

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



今日は、ここに示しましたような甲状腺ホルモン受容体に活性を示すような物質と環境中からどのようにスクリーニングするかということで、幾つもの研究を進めてまいりました。その一端を一部紹介できればなと思います。

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)

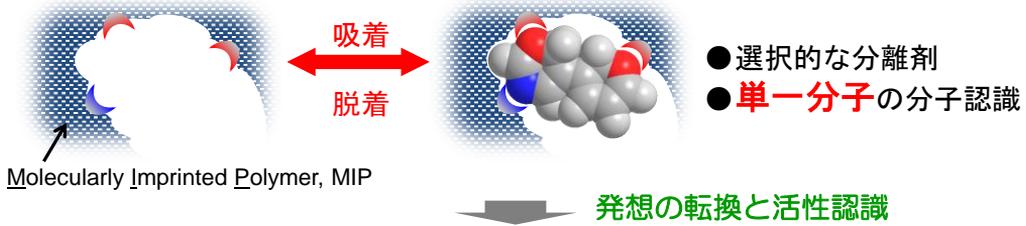
まず、我々が10年近く取り組んできた研究の内容としましては、環境省の環境研究総合推進費によりまして、ここに示しました3つのプロジェクトを進めてまいりました。

これを今日は少しずつ紹介したいなと思うのですが、1つ目は、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ということで、代表者は国立環境研究所の中島先生、分担として私が入っております。

その後、ターゲットを甲状腺ホルモン受容体に絞り込みまして、また簡便スクリーニングの手法開発というのを私が代表で進めてまいりました。さらに、その発展型として現在進行中の同じく甲状腺ホルモン作用を示すような化学物質の同定・分級及び複合的健康影響ということで、私が代表で、分担に国環研の中島先生、京都大学の山内先生と一緒に進めております。

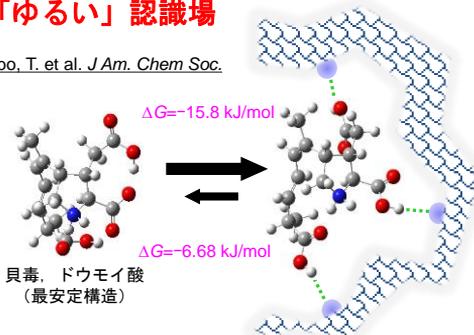
活性特異的濃縮基材の着想

分子インプリンティング（従来法）

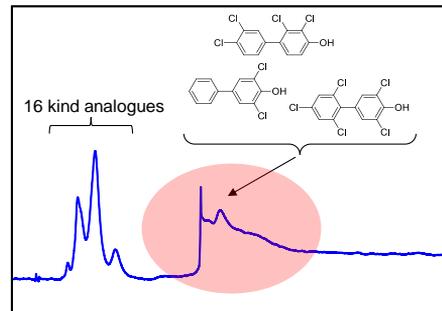


「ゆるい」認識場

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



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



「受容体活性群」の分離

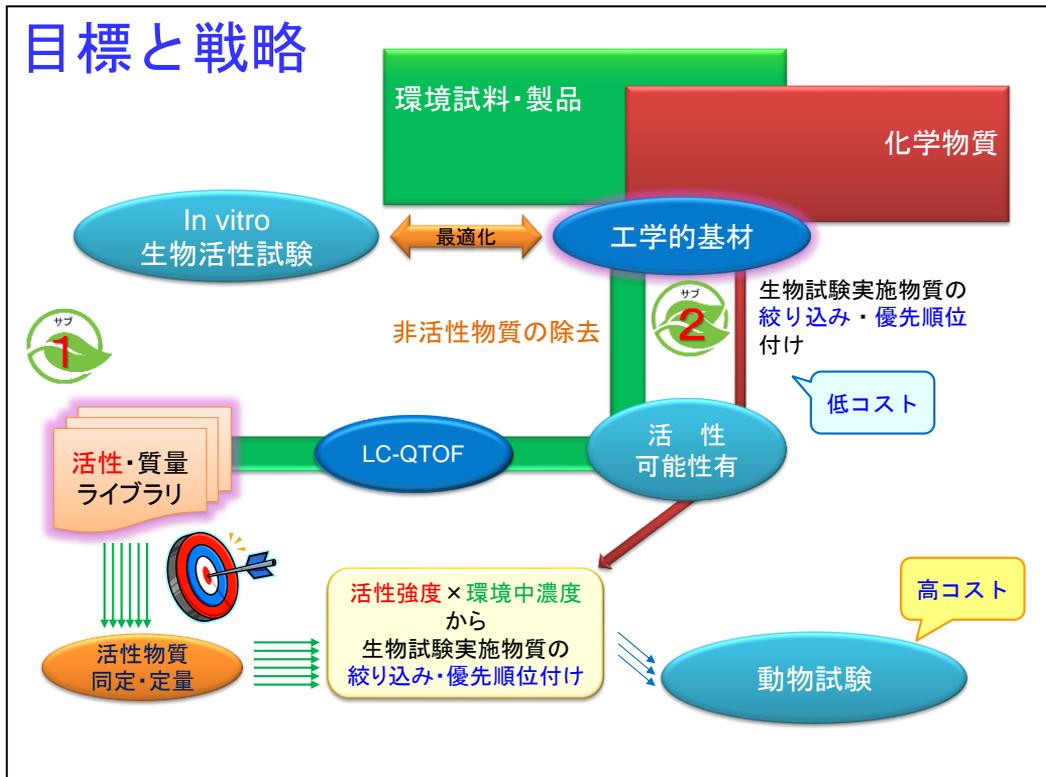
まず、一番初めの研究の内容について、簡単に御説明申し上げます。

ここに示した「活性特異的濃縮基材」、若干ややこしいネーミングになっていますが、簡単に申し上げますと、ここに示した分子インプリンティングという分子認識を工学的に作り上げるという方法がございまして、これは比較的簡単な概念で、有機高分子を使って、有機高分子の中に分子と分子を認識するような穴、いわゆる鍵と鍵穴の関係を分子レベルで作って、そこに特定の物質を吸着するような材料を作るという方法です。

これは従来単一の分子をどれだけ選択的に捕まえるかということで広く研究が進められてきたのですが、これを少し発想の転換を行いまして、我々の中に存在するような受容体というのはたんぱく質をベースに使うような比較的柔らかい材料を使っているんで、単一の分子を捕まえるというよりはもうちょっとルーズな分子認識が作れば受容体で発現するような分子認識が獲得できるのではないかとということで、ここには1つの例を示していますが、ゆるい認識場を使うとこういう複雑な化合物でも選択的に捕まるといようなことを以前私が報告しているのですが、そのほかにもここでは水酸化PCB、いわゆる毒性物質として知られるPCBが水酸化されたようなものの中から甲状腺ホルモン受容体に結合するような物質だけを分離するというような、こういう2つの例を以前に研究していました。これを使って、ここでは同じようなことで環境中から化学物質をスクリーニングできないかということ

で研究を進めました。

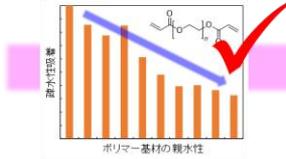
目標と戦略



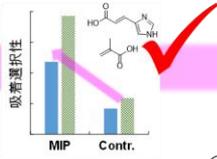
このときの研究の目標と戦略としては、例えば環境試料あるいは新たに出てきた製品・化学物質を現在は生物学的な手法をもってそれが毒性がある・ないということを決めているのですが、そうではなくて、もう少し我々が中心にやってきたような工学的な手法で動物実験を使わずに簡単なスクリーニングでその毒性を評価できれば、もう少し最終的な動物を使ったような実験に付与するような化学物質の絞り込みというのができないか、優先順位を決められないかということで、この工学的基材というのを開発しようということで研究を進めました。

活性特異的濃縮基材の開発

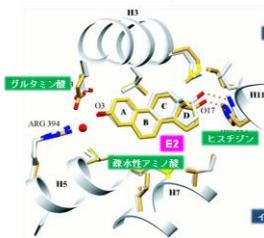
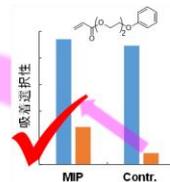
①ポリマーへの疎水性吸着の低減



②機能性モノマーの選定



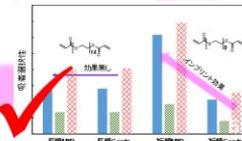
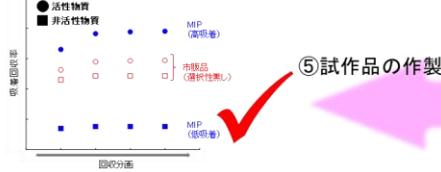
③疎水性モノマーの選定



活性特異的濃縮基材の創成！

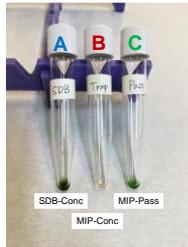
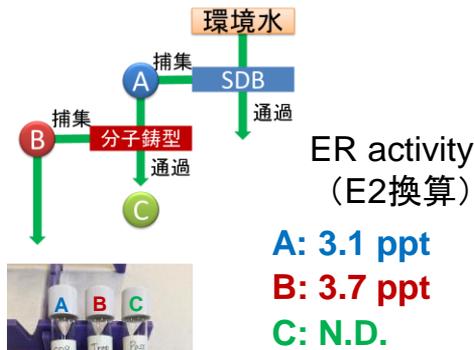
エストロゲン受容体: J. Biol. Chem. 2001

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



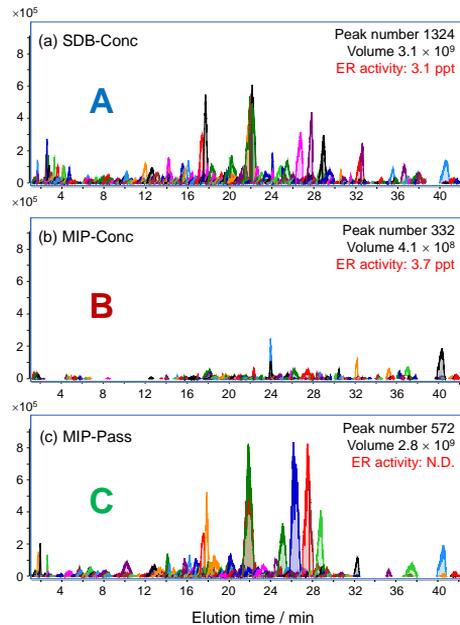
細かい話は少し割愛しますが、例えばこれは女性ホルモンとして働くエストロゲン受容体のエクソ線構造解析で、その中にはまった17β-エストラジオールと呼ばれるホルモンがどういふふう結合しているかを模式的に表した図ですが、これを人工的にまねたような人工基材をつくりまして、それで活性特異的な濃縮基材を作成しようということで、それを最適化するためのスキームとしてここに示したような、できるだけ水になじむような材料を使うということと、いわゆる水素結合と呼ばれるような相互作用をうまく使う、あるいは、ここはちょっと見にくいですが、受容体の中にある疎水部とホルモンの疎水部が吸着するような部分をまねるような手法であるとか、あるいは架橋剤、これは後ほどもう少し詳しく説明しますが、この真ん中の基材を作るためのマトリックスを柔らかくするか硬くするかというような調整をそれぞれ行いまして、最終的に作成物質に対して選択的な吸着を示すような材料ができました。

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.

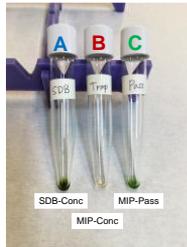
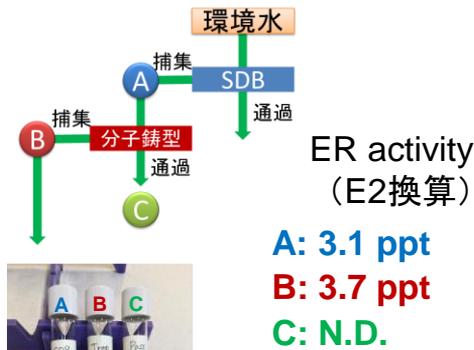


妨害成分の除去によって、真の活性値を検出

これが実際に環境試料を用いたときに本当に役に立つのかというのをこのプロジェクトでは最後にやっているのですが、ここに示すスキームは、一般的に行われている方法で、環境試料水をSDBというのはスチレンジビニルベンゼンと呼ばれる疎水的な吸着剤を通して、そこで捕集されたこのAという物質群が、現在の公定法ではこれをバイオアッセイにかけてエストロゲン受容体の活性があるかないかということの評価をしています。

我々の実験では、ここで捕集したものを我々が作った、先ほどお見せしたような分子鑄型に通して捕集したものと、それを通過したものという、A、B、Cという3つのサンプルをつくります。これの実際に回収されたものをここに示しているのですが、Aで従来法で回収されたものというのは非常に着色があって、いろいろな化合物が含まれているのだらうということが予想される。これを我々の基材を通して捕集したものが真ん中のBということで、少なくとも色がなくなっている。通過したところはやはり色が残っているという関係がある。

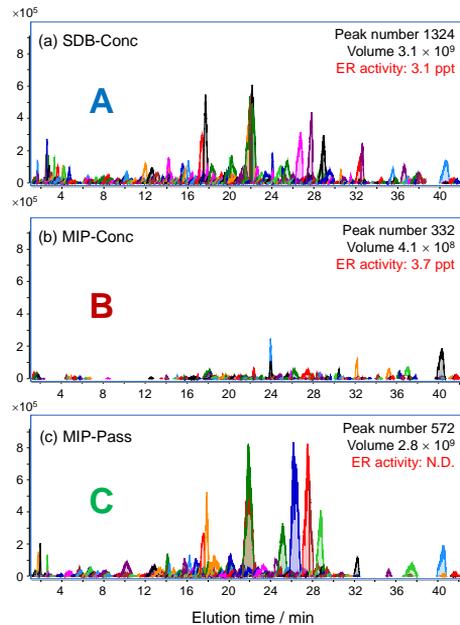
実試料評価 (by バイオアッセイ and LC-QTOF)



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

これを実際の質量分析計という検出・分析方法にかけますと、このA、B、Cと示しましたこういうスペクトルが得られます。このスペクトルは何を示しているかという、このピーク一本一本が物質の種類を示していると理解していただけるのですが、従来法で環境試料水を回収してきた場合はPeak numberが1300と書いてありますので、1300種類ぐらいの化合物が回収されている。それに対して我々の基材を通すと、それを300ぐらいまで絞り込むことができ、通過したところにその残りがあ。では、その実際に回収されたもののバイオアッセイ、生理活性がどうなっているかを評価しますと、ここに示したのがER activityというもので、エストロゲン受容体に対する活性を示した値ですが、この値が大きければ大きいほど活性が高いということを示している。結果だけ申し上げますと、今までの方法と我々が作ったものを通した方法で比べますと、今までの方法よりも活性値が高いということが分かりました。これだけピーク数が多く、こっちでは少ないにもかかわらず活性値はBで回収したほうが大きいということで、この方法を使ったことによって今まで見逃されていたような活性物質がちゃんとカウントされている。つまり真の活性値を検出できた。さらにこの方法では、ここに示したこの質量分析計では特定の化合物の種類を決めることができるのですが、このAの方法では決められなかったような化合物、ここに埋もれてしまって見えていなかったような化合物もBのサンプルでは見えているので、生成効果に妨害成分を除去することによって真の活性値及び活性に寄与するような化合物をちゃんと特定することができるようになります。

ました。

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

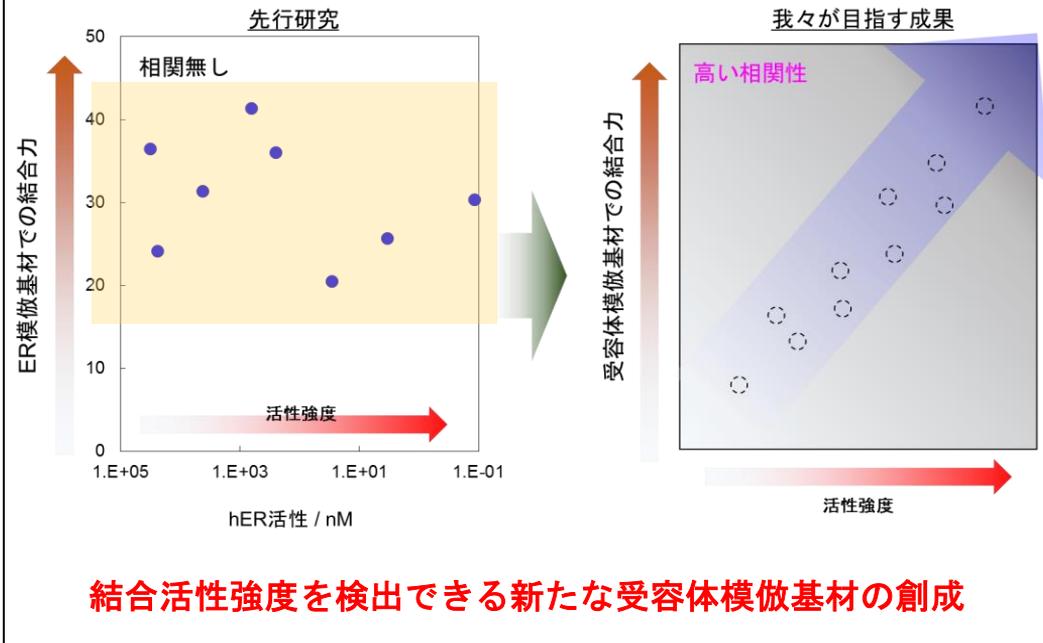
（代表：久保拓也，分担：中島大介）

【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）

実用性の高いスクリーニングへ向けて

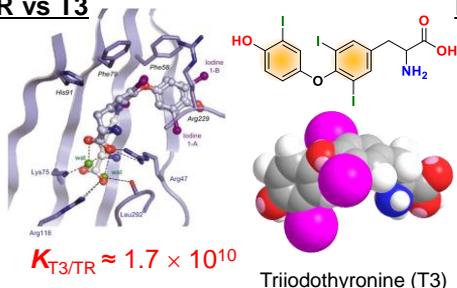


今御説明申し上げた先行研究というのはエストロゲン受容体の結果ですが、例えばある化合物の活性強度を横軸にとって、縦軸に我々が作った基材の結合力というのをプロットすると、先行研究では、活性があるものというのは根こそぎ全て回収はできているのですが、活性強度に対しての相関というのは全くないということが分かっています。

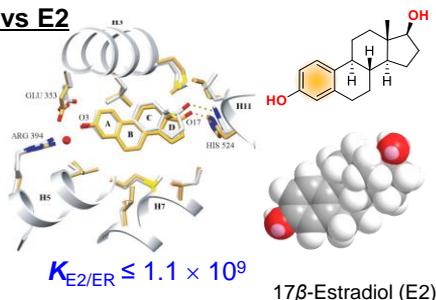
我々が目指す方向性としては、活性強度に対して受容体模倣基材での結合力が比較的に線形な線形を持つような相関を持てれば、より模倣基材の機能が上がるのではないかとということで、活性強度を検出できるような新たな方法を想定できないかということで研究に取り組みました。

甲状腺ホルモン受容体 (TR)

TR vs T3



ER vs E2



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)

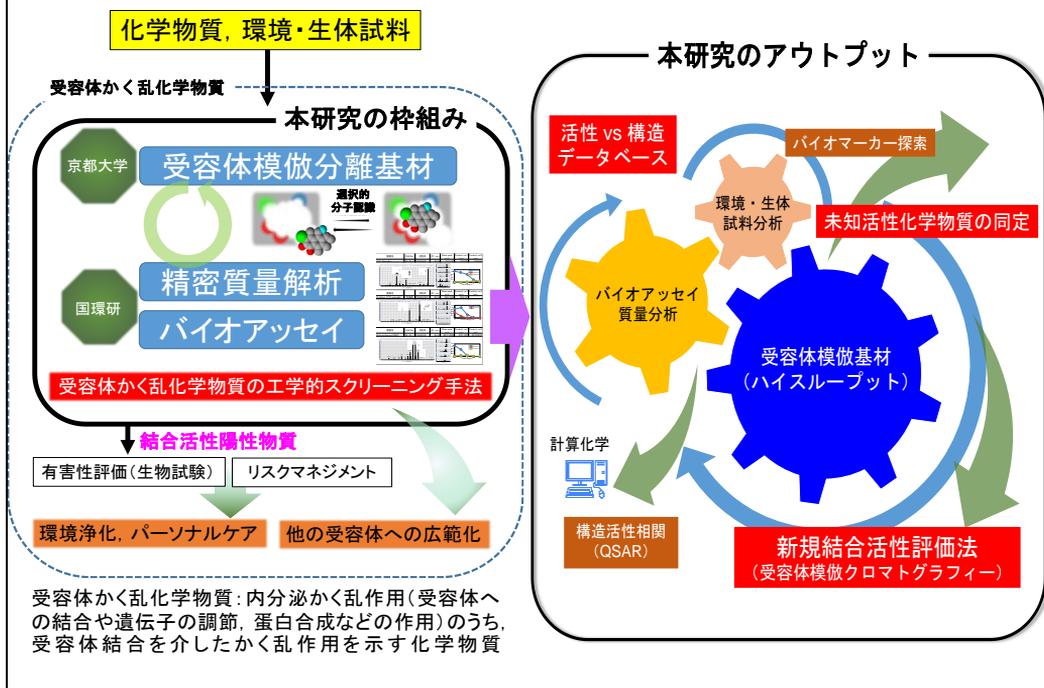
アゴニスト, アン
タゴニストの分子
認識機構の解明
に期待

- 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)

先ほど申し上げたエストロゲン受容体とE2というのは17β-Estradiolという化合物で、ここには甲状腺ホルモン受容体と我々の体の中でつくられるT3の結合様式を模式的に示したものと、それに対する結合定数を示しています。

これを見ますと、甲状腺ホルモン受容体を用いた場合には、非常に化学的な相互作用が起こりやすいような物質を捕まえているということで、結合定数もこちらに比べると1桁以上大きくなっています。それを言い換えますと、人工的に模倣するにはこちらのほうが適しているという判断です。プラスアルファで、受容体モデルとしての甲状腺ホルモン受容体というのが我々の工学的立場からするといろいろな設計がしやすい、評価もしやすいということと、環境的な立場で見ると、この後山崎様から御説明がありますが、EXTEND22あるいはエコチル調査でアメリカの環境保護庁でもかなりthyroid、甲状腺ホルモンに対する懸念が強くなってきていますので、環境研究としても非常に重要な位置づけになるということで、ここから甲状腺ホルモン受容体をターゲットにしたような研究を進めてまいりました。

本研究の概要

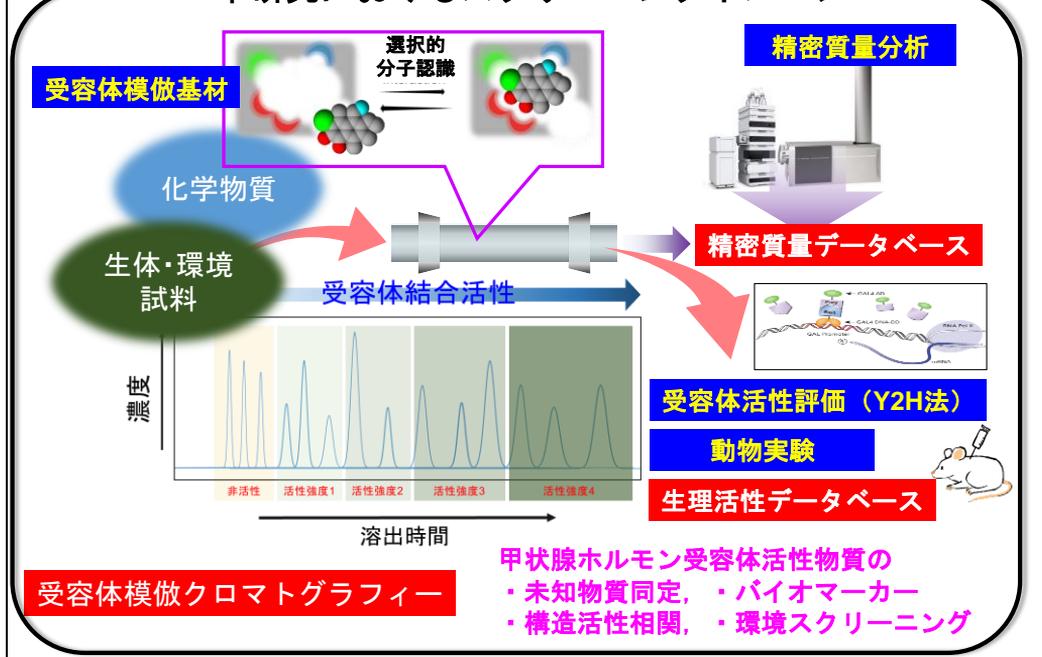


この研究の概要としましては、受容体模倣分離基材を作って、さらに精密質量解析とバイオアッセイを組み合わせ、これは国環研でやっていただいたのですが、こういうデータベースをぐるぐる回しながら、全体を通して受容体かく乱化学物質の工学的スクリーニングを行おう、これが研究内の枠組みとしてはこうなっておりまして、それがいろいろなところに派生するだろう。

実際の本研究のアウトプットとしては、この後お見せしますが、新規結合活性評価法としての受容体模倣クロマトグラフィーと名づけたような手法でありますとか、環境中に存在する未知活性物質を同定したり、あるいは活性と構造がリンクしたようなデータベースを作る。この3つのアウトプットを柱に研究を進めてきました。

本研究の具体的イメージ

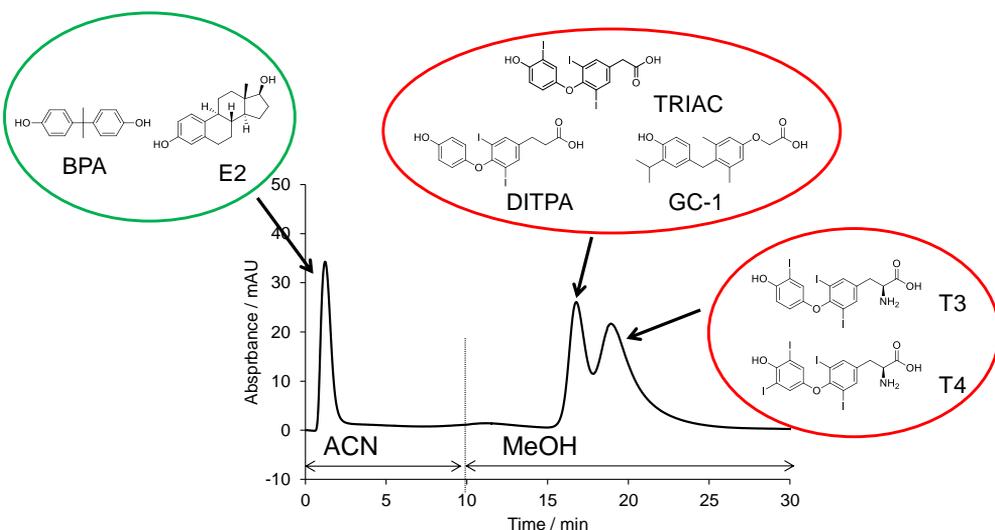
本研究におけるスクリーニングイメージ



具体的なイメージとして、これはいわゆるクロマトグラフィーと呼ばれる手法で、例えば化学物質あるいは生体・環境試料をこういうカラムと呼ばれるものの中を通して、この中には我々が作った受容体模倣基材が充填されている。このカラムを通していく中でこういうふうなピークが現れている。この現れてきたピークが溶出時間に対してこういう活性強度が順に強くなるような関係が得られれば、我々が目指しているような受容体を模倣したようなクロマトグラフィーという新たな手法が創生できるだろう。

さらに、ここで示した精密質量データベースあるいは生理活性データベースを組み合わせて、ここへ出てきたものとこれがリンクするような形で新たなスクリーニングを開発したいということで進めてきました。

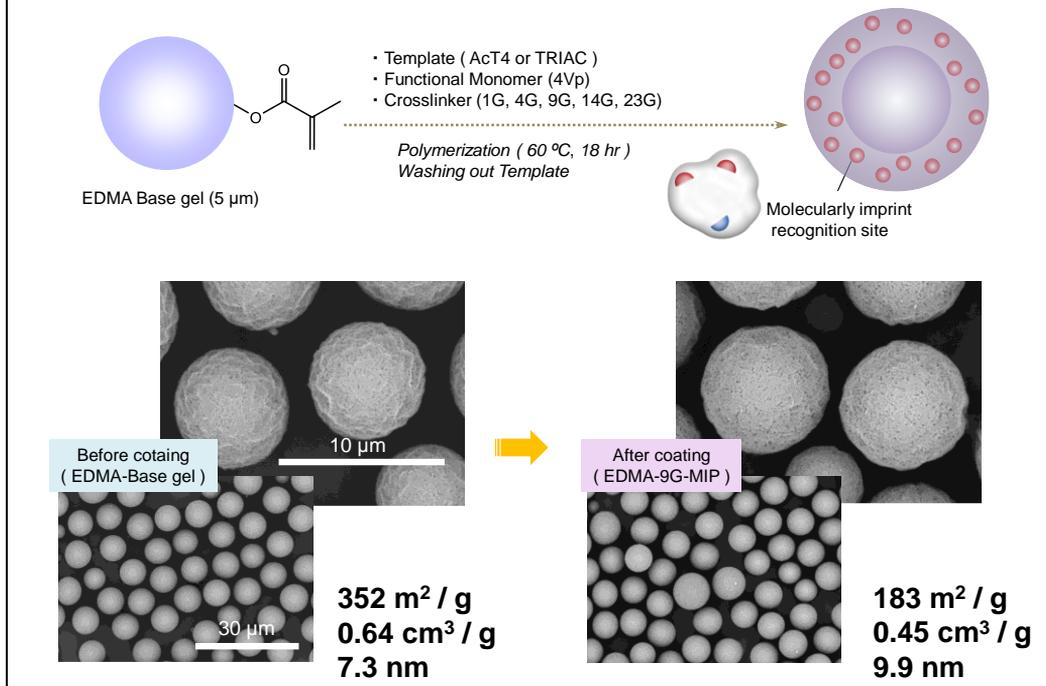
TR結合物質の分離



TR結合，非結合物質の分離に成功

まず、これは極めて簡単な例としてお見せしますが、初めに作成したTRの模倣基材を使って今申し上げたクロマトグラフィーというものをやってみますと、ここに示した化合物を全部混合して一気に分析をしているのですが、まずTRには活性を示さないようなビスフェノールAあるいは17β-Estradiolというのが簡単に溶出します。この途中で溶媒を切り替えることによって、ここに示した赤で囲んだものはTRに対して活性を示す物質ですが、この結果から申し上げたいのは、TR結合、非結合物質を簡単に分離することができる。これはERのエストロゲン受容体のときの成果と同じようなところまではすぐに到達することができたことを示しています。

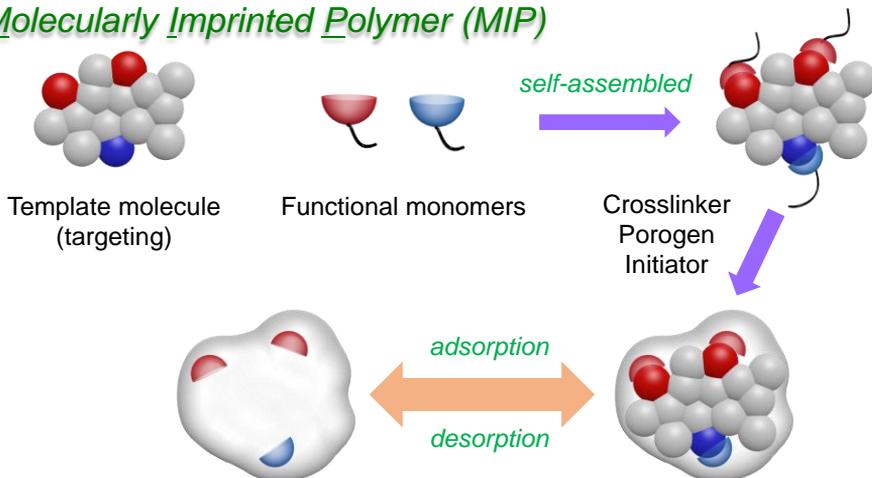
分離能の向上と認識能の最適化



この後、最終的には分離能の向上と認識能を最適化するという目的で、こういうコアシェル型、真ん中にビーズがあってその表面に分子認識場を作ったような、新たな機材を作って、実際にできたものというのは、こういう基材から周りをコーティングすると少しだけ見た目が変わるのですが、モルフォロジーとしてはこういうふうに表面積が減っていたり採光用量が減っていたりということで、いろいろな違いが見えている。

分子インプリント法の概念

Molecularly Imprinted Polymer (MIP)

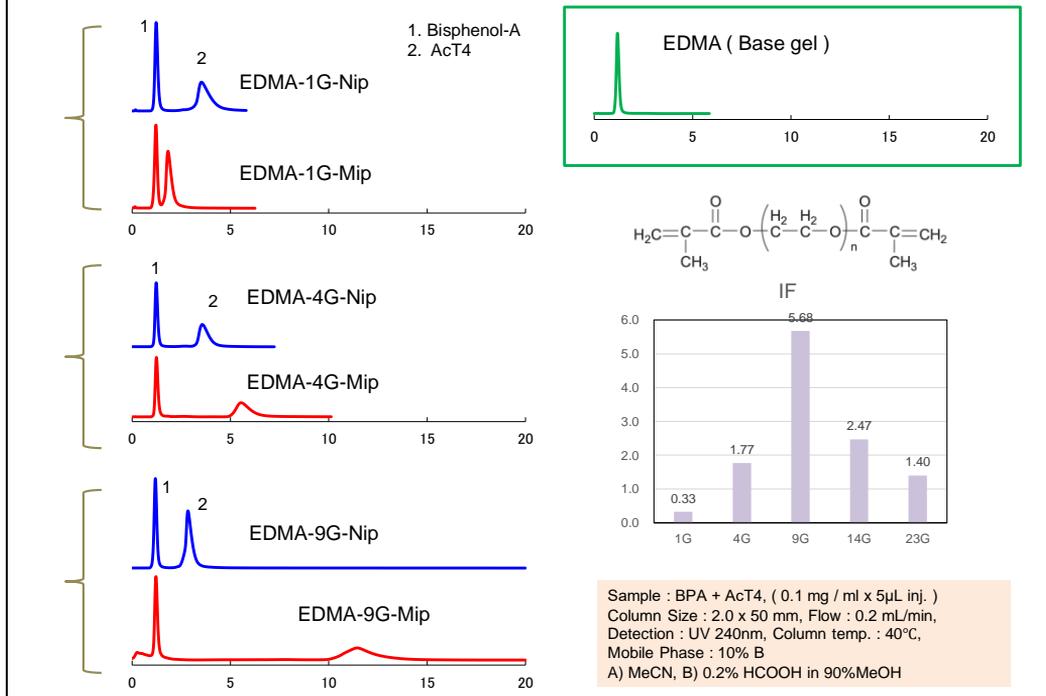


骨格の緩さを検討した例はなかった

ここでもう少し突っ込んでやったのは、初めに申し上げた分子インプリント法の概念というのは、ここに示したポンチ絵で描きますと、例えばターゲットにしたい化合物がある。この化合物と科学的な相互作用をするFunctional monomers、機能性 monomerと呼ばれるものをがちゃっと混ぜますと、こういう複合体ができちゃう。この複合体ができた状態で架橋剤と呼ばれる二重結合を2つ持ったような、手を2つ持ったような試薬と一緒に混ぜ込みますと、この複合体を囲んだような形で補強された高分子というものを作ることができる。最終的にこの高分子の中からこのテンプレート分子をある条件で洗い流すと取り除けますので、取り除くと分子レベルでの鍵と鍵穴の関係というものがつくれる。

これまであまりアプローチされていなかったのですが、ここで言うCrosslinkerと書いている部分が架橋して、ポリマーの高分子の骨格を作るのですが、その骨格を緩くするかかちかちにするかというのをうまく制御したという検討例は今までなかった。これを今回の研究では少し突っ込んで評価をしてみる。

架橋剤鎖長の効果



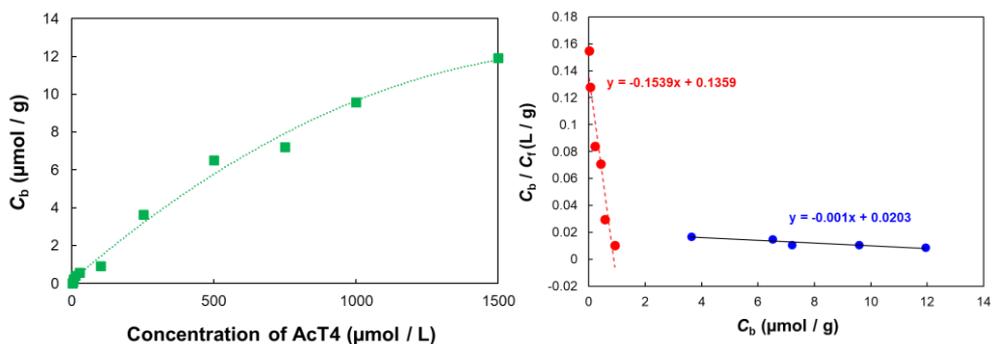
それが実際の架橋剤を使ったものというのはここに示しているもので、両端に二重結合いわゆるビニル基というものがついている。その間にポリエチレングリコールの鎖がつながっているのですが、このnの部分、長くなればなるほど緩々のものができて短くなればなるほどかちかちのものができているのですが、ここをいろいろコントロールしてターゲット分子に対する認識能が変わるのかを評価する。

ここでは認識に関係ないビスフェノールAとTR活性を示すアセチルT4というものをサンプルにしてクロマトグラフィー的な手法で評価しますと、このNipというのはインプリントしていない、認識場を作っていないもので、Mipというのが認識場を作っているものというふうに理解していただくと、このMipと書いたほうでどれだけ選択的にこのアセチルT4というのが保持されるかというのが評価対象になる。

結果から申し上げますと、この架橋剤、このnの値を伸ばしていくと、この赤い2個目のピークの位置を見ていただくとどんどん大きくなっています。これは何を示しているかというと、nが9の架橋剤を使ったときに非常に選択性が高くなったということが分かる。さらに伸ばしていくと、これは実は、これは選択性の指標を縦軸にとって横軸にnの値の架橋剤の種類を示しているのですが、9のときに最も選択制が高く、それより長くすると選択性がまた下がってくるということで、マトリックスの柔らかさをコントロールすると分子認識能が発現する最適時が存在するので、この5.68という数字が非常に高い値なのですが、こういう非常に選択性の高い基材

を作ることができます。

結合強度の算出



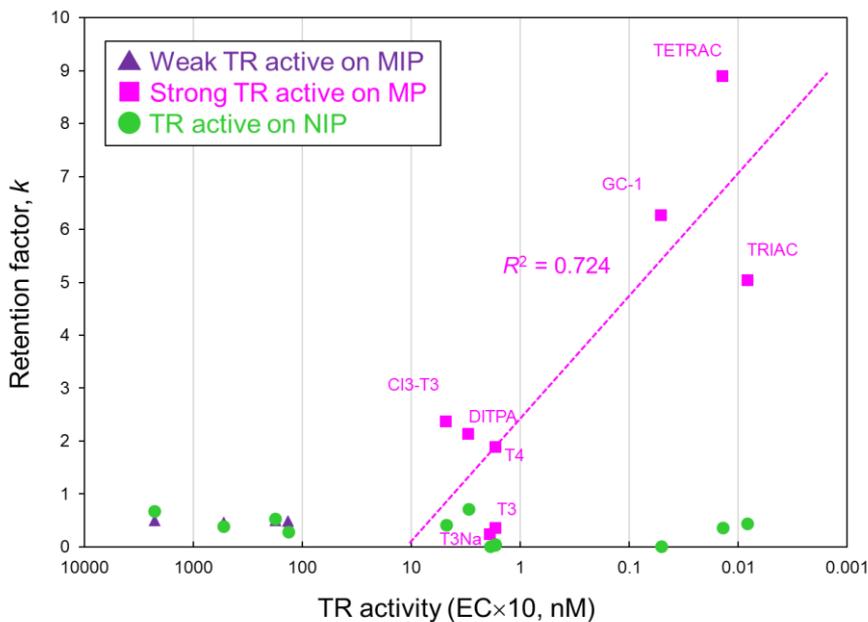
$$C_b / C_f = nK_P - KC_b,$$

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

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

ここは専門的なことなので結果だけを申し上げますが、結合強度そのものを実験的な結果から算出しますと、結合定数、我々が作った基材とアセチルト4という化合物の結合定数というのは「 $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 」ということで、非常に吸着・選択性の高い基材を作ることができたということまで来ました。

TR生理活性との相関

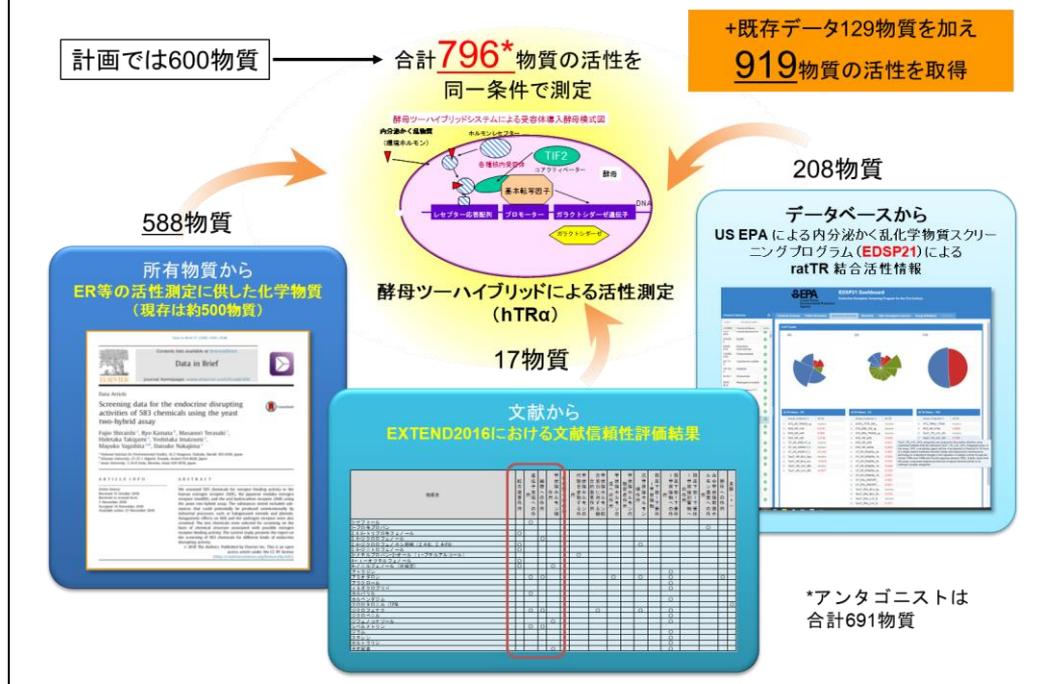


強い活性を示す化合物に対して結合強度が正の相関

では、これを使ってほかの化合物、TR活性物質に対してはどういう選択性を示すかということで、我々がもともと目指していた線形の結果が得られるかということですが、例えばこれが縦軸にクロマトグラフィーにおける保持の強さを示していて、横軸にはTR activity、右に行けば行くほど活性が高いことを示しているのですが、まず、先ほどもお見せしたNipというインプリントしていないような基材を使ってプロットしますと、このactivityに対して結合の強度というのはほとんど相関を示さない、緑のプロットですが。

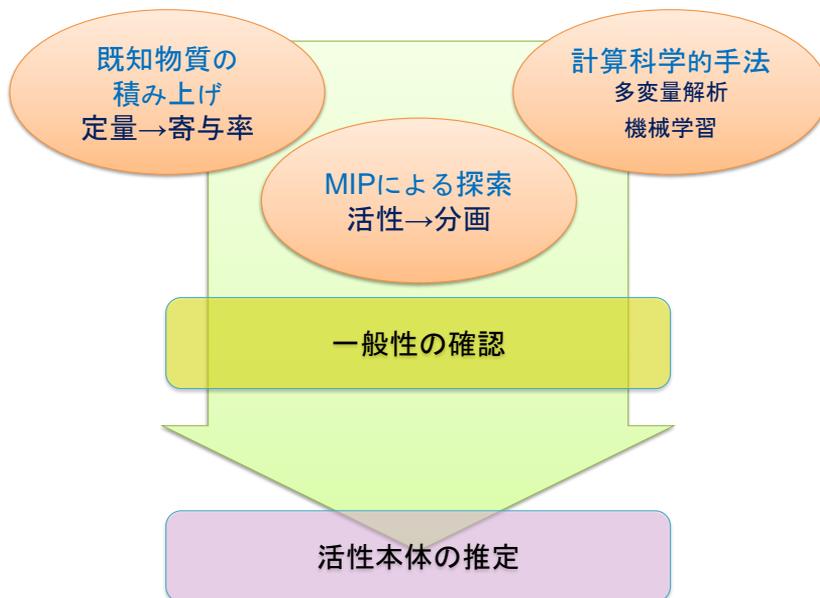
それに対して紫の三角とピンクはMipを使った結果ですが、まず弱い結合を示すような、弱い活性を示すようなところはそんなに相関がよくないのですが、活性が比較的高いピンクの四角で示した辺りになりますと、完全な線形ではないですが、ある程度線形に近いような結果が得られて、我々がもともと目指していたような活性と結合強度に相関があるようなところが見えるようになってきたということが分かりました。

hTRα 活性データの測定



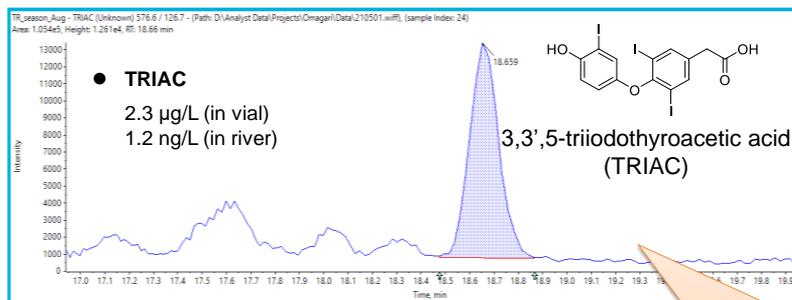
さらにこの研究の中では、ヒト(ヒューマン)のhTRα活性データということで、796種類の物質を使って酵母アッセイをかけまして、どういう化合物が活性があるか、アゴニストなのかアンタゴニストなのかということをして評価してデータベース、それとさらに質量分析の結果がリンクするようなデータベースを作り上げることができました。

下水処理場排水中の活性物質探索



さらに我々が作ったMIPを使って環境試料中から回収して、その中に含まれるTRの活性物質、このときは新規化合物が見つかるだろうということで評価をして、実際に得られた結果というのはここに示したTRIACです。

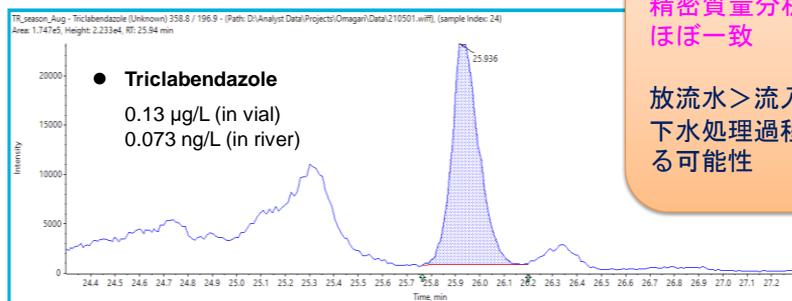
アゴニストの検出・定量



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

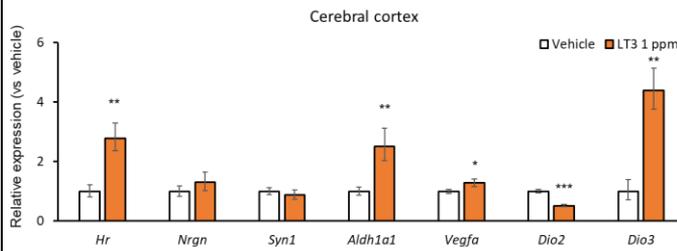


精密質量分析でTRIACと
ほぼ一致

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

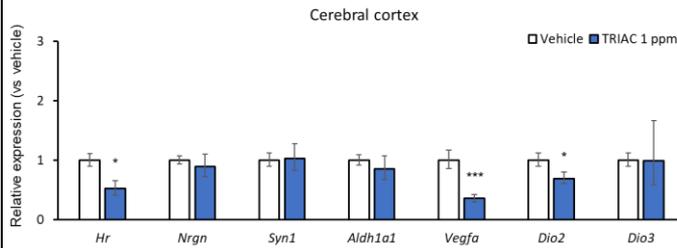
これは体の中ではつくられないもので、恐らく下水処理の過程でできてきた化合物なのですが、このTRIACと呼ばれる化合物が原因物質である。この場合は下水処理場の下流で取った試料の中に比較的高いTR活性がみつけられて、そのほとんどの原因物質がこいつであると。これは何点かで評価をしたのですが、どの点においてもこのTRIACが今のところ原因であると。これは未知物質ではなく既知の物質ではあるのですが、初めて環境試料の中でこういう物質が原因物質であるということを特定した結果です。

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

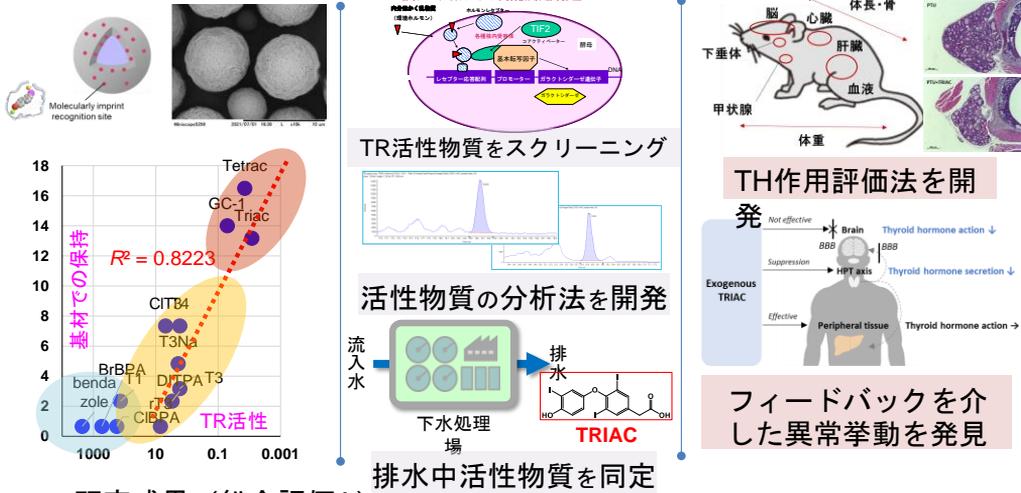
大脳皮質における
TR標的遺伝子発現を
低下させた

TRIACは脳におけるTR作用を減弱するかく乱物質である

この物質に関してはそれほど毒性試験というのがまだ進められていなかったの
で、我々の研究グループの中でマウスを使った研究というもので評価をしてみます
と、これはちょっと細かい話はここには書いていないのですが、そのTRIACという
ものをマウスの体に入れますとTRの甲状腺ホルモンというふうに認識されて末梢
臓器、例えば肝臓であるとかその他の臓器の中では甲状腺ホルモンが今分泌さ
れているというふうになるのですが、この物質は脳関門と呼ばれる脳にだけ届か
ないような性質を示すという特異な結果が示されました。

つまり体の中の首から下の部分ではこの物質はホルモンとして認識されるので
すが、ところが脳にだけそのホルモンが到達しないということで、非常に特異な
TRIACというのは脳におけるTR作用の減衰をするかく乱物質であるということ。こ
れも初めて特定したような結果です。こういう物質が恐らくまだ世の中に存在する
ということが予想されます。

【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**）

今のこの研究をまとめますと、こういう線形の基材ができて、データベースができて、さらに甲状腺ホルモンの作用評価法を一部開発してフィードバックを介した挙動を発見したということですが、この段階ではここに示すように相関が見られたのは主要物質のみで、物質量、実環境試料から得られたTR活性寄与物質というのがTRIACのみであると。さらにTR影響評価法を確立したのですが、これもあくまでも今1種類しかやっていないと。

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)

ここでは非常に研究要素が残された状態でこの研究が終わりを迎えたので、まだまだこれは研究の余地があるということで、現在取り組んでおりますこの3つ目のプログラムに移っていくと。

甲状腺異常に寄与する内分泌かく乱化学物質

甲状腺

どんな化学物質が？
(化学構造特異性)

環境中のどこに、どの程度？

アゴニスト作用？
アンタゴニスト作用？

健康への影響は？
(甲状腺疾患, 発達障害)

複合影響はある？

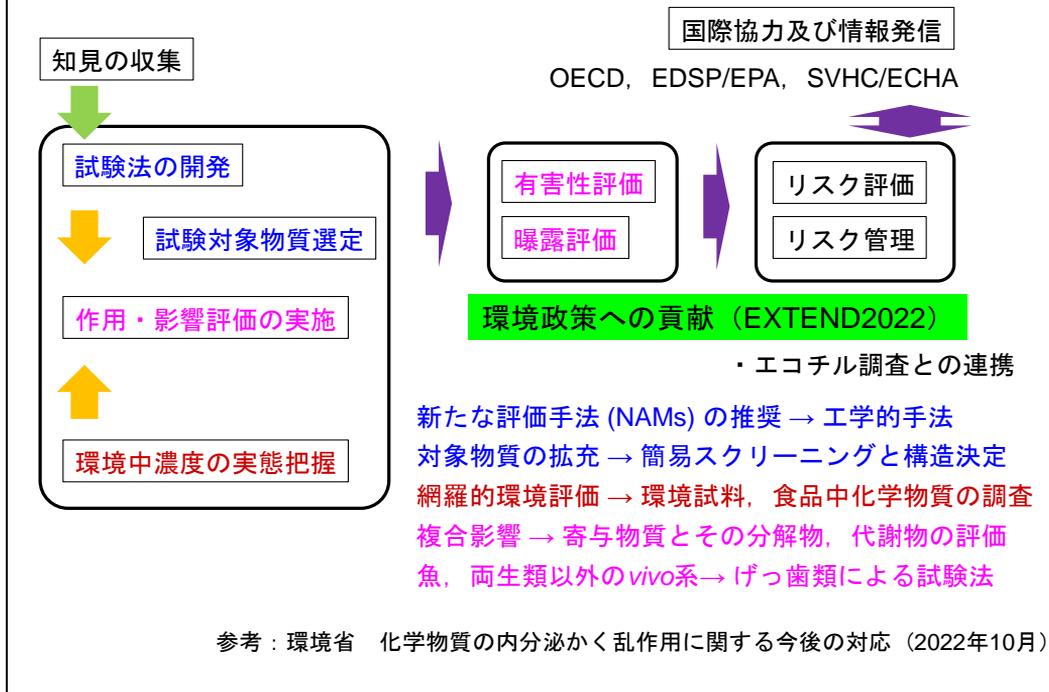
未知物質は存在する？

Environ. Sci. Pollut. Res., 2022, 29, 38912; *Sci. Total Environ.*, 2022, 838, 156386; *Environ. Sci. Technol.*, 2022, 56, 460; *Endocr. Rev.*, in press; *Front. Endocrinol.*, 2022, 13, 883827; *Thyroid. Res.*, 2021, 14, 25; *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2021, 28, 6830; *Front. Endocrinol.*, 2021, 12, 627167; *Crit. Rev. Toxicol.*, 2020, 50, 740; *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2019, 15, 444; *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2019, 1446, 44.

甲状腺異常に寄与する内分泌かく乱化学物質としてここに示しているのは、先ほどお見せしたTRIAC、脳関門を通らない。T3、T4というのは体の中でつくられる甲状腺ホルモン、こういうものがあるのに対して、我々の環境中からはこういうハロゲンのついたもの、この後出てきますが、ビスフェノールAのハロゲン物質であるとかプラスチックから出てくるこういうフタル酸エステル、我々が口にする食品にもこういういろいろな化合物が含まれていて、一体どこから何が入ることによって甲状腺異常が発生するのかということで研究としては非常に多く発表されています。

ここで我々の主な疑問としては、どんな化合物が、どういう化学物質の特異性があるのか。環境中のどこにどの程度、それがアゴニスト・アンタゴニスト作用のどちらなのか。健康影響、それらの複合影響、未知物質はどれだけあるかと。考えただけでもこれぐらいの疑問が出てきます。

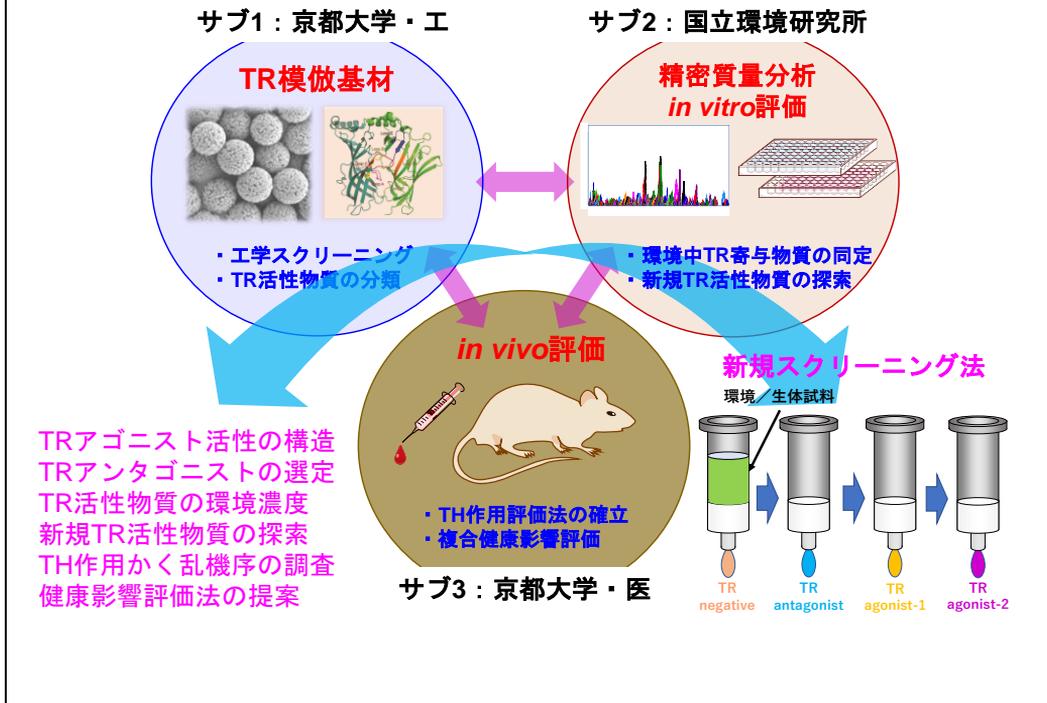
EXTEND2022の枠組みと求められるアウトプット



これを解決するための研究を進めようということで、現在のEXTEND2022の枠組み、これは環境省のホームページから抜粋したのですが、こういう流れになっています。

この流れの中でやるべきことが幾つかあるだろうということで、1つ目は新たな評価方法、我々がこれを今まで開発し続けてきたような工学的手法、それを含めたような簡易スクリーニングと構造決定をするような手法が必要であると。もう一つは網羅的な環境評価、環境試料や食品も含めた化学物質の調査も必要であって、複合影響としては寄与物質とその分解物、代謝物を含めた複合的な複数の化合物が混ざったときにどういう影響があるか。現在行われているvivo評価としては魚類とか両生類の評価が主ですが、それをげっ歯類で我々としては試験法を確立したいと。こういうことを今回の研究の中での枠組みとして進めてきています。

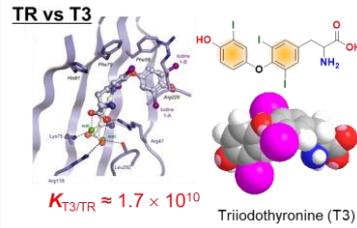
甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質評価へ向けた研究提案



今始めました研究提案としては、こういう我々のグループで工学的なスクリーニング、あるいはTR活性物質を分類するということであるとか環境中の物質を同定して探索する。そして動物実験を使ったような健康影響を評価して、結果的に新規のスクリーニング手法を開発してここに示したようなアウトプットを出していきたいと考えているところです。

サブテーマ (1) 京都大学 大学院工学研究科

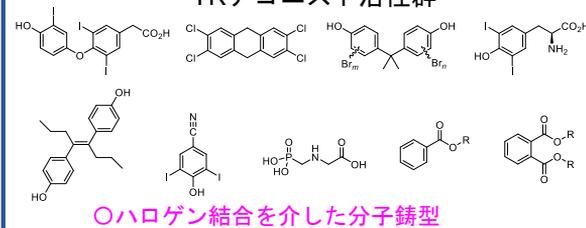
TR vs T3



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

Triiodothyronine (T3)

TRアゴニスト活性群

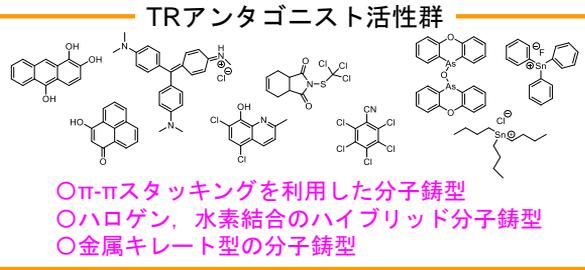


- ハロゲン結合を介した分子鑄型
- 距離認識（酸性官能基）型の分子鑄型
- 水素結合型の分子鑄型

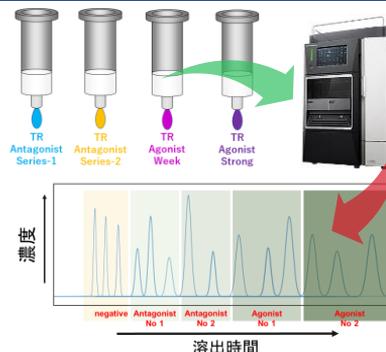
既知の分子認識模倣では不十分

分類わけされたTR模倣基材

TRアンタゴニスト活性群



- π - π スタッキングを利用した分子鑄型
- ハロゲン、水素結合のハイブリッド分子鑄型
- 金属キレート型の分子鑄型



TR Antagonist Series-1, TR Antagonist Series-2, TR Agonist Weak, TR Agonist Strong

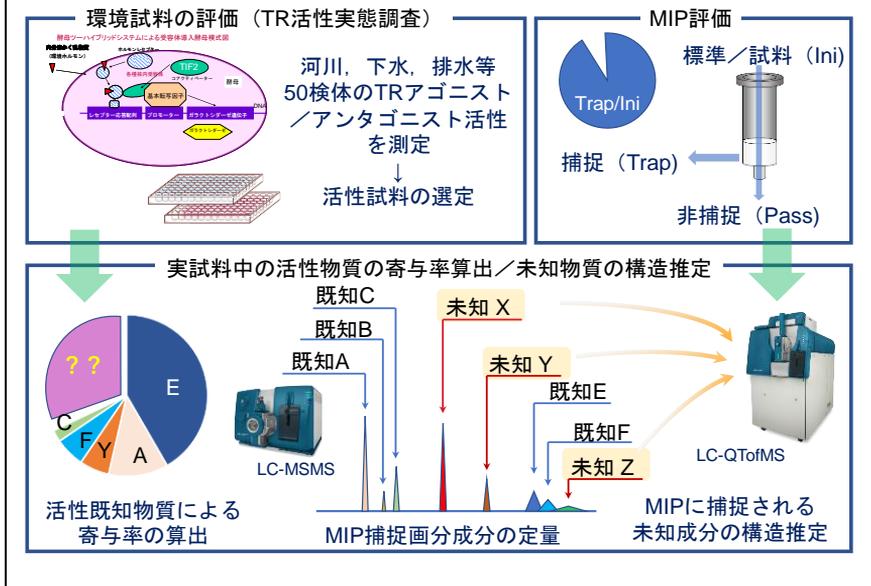
濃度 vs 溶出時間

negative Antagonist No 1, Antagonist No 2, Agonist No 1, Agonist No 2

実際のところ、我々のテーマでは、私のグループでは今までやってきたような既知の分子認識模倣では不十分だという判断になりまして、例えばTRのアゴニスト活性群としましても、こういうメジャーなものに対してここに示したような様々な科学的な構造が異なるような物質が存在すると。これを捕まえるために幾つかの手法を組み合わせたとような方法で模倣基材を作成する。

さらに拡大しますと、TRアンタゴニスト活性群というのはもっと複雑な構造を持ったものが含まれているので、これらに対してもある程度構造別に分類するような基材をつくりたいと。それを模式的に表すと、ある一つのカートリッジとかカラムを使ったときにアゴニスト群だけを出していく。アンタゴニスト群だけの1・2を出したりアゴニストの弱いものと強いものをこういうふうに分けていって、最終的にクロマトグラフィー的に分離したときにある程度の活性の強度と構造が相関したような分類分けをできるような基材を複数作成するというのが私のグループ。

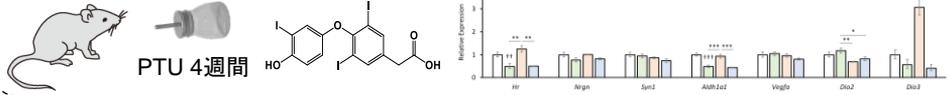
サブテーマ (2) 国立環境研究所 環境リスク・健康



サブテーマ(2)では、そのようにして作ってきた基材を使って捕集されたものの中に、例えば質量分析で見たときに既知物質がある場合はそれでいいのですが、その中で活性を示すのに化学構造に未知のものがあると。これに関しては質量分析で細かく見て新たな物質としてデータベースに加えるというようなことをしたり。

サブテーマ (3) 京都大学 大学院医学研究科

甲状腺機能低下症誘導 → TR活性物質投与 → 甲状腺ホルモン作用評価 bioRxiv,2022



KI併用 MMI使用
甲状腺機能低下症誘導を
1週間に短縮する

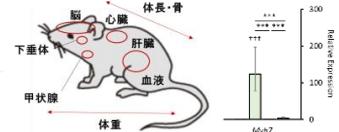
ハイスループット化
高感度化 高精度化

RNA-seq
鋭敏かつ安定して変動する
甲状腺ホルモン標的遺伝子群を探索

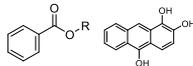
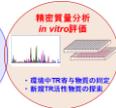
臓器毎に甲状腺ホルモン作用を定量評価できる *in vivo* 試験を最適化

単独投与
フェノタイプを把握
複合投与
単独投与での遺伝子発現変化量を元に
相加・相乗・競合を判定

**既知かく乱物質
によるモデル作成**



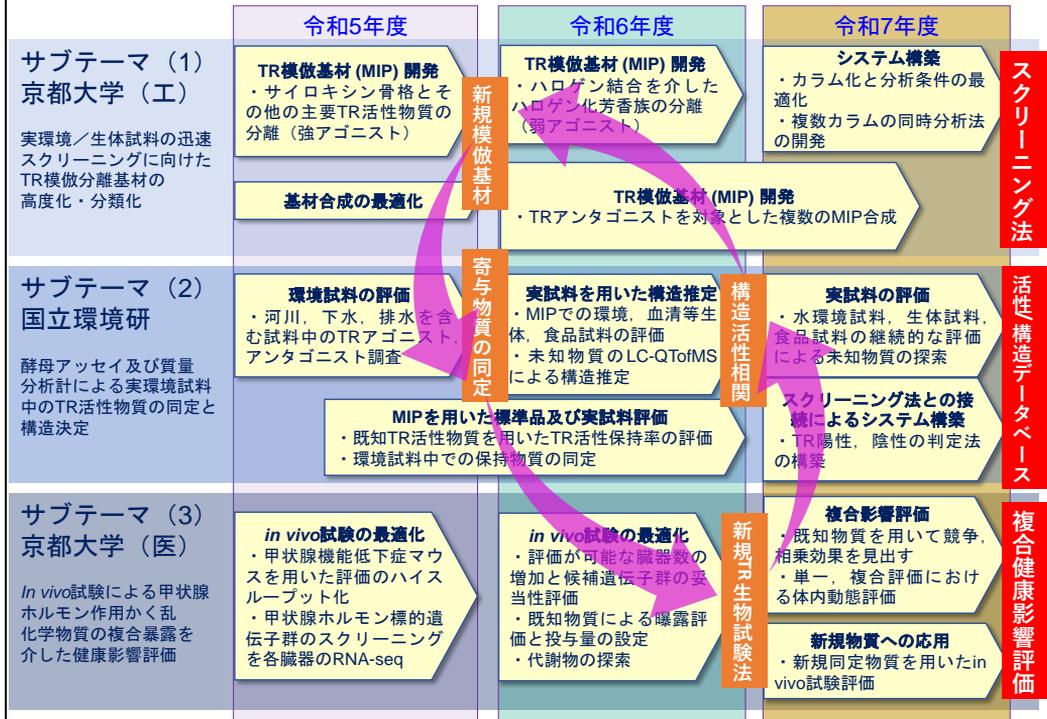
複合曝露影響評価スキームの確立



サブテーマ1及び2を通じて同定された
実環境/食品試料中の候補物質の健康影響評価

サブテーマ(3)では、前回やったようなマウスを使った実験、プラスアルファ複合影響を示すような評価を行うということで、3つのグループで評価を進めているところです。

研究内容（研究計画）



これはちょっと細かいので省きます。

環境政策への貢献

重点課題⑮において

「多種・新規の化学物質等の網羅的な環境動態の把握・管理と予測・評価」
「環境中の化学物質等の複合的なリスク等による生態・健康影響の評価・解明」
が求められており、本研究で見込まれる成果のうち、

新規スクリーニング手法、データベース構築、複合暴露を介した健康影響評価は、
これらの課題に合致する内容である。TRをモデルケースとして、様々な受容体を介した化学物質の評価、予測のプロトコルとして環境政策への貢献は大きい。



EXTEND2022, エコチル調査

行政ニーズとしての (5-3) 「作用、構造等が類似する複数物質の健康リスク評価に関する実践的研究」については、TR活性物質のうち極めて構造に近い物質であっても、健康影響が異なる可能性をすでに見出している。

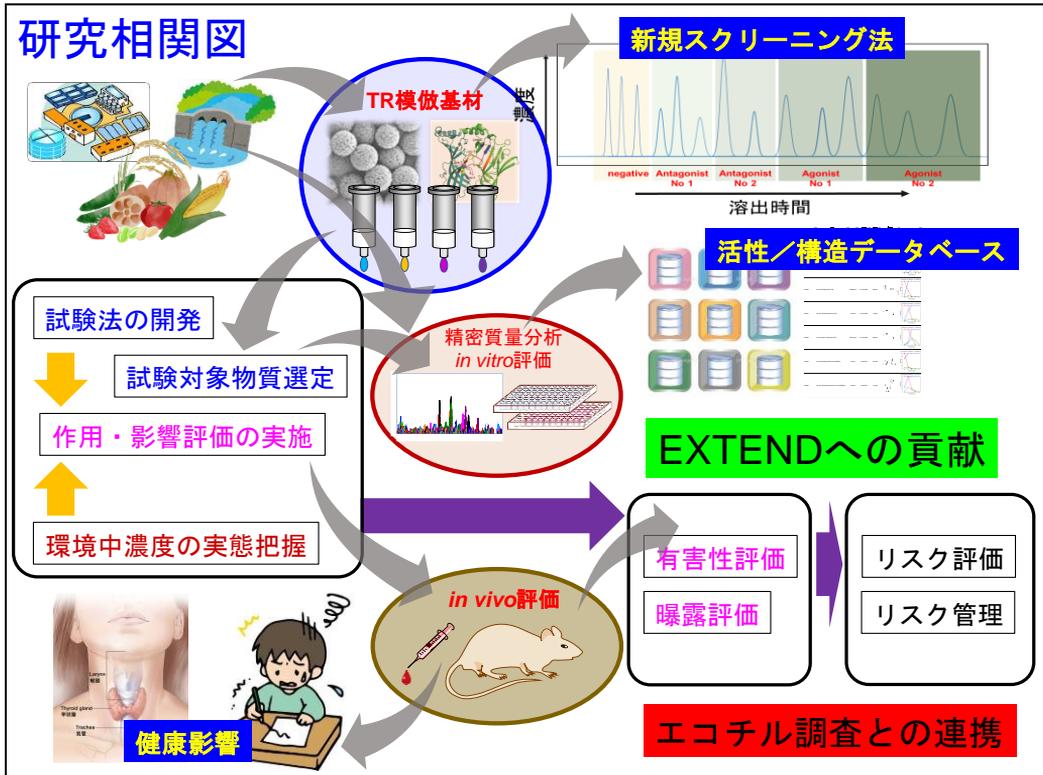
本研究内では、実環境試料に基づく化学物質のうち、単一化合物のそれぞれの健康影響の多様性を評価するとともに、それらの複合的な影響評価も視野に入れている。これらの影響評価に裏付けられた**工学的スクリーニング手法の開発**を目指すことから、本研究が行政ニーズのうち「化学物質の複合影響評価に関するガイダンス」や「健康リスク評価（環境リスク初期評価）」に貢献できる。



New Approach Method(ologie)s (NAMs), 環境分析産業

最終的には、EXTEND2022に貢献するようなスクリーニング手法、データベースを構築して複合影響を介したような健康影響評価をやっていきたいと。これは恐らく環境省の取り組んでおりますエコチルにも貢献できるような話だなと思います。

一つ、これはいろいろなところでニーズとして出てくるのですが、New Approach Methods。今までみたいな生物学的な手法ではなくて、もう少し工学的な知見から得られたような手法を開発するというので全世界的に力を入れられているようなので、僕らの方法に関してもこういうところに参入できるのではないかと考えているところです。



ちょっと時間が押していますので。

2023年度中の計画

- ・ HO-PCBを用いたHPLC評価
- ・ TRアンタゴニストの分離
- ・ ポリマー層の導入量：
 - 固体表面での重合効率を改善
 - 溶媒量の最適化要
 - 重合条件（基材表面への開始剤結合etc.）
- ・ ハロゲン相互作用：
 - 機能性モノマー以外の相互作用を抑制
 - 溶媒系の制限

2023年度の計画としてはここに示したような、まだ結果が途中なので今日はお出しませんが、こういうことを今進めていると。

環境中のPFAS

Effect-Directed Analysis Based on Transthyretin Binding Activity of Per-and Polyfluoroalkyl Substances in a Contaminated Sediment Extract
Environmental Toxicology and Chemistry, Volume 43, 2024, C1, 235-475

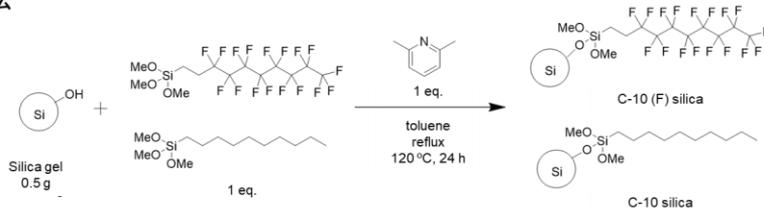
PFASに関する総合研究（環境省）

多くの種類が存在するPFASの中からリスク管理を行う優先度が高い物質（群）を抽出するために必要な、PFASの有害性やその定量的な把握手法に関する研究を推進します。これは、PFOS、PFOA等の次にリスク管理の優先度が高いと考えられる物質（群）について、物質群としての合算評価（作用、構造等が類似しているものを物質群として評価する、いわゆる「複合影響評価」）や管理も視野に入れ、その候補となる物質（群）を抽出し、そのような物質（群）の健康リスクを適切に評価するための知見を得ることを目的としています。

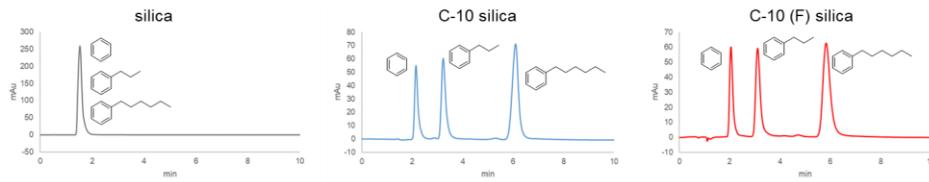
これも時間の関係で省きますが、去年の論文の中で環境中のPFAS、いわゆるフッ素がいっぱいついたような化合物も同じように、甲状腺ホルモン受容体に対して結合するというような報告がありまして、このPFASに関しても直接的に私の今回の研究の内容とはかぶらないのですが、それと関連するような形でPFASに関しても今研究を進めていて、最終的にはこれを成果の一部として組み合わせてPFASも含めた成果にしたいと考えております。

フッ化アルキル修飾シリカゲルの作製

作製方法



LC測定による表面修飾の確認



LC condition

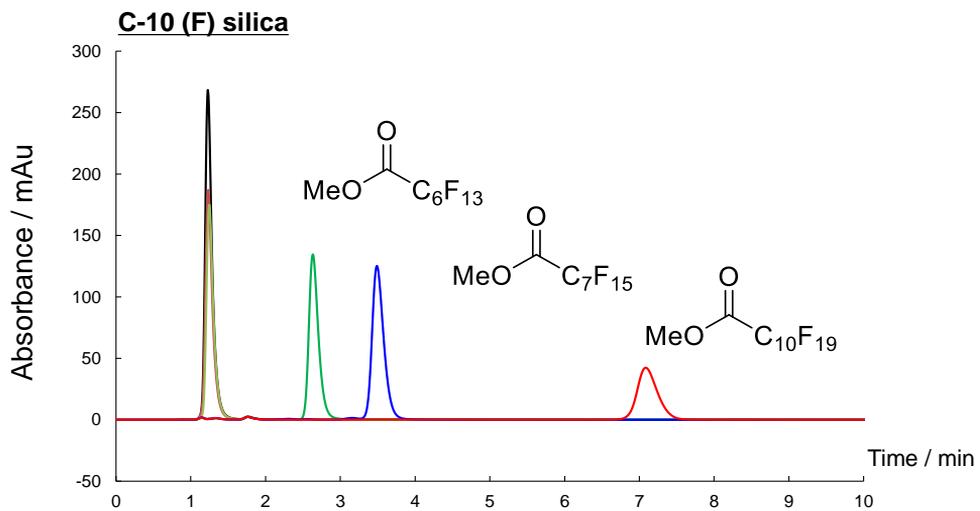
column, silica column, C-10 silica column, C-10 (F) silica column (100×2.0 mm i.d.); injection volume, 5 μL ; temperature, 40 $^\circ\text{C}$; flow rate, 0.2 mL/min; detection, UV 260 nm; mobile phase, water/methanol = 3/7.

疎水性相互作用が発現



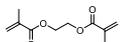
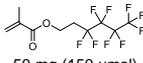
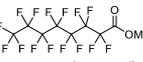
表面修飾の成功を確認

フッ化アルキルの分離



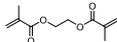
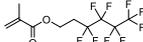
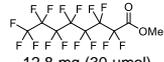
HPLC conditions: column, C-10 (F) silica (100 × 2.0 mm i.d.); mobile phase, **acetonitrile**; flow rate, 0.2 ml / min; analytes, 1 methyl heptanoate, 2 methyl octanoate, 3 methyl decanoate, 4 methyl tridecafluoroheptanoate, 5 methyl pentadecafluorooctanoate, 6 methyl nonadecafluorodecanoate (2000 ppm in acetonitrile); injection, 1.0 µl; temperature, 40 °C; detection, UV 210 nm

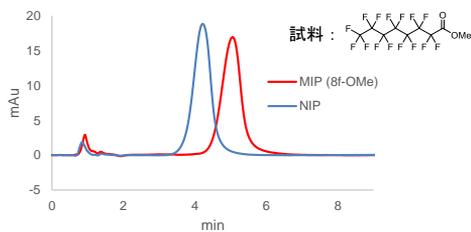
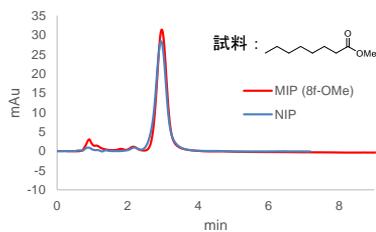
表面修飾によるMIPの作製

	架橋剤	機能性モノマー	鑄型分子
NIP	EDMA  50 mg	F9-monomer  50 mg (150 μmol)	-
MIP (8f)	EDMA 50 mg	F9-monomer 50 mg (150 μmol)	8f  12.4 mg (30 μmol)
MIP (8f-OMe)	EDMA 50 mg	F9-monomer 50 mg (150 μmol)	8f-OMe  12.8 mg (30 μmol)



NIP, MIP充填カラムのLC測定結果-2

	架橋剤	機能性モノマー	鑄型分子
NIP	EDMA  50 mg	F9-monomer  50 mg (150 μmol)	-
MIP (8f-OMe)	EDMA 50 mg	F9-monomer 50 mg (150 μmol)	8f-OMe  12.8 mg (30 μmol)



LC condition

column, NIP, MIP (8f-OMe) column (50 × 2.0 mm i.d.); temperature, 40 °C; flow rate, 0.2 mL/min; detection, UV 210 nm; mobile phase, water/acetonitrile = 5/5.

研究成果

Enhanced molecular recognition with longer chain crosslinkers in molecularly imprinted polymers for an efficient separation of TR active substances,

Takuya Kubo, Mayuko Yagishita, Tetsuya Tanigawa, Sayaka Konishi-Yamada, Daisuke Nakajima

Under revision in RSC advances

Evaluation of fluorous affinity using fluoroalkyl modified silica gel and selective separation of poly fluoroalkyl substances in organic solvents

Atsuya Tadano, Yoshiyuki Watabe, Tetsuya Tanigawa, Sayaka Konishi-Yamada, Takuya Kubo

Under review in J. Sep. Sci.

At least 3 papers

To be submitted (until Sep 30, 2024)

～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)

参加費
無料
定員100名

in コンベンションホールAP浜松町 N+O会議室

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「環境検体に基づく甲状腺ホルモン作用かく乱化学物質の同定・分類と発がん影響の評価法開発」
 5-2302「アーク振動発熱法による環境汚染物質の定量デジタルアークアップ手法の開発」
 連絡先：kuho.takuya.6c@kyoto-u.ac.jp

お申込み方法

<https://forms.gle/apznox3k62fpTug8A>
 QRコードから、googleフォームでお申込み→

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
 東京都港区芝公園2-4-1 芝パークビルB会地下1F
 AP浜松町
 ・都営地下鉄大江戸線/浅草線「大門駅」より徒歩3分
 ・京浜東北線「浜松町駅」より徒歩7分

最後に少し宣伝になるのですが、5月に私の推進費のグループと先ほど申し上げた国立環境研究所の中島先生の研究グループのジョイントシンポジウムを東京で行います。

これは近日中にERCAのホームページ、あるいは国立環境研のホームページにも公開されるのですが、もし御興味があればこのURLからお申し込みいただいて、ぜひ最新の環境中の化学物質の分析についての講演、6課題について聞いていただければと思います。

ちょっと駆け足になりましたが、以上です。