

Takeyama J, Suzuki T, Harada N, Andersson S, Sasano H.

The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

2. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2(11 β -HSD2)in the Human Lung:Gene Expression and Regulation by Glucocorticoids in the Human Bronchial Epithelial Cell Line, BEAS-2B

Darnel A, Suzuki S, Suzuki T, Tsubochi H, Hirasawa G, Takeyama J, Kaneko C, Krozowski Z, Sasano H.

The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

3. Analysis of Estrogen Receptor α and β in Human Aorta

Sasano H, Murakami H, Narasaka T, Suzuki T, Harada N,

The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

4. Developmental Roles of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein(StAR) Revealed by StAR

Knockout Mice

Hasegawa T, Zhao L, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker L.K.

The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

5. Developmental Changes of Steroidogenic Enzymes in Human Adrenal Cortex:Immunohistochemical Studies

Suzuki T, Sasano H, Takeyama J, Freije A.W, Carr R. B, Rainey E W.

The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

6. Retinoid Receptors in the Human Endometrium and Its Disorders: Possible Modulator of Local Estrogenic Action

Ito K, Suzuki T, Sasano H,

The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

7. 副腎腫瘍高血圧症のステロイド合成動態と病理 笹野公伸

第2回 Forum on Hypertension Science 福岡 2000.3.25

8. ホルモン依存性癌の intracrinology
宇都宮裕貴、笹野公伸
日本癌学会公開シンポジウム 大宮
2000.6.23
9. ヒト軟部-神経原性腫瘍におけるプロゲステロン受容体 A と B
井上宰、武山淳二、鈴木貴、
ダーネルアンドリュー、金子智香、羽鳥
正仁、黒川良望、里見進、笹野公伸
第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
10. 病理学実習の現状－東北大学医学部の試み
名倉宏、堀井明、笹野公伸
第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
11. ヒト内分泌腫瘍における beta-カテニンの発現異常の検索
仙波秀峰、池田秀敏、森谷卓也、笹野公伸、
堀井明
第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
12. ヒト成人組織における COUP-TFII の局在
鈴木貴、森谷卓也、DARNEL ANDREW、
武山淳二、笹野公伸
- 第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
13. ヒト卵巣上皮性腺癌におけるプロゲステロン受容体 A および B の発現
赤平純一、伊藤潔、佐藤信二、矢嶋聰、
森谷卓也、笹野公伸
第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
14. 先天性右主肺動脈欠損症の肺胞毛細血管内皮細胞における von WillebrandFactor と
トロンボモジュリンの発現
前田寿美子、鈴木貴、森谷卓也、鈴木聡、
坪地宏嘉、佐久間秀夫、千田雅之、須
田秀一、藤村重文、笹野公伸
第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
15. 胆道閉鎖症における cytokeratin subtype の発現についての免疫組織化学的検討
佐々木英之、仁尾正記、金子智香、岩見
大二、舟木伸夫、大井龍司、笹野公伸
第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13
16. 乳管内癌および乳管上皮過形成における retinoic acid receptor(RAR)および retinoid X receptor(RXR)の発現に

関する免疫組織化学的検討

有我直宏、鈴木貴、森谷卓也、木村道夫、
大内憲明、笹野公伸

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

17. 皮膚汗腺腫瘍におけるステロイド
ホルモンリセプター発現に関する免疫組
織学的検討

森谷卓也、鈴木貴、遠藤希之、溝呂木安
希、
渡辺みか、八重樫弘、笹野公伸、真鍋俊
明

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

18. XML(Extensible Mark-up
Language)および暗号化ソフトウェアを
用いたインターネット経由での病理診断
情報の交換に関する考察

志沢聡一郎、笹野公伸

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

19. Serrated adenoma の立体構造と
その成因—三次元再構築法と二次元上の
距離分布計測法を用いた検討

岩渕正広、遠藤希之、笹野公伸

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

20. 肺水腫における 11β -
hydroxysteroid dehydrogenase
type2(11β -HSD2)の発現動態

坪地宏嘉、鈴木貴、鈴木聡、藤村重文、
笹野公伸

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

21. C 型慢性肝炎における C 型肝炎ウ
ィルス陽性細胞の肝組織内分布—二次元
距離分布解析法を用いた定量的研究

遠藤希之、渡辺みか、森谷卓也、八重樫
弘、

高橋徹、笹野公伸

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

22. ヒト食道扁平上皮癌における腫瘍
組織内好酸球浸潤の検討

石橋悟、笹野公伸、大橋裕介、標葉隆三
郎

第 8 9 回日本病理学会総会 大阪
2000.4.11-13

23. 乳癌における Progesterone
receptor(PR)subtype : PRA および PRB
の発現に関する免疫組織学的検討

有我直宏、鈴木貴、森谷卓也、木村道夫、
笹野公伸、大内憲明

第 8 回日本乳癌学会総会 横浜
2000.5.11-12

- 24.** クッシング症候群の病理
笹野公伸
 第12回日本内分泌外科学会総会 東京
 2000.6.27-28
- 25.** 副腎皮質腫瘍の良悪性の鑑別
笹野公伸
 第12回日本内分泌外科学会総会 東京
 2000.6.27-28
- 26.** 乳癌におけるエストロゲン産生に
 における脂肪細胞の意義
笹野公伸、他2名
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 27.** ヒトにおける Melanin -
 concentrating hormone
高橋和広、笹野公伸、他6名
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 28.** アロマターゼ欠損マウスにおける
 脂肪蓄積機構の解析
本田伸一郎、鈴木貴、笹野公伸、原田信
広、
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 29.** 正常周期ヒト卵巣組織における
urocortin の発現
村松康成、鈴木貴、戸恒和人、笹野公伸
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 30.** ヒト心臓における CRF receptor の
 type1,type2 の発現の検討について
木村雄一郎、村松康成、鈴木貴、高橋和
広、
戸恒和人、笹野公伸
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 31.** ヒト胎児副腎におけるステロイド
 合成の免疫組織化学的検討
奈良坂俊明、鈴木貴、武山淳二、金子智
香、
Darnel Andrew、笹野公伸
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 32.** 小児発育過程における副腎皮質ス
 テロイド合成酵素の発現の変化
鈴木貴、奈良坂俊明、武山淳二、金子智
香、
笹野公伸
 第73回日本内分泌学会学術総会抄録集
 京都 2000.6.16-18
- 33.** Pre-clinical Cushing 症候群およ
 び Cushing 症候群における副腎ホルモ

ン産生異常症のメカニズムの検討
林晃一、柴田洋孝、安藤孝、栗原勲、鈴木利彦、本間桂子、粕谷泰次、笹野公伸、林松彦、齋藤郁夫、猿田享男
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

34. Preclinical Cushing 症候群を合併したコルチコステロン産生副腎腫瘍の 1 例
遠藤美月、浜口和之、深川光司、笹野公伸、坂田利家
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

35. 11β - Hydroxysteroid Dehydrogenase Type2 Gene Expression and Regulation in a Human Bronchial Epithelial Cell Line (BEAS-2B)
Darnel Andrew、鈴木聡、鈴木貴、平澤元、坪地宏嘉、武山淳二、金子智香、笹野公伸
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

36. ヒト消化管における 17β hydroxysteroid dehydrogenase type2 の検討

佐野俊和、鈴木貴、武山淳二、笹野公伸
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

37. 両側副腎偶発腫瘍で発見された先天性副腎過形成 (21 -水酸化酵素欠損症) の一例
栗原勲、柴田洋孝、鈴木利彦、安藤孝、笹野公伸、林晃一、林松彦、村井勝、齋藤郁夫、猿田享男
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

38. 両側副腎皮質腺腫によるクッシング症候群の 1 例
榎澤尚子、佐藤尚太郎、高橋隆、大塚史子、高橋育克、井上穰、五味由加利、久岡俊彦、吉本緑、井上健、鈴木 時、笹野公伸
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

39. ヒト胎児組織における 17β - hydroxysteroid dehydrogenase type1 と type2、及び Estrogen receptor の発現に関する検討
武山淳二、鈴木貴、原田信広、笹野公伸
第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

40. cortisol 産生能を有した原発性アルドステロン症の一例

谷口晋、生山祥一郎、平松真祐、笹野公伸、

西村純二

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

41. コルチゾールの自律性分泌、高 PTH 血症を認めた原発性アルドステロン症 (PA) の 1 例

牧野晋也、笹野公伸

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

42. 病理所見にて偽腺様構造を認めた副腎偶発腫瘍の一例

鈴木究子、松下明生、松下文枝、小澤恵、
沖隆、笹野公伸、中村浩淑

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

43. ヒト脳組織と褐色細胞腫・神経芽細胞腫の腫瘍組織における melanin-concentrating hormone レセプター mRNA の発現の検討

高橋和広、曾根正彦、村上治、戸恒和人、
在原善英、佐藤文俊、柴原茂樹、林富、
野城孝夫、笹野公伸、毛利虎一

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

44. カニクイザルを用いた Metyrapone および Aminoglutethimide による副腎抑制の急性期モデルの検討

赤松博、渡辺潔、林裕、福崎好一郎、笹野公伸、西川哲男

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

45. Pre-clinical Cushing 症候群を伴う原発性アルドステロン症を呈した副腎皮質癌の一例

小沢滋雄、岡崎亮、笹野公伸、田中孝司

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

46. 胎児正常組織における Progesterone receptor A と B の発現

井上宰、武山淳二、鈴木貴、Darnel Andrew、金子智香、黒川良望、里見進、笹野公伸

第 73 回日本内分泌学会学術総会抄録集
京都 2000.6.16-18

47. ヒト脳組織と褐色細胞腫・神経芽細胞腫の腫瘍組織における MCH レセプター mRNA の発現の検討

高橋和広、曾根正彦、村上治、戸恒和人、
佐藤文俊、柴原茂樹、林富、野城孝夫、
笹野公伸、毛利虎一

第 45 回東北内分泌研究会 仙台

- 2000.6.3
- 48.** ヒト胎児副腎におけるステロイド合成の免疫組織化学的検討
奈良坂俊明、鈴木貴、笹野公伸
第 45 回東北内分泌研究会 仙台
2000.6.3
- 49.** 小児発育過程における副腎皮質ステロイド合成酵素の発現の変化
鈴木貴、武山淳二、金子智香、奈良坂俊明、笹野公伸
第 45 回東北内分泌研究会 仙台
2000.6.3
- 50.** 胎児正常組織における Progesterone receptor A と B の発現
井上宰、赤平純一、武山淳二、鈴木貴、ダーネルアンドリュー、金子智香、黒川良望、里見進、笹野公伸
第 45 回東北内分泌研究会 仙台
2000.6.3
- 51.** 正常周期ヒト卵巣組織における urocortin の発現
村松康成、鈴木貴、笹野公伸
第 45 回東北内分泌研究会 仙台
2000.6.3
- 52.** 子宮の血管筋脂肪腫の一例
- 重樫弘、森谷卓也、添田周、米本行範、笹野公伸、名倉宏
第 29 回日本婦人科腫瘍学会学術集会
名古屋 2000.7.28-30
- 53.** Muralmodule を伴う卵巣粘液嚢胞性腫瘍の 1 例
赤平純一、森谷卓也、遠藤希之、八重樫弘、
佐藤滋、佐藤潔、今野良、佐藤信二、笹野公伸
第 29 回日本婦人科腫瘍学会学術集会
名古屋 2000.7.28-30
- 54.** ヒト原発、転移性乳癌における HER-2/ neu(c-erb-B2) の免疫組織化学ならびに FISH を用いた検討
笹野公伸、鈴木貴、志澤聡一郎、有我直宏、
森谷卓也
第 20 回日本分子腫瘍マーカー研究会
横浜 2000.10.3
- 55.** 乳癌と子宮急内膜癌における Intracrinology
笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也、原田信広
第 59 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6
- 56.** ヒト子宮内膜病変におけるアンドロゲン受容体の発現

伊藤潔、鈴木貴、宇都宮裕貴、赤平純一、
今野良、佐藤信二、笹野公伸
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

57. 食道扁平上皮癌における β -hCG
原田ジェームス統、石橋悟、宮崎修吉、
標葉隆三郎、里見進、笹野公伸
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

58. ヒト食道扁平上皮癌における腫瘍
組織内好酸球浸潤の検討
石橋悟、笹野公伸、大橋裕介、原田統、
宮崎修吉、標葉隆三郎、里見進
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

59. Serrated adenoma の立体構造と
その成因—三次元再構築法とフラクタル
解析法を用いた検討—
岩淵正広、遠藤希之、笹野公伸、森谷卓
也、
樋渡信夫、下瀬川徹
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

60. 乳癌における progesterone receptor
(PR)A および PRB の発現の変化：免疫
組織化学を用いた検討
有我直宏、森谷卓也、鈴木貴、大内憲明、

笹野公伸、木村道夫
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

61. ヒト乳癌病理組織標本を用いた c-
erb-B2 の検索—免疫組織化学と FISH
を用いた検討—
笹野公伸、鈴木貴、有我直宏、尾川清佳、
杉山慎一郎、森谷卓也
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

62. ヒト乳癌組織における androgen
合成酵素及び androgen receptor の発
現
鈴木貴、Darnel Andrew、有我直宏、
森谷卓也、尾川清佳、金子智香、武山淳
二、笹野公伸
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

63. 若年子宮体癌における内分泌療法
と 17β -hydroxysteroid
dehydrogenase (17β -HSD)発現との
関係について
宇都宮裕貴、鈴木貴、山川洋光、伊藤潔、
今野良、佐藤信二、笹野公伸

第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6

64. ヒト卵巣上皮性腺癌におけるプロ

- ゲステロン受容体 A および B の発現
赤平純一、伊藤潔、今野良、佐藤信二、
森谷卓也、鈴木貴、笹野公伸
第 5 9 回日本癌学会総会 横浜
2000.10.4-10.6
- 65.** ヒト甲状腺腫瘍における ER α と ER
 β の検討
川端和歌子、鈴木貴、武山淳二、笹野公伸、
樋渡信夫、木内喜孝、下瀬川徹
第 1 回日本内分泌学会東北地方会 弘前
2000.10.7
- 66.** ヒト心臓における Ucn 及び CRF
receptor の発現の検討について
木村雄一郎、村松康成、鈴木貴、笹野公伸、
戸恒和人、高橋和広
第 1 回日本内分泌学会東北地方会 弘前
2000.10.7
- 67.** ヒト副腎組織における chicken
ovalbumin upstream promoter
transcription factor の発現
鈴木貴、ターネル・アンドリュー、奈良
坂俊明、武山淳二、笹野公伸、高橋和広、
村上治
第 1 回日本内分泌学会東北地方会 弘前
2000.10.7
- 68.** 左副腎腫瘍中心部出血巣を伴った
皮質腺腫にプロラクチン産生下垂体腺腫
を合併した一例
在原善英、村上治、佐藤文俊、戸恒和人、
伊藤貞嘉、曾根正彦、高橋和広、笹野公伸、
千葉裕、折笠精一、毛利虎一
第 1 回日本内分泌学会東北地方会 弘前
2000.10.7
- 69.** ヒト乳癌における retinoid による
estrogen 局所調節作用
鈴木貴、森谷卓也、有我直宏、武山淳二、
笹野公伸
第 4 回日本内分泌病理研究会・学術集会
東京 2000.11.10-11
- 70.** 体腔液転移性乳癌における
HER2/ neu 発現の免疫細胞化学的検討
三浦弘守、森谷卓也、天野美奈子、有我
直宏、笹野公伸
第 3 9 回日本臨床細胞学会秋期大会 大
宮 2000.11.17-18
- 71.** 腹水中に出現した腺様化生を伴う
移行上皮癌の一例
星川友紀、三浦弘守、森谷卓也、石川暁
子、
星宣次、笹野公伸
第 3 9 回日本臨床細胞学会秋期大会 大
宮 2000.11.17-18

72. 副腎偶発腫瘍の病理 (シンポジウム)

笹野公伸

第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

73. ヒト眼組織における 11β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes の局在

鈴木貴、金子智香、尾川清佳、笹野公伸
第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

74. 妊娠後期に高血圧があり、出産後の検査で副腎偶発腫瘍が見い出された pre-Cushing 症候群について

小島元子、根本茂子、矢田部洋一郎、星野正美、笹野公伸
第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

75. 原発性アルドステロン症での血中 18-OH-B 濃度の検討

大村昌夫、齋藤淳、伊藤浩子、西川哲男、向笠浩司、関原久彦、笹野公伸
第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

76. 若年子宮体癌における内分泌療法と 17β -hydroxysteroid

dehydrogenase(17β -HSD)発現との関係について

宇都宮裕貴、伊藤潔、鈴木貴、笹野公伸
第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

77. ヒト上皮性卵巣癌における 5-alpha reductase 1 および 2 の発現

赤平純一、伊藤潔、佐藤信二、鈴木貴、笹野公伸
第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

78. ヒト正常子宮内膜および子宮内膜病変におけるアンドロゲン受容体の発現
伊藤潔、宇都宮裕貴、鈴木貴、笹野公伸
第8回日本ステロイドホルモン学会総会
大阪 2000.11.25

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. 実用新案登録 なし

表1 ヒト成人の消化管における17βHSD2の活性

Tissue	sex	age	Substrate converted in 4h(%)
			E2->E1
Esophagus	F	60	0
	M	63	0
	M	56	0
Stomach	F	84	1.12
	M	62	2.12
	M	62	3.7
	M	69	8.48
	M	77	0
	F	69	0
Duodenum	M	64	14.6
	M	70	4.12
	M	62	7.53
Ileum	M	72	10.12
Colon	M	63	7.93
	M	63	10.1
Rectum	F	82	12.25
	M	50	7.49

1 μM of 14C labeled E1 and E2 as substrates 10 mM NAD+ and NADH as co-factors After 4 h incubation amount of E1 and E2 were measured 17βHSD2 activity was calculated as a percentage of the substrate

表2 ヒト消化管における17βHSD2のRT-PCR法を用いたmRNA発現量

	sex	age	17βHSD1/β-actin	17βHSD2/β-actin
Esophagus	M	68	1.94	1.24
Stomach	M	70	0	146.2
Stomach	M	69	0	370.36
Duodenum	M	62	0	549.79
Ileum	F	72	0	1644.61
Colon	F	77	0	448.52
Colon	F	52	0	753.94
Rectum	F	82	0	211

表3 RT-PCR法に用いたprimers

mRNA	Primer	Sequence
17 β HSD1	Antisense for RT	5'-CGAAAGACTTGCTTGCTGTG-3'
	Antisense for PCR	5'-CTCTGGGCTGCCCAACAC-3'
	Sense for PCR	5'-GGACGTGCTGGTGTGTAAC-3'
17 β HSD2	Antisense for RT	5'-CATGCTGCTGACATTCACCA-3'
	Antisense for PCR	5'-CTTTGTGACCTCCACAGTTC-3'
	Sense for PCR	5'-GGTGTCATGCTTCCTCATGT-3'
β -actin	Antisense for RT	5'-ACGTCACACTTCATGATGGA-3'
	Antisense for PCR	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGC-3'
	Sense for PCR	5'-GTGATGGACTCCGGTGACGG-3'

表4 ヒト消化管における免疫組織化学のまとめ

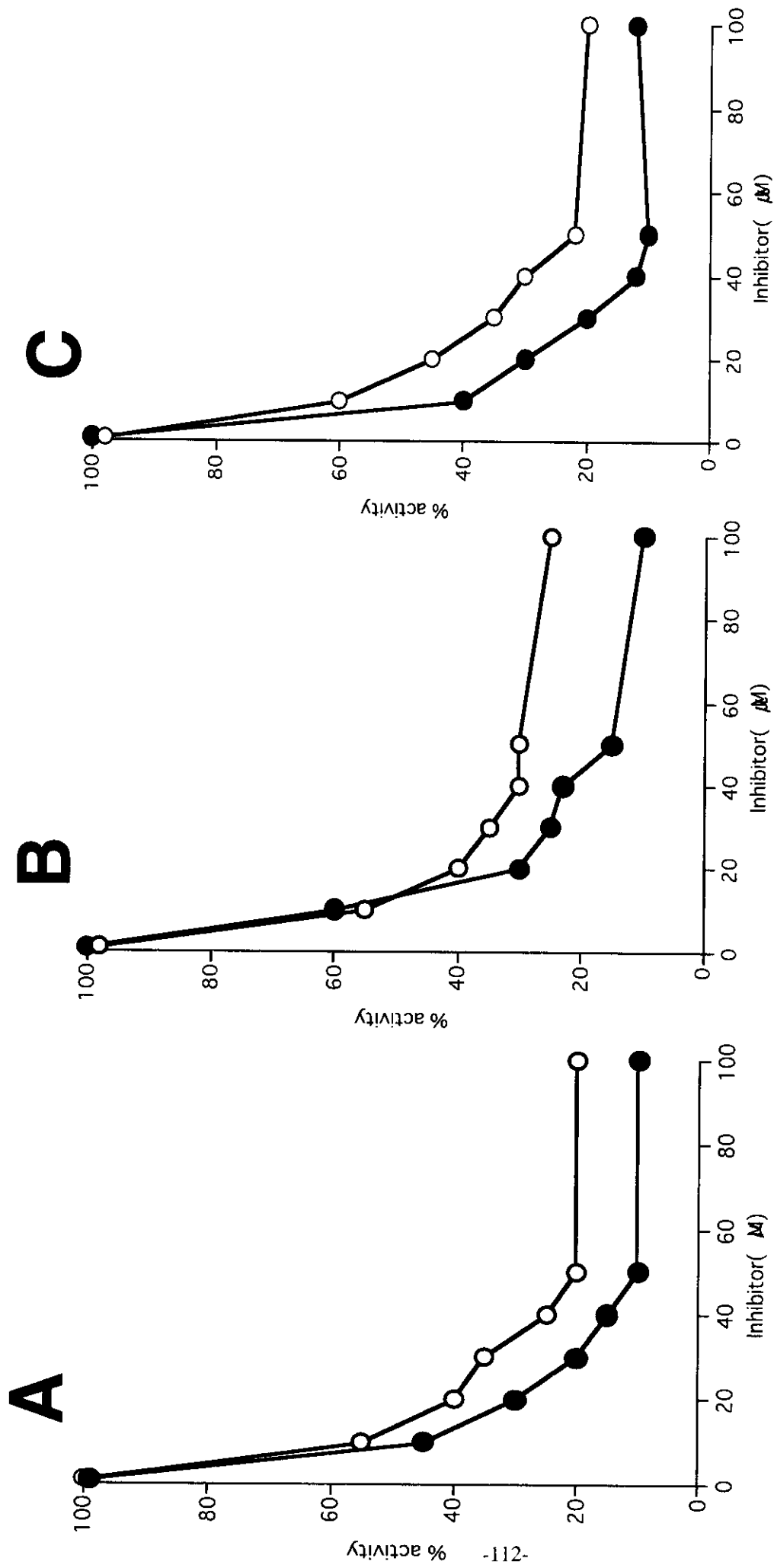
	発現あり	発現なし
esophagus	(-)	excretory ducts of submucosal esophageal glands squamous epithelium
stomach	intestinal metaplasia	columnar cells
duodenum	superficial epithelial	goblet cells
and ileum	columnar cells	
appendix	superficial epithelial	enteroendocrine cells
	columnar cells	goblet cells
Colon		
cecum, ascending	superficial epithelial	goblet cells
transeverse, descending	columnar cells	cells of crypt
sigmoid, rectum		

表5 17βHSD2をtransfectionさせたヒト胎児腎臓由来の293細胞を用いた酵素活性に対する内分泌かく乱物質の影響のまとめ

	(1)	(2)	平均
①DES	4.99	4.9	4.95
②Flutamide	40.79	43.44	42.1
③Vinclozolin	29.62	31.07	30.3
④testosterone propionate	23.19	13.96	18.6
⑤Genistein	9.38	9.56	9.47
⑥Estradiol	2.1	2.31	2.2
⑦BPA	24.66	25.97	25.3
⑧Phthalic acid benzil n-butyl ester	10.57	11.9	11.2
⑨BBP	13.32	13.26	13.3
⑩2,3,7,8-TCDD	7.28	9.15	8.2
⑪ethanolのみ	35.73	34.96	35.3
⑫DMSOのみ	35.31	22.87	29.09
⑬Corn oilのみ	9.55	10.47	10

これらの値はtestosteroneからandrostenedioneへの転換の%を示す。

図 1



DES (●) 及びgenistein (○) の17β-HSD 2 活性に与える胎盤 (A), 胎児肝臓 (B) そして胎児小腸 (C) での結果のまとめ。点は2つの実験の平均値を示す。

9. [内分泌かく乱研究整備] 神経に対する内分泌かく乱化学物質研究

-cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析-

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイは、大量の発現遺伝子の解析を迅速に進める手だてを現実のものとし、総合的な遺伝子発現カスケードを解析するツールとなることが期待される。そこで、緊急の課題として、平成 11 年度よりこれを研究班に導入した。本研究の目的達成に資する情報を得、もって内分泌かく乱化学物質の作用メカニズム解明に貢献する。

A. 研究目的

ホルモン受容体は転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、最終的に形態形成プログラムをも制御する。この過程において、受容体下流に位置する遺伝子群は、連鎖的に発現が調整される。この経時的変化は、臓器ごと、あるいは個体の発達段階により、多種多様であると考えられている。例えば、従来より行われている内分泌かく乱化学物質の *in vivo* 実験法である子宮肥大試験や Hershberger 試験で用いられる比較的単純な endpoint できさえ、幾重かの反応カスケードの結果の現象であると考えられる。これらの解析を個別に行うのは容易ではないが、近年、進歩の著しい cDNA

マイクロアレイを導入することにより、このような遺伝子群の発現カスケードの包括的な検討を迅速に進める方が開けてきた。そこで、当研究班では、これを時宜に即した早急に取り組むべき課題として、平成 11 年度から、緊急の課題として、内分泌かく乱化学物質研究への cDNA マイクロアレイ技術の導入を試みた。

B. 研究方法

cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子の解析を当班の高次系解析の中心となる神経系に焦点を当て、外来性ホルモン様作用物質の代表として DES の影響について検討することとした。対象として *in vivo* における神経系の発生・分化モデル

系である胎内暴露胎児脳を取り上げた。
mRNA の取得法は下記の通りである。

C57BL/6 妊娠マウスに DES を胎生 11 日目から 8 日間連続で 66 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与し、胎生 18 日目の胎児から脳全体を摘出し、total RNA を取得した。

得られた total RNA から mRNA を精製し、逆転写反応時に Cy3-dUTP または Cy5-dUTP を取り込ませ蛍光ラベルした cDNA を合成する。これを胎児で発現している遺伝子を載せた DNA チップに処理、無処理由来サンプルを同時にハイブリダイゼーションし、結果を解析した。

定量的 RT-PCR は ABI 社の PRISM7700 を用い、同社のプロトコールに従ってリアルタイムで PCR 増幅をモニターする方法にて行った。

C. 研究結果

ヘリックス研究所・関室長の協力下、マウス胎児に発現している遺伝子をピンコンタクト法でプロットした DNA チップを準備し用いた。Cy3, Cy5 の取り込みの違いおよびハイブリに対する影響の違いを考慮し、無処理由来 mRNA を Cy3 でラベルした場合と、Cy5 でラベルした場合の結果を比較した。どちらか一方の組み合わせでのみ発現が変動している結

果となった遺伝子は、ラベルの取り込み効率またはハイブリに対する影響の違いに由来する結果である可能性があるので、以降の解析からは除外した。ハイブリした結果を図 1 に示す。

異なるロットの mRNA を用い、アレイ解析を繰り返し、再現良く発現が変動している遺伝子を選別し、1.5 倍以上発現が変動した遺伝子を図 1 左下パネルにまとめた。 α -globin, β -globin を始め、globin 様の未知遺伝子を含め多数の globin 類遺伝子の発現が上昇した。また、ハンチントン病の原因遺伝子である Huntingtin Disease 遺伝子産物にユビキチンを結合し、分解を促進する酵素である HIP2 (Huntingtin Interacting Protein 2) の発現も上昇した。

DNA チップで得られた発現変動結果を検証するため、定量的 RT-PCR 法により、 α -globin, β -major globin, β -minor globin, HIP2 の発現変動を定量した。材料はマイクロアレイ解析に用いたのと同じ mRNA であるが、雄と雌を区別して DES 投与に伴う発現変動を比較した。定量結果は、定量的増幅が検出される PCR サイクル数のしきい値である Ct value で示した (Ct value が低いほど発現が高い)。また、コントロールとして

DES 投与で比較的発現変動の低い beta-actin を用い、その Ct value で標準化した値の DES 投与に伴う比を算出し比べた。その結果、表 1 に示したように、発現変動が検証された遺伝子は α -globin のみであり、Ct value が 1 少なくなっていることから、およそ 2 倍発現上昇していることが確認された。また、チップに載っていなかった遺伝子のうち、最近脳で存在が報告された globin である Neuroglobin に加え、Huntingtin Disease の発現変動も定量的 RT-PCR 法により検討したが、これらの発現は変動していなかった。

D. 考察

本研究では、近年進歩の著しい cDNA マイクロアレイ技術を内分泌かく乱化学物質研究に適用するため、高次系解析の中心である脳神経系発生への影響を対象とし、解析を進めた。その結果、DES 投与に伴い、 α -globin の発現が上昇する結果を得た。一方、DNA チップでの検討結果から発現が変動していると考えられた遺伝子が、定量的 RT-PCR による解析では必ずしも発現変動していないという結果も得られた。その理由として、今回用いた DNA チップが、完全長 cDNA を鋳

型とし、PCR にて増幅した遺伝子断片をスポットしたチップであることが考えられる。すなわちこのチップ作製方法では、遺伝子配列中に繰り返し配列やファミリー間で保存性の高い配列が存在する場合には、ラベルした cDNA がそれらのスポットに結合する「クロスハイブリダイゼーション現象」が避けられない。よって、この作製法による DNA チップでの解析では、陽性となった遺伝子の全てが確実に陽性であるとは限らないこととなる。一方、この方法の利点としては、遺伝子のライブラリーさえあれば、それを鋳型に用いることで、詳細な DNA 配列情報が無くてもマイクロアレイを作製することができる点があげられる。よって、特定の組織や細胞に特化した未知遺伝子を含むチップを作製し、解析する際には威力を発揮する。実際、ヘリックス研では神経幹細胞に特化したチップの作製を試みており、今後我々もそのチップを用いて神経幹細胞における内分泌かく乱化学物質投与に伴う遺伝子発現変動解析を進める予定である。

E. 結論

本研究により、cDNA マイクロアレイ解析技術を当班に導入するという当初の

目標は達成された。PCR 増幅した DNA をスポットする方法ではクロスハイブリの問題が生じることも分かり、この問題は、さらに cDNA マイクロアレイ解析を進めるにあたって重要なポイントとなると考えられる。また、組織を材料に用いた場合には発現変動が検出される遺伝子は少ないことが示唆される結果も得られたことから、今後は例えば視床下部のみというように標的とする部位を限定して解析することにより、組織に占める細胞の多様性を減じた解析や、細胞特異的なマーカーを用いて特定の細胞を分離して解析するなどの工夫が重要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue T.: Possible endocrine disruption and hormone-like chemicals. United Nation's University International Symposium on Endocrine-Disrupting Chemicals. United Nation's Univ. Publication, 2000. p.p.23-24.
2. Takahashi Y, Koizumi K, Takagi A, Kitajima S, Inoue T., Koseki H, Saga Y: Mesp2 initiates somite

segmentation through the Notch signaling pathway. Nat Genet 25: 390-6, 2000.

3. Kitajima S, Takagi A, Inoue T., Saga Y: MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. Development 127: 3215-26, 2000.
4. Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T.: Prevention of the down-regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol., Carcinogenesis. 21(9):1671-1676, 2000

2. 学会発表

1. Ono A., Kanno J., and Inoue T.: Molecular aspects of functional differences among estrogen receptor ligands, 11th International Congress of Endocrinology, 2000.10.

2. Kanno J., Igarashi K., Ono A.,
Takeyoshi M., Takatsuki M.,
Kubo A., Itai A., and Inoue
T. : Estrogen receptor alpha
point mutation altered
responses to flavones in the
reporter assay, 11th
International Congress of
Endocrinology, 2000.10.

3. 松島裕子、井上 達、菅野 純,
17 β -estradiol の思春期前ラッ
ト投与における子宮肥大反応に
ついて-内分泌かく乱作用を照
準とした経世代試験改良のため
の考察, 日本内分泌攪乱化学物
質学会第 3 回研究発表会
2000

3. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

なし

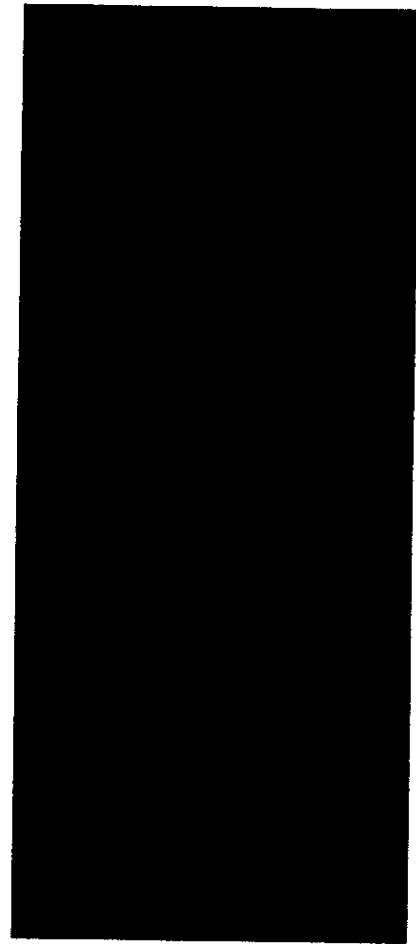
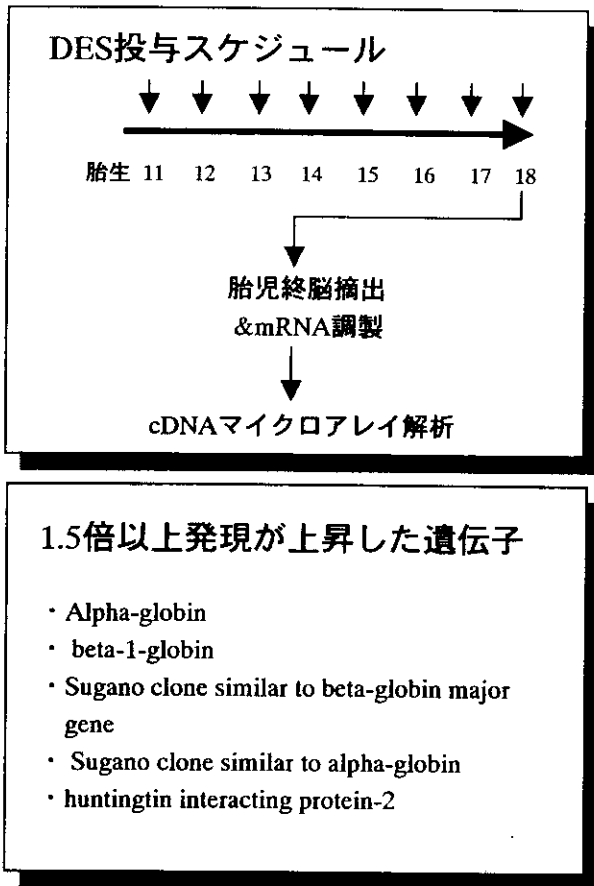
B. 実用新案登録

なし

C. その他

なし

図1 cDNAマイクロアレイハイブリダイゼーション結果



*数回繰り返した実験の典型的な結果を示した

DES (Cγ5)

表1. 定量的RT-PCR結果

alpha-globin

	Ct value		Normalized ratio/bActin
	mean	sd	mean
♀V	18.12	0.01	0.957
♀DES	17.10	0.02	
♂V	18.57	0.06	0.918
♂DES	17.10	0.02	

beta-major-globin

	Ct value		Normalized ratio/bActin
	mean	sd	mean
♀V	17.75	0.15	1.005
♀DES	17.85	0.09	
♂V	17.90	0.12	1.039
♂DES	17.88	0.05	

beta-minor-globin

	Ct value		Normalized ratio/bActin
	mean	sd	mean
♀V	18.32	0.12	0.998
♀DES	18.30	0.07	
♂V	19.35	0.13	1.036
♂DES	19.27	0.07	

HIP2

	Ct value		Normalized ratio/bActin
	mean	sd	mean
♀V	27.20	0.17	1.028
♀DES	27.36	0.12	
♂V	27.57	0.11	1.015
♂DES	27.43	0.18	

*Ct value = 定量的増幅が検出されるPCRサイクル数のしきい値で、この値が低いほど発現量が高い

**Normalized ratio/bActin = Ct valueをbeta-actinのCt valueで割って標準化し、DES投与の有無で算出した比