

- Maki A, Yamagata K, Zhao Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1209-1215, 2004.
- Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene*, 23, 6000-6005, 2004.
- © Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: In vivo potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells*, 9, 983-992, 2004.
- Kato S, Fujiki R, Kitagawa H.: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89-90, 173-178, 2004.
- Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K.: Function of androgen receptor in gene regulations. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89-90, 627-633, 2004.
- Meindl S, Rot A, Hoetzenecker W, Kato S, Cross S, Elbe-Burger A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *British J. Dermatology*, 2004 (in press).
- Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S.: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.*, 18, 1131-1143, 2004.
- Kahata K, Hayashi M, Asaka M, Hellman W, Kitagawa H, Yanagisawa J, Kato S, Imamura T, Miyazono K.: Regulation of transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes to Cells*, 9, 143-151, 2004.
- Aihara KI, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto., Kato S, Matsumoto T.: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J. Biol. Chem.*, 279, 35798-35802, 2004.
- Kawasumi M, Okada T, Yamada M, Miyamae-Kaneko M, Matsuoka M, Nakahara J, Tomita T, Iwatsubo T,

- Kato S, Aiso S, Nishimoto I, Kouyama K.: Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 2826-2838, 2004.
- Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, Kato S, Miyamoto K.: Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 287, F39-F47, 2004.
- Capuano P, Wagner CA, Radanovic T, Bacic D, Kato S, St-Arnaud R, Murer H, Biber J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1α -OHase deficient mice. *AJP/Cell*, 2004 (in press).
- Peters JM, Kato S, Gonzalez F.: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol. Carcinogenesis*, 41, 77-84, 2004.
- Uchida E, Kagawa N, Sasaki T, Urushino N, Sawada N, Kamakura M, Ohta M, Kato S, Inouye K.: Purification and characterization of mouse CYP27B1 overproduced by an *Escherichia coli* system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 505-511, 2004.
- Fan W, Yanase T, Wu Y, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol.*, 18, 127-141, 2004.

2. 学会発表

【国内】

平成16年度年度日本農芸化学会大会

エストロゲンレセプター特異的転写共役因子ノックアウトマウスの解析.

福田 亨、渡辺資之、関根圭輔、松本高広、中村 貴、田中佐依子、山本陽子、吉村公宏、椎名博子、宮本純子、加藤茂明.

組み換えヒストンタンパクを用いたクロマチンアッセイ系の構築.

佐々木康匡、藤木亮次、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明.

破骨細胞特異的性ステロイドホルモンレセプター遺伝子欠損マウス作出の試み.
中村 貴、渡辺資之、福田 亨、山本

陽子、松本高広、吉村公宏、宮本純子、椎名博子、田中佐依子、盛 真友、中道裕子、佐藤隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤茂明。

マウスY染色体ライブラリー作製および機能遺伝子群同定の試み。

秋本千央、池 郁生、盛 真友、松本高広、加藤茂明。

第22回骨代謝学会

破骨細胞は男性ホルモン標的細胞である：破骨細胞特異的アンドロゲンレセプターノックアウトマウスの作製と解析。

中村 貴、中道裕子、福田 亨、山本陽子、田中佐依子、加藤茂明。

第12回日本ステロイドホルモン学会

分子遺伝学的アプローチによるヒト性ステロイドホルモンレセプター新規転写制御因子の網羅的Screening系の構築。伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、城出裕子、鈴木絵里子、真木彰郎、Yue Zhao、山形 薫、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明。

新規エストロゲン受容体転写共役因子BRD4の機能解析。

目崎喜弘、神津 円、高田伊知郎、加藤茂明。

第27回日本分子生物学会

アンドロゲンレセプターを介したE2F-1/Rb転写制御機構の解析。

鈴木絵里子、武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、城出裕子、真木彰郎、山形 薫、

趙 越、Alexander Kouzmenko、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明。

分子遺伝学的アプローチによるヒト性ステロイドホルモンレセプター新規転写制御因子の網羅的Screening系の構築。伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、Alexandre Kouzmenko、城出裕子、鈴木絵里子、真木彰郎、Yue Zhao、山形 薫、相垣敏郎、多羽田哲也、加藤茂明。

ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体のクロストークを制御するユビキチンリガーゼ複合体の精製。

大竹史明、馬場敦史、三木ひろみ、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明。

脳の性差とその性分化を誘導するアンドロゲン受容体の機能。

松本高広、佐藤隆史、渡辺資之、中村貴、椎名博子、宮本純子、武山健一、加藤茂明。

アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である。

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛 真友、菅野 純、吉川裕之、加藤茂明。

Drosophila CBP involves in transcriptional repression in pericentric heterochromatin.

Zhao Y, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Sawatubashi S, Shirode Y, Maki A, Yamagata K, Kouzmenko A, Ishii S, Tabata T, Kato S.

Cross-talk *in vivo* between Wnt/b-catenin and estrogen signaling pathways.

Kouzmenko A, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S.

【国外】

Keystone Symposia

Co-regulator complexes for nuclear receptors and genetic analyses of AR function.

Kato S.

TRAP240, as a component of the mediator complex, represses transactivation function of androgen receptor.

Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Suzuki E, Maki A, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S.:

ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society

Classes of nuclear receptor coregulatory complexes.

Kato S.

UT Forum 2004 in Sweden

Transcriptional controls by nuclear receptors.

Kato S.

Azoospermic factor RBMY functions as a cofactor of ER α .

Sakari M, Kato S.:

ASBMR 26th Annual Meeting

Genetic evidence of androgen

receptor function in osteoclasts: generation and characterization of osteoclast-specific androgen Receptor knockout mice.

Nakamura T, Watanabe T, Nakamichi Y, Fukuda T, Matsumoto T, Yoshimura K, Miyamoto J, Yamamoto Y, Shiina H, Tanaka S, Sakari M, Sato T, Metzger D, Chambon P, Kato S.

Vitamin D Workshop Working Group

The Williams Syndrome and the Vitamin D Receptor.

Kato S.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
2. 実用新案登録
3. その他 (データベースなど)

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

核内レセプターを介した内分泌かく乱物質の生体影響

分担研究者 ISHWAR S. PARHAR 日本医科大学 第一生理学 講師

研究要旨

エストロゲン様化学物質は性成熟に必須であることが知られているが、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の発現調節における役割には不明な点が多い。本研究ではステロイド異生物性受容体(SXR)のうち、RXR および PXR をシクリッド科魚類より同定し、性成熟時の脳内 GnRH 産生ニューロンにおける遺伝子発現を解析した。PXR は GnRH1 と GnRH3 において発現が確認されたが、RXR はすべてのタイプにおいて発現が認められなかった。このことから、GnRH1 および GnRH3 を介する生殖腺の発達および性行動は、PXR を介して調節を受ける可能性があることが示された。

A. 研究目的

脊椎動物の生殖機能の開始および維持、調節の最終共通路である性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)産生ニューロンにおける核内受容体の局在は、生殖生理において核内受容体が重要な役割を担っていることを示唆するが、これまでは十分な証明が技術的に困難であった。本研究では単一細胞内遺伝子発現量を迅速に定量する手法を開発し、GnRH ニューロンにおけるステロイド異生物性受容体(SXR)の局在を解析した。

B. 研究方法

ティラピア肝臓由来 mRNA より PXR および RXR 遺伝子を同定した。免疫組織学的に同定した単一 GnRH ニューロンをマイクロマニピュレーターにより採取後、

RNA を抽出し、3 種類の GnRH ニューロンにおける PXR および RXR 遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。

C. 研究結果

PCR 法によりティラピアより PXR および RXR 遺伝子の部分配列を同定した。免疫組織学手に同定されたティラピア脳内の 3 種類の GnRH 産生ニューロン由来の RNA を用いた RT-PCR により、GnRH1 と GnRH3 ニューロンにおいて PXR の発現が確認された。一方、RXR の発現はいずれの GnRH タイプにおいても認められなかった。

D. 考察

本研究の結果から、GnRH1 と GnRH3 ニューロンによる精巣の発達や生殖行動の

調節は、PXR の影響を受ける可能性が示唆された。単一細胞レベルでの解析を行う本手法のアプローチは、GnRH ニューロンにおける様々な遺伝子発現プロファイリングを可能にした。大部分の脊椎動物は脳内に複数種の GnRH ニューロンが存在しているが、本手法は脊椎動物における各 GnRH タイプの分子生理学的基盤を理解するうえで非常に有効であると考えられる。

E. 結論

単一細胞内遺伝子発現解析手法により、非哺乳動物において初めてステロイド異生物性受容体 PXR が GnRH1 と GnRH3 ニューロンに局在し、生殖腺の発達および性行動の調節に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Parhar I.S., S. Ogawa and Y. Sakuma (2004) Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, 145: 3613-3618.

H. 知的所有権の取得状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

[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

本研究は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することを目指すものである。そのために、我々が開発した Percellome 手法を適用した Affymetrix 社の Genechip システムによる網羅的遺伝子発現解析による各班員の研究サポートを実施している。今年度実施したサポート研究は、笹野公伸班員とのヒト骨芽細胞株に対するエストロジェン、テストステロン、アロマターゼ阻害剤による遺伝子発現変動の解析である。また、今後必要性が増すことが予想される微量組織サンプルの網羅的遺伝子発現解析を可能とするために、T7 RNA polymerase による RNA 増幅を2回行う方法を検討し、定量性を維持しつつ安定してデータが得られるプロトコルを整備することに成功した。

A. 研究目的

本研究の目的は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することである。すなわち、

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、ホルモン活性物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試

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。このカスケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方法が開けてきた。そこで本研究では、当班へ DNA マイクロアレイ技術を導入し、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を目的とする。

B. 研究方法

各班員との協議の下、共同研究を行い、

組織もしくは細胞の検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析データ解析結果を班員にフィードバックすることで研究をサポートする。すなわち、各班員からの検体の RNA の分離精製

生体組織もしくは培養細胞を材料とする。生体組織の場合は、採取後すみやかに 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する。その後、RNA 抽出操作までは -80℃ にて保存する。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製し、破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。培養細胞の場合は、細胞に直接 RLT buffer を添加し、細胞破碎液を調製する。21G の注射針を通し、ゲノム DNA を裁断した後、破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。以降は生体組織の場合と同様である。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬まで、もしくは培養細胞 RLT 破碎液調製までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施した。

Genechip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、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 (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス)、Human Genome 133 2.0 (ヒト) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃ にて 18 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、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

微量組織サンプル解析

アフィメトリクス社のプロトコールに従い実施した。全 RNA (およそ 100ng) に対し、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 を得、2 本鎖とし、T7 RNA ポリメラーゼ (Ambion 社) を用いて cRNA を合成 (この段階ではビオチン化塩基は用いない) した (増幅 1 回目)。その cRNA を鋳型に random primer を用いて逆転写して cDNA を得、2 本鎖にし、T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP, UTP 共存下 cRNA を合成し、断片化した後、GeneChip へのハイブリに供した。

C. 研究結果

本年度は笹野班員とヒト骨芽細胞における内分泌攪乱化学物質の影響—マイク

ロアレイによる遺伝子発現の解析—を実施した。得られた結果は笹野班員と共同で解析中である。微量組織サンプルの網羅的遺伝子発現解析については、T7 RNA polymerase による RNA 増幅を2回行う方法を検討し、安定してデータが得られる環境を整備することに成功した。すなわち、

笹野班員の研究サポート

今年度は、笹野公伸班員とヒト骨芽細胞における内分泌攪乱化学物質の影響について、Percellome 手法を適用した Affymetrix 社の Genechip システムによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。具体的には、笹野班員より送られた細胞サンプルから、RNA 抽出を始めとする Genechip システム解析に必要な反応を行い、データを得、得られたデータを笹野班員と共同で解析した。以下でその状況について説明する。

共同研究概要：内分泌かく乱化学物質の骨格系に対する影響の解析を目的とする共同研究を開始した。内分泌かく乱化学物質の骨格系に対する影響は、げっ歯類、魚類などの実験動物で奇形という形で数多く報告されている。また、goldfish の骨芽細胞において、骨芽細胞マーカーのアルカリフォスファターゼ (ALP) が BPA によって減少することが明らかにされている。さらにマウス間葉系細胞 MC3T3-E1 を用いて、BPA、nonylphenol (NP)、bisphthalate (DEHP) の影響について、NP は濃度依存性 (10^{-9} - 10^{-4} M) に、BPA と DEHP は高濃度 (10^{-4} M) でその細胞増殖を抑制することが報告されている。このように近年になってようやく細胞単位での検索

が行われるようになったが、骨芽細胞における遺伝子レベルでの影響については今だ不明のままである。そこで共同研究ではヒト骨芽細胞のモデルとしてヒト骨芽細胞由来株の hFOB (ATCC, CRL-11372) を使用し、diethylstilbestrol, genistein, bisphenol A 等の種々の内分泌攪乱化学物質について細胞増殖刺激を指標とし、その影響を確認する。顕著な影響を示した物質について、その作用がどのような遺伝子に起因したものをマイクロアレイによって網羅的に解析する。さらに核内受容体のうち、Estrogen receptor, Androgen receptor に特に注目し、E2、5 α -DHT との遺伝子発現の比較、受容体拮抗剤、aromatase 阻害薬などを適用することによる変化をそれぞれ比較し、これら受容体を介した遺伝子発現変動を捉える。

今年度実施事項：今年度は、後半の E2、5 α -DHT、受容体拮抗剤、aromatase 阻害薬などを用いた解析を実施した。1) Vehicle、2) E2 (10nM)、3) DHT (10nM)、4) exemestane (100nM)、5) DHT+Flutamide (1 μ M)、6) exemestane+Flutamide (1 μ M) の 6 群を化合物添加後 12 時間の時点でサンプルを得、網羅的遺伝子発現解析を実施した。技術導入：微量組織サンプルの網羅的遺伝子発現解析

微量組織サンプルの網羅的遺伝子発現解析を実施可能とするために、T7 RNA polymerase による RNA 増幅を2回行う方法を検討した。微量組織サンプルの例として、マウス神経幹細胞凝集塊であるニューロスフェアを用い、1 個のニューロ

スフェアの網羅的遺伝子発現を解析可能か検討した。まず、1個のニューロスフェア中に含まれる細胞数を調べたところ、約700個の細胞からなることが判明した。また、1個のニューロスフェアから得られる total RNA 量を調べたところ、約140ngであった。よって、今回は1000個程度の細胞を含む、total RNA 量で100ng程度の微量組織からの網羅的遺伝子発現解析が可能かを検討する例として考察することとした。具体的にはアフィメトリクスが公開している T7 RNA ポリメラーゼによる2回増幅法を検討した。その方法では、RNA から cDNA を経て増幅した cRNA を鋳型に cDNA を合成し、再び cRNA 増幅を行う。ニューロスフェア3ヶを選び、各々から total RNA を抽出し、2回増幅法を試したところ、最終的に cRNA が40ug~60ug 得られた。GeneChip へのハイブリに15ugのcRNAが必要であることを踏まえるとこの収量は十分な量である。このcRNAをGeneChipにハイブリし、得たデータを解析すると、3ヶのニューロスフェアの網羅的遺伝子発現データは品質にも問題は無く、全体として類似した発現パターンを示した。よって、従来容易ではなかったと考えられていた微量サンプルの網羅的遺伝子発現解析が本研究でも十分に実施可能である状況となった。

D. 考察

今年度実施した技術導入検討により、微量サンプルの網羅的遺伝子発現解析も十分に実施可能となり、今後班員研究サポートを行っていく上で障害となる可能性のあったサンプル量の問題が解決され

たとえる。今年度実施した笹野班員との共同研究では、骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質影響に焦点を絞っているが、ほぼ全ての遺伝子の発現値を俯瞰して解析の進められる網羅的遺伝子発現の威力が発揮された。同様の研究に於いて、早期に研究の方向が定まり、研究の効率化が図られることが期待される。

E. 結論

網羅的遺伝子発現解析を用いることで、今後各班員の研究方向決定に影響を与える結果が短期間のうちに得られる可能性があることが確認された。

すなわち、網羅的遺伝子発現解析技術は、数万のマーカを対象に内分泌かく乱候補化学物質の影響を迅速に検討できる有効な技術である。本研究で示されてきているように、この技術は、はっきりした形で影響が現れることが少ない内分泌かく乱化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に本領を発揮するものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

◎ Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. J Steroid Biochem Mol Biol. (2004) 91 121-129.

◎ Nakamura Y, Igarashi K, Suzuki T,

Kanno J, Inoue T, Tazawa C, Saruta M, Ando T, Moriyama N, Furukawa T, Ono M, Moriya T, Ito K, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. E4F1: a novel estrogen responsive gene in possible athero-protection revealed by microarray analysis. Am. J. Pathol. (2004) 165 2019-2031.

2. 学会発表

◎Keystone Symposia: Nuclear Receptors: Steroid Sisters (J8)
Poster Number 176 Poster Session 1
February 29, 2004

Inappropriate activation of estrogen receptor *in utero* affects neural stem cell differentiation

Igarashi K, Kanno J

◎ Toxicogenomics International Forum 2004 Poster session

In utero DES (Diethylstilbestrol) exposure suppresses the expression of several estrogen responsive genes in embryonic neural stem cell revealed by DNA microarray analysis

Igarashi K, Takahashi Y and Kanno J

◎ 日本分子生物学会 2004 年会ポスターセッション

(2PB-195) 内分泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対する作用

五十嵐 勝秀, 高橋 芳樹, 菅野 純

◎ 日本分子生物学会2004年会ポスターセッション

(1PA-121) アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である

椎名博子, 佐藤隆史, 五十嵐勝秀, 松本

高広, 宮本純子, 高田伊知郎, 中村貴, 盛真友, 菅野純, 吉川裕之, 加藤茂明
日本分子生物学会2004年会ポスターセッション

(1PA-264) マウス胎児神経幹細胞の維持におけるDNA メチル化の役割

高橋芳樹, 五十嵐勝秀, 菅野純

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション

(2PA-457) 転写因子MesP1 およびMesP2 はマウス心筋細胞の分化に必須である

北嶋聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 井上達, 菅野純, 相賀裕美子

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション

(2PA-459) マウス心臓におけるNotch1 シグナリングの機能解析

渡辺裕介, 小久保博樹, 宮川一富田幸子, 五十嵐勝秀, 菅野純, 相賀裕美子

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション

(2PB-381) マウス肝臓におけるダイオキシン類による遺伝子発現変動解析

中津則之, 相崎健一, 小野敦, 五十嵐勝秀, 児玉幸夫, 菅野純

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション

(2PB-386) Percellome - 細胞1個あたりのRNA 発現量を測定する方法

相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 小野敦, 菅野純

H. 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

内分泌かく乱化学物質暴露によるモノアミン系発達に対する影響に関する研究

若手協力研究者 根岸隆之 青山学院大学理工学部 特別研究員 PD

研究要旨

内分泌かく乱化学物質のモノアミン系発達への影響の検証およびその障害機序を解明する目的で、モノアミン系の発達異常を評価しうる 1) *in vivo*（行動学的）および 2) *in vitro*（初代培養神経細胞）系の確立を目指した。その結果 1) ラットにおける周産期 Bisphenol A および Nonylphenol 暴露によるモノアミン系発達障害の可能性を行動学的に示した。2) またこのような影響を *in vitro* で検証しうる無血清培養液を用いた中脳および大脳皮質由来神経細胞初代培養系を確立した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質のモノアミン系発達への影響の検証およびその障害機序を解明する。

近年、環境からの外因性化学物質、特に内分泌かく乱化学物質の胎生期・授乳期暴露による神経系発達障害の可能性が指摘されている。しかし運動障害等明らかな行動障害が生じるわけではなく、未だその機序等は不明な点が多い。本研究ではこの仮説の検証を特にモノアミン系の発達に着目して行うことを目的とする。

B. 研究方法

モノアミン系の発達異常を評価しうる 1) *in vivo*（行動学的）および 2) *in vitro*（初代培養神経細胞）系の確立を目指した。

1) 周産期に Bisphenol A (BPA) および

Nonylphenol (NP) に暴露したラットを作成し、成熟個体にモノアミン系作動薬（Tranylcypromine, Methamphetamine, ドーパミン受容体(DR)1 アゴニスト、DR2 アゴニスト、セロトニン受容体(5-HT)1A アゴニスト、5-HT2 アゴニスト）を投与した。周産期暴露によりモノアミン系に構造的異常があるのであれば薬物誘発行動についてその感受性に変化が表れると考えられる。2) ラット胎仔中脳由来初代培養神経細胞を試みた。また同様に胎仔由来大脳皮質神経細胞の自発的神経活動に対するセロトニンの役割を検討した。

C. 研究結果

周産期 BPA および NP 暴露によりモノアミン系発達が障害されていることが行動学的に示され、また今後このような影響を検証しうる培養神経細胞を用いた *in*

*vitro*系を確立した。

1) 周産期に比較的 low 濃度 (0.1mg/kg/day) の BPA に暴露した個体は Tranylcypramine, Methamphetamine, DR1 アゴニスト, DR2 アゴニスト投与に対する反応性 (移動行動上昇) が有意に減退した。また NP 暴露も部分的ながらその傾向は見られた。一方、NP 暴露により Methamphetamine, DR1, DR2 アゴニストによって増加する立ち上がり行動が対照群に比し、有意に増加した。またセロトニン作動薬は周産期 BPA, NP 暴露に影響を受けなかった。

2) 胎仔中脳由来初代培養神経細胞は数%のドーパミン産生神経細胞を含んでいた。また無血清培養液で培養した胎仔大脳皮質神経細胞における自発的神経活動はセロトニンによって、その活動頻度が抑制された。この作用は少なくとも 5-HT1A を介した作用であると考えられた。

D. 考察

1) BPA を初めとするいくつかの化学物質は成体においては一般毒性が無いと考えられる比較的 low 濃度においても発達期暴露により非可逆的に神経系発達に影響を与える可能性が懸念されている。しかしながら、万が一ヒトにおいて影響があるとしてもその程度は軽いと考えられており広範囲の重度の神経障害とはそのメカニズムも一線を画すと考えられる。そこでその障害メカニズムとして我々はモノアミン系の発達障害の可能性を考えた。モノアミン系に着目した理由は、モノアミン (ドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリン) が成体において情動行動等

を制御する神経伝達物質でありこの系の変化は一般行動では顕在しにくく、ある特殊環境下 (ストレス等) でのみ発現する異常となり、現在懸念されている内分泌攪乱化学物質による行動発達異常と合致する点が多いからである。

今回行った実験により胎生期、授乳期における BPA, NP 暴露はたとえ比較的 low 濃度でもモノアミン系作動薬に対する反応性が変化しており、これはモノアミン系に構造的変化が生じていることを示唆する。本実験系においておこなったオープンフィールドテストで観察された一般行動は周産期化学物質暴露に影響を受けなかったが、電気刺激をもちいた学習試験では影響がみられた。この電気刺激という強いストレスに対する反応性の変化はモノアミン系の変化による可能性が高い。また、BPA と同様に弱いエストロゲン様化学物質として知られる NP もモノアミン系発達に影響を与えたが、その様式は明らかに BPA と異なる。このことはこの二つの化学物質暴露による影響メカニズムが異なること、つまり弱いエストロゲン様作用以外の作用の存在を示唆している。

またアゴニストを使った実験から合成系や代謝系ではなく受容体を介する直接的な反応性が減退している可能性が考えられた。しかしながら、単に受容体発現が変化している以外にもこの変化を説明しうる仮説は無数にある。そこで *in vitro* での限局した神経系発達およびそこに対する化学物質の影響を理解しやすい系の確立を試みた。今回確立した系のひとつの特徴は初代培養から血清成分を

極力排除し化学的に定義された培養液を用いたことである。初代培養に用いるウシ胎仔血清はホルモン、神経伝達物質をはじめとする多様な生理化学物質、さらに脂溶性化学物質を吸着しやすい多量のタンパク質を含むため、そこに外因性に化学物質を入れてもこれらの因子によるマスキング等が発生する可能性がある。血清の利用をさけることにより化学物質の影響をより正しく評価することが可能となる。今回確立した系は、ドーパミン系の起始核である黒質、VTA を含む中脳由来神経細胞で、本初代培養中に一定量のドーパミン産生神経細胞の存在を確認した。無血清培養液を用いるこの系に化学物質を暴露することによりドーパミン作動性神経細胞の発達に対する化学物質の影響を検討することが次の課題である。また、モノアミン系の投射先で、高次機能をつかさどる大脳皮質由来神経細胞にモノアミンを投与し、モノアミンによる大脳皮質神経細胞発達の制御を明らかにし、その発達に化学物質が影響を与えるかを検索することにより先の「モノアミンを作る細胞の発達」だけでなく「放出されたモノアミンにより制御される受け手側の発達」に対する影響も検討することが出来ると考えられる。

E. 結論

1) ラットでは、周産期 BPA および NP 暴露によりモノアミン系発達障害の可能性が行動学的に示された。2) またこのような影響を検証しうる *in vitro* 系を確立した。

今後は今回用いたモノアミン系攪乱試

験の妥当性を他の化学物質でも検討すると同時に、今まで個別で検討されてきた各種モノアミン系作動薬誘発行動の表現型をカタログ化する。また、今回確立した *in vitro* 系において化学物質の影響を検討し、内分泌攪乱化学物質暴露によるモノアミン系発達障害のメカニズムを追求する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ◎1) Negishi T, Kawasaki K, Sekiguchi S, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics induced by perinatal hypothyroidism in rats. *Behav Brain Res*. 2004 (*In press*).
- 2) Sekiguchi S, Takatori A, Negishi T, Kwon J, Kokubo T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Localization of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 in cynomolgus monkey placentas. *Placenta*. 2004 (*In press*).
- 3) Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Glutamate regulates the frequency of spontaneous synchronized Ca²⁺ spikes through group II metabotropic glutamate receptor in cultured mouse cortical networks. *Cell Mol Neurobiol*.

- 24(6):841-52, 2004.
- ◎4) Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Dopamine receptor 2 regulates L-type voltage-gated calcium channel in primary cultured mouse midbrain neural network. *Cell Mol Neurobiol.* 24(6):877-82, 2004.
- ◎5) Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypramine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect.* 112(11):1159-64, 2004.
- ◎6) Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Exp Anim.* 53(4):391-4, 2004.
- 7) Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Astroglial responses against Abeta initially occur in cerebral primary cortical cultures: species differences between rat and cynomolgus monkey. *Neurosci Res.* 49(3):339-46, 2004.
- ◎8) Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Endogenous dopamine maintains synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured-mouse midbrain neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 24(1):51-61, 2004.
2. 学会発表
- ◎1) Negishi T, Takasuga T, Kawasaki K, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Correlation between the concentration of serum polychlorinated biphenyls (PCBs) in pregnant cynomolgus monkeys and their offspring's behavioral scores in eye-contact test and finger maze learning test. *Dioxin2004*, Berlin, 2004
- ◎2) 根岸隆之、須崎真悟、高橋理貴、今村誠、川崎勝義、石井寿幸、久和茂、田代朋子、黒田洋一郎、吉川泰弘 周産期甲状腺機能攪乱による注意欠陥多動性障害様行動の惹起 *Neuro2004*、大阪、2004
- 3) 今村誠、根岸隆之、田代朋子 初代培養マウス中脳神経細胞におけるミトコンドリア機能阻害の影響 *Neuro2004*、大阪、2004
- ◎4) 根岸隆之、川崎勝義、前田春奈、石井寿幸、久和茂、田代朋子、黒田洋一郎、吉川泰弘 周産期ビスフェノール A およびノニルフェノール暴露による脳内ドーパミン系の発達異常 第7回環境ホルモン学会、名古屋、2004
- ◎5) 高橋理貴、根岸隆之、今村誠、近藤

恭光、田代英夫、鯉渕典之、田代
朋子 胎生期水酸化 PCB(4-OH-
2',3,3',4',5'-penta CB(5005)) 曝
露による発育脳の遺伝子発現変化
第7回環境ホルモン学会、名古屋、
2004

- 6) 中神明子、根岸隆之、高菅卓三、川崎
勝義、黒田洋一郎、小山高正、吉川泰
弘 カニクイザルにおける妊娠後
期母体 PCBs 汚染と次世代個体の行
動発達:予備的研究 第7回環境ホ
ルモン学会、名古屋、2004

H. 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. その他 (データベース等)

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	号: ページ	年
Adachi J, Mori Y, <u>Matsui S</u> , Matsuda T	Comparison of Gene Expression Patterns between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and a Natural Arylhydrocarbon Receptor Ligand, Indirubin.	Toxicol Sci	80:161-169	2004
<u>Aou S</u> , Hanazawa A, Nakagawa H	Behavioral and electrophysiological study on neural mechanisms underlying sensory recognition, emotional integration and behavioral expression: neurobiological basis of brain-inspired technology.			in press
Endo T, Abe S, Seidler HB, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, Kitagawa M, <u>Hirokawa K</u>	Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups.	Cancer Immunol Immunother	53:770-776	2004
Fujikawa S, Matsuura H, Kanai M, Fumino M, Ishii K, Arima K, Shiraishi T, <u>Sugimura Y</u>	The natural history of human prostate gland: morphometric and histopathological analysis of Japanese men.	Prostate	in press	2005
Fujimoto N, <u>Igarashi K</u> , <u>Kanno J</u> , Honda H, Inoue T	Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004 Jul;91(3):121-9.	J Steroid Biochem Mol Biol	91:121-129	2004
Fujimoto N, <u>Igarashi K</u> , Kanno J, Honda H, Inoue T	Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis.	J Steroid Biochem Mol Biol	91:121-129	2004
Fukamachi K, Han BS, Kim CK, Takasuka N, Matsuoka Y, Matsuda E, <u>Yamazaki T</u> , Tsuda H.	Possible enhancing effects of atrazine and nonylphenol on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats.	Cancer Science	95:404-410	2004
Fukatsu T, Hirokawa Y, Araki T, Hioki T, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Tsukino H, Qiu D, Katoh T, <u>Sugimura Y</u> , Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M	Genetic polymorphisms of hormone-related genes and prostate cancer risk in the Japanese population.	Anticancer Res	24:2431-2437	2004
<u>Fukushima S</u> , Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Nakae D, Kishida H, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F	Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine.	Toxicol Sci	80:109-114	2004
Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, <u>Inoue T</u>	Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses.	Toxicol Pathol	32 Suppl 2:12-16	2004
Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, <u>Inoue T</u>	Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses.	Toxicol Pathol	32 S2:12-16	2004
<u>Hirokawa K</u> , Utsuyama M	Search for factors determining early decline of thymic function.	Geriatr Gerontol Int.	4:S251-253	2004
Hoshi M, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, Okochi E, Ushijima T, Takaoka K, <u>Fukushima S</u>	No-Observed Effect Levels for Carcinogenicity and for in vivo Mutagenicity of a Genotoxic Carcinogen.	Toxicol Sci	81:273-279	2004

Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Ishii K, Onishi T, <u>Sugimura Y</u> , Hirano K	Zinc and metallothionein levels and expression of zinc transporters in androgen-independent subline of LNCaP cells.	J Androl	25:154-161	2004
<u>Inoue T</u> , Igarashi K, Sekizawa J	Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoint of their mechanism of action.	Japan Med Assoc J	46: 97-102	2003
<u>Inoue T</u>	Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health.	Pure Appl Chem	75: 2555-2561	2003
Ishii K, Otsuka T, Iguchi K, Usui S, Yamamoto H, <u>Sugimura Y</u> , Yoshikawa K, Hayward SW, Hirano K	Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn ²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion.	Cancer Lett	207:79-87	2004
Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, <u>Kanno J</u> , Inoue T, Saga Y	Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling.	Mech Dev	121:1443-1453	2004
Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, <u>Kato S</u>	In vivo potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation.	Genes to Cells	9:983-992	2004
Kawanishi M, Takamura-Enya T, Ermawati R, Shimohara C, Sakamoto M, Matsukawa K, Matsuda T, Murahashi T, <u>Matsui S</u> , Wakabayashi K, Watanabe T, Tashiro Y, Yagi T	Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka.	Toxicol Appl Pharmacol	197:238	2004
Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, <u>Kato S</u>	Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo.	J Biol Chem	279:40255-40258	2004
Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, <u>Iguchi T</u>	Estrogen-independent activation of ErbBs signaling and estrogen receptor α in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol.	Oncogene	23:340-349	2004
Miyagawa S, Suzuki A, Katsu Y, Kobayashi M, Goto M, Handa H, Watanabe H, <u>Iguchi T</u>	Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol.	J Mol Endocr	32:663-677	2004
Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, <u>Kato S</u>	Trans-repression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching.	EMBO J	23:1598-1608	2004
Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, <u>Kanno J</u>	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice.	Reprod Toxicol	18: 109-120	2004
Nakai D, Shimizu T, Nojiri H, Uchiyama S, Koike H, Takahashi M, <u>Hirokawa K</u> , Shirasawa T.	coq7/clk-1 regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q.	Aging Cell	3:273-281	2004
Nakamura Y, Igarashi K, Suzuki T, Kanno J, Inoue T, Tazawa C, Saruta M, Ando T, Moriyama N, Furukawa T, Ono M, Moriya T, Ito K, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H	E4F1: a Novel Estrogen Responsive Gene in Possible Athero-protection Revealed by Microarray Analysis.	Am J Pathol	165:2019-2031	2004
Nakamura Y, Miki Y, Suzuki T, Nakata T, Darnel AD, Moriya T, Tazawa C, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, <u>Sasano H</u>	Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta.	American Journal of Pathology	163:1329-1339	2003

Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y	Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranlycypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats.	Environ Health Perspect	112:1159-64	2004
Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Kuroda Y, Yoshikawa Y.	Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>), and chimpanzees (<i>Pan troglodytes</i>).	Exp Anim	53:391-394	2004
Okada A, Ohta Y, Brody SL, Watanabe H, Krust A, Chambon P, Iguchi T	Essential role of foxj1, but not of estrogen receptor alpha in ciliated epithelial cell differentiation of the neonatal oviduct.	J Mol Endocr	32:615-625	2004
Okada Y, Ito Y, Aida J, Yasuhara M, Ohkawa S, Hirokawa K	Lewy bodies in the sinoatrial ganglion: clinicopathological studies.	Pathol Int	54:682-687	2004
Omura M, Shimasaki Y, Oshima Y, Nakayama K, Kubo K, Aou S, Ogata R, Hirata M, Inoue N	Distribution of tributyltin, dibutyltin and monobutyltin in the liver, brain, gut and neonate of rats - evaluation in two-generation toxicity study of tributyltin chloride.	Environ Sci	11:123-132	2004
Parhar I.S., S. Ogawa and Y. Sakuma	Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish.	Endocrinology	145:3613-3618	2004
Sato T, Matsumoto T, Kawano H, Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, Fukuda T, Aihara K, Krust A, Yamada T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Nakamura T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Metzger, D, Chambon P, Kato S	Brain masculinization requires androgen receptor function.	Proc Natl Acad Sci USA	101:1673-1678	2004
Seidler HB, Utsuyama M, Nagaoka S, Takemura T, Kitagawa M, Hirokawa K	Expression level of Wnt signaling components possibly influences the biological behavior of colorectal cancer in different age groups.	Exp Mol Pathol	76:224-244	2004
Sekizawa J, Tanabe S	A comparison between integrated risk assessment and classical health/environmental risk assessment: emerging beneficial properties	Toxicol Appl Pharmacol	197: 144	2004
Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T	Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo.	Biochem Biophys Res Commun	318:571-578	2004
Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, Hirokawa K	Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells.	Biochem Biophys Res Commun	314:1021-1027	2004
Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H	Estrogen-related receptor {alpha} in human breast carcinoma as a potent prognostic factor.	Cancer Research	64:4670-4676	2004
Suzuki T, Nakata T, Miki Y, Kaneko C, Moriya T, Ishida T, Akinaga S, Hirakawa H, Kimura M, Sasano H	Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma.	Cancer Research	63:2762-2770	2003
Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Yamamoto A, Suzuki E, Maki A, Yamagata K, Zhao Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S	A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor.	Biosci Biotechnol Biochem	68:1209-1215	2004