

来組織であるが、その構造は母体由来血管等の母体組織が複雑に入り組んだものとなっている。したがって、胎盤全体を回収して RGDmAd の遺伝子導入効率を検討しただけでは、RGDmAd が胎盤ではなく胎盤に入り組んだ母体由来組織に遺伝子導入を行っている可能性を否定できない。そこで、GFP-Tg マウスの雄と野生型マウスの雌を交配させて作成した妊娠 10 日目のマウスに、赤色蛍光タンパク質である DsRed を発現する RGDmAd (RGDmAd-CMV-DsRed; 大阪大学大学院薬学研究科、真弓忠範先生よりご供与) を投与し、3 日後に解剖して胎盤を回収後、組織切片を作成し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。この妊娠マウスでは母体由来組織では蛍光を発しないが、胎児由来組織では雄の GFP-Tg マウス由来の緑色の蛍光を発する。したがって胎盤と母体由来組織を容易に見極めることが可能となる。またこの妊娠マウスに DsRed をレポーター遺伝子とする RGDmAd-CMV-DsRed を投与することで、RGDmAd の胎盤への遺伝子導入を評価することが可能である。検討の結果、緑色と赤色が重なり合う部分が存在し、RGDmAd は胎盤に遺伝子導入することが可能であることが示された (データは示さず)。

以上の結果は、RGDmAd が胎盤への遺伝子導入に有効であることを示しており、化学物質の胎盤毒性を模倣できる強力なツールとなる可能性が考えられた。

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

PL I および PL II 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、PL I の血中濃度は妊娠 9 ~ 11 日にピークを示し、PL II は PL I 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。PL I および PL II 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、PL I が転写開始点から上流-274bp、PL II が-1340~-2019bp の領域が必要不可欠である。また PL II 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 Tg マウスが既に作製されている。そこで我々は、この PL I および II 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。

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、PL I プロモーター (-274bp) と PL II 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-PL I -Luc および pGV-PL II -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 Swa I 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 Pac I 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、PL II プロモーター内には、-2121/-2128bp 部位に Swa I サイトが、-431/-438bp 部位に Pac I 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 Pac I サイトまで欠質したプロモーター PL II Sd と、さらにプロモーター内の Swa I 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

PL II Pm および PL II PmSd 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、Bgl II 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 Bgl II サイトまでを欠質させた PL II d 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、PL I および II 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、PL I および II 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. 16)。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、PL I および PL II PmSd 配列をそれぞれ用いて RGDmAd を作製した。

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 *in vitro* における遺伝子発現の検討

PL I -LUC、PL II PmSd-LUC を目的配列として組み込んだ RGDmAd を作製 (以下 RGDmAd-PL I -LUC、RGDmAd-PL II PmSd-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 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-PL I -LUC、RGDmAd-PL II PmSd-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-PL I -LUC、RGDmAd-PL II PmSd-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. 17)。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-PL II PmSd-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、PL II 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-PL I -LUC、RGDmAd-PL II PmSd-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-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

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-PL I -LUC は妊娠 9 日目のマウスに、RGDmAd-PL II PmSd-LUC は妊娠 1 2 日目、1 4 日目にそれぞれ投与を行い、投与 4 8 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-PL I-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-PL II PmSd-LUC と RGDmAd-B-LUC ではいずれの臓器も検出限界以下だった(データは示さず)。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-PL I-LUC、RGDmAd-PL II PmSd-LUC については、検量線の検出限界以下の発現であった(データは示さず)。

PL II 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 γ を発現する RGDmAd (RGDmAd-CMV-PPAR γ ; 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 γ ホモ欠損マウスのレスキュー実験を行った。PPAR γ 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 γ 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 γ を十分に発現させることが出来れば PPAR γ ホモ欠損マウスも生まれて来るはずである。PPAR γ 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 γ 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 γ ホモ欠損マウスの存在は確認できなかった (Table II)。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-7 胎盤特異的アロマトラーゼ発現コンディショナル 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ヒトのものでは、その構造および機能は大きく異なる。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が、齧歯類では、trrophoblast 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が、アンドロゲンをエストロゲンに変換するアロマトラ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、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トラーゼ活性と 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、アロマトラーゼに着目した。アロマトラーゼは、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トラーゼが欠損することにより、生まれてきた女兒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、アロマトラ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、アロマトラ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トラーゼ発現上昇が胎児にいかなる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トラーゼを過剰発現する Tg マウスの作成を試みた。

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トラーゼ活性の検討

胎盤は妊娠期のみが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となってしまう。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、組織や細胞レベルでの遺伝子発現やタンパク質の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. 18)。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-7.2 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リング

前項で作成した EGFP-Arom を発現する遺伝子と PL I および PL II d を連結したプラスミド (pCIEGFP-Arom-PL I、pCIEGFP-Arom-PL II) 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ピ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 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

今回の検討では、DES をはじめとするエストロゲンおよびエストロゲン様化学物質を中心に、内分泌攪乱物質の胎盤への影響について、ヒトとラットの絨毛細胞株を用いて検討を行った。その結果、それぞれのステロイドホルモン合成・代謝系に影響を与えるものがあり、その作用はヒトおよびラットの胎盤のみ存在する機能にも影響を与えることが明らかとなった。また Rcho-1 細胞の CYP17 においては、E2 と EE で上昇作用が認められたのに対し、DES では抑制傾向が認められたことから、ER に親和性のあるエストロゲン様化学物質の中でも、その影響が正反対になるような内分泌機能も存在することが明らかとなった。さらに DES の 3β -HSD I に対する作用は、Rcho-1 細胞においては特に影響を与えなかったが、JEG-3 細胞においては上昇作用が認められたことから、同じ内分泌機能に対してもその感受性に種差があることが明らかとなった。

このような作用の違いの原因としては、一つ目としてプロモーター領域の違いが考えられる。すなわち一方の種のプロモーターにはエストロゲン応答配列 (ERE) が存在するが、もう一方の

種のプロモーターにおいては、ERE が存在するはずの部分の配列が異なるため ERE とはならず、エストロゲンに反応しなかった可能性が考えられる。本考察は、ラットのステロイドホルモン合成酵素類のプロモーター解析に関する報告がほとんど皆無であるため推測の域を出ないが、最も典型的な例としては、CRBP II の発現調節が挙げられる。CRBP II は、小腸上皮細胞などの細胞質中に存在する 15kDa のタンパク質で、レチノールの核内への移行量を調節する。齧歯類における CRBP II の発現は、retinoic acid receptor (RAR) や RXR などのビタミン A の代謝物をリガンドとする核内受容体を介して制御されており、ラット CRBP II プロモーターには RAR 応答配列 (RARE) や RXRE である DR1 と DR2 が存在する。しかしながら、ヒトにおいては、ラットのプロモーターで DR1 や DR2 が存在するシスエレメントの配列が異なっているため、たとえ RXR や RAR に対するリガンドが存在しても、ヒトにおいては CRBP II の発現は上昇しないことが予想される。現に、Fig. 8 で示す通り、RXR リガンドとして働く有機スズ化合物をそれぞれの胎盤細胞に作用させた場合において、その誘導に明かな差が認められた。このようにエストロゲン様化学物質においても、CRBP II と同様にプロモーター領域のシスエレメントの配列の違いにより、反応性が異なった可能性が考えられた。

もう一つの原因としては、各細胞における ER の発現パターンに起因する可能性が考えられる。ER には α と β の 2 つのサブタイプが存在し、どちらのレセプターも E2 に対して高い結合能と特異性を有しており、ERE を介した転写活性を有しているものの、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しも同一でないことが報告されている。ER α および β は、DNA 結合ドメイン (DBD) を介して標的遺伝子のプロモ

一ター領域に存在する ERE に結合して作用するほか、転写因子 AP-1 を介して AP-1 応答配列にも作用することが知られているが、この AP-1 を介した転写活性化がエストロゲン様化学物質によって異なることが Paech らにより報告されている。すなわち、ER α を介した AP-1 活性化には E2 やエストロゲン様化学物質による差は認められないものの、ER β を介した AP-1 活性化においては、E2 ではアンタゴニストとして働くのに対し、ERE を介した転写ではアンタゴニストとして働くエストロゲン様化学物質がアゴニストとして働くのである。ER の発現は組織によってその分布が異なることが報告されているが、今回用いたラットおよびヒト絨毛細胞株においては、どちらの ER (ヒト絨毛細胞株の ER α は truncated type であったが) も発現していたこと (Fig. 3, 4) から、エストロゲン様化学物質による感受性の違いは、ER の発現に起因する可能性が考えられる。

しかし興味深いことに、今回検討したすべてのヒト絨毛細胞株において ER α は、ヒト乳癌細胞株やラットの絨毛細胞株で発現している 66kDa の full-length type ではなく、46kDa の truncated type しか発現していなかった。これは、組織によってエクソン I のスプライシングが異なるためであると考えられているが、ヒト胎盤において発現している 46kDa の hER α 46 に関する機能についてはほとんど報告がない。truncated type の ER には、DBD やリガンド結合ドメイン (LBD) は保存されていることは明らかとなっており、ERE に対する結合能は hER α に比べ hER α 46 の方が強いことも報告されている。しかし、最近ヒト血管内皮細胞の ER を介した内皮型 NO 合成酵素の誘導においては、full-length type の ER は転写を促進するのに対し、truncated type ではほとんど転写活性化はみられず、逆に

full-length type の ER の転写活性化を dominant-negative に抑制することが報告された。したがって、ラットとヒトの胎盤でエストロゲン様化学物質に対する反応が異なるのは、ER α のタイプが異なっていることも原因の一つであると考えられた。

ヒトにおける検討においては、E2、DES、EE などのエストロゲン以外の化学物質では、P4 で JEG-3 細胞の 17 β -HSD I 以外の 4 つの酵素および hCG β の mRNA 発現量が上昇した。ヒト胎盤初代培養細胞株を用いた検討で、E2 や P4 により P450scc、3 β -HSD I、17 β -HSD I の発現が上昇するという報告があり、今回の結果はこれまでの報告と合致する。NP、OP では 17 β -HSD I が上昇、スルファターゼが減少し、OP ではアロマターゼも上昇した。DDT では、3 β -HSD I、アロマターゼ、hCG β が上昇し、スルファターゼが減少した。BBP では P450scc、スルファターゼがそれぞれ減少した。Bis A、Cd では特に変化は認められなかった。一方で Cd は、ER α と親和性があり、転写活性化能を有することが報告されている。また Cd においては、ヒト胎盤初代培養細胞を用いた実験により P450scc、3 β -HSD I の発現や hCG の産生量が低下することが報告されているが、今回の結果はこれらの報告とは一致しなかった。しかしながら、その報告で用いられている Cd 濃度は今回の検討に用いた濃度よりも 10 倍以上高いこと、そのような濃度では JEG-3 細胞に細胞傷害が起こることから、同一の条件では検討できないが、Cd 濃度の違いにより作用が異なったのであると考えられる。以上の結果から、ステロイドホルモン合成酵素およびペプチドホルモンが化学物質の標的となり得ることが明らかとなった。今回検討を行った P4、Cd 以外の物質は ER への結合能は有するが、その結合能に応じた作用の強度というわけではなかった。これは、

ER を介した転写制御には結合能だけが関わっているわけではないという数多くの報告と合致する。

一方、Rcho-1 細胞において、ER に結合能があることが報告されている E2、EE により発現の上昇が認められたのは、P450scc、3 β -HSD I、CYP17、17 β -HSD II、PL II の 5 つの分子である。このことから、EE は今回検討した限りでは E2 と同様の作用を示すことが明らかとなった。齧歯類のこれら分子のプロモーター領域などに関する詳細な報告はほとんどないことから、現時点では E2 の作用が ER を介してどのように作用したのか、またどの ER を介した作用であるかは不明である。一方、DES 処理により発現の上昇が認められたのは、今回検討した分子では P450scc、17 β -HSD II のみであった。DES の ER に対する結合力は内因性のリガンドである E2 よりも強いにもかかわらず、E2 程の作用は示さなかった。したがって DES は、齧歯類胎盤の妊娠維持に重要なホルモン産生には、あまり影響を与えないと考えられた。しかしながら、DES は様々な内分泌攪乱作用を有していると考えられていることから、E2 とは異なった作用点が存在する可能性が十分に考えられる。Tremblay らは、DES が ERR β (estrogen receptor related receptor β) から転写共役因子を遊離させ、その転写活性化を阻害することや、妊娠マウスに DES を投与することにより ERR β 欠損マウスにおいて認められたような胎盤の labyrinth zone の欠損減少や trophoblast giant cell の蓄積などといった胎盤の形成異常を引き起こすことを報告している。またこのようなフェノタイプは、DES の代わりに E2 を投与しても認められない。DES と E2 に異なる作用点が存在することは、今回の検討と合致しており、ヒトの胎盤形成においてもなんらかの影響与える可能性が考えられる。

D-2 *in vitro* における有機スズ化合物の胎盤機能への影響について

これまでに我々は、有機スズ化合物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報告している。本研究では、有機スズ化合物の作用機構についても検討するため、種々の構造を有する有機スズ化合物の hCG 産生およびアロマトラーゼ活性への影響について検討を行った。その結果、hCG 産生およびアロマトラーゼ活性促進作用は、アルキル鎖の側鎖数が 3 つで、かつアルキル鎖の長さが 4~6 であるものに活性が認められた (Fig. 5, 6)。またこの結果は、hCG β およびアロマトラーゼの mRNA 発現誘導を伴っていたことから、有機スズ化合物の作用は hCG およびアロマトラーゼの転写活性化やそのシグナル伝達に関わる分子を介したものである可能性が示唆された。これらの遺伝子の発現に共通の発現調節機構の 1 つに cAMP を介した細胞内シグナル伝達系が知られている。そこで hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用が確認された有機スズ化合物の細胞内 cAMP 濃度を与える影響について検討を行ったが、細胞内 cAMP 濃度上昇作用は認められなかった (データは示さず)。したがって、有機スズ化合物による hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用は、cAMP を介した経路以外によるものと考えられた。

hCG β 遺伝子には 6 つのサブユニットが存在し、胎盤で主に発現しているのは hCG β 5 であると考えられている。hCG β 5 のプロモーター上には先に述べた cAMP 応答配列 (CRE) が存在することが良く知られているが、それ以外の転写調節機構については不明な点が多かった。しかしながら、hCG β 5 のプロモーター上に不完全ながら PPAR/RXR ヘテロダイマーや RXR ホモダイマーが結合するコンセンサス配列 DR1 を有しており、

また PPAR γ アゴニストまたは RXR アゴニストを処理することにより hCG 産生が上昇することが報告されている。一方で、アロマトラーゼ遺伝子は、非翻訳エクソンであるエクソン I と、共通の翻訳領域であるエクソン II~X とから構成され、非翻訳領域であるエクソン I が各々の組織によって異なっており、組織特異的に発現しているエクソン I がエクソン II に存在する共通のスプライシング部位と結合することで制御されている事が知られている。胎盤では主にエクソン I.1 が発現しており、RAR アゴニスト、RXR アゴニスト処理によりそのヒト胎盤細胞のアロマトラーゼ発現が上昇する事が知られている。また、卵巣においては、エクソン I の promoter II によってアロマトラーゼの発現が制御されており、ヒト顆粒膜細胞腫由来細胞のアロマトラーゼは PPAR アゴニスト、RXR アゴニスト処理によりその発現が顕著に抑制される事が知られている。さらに興味深いことに、ヒト顆粒膜細胞腫由来細胞においては、TBT および TPT によってもアロマトラーゼ mRNA の発現が抑制されることが報告されている。このような背景から、我々は有機スズ化合物の標的分子として PPAR γ および RXR に注目し、そのリガンドとしての可能性について検討を行った。その結果、hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用が確認された有機スズ化合物は、これら核内受容体のリガンドになることが明らかとなり、またこれら有機スズ化合物の RXR リガンドとしての親和性および転写活性化能と hCG 産生およびアロマトラーゼ活性上昇作用とは明らかな相関が認められた（データは示さず）。TBT や TPT は、この他にもヒト骨髓性白血病細胞株 HL-60 細胞に対する分化誘導作用や、マウスにおいて甲状腺ホルモン産生を抑制することなどが報告されているが、これらは RXR リガンドでも誘導されることから、有機スズ化合物はこれら

の核内受容体を介してその毒性を発揮するものと考えられた。

そこで次に、有機スズ化合物の他の内分泌機能への影響を検討すると共に、ヒトとラットの胎盤機能への影響についても比較検討した。その結果、有機スズ化合物はヒト胎盤の P450 $_{sc}$ 、3 β -HSD I、17 β -HSD I にも影響を与えることが確認された。一方で有機スズ化合物は、ラット胎盤の内分泌機能にも影響を与え、また P450 $_{sc}$ に対する作用はヒト胎盤に対する作用と正反対であったことから、同じ酵素に対しても種によってその作用が異なることが確認された。このような作用の違いは、前項でも述べたとおり、ラットとヒトで各分子のプロモーター領域の違いが考えられる。有機スズ化合物による作用は、RXR または PPAR γ を介して作用することが明らかであるため、各プロモーター領域の RXRE および PPAR 応答配列 (PPARE) の有無が、影響をあたえていると予想される。現に、その標的分子の一つである CRBP II がその典型的な例であることは、前項で述べたとおりである。

D-3 *in vivo*における化学物質の胎盤機能への影響について

*in vitro*における検討でヒトおよびラットの絨毛細胞株で顕著な作用を示した有機スズ化合物と DES について、*in vivo*での検討を行った。妊娠マウスの胎盤の遺伝子発現変動に与える各化合物の影響を検討する前に、まず各化合物の体内動態について検討を行った。腹腔内投与を行って検討した検結果、 $[^{14}\text{C}]$ -TPTOH は肝臓、膵臓、副腎、腎臓に多く移行することが示唆された。この結果は $[^{14}\text{C}]$ -TPTOH を経口投与した結果、肝臓、腎臓に多く移行したという過去の報告と一致するものである。また、 $[^{14}\text{C}]$ -TPTOH は投与後速やかに肝臓や腎臓に移行した後、代謝・排

泄され、その生体内半減期は24時間程度であった。さらに、胎盤においては投与後6時間でピークに達した後、経日的な減少が認められたが、投与後24時間では6時間と比べてもあまりその放射活性に差が認められなかった。胎盤では ^{14}C -TPTOHが移行した後、少なくとも投与後24時間まではほとんど ^{14}C -TPTOHが代謝を受けずに存在している（データは示さず）ことから、投与後24時間までにその影響が最大になる可能性が示唆された。一方で、胎児においては、投与後24時間で ^{14}C -TPTOHの大部分が代謝されているにもかかわらず、胎児における放射活性が144時間経過しても6時間の時とほとんど変化がないことから、 ^{14}C -TPTOHの代謝物が胎児に貯留していると考えられる。また、代謝物が胎盤関門を通り抜けることができないのであれば、 ^{14}C -TPTOHは代謝を受けない状態で胎児に移行した後、胎児の肝臓で代謝され、その代謝物が胎児に貯留している可能性が示唆された。

また今回 ^3H -DESについても妊娠マウスにおける体内動態を検討したが、 ^{14}C -TPTOHと同様に速やかに母体から排泄される一方で、投与後速やかに胎盤を通過して胎児へ移行し、そのまま蓄積する傾向が認められた。DESについては、過去に妊娠ラットを用いた検討が行われており、胎齢18~21日のラット胎児の肝臓においてはDESをほぼ完全に代謝するだけの代謝能を有する。今回の検討結果は、胎齢11日~12日目における検討であるが、 ^{14}C -TPTOH投与では24時間でほぼ ^{14}C -TPTOHが代謝されていることから、胎児の肝臓においてもすでに外来異物に対する代謝能が十分に備わっていると考えられる。また妊娠ラットを用いた検討において、胎齢18~21日のラット胎児中のDESは、静脈内投与後、3時間で約70%にまで減少し、残り

30%はグルクロニドかそれ以外の代謝物であることが報告されていることから、本研究で確認された胎児中に蓄積したDESはこれらの代謝物であると考えられる。したがって、DESの胎児に対する内分泌攪乱作用は、DESそのものではなく、DESの代謝物に由来するものである可能性も考えられた。

さらに本研究においては、妊娠マウスにおける各組織レベルでのTPTOHの影響を検討するため、RXR支配遺伝子であるCRABP IIの各組織における発現変動についても検討を行った。その結果、CRABP IIの発現変動は、RXRの発現量とTPTOHの移行量に依存していたが、その発現誘導は期待したほど顕著なものではなかった。先述のとおり有機スズ化合物は、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を投与しても、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。化学物質の毒性発現は、*in vitro*における検討のように単純なものではなく、化学物質の体内動態や標的臓器への移行性、排泄や代謝の速度にも依存するため、TPTOH投与による結果は、今回検討を行った投与量では、RXRおよびPPAR γ を介した内分泌攪乱作用を発現しないのかもしれない。現に、有機スズ化合物は非特異的な毒性が非常に強いいため、本実験では妊娠マウスの体重減少が起こらない限界の濃度を最高用量に設定している。しかしながら、ホルモンレセプターを介した内分泌攪乱問題においては、高用量の化学物質曝露による非特異的な毒性ではなく、低容量の慢性的な曝露による毒性が問題となっ

ているため、今回の検討のような化学物質を実験動物に投与することで変動遺伝子を検索し、表れたフェノタイプとの相関を検討することで、その毒性発現パターンを検証することは、困難であると言わざるを得ない。実験動物を用いた従来型の毒性試験はもちろん必須ではあるが、今後トキシコゲノミクス的な *in vitro-in vivo* 解析を行うためのデータベースの構築を行うためには、遺伝子発現変動とフェノタイプの相関がより明白に検討可能な毒性評価系の構築が必要不可欠であると考えられる。

D-4 RGDmAd を用いた胎盤特異的遺伝子導入法について

先述のとおり、化学物質を妊娠動物に投与することで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な検討が行われており、また PL II のプロモーターについては、これを用いたコンディショナル Tg 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。したがって、これらのプロモーターを利用した Tg マウスを作成することで、胎盤機能修飾による胎児への影響を検討することが可能であると考えられる。しかしながら遺伝子改変動物は、胎盤での遺伝子発現変動に伴うフェノタイプの検討に有効な手段であると考えられるが、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、

静脈内への投与を行った際の遺伝子導入においては肝臓への偏ったトロピズムが問題となっている。wAd は *in vitro* では CAR 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* におけるトロピズムも 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ンベース部分を改変し、CAR および α_v インテグリンと結合できない Ad においても、Ad のトロピズ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、組織特異的な遺伝子発現をさせるプロモーターを用いて如何に強力にコンディショナルな発現を実現させるかが問題となってくる。一方で、トロホプラストの子宮への浸潤は、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。トロホプ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、その種類は各々の形成過程によって異なる。しかしながら、 β_1 鎖や β_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が有効であると考えられた。現に、今回の検討で RGDmAd を用いて胎盤への遺伝子導入を試みた結果、RGDmAd は、wAd 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が、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ズムを示した結果、遺伝子導入効率が上昇したものと考えられる。

しかしながら RGDmAd と PL I および PL II プロモーター領域を用いて胎盤特異的遺伝子発現法の確立を試みたが、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、PL I および PL II プロモーターが機能できないこと、2) PL I および PL II 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 (*atRA*) 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 *atRA* 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 (データは示さず)。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 (データは示さず)。*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、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、PL I および PL II 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 PL II 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 γ 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 γ 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のように PPAR γ ホモ欠損マウスは生まれてこなかった (Table II)。今回の実験では、完全に出産した際のジェノタイプピングしか行っていないため、PPAR γ 発現 RGDmAd による PPAR γ 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、PL I と PL II 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 DESをはじめとするエストロゲン様化学物質および、有機スズ化合物などの化学物質により、ラットおよびヒトの絨毛細胞株の内分泌機能が修飾されることが明らかとなった。
- ② ERを介した作用を示すと考えられるエストロゲン様化学物質においても、内分泌機能によっては全く逆の作用を示すものが存在した。
- ③ ヒトとラットの絨毛細胞株では、同じ内分泌機能でも化合物によっては種間で全く逆の作用を示したり、一方のみにしか作用が認められないものが存在した。
- ④ 化学物質の中には、ヒトの胎盤または齧歯類の胎盤には存在しない機能に影響を与えるものが存在した。
- ⑤ ヒトとラットの絨毛細胞株では、ER α のスプライシングアイソフォームの発現が異なっていた。したがって、ヒトとラットの絨毛細胞株間で同じ化学物質に対する感受性が異なるのは、ER α の発現様式に起因する可能性が示唆された。
- ⑥ [^{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24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。[^3H]-DESについても同様の傾向が認められた。
- ⑦ 有機スズ化合物を曝露した際の妊娠マウスの各組織における遺伝子発現変動は、有機スズ化合物のレセプターであるRXRのその組織における発現量と有機スズ化合物の移行量に依存していた。しかしながら、有機スズ化合物は強力なRXRおよびPPAR γ リガンドであるにも関わらず、各組織レベルでの遺伝子発現変動は期待したほど顕著ではなく、化学物質を投与した際の遺伝子発現変動を指標とした毒性評価系では、その感度に疑問が残る結果となった。
- ⑧ 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、RGDmAdを作製し、胎盤への指向性を向上させることができた。
- ⑨ PL IおよびPL II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。
- ⑩ CMVプロモーター制御下でPPAR γ を発現するRGDmAdを、PPAR γ ヘテロ欠損マウス同士を交配させた妊娠マウスに投与しても、PPAR γ ホモ欠損マウスのレスキューは出来なかった。
- ⑪ ヒトアロマターゼタンパク質にEGFPを融合させたEGFP-アロマターゼ融合タンパク質は、通常のヒトアロマターゼタンパク質と

同等のアロマトラーゼ活性を保持していた。

- ⑫ PL I および PL II 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。

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

G-2. 学会発表

- 1) 化学物質の胎盤機能修飾による内分泌攪乱作用, 中西 剛, 平成17年衛生科学研究会・新年勉強会 (大阪), 平成17年1月

- 2) 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.
- 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, 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.
- 4) 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.
- 5) 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 (千葉), 平成16年10月
- 6) 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 (千葉), 平成16年10月
- 7) Effects of organotin compounds on endocrine functions of human placental cells., Nakanishi T, Itoh N, Tanaka K, 10th International Congress of Toxicology (Tampere, Finland), July, 2004
- 8) 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 (静岡),

平成16年6月

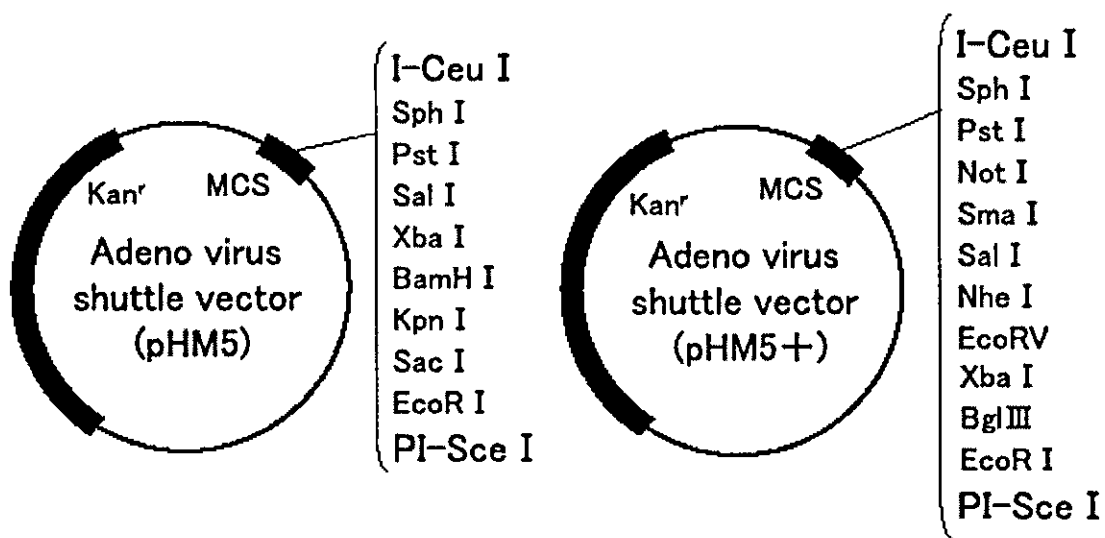
- 9) 有機スズ化合物のヒト胎盤機能修飾に関する妊娠マウスにおける Diethylstilbestrol (DES) の組織移行性・貯留性および、内分泌機能修飾に関する検討, 横山英明, 中西 剛, 石崎順一, 金子 真, 石村隆太, 伊藤徳夫, 田中慶一, 第6回日本内分泌攪乱化学物質学会(仙台), 平成15年12月.
- 10) ヒト胎盤における有機スズ化合物の内分泌攪乱作用およびその作用機構の解明, 中西剛, 廣森洋平, 横山英明, 小柳美穂子, 伊佐俊一, 伊藤徳夫, 西川淳一, 田中慶一, 第6回日本内分泌攪乱化学物質学会(仙台), 平成15年12月.
- 11) 内分泌攪乱物質と胎盤機能, 中西 剛, 第11回日本胎盤学会(ワークショップ;東京), 平成15年11月
- 12) Organotin compounds alter endocrine functions of human placental cells, Nakanishi T, Itoh N, Utoguchi N, Tanaka K, Society of Toxicology; 42nd Annual Meeting and ToxExpo (Salt Lake City, USA), March, 2003
- 13) ヒト胎盤のhCG産生とアロマトラーゼ活性に与える有機スズ化合物の影響, 廣森洋平, 中西剛, 伊藤徳夫, 田中慶一, 第5回日本内分泌攪乱化学物質学会(広島), 平成14年11月.
- 14) ヒト発生毒性における内分泌攪乱標的臓器としての胎盤に関する検討, 中西 剛, 第52回日本薬学会近畿支部総会・大会(日本薬学会近畿支部奨励賞 受賞講演;大阪), 平成14年10月
- 15) 環境化学物質のヒト胎盤機能修飾による内分泌攪乱作用の検討, 中西 剛, 伊藤徳夫, 宇都口直樹, 田中慶一, 胎盤オルガノイド研

究会/第5回バイオ胎盤シンポジウム(東京), 平成14年10月

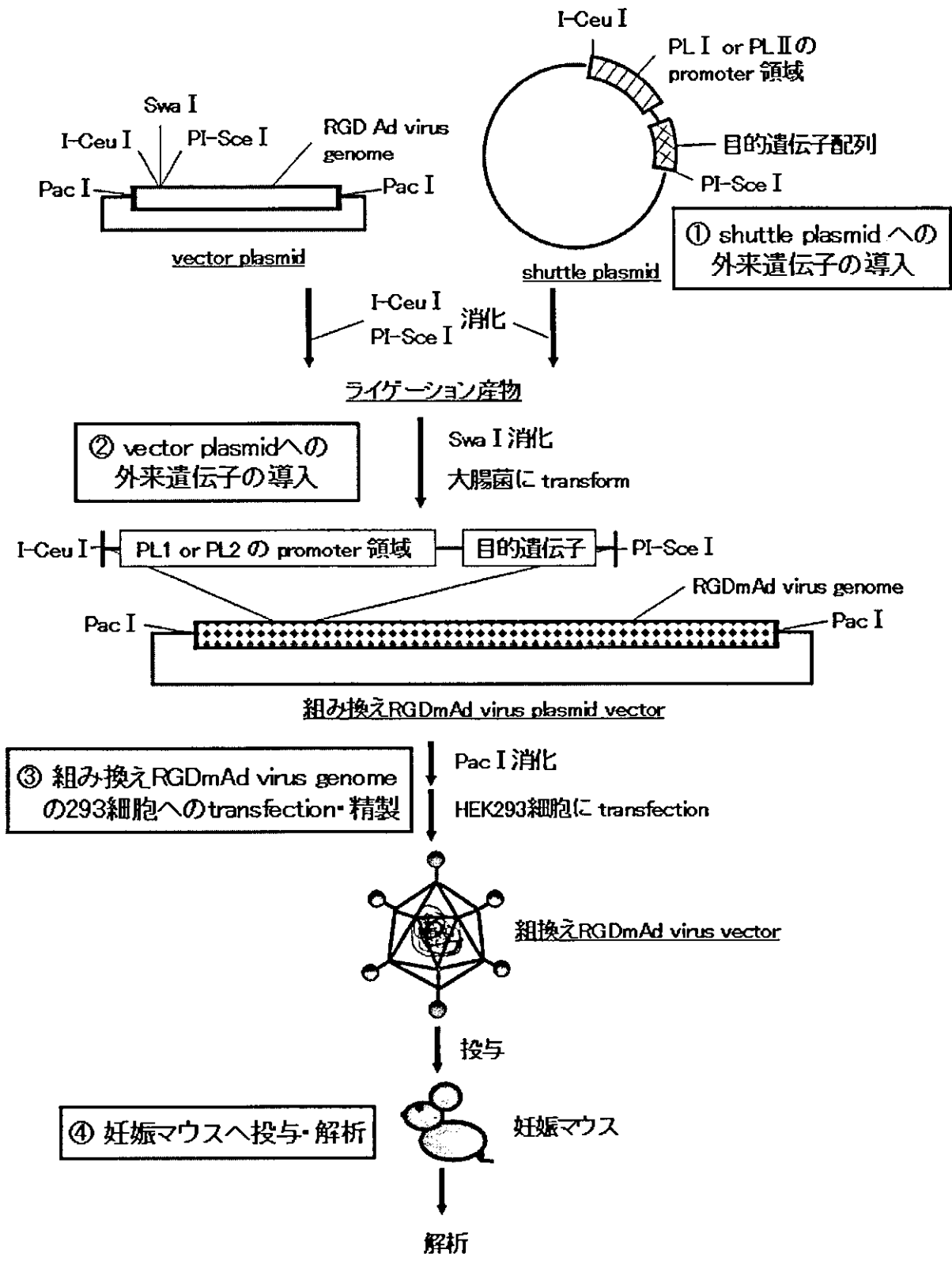
- 16) 有機スズ化合物のヒト胎盤機能修飾に関する検討, 廣森洋平, 中西 剛, 伊藤徳夫, 田中慶一, 第13回日本微量元素学会(千葉), 平成14年7月.

H. 知的財産権の出願・登録

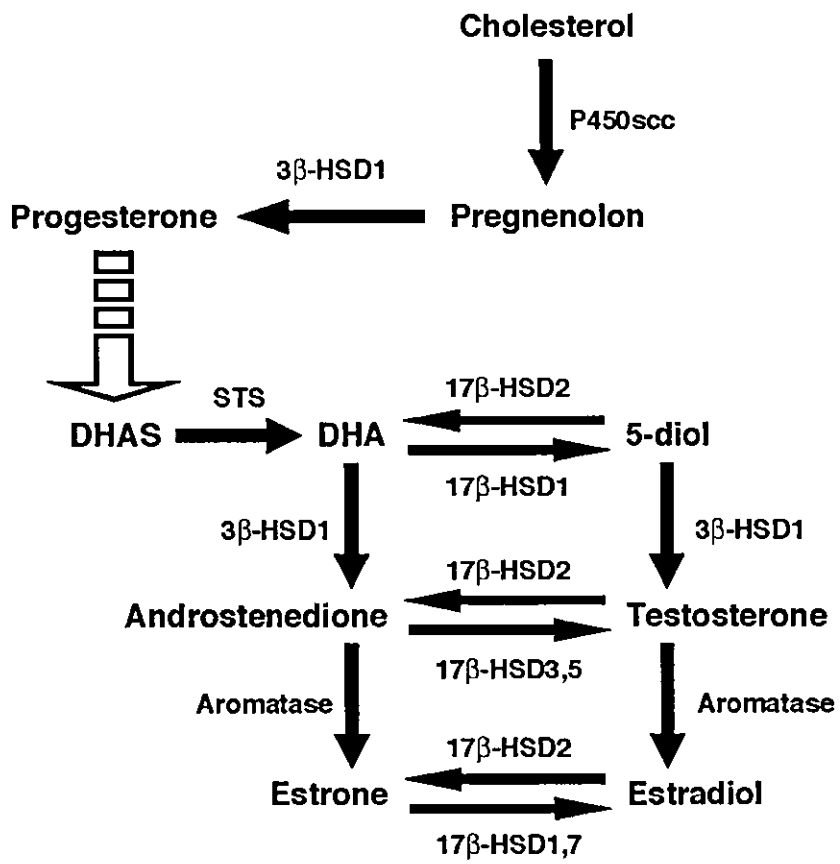
現段階においては、特に知的財産権の出願・登録はない。



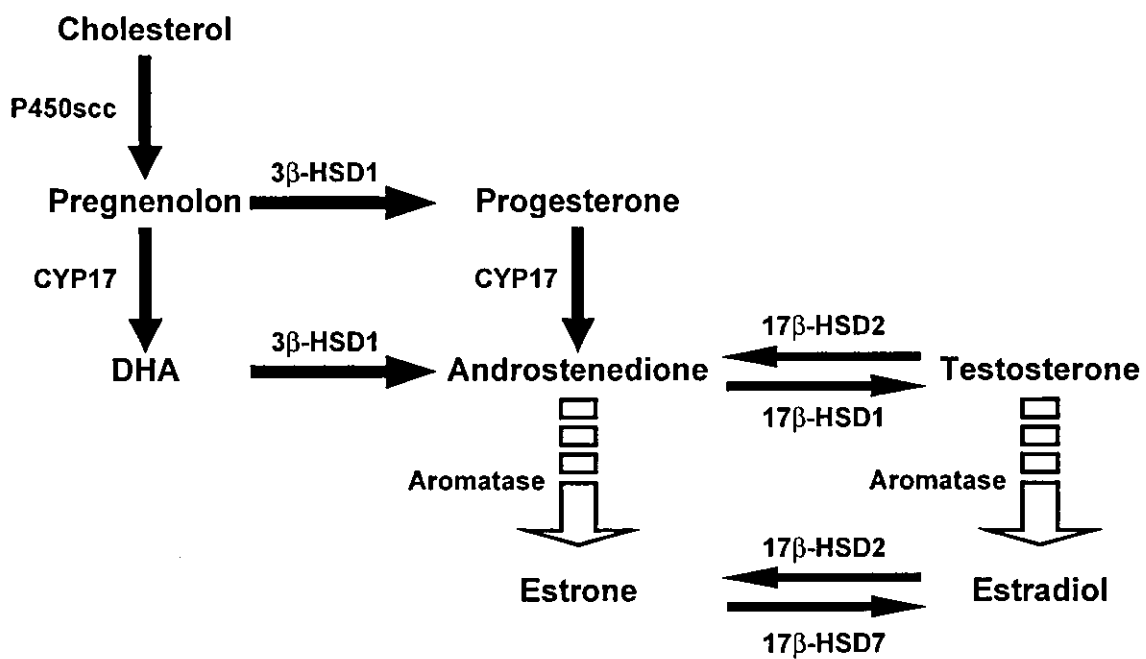
Scheme. 1. pHM5、pHM5+のマルチクローニングサイト (MCS) 図



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



Scheme. 3. Estrogen biosynthesis pathway in the human placenta.



Scheme. 4. Estrogen biosynthesis pathway in the placenta of rodents.

Table I. Affinity for hormone receptors and main use of various endocrine disruptors used in this research.

EDs	Main use	Affinity for HRs
diethylstilbestrol (DES)	medicine	ER
ethynyl estradiol (EE)	medicine	ER
cadmium (Cd)	component of plating	ER (?)
bisphenol A (BisA)	component of polycarbonate	ER
<i>p, p'</i> -DDT (DDT)	insecticide	ER
nonylphenol (NP)	surfactant	ER
octylphenol (OP)	surfactant	ER
butyl benzyl phthalate (BBP)	plasticizer	ER

Table. I. Effect of PPAR γ expression by RGDmAD in placenta on the lethality of PPAR γ -null mice.

Mouse No	Total	WT(+/+)	PPAR γ (+/-)	PPAR γ (-/-)
1	5	0	5	0
2	6	3	3	0
3	7	2	5	0