

## 環境化学物質の胎児期暴露による脳神経系特有の 核内受容体発現変化

### [1] 組織

代表者：松島 綾美  
(九州大学大学院理学研究院)

対応者：松本 健  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

### [2] 研究経過

長い間、環境化学物質による生殖系への悪影響が問題視されてきた。しかし、近年では、代謝系や脳神経系における異常など、その多様な悪影響が報告されている。特に、有害環境化学物質の一つであるビスフェノールAの胎児期暴露は、ごく微量の暴露で、脳における雌雄差の形態変化や行動の異常に繋がるため「低用量効果」として未解決のままとなっている [図1]。ビスフェノールAは、ポリカーボネート・プラスチックの原料として汎用される工業原料であり、そのためビスフェノールAの代替品が用いられているが、その安全性は十分には調べられていない。こうした背景より、ビスフェノールAのみならず、この代替品の暴露の影響を解析することは、非常に重要な課題である。本研究では、ビスフェノールAの代替として、あるいは、高機能プラスチックの原料として開発されている、ビスフェノールA類似骨格を持つ化合物のマウス脳に対する影響を解析することを目的として、研究を計画した。

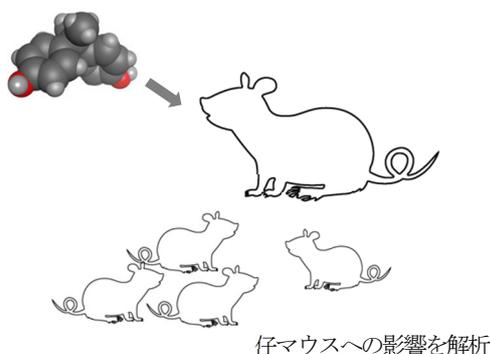


図1 ビスフェノールAのCPKモデル構造(左上)と研究計画のイメージ図

当初計画では、ビスフェノールA類似骨格を持つ化合物の影響を暴露したマウス脳、あるいはマウス胎仔脳の標本を東北大学加齢医学研究所に持参し、現地にて研究打ち合わせをし、免疫染色などを実施し、解析する予定であった。しかし、コロナウイルス感染拡大の影響を受けて、メールでの打ち合わせに切り替えた。また、福岡から東北大学への移動が難しい状況となったことから、まずは、用意したマウス脳を用いて、九州大学にて免疫染色を実施することとした。また、マウス脳を用いた解析を円滑に行うことが厳しい状況となったことから、合わせて東北大学加齢医学研究所の医用細胞資源センター・細胞バンクが保有する培養細胞を用いたレポーター試験により、ビスフェノールA類似骨格を持つ化合物の転写活性を調べることにした。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

研究経過に述べたように、コロナ感染拡大の影響を受けて、今年度は東北大学加齢医学研究所への訪問が非常に厳しい状況となった。まずは、計画に従い、環境化学物質の胎児期暴露マウスを用意した。これは、九州大学にて動物実験の承認(承認番号 A30-286-0)の元に適切に管理、実施したものである。妊娠1日目のマウスを購入(KBT オリエンタル社:佐賀県)し、購入直後よりビスフェノール類縁体を餌に混餌投与(25 mg/kg/day)することにより胎仔期のビスフェノール類縁体暴露マウスを用意した。生まれた仔マウスは離乳後、同様にしてビスフェノール類縁体を投与した。合わせて、比較対象となる化合物の投与なしのマウスも用意した。離乳後、20週齢までは計画に従い飼育を継続し、その後、オスのマウスを用いて三種混合麻酔による麻酔下で脳の還流固定を行い、脳組織を準備した。政府の緊急事態宣言の発出による移動が制限されたことから、固定後、九州大学にてクライオスタットによる切片作成を行い、研究標的とする核内受容体のひとつである抗エストロゲン受容体β型(ERβ)抗体によるプレリミナリーな免疫染色実験を行った。その結果、本抗体がマウス脳の免疫染色に使えるものであることが確認できた [図2]。



図2 抗ERβ抗体によるマウス脳のNi-DAB染色像

また、東北大学加齢医学研究所の医用細胞資源センター・細胞バンクより HeLa 細胞の頒布を受けて、ERβに対するレポーター遺伝子試験を行った。レポーター試験にはエストロゲン応答配列(3xERE)を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターベクター (pGL4.23ベクター/プロメガ社) を使用した。発現ベクターとしては pcDNA3.1 を用い、ヒト ERβの全長を導入し、一過性発現を行った。Lipofectamin LTX (サーモ・サイエンティフィック社) を用いてレポーターベクターと発現ベクターを共発現した。24 時間後に試験化合物を暴露し、さらに 24 時間インキュベートの後にルシフェラーゼ活性を測定することで、アゴニスト活性を評価した。アンタゴニスト活性の測定には天然の女性ホルモンであるエストラジオールを 10 nM 添加した場合に誘導される活性を阻害する割合で評価した。複数のビスフェノールA類似骨格を持つ化合物で、弱いアゴニスト活性のみならず、アンタゴニスト活性も見られた。

### (3-2) 波及効果と発展性など

現代社会の発展に伴い、多量の化学物質が環境中に放出されている。このリスク評価は、必要不可欠である。また、化学物質のリスクを抑えるためには、化学物質により生じる悪影響の分子機構の解明が必要である。そのためには、環境化学物質の標的と考えられる、核内受容体の発現変動解析が有用である。本研究では、胎仔期から生まれて 20 週齢までの長期間にわたり環境化学物質を食餌したマウス脳の解析に取り組んだ。今年度は、コロナウイルス感染拡大の影響のため、直接の研究者交流が難しかった。しかし、想定以上に、環境化学物質の転写活性化試験なども展開でき、これを契機に、今後の研究プロジェクトの発展が強く期待されている。本研究結果は、環境化学物質ビスフェノールAが示す低用量効果解明の端緒として有用な成果を与え、ビスフェノールAの代替として使えかわれる化合物にも内分泌かく乱作用が危惧されることを示す、重要な成果である。

### [4] 成果資料

#### 発表論文

(1) K. Tagawa, K. Suyama, H. Kesamaru, T. Masuya, T. Nose, and A. Matsushima, Design and Synthesis of a Universal Coactivator Peptide Binding to the Estrogen Receptor and Nurr1, *Peptide Science* 2020, pp. 123-124 (2021).

#### 学会発表

(1) 田川幸樹、巢山慶太郎、袈裟丸仁志、枡屋宇洋、野瀬 健、松島綾美、エストロゲン受容体αとオーファン核内受容体 Nurr1 に結合する合成コアク合成コアクチベータペプチドの合理的設計、第93回日本生化学会大会、オンライン (2020年9月14-16日)