

環境中ホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響に関する研究

分担研究者 塩田 邦郎

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究要旨

妊娠母体に取り込まれた環境物質は、まずはじめに胎盤を構成する胎児由来細胞である栄養膜細胞に作用すると考えられる。核内受容体およびオーファン受容体を介した環境中ホルモン様物質の内分泌かく乱作用機序を解析する基礎を確立する目的で、胎盤における核内受容体の発現様式とその機能を解析した。核内受容体の異常な活性化が胎盤形成に及ぼす影響を見るために、まず、すでにその核内受容体が胎盤で発現していることが報告されているレチノイン酸(RA)の、*in vivo* および *in vitro* での影響を解析したところ、RA投与によって栄養膜巨細胞の分化が促進された一方で、海綿状栄養膜細胞の分化阻害が確認された。この結果は、RA受容体を活性化あるいは不活性化する環境物質が妊娠母体に取り込まれた場合に、胎盤形成に異常が現れる可能性を示唆する。以上の結果に加え、ベンゾピレンやダイオキシンの生体内受容体であるとされる AhR の、培養栄養膜幹細胞における発現を、RT-PCRにより解析すると同時に、その cDNA のクローニングを行い、報告にない新規の AhR アイソフォームを同定した。

A. 研究目的

環境物質は核内受容体と呼ばれる一群の分子を介して作用している可能性が示唆されている。環境物質によって引き起こされる核内受容体およびオーファン受容体の異常な活性化・不活性化が、発生途上の胎児・胎盤に重大な影響を及ぼすことが容易に予想される。胎盤の大部分を構成する栄養膜細胞は、妊娠期間を通じて、母体側体液に直接さらされる唯一の胎児由来細胞である。したがって、その意味では、環境物質が胎児・胎盤機能へ及ぼす影響を解析するためには、まず栄養膜細胞における核内受容体およびオーファン受容体の発現様式、およびその機能を詳しく知る必要がある。また、胎盤(栄養膜細胞)に

おける環境物質の代謝機能についてもほとんど知見が無く、研究の必要性が唱えられている。本研究の第一の目的は、核内受容体およびオーファン受容体の、胎盤における発現様式とその機能を解析し、これら受容体を介した環境中ホルモン様物質の内分泌かく乱作用機序を解析する基礎を確立することにある(塩田)。第二に、ビスフェノールAおよびノニルフェノールの代謝酵素を特定し、これらの環境中ホルモン様物質を解毒する能力がどの程度存在しているかを評価することを目的とする(横田)。

B. 研究方法

① すでにその核内受容体が胎盤で発現し

ていることが報告されているレチノイン酸(RA)の、株化栄養膜幹細胞(TS細胞)の分化に及ぼす影響を見る目的で、TS細胞を1 $\mu$ MのRA存在下で培養し、FACS解析およびNorthern hybridization解析を行った。

② in vivoでの栄養膜細胞の分化に対するRAの影響を解析する目的で、25オ g/g body weightのRAを、妊娠雌マウスに妊娠6.5日および7.5日に腹腔内注射し、8.5日に栄養膜細胞の分化マーカーである、PL-1および4311遺伝子をプローブとして用いた in situ hybridization解析を行った。

③ 核内受容体の一つで、ベンゾピレンやダイオキシンの生体内受容体であるとされるAhRの、TS細胞における発現を、RT-PCRにより解析した。

④ ③で得られたPCR産物を精製し、ICR系統由来AhRcDNAのクローニングを行った。

### C. 研究結果

① RA存在下ではDNA含量の高い細胞がより多くをしめることが明らかになった。海綿栄養膜細胞特異的遺伝子である4311およびCca4の発現はRA添加により減少していた。

② RAの腹腔内投与により、PL-1陽性細胞の数が明らかに増加した。一方4311陽性細胞の数はRA処理群で減少していた(図1)。

③ AhRの発現は、TS細胞の分化に伴い一過的に上昇するパターンを示した。

④ マウスAhR遺伝子にはC57BL/6タイプとDBAタイプの2種類が報告されているが、今回ICR系統由来TS細胞から単離されたAhR遺伝子は、これら両タイプの特徴的配列を合わせ持つ、第3のタイプであった(図2)。

### D. 考察

RAは、in vitroにおいてTS細胞の栄養膜巨細胞への分化を促進するとともに、海綿栄養膜細胞への分化に対しては抑制的に作用した。in vivoでも、RA処理による栄養膜巨細胞数の増加と海綿栄養膜細胞数の減少が観察され、前者の分化には促進的に、後者の分化には抑制的にRAが作用することを示唆する結果が得られた。これらの結果は、RA受容体に結合しそれを活性化あるいは不活性化する物質が妊娠初期の母体に進入した場合、胎盤の形成や機能に影響を及ぼす可能性があることを示唆する。

AhRの発現パターンは、海綿栄養膜細胞の分化・生存に必須な遺伝子であるMash2の発現パターンと類似しており、AhRが栄養膜細胞の分化過程において何らかの機能を果たしている可能性を示唆する。今後、ベンゾピレン存在下でTS細胞を培養し、その分化に及ぼす影響を解析したい。

### E. 結論

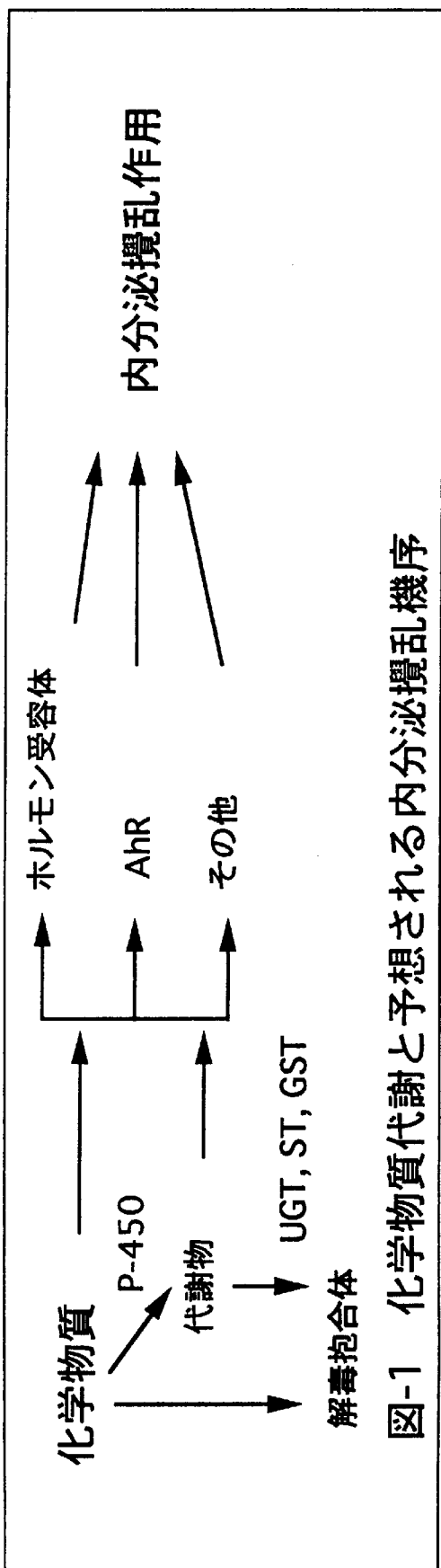
① レチノイン酸は、in vivoおよびin vitroの両方において栄養膜細胞の分化に大きな影響を及ぼした。これは、環境物質が胎盤の形成と機能に異常を及ぼす可能性を示唆する。

② AhRの発現、栄養膜細胞の分化に伴って変化した。したがって、AhRも栄養膜細胞の分化過程に何らかの役割を果たしている可能性がある。

### 研究業績

#### ① 学会発表

巖 軍麗・小田真由美・田中 智・塩田邦郎(東京大学・農学生命科学)栄養膜細胞幹細胞(TS細胞)におけるAhR発現の解析。第92回日本繁殖生物学会



1. BPA は生体内で 5-OH-BPA に酸化された。  
1966年 Knaak et al *Toxicol Appl Pharmacol*
  2. BPA は 5-OH-BPA、その後 BP-Quinone となり DNA と結合する。  
1995年 Atkinson et al *Biochim Biophys Res Commun*
  3. BPA はUGT2B1 により グルクロン酸抱合される。  
1999年 Yokota et al *Biochem J*
  4. BPA はラット肝灌流により80%以上がグルクロン酸抱合された。  
1999年 井上ら 環境ホルモン学会
  5. BPA の88%はラット糞中に抱合体として排泄されていた。  
1999年 根本ら 環境ホルモン学会
  6. BPA 投与後、ラット血漿中の90%がグルクロン酸抱合体であった。  
1999年 都田ら 環境ホルモン学会
- 図-2 ビスフェノールAの代謝に関する現在までの報告

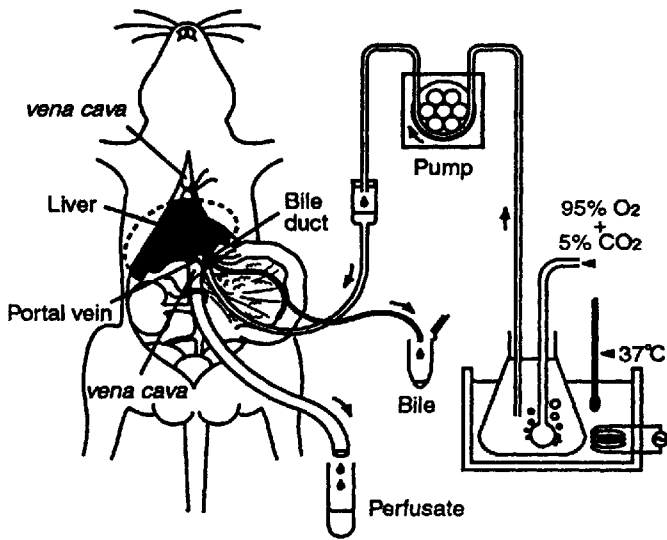


図-3

ビスフェノールA 肝灌流模式図

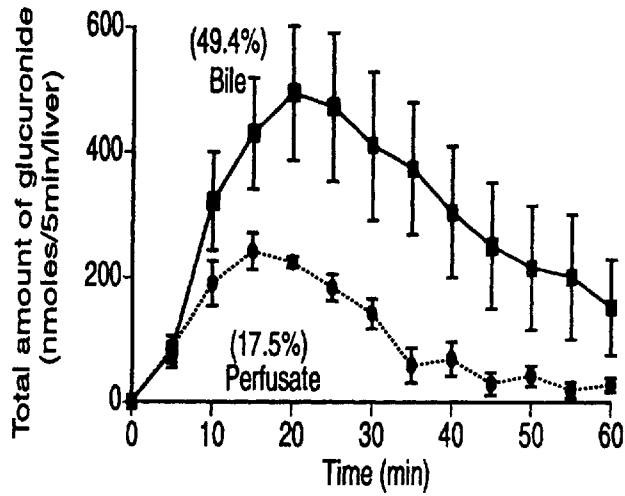


図-4

ビスフェノールAならびに抱合体量の経時的変化

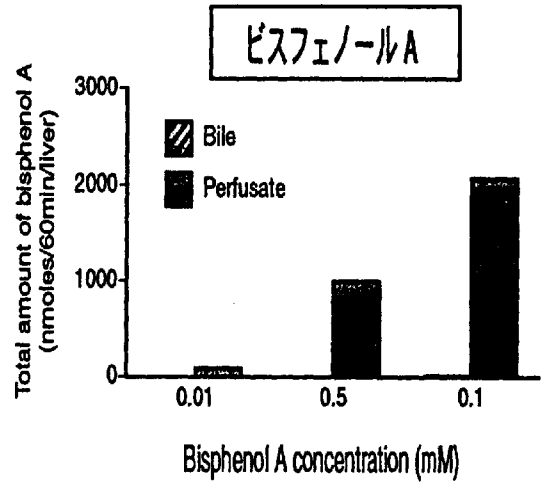


図-5 肝から胆汁・静脈へのビスフェノールAの排出

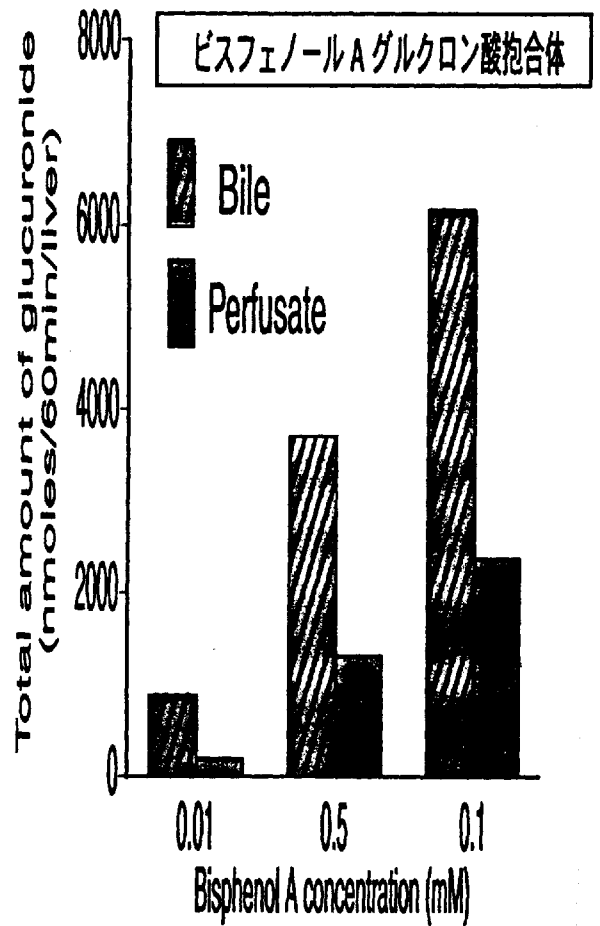


図-6 肝から胆汁・静脈へのビスフェノールA-グルクロン酸抱合体の排出

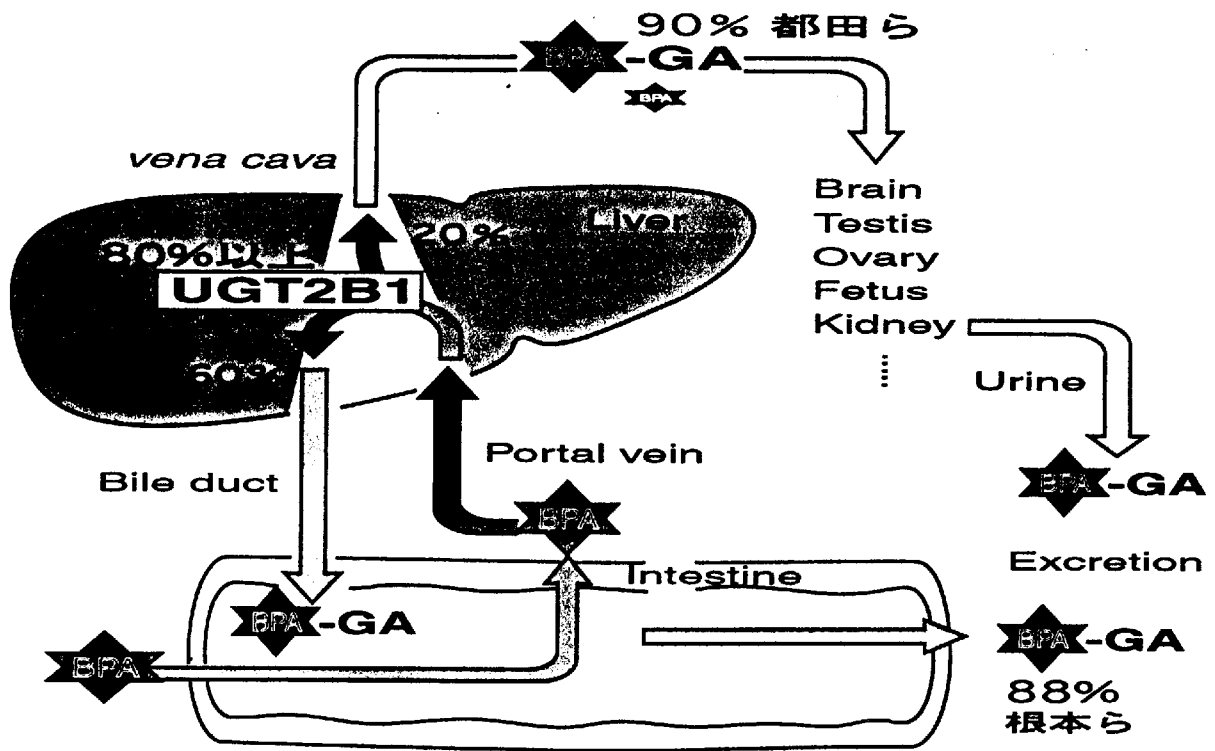


図-7 BPA の代謝模式図 (ラット)

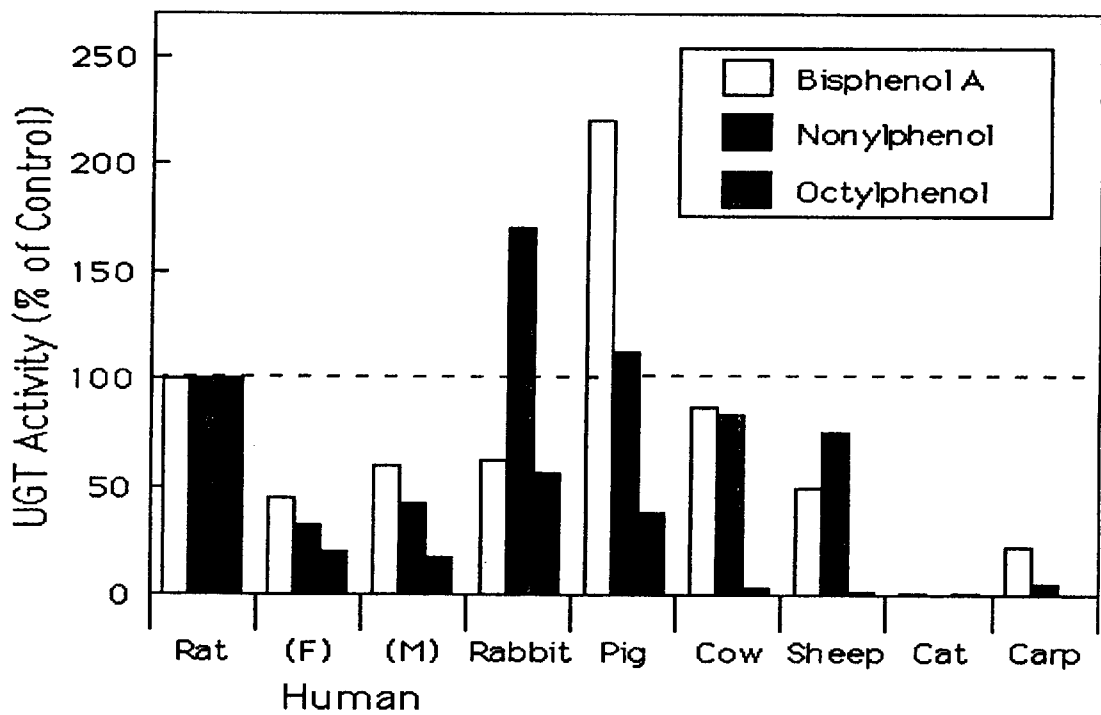
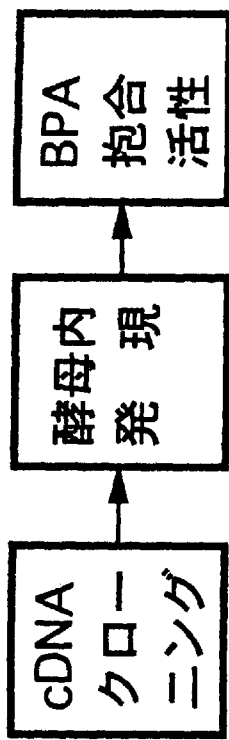


図-8

各種動物肝ミクロゾームによるビスフェノールA、ノニルフェノール、オクチルフェノールのグルクロン酸抱合活性



	cDNA	Expression	Activity
UGT2B4	Prep		
UGT2B7	Prep		
UGT2B10	Prep	Success	Slight
UGT2B15			
UGT2B17			

図-9 ヒトUGT2B 分子種特定の進捗現状

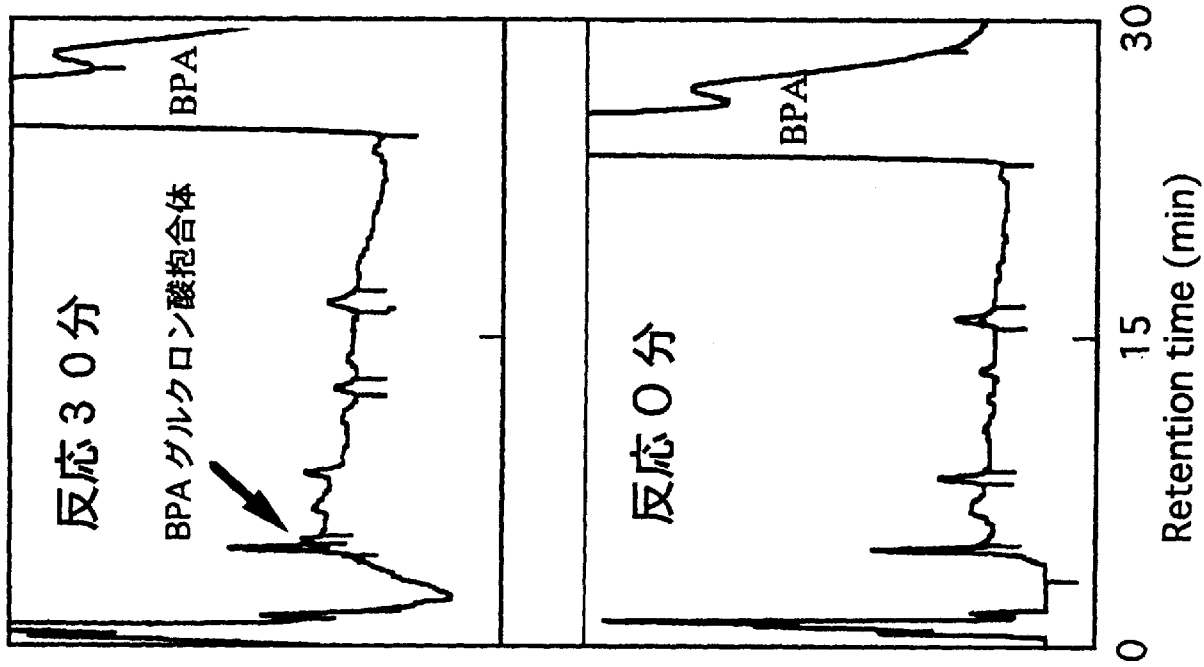


図-10 UGT2B10 での反応