

Cell No. JCRB0160

Cell Name **L190**

ESR1	RXRA	<b>AR</b>	PPARG	THRB	PPARA
RARA	ESR2	NR1H3	HNF4A	RXRB	THRA
PGR	NR0B2	RARB	NR5A1	NR4A1	PPARD
VDR	NR1H3	ESRRA	NR0B1	RXRG	NR2F1
NR2F2	R5A2	NR2C2	NR1I3	NR1H4	NR1H2
RORA	ESRRG	RARG	NR2C1	NR3C2	NR1I2
NR1D1	ESRRB	NR4A2	NR4A3	NR1D2	HNF4G
NR2F6	RORC	NR6A1	NR2E3	RORB	NR2E1

- 高発現
- 中発現
- 低発現
- 0

**細胞毎の核内レセプター発現情報**

Cell No. JCRB9004

Cell Name **HeLa**

<b>AR</b>	androgen receptor
-----------	-------------------

NR0B1	ESR1	NR3C1	RXRB	NR5A1	NR0B2
NR2C1	NR2C2	THRB			
ATF2	BRCA1	CCND1	OCNE1	CDK7	CDK9
CDKN1A	GREB1	CREBBP	ORSP2	CTNNB1	FHL2
GAPDH	HTATIP	MED12	MYC	NCOA1	NCOA2
NCOA3	NCOA4	NCOA8	NCOR1	NCOR2	NR1P1
NSD1	PIAS1	PIAS2	PNRC1	PPARBP	RAN
RB1	RNF14	RNF4	THRAP4		

**AR androgen receptor**

Summary:

The androgen receptor gene is more than 90 kb long and codes for a protein that has 3 major functional domains: the N-terminal domain, DNA-binding domain, and androgen-binding domain. The protein functions as a steroid-hormone activated transcription factor. Upon binding the hormone ligand, the receptor dissociates from accessory proteins, translocates into the nucleus, dimerizes, and then stimulates transcription of androgen responsive genes. This gene contains 2 polymorphic trinucleotide repeat segments that encode polyglutamine and polyglycine tracts in the N-terminal transactivation domain of its protein. Expansion of the polyglutamine tract causes spinal bulbar muscular atrophy (Kennedy disease). Mutations in this gene are also associated with complete androgen insensitivity (CAIS). Two alternatively spliced variants encoding distinct isoforms have been described.

[http://sra.ebi.ac.uk/sra/bin/cgi-bin/wget?~e+|REFSEQP-alttext:NP\\_000035](http://sra.ebi.ac.uk/sra/bin/cgi-bin/wget?~e+|REFSEQP-alttext:NP_000035)

図2 ホームページで公開した核内レセプター関連遺伝子の遺伝子発現解析データ



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究  
KeyMolnet を用いた分子ネットワークによる  
内分泌かく乱化学物質候補化合物の毒性予測法の構築

分担研究者 板井昭子 (株)医薬分子設計研究所  
研究協力者 佐藤陽美 (株)医薬分子設計研究所

### 研究要旨

生体において化合物の毒性は分子ネットワークを介して発現するが、化学物質の生体内作用は顕著なフェノタイプの変化を伴わない場合も多いため、その毒性予測、評価が困難である。そこで、近年技術的進歩が著しく、かつ感度の高い DNA マイクロアレイによる遺伝子発現データと形質非依存型トキシコゲノミクスに適応させたオリジナルのマイクロアレイデータ標準化法 (Percellome method, Kanno et al.) を用いて、*in vivo* (マウス肝) での核内受容体及び関連転写因子群に着目した化学物質に対するデータから、簡便かつプラクティカルな毒性予測法を構築することにした。ここでは生命情報統合プラットフォーム KeyMolnet を用いて DNA マイクロアレイデータに基づき、毒性作用に結びつく分子ネットワークを生成する。作用、ターゲット既知化合物の遺伝子発現データに基づき生成したネットワークのプロファイルを予め保存、蓄積し、同様に生成する作用未知化合物のネットワークのプロファイルと比較することで毒性予測を試みるという方針である。今年度は pilot study としてさらなるデータ蓄積のため、Troglitazone, Genistein, Tamoxifen を経口投与したマウスの肝臓から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2 チップより得た遺伝子発現データを用い、核内受容体 PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator activated receptor alpha) 及び ER (Estrogen Receptor) に制御されることが報告されている遺伝子の発現を異なる時系列、用量に対して観察した。さらに、発現変動の大きい幾つかのポイントを選定し、そのデータから分子ネットワークを生成した後、これらの分子ネットワークに対するカノニカルなパスウェイ、病態における現象 (病態イベント) に関するプロファイリングを行った。分子ネットワークは生体内の作用を惹起するメカニズムの示唆を与えることができ、かつ、本方法は化合物特異的な分子ネットワークを簡便・効率的に生成、抽出できることから、フェノタイプの変化が顕著でない比較的低用量の化合物の毒性予測に有用であることが示唆される。

#### A. 研究目的

内分泌かく乱作用をもつ可能性のある化合物の毒性予測を行うため、DNA アレイ技術と、Percellome method によるデータ標準化法及び KeyMolnet によるネットワーク解析を組み合

わせ、毒性予測のための方法を構築する。フェノタイプの変化が明確でない化学物質の作用に対してもその毒性予測が可能な簡便かつプラクティカルな方法を構築する。また、このパイロットスタディーに必要なデータを蓄積する。

## B. 研究方法

### 1. ネットワーク解析におけるデータ処理

Troglitazone, Genistein, Tamoxifen を経口投与したマウスの肝臓(1群3匹)から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2 により得た網羅的遺伝子発現データを Percellome method により標準化した値をすべての解析に用いた。投与条件は以下のとおりである。

Chemicals	Dose	Time(h)
Troglitazone	0, 1, 3, 10 (mg/kg)	2, 4, 8, 24
Genistein	0, 10, 30, 100 (mg/kg)	2, 4, 8, 24
Tamoxifen	0, 1, 3, 10 ( $\mu$ g/kg)	2, 4, 8, 24

用量0をコントロールとして、各3用量における各時系列の発現量比(fold change)を後のネットワーク解析に用いた。また、ここでは  $p < 0.05$  を有意なデータとして採用した(統計処理には Spotfire® を利用した)。

KeyMolnet は以下のバージョンを用いた。



### 2. カノニカルパスウェイ“PPAR $\gamma$ による発現調節”、“ER による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

KeyMolnet に収録されている“PPAR $\alpha$ による発現調節”、“ER による発現調節”に

Troglitazone (PPAR $\gamma$ ), Genistein, Tamoxifen (ER) 作用による各条件のデータをインポートし、各化合物の投与に対し、各核内受容体に発現調節される遺伝子の発現変動を観察した。

### 実験条件の絞り込み

上記 KeyMolnet 上で、各実験条件において、 $P < 0.05$ かつ2倍以上発現亢進または低下した分子(変動分子)の数を抽出し、発現変動の大きい観察点を分子ネットワーク生成の代表点として採用した。

### 3. 化合物作用に対する upregulate 及び downregulate ネットワークの生成

2の結果から、発現変動の大きかった観察点(3化合物ともいずれも最高用量、時系列は Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 投与でそれぞれ 4, 8, 4 時間後のデータを選定)を抽出し、各化合物の各点における変動分子を検索端点(search point)として、KeyMolnet のコンテンツデータに基づき、分子ネットワークを生成した(相互関係検索法利用)。生成した各ネットワークに対し、KeyMolnet のサマリーシートを用いて、カノニカルパスウェイ(Pathway)、病態における現象(病態イベント、Pathological Event)について、これらの関与度(超幾何分布法利用)とともにサマライズした。Troglitazone に対しては全体的に変動分子が少なかったため、以下の各点における分子ネットワークを OR 論理演算により、マージして、同様にサマライズした。

分子ネットワーク作成時の条件: 相互関係検索、3パス、分子リレーションの種類コアコンテンツ(発現+、直接+)、セカンダリコンテンツ(直接的)

### C. 研究結果

#### カノニカルパスウェイ(Pathway)“PPAR $\gamma$ による発現調節”、“ER による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 投与群に対し、PPAR $\gamma$  (Troglitazon), ER (Genistein, Tamoxifen)により発現制御される遺伝子の発現変動を観察した。KeyMolnet コンテンツから“PPAR $\gamma$ による発現調節”、“ERによる発現調節”を呼び出し、遺伝子発現データ(投与量 0 をコントロールとした発現量比 foldchange を数値データとして KeyMolnet にインポート)を色変換してマッピングした(図 1A-C)。観察点は 3 化合物とも最高用量、すなわち、10(mg/kg), 100(mg/kg), 10(mg/kg)かつ、4 時系列を同時に可視化して示した。

#### 実験条件の絞り込み

上記 KeyMolnet 上で、各実験条件において  $P < 0.05$  かつ 2 倍以上発現亢進(及び低下)した分子(変動分子)の数を表 1 に示す。この結果より、Troglitazone, Genistein, Tamoxifen 投与群に対し、それぞれ、投与 4, 8, 4 時間後のデータを次の分子ネットワーク生成に利用することにした。

#### 化合物投与により upregulate 及び downregulate するネットワークの生成

分子ネットワーク生成に用いた観察点は以下の通り。

Troglitazone; up 10(mg/kg)4 時間後, down10(mg/kg)4 時間後

Genistein; up 100(mg/kg)8 時間後, down10(mg/kg)8 時間後

Tamoxifen; up 10(mg/kg)4 時間後, down3(mg/kg)4 時間後

上記観察点において、有意に 2 倍以上発現亢進(または低下)した分子(変動分子)を検索端点にして、KeyMolnet の相互関係検索法を用いて分子ネットワークを生成させた (upregulation 図 3, downregulation 図 4)。生成した各分子ネットワークのサマリーを表 2(図 3 に対応)、3(図 4 に対応)に示す。さらに Troglitazon 投与群に対しては、変動分子数が少なかったため、次の各観察点における変動分子により上記と同様の条件で分子ネットワークを生成した後、全分子ネットワークを OR 論理演算によりマージした(図 4)。表 4 には図 4 に示した分子ネットワークのサマリーを示した。図 4 に示したネットワークに使用した観察点のデータ:1(mg/kg)2 時間後, 3(mg/kg)4 時間後, 10(mg/kg)4 時間後, 3(mg/kg)24 時間後の有意に 2 倍以上発現亢進した分子

### D. 考察

Troglitazone, Genistein, Tamoxifen いずれの作用に対しても、今回の用量の範囲では高用量で変動分子数が多かったが、時系列では概ね投与 4, 8 時間後で遺伝子発現の変動が大きかった。プラクティカルかつ簡便という点では、遺伝子発現変動の大きい幾つかの観察点を代表として選び出し、分子ネットワークを生成した後、作用既知(あるいはターゲット既知)化合物-分子ネットワーク-毒性作用を含むアノテーションという形式でデータ蓄積することにより、作用未知の化合物に対する同様のデータ比較することである程度の毒性予測が可能であろう。

Troglitazone 作用に対する幾つかのデータによる分子ネットワークのマージにより(図 5)、発現変動する分子には 2 層性があることが明らかであり、分子ネットワークも 2 つ生成された

ことから時系列に伴う作用の差異も示唆された。変動分子が少ない場合には、このように多数の観察点に基づく分子ネットワークのマップも有効かもしれない。このような場合には特に今回のような可視化は有効であると思われる。

#### E. 結論

化合物特異的に upregulate 及び downregulate するネットワークが簡便かつ効率的に抽出でき、そのネットワークに関する毒性作用、パスウェイなどのプロファイリングも行うことができた。今後はさらに他の化合物作用に対する特徴的なネットワークとそのプロファイリングデータを蓄積することが必要であると思われる。作用未知の化合物に対しても同様の操作により得たデータを蓄積したデータと比較することで毒性予測が行える可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 誌上発表

水谷実穂、板井昭子「論理的分子設計に基づく創薬」バイオテクノロジージャーナル 2007; 7(2), 247-250.

水谷実穂、板井昭子「分子構造から考える薬物の作用機序(2) 論理的分子設計からの創薬」医薬ジャーナル 2007、No.3、pp 5-10

武藤進、水谷実穂、板井昭子「蛋白構造と論理的分子設計に基づく創薬」Medical Science Digest 2007;33(10), 1057-1060.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

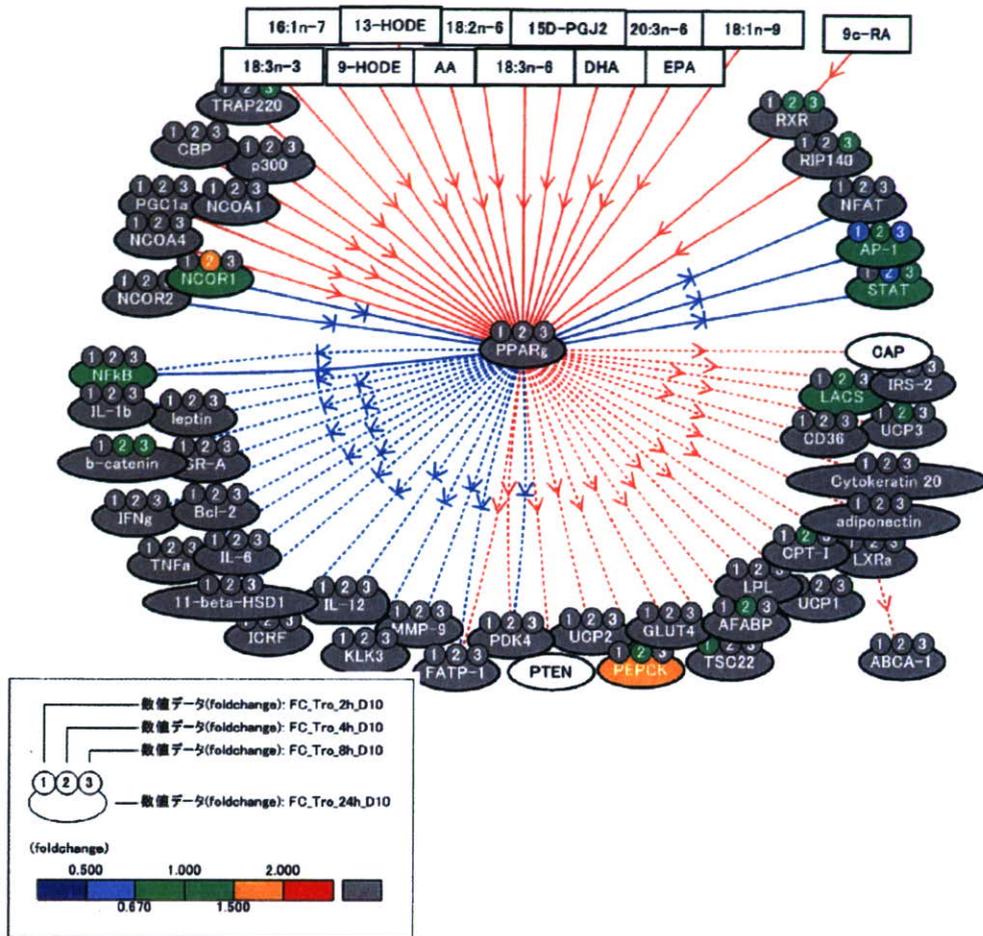
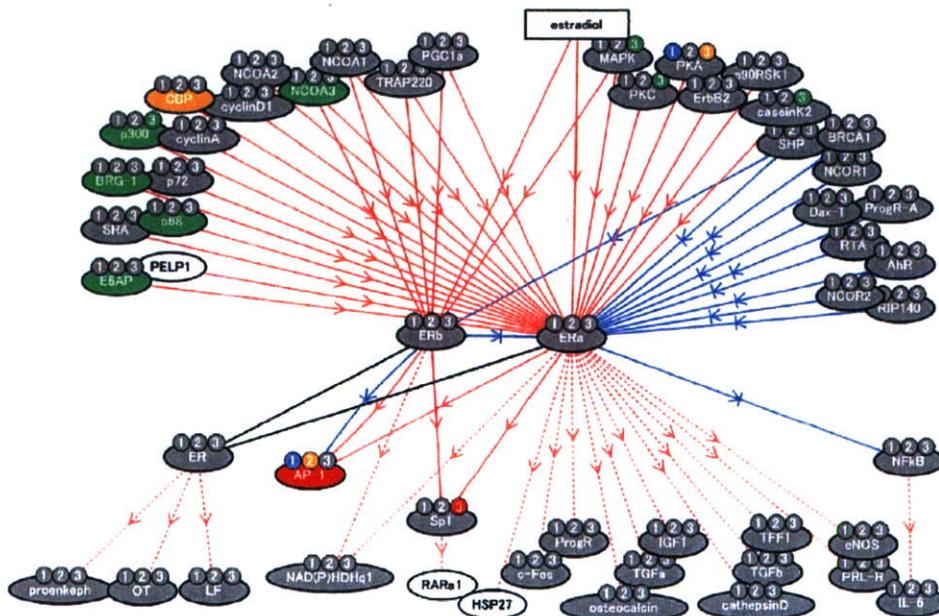


図 1A Troglitazone の“PPAR $\gamma$ による発現調節” への影響(10mg/kg)



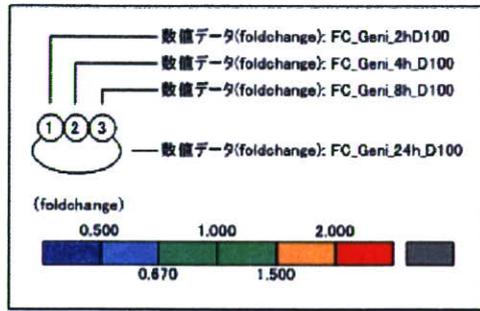


図 1B Genistein の“ER による発現調節” への影響(100 mg/kg)

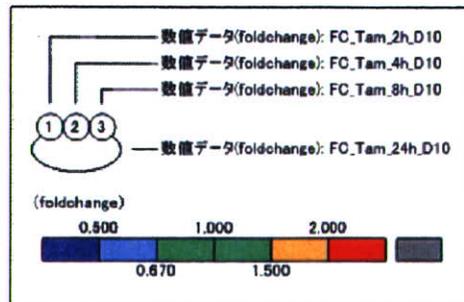
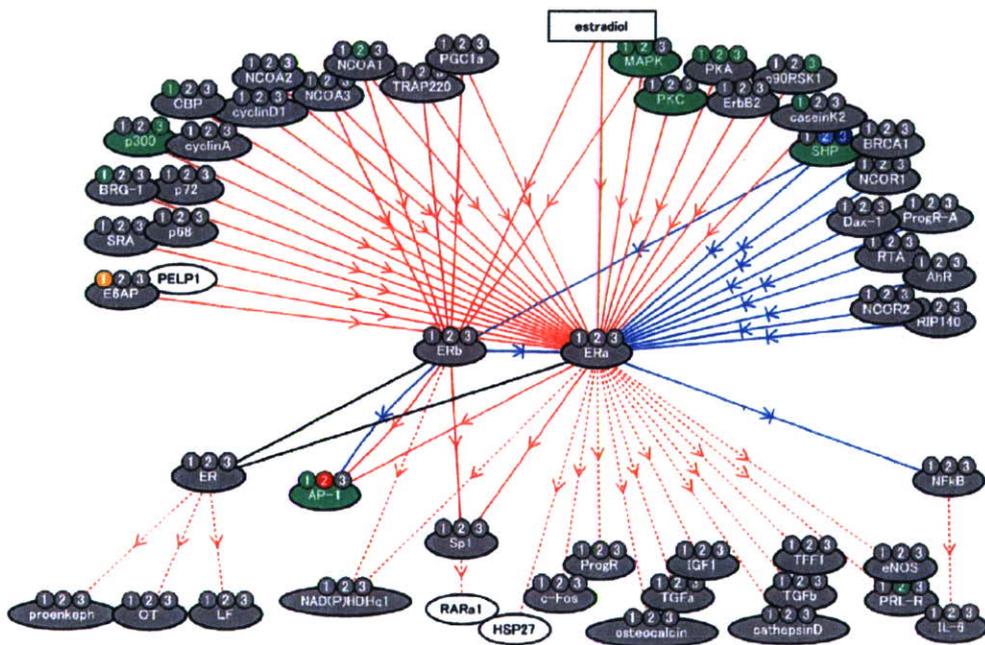
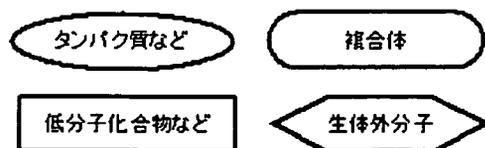


図 1C Tamoxifen の“ER による発現調節” への影響(10 mg/kg)

# Legends



Core Contents、ユーザ独自追加リレーション

**線の種類**

直接+ : 酵素反応等  
: その他

右図



S: 基質  
E: 酵素  
P: 生成物



総称分子-メンバ

複合体-構成要素

**線の太さ**

Core Contents(太線)

ユーザ独自追加リレーション  
(細線)

**Secondary Contents**



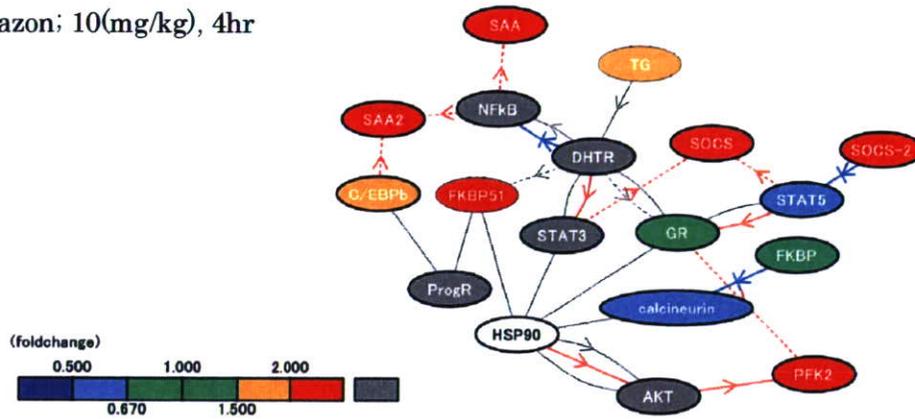
表 1 化合物投与に対する遺伝子発現変動数

2up: 2倍以上有意に増加, 2down: 2倍以上有意に低下

Tro	Troglitazone												
	Time (hr)	2			4			8			24		
	Dose (mg/kg)	1	3	10	1	3	10	1	3	10	1	3	10
2up		6	1	2	1	3	12	0	2	0	0	4	3
2down		0	3	1	2	9	50	5	2	3	1	3	7
Geni	Genistein												
	Time (hr)	2			4			8			24		
	Dose (mg/kg)	10	30	100	10	30	100	10	30	100	10	30	100
2up		1	0	2	4	4	1	19	7	9	32	29	52
2down		1	2	11	4	1	2	8	7	11	0	1	0
Tam	Tamoxifen												
	Time (hr)	2			4			8			24		
	Dose (µg/kg)	1	3	10	1	3	10	1	3	10	1	3	10
2up		1	0	0	7	3	11	0	3	4	4	20	2
2down		7	11	4	1	11	3	9	31	4	0	0	2

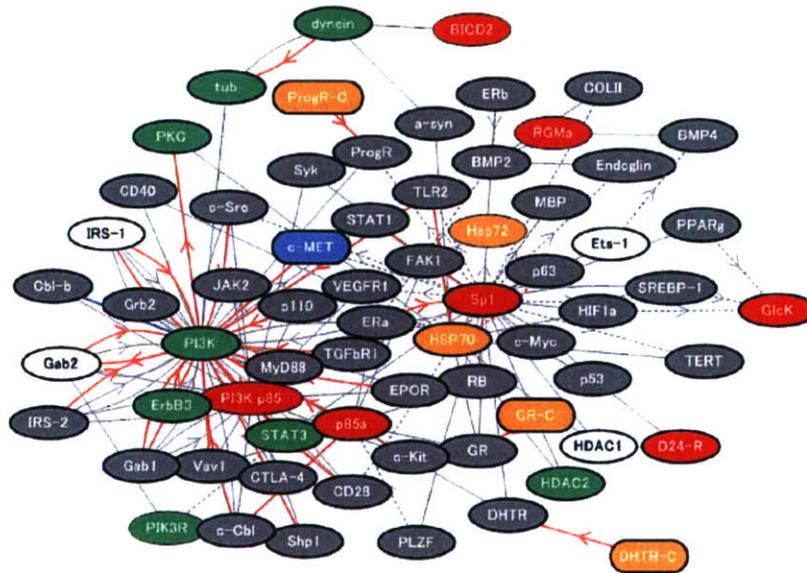
A

Troglitazon; 10(mg/kg), 4hr



B

Genistein;  
100(mg/kg), 8hr



C

Tamoxifen; 10(μg/kg), 4hr

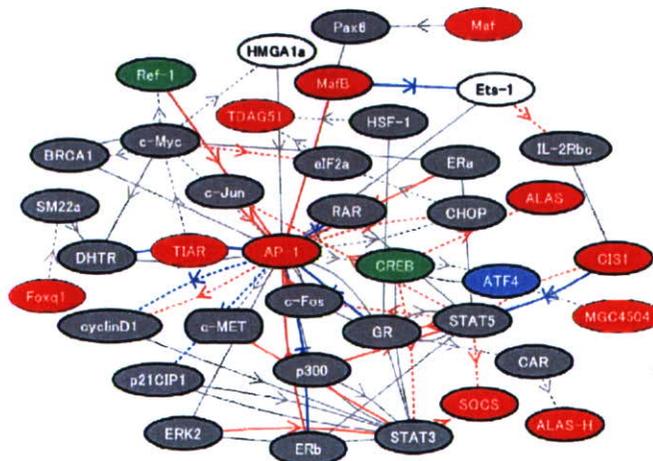
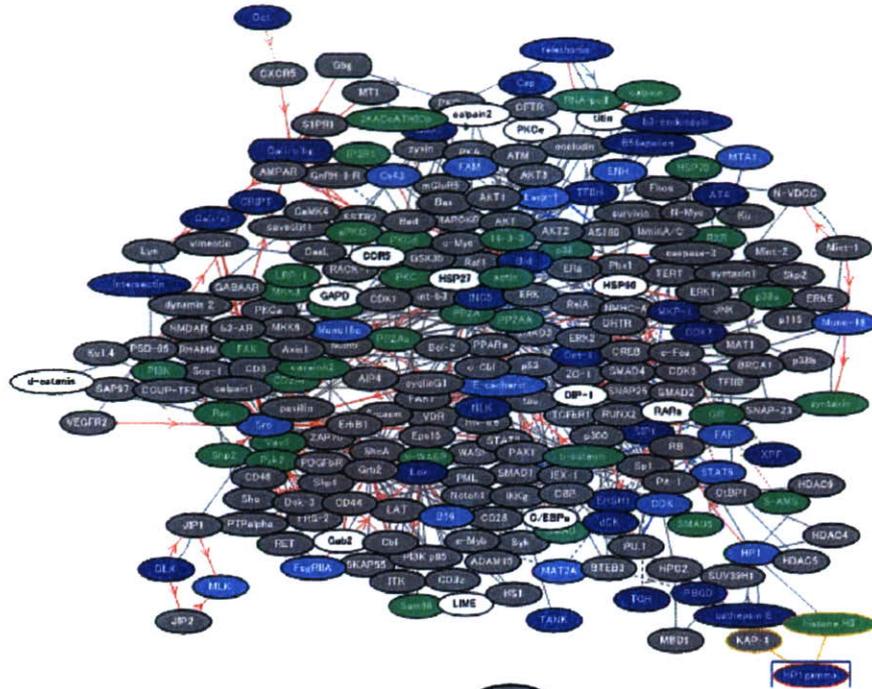
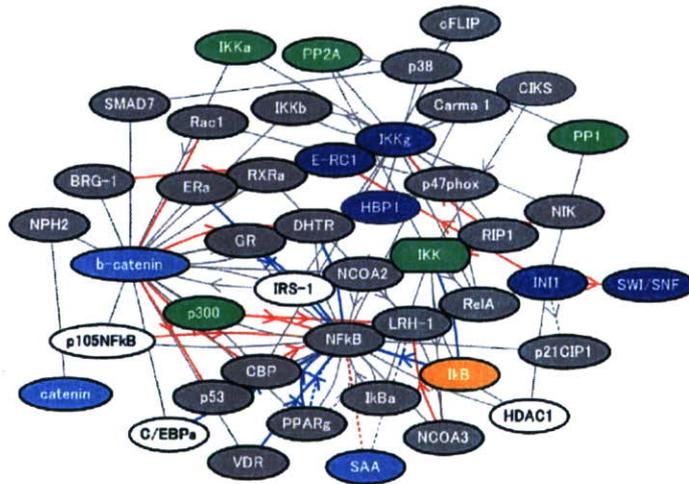


图 2 Upregulated networks

A  
Troglitazone;  
10(mg/kg),  
4hr



B  
Genistein;  
100(mg/kg),  
8hr



C  
Tamoxifen; 3 (μg/kg), 4hr

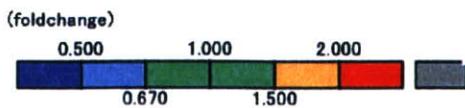
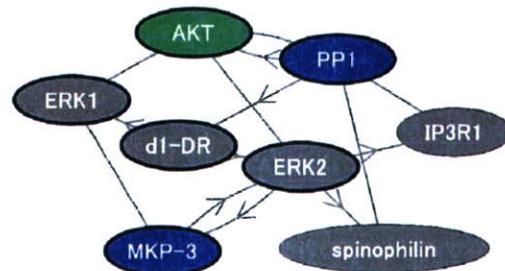


图 3 Downregulated networks

表2 分子ネットワークのサマリー (図2 Upregulated networks に対応)

•Troglitazon; up 10 (mg/kg), 4hr

**Pathway**

rank	name	score
1	TPO シグナル伝達	9.827
2	AKT シグナル伝達	7.046
3	GR による発現調節	5.308

**Pathological Event**

rank	name	score
1	癌 (Cancer)	23.697
2	赤血球生成 (Erythropoiesis)	15.211
3	骨制御 (Bone Regulation)	13.581
4	血管新生 (Angiogenesis)	8.781
5	小胞体ストレス (Endoplasmic Reticulum Stress)	8.031
6	ステロイド制御 (Steroid Regulation)	7.722
7	上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	7.511
8	肥満細胞機能 (Mast-cell Function)	7.075
9	血小板機能 (Platelet Function)	6.725
10	日光暴露 (Sun Exposure)	5.38

•Genistein; up 100 (mg/kg), 8hr

**Pathway**

rank	name	score
1	HGF シグナル伝達	9.07
2	prolactin シグナル伝達	8.315
3	Neurotrophin シグナル伝達	6.348
4	IL-4 シグナル伝達	5.148

**Pathological Event**

rank	name	score
1	癌 (Cancer)	54.517
2	赤血球生成 (Erythropoiesis)	33.507
3	肥満細胞機能 (Mast-cell Function)	24.167
4	血栓 (Thrombosis)	13.375
5	インスリン制御 (Insulin Regulation)	12.121
6	過敏性 (Hypersensitivity)	11.522

7	自己免疫 (Autoimmune)	9.267
8	自食作用 (Autophagy)	8.601
9	血管新生 (Angiogenesis)	8.369
10	骨制御 (Bone Regulation)	7.6

•Tamoxifen; up 10 (µg/kg), 4hr

**Pathway**

rank	name	score
1	AP-1 による発現調節	28.406
2	TPO シグナル伝達	11.643
3	IL-7 シグナル伝達	10.489
4	IL-5 シグナル伝達	8.025
5	ER による発現調節	7.272

**Pathological Event**

rank	name	score
1	癌 (Cancer)	33.424
2	小胞体ストレス (Endoplasmic Reticulum Stress)	14.088
3	依存症 (Addiction)	12.212
4	赤血球生成 (Erythropoiesis)	11.579
5	嗅覚 (Smell)	7.771
6	卵巣機能 (Ovary Function)	7.227
7	骨制御 (Bone Regulation)	5.924
8	タイトジャンクション (Tight Junction)	5.458
9	ステロイド制御 (Steroid Regulation)	5.423

表 3 分子ネットワークのサマリー (図 3 Downregulated networks に対応)

•Troglitazon; down 10 (mg/kg), 4hr

**Pathway**

rank	name	score
1	G タンパク質(Gi/o)シグナル伝達	19.257
2	CASK シグナル伝達	6.344
3	TCR(a/b)シグナル伝達	5.321

**Pathological Event**

rank	name	score
1	癌 (Cancer)	77.513

2	上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	54.547
3	肥満細胞機能 (Mast-cell Function)	34.99
4	タイトジャンクション (Tight Junction)	33.059
5	赤血球生成 (Erythropoiesis)	27.238
6	血管新生 (Angiogenesis)	20.842
7	小胞体ストレス (Endoplasmic Reticulum Stress)	17.542
8	化学療法 (Chemotherapy)	16.21
9	アポトーシス (Apoptosis)	16.179
10	血栓 (Thrombosis)	15.194

• Genistein; down 100 (mg/kg), 8hr

#### Pathway

rank	name	score
1	NFκB シグナル伝達	32.348
2	TLR3 シグナル伝達	9.341
3	TLR4 シグナル伝達	7.479
4	TLR1/2/6 シグナル伝達	7.254
5	RIG-I シグナル伝達	6.352
6	TLR5/7/8/9 シグナル伝達	6.11
7	LRH-1 による発現調節	5.888

#### Pathological Event

rank	name	score
1	上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	21.559
2	癌 (Cancer)	19.167
3	微生物感染 (Microbial Infection)	19.088
4	小胞体ストレス (Endoplasmic Reticulum Stress)	18.2
5	日光暴露 (Sun Exposure)	15.112
6	薬物毒性 (Drug-Induced Toxicity)	13.301
7	骨制御 (Bone Regulation)	9.594
8	細胞周期 (Cell Cycle)	8.801
9	食細胞システム (Phagocyte System)	8.186
10	血小板機能 (Platelet Function)	7.377

• Tamoxifen; down 10 (μg/kg), 4hr

#### Pathological Event

rank	name	score
------	------	-------

1	神経毒性 (Nephrotoxicity)	18.943
2	肥満細胞機能 (Mast-cell Function)	15.587
3	癌 (Cancer)	13.069
4	幻覚症状 (Delirium)	6.189
5	依存症 (Addiction)	5.47
6	赤血球生成 (Erythropoiesis)	5.261
7	線維芽細胞機能 (Fibroblast Function)	5.05
9	薬物毒性 (Drug-Induced Toxicity)	7.724
10	骨制御 (Bone Regulation)	5.332

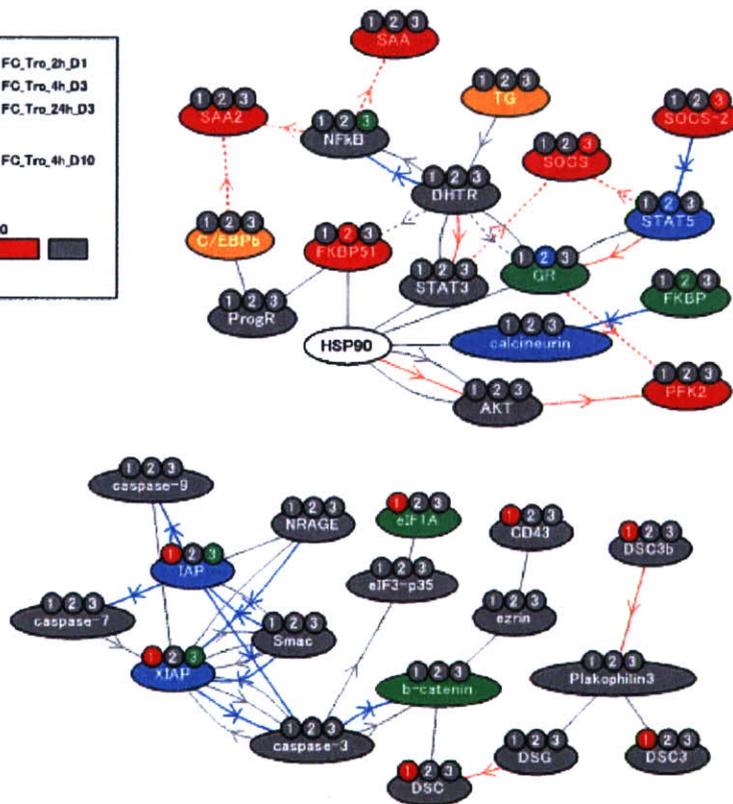
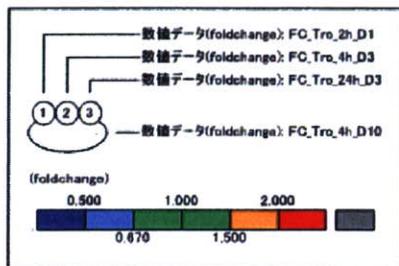


図 4 Merged networks

表 4 分子ネットワークのサマリー (図 4 Merged networks に対応)

Pathway

rank	name	score
1	cytochrome c シグナル伝達	13.348
2	TPO シグナル伝達	7.794
3	Netrin シグナル伝達	6.609
4	caspase シグナル伝達	5.724
5	AKT シグナル伝達	5.093

**Pathological Event**

rank	name	score
1	アポトーシス (Apoptosis)	26.51
2	癌 (Cancer)	21.763
3	上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition)	18.722
4	赤血球生成 (Erythropoiesis)	12.263
5	骨制御 (Bone Regulation)	10.662
6	血管新生 (Angiogenesis)	6.883
7	小胞体ストレス (Endoplasmic Reticulum Stress)	6.153
8	タイトジャンクション (Tight Junction)	5.889
9	ステロイド制御 (Steroid Regulation)	5.854
10	肥満細胞機能 (Mast-cell Function)	5.23

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

超高速分析法の比較解析と評価に関する調査研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

本研究班では、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・中間報告追補に示された「試験スキーム」に沿って要求される順位付けの為の大規模スクリーニングをすすめるとともに、内分泌かく乱物質を始めとする、核内受容体を標的とする化学物質について分子間相互作用への影響や遺伝子発現への影響など生体作用の科学的根拠に関わる諸要因に関する基礎的研究を進め、そのメカニズムに立脚した受容体標的毒性物質の評価研究への応用を目指している。一方、内分泌かく乱化学物質の問題解決に向けた取り組みは、欧米諸外国においても進められており、その評価基準やガイドライン策定は、国際的な強調のもとに行われるべきである。本研究では、本研究班における各スクリーニング系より得られた測定結果の比較解析を行い、その結果をもとに我が国におけるスクリーニング系の開発状況として OECD 等において報告するとともに、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング系としての評価基準を満たすものについて、国際的・国内的なバリデーション(有効性確認)あるいはプレ・バリデーションの対象となる手法としてガイドライン化を念頭に国内外で提案することを目的とする。本年度は、効率的かつ信頼性の高いスクリーニングスキームの確立に向けて、これまでに得られている各スクリーニング系における測定結果の比較解析を行い、各手法の特性や有用性について評価を行った。また、本研究におけるこれまでの研究成果をもとに OECD へのガイドライン化の提案を行っている ER $\alpha$  アゴニスト測定系に対するピアレビューコメントへの対応を行うとともに、さらに ER $\alpha$  アンタゴニスト測定系、AR アゴニスト・アンタゴニスト測定系についても、OECD ガイドライン化に向けて SPSF(Standard Project Submission Form)の提出を行った。

A. 研究目的

これまでに我々は、本研究に先立つ研究において内分泌かく乱化学物質 HTPS としてエストロゲン受容体  $\alpha$  及び  $\beta$  (ER $\alpha$ ) レポーター遺伝子導入 Hela 細胞系及び ER $\alpha$  及び  $\beta$  受容体ドッキングモデルを用いた *in silico* スクリーニング手法の開発を行い、実際に大規模スクリーニングを実施し HTPS 系としての検証を進めてきた。その研究成果は、厚生労働省「内

分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」における「試験スキーム」提案の基礎データ、及び内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会・中間報告追補における試験スキーム中のスクリーニング試験法及びその評価に資する関連データとなっている。

上述の「試験スキーム」におけるスクリーニングの位置付けは、各種のスクリーニング試験をバッテリー試験として実施し、後に続く確定試

験に供する物質の優先順位を決めることにある。それぞれ特色の異なる試験を組み合わせで評価することにより得られる優先順位リストは、常に最新の科学的知見に基づき更新され、取りこぼしの無いスクリーニングを行うことを可能とする。本研究班では、スクリーニングスキームの拡充を目的としてこれまでに構築した各スクリーニング手法の検証に加え、ER と並んで内分泌かく乱化学物質の標的となりうる核内受容体である AR、TR 系レポーター遺伝子測定系や ARドッキング *in silico* スクリーニング法の構築を行うとともに、核内受容体の作用機構に着目した手法として分子間相互作用解析によるスクリーニング手法や遺伝子発現解析によるパスウェイスクリーニング手法について研究を進めている。一方、内分泌かく乱化学物質の問題解決に向けた取り組みは、欧米諸外国においても進められており、その評価基準やガイドライン策定は、国際的な強調のもとに行われるべきである。我が国及び国際的なガイドライン及び評価基準策定における、スクリーニング試験法の評価基準として、自然、あるいは人の生活の環境中に存在していて、既に何らかの内分泌学的生体影響が自然、実験を問わず報告されている化学物質を当面の陽性対象物質群として、それらの影響の機序、或いは、影響の強度が十分な精度で観測可能であることが挙げられる。本研究では、本研究班における各スクリーニング系より得られた測定結果の比較解析を行い、信頼性の高い優先順位リスト作成のための試験スキームについて検討するとともに、解析結果をもとに我が国におけるスクリーニング系の開発状況を OECD 等において報告し、そのうち内分泌かく乱化学物質のスクリーニング系としての評価基準を満たすものについて、国際的・国内的なバリデーション（有効性確認）あるいはプレ・バリデーションの対象となる手法としてガイドライン化を念頭に

国内外で提案することを目的とする。

## B. 研究方法

本年度は、これまでの研究により得られているスクリーニング結果のうちエストロゲン受容体に関するレポーター遺伝子測定系、*in silico*ドッキングモデルスクリーニング系及び受容体相互作用解析系の各手法からの測定結果の比較解析を実施し、各手法の特性やスクリーニングにおける有用性や信頼性について考察した。比較解析には、前年度までに得られた各測定データを用いた。

また、本研究におけるこれまでの研究成果をもとに OECD へのガイドライン化の提案を行っている HeLa 細胞系 ER $\alpha$  アゴニスト測定系についてピアレビューコメントへの対応を行うとともに、さらに ER $\alpha$  アンタゴニスト測定系、AR アゴニスト・アンタゴニスト測定系についても、OECD ガイドライン化に向けて SPSF(Standard Project Submission Form)の提出を行った。

一方、*in silico*ドッキングモデルスクリーニング系については、VMG-NA とあわせて行われた ED-QSAR ワーキンググループミーティングにおいて本研究班における開発状況の報告を行った。

## C. 研究結果

### レポーター遺伝子スクリーニング測定

表1に、本研究ならびに先立つ研究における大規模スクリーニングにより測定された各種レポーター遺伝子アッセイ系測定済みの化合物数を示す。表は平成 19 年度に測定を実施した化合物を含む。これまでに ER $\alpha$  アゴニスト測定系においては、恒常的発現系及び一過性発現系あわせて約 600 化合物についての測定を終了している。また、ER $\beta$  発現系については、一過性発現系のみ利用可能であり、これまでに 340 化合物について測定を完了し

た。一方、新たに検討を始めたAR、TR系においては各 200 化合物の測定データを得た。

### in silico スクリーニング系とレポーター遺伝子測定系

図1には、結合実測値と *in silico* 予測値との比較を示した。なお結合実測値として、製品評価技術基盤機構の化学物質総合情報提供システムにて公開されている ER $\alpha$  競合結合アッセイのデータを用いた。*In silico* からの予測データは、実測値と非常に良く相関し、さらに偽陽性となる化合物は多いが、偽陰性は認められない。一方、図2にはレポーターアッセイアゴニスト測定系における、PC50 もしくは PC10 値と *in silico* 予測値との比較を示した。なお、これまでの検討から恒常的発現系と一過性発現系からの測定結果は、ほぼ一致することが確かめられており、今回は両者をあわせて解析に用いた。PC10 が測定される比較的弱い活性物質の一部では予測値からのぶれが認められるが相関性は高く、PC50 が認められる物質いずれも予測値-2 以上で示された。この値は、本研究で計算を行った 15000 化合物の上位 3 分の 1 程度の化合物に相当する。図3は、*in silico* 予測値ごとのレポーター活性値の化合物数分布を示す。予測値が高くなるにつれ活性を示す化合物の割合が高くなる。レポーター測定系との比較においても偽陽性は多いが、偽陰性は認められない。

### レポーター遺伝子系と受容体結合の比較

図4にレポーター遺伝子測定結果から化合物を 3 区分(活性非検出、PC10 検出、PC50 検出)して、受容体結合実測値と *in silico* 予測値の関係を示した。レポーター測定系では、PC50 が検出されるが結合アッセイではネガティブとなる化合物(青枠)やレポーター測定では活性が検出されないが、結合活性を示す化

合物(緑枠)が認められる。これらの化合物の多くは、*in silico* 予測値では、いずれも-2 を超える値を示している。

### 受容体共役因子相互作用スクリーニング

上述のとおり受容体結合活性とレポーター活性の結果は必ずしも一致しない。そこで、本研究班で検討を進めてきた受容体共役因子相互作用スクリーニングによりそれらデータギャップのある化合物の測定を行った結果を図5、6に示す。図5に示すとおりPC50 が検出されるものの結合活性が認められない化合物では、相互作用スクリーニングはネガティブ、一方、図6に示すとおり明らかな結合活性が認められた化合物では、ポジティブの結果が示された。

### OECD VMG-NA5 及び QSAR ワーキンググループ

本研究班において研究を進めている各スクリーニング系について、OECD VMG-NA5 において小野班員より報告を行うとともに、これまでに OECD ガイドライン化の提案を行っている ER $\alpha$  アゴニスト測定系に対するピアレビューコメントへの対応を行った。さらに ER $\alpha$  アンタゴニスト測定系、AR アゴニスト・アンタゴニスト測定系についても、OECD ガイドライン化に向けて SPSF(Standard Project Submission Form)の提出を行った。*In silico* スクリーニングを含む QSAR に関しては、VMG-NA5 にあわせて行われたアドオンミーティングにおいて本研究班における解析結果の報告を行い、今後の共同研究も含めた方針について議論を行った。

### D. 考察

本研究では、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・中間報告追補の「試験スキーム」に示されたスクリーニング

系の検証と拡充及び評価基準のため、本研究および先立つ研究によって得られた特徴の異なる評価系からの結果の比較解析により、各スクリーニング系の組合せによる効率的かつ信頼性の高い評価法について検討した。本研究班におけるER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR及びTRレポーター遺伝子アッセイによる大規模スクリーニングの結果、いずれの系においても一般に利用されている多岐に渡る化学物質による受容体活性が検出された。これまでに活性の知られていない化学物質も多く含まれていることから、本測定法がスクリーニング系として有用であり、本研究班により蓄積されたデータが詳細試験優先順位付けに直接利用可能であると考察された。一方、本研究班で研究を進めてきた *in silico* スクリーニングは、受容体構造をもとにしたドッキングモデルを構築し、受容体結合活性について予測計算を行う手法であり、従来のQSARとは大きく異なり、構造の多岐に渡る化合物に対して適用可能である。本研究班で構築したER $\alpha$ 、ER $\beta$ モデルでは、モデル構築時に行った検証では予測値と独立に測定された結合アッセイの文献測定値の相関係数は、それぞれ0.73、0.66とそれほど高くはない。本研究では、独自にドッキングモデルを用いたスクリーニングの有用性について評価を行うため、ER $\alpha$ 予測値に関して先の検証に用いた文献値とは別に報告されている結合実測値との比較を行った。さらに、ドッキングモデルは化合物の受容体結合を予測するものであるが、本研究ではさらにレポーターアッセイ系におけるER $\alpha$ アゴニスト測定データとの比較を試みた。いずれとの比較においても結合実測値及びレポーター測定系における活性値は良く相関し、さらに適当な *in silico* 予測値を閾値として偽陽性となる化合物は多いが、偽陰性は認められず、取りこぼしの無いスクリーニングを要求する内分泌かく乱化学物質スクリーニングにおける

*in silico* スクリーニングの有用性が示された。本研究班では、ARについても相関係数0.85と非常に精度の高いドッキングモデル構築に成功しており、ER系と同様に有用性が期待される。OECD及びEPA等では、スクリーニング系として受容体競合結合試験について検討を進めているが、本研究班及び上記の「試験スキーム」においては検討を行っていない。本研究における解析から、結合試験結果とレポーター測定系の結果が一致しない化合物も認められた。それらの化合物について本研究班で構築を進めてきた受容体共役因子相互作用スクリーニング系による解析を行った結果、受容体作用の有無についてより明確な評価が可能でありことが示された。この結果より、相互作用スクリーニング系は他のスクリーニング系を補完する系として有用であり、組み合わせることで効率的かつ信頼性の高い優先順位付けが可能になると考察された。現時点では、内分泌かく乱の標的となりうる全ての核内受容体についてそれぞれのスクリーニング系が確立されていない。今後、他の受容体についてもスクリーニング系構築と検証のための研究を行う必要がある。一方、本研究班で構築を進めたパスウェイスクリーニングは、標的の不明な化学物質について受容体作用の評価が可能であり、さらなるデータの充実をはかることにより生体影響をより詳細に検討可能な手法として有用性が期待される。

本研究班における個別のスクリーニング系についての研究成果及び比較解析結果については、これまでもOECD VMG-NA等において提案を行っており、本年度はOECDガイドライン化提案を行っているER $\alpha$ アゴニスト測定系に対するピアレビューコメントへの対応を行うとともに、さらにER $\alpha$ アンタゴニスト測定系、ARアゴニスト・アンタゴニスト測定系についても、OECDガイドライン化に向けてSPSF