

顎では乳中切歯、永久側切歯、第1および第2小臼歯、下顎では永久中切歯、第2小臼歯などで、犬歯や大臼歯には欠如はみられなかった。円錐歯は上顎の第1および第2小臼歯に、また萌出方向異常は上顎および下顎の第1および第2小臼歯に認められた。永久歯の萌出方向異常があると、乳臼歯は脱落せず、残存していた。エナメル質の欠損など、微細な異常を生存児で観察することは困難であった。

D. 考察

歯は胚子期から青年期にかけて長期間にわたって形成され、一度生じた変化は不可逆的である。このため、歯は有害化学物質の胎児・授乳期暴露の影響を検出する指標として意義が大きい。げっ歯類ではダイオキシン類の胎生期・授乳期暴露により歯の形成異常が誘発され、歯はダイオキシン類の発生障害作用に感受性の高い器官と考えられている。ヒトでも油症患者やセベソ事故被曝者の追跡調査で、ダイオキシン類に胎内で暴露された児には歯の欠如、石灰化不全、エナメル質欠損が多発することが報告されている。本実験結果から、TCDD 300 ng/kg の母体負荷が児の歯形成を障害することが明らかになった。本実験の TCDD 暴露期間は歯原基形成前から永久歯胚形成期に及び、乳歯、永久歯ともに欠如が誘発されたことは、発生段階の点から TCDD の影響によるものと考えてよい。異常は切歯、小臼歯に見られ、犬歯、大臼歯には認められなかったが、ヒトでは

側切歯、小臼歯は退化しつつある歯とされ、サルでも同様の傾向があるとすると、これに胎生期の環境障害因子の作用が加わって、これらの歯の欠如、形態異常、萌出方向異常が誘発されたと考えられる。本研究での用量段階 30 ng/kg と 300 ng/kg は、げっ歯類における TCDD の最小毒性体内負荷量 (LOEL) 86 ng/kg の約 1/3 と約 3 倍に相当する。300 ng/kg 負荷で高率に歯の形成障害が誘発されたが 30 ng/kg では障害作用が認められなかった本実験結果は、アカゲザルにおける TCDD の LOEL がげっ歯類におけるそれとほぼ同じ桁にあることを示唆している。

E. 結論

TCDD の胎生期・授乳期暴露は児の歯の形成を障害する。その LOEL は、げっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Arima A, Ihara T, Kubota S, Asaoka K, Tsuga K, Akagawa Y: *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. *Reprod Toxicol*, 20, 2005 (in press).
- 2) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Arima A, Ihara T, Kubota S, Asaoka K, Takasuga T, Tsuga K, Akagawa Y: *In utero* and lactational exposure to

2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo- *p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 66, 3321-3325, 2004.

- 3) Asaoka K, Iida H, Watanabe K, Goda H, Ihara T, Nagata R, Yasuda M, Kubota S: No effects of dioxin singly on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. *Organohalogen Compounds*, 66, 3421-3425, 2004.

2. 学会発表

- 1) 隅田寛, 松村俊彦, 田中領華, 青島由記江, 安田峯生, 有馬昭宏, 久保田俊一郎: 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) の胎生・授乳期暴露を受けたアカゲザル児精巣の変化. 環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集, 303 (抄録), 2004. (環境ホルモン学会第7回研究発表会, 2004年12月14-15日, 名古屋)
- 2) 徳田信子, 安達泰弘, 福本哲夫, 安田峯生, 隅田寛, 福田剛司, 今井統隆, 有馬昭宏, 久保田俊一郎: TCDD 妊娠・授乳期暴露の母ザルおよび児の免疫系への影響. 環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集, 330 (抄録), 2004. (環境ホルモン学会第7回研究発表会, 2004年12月14-15日, 名古屋)
- 3) 安田峯生, 安田以久, 隅田寛, : ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル口蓋ヒダ形成に及ぼす影響. 日本解剖学会第59回中国・

四国地方会要旨集, 13 (抄録), 2004.

(日本解剖学会第59回中国・四国地方会, 2004年11月6-7日, 岡山)

- 4) 隅田寛, 青島由記江, 田中領華, 松村俊彦, 安田峯生: ダイオキシン暴露のアカゲザル心筋線維化について. 日本解剖学会第59回中国・四国地方会要旨集, 13 (抄録), 2004. (日本解剖学会第59回中国・四国地方会, 2004年11月6-7日, 岡山)
- 5) 徳田信子, 安達泰弘, 沢田知夫, 福本哲夫, 安田峯生, 隅田寛, 久保田俊一郎: ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル胸腺とリンパ球への影響. 日本解剖学会第59回中国・四国地方会要旨集, 22 (抄録), 2004. (日本解剖学会第59回中国・四国地方会, 2004年11月6-7日, 岡山)
- 6) Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Arima A, Ihara T, Kubota S, Asaoka K, Takasuga T, Tsuga K, Akagawa Y: *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo- *p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. *Organohalogen Compounds*, 66, 3321-3325, (short paper), 2004. (24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, September 6-10, 2004, Berlin, Germany)
- 7) Asaoka K, Iida H, Watanabe K, Goda H, Ihara T, Nagata R, Yasuda M,

Kubota S: No effects of dioxin singly on limb malformations in macaque monkeys through epidemiological and treated studies. Organohalogen Compounds, 66, 3421-3425, (short paper), 2004. (24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, September 6-10, 2004, Berlin, Germany)

- H. 財産所有権の出願、登録状況
なし

3. 胚幹細胞 (ES 細胞) に対する受容体シグナルを介する化学物質の胎児毒性モデルとしての有用性の検討

高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。胎児毒性予測モデルとしての ES 細胞培養系の有用性を検討するため、本年度は ES 細胞を種々の培養条件下で TCDD に暴露し、形態学的観察を行った。その結果、TCDD は ES 細胞培養系において、LIF 存在下で、1nM 以上で細胞数増加に対し抑制的に作用し、LIF 非存在下で浮遊培養で形成させた胚様体 (EB) においては 1nM 以上でその細胞数増加に対し促進的に作用することを明らかにした。また、形成された EB をゼラチンコート dish 上で分化させると TCDD 暴露により他と異なった形態の細胞の割合の増加が 0.1nM 以上で認められ、ES 細胞培養系が TCDD の胎児影響を検索する良い系であることが示唆された。

A. 研究目的

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、全分化能を有する細胞である。また、ES 細胞から形成される胚様体 (Embryoid body : EB と略す) は胎児の卵筒胚 (egg cylinder, マウスで 5 ~ 7 日胚) に似ており、主に発生学分野で発生初期胎児に発現する遺伝子の解析等に利用されている。これまでにダイオキシン受容体が ES 及び EB において発現することを確認した。そこで、ダイオキシン類の発生初期への影響 (特に遺伝子レベルで) を調べる試験系として ES 細胞の有用性を検討するため、本年度は、ES 細胞培養系を用いて、ES 細胞の形態に及ぼす影響を検索した。

B. 研究方法

ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で LIF が存在下、ES 培地で培養した。2, 3, 7, 8-TCDD は DMSO に溶解して、最終濃度 0、1、10 あるいは 100nM で添加した。対照群には DMSO を 0.1% の最終濃度で添加し、それぞれ、細胞数を計測した。また、ES 細胞を LIF が非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体 (EB) の細胞数を計測した。また、ゼラチンコート dish 上で TCDD を除いた培地で EB をさらに培養して分化誘導させて、形態学的観察を行った。2, 3, 7, 8-TCDD は DMSO に溶解して、最終濃度 0、0.1、1、10 あるいは 100nM で添加した。

(倫理面への配慮)

ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

ES細胞をゼラチンコート Dish 上で LIF が存在下で培養し、培養 4 日後に ES 細胞の細胞数を計測した結果、TCDD の用量相関的に有意な減少または減少傾向が 1nM 以上の濃度で認められた。また、RT-PCR の結果、LIF 存在下で TCDD 添加 2 日間培養後、TCDD の 1nM から CYP1A1 の増加を確認した。

ES細胞を LIF が非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体 (EB) の細胞数を計測した結果、1nM 以上群で有意な増加が認められたが、0.1nM では有意な増加が認められなかった。また、ゼラチンコート dish 上で TCDD を除いた培地で EB をさらに培養して分化誘導させて、形態学的観察を行った結果、0.1nM 以上で形態学的に異なった大形細胞の出現数の増加が見られた。

D. 考察

今回の結果、ES細胞の細胞数には LIF 存在下で TCDD により減少が見られたことから、TCDD が ES 細胞の増殖抑制あるいは細胞死を亢進させている可能性が示唆された。また、EB においては細胞数増加が認められ、ES 細胞とは異なった反応性が示された。また、ゼラチンコート dish 上で TCDD を除いた培地で EB をさらに培養して分化誘導させて、形態学的観察を行った結果、0.1nM 以上で形態学的に異なった大形細胞の出現数の増加が見られたことから、早期の ES 細胞への TCDD の暴露が、後期の分化過程に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。以上の結

果、ES細胞培養系はダイオキシン類の反応を調べる良い系であることが明らかになった。

E. 結論

TCDD は ES 細胞培養系において、LIF 存在下で、細胞数増加に対し、抑制的に作用し、LIF の非存在下で形成させた EB においてはその細胞数増加に促進的に作用した。また、TCDD 暴露により EB の分化過程で他と異なった細胞の割合が増加した。

G. 研究発表

書籍

高木篤也、ヒト全 MHC 遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002。

雑誌

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y., Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. *Mechanisms of Development*, 108 59-69, 2001.

学会発表

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression

analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.] 第 63 回日本癌学会学術総会、2004 年 9 月 29 日～10 月 1 日、福岡

Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ema and Jun Kanno, The 23rd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. USA, 2003 年 8 月

ES 細胞の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響。高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、井上達、第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 2002 年 6 月

Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 22nd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Spain, 2002 年 8 月

Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A., MATSUDA,

N., KANEKO, T., KANNO, J. and INOUE T., 米国奇形学会, 2002 年 6 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

4. 受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機能解析

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

p53 ヘテロ欠失マウスを用いたこれまでの研究で示唆されたダイオキシンによる発がんの非単調用量反応性（逆U字型反応）の確認のため、短期発がんモデルである Tg.AC マウスの雄に、2, 3, 7, 8-TCDD を 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 6 ヶ月間経口投与した。死亡率、体重には差は認められなかったが、最高用量群で肝重量増加が確認された。投与群において前胃の腫瘤が低頻度ながら観察され、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての可能性が示唆された。また、プロモーター作用高感受性動物として Tg.AC マウスの形質を活かした TCDD の発がん作用解析のための新たなマウスモデルの樹立を目的として、TCDD 高感受性系統である C57Bl/6 マウスへの back cross を継続実施し、その過程で胸腺腫及び前胃の squamous papilloma（乳頭腫）が高頻度に自然発生することが示された。

A. 研究目的

TCDD の発がん性のメカニズムは非変異原性、難代謝性、および AhR 依存性から、プロモーター作用が中心であり、すなわち epigenetic carcinogen であると考えられる。そこで、ダイオキシンの発がん機構ならびに用量反応性を明らかにすることを目的に、プロモーター物質感受性遺伝子改変モデルとして、TCDD の実験に有用な Tg.AC マウスの試験系開発ならびに低用量 TCDD の 6 ヶ月間経口投与実験を行った。

B. 研究方法

1) プロモーター作用高感受性動物とし

て Tg.AC マウス（癌遺伝子の v-Ha-ras 導入トランスジェニックマウス）を用いた TCDD の発がん作用の解析に適したマウスを樹立し、TCDD のプロモーター作用を調べる。

2) Tg.AC マウスの雄（一群 8 匹）に、2, 3, 7, 8-TCDD を 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 6 ヶ月間経口投与した。対照群にはコーン油を投与した、投与終了後、病理組織学的検査を実施し、生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析し、その用量反応性の非単調性を確認する。

（倫理面への配慮）

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔

薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。ダイオキシン類の実験に際しては、専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

- 1) プロモーター作用高感受性動物として Tg. AC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のための新たなマウスモデルの樹立に関しては、動物の SPF 化と TCDD 高感受性系統の C57BL/6 への back cross を継続した。その過程で前胃に高頻度に発生する乳頭腫が TCDD 経口投与実験の標的として利用可能であることが示唆された。
- 2) Tg. AC マウスの雄に、2, 3, 7, 8-TCDD を 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回 6 ヶ月間経口投与した。当初は 4 ヶ月の予定であったが、死亡率等に変化が認められなかったため、さらに 2 ヶ月投与期間を延長し、のべ 6 ヶ月投与した。その結果、死亡率、体重には差は認められなかったが、最高用量群で肝重量増加が確認された。投与群において前胃の腫瘍が低頻度ながら観測され、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての可能性が示唆された。

D. 考察

プロモーター作用高感受性動物として Tg. AC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のための新たなマウスモデルの樹立に関しては、Tg. AC/AhRKO マウス作成に向けての C57BL/6 (TCDD 高感受性マウス) へ Back cross を行い、これまでに、皮膚乳頭腫誘発感受性が C57BL/6 背景でも保たれることを確認したと共に、前胃の乳頭種の自然発生が高率に認められることを見出した。さらに、戻し交配により B6 背景が濃くなるに連れて、胸腺腫 (胸腺リンパ腫) の発生が高率となり、歯芽腫及び前胃乳頭腫と近い発生率・発生時期を示すようになった。そこで、前胃の乳頭腫を標的とした経口投与による逆 U 字型用量相関の有無の追試検証を、まずは Tg. AC マウスを用いて実施した。解剖を終了し、病理組織学的検査を残した段階ではあるが、肉眼的には投与群において前胃粘膜の腫瘍が低頻度ながら観察された。

E. 結論

Tg. AC マウスの雄に、2, 3, 7, 8-TCDD を 1, 3, 10, 30 及び 100ng/kg 体重の用量で週 2 回で 6 ヶ月間の経口投与実験を実施した。その結果、投与群において前胃の腫瘍が低頻度ながら観測され、TCDD 投与の低濃度影響の検出系としての可能性が示唆された。B6 系への戻し交配中に見出された前胃乳頭腫の高頻度自然発現現象を利用した高感受性系として B6 戻し交

配動物による追加試験が考慮された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev.* 2004 Dec;121(12):1443-53.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol.* 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:12-6.

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 Jul;91(3):121-9.

Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming

growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jun;229(6):494-502.

Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol.* 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology.* 2004 Jan 15;195(1):19-29.

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの

導入、細胞工学 Vol.23 No.6
2004685-693、株式会社秀潤社

菅野 純：医薬品開発におけるわが
国のトキシコゲノミクスの取り組み、
月刊薬事、2004年5月、Vol.46, No.6
45-19 株式会社じほう

菅野 純：化学物質の毒性 化学と
教育 52巻5号『化学物質とリスク評
価』 2004年 302-305 (社)日本化
学会

2. 学会発表

Jun Kanno, Screening/Testing Scheme
for Endocrine Disrupting Chemicals,
19th Scientific Meeting of the
Malaysian Society of Pharmacology
and Physiology (MSPP), May17-18,
2004, Malaysia

Jun Kanno, Endocrine Disrupting
Chemicals Researches, Current Topics,
19th Scientific Meeting of the
Malaysian Society of Pharmacology
and Physiology (MSPP), May17-18,
2004, Malaysia

菅野 純 「前向き」 Toxicogenomics、
第 88 次日本法医学会総会、2004 年 6
月 2~4 日、旭川

高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀

裕美子、「Notch リガンド D113 は Mesp2
の欠損による体節形成と前後パターン
形成の異常を回復する」、日本発生生
物学会第 37 回大会、2004 年 6 月 4~6
日、名古屋

平林容子、壺井 功、菅野 純、井上
達、「造血器における細胞間ギャップ
結合の病理-コネクシン欠失による造
血障害と実験白血病高甘感受性につい
て-」、第 93 回日本病理学会総会、2004
年 6 月 9~11 日、札幌

J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu,
Y Kodama, K Igarashi , PHENOTYPE-
INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING
“PERCELLOME” AND “MILLE-
FEUILLE” DATA SYSTEM, 第 31 回日
本トキシコロジー学会学術年会 (特別
講演)、2004 年 7 月 6~8 日、大阪

中津則之、相 健一、五十嵐勝秀、小
野敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日
内変動遺伝子群プロファイルの解析」
第 31 回日本トキシコロジー学会学術
年会 (口演)、2004 年 7 月 6~8 日、大
阪

J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi ,
TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME”
AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM,
10th International Congress of

Toxicology, 11-15 July, 2004;

Tampere, Finland

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第 63 回日本癌学会学術総会、2004 年 9 月 29 日～10 月 1 日、福岡

菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相 健一、「解糖系障害で誘導される赤芽球アポトーシスと p53 の関連、p53 involvement in glycolysis disorder-induced apoptosis of erythroid cell」第 63 回日本癌学会学術総会、2004 年 9 月 29 日～10 月 1 日、福岡

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama "Percellome" Analysis of Hormonally Active Compounds. Toxicogenomics International Forum 2004, 12-13 October, 2004

五十嵐勝秀、高橋芳樹、菅野 純、内分泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対する作用、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

中津則之、相崎健一、小野 敦、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、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、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

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、アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

高橋芳樹、五十嵐勝秀、菅野 純、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、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

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、マウス心臓における Notch1 シグナリングの機能解析、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Percellome" method application to the analysis of hormonally active compounds and its possible contribution to the ecotoxicogenomics. 環境ホルモン学会第 7 回研究発表会、2004 年 12 月 15 日、名古屋

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
国内特許申請中（特願 2003-
317031、特願 2004-219285）

5.細胞アレイを指標とした内分泌かく乱化学物質の影響

矢守 隆夫

財団法人癌研究会 癌化学療法センター分子薬理部 部長

研究要旨

化学物質約40種をがん細胞パネルにかけFingerprintをデータベース化した。Cancer Cell Informatics によるこれらの化合物のクラスター分析が可能になりつつある。今後、被験化合物をさらに増やした検討を行う。Tributyltin の分子メカニズム解析にがん細胞パネルの中の前立腺癌 PC-3 細胞株がモデル系として用いた。Gene Chip 解析により Tributyltin により発現変化する遺伝子が多数抽出された。この情報に基づく Tributyltin の分子メカニズム解析を展開したい。

A. 研究目的

新規化学物質の作用メカニズムを予測するシステム「Cancer Cell Informatics」を用い、化学物質の評価を行う。ついで、細胞増殖阻害の分子機構を解析し、既知データとの対比を通じて内分泌かく乱分子機構を推測する。さらに増殖阻害の分子機構解析から、標的依存性とリガンド依存性の両面に関する生物学的意義を明らかにする。

B. 研究方法

ダイオキシン類を含む種々の化学物質、核内受容体アゴニストをヒト培養細胞パネルに対する増殖阻害活性の強弱を調べることにより、その毒性（増殖阻害）評価を行った。「Cancer Cell Informatics」により、その作用メカニズムについて既知の抗がん剤や阻害剤との比較検討を行った。また、ヒト癌細胞に対する化学物質曝露の影響を、GeneChipを用いた遺伝子発現解析^{*}を行い、その影響を観測した。

（倫理面への配慮）

本研究は培養細胞株を用いるものなので、倫理的問題が発生することはなかった。

C. 研究結果

ヒト培養細胞パネルを用いた「Cancer Cell Informatics」解析の結果9-cis, all-trans retinoic acidが同一のクラスターを形成した。また、Tributyltin が各種の化合物と比較して、高い感受性を示した。ヒト前立腺癌培養細胞株PC-3において、

Tributyltin 暴露による遺伝子発現変動を検討した結果、濃度、時間依存的な発現変動を示す遺伝子が多数抽出された。その中には3T3-L1細胞でTributyltinによる発現誘導が報告されているaP2遺伝子も含まれていた。Tributyltin処理24時間後に発現変化の見られた遺伝子はVEGFなどの血管新生関連遺伝子や、RHO関連シグナル伝達遺伝子などをはじめ300以上にのぼった。

D. 考察

ヒト培養細胞アレイを用いた「Cancer Cell Informatics」解析の結果9-cis, all-trans retinoic acidが同一のクラスターを形成したことから、これが新規化学物質に対しての化学物質、核内受容体アゴニスト評価系として有用と期待されるが、さらに多くの核内受容体アゴニストをこの系で評価して有用性の検証を行う必要がある。またTributyltinががん細胞パネルでは強い増殖阻害活性を示したので、その分子メカニズムを調べ、生体内作用様式との関連を考察するという方針で、GeneChipによる遺伝子発現解析^{*}を行った。その結果、既に変動することが報告されている遺伝子がここで用いたヒト前立腺癌 PC-3 細胞においても同様の変動を示したので、この系はTributyltinの作用メカニズムのモデル解析系として使える可能性がある。変動が確認された数100の遺伝子の文献調査をすすめてTributyltinの作用メカニズムに関連する可能性のある遺伝子を絞り込み、RNAi等でその機能解析を進めてゆきたい。

* (“Percellome”法を用いた解析)

E. 結論

現在まで種々の化学物質をがん細胞パネルにかけ Fingerprint をデータベース化した。Cancer Cell Informatics によるこれらの化合物のクラスター分析が可能になりつつある。今後、被験化合物をさらに増やして検討する。Tributyltin の分子メカニズム解析にがん細胞パネルの中の前立腺癌 PC-3 細胞株がモデル系として使える見込みである。当面この系で Tributyltin の分子メカニズム解析を行う。

G. 研究発表 (過去3年間)

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y., and Yamori, T. Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining the chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther*, 4, 399-412, 2005.
1. Lai, Y. Y., Huang, L. J., Lee, K. H., Xiao, Z., Bastow, K. F., Yamori, T., and Kuo, S. C. Synthesis and biological relationships of 3',6-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives as antimitotic agents. *Bioorg Med Chem*, 13:265-275, 2005.
3. Tanaka, R., Wada, S., Aoki, H., Matsunaga, S., and Yamori, T. Spiromarienols A and B: two new 7(8→9)abeo-lanostane-type triterpene lactones from the stem bark of *Abies mariesii*. *Helvetica Chemica Acta*, 87:240-249, 2004.
1. Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., and Sashida, Y. Triterpene Saponins from the Roots of *Clematis chinensis*. *J Nat*

Prod, 67:1511-1516, 2004.

1. Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T., and Shin-ya, K. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J Natl Cancer Inst*, 96:1300-1310, 2004.
1. Saito, H., Honma, T., Minamisawa, T., Yamazaki, K., Noda, T., Yamori, T., and Shiba, K. Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs. *Chem Biol*, 11:765-773, 2004.
1. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene*, 2004.
1. Sakai, K., Fukuda, Y., Matsunaga, S., Tanaka, R., and Yamori, T. New Cytotoxic Oleanane-Type Triterpenoids from the Cones of *Liquidambar styraciflua*. *J Nat Prod*, 67:1088-1093, 2004.
1. Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J., and Arai, H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem*, 279:17634-17639, 2004.
1. Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T., Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., and Asada, M. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 57:188-196, 2004.
1. Bai, J., Kitabatake, M., Toyozumi, K., Fu, L., Zhang, S., Dai, J., Sakai, J., Hirose, K., Yamori, T., Tomida, A., Tsuruo, T., and Ando, M. Production of Biologically Active Taxoids by a Callus

- Culture of *Taxus cuspidata*. *J Nat Prod*, 67:58-63, 2004.
12. Rengifo-Cam, W., Konishi, A., Morishita, N., Matsuoka, H., Yamori, T., Nada, S., and Okada, M. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis. *Oncogene*, 23:289-297, 2004.
 13. Andoh, T., Umemura, K., Yanase, K., and Yamori, T. Development of new topoisomerase II-targeting compounds as candidate anticancer drugs, p. 167-188. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003.
 14. Mashino, T., Nishikawa, D., Takahashi, K., Usui, N., Yamori, T., Seki, M., Endo, T., and Mochizuki, M. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 13:4395-4397, 2003.
 15. Sugiyama, Y., Dan, S., Yoshida, Y., Akiyama, F., Sugiyama, K., Hirai, Y., Matsuura, M., Miyata, S., Ushijima, M., Hasumi, K., and Yamori, T. A large-scale gene expression comparison of microdissected, small-sized endometrial cancers with or without hyperplasia matched to same-patient normal tissue. *Clin Cancer Res*, 9:5589-5600, 2003.
 16. Dan, S., Shirakawa, M., Mukai, Y., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Kawaguchi, T., Matsuura, M., Nakamura, Y., and Yamori, T. Identification of candidate predictive markers of anticancer drug sensitivity using a panel of human cancer cell lines. *Cancer Sci*, 94:1074-1082, 2003.
 17. Tanabe, M., Izumi, H., Ise, T., Higuchi, S., Yamori, T., Yasumoto, K., and Kohno, K. Activating transcription factor 4 increases the cisplatin resistance of human cancer cell lines. *Cancer Res*, 63:8592-8595, 2003.
 18. Bando, T., Iida, H., Tao, Z. F., Narita, A., Fukuda, N., Yamori, T., and Sugiyama, H. Sequence specificity, reactivity, and antitumor activity of DNA-alkylating pyrrole-imidazole diamides. *Chem Biol*, 10:751-758, 2003.
 19. Shiwa, M., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Fukawa, A., Arikuni, H., Ota, H., Kato, Y., and Yamori, T. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochem Biophys Res Commun*, 309:18-25, 2003.
 20. Matsuda, M., Yamori, T., Naitoh, M., and Okutani, K. Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Mar Biotechnol (NY)*, 5:13-19, 2003.
 21. Umemura, K., Yanase, K., Suzuki, M., Okutani, K., Yamori, T., and Andoh, T. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem Pharmacol*, 66:481-487, 2003.
 22. Suzuki, M., Watanabe, K., Fujiwara, S., Kurasawa, T., Wakabayashi, T., Tsuzuki, M., Iguchi, K., and Yamori, T. Isolation of Peridinin-Related Norcarotenoids with Cell Growth-Inhibitory Activity from the Cultured Dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a Symbiont of the Okinawan Soft Coral *Clavularia viridis*, and Analysis of Fatty Acids of the Dinoflagellate. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 51:724-727, 2003.
 23. Yamori, T. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52 Suppl 1:74-79, 2003.

24. Yang, L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., Yamori, T., Oh-Hara, T., and Tsuruo, T. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*, 63:831- 837, 2003.
25. Yang, L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., Yamori, T., Oh-Hara, T., and Tsuruo, T. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*, 63:831- 837, 2003.
26. Iwashima, M., Matsumoto, Y., Takenaka, Y., Iguchi, K., and Yamori, T. New Marine Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral *Clavularia koellikeri*. *J Nat Prod*, 65:1441-1446, 2002.
27. Iwashima, M., Terada, I., Iguchi, K., and Yamori, T. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the okinawan sponge of the genus *axinyssa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 50:1286-1289, 2002.
28. Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R., and Hayashi, S. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol*, 29:175-192, 2002.
29. Umemura, K., Mizushima, T., Katayama, H., Kiryu, Y., Yamori, T., and Andoh, T. Inhibition of DNA topoisomerases II and/or I by pyrazolo[1,5-a]indole derivatives and their growth inhibitory activities. *Mol Pharmacol*, 62:873-880, 2002.
30. Sasaki, T., Yamazaki, K., Yamori, T., and Endo, T. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *Br J Cancer*, 87:918-923, 2002.
31. Owa, T., Yokoi, A., Yamazaki, K., Yoshimatsu, K., Yamori, T., and Nagasu, T. Array-Based Structure and Gene Expression Relationship Study of Antitumor Sulfonamides Including N-[2-[(4-Hydroxyphenyl)amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzenesulfonamide and N-(3-Chloro-7-indolyl)-1,4-benzenedisulfonamide. *J Med Chem*, 45:4913 -4922, 2002.
32. Hashimoto, S., Xu, Y., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Uehara, Y., Shibuya, M., Yamori, T., and Nakaya, K. β -Hydroxyisovalerylshikonin Is a Novel and Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Kinases. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93:944-951, 2002.
33. Umezū-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., and Arai, H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, 158:227-233, 2002.
34. Naasani, I., Yamori, T., and Tsuruo, T. Screening with COMPARE analysis for telomerase inhibitors. *Methods Mol Biol*, 191:197-207, 2002.
35. Uesato, S., Kitagawa, M., Nagaoka, Y., Maeda, T., Kuwajima, H., and Yamori, T. Novel histone deacetylase inhibitors: N-hydroxycarboxamides possessing a terminal bicyclic aryl group. *Bioorg Med Chem Lett*, 12:1347 -1349, 2002.
36. Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Toshiwo, A., Umemura, K., and Numata, A. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities.

Tetrahedron, 58:479-487, 2002.

38. Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., and Miyagi, T. Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int J Cancer*, 97:180-185, 2002.
39. Iguchi, K., Sawai, H., Nishimura, H., Fujita, M., and Yamori, T. New Dolabellane-Type Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral of the Genus *Clavularia*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 75:131-136, 2002.
40. Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H., Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Research*, 62:1139-1147, 2002.

(総説)

1. 中津則之, 矢守隆夫 ヒトがん細胞パネルによる化合物の分子薬理の評価と抗がん剤感受性関連遺伝子. *がん分子標的治療*, 2:54-60, 2004.
2. 矢守隆夫 *Cancer Cell Informatics* 一抗が

ん剤探索とポストゲノム研究への応用. *バイオサイエンスとインダストリー* 62:445-449, 2004.

3. 矢守隆夫 癌分子標的と創薬スクリーニング. *現代医療*, 36:1339-1346, 2004.

2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

1. 山崎佳波、中津則之、菅野純、矢守隆夫. *Cancer Cell Informatics* による毒性物質の評価. *In: 日本癌学会 第63回学術総会*, 福岡, 2004.
2. 中津則之、吉田陽子、山崎佳波、且慎吾、中村知己、関万里子、福井泰久、菅野純、矢守隆夫. ヒトがん細胞パネルによる化合物の分子薬理・分子毒性の評価および抗癌剤感受性関連遺伝子の同定. *In: 日本癌学会 第62回学術総会*, 名古屋, 2003.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

6. ヒト型モデル動物による AhR の分子基盤解と AhR の生理的プロセスへの関与

藤井 義明 筑波大学先端学際領域研究センター・客員教授

研究要旨

ダイオキシンは、催奇型性、発癌のプロモーション作用、クローラクネの発症、内分泌かく乱作用など多岐に渡る生体毒作用を示すが、この毒性の殆どは AhR によって仲介されることが知られている。この毒性発現は AhR の正常な働きの裏面の作用と考えられるので AhR の毒性発現の関与のメカニズムを明らかにするためには、AhR の正常の働きを理解する必要がある。そのような観点から AhR の生殖、皮膚組織分化、マクロファージ及び T 細胞分化における正常な機能の解析を行っている。今回は雌マウスの卵巣における AhR の役割について検討した結果を報告する。

A. 研究目的

AhR を欠失した雌マウスは、部分的に不妊になる。これは AhR が雌の生殖機能に関与していることを示している。AhR の生殖への関与のメカニズムを検討した。

B. 研究方法

作製した AhR 欠失雌マウスの卵巣の形態及び機能を野性型マウスと比較して検討する。まず実験的にどの程度不妊であるかを定量する。さらに排卵数、生殖サイクル、精巣の遺伝子発現の変化について RT-PCR 法によって検討し、AhR の卵巣の機能欠損の原因を明らかにする。

(倫理面への配慮)

使用した飼育施設の規定に従って動物実験を行ない、屠殺に当たっては苦痛の少ない方法を用いた。

C. 研究結果

成熟した野性型雄マウス、野性型雌マウス、あるいは AhR ホモ欠失マウスを番(つがい)にして連続 3 ヶ月間飼育すると AhR ホモ欠失雌マウスは、野性型雌マウスに比較して平均 1/4 産児数しか得られない事が分かった。また、野性型雌マウスは、この間に殆どすべて 3 回出産するが、AhR ホモ欠失マウスは、3 回目の出産はどの雌マウスでも見られなかった。この原因について、PMSG と hCG を用いた強制排卵を行い、排卵数を調べた結果は、生後 3 ヶ月のマウスで野性型 25 ± 1.0 に対し AhR ホモ欠失型で 4.0 ± 4.6 で排卵数の顕著な減少が観察され、さらに hCG 処理後の卵巣で AhR ホモ欠失型では、顕著な黄体形成不全が認められた。このことは排卵数の低下と一致する結果である。また雌マウスは、4~5 日の生殖サイクルが観察されるが、AhR ホモ欠失マウスでは、このサイクルが遅延したり、認めら

れなくなったりして不順になっていた。卵巣ではコレステロールからテストステロンを経てエストラジオール (E_2) が形成される。観察された AhR ホモ欠失マウスの表現型は、アロマトーゼの欠失マウスと良く似ていたため、 E_2 の産生を定量した結果、 E_2 産生は AhR 欠失マウスでは野生型に比較して 1/3~1/5 に低下していること、 E_2 の前駆体であるテストステロンの量が、若干増加していることが明らかになった。さらに、PMSG と hCG による強制排卵の過程でステロイドホルモン合成系の酵素の発現を RT-PCR によって測定した結果、hCG 処理 4 時間後に P450 アロマトーゼ (CYP19) の発現が AhR ホモ欠失マウスで低下していることが分かった。さらに、マウスの CYP19 遺伝子を単離して遺伝し、その上流の制御配列を調べてみると XRE 配列の存在が確認された。また、ヒトの CYP19 遺伝子についても同様に XRE 配列が存在することが分かった。最近、魚の CYP19 遺伝子にも XRE の存在が確認されている。従って XRE 配列による CYP19 遺伝子発現制御は種を越えて保存していると考えられる。マウスとヒトの CYP19 遺伝子の上流の遺伝子発現制御領域を luciferase 遺伝子に結合してレポーター遺伝子を作製し、XRE が AhR と Arnt に応答して遺伝子発現を活性化するかどうかを調べた結果、AhR と Arnt ヘテロ 2 量体では弱い転写活性しか見られなかったが、Ad4BP/SF-1 を発現させると協調的に強いレポーター遺伝子の発現が観察された。また、マウスの卵巣の Granulosa 細胞を分離して、クロマチン免疫沈降法によって XRE に AhR/Arnt のヘテロ 2 量体、Ad4 配列に Ad4BP/SF-1 が結合しているかについて検討した結果、

Ad4BP と AhR/Arnt は DNA 上で相互作用をして、各々の認識配列に結合していることが明らかになった。

D. 考察及び E. 結論

AhR ホモ欠失雌マウスの部分的不妊は、生殖サイクルの不順による排卵数の低下が原因である。さらに原因を追求した結果、コレステロールからエストロジェンを合成する卵巣におけるステロイドホルモン合成系の律速酵素であり、最終の合成反応を触媒する CYP19 遺伝子の発現制御に AhR/Arnt が関与していることが明らかになった。恐らく生殖周期において AhR は FSH あるいは、LH によって直接又は間接に活性化されて CYP19 の発現を制御していると考えられる。この時に内在性のリガンドが合成されて、AhR の活性化がおこるのか、否かは現段階では分からない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

Kuroda M, Oikawa K, Ohbayashi T, Yoshida K, Yamada K, Mimura J, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y, Mukai K. A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett.* 579, 167-72 (2005)

Ogiso H, Kagi N, Matsumoto E, Nishimoto M, Arai R, Shirouzu M, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Yokoyama S. Phosphorylation analysis of 90 kDa heat

- shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. *Biochemistry*. 43, 15510-9 (2004)
- Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol*. 17, in print (2004)
- Nakatsuru Y, Wakabayashi K, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T, Kusama K, Ide F. Dibenzo[A,L]pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Int J Cancer*. 112, 179-83 (2004)
- Fukuzawa NH, Ohsako S, Wu Q, Sakaue M, Fujii-Kuriyama Y, Baba T, Tohyama C. Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse. *Mol Cell Endocrinol*. 221, 87-96 (2004)
- Kinoshita K, Kikuchi Y, Sasakura Y, Suzuki M, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. Altered DNA binding specificity of Arnt by selection of partner bHLH-PAS proteins. *Nucleic Acids Res*. 32, 3169-79 (2004)
- Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Takahashi T, Matsushita N, Miura C, Nikawa J, Gotoh O, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor-Arnt heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun*. 318, 746-55 (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, 571-8 (2004)
- Fetissov SO, Huang P, Zhang Q, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Rannug A, Hokfelt T, Ceccatelli S. Expression of hypothalamic neuropeptides after acute TCDD treatment and distribution of Ah receptor repressor. *Regul Pept*. 119, 113-24 (2004)
- Ito T, Tsukumo S, Suzuki N, Motohashi H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Mimura J, Lin TM, Peterson RE, Tohyama C, 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. *J Biol Chem*. 24, 25204-10 (2004)
- Shimada T. and Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens