

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 中西 剛

平成17（2005）年3月

## 目 次

総括研究報告書	3
研究要旨	3
A. 研究目的	4
B. 研究方法	6
B-1 細胞・動物	6
B-2 プラスミドの構築	6
B-3 RGDmAd の作製	7
B-4 LUC assay	7
B-5 定量的 PCR	8
B-6 EGFP-Arom 発現ベクターの構築と Tg マウスの作成	8
B-7 ジェノタイピング	9
C. 研究成果	9
C-1. RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子導入法の確立とその毒性評価系への応用の検討	9
C-1. 1 RGDmAd 用胎盤特異的プロモーターの作成とプロモーター活性の評価	9
C-1. 2 胎盤特異的プロモーター制御下で遺伝子発現する RGDmAd の in vitro における遺伝子発現の検討	10
C-1. 3 胎盤特異的プロモーター制御下で遺伝子発現する RGDmAd の妊娠マウスにおける遺伝子発現と発生毒性評価系への応用の可能性	11
C-2 胎盤特異的アロマターゼ発現コンディショナル Tg マウスの作成	11
C-2. 1 EGFP-Arom 融合タンパク質発現ベクターの作成とそのアロマターゼ活性の検討	12
C-2. 2 胎盤特異的に EGFP-アロマターゼ融合蛋白質を発現する Tg マウスの作成とジェノタイピング	13
D. 考察	13
D-1 RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子導入法について	13
D-2 胎盤特異的に EGFP-Arom 融合タンパク質を発現する Tg マウスについて	14
E. 結論	14
F. 健康危険情報	15
G. 研究発表	15

G-1. 論文発表 .....	15
G-2. 学会発表 .....	15
H. 知的財産権の出願・登録 .....	16
研究成果の刊行物に関する一覧表 .....	23

## 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、医薬品などの化学物質の標的臓器として胎盤に注目し、化学物質によってどのような胎盤機能が変化した場合に、いかなる影響が胎児へ及ぶのかを *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が可能な評価系の構築を最終目標としている。しかしながら *in vitro* において認められた遺伝子発現等の変動が、*in vivo* にどのように反映されるかについては、その情報があまりにも乏しいのが現状である。そこで本年度は、胎盤における任意の遺伝子変動が発生過程に与える影響を *in vivo* において検討する目的で、1) ファイバーミュータントアデノウイルスベクター (mAd) を用いた胎盤特異的遺伝子発現系の構築と発生毒性評価への応用の可能性について検討を行った。また mAd による発現が十分なものであるかを比較検討するために2) 胎盤特異的コンディショナルトランスジェニックマウスを作成した。発現させる分子としては、アンドロゲンを変換する酵素であるアロマトラーゼを選択し、検討を行った。1) 齧歯類胎盤の giant cell に特異的に発現する placental lactogen (PL) 1 および 2 のプロモーター領域を上流に連結したホタルルシフェラーゼ (LUC) 発現遺伝子 (PL1-LUC, PL2-LUC) を作成し、これらをウイルスのファイバー部分に RGD 配列を持たせた RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクター (RGDmAd) に組み込んで検討を行った。ラット絨毛細胞株 Rcho-1 とマウス繊維芽細胞株 L929 を用いた *in vitro* での検討では、ポジティブコントロールプロモーターに用いた cytomegalovirus (CMV) プロモーターを連結した LUC 発現遺伝子 (CMV-LUC) を搭載した RGDmAd (RGDmAd-CMV-LUC) と比較するとプロモーター活性は弱いものの、PL1-LUC、PL2-LUC を搭載した RGDmAd (RGDmAd-PL1-LUC, RGDmAd-PL2-LUC) を感染させた場合においては、Rcho-1 細胞で選択的な LUC 活性が認められた。しかしながら妊娠マウスを用いた *in vivo* での検討では、RGDmAd-PL1-LUC、RGDmAd-PL2-LUC を投与したマウスともに胎盤での LUC 活性はほとんど確認できなかった。また定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて LUC の mRNA の発現量を各臓器において比較検討したところ、RGDmAd-PL1-LUC 投与マウスにおいては、プロモーターを連結していない Basic LUC レポーター遺伝子を搭載した RGDmAd (RGDmAd-B-LUC) を投与したマウスと全く同じ発現パターンおよび発現量であり、RGDmAd-PL2-LUC 投与マウスにおいては RGDmAd-B-LUC で認められた肝臓での mRNA 発現さえも認められなかった。

そこで、RGDmAd を用いた遺伝子導入自体の胎盤機能制御における有用性について検討するために、胎盤不形成による胎生致死マウスである peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 欠損マウスのヘテロマウス同士を交配させた妊娠マウスに CMV プロモーターにより PPAR $\gamma$  を発現する RGDmAd (RGDmAd-CMV-PPAR) を感染させてレスキュー実験を行ったが、PPAR $\gamma$  欠損マウスは生まれてこなかった。以上の結果から、RGDmAd を用いた発生毒性評価モデルマウスの作成は、不可能である可能性が強く示唆された。2) 胎盤特異的にアロマトラーゼを発現するコンディショナルトランスジェニックマウス (Tg マウス) を 2 系統作成した。プロモーターには PL1 および 2 を使い、発現遺伝子はヒトアロマトラーゼ遺伝子に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を連結したキメラアロマトラーゼ発現ベクター (EGFP-Arom) を使い、それぞれ TG738 (PL1 プロモーター) マウス、TG739 (PL2 プロモーター) マウスと命名した。両マウスともに founder マウスを出産し、ジェノタイピングの結果 TG738 マウスにおいては、雄 3 9 匹中 5 匹、雌 3 1 匹中 1 0 匹の陽性マウスがそれぞれ確認できた。一方で TG739 マウスにおいては、雄 5 0 匹中 1 1 匹、雌 5 6 匹中 8 匹の陽性マウスがそれぞれ確認できた。現在、これらのマウスにおける各組織での EGFP-Arom の発現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が、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が、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、これらの作用が不可逆である場合が多いことから、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) が挙げら得る。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膣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

てきており、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ゲ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。

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四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な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。事実、我々は内分泌攪乱物質としての疑いのある有機スズ化合物が、このようなヒト胎盤の内分泌機能に影響を与えることを見いだしている。したがって、胎盤の機能を変化させるような化学物質の発生毒性評価においては、胎盤の種差をも十分に考慮した評価を行う必要があると考えられる。

一方で、近年のめざましいゲノム研究の発展により、従来の個体レベルや細胞レベルの毒性

学のみならず、毒性発現には直接的又は間接的に遺伝子/蛋白発現レベル変動を伴うという仮定のもとに、毒性発現機構をよりマイクロなレベルで捕らえる、いわゆる「トキシコゲノミクス」と称される新たな毒性学の概念も確立されつつある。トキシコゲノミクスにおいては、現在のところ、化学物質の毒性変化に関連して動く遺伝子群を解析することによって毒性発現メカニズムを解明する場合 (forward) と、既知毒性物質との遺伝子群の比較情報から未知化学物質の毒性を予測する場合 (reverse) の2方向からのアプローチが考えられている。そのためには、臨床的に、または動物実験ででの毒性が明らかとなっている化学物質の毒性発現によって変動する遺伝子群の解析を *in vivo*、*in vitro* の双方で行い、各組織における毒性データベースを構築する必要があるが、胎盤毒性の評価においては、妊婦での臨床試験は倫理上絶対に行えない上に、実験動物においては先述の種差の問題があるために *in vivo* におけるデータを得ることが非常に難しい。特に内分泌系の攪乱に起因する毒性評価については、通常の成人に用いるような医薬品などの毒性とは異なり、野生動物などにおいて認められているような次世代への影響が、ヒトにおいても当てはまるのかが焦点となっている。すなわち、主に生殖・発生毒性を対象としていることから、*in vivo* 発生毒性評価に纏わる上記問題を避けては通れない。このような問題を解決するためには、化学物質によって発現が変動するヒト胎盤中の遺伝子群の発現変動が、胎児の発育にいかなる影響を与えるのかを実験動物で検討できる評価系の構築が必要不可欠となってくる。

このような背景のもと、本研究では化学物質によってどのようなヒトの胎盤機能が変化した場合に、胎児に如何なる影響が及ぶのかを *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

が可能な評価系の構築を最終目標としている。一昨年度は、ヒト絨毛細胞株を用いて、化学物質によって変動するヒト胎盤の内分泌機能に関わる遺伝子群を検索し、有機スズ化合物を初めとする一部の内分泌攪乱物質がその遺伝子群を変動させることを明らかにした。また昨年度は、これらの遺伝子群をマウスの胎盤で発現させ、胎児への影響を検討するために、mAd を用いた遺伝子発現系の構築を行った。アデノウイルスベクターのファイバー部分に RGD 配列を持たせた RGDmAd において、野生型のアデノウイルスベクター (wAd) と比較して胎盤への遺伝子導入効率が約 100 倍に増加することを確認している。また RGDmAd による毒性評価系の有用性を確認するために、目的遺伝子を胎盤特異的に発現するコンディショナル Tg マウスの作成も平行して行った。この際に発現させる分子としては、アンドロゲンを変換する酵素でエストロゲン産生にもっとも重要な分子の一つであり、有機スズ化合物によって発現上昇が認められたアロマトラーゼを選択した。今年度は、1) RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子発現系の構築と発生毒性評価への応用の可能性について検討を行った。また 2) 胎盤特異的コンディショナル Tg マウスのジェノタイピングと各ラインのフェノタイプの解析を試みた。

## B. 研究方法

### B-1 細胞

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 ピルビン酸ナトリウムを含有した 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% charcoal-stripped 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 プラスミドの構築

RGDmAd 作製のシャトルプラスミド pHM5 (国立医薬品食品衛生研究所・水口裕之先生から供与) のマルチクローニングサイトを EcoR1 と Pst1 サイトで切断し、下記の合成オリゴヌクレオチドを挿入し、新たなマルチクローニングサイトを付加した (pHM5+ ; Scheme. 1.)。また胎盤特異的な遺伝子発現を確認するためのレポータープラスミドは、PGV-B2 (東洋インキ) をベシクベクターとして作製した。PL1 および PL2 プロモーターのクローニングは、マウスゲノムを鋳型として PCR 法にて増幅した。PL1 (転写開始点を +1 として、-274~+94) および PL2 (-2501~+12) プロモーター領域を増幅し、T ベクターにサブクローニングした (pGEM-PL1、pGEM-PL2)。

PL1 については、PGV-B2 への挿入は、Bgl2/Nco1 サイトを用いて行った (pGV-PL1-LUC)。シャトルプラスミドの作成は、pGV-PL1-LUC から Bgl2/Sal1 サイトを用いて、PL1 プロモーター領域と LUC 発現領域、polyA 領域を切り出し、pHM5+ に挿入した (pHM-PL1-LUC)。

PL2 については EcoR1/Sal1 サイトで、pCIneo (Promega) にさらにサブクローニング (pCI-PL2) した後に、Xho1/Hind3 サイトを用いることにより、PGV-B2 に挿入した (pGV-PL2-LUC)。また PL2 プロモーター領域の EcoR1 サイト (5' 側) から Bgl2 サイト (3' 側) までの領域を欠失させたレポーター遺伝子を作成するために、pGV-PL2-LUC から Bgl2/Nco1 制限酵素処理により目的のプロモーター領域を切り出し、PGV-B2 に挿入した (pGV-PL2d-LUC)。PL2 プロモーター領域内の Swa1 サイト (PL2d の 5' 末端より 353bp 下流) をを消失させるために、pGV-PL2d-LUC を PL2 プロモーター内に存在する Swa1 サイトと

pGV-B2 マルチクローニングサイトに存在する SmaI サイトで切断し、セルフライゲーションを行った。得られたプラスミドベクターを、pGV-PL2Sd-LUC (SmaI deleted pGV-PL2d-LUC) と命名した。pGV-PL2Sd-LUC の PL2 プロモーター内に存在する PacI サイトを消失させたプラスミドベクターは、PacI サイトに点変異を導入することで作成した。PacI 認識サイトを含み部分的に相補的なプライマー PL2PacI mutatuin<sup>+</sup>、PL2PacI mutatuin<sup>-</sup> と PacI サイトの上流に PL2 mid fow を設計し、下流側は pGV-B2 シーケンス用 S2 primer を使用した。PL2 mid fow と PL2PacI mutatuin<sup>-</sup>、PL2PacI mutatuin<sup>+</sup> と S2 primer の組み合わせで各々 PCR を行った。この PCR 産物を混合し PL2PacI mutatuin<sup>+</sup> と PL2PacI mutatuin<sup>-</sup> の相補的な配列で結合したハイブリッドを形成させ、それを鋳型に PL2 mid fow、S2 primer で PCR を行い変異が導入された PCR 産物を得た。

PL2mid fow : 5'- TATTTTCCAAAGCAACTAGTA -3'  
(21mer)

PL2PacI mutatuin + : 5'-  
TCATCTTTaAATTAATGCCAAAAAT -3' (26mer)

PL2PacI mutatuin - : 5'-  
GGCATTTAATTtAAAGATGAATTTCT -3' (26mer)

得られた PCR 産物を EcoRV/NcoI で処理し、これを EcoRV/NcoI で処理することで PL2Sd プロモーターを除いた pGV-PL2Sd-LUC に挿入した (PacI mutated pGV-PL2Sd-LUC; pGV-PL2PmSd-LUC)。PL2PmSd-LUC のシャトルベクターへの挿入は、pGV-PL2PmSd-LUC を BamHI で切断後、T4 DNA polymerase (Invitrogen) により平滑末端化し、さらにこれを NheI で処理して消化し、pHM5+ の NheI/SmaI サイトに挿入した (pHM-PL2PmSd-LUC)。

### B-3 RGDmAd の作製

RGDmAd のベクタープラスミドの作製は、Mizuguchi らの報告どおり“ *in vitro* ligation 法 ”にて行った (Scheme. 2.)。すなわちアデノウイルスファイバーの HI ループ をコード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 部位を有したベクタープラスミド (pHM1 ; 国立医薬品食品衛生研究所・水口裕之先生から供与) 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、pHM15-RGD を作製した。各シャトルプラスミドを I-CeuI/PI-SceI で切り出し、そのフラグメントをベクタープラスミドである pHM15RGD の I-CeuI/PI-SceI 部位に挿入した。このプラスミドを PacI 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。

### B-4 LUC assay

*in vitro* における検討は、以下の操作により実験を行った。24 穴平底プレートに Rcho-1 細胞、L929 細胞をそれぞれ  $3.0 \times 10^4$  cells/well となるように通常培地で播種した。各レポーター遺伝子のプロモーター活性の検討においては、24 時間培養後にカチオニックリポソメクション法を用いて遺伝子導入を行った。各レポータープラスミド 0.1  $\mu$ g、トランスフェクト効率補正用内部標準ベクターである ウミシイタケ由来 LUC 発現ベクター pRL-TK (Promega) 2ng を用いた。各 RGDmAd の LUC 発現の検討においては、各ウイルス懸濁液を各力価となるように加えた。トランスフェクション 48 時間後に培地を吸引、洗浄した後、細胞を回収し、各レポーター遺伝子のプロモーター活性の検討においては、Dual-Luciferase Reporter Assay System



(Promega) を用いてルミノメーターによりLUC活性を測定した。内部標準として、pRL-TKのウミシイタケ由来LUC活性を測定し、これを用いて遺伝子導入効率の補正を行った。各RGDmAdのLUC発現の検討においては、Luciferase Assay System (Promega) を用いてLUC活性を測定し、各サンプルのタンパク量によって補正を行った。

*in vivo*におけるRGDmAdによる遺伝子発現効率の評価は、ddY系の妊娠マウス（日本SLC）を用いて行った。妊娠マウスに、各RGDmAdを尾静脈に投与し、48時間後に各臓器を回収し、ホモジナイズを行った。回収した各サンプルに対して、Luciferase Assay System (Promega) を用いてLUC活性を測定し、タンパク量による補正を行った。

#### B-5 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 III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β-actinを同様に定量し、補正を行った。

#### B-6 EGFP-Arom 発現ベクターの構築と Tg マウスの作成

ヒトアロマトラーゼ遺伝子は、ヒト絨毛細胞株JEG-3細胞のcDNAを鋳型としてPCR法により増幅し、Tベクターにサブクローニングした。これをSalI/NotIサイトで切り出し、pSVSPORT1 (Invitrogen) に挿入し、ヒトアロマトラーゼ発現ベクター (pSVARom) を作成した。EGFP融合ヒトアロマトラーゼの作成は、pEGFP-N1 (Clontech) にフレームを合わせてクローニングするために

pSVARomを鋳型とし、SalIサイトを付加したprimerを用いて新規にヒトアロマトラーゼcDNAをPCRで作製した。得られたPCR産物をSalI処理し、pEGFP-N1のSalI/SmaIサイトに挿入した (pEGFP-N1-Arom)。しかしながらこのままでは、EGFP-ヒトアロマトラーゼ融合タンパク質発現部位とPoly A signal領域を同時に切り出すことができないため、同ベクター由来のSV40 Poly A signalをPCRで作製し、pEGFP-N1-AromをNotI処理後、平滑末端化したものに挿入を行った (pEGFP-Arom)。EGFP-Arom融合タンパク質のアロマトラーゼ活性をヒトアロマトラーゼ単独のものと比較するためにSV40プロモーターにEGFP-ヒトアロマトラーゼ配列を結合したベクターの作製を行った。pEGFP-AromをSalI/NotI処理をすることでEGFP-Arom配列とPoly A signal領域を切り出し、pSVSPORT1に挿入した (pSVEGFP-Arom)。またTgマウスの作成に用いるPL1プロモーターを有するEGFP-Arom発現ベクターは、pGEM-PL1をBglII/NheIサイトで切り出し、pCIneoにサブクローニング (pCI-PL1) した後に、BglII/SalIサイトで目的とするプロモーター領域を切り出して、pEGFP-Aromの残ったマルチクローニングサイトに存在するBglII/SalIサイトに挿入した。PL2プロモーターを有するEGFP-Arom発現ベクターについても同様に、pCI-PL2から目的とするプロモーター領域を切り出して、pEGFP-AromのBglII/SalIサイトに挿入した (pCIEGFP-Arom-PL1、pCIEGFP-Arom-PL2)。

アロマトラーゼ活性の測定は、<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O release assayにより行った。L929細胞を播種後、各遺伝子を導入し48時間培養した。無血清培地で2回洗浄後、50 nM [1β-<sup>3</sup>H] androst-4-ene-3,17-dione (NEN) 及び950 nM cold androst-4-ene-3,17-dioneを含む無血清培地に交換し4時間培養した。反応終了後、培養

上清 200  $\mu$ L を取り、クロロホルム 500  $\mu$ L を加え、攪拌後、9000 x g で遠心分離した。分離した水層をチューブに取り 5 % (w/v) 活性炭懸濁液 100  $\mu$ L を加えて攪拌し、室温で 10 分間静置した後、さらに 9000 x g で 5 分間遠心した。分離した水層 150  $\mu$ L をクリアゾル I (ナカライテスク) 3 mL と混和し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

Tg マウス作成は、大阪大学遺伝情報センターの岡部勝教授に依頼した。作成の際には、各プラスミドベクターを Bgl2/Not1 サイトで切断して目的とする領域を切り出し、精製後、BDF1 系マウスの受精卵にマイクロマニピュレーターを用いて細胞核内へ DNA 溶液を注入した。この受精卵を、偽妊娠 BDF1 マウスに移植した。得られたマウスについては、PL1 プロモーターを有するものを TG738、PL2 プロモーターを有するものを TG739 と命名した。

#### B-7 ジェノタイプピング

マウスの尾を切断したもの、または妊娠マウスより摘出した胎児を Proteinase K と Proteinase K reaction buffer で 56°C、一晚処理を行った。95°C で 2 時間半処理した後、スピンドアウンにより未分解物を除き、得られた上清を鋳型として PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲルにより電気泳動を行い、バンドの有無により判定を行った。各マウスにおける PCR 条件は以下の通り。

#### <PPAR $\gamma$ 欠損マウス>

ゲノムに組み込まれているネオマイシン耐性遺伝子を検出するために、以下の primer を設計した。

primer:

FP 5' -TGGAGAGCGTATTCGGCTATGACT-3'

RP 5' -CGCATTGCATCAGCCATGAT-3'

PCR 条件は、95°C、10 分間加熱した後、95°C、30 秒、58°C、30 秒、72°C、20 秒を 1 Cycle として 35 Cycle を行った。

<TG738 と TG739>

ゲノムに組み込まれている EGFP を検出するために、以下の primer を設計した。

primer:

FP 5' -CTACAACAGCCACAACGTCTAT-3'

RP 5' -CGAACTCCAGCAGGACCATGTGAT-3'

PCR 条件は、95°C、10 分間加熱した後、95°C、30 秒、63°C、30 秒、72°C、30 秒を 1 Cycle として 35 Cycle を行った。

#### C. 研究成果

C-1. RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子導入法の確立とその毒性評価系への応用の検討

PL1 および PL2 は、齧歯類胎盤の giant cell に特異的発現するプロラクチン (PRL) 様の黄体刺激因子であり、PL1 の血中濃度は妊娠 9~11 日にピークを示し、PL2 は PL1 の濃度が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がピークに達する。PL1 および PL2 が、胎盤特異的に発現するために必要なプロモーター領域についての解析はすでに報告がなされており、PL1 が転写開始点から上流-274bp、PL2 が-1340~-2019bp の領域が必要不可欠である。また PL2 については、そのプロモーター領域を用いた胎盤特異的に遺伝子発現をするコンディショナルトランスジェニックマウスが既に作製されている。そこで我々は、この PL1 および 2 のプロモーター領域と RGDmAd とを組み合わせることで、胎盤特異的な外来遺伝子導入法の開発を行い、発生毒性評価系への応用を試みた。

C-1. 1 RGDmAd 用胎盤特異的プロモーター

の作成とプロモーター活性の評価

胎盤特異的プロモーターはLinzerらのグループにより報告されている、PL1 プロモーター (-274bp) と PL2 プロモーター (-2501bp) を用いて、LUC 発現遺伝子を連結したレポーター遺伝子 pGV-PL1-Luc および pGV-PL2-Luc を作成した。RGDmAd の作成は“ *in vitro* ligation 法” (Scheme. 2.) により行うが、この作成過程においては、シャトルプラスミドからベクタープラスミドへのライゲーションの際に、ライゲーションされていない親シャトルベクターを除き陽性コロニーのみを選択的に増幅させるための SmaI による制限酵素処理と、組み替えした RGDmAd ゲノム DNA を HEK293 細胞にトランスフェクトする際に、ベクタープラスミドを PacI で制限酵素処理を行い、目的とする DNA を切り出す必要がある。しかしながら、PL2 プロモーター内には、-2121/-2128bp 部位に SmaI サイトが、-431/-438bp 部位に PacI サイトが存在するため、これらの制限酵素を用いることができない。そこで、-2501bp から PacI サイトまで欠質したプロモーター PL2Sd と、さらにプロモーター内の SmaI サイトに点変異を導入する (-437bp の T を A に変更する、すなわち TTAATTAA を TAAATTAA の変更) ことにより制限酵素サイトを消失させた PL2Pm および PL2PmSd を作成し、これらのレポーター遺伝子を作成した。さらに Tg マウス作成のためのコンストラクト作成には、BglII サイト利用したライゲーションが必要となるため、-2474/-2479bp 部位に存在する BglII サイトまでを欠質させた PL2d についてもレポーター遺伝子を作成し、検討を行った。実験は、PL1 および 2 のプロモーター活性が認められるラット胎盤細胞株 Rcho-1 細胞と、プロモーター活性が認められないマウス線維芽細胞株 L929 細胞を用いて、各レポータープラスミドをリポフェクションに

よりトランスフェクトした際の各細胞の LUC 活性について検討を行った。

検討の結果、PL1 および 2 プロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドにおいては、L929 細胞ではほとんど LUC 活性が認められなかったのに対し、Rcho-1 細胞においては高い LUC 活性が認められた (Fig. 1.)。すなわち、今回クローニングを行った各プロモーターにより胎盤特異的発現制御がなされていると考えられる。そこで、PL1 および PL2PmSd 配列をそれぞれ用いて RGDmAd を作製した。

#### C-1. 2 胎盤特異的プロモーター制御下で遺伝子発現する RGDmAd の *in vitro* における遺伝子発現の検討

PL1-LUC、PL2PmSd-LUC を目的配列として組み込んだ RGDmAd を作製 (以下 RGDmAd-PL1-LUC、RGDmAd-PL2PmSd-LUC) し、各ウイルスベクターを  $10^5$  PFU/well、 $10^6$  PFU/well、 $10^7$  PFU/well の濃度でそれぞれ Rcho-1 細胞、L929 細胞に感染させ、LUC 活性を測定した。ポジティブコントロールとして CMV-LUC を組み込んだ RGDmAd (RGDmAd-CMV-LUC; 国立医薬品食品衛生研究所・水口裕之先生から供与) を、ネガティブコントロールとしてプロモーター配列を有しない LUC 発現ベクター (RGDmAd-B-LUC) についても同時に検討を行った。また、各細胞溶解液のタンパク量を測定し、補正を行った。

検討の結果、すべてのウイルスベクターにおいて力価依存的な LUC 活性が得られた。RGDmAd-PL1-LUC、RGDmAd-PL2PmSd-LUC とともにポジティブコントロールほどの発現ではないものの、Rcho-1 細胞特異的な LUC 発現が認められ、その活性は RGDmAd-CMV-LUC と RGDmAd-B-LUC においては Rcho-1 細胞と L929 細胞において LUC 活性はほとんど同程度であったのに対し、

RGDmAd-PL1-LUC、RGDmAd-PL2PmSd-LUCにおいてはL929細胞と比べてRcho-1細胞の方が100倍以上のLUC活性を示した(Fig. 2.)。特に胎盤特異的発現という観点においては、 $10^5$  PFU/wellのRGDmAd-B-LUCでさえもL929細胞で若干のLUC発現が認められたにもかかわらず、RGDmAd-PL2PmSd-LUCにおいてはL929細胞でのLUC発現が $10^7$  PFU/wellにおいても検出限界以下であったことから、PL2プロモーターは他の組織では発現しないような強いサイレンサー領域を有している可能性を示唆する結果となった。以上の結果から、RGDmAd-PL1-LUC、RGDmAd-PL2PmSd-LUCはどちらも胎盤特異的な発現が期待できることが示唆された。

### C-1. 3 胎盤特異的プロモーター制御下で遺伝子発現するRGDmAdの妊娠マウスにおける遺伝子発現と発生毒性評価系への応用の可能性

ddY系妊娠マウスに $10^8$  PFUの各RGDmAdを尾静脈投与して、*in vivo*における各臓器でのLUC活性について検討を行った。RGDmAd-PL1-LUCは妊娠9日目のマウスに、RGDmAd-PL2PmSd-LUCは妊娠12日目、14日目にそれぞれ投与を行い、投与48時間後に各臓器を摘出し、LUC活性を測定した。また、同時にRGDmAd-CMV-LUCとRGDmAd-B-LUCについても投与を行った。

妊娠9日目にRGDmAd-CMV-LUCを投与した妊娠マウスにおいては肝臓や脾臓、胎盤などでLUC活性が認められたが、RGDmAd-PL1-LUCとRGDmAd-B-LUCではいずれの臓器も検出限界以下だった。また妊娠12、14日目のマウスにおいても、RGDmAd-CMV-LUC投与群においては肝臓や脾臓、胎盤などでLUC活性が認められたが、RGDmAd-PL2PmSd-LUCとRGDmAd-B-LUCではいずれの臓器も検出限界以下だった(data not shown)。またmRNAレベルでの検討についてもリアルタイム

RT-PCR法を用いて検討を行ったが、RGDmAd-PL1-LUC、RGDmAd-PL2PmSd-LUCについては、検量線の検出限界以下の発現であった(data not shown)。

PL2プロモーターについては、Tgマウスによりその*in vivo*での十分なプロモーター活性が報告されているにも関わらず、上述のようにRGDmAdを用いた遺伝子導入では十分な活性が得ることが出来なかった。そこで次にRGDmAdによる胎盤への遺伝子導入が、胎盤機能を変化させるのに十分なものであるかを検討するために、CMVプロモーター制御下でPPAR $\gamma$ を発現するRGDmAd(RGDmAd-CMV-PPAR $\gamma$ ;大阪大学大学院薬学研究科・真弓忠範先生より供与)を用いて、PPAR $\gamma$ ホモ欠損マウスのレスキュー実験を行った。PPAR $\gamma$ ホモ欠損マウスは、胎盤のlabyrinth層の形成が未熟で、胎児からの新生血管が不十分なため母胎胎児間での物質交換が十分に行えず、胎齢約10日で死に至るとされているが、野生型マウスのテトラプロイド胚を用いたレスキュー実験によりPPAR $\gamma$ ホモ欠損マウスも生まれてくることが報告されていることから、胎盤にPPAR $\gamma$ を十分に発現させることが出来ればPPAR $\gamma$ ホモ欠損マウスも生まれて来るはずである。PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスの雄と雌を交配させた妊娠マウスに、妊娠8、9、10日目に $10^9$  PFUのRGDmAd-CMV-PPAR $\gamma$ を3日間連続投与し、生まれてきたマウスのジェノタイピングを行った。3匹の妊娠マウスについて検討を行ったが、いずれのマウスにおいてもPPAR $\gamma$ ホモ欠損マウスの存在は確認できなかった(Table. I.)。以上の結果は、RGDmAdによる胎盤への遺伝子導入法が、胎盤の機能を変化させるツールとしては不十分である可能性を示唆するものである。

### C-2 胎盤特異的アロマトラーゼ発現コンディ

## シヨナル Tg マウスの作成

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ため、化学物質等による内分泌攪乱作用を伴う発生毒性評価には、重要な標的臓器であると言える。その一方で胎盤は非常に種差の大きな組織であり、実験動物として汎用されている齧歯類のものとは異なる。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が、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が、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 PL 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が、PL は発達しておりその遺伝子は 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 PL 遺伝子も存在しているが、PL 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。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、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ズ化合物、TBT および TPT が、ヒト絨毛細胞株のアロマターゼ活性と hCG 産生を促進することを明らかにしている。これらの結果は、有機スズ化合物の化学物質がヒトに曝露した際には、実験動物には存在しない胎盤の内分泌機能に影響を与える可能性を示唆している。しかしながら、これら化学物質の *in vivo* におけるヒト胎盤への影響、およびその機能変化による胎児への影響は明らかではなく、また実験動物を用いた検討では評価できない。そこで我々は、このような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の変化による胎児への影響を評価する第一歩として、アロマターゼに着目した。アロマターゼは、ヒトにおいてはその欠損症が報告されており、母体は正常であるにも関わらず胎盤のアロマターゼが欠損することにより、生まれてきた女児の仮性半陰陽や母体の男性化症状などを誘発することから、アロマターゼの発現変動がヒトの発生段階に重要な分子であることが既に明白となっている。しかしながら、アロマターゼが過剰発現した際の胎児への影響については報告がないことから、化学物質等の刺激による胎盤のアロマターゼ発現上昇が胎児に及ぼす影響を与えるのかは、予想がつかないのが現状である。本研究では、胎盤特異的にアロマターゼを過剰発現する Tg マウスの作成を試みた。

### C-2.1 EGFP-Arom 融合タンパク質発現ベクターの作成とそのアロマターゼ活性の検討

胎盤は妊娠期のみ存在する臓器であるため、

目的遺伝子の胎盤での発現の有無の確認するためには、妊娠マウス自体を屠殺する必要がある。しかしながら、妊娠マウスを殺してしまえば、胎盤での遺伝子発現変動による次世代への影響を検討することが不可能になってしまう。したがって、胎盤特異的に目的遺伝子を発現する Tg マウスを作成した際には、将来的に目的遺伝子の発現を、マウスを解剖せずに *in vivo* イメージングによりリアルタイムで確認出来る方が好ましい。またヒトアロマトラーゼ遺伝子のみを挿入した場合には、ヒトアロマトラーゼ遺伝子がマウスのアロマトラーゼ遺伝子とホモロジーが高いために、組織特異的な遺伝子発現を検討する際の障害となる。そこで胎盤特異的に目的遺伝子を発現する Tg マウスを作成した際の上記問題を解決するために、ヒトアロマトラーゼ遺伝子に EGFP を連結したキメラアロマトラーゼ発現ベクターの作成を試みた。EGFP を融合することによる酵素活性への影響を検討するため、作成したベクターを L929 細胞に発現させてそのアロマトラーゼ活性を測定した (Fig. 3.)。その結果、野生型のアロマトラーゼを発現させた細胞とほぼ同様の酵素活性を有することが確認された。

#### C-2.2 胎盤特異的に EGFP-アロマトラーゼ融合蛋白質を発現する Tg マウスの作成とジェノタイプング

前項で作成した EGFP-Arom を発現する遺伝子と PLI および PLIId を連結したプラスミド (pCIEGFP-Arom-PL1、pCIEGFP-Arom-PL2) を作成し、目的の部位を切り出して、Tg マウスを作成した。いずれの遺伝子を導入したマウスにおいても founder マウスが生まれた。生まれたマウスのジェノタイプングを行ったところ、TG738 マウスにおいては、雄 39 匹中 5 匹、雌 31 匹中 10 匹の陽性マウスがそれぞれ確認できた。一方で TG739 マウスにおいては、雄 50 匹中 11 匹、雌 56 匹中 8 匹の陽性マウスがそれぞれ

確認できた。現在、各ラインの組織特異的な発現について検討を行っているところである。

#### D. 考察

##### D-1 RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子導入法について

今回の検討では、昨年度に胎盤への遺伝子導入が確認できた RGDmAd と胎盤特異的プロモーターを用いて、胎盤特異的遺伝子導入法の確立を行った。PL1 および PL2 プロモーター領域を用いて検討を行った結果、*in vitro* においては CMV プロモーター領域のプロモーター活性と比較して低いものの、胎盤細胞特異的な遺伝子発現が認められたが、予想に反して *in vivo* においては胎盤での十分な遺伝子発現は認められなかった。この原因としては 1) RGDmAd は Giant Cell に感染していないため、PL1 および PL2 プロモーターが機能できないこと、2) PL1 および PL2 プロモーター領域のプロモーター活性が遺伝子発現をするには不十分であること、3) RGDmAd の胎盤への遺伝子導入効率自体が不十分、の 3 つの可能性が考えられる。

そこでまず 1) についての可能性を検証するために trophoblast stem cell (TS 細胞) を用い、*in vitro* における RGDmAd の感染実験を行った。その結果、未分化 TS 細胞に対しては、野生型 Ad と RGDmAd の感染効率はほぼ同等であったのに対し、feeder cell と分化維持因子である FGF4 を除いた培養条件にて分化させた TS 細胞に対しては、RGDmAd の方が野生型と比較して感染効率が高かった。また TS 細胞は、分化誘導条件においては Giant cell と spongiotrophoblast cell の 2 つの細胞に分化することが知られているが、この際に all-trans retinoic acid (*at*-RA) を添加すると Giant cell にのみ分化することも報告されている。そこで分化誘導条件下で *at*-RA を添加し、Giant cell にのみ分化させた TS 細胞

について RGDmAd の感染効率を検討したところ、単なる分化誘導条件で分化させた TS 細胞（すなわち Giant cell と spongiotrophoblast cell の混合集団）よりも、高い感染効率を示した（data not shown）。このことは *in vitro* の結果ではあるものの、RGDmAd は胎盤の細胞群の中でも Giant cell に対しては、比較的感染効率が良いことを示すデータである（data not shown）。*in vivo* において、RGDmAd が Giant cell に感染していない可能性は否定できないものの、今年のデータで RGDmAd は胎盤の細胞には感染していることは明らかであることから、1) の可能性は低いものと考えられた。

2) の可能性についてであるが、Fig. 2. のデータから、PL1 および PL2 のプロモーター領域の活性は、CMV プロモーター領域と比較して、それぞれ約 1/100、1/10000 であり、胎盤特異性は認められるものの、そのプロモーター活性はかなり低い。しかしながら、*in vitro* でのプロモーター活性が非常に低い PL2 においては、本プロモーターを用いたコンディショナル Tg マウスが作成されており、ゲノムに組み込まれることですべての Giant cell において目的遺伝子を発現させた場合には、十分な活性を有することが報告されている。また 3) の可能性についても、RGDmAd は CMV プロモーター制御下で LUC 遺伝子の発現は認められるが、果たしてこの発現が胎盤機能を変動させるのに十分なものであるかについては疑問が残る。事実、PPAR $\gamma$  ホモ欠損マウスのレスキュー実験を、CMV プロモーター制御下 PPAR $\gamma$  を発現する RGDmAd で行ったところ、野生型マウスのテトラプロイド胚を用いたレスキュー実験 (18) のように PPAR $\gamma$  ホモ欠損マウスは生まれてこなかった (Table I)。今回の実験では、完全に出産した際のジェノタイプングしか行っていないため、PPAR $\gamma$  発現 RGDmAd による

PPAR $\gamma$  ホモ欠損マウスの延命効果については定かではない。しかしながら、胎盤特異的なプロモーターを用いた胎盤特異的な遺伝子発現変動による発生毒性実験を行うためには、RGDmAd を尾静脈内投与する系ではなく、より効果的な胎盤への遺伝子導入法の開発が望まれると考えられる。

## D-2 胎盤特異的に EGFP-Arom 融合タンパク質を発現する Tg マウスについて

Tg マウスについては、PL1 と PL2 の両プロモーターを使用した Tg マウスともに founder マウスを出産した。この結果は、胎盤でアロマターゼが過剰発現してもマウスが無事に出産できることを示唆する結果であると思われる。しかし、マウスの胎齢 15 日目からプロモーター活性が誘導されるヒトユビキチン C プロモーター領域を用いたアロマターゼ Tg マウスにおいても、founder マウスは生まれてきているものの、F1 以降の世代の生殖系に異変が生じており、不妊であるという報告がある。今後、さらにフェノタイプの解析を行うことで、胎盤でのアロマターゼ過剰発現が胎児に与える影響について検討を行っていきたい。

## E. 結論

- (1) PL1 および PL2 プロモーター制御下で遺伝子発現をする RGDmAd は、*in vitro* においては、胎盤細胞 (Rcho-1 細胞) 特異的にレポーター遺伝子の発現を誘導したが、妊娠マウスに尾静脈内投与した際には、CMV プロモーターを用いた場合のように十分な胎盤での遺伝子発現は確認できなかった。
- (2) CMV プロモーター制御下で PPAR $\gamma$  を発現する RGDmAd を、PPAR $\gamma$  ヘテロ欠損マウス

ス同士を交配させた妊娠マウスに投与しても、PPAR $\gamma$ ホモ欠損マウスのレスキューは出来なかった。

- (3) ヒトアロマトーゼタンパク質にEGFPを融合させたEGFP-アロマトーゼ融合タンパク質は、通常のアロマトーゼタンパク質と同等のアロマトーゼ活性を保持していた。
- (4) PL1およびPL2のプロモーター制御下でEGFP-Arom融合タンパク質を発現するTgマウスを作成し、founderマウスを得た。TG738では、雄39匹中5匹、雌31匹中10匹の陽性マウスがそれぞれ確認できた。一方でTG739マウスにおいては、雄50匹中11匹、雌56匹中8匹の陽性マウスがそれぞれ確認できた。

## 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

- 1) Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions, Nakanishi T, Nishikawa JI, Hiromori Y, Yokoyama H, Koyanagi M, Takasuga S, Ishizaki JI, Watanabe M, Isa S, Utoguchi N, Itoh N, Kono Y, Nishihara T, Tanaka K, in revised.
- 2) Effects of organotin compounds on endocrine functions of human placental cells., Nakanishi T, Itoh N, Tanaka K, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 197, 231-232, 2004.

### G-2. 学会発表

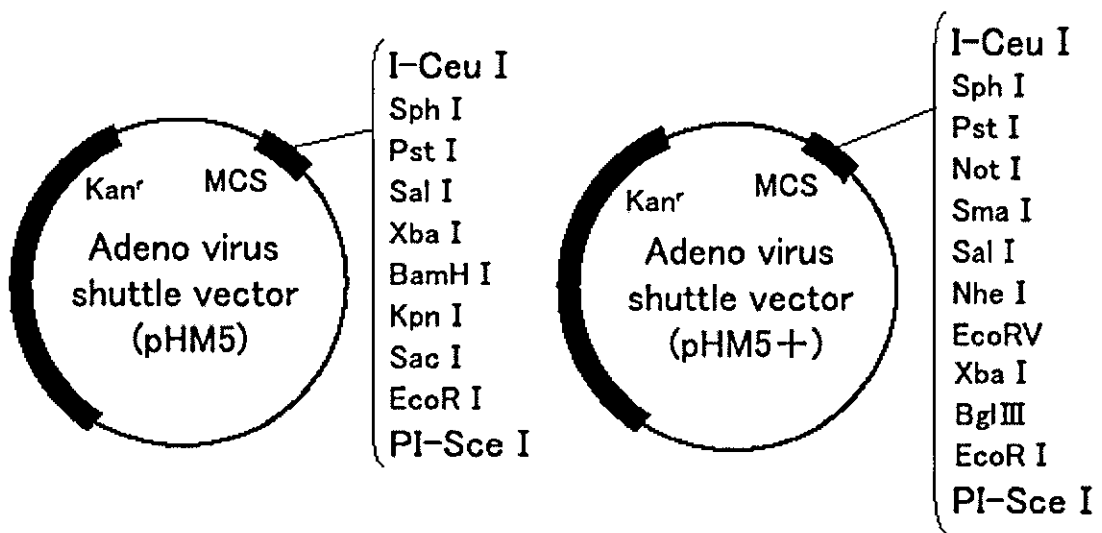
- 1) 核内受容体リガンドとしての有機スズ化合物の内分泌攪乱作用, 広森洋平, 中西 剛, 伊藤徳夫, 西川淳一, 田中慶一, 第7回日本内分泌攪乱化学物質学会(名古屋), 平成16年12月.
- 2) 妊娠マウスの諸臓器におけるRXRを介した有機スズ化合物 triphenyltin (TPT) の影響, 横山英明, 中西 剛, 金子 真, 伊藤徳夫, 西川淳一, 田中慶一, 第7回日本内分泌攪乱化学物質学会(名古屋), 平成16年12月.
- 3) 妊娠マウスの諸臓器におけるRXRを介した有機スズ化合物 triphenyltin (TPT) の影響, 金子 真, 中西 剛, 横山英明, 広森洋平, 伊藤徳夫, 西川淳一, 田中慶一, 第7回日本内分泌攪乱化学物質学会(名古屋), 平成16年12月.
- 4) 化学物質の胎盤機能修飾による内分泌攪乱作用に関する研究(日本薬学会環境・衛生部会賞受賞講演), 中西 剛, フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 平成16年10月(千葉)
- 5) 有機スズ化合物のヒト胎盤機能修飾による内分泌攪乱作用とその作用機構, 中西 剛, 西川淳一, 廣森洋平, 横山英明, 小柳美穂子, 伊佐俊一, 伊藤徳夫, 西原 力, 田中慶一, フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 平成16年10月(千葉)
- 6) Effects of organotin compounds on endocrine functions of human placental cells., Nakanishi T, Itoh N, Tanaka K, 10th International Congress of Toxicology, July, 2004 (Tampere, Finland)
- 7) 有機スズ化合物のヒト胎盤機能修飾による内分泌攪乱作用とその作用メカニズム, 中西 剛, 西川淳一, 田中慶一, 第14回金属の関



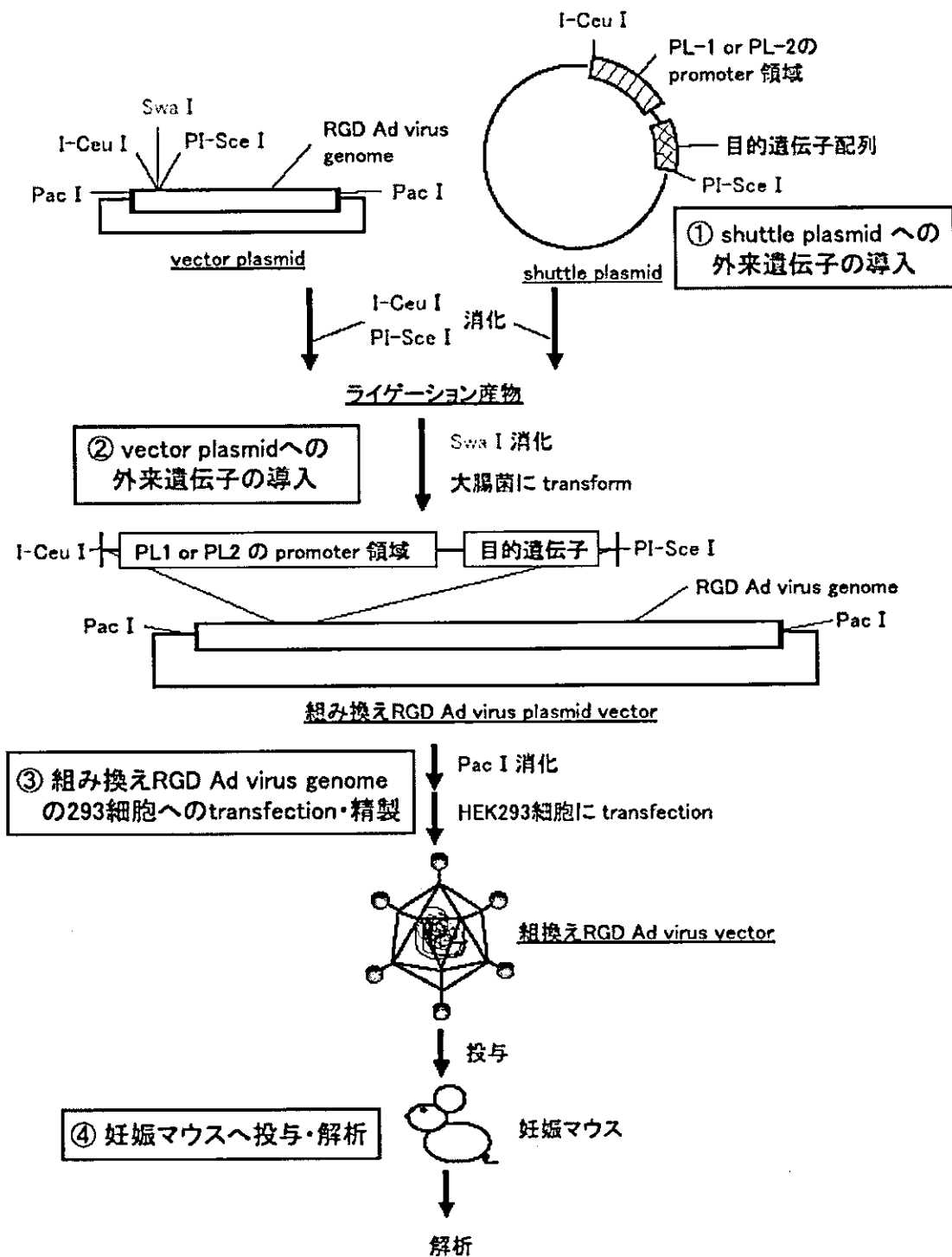
与する生体関連反応シンポジウム，平成16  
年6月（静岡）

#### 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。



Scheme. 1. pHM5、pHM5+のマルチクローニングサイト (MCS) 図



Scheme. 2. *in vitro* ligation 法による RGDmAd 作製法

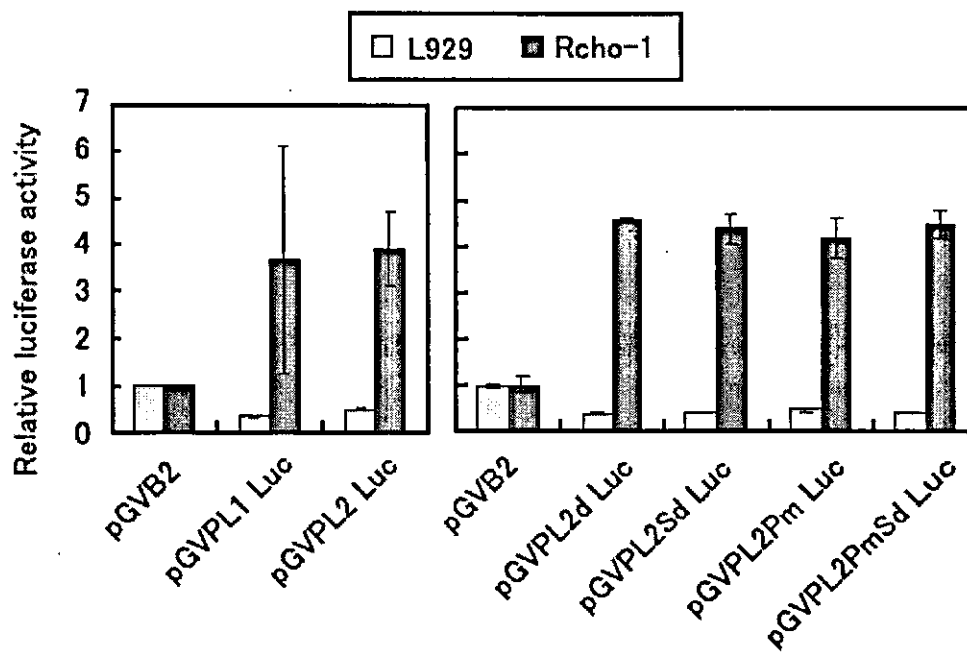


Fig. 1. Trophoblast-specific activity of PL1 and PL2 promoter in Rcho-1 cells and L929 cells. Luciferase reporter gene activities under the PL1 or PL2 promoter regions were measured from extracts of Rcho-1 and L929 cells transiently transfected by PL1 or PL2 promoter construct. Data represent means  $\pm$  S.D. of triplicate cultures.