

氏名（本籍）	松本 寛子(神奈川県)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第99号
学位授与の日付	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ゼブラフィッシュ胚の耳石形成における炭酸脱水酵素の関与
論文審査委員	(主査) 都筑 幹夫 教授 井上 英史 教授 高橋 勇二 教授 藤原 祥子 准教授

論文内容の要旨

背景・目的

近年、産業の発展に伴い環境に多くの化学物質が使用されており、そのうち人工的に作られた化学物質は世界全体で十萬種以上とも言われている。多種多様な化学物質は人々の生活を支える反面、環境やヒトへの毒性影響が明らかになっていない化学物質が大半を占め、世界的なリスク管理が求められている。

化学物質の環境生物への影響評価は、国際的な試験評価基準である経済開発協力機構(OECD)テストガイドライン等に準じた評価が求められる。多数の生物から構成される生態系に対する化合物の影響評価には、先ず各生態的地位の代表種として一般的には生産者である緑藻、低次消費者であるミジンコ、高次消費者である魚類を用いる。近年、魚類への毒性影響については、胚や稚魚等の発達成長過程に対する影響評価の重要性が提唱されている。その理由としては胚や稚魚は組織や臓器の未発達であるため免疫や解毒機能も十分ではなく、加えて表皮の防御機能が低いため体表からの化合物取り込み量が成魚に比べ高いため、化学物質によっては成魚に比べ胚や稚魚に対する感受性が高い可能性があるためである。しかしながらどのような作用点、化学的構造、性質を有する化合物が胚や稚魚へ高感受性を示すについては報告は少ない。

そこで、本研究では、強い胚毒性を引き起こす化学物質を抽出することを目的として、胚発達期に重要と考えられるpH維持やイオン産生など細胞や組織の恒常性を司るタンパク質や生長に関わるホルモンに着目し、それら機能をつかさどるタンパクやホルモン合成を阻害する化学物質の胚毒性を網羅的に解析した。その結果、高い胚毒性を示した化合物群として細胞や組織のpH維持やイオン産生を担う炭酸脱水酵素(CA)を阻害する化合物が抽出された。CAは魚類の発達に重要である恒常性維持に

関わり魚類の初期胚において多数の組織に局在する。器官や臓器形成や発達に大きく貢献する酵素であり、かつ重金属、医薬品、農薬等多くの化学物質により阻害されるが、胚や稚魚に対する感受性についての報告は殆どない。特に魚類の捕食、外敵からの逃避、遊泳など生存にとって極めて重要な平衡感覚や聴覚、それを司る内耳の形成・維持についての分子機構および CA の局在や機能については十分に明らかにされていない。そこで、本研究では、CA 阻害剤により生じる高い胚毒性の要因を解析することを目的として、内耳における耳石形成や遊泳への影響およびそれに関わる CA 発現や局在解析、胚への化合物蓄積と酵素活性阻害について検討した。さらに胚発達期の聴覚や平衡覚の異常を明らかにするため、耳石が司る聴覚や平衡覚の感覚受容器である **neuromast** を構成する有毛細胞の損傷を組織学的、形態学的に捉え解析しゼブラフィッシュ胚で生じた内耳毒性の作用性を明らかとすることとした。

結果・考察

魚類の胚発達期に重要と考えられる pH 維持やイオン産生など細胞や組織の恒常性を司るタンパク質や生長に関わるホルモンを阻害する化学物質をゼブラフィッシュ胚に暴露した。レトロゾールを除くすべての化学物質でゼブラフィッシュに形態的な異が生じた。供試した化学物質のなかで最も強い毒性影響を示した化合物は CA 阻害剤であるエトキシゾルアミド(EZA)であった。CA 阻害剤暴露により心臓浮腫や脊索弯曲等の共通した毒性影響がみられ、その中で最も顕著な影響は耳石低形成および遊泳不良であった。特にエトキシゾルアミド (EZA) については他化合物の影響濃度と比較し 100 倍以上低い濃度において影響を示した。神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンの受容体結合を阻害する化合物は脊索走行や断裂、アゴ形態異常といった神経発達異常様の影響がみられ、甲状腺ホルモンを阻害する化合物では発育遅延による未孵化がみられた。

最も胚毒性影響が強かった CA 阻害剤である EZA の特性を調べるため、成魚との感受性差およびアセタゾルアミド(AZA)との毒性影響差について確認した。その結果、半数致死濃度(LC₅₀)、影響濃度(EC₅₀)は成魚に比べ胚で 100 倍程度強く、胚に高い感受性を示すことが明らかとなった。一方で AZA では成魚と胚の影響濃度の差は 7 倍あり、EZA と同様に胚が高い感受性を示した。EZA の高い胚毒性が生じる要因を調べるために高胚毒性を示す EZA と低毒性を示す AZA の胚への化合物取り込み量を測定した。胚毒性の差は 350 倍も EZA が高く、胚への蓄積量は EZA では胚への蓄積量は暴露量の平均 3.5 倍蓄積していたが、AZA は暴露量に対する蓄積量は 0.0092 倍と非常に低いことが示された。脂質分配係数はアセタゾルアミドの 0.001 に比べエトキシゾルアミドは 30 であり脂溶性が非常に高く、蓄積性が高いという化学的特徴とを有する。これら化合物の化学的特性と胚への高蓄積性、高胚毒性は相応する結果が得られた。

耳石や感覚受容器である **neuromast** の形成や発達が活発に生じる後期胚—稚魚の期間に、CA 阻害剤を暴露すると顕著な影響がみられた。そこで主要な器官形成が完了する受精後 5 日までの耳石形成、石灰化、および石灰化に関わると考えられる内耳における CA の局在について調べた。哺乳類で内耳に発現がみられている 8 種の CA アイソフォームについて内耳および胚全体での mRNA 発現量について定量し、そのうち CA2a および CA15a については免疫組織化学染色にてタンパク質の発現、局在に

についても確認した。その結果、耳石や **neuromast** の形成が始まる受精後 2 日に内耳上皮細胞およびイオノサイトに **CA2a** および **CA15a** が発現していることが明らかになった。先行研究ではカワズメ胚のイオノサイトに **CA** 活性が確認されていたが、ゼブラフィッシュ胚ではイオノサイトに加え、魚類胚では初めて内耳有毛細胞ならびに支持細胞にも発現することを明らかにし、**CA2a** および **15a** はアイソフォームも特定することができた。

内耳上皮細胞に **CA** が高発現した受精後 2 日から 5 日は、内耳発達に重要な時期である。この期間に **EZA** を暴露すると、**CA2a** および **15a** が発現する有毛細胞や支持細胞には核や細胞質の濃縮、空胞変性が生じアポトーシス様の組織変化が観察され、聴覚や平衡覚の消失もみられた。これら影響がみられた胚の耳石はカルシウム沈着が阻害され耳石中カルシウム濃度が有意に減少しており、聴覚や平衡覚への影響の要因であることが明らかとなった。**CA** 阻害剤による耳石形成阻害はニジマスやサーモン等の成魚でも生じることが知られているが、胚発達期は内耳上皮細胞に **CA** が時期特異的に高発現し、耳石へのカルシウム沈着が活発になるため、成魚とは異なり **CA** 阻害剤の感受性が高まっていることが考えられた。

さらに **EZA** は耳石と連動して聴覚や平衡覚を司る内耳の耳石器官や感覚受容器である **neuromast** を構成する有毛細胞に対しても損傷を引き起こすことが明らかとなった。**neuromast** は音や水流を感知し、電気信号として脳へ伝達する。内リンパ液の **pH** 制御異常は **neuromast** の有毛細胞が損傷するという報告があり、内耳イオノサイトおよび上皮細胞に局在し内リンパ液へのイオン供給や **pH** 制御に寄与している **CA** は内耳においても耳石形成以外に **neuromast** にも影響が生じている可能性があると考え、感覚受容器に対する影響を調べた。ゼブラフィッシュ胚の体側に分布する 16 の **neuromast** の有毛細胞に対する **EZA** の影響を調べたところ、内耳に局在する有毛細胞が他の **neuromast** の有毛細胞と比較し特出し損傷することが明らかになった。損傷した有毛細胞は核ならびに細胞膜染色いずれにおいても染色性がなく細胞全体が損傷し機能を消失していることが確認された。ゼブラフィッシュ胚の有毛細胞の損傷はアミノグリコシドや抗腫瘍剤でも生じることが報告されている。これら薬剤は **ROS** 産生によりアポトーシスが誘導され **caspase** 系を介して有毛細胞が損傷されるとされているがその作用機序もまだ不明な点も多い。これまで **CA** 阻害剤では内耳有毛細胞損傷の報告がなく、どのような作用でアポトーシスが生じるか不明であったため、先ずアポトーシス、細胞新生に関わる遺伝子発現の変動を比較した。その結果、アポトーシスで関連遺伝子である **Bcl-2** の発現上昇および **Bid** の発現低下がみられ、アポトーシス抑制がみられた。また **p53**、**p27**、**p21** 等の発現量が上がっていることから細胞新生は抑制されていることが推察された。アミノグリコシドや抗腫瘍剤で誘導されたカスパーゼ系は誘導されず、**EZA** は異なる経路でアポトーシスが誘導された可能性が示唆された。

これまで内耳における **CA** 阻害剤の作用としては耳石石灰化阻害への研究が中心になされてきたが、本研究でその阻害作用は耳石石灰化に加えて、細胞内 **pH** 変化によるアポトーシス誘導、有毛細胞損傷および聴覚神経系の損傷が示され聴覚や平衡覚機能全体に影響を及ぼす可能性を見出すことができた。

以上の結果より、胚発達期に高い毒性影響を示し、かつ多くの重金属や医薬品、農薬の阻害作用点である **CA** を阻害する **EZA** を選抜し毒性作用機序解明を試みた。**EZA** がゼブラフィッシュ

に対し高い胚毒性を示す要因は脂溶性が高く表皮の防御機能が低いため体表からの化合物取り込み量が高いことによることを明らかとし、最も顕著な影響を示した内耳ではこれまで報告のない CA 阻害作用として、細胞内 pH 変化によるアポトーシス誘導、有毛細胞損傷および聴覚神経系の損傷等の新たな毒性を見出し毒性の作用機序を解明する手がかりを得ることができた。本研究は EZA のみならず、環境中に多く存在する CA 阻害作用を示す重金属、医薬品、農薬等の環境リスク評価において簡易かつ高感度の評価系として利用できることが期待できる。

研究結果

Matsumoto H, Fujiwara S, Miyagi H, Nakamura N, Shiga Y, Tsuzuki M. Carbonic anhydrase inhibitors induce developmental toxicity during zebrafish embryogenesis, especially in inner ear. (Submitted)

審査結果の要旨

生物への環境影響評価は、国際的な試験評価基準である OECD テストガイドライン等に準じた評価が行われているが、この評価は農薬などの開発においては不可欠なものであり、安全性確保の上で極めて重要なものである。そのため、より早くより感度よく正確に評価結果を出すことが強く望まれる。魚類を用いた影響評価は、脊椎動物への影響の視点も含めて重要であり、成魚のみならず胚を用いた評価も行われ始めている。申請者は、より早くより感度のよい評価系の開発と環境影響の生じやすい化合物の検討の視点から、ゼブラフィッシュの胚発生時の耳石形成における炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase; CA)の阻害剤等の影響を中心に生物影響についての研究を行った。

まず、種々のホルモン受容体に対する阻害剤を胚に暴露したところ、甲状腺ホルモンを阻害する薬剤により発育遅延による未孵化などの現象が認められた。また、ヒト胎児に神経管閉鎖阻害を誘発する化合物でも体の中軸をなす脊索に蛇行や断裂がみられ、脊索の配列に異常を示す個体も見出された。GABA の受容体結合を阻害する殺虫剤でも脊索走行や断裂、アゴ形態異常がみられ、発達期における神経伝達物質は魚類の脊索形成や神経管閉鎖に影響を及ぼす可能性が示唆された。

次に、さまざまな器官で発現し機能している CA について、その阻害剤による影響を調べた。種々の CA 阻害剤の中で、脂溶性の高いエトキシゾルアミド(EZA)では、低い濃度で顕著な影響が認められ、EC₅₀が 0.08 ppm ときわめて強い毒性を示した。そこで、主要な器官形成が完了する受精後 5 日までの耳石形成、石灰化、および石灰化に関して解析を行った。CA の発現とその局在について調べたところ、哺乳類の内耳と同様、8 種の CA アイソフォームが発現していることを確認した。また、CA2a および CA15a いずれも耳石石灰化が生じる受精 2 日後に協調して発現することが明らかになった。これまでイオノサイトで CA の発現は報告されていたが、魚類胚では初めて有毛細胞にも CA が発現することを明らかにした。さらに、CA の阻害により、細胞内 pH 変化によるアポトーシス誘導、有毛細胞損傷および聴覚神経系の損傷、耳石膜損傷、中脳の空胞変性も引き起こされることを示した。CA 阻害による有毛細胞のアポトーシス誘導はこれまでは知られていない。

本研究において、ゼブラフィッシュ胚からの耳石形成を調べることにより、脂溶性薬剤の強い毒性を迅速に見出す系を構築した点や CA 阻害により有毛細胞のアポトーシス誘導を示した点はきわめて重要な貢献である。また、本システムは、開発段階の化合物検定に用いられている点も評価できる。

提出された論文、口頭発表と質疑応答を審査した結果、学位授与に値すると考えられる。しかし、投稿論文として受理されてから学位を授与するべきとの意見があった。