

研究課題

ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* および *in silico* 解析による化学物質の抗アンドロゲン作用の評価

研究代表者 久保田 彰 (帯広畜産大学獣医学研究部門)

共同研究者 Chen Xing (帯広畜産大学大学院畜産学研究科)
平野 将司 (熊本高等専門学校生物化学システム工学科)
坂田 真有美 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
岩田 久人 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

背景と目的

現在、ケミカルアブストラクトサービスに登録されている化学物質は1億5千万種を超えている。日常生活において使用される化学物質だけでも世界で数万種に達すると言われていたが、これらのうち有害性が評価されているのはごく少数に過ぎない。合成された化学物質は、使用・廃棄を通じて環境中へ放出されヒトや野生生物が曝露する懸念もあることから、その有害性やリスクを評価しなければならない。一方、評価対象物質が膨大な数に及ぶことと、動物愛護の観点から、化学物質の有害性評価において動物実験代替法の利用を促進する活動が拡大している。

申請者はこれまで動物実験代替モデルとして有用なゼブラフィッシュを用いて、多様な化学物質による細胞内受容体介在性の生体影響を *in vivo* および *in silico* 統合手法により評価してきた。最近では、本 LaMer 助成を受けて、多様なビスフェノール類とエストロゲン受容体サブタイプの相互作用を *in silico* 解析することで *in vivo* 曝露試験によるエストロゲン作用を評価できることを明らかにした^{1,2)}。さらに、相対的に用量効果 (potency) の高いビスフェノール類は最大効力 (efficacy) が低い傾向にあり、パーシャルアゴニストの特徴を示すことを明らかにした³⁾。他方、環境化学物質の中には、エストロゲン様作用、抗エストロゲン作用の他にも、抗アンドロゲン作用を示すものが多数存在することが *in vitro* 試験系で報告されている⁴⁾。近年、ゼブラフィッシュ胚においてアンドロゲン曝露に応答する遺伝子 (*sult2st1* および *CYP2K22*) が同定されたことから (Fetter et al., 2015; Jarque et al., 2019)、申請者はアンドロゲン受容体 (AR) を介して発現誘導される標的遺伝子 (*sult2st3*、*cyp2k22*) を指標として、多様な化学物質の抗アンドロゲン作用を *in vivo* で評価することを構想した。さらに、ゼブラフィッシュ AR (zfAR) と化学物質の相互作用を *in silico* 解析し、*in vivo* 抗アンドロゲン作用との相関性を解析することで、*in silico* 手法による *in vivo* 抗アンドロゲン作用の予測性を検証することを構想した。

研究内容

In vivo 試験では、予備検討によりアンドロゲン応答性遺伝子として *sult2st3* を選定し、異なる発生ステージ（受精後 48 時間、72 時間、96 時間、120 時間）における *sult2st3* 発現のアンドロゲン応答性を評価した。このため、ゼブラフィッシュ胚（20 匹／ペトリ皿）にテストステロン（Tes）を 10^{-11} ~ 10^{-7} M で採材直前の 24 時間曝露した。次いで、Tes 誘発性の *sult2st3* 発現に対する各化合物の抗アンドロゲン作用を同様の曝露試験により評価した。*sult2st3* 発現量は、ハウスキーピング遺伝子（FE1a）で補正し、溶媒対照群（DMSO）に対する誘導倍率として $\Delta\Delta Ct$ 法で算出した。用量応答曲線は、4 パラメーター log ロジスティック関数を用いた非線形回帰モデルにより作成し、半数効果濃度（EC₅₀）と誘導倍率最大値（E_{max}）を算出した。

In silico 解析には、分子シミュレーションソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE, CCG 社) を用いた。ゼブラフィッシュの AR ホモロジーモデルを構築するため、ヒト AR と hydroxyflutamide との共結晶構造 (PDB ID: 2AX6) を鋳型として用いた。最適モデル構造を得るため、中間モデル構造数を 10,000 とした（主鎖: 100、側鎖: 100）。すなわち、100 個の主鎖モデルに対し、100 個の側鎖モデルを候補構造として構築した。得られた 10,000 個の候補構造から Score (GB/VI) の高かった構造に適切な水素を付加し、分子力学計算を行ったモデルを最終構造として抽出した。モデル構築には力場 Amber10:EHT を用いた。

本研究の *in silico* 解析では抗アンドロゲン剤のフルタミド、過去の *in vitro* 試験で強い抗アンドロゲン作用が報告されている殺虫剤 3 種（ビクロゾリン、*p,p'*-DDE、フェニトロチオン）、ビスフェノール類 15 種を対象とした。対象化合物の化学構造は PubChem compound から 2 次元構造を得た。これらを MOE の Rebuild3D を用いて 3 次元化し、MMFF94x 力場で極小化することで構造最適化した。3 次元化した化学構造をデータベースファイル化し、化合物ライブラリとした。ドッキングシミュレーションには MOE-Dock、Dock-Induced Fit、ASEDock の 3 つのアルゴリズムを実施し、作成した化合物との配座解析を行った。力場は Amber10:EHT を使用した。評価スコアとして結合ポテンシャルエネルギー（S score または U_Dock; kcal/mol）を算出し、結合状態を解析した。

研究成果

ゼブラフィッシュ胚に Tes を曝露したところ、試験した最も初期の発生ステージである 48 hpf を除いて、いずれの発生ステージにおいても濃度依存的な *sult2st3* mRNA の発現誘導が認められた (Fig. 1)。誘導能を表す EC₅₀ を算出したところ、72 hpf では 2.1 nM、96 hpf では 0.84 nM、120 hpf では 0.30 nM となった。誘導倍率

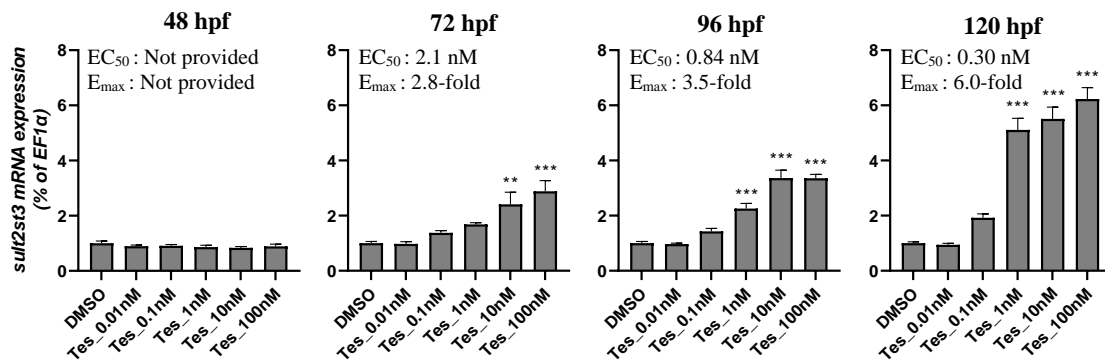


Fig. 1. Dose response relationships for effects of testosterone (Tes) on the mRNA expression of *sult2st3* in different stages of zebrafish development. Embryos were exposed to Tes for 24 h prior to collection at the particular stage of development mentioned in the figure. Statistical differences in transcript levels between DMSO control and other groups were determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test and are shown by asterisks (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Fifty-percent effective concentration (EC₅₀) and maximum fold change to vehicle control (E_{max}) were calculated by fitting the data in a four parameter logistic model.

を表す E_{max} は、それぞれ 2.8-fold、3.5-fold、6.0-fold となった。また Tes (0.1 nM、1 nM) により誘導された *sult2st3* 発現は、AR 拮抗薬 (フルタミド; 3 μ M、10 μ M) との共処置により有意に抑制された (Fig. 2)。以上の結果より、ゼブラフィッシュ胚においても Tes は AR を介して *sult2st3* mRNA の発現を誘導することが示された。

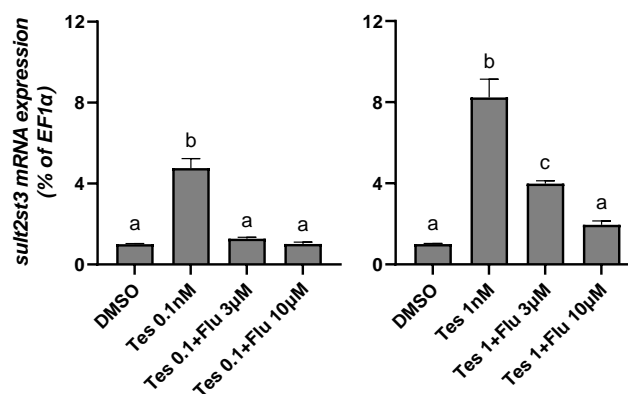


Fig. 2. Inhibitory effect of an androgen receptor antagonist (flutamide; Flu) on the testosterone (Tes) induced expression of *sult2st3* in zebrafish development. Embryos were exposed to Tes alone or in combination with Flu for 24 h prior to collection at 96 hpf. Statistical differences in transcript levels among groups were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and are shown by different letters ($p < 0.05$).

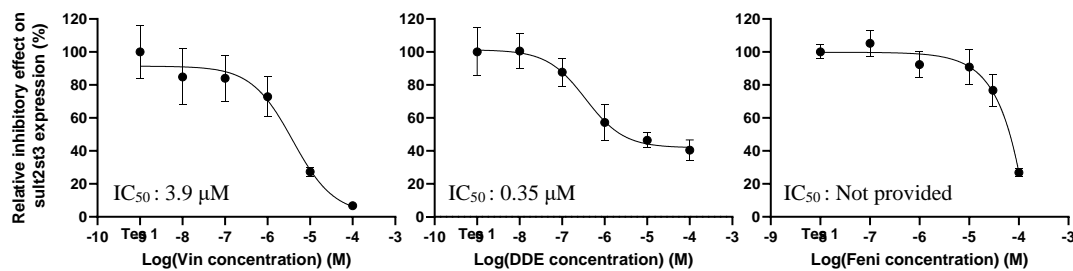


Fig. 3. Dose response relationships for inhibitory effects of 3 pesticides (vinclozolin; Vin, *p,p'*-DDE; DDE, fenitrothion; Feni) on the testosterone (Tes) induced expression of *sult2st3* in zebrafish development. Embryos were exposed to Tes alone or in combination with different concentration of pesticides for 24 h prior to collection at 96 hpf. Data are shown as percent inhibition relative to the fold change in Tes (1 nM) alone after subtraction from DMSO control as a baseline. Fifty-percent inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated by fitting the data in a four parameter logistic model.

続いて、*sult2st3* を AR 介在性反応のマーカーとして、過去の *in vitro* 試験で強い抗アンドロゲン作用が報告されている殺虫剤 3 種 (ビンクロゾリン、*p,p'*-DDE、フェニトロチオン) の抗アンドロゲンポテンシャルを評価した。その結果、Tes による *sult2st3* 発現誘導はいずれの化合物によっても濃度依存的な抑制が認められた (Fig. 3)。抑制能を表す IC_{50} は、*p,p'*-DDE で $0.35 \mu\text{M}$ 、ビンクロゾリンで $3.9 \mu\text{M}$ となった。フェニトロチオンでは最高濃度 ($100 \mu\text{M}$) で顕著に抑制がみられたものの、抑制がプラトーに達しなかったため IC_{50} は算出できなかった。以上より、本研究の *sult2st3* 発現量を指標とした抗アンドロゲン作用のポテンシャルは、*p,p'*-DDE > ビンクロゾリン > フェニトロチオンの順となった。本研究でみられた抗アンドロゲン作用のポテンシャルの順位は、ヒト AR の *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系でみられた抗アンドロゲン作用の順位 (ビンクロゾリン = フェニトロチオン > *p,p'*-DDE) とは顕著に異なっていたことから、これら化合物の抗アンドロゲン作用に種差があると考えられた。

次いで、ゼブラフィッシュ AR の 3D ホモロジーモデルを構築し、多様な化合物と AR の結合状態について *in silico* でシミュレーションを行い、相互作用エネルギーを算出した (Table 1)。3 つの異なるアルゴリズムで実施したシミュレーションにおいて、ASE_Dock による U_Dock 値は、Dock および Dock-Induced Fit による S score と有意な相関関係を示した (Fig. 4)。そこで U_Dock 値を用いて化合物間の相互作用エネルギーを比較したところ、上記の *in vivo* 抗アンドロゲン作用に関するデータのある化合物については、低い順にフェニトロチオン、フルタミド、ビンクロゾリン、*p,p'*-DDE であり、この順で AR との結合安定性が高いと考

Table 1. Interaction energy between zebrafish AR and a variety of chemicals			
Chemical	AR: Template 2AX6		
	Dock	Dock-Induced Fit	ASEDock_TBA
	S-score (kcal/mol)	S-score (kcal/mol)	U_dock (kcal/mol)
Flutamide	-7.39	-8.10	-56.94
Vinclozolin	-6.86	-7.10	-41.47
<i>p,p'</i> -DDE	-6.38	-7.08	-35.76
Fenitrothion	-7.19	-7.96	-59.63
17beta-estradiol	-6.92	-8.21	-60.41
2,2'-BPF	-5.86	-5.96	-31.23
2,4'-BPF	-5.91	-6.36	-45.67
4,4'-BPF	-6.03	-6.42	-55.16
BisMP	-4.81	-7.47	-52.57
BPA	-5.74	-7.10	-44.82
BPAF	-3.84	-6.48	-46.85
BPAP	-4.20	-7.47	-52.64
BPB	-5.50	-7.30	-48.83
BPC2	-6.21	-6.83	-53.59
BPE	-6.18	-7.06	-55.47
BPS	-6.11	-6.99	-54.63
BPS-monoP	-6.96	-8.25	-55.80
BPZ	-4.68	-6.88	-42.28
TBBPA	-3.80	-7.49	-36.19
TCBPA	-5.77	-7.74	-50.28
※ TBA: Tether Backbone Atoms			

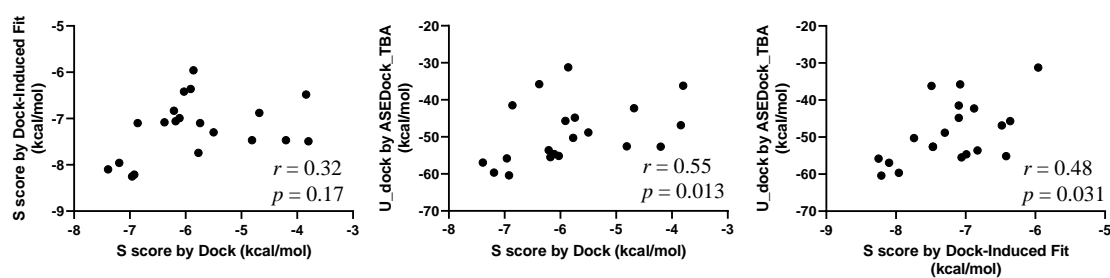


Fig. 4. Correlations among interaction energies calculated via different algorithms (Dock, Dock-Induced Fit, and ASE_Dock). Spearman's rank correlation analysis was conducted.

えられた。したがって、*in silico* 解析で予測された AR と化合物の結合安定性は、上記の *in vivo* 曝露試験による抗アンドロゲン作用のポテンシャルと相関性を示さなかった。この一因として、抗アンドロゲン作用の指標として用いたマーカー遺伝子の応答性が考えられた。ゼブラフィッシュ胚では、ER の標的遺伝子である

CYP19A1b の発現量を指標としたエストロゲン様作用について、多様な化合物の *CYP19A1b* 誘導に関する EC₅₀ 値と化合物-ER 間の相互作用エネルギーの間に有意な相関関係が認められている。一方、ER 標的遺伝子であるビテロジェニンをマーカー遺伝子とした場合では同様の相関関係はみられなかった。このことは、*in vivo* でのエストロゲン様作用の指標として用いる遺伝子の種類によって、*in silico* ドッキングシミュレーションで得られる相互作用エネルギーとの相関性が変化することを示唆している。したがって、AR 標的遺伝子であっても、遺伝子の種類によってアンドロゲン応答性や抗アンドロゲン応答性は異なるため、今後は *sult2st3* 以外の AR 標的遺伝子についても同様の検討が必要と考えられた。また、15 種類のビスフェノール類と AR の相互作用エネルギーは相対的に低い値を示したことから、多くのビスフェノール類は AR に安定的に結合するものと予想された。これらビスフェノール類についても、*in vivo* 抗アンドロゲン作用を評価する必要がある。

本研究の結果は、ゼブラフィッシュ AR の標的遺伝子である *sult2st3* の発現量を指標として、多様な化合物の *in vivo* 抗アンドロゲン作用を評価できることを示している。他方、化合物の *in vivo* 抗アンドロゲン作用を *in silico* ドッキングシミュレーションにより予測できるか否かについては今後さらなる検討が必要と考えられた。

成果発表

(査読付き学術論文)

1. Ishibashi H, Uchida M, Hirano M, Hayashi T, Yamamoto R, **Kubota A**, Ichikawa N, Ishibashi Y, Tominaga N, Arizono K. (2021): *In vivo* and *in silico* analyses of estrogenic potential of equine estrogens in medaka (*Oryzias latipes*). *Science of The Total Environment* 767, 144379 (9 pages).
2. Kawai YK, Itou K, Yoshino T, Iima H, Matsumoto F, **Kubota A**. (2020): Hepatic transcriptional profile and tissue distribution of cytochrome P450 1-3 genes in the red-crowned crane *Grus japonensis*. *Comp Biochem Physiol C* 228, 108643 (9 pages).
3. Lee JS, Morita Y, Kawai YK, Covaci A, **Kubota A**. (2020): Developmental circulatory failure caused by metabolites of organophosphorus flame retardants in zebrafish, *Danio rerio*. *Chemosphere* 246, 125738 (7 pages).