

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
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
新しいハイ・スルー・プットスクリーニング法の開発

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

内分泌かく乱物質問題の緊急性に鑑みて、その(1)ハイ・スルー・プットスクリーニング(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究と、(2)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、について検討した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質(EDCs)についての対応は、その候補物質であるホルモン作動性化学物質がすでにヒトを取り巻く環境中に存在し、それらが日常的に暴露対象となっていると考えられるものも少なくない事などから、緊急性を有している。同時にその影響の大きさから科学的に裏付けられた厳正な対応の必要性が求められている。

しかし、一方で生体本来の内分泌系自体の機能やレギュレーション機構については、これまで膨大な研究があるにも関わらず不明の部分も多く存在する。結果として、これまでに様々な化学物質についてその内分泌かく乱性が指摘されているが、それらの生体へおよぼす真の影響やその危険性については依然不明のままである。想定される化学物質による内分泌かく乱性のメカニズムは様々で、たとえば内因性ホルモンの生合成、代謝系、フィードバックなどに影響を与えることによっても内分泌系はかく乱される。しかし多くの化合物について、すでにエストロゲンを始めとしたホルモン受容体との結合性が示されており、それらの化合物ではレセプターとの結合を介してその作用を惹起すると考えられる。エストロゲンを始めとするホルモンは、その「特異的」レセプターと結合することでその作用を発現する。ホルモンと結合したレセプターは、DNA上の応答

性DNA配列に結合し、さらに補因子が結合して転写因子として機能しこれに続く生体反応を引き起こす。これら相互作用の変化はリガンド結合による受容体立体構造の変化によるものであり、これまでの研究から化合物のリガンドとしての生体作用は、その化合物が結合した受容体の構造と関連する事が指摘されている。

本研究では、内分泌かく乱物質問題の緊急性に鑑みて、その(1)ハイ・スルー・プットスクリーニング(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究と、新しい視点からリガンド結合と受容体構造変化の関連に注目した(2)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、について検討した。

B. 研究方法および研究結果

(1)ハイ・スルー・プットスクリーニング(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究

(1)-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)

研究目的: 本委託研究では通産省との共同研究として、EDSTAC が提案した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、必要な改良を行う事を目的とする。

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 EDCs 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)が、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。

上述の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ホルモン様作用を検出する手法と位置付けられている。本委託研究では通産省との共同研究として、EDSTAC が提案した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、必要な改良を行う事を目的としている。

Reporter Gene Assay の原理: 核内レセプターを介したシグナル伝達は標的遺伝子の発現を制御する役割を担っており、この点から遺伝子の発現調節の解析手段として繁用されている Reporter Gene Assay の手法は核内レセプターを介したシグナル伝達のかく乱の検出手段に応用することが可能である。ある種の遺伝子はその構造遺伝子(

蛋白質をコードする領域)の上流或いは下流にその遺伝子の転写量を調節する領域(調節領域又はシス領域)が存在する。核内レセプターを介した転写制御はそれぞれのホルモン応答性遺伝子のシス領域にリガンドとレセプターの複合体が結合することによって応答性遺伝子産物の転写量が増減し、結果としてそのホルモンの生理活性が発現することとなる。ステロイドホルモンレセプターや甲状腺ホルモンレセプターはリガンドと結合し、二量体を形成した後各ホルモン応答性遺伝子のシス領域に結合し、その遺伝子の転写を促進する。

Reporter Gene Assay は各ホルモン応答性遺伝子のシス領域の下流に Luciferase、 β -galactosidase 等、通常その細胞では発現していない酵素等の遺伝子を人為的に組み込んだ Plasmid を細胞内に導入し、導入された遺伝子産物の量(酵素活性)を化学発光法や比色法によって検出し、シス領域の転写活性を推定する方法である。

現在、開発が進められている Reporter Gene Assay による化学物質の内分泌かく乱能力の検出には 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 と各ホルモ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 も同時に使用される。今の High Throughput Screening にはこれらの Reporter Plasmid とレセプター発現 Plasmid を安定的に組み込んだヒト由来の細胞(HeLa cell)を用いた。

材料及び方法: 系の作動性を検討するため測定に供した既知化学物質を表1に示す。細胞: HeLa(ER α) 安定形質転換細胞株を住友化学株式会社より入手した。細胞株は H10 年度入手株(旧株)及び H12 年度入手株(新株)の2株を実験に用いた。EMEM-10%FBS 培地の調製: 粉末培地(イーグル MEM ニュスイ) 4.7g、10% 炭酸水素ナトリウム(10g $\rightarrow$ 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。細胞溶解剤の調製: 5 倍濃 Cell Culture Lysis Reagent (CCLR、プロメガ株式会社) 10mL に精製水を加え 45mL とした。Luciferase Assay Reagent の調製: Luciferase Assay Substrate ((株)プロメガ) の容器に Luciferase Assay buffer 105 mL 全量を直接加えて溶解した。化合物原液の調製: 各化合物を秤量した後終濃度が 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 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nM 及び 1nM とした。化合物は Assay plate 中に終濃度が 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM 及び 1pM となるように添加した(表2)。Assay の手順: 化学物質の転写活性化能の解析は以下の手順で行った。

-
- ↓ 細胞を測定用の 96well プレートに播種 (10⁴/well)
 - ↓ 化合物の添加(終濃度 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM 及び DMSO 各 n=4)*
 - ↓ 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×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(100 msec×50 interval)の積算

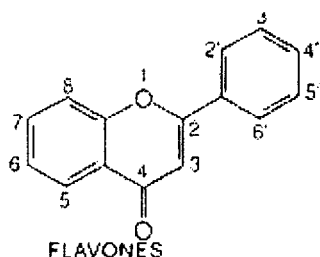
結果の解析: 各濃度区で得られた発光強度の平均値は、陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率 (Transcriptional activity)

を求めた。また、陰性対照区の発光強度の平均 + 3SD を陽性と判断される閾値 (Threshold)、陽性対照区の転写活性化倍率の 1/2 の値を与える濃度 (PC50) を近似式より求め、用量反応曲線から反応ピークが観察される場合には最大転写活性の 1/2 を与える濃度 (EC50) を Logistic 式より求めた。

結果の解析の流れは図1に示した。

結果及び考察: 55 化合物について ER α / HeLa 新株を用いて Reporter gene assay を実施した結果、PC50 値が算出された化合物は値の低い順すなわち Estrogen 活性の強い順に Equilin、Fenbuconazole、5,7-dihydroxy-2,3-diphenyl-4H-chromen-4-one、Equol、6,4'-dihydroxyflavone、3,6,4'-trihydroxyflavone、Norethrin-drone、Bisphenol B、Norgestrel、5,7-dihydroxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one、2,3-diphenyl-7-hydroxy-4H-1-benzophran-4-one、p-cumylphenol、5,4'-dihydroxy-flavone、7,4'-dihydroxyflavone であった。また ER α / HeLa 旧株を用いて同様に Reportergene assay を実施した結果 Estrogen 活性の強い順に Equilin、Fenbuconazole、Norethrin-drone、Equol、Norgestrel、6,7-dihydroxyflavone、6,4'-dihydroxyflavone、Clomiphene、6,3'-dihydroxyflavone、3,6,4'-trihydroxyflavone、Bisphenol B、p-cumylphenol、7,3'-dihydroxyflavone、5,7-dihydroxy-2,3-diphenyl-4H-chromen-4-one、ICI 47699、o.p'DDE であった。これらの内、5,7-dihydroxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one、2,3-diphenyl-7-hydroxy-4H-1-benzophran-4-one、4'-dihydroxyflavone 及び 7,4'-dihydroxyflavone は新株のみで PC50 が算出され、6,7-dihydroxyflavone、Clomiphene、6,3'-dihydroxyflavone、

7,3'-dihydroxyflavone、ICI 47699 及び o,p'DDE は旧株のみで PC50 が算出された。DDT の代謝物である o,p'DDD や o,p'DDE は旧株のみで活性がみられ、構造の類似した Flavone 類の反応を新旧2株で比較した場合、6 位に水酸基を持つ誘導体である(6,7-dihydroxyflavone、6,4'-dihydroxyflavone、6,3'-dihydroxyflavone、3,6,4'-trihydroxyflavone 等)は旧株に対して反応性を有し、4'位に水酸基を持つ誘導体(6,4'-dihydroxyflavone、3,6,4'-trihydroxyflavone、7,4'-dihydroxyflavone、5,4'-dihydroxyflavone 等)は新株の反応を引き起こす傾向がみられることから、新株及び旧株は化学物質に対する反応性に差を有する可能性が示唆された。



新株は発現しているヒト Estrogen receptor (ER) alpha 遺伝子の塩基配列に変異はないとされているが、旧株は導入した ER 遺伝子に Point mutation が生じ、発現している ER の Ligand binding domain (LBD) にアミノ酸置換が生じていることが指摘されている。今回新旧2株で化学物質に対する反応性に差が見られたことは LBD の一次構造の相違が化学物質による転写活性化誘導能に変化を与え得ることを示している。LBD の一次構造は多くの動物種間でよく保存され相同性が高いものの、動物種の違いによっても化学物質に対する感受性に差が存在する可能性を示唆している。LBD の一次構造とそれに伴う二次、三次構造の変化、更には LBD の構造の相違による化学物質に対する反応性の変化を解析することは化学物質のホルモン様作用の発現メカニズム解析、構造活性相関によるホルモン様作用物質

の Screening 法開発に関して有用な情報を提供するものと思われる。

(1)-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・毒性部)

研究目的: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、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攪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 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。また、OECD に於いても *in vivo* 試験系の立ち上げが進むとともに、その前段階としての *in vitro* スクリーニング法の開発・評価プロジェクトの必要性が取り上げられつつあるといった展開となっている。上述の 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類化学物質のホルモン作用を検出する手法と位置付けられており、現在、我が国で継続的に実験手法の開発及び検証試験が進められている。

本年度は、WHO/IPCS、EPA/EDSTAC、および OECD/EDTA 等の各方面からの情報を収集し、もって、我が国の HTPS の国際的位置関係、将来性を含んだ当 HTPS の将来性の評価、問題点を整理した。

研究方法:本班研究の前身的研究班であった「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(H10-生活-508

」で、数次にわたって開催した厚生省・通産省を主体とし、農林省・環境庁を含んだ「内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合」において得られた情報を中心に、国内の進捗状況及び、諸外国の情報を集積した。また WHO/IPSC や OECD/EDTA への出席、米国 EPA メンバーとの情報交換により、国際的動向および我が国の立場を把握するための情報を収集し、別途、会議報告資料としてこれをまとめた。

研究結果：米国 EPA/EDSTAC が OSI Pharma-ceuticals に委託したヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系立ち上げ研究に関する報告 (Endocrine Profiling Pilot Screen Report) によると、まずホルモン受容体の発現が細胞株自体に見られるヒト細胞株 (ER=T47D 細胞、AR=MDA-MB-453 細胞、TR=HeLa 細胞) にレポーター遺伝子のみを導入する方法で行われた HTPS 系は、経費の見積もりが低すぎたため、所定の結果を得るところまで検討が続行出来なかった点以外に①細胞株の応答性が乏しく、更に、この②培養血清のロット間での反応性のばらつきも見られ③代謝系を模倣する系の組み込み (cyp3A4 系) が完了していない、④手作業とロボット作業での反応性に差があり、ロボット設定が至適でない、などの問題点も指摘されている。

今後の EDSTAC の対応として、EPA は現行の HTPS は中止し、「HTPS Challenge Program」と称する方法を開始することとした。これは、情報が豊富な既知の化学物質 (数百物質) について、参加希望者が個々に持っている既存のシステムを用いてそれが HTPS として機能するかの如何を試行し、そのデータを持ち寄って最良の方法を見いだすというものである。

他方、OECD は、子宮肥大試験、Hershberger 試験、および改良テストガイドライン 407 (28日間反復投与試験) のプロトコールのプレバリデーション・バリデーション作業の

目途が立ち始めたことから、未知の物質に遭遇した際の用量設定方法を含む体系的な内分泌かく乱物質問題対応構図の描出に着手する意向が顕在化しつつあり、*in vitro* 評価系の一つとして HTPS そのもの、あるいはそこから発信されるデータの入手法、利用法についての提案が準備されつつある状況にある。

国内では、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系を、全て HeLa 細胞をベースに構築し、少なくとも ER α について、代謝活性系を組み合わせたものも含めて、ある程度の感度を保存したロボットが完了している。しかし細胞株の不安定性、方法の煩雑さ、経費の問題などから、この系の細胞株を含めた改良の必要性が指摘されている。特に安定細胞株を得て、それを維持する事の難しさが明らかとなり、transient transfection 法の再考論も現場からは持ち上がっていると伝えられている。また、併せて無細胞系の新しい方法 (小野・橋本班員報告参照) の開発も同時に進行させる事の重要性が確認されている。

考察：内分泌かく乱化学物質問題には、(1) 無作用量と無毒性量の見極めや、胎児影響の解析など、化学物質による内分泌かく乱の分子生物学的メカニズム解明が必要な研究対象、(2) ヒトが暴露されうる既存化学物質および、今後暴露されうる新規化学物質のホルモン様作用活性の緊急的検出作業とがあるが、後者についても、既存概念に基づく手法の技術開発のみならず、メカニズム研究によりもたらされる新しいエンドポイントと手法の検討が必須である。現在、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系で実用に耐えそうなレベルにあるもの (代謝活性系を含む) は我が国の ER α に関するシステムが世界をリードしている。今後、この系から発信されるデータの有用性を含めて、今後の研究開発の方向性を見極める作業が必要である。

(2) 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

(2)-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: ビアコア株式会社に対する委託業務)

研究目的: 本委託研究ではビアコア社が開発した表面プラズモン共鳴センサーを用いて、核内受容体をターゲットにした内分泌かく乱候補物質のアッセイ系の確立、また、このアッセイ系をもとに、高速分析法とそれに基づくハイスループット化のための技術開発を行い、大規模なスクリーニングが可能なアッセイ系の確立を目的とする。実験にはリガンドが既知のエストロジェン受容体 (α 型と β 型) とアンドロジェン受容体の他にリガンドが未知の核内受容体である Ad4BP/SF-1 と Dax-1 を用いる。Ad4BP/SF-1 と DAX-1 は分子内にリガンドを結合することができると予想される領域を有するのであるが、未だそのようなリガンド分子が明らかになっていない。これらの受容体は生殖腺や副腎皮質などのステロイドホルモン産生組織の分化に不可欠な転写因子としての機能を有するものであり、その転写活性は生体内でのステロイドホルモン量の変動を調節している。従ってこのような転写因子のリガンド、もしくはリガンド活性を示す外来性物質の存在は生体の内分泌調節系をかく乱する可能性がある。本研究ではこれらのオーファンレセプターをとりあげることと、 α 型と β 型エストロジェン受容体やアンドロジェン受容体に絞られてきたこれまでの研究を、更に多面的に展開することで生殖腺に対する内分泌かく乱物質の影響を検討した。

研究方法: 1) ホルモンレセプターの発現と精製: ヒト α 型と β 型エストロジェン受容体お

よびヒトアンドロジェン受容体の cDNA マウス Ad4BP/SF-1 とマウス Dax-1 の cDNA (後2者は基礎生物学研究所細胞分化研究部門でクローニングしたもの) について、バキュロウイルスを用いた発現システムにより、これらの cDNA からタンパク質を発現させるために、GIBCO BRL 社より購入した pFASTBAC のマルチクローニングサイトに cDNA を挿入した。得られた発現ベクターのコンストラクトは添付した図2に示す。これらの発現ベクターを昆虫細胞由来の Sf-9 細胞に感染させ、力価の高いウイルス粒子を得、更に高発現用の細胞である HIGH5 に感染させる。この細胞で発現されるタンパク質を精製することで、実験に必要なタンパク質の調製を行う。2) エストロジェン受容体系を用いたハイスループット性能の検討: アッセイでは受容体の標的配列をもつ DNA を結合させたビアコアセンサーチップを用いる。具体的には図 2 に示すように、ビオチン標識した標的配列を持つ DNA をあらかじめstreptavidinコートしたセンサーチップ上に結合させる。このチップ上での DNA と受容体の複合体の形成過程を、ビアコアを用いて重量の変化として検出する。この系をハイスループットとするための方策として、既存の機種であるところの2点測定に特化させた8レーン機 (抗原抗体反応専用) への応用の可能性を検討する。

研究結果: 1) ホルモンレセプターの発現と精製: 現在、各種 cDNA コンストラクトを用いたウイルス粒子を調整中である。今後、調整されたウイルス粒子を更に高発現用の細胞である HIGH5 に感染させ、この細胞で発現されるタンパク質を精製し、実験に必要なタンパク質の調製を行う。2) エストロジェン受容体系を用いたハイスループット性能の検討: 既存の機種であるところの2点測定に特化させた8レーン機 (抗原抗体反応専用) への応用の可能性を検討ため、スウェーデンビアコア本社技術者と検討を継続中である。チッ

プへ結合させるベイトに DNA 断片(ERE)を用いる以外の方策として、供役因子断片ペプチドなどが考えられた。また、ソフトウェア的に観測時点の拡張が可能であるか否かの観点からも検討中である。

考察: α 型と β 型エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体とオーファンレセプターである Ad4BP/SF-1 と Dax-1 受容体との外来性物質の相互作用について、ピアコアを用いた検討が、本研究の目的達成に必要である。本年度は培養細胞を用いた発現系が動き出したところである。今後効率の良い発現と精製系の組み立てを進める。

一方、エストロゲン受容体系を用いたハイスループット性能の検討のなかでチップの再生条件が問題の一つであることが明らかとなった。DNA 結合活性を有するレセプター類は多くの場合、およそ 0.5 M NaCl によって DNA から解離する。タンパク質は SDS に対し非常に感受性が高く種々の活性の失活を招く。本実験ではこのような条件で完全な解離が認められなかった。このことは DNA を介さないレセプターのチップへの結合も起こっていることが示唆され、このような非特異的結合の回避法が今後解決すべき問題として残された。

(2)-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):

研究目的: 本研究では、内分泌かく乱物質の生体作用メカニズムの解析のため、ホルモンレセプターシグナル伝達系の個々のステップへ与える影響を検討し、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いる。本年度は、表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー(BIAcoreTM)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)との相互作用に及ぼす影響を検討した。

材料と方法: 1) ERE 固定化センサーチップの作成: ストレプトアビジンをあらかじめコートしたセンサーチップにエストロゲンのレスポンスエレメントを含むビオチン化合成オリゴヌクレオチド(5'- Biotin- tcgagcaaagtcAGGTCAcagTGACCTgatcaat-3')をインジェクトして固定化し、引き続き、相補配列のオリゴヌクレオチドをインジェクトしてセンサーチップ上でアニーリングさせ、ERE センサーチップを作成した。 2) ER-ERE 相互作用の測定: ER α を Flow バッファーで希釈して、17 β -Estradiol(E2)もしくは、測定対象の化合物を混合し、氷冷下約1時間インキュベートした後、上述の ERE センサーチップにインジェクトして、SPR 装置(Biacore 3000, Biacore, Sweden)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。リコンビナント Human ER α に加える化合物の濃度は、結合試験の結果をもとにした。 3) バッファーおよび測定条件の検討: バッファー組成の影響およびアッセイに最適な条件の検討のため、バッファー中の KCl、Tween20 の濃度、緩衝剤および pH を変えてそれぞれ測定を行い、この結果をもとに測定用バッファーの組成を決定し Flow バッファーとして用いた。 4) ER-ERE 相互作用の変化の速度論解析: リガンドの結合による ER-ERE 相互作用への影響を定量的に解析するため、結合解離過程の速度論解析を行った。化合物とインキュベートした ER サンプルを Flow バッファーで4~5段階に系列希釈して、ERE センサーチップにインジェクトした。得られたデータより、結合定数(kd)、解離定数(ka)および結合度(KA)を求め、結合したリガンドがそれぞれのパラメータに及ぼす変化を検討した。なお、解析にはコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0)を用い、Langmuir 型 1 対 1 結合式によりパラメータを算出した。

研究結果:精製ER α は、リガンドの存在なしでEREに対する結合活性を示した。さらに、17 β -estradiol(E2)の結合はERのEREへの親和性を濃度依存的に増加させた。またER-ERE相互作用に変化を及ぼすE2の濃度範囲は結合試験による濃度範囲と同じであるという結果から、相互作用の変化はE2結合によるものである事が示された。また、速度論解析の結果、E2の結合、ER-ERE相互作用の結合、解離反応のいずれをも増加させ、この時、kaの増加がkdの増加に比べ大きいことにより見かけの結合定数(KA)が増大することが示された。

Bisphenol-A(BPA)や Genisteine(Gen)でも同様にERのEREへのアフィニティーの増大が示された。しかし解析の結果、BPAやGenが結合した状態では、E2が結合した時に比べて、EREからの解離が遅いことが示された。これらの差はわずかであるがそれぞれの化合物が結合したERではDBDの構造が異なり、生体においては特異的な障害を惹起する可能性が示唆された。一方、アンタゴニストであるICI-182,780やパーシャルアンタゴニストの4OH-Tamoxifenでは、いずれもERのEREからの解離が非常に遅くなることが示された。しかし4OH-Tamoxifenに比べICI-182,780では、解離がより遅くそれぞれが結合したERは互いに構造が異なることが示された。

考察:今回、ERはE2の結合によりEREへの親和性が濃度依存的に増加し、リガンド結合がERのDBD構造変化を引き起こす事が明らかとなった。細胞内ではERはHSP等と結合して存在することが示されており、それらがEREへの結合を抑制しているとも考えられる。E2結合構造のERではEREに対して結合、解離反応のどちらも増加し、ERがE2の結合により結合し易くより離れやすい状態になっていると考察された。一方、アゴニストとして知られるBisphenol-A(BPA)や、植物性エストロジェンのGenisteine(Gen)

)結合ERは、ER-ERE相互作用の違いからE2結合ERとは異なる立体構造を持つことが示された。アンタゴニストであるICI-182,780や4OH-Tamoxifenでは、これら化合物の阻害の機序については、ERのEREへの結合阻害によるともいわれているが、実際、結合速度は非常に遅いものの同時に解離速度も非常に遅くなっていることがわかる。興味深いことに、ICI-182,780が完全なアンタゴニストであるのに対して4OH-Tamoxifenはパーシャルアンタゴニストとして働くことが知られており、結果はそうした違いを反映しているものと考えられた。また、ER-ERE相互作用の差として示されるER構造の違いが、結合した化合物特異的な生体作用と関連する事を示唆した。特に他のアッセイにおいては、単にアゴニストとして示されるBPAやGenがERに引き起こす構造変化は、E2と異なり、このことより生体内においてはE2とは異なる特異な作用を惹起する可能性が示唆された。現在用いられているいずれの系においても、そのエンドポイントはエストロジェンの一部の作用、すなわち単一のレポーター遺伝子発現や子宮肥大といった単一の作用におけるエストロジェンとの同等性のみを捕らえることを目的としている。これに対して、我々の方法ではエストロジェンレセプターへ与える影響の差について感度良く捕らえる事が可能である。こうした構造の差が生体内でどのような異なるeffectsとして表されるのかについては今のところ不明であるが、今後、これらの化合物の*in vivo*系における作用の詳細な検討(特にそれぞれの化合物のより転写活性化される遺伝子の違い等)との比較において明らかになるものと考察された。

結論: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物質による、受容体のDNA結合性、およ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・

解離過程の変化を解析することで、内分泌かく乱性の検討を行う。さらに本系は生体内でのホルモン作用機構に即した解析を特徴としており、個々の化合物の生体内作用について予測性の高い解析が可能である。

この方法によれば、他の HTPS 系と同様にロボティカルなアッセイシステムを構築できると同時に、単にホルモン様の作用を有するか否かではなく、ホルモンレセプターを介したシグナル伝達系に対する機能修飾リアルタイムに速度論的に測定することが可能となり、対象とする化学物質の作用プロファイルを極短時間に鋭敏に検出することが可能となる。

今回、エストロゲン受容体に作用する化学物質では、アゴニストとアンタゴニストそれぞれで特徴的な変化を示すことが明らかとなり、今後、アンドロゲンなど他のレセプターに関しての同様の解析および co-factor との相互作用の解析などを行い、EDCs の内分泌かく乱のメカニズムの解析を進める。

(2)-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 (分担研究者 橋本 せつ子 ビアコア株式会社 開発部)

研究目的: 本研究ではビアコア社が開発した表面プラズモン共鳴センサーを用いて、核内受容体をターゲットにした内分泌かく乱候補物質のアッセイ系の確立の際に、受容体と標的配列の結合に影響を与える種々の条件の解析、センサーチップを再生する際に用いる条件の検討のため、溶媒の組成、インキュベーション条件、チップ再生試薬の条件を検討した。

研究方法と結果: 解析系の感度がバッファの pH と KCl 濃度に大きく左右されることが判明し、組成の異なる9種類のバッファについて、反応性を解析し、至適組成を検討した。その結果、HBS-バッファーにおい

て再考感度(estradiol, 60 %; BPA 51%)および結合シグナル (290-240 RU)が 組成(pH 9.0; KCl 100 mM)において得られた。Tricin バッファーにおいてはさらに高濃度の KCl で選択性は向上したものの、結合シグナルは低下した。ER と化学物質のインキュベーション時間と温度を検討したところ、室温で1時間静置し、測定まで4℃に保存するのが最適であった。

考察: 本年度はエストロゲンレセプターを用い、条件検討を行ったがセンサーチップの再生条件に疑問が残る。通常、タンパク質は SDS に対し非常に感受性が高く種々の活性の失活を招く。本研究で取り上げる DNA 結合活性を有するレセプター類は多くの場合、およそ 0.5 M NaCl によって DNA から解離する。本実験ではこのような条件で完全な解離が認められなかったが、このことはチップに対するレセプターの結合が DNA を介していないことを示すものであると推測される。特に、レセプター分子の安定性はレセプター分子ごとに異なる可能性を十分に考慮しなければならない。また、センサーチップの再生に SDS が必要であることから、センサーチップの作製にさらなる工夫が必要であると思われる。

C. 総括

(1) ハイ・スルー・プットスクリーニング

(High Through Put Screening, HTPS) を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究は、(1)-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)および(1)-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・毒性部)よりなり、前者委託研究では通産省との共同研究として、EDSTAC が提案した化学物質の内分泌かく乱作用の有無

を評価する方法としてのヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系の有用性を独自の立場から検討した。従来の ER α /HeLa 旧株 (H10 年度入手) の ER 遺伝子に点突然変異が生じ、Ligand binding domain (LBD) にアミノ酸置換が生じていることが指摘され、点突然変異を含まない ER α /HeLa 新株 (H11 年度入手) による検討が追加された。興味深いことには、多くの物質は両細胞株においてほぼ同等の結果を得たものの、株間で反応性に差の見える物質が存在した。特に、構造の類似した幾種類かの Flavone 類の反応を新旧2株で比較した場合、6 位に水酸基を持つ誘導体は旧株に対して反応性を有し、4' 位に水酸基を持つ誘導体新株の反応を引き起こす傾向が見られた。この差は、LBD の一次構造に起因すると考えられることから、3次元構造活性相関研究の貴重な材料となる可能性が考えられた。後者研究によって、米国 EPA/EDSTAC、OECD 等との連携の方向性が示され、国内では、無細胞系の新しい方法の開発も同時進行する重要性が認識される。

(2) 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) の開発研究は、(2)-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: ビアコア株式会社に対する委託業務) (2)-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)、および (2)-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 (分担研究者 橋本 せつ子 ビアコア株式会社 開発部) よりなる。本委託研究ではビアコア社が開発した表面プラズモン共鳴センサーを用いて、核内受容

体をターゲットにした内分泌かく乱候補物質のアッセイ系の確立、また、このアッセイ系をもとに、高速分析法とそれに基づくハイスループット化のための技術開発を行い、大規模なスクリーニングが可能なアッセイ系の確立を目的としている。この系には受容体タンパクが必要であり、その合成と基礎的解析を中心とした委託業務と、現在使用可能な試薬で検討可能な基礎的メカニズム研究および技術的研究とから構成されている。タンパク作製は現在、各種 cDNA コンストラクトを用い、ウイルス粒子を調整中の段階である。メカニズム研究としての成果は、リガンド結合が ER の DBD 構造変化を引き起こす事、特に Bisphenol-A (BPA) や植物性エストロジェンの Genisteine (Gen) 結合 ER は、E2 結合 ER とは異なる立体構造を持つことが示された点にある。すなわち、現行の多くのアッセイ系では、作用の強弱のみが測定されるが、今回の結果は、BPA と Gen との間には、結合により ER 構造に違いを生じることから、強弱以外に、質の異なった作用を有する可能性が示唆された点である。技術面では、バッファーの至適組成を得た。この作業は、幾つかの要素を総当たりに変動させる手法では膨大な組み合わせが生じ、膨大な時間と労力がかかるが、ビアコア本社の協力により比較的容易に結果が得られ、解析精度の向上に大きく寄与した。

考察: 内分泌かく乱化学物質問題には、

(1) 無作用量と無毒性量の見極めや、胎児影響の解析など、化学物質による内分泌かく乱の分子生物学的メカニズム解明が必要な研究対象、および (2) ヒトが暴露されうる既存化学物質および、今後暴露されうる新規化学物質の類ホルモン作用活性の緊急的検出作業とがある。本研究班は後者に重点を置いて計画立案・遂行をしてきた結果、初年度に達成すべき成果を上げたと考えられる。さらに、若干の予期せぬ事態に遭遇するも、それを利用してデータの収集を進め

た結果、分子生物学的メカニズム解明に繋がる様な興味深い事象をつかむことが出来たと考える。今後の班研究の進展に伴い、試験系開発が進むと期待される。更に、それと表裏を成す基礎研究として意味のあるデータの集積が同時に行われるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanno, J., Wakikawa, A., Utsuyama, M., Hirokawa, H. Effect of restraint stress on immune system and experimental b16 melanoma metastasis in aged mice. Mechanisms of ageing and development, 1997 93(1-3):107-117

Nishikawa A, Kase Y, Hayakawa T, Yanagisawa T, Kanno J, Hayashi Y Enhance ment of cell proliferation and prostaglandin biosynthesis by 1,8-dihydroxyanthraquinone in the rat large intestine. Carcinogenesis, 1997 18(6):1259-1263

Okada Y, Kawakami S, Fukuda H, Nagahama K, Saito K, Ohtsuka Y, Kihara K, Morita T, Oshima H, Eishi Y, Kanno J . [Small cell carcinoma of the urinary bladder : a case report and review of the Japanese literature][Article in Japanese] . Hinyokika Kiyo 1997 43(10):739-742

井上 達、菅野 純 Topics on Regulatory Toxicology (7). 内分泌障害性化学物質-その概念と問題点- J Toxicol Sciences 1997: 22(appendix):163-167.

菅野 純、井上 達 内分泌障害性化学物質の最近の諸問題. 1997 塩ビ食品衛生協会会報 121:1-10.

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- 1998 組織培養工学 24:268-271, 1998.

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 3:4-21, 1998

花田 信継、手島 英雄、木村 好秀、荷見よう子、天神 尚子、有田 白峰、成高 和稔、菅野 純、谷澤 徹 悪性卵巣腫瘍と術前診断された後腹膜原発脂肪肉腫の一例. 日産婦関東連会報 35(4):411-416,1998

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響 ファルマシア 3月号,35:219-223,1999

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):35-39,1999

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について-生物影響の立場から- (特別講演の抄録)ビルと環境 84:10-15,1999

菅野 純 内分泌攪乱のメカニズムを考慮した生物試験 医学のあゆみ 190(7-8):751-752,1999

Takeo Iwata, Jiro Kamikawa, Tetsuro Higuchi, Kazuo Yagi, Tadashi Matsuzaki, Jun Kanno, Akihiko Maekawa Development of Invasive Adenocarcinoma in a Long-Standing Diverted Ileal J-Pouch for Ulcerative Colitis Dis Colon Rectum, January 2000 Vol 43.No.1 p101-104

2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on E_R induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone symposia, 2000

2)佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上達:Pentachlorophenolの肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連: 第58回日本癌学会総会、広島(平成 11 年9月 29 日-10 月 1 日)

3)平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野純、黒川雄二、井上達:Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髓細胞での紫外線抵抗性:第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年9月 29 日-10 月 1 日)

4) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology 1999

5) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上達, 卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について, 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会 1999

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

表 1 **List of chemicals used in the study**

HTS No	Chemical Name	CAS Number	Manufacturer	Lot No
HTS00080	Rimsulfuron	122931-48-0	Riedel-de Haen	71990
HTS00081	Fenbuconazole	114369-43-6	Riedel-de Haen	71960
HTS00082	Phenobarbital Sodium Salt	57-30-7	Wako	ACE1373
HTS00083	Propylthiourea	927-67-3	Lancaster	-
HTS00084	Norethindrone	68-22-4	Wako	KSK5852
HTS00085	Norgestrel	797-63-7	Sigma	28H0860
HTS00087	RU 486	84371-65-3	Sigma	19H0828
HTS00088	Cortisol	50-23-7	Wako	CKJ1388
HTS00092	Equilin	474-86-2	Sigma	97H1529
HTS00093	Bisphenol B	77-40-7	Aldrich	
HTS00095	Equol	531-95-3	Fuhuka	409905/1
HTS00096	Phenol,p-cumyl	599-64-4	Wako	PAK1144
HTS00099	DDD,o,p'	53-19-0	Aldrich	42617
HTS00100	DDE,o,p'	3424-82-6	Wako	981119R-AC1
HTS00105	ICI 47699	10540-29-1	Wako	4636C
HTS00106	Nafoxidine	1847-63-8	Sigma	33F0540
HTS00107	Clomiphene	50-41-9	Sigma	28H0308
HTS00108	2-Butanone oxime	96-29-7	Wako	CPK5009
HTS00109	4,4'-diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid	81-11-8	Wako	CKR1319
HTS00110	Benomyl	17804-35-2	Aldrich	KV09529HV
HTS00111	Bromate	7789-38-0	Wako	CKH2613
HTS00113	Dibromoacetic acid	631-64-1	Aldrich	CU03807JS
HTS00114	dicyclohexyl-18-crown-6	16069-36-6	Wako	7642B
HTS00115	dicyclopentadiene	77-73-6	Wako	ACH6360
HTS00117	1,4-Dinitrobenzene	100-25-4	Wako	PAE1117
HTS00118	1,3-Dinitrobenzene	99-65-0	Wako	PAJ9833
HTS00119	1,2-Dinitrobenzene	528-29-0	Wako	CKR1294
HTS00120	Diphenyliodonium hexafluorophosphate	58109-40-3	Fuhuka	386071/1 42699
HTS00121	gossypol	303-45-7	Sigma	89H4058
HTS00123	Lactic Acid	50-21-5	Wako	CKJ5803
HTS00125	Methyl Salicylate	119-36-8	Wako	KSL4903

HTS00126	methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl	12108-13-3	Aldrich	13101BQ
HTS00128	N-6-benzyl adenine	1214-39-7	Wako	KSN5933
HTS00131	Tributyltin	688-73-3	Wako	51684
HTS00132	Triphenyl phosphate	115-86-6	Wako	KSM1759
HTS00133	Tween 20	9005-64-5	Wako	KSF1496
HTS00136	3',4',7-trihydroxyisoflavone	485-63-2	Lancaster	13839
HTS00138	Pinocembrine	-	Latoxan	110.001
HTS00139	6,7-dihydroxyflavone	38183-04-9	INDOFINE	96008
HTS00140	6,4'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	4DHF1188
HTS00141	3,6,4'-trihydroxyflavone	-	INDOFINE	97007
HTS00142	7-hydroxy-3-phenyl-4H-chromen-4-one	-	MAYBRIDGE	-
HTS00143	5,7-dihydroxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one	-	MAYBRIDGE	-
HTS00144	5,7-dihydroxy-2,3-diphenyl-4H-chromen-4-one	-	MAYBRIDGE	-
HTS00145	6-hydroxyflavone	-	Aldrich	-
HTS00146	7,3'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	89013
HTS00147	5,4'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	96012
HTS00148	7,4'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	4DHF388
HTS00149	2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one	-	MAYBRIDGE	-
HTS00150	2,3-diphenyl-7-hydroxy-4H-1-benzophoran-4-one	-	Aldrich	-
HTS00151	6-hydroxy-2'-methoxyflavone	-	INDOFINE	88022
HTS00152	5,2'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	88006
HTS00153	6,2'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	88007
HTS00154	7,2'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	201
HTS00156	6,3'-dihydroxyflavone	-	INDOFINE	92005

表 2

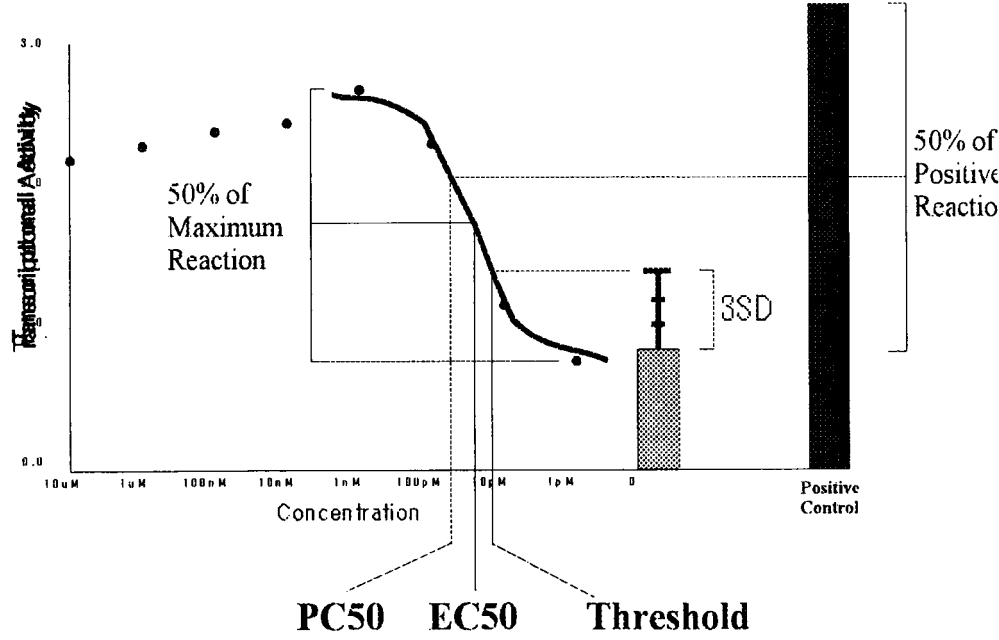
Assay プレート上のサンプル配列

	化合物 1				化合物 2				化合物 3			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1μM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	100nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	10nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	1nM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	100pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	10pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	1pM	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	NC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

NC:Negative control (Vehicle, DMSO)

PC:Positive control(17 β -Estradiol, 100pM)

図 1



Estrogen Receptor α
Estrogen Receptor β
Androgen Receptor
Ad4BP/SF-1
Dax-1

