

# Reporter Gene Assay を利用した High Throughput Pre-screening 法の有用性

武吉 正博

財団法人化学物質評価研究機構 (CERI)

安全性評価技術研究所 研究第 1 部 研究第 2 課 課長

ありがとうございます。丁寧なご紹介と、このシンポジウムでお話しできる機会を与えてくださったことを、菅野先生にお礼申し上げます。

私は、レポーター遺伝子アッセイを用いた HTPS 法の有用性についてお話しします。我々の仕事の大部分は、日本の経済産業省、厚生労働省の共同研究プロジェクトとして行なわれています。まず最初に、この共同プロジェクトについてお話しします。

経済産業省と厚生労働省による、内分泌攪乱化学物質に対する HTPS システムの共同研究プロジェクトは 1998 年にスタートしました。このプロジェクトの目的は、より高次のスクリーニング段階で試験すべき化学物質の優先順位を付けるための、ハイ・スループット・プレスクリーニング法を開発することです。このアッセイ系の開発作業とデータ収集作業は主に経済産業省、このシステムの検証作業は厚生労働省からの支援を受けています。

HTPS システムの現在の状況を、このスライドで示します。ヒト ER $\alpha$  細胞の培養細胞系が確立されて、前会計年度には 500 種類以上の化学物質の試験が完了しており、現在は、そのデータの分析が進行中です。

ラット ER $\alpha$ 、ヒト AR、メダカ ER $\alpha$ 、マミチヨグ ER 系を用いた一過性発現性の遺伝子導入系がすでに確立されています。ヒト ER $\alpha$ 、ヒト AR、ヒト TR $\alpha$  系で試験される化学物質の数は、全部で 1,000 種類以上になる予定です。現在我々は、500 種類の化学物質について、ER 結合アッセイとレポーター遺伝子アッセイの競合試験の結果を公表しています。

パイロット物質群は、ここに挙げた、脂肪族化合物、ステロイド類、ベンゼン誘導体、多環式芳香族化合物、縮合多環化合物、その他の種類の化合物といった複数のカテゴリーから構成されました。括弧の中の数値は、それぞれのカテゴリーに含まれる化学物質の数を表わします。

放射性同位元素で標識した 17 $\beta$ -エストラジオールによる競合受容体結合アッセイは、大腸菌 (E. coli) で発現させたヒト ER $\alpha$  のリガンド結合ドメインを用いて行ないました。レポーター遺伝子アッセイは、ルシフェラーゼの遺伝子の 5' 領域にビテロゲニン ERE を持つ遺伝子配列とヒトエストロゲン受容体 $\alpha$  発現遺伝子配列を導入した安定形質株で行ないました。この培養細胞系は、少なくとも 4 ヶ月間、30 継代にわたって安定していることを我々は確認しました。

我々のレポーター遺伝子アッセイ系では、化学物質のホルモン様活性を表わすのに PC 値を用いています。このスライドは、PC50 と PC10 値を表わしたものです。左の図が、化学物質の用量反応の例を示しており、右の図は、それぞれのアッセイにおける陽性および陰性コントロールの反応を示しています。

試験物質のこれらの PC 値は、陽性コントロール反応の 50%ないし 10%の反応を引き起すと予測されている濃度として定義されます。我々は陽性コントロールとして通常、100 pM または 1 nM の E2 を用いています。これら PC 値は、2 個のデータ点の間で、単純直線回帰によって求めることができます。

この図は、PC50 値と ER への結合親和性を有する化学物質の分布を示したものです。Y 軸はレポーター遺伝子アッセイにおける PC50 値の逆数を、X 軸は ER への相対的結合親和性を示しています。

全体的に見て、これら 2 種類のパラメータ間には J 型の関係がありますが、領域 1 と領域 2 に属する化学物質が存在する点が例外的です。領域 1 に属する化学物質とは、すなわち結合親和性から予測されるよりも強いホルモン様活性を発揮する化学物質であると言えます。領域 2 は領域 1 の反対になります。

このスライドは、領域 1 に属する化学物質の構造を示したものです。この種の化学物質には特有の構造があります。すなわち、エストラジオールの炭素 3 または炭素 17 のヒドロキシル基のエステル誘導体である、とい

うものです。この種の化学物質は、溶媒もしくは細胞内で加水分解して強力なエストロゲン様化合物になるのではないかと我々は考えています。

このスライドは、何種類かのブチルフェノールの ER 結合アッセイの結果を示したものです。この種のブチルフェノール類の中では、パラ型アイソマーが ER への結合親和性を有していますが、オルト型およびメタ型のアイソマーには ER への結合親和性がありません。

この図に示されているように、レポーター遺伝子アッセイでも同様の傾向が見られました。さらにこうした結果からは、化学物質のエストロゲン様作用の強さに関しては、側鎖を持つ型のアルキル鎖が寄与していることが、想定されます。

次に我々は、ラット ER を介するレポーター遺伝子アッセイの結果と、*in vivo* スクリーニング試験である未成熟雌ラットを用いた子宮増殖アッセイの結果とを比較してみました。このスライドは、その 2 種類のアッセイで得られた結果の関係を示したものです。

試験物質は 25 種類で、典型的なステロイド類、アルキルフェノール類、その他の種類の化学物質で構成されています。25 種類の物質のうち、PC50 値が得られたのは 8 種類であり、PC10 値が得られたのは 16 種類でした。子宮増殖アッセイで陽性反応を引き起した物質は 15 種類ありました。以上の結果は、PC10 値に関して陽性である化学物質は、ほとんどが子宮増殖アッセイでの陽性物質に相当する、ということを示しています。

続いて我々は、トランスレチノイン酸を用いて抗エストロゲン様作用を検出することで、内分泌攪乱化学物質スクリーニング試験の有効性を検証しました。トランスレチノイン酸は、レチノイン酸受容体を介して、もしくはエストロゲン応答配列レベルでのエストロゲン様作用に干渉することで、抗エストロゲン活性を發揮することが判っています。

このスライドは、トランスレチノイン酸の ER 結合アッセイとレポーター遺伝子アッセイの結果を示したものです。左の図が結合アッセイの結果で、白丸がトランスレチノイン酸の結果を示し、黒丸が E2 の結果を示しています。右の図がレポーター遺伝子アッセイによるアンタゴニストアッセイの結果です。両図とも X 軸は化学物質の濃度の対数になっています。

ご覧のように、トランスレチノイン酸は ER への結合親和性がまったく見られませんが、レポーター遺伝子アッセイでは明瞭なアンタゴニスト活性を示しています。

このスライドは、トランスレチノイン酸の未成熟雌ラット子宮増殖アッセイの結果を示したものです。アゴニストアッセイでは、トランスレチノイン酸はアゴニスト活性を示しませんが、アンタゴニストアッセイでは、抗エストロゲン様活性があることが確認されました。

そこで、トランスレチノイン酸のアンタゴニスト活性のメカニズムを明らかにする目的で、ゲルシフト・アッセイを行ってみました。このアッセイでトランスレチノイン酸は、ER の ERE への結合能に対して何の影響も及ぼしませんでした。

結合アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、子宮増殖アッセイなどのトランスレチノイン酸に関する一連の予測試験の結果から、トランスレチノイン酸は ER リガンドとの相互作用なしに抗エストロゲン様活性を發揮するということが、想定されます。

いずれにしても、内分泌攪乱化学物質に関するスクリーニング戦略は、レチノイン酸のような内分泌修飾物質を含めた様々な種類の内分泌攪乱活性物質が検出できるように設計される必要があります。したがってレポーター遺伝子アッセイは、高感度で選択性にも優れハイ・スループット・プレスクリーニング過程に適応が可能であるゆえに、もっとも有望で有効性の高いプレスクリーニング法であると思われます。また、このアッセイ法は実験動物を必要としません。

最後に、ここに挙げた我々の研究室の皆さん、特に卓越した技術で研究に貢献して下さった技術スタッフの皆さんにお礼を申し上げます。また、我々の仕事の大部分は政府機関による支援を受けたものですので、経済産業省および厚生労働省にも心よりお礼申し上げます。ご静聴ありがとうございました。

## 質疑応答

菅野：たいへんありがとうございました。コメントと質問をどうぞ。

曾根：国立環境研究所の曾根と申します。最後のスライドで、ゲルシフト・アッセイが、スクリーニングの一つの有用な手段となるのではないかというお話だったと思うのです。ゲルシフト・アッセイはそちらではノン RI でやられたのでしょうか。もし広くスクリーニングの一つとして広めていく場合には、ノン RI で行った方がいいかと思うのですが、その点教えてください。

武吉：今の質問ですが、ゲルシフト・アッセイはスクリーニングテストとしてやったものではなく、レティノイック・アシッドのアンチ・エストロゲニック・エフェクトの機能解明の目的として行った実験です。その中の質問で、このゲルシフト・アッセイにつきましては、蛍光プローブを使って実験を行っております。

青木：同じく環境研の青木ですが、そもそも論のような質問で申し訳ないのですが、50%有効濃度を求められるときに、すべての化合物に対して、エストラジオールのマックスの活性に対する 50%濃度を使われていますよね。

武吉：そうです。

青木：私の記憶が正しければ、教科書的に言えばパーシャル・アゴニストになるわけですから、それぞれの化合物の最大活性に対する 50%濃度を取った方が、正確な値になると思うのですが、なぜそのエストラジオールの最大発現量を基準にして 50%を取られているかという根拠を教えてくださいなのですが。

武吉：その質問に関してですが、よく使われているのは EC50 というパラメータが使われています。この場合は、ドース・レスポンス・カーブに対して、ロジスティック・イクエーションをアプライして、そして 50%濃度を求めるという方法だと思うのです。しかしこの方法ですと、弱いエストロジェニック・ケミカルについては、値が出せない場合がかなりあ

ります。我々のところで EC50 と PC50 について、相関性についての検討も実施していますが、非常によい相関性を持っています。そして PC50 という概念を使った方が、多くの化合物について評価ができるということです。

青木：評価の利便性という観点から、そのようにされていることですか。

武吉：そうです。

青木：わかりました。ありがとうございます。

質問：ダイゼインのスライドにありました、子宮増殖アッセイが検出に見かけ上失敗するという点に関する質問です。ゲニステインに比べていくぶん弱いものです。SC 投与する際に、100 mg/kg/day を超える用量を用いましたか？一般的な文献や一部の研究では、そのあたりかもっと上の用量で述べていますので、それなら陽性になるはずですが。

武吉：この試験で我々が行なった子宮増殖アッセイでは、最高用量が 200 mg/kg/day の固定用量法を用いましたので、ダイゼインの陰性の結果は用量関連性の現象です。ダイゼインによる子宮増殖陽性反応は、500 mg/kg/day で報告されています。