

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01914

研究課題名(和文) AOP研究基盤の高度化を目指した魚類を用いた化学物質の影響評価

研究課題名(英文) Adverse outcome pathway concept elucidating the developmental effects of equine estrogens on fish species

研究代表者

有蘭 幸司 (Arizono, Koji)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：70128148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊馬の尿中から検出されるエクインエストロゲン類(EQs)をモデルとして、メダカおよびゼブラフィッシュのエストロゲン受容体サブタイプに対する結合親和性のインシリコ予測、両魚種の胚に対するエストロゲン様作用の評価、両魚種の胚トランスクリプトームに及ぼす影響評価を行い、EQsのAdverse Outcome Pathway(AOP)の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、水環境中のEQs存在実態の解明だけでなく、魚類胚に対するAOPの一端を解明した点に学術的意義がある。また、魚類胚を用いた本研究は、動物福祉・愛護に大きく貢献する。本研究成果は、EQsの生態リスク評価における科学的根拠を提示しただけでなく、AOP研究基盤の高度化にも繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate the adverse outcome pathway (AOP) of equine estrogens (EQs) on developing medaka (*Oryzias latipes*) and zebrafish (*Danio rerio*) using in silico and in vivo assays. In silico docking simulation analysis revealed that six EQs interact with the ligand-binding domains of medaka and zebrafish estrogen receptor (ER) subtypes. Our quantitative real-time RT-PCR analyses documented that the mRNA expression levels of CYP19A1b and ChgL in developing zebrafish and medaka responded to various types and concentrations of EQs in a dose response manner. Furthermore, the transcriptome and bioinformatics analyses were performed to investigate the molecular mechanism of developmental toxicity caused by Eq and Eqn. Results revealed that the disruption of several KEGG pathways are involved in the developmental toxicity of EQs in fish embryos. These findings provide insights into the AOP concept elucidating the developmental effects of EQs on fish species.

研究分野：環境毒性

キーワード：エクインエストロゲン 生態毒性 次世代シーケンス 発生毒性 パスウェイ解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクインエストロゲン類 (Equine estrogens: EQs) は妊馬の尿中から検出されるステロイドホルモンであり、これまでにエクイリン (Eq)、エクイレニン (Eqn) およびこれらの代謝物 (17 α および 17 β 体) の存在が知られている¹⁾。EQs は 17 β -エストラジオール (E₂) と化学構造が類似し、ヒトや齧歯類に対してエストロゲン様作用を示すことから、更年期障害のホルモン補充用医薬品 (プレマリン) の原料として世界各国で販売・使用されてきた。欧米では、下水処理場の流入水・放流水などに EQs が存在することが報告されている²⁾。しかしながら、日本における EQs の存在実態は不明であった。

これまでヒト由来の E₂ などのエストロゲン類については多くの調査・研究がなされてきたが、家畜由来の EQs などのエストロゲン類を対象に水生生物に対する有害影響を評価した例はほとんどない。近年、化学物質のリスク評価分野では、国際経済協力機構 (OECD) を中心として Adverse Outcome Pathway (AOP) の概念に基づく評価手法が盛んに議論されている。AOP とは化学物質の有害作用について、分子-細胞-組織-個体レベルの各階層の事象に関する知見を有機的につなぎ、それらの因果関係を経路として表したものである。しかし、生態毒性分野関連の AOP はほとんど構築されていない。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、Eq を 3 週間曝露したヒメダカ (*Oryzias latipes*) において、産卵数の減少や次世代胚の孵化率の低下など Eq の有害影響を明らかにした。しかしながら、それらの作用メカニズムは不明であった。そこで、本研究では、魚類 (ヒメダカ: ol、ゼブラフィッシュ: dr) の胚に対する EQs の AOP を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 環境試料の化学分析

各種前処理を実施し、標的物質の定性・定量は液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) により行った。

(2) エストロゲン受容体サブタイプに対するドッキングシミュレーション解析

分子シミュレーションソフト (Molecular Operating Environment) を用いて、ol あるいは dr エストロゲン受容体 (ER α 、ER β 1、ER β 2) リガンド結合領域 (LBD) の 3D ホモロジーモデルを構築した。E₂ および EQs と各 ER-LBDs との結合エネルギー (kcal/mol) を計算し、リガンド-受容体相互作用に關与する水素結合やアミノ酸残基を同定した。

(3) 胚に対するエストロゲン様作用の評価

E₂ および EQs を 5 段階の濃度 (10⁻¹⁰ - 10⁻⁶ M、交比 10) に希釈し、受精後 5 時間 (ol) あるいは 72 時間 (dr) 以内の卵に 7 日間 (ol) あるいは 24 時間 (dr) 水性曝露した。曝露後、試料を回収し RNA 抽出、逆転写反応後、リアルタイム PCR を用いて olChgL および olChgH、drCYP19A1b の発現量を測定した。得られた用量反応曲線から E₂ および EQs の 50% 影響濃度 (EC₅₀ 値) を算出した。

(4) 胚トランスクリプトームに及ぼす影響評価

ヒメダカ胚を用いて Eq および Eqn のトランスクリプトームに及ぼす影響を RNA-seq 解析により評価した。試験物質は DMSO に溶解後、ヒメダカ卵等張液で希釈し、試験溶液を調製した。既報に従い、試験溶液中で受精後 5 時間の卵に高電界パルス印加し、各物質を卵内に導入した。発生毒性試験では、2 時間浸漬後に洗浄し、等張液中で 14 日間培養と観察を行った。印加した Eq および Eqn 試験溶液の濃度は、ともに 0.1、1 および 10 mg/L とした。胚トランスクリプトーム解析では、10 mg/L の Eq および Eqn を印加後、2 日間培養した胚を用いて RNA-seq を実施し、得られた発現変動遺伝子 (DEGs) のオントロジーおよびネットワーク解析を行った。

ゼブラフィッシュ胚を用いて E₂、Eq および Eqn のトランスクリプトームに及ぼす影響を RNA-seq 解析により評価した。各物質の CYP19A1b 発現誘導に関する EC₂₀ (E₂; 2.8e-10、Eq; 4.3e-10、Eqn; 3.0e-9) および EC₈₀ (E₂; 8.6e-9、Eq; 5.3e-8、Eqn; 2.0e-7) をそれぞれ低濃度曝露群、高濃度曝露群とし、受精後 72 時間の胚に水性曝露を行い受精後 96 時間で採材した。得られた結果より、マッピングされたリード数がコントロールと曝露群を合計して 10 未満のものを除き、発現量が 3 倍以上、1/3 以下に変動した遺伝子を DEGs とした。

4. 研究成果

(1) 環境試料の化学分析

北海道の馬の生産頭数が多い地域に隣接する河川水から Eq や Eqn を検出し、日本の水環境における EQs の存在実態を明らかにした。また、Eq や Eqn に加え、これらの代謝物 (17 α および 17 β 体) や硫酸およびグルクロン酸抱合体を対象に分析法の改良を行った。河川水等の汚染実態と環境挙動を調査し、EQs 濃度の季節変動を明らかにした。さらに馬尿中における EQs 濃度の季節変動を明らかにした。

(2) エストロゲン受容体サブタイプに対するドッキングシミュレーション解析

EQs の結合エネルギーは、 $oIER\alpha$ -および $oIER\beta1$ -LBDs に対して $17\beta\text{-Eq} < 17\alpha\text{-Eq} < \text{Eq} < 17\beta\text{-Eqn} < 17\alpha\text{-Eqn} < \text{Eqn}$ 、 $oIER\beta2$ -LBD に対して $17\beta\text{-Eq} < 17\beta\text{-Eqn} < 17\alpha\text{-Eq} < 17\alpha\text{-Eqn} < \text{Eq} < \text{Eqn}$ の順であった。 $oIER\alpha$ -LBD に対する EQs のドッキングポーズを図 1 に示した。

一方、EQs の結合エネルギーは、 $drER\alpha$ -および $drER\beta2$ -LBDs に対して $17\beta\text{-Eq} < 17\alpha\text{-Eq} < \text{Eq} < 17\beta\text{-Eqn} < 17\alpha\text{-Eqn} < \text{Eqn}$ 、 $drER\beta1$ -LBDs に対して $17\beta\text{-Eq} < \text{Eq} < 17\alpha\text{-Eq} < 17\beta\text{-Eqn} < 17\alpha\text{-Eqn} < \text{Eqn}$ の順であった。両魚種の ER-LBDs とともに、Eq および Eqn の 17 位がヒドロキシ基 (17 α および 17 β 位) では強い結合性を示し、Eq 関連化合物は Eqn 関連化合物と比較して強い結合性を示すと考えられた。また、両魚種の ER-LBDs に対する EQs の結合エネルギーは、リガンド結合ポケット内の水素結合や CH- π 結合に関与するアミノ酸の種類・数などにより影響を受けることが示唆された。

以上のことから、メダカおよびゼブラフィッシュの ER サブタイプに対する EQs の結合親和性が明らかになった。

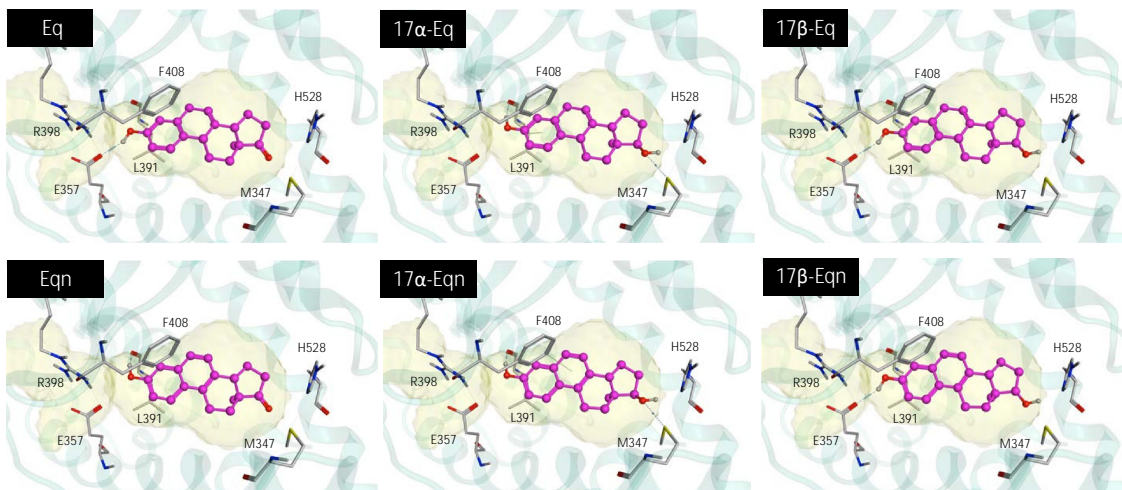


図 1. $oIER\alpha$ -LBD に対する EQs のドッキングシミュレーション解析

(3) 胚に対するエストロゲン様作用の評価

ヒメダカ胚：試験した全ての EQs はエストロゲン様作用を示した (図 2)。 $olChgL$ の発現誘導に対する EC_{50} 値を算出・比較したところ、 $17\beta\text{-Eq} < \text{Eq} < 17\beta\text{-Eqn} < \text{Eqn} < 17\alpha\text{-Eqn} < 17\alpha\text{-Eq}$ の順であり、 $17\beta\text{-Eq}$ は E_2 より強いエストロゲン様作用を示した。

ゼブラフィッシュ胚：試験した全ての EQs はエストロゲン様作用を示した。 $drCYP19A1b$ の発現誘導に対する EC_{50} 値を算出・比較したところ、 $17\beta\text{-Eq} < 17\alpha\text{-Eq} < \text{Eq} < \text{Eqn} < 17\beta\text{-Eqn} < 17\alpha\text{-Eqn}$ の順であり、 $17\alpha\text{-Eq}$ と $17\beta\text{-Eq}$ は E_2 より強いエストロゲン様作用を示した。

以上のことから、ヒメダカおよびゼブラフィッシュ胚に対して EQs のエストロゲン様作用が明らかになった。

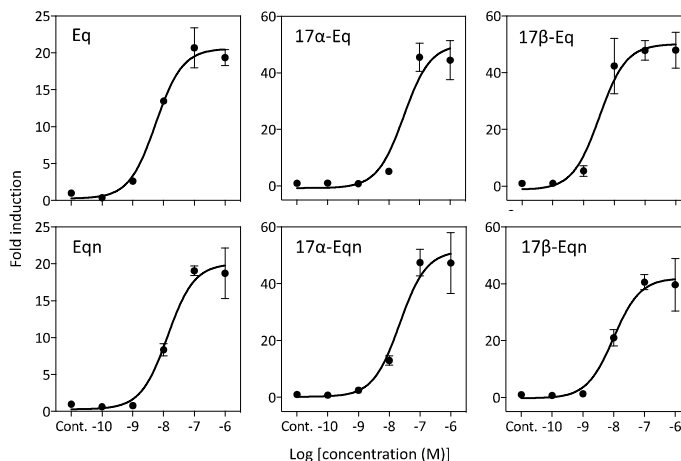


図 2. ヒメダカ胚 $olChgL$ の発現解析

(4) 胚トランスクリプトームに及ぼす影響評価

ヒメダカ胚：Eq および Eqn を印加したすべての濃度区において、孵化の遅延する個体が増加した。また、それらの個体では血栓、心拍・血流の異常、尾部湾曲などの奇形が観察された。胚トランスクリプトーム解析では、Eq および Eqn の印加により neuroactive ligand-receptor interaction、calcium signaling pathway、cell adhesion molecules、phototransduction、steroid hormone biosynthesis および drug metabolism が共通して影響を受けており、これらは主に神経発達や細胞接着などの発生影響に関わるパスウェイであった。さらに Eq 印加では、MAPK signaling、retinol metabolism などのパスウェイが特異的に影響を受けており、レチノール代謝の攪乱による胚の奇形が示唆された。また Eqn 印加では、cytokine-cytokine receptor interaction のパスウェイが特異的に影響を受けており、細胞の分化や増殖などへの影響が示唆された。

ゼブラフィッシュ胚:各物質の高濃度曝露群では、DEGsはE₂で最も少なく、902遺伝子(発現量増加465、発現量減少437)、次いで、Eqnの1440遺伝子(発現量増加954、発現量減少486)最も多いEqで1643遺伝子(発現量増加1072、発現量減少571)であった。E₂、Eq、Eqnのすべての物質で共通したDEGsは129遺伝子あり、E₂とEqnで共通したDEGsは237、E₂とEqで共通したDEGsは253遺伝子であった。E₂と共通したDEGsと比較してEq、Eqn曝露群間で共通したDEGsは多く、618遺伝子であった(図3)。

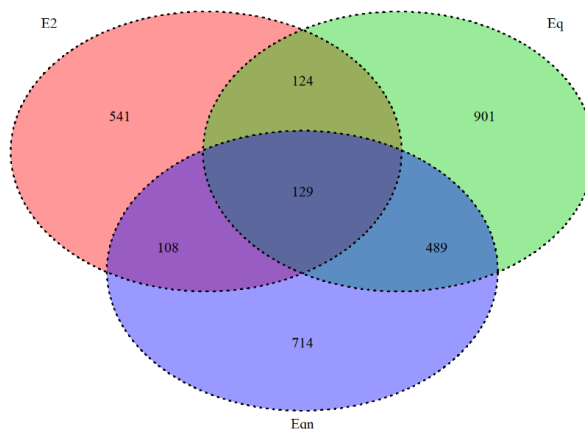


図3. ゼブラフィッシュ E₂、Eq、Eqn 処置群における発現変動遺伝子のベン図

E₂、Eq、Eqnの高濃度曝露群でのDEGsについてmetascapeを用い機能アノテーション情報のエンリッチメント解析を行った結果、p-valueが低い20の用語ではE₂、Eq、Eqnで共通のものは得られなかった(図4)。エクインエストロゲン類では共通して、reactomeパスウェイデータベースで「インスリン様成長因子結合タンパク質(IGFBP)によるIGFの輸送と取り込みの制御」とアノテーションされている遺伝子、およびGOデータベースの酸化還元に関わる遺伝子がDEGsに含まれていることが示された。Eqでは血液凝固に関わる遺伝子や、心臓の形態形成に関わる遺伝子がDEGsに含まれていることが示された。

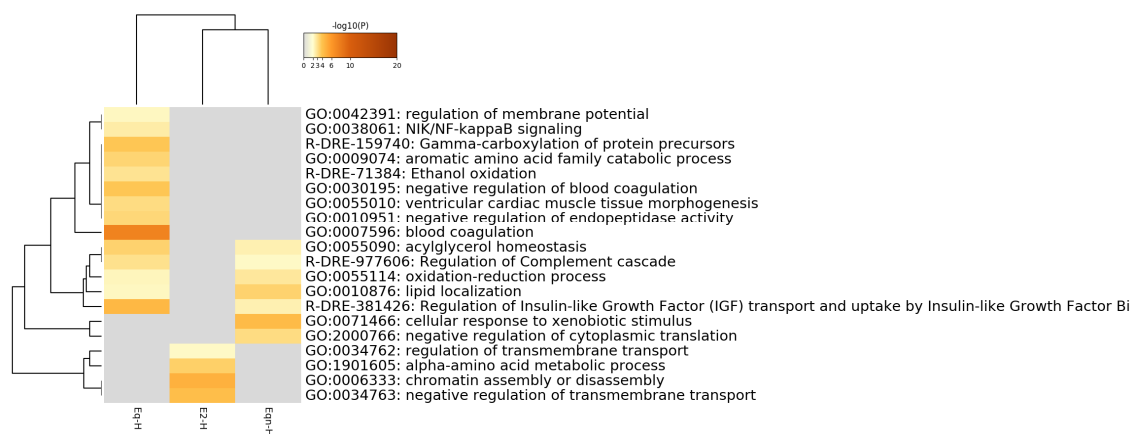


図4. E₂、Eq、Eqn高濃度曝露群におけるDEGsの中からエンリッチされた用語をもとに作成したヒートマップ。色はp-valueを表し、低い順に上位20用語を対象とした。

また、ER標的遺伝子であるCYP19A1bについては、マッピングされたリード数がDMSOでゼロだったものの、E₂高濃度曝露群で41、Eq高濃度曝露群で70、Eqn高濃度曝露群で64まで増加していたことから、当該遺伝子の発現誘導が示唆された。さらに、EqとEqnに共通して、高濃度曝露群では複数の異物代謝酵素の発現量増加が認められた。とくにCYPでは、これまでPXRやAHRの標的遺伝子であることが報告されている複数のCYP2AA分子種やCYP3C3、CYP2Y3がEqおよびEqn曝露に特異的な発現誘導遺伝子として同定された。こうした結果ならびにRNA-seq解析によるDEGsプロファイルは、EqやEqnが、少なくとも一部はE₂と異なる作用機序を有し、トランスクリプトーム発現に影響を及ぼしていると考えられた。

以上のことから、ヒメダカおよびゼブラフィッシュ胚に対するEQsのAOPの一端が明らかになった。本研究成果は当該分野のモデルケースとなり、AOP研究基盤の高度化に繋がることが期待される。

<引用文献>

- 1) Bhavnani et al., 2014. Pharmacology of conjugated equine estrogens: efficacy, safety and mechanism of action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142, 16–29.
- 2) Tyler, C.R., Filby, A.L., Bickley, L.K., Cumming, R.I., Gibson, R., Labadie, P., Katsu, Y., Liney, K.E., Shears, J.A., Silva-Castro, V., Urushitani, H., Lange, A., Winter, M.J., Iguchi, T., Hill, E.M., 2009. Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3897–3904.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi H, Uchida M, Yoshimoto K; Imamura Y, Yamamoto R; Ikenaka Y, Kawai M, Ichikawa N, Takao Y, Tominaga T, Ishibashi Y, Arizono K	4. 巻 239
2. 論文標題 Occurrence and seasonal variation of equine estrogens, equilin and equilenin, in the river water of Japan: implication with endocrine disrupting potentials to Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 281-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tominaga N, Shino S, Uchida M, Ishibashi H, Iida, M, Okobira T, Arizono K, Yoshida N, Arizono K,	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of lithium on developmental toxicity, teratogenicity and transcriptome in medaka embryos	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2131/fts.6.31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi A, Uchida M, Ishibashi H, Hirano M, Ichikawa N, Arizono K, Koyama J, Tomonaga N	4. 巻 242
2. 論文標題 Potential mechanisms underlying embryonic developmental toxicity caused by benzo[a]pyrene in Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 inpress
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） Doi:10.1016/j.chemosphere. 2019.125243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi H, Uchida M, Temma Y, Hirano M, Tominaga N, Arizono K	4. 巻 193
2. 論文標題 Choriogenin transcription in medaka embryos and larvae as an alternative model for screening estrogenic endocrine-disrupting chemicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 inpress
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） Doi:10.1016/j.ecoenv. 2020.110324	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Koji Arizono
2. 発表標題 Equine Estrogens Concentrations in Aquatic Environment and Their Endocrine Disrupting Potentials for Fish
3. 学会等名 11th International Conference on Environmental Health Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 石橋弘志、内田雅也、天満柚来 平野将司、富永伸明、有菌幸司
2. 発表標題 17 estradiolによるメダカ胚エストロゲン応答遺伝子の発現解析
3. 学会等名 環境ホルモン学会第21回研究発表会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 内田雅也、石橋弘志、平野将司、福島聡、石橋康弘、富永伸明、有菌幸司
2. 発表標題 メダカ初期胚を用いたエクインエストロゲン類のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 環境ホルモン学会第21回研究発表会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 K Arizono, M Uchida, S. Fukushima, H. Ishibashi, N. Tominaga
2. 発表標題 Nanosecond pulsed electric field incorporation technique to predict molecular mechanisms of teratogenicity and developmental toxicity of equine estrogens on medaka embryos
3. 学会等名 SETAC-North America 39th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ishibashi, Masaya Uchida, Keisuke Yoshimoto, Ryoko Yamamoto, Nobuaki Tominaga, Yasuhiro Ishibashi, Koji Arizono
2. 発表標題 EPRODUCTIVE AND TRANSGENERATIONAL EFFECTS OF EQUILIN IN JAPANESE MEDAKA (ORYZIAS LATIPES) AND HEPATIC ESTROGEN-RESPONSIVE GENE EXPRESSION
3. 学会等名 PRIMO19 (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Hiroshi Ishibashi, Masaya Uchida, Keisuke Yoshimoto, Ryoko Yamamoto, Nobuaki Tominaga, Yasuhiro Ishibashi, Koji Arizono
2. 発表標題 Reproductive and transgenerational effects of equilin in Japanese medaka and hepatic estrogen-responsive gene expression
3. 学会等名 2017 SETAC North America (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Koji Arizono, Masashi Hirano, Hiroshi. Ishibashi, Masaya Uchida, Nobuaki Tominaga and Akira Kubota
2. 発表標題 In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of equine estrogens in zebrafish
3. 学会等名 SETAC-North America 40th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 内田雅也、久保田彰、平野将司、石橋弘志、福島聡、石橋康弘、富永伸明、有園幸司
2. 発表標題 In vivo 及び in silico解析を用いたエクインエストロゲン類のエストロゲン様作用の評価
3. 学会等名 環境ホルモン学会第22回研究発表会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Koji Arizono, Masashi Hirano, Hiroshi. Ishibashi, Masaya Uchida, Nobuaki Tominaga and Akira Kubota
2. 発表標題 Analyses of embryonic CYP19A1b gene expression and estrogen receptor binding ability by equine estrogens in zebrafish
3. 学会等名 環境ホルモン学会第22回研究発表会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富永 伸明 (Tomonaga Nobuaki) (30227631)	有明工業高等専門学校・創造工学科・教授 (57102)	
研究分担者	石橋 弘志 (Ishibashi Hiroshi) (90403857)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	
研究分担者	吉田 佳督 (Yoshida Yoshitoku) (90506635)	修文大学・看護学部・教授 (33942)	