

## 論文内容の要旨

論文題目：妊娠ラット肝、胎盤および胎児肝における Cytochrome P450 の発現動態

氏名：江尻 紀子

Cytochrome P450 (CYP) は生体内において非常に多くの内因性物質および外因性物質の第 I 相代謝にきわめて重要な役割を果たす酵素群であり、主として CYP1、2、3 family と CYP4 family の一部が毒性物質や薬物の代謝に関与している。CYP は主に肝で見い出されるが、肝以外の臓器でも、腎、副腎、肺、小腸、脳、皮膚、胎盤などに存在することが知られている。

ところで、ラットは胚毒性や胎児毒性の研究に繁用されているが、妊娠中の全期間を通じて胎児と母体をつなぐ重要な器官で、内分泌機能や代謝機能を備えている胎盤における CYP の発現に関する報告はごく少なく、また、妊娠中の母体、胎盤および胎児のそれぞれの間での薬物代謝の流れを理解するためには、母体肝、胎盤および胎児肝での CYP の発現状況を明らかにすることが必要である。

こうした背景の下、本研究では、まず、正常妊娠ラット胎盤における CYP タンパクの発現状況を妊娠全期間を通じて経時的に検索した。ついで、その結果に基づいて CYP 誘導剤を用いた母体肝、胎盤および胎児肝における CYP タンパクの誘導実験を行った。さらに、CYP 誘導剤を用いた場合の母体肝、胎盤および胎児肝における第 I 相薬物代謝酵素関連遺伝子 (CYP)、第 II 相薬物代謝酵素

関連遺伝子 (GST および UDPGT) の発現プロファイルについて検索を行った。加えて、orphan nuclear receptor にも着目してデータ解析を行った。orphan nuclear receptor は近年注目されてきている核内受容体で、PCN 投与により Nr1i2 が誘導され、これにより CYP3A subfamily が誘導されると言われている。また、PB 投与により Nr1i3 が誘導され、CYP2B subfamily が誘導されると言われている。得られた結果は下記の通りである。

(1) 正常妊娠ラット胎盤を対象に、入手可能な 9 種類の CYP 抗体 (CYP1A1、CYP2B1、CYP2C6、CYP2C12、CYP2D1、CYP2D4、CYP2E1、CYP3A1 および CYP4A1) を用いて Western blot 解析および免疫組織化学的検索を行った。その結果、CYP3A1 タンパクのみが妊娠の全期間を通じて胎盤の栄養膜細胞層に存在する巨細胞の細胞質に存在することが示された。

(2) 胎盤に常在することが示された CYP3A1 タンパクを誘導する薬剤、dexamethasone (DEX) および pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) を 1 (16DG) ないし 4 日間 (13-16DG)、妊娠ラットに投与し、母体肝、胎盤および胎児肝を対象に、CYP3A1 抗体を用いて Western blot 解析および免疫組織化学的検索を行った。Western blot 解析の結果、母体肝および胎児肝では、DEX および PCN 投与により、CYP3A1 タンパクの著しい誘導が認められた。母体肝に比べ、胎児肝では、より顕著な誘導が認められた。胎盤では、PCN の 4 回投与群でのみ対照群と比べて有意な CYP3A1 タンパクの誘導が認められた。免疫組織化学的には、母体肝および胎児肝では、対照群に比べ、CYP3A1 陽性肝細胞領域が著しく拡大したが、胎盤では、CYP3A1 陽性領域および発現部位に変化は認められなかった。

(3) 広範な薬物代謝酵素を誘導する薬剤として知られる PB を妊娠ラットに 4 日間 (13-16DG) 投与し、母体肝、胎盤および胎児肝について 9 種類の CYP 抗体を用いた Western blot 解析および免疫組織化学的検索を行った。Western blot 解析では、母体肝では PB 投与により CYP3A1 タンパクの発現が増加した。CYP2B1 タンパクは対照群では発現がみられなかったが、PB 投与群では著しい発現が認められた。CYP2D1 タンパクについては発現が減少した。他の CYP 種には有意な変化は認められなかった。胎盤では、CYP3A1 タンパクの発現のみが観察されたが、PB による有意な誘導は認められなかった。胎児肝では、Western blot 解析でのみ CYP3A1 および CYP2C6 タンパクの有意な誘導が観察されたが、

その発現は弱かった。免疫組織化学的検索では、母体肝では、CYP3A1 陽性肝細胞領域の拡大が観察され、CYP2B1 陽性肝細胞も認められるようになった。CYP2D1 は免疫組織化学的にも染色性の減弱が認められた。他の CYP 種についても、Western blot 解析と一致する結果が得られた。胎盤では Western blot 解析の結果と同様、CYP3A1 タンパクのみが認められ、また、発現部位に変化はなく、栄養膜細胞層の巨細胞に陽性像が認められた。胎児肝では、Western blot 解析で陽性を示した CYP3A1 および CYP2C6 について免疫組織化学的検索では明瞭な陽性像は観察されなかった。

(4) PCN あるいは PB を 4 日間 (13~16DG) 投与した妊娠ラットの母体肝、胎盤および胎児肝を対象に、40 種類の CYP 遺伝子、16 種類の GST 遺伝子、11 種類の UDPGT 遺伝子および 2 種類の CYP 誘導遺伝子 (orphan nuclear receptor 遺伝子) の発現について、DNA microarray 法を用いて検索を行った。40 種類の CYP 遺伝子のうち、母体肝では CYP3A subfamily および CYP2B subfamily に属する遺伝子を中心に、PCN 群では 12 種類および PB 群では 9 種類の遺伝子発現の有意な増加が認められた。胎盤では、有意な変化を示す遺伝子はほとんど認められず、PB 群で Cyp3A1 遺伝子のみが有意な増加を示した。また、PCN 群では、Cyp3A1 遺伝子は増加する傾向にはあったが、有意な変化は認められなかった。胎児肝では CYP3A subfamily および CYP2B subfamily に属する遺伝子を中心に、PCN 群で 4 種類および PB 群で 4 種類の遺伝子発現の有意な増加が認められた。第 II 相代謝系の GST 酵素遺伝子および UDPGT 酵素遺伝子では、母体肝と胎児肝で誘導される遺伝子の種類が多く異なっており、母体肝と胎児肝の薬物誘導能の違いが示唆された。胎盤では有意な変化は認められなかった。orphan nuclear receptor 遺伝子の発現については、Nr1i2 遺伝子が PCN 群の母体肝でのみ有意な発現の増加を示し、Nr1i3 遺伝子の発現についてはすべての群で変化がみられなかった。

以上の結果から、胎盤では CYP3A1 が栄養膜細胞層の巨細胞の細胞質に常在していることが明らかとなり、CYP3A1 が妊娠期間を通じて CYP による薬物代謝システムの主要な構成要素であると考えられた。胎盤で発現する CYP3A1 は、誘導剤の投与により若干の誘導を受けるが、母体肝および胎児肝で認められる程明らかではなく、また、広範な薬物代謝酵素誘導剤である PB の投与によっても、胎盤では他の CYP 種が発現することはないことが明らかとなった。また、

母体肝と胎児肝については、その薬物代謝能に、第Ⅰ相および第Ⅱ相ともに大きな差があることが明らかとなった。さらに、妊娠ラットにおける母体肝、胎盤および胎児肝における薬物代謝酵素関連遺伝子の発現プロファイルが明らかとなった。

本研究の成果は、妊娠動物における薬物代謝の基礎資料として極めて重要で、胎児毒性や催奇形性等の発生毒性の研究の展開に大きく寄与するものと考えられる。