

別紙1

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～16年度 総合研究報告書

主任研究者 中西 剛

平成17（2005）年3月

目 次

| | |
|--|----|
| 総合研究報告書 | 3 |
| 研究要旨 | 3 |
| 研究目的 | 5 |
| B. 研究方法 | 6 |
| B-1 細胞・動物 | 6 |
| B-2 定量的 PCR | 7 |
| B-3 Western Blot 解析 | 7 |
| B-4 hCG の定量 | 7 |
| B-5 アロマターゼ活性の測定 | 7 |
| B-6 <i>in vivo</i> における化学物質の体内動態の検討と化学物質による遺伝子発現変動の検討 | 8 |
| B-7 プラスミドの構築 | 8 |
| B-8 RGDmAd の作製 | 9 |
| B-9 LUC assay | 9 |
| B-10 EGFP-Arom 発現ベクターの構築と Tg マウスの作成 | 9 |
| B-11 ジェノタイピング | 10 |
| C. 研究成果 | 11 |
| C-1. ヒト絨毛細胞への影響 | 11 |
| 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 | 12 |
| 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 | 13 |
| C-4. ヒトおよびラット胎盤の内分泌機能に対する有機スズ化合物の影響 | 14 |
| C-4. 1 ヒト胎盤の hCG 産生およびアロマターゼ活性における有機スズ化合物の影響とその構造活性相関の検討 | 14 |
| C-4. 2 ヒトおよびラット胎盤のステロイドホルモン産生酵素類の発現に対する有機スズ化合物の影響 | 15 |
| C-5 妊娠マウスにおける化学物質の影響 | 16 |
| C-5. 1 妊娠マウスにおける [³ H]-DES の体内動態 | 16 |
| C-5. 2 妊娠マウスにおける [¹⁴ C]-TPTOH の体内動態 | 17 |
| C-5. 3 妊娠マウスの胎盤における有機スズ化合物の影響 | 17 |
| C-6 改変型アデノウイルスベクター (mAd) 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 | 18 |
| C-6. 1 RGDmAd によるマウス胎盤への遺伝子導入効率の検討 | 18 |

| | | |
|--------|---|----|
| C-6. 2 | 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 | 20 |
| C-6. 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 <i>in vitro</i> における遺伝子発現の検討 | 21 |
| C-6. 4 | 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 | 21 |
| C-7 | 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 | 22 |
| C-7. 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 | 23 |
| C-7. 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プリング | 23 |
| D. | 考察 | 24 |
| D-1 | エストロゲンおよびエストロゲン様化学物質の胎盤機能への影響について | 24 |
| D-2 | <i>in vitro</i> における有機スズ化合物の胎盤機能への影響について | 26 |
| D-3 | <i>in vivo</i> における化学物質の胎盤機能への影響について | 27 |
| D-4 | RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子導入法について | 29 |
| 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 | 30 |
| E. | 結論 | 31 |
| F. | 健康危険情報 | 32 |
| G. | 研究発表 | 32 |
| G-1. | 論文発表 | 32 |
| G-2. | 学会発表 | 32 |
| H. | 知的財産権の出願・登録 | 33 |
| | 研究成果の刊行物に関する一覧表 | 58 |

総合研究報告書

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が変化した場合に、いかなる胎児への影響が及ぶのかを *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。しかしながら胎盤は種差が大きい上に、*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という問題については、その情報があまりにも乏しいのが現状である。そこで平成14年度は、医薬品を初めとする様々な化学物質の胎盤の内分泌機能への影響を、*in vitro* での直接的な影響を把握するために、ヒト絨毛細胞株（JEG-3細胞とJar細胞）およびラット絨毛細胞株（Recho-1細胞）を持って比較検討を行った。その結果、ジエチルスチルベステロール（DES）を初めとするエストロゲンや、農薬、船底塗料などに用いられている有機スズ化合物などの化学物質が、ヒト胎盤には存在するが齧歯類には存在しない内分泌機能に影響を与えることが確認された。また逆に、齧歯類の胎盤には存在するがヒトには存在しない内分泌機能にも影響を与える化学物質も存在することが明らかとなった。

平成15年度には、JEG-3細胞とRecho-1細胞の内分泌機能に顕著な影響を与えたDESと有機スズ化合物の1つであるtriphenyltin（TPT）の妊娠マウスにおける体内動態と、*in vitro* で確認されたmRNA発現変動が *in vivo* を反映したものであるかを検討した。妊娠マウスに ^3H -DESまたは ^{14}C -TPTを投与したところ、ともに胎盤への分布が確認された。また両化合物とも母体からは速やかに排泄されるにも関わらず、胎児には貯留する傾向が認められた。これまでの我々の研究からTPTやtributyltin（TBT）はretinoid X receptor（RXR）のリガンドとして機能することが明らかとなっているため、妊娠マウスに投与した際のマウスにおける典型的なRXR支配遺伝子であるcellular retinoic acid binding protein II（CRABP II）遺伝子の変動を確認したところ、肝臓や膵臓といったRXRの発現とTPTの移行量が顕著に高い組織でのみ上昇する傾向が認められたが、RXRを高発現しているにもかかわらず、TPTの移行量があまり高くない胎盤などの組織においては、その変動を確認できなかった。TPTは既存のRXRアゴニストと同等以上の強い活性を有することが明らかとなっているが、そのような化学物質を投与しても肝臓などの主要移行組織のみでわずかに遺伝子発現変動が確認できる程度であるため、組織全体からtotal RNAを回収して微妙な遺伝子発現変動を検出し、発生毒性との相関を得ることは、極めて困難である可能性が示唆された。さらに発生毒性においては、母体-胎盤-胎児が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と考えられた。そこで、被験物質により変動が認められたヒト胎盤中の遺伝子を、胎盤特異的に発現させて胎児への影響を検討する評価系の構築を行うことにした。本研究ではその前段階として、アデノウイルスベクター (Ad) を用いた胎盤指向性 Ad の開発を試みた。Ad は静脈内投与した際には、95%以上が肝臓に移行するが、Ad のファイバー部分に細胞接着に重要な役割を果たしているラミニンの活性部位である RGD 配列を持たせた、RGD ファイバーミュータント Ad (RGDmAd) を用いて検討を行ったところ、胎盤への移行性が約 100 倍に上昇し、投与量の 10%程度が移行することが確認された。また RGDmAd を用いて胎盤特異的な遺伝子発現制御を行うために、齧歯類胎盤の giant cell において特異的な発現をする placental lactogen (PL) I および II のプロモーター (それぞれ転写開始点から上流約-280bp と約-2700bp) を用いた。この下流にレポーター遺伝子であるホタルルシフェラーゼ (LUC) や、齧歯類の胎盤には存在しない典型的なステロイドホルモン合成酵素であるヒトアロマトラーゼと enhanced green fluorescence protein (EGFP) の融合蛋白質 (EGFP-Arom) を発現する遺伝子を連結したコンストラクト (PL I-LUC, PL II-LUC, PL I-EGFP-Arom, PL II-EGFP-Arom) を作成した。PL I および II のプロモーター活性について、PL I-LUC と PL II-LUC の発現を Rcho-1 細胞とマウス繊維芽細胞株 L929 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が確認された。また EGFP-Arom は、EGFP を融合してもアロマトラーゼ活性を保持していることを確認した。

平成 16 年度は、これらの遺伝子を RGDmAd に搭載し、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。また RGDmAd を用いた胎盤特異的な遺伝子導入系の有用性を比較検討するために、PL I-EGFP-Arom または PL II-EGFP-Arom を用いてトランスジェニックマウス (Tg マウス) の作成を試みた。*in vitro* において RGDmAd を用いた胎盤特異的な遺伝子発現系について検討を行ったところ、PL I-LUC、PL II-LUC を搭載した RGDmAd (RGDmAd-PL I-LUC、RGDmAd-PL II-LUC) を感染させた場合においては、cytomegalovirus (CMV) プロモーターをポジティブコントロールプロモーターに用いた 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、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-PL I-LUC、RGDmAd-PL II-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-PL I-LUC 投与マウスの肝臓および胎盤においては、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-PL II-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 γ (PPAR γ) 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 γ 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ところ、PPAR γ 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。Tgマウスについては、PL I -EGFP-AromおよびPL II -EGFP-Aromを導入した両マウスともに founder マウスを出産し、それぞれ TG738、TG739 と命名した。各マウスをジェノタイプングした結果、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、これらのマウスにおける各組織での EGFP-Arom の発現およびフェノタイプ等について検討中である。

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万能薬のように使用されてきたが、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化学物質の暴露影響に端を

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と予想される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うことができる。

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体胎児複合体に作用し、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トラーゼ (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 α 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。このようなアプローチを可能にするためには、臨床的に、または動物実験での毒性が明らかとなっている化学物質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否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先述の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。

そこで本研究では、まず発生課程に最も重要な役割を果たしている胎盤機能の1つである内分泌機能に焦点を絞り、ヒトおよび齧歯類のモデル胎盤細胞を用いて、医薬品等の化学物質によってどのような内分泌機能が修飾を受けるかについて検討を行った。さらに、そ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 Tg マウスや、Ad を用いて目的遺伝子を胎盤特異的に発現させたりすることで、*in vivo* におけるフェノタイプの検討を行うことが可能な *in vivo* 胎盤毒性評価系の構築を試みた。このように本研究は、*in vitro* における遺伝子発現変動の結果から、発生毒性の予測が可能な評価系の構築を試みるものであり、今後の発生毒性研究の方向性を示す一里塚になるものと思われる。

B. 研究方法

B-1 細胞・動物

Rcho-1 細胞 (国立環境研 石村隆太先生から

ご供与)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% CO₂条件下で通常培養した。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、MCF-7 細胞、L929 細胞は、10% FCS含有したDMEM培地で、いずれも 37°C、5% CO₂条件下でそれぞれ通常培養した。実験時には、5% charcoal-sripped ウシ胎児血清 (活性炭処理により吸着物質を除いた血清) を用いて培養を行い、化学物質の処理濃度は [³H]-thymidineの取り込みを指標に細胞毒性を示さない最高濃度に設定した。HEK293 細胞は、10% FCSを含有するDMEM培地で培養を行った。*in vivo*における化学物質の体内動態および化学物質曝露による遺伝子発現変動の検討には、ICR系の妊娠マウス (日本クレア) を、Adの遺伝子導入効率の検討には、ddY系の妊娠マウス (日本SLC) を用いた。また Tgマウスの作成は、BDF1 系マウス (日本SLC) を用いた。PPAR γ 欠損マウスは、大阪大学大学院歯学研究科、和田孝一郎先生から御供与頂いた。GFP-Tgマウスは、大阪大学遺伝情報センターの岡部勝先生から御供与頂いた。

B-2 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 (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-3 Western Blot 解析

各細胞から回収した細胞溶解液を 50 μ g / lane で 10% アクリルアミドゲルに展開し、ニトロメンブランにトランスファーした。メンブランをブロッキング後、ウサギ抗エストロゲンレセプター (ER) α 抗体、およびウサギ抗 ER β 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 (Amersham Bioscience) を用いてX線フィルムに露光して検出した。

B-4 hCG の定量

細胞を化学物質で処理後、洗浄操作を行い、5% charcoal-sripped ウシ胎児血清を含有する新鮮培地でさらに24時間培養した。その後、培養上清を回収し、24時間で培地中に産生された hCG 量を、抗 hCG β 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により、定量を行った。なお hCG 定量用の標準品は、帝国臓器製薬よりご供与いただいたものを使用した。

B-5 アロマトラーゼ活性の測定

アロマトラーゼ活性の測定は、³H₂O 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 [1 β -³H] 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 μ Lを取り、クロロホルム 500 μ 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 μ 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 μ 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。

B-6 *in vivo*における化学物質の体内動態の検討と化学物質による遺伝子発現変動の検討

化学物質による *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 1 1 日）を用いて検討を行った。遺伝子発現の検討においては、TBTC1 または TPTOH を腹腔内投与 3 日後に各臓器を回収し、定法により total RNA を抽出後、リアルタイム RT-PCR 法により、各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。また体内動態の検討については、 $[^3\text{H}]$ -DES (American Radiolabeled Chemicals; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.1mBq/head)、または $[^{14}\text{C}]$ -TPTOH (Amersham Biosciences; 0.45mg/kg, 0.1mBq/head) を腹腔内に投与後、経時的に各臓器、または糞尿を回収し、その放射活性を測定することで評価した。

B-7 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・水口裕之先生からご供与) のマルチクロニングサイトを EcoR I と Pst I 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) をベクターとして作製した。PL I および PL II プロモーターのクロニングは、マウスゲノムを鋳型として PCR 法にて増幅した。PL I (転写開始点を +1 として、-274~+94) および PL II (-2501~+12) プロモーター領域を増幅し、T ベクターにサブクロニングした (pGEM-PL I、pGEM-PL II)。

PL I については、PGV-B2 への挿入は、Bgl II

/Nco I サイトを用いて行った (pGV-PL I-LUC)。シャトルプラスミドの作成は、pGV-PL I-LUC から Bgl II/Sal I サイトを用いて、PL I 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-PL I-LUC)。

PL II については EcoR I /Sal I サイトで、pCIneo (Promega) にさらにサブクロニング (pCI-PL II) した後に、Xho I /HindIII サイトを用いることにより、PGV-B2 に挿入した (pGV-PL II-LUC)。また PL II プロモーター領域の EcoR I サイト (5'側) から Bgl II 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-PL II-LUC から Bgl II/Nco I 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-PL II d-LUC)。PL II プロモーター領域内の Swa I サイト (PL II d の 5' 末端より 353bp 下流) を消失させるために、pGV-PL II d-LUC を PL II プロモーター内に存在する Swa I サイトと pGV-B2 マルチクロニングサイトに存在する Sma I 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-PL II Sd-LUC (Swa I deleted pGV-PL II d-LUC) と命名した。pGV-PL II Sd-LUC の PL II プロモーター内に存在する Pac I サイトを消失させたプラスミドベクターは、Pac I サイトに点変異を導入することで作成した。Pac I 認識サイトを含み部分的に相補的なプライマー PL II Pac I mutatuin+, PL II Pac I mutatuin- と Pac I サイトの上流に PL II mid fow を設計し、下流側は pGVB2 シーケンス用 S2 primer を使用した。PL II mid fow と PL II Pac I mutatuin-, PL II Pac I mutatuin+ 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 PL II Pac I mutatuin+ と PL II Pac I mutatuin- 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 PL II mid fow、S2 primer で PCR を

行い変異が導入された PCR 産物を得た。

PL II mid flow :

5' - TATTTTCCAAAGCAACTAGTA -3' (21mer)

PL II Pac I mutatuin+ :

5' - TCATCTTTaAATTAATGCCAAAAAT -3' (26mer)

PL II Pac I mutatuin- :

5' - GGCATTTAATTtAAAGATGAATTTCT -3' (26mer)

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

B-8 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 Csp45 I と Cla I 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・水口裕之先生からご供与) 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-Ceu I /PI-Sce I 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-Ceu I /PI-Sce I 部位に挿入した。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。

B-9 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 3.0×10^4 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、細胞播種 24 時間後に、各レポータープラスミド $0.1 \mu\text{g}$ と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) 2 ng をリポフェクション法によりトランスフェクトした。各 RGDmAd の *in vitro*における LUC 発現の検討では、各細胞を播種 24 時間後に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、ウミシイタケ由来の LUC 活性を測定し、この値をもち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) を用いてルミノメーターにより 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-10 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 Sal I /Not I 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、Sal I 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 Sal I 処理し、pEGFP-N1 の Sal I /Sma I サイトに挿入した (pEGFP-N1-Arom)。しかしながらこのままでは、EGFP-Arom 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 法により作製し、pEGFP-N1-Arom を Not I 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通常のヒトアロマトラーゼの活性と比較するために SV40 プロモーターに EGFP-Arom 配列を結合したベクターの作製を行った。pEGFP-Arom を Sal I /Not I 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 PL I プロモーターを有する EGFP-Arom 発現ベクターは、pGEM-PL I を Bgl II /Nhe I サイトで切り出し、pCIneo にサブクローニング (pCI-PL I) した後に、Bgl II /Sal I 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 Bgl II /Sal I サイトに挿入した。PL II 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-PL II から目的とするプロモーター領域を切り出して、

pEGFP-Arom の Bgl II /Sal I サイトに挿入した (pCIEGFP-Arom-PL I、pCIEGFP-Arom-PL II)。

Tg マウス作成は、大阪大学遺伝情報センターの岡部勝先生に依頼した。作成の際には、各プラスミドベクターを Bgl II /Not I 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、PL I プロモーターを有するものを TG738、PL II プロモーターを有するものを TG739 と命名した。

B-11 ジェノタイピング

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 γ 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1Cycleとして35Cycleを行った。

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 (Scheme 3)。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をはじめとするエストロゲン医薬品やエストロゲン様化学物質 (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. 1A に示す。P450scc は、ER に強い親和性を示す、エストラジオール (E2)、エチニルエストラジオール (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 β -hydroxy-steroid dehydrogenase (HSD) I への影響

各化学物質の 3 β -HSD I への影響を検討した結果を Fig. 1B に示す。3 β -HSD I は、DES によってその発現が約 2 倍に上昇した。また同じエストロゲン作用を有する 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 (Scheme 3)。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 (Scheme 3)。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. 1C)。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. 1C)。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. 1C)。

C-1. 4. 17 β -HSD Iへの影響

E2などへの変換に必要である17 β -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. 1D示すように、NP、OPに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. 1E)。また、DDTとOPによってもその発現が上昇した (Fig. 1E)。

C-1. 6. hCG β 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、 α と β 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 α 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 β 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 β 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 β 発現が顕著に誘導された (Fig. 1F)。また、DDTによってもその発現が上昇した (Fig. 1F)。

C-2. ラット絨毛細胞株の内分秘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ゲ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 (Scheme 4)。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、ラット胎盤の mRNA 発現に与える影響について、リアルタイム RT-PCR 法による解析を行った。

C-2. 1. P450_{scc} への影響

各化学物質の P450_{scc} への影響を検討した結果を Fig. 2A に示す。その結果、E2、EE は P450_{scc} の発現を有意に上昇させた。DES においても、P450_{scc} 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 β -HSD I への影響

各化学物質の 3 β -HSD I への影響を検討した結果を Fig. 2B に示す。その結果、E2、EE は P450_{scc} の結果と同様の 3 β -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 β -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ゲンをできないが、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ゲンの合成が可能である (Scheme 4)。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. 2C)。

C-2. 4. 17 β -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 β -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. 2D)。

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. 2E)。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. 2F)。

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

エストロゲンは、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 α と β 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、エストロゲン応答配列を介した転写活性も有しているものの、ER α と β 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ゲ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 α と β 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ゲ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 細胞においては ER α 、 β ともに発現していることが明らかとなった (Fig. 3)。また ER β に関しては、ヒト胎盤細胞株である JEG-3 細胞と同様の 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 細胞では 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 α の発現は、Rcho-1 細胞においては、MCF-7 細胞同様 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 α しか発現していなかった (Fig. 4)。したがって、ラットの胎盤とヒトの胎盤ではエストロゲ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。

C-4. ヒトおよびラット胎盤の内分泌機能に対する有機スズ化合物の影響

有機スズ化合物は、船底塗料、農薬、木材処

理、塩化ビニル樹脂安定剤などに利用されており、我々人類が食する魚介類や野菜類にも混在している。特に TBT と TPT は、一部の腹足類の雌において雄の性徴発達を示すインボセックスと呼ばれる現象を誘導することが明らかとなっている内分泌攪乱物質であるが、ヒトの生殖・発生系に対する内分泌攪乱作用については明確な結論は出ていない。また有機スズ化合物は、ER およびアンドロゲンレセプターとの親和性に乏しく、有機スズ化合物はこれらのホルモンレセプター以外の作用点を有することが予想される。このような背景のもと、我々は TBT chloride (TPTCl) および TPT hydroxide (TPTOH) が、ヒト絨毛細胞株の hCG 産生とアロマトラーゼ活性を促進することを明らかにしてきた。そこで本項では、有機スズ化合物が与えるヒトおよびラット胎盤の標的遺伝子の発現変動について検討を行った。

C-4. 1 ヒト胎盤の hCG 産生およびアロマトラーゼ活性における有機スズ化合物の影響とその構造活性相関の検討

有機スズ化合物は、その側鎖の数やアルキル鎖の種類によって生体に対して様々な影響を与えることが知られている。また TBTC1 や TPTOH 以外の有機スズ化合物の中にも、かつて農薬として使用されていたものや、ビニル袋などの可塑剤として使用されていたものなどが存在する。そこでまず、有機スズ化合物による胎盤機能修飾の検討を足がかりとすることで、これまで説明できなかった生殖器官や生殖機能の異常に対する環境化学物質の作用解明につながると考え、TBTC1、TPTOH 以外の有機スズ化合物が与えるヒト胎盤細胞の hCG 産生およびアロマトラーゼ活性に対する影響について、Jar 細胞を用いて検討を行った。本検討では側鎖の数と長さの異なる

種々の有機スズ化合物を用いてヒト絨毛細胞株 hCG 産生に及ぼす影響について検討を行った。まず Jar 細胞における hCG 産生に及ぼす有機スズ化合物の影響を検討した (Fig. 5)。まずトリアルキル体のアルキル鎖の長さの影響について検討を行ったところ、TBTC1 及び TPTOH 以外にも、tripropyltin chloride (TPrTCl)、tricyclohexyltin hydroxide (TCHTOH) が共に、有意な hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用を示した (Fig. 5A, B)。次にブチルスズとフェニルスズの側鎖の数の影響について検討を行ったところ、ブチルスズとフェニルスズともにトリアルキル体が最も強い hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用を示した (Fig. 5C, D)。tetrabutyltin (TeBT) については、同程度の hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用を示すものの、作用濃度はトリアルキル体の約 100 倍程度の濃度が必要であった。ジアルキル体も上昇作用を示したが、その影響は微弱なものであった。さらに TBT と TPT の 4 本目の側鎖の影響についても検討を行ったところ、TBT、TPT ともに 4 本目の側鎖がハロゲンや水素原子、また水酸基のような少ない原子数で構成されている官能基の場合には、その作用に顕著な影響は確認されなかったが、TBT にビニル基やブチル基が付加された場合には、hCG 産生やアロマトラーゼ活性を上昇させる作用はあるものの、その作用は 100 倍以上の高濃度が必要となり、効果の減弱が確認された (Fig. 5E, F)。またこれらの有機スズ化合物による影響は、JEG-3 細胞でも確認され (データは示さず)、また mRNA レベルでもほぼ同様の発現上昇パターンが確認された (Fig. 6)。以上のように有機スズ化合物のヒト胎盤に対する hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用には明らかな構造相関があり、有機スズ化合物のこのような作用は何らかの標的分子を介してい

る可能性が示唆された。またその標的分子は、ヒト胎盤の hCG β とアロマトラーゼの発現を共に上昇させる共通の pathway であることが示唆された。本補助金の研究計画には含まれていないが、その後の研究結果から、有機スズ化合物のこれらの分子の発現上昇作用は、retinoid X receptor (RXR) や PPAR γ を介した作用であることが確認されている。

C-4. 2 ヒトおよびラット胎盤のステロイドホルモン産生酵素類の発現に対する有機スズ化合物の影響

JEG-3 細胞の P450_{scc}、3 β -HSD I、スルファターゼ、17 β -HSD I の発現に対する各有機スズ化合物の影響を検討した (Fig. 7A)。TBTC1 と TPTOH は共に P450_{scc} の発現を抑制する傾向を示した。TBTC1 と TPTOH はともにスルファターゼには影響を与えなかった。3 β -HSD I および 17 β -HSD I においては、TBTC1 と TPTOH ともに発現を上昇させる作用が認められた。

Rcho-1 細胞の P450_{scc}、3 β -HSD I、CYP17、17 β -HSD II および VII の発現に対しても同様の検討を行った (Fig. 7B)。3 β -HSD I においては、JEG-3 細胞における結果と同様に、TBTC1、TPTOH 共に上昇作用が認められた。一方で、P450_{scc} の発現に対する影響は、JEG-3 細胞の場合とは逆に、TBTC1 では有意な上昇が確認された。また TPTOH においても上昇傾向が確認された。17 β -HSD II においては、TBTC1 で発現上昇が確認されたが、TPTOH ではそれほど影響は認められなかった。また CYP17 と 17 β -HSD VII においては、TBTC1 で若干の上昇傾向が認められるものの、TPTOH ではほとんど影響が認められなかった。

このような有機スズ化合物の mRNA 発現変動における種差を検証するために、ラットにおける RXR 標的遺伝子の 1 つである cellular retinol

binding protein II (CRBP II) の発現変動に与える有機スズ化合物の影響について検討を行った (Fig. 8)。その結果、Rcho-1 細胞においては、TBTC1 および TPTOH の濃度依存的に mRNA の発現上昇が確認されたが、JEG-3 細胞においては CRBP II の mRNA 発現上昇は全く認められなかった。また天然の RXR リガンドである 9-*cis* レチノイン酸 (9cRA) をポジティブコントロールとして用いたところ、有機スズ化合物と同様に Rcho-1 細胞では mRNA の上昇が認められたが、JEG-3 細胞では全く認められなかった。ラットおよびマウスの CRBP II プロモーター上には、RXR 応答配列 (RXRE) が存在し、RXR リガンドによって RXR ホモダイマーが RXRE に結合することで転写活性化が起こることが明らかとなっている。そこでヒトと齧歯類における CRBP II プロモーターの配列を比較検討したところ、ラットおよびマウスの RXRE に相当する部位の配列がヒトでは異なっていた (Fig. 9)。Rcho-1 細胞、JEG-3 細胞は共に RXR を発現していることから、これら両細胞における有機スズ化合物の CRBP II 発現誘導に対する影響の違いは、CRBP II プロモーター上の RXRE の有無に起因することが示唆された。またヒトと齧歯類の胎盤で、有機スズ化合物やエストロゲン化合物の各ステロイドホルモン産生酵素発現に対する影響の違いが確認されたが、これらについても同様にプロモーター上の応答領域の有無に起因する可能性がある。しかしながら、ヒトおよび齧歯類の各ステロイドホルモン産生酵素については十分なプロモーター解析が行われていないため、これらの問題については今後の検討課題であると考えられる。

C-5 妊娠マウスにおける化学物質の影響

これまでに、エストロゲン化合物や有機スズ化合物の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について検討を行ってきた結果、DES や EE などのエストロゲンや有機スズ化合物が、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。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らかではない。そこで本項では、胎盤への影響が確認された DES および有機スズ化合物の胎盤への移行性について妊娠マウスを用いて検討するとともに、*in vivo*における有機スズ化合物の胎盤に対する影響についても検討を行った。

C-5.1 妊娠マウスにおける³H-DESの体内動態

DESの妊娠動物における体内動態については、すでにいくつかの報告があるものの、いずれの報告も投与後数時間の検討にとどまっており、滞留性を含めた比較的長期的な検討による体内動態については報告がない。そこで³H-DESを用いて、妊娠マウスにおける胎盤への移行量およびその滞留性について検討を行った。妊娠 11 日目のマウスに³H-DESを腹腔内投与し、投与後 6, 24, 48, 96 時間後に各臓器を回収し、その放射活性を指標に移行量を評価した。その結果、過去の報告通り³H-DESは、投与後 6 時間で回収したほとんどの組織に分布し、大腸と肝臓で特に濃度が高いことが確認された。また卵巣や、子宮などエストロゲンレセプターの発現が高い組織においても、比較的濃度が高いことが確認された。しかしながらほとんどの臓器においては、投与後 48 時間までに速やかに DES 濃度の減少が確認された。一方で、胎盤および胎児においては、他の組織と同様に投与後 6 時間でその分布が確認され、その後 48 時間まで一定の DES 濃度を保った後に、96 時間後には

[³H]-DES濃度の減少が確認された (Fig. 10A)。しかしながら、胎盤および胎児は妊娠 1 1 日目と 1 5 日目では、その重量がそれぞれ約 2 倍および 10 倍となり、組織重量あたりのDES濃度での評価では滞留性を過小評価してしまう可能性がある。そこでFig. 10Bにおいては、組織あたりのDES絶対量の経時変化を示した。その結果、肝臓や大腸などの組織では投与 6 時間後から速やかに放射活性の消失が確認されたのに対し、胎盤では 4 8 時間まで滞留する傾向が、また胎児においてはその絶対量が投与 6 時間後から増加し、9 6 時間後においてもその放射活性ほとんど消失しないことが明らかとなった。このことは、DESが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-5. 2 妊娠マウスにおける [¹⁴C]-TPTOHの体内動態

有機スズ化合物の *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、有機スズ化合物の妊娠マウスでの体内動態を検討するために、[¹⁴C]-TPTOHを用いて検討を行った。妊娠 1 1 日目のマウスに [¹⁴C]-TPTOHを腹腔内投与し、経日的に採糞、採尿を行うと共に、臓器を回収した。その結果、[¹⁴C]-TPTOH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が明らかとなった (Fig. 11A)。この結果を反映して、[¹⁴C]-TPTOH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. 11B)。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が明らかとなった (Fig. 11B)。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が確認された (Fig. 11A)。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[¹⁴C]-TPTOH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がないことが明らかとなった (Fig. 11A)。したがって、有機スズ化合物においてもDESと同様に、一度胎児側に移行すると母体からの速やかな消失とは裏腹に、胎児からは非常に排泄されにくいことが示唆された。

C-5. 3 妊娠マウスの胎盤における有機スズ化合物の影響

TBT および TPT は、RXR と PPAR γ リガンドとして作用することは、先述の通りである。したがって妊娠マウスにおいても、これらの有機スズ化合物はこれらの核内受容体を介して、その作用を発揮すると考えられる。そこで次に、先に検討した TPTOH の体内動態と有機スズ化合物の *in vivo*における作用の相関を検討するために、マウスにおける代表的な RXR 支配遺伝子である cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) 遺伝子の各組織における発現変動について検討を行った。CRABP II は、promoter 領域に DR1 配列を持ち、RXR ホモダイマーを活性化することで、転写が活性化されることがすでに明らかとされている。しかしながら、核内レセプターは臓器特異的に発現していることが知られているため、TPTOH が RXR を介して妊娠マウス諸臓器に及ぼす影響について検討を行う前に、まずリアルタイム PCR 法により ICR 系妊娠マウス諸臓器における各 RXR の mRNA 発現量の定量を行った。また、内部標準として β -actin の mRNA 発現量についても定量を行い、補正を行った。その結果、RXR α はあらゆる臓器で発現しており、

肝臓、脂肪、膵臓、腎臓で特に高発現していた (Fig. 20)。また RXR β についても、あらゆる臓器で比較的一様に発現していた、一方で、RXR γ は脳、胎児で特異的に発現していることが明らかとなった (Fig. 12)。

次に妊娠マウスに TPTOH を投与して、各臓器における CRABP II 遺伝子の発現変動を検討したところ、TPTOH の移行量が多く、RXR α 、 β が高発現している肝臓、膵臓で CRABP II 遺伝子の上昇が認められた。また、副腎、腎臓、小腸、大腸、脂肪、子宮においても CRABP II 遺伝子の上昇傾向が認められた (Fig. 13)。以上の結果は、TPTOH による遺伝子発現誘導が、TPTOH の移行量とそのレセプターの発現量に依存していることを示している。一方で、胎盤においては十分な CRABP II 遺伝子の発現上昇が認められなかった。また Rcho-1 細胞を用いた *in vitro* における検討で確認された P450 $sc\alpha$ 、CYP17、17 β -HSD II、17 β -HSD VII などの発現上昇は、TBTC1 および TPTOH を投与した妊娠マウスの胎盤では認められず (データは示さず)、わずかに TBTC1 を投与したマウスにおいて、3 β -HSD I の上昇が確認されただけであった (Fig. 14)。有機スズ化合物は、これまでに数多く報告されているエストロゲン様化学物質とは異なり、既知の RXR リガンドと同等以上の RXR アゴニストとして作用することを我々は明らかにしているが、本結果は、そのように非常に強力な RXR リガンドである有機スズ化合物が *in vivo* においても確かに RXR を介して標的遺伝子の発現を変動させるものの、回収した臓器全体の遺伝子発現変動の検討では非常に感度が悪く、局所での微弱な遺伝子発現変動に伴うフェノタイプの解析を行うのは難しい可能性を示唆している。

C-6 改変型アデノウイルスベクター (mAd)

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

これまでの検討結果より、*in vivo* における胎盤機能修飾による発生毒性評価には種差の問題がある上、たとえ種差の問題を考慮しなかったとしても、化学物質を動物に投与することで胎盤全体の遺伝子群の変動とそのフェノタイプについて検討を行う方法では、毒性評価系としては非常に感度が悪い可能性が示唆された。したがって、任意の胎盤中の遺伝子発現変動による発生毒性の評価を行うには、胎盤特異的に遺伝子発現をさせることで、そのフェノタイプを評価する遺伝子発現系の構築が必要不可欠であると考えられる。最も有効な手法としては、胎盤特異的に目的遺伝子を発現させるコンディショナル Tg マウスを作製する方法が考えられるが、作成後のジェノタイピングや各ラインの characterization に多大な労力と時間を要する上、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。

一方で Ad は、現存するウイルスベ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が可能である。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が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。そこで本項では、Ad を応用した胎盤毒性評価モデルの構築と評価系としての可能性について検討を行った。

C-6. 1 RGDmAd によるマウス胎盤への遺伝

子導入効率の検討

Ad は先述の通り様々な利点を有する遺伝子導入ベクターではあるが、その一方でベクター感染域に特異性が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、遺伝子導入効率が極端に低い細胞、組織が存在する、といったいくつかの欠点が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目的に胎盤への遺伝子導入を行う場合には、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が有効であると考えられるが、Ad は静脈内投与した場合はほぼ 100%が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が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ベクターの構築が求められる。

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が細胞表面上に存在する膜貫通型タンパク質 Coxackie-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、ウイルスペントンのRGD (-Arg-Gly-Asp-) モチーフが細胞表面上の接着分子であるインテグリン、中でも α_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が細胞内へ侵入する為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が有用であることが推察される。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、ノブに分けられ、ファイバー

のC末端のノブが受容体であるCARと結合が、これまでにファイバーの中でもノブHIループがウイルス表面に突出した構造をとっていることから、外来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、最近この部位へ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) の構築が行われてきている。実際に、野生型Ad (wAd) による遺伝子導入効率の低い様々な細胞にRGDmAdは、効率よく遺伝子導入できることが確認されている。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、RGDmAd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、CMV-LUC を搭載した wAd (wAd-CMV-LUC ; 国立医薬品食品衛生研究所・水口裕之先生からご供与) と RGDmAd (RGDmAd-CMV-LUC ; 国立医薬品食品衛生研究所・水口裕之先生からご供与) 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、LUC 活性を指標に評価した (Fig. 15)。その結果、wAd 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、RGDmAd 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 wAd-CMV-LUC の約100倍上昇した。また RGDmAd 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 wAd 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. 15)。

一方で胎盤は母体由来組織ではなく、胎児由