

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	レチノイン酸の濃度変化を引き起して催奇形性を示す化学物質のスクリーニング法の開発と催奇形性発症の分子機構の解明 (課題番号：1402) (研究期間：平成26年度～平成27年度)
主任研究者名	研究者名：永田 清 所属機関：東北薬科大学（現 東北医科薬科大学）

我々の生活において、農薬や食品添加物等のばく露によって引き起こされる催奇形性発症の原因を、組織中のレチノイン酸濃度の変動に影響を与える合成・代謝系酵素活性に焦点を当て、催奇形性を示す化学物質の構造的特徴と発症の種差の原因及び分子機構を明らかにすることを目的として研究を実施した。

レチノイン酸合成酵素RALDH及び分解酵素CYP26発現アデノウイルス発現系を完成させた。これらの活性測定のための最適な培養細胞を調べ、内因性のこれら酵素の発現が少ないHeLa細胞を用いることとした。代謝物を測定するためにULPC-MC/MCを用いたが、基質濃度は5 mMが限界量であることが判明した。今回、入手可能な19種類のアゾール系農薬と代表的なアゾール系抗菌薬（ケトコナゾール）を用いた活性阻害実験で薬物代謝酵素P450においては、強い阻害が認められた。しかし、CYP26A1については、タラロゾールのみで比較的強い阻害が認められたものの（活性阻害定数 IC_{50} ：2 μ M）、他のものは阻害しなかった。また、ケトコナゾールもCYP26A1活性を強く阻害する（ IC_{50} ：0.55 μ M）と報告されているが、本実験では10 μ Mでも全く阻害が認められなかった。アゾール化合物によるこれら酵素の遺伝子発現への影響について、mRNA量の変動を調べた。レチノイン酸ほどではないが、いくつかのアゾール化合物によって、CYP26A1遺伝子の転写活性化が認められ、特にタラロゾールで強かった。逆にRALDHでは、いくつかのアゾール化合物によって、約半分ほどの転写活性化の抑制が認められた。これらの結果から、アゾール系農薬による催奇形成発症は、レチノイン酸分解酵素であるCYP26活性阻害により、組織のレチノイン酸濃度が高くなり、その後この酵素が誘導されて逆にレチノイン酸濃度が低下することが原因であると予測していたが、組織のレチノイン酸濃度については、その合成分解酵素活性の阻害以外に酵素発現量の変動によってもたらされる可能性が考えられた。

組織におけるレチノイン酸濃度はULPC-MC/MCによる測定が難しいため、本研究ではレポーターアッセイ法を応用して濃度変動を測定する試みを行った。そのためにレチノイン酸にて強く転写活性されるHoxA1、HoxA2及びCYP26A1遺伝子のプロモーター遺伝子を単離し、レポータープラスミド構築を完了した。しかし、HoxA1、HoxA2レポータープラスミドでは強い誘導は認められなかったが、CYP26A1レポータープラスミドでは強い誘導が認められた。より感度を上げるために人工的なRXR結合配列をこのプラスミドに挿入し、10倍ほど誘導が強いレポータープラスミドを作成した。このレポータープラスミドとレチノイン酸合成酵素RALDH及び分解酵素CYP26発現アデノウイルス発現系を併用することにより1-10 nM濃度にてレチノイン酸の濃度変化を検出可能なレポーターアッセイ法を樹立した。さらに、これをアデノウイルスに組み、マウスに投与して発現するか検討したところ、肝臓及び脳にてレポーター活性が検出された。タラロゾール（5 mg/kg）及びWIN18446（4 mg/body）をICR妊娠マウスに投与すると、奇形胎児数は有意に増加した。特に、鼻の形成不全及び口唇裂が、両群で高頻度に認められた。その他、散発的に眼瞼、水晶体の形成異常、多指症、短尾・曲尾が両群で認められた。

本研究では、化学物質によるレチノイン酸合成酵素RALDH及び分解酵素CYP26活性阻害評価システムの構築および組織における非常に低いレチノイン酸濃度変動を測定するためのCYP26A1レポータープラスミドの構築に成功し、これらを併用することにより1-10 nM濃度にてレチノイン酸の濃度変化の測定に成功すると同時に、化学物質投与による奇形胎児発症のモデルを構築することにも成功した。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	レチノイン酸の濃度変化を引き起して催奇形性を示す化学物質のスクリーニング法の開発と催奇形性発症の分子機構の解明 (研究期間：平成26年度～平成27年度)
主任研究者名	所属：東北薬科大学（現 東北医科薬科大学） 氏名：永田 清（研究課題番号：1402）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間 平成26年度～平成27年度

2 研究目的

本研究では、我々の生活において、農薬や食品添加物等のばく露によって引き起こされる催奇形性発症の原因を、組織中のレチノイン酸濃度の変動に影響を与える合成・代謝系酵素活性に焦点を当て、催奇形性を示す化学物質の構造的特徴と発症の種差の原因および分子機構を明らかにすることを目的としている。

レチノイン酸と催奇形性の関連について

胎児幹細胞の各臓器への分化誘導にWntやHoxなどの転写因子が重要な働きをしており、催奇形性の発症の多くは、これらの発現が変動するために起こることが予測されている。近年、これらの遺伝子の中でもHox遺伝子は、4つのクラスター遺伝子群を形成しており、その発現は、胚の発生過程において、時期および部位特異的な分化に強く関わっていることが解ってきた。また、この遺伝子群は、ビタミンA活性体のレチノイン酸がRetinoic Acid Receptor (RAR)/Retinoid X Receptor (RXR)ヘテロダイマーあるいはRXRホモダイマーを活性化することで、発生の時間軸に従って転写活性化されることが明らかになっている。従って、ビタミンAの過剰投与によって発症する催奇形性は、これらのレセプターを介してHoxの発現量が増大するためと考えられる。

実際に妊娠母獣にレチノイン酸を投与すると、中枢神経系、顔面奇形、鰓弓奇形、眼奇形、中軸骨格の奇形、四肢の奇形など、70種類以上の奇形を生じることが知られている。また、ヒトにおいてもビタミンAの過剰摂取は、催奇形性を示すことはよく知られており、実際にニキビ経口治療薬であるイソトレチノイン(ビタミンAの誘導体)の投与を受けていた母親は、奇形の子供を出産する危険性が高くなるとの報告もある。逆に、ラットのビタミンA欠乏状態は、胎児に無眼症、小眼症などの眼の奇形、神経系の奇形、中軸骨格異常などが生じると報告されている。

一方、抗てんかん薬による催奇形性は、レチノイン酸の濃度を変動させることが原因であるとの報告がなされている。さらに、抗真菌薬あるいは農薬として用いられているイミダゾールあるいはトリアゾール含有化合物は、ラットやマウスで催奇形性を発症することが報告されているが、これは、レチノイン酸の代謝酵素活性を阻害することにより、レチノイン酸の濃度が組織に於いて過剰となるためと考えられている。

レチノイン酸の組織濃度変動を起こす要因について

活性体のレチノイン酸は、ビタミンAがアルコール脱水酵素であるretinol dehydrogenase (RDH)によりレチナールへ、そしてさらにアルデヒド脱水酵素であるretinaldehyde dehydrogenase (RALDH)により生合成される。そしてこの活性体は、cytochrome P450(P450)遺伝子ファミリー中のCYP26分子種により代謝不活性化される。

従って、化学物質投与による組織中のレチノイン酸の濃度が変動する最も大きな原因の一つに、これらの酵素活性阻害が考えられる。先に述べたイミダゾールあるいはトリアゾール含有化合物は、ラットやマウスにて催奇形性を示すと報告されているが、これらの構造を含む薬は、肝臓に主に存在し薬物代謝に関わるP450を強く活性阻害することがよく知られており、CYP26分子種の酵素活性も強く阻害すると考えられている。一方、CYP26遺伝子は3つ存在するが、CYP26A1とCYP26B1遺伝子はレチノイン酸によって強く転写活性化されることが解っている。近年、ビタミンAの過剰摂取による催奇形性は、これらの遺伝子が転写活性化され、レチノイン酸の代謝分解が亢進し、結果的に分化発生過程の組織において、レチノイン酸の欠乏状態を引き起こすために発症すると報告された。この実験結果は、それまで考えられた説を覆すものであるが、過剰摂取によって発症する未発育の催奇形性を説明するには、都合の良いものである。いずれにしろビタミンAが関わる催奇形性は、胎児の分化組織中のレチノイン酸の濃度変動に強く依存することは明らかであるために、本研究では、レチノイン酸の合成・代謝酵素活性阻害を引き起こす化学物質に焦点を当て行う。

必要性

催奇形性を示す化学物質は2,000種類以上が明らかになっているが、生殖発生毒性試験では、動物種間で毒性発現が大きく異なる種差が存在すること、また、長期にわたって投与すると多様な臓器発生異常が観察されるが、それが有意な催奇形性とならない場合があり、個体差が存在することなどが大きな問題となっている。このようなことから化合物による催奇形性発症の予測は難しく、また、その分子機構が不明であるため動物実験の結果をヒトに外挿することができない。従って、現在催奇形性発症の分子機構を明らかにすることが強く求められている。

先に述べたように化学物質による催奇形性発症の分子機構は、臓器の分化過程において、組織内のレチノイン酸の濃度が変動することがその一要因と考えられる。従って、どのような分子機構によりこの濃度変動を引き起こすのか、そして、それがどのような化学構造のものであるかを明らかにすることが、化学物質の催奇形性発生に対するリスク評価として極めて重要である。

期待される成果

化学物質による催奇形性発症の詳細な分子機構が解っていないために、実験動物のデータをヒトに外挿することは現状では困難である。申請者は、化学物質による催奇形性発症の分子機構として、レチノイン酸の合成・代謝酵素活性阻害により濃度変動が生じ、それに伴い胚の発生過程の時間軸に従ったHox遺伝子群の発現が乱されるためと考えている。また、催奇形性発症は、レチノイン酸組織中の濃度過剰、あるいは不足に起因するのか、現在のところ明らかとなっていない。

本研究において、レチノイン酸の合成・代謝酵素活性阻害評価のための簡便なスクリーニング系および濃度の測定可能なレポーターアッセイ系が確立され、この仮説が立証されれば、化学構造から実験動物のみならず、ヒトにおける化学物質による催奇形性発症のリスクを予測することが可能となり、化合物による催奇形性発症を未然に防ぐことが期待される。

また、将来的には、レチノイン酸の濃度変動と各Hox遺伝子群の発現との関係を解き明かすことで、化合物による各種の催奇形性発症の詳細な分子機構の解明が期待される。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
アッセイ系の構築	CYP26およびRALDH酵素の発現・抑制システム系およびレチノイン酸レポーターアッセイ系構築	永田 清（東北薬科大学）
化学物質のスクリーニング	酵素活性阻害を示す農薬や食品添加物等のスクリーニング	吉成浩一（静岡県立大学）
催奇形性発現手法の構築	レチノイン酸合成・代謝酵素発現抑制による催奇形性の確認	八田稔久（金沢医科大学）
レチノイン酸濃度と催奇形性	催奇形性を示したマウス臓器細胞のレチノイン酸濃度測定と統括	永田 清（東北薬科大学）

4 倫理面への配慮について

研究は基本的に、本邦における「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日）（平成16年12月28日全部改正）（平成17年6月29日一部改正）（平成20年12月1日一部改正）文部科学省 厚生労働省 経済産業省」に沿って行われる。また、実験動物使用については、東北薬科大学薬学部・大学院薬学研究科倫理委員会の承認を受けている。また、これらのガイドラインで対応できない場合は、文部科学省及びその関連機関に問い合わせた後に東北薬科大学薬学部・大学院薬学研究科倫理委員会に報告し、その対処方法を検証する。

なお、本申請を遂行するにあたり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究は含まれない。

II 研究内容及び成果等

(1)

1) 研究項目名：アッセイ系の構築

個別課題名：CYP26およびRALDH酵素の発現・抑制システム系およびレチノイン酸レポーターアッセイ系構築（研究者名：永田 清（東北薬科大学））

研究目的・手法：レチノイン酸の代謝P450であるマウスCyp26a1, Cyp26b1およびヒトCYP26A1, CYP26B1のアデノウイルス発現系を作製する。また、RALDH1とRALDH2についても同様に発現系を作製する。酵素活性評価は、HPLCあるいはLC/MS/MSを用いてレチノイン酸および代謝産物の濃度を測定することで行う。十分な活性が得られた酵素発現細胞は、マイクロウェルを用いて活性阻害測定の高スループット化する。

レセプターRAR/RXRによって転写活性化される遺伝子のプロモーター遺伝子を単離し、レポータープラスミド構築する。そして、培養細胞の染色体にこのレポータープラスミドDNAを挿入し、レポーター安定発現細胞株の樹立を行う。

HPLCによって測定した細胞中のレチノイン酸濃度とレポーター活性強度との関係を明らかにし、レポーター活性測定によるレチノイン酸の濃度測定手法を開発する。さらに、活性阻害測定の高スループット化を行う。

また、*in vivo*でもレポーター活性が測定可能なレポーター発現アデノウイルスを製する。これと同時に蛍光タンパク質発現ウイルスも同様に作製する。

「研究成果」

CYP26A1活性評価系の構築

CYP26A1発現アデノウイルスを用いたCYP26A1発現系の構築

本研究を行うに際し、ヒト子宮頸がん由来細胞（Hela細胞）およびCYP26A1発現アデノウイルス（Ad-CYP26A1）を用いてCYP26A1の発現系の構築を行った。

Hela細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間後にAd-CYP26A1を1 MOI、3 MOI、10 MOI、30 MOIで1時間強の感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μ L を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、CYP26A1の基質である*all-trans* retinoic acid (atRA) 20 μ M含有培地を添加し、5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて4-Hydroxy retinoic acid (4-OHRA) の生成活性測定を行った結果、Ad-CYP26A1のMOI依存的なCYP26A1活性の上昇が認められた(Fig. 1)。また、感染させていない群のバックグラウンドの値を測定の値から差し引き、活性値とした。次に、CYP26A1のタンパク質の発現をWestern blotting 法により確認した。細胞の播種、アデノウイルスの感染方法は活性の測定と同様に行い、感染量を0 MOI、3 MOI、10 MOI、30 MOIとした。このAd-CYP26A1感染細胞を48時間培養後に回収し、CellLyticM により細胞質タンパク質を抽出した。その結果、CYP26A1の分子量である約56 kDa付近にバンドが検出された。以上の結果から、今回使用したAd-CYP26A1は、そのMOI依存的なCYP26A1活性およびCYP26A1タンパク質発現量の上昇が確認された(Fig. 2)。

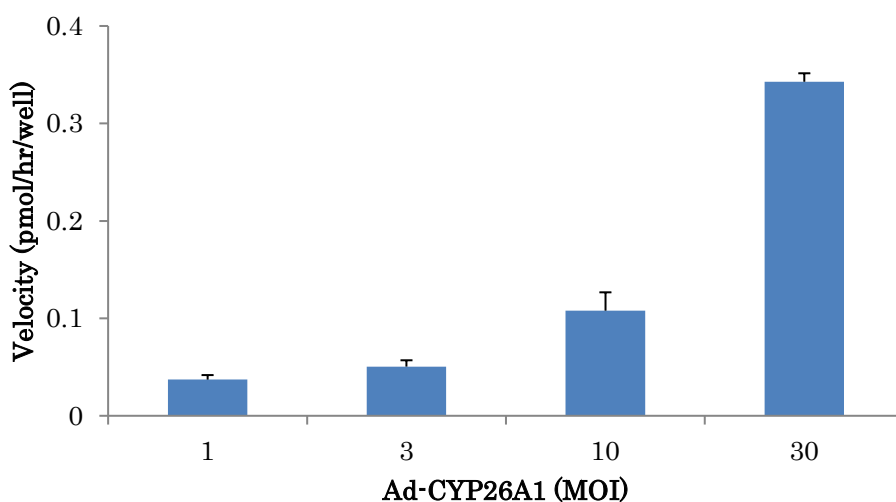


Fig. 1. Enzymatic activity of CYP26A1 in HeLa cells infected with Ad-CYP26A1.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26A1 (MOI of 1, 3, 10, or 30). After 72 h, the cells were incubated with 20 μ M *all-trans* retinoic acid for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

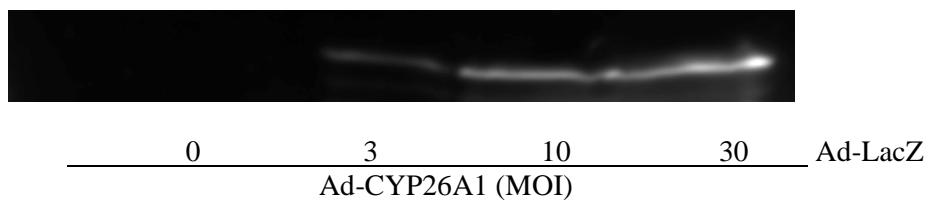


Fig. 2. Detection of CYP26A1 protein expressed in HeLa cells infected with Ad-CYP26A1 by immunoblot analysis.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26A1 (MOI of 3, 10 or 30). After 48 h, the cells were lysed in CelyticM. CYP26A1 proteins were detected by immunoblot analysis.

CYP26A1活性評価系の至適条件検討

前項の検討から、Ad-CYP26A1感染HeLa細胞においてCYP26A1活性およびタンパク質の発現が確認できたことから、CYP26A1活性評価系の構築のために、細胞数、Ad-CYP26A1 MOI数、基質添加後の反応時間の詳細な条件検討を行った。

HeLa細胞を48-well plate に 1×10^4 cells/well と 3×10^4 cells/wellで播種し、48時間後にAd-CYP26A1を1 MOI、3 MOI、10 MOI、30 MOI、50 MOIで1時間の強感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μ L を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、CYP26A1の基質である atRA 5 μ M含有培地を添加し、3時間または5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて活性測定を行った。また、感染させていない群のバックグラウンドの値を測定の値から差し引き、活性値とした。その結果、細胞数、Ad-CYP26A1 MOI数、基質の反応時間に依存的なCYP26A1活性の上昇が認められた(Fig. 3)。本検討から、十分な活性が得られ、且つ、Ad-CYP26A1感染による細胞に対する影響の少なかった細胞数 (3×10^4 cells/well)、Ad-CYP26A1 MOI数 (50 MOI)、反応時間 (5時間) を評価系の各条件として設定することとした。

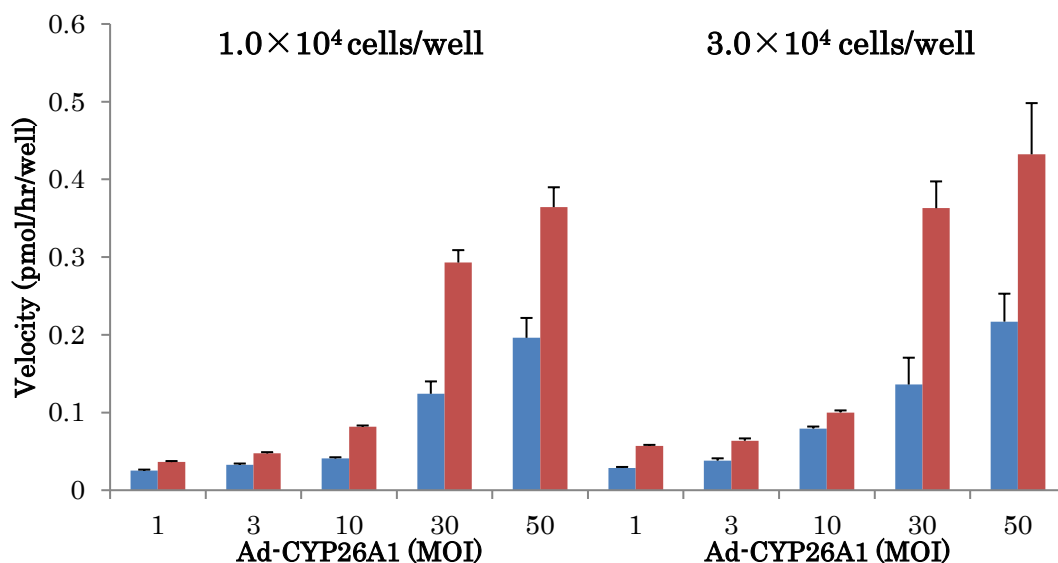


Fig. 3. Effects of cell density and reaction time on CYP26A1 activities in HeLa cells infected with Ad-CYP26A1.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 1×10^4 cells/well or 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26A1 (MOI of 1, 3, 10, 30, or 50). After 72 h, the cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ *all-trans* retinoic acid for 3 h or 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=2).

CYP26A1活性評価系を用いた酵素速度論的解析

前項の検討より、CYP26A1活性評価系を確立したことから、本評価系を用いてatRA代謝の酵素速度論的解析を行った。HeLa細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間後にAd-CYP26A1を50 MOIで1時間の強感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μL を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、atRA 1.0 μM 、2.0 μM 、5.0 μM 、10 μM 、20 μM 、40 μM 含有培地を添加し、5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて活性測定を行った。その結果、CYP26A1によるatRAの代謝速度は、Michaelis-Mentenの式に従うことが示された(Fig. 4)。Hanes Woolfの式を用いてKmおよびVmaxを算出したところ、それぞれ4.37 μM 、0.785 pmol/hr/wellであった。

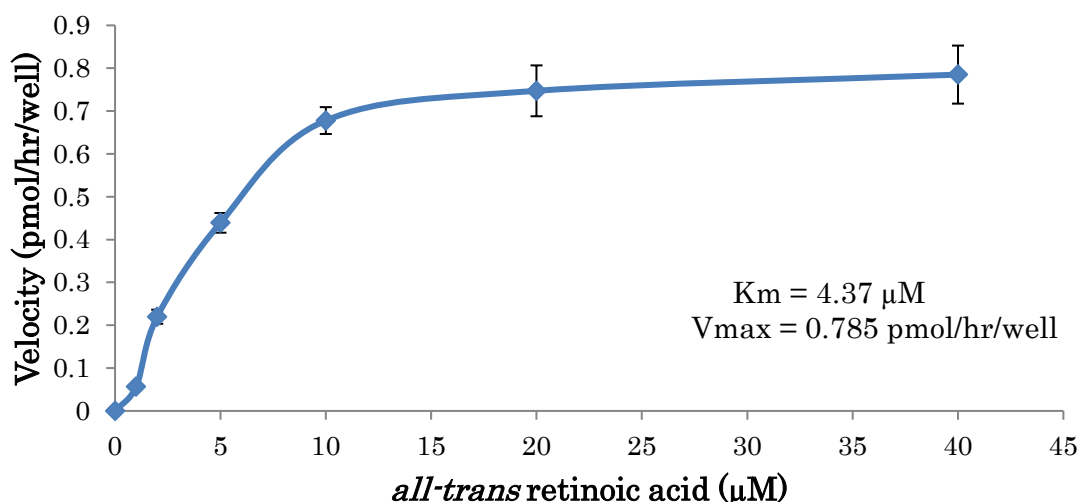


Fig. 4. Michaelis-Menten curves of *all-trans* retinoic acid metabolism in HeLa cells infected with Ad-CYP26A1.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26A1 at 50 MOI. After 72 h, the cells were incubated with *all-trans* retinoic acid (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , or 40 μM) for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

CYP26B1活性評価系の構築

CYP26B1発現アデノウイルスを用いたCYP26B1発現系の構築

本研究を行うに際し、ヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa細胞) およびCYP26B1発現アデノウイルス (Ad-CYP26B1) を用いてCYP26B1の発現系の構築を行った。

HeLa細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間後にAd-CYP2

6B1を1 MOI、3 MOI、10 MOI、30 MOIで1時間の強感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μ L を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、CYP26B1の基質であるatRA 20 μ M含有培地を添加し、5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて4-OHRA の生成活性測定を行った結果、Ad-CYP26B1のMOI依存的なCYP26B1活性の上昇が認められた(Fig. 5)。また、感染させていない群のバックグラウンドの値を測定の値から差し引き、活性値とした。

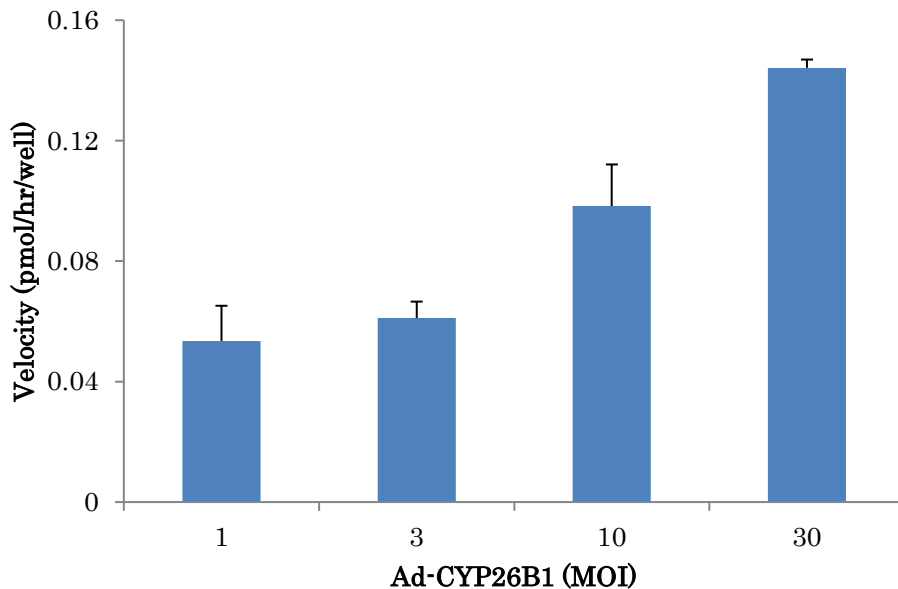


Fig. 5. Enzymatic activity of CYP26B1 in HeLa cells infected with Ad-CYP26B1.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26B1 (MOI of 1, 3, 10, or 30). After 72 h, the cells were incubated with 20 μ M *all-trans* retinoic acid for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

CYP26B1活性評価系の至適条件検討

前項の検討から、Ad-CYP26B1感染HeLa細胞においてCYP26B1活性が確認できたことから、CYP26B1活性評価系の構築のために、細胞数、Ad-CYP26B1 MOI数、基質添加後の反応時間の詳細な条件検討を行った。

HeLa細胞を48-well plate に 1×10^4 cells/well と 3×10^4 cells/wellで播種し、48時間後にAd-CYP26B1を1 MOI、3 MOI、10 MOI、30 MOI、50 MOIで1時間の強感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μ L を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、CYP26B1の基質である atRA 5 μ M含有培地を添加し、3時間または5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて活性測定を行った。また、感染させていない群のバックグラウンドの値を測定の値から差し引き、活性値とした。その結果、細胞数、Ad-CYP26B1 MOI数、基質の反応時間に依存的なCYP26B1活性の上昇が認められた(Fig. 6)。本検討から、十分な活性が得られ、且つ、Ad-CYP26B1感染による細胞に対する影響の少なかった細胞数 (3×10^4 cells/well)、Ad-CYP26B1 MOI数 (50 MOI)、反応時間 (5時間) を評価系の各条件として設定することとした。

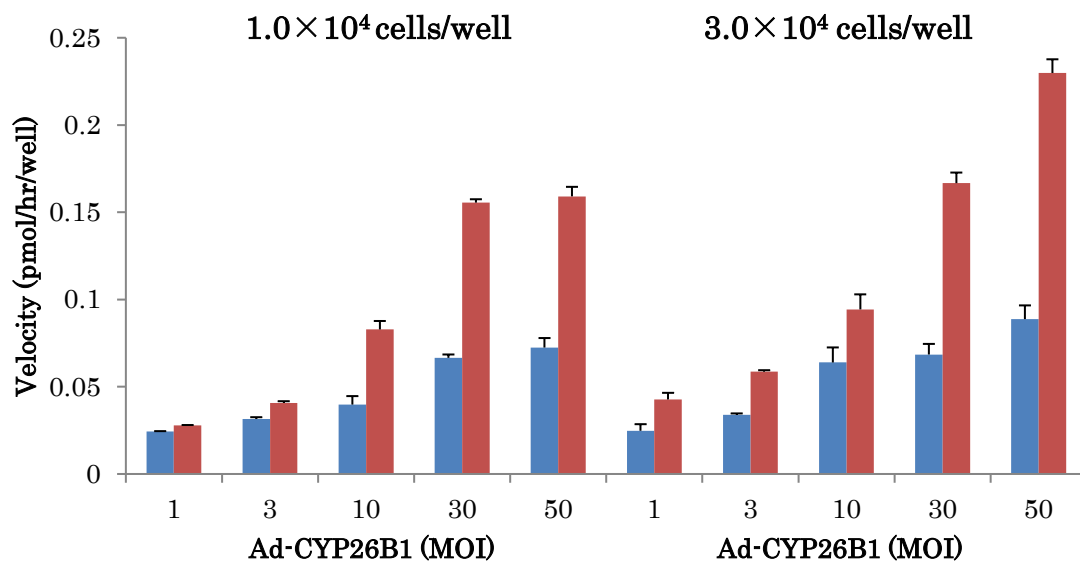


Fig. 6. Effects of cell density and reaction time on CYP26B1 activities in HeLa cells infected with Ad-CYP26B1.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 1×10^4 cells/well or 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26B1 (MOI of 1, 3, 10, 30, or 50). After 72 h, the cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ *all-trans* retinoic acid for 3 h or 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=2).

CYP26B1活性評価系を用いた酵素速度論的解析

前項の検討より、CYP26B1活性評価系を確立したことから、本評価系を用いてatRA代謝の酵素速度論的解析を行った。HeLa細胞を48-well plateに 3×10^4 cells/wellで播種し、48時間後にAd-CYP26B1を50 MOIで1時間強感染させた。48時間培養した後、DMEM 200 μL を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、atRA 1.0 μM 、2.0 μM 、5.0 μM 、10 μM 、20 μM 、40 μM 含有培地を添加し、5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて活性測定を行った。その結果、CYP26B1によるatRAの代謝速度は、Michaelis-Mentenの式に従うことが示された(Fig. 7)。Hanes-Woolfの式を用いて K_m および V_{max} を算出したところ、それぞれ0.2 μM 、0.614 pmol/hr/wellであった。

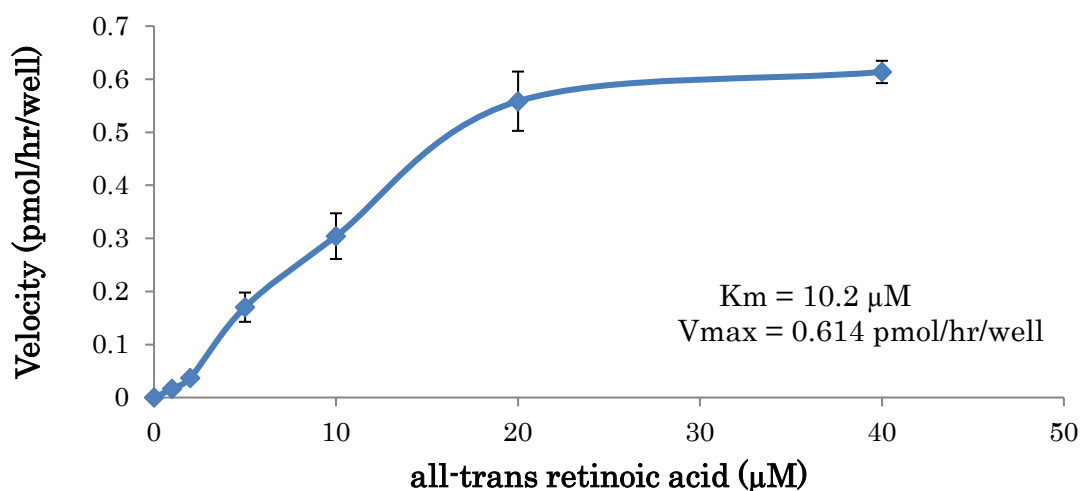


Fig. 7. Michaelis-Menten curves of *all-trans* retinoic acid metabolism in Hela cells infected with Ad-CYP26B1.

Hela cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26B1 at 50 MOI. After 72 h, the cells were incubated with *all-trans* retinoic acid (1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, or 40 μM) for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

RALDH2活性評価系の構築

RALDH2発現アデノウイルスを用いたHela細胞でのRALDH2 mRNA発現

本研究を行うに際し、ヒト子宮頸がん由来細胞 (Hela細胞) およびRALDH2発現アデノウイルス (Ad-RALDH2) を用いてRALDH2のmRNA発現レベルを検討した。

Hela細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、24 時間後にAd-RALDH2を1 multiplicity of infection (MOI)、3 MOI、10 MOI、30 MOI、50 MOI、100 MOIで1時間強感染させた。48 時間培養した後回収し、real-time PCRを用いてmRNA発現レベルの測定を行った結果、Ad-RALDH2のMOI依存的なRALDH2 mRNAの上昇が認められ、100 MOIにおいては約2,600倍であった (Fig. 8)。

次に、RALDH2のタンパク質の発現をWestern blotting 法により確認した。細胞の播種、アデノウイルスの感染方法は、活性の測定と同様に行い、このAd-RALDH2感染細胞を48時間培養後に回収し、CellLyticM により細胞質タンパク質を抽出した。その結果、RALDH2の分子量である約56 kDa付近にバンドが検出された。以上の結果から、今回使用したAd-RALDH2は、その感染量 (MOI) 依存的なmRNAの発現およびRALDH2タンパク質発現量の上昇が確認された (Fig. 9)。

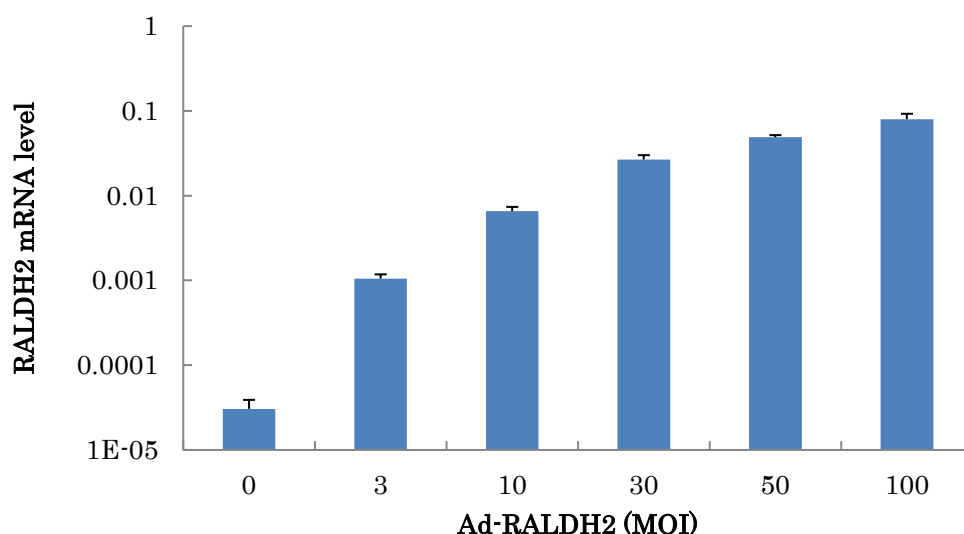


Fig. 8. Real-time PCR analysis of RALDH2 mRNA expressions in HeLa cells.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-RALDH2 (MOI of 3, 10, 30, 50 or 100). After 48 h, the cells were collected and mRNA was analyzed by real-time PCR. Data represent mean \pm SD (n=3).

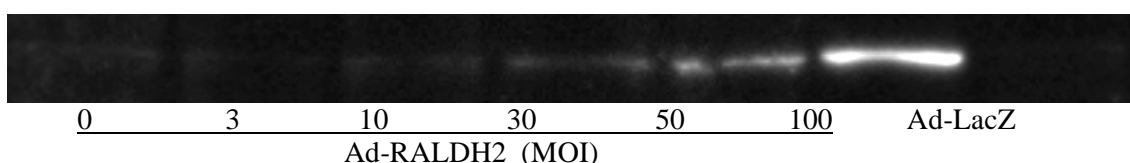


Fig 9. Detection of RALDH2 protein expressed in HeLa cells infected with Ad-RALDH2 by immunoblot analysis.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-RALDH2 (MOI of 3, 10, 30, 50 or 100). After 48 h, the cells were lysed in CelyticM. RALDH2 proteins were detected by immunoblot analysis.

RALDH2活性評価系の至適条件検討

前項の検討から、Ad-RALDH2感染HeLa細胞において、mRNA発現レベルの上昇が確認できたことから、RALDH2活性評価系の構築のために、細胞数、Ad-RALDH2 MOI数、基質添加後の反応時間の詳細な条件検討を行った。

HeLa細胞を48-well plate に 1×10^4 cells/well と 3×10^4 cells/well で播種し、48時間後にAd-RALDH2を1 MOI、3 MOI、10 MOI、30 MOI、50 MOIで1時間の強感染をさせた。48時間培養した後、DMEM 200 μ L を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、RALDH2の基質である *all-trans* retinal 5 μ M含有培地を添加し、3時間または5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いて活性測定を行った。また、感染させていない群のバックグラウンドの値を測定の値から差し引き、活性値とした。その結果、細胞数、Ad-RALDH2 MOI数、基質の反応時間に依存的なRALDH2活性の上昇が認められた(Fig. 10)。本検討から、十分な活性が得られ、且つ、Ad-RALDH2感染による細胞に対する影響の少なかった細胞数 (3×10^4 cells/well)、Ad-CYP26A1 MOI数 (50 MOD)、反応時間 (5時間) を評価系の各条

件として設定することとした。

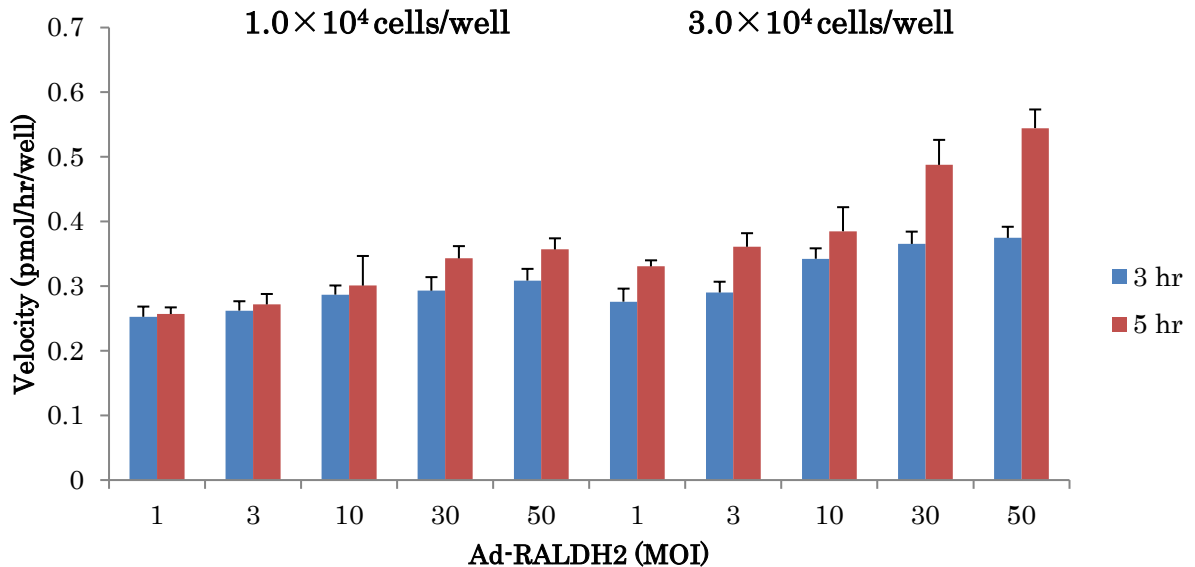


Fig. 10. Effects of cell density and reaction time on RALDH2 activities in Hela cells infected with Ad- RALDH2.

Hela cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 1×10^4 cells/well or 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-RALDH2 (MOI of 1, 3, 10, 30, or 50). After 72 h, the cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ *all-trans* retinal for 3 h or 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=2).

RALDH2活性評価系を用いた酵素速度論的解析

前項の検討より、RALDH2活性およびRALDH2タンパク質発現量の上昇が認められたことから、*all-trans* retinal代謝の酵素速度論的解析を行った。Hela細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間後に Ad- RALDH2 を 50 MOI で 1 時間強感染させた。48 時間培養した後、DMEM 200 μL を添加し、さらに 24 時間後にウイルス含有培地を除去し、*all-trans* retinal 1.0 μM 、2.0 μM 、5.0 μM 、10 μM 、20 μM 、40 μM 含有培地を添加し、3 時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MS を用いて活性測定を行った。その結果、RALDH2 による *all-trans* retinal の代謝速度は、Michaelis-Menten の式に従うことが示された (Fig. 11)。Hanes Woolf の式を用いて K_m および V_{max} を算出したところ、それぞれ 3.15 μM 、0.326 pmol/hr/well であった。

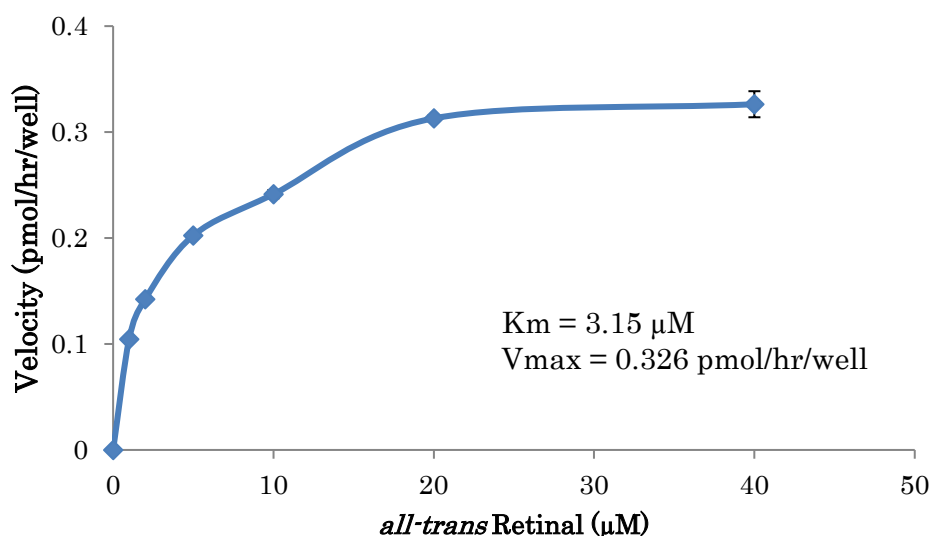
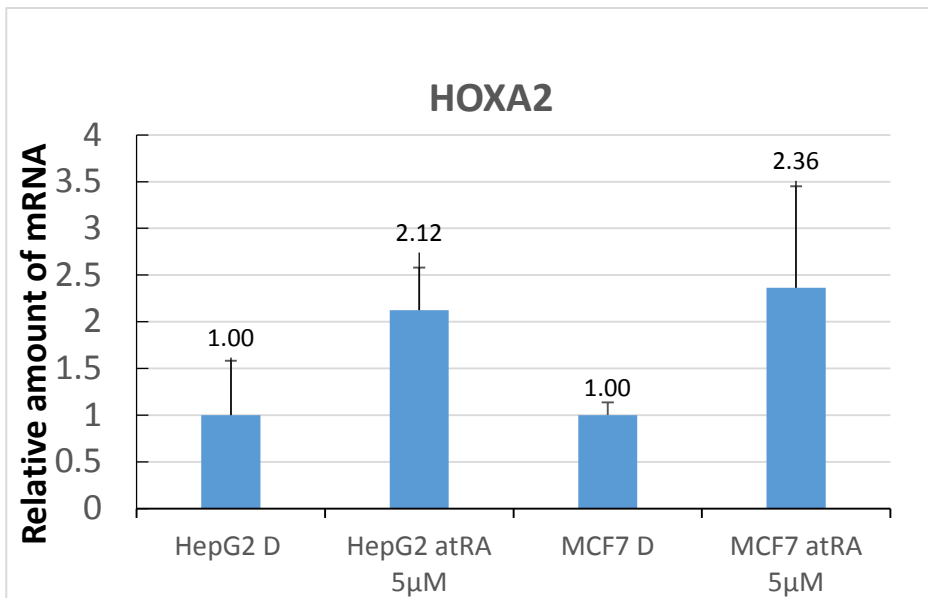
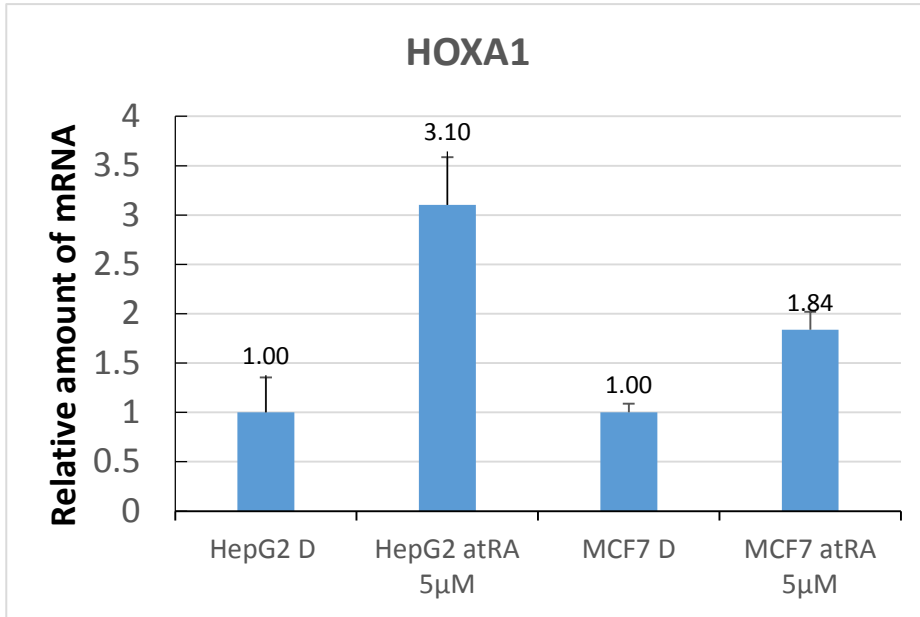


Fig. 11. Michaelis-Menten curves of *all-trans* retinal metabolism in Ad-RALDH2 -infected Hela cells.

Hela cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-RALDH2 at 50 MOI. After 72 h, the cells were incubated with *all-trans* retinoic acid (1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, or 40 μM) for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

レポータープラスミドの構築

レチノイン酸のレセプターRAR/RXRを介したレポーターアッセイ系の作成を行うために、ヒトのHoxA1, HoxA2およびCYP26A1遺伝子のプロモーター遺伝子をPCRにより単離し、pGL4.10プラスミドにDNA断片を挿入し、レポータープラスミド構築を完了した。まず、HepG2細胞とMCF-7細胞の内因性HoxA1, HoxA2およびCYP26A1のmRNA発現を測定したところ、MCF-7でCYP26A1は1000倍以上の誘導が認められたが、HoxA1およびHoxA2は2-3倍程度の誘導しか認められなかった (Fig.12, 13)。これらの細胞株に作成したレポータープラスミドpGL4.10_26A1を導入しレポーター活性を測ると、10 μMのレチノイン酸添加で、HepG2で約10倍、MCF-7で約26倍の誘導が認められた (Fig.13)。この誘導率の違いは、使用した培養細胞株に元々あまり発現していないためであると考えられた。そこで本実験では、誘導率の良いMCF-7を用い誘導評価を行うこととした。



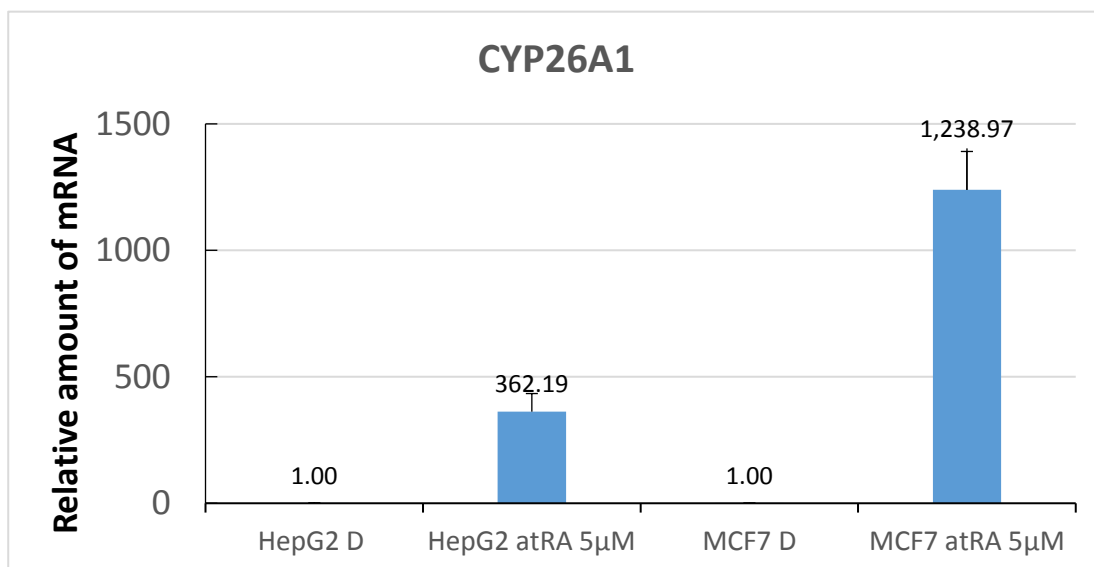


Fig. 12 Effect of retinoic acid on expression level of HOXA1, HOXA2 and CYP26A1 mRNAs

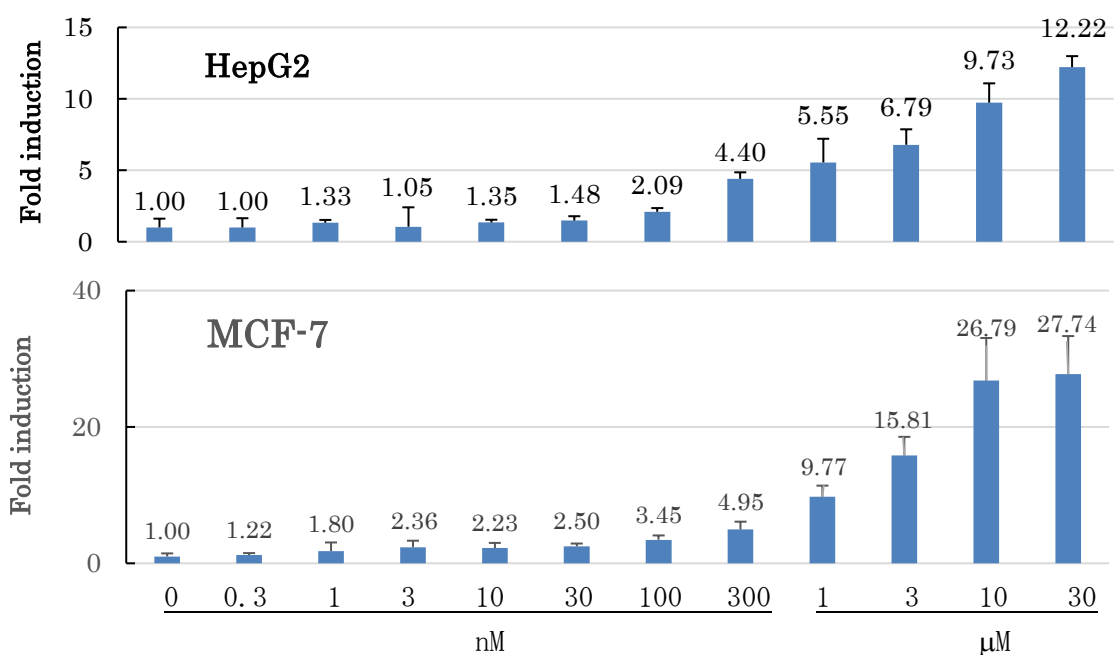


Fig. 13 Dose dependent induction of luciferase activity mediated through CYP26A1 gene

CYP26A1 遺伝子レポータープラスミドを導入した MCF-7 細胞では、10 µM の all trans レチノイン酸により約 25 倍の誘導が確認できたが、低容量 (10-30 nM) ではわずか数倍の誘導であった。そこで、感度を上げるために人工的にレポータープラスミドに RAR/RXR 結合するシスエレメント配列、RARE を 1 つ及び 3 つ組み込んだものを作成した。その結果、1 つ組み込んだものが、1 nM で 10 倍ほどの誘導が認められたが、3 つ挿入したものは思ったほどの感度上昇はなかった (Fig.13)。一方、Ho

xA1 および HoxA2 遺伝子を組み込んだレポータープラスミドでは、細胞種によって差が見られ、期待したほどの誘導も認められなかった。今後は細胞種の検討が必要と考えている。

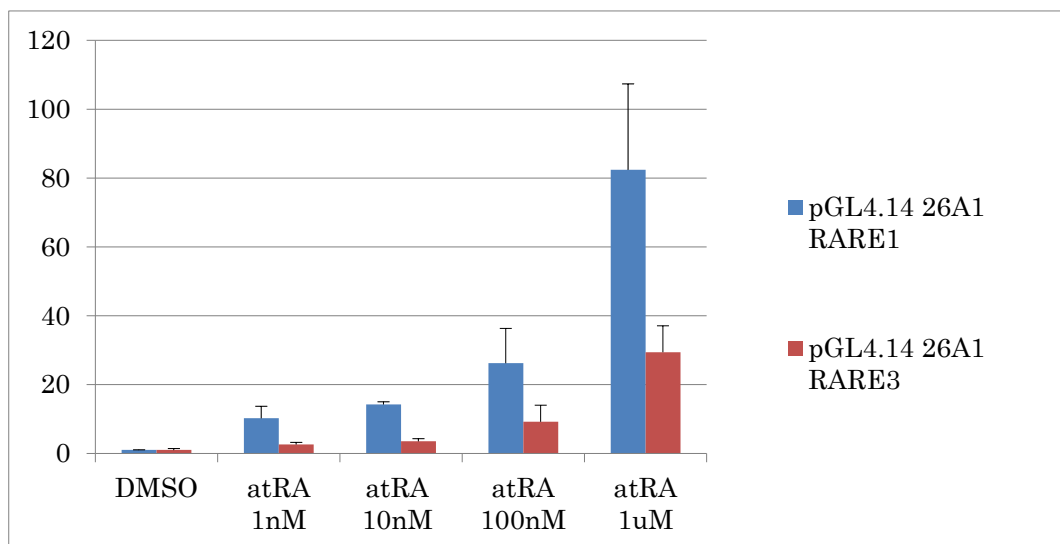


Fig. 14 Effect of number of RARE on induction level of reporter activity

CYP26A1遺伝子レポーター発現ウイルスの構築

前節で作製したpGL-4.14-26A1-GFPベクターを*in vivo*で用いるためにアデノウイルスを用いて発現させるために、アデノウイルスベクターpAd/CMV/-4.14-26A1-GFPを作成した。このベクターは、ルシフェラーゼと蛍光タンパク、GFPが融合した発現子、両酵素活性を示す。出来上がったベクターからウイルスを作製し、レポーターアッセイを実施した。

MCF-7およびHeLa細胞を24 well plateに 3×10^4 cells/wellで播種し、24時間後にウイルスに感染させる。0, 1, 3, 5, 10 MOIで感染させ、48時間後に1 μ MのatRAとコントロール群のDMSOを薬物処理し48時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてレポーター活性を測定した。ウイルスのレポーター活性はMOI依存的に上昇し、DMSO群に比べてatRA処理群は活性が大きく確認された (Fig.15)。MCF-7細胞においては、非常に高いルシフェラーゼ活性が認められたが、蛍光は認められなかった。本ウイルスをマウスに腹内投与し、肝臓と脳のルシフェラーゼ活性を調べたが検出できなかった。

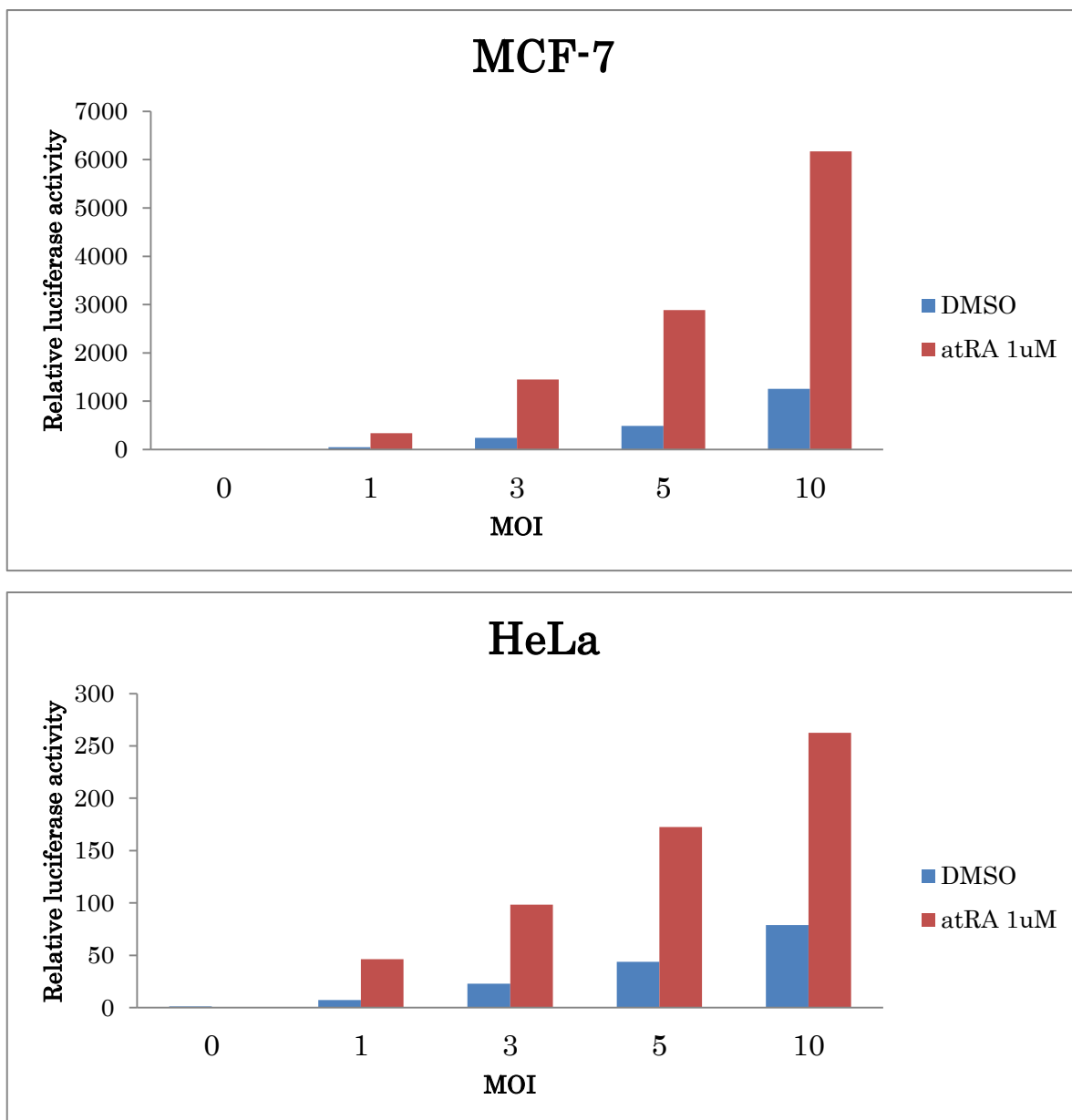


Fig. 15 Luciferase activity in MCF-7 and HeLa cells infected with Ad/CMV/-4.14-26A1-GFP

「考察」：レチノイン酸の代謝P450であるCYP26分子種は3種類知られているが、マウスにおいて *Cyp26a1* および *Cyp26b1* 遺伝子発現が催奇形性に強く関わっている報告から、マウス *Cyp26a1* およびヒト *CYP26A1* とマウス *Cyp26b1* およびヒト *CYP26B1* のアデノウイルス発現系を完成させた。 *Cyp26c1* 種も存在するが、この遺伝子のノックアウトマウスを用いた研究より、催奇形性への関与が低いと報告されているため、本研究ではその発現は試みなかった。一方、レチノイン酸合成系酵素の *RALDH* も3種類存在しており、 *RALDH2* および *RALDH3* 遺伝子発現が催奇形性に強く関わっている報告から、 *RALDH2* および *RALDH3* の発現系の作成を行った。これらのウイルスはいずれも、HepG2細胞（ヒト肝癌由来細胞）に感染させ、タンパク質の発現が確認されている。その中でマウス *Cyp26a1* およびヒト *CYP26A1* は、HPLCによって代謝産物で

ある4水酸化レチノイン酸を生成することが確認された。また、クロマトグラムからはマウスCyp26a1とヒトCYP26A1の間では大きな代謝活性差は見られなかった。組織のレチノイン酸濃度は非常に低いために、低濃度 (nM) のレチノイン酸および代謝産物を測定するにはHPLCよりもLC/MS/MS用いた方が感度よく測定可能と考え、その測定条件検討を行い、測定の手法を確立した。また、薬物代謝酵素P450をCYP26の対照として用いることを考え、これらP450をHepG2細胞に発現させ、ミコナゾール、ケトコナゾール、フコナゾールを阻害剤として用いた実験を行った。薬物代謝酵素P450は、予想通りミコナゾールおよびケトコナゾールで強く阻害された。しかしながら、イミダゾールあるいはトリアゾール系化学物質によるマウスCyp26a1およびヒトCYP26A1の代謝活性阻害実験では、再現性の高い結果が得られなかった。同様にHepG2細胞に発現させたRALDH2については当初、本研究の測定条件においてはレチナールからレチノイン酸の生成は認められなかった。これらの原因について、以下のことが考察された。

1. 発現に使用したHepG2細胞にヒトCYP26およびRALDHが高発現している。実際、CYP26、RALDHのmRNA量を測定したところ、HepG2、MCF-7細胞 (ヒト乳癌由来細胞) では各分子間では差があるものの、いずれも高い発現を示していた。
2. レチノイン酸結合タンパク質の存在により培養液中の非結合型レチノイン酸の量が少ない。(レチナールは細胞内のCRBPIに結合し、レチノイン酸は細胞内のCRABPI/IIに結合する。また、血清中では、アルブミンと結合することが判っている。)
3. 使用したレチノイン酸が時間経過により分解した。(古いサンプルを測定したところいくらかの分解産物が認められた。) 特に、HepG2細胞は肝臓細胞の性質を強く保持しているために、ビタミンAの濃度維持のための代謝あるいは貯蔵の機能を強く保持しているようであった。

そこで現在は、これら酵素の発現が低いHeLa細胞を用いることにより再現性の高い活性測定が可能になった。また、代謝活性の種差 (マウスとヒト間) は、認められなかった。また、CYP26A1とCYP26B1のP450分子種間での活性の違いについても認められなかったが、発現レベルで比べると若干CYP26A1を発現させた細胞の方が高い代謝活性を示した。

一方、当初から予測はしていたが、胎児を含む組織細胞内のレチノイン酸濃度は、非常に低いことから、現在当研究室で使っているUPLC-MS/MSを用いても、組織中のレチノイン酸濃度の測定は難しいと判断された。そこで、レチノイン酸のレセプターRAR/RXRを介したレポーターアッセイ系の作成を行うために、ヒトのHoxA1, HoxA2およびCYP26A1遺伝子のプロモーター遺伝子を単離し、レポータープラスミド構築を完了した。このプラスミドをHepG2細胞とMCF-7細胞に導入してレポーターアッセイを行った。しかしながら、強い誘導は認められなかった。その原因は使用したレポーター (レニーラ) 活性のバックグラウンドが高かったことが判明した。そこで他のレポーター (ルシフェラーゼ) プラスミドにプロモーター遺伝子を組み替えた。また、内因性HoxA1, HoxA2およびCYP26A1のmRNA発現は細胞間で大きく異なっていたがHoxA1およびHoxA2は2-3倍程度の誘導しか認められなかった。そこで、CYP26A1遺伝子のプロモーターを誘導評価に用いることとした。上流域約4kbのDNA断片を挿入したレポータープラスミドDNAをMCF-7に導入した細胞では、10 μ Mのall transレチノイン酸で約25倍の誘導が確認できた。しかし、低容量 (10-30 nM) では数倍の誘導であった。そこで、さらに感度を上げるために人工的にRAR/RXR結合するシスエレメントを1つおよび3つ平行に並べたDNA配列をレポータープラスミドに組み込み、1 nmでも約10倍感度の高いものの作成に成功した。そこでこの感度のより高いプラスミドを用いてCYP26A1レポーターアデノウイルスを現在作成した。しかし、マウスを用いた予備実験では、レポーター活性は確認できなかった。今後、既にマウスに投与して成功

しているCYP3A4レポーターウイルスをコントロールとして、ルシフェラーゼ発現の条件を検討する。また、恒常的に誘導評価可能なレポーター安定発現細胞株の樹立についても、今回新たに作成した感度の高いCYP26A1レポータープラスミドを用いて作成を目指し、スクリーニングを行っている。この細胞株が樹立できれば、レチノイン酸濃度の測定実験手法の樹立はこの細胞を用いて行う。

2) 研究項目名：化学物質のスクリーニング

個別課題名：酵素活性阻害を示す農薬や食品添加物等のスクリーニング (吉成浩一 (静岡県立大学))

研究目的・手法：アデノウイルスによって酵素が発現した細胞を用いて、すでに催奇形性を示すことが報告されている農薬、食品添加物およびビタミンA類似化合物等を用いて酵素活性阻害を調べる。特にマウスの酵素とヒトの酵素間に活性阻害に差があるのかを明らかにする。

レポーター安定発現細胞株に各酵素を発現させたハイスループット化活性阻害評価系を用いて、酵素活性阻害を示す化学物質を網羅的に調べ、活性阻害の構造相関性を明らかにする。

「研究成果」

ヒトCYP26A1とマウスCyp26a1のレチノイン酸代謝活性の比較

レチノイン酸代謝活性の種差をヒトCYP26A1とマウスCyp26a1による代謝産物の液体クロマトグラム (Fig.16) を比較した。26-27分に見られる2つのピークは、基質のall transレチノイン酸 (727分) と転移した7-cisレチノイン酸 (26分) である。それ以外のピークは代謝産物と考えられるが、標品としては4-水酸化のみしか入手できなかったために、他の代謝産物については測定しなかった。液体クロマトグラムの溶出パターン及びピークの高さの比較からヒトCYP26A1とマウスCyp26a1による代謝の種差は、マウスで若干活性が低いようであるが、全体的には変わらないと推定された。

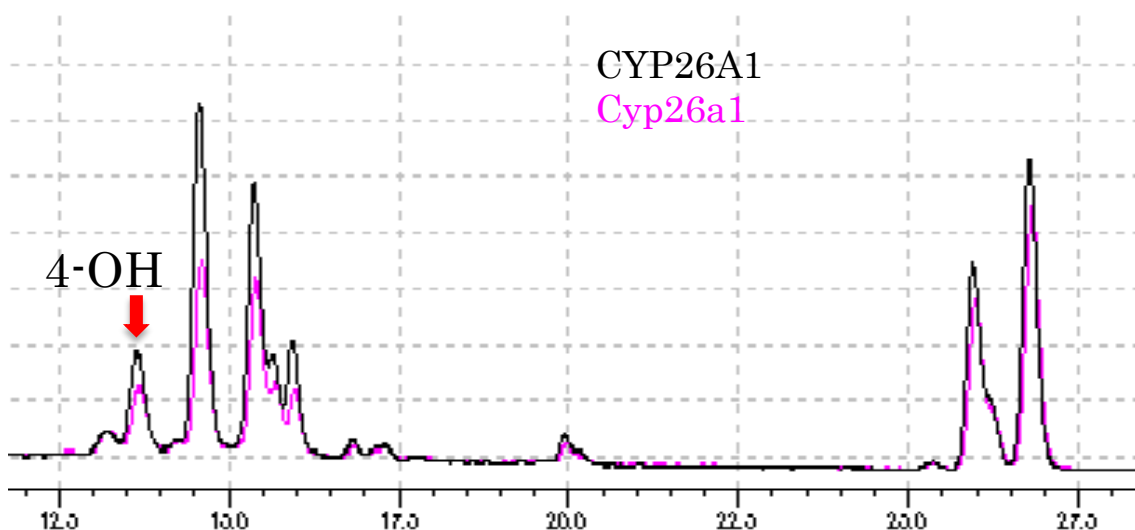


Fig. 16 Comparison of chromatogram in retinoic acid metabolites between human CYP26A1 and mouse Cyp26a1

農薬による主要な薬物代謝CYP分子種の活性阻害評価

ヒト肝がん由来細胞 (HepG2細胞) およびCYP1A2、CYP3A4、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6発現アデノウイルス (Ad-CYP1A2、Ad-CYP3A4、Ad-CYP2C9、Ad-CYP2C19、Ad-CYP2D6) と、農薬として使用されているトリアゾール含有化合物18種類 (1,2,4-triazole、azaconazole、cyproconazole、difenoconazole、epoxiconazole、fenbuconazole、fluquinconazole、flusilazole、hexaconazole、imibenconazole、metconazole、penconazole、simeconazole、tebuconazole、triadimefon、triadimenol、triticonazole、uniconazole) また、薬物代謝CYPを阻害すると報告されている²⁶⁾薬物4種類 (fluconazole、imidazole、ketoconazole、miconazole)、CYP26A1を強く阻害すると報告されている²⁷⁾talarozoleを用いて薬物代謝CYP分子種の代謝活性阻害について検討した。

HepG2細胞を 48-well plate に 5×10^4 cells/well で播種し、48時間後にAd-CYP1A2、Ad-CYP3A4、Ad-CYP2C9、Ad-CYP2C19およびAd-CYP2D6をそれぞれ5 MOI、10 MOI、1 MOI、2 MOI、0.05 MOIで1時間の強感染をさせた。48時間培養した後、DMEM 200 μ Lを添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、それぞれの基質薬物であるphenacetin 100 μ M、midazolam 10 μ M、diclofenac 25 μ M、omeprazole 10 μ M、dextromethorphan 10 μ M含有培地を添加した。その後、直ちに阻害剤として用いる薬物10 μ M含有培地を添加し5時間反応させた。この培地を回収し、LC-MS/MSを用いて代謝物の生成活性測定を行った。その結果、CYP26A1を強く阻害するtalarozoleによる阻害は、CYP3A4以外の4種類において認められた。CYP1A2では特にepoxiconazole、uniconazoleによる活性阻害が認められた。CYP3A4は、いくつかのアゾール系の化合物によって活性阻害が認められたが、特に医薬品であるketoconazoleやmiconazoleなどによって強く阻害され、そのIC₅₀はそれぞれ0.06 μ Mと0.24 μ Mであり、報告されているIC₅₀とほぼ同じであった²⁸⁾。CYP2C9では特に、cyproconazole、difenoconazole、hexaconazole、imibenconazole、metconazole、tebuconazole、triticonazoleおよびmiconazoleによって強く阻害が認められた。その中でも最も阻害作用が強かったのがcyproconazoleであり、IC₅₀は0.25 μ Mであった。また、miconazoleによる阻害も顕著に現れ、そのIC₅₀は1.5 μ Mであり、報告されている活性値とほぼ同じであった²⁹⁾。CYP2C19は、fenbuconazole、hexaconazole およびmiconazoleによって強く阻害され、hexaconazoleで阻害が認められたのはCYP2C9とCYP2C19のみであった。CYP2D6ではtalarozoleによる阻害が最も強く現れたが他のCYPと比べて、活性阻害をされた化合物は少なかった (Fig.17-21)。

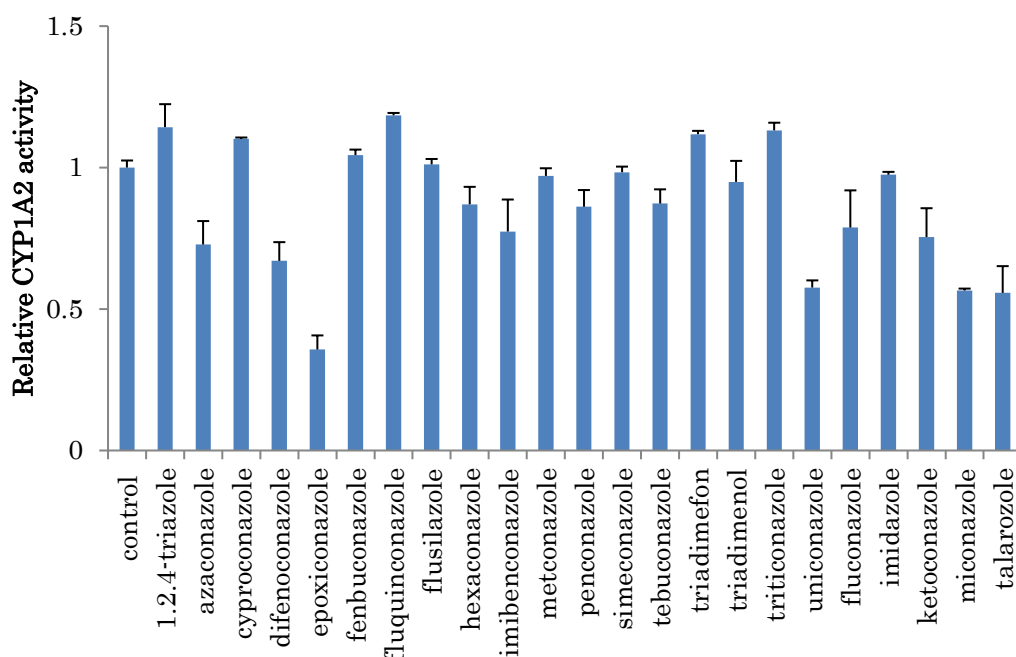


Fig. 17. Assessment of CYP1A2 inhibitions by azole compound in HepG2 cells infected with Ad-CYP1A2 .

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP1A2 5 MOI. After 72 h, the cells were incubated with 100 μ M phenacetin and 10 μ M azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

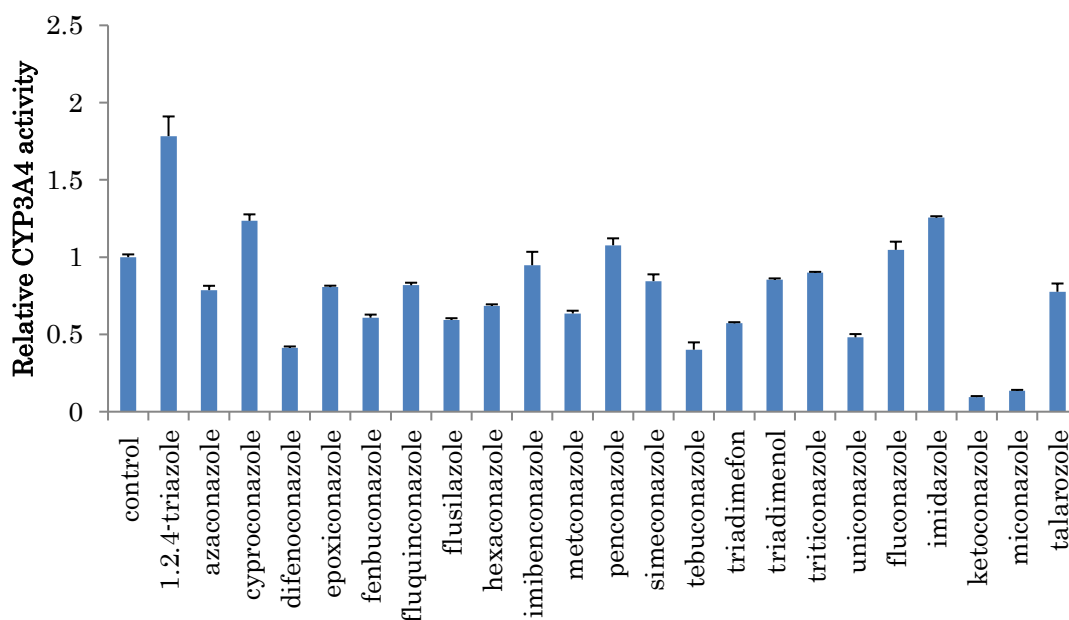


Fig. 18. Assessment of CYP3A4 inhibitions by azole compound in HepG2 cells infected with Ad-CYP3A4.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP3A4 10 MOI. After 72 h, the cells were incubated with 10 μ M midazolam and 10 μ M azole compound for 5 h. Then, medium was

collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

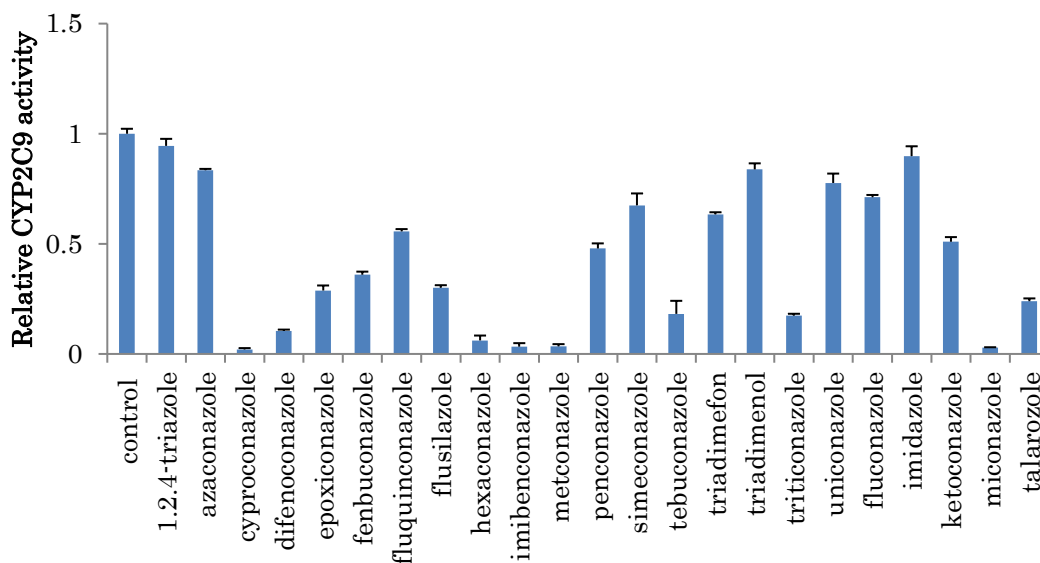


Fig. 19. Assessment of CYP2C9 inhibitions by azole compound in HepG2 cells infected with Ad-CYP2C9.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP2C9 1 MOI. After 72 h, the cells were incubated with 25 μ M diclofenac and 10 μ M azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

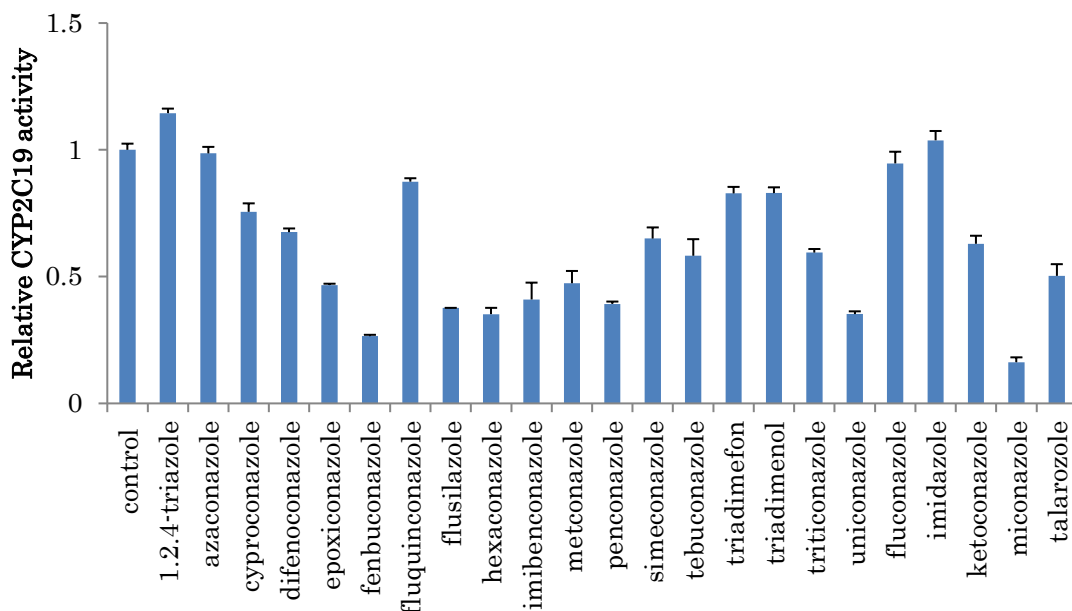


Fig. 20. Assessment of CYP2C19 inhibitions by azole compound in HepG2 cells infected with Ad-CYP2C19.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP2C19 2 MOI. After 72 h, the cells were incubated with 10 μ M omeprazole and 10 μ M azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

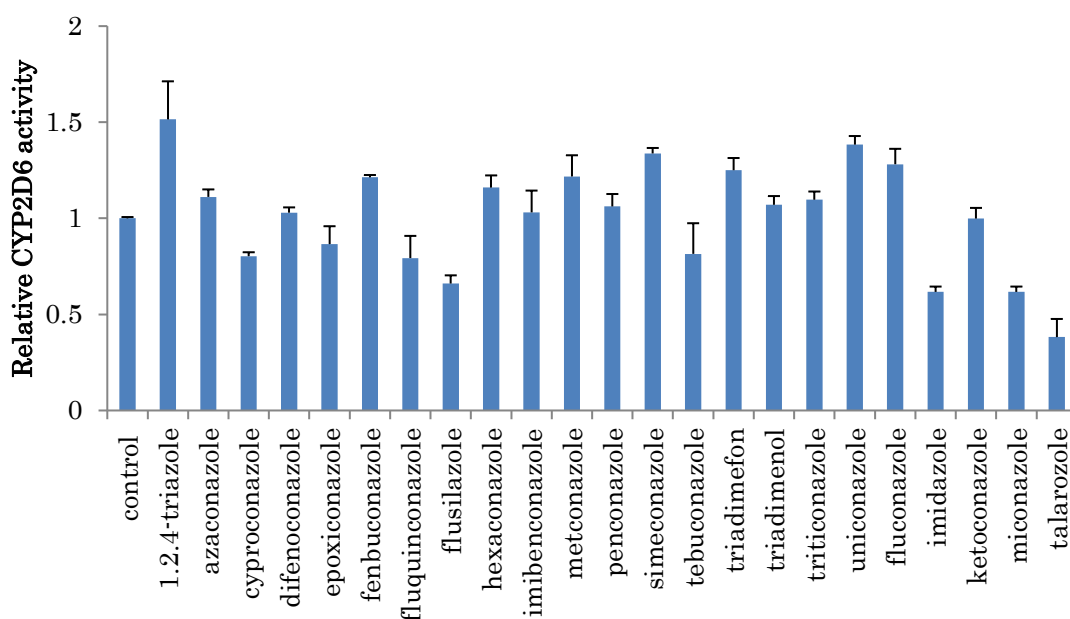


Fig. 21. Assessment of CYP2D6 inhibitions by azole compound in HepG2 cells infected with Ad-CYP2D6.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP2D6 0.05 MOI. After 72 h, the cells were incubated with 10 μ M dextromethorphan and 10 μ M azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

農薬によるRALDH2活性阻害評価

本研究を行うに際し、ヒト子宮頸がん由来細胞 (Hela細胞) およびRALDH2発現アデノウイルス (Ad-RALDH2) を用いてRALDH2の代謝活性阻害の評価を行った。

Hela細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間後にAd-RALDH2を50 MOIで1時間の強感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μ L を添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、RALDH2の基質である *all-trans* retinal 5 μ M含有培地を添加した。その直後に前節で使用した阻害剤を10 μ M添加し、5時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MSを用いてatRAの生成活性測定を行った結果、penconazoleによる阻害が最も強く認められ、その残存活性は約60%であった(Fig. 22)。

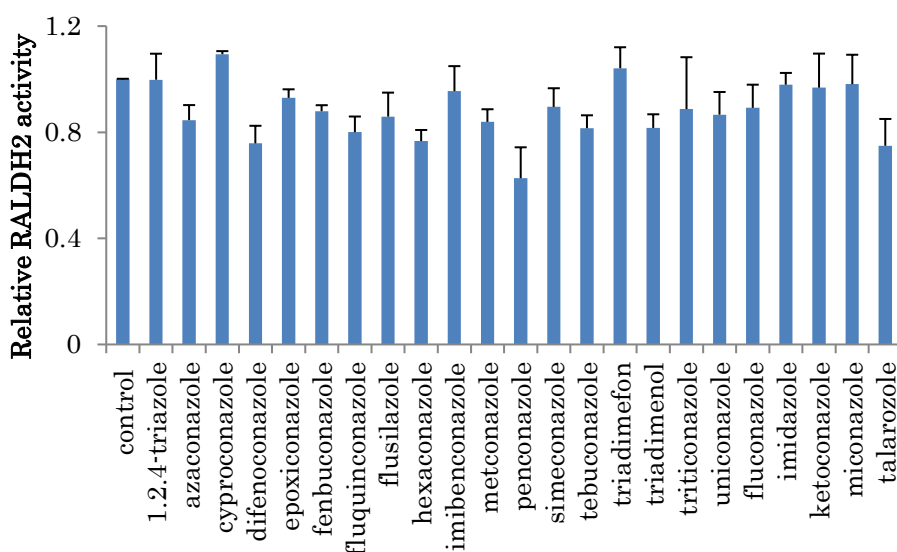


Fig. 22. Assessment of RALDH2 inhibitions by azole compound in Hela cells infected with Ad-RALDH2.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-RALDH2 50 MOI. After 72 h, the cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ *all-trans* retinal and $10 \mu\text{M}$ azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

農薬によるCYP26A1、CYP26B1活性阻害評価

本研究を行うに際し、ヒト子宮頸がん由来細胞 (Hela細胞) およびCYP26A1発現アデノウイルス (Ad-CYP26A1)、CYP26B1発現アデノウイルス (Ad-CYP26B1) を用いてCYP26A1、CYP26B1の代謝活性阻害の評価を行った。

Hela細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48 時間後に Ad-CYP26A1 もしくは Ad-CYP26B1 を 50 MOI で 1 時間の強感染をさせた。48 時間培養した後、DMEM 200 μL を添加し、さらに 24 時間後にウイルス含有培地を除去し、CYP26A1 と CYP26B1 の基質である atRA $5 \mu\text{M}$ 含有培地を添加した。その直後に前節で使用した阻害剤を $10 \mu\text{M}$ 添加し、5 時間反応させた。その後、培地を回収し、LC-MS/MS を用いて atRA の生成活性測定を行った結果、CYP26A1 においては、talarozole による約 75% の代謝活性の阻害が認められたが、CYP26B1 では確認することができなかった (Fig. 23, 24)。

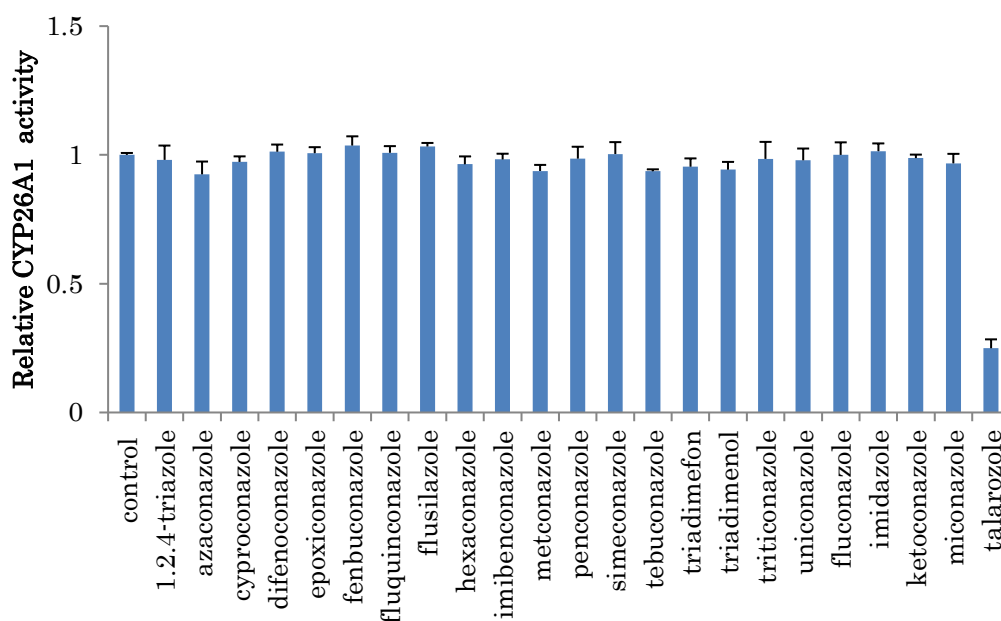


Fig. 23. Assessment of CYP26A1 inhibitions by azole compound in HeLa cells infected with Ad-CYP26A1.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26A1 50 MOI. After 72 h, the cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ atRA and $10 \mu\text{M}$ azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

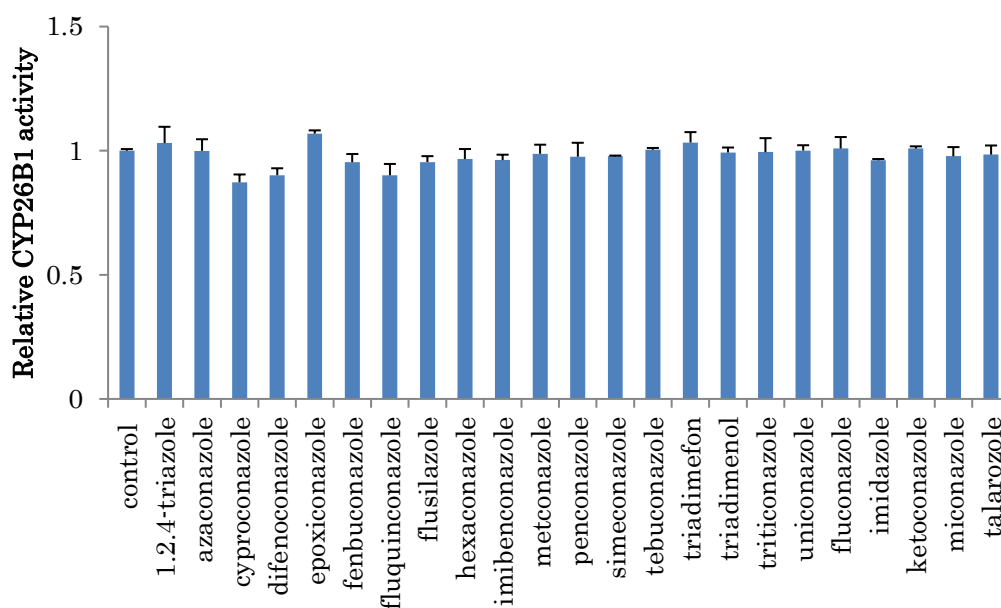


Fig. 24. Assessment of CYP26B1 inhibitions by azole compound in HeLa cells infected with Ad-CYP26B1.

HepG2 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26B1 50 MOI. After 72 h, the cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ atRA and $10 \mu\text{M}$ azole compound for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

talarozoleによるCYP26A1活性阻害評価

前節において、CYP26A1の代謝活性の阻害効果について検討を行ったところ、talarozoleによる活性阻害が認められたため、talarozole濃度依存的な活性の阻害を検討した。

Hela細胞を 48-well plate に 3×10^4 cells/well で播種し、48時間後にAd-CYP26A1を50 MOIで1時間強感染させた。48時間培養した後、DMEM 200 μ Lを添加し、さらに24時間後にウイルス含有培地を除去し、atRA 5 μ M含有培地を添加した。その後、直ちにtalarozole 0.2 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M 含有培地を添加し、5時間反応させた。この培地を回収し、LC-MSMSを用いて4-OHRAの生成活性測定を行った。その結果、CYP26A1の代謝活性は、talarozole濃度依存的に低下し、その測定値から算出したIC₅₀値は2.0 μ Mとなった(Fig. 25)。

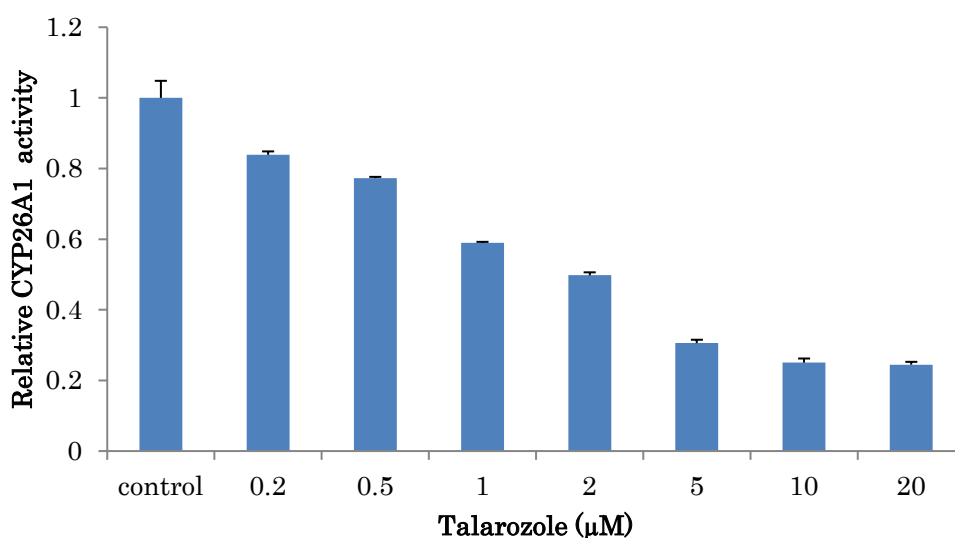


Fig. 25. Assessment of CYP26A1 inhibitions by talarozole in HeLa cells infected with Ad-CYP26A1.

HeLa cells were seeded in 48-well tissue culture plates at 3×10^4 cells/well a day before adenovirus infection. The cells were infected with Ad-CYP26A1 50MOI. After 72 h, the cells were incubated with 5 μ M *all-trans* retinoic acid and Talarozole (0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) for 5 h. Then, medium was collected and metabolite was analyzed by LC-MS/MS. Data represent mean \pm SD (n=3).

アゾール系化学物質によるRALH、CYP26A1およびCYP26B1発現への影響

CYP26A1は薬物の投与によっても誘導されることが報告されている。そこで、HepG2を用いて、Table 1に農薬を中心としたアゾール系化学物質によるRALH2、CYP26A1およびCYP26B1発現への影響を各mRNAの発現量を測定することにより検討した。その結果、アザコナゾール、フルシラゾールおよびプロピコナゾール10 μ M濃度にてCYP26A1の発現量は2-3倍上昇した。また、タラロゾール10 μ M濃度にて5倍上昇していた。また、CYP26B1の発現量は、ジフェコナゾール及びプロピコナゾールにて約3倍の上昇が認められた。一方、レチノイン酸合成酵素であるRALDH2発現量に対して、シメコナゾール、フェンブコナゾール、フルコナゾールおよびフルシラゾールは約半分が発現を抑制した。

さらに、アゾール系の農薬以外のものの中で、生殖発生毒性が報告されている農薬49種及び生殖発生毒性が報告されていない農薬について別途、CYP26A1およびCYP26B1発現への影響を各mRNAの発現量を測定することにより検討した。ブタミホス、クロルフェナビル、イソピラザム等で2-3倍のCYP26A1発現の上昇が認められた。

Table 1 Effect of Azol Compounds on expression of RALDH, CYP26A1 and CYP26B1 mRNAs

	RALDH		CYP26A1		CYP26B1	
	(1 μ M, 10 μ M)	(1 μ M, 10 μ M)	(1 μ M, 10 μ M)	(1 μ M, 10 μ M)	(1 μ M, 10 μ M)	(1 μ M, 10 μ M)
アザコナゾール	1.24	1.09	1.39	2.28	1.05	1.17
イミベンコナゾール	1.32	1	0.84	0.77	1.27	1.06
ウニコナゾール	1.04	1.08	1.17	0.79	1.24	1.34
エポキシコナゾール	2.43	1.53	1.11	0.82	1.24	1.38
ジフェノコナゾール	1.39	1.91	0.56	0.21	1.59	2.93
ジプロコナゾール	0.77	1.62	0.98	0.68	2.25	1.46
シメコナゾール	1.13	0.6	0.97	1.09	0.88	1.69
タラロゾール	0.73	1.43	2.92	5.54	1.34	1.39
テトラコナゾール	2.08	1.03	1.35	0.96	4.51	2.89
テブコナゾール	0.84	0.76	0.79	1.01	1.43	1.53
トリアジメノール	1.08	1.96	1.2	1.19	1.84	1.57
フェンブコナゾール	0.73	0.5	1.05	1.32	1.9	1.63
フルキシノナゾール	1.58	1.22	1.51	0.63	1.12	0.98
フルコナゾール	1.59	0.62	1.43	0.91	2.57	1.82
フルシラゾール	0.9	0.62	1.6	2.89	3.43	2.13
プロピコナゾール	0.57	1.16	1.57	2.38	2.86	3.38
ヘキサコナゾール	1.94	2.13	1.49	0.81	0.85	0.83
ペンコナゾール	1.2	1.19	1.53	1.72	1.39	1.16
メトコナゾール	1.32	1.28	1.18	0.59	1.21	1.03

「考察」：活性阻害を示す化学物質のスクリーニングを行うため、マウスCyp26a1、26b1,ヒトCYP26A1、26B1およびヒトRLADH2,3発現アデノウイルスの譲渡を受け、HeLa細胞に4種のCYP26および2種のRALDHを発現させ農薬や薬物による酵素活性阻害の実験を行った。

まず、CYP26A1およびCYP26B1活性の阻害スクリーニングを行うにあたり、対象の実験として同様に薬物代謝酵素P450アデノウイルスを用いてHepG2細胞に発現させ、同様にイミダゾールあるいはトリアゾール系の農薬及び医薬品を用いて阻害活性を測定した。また、前研究項目にて述べたがCYP26A1、26B1および26C1が、程度は低いながらHepG2細胞にて発現しているために、これらの発現の低いHeLa細胞を用いて活性阻害実験に用いた。アゾール系の農薬19種、医薬品3種及びイミダゾールの23種化学物質の

スクリーニングを行ったが、タラロゾール (10 μM) のみにCYP26A1活性に対してのみ強い阻害が認められ、他のものには阻害は認められなかった。一方、CYP26B1に対しては、タラロゾールを含め全く活性阻害は認められなかった。対象として用いた薬物代謝酵素P450では、CYP3A4が既に報告されているケトコナゾールおよびミコナゾールで強く阻害され、同様にCYP2C9がミコナゾールにて強く阻害された。また、アゾール系の幾つかの農薬でもこれらの強い活性阻害が認められた。特にシプロコナゾールは、CYP2C9を最も強く阻害し、そのIC₅₀は0.25 μM であり、代表的CYP2C9阻害薬であるスルファフェナゾール (0.75 μM : 報告値0.3 μM) より強かった。タラロゾールのCYP26A1のIC₅₀は2 μM であった。この値は、既に報告されている実験結果の値 (5 nM) とは大きく異なっていた。このIC₅₀値が1000倍も違う理由は現在不明である。今まで報告されてきたCYP26によるインビトロ実験と我々の実験系の違いの一つは、活性測定にはCYP26の酵素原としてマイクロゾームが用いられているが、我々の実験系はCYP26が発現した培養細胞を用いている。しかしながら、薬物代謝酵素P450の各分子種におけるスルファフェナゾール、ケトコナゾール (CYP3A4阻害剤)、キニジン (CYP2D6阻害剤) を使った同様の阻害実験では、マイクロゾームを用いた阻害の報告データとほぼ同じであった。実験系の違いのもう一つは、使用している基質としてのレチノイン酸濃度である。報告では、トリチュウム標識体を10-1000 nM使用しており、我々の実験系はLC-MC/MCの検出感度の限界から、10 μM を用いている。今後、この2点の違いが活性阻害値の違いなのかを検討する必要がある。また、メトコナゾールは、食品健康影響評価書の中で催奇形成があるとされているが活性阻害は示さなかった。以上のことからCYP26A1およびCYP26B1は内因性のレチノイン酸を基質であることから、薬物代謝P450に比べると基質特異性が非常に高いと考えられる。従って、レチノイン酸以外は内部の基質結合サイトに取り込まれにくいために、アゾール環を持つ化合物であれば全てがCYP26A1およびCYP26B1のヘム鉄に配位するわけではないことが判明した。今後は、マイクロゾーム用いて同様な阻害実験を行い、さらに確認する。また、RALDHについても、これらアゾール系の農薬を用いて活性阻害実験を行ったが、強い阻害を示すものはなかった。

一方、HepG2を用いたアゾール系農薬およびアゾール系農薬以外農薬に於いてCYP26A1,26B1およびRALDH2発現への影響について検討した結果、複数の化合物において2-3倍のCYP26A1発現量の上昇が確認された。また、タラロゾールは10 μM 濃度にて5倍上昇していた。CYP26B1の発現については、ジフェコナゾール及びプロピコナゾールにて約3倍の上昇が認められた。一方、レチノイン酸合成酵素であるRALDH2発現量に対して、シメコナゾール、フェンブコナゾール、フルコナゾールおよびフルシラゾールは約半分に発現を抑制した。この結果から次のようなことが予測される。レチノイン酸の分解酵素であるCYP26が誘導されれば、代謝活性が亢進し、細胞中のレチノイン酸濃度が低下する。また、レチノイン酸合成酵素であるRALDHの発現が抑制されると、同様に細胞中のレチノイン酸濃度が低下する。その結果、発生期の組織中のレチノイン酸濃度が低いために、催奇形成が発症することも考えられるので、今後は、この可能性をも含め、マウスの各組織に於いてこれら化学物質によりCYP26A1、CYP26B1およびRALDHのmRNA発現量に変動があるか調べる。

3) 研究項目名：催奇形性発現手法の構築

個別課題名：レチノイン酸合成・代謝酵素発現抑制による催奇形性の確認 (研究者名：八田稔久 (金沢医科大学))

研究目的・手法：マウスのレチノイン酸合成・代謝酵素発現をshRNAの導入により直接抑制することで、酵素活性が低い状態、即ちレチノイン酸が欠乏および過剰状態を

模倣し、妊娠後のマウスに臓器の発生時間軸に従い投与することで、どの臓器にどのような異常が起こるのかを明らかにする。

レチノイン酸合成・代謝酵素を強く阻害した幾つかの化学物質は、妊娠後のマウスに臓器の発生時間軸に従い投与し、どの臓器にどのような催奇形性を引き起こすか調べる。また、臓器の発育異常が見られたならば、shRNAによって見られたものと比較し、その類似性を調べる。

「研究成果」： CYP26A1に対して強い活性阻害を示したタラロゾール（5 µg/匹、DMSOに溶解）およびRALDHに対して強い活性阻害を示すことが報告されているWIN18446（4 mg/匹、DMSOに溶解）をICR妊娠マウス（各群2匹）に腹腔内投与し、奇形発症について調べた。陰性対照群にはDMSOを単独投与（0.1ml）した。投与時期は顔面形成が始まる9.5日齢に単回投与し、18.5日齢に胎児を摘出し、体重及び胎盤重量を計測した。その後、半数を外表及び内臓観察用標本に、残りを骨染色標本に供した。まず、体重の変動について、タラロゾール投与群及びWIN14486投与群で有意に低値を示し、両群で発育遅滞が認められた。また、胎盤重量はWIN184486投与群で有意に低値を示した。

Tale 2 Effect of talarozole and WIN18846 on body and placenta weight

	n=	Placenta (mg)	sd	BW (mg)	sd
Talarozole	28	150	30.4	1138	166.0 *
WIN18846	24	126	15.4 *	1267	152.3 **
Cont	29	154	17.5	1361	176.1

Student's t-test

*: p<0.01, compared with control

** : p<0.05, compared with control

タラロゾール及びWIN18446投与により、奇形胎児数は有意に増加した。特に、外鼻及び上唇の形成不全が、両群で有意に増加した。その他、散発的に眼瞼、水晶体の形成異常、多指症、短尾・曲尾が両群で認められた。外脳症、小頭症、二分脊椎、顔面裂、口蓋裂、外生殖器奇形等は認められなかった。内臓の組織観察ならびに骨格観察は、現在、標本作成中であり今後、解析を継続して行う予定である。また、検体数が少ないため、母獣数を追加する必要がある。投与時期ならびに投与量についても、より幅広く検討する予定である。

Table 3 胎児外表観察のまとめ

	Taralozole		WIN14486		Cont	
母獣数	2		2		2	
着床数	34		30		29	
吸収胚数	5		4		1	
死亡胎児数	1		2		0	
生存胎児数	28		24		28	
観察個体数	13		10		14	
奇形胎児数	7	53.8%	7	70.0%	1	7.1%
眼球	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%
眼瞼	0	0.0%	2	20.0%	0	0.0%
水晶体	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%
外鼻/上唇形成不全	3	23.1%	3	30.0%	0	0.0%
下肢（尖足）	1	7.7%	0	0.0%	0	0.0%
多指	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%
側彎	1	7.7%	0	0.0%	0	0.0%
短尾・曲尾	3	23.1%	1	10.0%	0	0.0%
胸壁破裂	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%

CYP26A1およびB1の発現は、主に、鰓弓（顔面）、前・後肢芽、尾に発現が認められる。左右外鼻の間では、発現が異なる可能性があった。また、発現時期については、胎齢9.5-10日は、CYP26A1およびB1共に、鰓弓、前・後肢芽、尾に発現を認めた。また、前頭隆起はCYP26A1のみ発現が認められた。しかし、肝臓、心臓に発現は認められなかった。胎齢10.5日~11日には、CYP26A1は急激に発現が下がり、発現を検出できなかったが、26B1は弱いながらも、発現が認められた。胎齢11.5日以降では共に発現を検出できなかった。今後は、qPCRや Western blottingなどを行うことによりこれらを確認する必要がある

今回の解析により、タラロゾール及びWIN18446による奇形発現部位とCYP26A1およびB1の発現領域（Fig. 26）がほぼ一致することが明らかとなった。

しかし、タラロゾール及びWIN18446投与に対する、CYP26A1及びB1の反応性の相違については不明である。今後、各剤投与後の胎児中器官でのCYP26A1及びB1の発現量を、胎児鰓弓、前・後肢芽及び尾において計測する必要がある。

Fig. 26 Expression of CYP26A1 and 26B1 in mouse embryos (9.5-10dcp)



26A1

26B1

「考察」：タラロゾールやWIN18446による *in vivo* のCYP26およびRALDH酵素活性阻害にたいする対象実験として、マウスのレチノイン酸合成・代謝酵素発現をshRNAの導入により直接抑制する考え、現在マウスCyp26a1の4種shRNA発現レンチウイルスを作成し、mRNAの発現を抑制するか検討している。化学発光および蛍光タンパク質発現ウイルスは既に作成が完了しているので、現在、先行して作成したレポーター発現アデノウイルスをマウスに実際に投与して、肝臓、神経細胞などの組織細胞においてレポーター活性が測定可能か現在解析した。しかし、今回活性は得られなかった。今後ウイルスの感染条件を変えることにより再度検討する。この実験結果より、組織での発現が確認できれば、妊娠ラットにこのウイルスを投与し、胎児にレポーターが発現するか、またその活性からレチノイン酸濃度が定量可能かを検討する。マウス組織においてレポーター活性が得られ次第、妊娠マウスあるいは胎児組織培養系に感染させ、発生・分化過程の胎児組織細胞で蛍光が認められるか、さらに、蛍光を示す組織を用いて化学発光の測定による定量が可能かも検討する。

タラロゾールとWIN18,446投与により胎児マウスに催奇形性の発症が確認できた。現在、催奇形性を行う予備実験としてCYP26A1、CYP26B1およびRALDH2の局所細胞での発現の変動を組織染色およびmRNAにて確認する実験を行っている。また、レチノイン酸合成・代謝酵素発現をshRNAの導入により直接抑制するためにshRNAウイルスを作成した。現在マウスCyp26a1の4種shRNA発現レンチウイルスをマウスに感染させ、肝臓や神経細胞のCyp26a1に影響を与えるのかの実験の準備をしている。

4) 研究項目名：レチノイン酸濃度と催奇形性

個別課題名：催奇形性を示したマウス臓器細胞のレチノイン酸濃度測定と統括（研究者名：永田 清（東北薬科大学））

研究目的・手法：化学発光および蛍光タンパク質発現ウイルスを妊娠マウスに同時感染させ、組織細胞で蛍光が認められるか、化学発光の測定が可能かを検討する。

化学物質およびshRNA処置により催奇形性が認められたものは、これらの投与と同時に化学発光および蛍光タンパク質発現ウイルスを感染させ、異常が見られた臓器細胞において、蛍光が認められた細胞のレポーター活性を測定し、レチノイン酸濃度を定量する。

研究成果・考察：現在マウスを用いた予備実験を行っている。化学発光および蛍光タンパク質発現ウイルスが完成したので、妊娠マウスに同時感染させ、組織細胞で蛍光が

認められるか、化学発光の測定が可能かの予備検討を行っている。現在の実験条件基ではレポーターの活性はマウス肝臓にては検出されていない。今後は、タラゾールにて催奇形性が確認されたので、この実験条件を至急整え、さらにCYP26A1 mRNA発現を抑制するshRNAも用いて、これらの投与と同時に化学発光および蛍光タンパク質発現ウイルスを感染させ、異常が見られた臓器細胞においてレチノイン酸濃度を定量する予定である。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

レチノイン酸合成酵素 RALDH 及び分解酵素 CYP26 発現アデノウイルス発現系を完成させた。これらの活性測定のための最適な培養細胞を調べ、内因性のこれら酵素の発現が少ない HeLa 細胞を用いることとした。代謝物を測定するために ULPC-MC/MC を用いたが、基質濃度は 5 mM が限界量であることが判明した。今回、入手可能な 19 種類のアゾール系農薬と代表的なアゾール系抗菌薬を用いた活性阻害実験で薬物代謝酵素 P450 においては、強い阻害を示すもの（抗菌薬の場合は、報告されているものとその程度は同じであった。）が認められた。しかし、CYP26A1 は、タラゾールのみで比較的強い阻害が認められたものの、他のものは阻害しなかった。また、タラゾールの CYP26A1 活性阻害定数は $IC_{50}: 2 \mu M$ であり、報告値 5 nM と大きく異なっていた。さらに、抗菌薬であるケトコナゾールも CYP26A1 活性を強く阻害する ($IC_{50}: 0.55 \mu M$) と報告されているが、本実験では 10 μM でも全く阻害が認められなかった。本研究を行うに当たり研究の立案した当時、アゾール系の抗菌薬の薬効は、菌の CYP51 活性の阻害であるため、また、薬物代謝酵素 P450 を同様に強く阻害することから、アゾール系農薬による催奇形成発症は、レチノイン酸分解酵素である CYP26 活性阻害により、組織のレチノイン酸濃度が高くなり、その後この酵素が誘導されて逆にレチノイン酸濃度が低下することがその原因であると予測していた。そのために組織中の濃度を測定することができれば、これを証明できると考えていた。また、多くのアゾール系農薬は CYP26 活性を阻害するだろうと予測していた。一方、本実験ではヒト CYP26A1 および CYP26B1 の発現を Western Blotting, 酵素活性等を詳細に調べ、間違いなくこれらは発現していることを確認している。また、同時に対照実験として行った薬物代謝酵素 P450 活性は、予測通りの結果を示していることから、実験の手法や発現酵素自体には問題ないと考えている。仮に基質を生体と同じ低い濃度で行った活性阻害実験でも、酵素学的には高い場合と阻害定数は同じになるはずである。報告されているタラゾールの CYP26A1 活性阻害定数は $IC_{50}: 4-5 \mu M$ は非常に低い値であり、タラゾールはごく微量でも催奇形成を発症することが予測される。

一方、アゾール化合物によるこれら酵素の遺伝子発現への影響について、mRNA 量の変動を調べた。レチノイン酸ほどではないが、いくつかのアゾール化合物によって、CYP26A1 遺伝子の転写活性化が認められた。特に、タラゾールで強かった。逆に RALDH では、いくつかのアゾール化合物によって、約半分ほどの転写活性化の抑制が認められ、組織のレチノイン酸濃度はその合成分解酵素活性の阻害以外に酵素発現量の変動によってもたらされる可能性が考えられた。

組織におけるレチノイン酸濃度は ULPC-MC/MC を用いても難しいため、本研究ではレポーターアッセイ法を応用して濃度を測定することを実験目的とした。そのためにレチノイン酸にて強く転写活性される HoxA1, HoxA2 および CYP26A1 遺伝子のプロモーター遺伝子を単離し、レポータープラスミド構築を完了した。しかし、HoxA1, HoxA2 レポータープラスミドでは強い誘導は認められなかったが、CYP26A1 レポータープラスミドでは、強い誘導が認められた。さらに感度を上げるために人工的な RXR 結合配列をこのプラスミドに挿入し、10 倍ほど誘導が強いレポータープラスミドを作成した。同時に、レポーター遺伝子として蛍光化学発光遺伝子であるルシフェラーゼと

蛍光タンパクを融合させたものも作成した。これをアデノウイルスに組み、マウスに投与して発現するか検討したが、活性の検出はできなかった。条件を検討することで活性の測定は可能と考えている。

タラゾール (5 µg/body) 及び WIN18446(4 mg/body)を ICR 妊娠マウスに投与すると、奇形胎児数は有意に増加した。特に、鼻の形成不全及び口唇裂が、両群で高頻度に認められた。その他、散発的に眼瞼、水晶体の形成異常、多指症、短尾・曲尾が両群で認められた。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
なし
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
レチノイン酸代謝酵素CYP26の活性阻害評価系構築
新井 悠、佐々木崇光、稲見敬太、佐藤 裕、熊谷 健、吉成浩一^a、永田 清
(^a静岡県大薬) 第54回日本薬学会東北支部大会、岩手、2015年9月、要旨集p. 61
- 3 特許及び特許出願の数と概要
なし
- 4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)
なし

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

- 1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) レチノイン酸合成・代謝酵素を阻害する化学物質の構造相関性が存在するか。	4	本研究の成果の一つは、研究計画の当初から活性阻害の構造相関性はアゾ-ル環にあると想定し、酵素活性および誘導評価が可能な実験試料を一から全て作成し、活性阻害及び誘導評価の実験系の構築に成功したところにある。結果的にCYP26 活性阻害は、タラゾールに認められるのみで、今回使用したアゾ-ル系の農薬には活性阻害が見いだせなかった。これらの大半(催奇形性が発症するものも含む)は、食品安全委員会農薬専門調査会にて審議されてものであり、アゾ-ル骨格を持つ化学物質は、必ずしも CYP26 の活性を阻害するわけではないあるいは催奇形性を示すわけではないことが示唆さ

		れ、本研究での大きな評価と考えている。
(2) 実験動物とヒトの種差は、レチノイン酸合成・代謝酵素阻害の種差に起因するか。	4	ヒトの CYP26A1 および CYP26B1 とマウスの Cyp26a1 および Cyp26b1 の酵素活性は、レチノイン酸代謝の代謝産物種及びその生成量は大きく変わらなかった。内因性の化合物を基質としている酵素は、一般的に基質特異性が高く、構造が少しでも変化すると基質結合サイトに結合できなくなり触媒反応が起らないと考えられた、また、実験項目 (1) の結果も、このことを指示しており、本研究での成果と考えている。従って、合成酵素および分解酵素の活性阻害の種差は少なく、実験動物とヒトの催奇形性の種差はあまりないことが予測できた点が評価されると考えている。
(3) 催奇形性の分子機構は、組織細胞のレチノイン酸濃度変動によって説明可能かを明らかにする。	2	本研究では、最終目的の組織細胞のレチノイン酸濃度変化と催奇形成の関係までを明らかにするまでには至らなかったが、マウス胎児に於ける CYP26A1 および 26B1 の発現臓器、時期を明にすることができた。特にレチノイン酸によって誘導を受ける CYP26A1 は、胎齢 9 から発現し、胎齢 10-11 から急激に減少、そして胎齢 11.5 には発現しないこと、そしてこの時期にタラロゾールを投与することにより催奇形成の発症が確認できたことは大きな成果と考えている。この結果より、実験的に催奇形性を起こすためには、CYP26A1 活性を阻害する化学物質の投与を胎齢 9-11 に行うことが必要であることが判明した。これらの結果はマウス Cyp26a1 の shRNA 発現レンチウイルスを用いて、今後さらに確認する予定であり、また、レポーターを用いたレチノイン酸濃度の測定も胎齢に行えばよいことが判明した

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	3	<p>本研究では、研究を進める上で必要な遺伝子の単離、プラスミド、ウイルスの作成を一から行いその有効性の確認を行う基礎実験を行う必要があったために、これに大半の時間を費いやした。また、予定外の実験の停滞により、後半に予定していた <i>in vivo</i> 実験があまりできなかった。特にレポーター活性から <i>in vivo</i> のレチノイン酸濃度を測定可能な実験系の構築は、多くの実験手法の構築が必要であったために2年間の期間内に実施できなかった。それでも当初予定していた全実験内容の 60-70%は達成できたと考えている。中でも化学物質による酵素活性阻害の系の樹立およびレポータープラスミドおよびウイルスの作成の完了、そして CYP26 酵素活性阻害が予測されたアゾール系農薬ではいずれも酵素阻害を示さず、このことからアゾール系環を有するものが必ずしも酵素活性阻害及び催奇形性を示さないことが判明したところに大きな成果がある。</p>
(2) 研究成果の有用性	4	<p>農薬評価書に催奇形性を示すと記載されている農薬について CYP26A1, 26B1 を阻害しないことから、初期の仮説が覆され、新たな展開が必要なことが明らかになる可能性があり、本研究の成果は大きな有用性があると考えている。また、実験動物とヒトの催奇形性の種差はあまりないことが予測できた点、およびマウス胎児に於ける CYP26A1 および 26B1 の発現臓器、時期が明らかとなったことで、今後のレチノイン酸濃度測定および催奇形性の実験を行う上で非常に有用性の高い情報を得ることができた。</p>
<p>総合コメント</p> <p>今回使用したアゾール系の農薬の大半(催奇形性が発症するものも含む)は、食品安全委員会農薬専門調査会にて審議されてものであったが、タラゾロールのみに阻害</p>		

が認められるのみで、アゾール骨格を持つ化学物質は、CYP26 の活性を阻害する可能性はあるが、薬物代謝酵素 P450 とは異なり、その多くは CYP26 活性を阻害しないことが判明した。ただし、活性阻害するものは催奇形性を引き起こす可能性が高いことが示唆された。また、活性阻害については大きな種差がないこと想定された。

本研究を遂行するに当たり、研究を担当していた職員の異動、死去及び大学院生の退学、学部学生の体調不良などが重なり研究が進まず、予定が大幅に遅れたが、最後に CYP26A1 活性を強く阻害するタラロゾールを妊娠マウスに投与することにより催奇形成の発症が確認でき、今後の研究に繋がる研究成果が得られた。研究材料はほぼ揃ったので、初期の目的達成のために今後も本実験を進め最終的に英文雑誌に数報投稿することを考えている。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。