

Study on the assessment for the adverse effects of the bisphenol A analogs in the human body

袈裟丸, 仁志

<https://hdl.handle.net/2324/2236029>

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 袈裟丸 仁志

論 文 名 : Study on the assessment for the adverse effects of the bisphenol A analogs in the human body
(ビスフェノール A アナログが人体に与える有害作用の評価に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

化学物質が大量に開発・使用されている現在、様々な形で環境中に放出される、所謂環境化学物質が生体に与える影響、リスクを評価することは緊要の課題である。そのような化学物質のリスク評価に従来用いられてきた、動物を使用した*in vivo*の手法は、動物愛護などの倫理上の問題や、評価に時間と費用を要するといった欠点から、大量の化学物質に対する適用が難しいという現状がある。そのため、大量の化学物質のリスクを迅速に、かつ、比較的安価に実施することが可能な*in vitro*や*in silico*の手法によるリスク評価法の確立が求められている。その中でも、化学物質が最初に生体にアクセスする標的の一つ、受容体タンパク質に対する化学物質の影響を評価することは重要な課題である。本研究では、環境化学物質の一つであり、代表的な内分泌かく乱物質であるビスフェノールA(BPA)が関わる生体へのリスクの評価に焦点を当て、まず、受容体タンパク質に対する化学物質の結合および転写活性を計算化学的な手法で評価するために、ドッキング計算の条件検討を行った。さらに、BPAの化学修飾、ここではハロゲン化に焦点を当て、これが生体に及ぼす影響について、核内受容体を標的とした内分泌かく乱作用、及び、細胞毒性の観点からの評価を行った。本博士論文では、以下のような章立てに従って、上記の研究の経緯および結果を記述した。

第1章では、環境化学物質が生体に与える影響を評価する手法の確立を目指し、*in silico*の研究手法であるドッキング計算における鋳型受容体の立体構造の重要性を評価した。まず、これまでに多数のX線結晶構造が報告されているエストロゲン受容体 α 型(ER α)の中から、83個の受容体構造について立体構造の比較を行うことにより活性化型構造であるアゴニスト結合型構造、及び、不活性化型構造である非アゴニスト結合型構造への分類を行い、それら全てに対して、アゴニスト、アンタゴニスト合わせて8種類のリガンドを用いたドッキング計算を行った。得られた計算結果についてどのような受容体構造がリガンドの結合に影響を与えるかを解析したところ、アゴニストはアゴニスト結合型の受容体構造に、アンタゴニストは非アゴニスト型の受容体構造に選択的に結合することが確認された。また、このリガンドのアゴニスト結合型構造、非アゴニスト結合型構造に対する選択性は、受容体のヘリックス12の空間的配向の差が大きく寄与すること、また、アンタゴニストの受容体構造選択性には、ヘリックス11の影響は少ないことを明らかとした。これらのことから、化

学物質と受容体のドッキング計算を行う際には、複数の受容体構造、特に、アゴニストやアンタゴニストなど異なる活性のリガンドが結合した数種類の複合体構造を鋳型に用いることの重要性が示され、同時に、活性未知のリガンドについても選択的に結合する受容体構造を明らかとすることで結合性のみならず生理活性が予測できることを示した。

第2章では、ビスフェノールA誘導体であるハロゲン化BPAについて、核内受容体・エストロゲン受容体を介した内分泌かく乱作用を評価した。近年、ハロゲン化BPAは工業材料の原料としての使用が拡大しており、それらのリスク評価が必要とされている。ビスフェノールAの芳香環にハロゲン原子を導入したBPA-mono/di/tri/tetraX(X = F, Cl, Br, I)を合成、または、購入し、それらハロゲン化BPAアナログについて、エストロゲン受容体 α 型 (ER α)、及び、 β 型 (ER β) との結合性、及び、転写活性をそれぞれ競合結合試験、及び、レポーター遺伝子試験によって評価し、ビスフェノールのハロゲン化が核内受容体との結合性や転写活性に及ぼす影響について解析した。その結果、ER α に対しては、ハロゲン化BPAは、BPAよりもわずかに結合性が強いものの、大きな受容体結合性の変化は生じなかった。一方、BPA-triF, BPA-tetraFが、BPAよりもER β に対する強い結合性を示すことを本研究では見出した。また、転写活性においては、ER α 、ER β に共通してフッ素置換BPAアナログを除くハロゲン化BPAアナログは、BPAよりもアゴニスト活性が低下し、一方で、フッ素置換BPAアナログはBPAよりも高いアゴニスト活性を示すことを明らかとした。これらのことから、ハロゲン化のような新しい化学物質の開発に広範に用いられる修飾によって、予期しない生体への影響を惹起する危険性があることが示され、化学修飾により生じる化学物質についての広範かつ詳細なリスク評価が必要であることを明らかとした。

第3章では、第2章で核内受容体を介した内分泌かく乱作用を評価したハロゲン化BPAアナログについて、HeLa細胞に対する細胞毒性を調べた。近年、BPAは内分泌かく乱以外の経路でも生体に悪影響を及ぼすことが報告されている。MTT試験による細胞生存率測定の結果、ハロゲン化BPAアナログはBPAよりも強い細胞毒性を示した。その毒性は、導入したハロゲン原子の種類、個数によって変化し、ハロゲン二置換BPAアナログが最も強い細胞毒性を示し、その中でも臭素、ヨウ素置換BPAアナログが最も強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。さらに、強い細胞毒性を示したハロゲン二置換BPAアナログについて、蛍光染色によって細胞死の形態判別を行ったところ、BPA-diIのみアポトーシスではなくネクローシス経路による細胞死を誘導していることが判明した。この結果は、フッ素多置換BPAアナログが最も強い活性を示した内分泌かく乱作用と比べて対照的であった。このことは、化学物質が想定された悪影響を引き起こす経路に対する活性を示さなくても、予期せぬ経路を通して生体に対して予想と異なる悪影響を及ぼし得るということを示した。

本研究において、化学物質の結合性スクリーニングに使用されるドッキング計算で核内受容体に対する結合性、および、核内受容体を介した転写活性が予測できること、さらに、構造や化学的な性質が類似したハロゲン化BPA誘導体において、それぞれが異なる経路で悪影響を示すリスクがあることを発見した。このようなハロゲン化BPA誘導体が異なる悪影響を示す報告例はこれまでになく、本研究により環境化学物質のリスク評価、特に、BPA関連化合物のリスクにおけるきわめて重要な知見が示された。