

研究課題番号	5-1953
研究課題名	「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」
研究実施期間	令和元年度～令和3年度
研究機関名	京都大学
研究代表者名	久保 拓也

1. 研究開発目的

本研究では、TR 結合活性物質のスクリーニング手法を確立することを目的として、TR 模倣分離基材によるクロマトグラフィー的手法と機器分析を用いた TR 結合活性評価法を開発し、さらに、同法及び酵母アッセイと精密質量分析計との組み合わせにより TR 結合活性化合物のデータベースを作成する。また、研究期間後半において、新規 TR 結合物質の検出とそのバイオマーカー探索を行う。

本研究で創出される新規スクリーニング手法は、行政ニーズ内であげられたノンターゲット分析やバイオマーカー探索を含んでいることから、子どもたちの血液・尿等の生体試料に対する、少量で精度・感度良く効率的に分析する方法の開発に取り組み、信頼性のある手法の確立に貢献すると予想できる。

さらに、本研究の成果は、TR のみならず受容体結合活性を有する多くの化学物質への応用が可能であり、生理活性メカニズム解明などの学術的知見の獲得に始まり、将来的には汎用のスクリーニング手法として、国内・国外での環境化学物質モニタリングに適用可能であると予想される。そのため、これらに関連する専用の分離基材及び化学物質データベース（精密質量、生理活性、化学構造）は、継続的にアップデートされる消耗品として潜在的な環境ビジネスの市場として期待できる。

2. 研究目標

全体目標

- (a) TR 模倣クロマトグラフィーと TR 生理活性／精密質量データベースを組み合わせた新規 TR スクリーニング手法の確立
- (b) 実環境試料中の複数の未知 TR 活性物質の同定

サブテーマ1

- (a) TR 活性物質の包括的な濃縮・分離を可能とする吸着剤開発
- (b) TR 結合活性 vs 保持時間に線形相関性のある LC 評価法開発
- (c) TR 活性候補物質の *in vivo* 試験による有毒性評価
- (d) マウスを用いた TR 活性物質のバイオマーカー探索

サブテーマ2

- (a) 約 600 物質の *in vitro* 試験による TR 生理活性（アゴニスト、アンタゴニスト）評価とデータベース化
- (b) TR 結合活性物質の精密質量データベースの作成
- (c) 下水処理場排水における既知 TR 結合活性物質及び未知活性物質の寄与率評価

3. 研究の進捗状況

全体目標

- (a) TR 模倣クロマトグラフィーと TR 生理活性／精密質量データベースを組み合わせた新規 TR スクリーニング手法の確立【自己評価：計画通りに進展している】

サブテーマ 1、2 ともに当初の計画よりも成果が出ており、TR 模倣クロマトグラフィーの確立と TR 活性/精密質量データベースの作成が着実に進行している。2020 年度では、TR 模倣基材の精密化が進行することが予想され、また、広範化されたデータベースとの組み合わせによって、当初の計画よりも前倒しにプロトタイプのスクリーニング手法の創成が期待できる。

(b) 実環境試料中の複数の未知 TR 活性物質の同定【自己評価：計画以上の大きな進展がある】

2020 年度に行う予定であった TR 模倣 MIP を用いた環境試料の評価については、現時点で試験的な評価を始めている。この評価において、すでに未知の TR 活性物質が検出されており、その構造決定を進めている。さらに、新たに *vivo* 試験を計画していることから、より確実な TR 活性物質の同定が実現すると予想される。

サブテーマ 1

(a) TR 活性物質の包括的な濃縮・分離を可能とする吸着剤開発

【自己評価：計画以上の大きな進展がある】

TR を模倣した MIP の作製を目指し、MIP を構成する機能性モノマー、鋳型分子の選定を進めてきた。すでに、既知の TR 活性物質に対しては 9 割程度の物質が完全に吸着することが確認された。さらに、2020 年度に行う予定であったハロゲン化物の評価にも着手しており、その基礎となる。ハロゲン結合に関する学術論文も公開した。これらを基に、2020 年度以降ではより精密な分子認識能を有する TR 模倣 MIP の作製を目指す。

(b) TR 結合活性 vs 保持時間に線形相関性のある LC 評価法開発

【自己評価：計画通りに進展している】

LC における溶離条件の最適化によって、TR 活性物質の溶出時間を制御することに成功した。2020 年度以降では、複数の相互作用を制御する条件を確立することで、活性/保持時間に相関のある分析条件を探索し、さらに、サブテーマ 2 のデータベースを参考に、TR 活性の陽性物質を保持時間から判断できる方法論を作成する。

(c) TR 活性候補物質の *in vivo* 試験による有毒性評価【自己評価：計画通りに進展している】

当初計画では、*in vivo* 試験は計画されていなかったが、本課題で同定された TR 活性候補物質の生理活性をより確実に把握、確定するためにマウスによる評価を進める。現時点で、標準品を用いた評価に着手しており、2020 年度内には未知の候補物質の迅速な評価が可能となる。

(d) マウスを用いた TR 活性物質のバイオマーカー探索【自己評価：計画通りに進展している】

本研究の発展的課題としてのバイオマーカー探索については、(c)での評価の延長で、既知/未知 TR 活性物質を用いて、マウスの臓器内の代謝物評価を行うスキームを現在構築中である。2020 年度後半には、TR 異常時の評価項目を決定し、バイオマーカー探索の評価法を決定する。

サブテーマ 2

(a) 約 600 物質の *in vitro* 試験による TR 生理活性 (アゴニスト、アンタゴニスト) 評価とデータベース化

【自己評価：計画以上の大きな進展がある】

化学物質の TR 結合活性について、分担者らが過去に ER 結合活性等に供した約 600 物質に加え、EDSP21 における TR 結合活性評価結果、EXTEND2010 及び 2016 において信頼性が確認されている文献等を参考に 207 物質を追加し、目標を上回る合計 837 物質のスクリーニング結果を得ている。

(b) TR 結合活性物質の精密質量データベースの作成【自己評価：計画以上の大きな進展がある】

前項で陽性を示したアゴニスト、アンタゴニストについて、LC-QToFMS を用いて ESI により検出可能かどうかの評価がほぼ終了している。続いて衝突誘起解離 (CID) によるプロダクトイオンの精密質量を測定する予定である。また 2020 年度に下水処理場排水の MIP 吸着画分中の TR 結合活性物質の検出及び定量を行い、その寄与率を算出する予定であるが、既に下水処理場排水の TR 結合活性を確認済みであり、陽性物質の化学的検出にも着手している。またサブテーマ 1 から提供された MIP 試作品を用いたピークの確認等にも着手しており、いずれも計画より早めに進捗している。

(c) 下水処理場排水における既知 TR 結合活性物質及び未知活性物質の寄与率評価

【自己評価：計画通りに進展している】

計画では下水処理場排水等から検出された MIP 溶出画分中のデータベース未収録のピークの構造推定の優先順位付け、生体試料の TR かく乱物質を検索する予定である。これは 2021 年度に実施する計画であるため現時点では直接的に着手している訳ではないが、下水処理場排水の LC/ToFMS 測定の実行等、準備は進められており、計画通り進展する見込みである。

4. 環境政策への貢献(研究代表者による記述)

本研究では、受容体選択的な吸着基材を開発し、データベースと組み合わせることで、生物的手法に頼らない新たな工学的スクリーニング手法の開発を目指している。創出されるこれらの成果は、

- ・生物学的なスクリーニングに替わる化学物質の迅速・安価な工学的評価
- ・環境試料からの受容体結合活性物質の選択的に補足・濃縮。効率的な分析時の夾雑物質除去
- ・活性未知物質の検出と化学同定

等への寄与が期待できる。本研究で開発したスクリーニングの概念は、モデルとしての TR に留まらず、将来的には内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法として、現在の生物学的な手法に替わる簡易

- ・低コストの手法として、公定法等への採用も期待できる。

5. 評価者の指摘及び提言概要

目的、計画に沿って順調に進展していると判断した。特にサブテーマ 1 ではよい成果が得られている。環境試料適用へ発展できる前処理方法の提案が出てくる可能性があるのも、興味深い。LC で Target を確認するための充填剤開発なども行っており、基盤的な部分での波及も期待できる。生物学的なスクリーニングに替わる化学物質の工学的な評価手法の開発に期待している。

LC によるアンタゴニスト評価について、化学構造が多岐にわたる物質に適用可能なのか。その点は工夫が必要と思われる。活性総体を捉え、原因物質を探索していく手法については、研修やマニュアル作成などで、地環研等で広く活用されるよう普及を目指すことが望まれる。

6. 評点

評価ランク：A