

甲状腺ホルモン受容体応答性レポータージーンアッセイ法による 内分泌攪乱化学物質のスクリーニング

加藤 輝久¹、大野 研¹、荒木 直比呂¹、北村 繁之²、太田 茂²、黒木 広明³、藤本 成明⁴、飯田 満¹

¹大塚製薬(株)大塚ライフサイエンス事業部 EDC 分析センターエコ・スクリーン開発室、

²広島大学大学院医歯薬学総合研究科、³第一薬科大学、⁴広島大学原爆放射能医科学研究所

近年、ヒトを含む生物の性ステロイドホルモンなどのホルモンに類似の働きをしたり、そのホルモンの働きを妨害することにより、生物の内分泌系を攪乱する物質が注目されてきている。そこで、現存する化学物質から新たに開発されるであろう化学物質まで、その物質の内分泌攪乱作用を迅速に試験する測定系の開発が必要とされている。当開発室では、これまでに性ホルモンであるエストロジェン、アンドロジェンの受容体や、ヒトの発育、成長や恒常性維持に重要な役割を果たしている甲状腺ホルモン受容体(TR)の機能に影響を与える物質を測定する目的で、これらのホルモンの受容体とルシフェラーゼ遺伝子を組み合わせたレポータージーンによるアッセイ法を開発してきた。

本研究では、これまでの甲状腺ホルモン受容体応答性レポータージーンアッセイ法(TR-Pal 系)に加え、複数の甲状腺応答エレメントに対応できるように TR-DR4, TR-LAP 系を開発した。更にこれらのエレメントに結合する受容体の組み合わせとして TR と RXR を共発現させる系も構築した。これらの受容体とエレメントのベクターの組み合わせを哺乳動物細胞(CHO)に導入し、既存の化学物質の TR に対するアゴニスト、アンタゴニスト活性を測定した。T3 の誘導体数種にアゴニスト活性が、ビスフェノールの誘導体や PCB 水酸化体数種にアンタゴニスト活性が認められた。このことより本測定系では、甲状腺ホルモン受容体の機能に影響を与える可能性のある物質を特異的にスクリーニングでき、その強度も観察できることが示唆された。

Screening for EDCs using the Thyroid Hormone Receptor Responsible Reporter Gene Assay

Teruhisa Kato¹, Ken Ohno¹, Naohiro Araki¹, Shigeyuki Kitamura², Shigeru Ohta², Hiroaki Kuroki³, Nariaki Fujimoto⁴, Mitsuru Iida¹

¹EDC analysis center, Otsuka Life Science Initiative, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., ²Institute of Pharmaceutical Science, Hiroshima University School of Medicine, ³Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, ⁴Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Japan

Recently, concern has been raised that a number of chemicals in the environment are disrupting normal endocrine function of both humans and wildlife. Thus, there is a great needs for developing screening methods to detect endocrine-active compounds. Our R&D section has been developing rapid and sensitive reporter gene assay methods for detecting the transcriptional activities of estrogen, androgen and thyroid hormone receptors (TR) using luciferase gene.

In this study, we newly constructed the vectors that contains TRE-direct repeat 4 (DR4) and TRE-everted repeat 6 (ER6: LAP) for reporter vectors and retinoid X receptor (hRXR) for receptor expression vector. Reporter vectors (TRE; Palindrome (Pal), DR4 or Lap) and receptor expression vectors (hTRalpal or betal with/without hRXR) were transfected in mammalian cells (CHO). We tested several compounds for TR agonist/antagonist activity: T3 derivatives shows TR agonist activity, bisphenol derivatives and some OH-PCB shows TR antagonist activity respectively. This method is suitable for the preliminary screening of a large number of environmental chemicals and may help to distinguish the test compounds that need further testing.