

13. Narasaka T, Suzuki T, Moriya T, **Sasano H**. Temporal and spatial distribution of Corticosteroidogenic Enzymes Immunoreactivity in developing human adrenal. *Molecular and cellular Endocrinology* 28:111-120 2001
14. Suzuki T, Darnel AD, Akahira JI, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T, **Sasano H**. 5alpha-Reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:2250-2257 2001
15. Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, **Sasano H**. Expression and Cellular Localization of Estrogen Receptors alpha and beta in the Human Fetus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:2258-2262 2001
16. Uzuki M, **Sasano H**, Muramatsu Y, Totsune K, Takahashi K, Oki Y, Iino K, Sawai T. Urocortin in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Science (Colch)* 100:577-589 2001
17. Vesely A, **Sasano H**, Volgyesi G, Somogyi R, Tesler J, Fedorko L, Grynspan J, Crawley A, Fisher JA, Mikulis D. MRI mapping of cerebrovascular reactivity using square wave changes in end-tidal PCO(2). *Magnetic Resonance in Medicine* 45:1011-1013 2001
18. Murakami M, Suzuki T, Nakagawasai O, Murakami H, Murakami S, Esashi A, Taniguchi R, Yanagisawa T, Tan-No K, Miyoshi I, **Sasano H**, Tadano T. Distribution of various calcium channel alpha(1) subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of omega-conotoxin SVIB in mice. *Brain Research* 903:231-236 2001
19. Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, **Sasano H**, Okamura K. Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertility and Sterility* 75:1198-205 2001
20. Yamaki H, **Sasano H**, Ohashi Y, Shizawa S, Shineha R, Satomi S, Nagura H. Alteration of X and Y chromosomes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 21:985-990 2001
21. Ito K, Suzuki T, Moriya T, Utsunomiya H, Sugawara A, Konno R, Sato S, **Sasano H**. Retinoid receptors in the human endometrium and its disorders: a possible modulator of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:2721-2727 2001
22. Nagura H, Ohtani N, Ohtani H, **Sasano H**. [Immuno-inflammatory responses and upper gastrointestinal disorders: immuno-inflammatory mechanisms of chronic active gastritis]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 98:375-384 2001
23. Makino S, Oda S, Saka T, Yasukawa M, Komatsu F, **Sasano H**. A case of aldosterone-producing adrenocortical adenoma associated with preclinical Cushing's syndrome and hypersecretion of parathyroid hormone. *Endocrine Journal* 48:103-111 2001
24. Cho YY, Kang MJ, Sone H, Suzuki T, Abe M, Igarashi M, Tokunaga T, Ogawa S, Takei YA, Miyazawa T, **Sasano H**, Fujino T, Yamamoto TT. Abnormal uterus with polycysts, accumulation of uterine prostaglandins, and reduced fertility in mice heterozygous for acyl-coa synthetase 4 deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284:993-997 2001
25. Utsunomiya H, Suzuki T, Kaneko C, Takeyama J, Nakamura J, Kimura K, Yoshihama M, Harada N, Ito K, Konno R, Sato S, Okamura K, **Sasano H**. The analyses of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human endometrial hyperplasia and carcinoma.

- Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86:3436-3443 2001
26. Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H, **Sasano H**. Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathology International* 51:333-337 2001
  27. Ise T, Shimoda A, Takakuwa H, Kato T, Izumiya Y, Shimizu K, Suzuki T, **Sasano H**, Yokoyama H, Kobayashi K. A chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene in glucocorticoid-insuppressible familial hyperaldosteronism. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 55:131-134 2001
  28. Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Suzuki T, Watanabe T, **Sasano H**. Analysis of cortisol secretion in hormonally inactive adrenocortical incidentalomas: study of in vitro steroid secretion and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes. *Endocrine Journal* 48:167-174 2001
  29. Ogihara M, Nakagawa A, Tamura C, Maejima K, Ito T, Nakano S, Kigoshi T, Uchida K, Matsubara J, **Sasano H**. [Renovascular hypertension coexisting with an aldosteronoma]. [Article in Japanese] *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 90:1082-1084 2001
  30. Sasaki H, Nio M, Iwami D, Funaki N, Ohi R, **Sasano H**. Cytokeratin subtypes in biliary atresia: Immunohistochemical study. *Pathology International* 51:511-518 2001
  31. Semba S, Yamakawa M, **Sasano H**. The cadherin-catenin superfamily in endocrine tumors. *Endocrine Pathology* 12:1-13 2001
  32. Inoue T, Akahira J, Takeyama J, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Kurokawa Y, Satomi S, **Sasano H**. Spatial and topological distribution of progesterone receptor A and B isoforms during human development. *Molecular and Cell Endocrinology* 182:83-89 2001
  33. **Sasano H**, Matsuzaki S, Suzuki T. Estrogen receptor mRNA in situ hybridization using microprobe system. *Methods Molecular Biology* 176:317-325 2001
  34. Kumamoto H, **Sasano H**, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. *Pathology International* 51:579-584 2001
  35. Maeda S, Suzuki S, Moriya T, Suzuki T, Chida M, Suda H, Sakuma H, Kondo T, **Sasano H**. Isolated unilateral absence of a pulmonary artery: influence of systemic circulation on alveolar capillary vessels. *Pathology International* 51:649-653 2001
  36. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, **Sasano H**, Murakami O. Role of urotensin II in patients on dialysis. *The Lancet* 358:810-811 2001
  37. Nakamura Y, Son Y, Kohno Y, Shimono D, Kuwamura N, Koshiyama H, **Sasano H**, Matsuda T. Case of adrenocorticotrophic hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II. *Endocrine* 15:57-61 2001
  38. Akahira JI, Suzuki T, Ito K, Darnel AD, Moriya T, Sato S, Yaegashi N, Okamura K, **Sasano H**. Expression of 5alpha-reductases in human epithelial ovarian cancer: its correlation with androgen receptor status. *Japanese Journal of Cancer Research* 92:926-932 2001
  39. Ito K, **Sasano H**, Watanabe K, Ozawa N, Sato S, Yajima A. Immunohistochemical study of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) in normal and abnormal endometrium. *International Journal of Gynecological Cancer* 3:122-127 2001
  40. Sano T, Hirasawa G, Takeyama J, Darnel

- AD, Suzuki T, Moriya T, Kato K, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Nakamura J, Yoshihama M, Harada N, **Sasano H**. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and enzyme activity in the human gastrointestinal tract. *Clinical Science (Lond)*.101:485-491 2001
41. **Sasano H**, Vesely AE, Iscoe S, Tesler JC, Fisher JA. A simple apparatus for accelerating recovery from inhaled volatile anesthetics. *Anesthesia Analgesia* 93:1188-1191 2001
  42. Taniguchi S, Ikuyama S, Hiramatsu S, Shiokawa S, Hata T, Sato F, Imagawa M, Nomura Y, Sasano H, Nishimura J. [Aldosterone and cortisol-producing adrenal tumor] *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 90:2291-2294 2001
  43. Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Moriya T, Tsuchiya F, Ogawa S, Muramatsu M, **Sasano H**. EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *British Journal of Cancer* 85:1731-1737 2001
  44. Takeyama J, Suzuki T, Hirasawa G, Muramatsu Y, Nagura H, Iinuma K, Nakamura J, Kimura KI, Yoshihama M, Harada N, Andersson S, **Sasano H**. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 expression in the human fetus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:410-416 2000
  45. Moriya T, Sakamoto K, **Sasano H**, Kawanaka M, Sonoo H, Manabe T, Ito J. Immunohistochemical analysis of Ki-67, p53, p21, and p27 in benign and malignant apocrine lesions of the breast: its correlation to histologic findings in 43 cases. *Modern Pathology* 13:13-18 2000
  46. Kimura K, **Sasano H**, Shimosegawa T, Mochizuki S, Nagura H, Toyota T. Ultrastructure of cells undergoing apoptosis. *Vitamin and Hormone* 58:257-266 2000
  47. Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, **Sasano H**. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters. *British Journal of Cancer* 82:518-523 2000
  48. Speiser PW, Susin M, **Sasano H**, Bohrer S, Markowitz J. Ovarian hyperthecosis in the setting of portal hypertension. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:873-877 2000
  49. Hirasawa G, Takeyama J, **Sasano H**, Fukushima K, Suzuki T, Muramatsu Y, Darnel AD, Kaneko C, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H, Krozowski ZS. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:1306-1309 2000
  50. Sone M, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Arihara Z, Satoh F, **Sasano H**, Ito H, Mouri T. Binding sites for melanin-concentrating hormone in the human brain. *Peptides* 21:245-250 2000
  51. Suzuki S, Suzuki T, Tsubochi H, Koike K, Tateno H, Krozowski ZS, **Sasano H**. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in primary lung carcinomas. *Anticancer Research* 20:323-328 2000
  52. Kaaijk EM, **Sasano H**, Suzuki T, Beek JF, van Der Veen F. Distribution of steroidogenic enzymes involved in androgen synthesis in polycystic ovaries: an immunohistochemical study. *Molecular Human Reproduction* 6:443-447 2000
  53. Tashiro A, **Sasano H**, Nishikawa T, Yabuki N, Muramatsu Y, Coughtrie MW, Nagura H, Hongo M. Expression and activity of dehydroepiandrosterone sulfotransferase in human gastric. *Journal of Steroid*

- Biochemistry Molecular Biology  
72:149-154 2000
54. Arai K, Muro H, Suzuki M, Oba N, Ito K, **Sasano H** Adrenal rest tumor of the liver: A case report with immunohistochemical investigation of steroidogenesis. *Pathology International* 50:244-248 2000
  55. Yoshimoto T, Naruse M, Ito Y, Naruse K, Ueda T, Tanabe A, Harada S, Nishikawa T, **Sasano H**, Obara T, Demura H Adrenocortical carcinoma manifesting pure primary aldosteronism: a case report and analysis of steroidogenic enzymes. *Journal of Endocrinological Investigation* 23:112-117 2000
  56. Ariga N, Moriya T, Suzuki T, Kimura M, Ohuchi N, Satomi S, **Sasano H** 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in ductal carcinoma in situ and intraductal proliferative lesions of the human breast. *Anticancer Research* 20:1101-1108 2000
  57. Iwabuchi M, **Sasano H**, Hiwatashi N, Masuda T, Shimosegawa T, Toyota T, Nagura H Serrated adenoma: a clinicopathological, DNA ploidy, and immunohistochemical study. *Anticancer Research* 20:1141-1147 2000
  58. Tsubochi H, Suzuki T, Suzuki S, Ohashi Y, Ishibashi S, Moriya T, Fujimura S, **Sasano H** Immunohistochemical study of basaloid squamous cell carcinoma, adenoid cystic and mucoepidermoid carcinoma in the upper aerodigestive tract. *Anticancer Research* 20:1205-1212 2000
  59. Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Hayashi Y, **Sasano H**, Mouri T Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides* 21:565-570 2000
  60. Murakami M, Nakagawasai O, Fujii S, Hosono M, Hozumi S, Esashi A, Taniguchi R, Okamura T, Suzuki T, **Sasano H**, Yanagisawa T, Tan-no K, Tadano T, Kitamura K, Kisara K Antinociceptive effect of cilnidipine, a novel N-type calcium channel antagonist. *Brain Research* 868:123-127 2000
  61. Matsuzaki S, Fukaya T, Uehara S, Murakami T, **Sasano H**, Yajima A Characterization of messenger RNA expression of estrogen receptor-alpha and -beta in patients with ovarian endometriosis. *Fertility and Sterility* 73:1219-1225 2000
  62. Matsuzaki S, Murakami T, Sato S, Moriya T, **Sasano H**, Yajima A Endometriosis arising in the uterosacral ligament: A case report including a literature review and immunohistochemical analysis. *Pathology International* 50:493-496 2000
  63. Semba S, Moriya T, Youssef EM, **Sasano H** An autopsy case of ovarian hyperstimulation syndrome with massive pulmonary edema and pleural effusion. *Pathology International* 50:549-552 2000
  64. **Sasano H**, Suzuki T, Moriya T Recent advances in surgical pathology of adrenal incidentaloma. *Biomed & Pharmacother* 54 Suppl 1:169s-174s 2000
  65. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, **Sasano H** Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:35-42 2000
  66. Iino K, Oki Y, **Sasano H** A case of adrenocortical carcinoma associated with recurrence after laparoscopic surgery. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 53:243-248 2000
  67. Yamanaka K, Iitaka M, Inaba M, Morita T, **Sasano H**, Katayama S A case of renin-producing adrenocortical cancer. *Endocrine Journal* 47:119-125 2000
  68. Suzuki T, Takahashi K, Darnel AD, Moriya T, Murakami O, Narasaka T, Takeyama J, **Sasano H** Chicken ovalbumin upstream promoter

- transcription factor II in the human adrenal cortex and its disorders. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:2752-2757 2000
69. Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, **Sasano H**, Parker KL Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Molecular and cellular Endocrinology* 14:1462-1471 2000
  70. Suzuki T, Moriya T, Darnel AD, Takeyama J, **Sasano H** Immunohistochemical distribution of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human tissues. *Molecular and cellular Endocrinology* 164:69-75 2000
  71. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, **Sasano H** Molecular basis for treating endometriosis with aromatase inhibitors. *Human Reproduction Update* 6:413-418 2000
  72. Kato M, Ioritani N, Suzuki T, Kambe M, Inaba Y, Watanabe R, **Sasano H**, Orikasa S Mechanism of anti-tumor effect of combination of bleomycin and shock waves. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:1065-1072 2000
  73. Suzuki T, **Sasano H**, Andersson S, Mason JI 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-->4-isomerase activity associated with the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isoform. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000 85:3669-3672
  74. Ohashi Y, Ishibashi S, Suzuki T, Shineha R, Moriya T, Satomi S, **Sasano H** Significance of tumor associated tissue eosinophilia and other inflammatory cell infiltrate in early esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 20:3025-3030 2000
  75. Takahashi K, Yoshinoya A, Arihara Z, Murakami O, Totsune K, Sone M, **Sasano H**, Shibahara S Regional distribution of immunoreactive prolactin-releasing peptide in the human brain. *Peptides* 21:1551-1555 2000
  76. Akahira J, Inoue T, Suzuki T, Ito K, Konno R, Sato S, Moriya T, Okamura K, Yajima A, **Sasano H** Progesterone receptor isoforms A and B in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR studies. *British Journal of Cancer* 83:1488-1494 2000
  77. Ariga N, Moriya T, Suzuki T, Kimura M, Ohuchi N, **Sasano H** Retinoic Acid Receptor and Retinoid X Receptor in Ductal Carcinoma in situ and Intraductal Proliferative Lesions of the Human Breast. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:1169-1176 2000
  78. **Sasano H**, Suzuki T, Takeyama J, Utsunomiya H, Ito K, Ariga N, Moriya T 17-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human breast and endometrial carcinoma. a new development in intracrinology. *Oncology* ;59 Suppl 1:5-12 2000
  79. Utsunomiya H, Suzuki T, Harada N, Ito K, Matsuzaki S, Konno R, Sato S, Yajima A, **Sasano H** Analysis of estrogen receptor alpha and beta in endometrial carcinomas: correlation with ER beta and clinicopathologic findings in 45 cases. *International Journal of Gynecological Pathology* 19:335-341 2000
  80. Muramatsu Y, Fukushima K, Iino K, Totsune K, Takahashi K, Suzuki T, Hirasawa G, Takeyama J, Ito M, Nose M, Tashiro A, Hongo M, Oki Y, Nagura H, **Sasano H** Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides* 21:1799-1809 2000
  81. Suzuki T, **Sasano H**, Takeyama J, Kaneko C, Freije WA, Carr BR, Rainey WE Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 53:739-747

2000

82. Narasaka T, Moriya T, Endoh M, Suzuki T, Shizawa S, Mizokami Y, Matsuoka T, Sasano H. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and dehydroepiandrosterone sulfotransferase in the human liver. *Endocrine Journal* 47:697-705;2000
83. 笹野公伸 病理組織、細胞診診断の最近の進歩 宮城県医師会報 662:212-218;2001
84. 伊藤潔、笹野公伸、佐藤信二 子宮内膜癌(体癌)若年子宮体癌 新女性医学大系 35:251-263;2001
85. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 子宮体部病理と臨床【臨時増刊号】 19:158-163;2001
86. 森谷卓也、八重樫弘、笹野公伸 アポクリン硬化性腺症 病理と臨床 19:358-360;2001
87. 名倉宏、大谷紀子、大谷明夫、笹野公伸 上部消化管疾患と免疫応答—慢性活動性胃炎を中心に— 日消誌 98:375-384;2001
88. 森谷卓也、笹野公伸、大内憲明 異型乳管過形成(ADH) 非浸潤性乳管癌の基礎と臨床 57-64;2001
89. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 副腎皮質疾患の臨床病理—副腎偶発腫を中心に— 泌尿器外科 14:411-414;2001
90. 笹野公伸、奈良坂俊明、鈴木貴 副腎ホルモンの調整機構—機能と形態— ホルモンと臨床 49:3-10;2001
91. 森谷卓也、鈴木貴、遠藤希之、有我直宏、笹野公伸、大内憲明 ADH,ALH と乳腺上皮内増殖性病変 病理と臨床 19:460-466;2001
92. 鈴木貴、笹野公伸 内分泌関連疾患における遺伝子研究の現状と展望 医学のあゆみ 197:1159-1163;2001
93. 森谷卓也、秋保信彦、三浦弘守、喜多見路世、遠藤希之、八重樫弘、渡辺みか、平川久、木村道夫、笹野公伸 乳管内増殖性病変に対する穿刺吸引細胞診診断成績と細胞像の特徴に関する検討 日本臨床細胞学会雑誌 40:531-539;2001
94. 武山淳二、森谷卓也、佐々木英之、佐野信行、仁尾正記、中村潤、林富、笹野公伸 先天性嚢胞性腺腫様奇形を合併した肺外分画症の1例 診断病理 18:358-360
95. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 ヒト乳癌、子宮内膜癌の発生、進展におけるエストロゲンの役割 内分泌・糖尿病科 13:343-350
96. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 副腎偶発腫瘍の病理 ホルモンと臨床 49:23-25
97. 鈴木貴、尾川清佳、金子智香、笹野公伸 ヒト眼組織における  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes の局在 ホルモンと臨床 43:64-67
98. 谷口普、生祥一郎、平松真祐、塩川左斗志、西村純二、秦聡孝、佐藤文憲、今川全晴、野村芳雄 アルドステロン・コルチゾール同時産生副腎腫瘍の1例 日本内科学会雑誌 90:139-142
99. 笹野公伸、鈴木貴 ACTH independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH)の一例 病理と臨床 18:54-55, 2000
100. 笹野公伸、鈴木貴、宇都宮裕貴、伊藤潔 子宮内膜増殖症における性ステロイドホルモン-intracrinology との関連について—産科と婦人科 67:57-62, 2000
101. 笹野公伸 液性内分泌学から組織・細胞内分泌学へ 東北医誌 111:191-193, 2000
102. 森谷卓也、渡辺みか、笹野公伸 粘液性境界悪性腫瘍(低悪性度腫瘍) 病理と臨床 18:419-424;2000
103. 笹野公伸、鈴木貴 エストロゲン産生臓器としての脂肪組織 ホルモンと臨床 臨時増刊号 31-34;2000
104. 笹野公伸、伊達文子 免疫二重染色組織細胞科学2000 96-101;2000
105. 鈴木貴、金子智香、笹野公伸 固定法病理と臨床 臨時増刊号 18:8-10;2000
106. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 細胞増殖関連抗原 病理と臨床 臨時増刊号 18:85-90;2000
107. 笹野公伸 自動化 病理と臨床 臨時増刊号 18:290-292;2000

108. 笹野公伸、金子智香、伊達文子 市販抗体の免疫組織化学における使い方と注意点 病理と臨床 臨時増刊号 18:69-71;2000
109. 鈴木貴、Andrew D.Darnel、武山淳二、笹野公伸 ステロイドホルモンの免疫組織化学 病理と臨床 臨時増刊号 18:99-103;2000
110. 笹野公伸、鈴木貴 内分泌 e. 副腎病理と臨床 臨時増刊号 18:164-165;2000
111. 鈴木貴、志沢聡一郎、奈良坂俊明、笹野公伸 免疫組織化学の画像処理 病理と臨床 臨時増刊号 18:313-317;2000
112. 笹野公伸、鈴木貴 エストロゲン産生臓器としての脂肪組織 内分泌・糖尿病科 11:190-195;2000
113. 渡辺みか、隈部俊宏、白根礼造、吉本高志、笹野公伸 pilocytic astrocytoma(毛細胞性星状膠細胞腫) 病理と臨床 18:1043-1050;2000
114. 笹野公伸、奈良坂俊明、鈴木貴 ヒト副腎、肝臓疾患における Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase (DHEA-ST) の発現動態 ホルモンと臨床 48:71-76;2000
115. 志澤聡一郎、森谷卓也、笹野公伸、増田高行、名倉宏 暗号化電子メールを用いたインターネット経由の病理診断情報送受信の試み—PGP (Pretty Good Privacy) により電子メールの暗号化、電子署名の病理診断学分野への応用 病理と臨床 18:969-974;2000
116. 志澤聡一郎、笹野公伸 病理検査室の小規模データベースにおける暗号化ソフトウェアの利用 —ファイルメーカー Pro と Troi Coding Plug-In を用いて— 病理と臨床 18:814-816;2000
117. 宇都宮裕貴、鈴木貴、伊藤潔、笹野公伸 ヒト子宮類内膜腺癌におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  および  $\beta$  の発現 ホルモンと臨床 48:62-65;2000
118. 笹野公伸、村上博、鈴木貴、原田信広 ヒト大動脈におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  および  $\beta$  発現の検索 ホルモンと臨床 48:70-73;2000
119. 伊藤潔、宇都宮裕貴、鈴木貴、笹野公伸、佐藤信二 ヒト子宮内膜癌における retinoid receptors および  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type2 の発現に関する研究 ホルモンと臨床 48:83-86;2000
120. 奈良坂俊明、鈴木貴、笹野公伸 ヒト肝臓における  $17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Thpe2 および Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase の検討 ホルモンと臨床 48:87-91;2000
121. 鈴木貴、森谷卓也、有我直宏、金子智香、笹野公伸 ヒト浸潤性乳管癌における  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の発現 ホルモンと臨床 48:92-95;2000
122. 小島元子、根本茂子、横山純、金彰午、笹野公伸 多嚢胞性卵巣症候群が否定的な副腎皮質結節を有する androgen 過剰症について ホルモンと臨床 48:169-174;2000
123. 宇都宮裕貴、笹野公伸 ホルモン依存性癌の intracrinology Molecular Medicine 37:1130-1134;2000
124. 名倉宏、大谷明夫、笹野公伸、松本誉之 免疫病理学からみた H.pylori 感染性胃炎と炎症性腸疾患 Helicobacter pylori 感染の基礎と臨床 251-262 2000
125. 溝呂木安希、井上絃子、森谷卓也、笹野公伸 メラニン顆粒を含む組織標本に対する免疫組織染色の検討 病理技術 62:24-25 2000

## 2. 学会発表

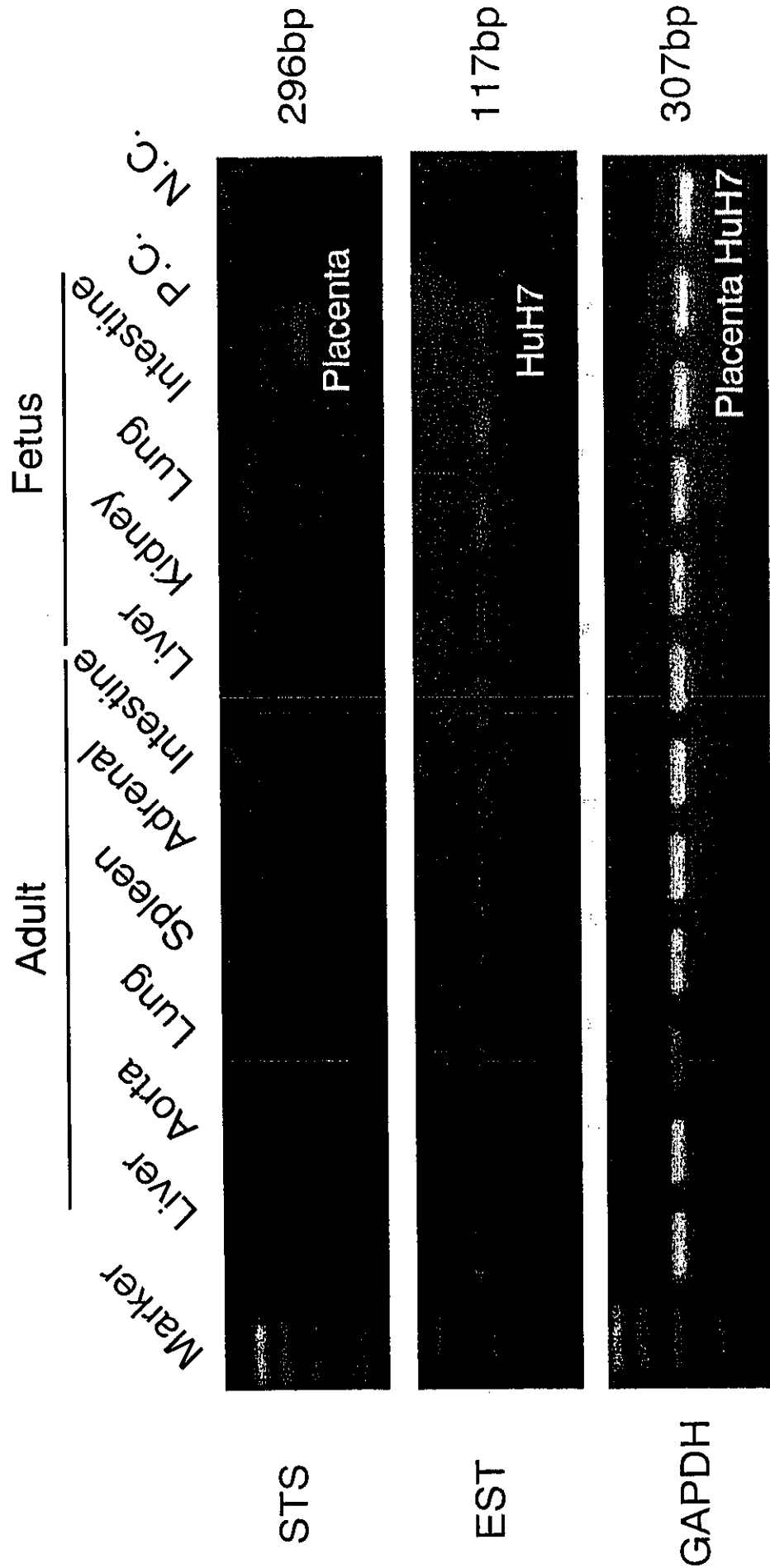
1. A role for the transcription factor nurr1 in adrenal aldosterone production MH Bassett, T Suzuki, H Sasano, PC White, WE Rainey. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
2. Mineralocorticoid receptor, type1 and type2  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart A Konishi, C Kaneko, T Inoue, T Suzuki, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd

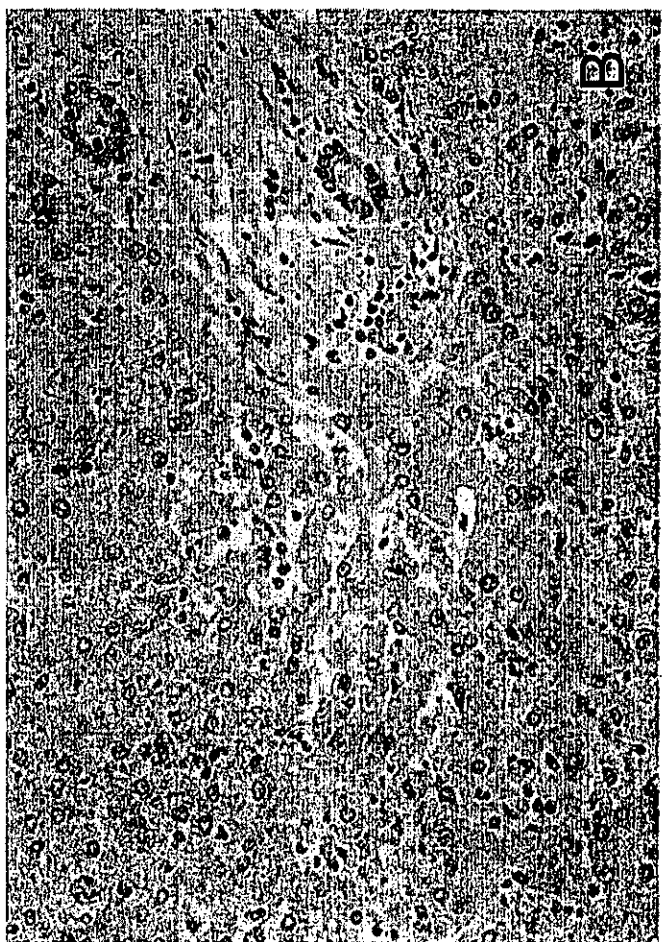
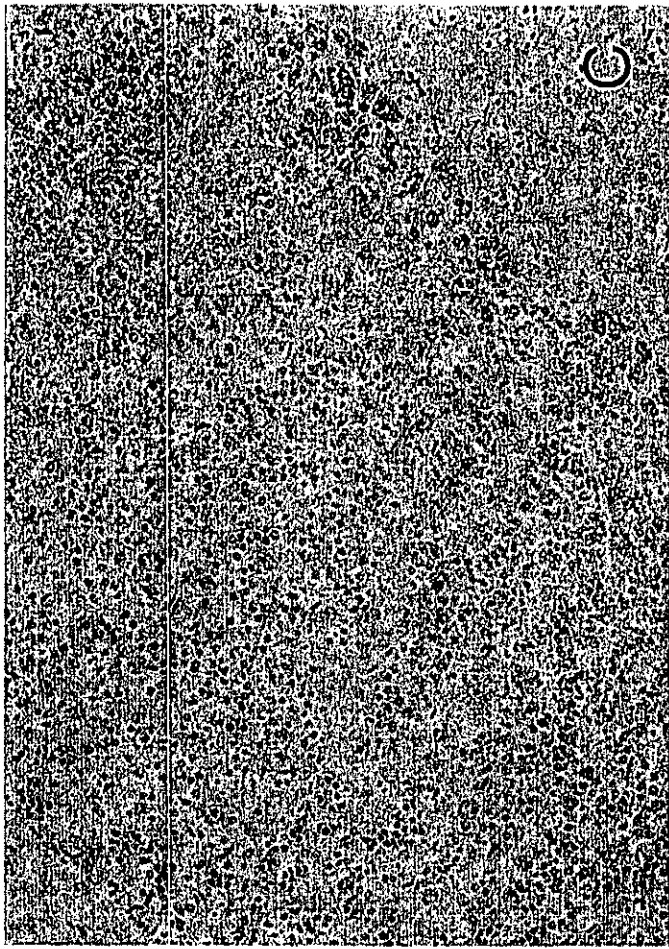
- Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
3. Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart Y Kimura, K Takahashi, Y Muramatsu, C Kaneko, T Suzuki, K Totsune, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
  4.  $5\alpha$ -reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions T Suzuki, AD Darnel, J Akahira, S Ogawa, J Takeyama, T Mcriya, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
  5. Progesterone receptor a and b isoforms in human neurogenic and soft tissue tumors T Inoue, J Akahira, J Takeyama, T Suzuki, AD Darnel, C Kaneko, M Hadori, T Kumabe, Y Kurokawa, S Satomi, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
  6. Expression and regulation of  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $11\beta$ -HSD) in a human fetal epithelial cell line AD Darnel, T Suzuki, S Suzuki, C Kaneko, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
  7. 左側副腎多発性腺腫ならびに皮質結節および右副腎腫瘍を有する preclinical Cushing 症候群について 小島元子、我孫子尚、安藤善郎、星野正美、笹野公伸 第9回日本ステロイドホルモン学会 東京 2001.11.17
  8. 慢性関節リウマチ滑膜組織における性ホルモン受容体の局在 石塚正人、鈴木 貴、笹野公伸 第9回日本ステロイドホルモン学会 東京 2001.11.17
  9. ヒト神経原性腫瘍におけるプロゲステロンの影響 井上幸、赤平純一、武山淳二、鈴木 貴、ダーネルアンドルー、金子智香、隈部俊宏、羽鳥正仁、高橋和広、黒川良望、里見進、笹野公伸 第9回日本ステロイドホルモン学会 東京 2001.11.17
  10. ヒト白血球細胞におけるプロゲステロン代謝経路の同定 鈴木 貴、笹野公伸 第9回日本ステロイドホルモン学会 東京 2001.11.17
  11. 内分泌療法と Intracrinology 笹野公伸 第39回日本癌治療学会総会 広島 2001.11.7-9
  12. 心臓における mineralcorticoid receptor および  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の発現 小西章敦、金子智香、Andrew D.Darnel、鈴木 貴、田林暁一、笹野公伸 第3回日本内分泌学会東北地方会 山形 2001.9.29
  13. ヒト組織におけるオレキシンAの局在 中林正雄、鈴木 貴、高橋和広、武山淳二、笹野公伸 第3回日本内分泌学会東北地方会 山形 2001.9.29
  14. ヒト白血球細胞におけるプロゲステロン代謝経路の解析 鈴木 貴、笹野公伸 第3回日本内分泌学会東北地方会 山形 2001.9.29
  15. 慢性関節リウマチ滑膜組織における性ホルモン受容体の局在 石塚正人、鈴木 貴、笹野公伸、澤井高志、宇月美和 第3回日本内分泌学会東北地方会 山形 2001.9.29
  16. ヒト大動脈におけるエストロゲンレセプター発現の検討 中村保宏、鈴木 貴、日高久美子、金子智香、笹野公伸 第3回日本内分泌学会東北地方会 山形 2001.9.29
  17. ヒト大腸癌組織における性ステロイド受容体の発現 江幡明子、川端和歌子、鈴木 貴、日高久美子、笹野公伸 第3回日本内分泌学会東北地方会 山形 2001.9.29
  18. 若年子宮体癌のホルモン療法後に妊娠・分娩に至った3症例 宇都宮裕貴、新倉仁、伊藤潔、笹野公伸、八重樫伸生 第31回日本婦人科腫瘍学会学術集会 大阪 2001.11.29-30
  19. 卵巣におけるステロイド産生腫瘍と Intracrinology 笹野公伸、鈴木貴、伊藤潔、森谷卓也 第31回日本婦人科腫瘍学会学術集会 大阪 2001.11.29-30
  20. International Case Conference Adrenal Glands 笹野公伸、入江準二、河合紀生子、相羽元彦、Anne Marie McNicol 第5回日本



- 内分泌病理学会総会 東京 2001.9.14-15
21. 原発性アルドステロン症(PA)の病態の推移: 局所再発を示した副腎癌による一症例からの考察 成瀬光栄、田辺晶代、松田大輔、高木佐知子、吉本貴宣、飯原雅季、小原孝男、笹野公伸、高野加寿恵 第5回日本内分泌病理学会総会 東京 2001.9.14-15
  22. 卵巣におけるステロイド産生腫瘍と Intracrinology 笹野公伸 第30回日本婦人科腫瘍学会学術集会 横浜 2001.7.26-28
  23. 心筋における鉱質コルチコイド受容体、1型、2型  $11\beta$ -HSD 小西章敦、金子智香、井上幸、鈴木たかし、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  24. 卵巣癌細胞における Progesterone receptor isoformの発現と estrogenによる regulation: 定義 PCR法を用いての検討 赤平純一、鈴木貴、伊藤潔、佐藤信二、八重樫伸生、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  25. ヒト乳癌組織における  $5\alpha$ -reductaseの発現 鈴木貴、Darnel Andrew、尾川清佳、有我直宏、森谷卓也、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  26. 腎細胞癌と鑑別が困難であった副腎癌の一例 佐藤文俊、小原克也、山岸俊夫、棚橋善克、八重樫弘、村上治、笹野公伸、伊藤貞嘉 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  27. 左副腎腺腫による food-dependent Cushing 症候群の一例 榊澤政広、本島新司、青柳和美、沖隆、笹野公伸、第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  28. 両側副腎腺腫を有する Cushing 症候群における腺腫のステロイド産生能の特徴と腺腫摘出術後の副腎皮質機能について 小島元子、根本茂子、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  29. ヒト脳における prolactin-releasing peptide 免疫活性の分布及び受容体の検討 曾根正彦、高橋和広、在原善英、佐藤文俊、村上治、戸恒和人、吉野谷彩子 笹野公伸、毛利虎一、柴原茂樹 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  30. ヒト胎児における Estrogen receptor  $\alpha$ と $\beta$ の発現の検討 武山淳二、鈴木貴、原田信広、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  31. 11-デオキシコルチゾール(S)・デオキシコルチコステロン(DOC)同時産生を認めた Preclinical Cushing's syn.の1例 田口晴子、稲垣朱実、坂野僚一、中村麻友美、板津武晴、小林弘明、都築豊徳、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  32. クッシング症候群を呈した右副腎癌の一例 在原善英、村上治、戸恒和人、佐藤文俊、伊藤貞嘉、高橋和広、曾根正彦、笹野公伸、毛利虎一、第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  33. ヒトにおける新たな心血管作動性ペプチド、ユーロテンシンII 戸恒和人、高橋和広、村上治、在原善英、佐藤文俊、曾根正彦、木村雄一郎、伊藤貞嘉、毛利虎一、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  34. ヒト心臓における urocortin, corticotropin-releasing factor (CRF) 及び CRF receptorsの発現の検討について 木村雄一郎、高橋和広、村松康成、金子智香、戸恒和人、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  35. ヒト甲状腺腫瘍における  $ER\alpha$ と $ER\beta$ の検討 川端和歌子、鈴木貴、武山淳二、亀山香織、高見博、下瀬川徹、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  36. 先天性副腎リポイド過形成(steroidogenic acute regulatory protein(SIAR) deficiency)の性腺における病態—SIAR ノックアウトマウスを用いた検討— 長谷川奉延、鈴木貴、笹野公伸、Parker Keith L、松尾宣武 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  37. 傍神経節種の生物学的悪性度に関する最近の知見 渡辺みか、遠藤希之、森谷卓也、笹野公伸 第74回日本内分泌学会学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
  38. 血管壁内でのエストロゲン系の Endocrinologyと Intracrinology 笹野公伸、

- 村上博、原田信広 第74回日本内分泌学会  
学術総会 横浜 2001.6.29-7.1
39. 副腎における結節性過形成と腫瘍の鑑別 笹野公伸 第13回日本内分泌外科学会総会  
名古屋 2001.5.24-25
40. 乳腺の微小浸潤癌(浸潤径1mm 以下)の病  
理的検討 森谷卓也、遠藤希之、八重樫弘、  
渡辺みか、鈴木貴、笹野公伸 第90回日本  
病理学会総会 東京 2001.4.5-7
41. ヒト乳癌組織における EBAG9の発現 鈴木  
貴、川端和歌子、赤平純一、有我直宏、森谷  
卓也、井上聡、笹野公伸 第90回日本病理  
学会総会 東京 2001.4.5-7
42. 間質の黄体化を伴う膵の Mucinous Cystic  
Tumor 石黒洋、加藤佳瑞紀、高橋利幸、笹  
野公伸、石倉浩 第90回日本病理学会総会  
東京 2001.4.5-7
43. 胎児肝、胆道閉鎖症での LST(liver specific  
transporter)1及び2の発現についての検討  
佐々木英之、鈴木貴、阿部高明、海野倫明、  
大井龍司、笹野公伸 第90回日本病理学会  
総会 東京 2001.4.5-7
44. 子宮頸癌、特に頸部腺癌における性ステロイ  
ドホルモンレセプターの発現 伊藤潔、鈴木  
貴、笹野公伸 第90回日本病理学会総会  
東京 2001.4.5-7
45. 食道扁平上皮癌(pSM,pMP)における浸潤形  
態のフラクタル次元を用いた定量的解析 遠  
藤希之、阿部薫夫、千場良司、八重樫弘、渡  
辺みか、森谷卓也、笹野公伸 第90回日本  
病理学会総会 東京 2001.4.5-7
46. ヒト胎児肺血管発達過程における  
thrombomodulinと von Willebrand factor の  
発現形式 前田寿美子、鈴木聡、鈴木貴、遠  
藤希之、近藤丘、笹野公伸 第90回日本病  
理学会総会 東京 2001.4.5-7
47. 新生家兔に対するヘパリンの肺血管成長促  
進効果の実験病理学的検討
48. 渡辺卓、鈴木貴、志澤聡一郎、小西章敦、遠  
藤雅人、田林暁一、笹野公伸 第90回日本  
病理学会総会 東京 2001.4.5-7
49. ヒト肺の発達過程におけるレチノイド受容体  
RAR,RXR の発現動態の解明 木村雄一郎、  
鈴木貴、金子智香、鈴木聡、笹野公伸 第90  
回日本病理学会総会 東京 2001.4.5-7
50. GIST を含むヒト軟部一神経原性腫瘍におけ  
るプロゲステロン受容体AとBの発現 井上幸、  
赤平純一、鈴木貴、ダーネルアンドルー、武山  
淳二、金子智香、隈部俊宏、羽鳥正仁、黒  
川良望、里見進、笹野公伸 第90回日本病  
理学会総会 東京 2001.4.5-7





組織	成人			胎児		
	mRNA		免疫染色(EST)	mRNA		免疫染色(EST)
	STS	EST		STS	EST	
脳	-	++	+	±	±	-
心臓	-	±	+	±	+++	+
大動脈	±	++	中膜	-a)	-a)	-a)
肺	±	+	+	±	+++	-a)
気管	±	±	+	-a)	-a)	+
食道	-	±	上皮	-a)	-a)	上皮
胃	-	+	上皮	-a)	-a)	上皮
小腸	-	+	上皮	±	+++	上皮
大腸	-	+	上皮	±	+++	上皮
肝臓	±	+	+	-	+++	+
膵臓	-	-	-	-a)	-a)	-
脾臓	-	-	-	-a)	-a)	-
腎臓	-	+	尿細管	±	±	間質
膀胱	-	±	上皮	-a)	-a)	上皮
副腎	-	+++	皮質	-	++	胎児層
胸腺	-a)	-a)	-	±	±	-
甲状腺	±	±	+	±	+++	+
精巣	±	±	ライディッヒ	±	++	+
前立腺	-	±	+	-a)	-a)	-a)
筋肉	-	±	+	-a)	-a)	-a)

研究課題名=[マイクロアレイ基盤整備]

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立

分担研究者 五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

遺伝子発現の網羅的検索技術である cDNA マイクロアレイ解析の本研究室への導入を目的とした検討を行った。その結果、本技術の主流である2種のプラットフォーム、Genechip システム(オリゴ DNA 基盤上合成型)およびスライドガラス型 cDNA マイクロアレイ、による解析が可能となった。これにより、今後基盤研究における網羅的遺伝子発現検討の進行をサポートする体制が整った。また、本システムを高次系解析の中心である脳神経系発生への影響解析に適用する目的で、マウス脳性分化に伴う遺伝子発現の網羅的解析とその内分泌かく乱候補化学物質による変動の解析を開始した。今年度は、前者に対しては性分化の開始時期である胎生 17 日を中心に胎生期から新生児期の視床下部を雌雄別に経時的にサンプリングした。また、後者に対しては DES 0.2 $\mu$ g/kg/day を母体に妊娠16日目から18日目まで皮下投与し、出生後1日に得た胎児の視床下部遺伝子発現を検討した。その結果、発生に伴い雄雌で発現パターンが異なる遺伝子群、および、DES 暴露により発現パターンが変動する遺伝子群が明らかとなった。

A. 研究目的

ホルモン受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子(群)を連鎖的に発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・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、従来から行われているホルモン活性物質の *in vivo* 試験系である子宮肥大試験や Hershberger 試験における比較的単純な endpoint でさえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケード解析を該当遺伝子ごとに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包括的に迅速な検討を行う方が開けてきた。そこで当研究室では、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計画し、各

班員が実施中の研究を網羅的遺伝子発現解析という側面からサポートする体制を整えることとした。あわせて、本技術を高次系影響研究の中心である脳神経系発生への影響解析に適用する目的で、マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析とその内分泌かく乱化学物質による変動の解析を開始した。

B. 研究方法

【マウス組織からの RNA の分離精製】

マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが5mm以下となるように細切した。その後、RNA 抽出操作まで-80 $^{\circ}$ Cにて保存し、RNAlater を除いた後、ISOGEN(日本ジーン社)を用いて全 RNA を抽出した。得た全 RNA は、キアゲン社の RNeasy キッ

トを用いて精製し、1 $\mu$ gを電気泳動し分解の有無を検討した。

#### 【スライドガラス型マイクロアレイ解析】

スライドガラス型マイクロアレイとしては、主にクロンテック社から市販されている Glassarray (Mouse Glassarray1.0:1081 遺伝子/アレイ、全長 cDNA)を用いた。他にヘリックス研究所より供与されたスライドガラス型マイクロアレイ(2241 遺伝子/アレイ、全長 cDNA)も検討した。ターゲット液の調製は、(1)蛍光物質(Cy3, Cy5)を直接 cDNA 合成時に取り込ませる方法および、(2) cDNA にはビオチンもしくは Fluorescein を取り込ませ、ハイブリダイゼーション後に抗体を用いて Cy3, Cy5 を付加して検出する方法 (Tyramide signal amplification 法)の2種類を検討した。(1)の方法にはクロンテック社の Glassarray fluorescein labeling kit を用い、添付のプロトコールに従った。(2)の方法には NEN 社の TSA kit を用い、添付のプロトコールに従った。

#### 【Spike RNA】

マウス遺伝子と相同性の無い Lamda phage DNA (Bacteriophage lamda B (capsid component))を spike RNA に用いることとした。Plasmid vector pBluescriptII を鋳型に PCR にて増幅して RNA を得た。増幅断片に poly A 配列 (16ヶの A) および T7 promoter 配列を 3' 側に付加し、同 plasmid vector に組み込んだ。Ambion 社の T7 in vitro transcription kit を用い、添付のプロトコールに従い、RNA を合成後、RNA 量を測定し、spike RNA として用いた。また、Spike RNA の検出・定量のための定量 RT-PCR 用のプライマーは ABI 社の PrimerExpress を用いて設計した。

#### 【Genechip 解析】

マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)に浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出

操作まで -80°C にて保存した。RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社)を用い、全 RNA を抽出し、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製した。アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5  $\mu$ g を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット)を用い、ビオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip にはマウス MGU74Av2 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

#### 【マウス視床下部材料の分離】

マウス C57BL/6 妊娠 16 日目、17 日目、18 日目、出生後 1 日目の胎児より、視床下部領域を分離し、すみやかに RNA later に浸漬した。4°C で 1 晩置いた後、-20°C で RNA 抽出まで保存した。同時に胎児組織 (尾部)を分離し、ProteinaseK 処理した後、Y 染色体特異遺伝子を PCR 検出することにより性別を判定した。性別決定後、視床下部組織を性別にプールし全 RNA を分離精製した。

#### 【DES in vivo 暴露】

DES はコーンオイルに溶解し、妊娠 16 日目から 18 日目まで母体体重あたり 0.2 あるいは 2  $\mu$ g/kg を連日皮下投与した。溶媒対象にはコーンオイルを用いた。

#### C. 研究結果

スライドガラス型 cDNA マイクロアレイ技術の導入

### (1) 検出感度の向上

小型実験動物を用いた in vivo 研究においては、マイクロアレイ解析を実施するに当たり、対象によっては極少量の材料しか得られず、マイクロアレイの標準的プロトコルが要求する RNA 量、あるいは、実際に目的とする遺伝子発現の解析の際に十分な強度のシグナルが得られないことがあり得る(これまでのプロトコルでは、全 RNA として 20 $\mu$ g 以上を要求される。全 RNA は、通常、臓器湿重量の 0.1-1 に当たることから、20mg の組織が必要であり、複数回測定するとすると、50-100mg の組織を用意することになる)。そこで、全 RNA の必要量を減らすために、tyramide を利用したシグナル増幅系を検討した。ここで用いた Tyramide システムは、蛍光ラベルされた tyramide 基質を酵素反応により切断し、反応場の極近傍のチロシン残基と共有結合させることを利用したシグナル増幅と、間接酵素抗体法による増幅とを組み合わせたものである。実際にこの Tyramide システムを検討した結果、図 5 に示すように、全 RNA 2 $\mu$ g にて十分なシグナルを得ることができることがわかり、現状でスライドガラス型マイクロアレイを実施するために必要な全 RNA の量は、最低 2 $\mu$ g で済むこととなった。

### (2) ハイブリダイゼーションおよび洗浄の自動化検討

今後マイクロアレイ解析を幅広く実施していくためには、多くのサンプルを安定して解析することが必要となる。しかし、ハイブリダイゼーション、その後の洗浄操作を個々のスライドガラスについて一つ一つ手作業で行っていると、熟練を要する上に熟練者においても、ある程度のデータのばらつきが生じることが経験された。よって、このステップを自動化することにより、解析数が増加しても安定した結果を得られることが期待される。そこで、現時点で市販されている自動装置 2 種類(アマシャムバイオサイエンス社の

Automated Slide Processor (ASP)およびジェノミックソリューションズ社の GeneTAC)について、販売代理店の協力を得て検討した。その結果、ASP ではシグナルは検出されるものの結果の再現性の点でさらにプロトコルの検討を要することがわかった。一方、図 6 に示すように、GeneTAC では現存のプロトコルにおいて安定して十分な強度かつバックグラウンドの低いシグナルが得られた。よって、少なくとも GeneTAC を導入することにより、ハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄のステップの自動化を即座に行うことが可能である見通しが得られた。今後必要となるスライドガラス型マイクロアレイ実験数によっては、本システムの導入を検討する必要があると考えられる。

### (3) Genechip システムの導入

本システム(図 1-3)を導入し、テスト実験を経、実際に当部で本システムを用いた遺伝子発現解析を実施可能であることを確認した。

### (4) 遺伝子発現絶対比較のための spike RNA 法の検討

cDNA マイクロアレイを用いた解析法のみならず、異なる材料の間の遺伝子発現を比較する手法一般について、その発現変動の基準値として、ハウスキープング(house-keeping)遺伝子と称される、どの組織でも発現している遺伝子のそれが用いられてきた。その際の前提は、化学物質を処理してもハウスキープング遺伝子の発現は変動しないということであるが、様々な解析結果から、現実にはそれらの発現も処理によっては変動することが判明した。よって、ハウスキープング遺伝子を基準として遺伝子発現比較を行うと、それは相対的な比較に留まることとなる。すなわち、個々の遺伝子発現が、細胞当たりどれだけ変動したかという絶対的な遺伝子発現比較をするためには、基準物質を新たに導入することが必要となる。そ



の基準物質を、材料中に含まれる細胞数を反映する量だけ、正しく添加することにより、個々の遺伝子の発現変化を細胞当たりの変化として捉えることが可能となる。また、その基準は実験操作全般の状態を正確に反映することが理想であり、RNA 分子であることが求められる。

そこで我々は、基準となる RNA (以下では Spike RNA) を、組織を破壊する前に細胞数に対応する量を添加し、Spike RNA を基準に目的遺伝子の発現を比較する系を構築することを目指し検討した。具体的には、spike RNA として、ほ乳類の遺伝子とホモロジーの無い lambda phage の DNA を RNA 合成して用い、組織に含まれる細胞数を反映する数値として、組織重量を選んだ。Spike RNA による標準化が実際に機能するかを、重量をあらかじめ測定した一連の肝臓組織に、一定量の spike RNA を組織破砕前に添加し、RNA 抽出後に spike RNA に対する定量 RT-PCR を実施し、元々の組織重量に逆相関する検量線が描けるかどうかで検討した。

まず、spike RNA を検出定量するための primer を設定し、その検出感度、特異的検出の有無を検討したところ、図 7 に示すように、肝臓由来の RNA を添加しても spike RNA を添加しなければ増幅は得られないこと、spike RNA は全 RNA 1 $\mu$ g 当たり少なくとも 0.024ng 以上あれば十分に検出可能であることが判明した。この結果を受け、重量の異なる肝臓組織を準備し、各々重量を測定しつつ、一定量(10ng)の spike RNA を肝臓破砕前に加え、定量 RT-PCR を実施した。図 8 に示すように、定量 RT-PCR で測定された spike RNA の量と組織材料の重量とはよい逆相関が得られ、組織材料の重量に応じて spike RNA を加えることにより、個々の遺伝子発現変化を組織重量当たりの変化として捉えることが可能であることが示された。以上より、今後各班員の材料をマイクロアレイ解析するに当たり、spike RNA を用い細胞当たりの遺伝子発現変化という視点から比較することが可能とな

った。なお、spike RNA としては *Bacillus* 由来の RNA 5 種をさらに導入する予定である。

(5) マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析  
発生期の脳は、極低用量の内分泌かく乱候補化学物質が影響を与えることが示唆されている標的臓器である。ほ乳類の脳性分化は雌型がデフォルトであり、雄胎児自身の精巣から分泌されるテストステロンが脳内でエストロジェンに変換され作用し、雄型脳が形成されると考えられている。よって、脳の性分化にはエストロジェンにより制御される一連の遺伝子発現カスケードが存在すると考えられ、内分泌かく乱候補化学物質によりそのカスケードがかく乱される可能性がある。そこで、本研究ではマウスを材料に、脳性分化過程に関わる遺伝子群の同定およびそれら遺伝子群の内分泌かく乱候補化学物質による発現変化の検討を開始した。

本年度は、エストロジェン作用によって中枢神経系発生初期に発現制御される遺伝子群の同定を目的に、精巣からテストステロンが分泌される時期である胎生 17 日あたりの時期を検討対象とした。また、DES を内分泌かく乱のモデル化合物に選び、母体体重当たり 0.2  $\mu$ g/kg を投与しその影響を解析した。

マウス C57BL/6 妊娠 16 日目、17 日目、18 日目、出生直後の胎児もしくは新生児より、視床下部領域を分離し、Y 染色体特異的な遺伝子の有無を PCR 法にて検討し性別を特定した後に、全 RNA を分離精製した。得られた RNA を用い、Genechip MGU74A version2 (既知遺伝子 6,000、EST6,000、合計 12,000) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。性別毎に経時的に遺伝子発現変化を検討した結果を図 12 に示す。雌雄ともに胎生 16 日目を基準とし、変動比をプロットした。雌雄特異的な遺伝子発現変動パターンを示す遺伝子群を同定するために、クラスター解析を行い、発現経時変化の同様な遺伝子群を 20 グループに分類し、性毎に異なる経時的発現変化を

示す遺伝子群を特定した(図13)。その結果、雄特異的な発現パターンを示すグループとして、set1, set5, set9, set16, set20(図14)が、雌特異的な発現パターンを示すグループとして、set6, set12, set14(図15)が選ばれた。図16に実際に選ばれた遺伝子の経時的な発現パターンを雄、雌1例ずつ示す。

次に、DESを妊娠16日目、17日目、18日目に母体皮下に母体体重当たり0.2 $\mu$ g/kg/day投与し、出生直後に胎児脳視床下部領域を取得し、網羅的遺伝子発現解析を行った。図17にDES処理していない出生直後の遺伝子発現解析結果と比較したscatter plotを示したが、DES処理により多くの遺伝子発現が変動していることが判明した。一方で、DES処理による遺伝子発現を雄と雌とで比較する(図18)と、出生後1日の時点では雌雄差はそれほど大きくないことが判明した。そこで雄で発現が上昇している遺伝子群、雌で発現が上昇している遺伝子群を選別し(発現差2倍以上)、それらの発生期における発現を調べた。結果を図19(雄)、図20(雌)に示す。図19より、雄でDES処理に伴い発現が上昇した遺伝子は、発生期においても雄で発現が高い遺伝子か雌雄差の無い遺伝子であるのに対し、図20より、雌で上昇した遺伝子は、発生期に雄で発現が高い遺伝子が多いことが判明した。

以上、マウス脳性分化過程を研究対象に選び、本研究で導入したcDNAマイクロアレイシステムを利用して、性分化に関わる遺伝子群の同定およびそれら遺伝子群の内分泌かく乱化学物質による発現変化を検討し、雌雄で発現パターンの異なる遺伝子群の存在、DES処理により、雌雄で応答の異なる遺伝子群を明らかとした。

#### D. 考察

本年度は、当班基盤研究へのcDNAマイクロアレイ技術の導入および各班員の研究サポートを計画し、各班員が実施中の研究をサポートする体制を整える

ことを第一目的とした。あわせて、高次系解析の中心である脳神経系発生への影響解析に本技術を適用する目的で、マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析とその内分泌かく乱候補化学物質による変動の解析を実施した。cDNAマイクロアレイ技術の導入に当たり、本技術の主流をなすと考えられる2つのプラットフォームである、Genechipシステム(オリゴDNA基盤上合成型)およびスライドガラス型cDNAマイクロアレイの導入に成功し、実際に各班員の研究をサポートする体制が整った。同時に、スライドガラス型マイクロアレイを実施する際に必要な全RNA量を減らすため、TSA法を検討し、実際に全RNA必要量を20 $\mu$ gから2 $\mu$ gに低下させることができることを確認した。さらに、遺伝子発現比較解析の際に問題となる、比較基準の問題に対処するために、spike RNAを組織破碎前に添加する系を検討し、その系が機能することを確認した。

以上より、cDNAマイクロアレイ実験のサポート体制として、スライドガラス型マイクロアレイについては、用いるマイクロアレイ毎に若干の予備検討が必要ではあるものの、必要な全RNA量を減らしつつ実施することが可能であり、Genechipシステムについては安定的に実施可能な体制を整えることができた。今後、各班員と相談の上、各班員の研究を網羅的遺伝子発現解析の面からサポートしていく。

マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析とその内分泌かく乱候補化学物質による変動の解析においては、本年度はエストロゲン作用により初期に発現変動する遺伝子群を同定する目的で胎生16日から出生直後を検討し、雌雄で発現変動パターンが異なる遺伝子群を同定することに成功した。DESを胎生16日、17日、18日、母体に0.2 $\mu$ g/kg/day皮下投与し、結果として生じる新生児視床下部の遺伝子発現を検討した結果、DES投与に伴い、遺伝子発現は大きく変動するものの、雌雄差は大きく無いという結果が得られた。雌雄毎にDES影響の異なる遺伝

子を選択し、その発現期における発現パターンを調べた結果、雌で発現が上昇する遺伝子はもともと雄で上昇する遺伝子が多いこと、雄で発現が上昇する遺伝子にはもともと雄で上昇する遺伝子に加え、発現期における変動が少ない遺伝子が多いことが分かった。今後、検討する性分化期間を脳性分化臨界期間をカバーする範囲(胎生 14 日から出生後 10 日まで)まで延長し、性分化に伴う遺伝子発現変動を雌雄毎にさらに明らかにする。また、出生直後以外の時期における DES 影響も検討する。もともと感受性の高い時期を定めた後に、他の内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現変動を比較し、脳性分化に対する内分泌かく乱化学物質の影響を明らかとする。

#### E. 結論

本年度の研究により、cDNA マイクロアレイ解析技術を当班に導入し、班員の研究をサポートする体制を整えることに成功した。脳性分化発達に伴う網羅的な遺伝子発現変化の検討から、DES により性分化過程の初期の時期に発現変化する遺伝子群も判明し、低用量内分泌かく乱化学物質の脳神経系への影響を検討する基盤となりうる知見が得られたものと考えられる。

網羅的遺伝子発現解析技術は数万以上のマーカーを対象に内分泌かく乱化学物質の影響を、検討できる非常にパワフルな技術である。この技術はスクリーニングとして用いることも可能であるが、むしろ、そのメカニズムに立ち入って解析する際に本領をは発揮するものと期待される。本技術を各班員の研究に適用することで、低用量で変動する遺伝子を特定し、その遺伝子の機能解析を通じ、低用量影響を解析する基盤となる重要な知見が得られるものと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ueno M, Igarashi K, Kimura N, Okita K, Takizawa M, Nobuhisa I, Kojima T, Kitamura T, Samulowitz U, Vestweber D, Shimomura T, Suda T, Nakashima K, Taga T. Endomucin is expressed in embryonic dorsal aorta and is able to inhibit cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 287, 501-506 (2001)

##### 2. 学会発表

1. 上野 将也、五十嵐 勝秀、木村 直紀、沖田 圭介、滝沢 牧子、下村 泰三、高倉 伸幸、須田 年生、北村 俊雄、信久 幾夫、中島 欽一、田賀 哲也 造血幹細胞の起源であるマウス胎仔背側大動脈での endomucin の発現とその機能、大阪、2001(第 31 回日本免疫学会)

##### 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

表 1

## 実施可能となったcDNAマイクロアレイ実験

### (1) Genechipシステム

25merのオリゴDNAが高密度に配置されたGenechipを使用。

対象種

ヒト	60,000以上のヒト既知遺伝子とESTクラスター
ラット	24,000以上のラット既知遺伝子とESTクラスター
マウス	36,000以上のマウス既知遺伝子とESTクラスター
酵母	既知ORF6,400すべてに対応

1色比較

### (2) スライドガラス型市販cDNAマイクロアレイ

cDNAもしくはオリゴDNA断片をスポットしたスライドガラスを使用。

対象種

ヒト、ラット、マウス、酵母等。  
遺伝子種類は1000~4000遺伝子程度

2色比較が主

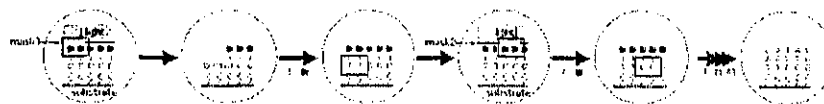
図 1 Genechip



特徴

- ・ 基盤上にオリゴDNAを合成
- ・ 1枚で10,000種の遺伝子を解析可能
- ・ 工場による製造を経、安定供給が可能

GeneChipプロセスの各工程



1. フォトリソグラフィックマスクを利用して、活性化させたい部位を精密的に光照射します。
2. 光照射した領域が活性化されます。
3. マクロチドとインキュベーションすると、活性化された部位においてのみ化学的なカップリング反応が起こります。
4. 次に、新規のマスクパターンを使用します。
5. 3と同様のカップリングステップが繰り返されます。
6. この過程を繰り返して目的とするプロトセットを完成します。