

研究課題名:内分泌かく乱物質の超高速選別法の開発・検証に関する調査研究

主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究要旨

バイオフィールド3次元定量的構造活性相関(3D-QSAR)は、既知の化学物質の化学構造と生物活性をモデル化して関連づけ、そのモデルにより生物活性が分かっている化合物の生物活性を予測する手法である。このためには実験動物あるいは試験管内試験系を用いた内分泌かく乱作用に関する試験結果、化学物質の構造及びホルモンレセプターの構造等を有機的に連携づけることが必須である。この方法は、将来的に高速でかつ経費のかからないハイスループットスクリーニングの一つとしてその効果が期待されるものである。本研究ではこのバイオフィールド3次元定量的構造活性相関に関する情報収集を行い、現在日米で進められている手法、すなわち CoMFA、HQSAR、Pharmacophore による方法、及び、板井らのドッキングモデル法について調査検討し得た。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所
部長

A. 研究目的

創薬の現場ではリード化合物の選定の過程で3次元構造活性相関を用いた電子計算機内での化合物選定が行われている。この方法は、未だに開発途上であるものの、その高速性と経済性から、膨大な数に上る環境化学物質の中から内分泌かく乱作用を持ち得る化合物をスクリーニングするための非常に有効な手段となることが期待される。そして、ここで得られたデータは、次の段階の各種試験によって環境化合物を検討するための優先順位付けの為に、大きな役割を果たすことが期待される。

本研究では、3次元構造活性相関によるエストロゲン受容体に対する各種環境化学物質の結合や機能発現のシミュレーションがどの様に可能で、その精度向上にはどのようなデータを電算機が要求するか、その実現にはどのような問題点があるかを調査研究する事を目的とするものである。また、本班研究が通産省研究班との共同研究であるという立場を利し、OECD 等の国際的活動に対する実験研究の重複を国内で避けることおよび科学的情報の交換を行うことを目的として、内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合の運営を通産省側と共同して行った。

B. 研究方法

アメリカ合衆国アーカンソー州にある
National Center for Toxicological

Research (NCTR) の Estrogen Knowledge Base Program を指揮する Dr. Daniel Sheehan の率いる3次元構造活性相関研究グループを訪問し、使用している手法の種類、研究の進行状況と問題点などについて、詳細に意見交換を行った。日本国内においては、医薬分子設計研究所・板井昭子博士の研究所を訪問し、使用している手法の種類、研究の進行状況と問題点などについて、意見交換を行った。

(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、本研究所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、当研究施設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

NCTR: Estrogen Receptor に対する化合物の結合に関する 3D-QSAR の状の視察及び意見交換: Dr. Sheehan の研究室で行われている 3D-QSAR は、CoMFA、HQSAR と Pharmacophore による検討。

- CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) は、2オングストロームの3次元格子点空間にリガンド分子を置き、格子点にプローブ原子核(通常炭素 13)を置いたときのリガンドとの立体的および静電的相互

作用を全ての格子点についてシミュレーション計算し、リガンドの性質の数値化を行う。3D 空間に分子を配置するところで、手作業が入り経験を有する化学者が必要であり、従って、数をこなせるスピードに限度があるので、別にプレスクリーニング計算が必要である。HQSAR (Hologram QSAR) は、化学物質の構造を部分に分解し、その構造を数値化することにより化合物を数列で表記するもので、その表記と生物学的活性との相関を得るものである。Pharmacophore は、モデル分子(estradiol と DES) の特徴的構造部位を3次元の球で代表させ、その配置と生物活性を連関させる方法であり、定性的判断のみをおこなうものである。

Kepona がこの方法で拾い上げられる(他の方法では難しい)ことが興味深い。これからは、非活性物質から得られた禁止 sphere 的な要素を加える段階である。これらの方法が拠り所としているのは、生物アッセイデータと、4化合物(DES、E2、Tamoxifen、raloxifen) の ER ligand binding domain の結合したままの結晶回析データである。Helix 12 が antagonist の結合時に 90 度方向が変わることも、ある程度条件に組み込んだ段階である。

ドッキングモデル(板井らの方法): ドッキングモデルは、上記の3方法とは考える順番が異なる。この方法は、受容体分子の結合ポケットを構成するアミノ酸等の構造をもとに、そのポケットの立体的、静電的情報を計算し、それに対するリガンドの相互作用

を計算するものである。リガンドとなる化学物質の構造そのものを用いないところから、構造的に非常にバラエティーに富んだリガンドがピックアップされる長所を有している。リガンドに依存したレセプター分子の構造変化、水和水の扱いなどが盛り込まれる。

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合：

厚生省、通産相、農林省、および環境庁の関連研究機関の実験者レベルでの打ち合わせと連絡のための会合を、各省庁係官の同席のもとで、計7回実施した。OECD 対応の子宮肥大試験やハーシュバガー試験について協議した（実績報告書別添第1～7回議事録参照）。

D. 考察

バイオフィールド3次元定量的構造活性相関の利用が、現存する膨大な環境化学物質のみならず将来にわたり増加し続ける新規化合物に対する有効なスクリーニング手法の一つとして注目を浴びつつある。この方法は、生体側の分子(受容体)とそれに結合する化学物質の分子レベルにおける相互作用を考慮した新しい構造活性相関であり、この体系を確立する事は High Throughput の観点からも意義が大きいものであることが認識された。

E. 結論

調査検討したこれらの方法のなかでは、ドッキングモデルがもっとも応用性と柔軟

性に富んでおり、生体分子側の構造変化(リガンド依存性のみならず遺伝子突然変異によるアミノ酸置換等による変化を含む)にも高精度に即応できる優れた面があると考えられた。ただし、どの手法の精度を向上させる為にも、常に生物学的活性のデータなどによるシミュレーションプログラムの教育が必要であり、また、その要求に適合した生物学的実験を効率よく行うことが重要である点が再確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験- 内分泌障害性を中心に- 組織培養工学24 H10年7月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について- 生物学的立場から-

有機合成化学協会誌57(1) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響

ファルマシア35 H11年3月

2. 学会発表

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質(endocrine disruptors)の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向。ポリオレフィン等衛生協議会安全性セミナー

一 H10年3月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 第169回有機合成化学協会懇談会 H10年7月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 H10年10月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション H10年10月

宮城恵理、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純 内分泌かく乱化学物質 (Xenoestrogen)高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応性の経時変化 第15回日本疾患モデル学会 H10年11月

菅野 純 動物の生態と内分泌攪乱物質 (環境ホルモン)について パネルディスカッション 第25回環境保全・公害防止研

究発表会 H10年11月

菅野 純、Kyung-Sun Kang、武木田薫、宮城恵理、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、平林容子、金子豊蔵、井上 達 内分泌かく乱化学物質におけるin vitro試験系のin vivo 試験に対する代替性 第12回日本動物実験代替法学会 H10年11月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について 第9回安科研学術講演会 H10年12月

菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon 内分泌かく乱物質の短期in vivo試験系について 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 H10年12月

小野 敦、山本雅也、高木敦也、菅野 純、井上 達 Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 第26回建築物環境衛生管理全国大会 H11年1月

G.知的所有権の取得状況