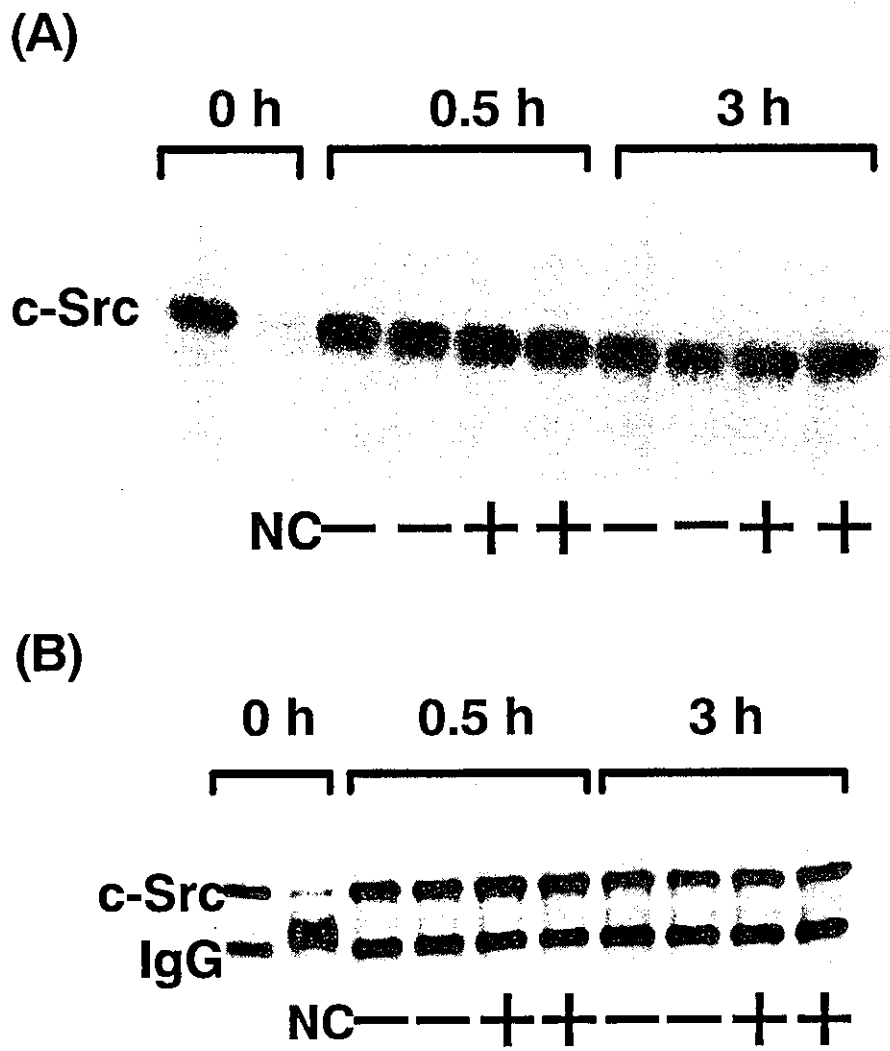


Figure 2



☒ 3

コプラナーPCBとTCDDの毒性発現機構の比較解析(3)

分担研究者 前田秀一郎  
山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授

研究要旨

PCBの毒性をTCDD類似毒性と非TCDD毒性に分類するための評価法を確立することを目的に、先ず以下のように、TCDDの毒性発現機構を解析した。体重当り5 µg/kgのTCDDへの周産期曝露が胎仔脳における遺伝子発現をどう変化させるかを、DNAマイクロアレイ法で網羅的に解析して見出した、発現量が増加、あるいは減少する遺伝子群につき、昨年度に引き続き解析を進めた。この結果、2種類のケモカイン遺伝子の発現量が増加することを明らかにした。今後、コプラナーPCBへの同様の曝露により、これらTCDDへの曝露で発現量が変化する遺伝子群の発現がどう変化するかをReal-time RT-PCR法で解析し、PCBの胎仔脳における遺伝子発現への影響を、TCDDに類似したものと類似しないものに分類する。

A. 研究目的

PCBの毒性を2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) 類似毒性と非TCDD毒性に分類するための評価法を確立することを目的に、先ずTCDDの毒性発現機構の解析を進めることにした。TCDDは、発癌性、免疫毒性、生殖毒性など人体に種々の毒性をもつことが懸念されている(Tohyama, 2002)。また、疫学的にヒトの脳の発達や高次機能に影響することが示唆されており(Vreugdenhil, et al., 2002)、げっ歯類においては、脳神経系に種々の生化学的変化を惹起することが確かめられている(Cheng, et al., 2002, Haavisto, et al., 2001, Hays, et al., 2002, Ikeda, et al., 2002, Kakeyama, et al., 2001, Pitt, et al., 2000, Unkila, et al., 1995)。さらに、妊娠ラットへの投与が胎仔脳の形態や成長後の行動に影響することが報告されている(Hojo, et al., 2002, Zareba, et al., 2002)。しかし、このような脳神経毒性が惹起される分子機構は未だ明らかでない(Kakeyama and Tohyama, 2003, Petersen, et al., 2000)。そこで先ず、体重当り5 µg/kgのTCDDへの周産期曝露が胎仔脳における遺伝子発現をどう変化させるかを、DNAマイクロア

レイ法で網羅的に解析し、発現量が変化する遺伝子群につき解析を進め、次にコ

プラナーPCBへの同様の曝露により、これらTCDDへの曝露で発現量が変化する遺伝子群の発現がどう変化するかをReal-time RT-PCR法で解析し、PCBの胎仔脳における遺伝子発現への影響を、TCDDに類似したものと類似しないものに分類する。

本年度は、体重当り5 µg/kgのTCDDへの周産期曝露が胎仔脳における遺伝子発現をどう変化させるかを、昨年度に引き続き、DNAマイクロアレイ法で網羅的に解析し、発現量が増加、あるいは減少する遺伝子群につき、解析を進めた。

B. 研究方法

1 TCDD

実験動物には、Cambridge Isotope Laboratoriesから購入したTCDD(50 µg/ml、ノナン溶液)を、TCDDの含量が0.5 µg/mlとなるようにコーン油に溶解させ、マウス用胃ゾンデで強制経口投与した。対照群にはコーン油を同様に投与した。

2 実験動物および飼育条件

C57BL/6Nマウスは日本クレア株式会社から購入した。マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て行った。

### 3 実験計画

体重当り 0 µg/kg または 5 µg/kg の TCDD を、妊娠 12.5 日目の 6 匹の C57BL/6N マウスに投与し、6 日後、これらマウスの雌雄の胎仔、それぞれ 1 匹ずつ、計 12 匹の脳 RNA の量や種類を、6 匹の対照非投与妊娠マウスの雌雄の胎仔、それぞれ 1 匹ずつ、計 12 匹の脳 RNA と DNA マイクロアレイ (CodeLink; Amersham 社) で比較解析した。各胎仔の雌雄の判定は、各胎仔の体の一部から DNA を抽出し、Y 染色体上の Sry 遺伝子を PCR 法で確認することにより行った。解析には、子宮内で異性に挟まれた位置にない胎仔を用い、各サンプルあたり 2 枚のマイクロアレイを用いて解析した。なお、マイクロアレイ解析は、エコジェノミクス株式会社と共同で行った。次に、マイクロアレイ解析で発現量に差異を認めた遺伝子については、Real-time RT-PCR 法で差異を再検討した。さらに、差異を確認した遺伝子について、脳切片を用いて、組織レベルでの発現部位、及び発現量を In situ hybridization 法により解析した。

### 4 分析方法

#### 4.1 DNA マイクロアレイ

CodeLink DNA マイクロアレイ (1 枚あたり、約 1 万種の異なる cDNA に相当する 30 塩基長のオリゴヌクレオチドを結合させたもの (Amersham 社製) を、各サンプルあたり 2 枚用いて解析した。

#### 4.2 In situ hybridization

雄雌共に増加が認められた遺伝子ケモカイン $\alpha$ について in situ hybridization で脳内の mRNA の局在と TCDD 曝露による量の変化を調べた。

cRNA プロブは、 $[^{35}\text{S}]$  UTP でラベルしたものを作製した。胎仔の脳を採取し、ドライアイスパウダー上で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。20 µm の切片をクライオスタットで作製し、固定は 4% パラホルムアルデヒドで 15 分間行った。これを proteinase K (2 µg/ml) で 30 分間、 $37^{\circ}\text{C}$  で処理し、アセチル化、脱水を行った後、 $55^{\circ}\text{C}$  で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、切片を RNase A で 30 分処理し、 $0.1\times\text{SSC}$

で  $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間洗浄した。シグナルの検出は、X 線フィルムに 10 日間曝露させて行った。

### C. 結果

#### 1 DNA マイクロアレイ解析

TCDD 投与により雄雌共に発現量が増加した遺伝子を 7 種、減少した遺伝子を 1 種見出した。また、雄のみで増加した遺伝子を 27 種類、減少した遺伝子を 39 種類、雌のみで増加した遺伝子を 64 種類、減少した遺伝子を 10 種類見出した (1.5 倍以上の増加、または 0.6 倍以下の減少を、変化が見られたものとした。なお、2.0 倍以上の増加、または 0.5 倍以下の減少を、変化が見られたものとした場合には、TCDD 投与により、雌雄共に発現量が増加、または減少する遺伝子は無く、雄のみで発現量が増加した遺伝子を 2 種類、減少した遺伝子を 19 種類、また、雌のみで発現量が増加した遺伝子を 19 種類、減少した遺伝子を 2 種類認めた。)

#### 2 Real-time RT-PCR 法による解析

DNA マイクロアレイ解析によって、変化が認められた遺伝子のいくつかについて Real-time RT-PCR 法で変化を検討した。内部コントロールには、Cyclophilin 遺伝子を用いた。このうち、CYP1B1 遺伝子と 2 種類のケモカイン遺伝子については、DNA マイクロアレイの結果と同様の結果が得られた (図 1)。ケモカイン遺伝子群は、炎症時の白血球の遊走に参与する (Sallusto, et al., 2000) が、最近、脳神経系の形成に参与していることが報告されている (Cartier, et al., 2005, Tran and Miller, 2003)。そこで、他のケモカイン遺伝子についても、Real-time RT-PCR 法で調べた結果、変化が認められないものや、発現量が TCDD 投与群で、減少しているものが認められた。現在、DNA マイクロアレイの結果、変化が認められた他の遺伝子についても Real-time RT-PCR 法で変化を確認中である。

#### 3 In situ hybridization

雄雌共に発現量の増加が認められたケモカイン $\alpha$ 遺伝子について、TCDD 曝露群及び非曝露群、各 5 匹ずつの胎仔脳を

in situ hybridization 法で調べた結果、非投与群ではかすかなシグナルしか検出できないが、TCDD 投与群では、脳室周囲、及び脳表面周囲に、より強いはっきりしたシグナルが認められ、組織レベルでも mRNA 量の増加を確認した。

#### D. 考察

本研究では、PCB の毒性発現機構を TCDD 類似毒性と非 TCDD 毒性に分類する評価法を確立することを目的に、先ず TCDD への周産期曝露が胎仔脳における遺伝子発現をどう変化させるかを、DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析し、2 種類のケモカイン遺伝子の発現量が増加することを明らかにした。

ケモカイン遺伝子群は、主に炎症時の白血球の遊走に関与している(Sallusto, et al., 2000)が、最近、ノックアウトマウスを用いた研究により、ケモカイン遺伝子群のうちの一つが、海馬歯状回の形成に必須であることが報告され(Lu, et al., 2002)、脳神経系の形成にも関与していることが示唆されている(Cartier, et al., 2005, Tran and Miller, 2003)。これらケモカイン遺伝子群のうち、2 種類の発現量が TCDD 投与により雌雄ともに増加していた。この結果は、胎仔期における TCDD への曝露が、ケモカインを介して脳神経毒性を惹起する可能性を示唆する。今後、この変化を経時的、あるいは曝露量を変化させて調べ、TCDD による変化の詳細を明確にする。そしてこの変化を、コプラナー PCB 曝露による変化と比較し、その差異を明らかにすることによって、コプラナー PCB の胎仔脳におけるケモカイン遺伝子発現への影響を、TCDD に類似したものと類似しないものに分類することを目指す。

#### E. 結論

本研究では、PCB の毒性発現機構を TCDD 類似毒性と非 TCDD 毒性に分類する評価法を確立することを目的に、先ず TCDD への周産期曝露が胎仔脳における遺伝子発現をどう変化させるかを、DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析し、2 種類のケモカイン遺伝子の発現量が増加することを、明らかにした。この結果は、

胎仔期における TCDD への曝露が、ケモカインを介して脳神経毒性を惹起する可能性を示唆する。

#### F. 参考文献

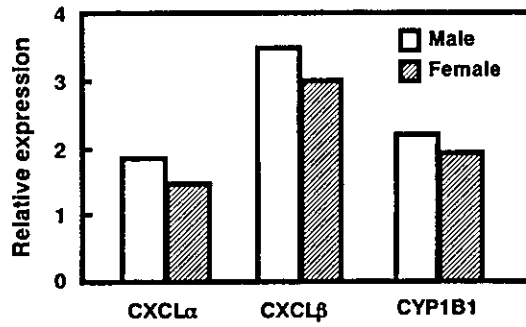
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 48:16-42
- Cheng SB, Kuchiiwa S, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, et al. (2002) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment induces c-Fos expression in the forebrain of the Long-Evans rat. *Brain Res* 931:176-80
- Haavisto T, Nurmela K, Pohjanvirta R, Huuskonen H, El-Gehani F, Paranko J. (2001) Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol Cell Endocrinol* 178:169-79
- Hays LE, Carpenter CD, Petersen SL. (2002) Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. *Environ Health Perspect* 110:369-76
- Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, Kost JT, Weiss B. (2002) Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect* 110:247-54
- Ikeda M, Inukai N, Mitsui T, Sone H, Yonemoto J, Tohyama C, et al. (2002) Changes in fetal brain aromatase activity following in utero 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 11:1-7

- Takeyama M, Sone H, Tohyama C. (2001) Changes in expression of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. *Neuroreport* 12:4009-12
- Takeyama M, Tohyama C. (2003) Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Industrial Health* 41:215-30
- Lu M, Grove EA, Miller RJ. (2002) Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7090-5.
- Petersen SL, Curran MA, Marconi SA, Carpenter CD, Lubbers LS, McAbee MD. (2000) Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J Comp Neurol* 427:428-39
- Pitt JA, Buckalew AR, House DE, Abbott BD. (2000) Adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion by perfused pituitary and adrenal glands from rodents exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology* 151:25-35
- Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 18:593-620.
- Tohyama C. (2002) Low-dose exposure to dioxin, its toxicities and health risk assessment. *Environ Sci* 9:37-50
- Tran PB, Miller RJ. (2003) Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci*. 4:444-55
- Unkila M, Pohjanvirta R, Tuomisto J. (1995) Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol* 27:443-55
- Vreugdenhil HJI, Slijper FME, Mulder PGH, Weisglas-Kuperus N. (2002) Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environ Health Perspect* 110: A593-8
- Zareba G, Hojo R, Zareba KM, Watanabe C, Markowski VP, Baggs RB, et al. (2002) Sexually dimorphic alterations of brain cortical dominance in rats prenatally exposed to TCDD. *J Appl Toxicol* 22:129-37
- G. 健康危険情報  
特に無し
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
特に無し
  2. 実用新案取得  
特に無し
  3. その他  
特に無し
- I. 図とその説明
- 図 1 Real-time RT-PCR 法によるサイトカインおよび CYP1B1 の解析。TCDD 曝露及び非曝露、雌雄各 6 匹の胎仔全脳から得られた RNA を用い、非曝露群の mRNA 量を 1 とした時の、曝露群の相対的な mRNA 量を示した。  
CXCLa : ケモカインの 1 種  
CXCLB : ケモカインの 1 種  
CYP1B1 : シトクローム P450 1B1
- 図 2. In situ hybridization 法による解析

C57Bl/6N マウスの妊娠 12.5 日目に  
TCDD を投与し、妊娠 18.5 日目の胎仔の  
脳におけるケモカイン (CXCL $\alpha$ ) mRNA  
の発現を【35S】UTP 標識 cRNA プロ  
ブを用いて行った In situ hybridization  
の結果。

A: 対照、 B: TCDD 曝露

図 1 Real-time RT-PCR 法による解析



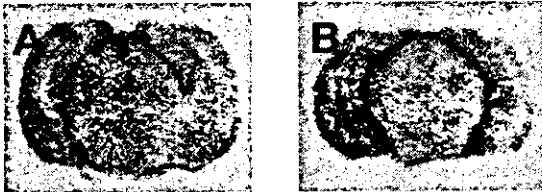
TCDD 曝露及び非曝露、雌雄各 6 匹の胎仔全脳から得られた RNA を用い、非曝露群の mRNA 量を 1 とした時の、曝露群の相対的な mRNA 量を示した。

CXCL $\alpha$  : ケモカインの 1 種

CXCL $\alpha$  : ケモカインの 1 種

CYP1B1 : シトクローム P450 1B1

図 2. *In situ* hybridization 法による解析





ヒト型AhRノックインマウスの作成とこれを用いた TCDD 毒性の解析

分担研究者 山本雅之  
筑波大学・基礎医学系 教授

研究要旨

ダイオキシン類に対する感受性とその生体に対する影響は、動物種により著しく異なることが知られている。ヒトにおける感受性と影響のモニタリングを可能にする動物モデルを作製する目的で、マウスダイオキシン受容体の代わりに、ヒトダイオキシン受容体を有する、ヒトダイオキシン受容体 (hAHR) ノックインマウスを作製し、その薬剤に対する反応性を調べた。3-メチルコラントレンに対する反応は、hAHR ノックインマウスもコントロールマウスも同程度であったが、TCDD に対する反応は前者の方が弱いという結果であった。この結果は、ダイオキシン受容体のリガンドによる反応の特異性が、種により異なること、そして、hAHR ノックインマウスがヒトの反応の特異性を再現できる有用なモニター動物として利用可能であることを示唆するものである。

A. 研究目的

ダイオキシン類を始めとする芳香族炭化水素は、体内に摂取されると、生体に対して様々な悪影響をもたらす。こうした症状は、動物種により多様であり、また、感受性も種により大きく異なっている。これら化学物質の環境基準・食品基準を設定する上で、ヒトの反応性をなるべく正確に推測することは非常に重要である。しかしながら、ヒトに対する影響を系統的に調べることは、倫理上不可能である。そこで、ヒトに対するこれら化学物質の毒性を適切に評価することのできるモデル動物は非常に有用であると考えられる。これまで報告された AhR 遺伝子破壊マウスを用いた実験から、芳香族炭化水素により引き起こされる多くの生体反応は、ダイオキシン受容体 (AhR) を介していることが明らかにされている。我々は、AhR 分子の特性が、それぞれの動物種ごとの特徴的な反応を規定すると考え、ヒトに対する影響とその感受性をモニターリングするための動物モデルを作製する目的で、マウス AhR 分子の代わりに、ヒト AhR 分子を有するヒト AhR (hAhR) ノックインマウスを作製した。

B. 研究方法

1) hAhR ノックインマウスの作製マウス AhR 遺伝子座に、hAhR cDNA を挿入することにより、マウス AhR 遺伝子を破壊すると同時に、マウス AhR 遺伝子のプロモーターの制御下で hAhR cDNA が転写されるように、ターゲティングベクターをデザインした。得られたマウスは、野生型 C57BL6 マウスへ戻し交配し、コンジェニック化を図った。hAhR を持つ C57BL6 マウスを樹立した。

2) AhR リガンドに対する薬剤代謝酵素群の誘導反応 *in vitro* で計測された TCDD との親和性は、C57BL6 の AhR (AhR<sup>b1</sup>) で高く、DBA/2 の AhR (AhR<sup>d</sup>) で低く、後者の親和性は hAHR のそれと同程度である。hAhR, AhR<sup>b1</sup>, AhR<sup>d</sup> それぞれの AhR 分子が指令する生体反応を、同一の遺伝的背景において比較するために、C57BL6 に純系化された hAhR ノックインマウス (hAhR マウス)、野生型 C57BL6 マウス (AhR<sup>b1</sup> マウス)、C57BL6 の遺伝的背景に AhR<sup>d</sup> を有するコンジェニックマウス (AhR<sup>d</sup> マウス) の 3 系統を比較した。まず、AhR リガンドに対する薬剤代謝酵素群の誘導反応を調べた。3-メチ

ルコラントレン (3-MC) と 2,3,7,8-TCDD 投与に対する、肝臓での CYP1A1, CYP1A2 の発現誘導を RNA プロット解析により調べた。

3) TCDD に対する催奇形性の検討次に TCDD に対する催奇形性を調べるために、胎齢 12.5 日の時点で母体に TCDD を投与し、胎齢 18.5 日で胎児を解析した。口蓋裂の発生頻度と水腎症の発生頻度と重症度を形態学的に調べた。

### C. 研究結果

hAhR マウスは、生存可能で、生殖能も正常であった。3-MC 投与による肝臓での CYP1A1 あるいは CYP1A2 の誘導の強度は、AhR<sup>b-1</sup> マウス >> AhR<sup>d</sup> マウス = hAhR マウスという順番であり、hAhR マウスと AhR<sup>d</sup> マウスの反応性はほぼ等しかった。一方、TCDD 投与による誘導の強度は、AhR<sup>b-1</sup> マウス > AhR<sup>d</sup> マウス > hAhR マウスであり、hAhR マウスは、3-MC に比べて TCDD に反応しにくいということが明らかになった。TCDD に対する催奇形性も、この結果と一致する傾向が得られた。口蓋裂は、AhR<sup>b-1</sup> マウスで 100%、AhR<sup>d</sup> マウスで 30%、hAhR マウスで 0% という発生率であった (Table 1)。水腎症の発生率は、いずれの系統においても 8 割前後であったが、重症度は AhR<sup>b-1</sup> マウス > AhR<sup>d</sup> マウス > hAhR マウスという傾向が認められた。

### D. 考察

in vitro で測定された TCDD に対する親和性は、AhR<sup>d</sup> も hAhR もほぼ等しいにもかかわらず、AhR<sup>d</sup> マウスと hAhR マウスの TCDD に対する反応性が異なっていたという点が、面白い点である。3-MC に対する反応が同程度であることを鑑みれば、AhR<sup>d</sup> と hAhR とでは、相対的な基質特異性が異なっているといえる。つまり、hAhR マウスの反応性は、ヒトの反応性の特徴を模倣していることが示唆される。hAhR マウスに対して、様々な芳香族炭化水素類を曝露して、個体に及ぼす影響とその感受性を明らかにしていくことは、これら化学物質の毒性の適切な評価を行う上で、非常に有用な情報を提供するものと期待される。

このメカニズムとしては、hAhR と AhR<sup>d</sup>

とのアミノ酸配列の違いによる分子の構造的な差異 (特に、カルボキシル末端側の保存性が低い) に基づく共役因子との相互作用の違いが有力であると推測している。

### E. 結論

ヒトの特徴的な反応性を推測するためのモデル動物として、hAhR ノックインマウスを作製し、3-MC と TCDD に対する反応性を調べたところ、後者に対する反応が弱いことが明らかになった。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 参考論文

Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Heideman, W. & Peterson, R.E. Transactivation activity of human, zebrafish, and rainbow trout aryl hydrocarbon receptors expressed in COS-7 cells: greater insight into species differences in toxic potency of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners. (1999) *Toxicol Appl Pharmacol.* 159, 41-51.

Birnbaum, L. S., Harris, M. W., Barnhart, E. R & Morrissey, R. E. (1987) Teratogenicity of 3 polychlorinated dibenzofurans in c57bl/6n mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 90, 206-216.

Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S. & Fujii-Kuriyama, Y. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27337-27343.

Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 184, 246-253.

Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S. T., Kimura, S., Nebert, D. W., Rudikoff, S., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme. (1995) *Science*

268, 722-726.

Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. & Monk, M. (1987) Hprt-deficient (lesch-nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured-cells *Nature*. 326, 292-295.

Kohkalainen, M., Tuomisto, J. & Pohjanvirta, R. The AH receptor of the most dioxin-sensitive species, guinea pig, is highly homologous to the human AH receptor. (2001) *Biochem Biophys Res Commun*. 285, 1121-1129.

Micka, J., Milatovich, A., Menon, A., Grabowski, G. A., Puga, A. & Nebert, D. W. The AH receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD: segregation of the resistant alleles to different rat lines. (1997) *Pharmacogenetics* 7, 95-101.

Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells. Genes Cell*. 2, 645-654.

Moriguchi, T., Sakurai, T., Takahashi, S., Goto, K. & Yamamoto, M. The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. (2002) *J. Biol. Chem*. 277, 16985-16992.

Okey, A. B., Riddick, D. & Harper, P. A. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. (1994) *Toxicol. Lett*. 70, 1-22.

Okey, A. B., Vella, L. M. & Harper, P. A. Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. (1989) *Mol. Pharmacol*. 35, 823-830.

Poland, A. & Glover, E. Characterization and strain distribution pattern of the murine Ah receptor specified by the Ahd and Ahb-3

alleles. (1990) *Mol. Pharmacol*. 38, 306-312.

Poland, A., Palen, D. & Glover, E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. (1994) *Mol. Pharmacol*. 46, 915-921.

Rowlands, J. & Gustafsson, J. A. (1997) Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction *CRC Crit. Rev. Toxicol*. 27, 109-134.

Swanson, H. J. & Bradfield, C. A. The AH-receptor: genetics, structure and function.

(1993) *Pharmacogenetics* 3, 213-230.

Tuomisto, J. T., Viluksela, M., Pohjanvirta, R. & Tuomisto, J. The AH receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD: segregation of the resistant alleles to different rat lines. (1999) *Toxicol Appl Pharmacol* 155, 71-81.

Yasuda, M., Igarashi, E., Datu, A.R. & Igawa, H. (1986) Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (tcdd) in JCL-ICR mice. *Teratology* 34, 454-455.

## H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
特になし
- 2.実用新案登録  
特になし
- 3.その他  
特になし

ダイオキシン/PCBの毒性に関わる遺伝子の網羅的解析法の確立と応用

分担研究者 宮本 薫  
福井医科大学 教授

研究要旨

コプラナーPCB の非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の設定を行うため、基礎的検討としてラット胎盤におけるダイオキシンによる遺伝子発現の変化を、DNA マイクロアレイおよびサブトラクションクローニングを組み合わせたことにより解析した。

A. 研究目的

コプラナーPCB の非ダイオキシン毒性の識別によるダイオキシン耐容摂取量の設定を行うためには、まずダイオキシン毒性の詳細を明らかにしておく事が必須である。ダイオキシン毒性のエンドポイントとして、TCDD 投与のラット胎盤における遺伝子発現の変化を明らかにし、コプラナーPCB の非ダイオキシン毒性での遺伝子発現変化と比較することで、ダイオキシン耐容摂取量の設定の一助とすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

独立行政法人国立環境研究所の遠山らとの共同研究により、ホルツマン系雌ラット妊娠 15 日目に TCDD 1600 ng/kg を投与し、妊娠 20 日目の胎盤から mRNA を抽出した。コントロールとしてホルツマン系妊娠ラット 18 日目の胎盤からも mRNA を抽出し以下の実験に用いた。コントロールおよび TCDD 投与ラット胎盤から抽出した mRNA を cDNA に変換したのちサブトラクションクローニングを行い、TCDD 誘導性および抑制性遺伝子群をピックアップした。また、サブトラクションクローニングにより作製した cDNA を蛍光色素 Cy3、Cy5 で標識したものをプローブとして用い、市販の cDNA マイクロアレイとハイブリザイズさせることで、高感度のマイクロアレイスクリーニングシステムを開発した。

C. 研究結果

妊娠 15 日目に TCDD 1600ng/kg を投与したホルツマン系雌ラットでは、胎児の約 1 割に死亡例が観察されたことから、胎盤に対して何らかの影響が生じていることが推測された。そこで、TCDD 投与ラットの胎盤を妊娠 20 日目に採取し、mRNA を抽出して、ダイオキシン投与による遺伝子発現の変化を解析した。コントロールとして妊娠 20 日目のラットからも胎盤を採取し、同様に mRNA を抽出した後 cDNA に変換した。TCDD 誘導性および抑制性の遺伝子群をピックアップするため、TCDD 投与とコントロールの cDNA 同士の差し引きを行い、サブトラクション cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーから誘導性および抑制性遺伝子クローンをそれぞれ単離し、塩基配列を解析することで同定を行った。また、このサブトラクション cDNA ライブラリーをマイクロアレイのプローブとして用いることで誘導性および抑制性遺伝子クローンの網羅的解析を行った。

図 1 から明らかなように、サブトラクション cDNA ライブラリーをプローブとして用いると、マイクロアレイでの発現変化が強調されるため、TCDD 誘導性および抑制性遺伝子群の同定が容易となる。その結果、TCDD 誘導性候補遺伝子として約 50 種類、抑制性候補遺伝子として約 10 種類の遺伝子を同定した。これらの中には、グルコーストランスporterやアポリポプロテイン、トランスフェリンな

どが含まれ、グルコース代謝や脂質、鉄分の輸送など幅広い範囲でダイオキシンの影響が生じていることが確認された。

#### D. 考察

私どもは、ダイオキシンなどの投与による遺伝子発現の変化をサブトラクションクローニングと呼ばれる方法で解析している。本研究においてもラット胎盤で誘導もしくは抑制される遺伝子群を多数同定した。この方法の特色は、比較的発現量の少ない遺伝子群でも同定することが可能である点と、未知の遺伝子群をピックアップできる点である。本研究でも数種類の未知遺伝子が同定され、現在それらについての解析を行っている。一方、サブトラクションクローニング用に作製した cDNA ライブラリーは、市販のマイクロアレイの高感度のスクリーニングに応用できることが明らかとなった。マイクロアレイの欠陥として比較的発現量の多い遺伝子しか検出できない点が指摘されているが、私どもが作製した cDNA をプローブとして用いることでこの欠陥を補うことができることが示された。特にグルコーストランスポーター2 は胎盤では発現量が低く、本法の応用で始めて明らかにされた知見である。

#### E. 結論

サブトラクションクローニング法と DNA マイクロアレイを併用することにより、妊娠ラットの胎盤での遺伝子発現に及ぼすダイオキシンの影響を網羅的に明らかにすることができた。本研究では DNA マイクロアレイのプローブにサブトラクションライブラリーを用いることによって、従来の方法では検出感度以下と考えられるクローンも単離できることが明らかとなり、マイクロアレイの応用範囲が大きく広がった。本研究により、ダイオキシン誘導性及び抑制性の新規遺伝子も単離することに成功した。

#### F. 参考文献

Miyamoto, K.: Comprehensive analysis of

genes in reproductive organs affected by low concentrations of endocrine disruptors. 5th Scientific Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies "Endocrine disruptors symposium". 2002,9, Malaysia

宮本薫：低濃度ダイオキシン (TCDD) の生殖系への影響解析—遺伝子発現を中心として—。第 75 回日本生化学会大会。シンポジウム 内分泌攪乱作用研究の進展。2002,10,京都

水谷哲也、矢澤隆志、中川幸、吉田和世、吉野美紀、関口俊男、梶谷宇、川田広子、井上佳子、山田一哉、宮本薫：ラット卵巣顆粒膜細胞の遺伝子発現に及ぼす低濃度ダイオキシンの影響。第 7 回日本生殖内分泌学会。2002,12,大阪

#### G. 健康危険情報

特に無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に無し
2. 実用新案取得  
特に無し
3. その他  
特に無し

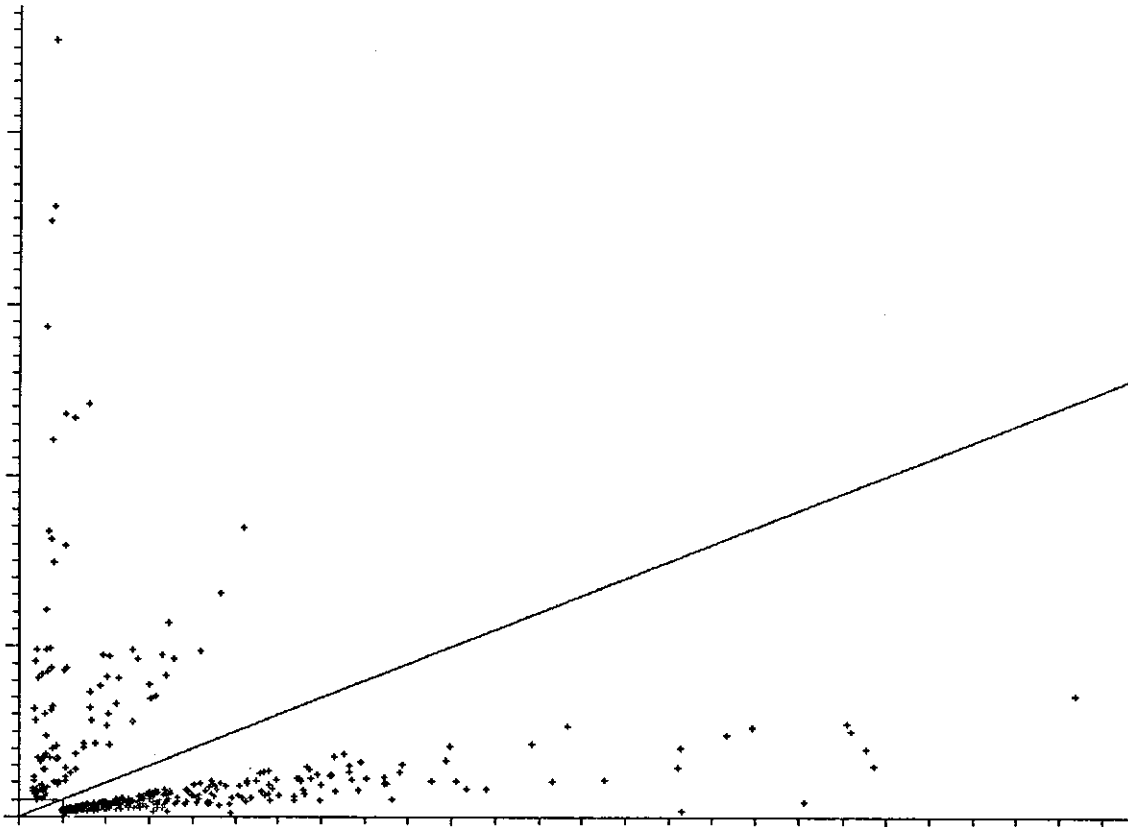


図1 サブトラクシオンcDNAライブラリーをプローブとして用いたマイクロアレイスクリーニングの解析。横軸に TCDD 処理胎盤での遺伝子発現強度、縦軸にコントロール胎盤での遺伝子発現強度を示す。各点が個々の遺伝子の発現強度を示している。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                           | 巻号・ページ                | 出版年  |
|--|---|--------------------------------|-----------------------|------|
| Ohta C, Haraguchi K, <b>Kato Y.</b> and Koga N.  | In vitro metabolism of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB 187) with liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs  | <i>Xenobiotica</i>             | in press              | 2005 |
| Haraguchi K., <b>Kato Y.</b> , Koga N. and Degawa M.   | Species differences in tissue distribution of catechol and methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyls in rats, mice, hamsters, and guinea pigs.                       | <i>Xenobiotica</i>             | in press              | 2005 |
| Nishimura N., Yonemoto J., Nishimura H., Ikushiro S.I., <b>Tohyama C.</b>  | Disruption of Thyroid Hormone Homeostasis at Weaning of Holtzman Rats by Lactational But Not in Utero Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p- Dioxin.                             | <i>Toxicol Sci.</i>            | in press.             | 2005 |
| Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Fujii-Kuriyama Y., <b>Tohyama C.</b>   | Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice.   | <i>Arch. Toxicol.</i>          | in press.             | 2005 |
| Nohara K., Pan X., Tsukumo S., Hida A., Ito T., Nagai H., Inouye K., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., <b>Tohyama C.</b> | Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. | <i>J Immunol., 174, 2770-7</i> | 174:<br>2770-27<br>77 | 2005 |
| Nagai H., Takei T., <b>Tohyama C.</b> , Kubo M., Abe R., Nohara K.   | Search for the target genes involved in the suppression of antibody production by TCDD in C57BL/6 mice.   | <i>Int Immunopharmacol.</i>    | 5:<br>331-343         | 2005 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                       | 巻号・ページ                  | 出版年  |
|--|---|----------------------------|-------------------------|------|
| Haraguchi K., Koga N. and <b><u>Kato Y.</u></b>  | Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters and guinea pigs.  | <i>Drug Metab. Dispos.</i> | 33:<br>373-380          | 2005 |
| Mizutani T., Yoshino M., Satake T., Nakagawa M., Ishimura R., <b><u>Tohyama C.</u></b> , Kokame K., Kangawa K., Miyamoto K.                          | Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible and -suppressive genes in the rat placenta: induction of interferon-regulated genes with possible inhibitory roles for angiogenesis in the placenta. | <i>Endocr J.</i>           | 51:<br>569-577          | 2004 |
| Watanabe H., Suzuki A., Goto M., Ohsako S., <b><u>Tohyama C.</u></b> , Handa H., Iguchi T.   | Comparative uterine gene expression analysis after dioxin and estradiol administration.   | <i>J.Mol. Endocrinol</i>   | 33:<br>763-71           | 2004 |
| Pan X., Inouye K., Ito T., Nagai H., Takeuchi Y., Miyabara Y., <b><u>Tohyama C.</u></b> , Nohara K.  | Evaluation of relative potencies of PCB126 and PCB169 for the immunotoxicities in ovalbumin (OVA)-immunized mice.   | <i>Toxicology.</i>         | 204:<br>51-60           | 2004 |
| Fukuzawa NH., Ohsako S., Wu Q., Sakaue M., Fujii-Kuriyama Y., Baba T., <b><u>Tohyama C.</u></b>  | Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse.   | <i>Mol.Cell Endocrinol</i> | 221:<br>87-96           | 2004 |
| Ito T., Tsukumo S., Suzuki N., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Mimura J., Lin TM., Peterson R.E., <b><u>Tohyama C.</u></b> , Nohara K. | A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest.   | <i>J.Biol. Chem.</i>       | 279:<br>25204-2<br>5210 | 2004 |



| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                            | 巻号・ページ           | 出版年  |
|---|--|---------------------------------|------------------|------|
| Haraguchi K., <u>Kato Y.</u> ,<br>Koga N. and Degawa M.   | Metabolism of polychlorinated biphenyls by Gunn rats: Identification and serum retention of catechol metabolites.  | <i>Chem. Res. Toxicol.</i>      | 17:<br>1684-1691 | 2004 |
| <u>Kato Y.</u> , Ikushiro S.,<br>Haraguchi K.,<br>Yamazaki T., Ito Y.,<br>Suzuki H., Kimura R.,<br>Yamada S., Inoue T.<br>and Degawa M. | A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats.   | <i>Toxicol. Sci.</i>            | 81:<br>309-315   | 2004 |
| Gauger K.J., <u>Kato Y.</u> ,<br>Haraguchi K., Lehmler<br>H.J., Robertson L.W.,<br>Bansal R. and Zoeller<br>R.T.                        | Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors.                                       | <i>Environ Health Perspect.</i> | 112:<br>516-523  | 2004 |
| 加藤善久、木村良平、<br>山田静雄、出川雅邦   | PCB 類による甲状腺ホルモンかく乱作用とその作用機構  | 動物種差、環境変異原研究                    | 26:<br>101-106   | 2004 |
| Wu Q., Ohsako S.,<br>Ishimura R., Suzuki J. S.,<br>and <u>Tohyama C.</u>  | Exposure of Mouse Preimplantation Embryos to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) Alters the Methylation Status of Imprinted Genes <i>H19</i> and <i>Igf2</i> . | <i>Biol. Reproduction</i>       | 70:<br>1790-1797 | 2004 |
| Fukuzawa N. H., Ohsako<br>S., Wu Q., Sakaue M.,<br>Fujii-Kuriyama Y., Baba<br>T., and <u>Tohyama C.</u>                                 | Testicular cytochrome P450 <sub>scc</sub> and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) in the mouse.                                     | <i>Mol. Cell. Endocrinol.</i>   | 221:<br>87-96    | 2004 |
| Ishizuka M., Yonemoto<br>J., Zaha H., <u>Tohyama<br/>C.</u> , and Sone H  | Perinatal exposure to low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11.   | <i>J. Biochem. Toxicol.</i>     | 17:<br>278-282   | 2003 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                             | 巻号・ページ         | 出版年  |
|---|--|----------------------------------|----------------|------|
| Ohsako S., Kubota K., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Ishimura R., and <b>Tohyama C.</b>                         | Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide.   | <i>J. Reprod Dev,</i>            | 49:<br>275-290 | 2003 |
| Kubota K., Ohsako S., Kurosawa S., Takeda K., Wu Q., Sakaue M., Kawakami T., Ishimura R., and <b>Tohyama C.</b> | Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat.   | <i>J. Reprod Dev</i>             | 49:<br>403-412 | 2003 |
| Inouye K., Ito T., Fujimaki H., Takahashi Y., Takemori T., Pan X., <b>Tohyama C.</b> , and Nohara K.            | Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice.   | <i>Toxicol. Sci,</i>             | 74:<br>315-324 | 2003 |
| Doi H., Baba T., <b>Tohyama C.</b> , and Nohara K.  | Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin.  | <i>Chemosphere,</i>              | 52:<br>655-662 | 2003 |
| Arisawa K., Matsumura T., <b>Tohyama C.</b> , Saito H., Satoh H., Nagai M., Morita M., and Suzuki T.            | Fish intake, plasma omega-3 polyunsaturated fatty acids, and polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins/polychlorinated dibenzo-furans and co-planar polychlorinated biphenyls in the blood of the Japanese population . | <i>Int. Arch. Occ. Env. Hea.</i> | 76:<br>205-21  | 2003 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                               | 巻号・ページ                | 出版年  |
|--|--|------------------------------------|-----------------------|------|
| Moriguchi T., Motohashi H., Hosoya T., Nakajima O., Takahashi S., Ohsako S., Aoki Y., Nishimura N., <b>Tohyama C.</b> , Fujii-Kuriyama Y., and Yamamoto M. | Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse.  | <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> | 100:<br>5652-56<br>57 | 2003 |
| Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sato M., and <b>Tohyama C.</b>   | Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin  | <i>Endocrinology</i>               | 144:<br>2075-20<br>83 | 2003 |
| Fukuzawa H. N., Ohsako S., Nagano R., Sakaue M., Baba T., Aoki Y., and <b>Tohyama C.</b>   | Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, a coplanar polychlorinated biphenyl congener, on cultured neonatal mouse testis.   | <i>Toxicology In Vitro</i>         | 17:<br>259-269        | 2003 |
| Takeyama M., and <b>Tohyama C.</b>   | Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds.   | <i>Industrial Health</i>           | 41:<br>215-230        | 2003 |
| Fukuzawa H. N., Ohsako S., Nagano R., Sakaue M., Baba T., Aoki Y. and <b>Tohyama C.</b>  | Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, a coplanar polychlorinated biphenyl congener, on cultured neonatal mouse testis.   | <i>Toxicology in vitro</i>         | 17:<br>259-269        | 2003 |
| Takeyama M., Sone H., Miyabara Y. and <b>Tohyama C.</b>  | Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin alters activity-dependent expression of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. | <i>Neurotoxicology</i>             | 24:<br>207-217.       | 2003 |

# Constitutively Active Aryl Hydrocarbon Receptor Expressed Specifically in T-Lineage Cells Causes Thymus Involution and Suppresses the Immunization-Induced Increase in Splenocytes<sup>1</sup>

Keiko Nohara,<sup>2\*</sup> Xiaoqing Pan,<sup>\*</sup> Shin-ichi Tsukumo,<sup>\*</sup> Azumi Hida,<sup>†</sup> Tomohiro Ito,<sup>\*</sup> Haruko Nagai,<sup>\*‡</sup> Kaoru Inouye,<sup>\*</sup> Hozumi Motohashi,<sup>†</sup> Masayuki Yamamoto,<sup>†</sup> Yoshiaki Fujii-Kuriyama,<sup>†</sup> and Chiharu Tohyama<sup>\*</sup>

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcription factor belonging to the basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM superfamily. Xenobiotics, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, bind the receptor and trigger diverse biological reactions. Thymocyte development and T cell-dependent immune reactions are sensitive targets of AhR-dependent 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity. However, the exact role of the AhR in T cells in animals exposed to exogenous ligands has not been clarified because indirect effects of activated AhR in other cell types cannot be excluded. In this study, we generated transgenic (Tg) mice expressing a constitutively active mutant of AhR under the regulation of a T cell-specific CD2 promoter to examine AhR function in T cells. The mRNAs of the constitutively active mutant of AhR and an AhR-induced gene, CYP1A1, were expressed in the thymus and spleen of the Tg mice. The transgene expression was clearly detected in the thymocytes, CD4, and CD8 T cells, but not in the B cells or thymus stromal cells. These Tg mice had a decreased number of thymocytes and an increased percentage of CD8 single-positive thymocytes, but their splenocytes were much less affected. By contrast, the increase in number of T cells and B cells taking place in the spleen after immunization was significantly suppressed in the Tg mice. These results clearly show that AhR activation in the T-lineage cells is directly involved in thymocyte loss and skewed differentiation. They also indicate that AhR activation in T cells and not in B cells suppresses the immunization-induced increase in both T cells and B cells. *The Journal of Immunology*, 2005, 174: 2770–2777.

Xenobiotics, such as polycyclic aromatic hydrocarbons and halogenated aromatic hydrocarbons, bind and activate the aryl hydrocarbon receptor (AhR),<sup>3</sup> a transcription factor belonging to the basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) superfamily (1, 2), and elicit diverse biological and physiological responses (3–6). These findings suggest that the AhR functions physiologically as a ligand-dependent transcription factor, whereas the endogenous ligands and intrinsic role of the AhR have yet to be identified. The decreased fertility and abnormalities found in various organs, including the liver, spleen, vascular structures, ovary, mammary gland, and bone marrow lymphocytes, in AhR-deficient mice (7–12) also imply intrinsic roles of the AhR in normal developmental processes. In the absence of

ligands, the AhR exists in the cytoplasm in an inactivated form complexed with a dimer of heat shock protein 90 and the immunophilin homologue hepatitis B virus X-associated protein 2 (13). Upon binding with ligands, such as its most potent ligand, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), the AhR becomes activated, dissociates from the protein complex, and translocates into the nucleus, where the receptor dimerizes with another basic helix-loop-helix-PAS transcription factor, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). The AhR/ARNT heterodimer specifically binds DNA sequences, called xenobiotic responsive elements (XREs), distributed in the enhancer regions of various genes, including one of the most sensitive targets, CYP1A1, and modulates their expression (14). The receptor complex also interacts with various nuclear proteins, such as retinoblastoma, NF- $\kappa$ B, and estrogen receptors (15–17). However, determination of the functions of the AhR requires identification of the genes and proteins that it modulates and the cell types in which the individual biological or physiological reactions occur.

The immune system is one of the sensitive targets of TCDD (6). Although a major portion of TCDD toxicities, such as thymus involution, suppressed CTL activity, and reduced Ab production, have been demonstrated to be mediated through the AhR by studies in AhR-deficient mice (18–20), the precise mechanisms of AhR function, including the primary cellular targets and biological reactions involved in these toxic effects, remain to be clarified. The thymus involution induced by administration of TCDD or other AhR ligands to mice is characterized by decreases in tissue weight and cell number that are mainly attributable to a decrease in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive (DP) cells, the predominant population of thymocytes. Skewing of thymocyte differentiation toward CD8 single-positive (SP) T cells is another peculiar feature of the

\*Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies and <sup>†</sup>Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan; and <sup>‡</sup>Research Institute for Biological Sciences, Science University of Tokyo, Noda, Japan

Received for publication August 10, 2004. Accepted for publication December 20, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> K.I. was supported by the Japan Society for the Promotion of Science (Domestic Research Fellowship).

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Keiko Nohara, Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba 305-8506, Japan. E-mail address: keikon@nies.go.jp

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: AhR, aryl hydrocarbon receptor; PAS, PER-ARNT-SIM; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; XRE, xenobiotic responsive element; DP, double-positive; SP, single-positive; FTOC, fetal thymus organ culture; Tg, transgenic; CA-AhR, constitutively active mutant of AhR; h, human; DIG, digoxigenin; 7-AAMD, 7-aminonactinomycin D; DN, double negative.