

200401234A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた
新しいハイ・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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 17(2005)年 4 月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 17(2005)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 139
- 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 143
- 小野 敦
3. 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価 157
- 板井 昭子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 175

IV. 研究成果の刊行物・別刷 177

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
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新しいハイ・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

研究要旨

本研究は、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」に沿って本研究に要求される優先順位付けにおける化学物質スクリーニングを目的として(1) 内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価、(2) 培養細胞系ハイスルー・プットスクリーニング(HTPS)による超高速分析法、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手法を用いた大規模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、核内受容体-リガンド結合性、受容体と応答 DNA 配列及び共役因子の相互作用と化学物質がその相互作用に及ぼす影響等に関する基礎的研究を進め、内分泌かく乱のメカニズムやリスクアセスメントへの有効応用を目指している。

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 β (ER β) ドッキングモデルを構築して約2万化合物の *in silico* スクリーニング計算を実施し、約 15,000 の物質について結合様式と結合強度の予測結果を得た。また、パスウェイスクリーニング系構築のため核内受容体リガンドにより変動する遺伝子のネットワーク解析により、幾つかの特徴的に変動するネットワークパターンが抽出された。(2) 培養細胞 HTPS 系では ER α 、ER β 系において各 100 化合物、TR、AR 系において各 50 化合物の測定を行った。(3) 表面プラズモン共鳴(SPR)HTPS 系においては、100 化合物について ER β 測定を実施した。またアポ型 ER と相互作用するペプチドを用いた測定系の開発を行った。

分担研究者

板井 昭子 株)医薬分子設計研究所
代表取締役
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

する必要がある。これまでに、米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を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、必要な改良を行うための研究を平成 10 年度に立ち上げ、エストロゲン受容体反応レポーター遺伝子導入細胞を用いた HTPS 系を構築し、63 物質 (350 測定) について試験を行った。その後の 3 年間の研究において、更に約 300 の化学物質に対する測定を行い評価系の検証を進めてきた。また一方で、ホルモン受容体の作用機構に基づく新規評価系として表面プラズモン共鳴高速分析 (Surface Plasmon Resonance High Through

A. 研究目的

我々の現代生活においては、膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質について、内分泌かく乱性の観点から緊急に再評価

Put Screening, SPR-HTPS)による上記ホルモン受容体と生体分子との相互作用の高速取得技術の開発を行い、無細胞系における化学物質の受容体への影響をリアルタイムで数値化(グラフ化)することにより、化学物質の受容体作用をその結合と解離の状況から明らかにしてきた。これらの情報は、受容体アゴニスト効果(作動)/アンタゴニスト効果(阻害)の予測に有効であることが示された。さらに共役因子等を系に加えることにより、詳細な機能の測定が可能であることも示された。一方、内分泌かく乱化学物質の標的受容体との相互作用を原子レベルで理論的に解析する *in silico* におけるドッキング解析法を確立し、これを用いた超高速スクリーニング法を開発した。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)の完成に寄与しており、内分泌かく乱問題の早期解決のためのさらなる評価系の検証とスクリーニングにあわせ内分泌かく乱メカニズムの解明が必要とされている。

本研究班の目的は、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」に沿って本研究に要求される優先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と評価、(2)培養細胞系ハイスループットスクリーニング(HTPS)による超高速分析法、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手法を用いた大規模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-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。

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)

化学物質の内分泌かく乱性について電算解析する手法の構築のため、これまで研究を進めてきた低分子化合物三次元化法並びに三次元データベ

ース検索法、さらに複合体エネルギー極小化計算法及び結合自由エネルギー解析法を応用して、内分泌かく乱作用未知の膨大な数の化学物質について、標的受容体に対する結合様式と、結合自由エネルギー値から導き出される相対結合能を推算することを目的とした。また新たに、近年データが蓄積されつつある遺伝子発現データをもとに作用未知または未確認の化学物質の内分泌かく乱による生体作用を簡易に予測するパスウェイスクリーニング系構築のため、主要なホルモン受容体リガンドである Ethynyl estradiol, Testosterone propionate, Levothyroxine をそれぞれ経口投与したマウス肝臓のトランスクリプトーム解析データをもとに、各ホルモンに対するリセプターによる発現パスウェイと、発現変動データによるホルモン特異的ネットワークの抽出を行った。

(1)-1 ER β ドッキングモデルによる、*in silico*大規模スクリーニング

今年度は、昨年度報告したER β との結合強度予測式を利用して、ER β に対する活性未知の化学物質について結合強度の予測を行った。独自に入手した約 58,000 化学物質リストの中から、正確な化学構造式が入手でき且つ実際の活性確認のための生化学的試験を実施し得る(すなわち入手可能な)約 20,000 化合物に絞り 17 β -エストラジオールに対する相対結合強度(RBA 値)の予測を行った。

1. ドッキングに使用する受容体立体構造の準備

ドッキング計算に使用する受容体立体構造は Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型 ER β のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ICI164384 が結合している結晶構造である 1hjl.pdb を使用した。PDB 中の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 で水素構造の最適化を行った後に 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を実行する際に必要な水素結合情報を割り振った。

2. ドッキングに使用する低分子立体構造の準備 結合強度予測計算に使用する化学物質は、

国立医薬品食品衛生研究所より提供された 58,591 の化学物質リストを対象とした。検討に先立って、化学構造式をチェックしたところ、明らかな構造式の誤りや立体構造の不備が目立った。我々の行うコンピュータスクリーニング計算においては化学物質の立体構造情報が非常に重要であり、間違った情報を使用した計算はまったく意味を持たないことから、市販化合物データベース(Available Chemicals Directory)を利用してデータの補完を行った。その結果、19,667 化学物質について、市販化合物データベースから立体構造情報を含む化学構造式が入手可能であった。これらの構造を低分子化合物三次元化プログラム Key3D(旧称 Olive)により、原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造に変換した。さらに自動ドッキングプログラム Adam を実行するために必要な水素結合情報、コンフォメーション探索時の結合回転情報や芳香族環の位置情報を付加した。

3. ER β と各低分子化合物のドッキング計算

タンパク質-リガンド自動ドッキングプログラム Adam を用いて各化学物質の複合体構造を推定した。続いて、複合体が得られた化学物質についてタンパク質-リガンド複合体構造最適化プログラム Bluto を使用して、複合体における構造最適化を行った。最後にタンパク質-リガンド複合体における結合自由エネルギー解析プログラム GenB 並びに複合体形成に伴う脱溶媒和評価プログラム Desolv を用いて複合体安定化に寄与すると考えられる各種エネルギー項の計算を実行した。

4. 結合強度予測方法

logRBA の推算には昨年度検証した以下の式を使用した。

$$\log RBA(ER\beta) = -1.495GBelc - 0.401GBrep - 0.205GBcnf - 0.132Desolv - 4.049 \quad (1)$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Desolv: 結合自由エネルギー計算で算出される各エネルギー項

GBelc: GenB で計算される分子間静電相互作用

エネルギー

GBrep: GenB で計算される分子間立体相互作用エネルギー

GBcnf: GenB で計算されるリガンドの結合に伴う回転結合自由度の束縛効果

Desolv: Desolv で計算されるリガンド、蛋白双方の複合体形成に伴う脱溶媒和

(1)-2 遺伝子発現ネットワーク解析による、核内受容体制御パスウェイの抽出

1. ER, DHTR, TR 及びこれらに直接制御される分子群のパスウェイの抽出

解析ソフトとして KeyMolnet を用い“ER による発現調節”、“DHTR による発現調節”、“TR による発現調節”により、各々の転写因子と発現調節される分子の文献情報からの関連パスウェイを得た(KeyMolnet では蛋白質を中心とするネットワークを生成でき、転写制御の関係においては基本転写因子群の系をスキップして表している)。次に、“ER による発現調節”、“DHTR による発現調節”、“TR による発現調節”の 3 つの転写因子とそれらに直接制御される分子群をマージさせて抽出し、さらに既知または未知のホルモンに対して、これらの転写因子により直接発現制御を受ける遺伝子の発現量の変動の解析を行った。

2. 発現データのトランスクリプトーム解析

マウスに Ethynyl estradiol; 1, 3, 10(mg/kg) Testosterone propionate; 1, 3, 10 (mg/kg), Levothyroxine; 1, 3, 10 (mg/kg) をそれぞれ経口投与し、2, 8, 24 時間後の肝臓における遺伝子発現データを入手し、ネットワークを生成した。

3. トランスクリプトーム解析とホルモン特異的ネットワークの構築

1) 各ホルモンに対し、それぞれの時間において、投与量 0 をコントロールとして発現亢進した分子を端点として周辺検索法 1 によりネットワークを生成する。

2) 各ホルモンに対し、この中で変動の認められた実験セットに対するネットワークの共通部分を AND

論理演算法 2 により抽出し、3 種のホルモンに対するネットワークを抽出する。

3)さらに DIFF 演算法 3 によりホルモン特異的に活性化しているネットワークを抽出する。

1 周辺検索法:指定した端点の上下流の周辺の分子リレーション(分子-分子の関係)を辿ってネットワークを生成する方法

2 AND 論理演算法:複数のネットワークの共通部分を抽出する方法

3 DIFF 演算法:複数のネットワークの差分を抽出する方法

(2)培養細胞系ハイスループットスクリーニング(HTPS)による超高速分析法

(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委託業務)

近年、化学物質の持つ有害作用の中で動物の生殖機能に影響を与えることが懸念される毒性影響、いわゆる内分泌かく乱化学物質(EDs)問題が注目を集めている。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いる。米国では環境保護庁(EPA)の諮問機関として1996年に設置されたEndocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC)では現在使用されている化学物質の内分泌かく乱能力を評価するためのフロースキームを提案し、ポリマー及び年間生産量が10000ポンドを下回る化学物質を除く約15000種の化学物質についてHigh Throughput Prescreening (HTPS)を行い、内分泌かく乱作用について優先順位を付けた上で齧歯類子宮増殖試験、Hershberger 試験等の高次 Screening 試験へ移行し化学物質の持つ内分泌かく乱作用を明らかにしていく方針を示した。本年度は Firefly Luciferase 遺伝子の5'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 alpha 又は ER beta を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に一過性に導入されたヒト由来の細胞(HeLa cell)を使用し、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100物質の測定を実施した。

1. 試薬の調製

1) 化合物原液の調製

各化合物を秤量した後、10mM となるように Dimethyl sulfoxide(DMSO、ナカライテスク)を加えて溶解した。10mM に調製した化合物は DMSO にて 1/10 希釈を行い 1mM 100µM, 10µM, 1µM, 100nM, 10nM 及び 1nM とした。化合物は終濃度が 10µM, 1µM, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM 及び 1pM となるように EMEM-10%FBS 培地に添加した。

2) 細胞

ヒト子宮頸ガン由来細胞株 HeLa (ATCC No. CCL-2.1)を ATCC より購入し使用した。

3) プラスミド

i) 女性ホルモンレセプター(ER)発現プラスミド

当機構にてクローニングしたヒト ER alpha coding cDNA 全長(Genbank Accession No. M12674)及びヒト ER beta coding cDNA 全長(Genbank Accession No. AB006590)を哺乳動物細胞用発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen)に導入し作製した hER α /pcDNA3.1 及び hER β /pcDNA3.1 (図 1)を使用した。

ii) レポータープラスミド

当機構にてクローニングした Rat alpha2u-globulin (AUG)遺伝子のプロモーター配列の一部を pGL3 basic vector (Promega)のマルチクローニングサイトに導入し、更にアフリカツメガエル Vitellogenin 由来のエストロゲン応答配列(ERE)の3回連続繰り返しからなる合成オリゴヌクレオチドをプロモーター配列の上流に組み込み作製した ERE-AUG-Luc+ (図 1)を使用した。

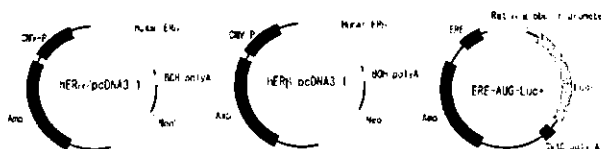


図 1 本研究に用いた受容体発現プラスミドおよびレポータープラスミド

3) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地(イーグル MEM ニュッスイ) 4.7g、10% 炭

酸水素ナトリウム(10g→100mL) 9mL 及び 3% L-グルタミン(3g→100mL) 6mL に精製水を加えて 500mL とした (EMEM 基礎培地) 後、Dextran coated charcoal(DCC)処理した牛胎児血清(FBS) 56mL を加え、ろ過滅菌した。

4) 細胞溶解剤

5x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR、プロメガ株式会社) 10mL に精製水を加えて 45mL とした。

5) Luciferase Assay Reagent の調製

Luciferase Assay Substrate (プロメガ株式会社) の容器に Luciferase Assay buffer 105 mL 全量を直接加えて溶解した。

2. ER α 及び ER β agonist 検出系

1) Assay プレート上のサンプル配列

以下の plate format に従い、自動試薬分注装置 (Biomek 2000、Beckmann-Coulter 株式会社) を用いて化学物質の添加を行った。

* 被験物質及び陽性対照物質は、下図の配置例に従って Microplate の各 well に添加する。

	化合物1			化合物2			化合物3			化合物4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aa	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ab	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ad	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ae	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
af	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ag	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ah	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ai	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aj	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ak	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
al	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
am	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
an	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ao	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ap	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aq	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ar	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
as	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
at	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
au	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
av	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aw	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ax	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ay	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
az	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ba	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bb	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bc	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bd	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
be	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bf	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bg	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bh	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bi	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bj	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bk	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bl	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bm	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bn	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bo	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bp	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bq	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
br	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bs	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bt	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bu	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bv	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bv	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bw	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bx	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bx	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
by	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
by	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
by	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bz	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bz	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bz	100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2) 測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

↓ 細胞を測定用の 96well プレートに播種 (104/50 μ L/well)

↓ 培養一晚(12 時間以上)

↓ Transfection 液調製

FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) 20 μ L

発現 Plasmid 2 μ g, レポーター-Plasmid 8 μ g

無血清培地 580 μ L

↓ 15 分間静置

↓ total 1 mL になるよう無血清培地添加

↓ 各 well に 50 μ L ずつ添加

↓ インキュベータ内 2 時間静置

↓ 化合物の添加(終濃度 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM 及び DMSO 各 n=3 又は n=6)*

↓ CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)

↓ 培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L \times 2 回)

↓ 細胞溶解剤の添加(15 μ L/well)

↓ 10 分間室温で静置

↓ ルミノメータによる発光測定

注入量 : 50 μ L/well

測定時間: 注入 1 秒後~5 秒間(100 msec \times 50 interval)の積算

3) 結果の解析:

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で差し引いた後、陽性対照区の平均値(通常、誘導活性がプラトーに達する 1 nM 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、図 2 で定義される陽性対照区の最大転写活性化倍率 (通常 1 nM 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。

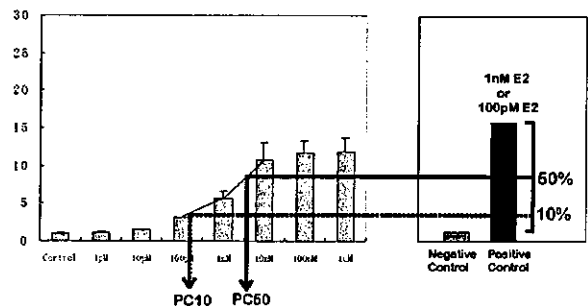


図 2 DATA 処理法模式図(PC10, 50 の定義)

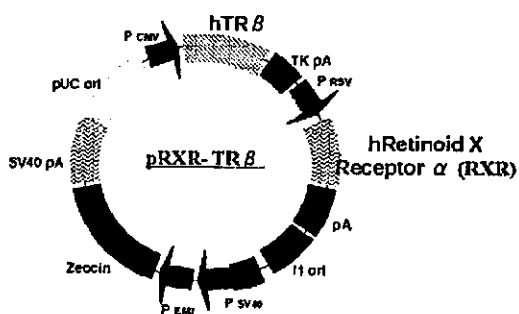
(2)-2 レポーター遺伝子導入培養細胞株を用いた TR、AR 作用物質超高速分析法に関する試験研究 (主任研究者: 大塚製薬ライフサイエンス事業部 EDC 分析センター委託業務)

性ホルモン受容体の一つであるアンドロゲン受容体(AR)と甲状腺ホルモン受容体(TR)についてルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしたレポーター遺伝子アッセイ法を開発し、この実証研究の一環として、AR 及び TR に対するアゴニスト及びアンタゴニスト活性を各々 50 物質について測定した。

AR レポーター遺伝子アッセイ法は、ヒト AR と蛍光ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミド、及び細胞毒性評価の指標となるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞“AR-EcoScreen™”を用いた。TR レポーター遺伝子アッセイ法は、ホルモンレセプターとして TR- β を RXR と共発現させ、DR-4 のレスポンスエレメントを持つレポータープラスミド及び細胞毒性の指標としてのウミシイタケルシフェラーゼを恒常発現するプラスミドを組み合わせた一過性発現系を用いた。

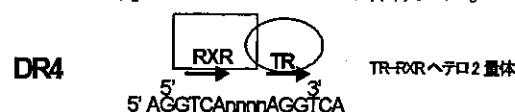
1. 受容体発現ベクターの構築

Androgen Receptor (AR) はそれぞれヒト胎盤 cDNA ライブラリー及びヒト前立腺 cDNA ライブラリーより RT-PCR 法にて増幅しクローニングベクターにサブクローニングして塩基配列を確認した後 pZeoSV2 (Invitrogen) にクローニングして AR 発現ベクター (pZeoSV2AR) とした。RXR 発現ベクターは、ヒト RXR α が組み込まれている pVgRXR (Invitrogen) から CMV プロモーター制御下の VgEcR (エクジソン受容体) 部分を除去し、ヒト TR β 1 の遺伝子を組み込み、TR β と RXR の 2 種類の受容体を共発現するベクター (pRXR-TR β) を構築した。



2. ルシフェラーゼレポータージーン構築

AR レポータージーンは、pIND- hygro (Invitrogen) からホルモンレスポンスエレメントを切り出しマルチクローニングサイトに蛍光ルシフェラーゼ遺伝子を組みこんだ pIND MCS-LUC(1) に AR 応答エレメント C3gene : AGTACGNNNTGTTCT (1) 4 つを同じ向きに導入し、マルチクローニングサイトにルシフェラーゼ遺伝子を導入して pIND ARE B-10 を作製し実験に供した。TR レポータージーンに用いる甲状腺ホルモン受容体応答性エレメント (TRES) は、RXR とヘテロダイマーを形成して作用すると考えられている DR-4 を用いた。AR レポータージーンと同様に pIND MCS-LUC に DR-4 エレメントを 4 個導入し、pIND-TRE-DR-4 を作成した。



3. 細胞毒性評価用ルシフェラーゼ恒常発現ベクター

被検化学物質が及ぼす細胞毒性評価のための指標としてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター pRL-TK (Invitrogen) を用いた。

4. アンドロゲンレスポンスシブルなレポーター遺伝子アッセイ機能を持つ安定細胞系の構築

6 ウェルのプレートに培養した 50% コンフルエントな CHO-K1 細胞に 0.04 μ g の pZeoSV2AR、1.0mg pINDAREB-10、1.0 μ g pRL-TK (1:25:25 の比率) でトランスフェクションする。24 時間後、細胞をトリプシン処理し、10cm のシャーレに播種する。200 μ g/mL の Zeocin と Hygromycin を加えた Medium でコロニーが成長するまで培養する。(約 10 日間) その後 10⁻⁸M の 5 α -ジヒドロテストステロン (5 α -Dehydrotestosterone; DHT) とルシフェリンを加えルシフェラーゼ陽性クローンを CCD カメラで選択する。細胞を増やした後、さらに 96 ウェルプレートに 1 cell/well の割合で播種し、前述と同様にクローニングを行う。これらの操作で選び出されたクローンの内、ウミシイタケルシフェラーゼを安定に発現し、さらに蛍光ルシフェラーゼ誘導活性の高さと安定性に優れた 1 つのクローン (AR-EcoScreen™) を選抜し実験に供した。

5. アンドロゲン受容体アゴニスト測定の手順

AR-EcoScreen 細胞を 1×10^5 cell/mL の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 90 μ L/well で播種する。このときの培養メディウムは Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal Dextran treated FCS (Hyclone) を用いる。翌日(約 20 時間後) 10⁻⁵M から 10 倍希釈したサンプル調整液、及び標準物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェルに 10 μ L 加え CO₂ インキュベータでさらに培養する(約 20 時間)。翌日、ルシフェリン溶液(Steady-GloTM: Promega)を加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解せしめ、ルシフェラーゼ誘導活性をで発光強度として測定した。蛍光及び発光測定は ARVO.sx multilabel counter(Wallac Berthold)を用いた。

6. アンドロゲン受容体アンタゴニスト測定の手順

アゴニスト測定と同様に AR-EcoScreen 細胞を播種する。翌日(約 20 時間後) サンプル及び標準物質をプレートフォーマットに従って調製する。このとき、最終希釈メディウムに終濃度が 5×10^{-10} M となるように 5α -dihydrotestosterone (Wako) (DHT) を加えておく。10⁻⁵M から 10 倍希釈したサンプル調整液を AR-EcoScreen 細胞に 10 μ L 加え CO₂ インキュベータでさらに培養する(約 20 時間)。翌日、蛍ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (Dual-GloTM: Promega) をマニュアルに従って加え、各ステップで約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。

7. 一過性発現系を用いる TR レポータージーンアッセイ

CHO-K1 細胞を 1×10^5 cell/ml の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 84 μ L/well で播種する。このときの培養メディウムは Phenol Red Free D-MEM/F12(GibcoBRL), 5% Charcoal Dextran treated FCS (Hyclone)を用いる。翌日、TR アゴニストアッセイにはプレート 1 枚あたり、pTR-b-RXR 3.1mg, pIND-TRE-DR4 3.1mg, pUC-18(トランスフェクション量の調整に用いるためのベクター) 6.2mg を希釈トランスフェクション試薬) (FuGene (ロッシュ) 18.6 ml を Medium(血清無添加) 620ml で希釈したも

の)に加え 96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6ml ずつ添加し、CO₂ インキュベータで培養する。TR アンタゴニストアッセイには pTR-b-RXR 3.1mg, pIND-TRE-DR4 3.1mg, phRL-TK 6.2mg pUC-18 3.0mg のプラスミド Mix を同様に用いる。培養 3 時間後にサンプル及、標準物質及び各コントロール物質をプレートフォーマットに従って各ウェル 10 μ L 加え CO₂ インキュベータでさらに培養する(TR アンタゴニストアッセイの場合全てのサンプルに終濃度が 5×10^{-8} M となるように T3 を加えておく。この濃度はルシフェラーゼを最大に誘導する活性の約 70%に相当する)。翌日、蛍ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (アゴニストアッセイは Steady-GloTM アンタゴニストアッセイは Dual-GloTM: Promega) をマニュアルに従って加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。蛍光及び発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

(2)-3 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)

世界保健機構化学物質安全計画(WHO/IPCS)、経済協力開発機構(OECD)、欧州連合内分泌かく乱化学物質委員会(EU-EDC)、国際代替法研究センター(ECCVAM)などの国際組織や、米国トキシコロジー学会、韓国トキシコロジー学会、さらに国際トキシコロジー学会連盟などにおけるこの課題での研究の進展状況を国際会議への出席、関連研究機関への訪問などにより、関連情報の収集にあたる。

(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研究(主任研究者:ピアコア株式会社委託業務)

本研究では、化学物質のホルモン作用を迅速に評価する高速一次スクリーニング法の開発研究を

行っている。表面プラズモン共鳴センサーを用いて、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法を開発している。これまでに、表面プラズモン共鳴センサーBiacore®を用いて、 α 型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2種類開発した。すなわち、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(ERE アッセイ)と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(TIFアッセイ)の2種類である(図1)。今年度は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、 β 型エストロゲンレセプターを用いたアッセイをHTPS化した。結合分子には昨年度までのERE、TIFにCathepsin DのERE塩基配列を追加し(AOアッセイ)、3つのアッセイを同時に実施した。100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。

1) 化学品の調整

- ① 0.1Mとなるように100% DMSOに溶解する。
- ② ①のストック溶液を10倍ずつ4段階の濃度に100% DMSOで希釈する。
- ③ 4段階の希釈サンプルを4mL ガラスバイアルに入れ、 -30°C で保存。

2) 表面プラズモン共鳴高速分析法

使用機器: Biacore® 3000 (Biacore 社)

センサーチップ: ストレプトアビジンを固定化したセンサーチップ SA (製品コード番号 BR-1000-32, Biacore 社) を使用。

ランニングバッファー: 25mM Tricine, 160mM KCl, 5mM MgCl_2 , 0.05% Tween20 (pH 7.8)

再生溶液1: 100mM NaOH, 再生溶液2: 25mM HCl

エストロゲンレセプター($\text{ER}\alpha$): Estrogen Receptor - alpha human recombinant (P2187, PANVERA 社)

- ① 化学物質を含む DMSO 溶液 $1\mu\text{l}$ を $500\mu\text{l}$ のランニングバッファーで希釈する。
- ② ER を 80nM となるようにランニングバッファーで希釈する
- ③ ①、②の溶液を $40\mu\text{l}$ ずつサンプルチューブに取り、 37°C 、5 分間加温後、 4°C に冷却した Biacore 3000 のサンプルラックに乗せる。
- ④ ③のサンプルを SA センサーチップにインジェクトする。流速: $20\mu\text{l}/\text{min}$ 。結合2分間、解離2分間の kinject mode を使用。
- ⑤ 再生溶液1を 13 秒間インジェクト、次に再生溶液2を 5 秒間インジェクトしてセンサーチップを再生する。

3) ERE アッセイ

センサーチップに固定化するリガンドにはビテロジェニンの ERE 配列を含む 5' 末端 をビオチン化した 34 mer の合成オリゴマーを用いた。このオリゴマーをセンサーチップのフローセル 2 番に固定化し、アンチセンス ERE をハイブリダイズさせた。

biotin-sense ERE:

5'-biotin-tcgagcaaaagtcaggtcacagtgacctgatcaat-3'

antisense ERE:

5'-attgacaggtcactgtgacctgactttgctcga-3'

ビオチン化 ERE を固定化するために、まずストレプトアビジン(SA)が既に固定化されているセンサーチップ SA を Biacore3000 本体にセットして、測定用緩衝液を用いてシステム全体の平衡化を行った。約7分の平衡化後、ベースラインの安定性を得るために実際の測定で用いる2種類の再生溶液である 100mM NaOH、25mM HCl をそれぞれ 30 秒間、5 回ずつ添加してベースラインが安定したことを確認した後にビオチン化 ERE の固定を行った。まず、1mg/ml のビオチン化 ERE を測定用緩衝液で 10,000 倍に希釈して、その $100\mu\text{l}$ を 105°C で 5 分間加熱した後、急冷し直鎖化を行った。これをサンプルラックにセットし、結合量を観察しながらセンサーチップに約 200 レゾナンスユニット(RU)固定した。その後、ビオチン化 ERE が結合していないストレプトアビジンをブロックするために $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチンを 30 秒間、2 回添加した後に再度 100mM NaOH、25mM HCl をそれぞれ 30 秒間、5 回ずつ添

加して相補鎖 ERE を解離させて、センサー表面のコンディショニングを行った。アッセイの各サイクルの始めに相補鎖 DNA のアニーリング反応を行う。すなわち、1mg/ml のストック溶液を測定用緩衝液で 100 倍に希釈し、ビオチン化 ERE と同様に直鎖化処理を施した相補鎖 ERE をビオチン化 ERE を固定化したフローセル 2 に 2 分間添加し、二本鎖 ERE を形成させる。この反応直後の結合シグナルを測定することにより、二本鎖 DNA の形成量を確認する。ERE の二本鎖を形成したフローセルに前項 2) に記述した手順で ER を添加し、ER の ERE への結合量を測定する。ER の結合、解離をそれぞれ 2 分間観察した後、再生溶液 1、2 を順次添加して、相補鎖 DNA を解離させ、ビオチン化 ERE のみの状態に戻す。再生反応後のベースラインのシグナルを測定し、ER 及び相補鎖 DNA が完全に除かれているかどうか、さらにビオチン化 DNA が失われているかどうかを確認する。

4) TIF アッセイ

ER の遺伝子発現コファクターとして機能することが知られている TIF2 の 3 つの LxxLL モチーフ (NR box) のうち第 2 モチーフを含む合成ビオチン化ペプチド (KEKHKILHRLQLD) を用いた。このペプチドをセンサーチップのフローセル 3 番に約 300RU 固定化した。相互作用反応のすべての条件は ERE アッセイと同じ条件で設定した。

5) AO アッセイ

ヒト cathepsin D 遺伝子プロモーター領域のエストロゲンのレスポンスエレメント周辺配列を含む合成オリゴヌクレオチド 5'-TTCGAGGGGGCCGGGCTGACCCGGAGCGGAAGCTCTGCTCGACGGATT-3' をあらかじめ相補配列 5'-CCGCTCCGGGTCAGCCCGGCCCTCGAA-3' とアニーリングさせた後、ストレプトアビジンをコートしたセンサーチップに固定化したアダプターオリゴヌクレオチド 5'-Biotin-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' に約 220RU 程度ハイブリダイズして用いた。相互作用反応のすべての条件は ERE アッセイと同じ条件で設定した。

6) 化学物質の 3 アッセイ同時スクリーニング

化学物質毎に 4 段階の濃度で ERE アッセイ、TIF アッセイ及び AO アッセイを行い、ER の結合について濃度依存的活性化作用の有無を調べた。センサーチップのフローセル 1 番にはリガンド分子を何も固定化せずブランクコントロールとして用いた。2 番目のフローセルに ERE、3 番目のフローセルに TIF、4 番目のフローセルに AO を固定化し、あらかじめ化学物質とインキュベートした ER 溶液を各フローセルに 1→2→3→4 と連続的に添加し、各々のフローセルで相互作用を同時に測定した (図 2)。ERE アッセイについてはフローセル 2 のセンサーグラムからフローセル 1 のブランクコントロールのセンサーグラムを差引いたセンサーグラムを用いてデータを解析した。同様に TIF アッセイについてはフローセル 3 からフローセル 1 を差引いたセンサーグラムを、AO アッセイについてはフローセル 4 からフローセル 1 を差引いたセンサーグラムを用いた。

時間経過による ER の結合活性低下の影響を補正するために、化学物質毎に 1 セットのスクリーニングの最初と最後に ER に 100nM 17β エストラジオール (E2) を加えたポジティブコントロール、DMSO (終濃度 0.1%) のみを加えたネガティブコントロールの試料を測定した。1 セットのスクリーニングは下記のような構成となる。

- サイクル 1 ポジティブコントロール
- サイクル 2 ネガティブコントロール
- サイクル 3 対象化学物質 100nM (10^{-7} M)
- サイクル 4 対象化学物質 1μM (10^{-6} M)
- サイクル 5 対象化学物質 10μM (10^{-5} M)
- サイクル 6 対象化学物質 100μM (10^{-4} M)
- サイクル 7 ポジティブコントロール
- サイクル 8 ネガティブコントロール

1 回目と 2 回目のポジティブコントロール及びネガティブコントロールの結合量からサイクル毎の ER 結合活性の低下率を求め、これから各サイクルでのネガティブコントロール及びポジティブコントロールの推定結合量を算出し、この値をもとに以下の式で得られる相対活性化度 (% activation) を求め、化学物質の濃度との相関を解析した (図 3)。

% activation = (化学物質存在下の結合量 - ネガティブコントロール結合量) / (ポジティブコントロール

結合量-ネガティブコントロール結合量) x 100

溶解性の低い化学物質については一桁低い濃度シリーズ(10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M)で測定を行った。

(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)

本研究では、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、表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー(BIAcore™)を用いて、化学物質のERへの結合がERと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、新たに甲状腺受容体(TR)についてこれまで構築したER α 、 β 測定系と同様にレスポンスエレメント及び共役因子とのリガンド結合による相互作用変化について解析を行いスクリーニング系への応用について検討を行うとともに、ER系についてはアポ型ERを特異的に認識するペプチドをプローブとすることで、化合物の受容体作用についてこれまでと異なる観点から評価する測定系を構築しハイスループットアッセイとしての有用性について検討した。

1. ERE固定センサーチップの作成

EREオリゴヌクレオチドは、アダプター法にてセンサーチップに固定化した:すなわちストレプトアビジンをあらかじめコーティングしたセンサーチップを用い、ビオチン化アダプター一本鎖オリゴヌクレオチドを固定化し、アダプター相補配列を突出末端として付加したEREを含む二本鎖オリゴヌクレオチドをインジェクトしてハイブリダイゼーションによりセンサーチップ上に固定化した。プローブの交換には、50mM NaOHでアダプターオリゴを一本鎖化して再びEREオリゴをflowして固定化した。

2. ペプチド固定化センサーチップの作成

N末端をビオチン化したペプチドを合成し、測定

用バッファーに希釈してストレプトアビジンセンサーチップにインジェクトすることにより固定化して測定に用いた。ER-コファクター相互作用を検討するにあたっては、ERによる遺伝子発現においてコファクターとして機能することが示されているTIF2のER結合サイト(LxxLLモチーフ)をコードするオリゴペプチドを合成して用いた。TIF2は3つのLxxLLモチーフを有するが、実験では第2モチーフを用いた。また、アポ型受容体を認識するペプチドとしては、文献情報をもとに合成した数種のシークエンスについて検討し、最適な結合の得られたap01ペプチドを測定に用いた。

3. 相互作用の測定

ERは、リコンビナントHuman ER α 及び β を使用した。ERを測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.05% Tween 20、BSA 5 μ g/ml、TCEP 5nM)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解析にあたっては、化合物を 10^{-5} ~ 10^{-8} Mの濃度範囲で10nM 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。

4. 解析

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。解析には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))を用いた。

C. 研究結果

(1) 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価

(1)-1 ER β ドッキングモデルによる、*in silico*大規模スクリーニング

1. 低分子化合物の三次元化

国立医薬品食品衛生研究所より提供された 58,591 化学物質リストのうち、正確な構造式が入手できた 19,667 化学物質の三次元構造への変換を行った(三次元化にはプログラム Key3D を使用)。その際、力場パラメータ不足等により三次元化できなかった化合物が 77 化合物あった。これらのほとんどは無機化合物であった。ラジカルや金属イオン等の計算に適さない原子を含む分子並びに1分子当たりの構成原子数が 200 原子より多い分子等を変換時に除外し、最終的に 17,744 化学物質について原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造が得られた。

2. ER β との結合様式の探索

プログラム Adam を用いて ER β とのドッキング計算を行った。受容体とリガンド間のマッチングの足がかりに利用する水素結合可能な原子(酸素、窒素)や芳香族環を全く含まないもしくは1分子中の回転可能結合数が規定以上である等の理由により計算実行困難な化学物質が 2,198 分子含まれていたがこれらは計算の対象外とした。残りの 15,546 分子について結合様式探索を実行した結果、15,287 の化学物質について ER β との複合体構造が得られた。

3. 結合活性値の予測

Adam で用いるエネルギー値は格子点を利用して概算されている。そこでプログラム Bluto により、Adam で得られたすべての複合体構造それぞれについて、リガンド結合キャビティを構成している全てのアミノ酸残基と各リガンドとを対象とした複合体でのエネルギー極小化計算を実行した。ついでプログラム GenB, Desolv によるエネルギー解析によって得られた各エネルギー項をもとに ER β に対する結合活性値を予測した。予測された結合活性値の上位 1000 化合物についてその CAS 番号と推定活性値を表1.に示した。

(1)-2 遺伝子発現ネットワーク解析による、核内受容体制御パスウェイの抽出

1. ER, DHTR, TR 及びこれらに直接制御される分子群のパスウェイにおける各ホルモンに対する

遺伝子発現の変化

採用するデータとして p 値を 0.05 未満、log ratio が 1 以上(コントロールと比較して2倍以上発現亢進)の分子を抽出したところ、分子数が少なかつたため、閾値を下方に設定し直し、log ratio が 0.75 以上とした。ここで、Testosterone propionate に対して発現亢進する分子数の推移に傾向は認められなかったが、Ethinyl estradiol, Levothyroxine に対しては 8h で用量依存的に発現亢進する分子が増加した。しかしながら Ethinyl estradiol, Testosterone propionate, Levothyroxine に対する ER, DHTR, T 及びこれらに直接制御される分子群のパスウェイに上述した方法による各発現データ(fold change)を載せ、各ホルモンに対する核内リセプター(ER, DHTR, TR)に直接制御される分子群の発現量を観察すると、わずかに Testosterone propionate 投与による TR 下流分子の発現誘導が認められただけでその他のホルモンに対してはほとんど直接的な変動は認められなかった。そこで、発現量に変動の認められた分子に基づき、各ホルモンに対して特異的に変化するパスウェイを構築する必要があると考えられた。

2. 各ホルモン特異的に活性化するネットワークの構築

各ホルモンに対し、コントロールに比べ発現亢進した分子の数より、8h のデータを用いることが有用であることが示唆されたため、ER8hD3, ER8hD10, DHTR8hD1, DHTR8hD10, TR8hD3, TR8hD10 のデータを基にネットワークを生成した。ここでは各ホルモンそれぞれに対し、2つのネットワーク群の共通部分を AND 論理演算により抽出し ER, DHTR, TR 活性化ネットワークとした。さらに、3 つのホルモンそれぞれに特異的に活性化するネットワークを抽出するため、ER-(DHTR+TR), DHTR-(ER+TR), TR-(ER+DHTR)の DIFF 論理演算を行い、ER, DHTR, TR 特異的活性化ネットワークを抽出した。各ホルモンに対する特異的活性化ネットワークのプロファイルはサマリーシートによって行うことができる。ER 特異的活性化ネットワークのサマリーより、“STAT による発現

調節”、“解糖系”の一部が特異的に活性化していた。さらにDHTRに対しては、“ephrinシグナル伝達”の一部が活性化しており、TRに対しては“TRによる発現調節”、“threonine代謝”の一部が活性化していた。

(2) 培養細胞系ハイスクリーンブットスクリーニング (HTPS)による超高速分析法

(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 ERα及びERβ agonist 検出系

結果はTable 2に示した。またアゴニスト活性を有する物質を以下に示した。

100物質について本実験系にてERα及びERβアゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果、PC10が検出された物質は、ERαのみについて21物質、ERβのみについて2物質であり、両者共にPC10が検出された物質は、8物質であった。この8物質中ではERαに選択性の高いもの(5倍以上濃度差のあるもの)3物質、ERβに選択性の高いもの1物質、同等のもの4物質であった。ERβのみ検出された物質の中には6-hydroxyflavoneがあり、植物エストロゲン(Phytoestrogen)がERβに選択性が高いことと一致している。比較的強いアゴニスト活性(PC50)を有する物質はERαのみについて1物質、ERβのみについてはなく、両者共に有する物質は、2物質であった。

HTPS	ERα	ERβ	Chemical Name	CAS	ERα PC10	ERβ PC10	ERα PC50	ERβ PC50
HTPS01	HTPS01	HTPS01	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS02	HTPS02	HTPS02	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS03	HTPS03	HTPS03	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS04	HTPS04	HTPS04	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS05	HTPS05	HTPS05	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS06	HTPS06	HTPS06	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS07	HTPS07	HTPS07	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS08	HTPS08	HTPS08	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS09	HTPS09	HTPS09	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS10	HTPS10	HTPS10	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS11	HTPS11	HTPS11	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS12	HTPS12	HTPS12	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS13	HTPS13	HTPS13	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS14	HTPS14	HTPS14	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS15	HTPS15	HTPS15	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS16	HTPS16	HTPS16	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS17	HTPS17	HTPS17	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS18	HTPS18	HTPS18	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS19	HTPS19	HTPS19	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS20	HTPS20	HTPS20	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS21	HTPS21	HTPS21	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS22	HTPS22	HTPS22	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS23	HTPS23	HTPS23	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS24	HTPS24	HTPS24	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS25	HTPS25	HTPS25	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS26	HTPS26	HTPS26	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS27	HTPS27	HTPS27	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS28	HTPS28	HTPS28	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS29	HTPS29	HTPS29	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS30	HTPS30	HTPS30	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS31	HTPS31	HTPS31	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS32	HTPS32	HTPS32	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS33	HTPS33	HTPS33	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS34	HTPS34	HTPS34	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS35	HTPS35	HTPS35	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS36	HTPS36	HTPS36	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS37	HTPS37	HTPS37	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS38	HTPS38	HTPS38	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS39	HTPS39	HTPS39	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS40	HTPS40	HTPS40	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS41	HTPS41	HTPS41	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS42	HTPS42	HTPS42	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS43	HTPS43	HTPS43	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS44	HTPS44	HTPS44	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS45	HTPS45	HTPS45	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS46	HTPS46	HTPS46	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS47	HTPS47	HTPS47	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS48	HTPS48	HTPS48	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS49	HTPS49	HTPS49	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS50	HTPS50	HTPS50	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS51	HTPS51	HTPS51	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS52	HTPS52	HTPS52	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS53	HTPS53	HTPS53	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS54	HTPS54	HTPS54	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS55	HTPS55	HTPS55	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS56	HTPS56	HTPS56	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS57	HTPS57	HTPS57	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS58	HTPS58	HTPS58	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS59	HTPS59	HTPS59	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS60	HTPS60	HTPS60	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS61	HTPS61	HTPS61	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS62	HTPS62	HTPS62	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS63	HTPS63	HTPS63	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS64	HTPS64	HTPS64	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS65	HTPS65	HTPS65	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS66	HTPS66	HTPS66	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS67	HTPS67	HTPS67	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS68	HTPS68	HTPS68	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS69	HTPS69	HTPS69	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS70	HTPS70	HTPS70	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS71	HTPS71	HTPS71	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS72	HTPS72	HTPS72	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS73	HTPS73	HTPS73	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS74	HTPS74	HTPS74	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS75	HTPS75	HTPS75	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS76	HTPS76	HTPS76	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS77	HTPS77	HTPS77	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS78	HTPS78	HTPS78	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS79	HTPS79	HTPS79	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS80	HTPS80	HTPS80	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS81	HTPS81	HTPS81	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS82	HTPS82	HTPS82	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS83	HTPS83	HTPS83	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS84	HTPS84	HTPS84	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS85	HTPS85	HTPS85	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS86	HTPS86	HTPS86	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS87	HTPS87	HTPS87	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS88	HTPS88	HTPS88	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS89	HTPS89	HTPS89	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS90	HTPS90	HTPS90	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS91	HTPS91	HTPS91	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS92	HTPS92	HTPS92	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS93	HTPS93	HTPS93	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS94	HTPS94	HTPS94	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS95	HTPS95	HTPS95	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS96	HTPS96	HTPS96	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS97	HTPS97	HTPS97	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS98	HTPS98	HTPS98	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS99	HTPS99	HTPS99	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09
HTPS100	HTPS100	HTPS100	17β-Estradiol	50-41-9	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09	1.42E-09

Table.2

(2)-2 レポーター遺伝子導入培養細胞株を用いたTR、AR作用物質超高速分析法に関する試験研究

1. ARアゴニスト活性ポジティブの化合物

本アッセイ法を用いて100物質についてアゴニス

ト活性を測定した結果、PC10を算出することができた物質について、その結果をTable 1に示す。Methyltestosterone, (PC10 = 6.48 × 10⁻¹¹) や Stanolone (PC10 = 1.59 × 10⁻¹¹) などの Androst-4-ene-3,17-dione (PC10 = 1.46 × 10⁻¹¹) の類似体、3種類についてはPC10が10⁻¹⁰以下という非常に強いアゴニスト活性であった。また、Progesterone (PC10 = 8.43 × 10⁻⁸)及びその類似化合物である Norethirindrone (PC10 = 2.15 × 10⁻¹⁰)や D(-)-Norgestrel (PC10 = 1.20 × 10⁻¹⁰)についても強いアゴニスト活性を認めた。また非常に弱い活性を示した物質として chalcone 及びその誘導体、フラボン類、ベンゾフェノン誘導体があった。

AssayID	Name	CAS	PC 50	PC 10
AT096	Androst-4-ene-3,17-dione	000063-05-8	5.49E-11	1.46E-11
AT090	Stanolone	000521-18-6	8.36E-11	1.59E-11
AR052	Testosterone, methyl	000058-18-4	3.75E-10	6.48E-11
AT065	D(-)-Norgestrel	000797-63-7	5.80E-10	1.20E-10
AT098	Norethirindrone	000068-2		

は算出していない。比較的強いアンタゴニスト作用が認められた物質には Progesterone やビスフェノール類やベンゾフェノン類があった。

3. TR アゴニスト活性

50 化合物に対して TR アゴニストアッセイを行った。このうち、2 化合物 (AT061、AT087) に明確な TR アゴニスト活性が認められた。これらはこれまでに TR 攪乱作用の報告がない化合物であった。

4. TR アンタゴニスト活性ポジティブの化合物

50 化合物に対して TR アンタゴニスト活性の有無も同時に評価した。このうち、1 化合物が、弱いながらも TR アンタゴニスト活性を示した。(AT098)。

(2)-3 超高速選別法(HTPS)の検証の評価に関する調査研究

欧州連合 (EU) 欧州委員会 (EC) 主催による内分泌かく乱に関する国際会議に参加し、本邦における取り組みの紹介とともに、厚生労働科学における内分泌かく乱研究の進行状況を紹介した。欧州連合は、内分泌かく乱化学物質問題が欧州連合科学技術委員会の取り上げるべき重要な研究課題であるものとして、2000 年に欧州圏内外の研究者を招聘して、研究の方策についての検討を、スウェーデンのアーンズブルグにて開催した。今回の国際会議は、いわばその進行状況を EU として公式に発表し、また、各招待者はそれぞれの立場における研究の進行状況を紹介し、相互のこの問題への理解を深めることを目的として開催された。また、OECD 開催の Toxicogenomics に関する Workshop や内分泌かく乱試験及びアセスメントタスクフォース実務者会議などにおいても、内分泌かく乱化学物質試験法の検討とその後の各国の情報交流により我国における内分泌かく乱化学物質研究の状況情報収集を行った。

その結果として内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験法開発について本研究班では、階層構造的に① *in silico* の negative/positive selection を意図したデータベーススクリーニング、②試験管内のハイスループットスクリーニングによる受容体原性 negative selection、③受容体原性

の positive selection としての生体内スクリーニング試験、及び④内分泌かく乱性の判定を意図する positive selection としての決定試験法、などを総合的に進めることとして来たが、今後、適切な方法を構築して、スクリーニングスキーム確立に向けて OECD をはじめ各国の協力によるバリデーションを得て、試験法として確立してゆく必要がある。

(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度取得技術及び HTPS に特化するための試験研究

今年度国立医薬品食品衛生研究所から支給された化学物質は合計 100 種類であった。まずすべての化学物質について ERE、TIF、AO の 3 アッセイのスクリーニングを 1 回行った。その結果、 β 型エストロゲンレセプターでは ERE と AO アッセイの結果は同等であることが示された (図5) ので、2 回目のスクリーニングは TIF、AO の 2 アッセイについて行った。化学物質毎に化学物質の濃度と相対活性化度 (% activation) をプロットしたグラフを図4に、それぞれの値を表1に示した。

(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

1. TR-DR4 及び TR-LxxLL 相互作用のリガンド結合による変化の検討

これまでに構築した ER α 、ER β 系と同様に TR について、その代表的なレスポンスエレメントである DR4 及び共役因子の受容体結合モチーフとして TIF2 の第 2LxxLL モチーフをプローブとしてセンサーチップに固定化し、TR のリガンドである T3、T4 存在下、非存在下における相互作用について測定を行い、リガンド結合による相互作用変化について検討を行った。これまでの ER についての検討において、核内受容体及びその相互作用は測定条件により影響を受けることが示されていることから、まず始めに測定条件の検討を行い相互作用の検討を行うことのできる条件の最適化を行った。最適化し

た条件下で、それぞれのプローブとの相互作用について検討した結果、TR-DR4 相互作用についてはリガンドの有無による変化は検出されなかった。一方、LxxLL 相互作用については、ER と同様、リガンド非存在下では反応は認められず、リガンドの存在により反応が認められた。

2. RXR 共存による、TR 相互作用への影響についての検討

TR は生体内では主に RXR とヘテロダイマーを形成して機能することが報告されていることから、RXR 共存による、TR-DR4、TR-LxxLL 相互作用への影響について検討を行った。DR4 との相互作用は RXR 共存下において TR 単独もしくは RXR 単独に比べ大きく増加したが、TR リガンドもしくは、RXR リガンドの共存による相互作用変化は認められなかった。一方、LxxLL 相互作用について、TR、RXR 共存下では、リガンド非存在下では反応は認められず、TR リガンドもしくは RXR リガンドのいずれかの存在により、同程度の反応が認められた。また TR、RXR 共存下における反応はいずれも TR 単独における反応に比べ強く認められた。

3. アポ型受容体相互作用ペプチドの受容体作用検出系への適用に関する検討

代表的なコプレッサーである SMRT、NcoR の核内受容体相互作用モチーフ (CoRNR ボックス) を含むペプチド及び文献で報告されているアポ型受容体結合ペプチド数種について検討した結果、コプレッサーより選択したペプチドには、活性型・非活性型 ER のいずれも反応を示さなかった。一方、検討したペプチドのうち apol は、非活性型 ER のみに反応を示し、機知のリガンド存在下では反応を示さなかった。いくつかの化合物について濃度依存性を検討した結果、アゴニスト・アンタゴニストいずれも、化合物濃度依存的に反応は低下した。ER β では ER α に比べ反応そのものは弱いと同様に濃度依存的な反応の低下が認められた。

D. 考察

(1) 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価

我々の開発したコンピュータスクリーニング法を利用して、ER β に対する多種化学物質の結合活

性値予測を試みた。独自に入手した約 58,000 化学物質のうち、約 20,000 の化学物質について ER β への結合様式の推定を行った後結合強度の予測を行った結果、約 15,000 の物質について結合様式と結合強度を予測することができた。この手法は、化学物質の構造を選ぶことなく結合様式を推定でき、且つ結合強度が予測可能であるため非常に有用であると考えられる。

一方、ホルモン特異的に活性化するパスウェイの構築のためのネットワーク解析により、各ホルモンに対して幾つかの特徴的なネットワークパターン抽出が可能であることが示唆された。今後は、この方法を基にさらにデータ数を蓄積し、より確実なネットワークを抽出することで、内分泌かく乱による生体作用予測のよい指標になると考えられた。

(2) 培養細胞系ハイスループットスクリーニング (HTPS) による超高速分析法

Firefly Luciferase 遺伝子の 5' 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 又は ER β を常時発現するための Plasmid が同時に一過性に導入された細胞を使用し、100 種類の化学物質についてその ER α 及び ER β アゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、100 物質中アゴニスト活性を有する物質は、ER α のみについて 21 物質、ER β のみについて 2 物質であり、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、8 物質であった。この 8 物質中では ER α に選択性の高いもの 3 物質、ER β に選択性の高いもの 1 物質、同等のもの 4 物質であった。また、昨年度より新たに検討を始めた AR と TR についての CHO 細胞においてルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしたレポーター遺伝子アッセイ法を用いて AR 及び TR に対するアゴニスト及びアンタゴニスト活性を各々 50 物質について測定した。その結果、それぞれの内在性のリガンドについて高感度に検出することができることを確認し、いくつかの内分泌かく乱化学物質として知られている物質を検出することができた。これらの方法により選出された物質については *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、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、これらのレポーター遺伝子アッセイシステムは、各受容体作用をもつ化合物の広範なスクリーニング手法として内分泌かく乱化学物質試験法として有用であると結論された。

(3) 表面プラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析

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、ER 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を構築した。β型 ER を用いたアッセイ方法を HTPS 化し、このスクリーニング法の有用性を検証するために100種類の化学物質のスクリーニングを行った。スクリーニング結果の解析から、β型 ER では化学物質によるEREとTIFへの相互作用への影響の違いは観察されなかった。これはα型ERで得られた知見と大きく異なる点である。α型とβ型ERの結果を比較すると、β型の方が相対的に反応性が高く、化学物質の影響をより敏感に検出できる可能性が示された。

細胞を用いた試験系では、対象物質のレセプター以外への作用を考慮する必要があるが、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。ホルモンレセプターの作用メカニズムをもとにした本スクリーニング法により、多数の化学物質についてそのホルモン様作用を迅速にスクリーニングすることが可能である。

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は、従来の試験法と比較しても迅速、且つ高精度に判定が可能で、しかもより多くの情報をもたらす手法であることが確かめられた。ER上の異なる二つの作用点に対する化学物質の影響を同時に観察することが可能となり、ひとつのアッセイでは確実に判定できないエストロゲン様作用をよりの確に判定できる可能性が示唆された。本研究により表面プラズモン共鳴高速スクリーニング法は、化学物質の内分泌かく乱性の判定に優先順位をつける迅速な一次スクリーニング法としての有用であると考えられた。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価における、受容体リガンド結合部位と化学物質の三次元構造を利用して相互作用を解析する手法は、化学物質が受容体リガンド結合キャビティと物理化学的にフィットするかどうか、すなわち結合親和性を有するかどうかを直接的に見積もることができる有力な手法であると考えられる。さらに、例えば入手困難な化学物質の結合親和性でさえも、その化学構造式が判明していれば我々の開発した手法を用いて相互作用の強さを計算により見積もることも可能である。今回、化学物質の三次元化に使用したプログラム Key3D では、パラメータ不足等の問題により三次元化できなかった物質数は77と非常に少数であった。これらの化学物質はそのほとんどが無機化合物であり、単独で作用を及ぼす可能性の低い物質であった。これまで述べたように、受容体リガンド結合部位と化学物質の三次元構造を利用して相互作用を直接解析する手法は結合親和性を見積もるために非常に有効であると考えられるが受容体リガンド結合部位とリガンドが直接相互作用する段階は相互作用の最終ステップであり、受容体とリガンドが相互作用する初期の段階においてはまた別の相互作用が必要であると考えられる。例えばERαとERβのリガンド結合キャビティはアゴニスト結合状態ではhelix12が蓋のように閉じた状態で安定化するが、この最終構造をとる以前のリガンドとリガンド結合ドメイン表面との相互作用や、リガンド結合ドメイン内でのヘリックス間の相互作用、また補因子とリガンド及び補因子とリガンド結合ドメインの相互作用等が結果的に結合活性に重要な影響を及ぼすと推測される。実験的な結合活性値との相関をさらに高めるためには今後初期段階における相互作用に必要な要素を特定する必要があるかもしれない。定法の問題も完全に解決されておらず、今後さらに検討と改良が必要である。一方、パスウェイスクリーニング系構築に向けたネットワーク解析においては各ホルモンに対する特異的な核内レセプターにより発現が制御される分子のパスウェイを抽出し、各々の発現データをインポートして直接の影響を検討したところ、TR以外のレセプター下流への直接影響は認められなかった。従って、特に低用量の環境ホルモンの毒性予測を行うためには直接影

響を及ぼす分子とそれらを制御する核内レセプターによるパスウェイの観察のみでは困難であることが示唆された。さらに、各ホルモンに対して特異的に活性化するネットワークの抽出を試みたところ Ethynyl estradiol に対しては“STAT による発現調節”、“解糖系”の一部がホルモン特異的に活性化していることが示唆され、STAT 下流の分子の発現量や、GO(Gene Ontology)term との関連などを考え合せると、細胞増殖が亢進している可能性が考えられた。今後は各ホルモンに対して特異的に抑制されるネットワークを構築し、活性化のネットワークと組み合わせることで化学物質の内分泌かく乱性予測に有用な手法になると考えられる。レポーター遺伝子導入細胞による高速分析法では、100 物質について ER α 、ER β 活性の測定を ER α のみについて活性を有する物質は 21 物質、ER β のみについて 2 物質、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、8 物質であった。この 8 物質中では ER α に選択性の高いもの 3 物質、ER β に選択性の高いもの 1 物質、同等のもの 4 物質であった。一方 CHO 細胞を用いた AR、TR-RXR 系においてはそれぞれ 50 物質の測定を行い、AR 系についてはアゴニスト活性、アンタゴニスト活性がそれぞれ 9 物質、14 物質に、TR 系については 2 物質、1 物質に検出された。これらの物質については *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があるが、手法の簡便さ、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内分泌かく乱化学物質試験法として、特に高次試験実施における優先順位設定のためのプレ・スクリーニング法として有用であると考察された。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レセプターを用いた SPR-HTTPS 系においては、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。本年度は、昨年、構築した ER β 系の検証のため、これまでの ER α 測定において活性の認められた 100 物質の測定を行った結果、一部の物質では ER α で得られた知見と大きく異なる結果を得た。また、 α 型と β 型 ER の結果を比較すると β 型の方が相対的に反応性が高く、化学物質の影響をより

敏感に検出できる可能性が示された。細胞を用いた試験系では、対象物質のレセプター以外への作用を考慮する必要があるが、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。ホルモンレセプターの作用メカニズムをもとにした本スクリーニング法により、多数の化学物質についてそのホルモン様作用を迅速にスクリーニングすることが可能である。今後は、測定結果の再現性を含め、さらなるデータの蓄積を行うことで化学物質の内分泌かく乱性においてそのメカニズムからの科学的な評価を行える一次スクリーニング法として有用であると考えられる。内分泌かく乱化学物質に関する、今後のリスクアセスメントの問題に関してはレセプター構造と活性制御の研究を始めとした核内レセプターによる遺伝子制御機構の解明はもとより、個々の化合物の生体作用について解明にあたっては、マイクロアレイを用いたゲノミクス手法による作用物質と遺伝子発現プロファイルに関する知見などインフォマティクスの果たす役割も大きいと考えられる。本研究班においてこれまでに構築を進めてきた、*in silico*、*cell free*、*in vitro* スクリーニング手法にあわせ、本年度新たに検討を進めたパスウェイスクリーニングを組み合わせることで、対象とする化学物質についてより科学的な観点からの情報を蓄積し、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。この優先順位リストにより、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解明への貢献が期待される。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue

T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Jul;91(3):121-9.

Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jun;229(6):494-502.

Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol.* 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.

Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S*, Inoue, T, and Kanno, J (2004) Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor. *Anal Sci.* 2004 20, 611-616

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology.* 2004 Jan 15;195(1):19-29.

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6 2004685-693、株式会社秀潤社

菅野 純:医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、月刊薬事、2004年5月、

Vol.46, No.6 株式会社じほう

菅野 純:化学物質の毒性 化学と教育 52 巻 5 号『化学物質とリスク評価』2004年 302-305 (社)日本化学会

2. 学会発表

Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

菅野 純 「前向き」Toxicogenomics、第 88 次日本法医学会総会、2004年6月2~4日、旭川

高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子、「Notchリガンド D113 は Mesp2 の欠損による体節形成と前後パターン形成の異常を回復する」、日本発生生物学会第37回大会、2004年6月4~6日、名古屋

平林容子、壺井 功、菅野 純、井上 達、「造血器における細胞間ギャップ結合の病理-コネクシン欠失による造血障害と実験白血病高甘感受性について-」、第 93 回日本病理学会総会、2004年6月9~11日、札幌

J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi, PHENOTYPE-INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会(特別講演)、2004年7月6~8日、大阪

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日内変動遺伝子群プロファイルの解析」第31回日本トキシコロジー学会学術年会(口演)、2004年7月6~8日、大阪