

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名

内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者	梅澤 喜夫	東京大学	大学院理学系研究科	教授
主たる研究参加者	稲寺 秀邦	富山医科薬科大学	医学部	教授
〃	橋本 真一	東京大学	大学院医学系研究科	助手
〃	金子 周一	金沢大学	大学院医学研究科	助教授
〃	国本 学	北里大学	薬学部	教授

### 3. 研究内容及び成果：

内分泌かく乱作用の有無を調査すべき化学物質は膨大な数にのぼる。内分泌かく乱物質（ED）のリスク評価を効率良く実施する為には、動物を用いた確認試験の前に実施すべき、高速前試験（High Throughput Pre-Screening；HTPS）法を開発する必要がある。EDのリスク評価を困難にしている原因は、候補物質の多種・多様に加え、その作用部位・作用機構の多様性・未知性にあるものと思われる。内分泌かく乱作用としては、従来から注目、研究されて来た遺伝子発現を介した作用に加え、遺伝子発現を介さず、直接細胞内情報伝達系を攪乱する作用が注目されて来ている。細胞内情報伝達系は数が限られており、比較的理解が進んでいるため、その恒常性の攪乱を体系的・網羅的に探査することは可能であり、有効なHTPS法の一つと成り得るものと考えられる。

これらの背景から、本研究では①化学物質による細胞内情報伝達系の攪乱を生細胞内で可視化・検出できる新規なプローブを多数開発し、細胞内情報伝達系攪乱の探査がEDスクリーニング法として有効である事を検証する、②化学物質による遺伝子発現への影響を系統的・包括的に解析し、変動する遺伝子を用いてDNAチップを開発すると共に、遺伝子発現変動に基づくEDスクリーニング法を開発する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

#### （1）細胞内シグナル伝達の諸過程を指標としたEDスクリーニング（梅澤グループ）

- ①エストロゲン受容体（ER）／アンドロゲン受容体（AR）と転写共役因子（SRC-1）との相互作用を、生細胞内で可視化・検出できる蛍光プローブ（LEED）を開発した。アゴニスト、アンタゴニスト性及びその程度を数分で高選択的に評価可能である。
- ② c GMPを生細胞内で可視化・検出できる蛍光プローブ（CGY）を開発した。子宮平滑筋肉腫細胞（SKN）を用いて、ED等による c GMP合成酵素 mRNA量の低下は、核内転写メカニズム（genomic pathway）ではなく、細胞膜に存在するERを介したmitogen-activated protein kinase（MAPK）の活性化（nongenomic pathway）によるものである事を明らかにした。
- ③蛋白質リン酸化・脱リン酸化を生細胞内で可視化・検出できる蛍光プローブ（phocus；Aktus；Srcus；Raftus）を開発した。ERは核外においてc-Srcを活性

化するが、その際エストロゲン (E2) のみならず、上皮細胞成長因子 (EGF) も必要であり、ER/EGF受容体複合体にc-SrcがE2、EGF刺激依存的に結合・活性化する事を明らかにした。一方、ARは単独でアンドロゲン依存的にc-Srcに結合し、活性化できる事が明らかとなった。E2によるc-Src活性化は細胞膜から始まり徐々に細胞内に伝播されて行くが、これはc-Src/EGF受容体が細胞内にエンドサイトーシスされる為であり、アンドロゲンによる活性化は細胞膜近傍に留まっている事から、従来性差が無いと考えられていた、性ステロイドのnongenomicなシグナル伝達にも性差が存在する可能性が示唆された。

④脂質セカンドメッセンジャー/フォスファチジルイノシトール-3、4、5-三リン酸 (PIP<sub>3</sub>) を生細胞中で可視化・検出できる蛍光プローブ (flip) を開発した。血小板由来成長因子 (PDGF) 等のペプチドホルモン刺激により、PIP<sub>3</sub>が従来考えられていた細胞膜のみならず、小胞体膜、ゴルジ体膜等の細胞内膜でも大量に増加している事、細胞内膜におけるPIP<sub>3</sub>はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた受容体に刺激されて細胞内膜で合成されたものである事を明らかにした。この事から、オルガネラ膜上で合成されたPIP<sub>3</sub>が、シグナル伝達の下流に位置する蛋白質をその膜上で活性化し、細胞機能を制御している事が示唆された。

⑤Ca<sup>2+</sup> を生細胞中で可視化・検出できる蛍光プローブを開発した。MCF-7細胞を用いて、E2、ビスフェノールA (BPA) が細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる事を明らかにした。その濃度は、前者ではCaMK活性化には不十分であるが、後者では充分であり、BPAがCa<sup>2+</sup>シグナル伝達系を攪乱する事が示唆された。

⑥蛋白質間相互作用を生細胞中で可視化・検出できる蛍光/生物発光プローブを開発した。ER、ARと相互作用する蛋白質の解析、相互作用に対する化学物質の影響の解析が可能である事が確認され、EDの新規なHTPS法として有効である事が示唆された。

⑦オルガネラ局在蛋白質を網羅的に解析できる蛍光プローブを開発した。機能未知の蛋白質のオルガネラ局在が判れば、機能推定の重要な手掛かりとなる。ミトコンドリアで検討し、既知蛋白質に加え、10種の新規蛋白質を同定する事が出来た。

⑧蛋白質の核内移行を可視化・検出できる蛍光プローブを開発した。ARのアンドロゲン依存的核内移行を細胞レベルで検出できるばかりでなく、マウス個体内のアンドロゲン濃度変化を非侵襲的に検出できる事が確認された。本法は、ARの核内移行を指標としたHTPS法として、さらに、個体内非侵襲的イメージング法として有効である事が示唆された。また、E2のnongenomic pathwayを介してリン酸化され、2量体として核内移行するERK2蛋白質の定量的検出も可能である事が確認された。

## (2) 遺伝子発現の系統的解析

### 1) 乳癌細胞株における遺伝子発現の系統的解析 (稲寺・橋本グループ)

哺乳類におけるE2曝露評価用バイオマーカーを取得する目的で、MCF-7細胞のトランスクリプトームを解析し、新規E2応答遺伝子としてWISP-2 (Wnt-1 inducible signaling pathway protein 2) を得た。WISP-2発現誘導はERを介するE2特異的・濃度依存的な応答であり、BPA、ノニルフェノール、DES、植物エストロゲンでも同様に濃度依存的に発現が誘導される事を明らかにした。WISP-2蛋白質は分泌蛋白質であり、E2様物質曝露評価指

標と成り得る事が示唆された。

#### 2) ヒト肝臓細胞における遺伝子発現の系統的解析 (金子グループ)

常及び各種病態ヒト肝における遺伝子発現をSAGE法で解析し、肝臓由来の包括的遺伝子ライブラリーを作成した。約52万種からなる世界最大の包括的遺伝子発現情報データベースである。約1万種の肝臓特異的遺伝子群からなるDNAチップを作成した。ED暴露による、肝臓での発現変動遺伝子解析に有用である事が示唆された。

#### 3) ヒト神経細胞株における遺伝子発現の系統的解析 (国本グループ)

ヒト神経芽細胞腫NB-1細胞を用いて、BPAはE2と同様にオリゴデンドロサイト分化促進能を有する事を明らかにした。BPAが正常な分化のタイミングを攪乱する可能性が示唆された。

### 4. 事後評価結果

#### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

多数の細胞内情報伝達過程を可視化する独創的なプローブ/解析法を開発し、ERに対するアゴニスト/アンタゴニスト的作用の識別、蛋白質の相互作用/細胞内オルガネラ局在性/核内移行/リン酸化、セカンドメッセンジャーの動態等を、生きた細胞中で時間的・空間的に解析する事を可能にした。これらの方法によって初めて明らかにされた細胞内情報伝達過程や、EGF受容体とERの相互作用等の新しい知見も含め、極めてインパクトの大きい研究成果であった。

研究成果は質の高い国際誌に50報掲載されたが、Analytical Chemistry、Nature Biotechnology、Nature Cell Biology等に掲載された前記の成果は大きな注目を集め、Nature Reviews/Molecular Cell Biology、Nature Biotechnology、Analytical Chemistry、Chemical & Engineering News 等で特別紹介記事が掲載された。学界発表も国内で47件、国際学会で41件行われたが、特筆されるべきは招待講演の多さであり、国際学会18件、国内学会21件にのぼり、インパクトの大きさが伺える。

特許出願は12件であり、その内9件は前記のプローブ・解析法に係るものであって、国際出願も行われている。それらの出願は、概念的・包括的な広範の権利範囲を請求する、当該分野の基本特許とも成るべきものである。論文発表、特許公開等に基づく技術引き合いも多く、ライセンスにまでは至っていないが、欧米有力企業10社からの技術引き合いがあった。また、新規プローブへのサンプル供与依頼は引きも切らずといった状態であり(170余件、90%は海外)、30の大学・研究機関を厳選し、「サンプル供与覚書(Material Transfer Agreement)」を締結して、サンプルを供与済みである。それらの大学・研究機関の研究者との共同研究の結果、「内分泌かく乱物質」分野以外の研究領域でも成果が挙がりつつあり、今後の進展・展開に大きな期待が持てる。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

「内分泌かく乱作用のnon-genomic pathwayを、細胞内伝達過程の攪乱として体系的・網羅的に探索する手法を開発する」という目標は略達成しており、高く評価される。予備的検討段階ではあるが、HTPS法としての有効性も示唆されており、「EDの予備的スクリ

「スクリーニング法開発」に大きく貢献するものと期待される。OECD等でのスクリーニング法開発に一石を投ずるものとなろう。「遺伝子発現変動解析に基づくスクリーニング法開発」を目標とした他のグループに付いては、各々のグループで個別的に注目すべき成果を挙げているが、スクリーニング法として提案できるまでには至っていない。研究目標の難易度もあるが、梅澤グループの圧倒的な成果に比べ印象が薄い感が否めない。

FRET、生物発光／蛍光等を利用したプローブ開発は梅澤グループの独壇場と言っても過言では無く、独創的な分析手法の開発として、科学技術へのインパクトも極めて大きい事は前項に記載した通りである。これらの研究成果、技術は、単に「内分泌かく乱物質」領域の研究に止まらず、基礎生物学、分子生物学、医学等の広範の学問分野に新しい視点、解析手法を提供するものとして、その発展に大きく貢献するものと期待される。現在、世界の大学・研究機関と学際的な共同研究が多数進行中であり、その成果が楽しみである。また、それらの科学研究を通して、予期していない様な利用・応用等が開発され、医薬品開発等への産業応用にまで繋がる事を期待したい。

#### 4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

研究代表者は2000年に「日本分析化学会 学会賞」を受賞した。

本研究期間中に、稲寺氏が富山医科薬科大学医学部教授に、国本氏が北里大学薬学部教授に、小澤氏が東京大学大学院理学系研究科講師に、佐藤氏が東京大学大学院理学系研究科助手に、Philippe Buhlmann氏がミネソタ大学化学科助教授に就任した。