

**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**

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 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 大迫 誠一郎

平成 17 (2005) 年 3 月

研究課題名 : 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

研究費の名称 : 厚生労働科学研究費補助金

研究事業名 : 萌芽的先端医療技術推進研究事業

国庫補助金精算所要額 : 14,000,000 円

研究期間 : 平成 14 (2002) 年度～平成 16 (2004) 年度

主任研究者名 : 大迫 誠一郎

目次

I. 総合研究報告書

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

大迫 誠一郎

A. 研究目的	-----	6
B. 研究方法	-----	9
C. 研究結果と考察	-----	15
D. 結論	-----	24
図	-----	25
E. 参考文献	-----	46
F. 健康危機情報	-----	48
G. 研究発表	-----	48
H. 知的所有権の取得状況	-----	49

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）

総合報告書

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 大迫 誠一郎 独立行政法人国立環境研究所 主任研究員

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、種々の化合物がその分化に与える影響を指標にして新たな標的分子を同定するスクリーニングシステムを構築することを目的とした。

まず、Rcho-1 細胞の分化特異的マーカー遺伝子の選別を行い、P450 側鎖切断 (P450sc) 酵素のプロモーターを用いたレポーター遺伝子アッセイを確立した。この系で Rcho-1 は 17 β -estradiol (E2) に対して不応性であり、なおかつ両エストロゲン受容体 2 種の ER (ER α , ER β) 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。この P450sc-Luc レポーター遺伝子アッセイを利用して、27 種の化合物について作用を検討したところ、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、レチノイン酸 (RA)、Carbaryl は分化促進作用を有していた。

さらに、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin による遺伝子発現プロファイルを比較検討した。各化合物を Rcho-1 細胞の分化開始時から 6 日間曝露し、DNA チップに供し、クラスタリング解析を行った結果、ICI と Carbaryl が最も類似した遺伝子の発現パターンを示し、DES さらには RA の作用とは最も相違していることが明らかになった。DES は ER β

に結合することが知られている。したがって、Carbaryl および Permethrin は、RA や ERR β 以外の標的分子に結合して作用し、細胞の分化に影響を与えている可能性が高いことが示唆された。

さらに、核内の標的分子を同定する目的で、RA、DES、ICI、Carbaryl、化合物によって特異的な細胞内分布を呈するタンパク質の同定を 2 次元電気泳動法と LC-ESI-MS/MS 解析で行った。RA、DES、ICI、Carbaryl とともに核内でコンテンツの変動するスポットが数種発見できたが、特異的に発現または消失するものは見いだせなかった。分化促進に関連すると考えられる核内因子の分離を行うため、最も分化促進効果のあった Carbaryl の処理サンプルからコンテンツの上昇したタンパクの同定を行ったところ、Nuclear RNA helicase ファミリーなどが検出された。

ここまでの様々な実験系により、Rcho-1 細胞が ER 以外の標的分子を介して各種の化合物に反応することを見出した。特に P450_{scc} プロモーターを用いたレポーター遺伝子アッセイで迅速に化合物のスクリーニングを行うことが可能であると思われる。また、DNA チップにより、いくつかの試験化合物でその遺伝子発現プロファイルを明らかにし、また、プロテオーム解析により変動する核内因子の同定が可能であることを確かめた。目的とする新規核内受容体は同定できなかったが、確立したスクリーニングシステムは、今後、新規化合物の標的分子解析に有効であろうと考えられた。

A. 研究目的

医薬品候補化合物の中にはエストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) 等のいわゆる核内受容体との相互作用により薬効が発揮されるものが相当数ある。特にエストロゲン (17β -estradiol: 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。また厚生労働行政に関与する課題としての内分泌攪乱作用を有する物質 (内分泌攪乱化学物質) を見ても、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 様の化合物の薬効または有害性を見分けるために、エストロゲン受容体 (ERs) を介したりポータージーンアッセイシステム等を用いて、簡便にその生理作用が評価されている (Safe et al., 2002)。

しかし、これらの化合物の中には ERs を介して作用を発揮するだけではないものが多く含まれていることが近年の研究から明らかとなってきた。Diethylstilbestrol (DES)

は、従来 ERs 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 orphan receptor beta (ERR β) に結合し、胎盤の幹細胞である Trophoblast stem cell (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、実際は流産を増加させ、胎児への悪影響を誘起することが判明し使用中止となった経緯をもつ。この流産増加の原因がオーファン受容体を活性化したためと考えられている。このことから ERs 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、新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 (Coward et al., 2001)。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、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も、既知の受容体を対象とするだけでなく、オーファン受容体を含めた反応系を考慮に入れた解析が必要と思われる

る。

本研究では、ラット胎盤由来の Rcho-1 細胞を用いて、このような新規核内受容体の同定を介した作用メカニズムの解明を目指す。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 (Trophoblastic giant cell) に分化を培養密度により誘導することができる。また、ラットの胎盤で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)。その発現様式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、Rcho-1 細胞は *in vivo* の性質を反映している細胞株として知られている。一方、上記の 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 細胞であるが、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。また、胎盤細胞は数多くの生理活性物質を産生する組織として認知されている。TS 細胞を用いて ERR の存在が発見されたことを念頭に入れると、このような胎盤由来細胞は ERR の parent すなわち未知の生理活性物質を産生していることが十分に想像できる。さらには、他のオーファン受容体を発現し、その他の生理活性物質を使用して分化を制御しているものと考えられる。Rcho-1 細胞は TS 細胞より取り扱いが容易であり、このような新規生理活性物質や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、先ず ER が発現していない胎盤の培養細胞 (Rcho-1) を用いて、様々な化合物をその作用様式により細分類化できるスクリーニングシステムの構築を行う。第一年次において、ルシフェラーゼ (Luc) を利用し細胞の分化を簡易に検出できる組換え Rcho-1 細胞の構築を行い、一度に多くの化合物を対照とし、分化に影響を与える化合物の選定を行う。第二年次では、選定された化合物において DNA マイクロアレ

イ法を用いて特異的に誘導される遺伝子を明らかにする。遺伝子の発現変化のパターンをもとに、どの化合物が類似したメカニズムを介して作用しているのかを明らかにする。第三年次では、化合物に結合した核内受容体の多くは細胞内分布を変化させるという性質に着目して研究を行う。Rcho-1細胞の核タンパクを二次元電気泳動法により分離し、化合物によって特異的な細胞内分布を呈するタンパク質の同定を行う。当初の計画では、第三年次には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予定であったが研究方法の変更を行った。

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 μ M 2-mercaptoethanol、1 mM sodium pyruvate、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin) で、37°C、5% CO₂の湿気条件下で培養した。細胞は2日に1度継代し、100 mm のディッシュ (Nunc Brand Products, Roskilde, Denmark) で、10 ml のメディアム、10⁴/100 mm の細胞密度条件で維持した。分化を誘導する際には、10⁶/100 mm (Nunc ディッシュ) または1×から3.5× 10⁴/10 mm (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(図1)。E2, 17 β -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 μ 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。またレポータージー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 μ g に 400 units 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 20 µl とし、42°C、50 min 逆転写反応をおこなった。0.5 µl の cDNA 産物に、1.25 unit の Ex Taq™ ポリメラーゼ (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)、1× 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、5 min、次に Denaturation: 94°C、30 min、Annealing: 30 sec、Extension: 72°C、1 min を所定のサイクル行い、Final extension step: 72°C、7 min で行なった。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 2× 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でミニアレイ解析を行なった。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 500 ng 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 µg の RNA を用いて [α^{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× SSPE/0.1% SDS で 42°C、30 min 洗浄し、その後再び 1× SSPE/0.1% SDS で 60 min 洗浄した。メンブレンを X 線フィルムで 24 時間感光させ検出を行なった。

プラスミドベクターの構築

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 600 bp 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 560 bp フラグメントを、pGL3-Basic Vector (Promega Corporation,

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 850 bp 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 850 bp 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。

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 Corporation, 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。未分化 Rcho-1 細胞を、1 ウェルあたり 1×10^4 から 3.5×10^4 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 μg の pGL3-P450scc と 0.5 μg の pRL-SV40 (Promega Corporation, Madison, WI) を血清非存在下で 1 時間トランスフェクトした。プラスミドの導入には、Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Valencia, CA) を用いた。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 1 時間インキュベートし、その後、340 nm の波長で、核の蛍光観察をおこなった。

蛍光標識 cDNA の作製

本実験では比較したい検体 RNA を鋳型とし、逆転写反応により Cy3 または Cy5 を取り込ませ、蛍光標識 cDNA を合成した。蛍光標識 cDNA の作製には CyScript™ First Strand cDNA Labelling Kit (Amersham Biosciences 社製) を使用した。mRNA (0.5–2 μg) に oligo (dT) primer、random nonamers、dUTP or dCTP nucleotide mix、CyDye™ –dUTP or –dCTP、および CyScript reverse transcriptase を加え、42°C、90 分間インキュベートし、蛍光標識させた。その後、鋳型である mRNA を 2.5 M NaOH を加えて分解させた。CyDye labeled cDNA を CyScribe GFX Purification Kit) を用いて精製した。

ハイブリダイゼーション

DNA チップは、Rat 5K cDNA Microarray (日本レーザ電子(株)製) を用いた。スライドガラス (DNA チップ) を 5×

SSC0.1%SDS、10 mg/ml BSA で42°C0.5-1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。蛍光標識 cDNA 溶液 (15 μ l) に、5 \times SSC、0.1%SDS、50% Formamide を加え、DNA チップとハイブリダイゼーションを行った。その後、DNA チップを42°Cの1 \times SSC、0.2% SDS 溶液および0.1 \times SSC 溶液で洗浄を行った。DNA チップを GTMAS Scan II (日本レーザ電子機社製) でスキャンを行い、Array-Pro ANALYZER Ver4.0 (Media Cybernetics 社製) もしくは GCOS (アフィメトリクス社製) で解析を行った。

核抽出液の調整

各細胞の核内タンパク分画は NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE, Woburn, MA)を用いて精製した。下記の操作は、すべて氷上でおこなった。まず、回収した細胞を500 \times gで3分間遠心し、上清を取り除いた後500 μ l の Cytoplasmic Extraction Reagent I を添加した。さらに27.5 μ l の Cytoplasmic Extraction Reagent II を添加・混和し、16,000 \times gで遠心した。直ちに上清を取り除き、250 μ l の

Nuclear Extraction Reagent を添加、40分間放置した。サンプルを16,000 \times gで遠心し、その上清を2次元電気泳動の試料とした。

2次元電気泳動

各化合物 (DMSO、RA、ICI、Carbaryl) を曝露した Rcho-1 細胞の核内タンパク質80 μ g を9.9 M 尿素 (和光純薬工業、大阪、日本)、4% Triton X-100、2.2% ampholytes (pH3-11) (Genomic Solutions, Inc., Ann Arbor, MI) および100 mM DTT を含む溶液に溶解し、全てのサンプルは同時に泳動展開をおこなった。まず、9.5 M 尿素、2% Triton X-100、4.1% アクリルアミドおよび5 mM ampholytes を含む溶液に10% APS を加えて重合反応させた1次元ゲル(長さ:260 mm、直径:1.2 mm) に各サンプルを35 μ l ずつ装填した。2D/E システム (Genomic Solutions Inc.) を使い、室温、1000V で17時間、さらに2000V で30分間泳動をおこなった。1次元終了後、ゲルを取り出し3 ml の平衡化バッファー (0.3 M Tris-HCl (pH 6.8)、3.0% SDS、50 mM DTT、0.01%プロモフェノールブルー) 中に2分間静置した。各1D サンプ

ルを 11%の SDS/ポリアクリルアミドゲル (220×220×1 mm) に装填し、20°C、500V で 3 時間半泳動を行った。2 次元電気泳動 終了後、ゲルは 40%メタノールおよび 10% 酢酸を含む溶液にて固定し、タンパク質の スポットは銀染色キット (和光純薬工業、 大阪) を用いて検出した。

ESI-MS/MS 解析

2 次元電気泳動によりコンテンツの変動 したスポットタンパクの同定を行うため、 Electropray ionization (ESI) 法による MS/MS 解析を行った。上記 2 次元電気泳動で処理 したサンプルと同一のものを、同様に 2 次 元電気泳動で展開し、グルタルアルデヒド 非処理による銀染色を施した。得られた 標的スポットをくり抜き、トリブシン処理 した。このサンプルを LC-nanoESI-MS/MS 解析に供し、検索エンジン Mascot (Matrix Science 社製) による MS/MS イオンサーチ でデータベース検索を行いタンパクの同定 を行った。

C. 研究結果と考察

Rcho-1 細胞の分化誘導と分化マーカーの選定

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 2A 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 2B)。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 2C)。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

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 細胞における ERs の発現と E2 感受性

Rcho-1 細胞に ERs (ER α , ER β) が発現しているかどうかは不明である。そこで ERs の mRNA が発現を 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 α mRNA の発現、および ER β 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 (図 3)。このことから、Rcho-1 細胞は両 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 μ 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 4 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 (Nestler, 1993; Siiteri and Thompson *et al.*, 1975)、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。

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 5 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不可欠である。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。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600 bp 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

クトしたが、PL-I のプロモーター活性が有意に高くなく、分化した細胞でも測定に十分な蛍光を得ることができなかった。(データ不掲載)。使用した EGFP は比較的半減期の長い蛍光タンパクであるため、用いた PL-I プロモーター領域では十分に誘導をかけられないことによるものと思われる。そこで図 2 にも示すように、PL-I のプロモーター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。約 850 bp 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-SV40 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データを示した。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

の分化状態を計測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-P450scc を用いたリポーター遺伝子アッセイを行い、図 1 に示した種々の化合物が持つ Rcho-1 細胞の分化に与える影響について検討した。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、上記で確立した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。予備実験における PL-I mRNA 発現に及ぼす影響が無かったことから予想通り、E2 は対照群の DMSO 処理群とほぼ同じレベルであった。一方、RA は DMSO に比べ約 2 倍にルシフェラーゼ値が上昇していた。これは、RA が Rcho-1 細胞においても TS 細胞同様、分化を著しく誘導することを示している。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 5 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ったが、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必要性があらうと考えられる。

核蛍光観察

Rcho-1 細胞は図 2 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。上記、レポーター遺伝子アッセイで影響のあった RA, ICI, DES, Tam による Rcho-1 細胞の形態変化を Hoechst33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて曝露後 d6 にて核蛍光観察により行った。図 9C および 9D 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。一方、図 9E および 9F に示すように、ICI 曝露群では、凹型を示す変形核を有する細胞種が多く観察された。このような影響は DES や Tam でも観察された。ICI はピュアエストロゲンアンタゴ

ニストであり、ERsを持たない Rcho-1 細胞では無反応性であることが予想されたが、レポーターアッセイにおいても蛍光観察においても、DMSO とは異なる分化様式を呈する細胞となった。また、この形態は正常な巨細胞分化を再現していると考えられる RA のものとも異なり、ICI, DES, Tam のもつ特異な作用の表現型であると思われる。

DNA チップ解析

上記レポータージーンアッセイの結果に基づき、DMSO (対照群)、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin を用いて DNA チップ解析により遺伝子発現変動のプロファイリングを行った。Rcho-1 細胞の分化開始日に、各種化合物を曝露させ、分化 6 日目に細胞を回収し、トータル RNA 画分を精製した。DMSO (対照群) Cy5 で、化合物を曝露した検体を Cy3 で標識し、スタンフォード法 (対照群より発現量の増加している遺伝子は、緑色に、減少している遺伝子は赤色に、発現量の変化しない遺伝子は黄色に検出される) で解析を行った。アレイの画像解析結果を図 10 に示す。各化合物曝露により、

発現量が増加している遺伝子および減少している遺伝子が確認され、その代表的な遺伝子と、そのアレイスポットを図 11 に示した。Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric は、RA では緑色で発現量が増加していることを意味するが、その他の化合物では黄色で発現量に変化がなく、適切な内部標準と考えられる。リストしたこれらの遺伝子のうち、Rattus norvegicus DAD-1 gene, Rat mRNA for 140-kD NCAM polypeptide、Catalase、Rattus norvegicus purine specific Na⁺ nucleoside cotransporter mRNA、Rat mRNA for CRP2 (cysteine-rich protein 2)、Rattus norvegicus vascular endothelial growth factor mRNA、Rat low molecular weight fatty acid binding protein mRNA について、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin 以外に他の化合物 (TAM、BisA、NP、DBP、BBP) の曝露影響を含めて、半定量 RT-PCR 解析を行った。様々な反応のパターンが確認されたが、例えば Rattus norvegicus purine specific Na⁺ nucleoside cotransporter や CRP2 は、他の化合物が反応していないのに対し RA のみで反応していた (図 12)。RA はレチノイン酸