

甲状腺ホルモン受容体活性物質の スクリーニング手法に関する研究成果等

久保 拓也

(京都大学 大学院工学研究科)



Analytical Chemistry of Materials
Department of Material Chemistry
Graduate School of Engineering
Kyoto University



我々の取り組み

環境省・環境研究総合推進費

【5-1552】

活性特異的濃縮基材と精密質量数による内分泌かく乱化学物質の
スクリーニング法開発

(代表：中島大介, 分担：[久保拓也](#), 中山祥嗣)

【5-1953】

甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の簡便スクリーニングと新規
バイオマーカー探索

(代表：[久保拓也](#), 分担：中島大介)

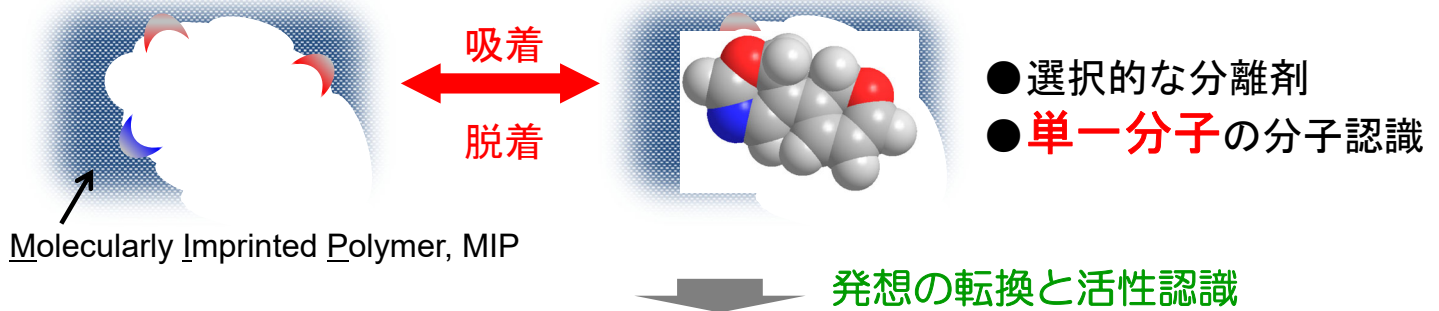
【5-2303】

実環境試料に基づく甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の同定・
分級と複合的健康影響の評価法開発

(代表：[久保拓也](#), 分担：中島大介, 山内一郎)

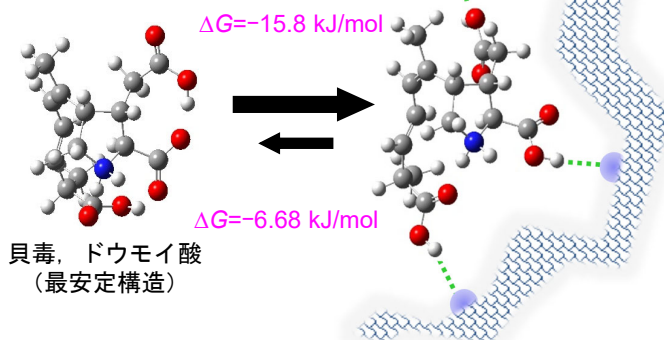
活性特異的濃縮基材の着想

分子インプリンティング（従来法）

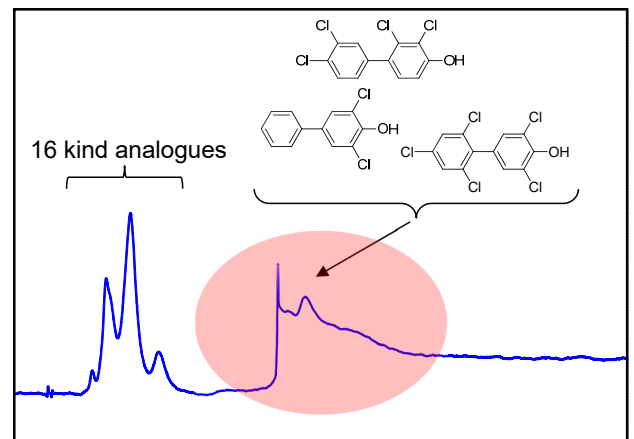


「ゆるい」認識場

Kubo, T. et al. *J Am. Chem Soc.*



Kubo, T. et al. *Anal. Chim. Acta*



「受容体活性群」の分離

3

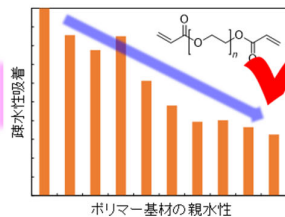
目標と戦略



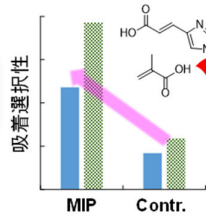
4

活性特異的濃縮基材の開発

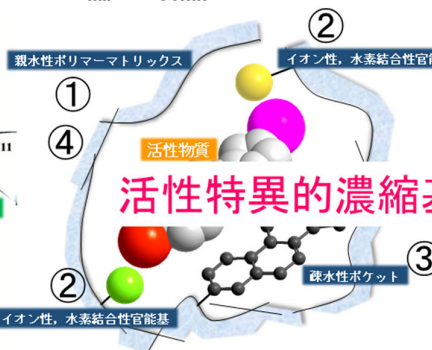
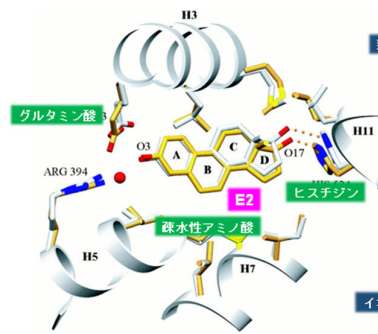
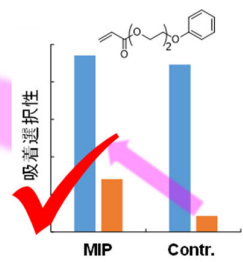
①ポリマーへの疎水性吸着の低減



②機能性モノマーの選定



③疎水性モノマーの選定

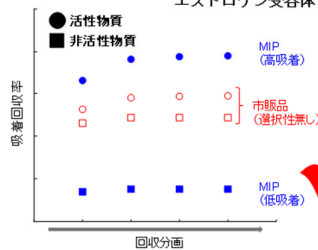


活性特異的濃縮基材の創成！

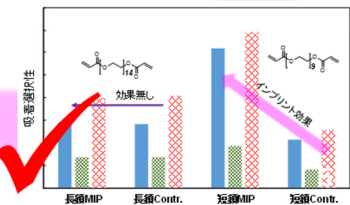
エストロゲン受容体: J. Biol. Chem. 2001

活性特異的濃縮基材のデザインイメージ (サブ2)

④架橋剤長さの調節

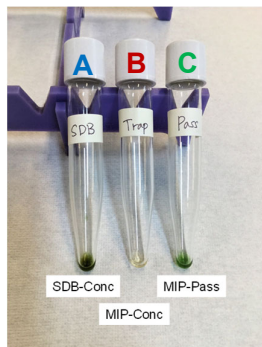
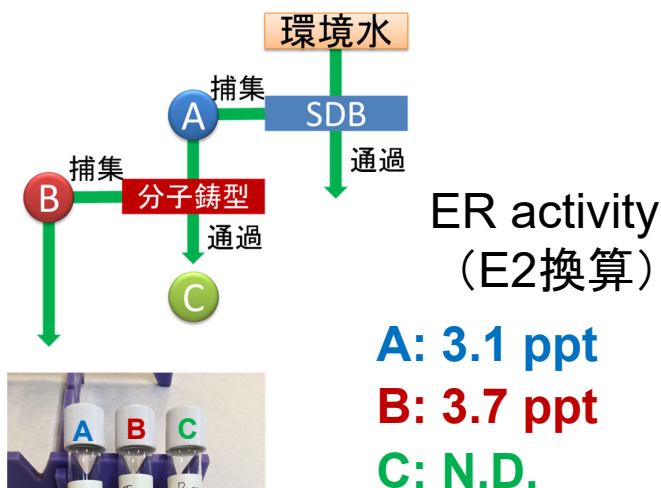


⑤試作品の作製



5

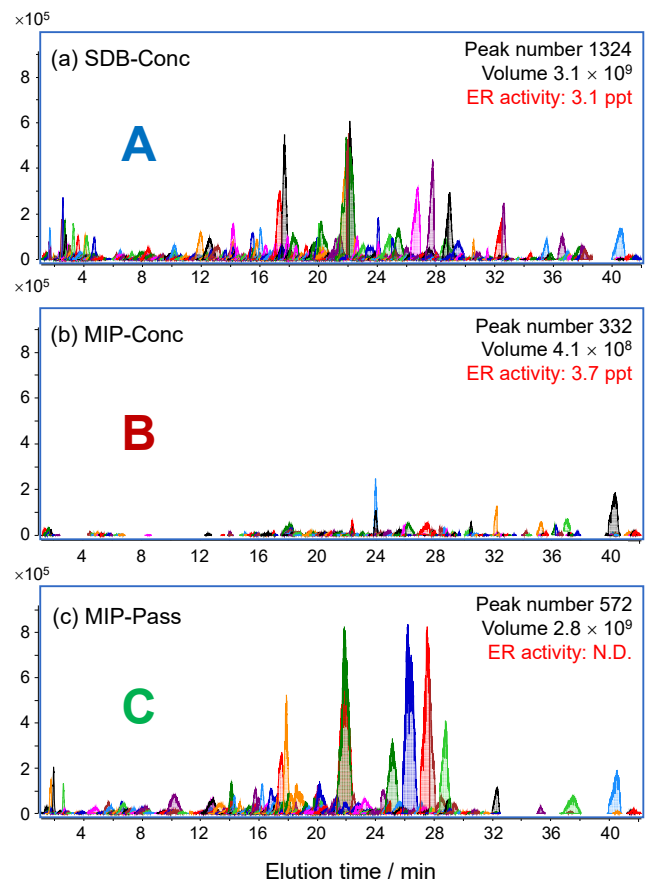
実試料評価 (by バイオアッセイ and LC-QTOF)



Compounds	SDB-Conc (ppt)	MIP-Conc (ppt)
equol	N.D.	6.0×10^2
6,8-dichlorogenistein	N.D.	10
E2	0.30	0.60
estrone	1.4	3.2

MIP濃縮で、夾雑成分の大幅な除去に伴うER活性の増加、活性物質の同定に成功

Chemosphere 2019, 217, 204–212.



妨害成分の除去によって、真の活性値を検出

6

我々の取り組み

環境省・環境研究総合推進費

【5-1552】

活性特異的濃縮基材と精密質量数による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法開発

(代表：中島大介，分担：久保拓也，中山祥嗣)

【5-1953】

甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の簡便スクリーニングと新規バイオマーカー探索

(代表：久保拓也，分担：中島大介)

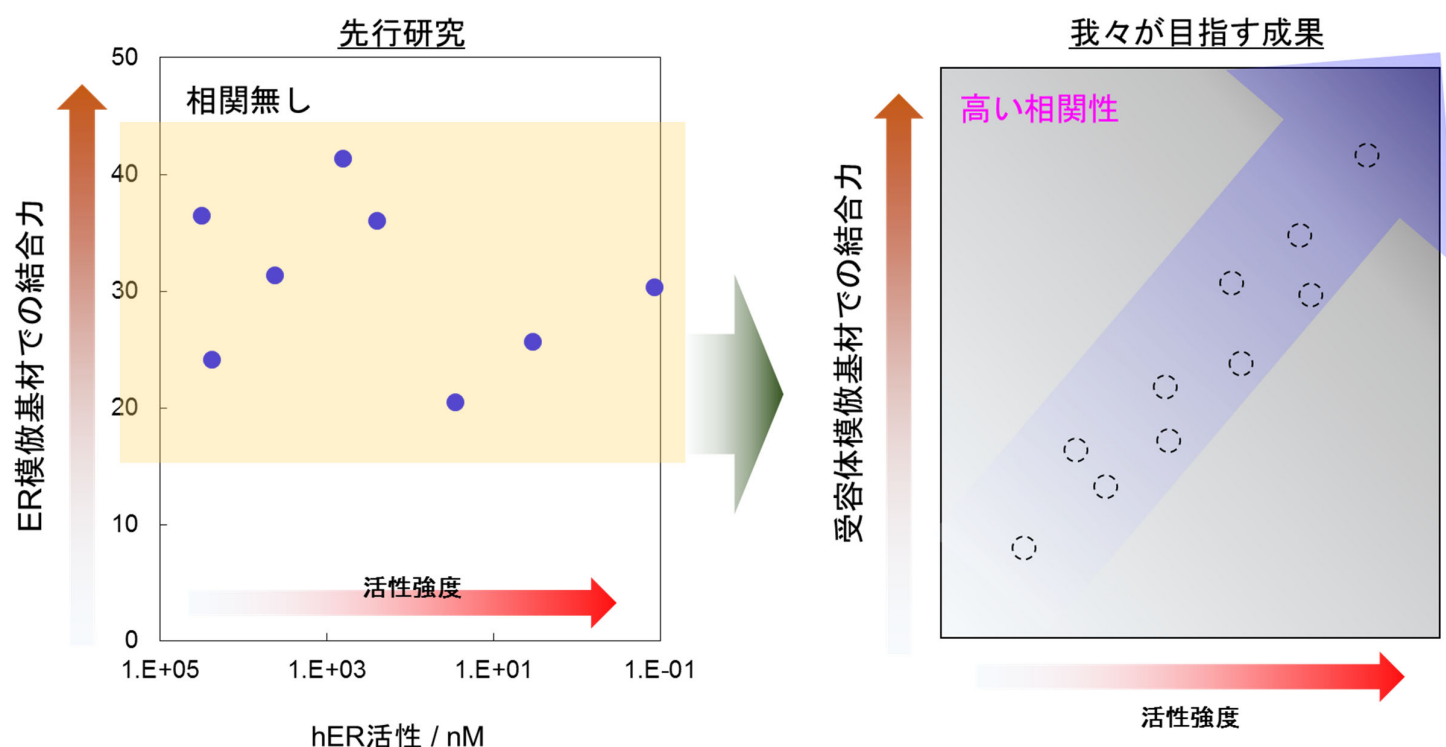
【5-2303】

実環境試料に基づく甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の同定・分級と複合的健康影響の評価法開発

(代表：久保拓也，分担：中島大介，山内一郎)

7

実用性の高いスクリーニングへ向けて

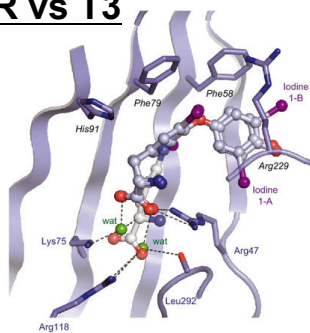


結合活性強度を検出できる新たな受容体模倣基材の創成

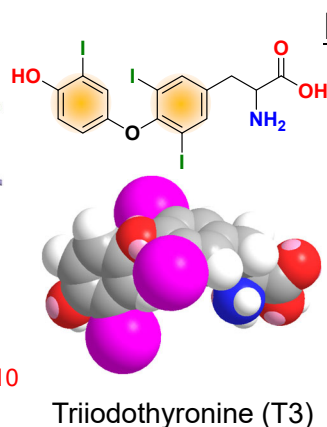
8

甲状腺ホルモン受容体 (TR)

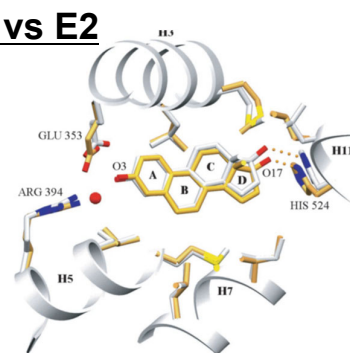
TR vs T3



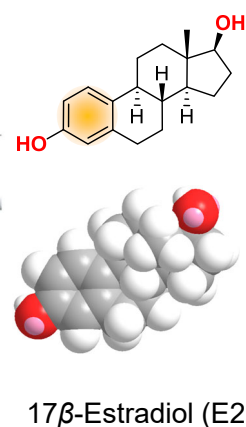
$$K_{T3/TR} \approx 1.7 \times 10^{10}$$



ER vs E2



$$K_{E2/ER} \leq 1.1 \times 10^9$$



受容体モデルとしてのTR

- 化学結合様式多様性(水素結合, 静電相互作用, π - π , ハロゲン- π)
→クロマトグラフィーにおける溶出条件で特定の相互作用を抑制
- 三次元的な官能基配置の可能性(官能基の配向性)
→部分構造の分子認識を三次元的に制御
(*J. Phys. Chem. C* 2018; *Anal. Chem.* 2019)

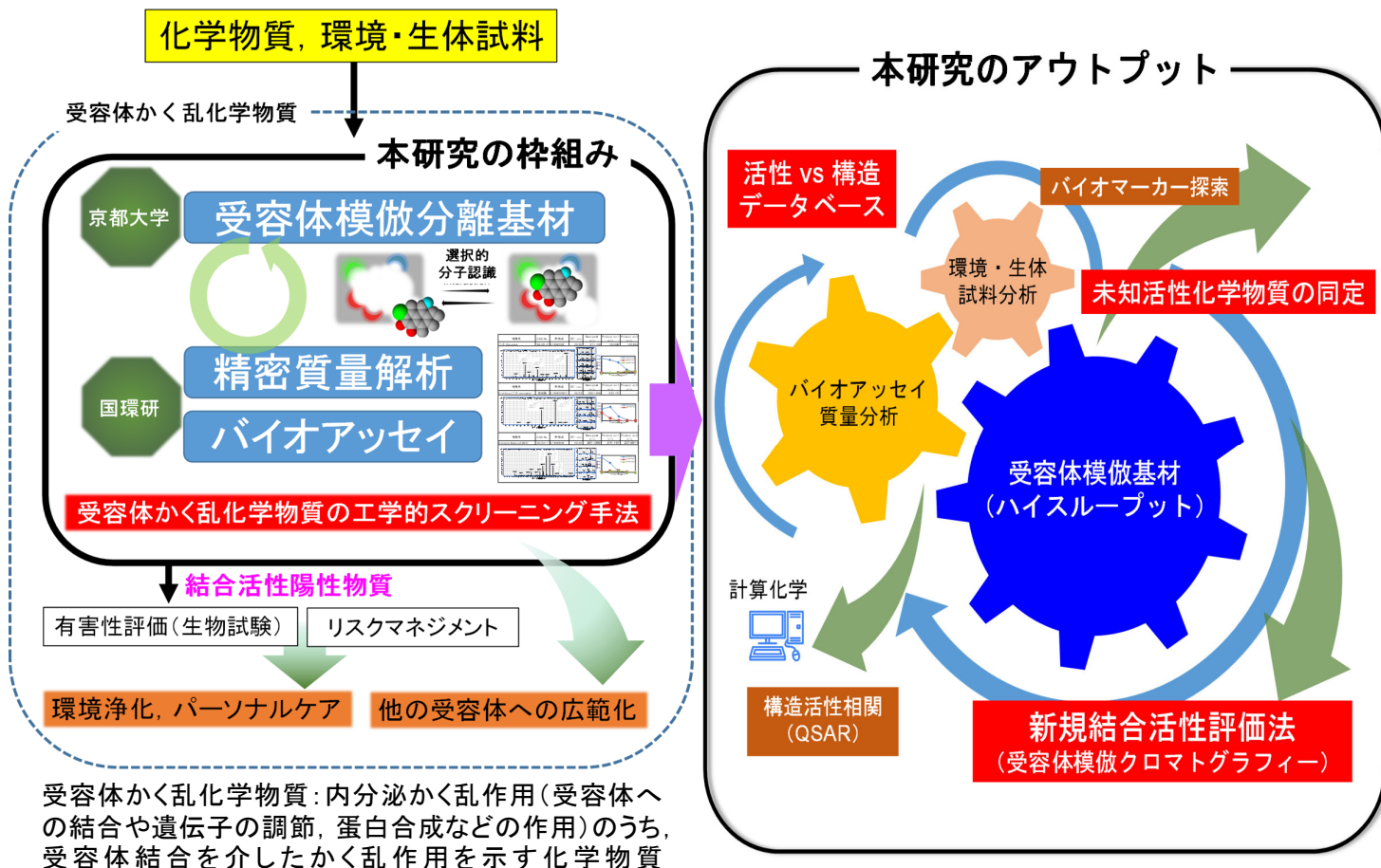
アゴニスト, アン
タゴニストの分子
認識機構の解明
に期待

- EXTEND2022, エコチル調査, EPA**等での重要課題に貢献

EDSP in the 21st Century (estrogen, androgen or **thyroid)

9

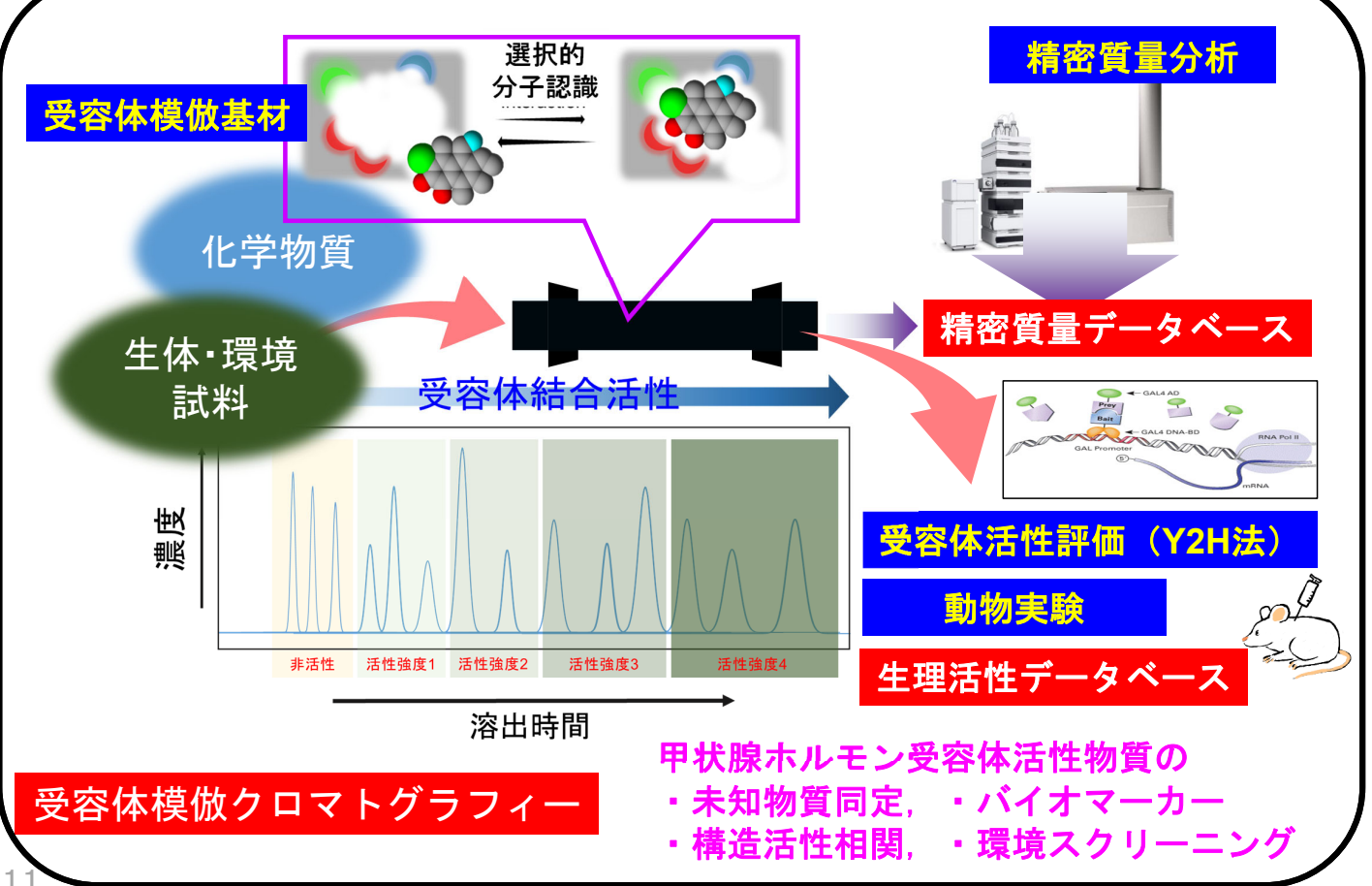
本研究の概要



10

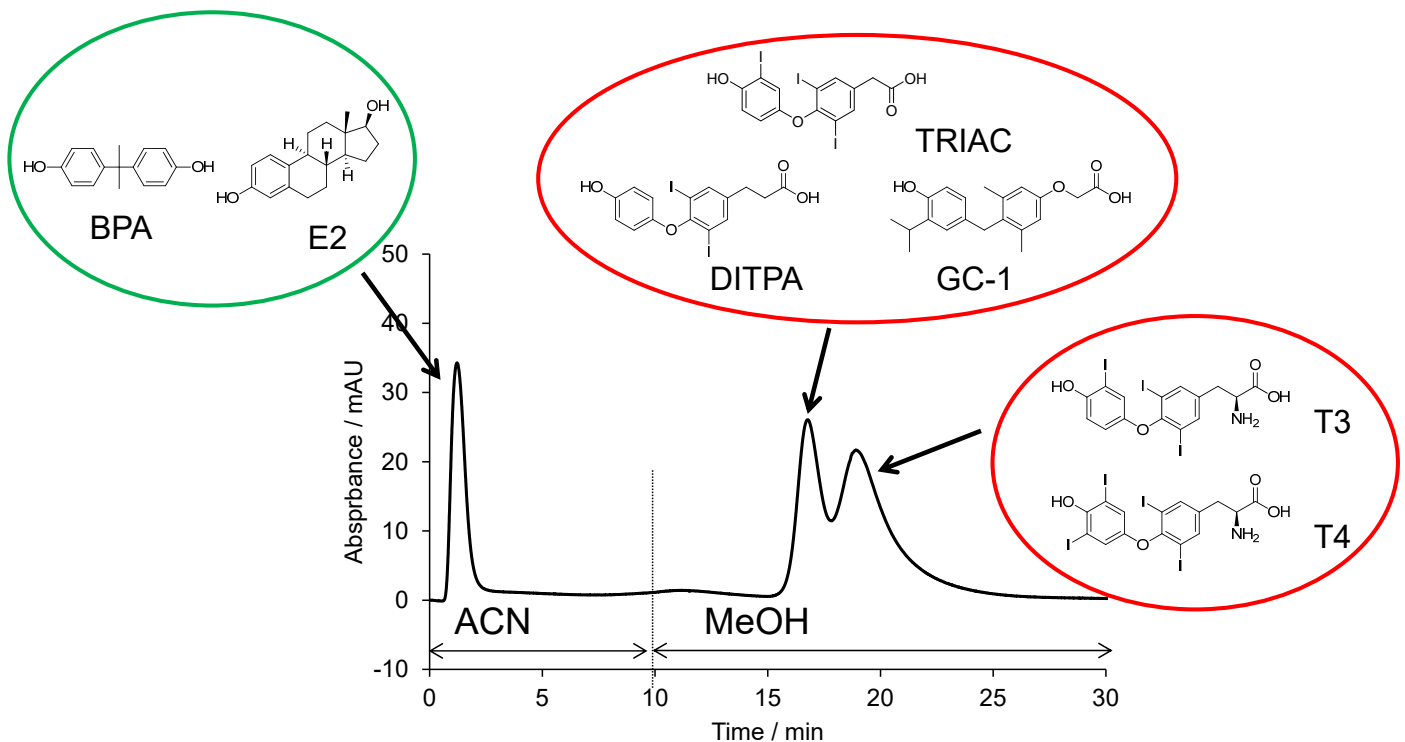
本研究の具体的イメージ

本研究におけるスクリーニングイメージ



11

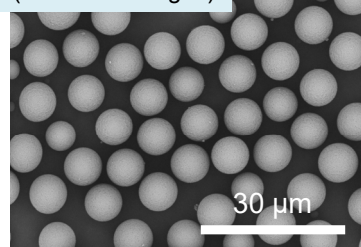
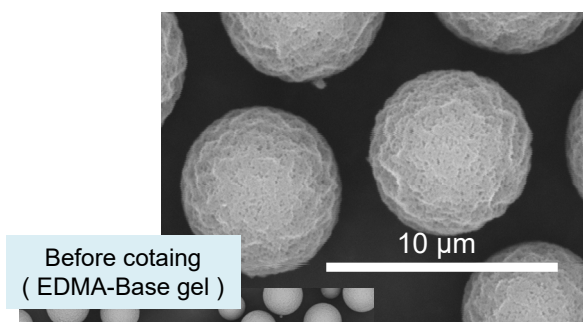
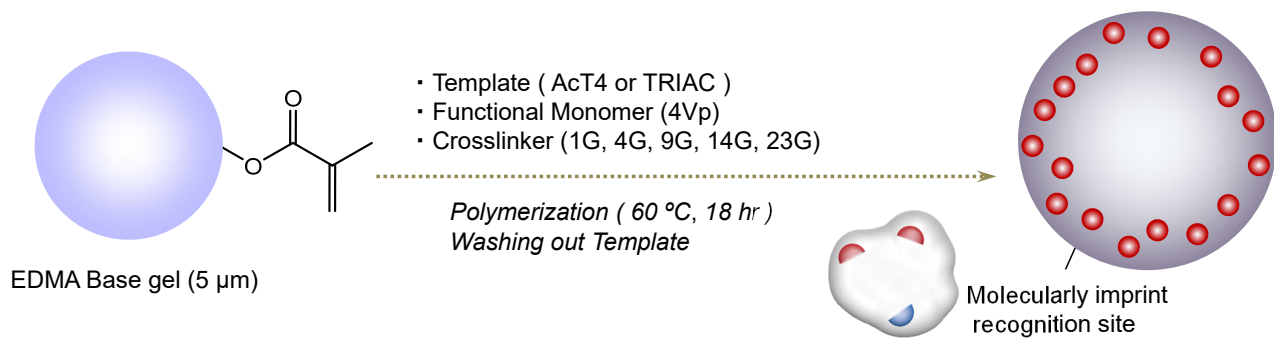
TR結合物質の分離



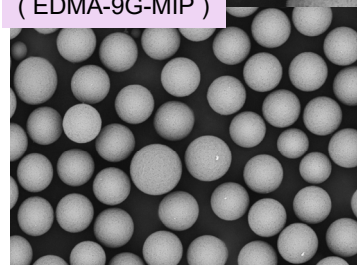
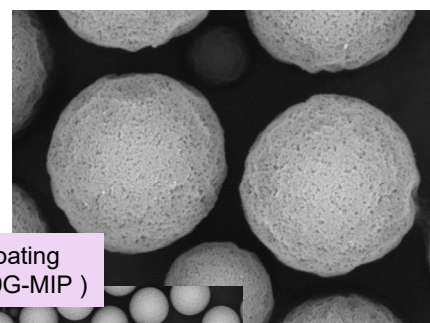
TR結合, 非結合物質の分離に成功

12

分離能の向上と認識能の最適化



352 m^2 / g
0.64 cm^3 / g
7.3 nm

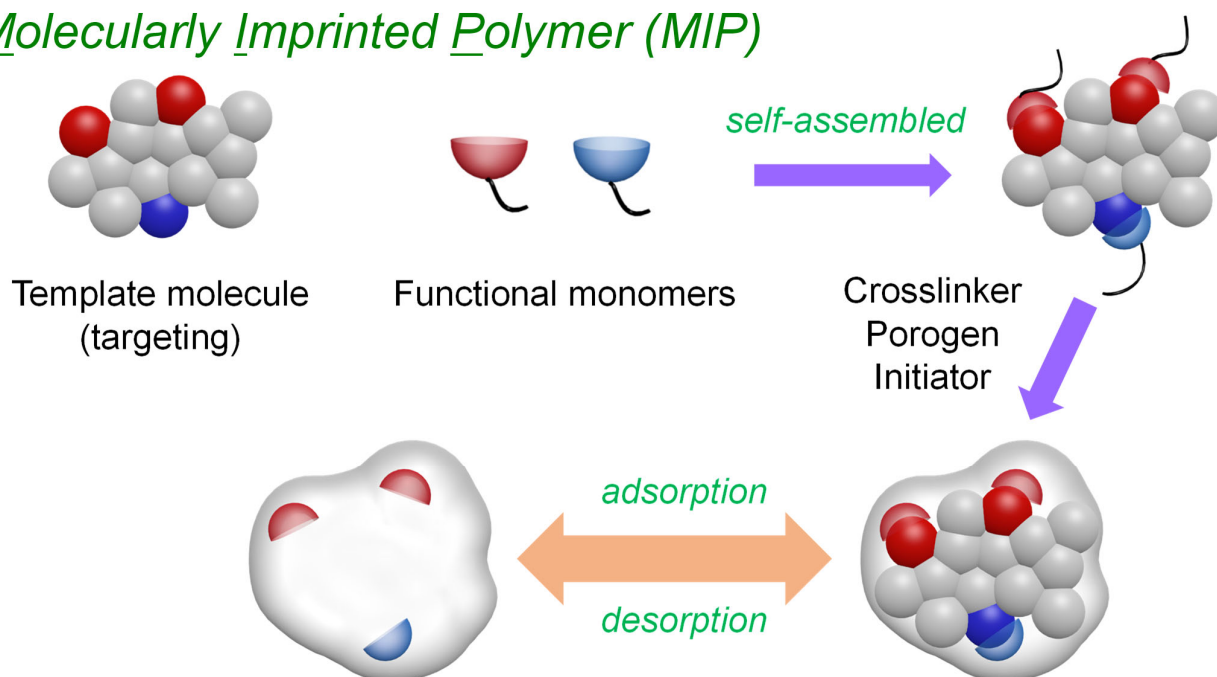


183 m^2 / g
0.45 cm^3 / g
9.9 nm

13

分子インプリント法の概念

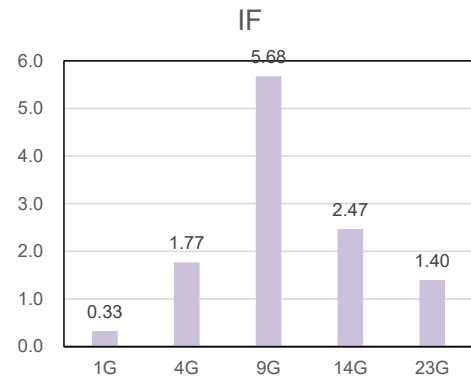
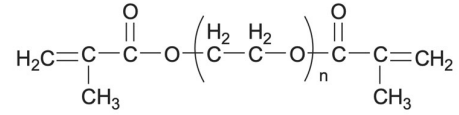
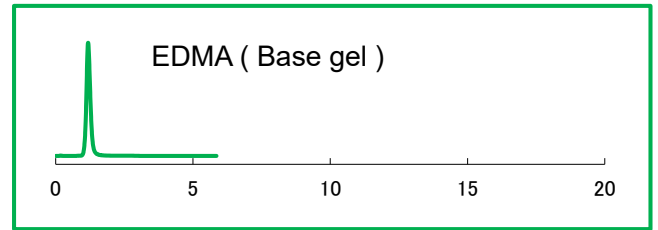
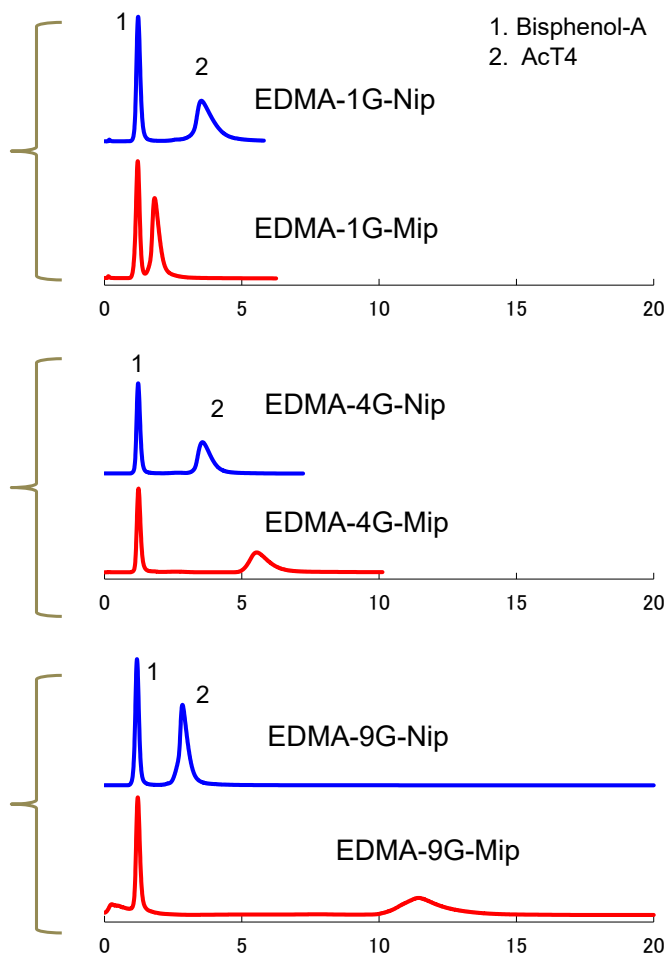
Molecularly Imprinted Polymer (MIP)



骨格の緩さを検討した例はなかった

14

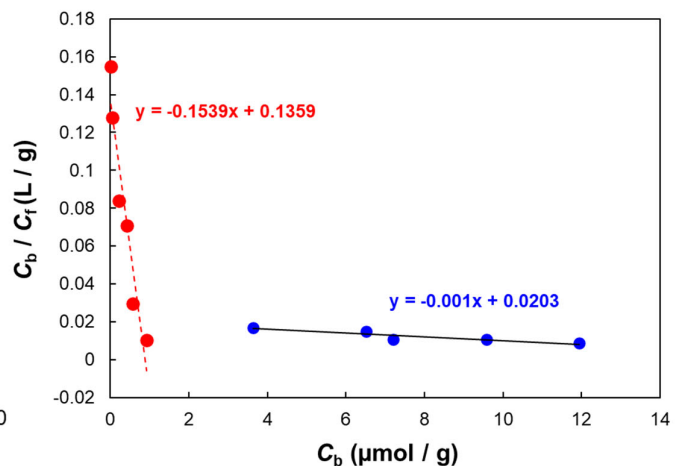
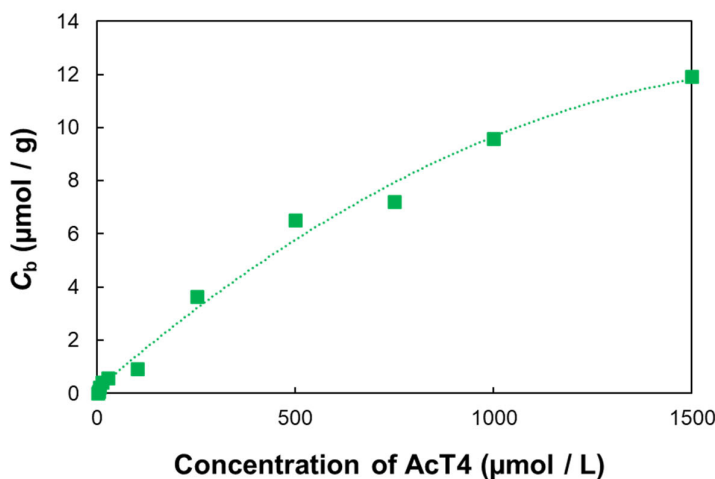
架橋剤鎖長の効果



Sample : BPA + AcT4, (0.1 mg / ml x 5μL inj.)
 Column Size : 2.0 x 50 mm, Flow : 0.2 mL/min,
 Detection : UV 240nm, Column temp. : 40°C,
 Mobile Phase : 10% B
 A) MeCN, B) 0.2% HCOOH in 90%MeOH

15

結合強度の算出

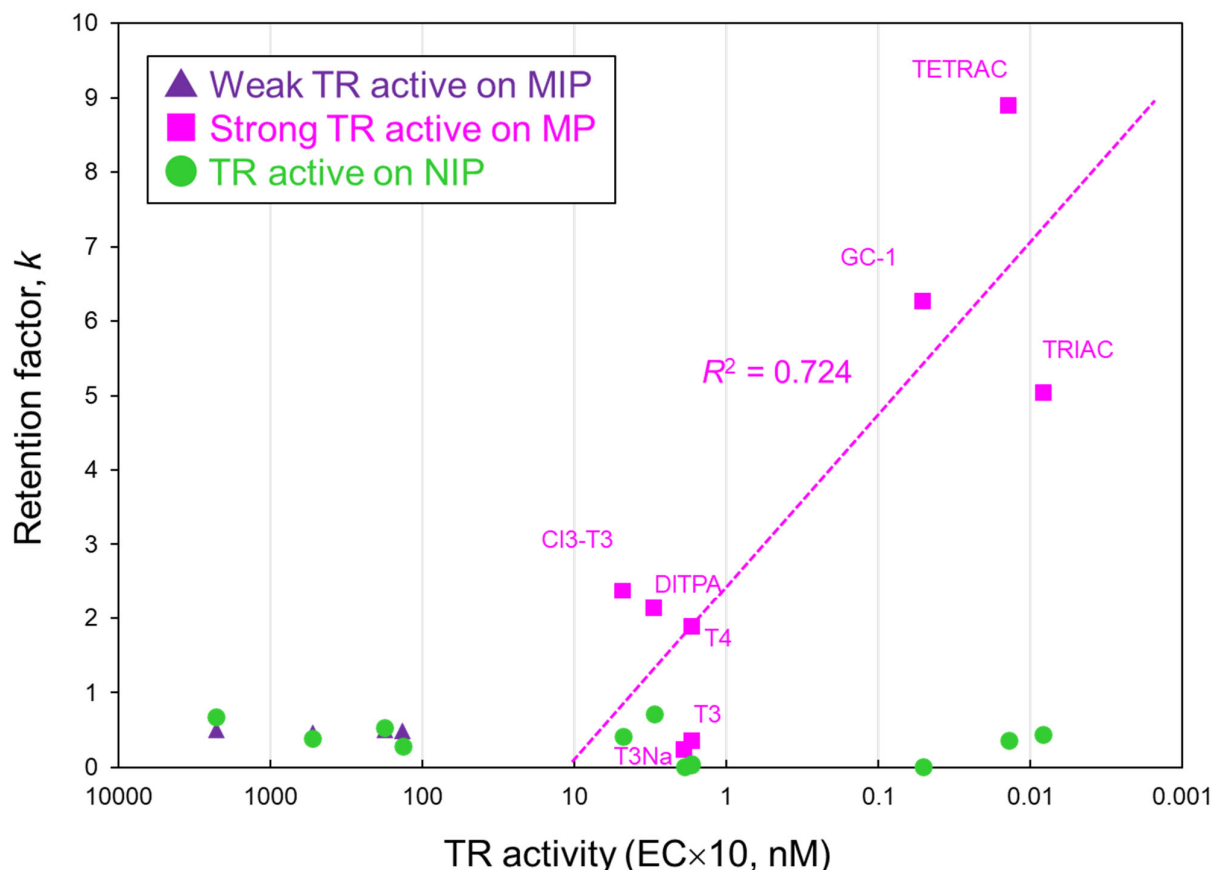


$$C_b / C_f = nK_P - KC_b,$$

C_b , C_f , n , K はそれぞれ, AcT4の吸着量, 吸着しなかったAcT4, 結合サイト数, 結合強度を示す

$$K = 1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

TR生理活性との相関



強い活性を示す化合物に対して結合強度が正の相関

hTRα 活性データの測定

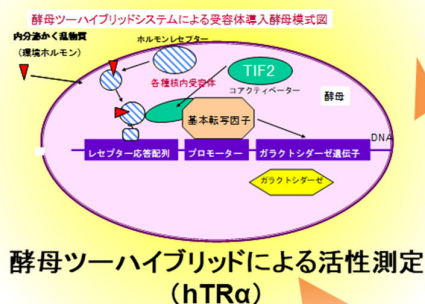
計画では600物質

合計 **796*** 物質の活性を
同一条件で測定

+既存データ129物質を加え
919物質の活性を取得

588物質

所有物質から
ER等の活性測定に供した化学物質
(現存は約500物質)



酵母ツーハイブリッドによる活性測定
(hTRα)

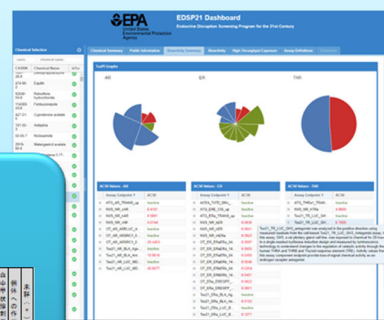
17物質

文献から
EXTEND2016における文献信頼性評価結果

物質名	信頼性評価	評価理由	評価結果
ビスフェノールA	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールF	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールF	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールF	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールF/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールF/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB/ビスフェノールF	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールF/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールF/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールF/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールF/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールF/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB/ビスフェノールF/ビスフェノールS	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB/ビスフェノールF/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールB/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールA/ビスフェノールF/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールB/ビスフェノールF/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり
ビスフェノールF/ビスフェノールS/ビスフェノールZ	信頼性あり	信頼性あり	信頼性あり

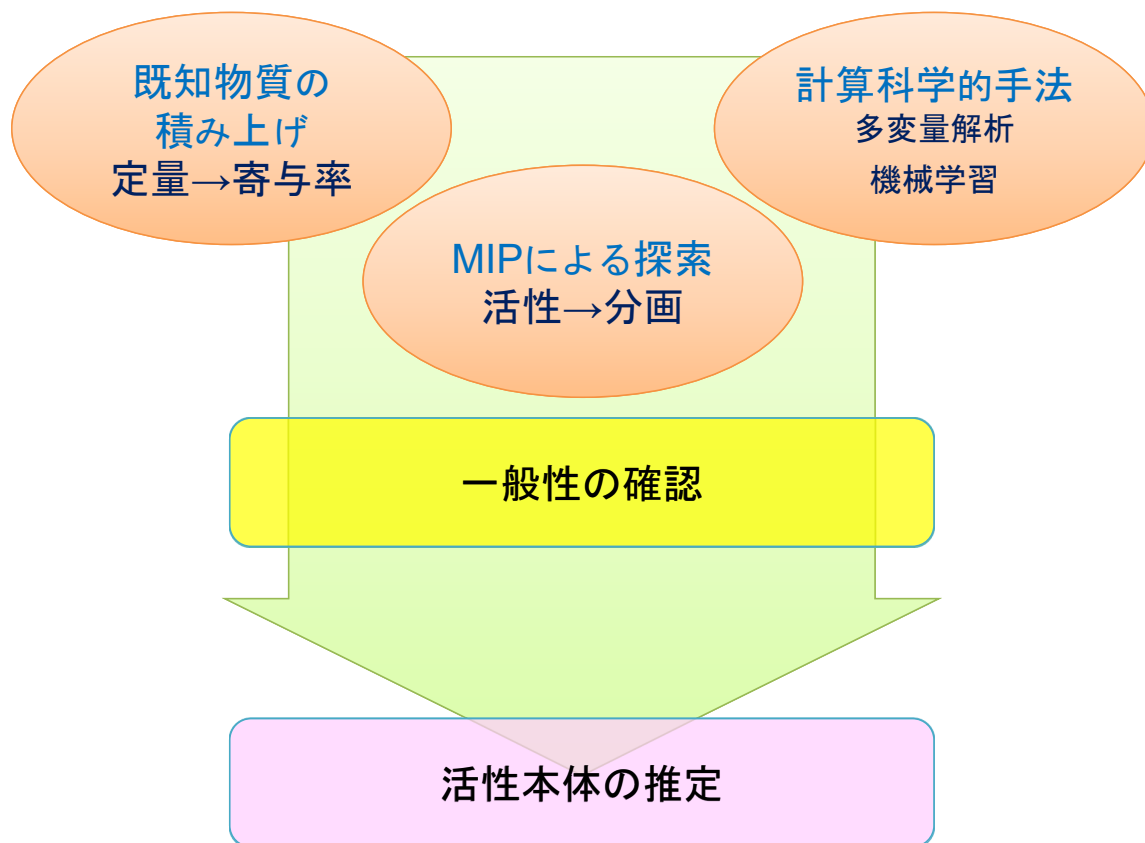
208物質

データベースから
US EPA による内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム (EDSP21) による
ratTR 結合活性情報



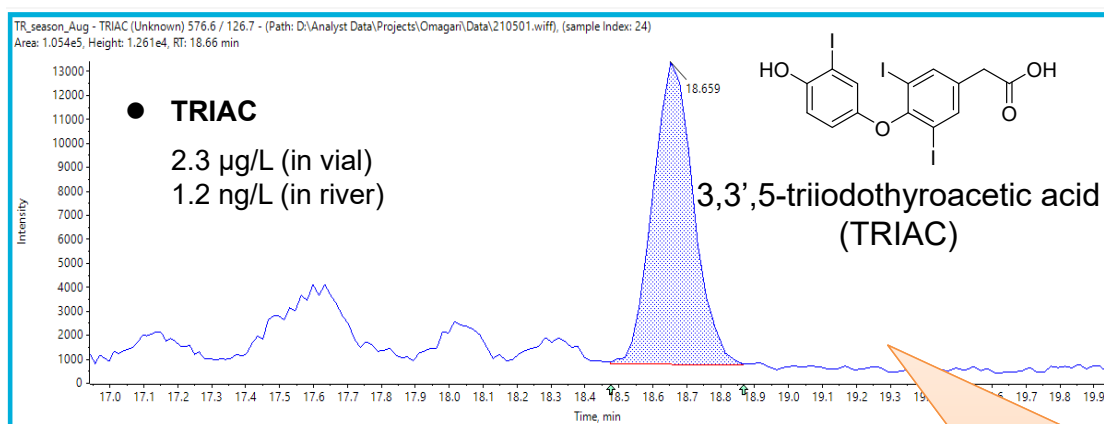
*アンタゴニストは
合計691物質

下水処理場排水中の活性物質探索



19

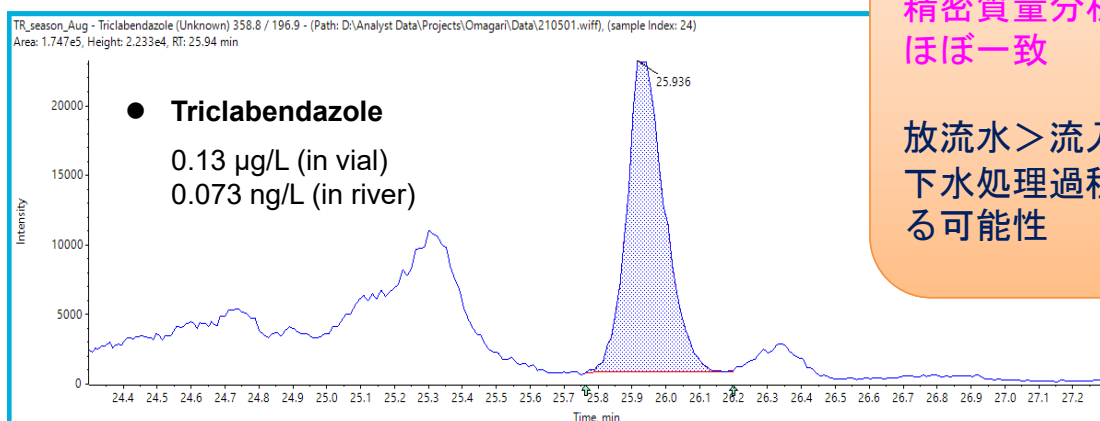
アゴニストの検出・定量



条件C

霞ヶ浦浄化センター
2020年8月試料

2000倍濃縮
6 µL注入

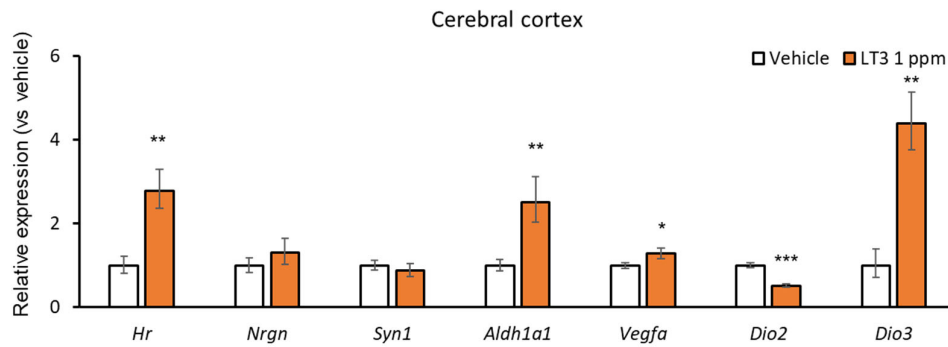


精密質量分析でTRIACと
ほぼ一致

放流水 > 流入水 であり、
下水処理過程で生成してい
る可能性

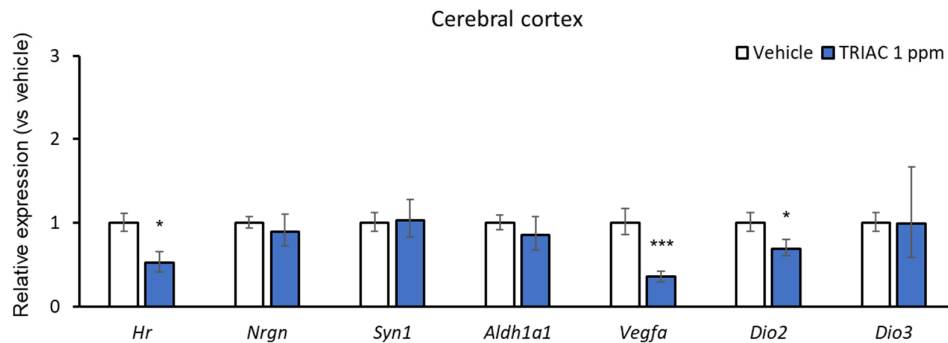
20

TRIACの脳への影響



LT3投与

大脳皮質における
TR標的遺伝子発現を
増加させた



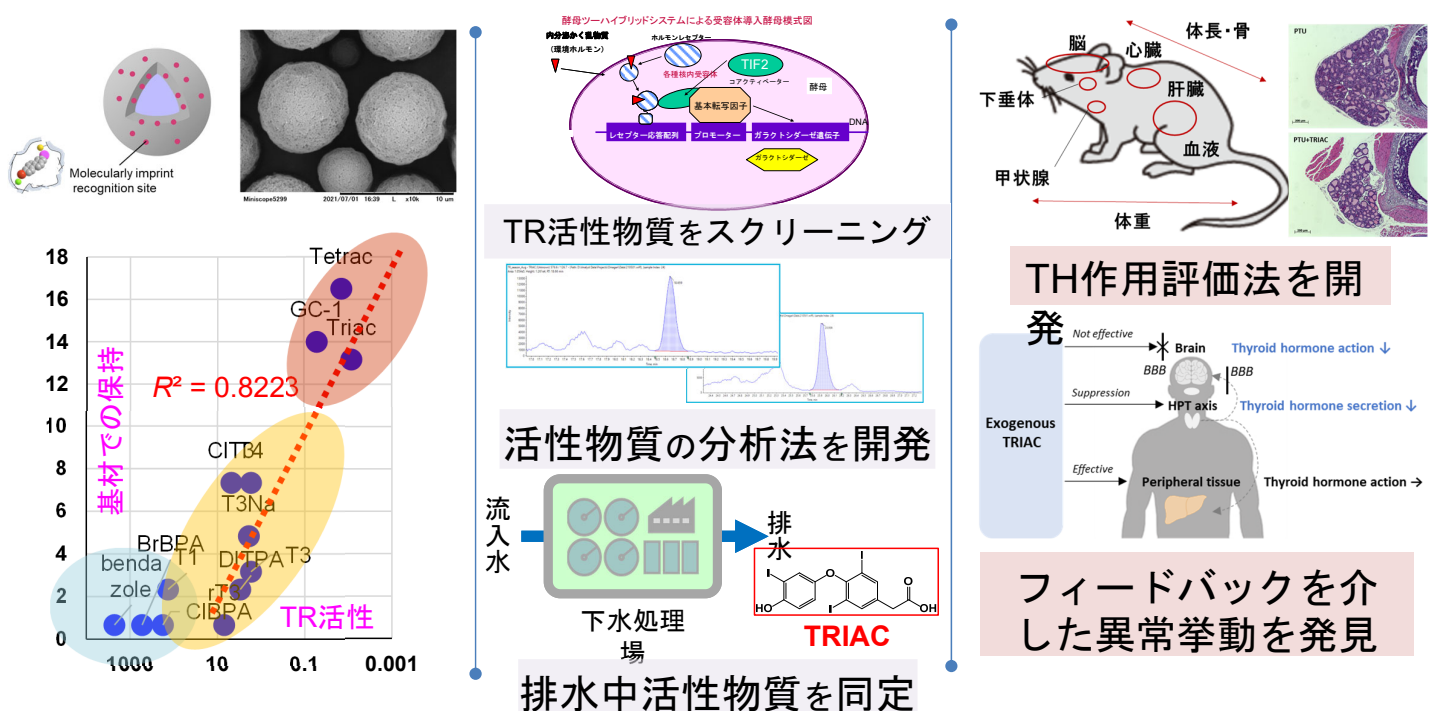
TRIAC投与

大脳皮質における
TR標的遺伝子発現を
低下させた

TRIACは脳におけるTR作用を減弱するかく乱物質である

21

【5-1953】 のまとめ



研究成果（総合評価A）

- TR模倣基材での結合強度とTR活性に正の相関（**主要物質のみ**）
- 900種類以上のアッセイからデータベースを構築
- 実環境試料におけるTR活性寄与物質を決定（**TRIACのみ**）
- げっ歯類でのTR影響評価法を確立（**TRIACにおける異常挙動を発見**）

22

我々の取り組み

環境省・環境研究総合推進費

【5-1552】

活性特異的濃縮基材と精密質量数による内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法開発

(代表：中島大介，分担：[久保拓也](#)，中山祥嗣)

【5-1953】

甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の簡便スクリーニングと新規バイオマーカー探索

(代表：[久保拓也](#)，分担：中島大介)

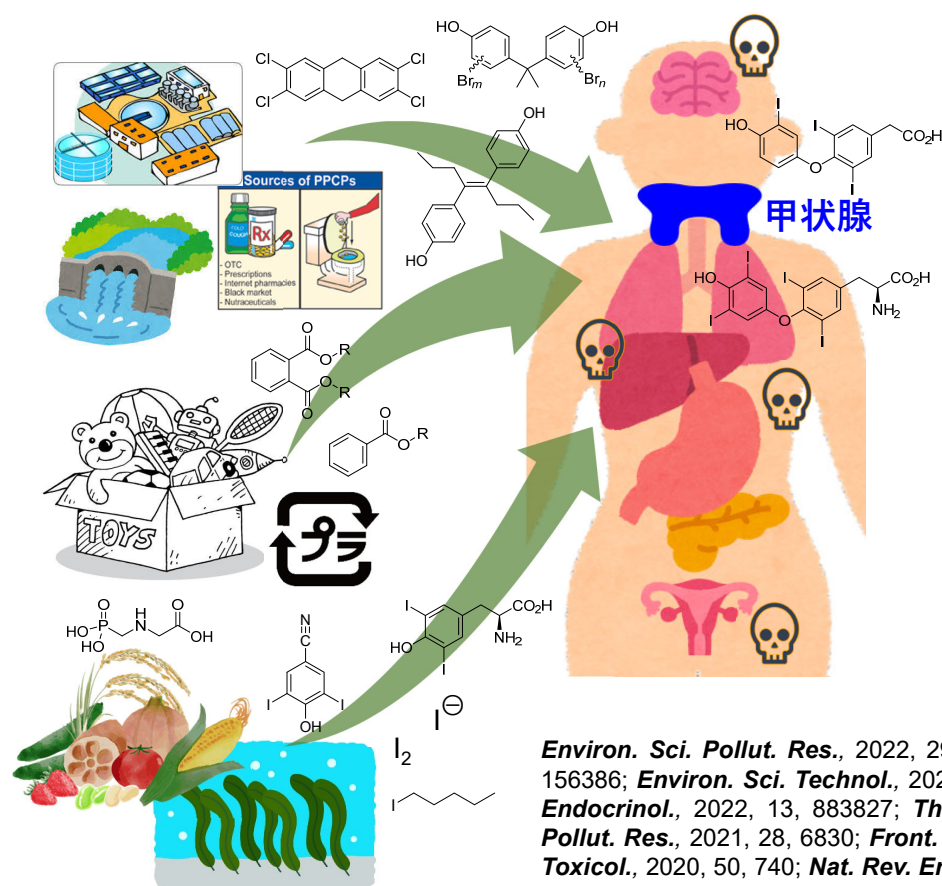
【5-2303】

実環境試料に基づく甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の同定・分級と複合的健康影響の評価法開発

(代表：[久保拓也](#)，分担：中島大介，山内一郎)

23

甲状腺異常に寄与する内分泌かく乱化学物質



EXTEND2022の枠組みと求められるアウトプット

国際協力及び情報発信

OECD, EDSP/EPA, SVHC/ECHA

知見の収集

試験法の開発

試験対象物質選定

作用・影響評価の実施

環境中濃度の実態把握

有害性評価

曝露評価

リスク評価

リスク管理

環境政策への貢献（EXTEND2022）

・エコチル調査との連携

新たな評価手法 (NAMs) の推奨 → 工学的手法

対象物質の拡充 → 簡易スクリーニングと構造決定

網羅的環境評価 → 環境試料, 食品中化学物質の調査

複合影響 → 寄与物質とその分解物, 代謝物の評価

魚, 両生類以外のvivo系 → げっ歯類による試験法

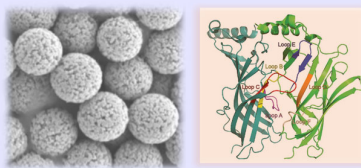
参考：環境省 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応（2022年10月）

25

甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質評価へ向けた研究提案

サブ1：京都大学・工

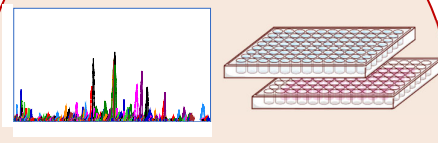
TR模倣基材



- ・工学スクリーニング
- ・TR活性物質の分類

サブ2：国立環境研究所

精密質量分析
in vitro評価



- ・環境中TR寄与物質の同定
- ・新規TR活性物質の探索

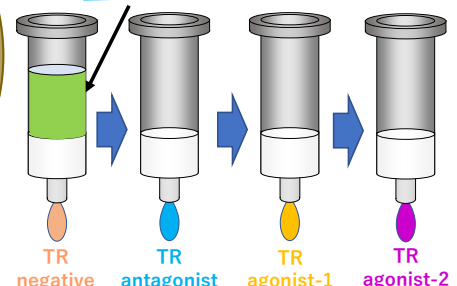
in vivo評価



- ・TH作用評価法の確立
- ・複合健康影響評価

新規スクリーニング法

環境/生体試料



TRアゴニスト活性の構造
TRアンタゴニストの選定
TR活性物質の環境濃度
新規TR活性物質の探索
TH作用かく乱機序の調査
健康影響評価法の提案

サブ3：京都大学・医

26

～あるものを全部見る、悪者だけを選んで診る～

環境中化学物質分析の 新たな潮流

公開シンポジウム

2024

5.1

WED

13:30～(開場13:00)

in コンベンションホールAP浜松町 N+O会議室

参加費
無料
定員100名

- | | |
|----------------|--------------------------------|
| 池中 良徳(北海道大学) | 「質量分析計で動物の病気を診る」 |
| 山内 一郎(京都大学) | 「甲状腺専門医が甲状腺ホルモン受容体かく乱物質を診る」 |
| 久保 拓也(京都府立大学) | 環境研究総合推進費(5-2303)の研究について |
| 宮脇 崇(北九州市立大学) | 「化学物質スクリーニングによる“環境ドック”の提案」 |
| 橋本 俊次(国立環境研究所) | 「ノンターゲットスクリーニングのためのデータマイニング事例」 |
| 中島 大介(国立環境研究所) | 環境研究総合推進費(5-2302)の研究について |

お問い合わせ

主催：京都府立大学・久保拓也
共催：国立環境研究所・中島大介
協賛：環境研究総合推進費
5-2303「実環境試料に基づく甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の同定・分級と複的健康影響の評価法開発」
5-2302「データ非依存型取得法による環境汚染物質の定量デジタルアーカイブ手法の開発」
連絡先：kubo.takuya.6c@kyoto-u.ac.jp

お申込み方法

<https://forms.gle/apzn0x3k62fpTug8A>

QRコードから、googleフォームでお申込み→

※切4/12(金)



ACCESS

〒105-0011

東京都港区芝公園2-4-1 芝パークビルB会地下1F



・都営地下鉄大江戸線/浅草線「大門駅」より徒歩3分
・JR線・東京モノレール「浜松町駅」より徒歩7分