

2018年日化協LRI研究報告会(平成30年8月31日:東京証券ホール)

日本毒性学会 第4回日化協LRI賞受賞講演

# 核内受容体作動性ハザードによる生殖発生毒性 およびその評価系に構築に関する総合研究



岐阜薬科大学 衛生学研究室  
中西 剛

*Tsuyoshi Nakanishi, Ph.D.*

*Lab. Hygienic Chem. Mol. Toxicol., Gifu Pharmaceutical University*



# リスク評価とは？

リスク = ハザードの強度（有害性） × 曝露量（摂取量）

## ハザードアセスメント

- ハザードの同定  
⇒ どんな化学物質なのか？
- ハザードの特徴付け  
⇒ どんな毒性を示すのか？  
⇒ どのぐらいの  
曝露まで大丈夫なのか？  
⇒ 作用メカニズムは？

## エクスポージャー アセスメント

- 推定曝露量の算出  
⇒ 環境中、食品中濃度の分析
- 直接的な曝露量の定量  
⇒ ヒト検体中濃度の分析



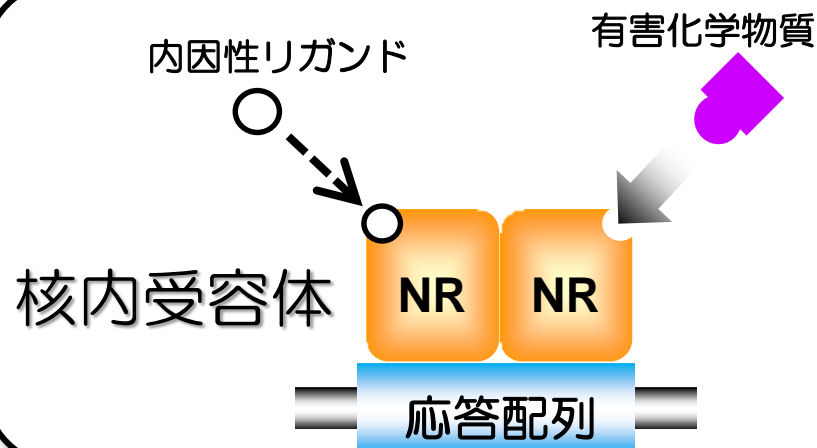
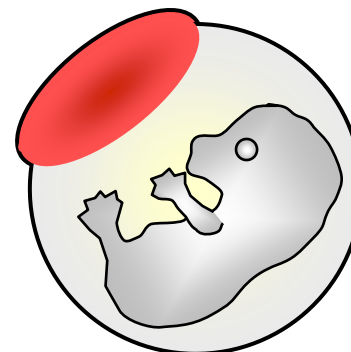
# リスク評価とは？

リスク = ハザードの強度（有害性） × 曝露量（摂取量）

## ハザードアセスメント

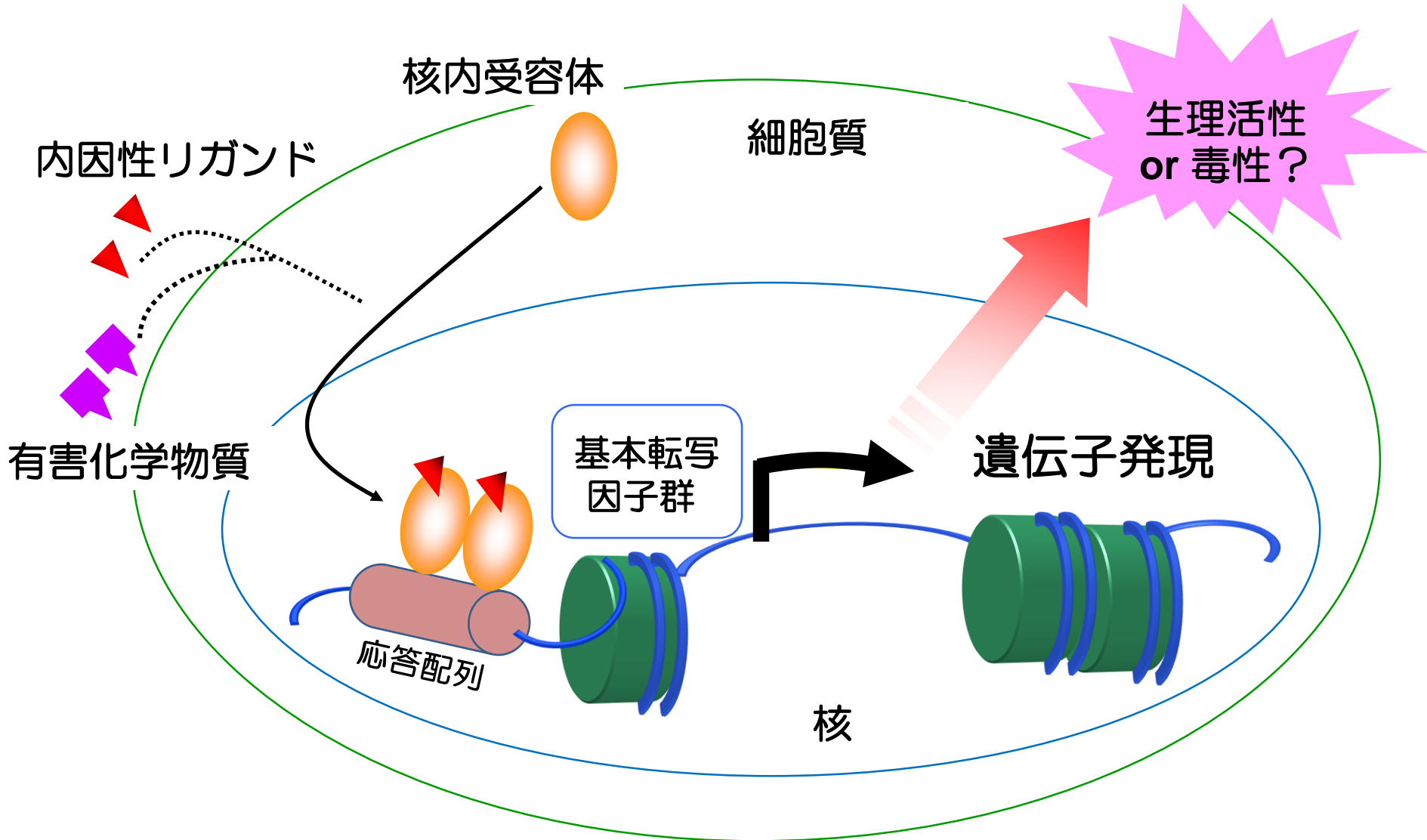
- ハザードの同定  
⇒ どんな化学物質なのか？
- ハザードの特徴付け  
⇒ **どんな毒性を示すのか？**  
⇒ どのぐらいの  
曝露まで大丈夫なのか？  
⇒ **作用メカニズムは？**

生殖発生毒性（胎盤）



# 核内受容体を介した生理作用

核内受容体・・・リガンド依存的に作用する転写因子





# Outline

---

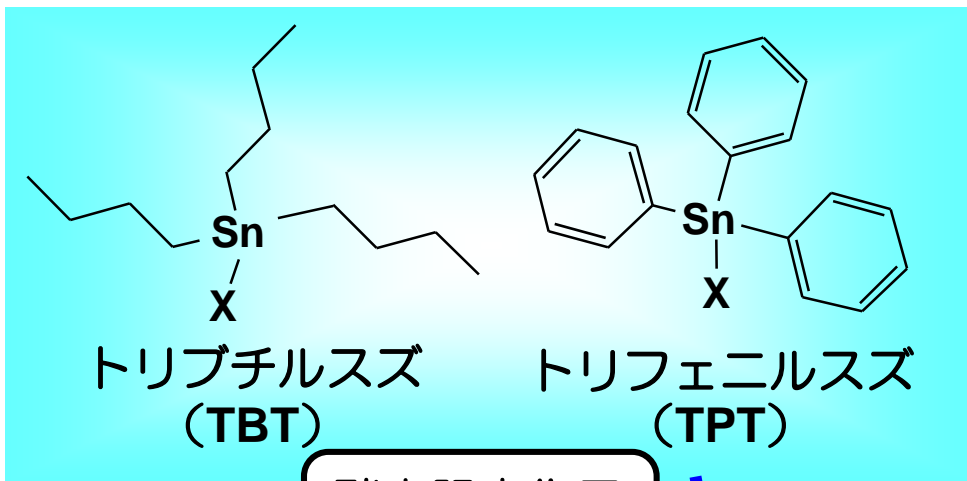
- 有機スズ化合物の生殖発生毒性
  - 代替ビスフェノールAの生殖発生毒性
  - モデル動物を用いたハザード・リスク評価系の構築
-



# 有機スズ化合物の生殖発生毒性

# 有機スズ化合物の生殖発生毒性

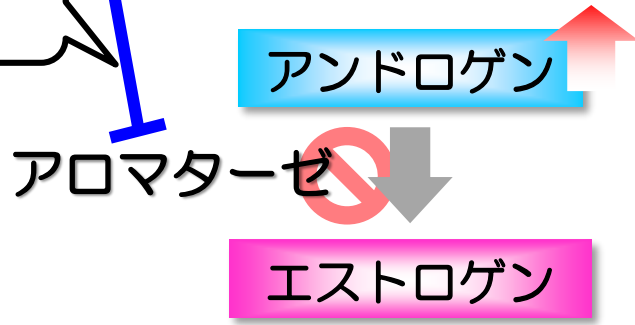
船底塗料や漁網防汚剤に使用されていた海洋汚染物質



酵素阻害作用  
 μMレベル



通常の雌



仮説：アロマトラーゼ酵素阻害説

nMレベルで雄化の誘導



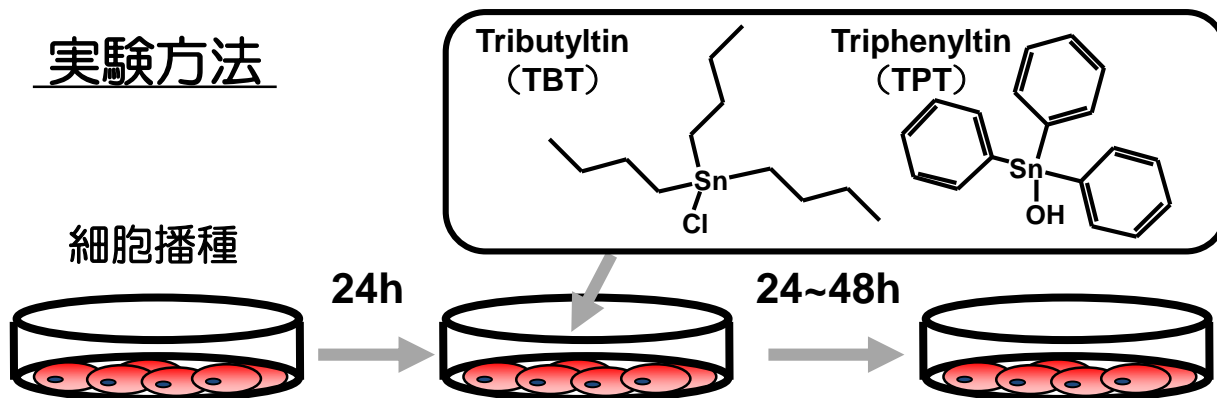
雄化した雌

## § ヒトへの曝露状況

- 米国  
 血中TBT濃度： ~ **25 nM**  
 (Kannan et al., Environ. Sci. Technol., 1999)
- ドイツ  
 血清中TPT 濃度： **0.49 ~ 1.92 nM**  
 (Lo et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2003)

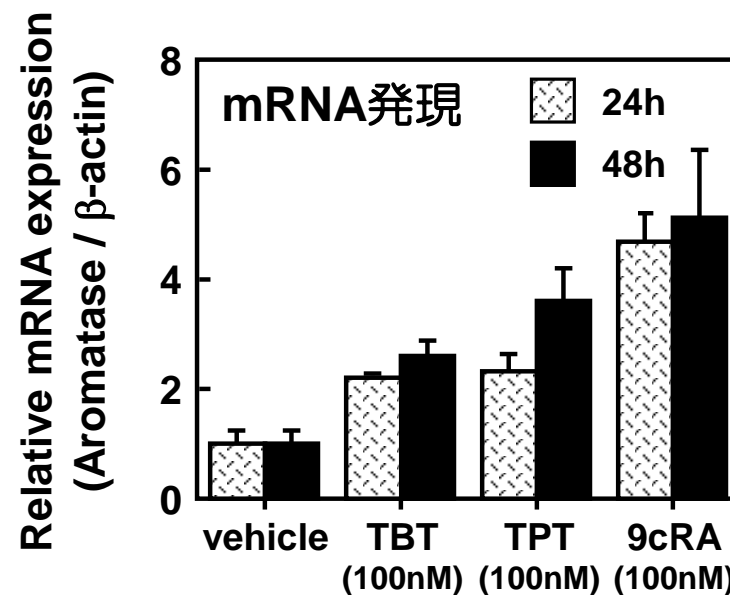
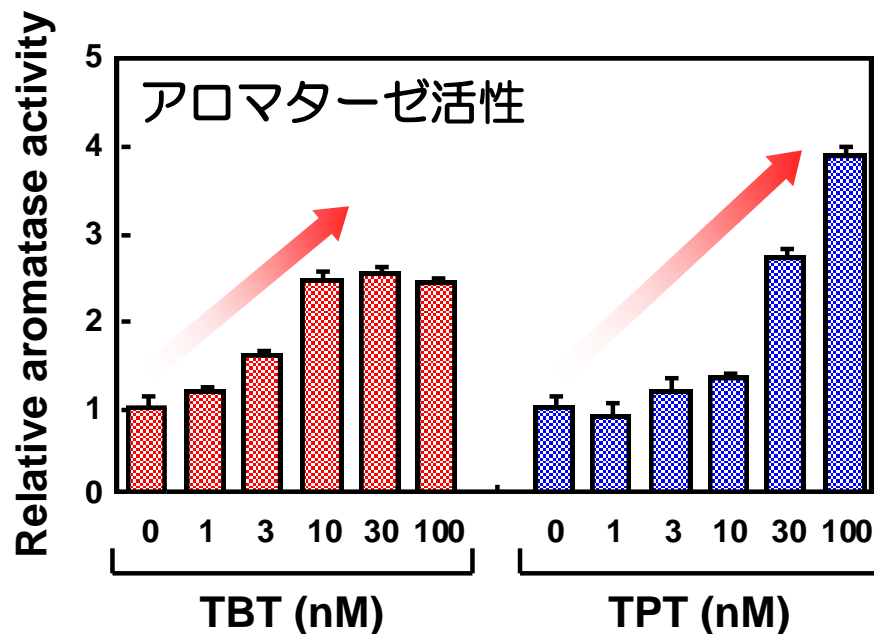
# 有機スズ化合物の胎盤機能への影響

## 実験方法



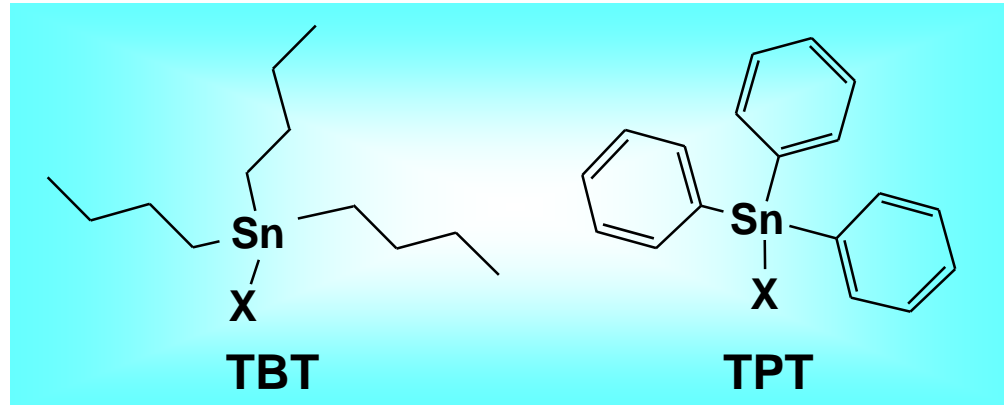
- 1) アロマターゼ活性測定
- 2) mRNA回収, リアルタイムRT-PCR

アロマターゼへの影響 → **nMレベル**でmRNA発現を伴って上昇





# 小括1：生物種による有機スズ化合物の毒性の違い

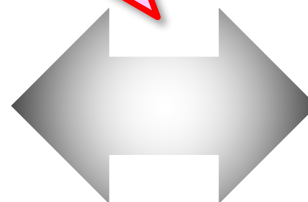


巻貝類

雌固体の雄化  
(アロマターゼ酵素阻害説?)

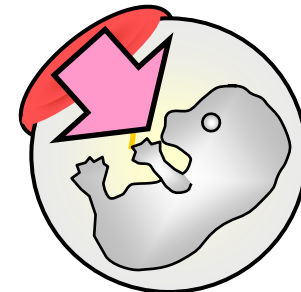


相反する  
表現型?



ヒト胎盤

エストロゲン産生の亢進  
(アロマターゼ発現の亢進)



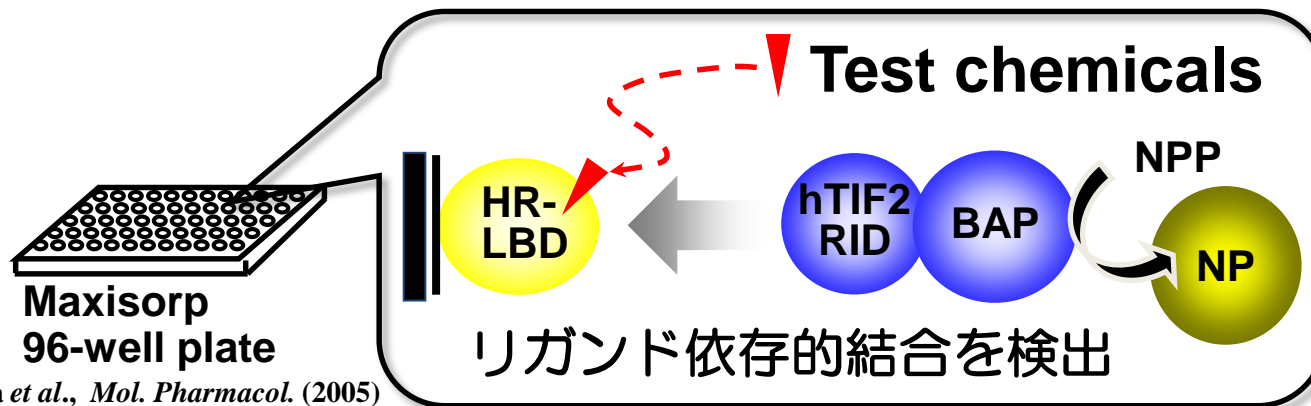


# *in vitro*核内受容体リガンドスクリーニング系 (CoA-BAP)

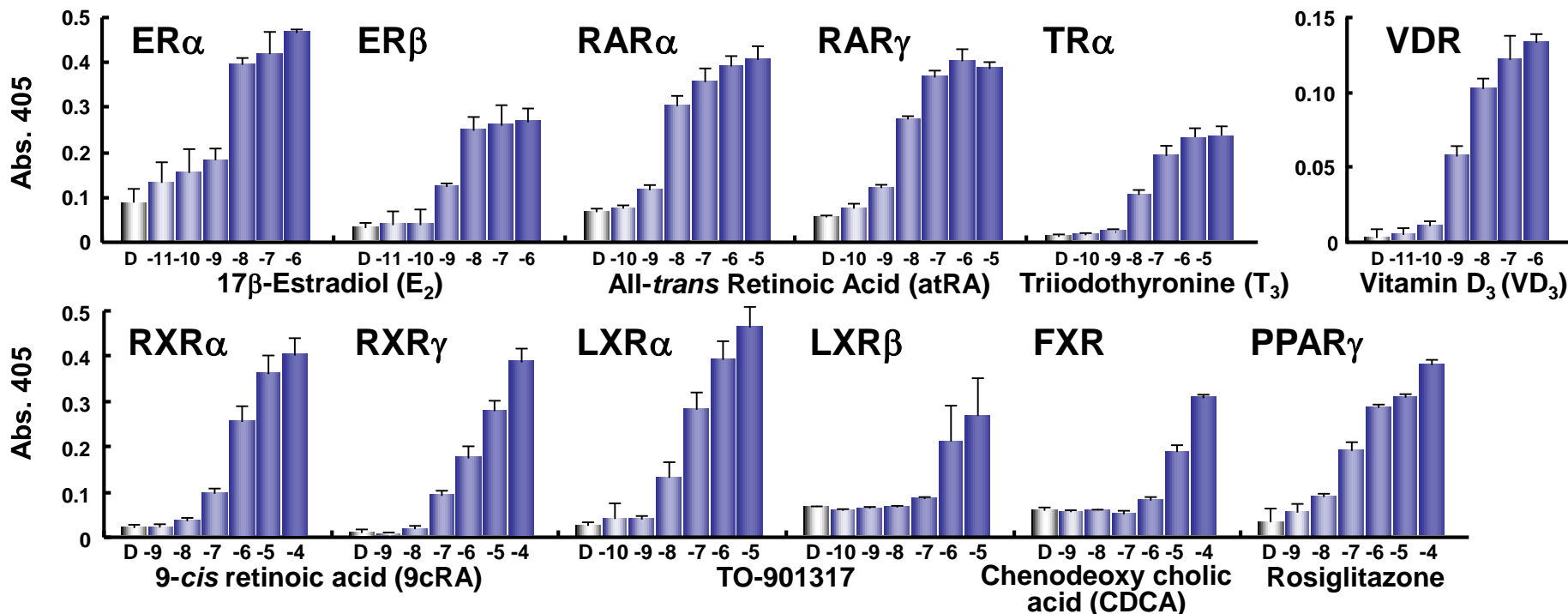
CoA-BAP法: Coactivator - Bacterial Alkaline Phosphatase



武庫川女子大・薬  
西川淳一先生



Kanayama *et al.*, *Mol. Pharmacol.* (2005)



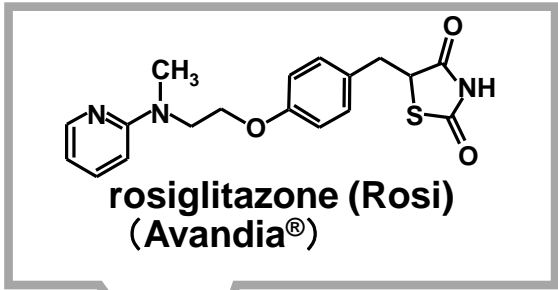
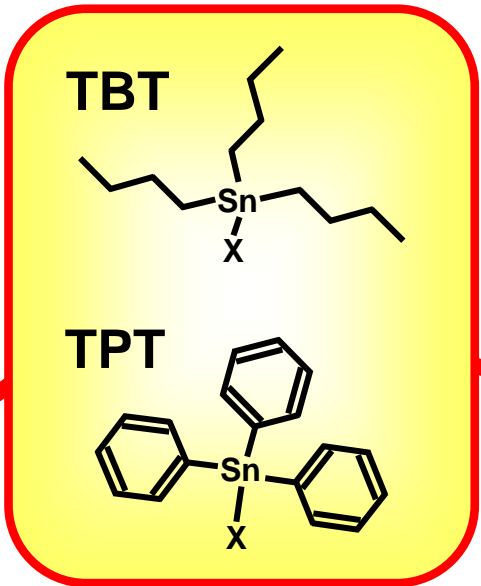
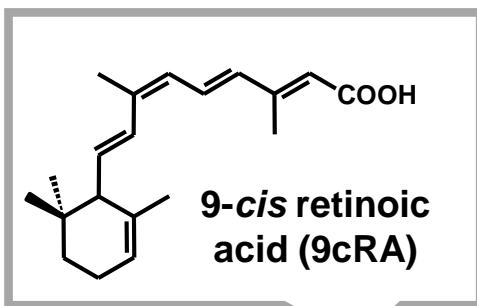
# 有機スズ化合物は核内受容体アゴニストとして作用する

## レチノイドX受容体 (RXR)

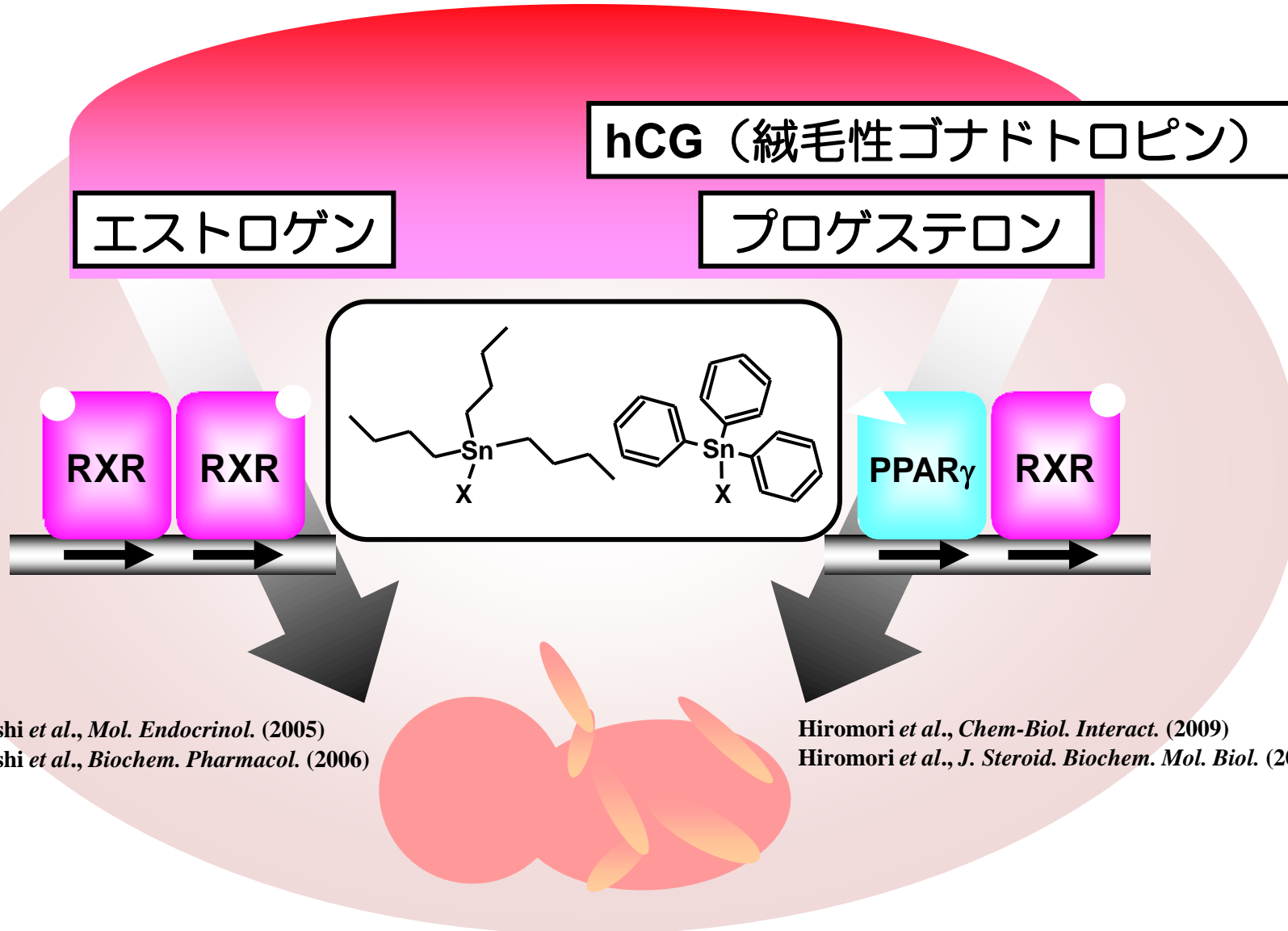
- ビタミンAの代謝物である9-*cis*レチノイン酸等をリガンドとする核内受容体
- ビタミンAの代謝等様々な遺伝子発現制御に関与
- ホモダイマーまたはPPAR、RAR、VDR、TR等とヘテロダイマーを形成

## ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

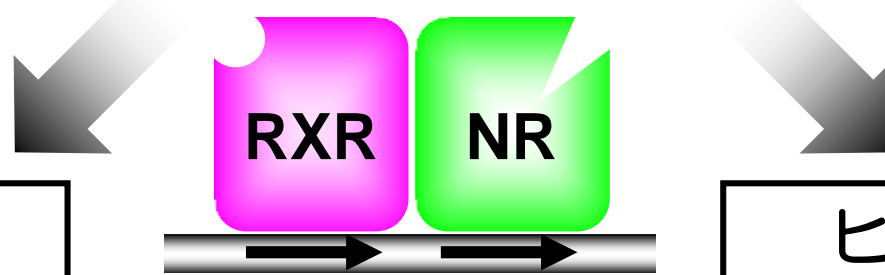
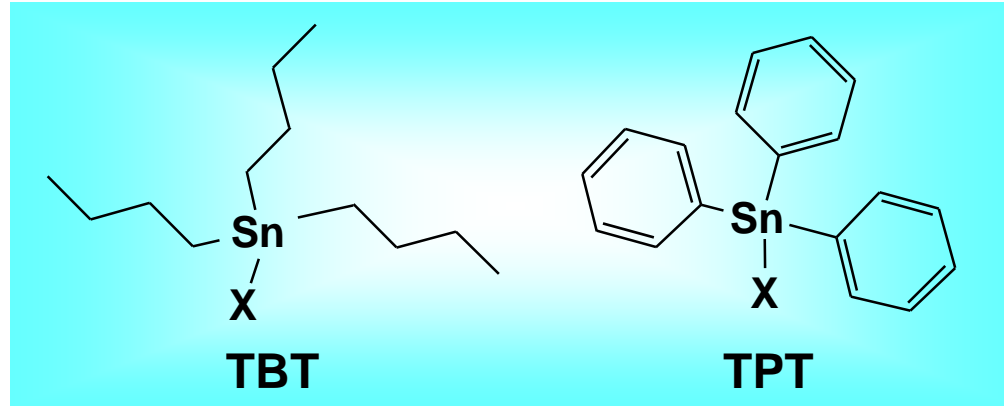
- RXRとヘテロダイマーを形成
- II型糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体の受容体
- 脂質代謝・糖質代謝、胎盤形成などに関与



# 有機スズ化合物はRXR、PPAR $\gamma$ を介して ヒト胎盤内分泌機能を修飾する



# 有機スズ化合物の内分泌かく乱作用の違い



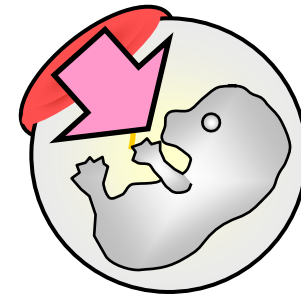
巻貝類

雌固体の雄化  
(~~アンドロゲン代謝阻害?~~)



ヒト胎盤

エストロゲン産生の亢進  
(アロマターゼ発現の亢進)



# 小括1：有機スズ化合物の毒性

- ✓ 有機スズ化合物はRXRやPPAR $\gamma$ を介して、ヒト胎盤内分泌機能の修飾や、巻貝類の雄化を誘導する。
- ✓ 有機スズ化合物はRXRやPPAR $\gamma$ を介して、さまざま生物種に生態影響を与える可能性がある。



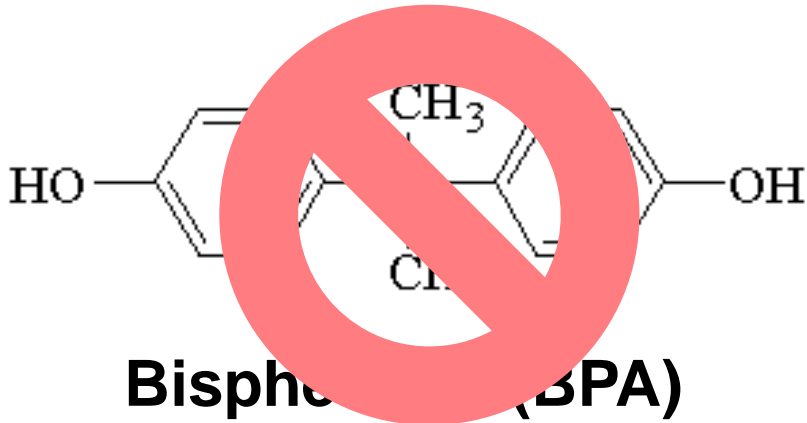
## 将来展望

ヒトにおいては、巻貝類のような生殖器形成異常の心配はないが、RXRやPPAR $\gamma$ を考慮したリスク評価を行う必要がある。



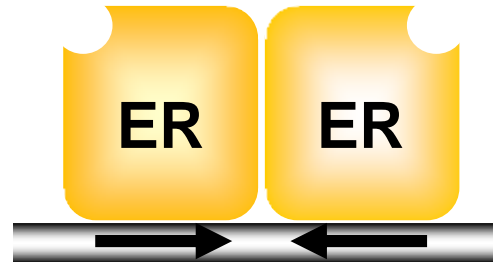
# 代替ビスフェノールAの生殖発生毒性

# Bisphenol A (BPA) とは？



多くの国で食品に触れる容器等  
での使用禁止または規制

主にポリカーボネート (PC)  
製のプラスチック樹脂として  
使用



エストロゲン作用があることが示され、内分泌疾患や  
内分泌関連がんの発生率上昇との因果関係が懸念されている。



BPAの代替物質が導入されるようになる

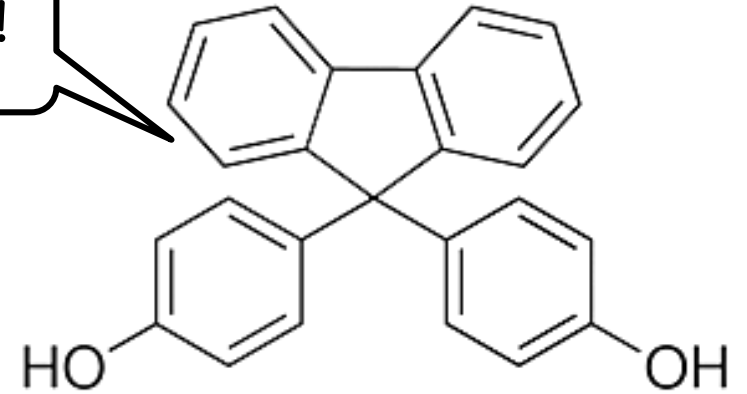


# ペットボトル中の飲料水に存在する代替ビスフェノール



BPAフリーのPC製  
安全ペットボトル中  
の飲料水

世界に先駆けて発見！  
Zhang et.al., Nat. Commun. (2017)



**Fluorene-9-bisphenol (BHPF)**  
9,9-bis(4-hydroxyphenyl)-fluorene

**BPA代替物質**として  
プラスチック製造に使用  
・ポリカーボネート (PC)  
・エポキシ樹脂など



北京大学  
城市与环境学院  
胡建英先生



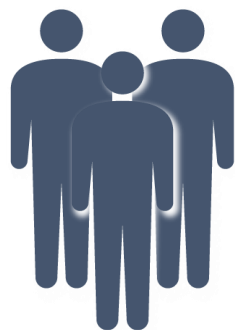
食物に触れる製品にも使用されるが  
毒性評価に関する報告が全く存在しない！

# 学生ボランティア血液中のBHPF濃度

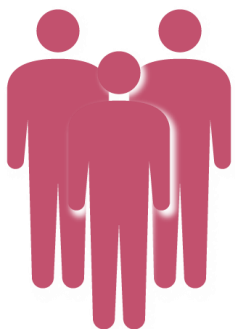


## § 実験方法

日常的にプラスチックボトルから飲料水を飲んでいる  
大学生ボランティア100人（男女50人ずつ）の血漿  
サンプル中のBHPF濃度を測定

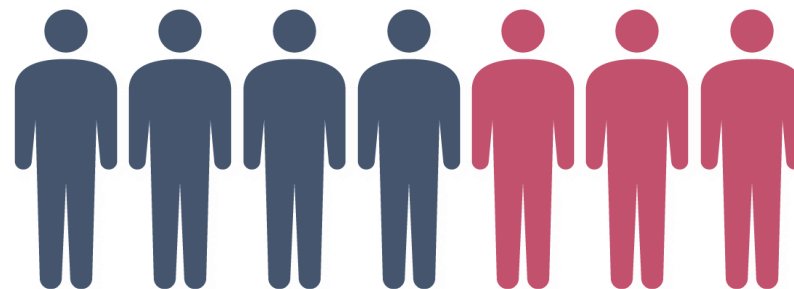


男子学生50人



女子学生50人

7人の血漿サンプルからBHPF検出



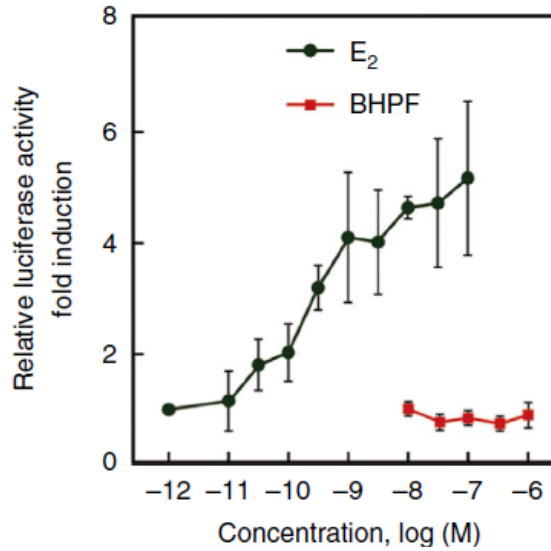
平均  $340 \pm 210$  pg/mL  
最高 700 pg/mL



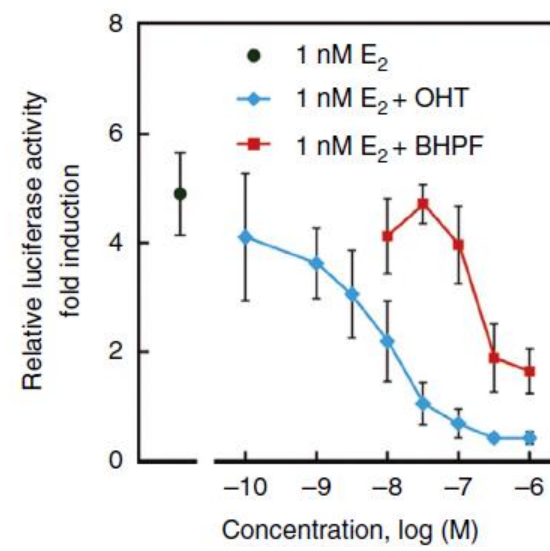
# *in vitro*におけるBHPFのエストロゲン作動性

**ER $\alpha$**

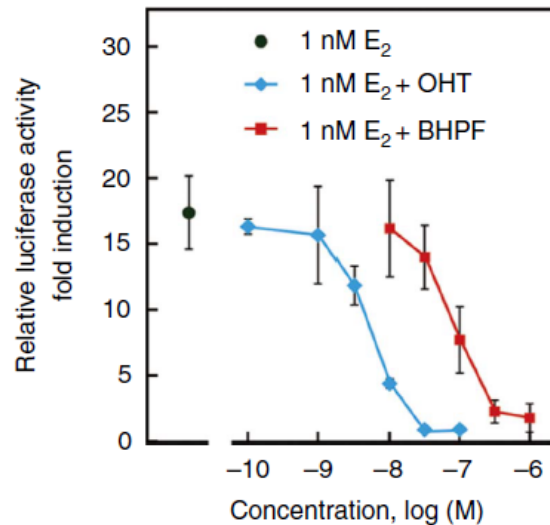
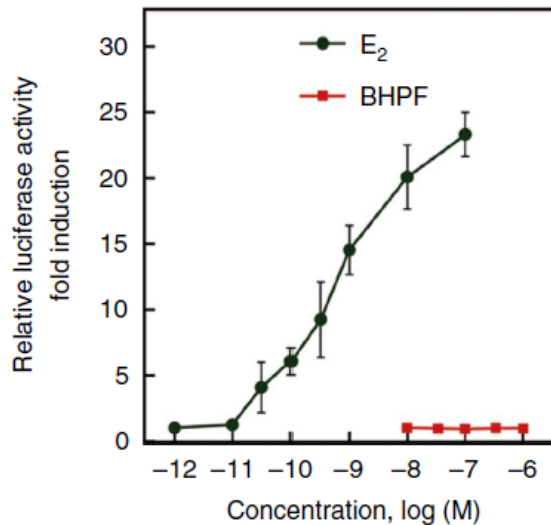
アゴニスト活性



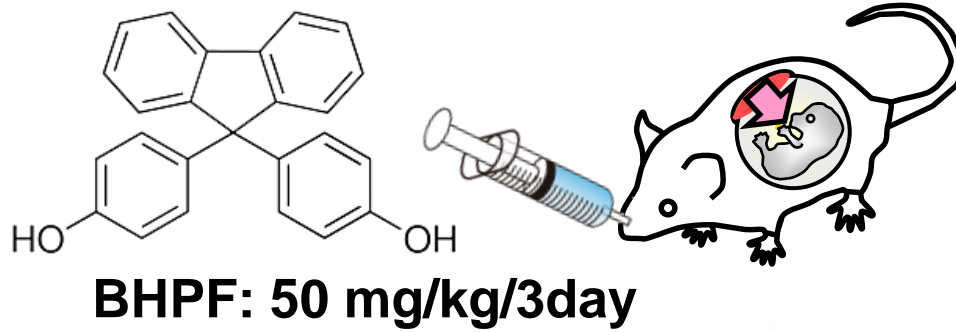
アンタゴニスト活性



**ER $\beta$**



# BHPF投与群での異常妊娠



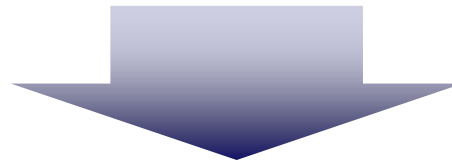
出産後期での胎児死



不十分な吸収胚を  
含む晩期流産

## 小括2：代替ビスフェノールAの生殖発生毒性

- ✓ ペットボトル中の飲料水中に抗エストロゲン作動性のハザードであるBHPFを新たに同定した。
- ✓ BHPFはヒト血中からも検出される。
- ✓ BHPFは生殖発生毒性を引き起こす可能性がある。



将来展望

詳細なリスクアセスメントが必要



# モデル動物を用いたハザード・リスク評価系の構築

## ～アデノウイルスベクターを用いた胎盤機能修飾モデルの作製～

# 胎盤の種差

## 胎盤は非常に種差が大きい臓器

- 構造的種差

例：胎盤細胞層の数

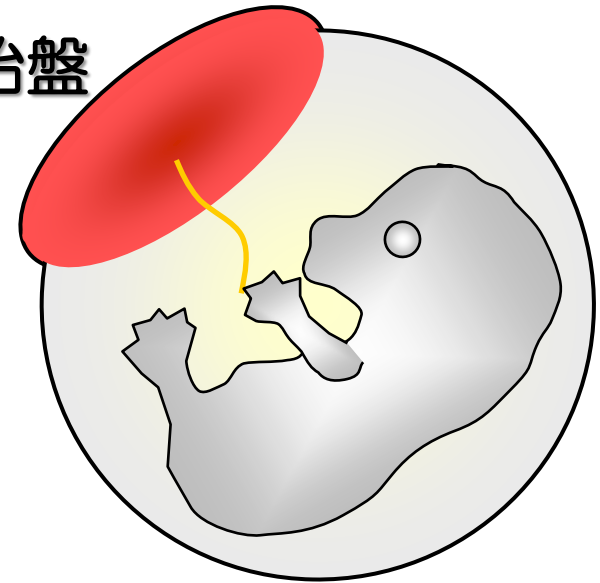
ヒト ⇒ 1層  
齧歯類 ⇒ 3層

- 機能的種差

例：内分泌機能

ヒト ⇒ アロマターゼがある  
齧歯類 ⇒ アロマターゼがない

胎盤



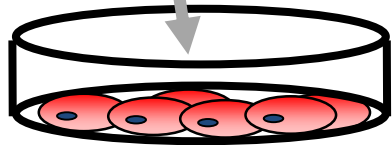
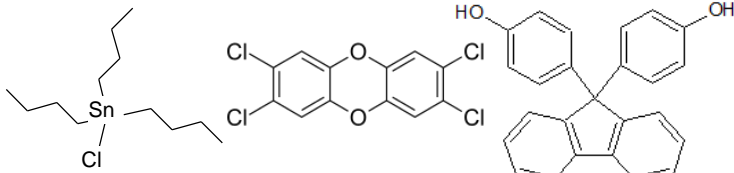
有機スズ化合物やレチノイン酸などのヒトにおける影響を齧歯類では再現できない。

Itoh et al., *Gen. Comp. Endocrinol.* (2009)

Nakanishi T, *Yakugaku Zasshi* (2007)

# アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた胎盤機能修飾

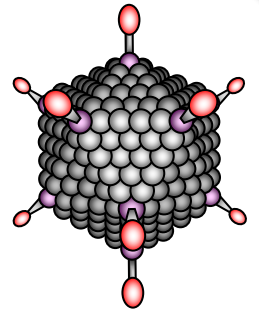
被験物質



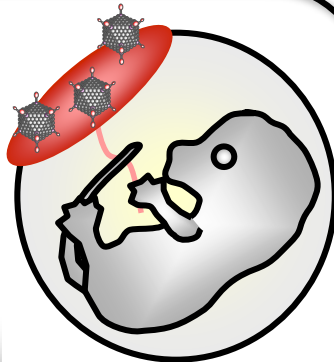
ヒト胎盤細胞

発現変動する  
(毒性に関与する)  
遺伝子群を抽出

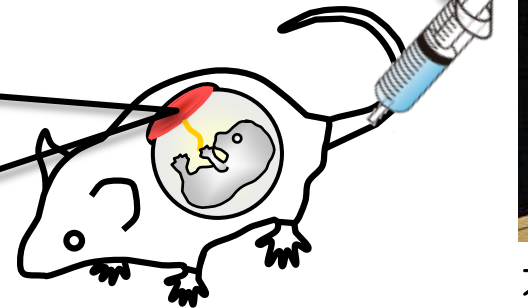
目的遺伝子を発現する  
Advベクターの作製と  
妊娠動物への投与



胎盤特異的な  
遺伝子発現変動  
の影響を解析



ヒトにおける毒性の予測  
(アニマルスケールアップの解決)



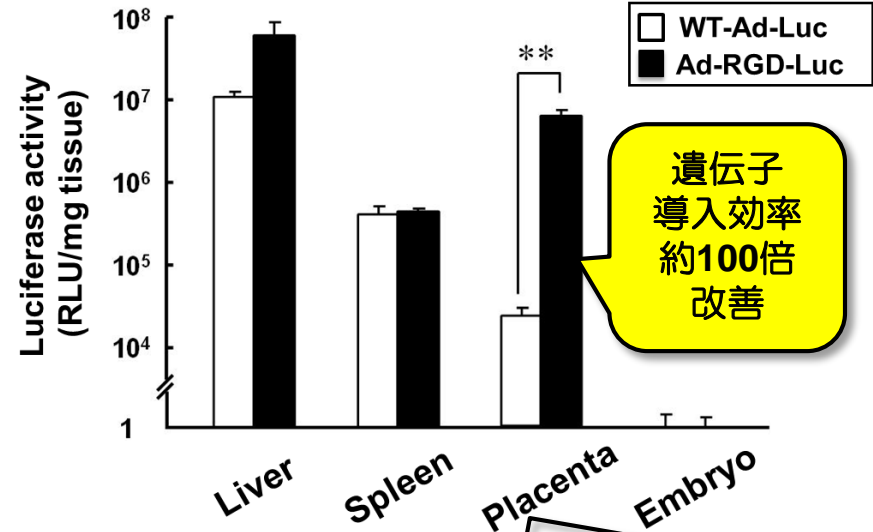
大阪大院・薬  
水口裕之先生



# アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた胎盤機能修飾

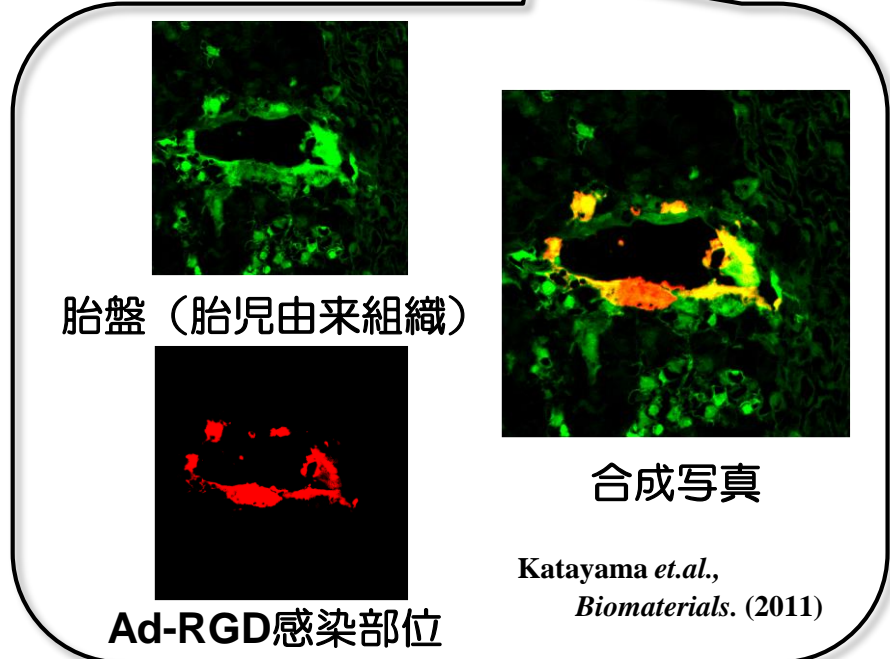
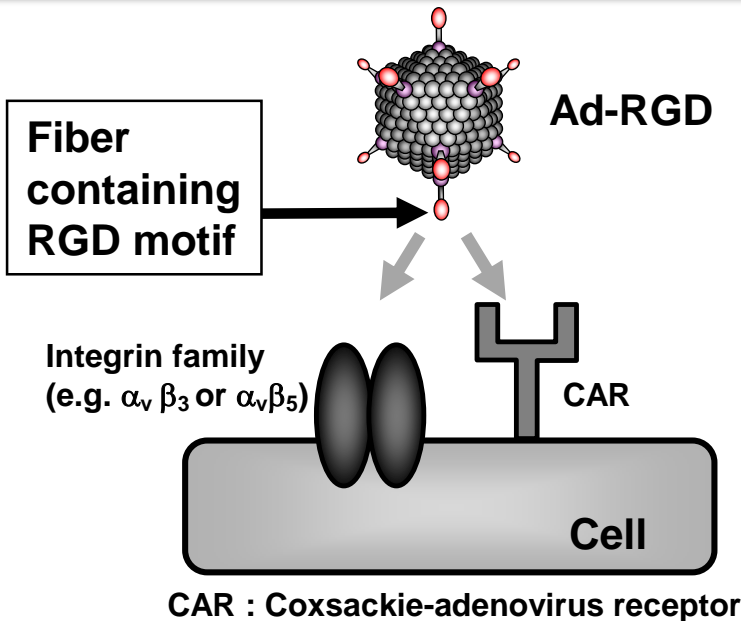
## Adベクターの欠点

- ウイルス受容体 (CAR) を持たない細胞には感染しない
- 胎盤への移行量が少ない



遺伝子  
導入効率  
約100倍  
改善

## ファイバー改変Adベクターの応用



## 小括3：Adベクターを用いた胎盤機能修飾モデルの作製

- ✓ **Fiber部分にRGDモチーフを付与したAd-RGDでは、胎盤への遺伝子導入効率が100倍以上改善した。**
- ✓ **妊婦におけるAd-RGDを用いた遺伝子治療には、胎盤への感染の注意が必要である。**