヘース部分を改変し、CAR および  $\alpha v$  インテグリンと結合できない Ad においても、Ad のトロピスムに変化がなかったことから、肝臓への感染を抑制することは不可能であると考えられる。したがって、組織特異的な Ad による遺伝子発現を行うには、できるだけ多くの Ad を目的の組織に移行させて、コンティンショナルに発現させることが問題となってくる。一方で、トロホブラストの子宮への侵襲は、細胞外マトリックス (ECM) への接着と酵素による ECM の分解が必要である。トロホブラストは胎盤形成過程において様々なインテグリンファミリーを発現しており、その種別は各々の形成過程によって異なる。しかしながら、 $\beta 1$  鎖や  $\beta 3$  鎖などの RGD 配列を認識するものは、受精卵の 2 細胞期以前より発現していることから、これらのインテグリンファミリーを標的分子として Ad の胎盤への指向性を向上させることは有効であると考えられた。現に、今回の検討で RGD-mAd を用いて胎盤への遺伝子導入を試みた結果、RGD-mAd は、WT-

Ad と比較して、胎盤での遺伝子発現量が約 100 倍に増大した。詳細なメカニズムは不明であるか、おそらく胎盤の特定のインテグリンファミリーに対しての高いトロピスムを示した結果、遺伝子導入効率が増大したものと考えられる。今後は、RGD-mAd と PI-I および II のプロモーターを用いて、*in vivo* における遺伝子発現について検討する予定である。

## E 結論

- (1) TBT は妊娠マウスの胎盤において、 $3\beta$ -HSD I と CRBP II の発現を上げさせた。またこれらの作用は、RXR を介したものであることが示唆された。
- (2) [ $^{14}$ C]-TPT は、妊娠マウスにおいて投与後 1 時間で速やかに胎盤と胎児へ移行した。また胎盤においては 6 時間後に蓄積量がピークに達した後、速やかに減少した。一方で胎児では、6 日後においてもほとんど蓄積量の減少が認められなかった。さらに [ $^{14}$ C]-TPT の体内半減期はわずか 2-4 時間程度で、6 日目にはほぼ 100% 排泄されることが確認された。
- (3) PI-I および PI-II のプロモーター領域をクローニングし、この配列を有する胎盤特異的な遺伝子発現を行うためのプラスミドベクターの構築を行った。
- (4) Ad を用いて胎盤での遺伝子発現効率を上昇させるために、RGD-mAd を作製し、胎盤への指向性を向上させることができた。

## 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

特になし

### G-2 学会発表

- 1) 有機スス化合物のヒト胎盤機能修飾に関する妊娠マウスにおけるDichylstilbestrol (DES) の組織移行性 貯留性および、内分泌機能修飾に関する検討, 横山英明, 中西 剛, 石崎順一, 金子 真, 石村隆太, 伊藤徳夫, 田中慶一, 第6回日本内分泌攪乱化学物質学会(仙台), 平成15年12月
- 2) ヒト胎盤における有機スス化合物の内分泌攪乱作用およびその作用機構の解明, 中西 剛, 廣森洋平, 横山英明, 小柳美穂子, 伊佐俊一, 伊藤徳夫, 西川淳一, 田中慶一, 第6回日本内分泌攪乱化学物質学会(仙台), 平成15年12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

特になし

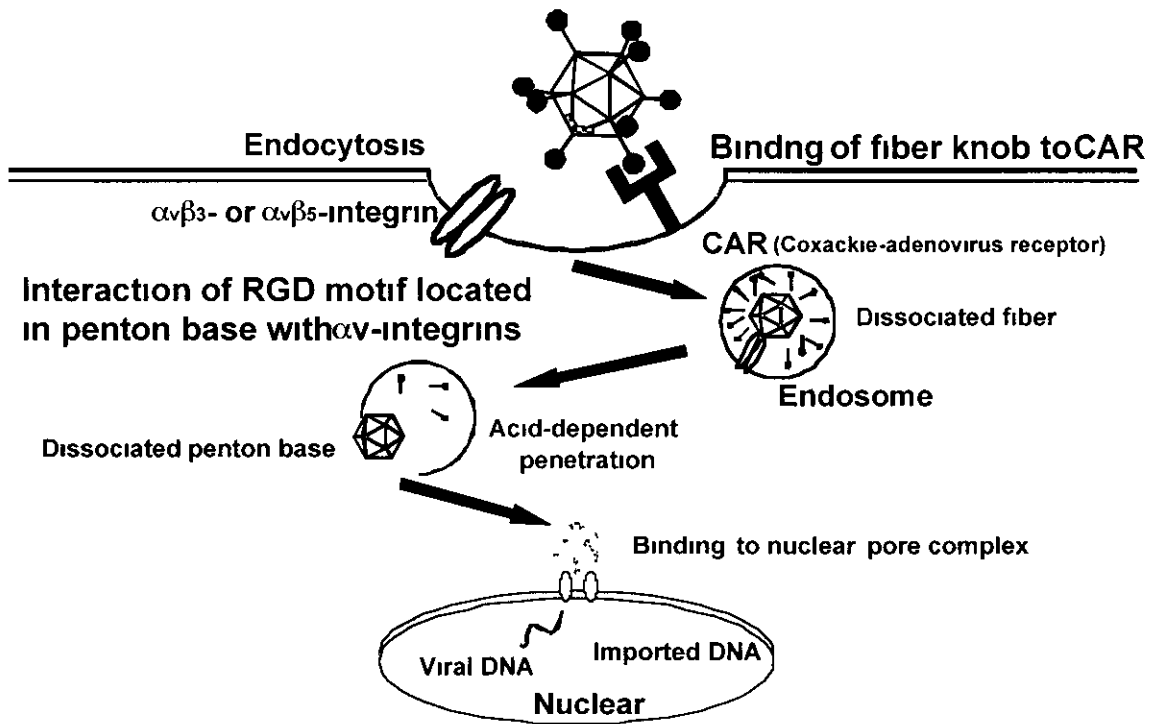
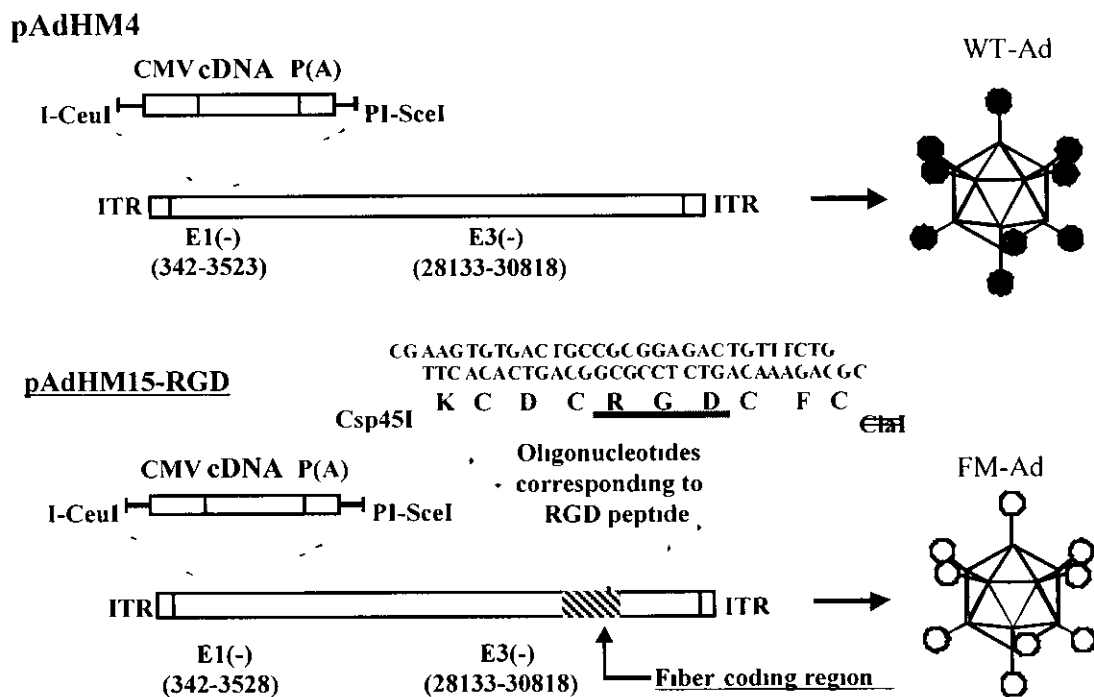


Fig.1 Infection mechanism of adenovirus





**Fig.2 Diagram construction of fiber-mutant adenoviral vector**

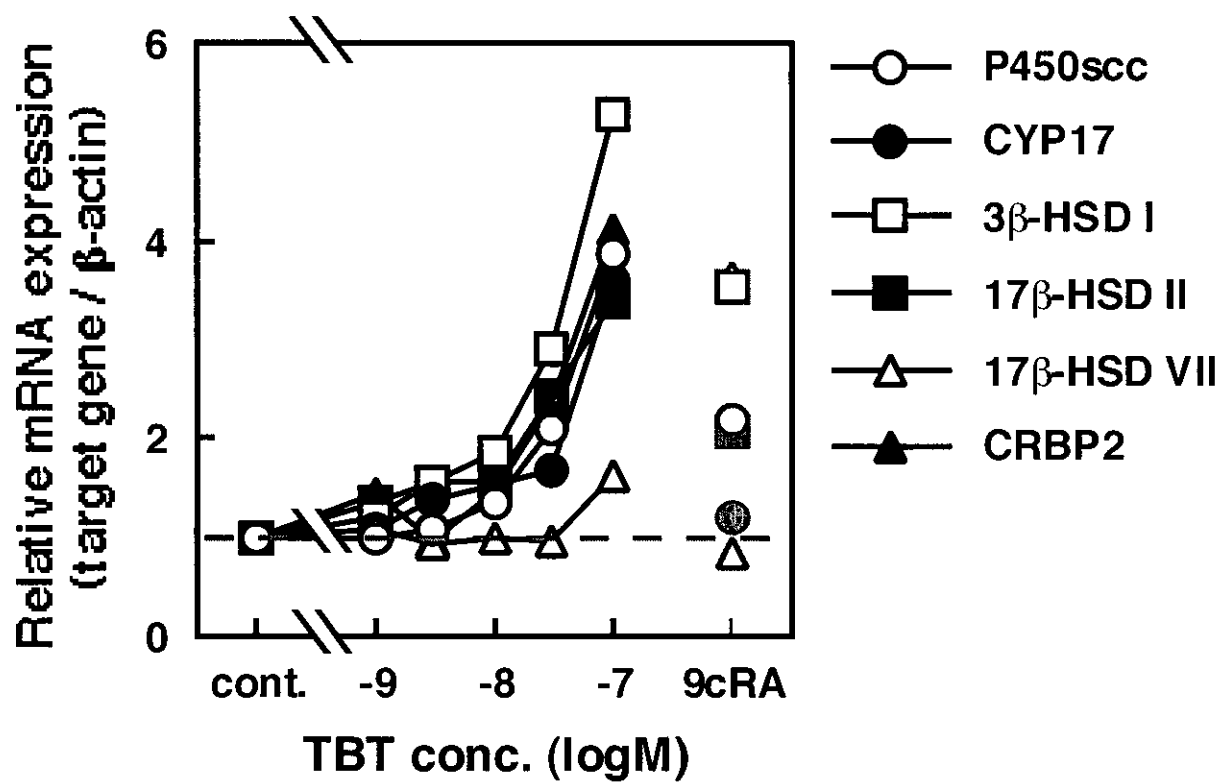


Fig.3 Effect of TBT on steroidogenesis in Rcho-1 cell

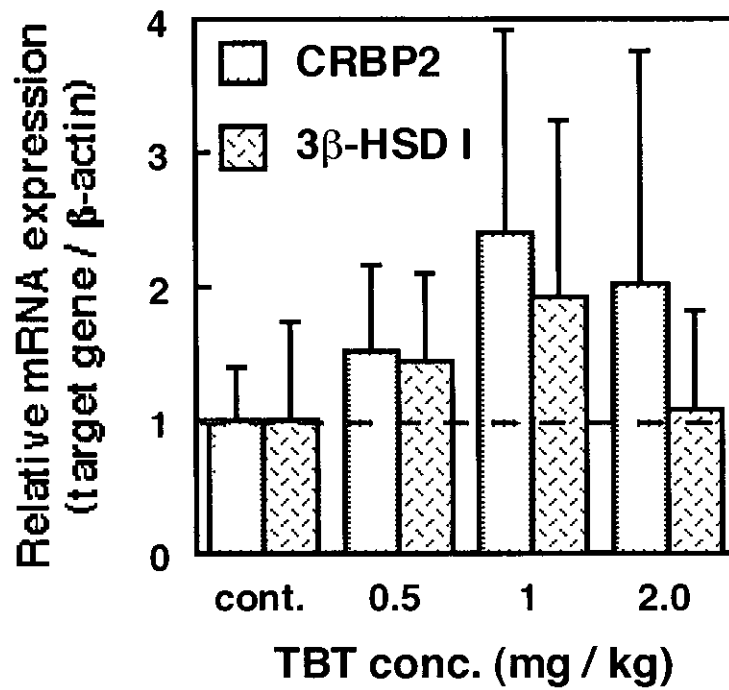


Fig.4 Effect of TBT on steroidogenesis in the placenta of ICR pregnant mouse

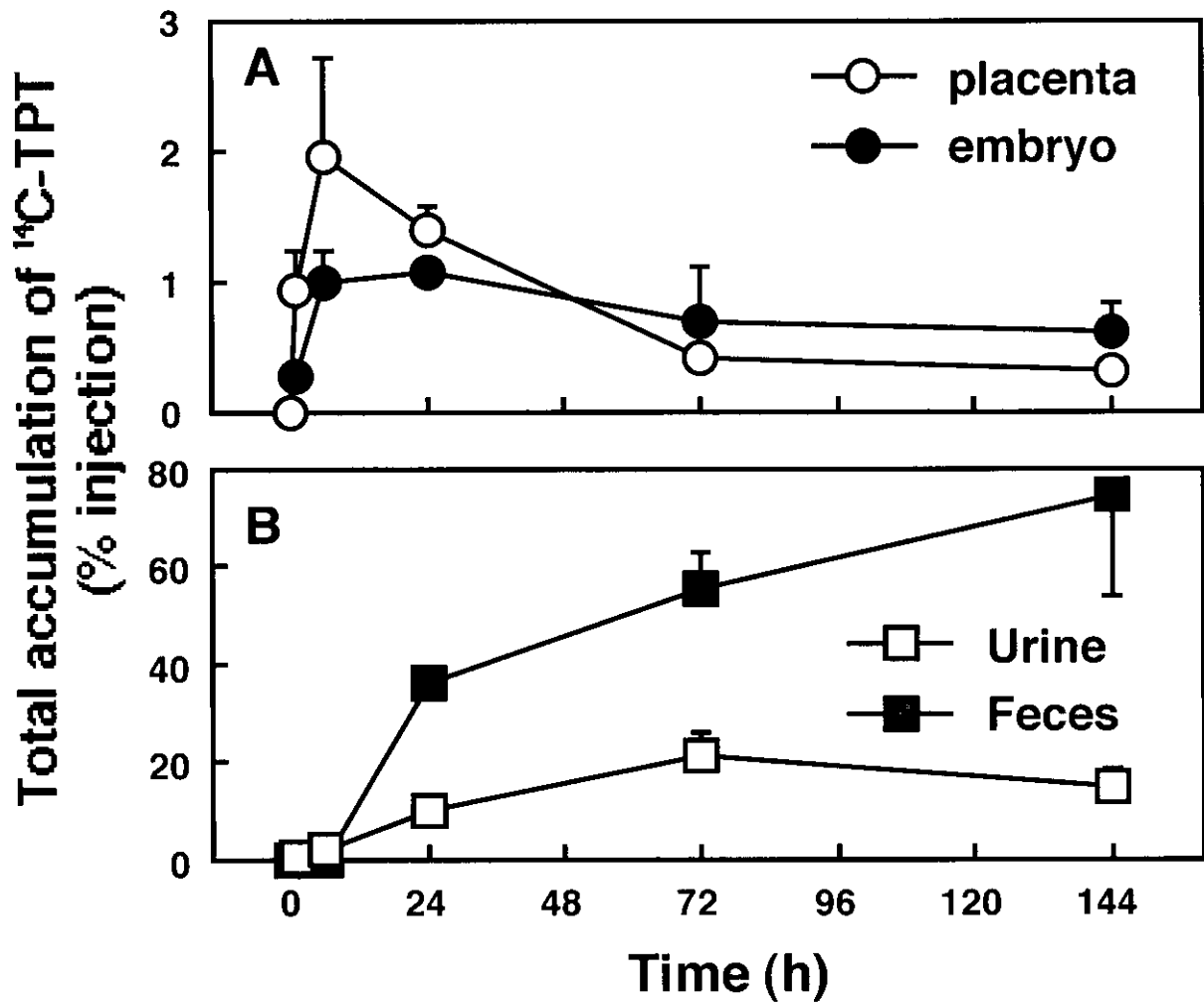


Fig.5 Time course for total amount of <sup>14</sup>C-TPT in placenta, embryo, feces and urines of ICR pregnant mice after i.p injection.