

研究課題名：環境ホルモン受容体センシング法による内分泌かく乱性の順位予測

主任研究者：所属機関：九州大学大学院（理学研究院）

氏名：下東康幸

1. 研究目的

内分泌かく乱作用が懸念される非常に多数の既存の化学物質を、迅速に精度高くスクリーニングする方法が必要とされている。化学物質の内分泌かく乱作用は、化学物質のホルモン受容体応答性に密接に関連している。したがって、化学物質のホルモン受容体結合性、ホルモン作用、あるいは抗ホルモン作用の3つの活性を統合的に評価し、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論の開発が求められている。

我々は、「化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする」という、全く新しい着想に基づく「ホルモンの受容体結合性およびホルモン活性の同時測定評価法」を開発した。

本研究課題では、このホルモン受容体コンホメーション変化センシング抗体法を「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立することを目的とする。

このためまず、核内受容体のうち、その内分泌かく乱作用が最も懸念されているエストロゲン受容体 (ER) を取り上げ、内分泌かく乱性順位予測法を確立する。さらに、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体をはじめ、グルココルチコイド受容体やプロゲステロン受容体でも同様に実施する。

2. 研究の進捗状況及び得られている成果

① 女性ホルモン・エストロゲン受容体 (ER) コンホメーションセンシング抗体を用いた、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法の確立

ホルモン受容体にホルモンや化学物質が結合すると受容体がホルモン活性型 (アゴニスト型)、あるいは不活性型 (アンタゴニスト型) に構造 (コンホメーション) 変化する (図1)。ホルモン受容体コンホメーション変化センシング抗体法は、ERについて開発されたものであり、こうしたコンホメーション変化を特異的な抗体で感知 (センシング) しようとするものである。この方法は、化学物質のホルモン受容体結合活性のスクリーニングのみならず、ホルモン活性について同時に測定・評価することを可能にする方法である。

この方法を「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立するために、本研究ではまず、試験方法および解析方法について検討した。用いる受容体の濃度、抗体の濃度、競合する抗原ペプチドの固定化方法、アッセイ手順等について検討し、試験条件を最適化した。そして、受容体結合試験における結合能 IC_{50} (M) と対応する抗体応答有効濃度 EC_{50} (M)、ホルモン活性と対応する最大抗体応答性 R_{max} (%) を算定する2次解析の方法を確立した (図2)。

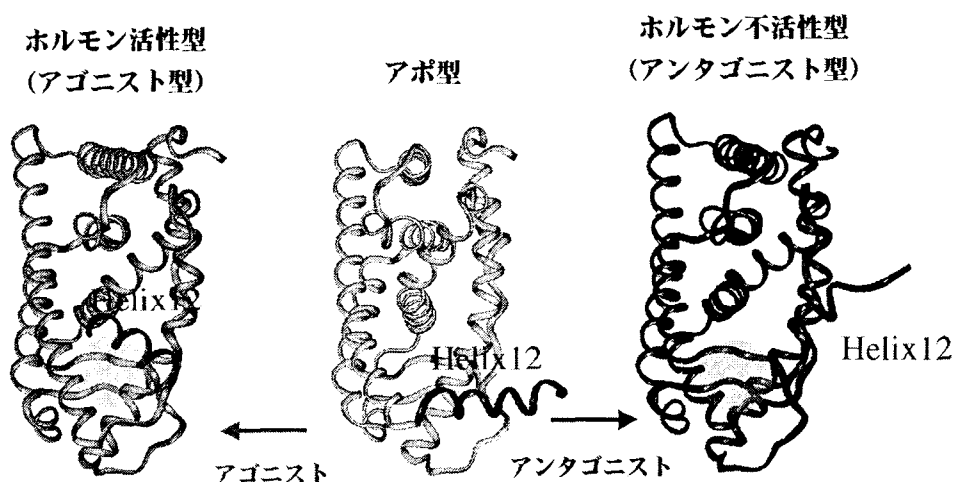
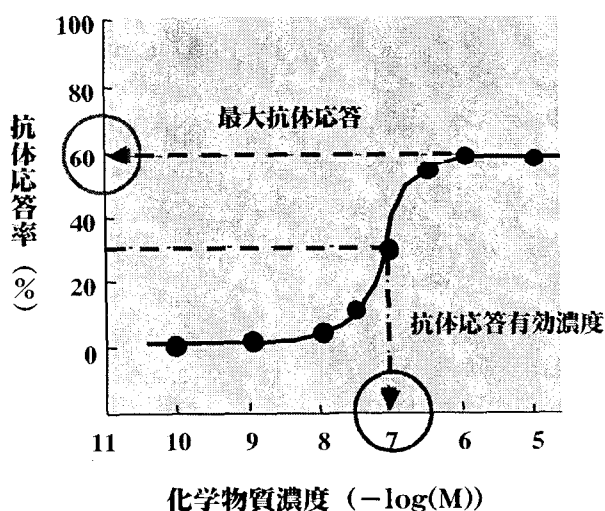


図1. ERの化学物質結合に伴うコンホメーション変化

図2. EC₅₀ 値の算出方法

ER に対して受容体結合が確認された化学物質 503 種類について、ER に対するコンホメーション変化センシング抗体法を用いた試験を完了した。抗体には、ER のリガンド結合ドメイン中において、エストロゲンの結合によって、その位置取りを変え、コンホメーションが変化する α -ヘリックス 12 を抗原として調製したポリクローナル・センシング抗体を用いた。

EC₅₀ (M) と Rmax (%) について 2 次解析した結果、EC₅₀ (M) と受容体結合試験の結果には良い正の相関性があることが判明した。また、Rmax とレポーター遺伝子アッセイの結果も良い正の相関があった。

EC₅₀ (M) を指標として、503 化学物質を 5 グループに分けた。すなわち、抗体応答活性が非常に強い第 1 グループ、ある程度の強い活性の第 2 グループ、活性はかなり弱い

がその活性が明確である第3グループ、活性がきわめて弱い第4グループ、そして、不活性な第5グループの合計5グループである。

このうち、62種類の化学物質は、活性の強弱から大まかなグループ（第1～第3グループ）に分けられることが判明した（図3）。

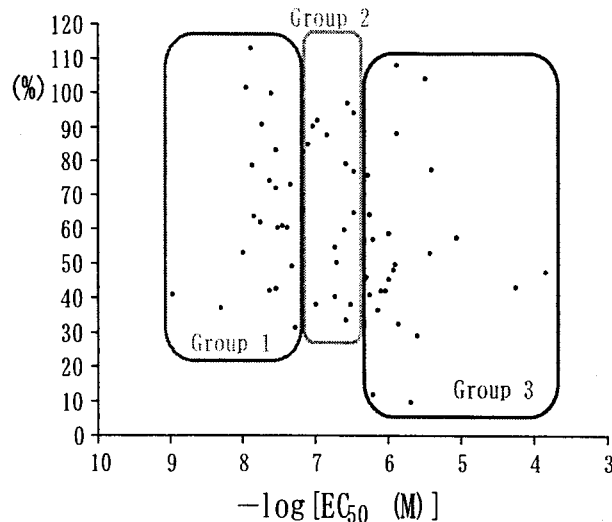


図3. 化学物質のERコンホメーション変化
センシング抗体による相互作用性解析

受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、 $R_{max} (%)$ が非常に小さい化学物質（第4グループ）51種類は、 $EC_{50} (M)$ がきわめて小さく、算定できなかった。また、390種類の化学物質は、ERに全く応答しない化学物質群（第5グループ）であった。

こうして、平成15年度までに、 $EC_{50} (M)$ によるグループ化、次いで $R_{max} (%)$ の序列化という手順・スキームによって、ERを介した内分泌かく乱作用性の順位予測について受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法が確立された。

② ①以外の核内受容体のいずれにも適用可能な、受容体コンホメーションセンシング抗体を用いる内分泌かく乱作用性の順位予測法の確立

2002年ヒト・ゲノム解読の結果、核内受容体48種類の存在が明らかとなった。そして、化学物質の内分泌かく乱作用は、エストロゲンのみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題と認識されるようになった。

受容体コンホメーション変化センシング抗体法は、すべての核内受容体に適用可能で、ER以外の核内受容体を介する、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法を確立することは緊要の課題と思われる。

最近になってグルココルチコイド受容体 (GR) の重要性が指摘されたため、平成14年度よりこの解析研究を開始した。平成15年度には、このGRのcDNAクローニング、発現ベクターへの組込み、受容体タンパク質の発現・精製まで完成させた。

さらに研究計画の男性ホルモン・アンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR)、プロゲステロン受容体 (PR) に関しても、発現ベクターへの組込みまで完了した (ARのみ市販)。これらの抗体の作製にあたり、まず、抗原ペプチドについて

コンピュータ解析し、H12を中心とする抗原決定部位を同定した。ARについては、ポリクローナル抗体の作製も完了し、現在、センシングアッセイ系の構築を試みている。TRおよびPRに関しても抗体を作製中である。

③ 受容体コンホメーション変化センシングモノクローナル抗体の作製による予測法の進化改良

ポリクローナル抗体は、それぞれのコンホメーション変化構造に特異的な抗体の集合体と考えられる。したがって、もしこれらをモノクローナル抗体として別途に調製することができれば、アゴニストとアンタゴニストを区別しながら特異的に定量・測定できるアッセイ系の構築が可能になる。この進化改良法をERについて平成14年度より開始し、まず、ERのH12を抗原とするモノクローナル抗体を作製して解析した。その結果、センシングアッセイが可能なモノクローナル抗体が3種類得られた。

これらのうち、アゴニスト・ 17β -エストラジオール (E2) が誘起するコンホメーション変化を非常に高い特異性でセンシングする抗体が2種類 (mAB1 および mAB3)、一方、アゴニスト E2 のみならず、アンタゴニスト・4-ヒドロキシタモキシフェン (HTM) の両方に応答性を示すモノクローナル抗体が1種類 (mAB2) が得られた。特に後者の抗体は、E2 と HTM とで逆の応答性を示すことが判明し、アンタゴニストとアゴニストを「抗体認識の可・否」の応答性で識別できるため、定性的な解析にも、定量的な解析にも有用な分子ツールと期待され、きわめて重要な抗体を手にすることができた。

なお、エストロゲン様化学物質12種について、モノクローナル抗体 mAB1 を用いたセンシングアッセイを実施し、ポリクローナル抗体の場合と比較した。その結果、両者の結果の間に強い正の相関が見られた。一方、モノクローナル抗体 mAB1 の方が低い EC_{50} (M) を示し、感度がより高く、受容体結合試験の結果と良く一致することが判明した。また、モノクローナル抗体を使用した場合、必要な抗体量も少なくて済むことが分かった。

3. 今後の予定

① モノクローナル抗体によるコンホメーション変化センシング抗体法

ER に関するコンホメーション変化センシング抗体法最大活性の化学物質群・第1グループについては、Rmax (%) が 40～120%の領域に分布する。これらの抗体応答性を識別・解析するためには、モノクローナル抗体での解析が必須と考えられる。平成 15 年度にモノクローナル抗体の選別に一応成功したので、まずこれらを用いたセンシングアッセイを実施、ポリクローナル抗体での結果と比較解析し、より精緻な予測法の確立を図る (図 4)。

② 他の核内受容体の受容体コンホメーション変化センシング抗体法の確立

AR の H12 近傍を抗原としたポリクローナル抗体を既に作製し、現在、精製等を進めている。AR については、他の受容体と異なり、種々のアッセイ系での困難性が指摘されている。まず、センシングアッセイの条件の最適化に取組み、試験系の確立をはかる (図 4)。

グルココルチコイド受容体 (GR)、プロゲステロン受容体 (PR)、甲状腺ホルモン受容体 β (TRβ) の cDNA クローニングに成功し、一部についてはタンパク質の発現にも成就している。今後、これらの核内受容体についてもポリクローナルおよびモノクローナルのセンシング抗体を作製し、抗体アッセイを逐次実行する (図 4)。一方、ER のサブタイプとして関連受容体 3 種 (ERRα、β、γ) が同定され、これらがエストロゲン受容体 (ERα、β) と複合体を形成して機能していることが報告された。このことは、ERRα、β、γへの化学物質の影響を無視できないことを示唆しており、これらについても検討することとした。

	平成14年度	平成15年度	平成16年度
エストロゲン受容体 (ER)	ポリクローナル抗体法の確立		
		モノクローナル抗体法の確立	
	ポリクローナル抗体法およびモノクローナル抗体法を用いた500化合物の試験、解析および内分泌かく乱性の順位付け		
グルココルチコイド受容体 (GR)		ポリクローナル抗体法およびモノクローナル抗体法の確立	
			内分泌かく乱性の順位付け
アンドロゲン受容体 (AR)		ポリクローナル抗体法およびモノクローナル抗体法の確立	
甲状腺ホルモン受容体 (TR)			
プロゲステロン受容体 (PR)			内分泌かく乱性の順位付け

図 4. 核内受容体毎の研究進行年次計画

(添付)

表1. エストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果
抗体応答有効濃度および最大抗体応答性

化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)
Diethylstilbestrol Dipropionate	1.03	41.0	Estriol 3-methylether	269	79.7
Estrone	4.88	38.0	Nafoxidine	273	34.0
Hexestrol	10.1	54.0	17 α -Ethinylestradiol-3-cyclopentaether	274	97.3
17-Epiestriol	11.6	102	Daidzein	324	38.0
Estriol	13.0	113	2, 4, 4'-Trihydroxybenzophenone	329	64.9
Diethylstilbestrol	13.5	79.0	5 α -Dihydrotestosterone	363	77.0
16-Ketoestradiol	14.9	64.4	Norethindrone	490	77.7
16 α -Hydroxyestrone	16.9	63.6	β -Zearalanol	506	47.0
Ethinyl estradiol	17.1	91.0	Isoliquirtigenin	555	42.1
Diethylstilbestrol	22.9	74.1	4, 4'-Dihydroxydiphenyl	565	65.1
17 β -Estradiol	23.1	100	2, 2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	608	12.0
6 β -Hydroxyestradiol-17	23.3	42.0	4, 4'-Dihydroxybenzophenone	716	37.0
6-Ketoestradiol	27.2	73.0	6-hydroxy-2-naphthylidysulfide	833	42.0
β -Zearalanol	28.3	43.0	<i>p</i> -naphtholbenzein	969	43.0
Mestranol	29.2	82.0	6-hydroxyflavanone	1040	45.3
α -Zearalanol	30.1	61.0	3', 4', 7-Trihydroxyisoflavone	1190	48.2
17 α -Estradiol	10.1	54.0	2, 3, 4, 4'-Tetrahydroxybenzophenon	1250	89.4
Dehydrostilbestrol	32.9	61.0	β -Estradiol-3-benzoate	1280	50.6
Coumestrol	35.8	61.0	Kaempferol	1360	109
6 α -Hydroxyestradiol	42.3	73.0	Norethynodrel	1420	33.0
Equilin	48.3	50.1	4-Cyclohexylphenol	2050	10.6
Estrone 3-hemisuccinate	54.6	31.9	6-Benzoyl-2-naphthol	2470	30.0
2-Methoxy- β -estradiol	67.4	80.7	Nonylphenol	3310	104
4-Hydroxyestradiol	81.0	85.0	6-Ketoestradiol-6-(<i>o</i> -carboxymethyl)oxime	3610	52.9
2-Hydroxyestriol	94.3	91.0	Levonorgestrel	4080	78.0
Estrone acetate	106	38.2	2, 2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane	7660	112
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	107	92.0	Benzyl-4-hydroxybenzoate	8090	58.0
2-Hydroxyestradiol	144	88.0	Triphenylethylene	55400	44.0
Genistein	175	56.0	4, 4'-Dihydroxydiphenylmethane	133000	48.0
4, 4'-Dihydroxytetraphenylmethane	177	41.0			
4-(1-Adamantyl)phenol	194	51.0			
4, 4'-Thiobis-naphenol	241	58.9			
			4-Octylphenol		

抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) に基づいて順番に並べた。