

別添2

厚生労働科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

研究課題名(課題番号)内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てたハイ・ス
ルー・プットスクリーニング法による内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究
(H14-食品・化学-007)

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 15(2003)年 4 月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てたハイ・スルー・プットスクリーニング法による内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究の総括、及びヒト由来培養細胞系及び表面プラズモン共鳴を用いた超高速分析法の検証に関する調査研究・*in vivo* データとの比較検討

.....1

菅野 純

II. 分担研究報告書

1. 超高速選別法の検証の評価に関する調査研究

.....102

井上 達

2. 内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発

.....105

小野 敦

3. 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価

.....110

板井 昭子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....127

IV. 研究成果の刊行物・別刷

.....128

別添 4

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業) 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てたハイ・スルー・プットスクリーニング法による 内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究

主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

世界的に検討が始まったところの化学物質の内分泌かく乱性を緊急に再評価する方法の有用性を、独自の立場から検討するとともに、その必要な改良を行うための研究を平成10年度に立ち上げた。これまでの研究成果は、内分泌かく乱作用の有無を確認するための詳細試験に資すべき化学物質の優先順位付けの為の試験スキーム(内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会・中間報告追補、平成13年)、及びその発展系である「拡張試験スキーム」の完成に寄与しており、その中の各種スクリーニング法について検討を進めてきた。本年度は、(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価については、エストロゲン受容体 α (ER α)とER α に結合する可能性のある化学物質各々の立体構造情報に基づいた理論的な結合様式の推定及び相対的結合能(Relative binding affinity)の計算法開発を行い、また(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイ・スルー・プットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析では、新たに66物質についてER agonist及びantagonist活性の測定を実施した。(3)表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening (SPR-HTPS))研究においては、これまで検討を進めてきた化学物質によるER α 受容体の応答配列DNAに対する結合・解離過程への影響の計測とあわせて、共役因子結合配列LxxLLに対する受容体結合性の計測を約100化合物について行うとともに、ER β 受容体測定系構築を行った。

分担研究者

井上 達	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長
小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所毒性部主任研究官
板井 昭子	(株)医薬分子設計研究所代表取締役

A. 研究の目的

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質問題の解明に向けた厚生労働省の「試験スキーム」及びその発展系である「拡張試験スキーム」に沿って本研究に要求される順位付けの

為のスクリーニング、すなわち(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索、(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイ・スルー・プットスクリーニング

(HTPS)を利用した超高速分析法、及び(3)表面プラズモン共鳴を応用した新規高速分析法、の3手法を用いたスクリーニングを進めるとともに、順位付けの科学的根拠に関わる諸要因、すなわち、受容体ーリガンド結合性、受容体と応答DNA配列との相互作用、転写に関わる共役因子と受容体の相互作用、等に関する基礎的研究をさらに進め、内分泌かく乱の評価やメカニズム研究への有効応用を目指すものである。

これらの結果により、次の段階として詳細試験に供する化学物質のより正確な優先リストが完成することが期待される。このリストにより、内分泌かく乱化学物質問題の効率的な解決への一つの道筋ができるものと考え。また、ここで得られる受容体、応答DNA配列、共役因子等の相互作用に関するデータが有機的に組み合わせられて運用されることにより、内分泌かく乱化学物質問題のもう一つの焦点である「詳細試験」(有害性認定試験)開発へのメカニズム面からの貢献も期待される。

B. 研究方法

(1)内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価 (分担研究者:板井 昭子 (株)医薬分子設計研究所)

女性ホルモン等核内受容体のリガンド結合ドメインは結晶構造が解析されており、標的受容体の立体構造の情報に基づくコンピュータを用いた理論的なアプローチが可能である。当研究者らは以前から、標的受容体の立体構造が利用できる場合に、受容体ーリガンド間で形成され得る水素結合を足がかりとして任意の化合物が形成できる最も安定な複合体の構造を予測し、原子レベルでの相互作用様式と結合の強さを推定する自動ドッキング法及びそ

の方法に基づいて新規の活性化合物を探索する目的で、膨大な化合物群から標的受容体に安定に結合する可能性の高い少数の化合物を選別する三次元データベース検索法の開発を行ってきた。この方法によれば、あらかじめ設定した蛋白質結合キャビティ内の水素結合部位や芳香族環の相互作用部位と、対象データベース中の低分子化合物の水素結合部位や芳香族環とのマッチングを、低分子化合物のコンフォメーションを系統的に変えることで網羅的に実行することができる。本研究は、この三次元データベース検索法を利用して選び出した少数の候補化合物を入手し実験的に活性確認することにより、未知のかく乱作用を有する化学物質を効率よく探索することを目的として、今年度は、米国 EPA 環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物のうち市販化合物データベースである ACD にも登録されていて分子結合情報だけではなく立体構造情報まで得ることができる化学物質だけを今回の計算対象とすることとした。また、アンタゴニスト予測の試みも実施しており、その場合、Protein Data Bank (PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型 ER α のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ラロキシフェン(RAL)が結合している 1err.pdb を使用した。いずれも、蛋白質座標に水素を付加し、蛋白質分子力場計算プログラム AMBER で付加した水素の構造の最適化・AMBER 原子タイプ・原子電荷の割り振りを行った。さらに自動ドッキングプログラム Adam & Eve を実行する際に必要な水素結合情報を割り振った。リガンド候補化合物は三次元化した後、自動ドッキングに必要な情報(水素結合情報とコンフォメーション探索時の結合回転情報)を付加した。なお、三次元化には単純なディスタンスジオメトリ法による構造立ち上

げの後 MMFF 力場を用いた構造最適化と MOPAC-MNDO 法による原子電荷計算を行うプログラム Olive を使用し、自動ドッキングに必要な情報付加には、Adam & Eve の付属プログラムである Eve-make を使用した。スクリーニングの結果、結合活性値と受容体-リガンド間の相互作用の強さとの間に良好な相関(相関関数:R=0.73)を得た。また、これらの化学物質のうち入手可能性、分子構造の確実性を重視して、logRBA 推算を行なう化合物群を以下の流れで選び出した。

- (1) EPA 化合物のデータから CAS 番号リストを作成:58,591 化合物
- (2) ACD 化合物のデータから CAS 番号リストと ACD 化合物番号を作成:80,523 化合物
- (3) (1)と(2)で CAS 番号のマッチングを実行:20,223 化合物
- (4) ひとつの CAS 番号について、ACD 番号が複数ある化合物は ACD 番号の小さい化合物を採用して化合物を一意に決定:19,667 化合物

この 19,667 化合物は ACD データベース中に立体構造が明記されており、構造の不確実さのために誤った計算結果がでることのない質の高い低分子構造が得られた。これらについて、結合様式の推定、複合体構造最適化、自由エネルギー解析を実行し、式(1)に従ってスコアを算出した。スコアの高い上位 1000 化合物について、その CAS 番号とスコア値を求めた。得られた情報を利用して、エストロゲン作用を有する物質が既に多く知られているフラボン類の市販化合物を対象としてバーチャルスクリーニングを実行し、21 化合物を選び出した。これらの化合物の転写活性を測定したところ、11 化合物に活性がみられた。

(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイ・スルー・プットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する研究

(2)-1 レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究(主任研究者:(財)化学物質評価研究機構に対する委託業務)

化学物質のホルモン様活性の高速スクリーニング試験法の開発及びその検証を目的として、平成 10 年度の厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業に始まり、平成 11 年度～13 年度の本研究班で継続的に実施してきた Firefly Luciferase 遺伝子の上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid とエストロゲンレセプター-蛋白を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に、且つ安定的に組み込まれたヒト由来の細胞(HeLa cell)を使用した高速自動分析法による化学物質の解析を引き続き行った。また、開発に困難を来しているアンドロゲンレセプター及び甲状腺レセプターとレポーター遺伝子を組み込んだ培養細胞を用いたロボットアッセイシステムの開発を継続した。

尚、ER α agonist 検出系については、被験物質及び陽性対照物質の全濃度区で得られた発光強度(RLU)から陰性対照区の平均値を差し引いた後、陽性対照区の平均値(通常、誘導活性がプラトーに達する 100pM E2 を使用)で除し、相対転写活性化倍率(Relative transcriptional activity)を求めた。また、各濃度区で得られた発光強度(RLU)を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率(Transcriptional activity, Fold induced)を求めた後、陽性対照区の最大転写活性化倍率(通常 100 pM E2)の 10%の値を与える濃度(PC10)及び 50%の値を与える濃度(PC50)を 2

濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。PC10が算出されない化合物はエストロゲン活性陰性(-)と判定した。また、ER α antagonist 検出系については、各濃度区で得られた発光強度の平均値を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率(Transcriptional activity)を求め、陽性対照区の転写活性化倍率の1/2の値まで転写活性化倍率が阻害される化学物質の濃度(IC50)を Logistic 式より求めた。

(2)-2.超高速選別法(HTPS)の検証の評価に関する調査研究(分担研究者:井上 達 国立医薬品食品衛生研究所)

化学物質の内分泌かく乱作用を評価するための毒性試験法は未だ確立されておらず、現在、OECDなどの国際機関を中心にEDsスクリーニング法の開発・評価プロジェクトが展開されており、HTPSはEDCsスクリーニング法の中でも迅速且つ高感度に多種類の化学物質の類ホルモン作用を検出する手法と位置付けられている。本年度は、内分泌かく乱化学物質試験法について、国際的動向及び我が国の立場、現状での問題点を把握するため、アジア太平洋生理学主催の国際会議における内分泌かく乱化学物質のシンポジウムを中心として、受容体原生に伴う低用量効果・複合効果についての関係研究者と情報交換を行った。また、研究課題の今後の進展の参考とするため当方の研究成果を発表し、その内容に対する意見の交換を行った。ホルモン受容体作用による内分泌かく乱作用は、従来の毒性的手法では検出できない低用量域からの生体作用や逆U字と呼ばれる複雑な用量-生体反応を示すことを示唆する結果が多く報告されているが、いまだそのメカニズムの解明に至っていない。さらには、いくつもの化合物に同時

に暴露された際の生体影響や、いくつもの受容体に作用を有する化合物による複雑な生体影響については、科学的に未解明の部分が多く、効果的に判断できるアッセイ手法はないと考察された。ホルモン受容体は、リガンド依存性転写因子であり、その生体作用は下流遺伝子発現制御により惹起される。すなわち、その遺伝子制御メカニズムに関する最新の知見に基づく手法や、microarray技術などによる化学物質により、変動する遺伝子の網羅的解析などの戦略は、これに対応するものと考察され、今後のその応用によりさらに信頼性及び妥当性の向上が図られると考察された。

(3)表面プラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening、SPR-HTPS)の開発研究

(3)-1.「表面プラズモン共鳴高速分析によるデータの高速取得技術及びHTPSに特化するための試験」(主任研究者:ピアコア株式会社に対する委託業務)

本委託研究では、化学物質のホルモン作用を評価する一次スクリーニング法の開発のために、ホルモンレセプターの作用メカニズムに焦点をあてた無細胞系のスクリーニング用アッセイの開発研究を行った。ピアコア社の表面プラズモン共鳴センサーBiacoreRを用いて、エストロゲンレセプターを組み込んだ内分泌かく乱候補化学物質のアッセイ系を開発した。表面プラズモン共鳴センサーは分子間の結合・解離を非標識で、リアルタイムに測定することができる。さらに分子間の相互作用に関して、結合の有無だけでなく、結合の反応速度論的解析が可能であるという特徴を持っている。アッセイに用いるレセプターとしてはリガンドが既知の α 型エストロゲンレセプター(ER)を用いた。

国立医薬品食品衛生研究所の小野が開発した方法をもとに、表面プラズモン共鳴センサーを用いて α 型エストロゲンレセプターとエストロゲンレセプターホルモン応答 DNA 配列(ERE)との相互作用を測定する系を構築し、これをハイ・スループット・スクリーニング向けに測定条件を至適化した(ERE アッセイ)。次に ER の遺伝子発現調節の共役因子(コファクター)である TIF2 の ER 結合サイト LxxLL モチーフを用いたアッセイを構築した(TIF アッセイ)。

化学物質を添加したレセプターの同一試料を用いてこの 2 つのアッセイを同時に行った。99 種類の化学物質について表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質の高速スクリーニング法を実施し、このスクリーニング法の有用性を検証した。アッセイの検証については、ERE アッセイ及び TIF アッセイの再現性を確認するために、ポジティブコントロール(100nM E2)とネガティブコントロール、(DMSO、終濃度 0.1%)を交互に繰り返し計 16 サイクル繰り返す測定を行った。ERE アッセイ、TIF アッセイでポジティブコントロールの平均値はそれぞれ 100.0%、100.4%、標準偏差は 4.29、2.36 と非常に高精度の結果が得られ、これら 2 つのアッセイの再現性の高さが示された。両アッセイにおいて、ER の結合活性低下の補正法の妥当性、サイクルを繰り返したときのベースラインの安定性についても合わせて検証した。16 サイクルのアッセイを繰り返したときの ER の結合活性の変化は線形一次近似式でフィッティングすると相関係数 R2 は 0.97 以上であり、この活性の補正法は妥当であることが示された。またアッセイ終了時のベースラインの値の変化を見ると、16 サイクルでその差は ± 10 RU 以内であり、特に上昇、減少するような傾向も見られなかったので再生は十分かつ適

切に行われていることが確認された。ベースラインの変化は結合シグナル(1130-868 RU)に対して充分小さい値であり、アッセイの結果に影響を及ぼさない範囲であることも確認できた。ER の異なるロット 4 種類について上記の検証試験を繰り返したが、いずれのロットにおいても再現性の高い結果が得られ、このアッセイ法及びデータ解析法の信頼性の高さが確認された。引き続き、国立医薬品食品衛生研究所から支給された合計 99 種類の化学物質について ERE、TIF の両アッセイを 2 回ずつスクリーニングし、化学物質毎に化学物質の濃度と相対活性化度(% activation)を求めた。99 種類の化学物質のうち、EA151、EA240、EA246、EA258、EA318、ER617、ER618、ER619、ER628 の 9 種類の化学物質は 100%DMSO に全く溶解しなかったため、スクリーニングにかけることができなかった。

スクリーニングの結果から相対活性化度を判定基準として化学物質を分類した。ERE アッセイでは 100nM において E2 と比較して 50% 以上の活性化が起こる物質を高反応性物質(high responder, H)、20-50%の活性化が起こる物質、あるいは 20%よりも低いのが明らかに濃度依存的に活性化が見られる物質を低反応性物質(low responder, L)、活性化が 20%以下の物質を無反応性物質(non-responder, N)とした。また ER の結合を阻害する化学物質もあったので、これらについては、100nM において E2 と比較して 20-50%の阻害を起こす物質を低阻害性物質(low inhibitor IL)、50%以上の阻害を起こす物質を高阻害性物質(high inhibitor, IH)と定義した。

TIF アッセイでは 100nM において 50%以上の活性化が起こる物質を高反応性物質(high responder, H)、10-50%の活性化が起こる物質、

あるいは10%よりも低いのが明らかに濃度依存的に活性化が見られる物質を低反応性物質 (low responder, L)、活性化が10%以下の物質を無反応性物質(non-responder, N)とした。この定義に従って化学物質を分類した。

(3)-2 内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発(分担研究者:小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

内分泌かく乱化学物質のレセプターを介した生体作用におけるレセプターシグナル伝達系の個々のステップへの影響を解析し、その結果をもとにした新規ハイスループット (HTPS)系への応用を目的として、これまで表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー (BIAcore™)を用い、化学物質のエストロゲンレセプター(ER)への結合がERとそのレスポンスエレメント(ERE)との相互作用やコファクターとの相互作用に及ぼす影響から、ERに結合した化合物の生体作用との関連について解析を進めてきた。本年度は、これまで測定が困難であったER β 測定系を構築し、代表的リガンドについて相互作用を検討した。まず、ERE固定化センサーチップ及びコファクター結合モチーフ固定化センサーチップを作成し、ER(リコンビナント Human ER α 及び β)を測定用バッファーで希釈して、対象化合物と混合し、30°Cで5分間インキュベートした後、サンプルをERE及びLxxLLを固定化したセンサーチップにインジェクトしてSPR装置 (Biacore 3000, BiacoreAB)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。化合物の結合による相互作用への影響を解析するにあたっては、化合物を 10^{-5} ~ 10^{-8} Mの濃度範囲で10nMのERと混合し、ERのERE及びLxxLL

ペプチドに対する結合解離過程を測定した。市販のコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)及びJMP ver.3(SAS institute))を用いて、各化合物の存在下及び非存在におけるER-ERE相互作用の結合解離過程をそれぞれ2分間測定してそのレスポンスの変化を比較した。また、2分間のレスポンスの増加を、結合量として求めた。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、各研究機関の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、特に国立衛研はそのモデル施設となっている。本研究を構成する分担研究者には、米国においてAAALACのGLP承認国立研究機関における研究歴を有する経験者を含んでおり、実験における倫理面での配慮に明るい。

C. 研究結果

(1) 内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価(分担研究者 板井昭子 医薬分子設計研究所)

エストロゲン受容体 α (ER α)とER α に結合する可能性のある化学物質各々の立体構造情報に基づいた理論的な結合様式の推定及び解析として、EPAのHTS候補化合物のうち、市販化合物データベースであるACDに記載されていて構造が一意に決定されかつ入手できる可能性のある化合物群に対してそのRBA (relative binding affinity)値予測を行った。RBA値既知の化合物群でRBAを予測したところ、予測値と実測値の相関は良好であった。その一方で、活性未知化合物については、予測値が上位となった化合物は現状の

計算法で扱うには不具合のある化合物が多く、さらに検討が必要であると結論付けられた。また、これらの化学物質のうち入手可能なものについては COS-1 細胞を用いて転写活性値の測定も行った。得られた情報を利用して、エストロゲン作用を有する物質が既に多く知られているフラボン類の市販化合物を対象としてバーチャルスクリーニングを実行し、化合物を選び出した。これらの化合物の転写活性を測定したところ、11 化合物に活性が見られた。

(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイスループットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析は、(2)-1.レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究（主任研究者：(財)化学物質評価研究機構に対する委託業務）及び(2)-2. 超高速選別法の検証の評価に関する調査研究（分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所）よりなる。現在、製造されている化学物質は数万種類といわれており、これらの中でホルモン様作用を示す可能性のある物質を効率的に把握し、その有害性を評価するためのプレスクリーニング試験としてのレポーター遺伝子活性化試験の有用性を検討するため、前者委託研究では本年度は既存の化学物質のうち、未測定約 66 物質について ER α を介するアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性について検討を行った。その結果、66 物質の中で 14 物質が比較的強いアゴニスト活性を有する物質として選出されたが、ER α に対するアンタゴニスト活性を有する化合物は無いものと推察された(1 検体が偽陽性)。後者(2)-2 研究では、本年度はアジア太平洋生理学主催の国際会議における内分泌かく乱化学物質のシンポジウムに出席し、内分泌

かく乱化学物質の低用量効果・複合効果を中心に現時点での試験法の問題点等について関係研究者と情報の交換を行い、さらに当方の研究成果を発表し、その内容に対する議論を行う等、国内外の当研究課題について調査を行なったところ、現状ではいずれの手法も完璧とはいえず、内分泌かく乱化学物質問題解明のためには、引き続き最新の知見に基づく新規試験法の開発が重要であると結論付けられた。

(3)「表面プラズモン共鳴高速分析によるデータの高速取得技術及び HTPS に特化するための試験」(主任研究者：ピアコア株式会社に対する委託業務及び国立医薬品食品衛生研究所 小野敦)

SPRによる方法は生体分子間の相互作用をリアルタイム解析するシステムであり、これにより内分泌かく乱化学物質による受容体の DNA 結合性、及び受容体と共役因子との相互作用への影響を、それぞれの結合・解離過程の変化を捕らえることにより解析するものである。本年度は内分泌かく乱性指標としての可能性を考慮しつつ引き続き本システムの精度向上及び生物学的意義との関連づけの検討を進めた。すなわち、本系は生体内でのホルモン作用機構を試験管内で再現した形での解析を特徴としており、個々の化合物に依存した生体内作用の差異の予測性の高い解析が可能である。すでにこれまでの3年間において、エストロゲン受容体に作用する化学物質については、アゴニストとアンタゴニストそれぞれにおいて特徴的な変化を示すことが明らかとなった。本研究においては、3カ年でさらに約 300 物質の測定を行う予定であり、今年度はこれまで検討を進めてきた化学物質による ER α

受容体の応答配列DNAに対する結合・解離過程への影響の計測、及び99種類の化学物質について共役因子結合配列LxxLLに対する受容体結合性の計測を実施し、このスクリーニング法の有用性を検証した(ピアコア社、委託事業)。また、エストロゲン様作用物質の間で異なる生体作用の報告されているものがあるが、その差異の原因は、個々の化合物によってERの構造が特異的に変化を受けるために、それによる遺伝子発現制御が変動する為であるという可能性が、今までの検討で示唆されている。平成14年度は、これまで測定が困難であったER β 測定系を構築した。それを用いて代表的リガンドについて相互作用を検討したところ、測定を行ったいずれのER α アゴニストでもER β のERE及びLxxLL相互作用アフィニティーの増加が認められた。また、アンタゴニストもまた、ERE相互作用を増加させる一方で、ER α と同様LxxLL相互作用は示さなかった。ER-ERE相互作用結合解離パターンにおいてER α では、アゴニスト結合型とアンタゴニスト結合型で大きな差が示されるが、ER β ではアゴニストとアンタゴニストで相互作用パターンに明確な差は認められず、またさらに、E2を含むすべての化合物でER α アンタゴニスト結合型に近い相互作用パターンを示した。いくつかの化合物について化合物濃度依存性の検討を行った結果、植物エストロゲンのゲニスタインは、ER α に比べ低い濃度範囲でER β 活性化作用を示した。

D.考察

本年度は、(1)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価ではエストロゲン受容体 α (ER α)とER α に結合する可能性のある化学物質各々の立体構造情報に基づいた理論的な結

合様式の推定及び解析を行った、また HTPS系のうち(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイ・スルー・プットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析(財団法人化学物質評価研究機構)では、新たに66物質についてER agonist及び antagonist 活性の測定を実施した。一方、(3)表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)研究においては、これまで検討を進めてきた化学物質によるER α 受容体の応答配列DNAに対する結合・解離過程への影響の計測とあわせて、共役因子結合配列LxxLLに対する受容体結合性の計測を約100化合物について行った。あわせて本年度は、ER β 受容体測定系構築を行った。

(1)内分泌かく乱化学物質の電算探索による*in silico*スクリーニングでは、既知リガンドと構造が全く異なる候補化合物であっても非常に高速且つ高精度の結果を得られることから、内分泌かく乱化学物質の初期スクリーニングに有用である。これまでのところ、計算によって求めたlogRBA値と、実験的に求められたlogRBA値との相関係数はR=0.73であり、一応の相関があると考えられる。しかしながら、文献上の検出限界以下の活性化合物(グラフ中では実験的なlogRBA値を便宜的に-5として表示)のlogRBA計算値は-2.5から0.5の範囲でばらついており、活性化合物との区別がつかなかった。これは、本来ならば複合体形成の障害となり得る局所的なぶつかりや電気的な不具合が複合体構造最適化によって消滅し、過剰に安定化してしまった可能性があり、今後さらに検討が必要であると考えられた。(2)ヒト由来培養細胞系を用いたハイ・スルー・プットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析法については、Firefly Luciferase 遺伝子

の上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER α を常時発現するための Plasmid が同時に且つ安定的に組み込まれた細胞を使用し、66 種類の化学物質についてその ER α アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、アゴニスト検出系では PC10 値が 25 物質に算出され、PC50 値は 14 物質において算出された。アンタゴニスト検出系では、1 物質(Malachite green) のみに IC50 が算出されたが、本物質では ER α 安定形質株細胞のルシフェラーゼ活性の阻害がみられた用量域において、Control 細胞でも同様にルシフェラーゼ活性の阻害が認められ、今回 Malachite green base にみられた ER α アンタゴニスト作用は細胞毒性に伴う偽陽性反応と考えられた。従って今回、実験に供した 66 物質の中には ER α に対するアンタゴニスト活性を有する化合物はないものと推察された。本法により選出された物質の *in vivo* 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要はあるが、本法の簡便さ、短期間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点などから、有用な内分泌かく乱化学物質試験法、特に高次試験実施における優先順位ののためのプレスクリーニング法として有用であると考察された。詳細な試験へ進む際に行うべき化学物質の優先順位付けに資するとともに、得られた結果に関して、*in vivo* 試験データや他のスクリーニング系との比較検討を行うことにより、データの有効性の検証が進むと考えられる。高速スクリーニングシステムとしては、酵母を用いたレポーター遺伝子アッセイ、ヒト細胞を含むさまざまな細胞系による遺伝子転写活性化を指標とするアッセイ系をはじめ、さまざまな受容体結合活性

の測定法など、*in vivo* スクリーニング法としては、子宮肥大試験やハーシュバーガー試験等の高次スクリーニング試験が提唱されており、これらを組み合わせて実施することでより包括的なスクリーニングが可能となると考察された。しかし、現状では、エストロゲン系(ER α 系)については系がほぼ揃ったと考えられるが、その他のホルモン関連受容体系に関しては、守備範囲、内容ともに完璧とはいえず、EDC の問題をカバーするためには、引き続き最新の知見に基づく新規試験法開発が重要である。(3)内分泌かく乱化学物質の作用メカニズムに焦点を当てたスクリーニング法の開発のためにホルモン受容体を用いた SPR-HTTPS 開発研究については、ER-ERE アッセイについては測定条件の改良を行うことにより、ハイ・スルー・プットスクリーニング法として信頼性と再現性の向上を得た。培養細胞を用いた系と比較して、本アッセイ系は *in vitro* の再構成系であり、純粋なレセプター-シグナル伝達系への作用のみを検討することができる特色があり、さらに、同じアゴニストであっても、その相互作用に与える影響が異なることが本系により明らかに示されることから、内分泌かく乱性の評価において有用であると考えられる。また本年度の検討の結果、新たに ER β 作用の測定が可能となった。数種の ER リガンドを用いて検討を行ったところ、ER β では ER α とは異なる相互作用パターンを示し、本系により化合物の ER 分子種選択性についても検討可能であることが示された。現在のところ ER β サンプルが安定な反応を示すのは、調整後約 1~2 時間程度であり、大規模スクリーニングへの適用にあたっては、いまだ改良すべき点が残る。今後、ハイスルー・プットスクリーニング法として、アッセイの精度、効率等の改

善を行うとともに、臓器特異的に発現するコファクターや配列の異なる ERE との相互作用解析を進め、化合物特異的な受容体作用のメカニズムについての検討を進める予定である。

以上、本研究班において構築されたこれら、*in silico*、*cell free*、*in vitro*スクリーニング手法により、対象の化学物質について、あるいは生体側の要因に依存して、それぞれ特異的な情報を得ることが可能である。これらを組み合わせることで、次の段階として詳細試験に供する化学物質の科学的根拠に基づく、より正確な優先化合物の抽出が期待される。また、ここで得られる受容体、応答DNA配列、共役因子等の相互作用に関するデータと細胞、個体レベルでの作用データが有機的に組み合わせられることにより、内分泌かく乱化学物質の作用メカニズムの解明への貢献が期待される。

E. 結論

*In silico*においてはアンタゴニスト結合受容体構造からのドッキングモデルを構築し、抽出された化合物を中心に、レポーター遺伝子導入細胞系及びSPRアッセイ系を実施し、得られたデータのフィードバックを行うことで*in silico*系の改良を進めた。また、レポーター遺伝子系、SPR系の双方でこれまで測定が困難であったエストロゲンβ受容体アッセイ系の構築をほぼ完了した。本研究により、次の段階として詳細試験に供する化学物質のより正確な優先リストの完成が期待される。このリストにより、内分泌かく乱化学物質問題の効率的な解決への道筋ができるものと考えられる。また、ここで得られる受容体と化学物質、応答DNA配列及び共役因子等の相互作用に関するデータが有機的に組み合わせられることにより、内

分泌かく乱問題のもう一つの焦点である「詳細試験」(有害性認定試験)開発への、メカニズム面からの貢献も期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I, A statistical method for judging synergism: application to an endocrine disruptor animal experiment, *Environmetrics*, 14(2):213-222, 2003.

Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K, Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice, *Toxicol Lett.*, 135(1-2):145-53, 2002.

Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T, Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies, *J Agri Food Chem.*, 50(13): 3883-5, 2002.

浅野和信、小野敦、橋本せつ子、井上達、菅野純 分析化学 Vol.51 No.6 pp389-396 (2002) 表面プラズモン共鳴センサーを用いる内分泌攪乱化学物質スクリーニング法

Kanno J, Reverse toxicology as a future predictive toxicology, T. Inoue, W.D.Pennie Eds, *Toxicogenomics*, Springer-Verlag Tokyo (2002), pp.213-218

菅野純、板井昭子、ドッキングモデルを用いた構造活性相関、CMC 出版、環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発、2003年3月

Inoue, T., Igarashi, K., and Sekizawa, J. Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoints of their mechanisms of action. *JMAJ (Japan Medical Association Journal)*, 46: 97-102, 2003.

Inoue, T. Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.

T. Inoue. Toxicogenomics-applied genomics: a tool in toxicology. *Proceedings of the Joint*

Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology (Special Session on the Use of Genomics (Toxicogenomics, Proteomics) in Hazard and Risk Assessment), OECD. (2002.2, Paris)

表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法：実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編 pp.199-204 (羊土社、2002)

環境ホルモン検出センサー：環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発 pp.247-251 (シーエムシー出版、2003)

2. 学会発表

Kazunobu ASANO, Atsushi ONO, Setsuko HASHIMOTO, Tohru INOUE, Jun KANNO Rapid in vitro screening assay for estrogenic chemicals using Biacore. Biacore Symposium, May 5-8, 2002, Chicago, USA

小野敦、浅野和信、橋本せつ子、井上達、菅野純 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法 第29回日本トキシコロジー学会学術年会 2002年6月18日-20日 名古屋

橋本せつ子、浅野和信、小野敦、井上達、菅野純 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法 第75回日本生化学会大会 2002年10月14日-17日 京都

Kanno J Toxicogenomics in Pharmacology/Physiology studies by functional genomics technology, The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 24-26, 2003, Fukuoka, Japan

Kanno J Reverse toxicology and data normalization/standardization Toxicogenomics International Forum 2002, Okazaki, 2002

菅野 純、内分泌攪乱化学物質とトキシコジェノミクス、第5回日本水環境学会シンポジウム、平成14年9月26日、東京

菅野 純、トキシコジェノミクスの展望、薬物動態談話会特別例会、平成14年10月4日、浜松

Kanno J Toxicogenomics の現状 ゲノム創薬フォーラム ゲノム創薬へのパラダイムシフト、平成14年11月13日、東京

菅野 純、創薬とトキシコジェノミクス研究戦略、

第94回基礎研究部総会、平成15年2月27日、浜松

T. Inoue: WS1-3 Risk Management in Drug & Food. International Conference of Risk Management for Preventive Medicine (2003.3.28)

T. Inoue: Introductory Note: Practical approaches for toxicogenomics. Toxicogenomics International Forum 2002 (2002.11.23)

T. Inoue: Workshop6: Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health. SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances (2002.11.21)

T. Inoue: Symposium 1: Current progress of endocrine disruptor research. 5th Scientific Congress Federation of Asian & Oceanian Physiological Societies (FAOPS) (2002.9.24)

T. Inoue: Low-dose effect in endocrine disruptors: Strategy for testing and assessment. Satellite Symposium on Endocrine Disruptors: Impact on Reproductive Health (2002.9.27)

T. Inoue: Practical approaches to testing and validation for possible endocrine disruptors with respect to a mechanism of action. 4th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2002.8.11-15)

Kazunobu ASANO, Atsushi ONO, Setsuko HASHIMOTO, Tohru INOUE, Jun KANNO Rapid in vitro screening assay for estrogenic chemicals using Biacore. Biacore Symposium, May 5-8, 2002, Chicago, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

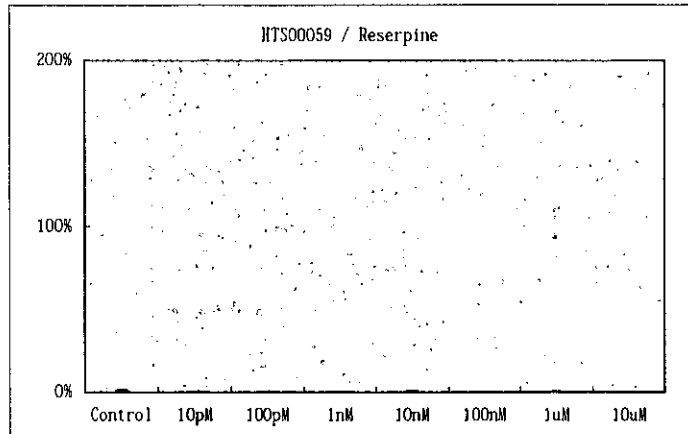
なし

ER α /HeLa Agonist

HTS00059

Reserpine

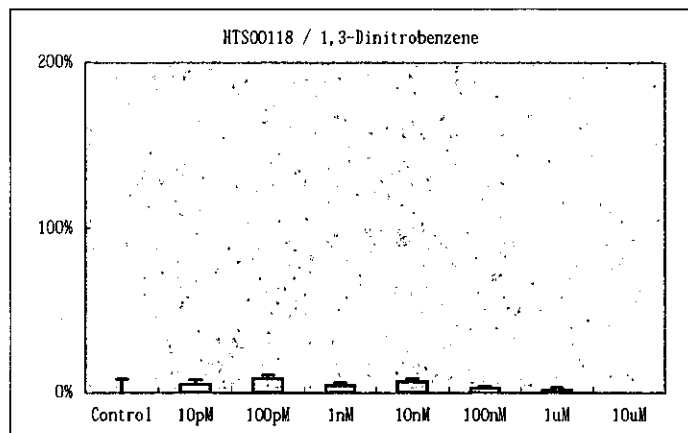
PC50 (pM): -



HTS00118

1,3-Dinitrobenzene

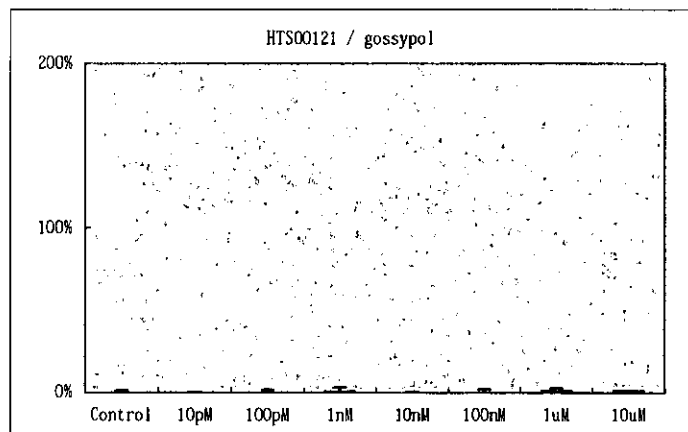
PC50 (pM): -



HTS00121

gossypol

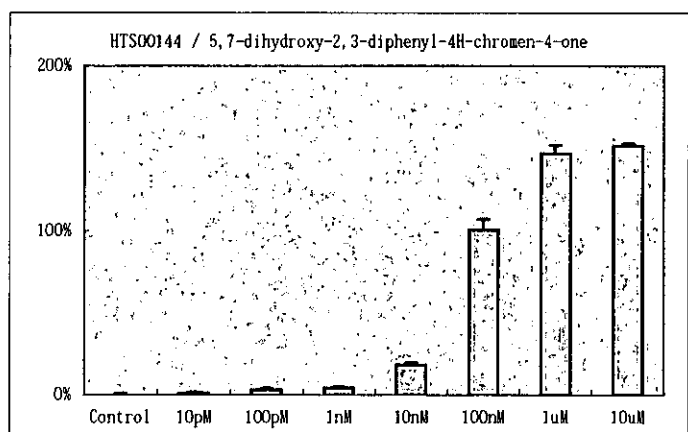
PC50 (pM): -



HTS00144

5,7-dihydroxy-2,3-diphenyl-4H-chromen-4-one

PC50 (pM): 2.44E+04

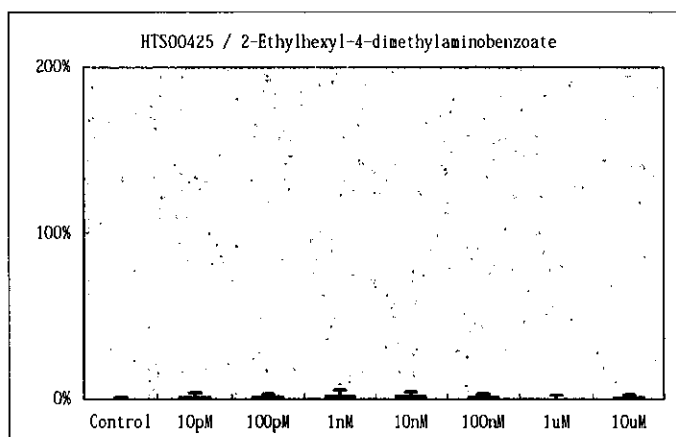


ER α /HeLa Agonist

HTS00425

2-Ethylhexyl-4-dimethylaminobenzoate

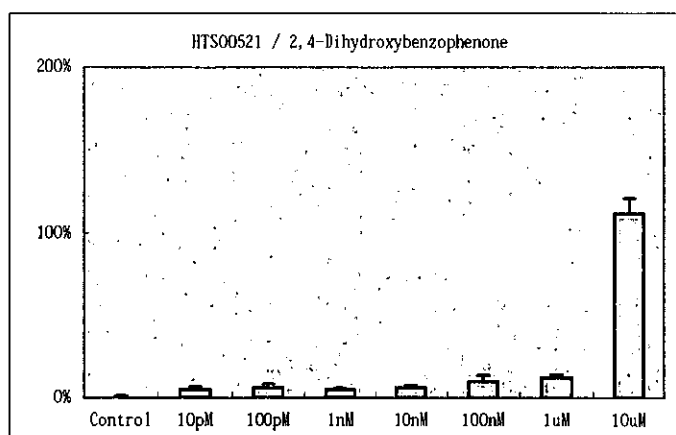
PC50 (pM): -



HTS00521

2,4-Dihydroxybenzophenone

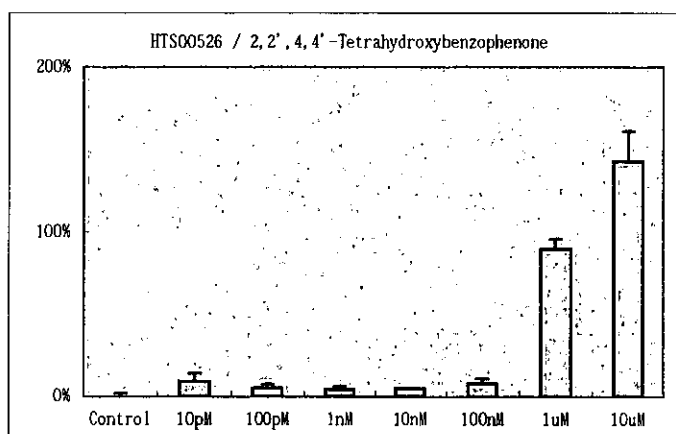
PC50 (pM): 2.41E+06



HTS00526

2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone

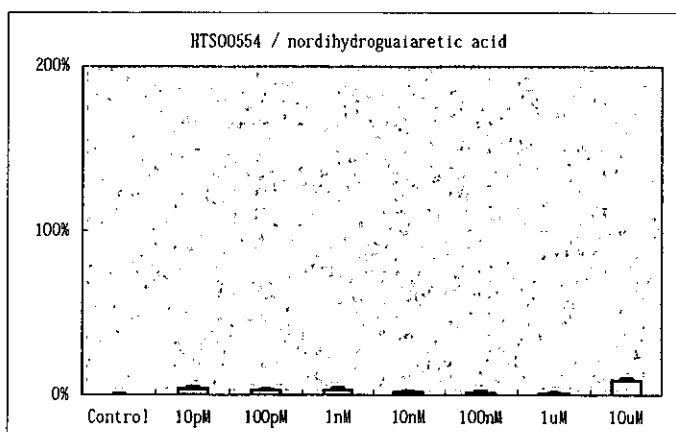
PC50 (pM): 3.28E+05



HTS00554

nordihydroguaiaretic acid

PC50 (pM): -

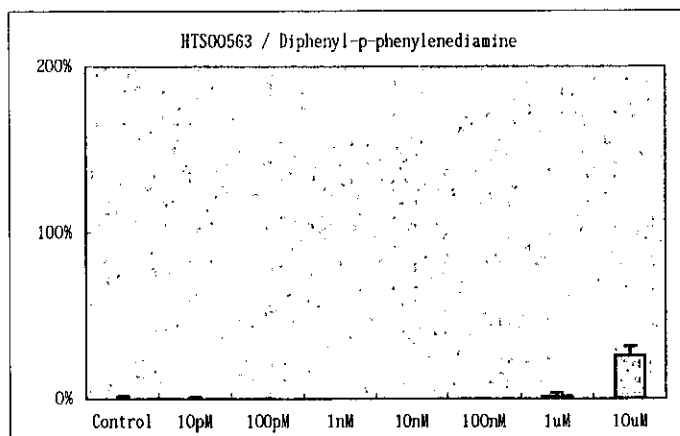


ER α /HeLa Agonist

HTS00563

Diphenyl-p-phenylenediamine

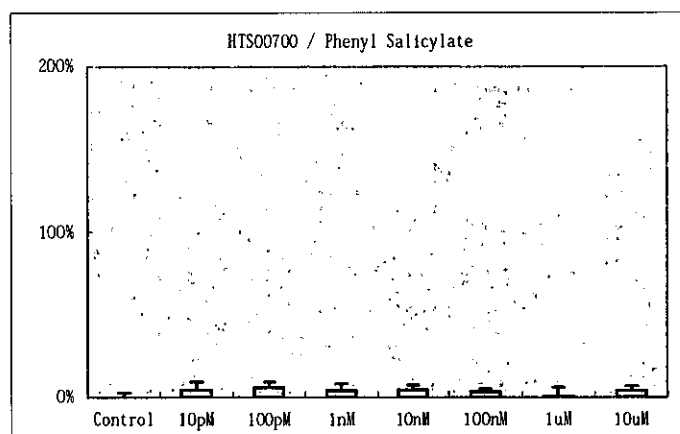
PC50 (pM): -



HTS00700

Phenyl Salicylate

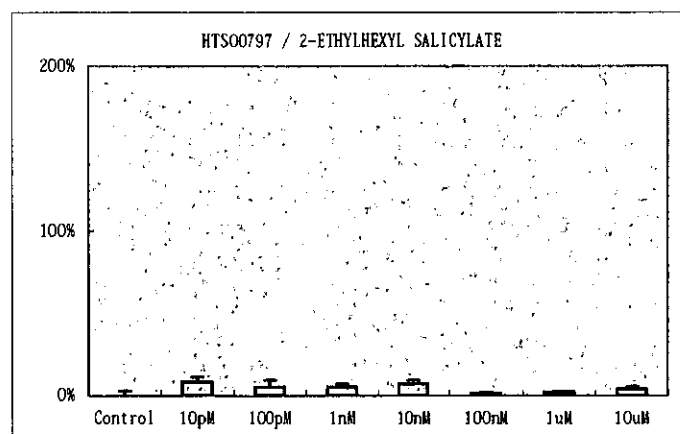
PC50 (pM): -



HTS00797

2-ETHYLHEXYL SALICYLATE

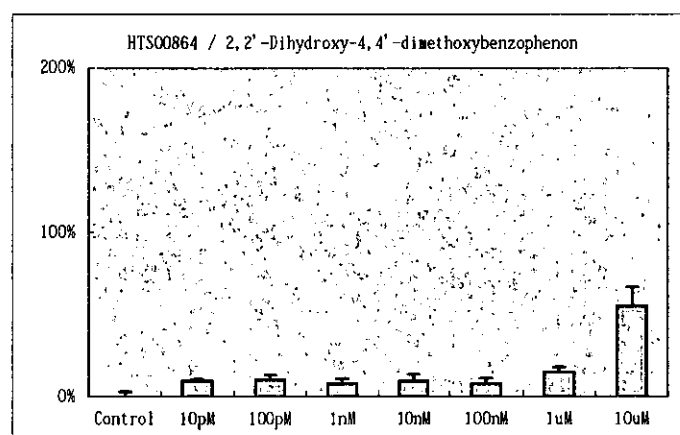
PC50 (pM): -



HTS00864

2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon

PC50 (pM): 7.62E+06

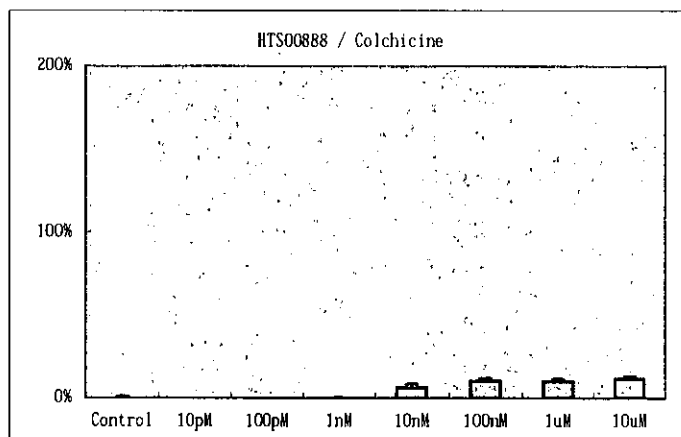


ER α /HeLa Agonist

HTS00888

Colchicine

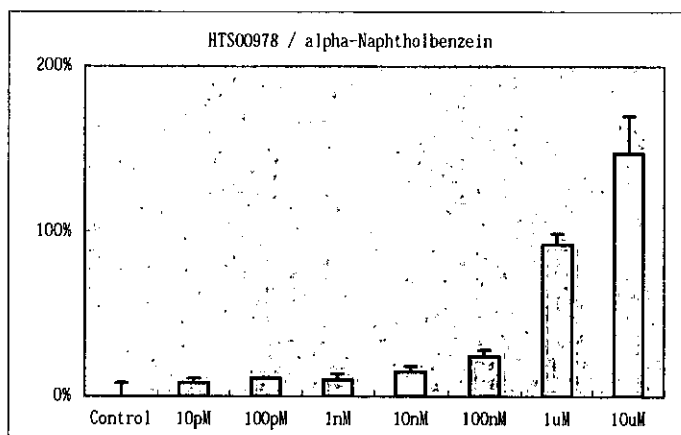
PC50 (pM): -



HTS00978

alpha-Naphtholbenzein

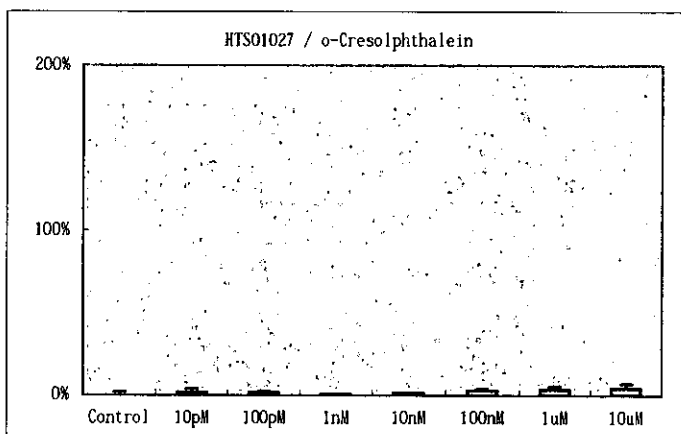
PC50 (pM): 2.43E+05



HTS01027

o-Cresolphthalein

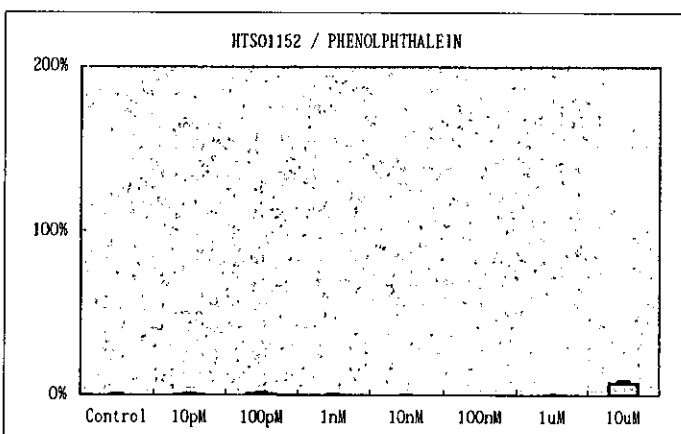
PC50 (pM): -



HTS01152

PHENOLPHTHALEIN

PC50 (pM): -

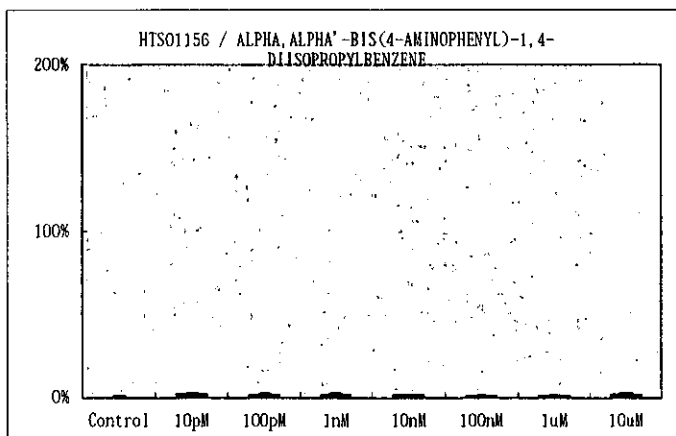


ER α /HeLa Agonist

HTS01156

ALPHA,ALPHA'-BIS(4-AMINOPHENYL)-1,4-DIISOPROPYLBENZENE

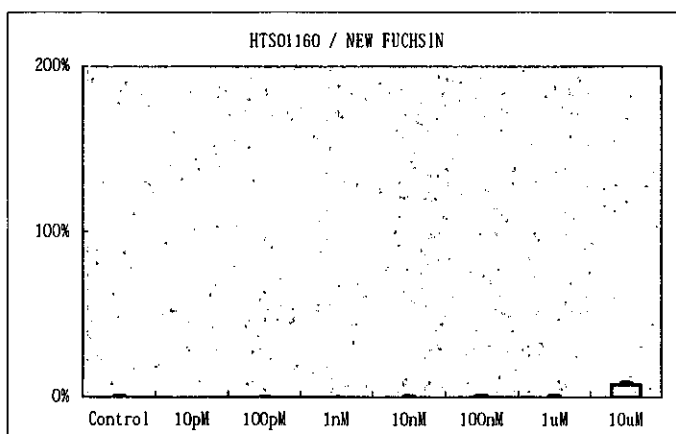
PC50 (pM): -



HTS01160

NEW FUCHSIN

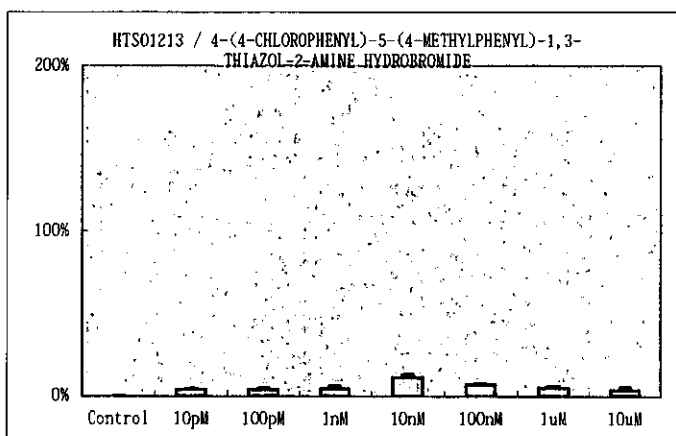
PC50 (pM): -



HTS01213

4-(4-CHLOROPHENYL)-5-(4-METHYLPHENYL)-1,3-THIAZOL-2-AMINE HYDROBROMIDE

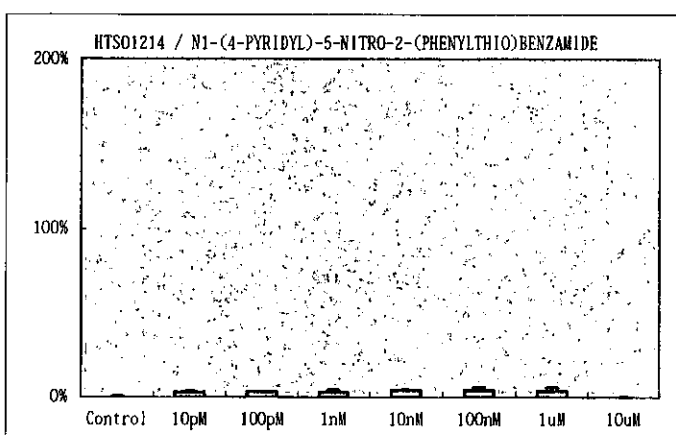
PC50 (pM): -



HTS01214

N1-(4-PYRIDYL)-5-NITRO-2-(PHENYLTHIO)BENZAMIDE

PC50 (pM): -

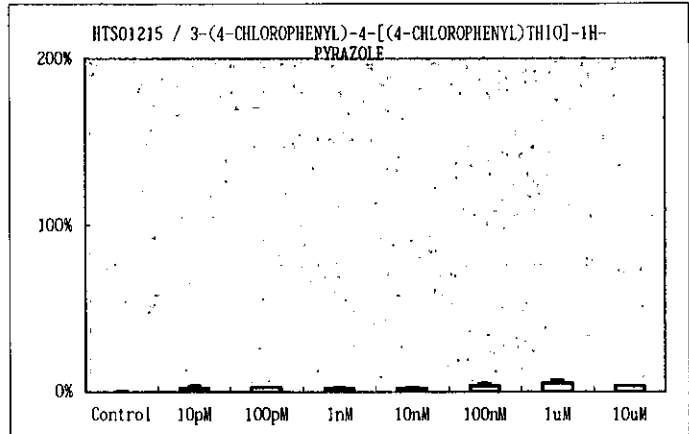


ER α /HeLa Agonist

HTS01215

3-(4-CHLOROPHENYL)-4-[(4-CHLOROPHENYL)THIO]-1H-PYRAZOLE

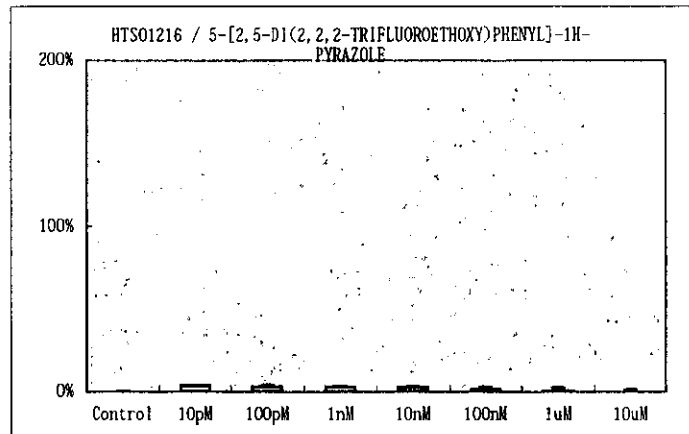
PC50 (pM): -



HTS01216

5-[2,5-DI(2,2,2-TRIFLUOROETHOXY)PHENYL]-1H-PYRAZOLE

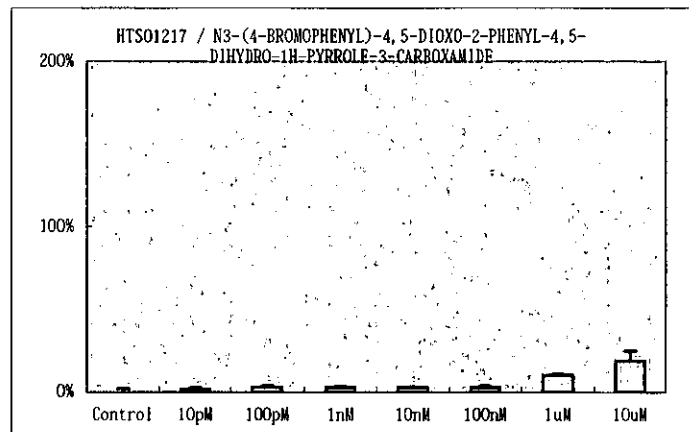
PC50 (pM): -



HTS01217

N3-(4-BROMOPHENYL)-4,5-DIOXO-2-PHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRROLE-3-CARBOXAMIDE

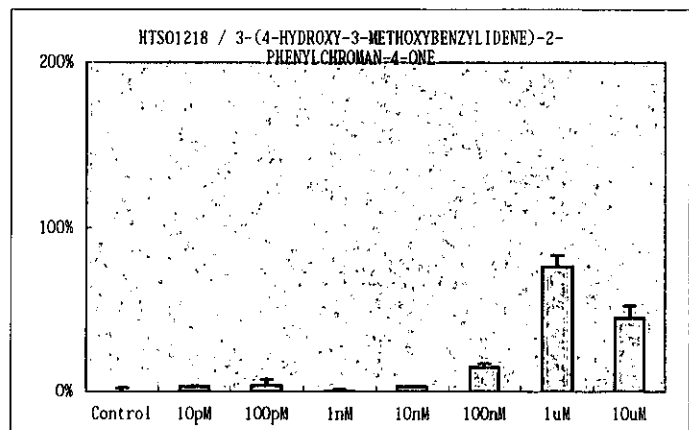
PC50 (pM): -



HTS01218

3-(4-HYDROXY-3-METHOXYBENZYLIDENE)-2-PHENYLCHROMAN-4-ONE

PC50 (pM): 3.78E+05

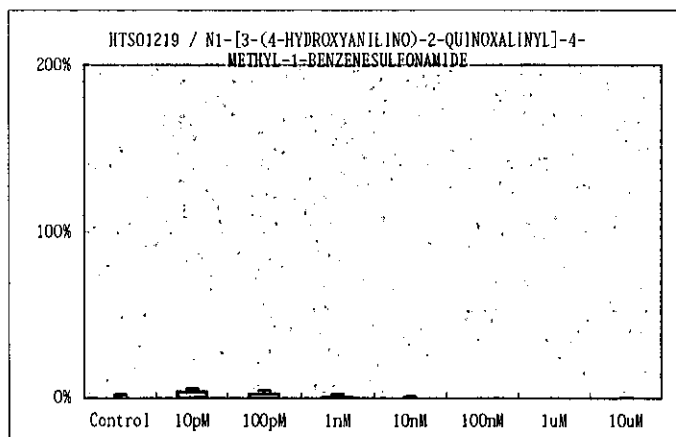


ER α /HeLa Agonist

HTS01219

N1-[3-(4-HYDROXYANILINO)-2-QUINOXALINYL]-4-METHYL-1-BENZENESULFONAMIDE

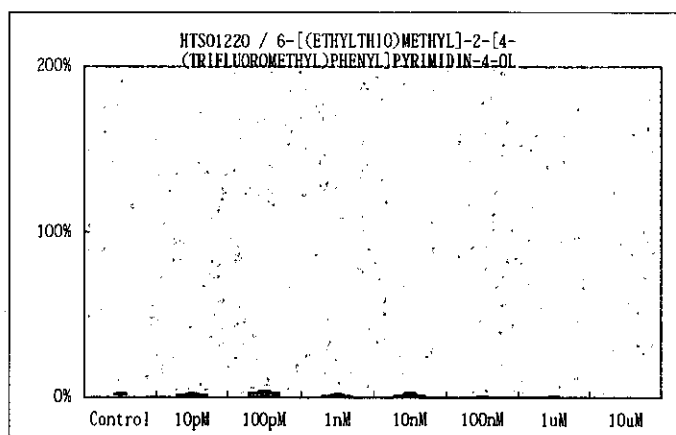
PC50 (pM): -



HTS01220

6-[(ETHYLTHIO)METHYL]-2-[4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]PYRIMIDIN-4-OL

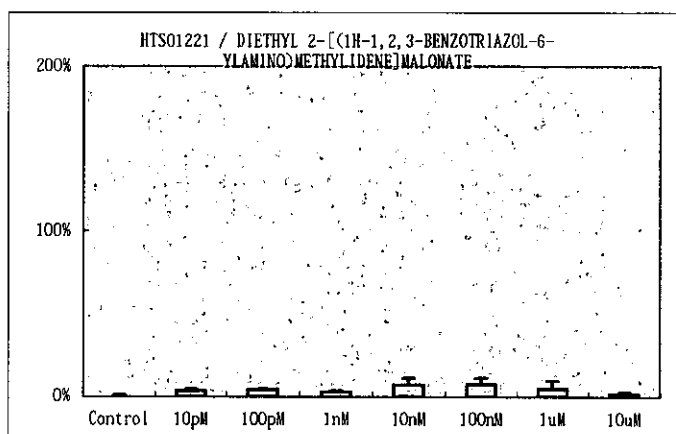
PC50 (pM): -



HTS01221

DIETHYL 2-[(1H-1,2,3-BENZOTRIAZOL-6-YLAMINO)METHYLIDENE]MALONATE

PC50 (pM): -



HTS01222

5-(3,4-DIMETHOXYPHENYL)-1,3-DIPHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE

PC50 (pM): -

