

40. 谷口絵菜、勝義直、山藤憲明、戸笈修、井口泰泉、松野あきら: Raucous toad のエストロゲン受容体配列解析. 日本動物学会第 77 回大会、島根, 2006 年 9 月 21-24 日.
41. 中村武志、勝義直、渡邊肇、井口泰泉: 新生仔期に DES を投与されたマウスの臍における Wnt ファミリー遺伝子の発現変化. 日本動物学会第 77 回大会、島根, 2006 年 9 月 21-24 日.
42. 勝義直、市川理恵、池内俊貴、ジレット・ルイス、井口泰泉: 爬虫類ステロイドホルモン受容体のクローニング. 日本動物学会第 77 回大会、島根, 2006 年 9 月 21-24 日.
43. 加藤泰彦、小林かおる、勝義直、渡邊肇、井口泰泉: オオミジンコ DM ドメイン遺伝子ファミリーの解析. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、東京, 2006 年 11 月 11-12 日.
44. 高瀬稔、三井直子、戸笈修、山藤憲明、井口泰泉: ニシツメガエルの尾、肝臓および脳において発現している甲状腺ホルモン応答遺伝子の単離. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、東京, 2006 年 11 月 11-12 日.
45. 中村武志、勝義直、渡邊肇、井口泰泉: DES によるマウス雌性生殖器官での Wnt ファミリー発現変動. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、東京, 2006 年 11 月 11-12 日.
46. 漆谷博志、勝義直、河野郷通、Louis J. Guillette Jr.、井口泰泉: アメリカワニ Anti-Mullerian Hormone 遺伝子の単離・発現解析. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、東京, 2006 年 11 月 11-12 日.
47. 田中麻友美、鈴木敦子、加藤英男、井口泰泉、太田康彦: 周生期に投与した BPA の卵管発達における持続効果. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、東京, 2006 年 11 月 11-12 日.
48. Tatarazako, N., S. Ogino, M. Kato, R. Abe, S. Oda, T. Iguchi and H. Shiraishi: Proposal of new screening method with endocrine disrupting chemicals on crustaceans. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会、東京, 2006 年 11 月 11-12 日.
49. 佐藤友美、金 那、桐ヶ谷明子、井口泰泉、林しん治: 出生直後の Diethylstilbestrol (DES) 投与による多卵性卵胞(PF)誘導とエストロゲンレセプター (ER) β の関与. 第 11 回日本生殖内分泌学会、東京, 2006 年 11 月 25 日.

H. 知的所有権の取得状況
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

ヒト骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者：笹野 公伸 東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻
病理病態学講座 病理診断学分野 教授

研究要旨

本研究ではエストロゲン様化合物のヒト骨芽細胞（株化培養細胞）に対する影響を遺伝子レベルで検討した。培養細胞は正常ヒト骨芽細胞 hFOB を対象とし、細胞増殖について Estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、diethylstilbestrol (DES) の影響を検索した。さらにマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。結果、BPA は hFOB の増殖を促したが、逆に DES は細胞死を起し、GEN は hFOB に影響を与えなかった。遺伝子発現では BPA と E2 が比較的類似した発現プロファイルを示した。さらに BPA による細胞増殖は steroid and xenobiotic receptor を介することが示唆された。ヒト骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対して種々の内分泌かく乱物質の与える影響を検討する本研究では内分泌かく乱化学物質がヒト成人骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであった。又その影響は化合物によって質的な差を示した。

A. 研究目的

本研究ではエストロゲン様化合物の骨芽細胞（株化培養細胞）に対する影響を遺伝子レベルで検討した。

すなわち、ヒト骨組織は種々のステロイドホルモンの標的組織であり、内分泌かく乱化学物質の影響も強く受けると考えられるが、ヒト骨組織に対しての影響を詳細に検討した報告はない。そこで本研究ではヒト骨芽細胞を用いて代表的なエストロゲン様作用を有するとされる bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、diethylstilbestrol (DES) の影響を確認して、内分

泌かく乱物質の代表的な性ステロイド標的組織である骨組織に対しての影響を検討する第一歩とした。

（倫理面への配慮）

ヒト骨組織を用いた検討は、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得て、実施した。

B. 研究方法

ヒト骨芽細胞 hFOB を対象とし、estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、genistein (GEN)、

diethylstilbestrol (DES) の細胞増殖と遺伝子発現に与える影響について検索した。

すなわち、以下の方法で実験を進めた。

化合物

Estradiol、diethylstilbestrol、dexamethason、RU38,486、diclofenac (以上、Sigma-Aldrich Co.)、genistein、bisphenol A (以上、和光純薬工業株式会社)、ICI 182,780 (Tocris Cookson, Inc.)。

ヒト正常骨芽細胞

hFOB 1.19 [ATCC, CRL-11372, transfected with T large antigen; established by Harris SA *et al.* (1995, *J Bone Miner Res*)] を使用した。

細胞増殖及び細胞周期解析

細胞増殖の判定には Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所) を使用した。細胞周期解析には FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) を使用した。

Apoptosis assays

アポトーシスの判定には Hoechst33258 染色を行い、DNA ラダーの検出には Apoptosis Ladder Detection Kit (和光純薬工業株式会社) を用いた。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイを用いた解析は、五十嵐班員との共同研究で行った。RNA の抽出からデータの数値化までは五十嵐班員の下で行われた。GeneChip Human Genome 133 ver. 2.0 (Affymetrix, Inc.) を用い、各薬物の添加によって2倍以上増加した遺伝子群について、さらに、クラスター解析 (Cluster System & TreeView; Stanford University) を行った。

定量的PCR

LightCycler System (Roche Diagnostics, GmbH) を使用した。得られた値は同サンプルのインターナルコントロール (RPL13A) の発現で補正し

た。

Bisphenol A の作用については、さらに steroid and xenobiotic receptor (SXR) との関連について以下の方法を用いて検討した。

骨芽細胞様細胞

ヒト骨芽細胞様細胞は MG-63 (osteosarcoma; 東北大学医用細胞資源センター) を用いた。

SXR reporter gene assays

pcDNA3.1(-)/SXR 及び pGL3/CYP3A4 promoter をトランスフェクションした。SXR agonist の rifampicin (RIF)、Estradiol (E2) 及び BPA をそれぞれ添加し、ルシフェラーゼの活性を測定した。

免疫組織化学

SXR (株式会社ペルテウスプロテオミクス)、alkaline phosphatase (骨芽細胞マーカー; Biogenesis Ltd.) 及び tartrate resistant acid phosphatase (破骨細胞マーカー; Lab Vision Corporation)の抗体をそれぞれ用い、ヒト骨組織5例での検討を行った。

C. 研究結果

BPA は hFOB の増殖を促したが、逆に DES は細胞死を起こし、GEN は hFOB に影響を与えなかった。遺伝子発現では BPA と E2 が比較的類似した発現プロファイルを示した。さらに BPA による細胞増殖は SXR を介することが示唆された。

すなわち、今回用いた hFOB は、estrogen receptor (ER) β 、androgen receptor、progesteron receptor が発現しており、各化合物の 72 時間添加では、E2 (10^{-8} M) の添加により細胞数が増加し、BPA (10^{-7} ~ 10^{-5} M) の投与でも細胞数は増加したが、DES (10^{-8} ~ 10^{-6} M) の添加では細胞数は

減少し、GEN (10^{-6} M)の添加は細胞数に影響しなかった。マイクロアレイ/クラスター解析の結果では、増殖を認めた E2 (10^{-8} M) と BPA (10^{-7} M) の添加時の遺伝子発現プロファイルが類似した。

1. bisphenol A の影響

BPA (10^{-7} – 10^{-5} M) の添加 (72 時間) にて、有意な細胞数の増加を確認した。また、この増加はエストロゲン受容体阻害剤 ICI 182,780 で抑制されなかった。さらに細胞周期解析では、 10^{-7} M BPA の添加後 48 時間で S 期の細胞の増加 (15% → 20%) を確認した。hFOB への BPA (10^{-7} M) 添加について、骨芽細胞のマーカである alkaline phosphatase (ALP) mRNA の変動を経時的 (24、48、72 時間) に定量的 PCR で確認したところ、24 時間添加から既に有意な増加を示した。

マイクロアレイの結果から、変動が大きかった遺伝子の中に、RAS family に関連する遺伝子が 5 つ含まれた [RAB40C (RAS oncogene family), RAB39 (RAS oncogene family), RHEBL (RAS homolog enriched in brain like 1), RIN3 (RAS and RAB interact 3), RHEB (RAS homolog enriched in brain)]。さらに collagen type13 も増加した。これらのうち RAB40C, RAB39, RHEB は E2 添加でも 2 倍以上の変動を認め、定量的 PCR にて、bisphenol A 添加によるこれら遺伝子の増加を確認した。

SXR との関連についての解析では、hFOB での検討では、RIF (10^{-5} M) 添加によって有意な CYP3A4 promoter の活性 (溶媒対照と比して約 8 倍) が認められた。さらに BPA (10^{-6} 及び 10^{-5} M) 添加によっても有意な活性 (約 3–5 倍) が認め

られた。E2 添加では高濃度 (10^{-6} M) でのみ有意な活性 (約 4 倍) を認めた。MG-63 においても、BPA による有意な活性 (約 3 倍) を認めた。SXR の免疫組織化学では、検討した全ての症例で、その発現を認めた。この SXR 陽性細胞は、骨芽細胞のマーカである alkaline phosphatase を発現していた。

2. diethylstilbestrol の影響

DES (10^{-8} – 10^{-6} M) の影響を経時的 (2, 4, 8, 12, 24hr) に確認した。 10^{-8} M では 24hr で有意な細胞数の減少を認めた。 10^{-7} M では 8hr から有意な減少を認めた。 10^{-6} M では 2hr から細胞死が認められ、8hr 以降、ほとんどの細胞が死んでしまい、測定できなかった。DES 添加後 (10^{-7} M, 2, 4, 8, 12, 24hr) の細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、添加 4 時間後から DNA ラダー像が検出できた。同様に骨芽細胞にアポトーシスを起こすことが知られている dexamethason (Dex; 10^{-7} M) でも DNA ラダー像が確認できたが、GEN (10^{-5} M) や BPA (10^{-5} M) では変化がなかった。さらに Dex による AP は GR blocker (RU386) で抑制できたが、DES による AP は RU386 と同様に ER blocker (ICI) でも抑制できなかった。

マイクロアレイの結果ではアポトーシスに関連が深い GDF15/NAG-1 の発現に注目し、定量的 PCR にて確認を行った。DES の添加 4 時間後から GDF15 mRNA の増加が認められた。GDF15 の強力な誘導剤の diclofenac (10^{-6} M) でも同様の変化が認められた。

D. 考察

近年、内分泌かく乱化学物質の骨組織への影

響は魚類や爬虫類で注目されつつあり (Suzuki and Hattori, 2003, *Life Sci*; Lind et al., 2004, *Environ Health Perspect*)、さらに、Tsukamoto ら (2004, *Biochem Pharmacol*) はトリブチルスズ化合物の添加によってマウス胎児の骨形成が妨げられることを示した。このことはヒトを含めたほ乳類の骨組織に内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼす可能性を示唆している。

本研究では、BPA の骨芽細胞増殖作用がエストロゲン受容体を介さないことが確認された。そこで、本研究では BPA による骨芽細胞の増殖機序として、SXR に注目した。SXR は主に肝臓及び小腸に発現する他、我々は腎臓、肺及び大腸にも発現することを報告してきた (笹野, 平成 14 年度井上班会議, 2003 ; Miki et al., 2005, *Mol Cell Endocrinol*)。また、ヒト乳癌での検討では、SXR の発現が癌の増殖と進展に関与する可能性を示唆した (Miki et al., 2006, *Cancer Res*)。近年、Tabb ら (2003, *J Biol Chem*) は骨芽細胞様細胞 (MG-63) を用い、SXR を介したビタミン K₂ の作用を報告しており、さらに 2006 年に Ichikawa ら (2006, *J Biol Chem*) は、ビタミン K₂ が SXR を介してコラーゲン蓄積に重要な遺伝子 (tukushi) を増加させることを報告した。以上のことから、骨芽細胞における SXR を介した細胞増殖経路が骨組織の維持に重要な働きを担っていると考えられる。BPA が SXR に結合し得ることは既に報告 (Takeshita et al., 2001, *Eur J Endocrinol*) されており、本研究で確認した BPA による細胞増殖刺激は、ビタミン K₂ と同様に SXR を介するものと示唆される。

今回、Ras oncogen family, Rab とその関連遺伝子の発現が BPA の添加によって増加した。Ras 遺伝子は cell cycle control に関与することで有

名であるが、RAB については、vesicle transport に関係することが報告されている以外、正常、病態組織での意義は不明である (Review in Oxford & Theodorescu, 2003, *Cancer Lett*; Wennerberg et al., 2005, *J Cell Sci*) ため、骨芽細胞数の増加との関係は今後の検討課題である。また、BPA は骨芽細胞の増殖に関連することが知られている collagen type13 (Ylönen et al., 2005, *J Bone Miner Res*) の発現を増加させ、増殖刺激を促していると示唆された。SXR とこれら遺伝子の関係を本研究では明らかにすることはできなかったが、BPA の骨芽細胞への影響を明らかにする上で、重要な今後の検討課題であると考えられる。

一方、DES 添加ではアポトーシスを示したが、これも受容体非依存的な作用であった。この時、非ステロイド抗炎症剤 (NSAIDs) の Diclofenac と同様に GDF15/NAG-1 を介した経路が関係すると示唆された。GDF15/NAG-1, Growth Differentiation Factor 15 / Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-activated Gene-1 は、NSAIDs によって誘導され、種々細胞にアポトーシスを起こすことが報告されている (Kim et al., 2002, *Gastroenterology*; Wilson et al., 2003, *Int J Cancer*; Jung et al., 2004, *Carcinogenesis*)。

内分泌かく乱化学物質のヒト骨組織での健康被害の報告例は無いが、過去には DES に暴露した子供や (Wattenhall et al., 1975, *J Pediatr*)、エストロゲン・クリーム (Estradiol K; 製品に関する詳細は不明) を使用していた妊婦の男児 (Felner and White, 2000, *Pediatrics*) の骨格成長が促進したと報告されている。骨格系への影響は、種々のホルモンが関与しており、これらの結果が必ずしも骨細胞への直接影響を示す訳で

は無い。また、血液透析に用いられるダイアライザーや血液回路などの医療器具にはポリ塩化ビニール樹脂やポリカーボネートを素材とするものも多く、そこから溶出するビスフェノール A などの化学物質が体内に運び込まれている可能性を指摘されている（菅野ら、2000 年、日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究会、横浜市）。近年、polymethylmethacrylate が椎骨圧迫骨折の治療に用いられており、骨組織に直接、化学物質が接触することが医療的に生じている。このことから、今後、内分泌かく乱化学物質を含めた化学物質の骨組織への影響を検討し、明らかにすることが必要であると考えられる。

今回の研究では、エストロゲン様化合物が直接骨芽細胞に影響を与えることを示した。また、同じエストロゲン様化合物に分類されているものでも、骨芽細胞に対しては全く異なる作用を介した影響を与えることが確認できた。

E. 結 論

ヒト骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対して種々の内分泌かく乱物質の与える影響を検討する本研究では内分泌かく乱化学物質がヒト成人骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであった。またその影響は化合物によって質的な差を示した。

内分泌かく乱化学物質は胎児組織、生殖器系（生殖能）、神経系に対しては重要な影響をおこす事が報告され、その健康被害に注目されている。同じく重要な性ステロイド標的組織である成人骨組織に対する影響は、他種の生物への影響から推測されているが、科学的な検証は殆ど行われていない。今回の研究では内分泌かく乱物質のヒト骨芽細胞に対しての影響の一部を明

らかにすることができたが、今後、さらなるメカニズムについて詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishizuka M, Hatori M, Suzuki T, Miki Y, Darnel AD, Tazawa C, Sawai T, Uzuki, M, Tanaka Y, Kokubun S, Sasano H. Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clinical science(London, England)*.106:293-300.2004
2. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The Orphan Nuclear Receptors NURR1 and NGFIB Regulate Adrenal Aldosterone Production. *Molecular Endocrinology*18:279-290.2004
3. Murakami M, Aoyama M, Suzuki T, Sasano H, Nakayama S, Iijima T. Genetic characterization of a new splice variant of the beta2 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Molecular and Cellular Biochemistry*.254:217-225.2003
4. Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Koide H, Shigeta A, Ichikawa T, Sasano H, Saito Y. Vasopressin responsiveness of subclinical Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clinical Endocrinology (Oxf)*.60:192-200.2004
5. Inoue T, Sasano H. Possible effects of progesterone on human central nervous system and neurogenic tumors. *Journal of Endocrinological Investigation*. 27:76-79.2004

6. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Saruta M, Nakabayashi M, Suzuki T, Sasano H, Shibahara S. Expression of urocortin III/stresscopin in human heart and kidney. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89:1897-1903.2004
7. Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Seminars in Reproductive Medicine*. 22:5-9.2004
8. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clinical Cancer Research*. 10:2687-2693.2004
9. Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H. Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 218:147-153.2004.
10. Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, Tazawa C, Senzaki K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 219:17-26.2004
11. Akahira JI, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 90:2197-2202.2004.
12. Urano T, Takahashi S, Suzuki T, Fujimura T, Fujita M, Kumagai J, Horie-Inoue K, Sasano H, Kitamura T, Ouchi Y, Inoue S. 14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Commun*. 319:795-800.2004
13. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, De Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE. The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase: Implications for the control of adrenal functional zonation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:37622-37630.2004
14. 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
15. Deb S, Amin S, Imir AG, Yilmaz MB, Suzuki T, Sasano H, Bulun SE. Estrogen regulates expression of tumor necrosis factor receptors in breast adipose fibroblasts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89:4018-4024.2004
16. Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H. Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89:4113-4118.2004

18. Utsunomiya H, Ito K, Suzuki T, Kitamura T, Kaneko C, Nakata T, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma. *Clinical Cancer Research*.10:5850-5856.2004
19. Saner KJ, Suzuki T, Sasano H, Pizzey J, Ho C, Strauss JF 3rd, Carr BR, Rainey WE. Steroid sulfotransferase (SULT2A1) gene transcription is regulated by steroidogenic factor 1 (SF1) and GATA-6 in the human adrenal. *Molecular Endocrinology*.19:184-197.2004
20. Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T, Iijima T. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha(1) subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Research*.1024:122-129.2004
21. Oki Y, Sasano H. Localization and physiological roles of urocortin. *Peptides*.25:1745-1749.2004
22. Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Torii A, Kawakami M, Sasano H. Urocortin 1 in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.89:5352-5361.2004
23. 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 Atheroprotection, Revealed by Microarray Analysis. *American Journal of Pathology*.165:2019-2031.2004
24. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Sasano H, Mizuguchi H, Asano T, Oka Y. Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.326:402-409.2005
25. Sato S, Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Suzuki T, Sasano H, Krozowski Z, Shibata C, Sasaki I. Induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and hyperaldosteronism are essential for enhanced sodium absorption after total colectomy in rats. *Surgery*.137:75-84.2005
26. Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, Sasano H, Clyne CD. Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Research*:65:657-663. 2005
27. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B, Sasano H Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 231:75-85. 2005
28. Cunat S, Rabenoelina F, Daures JP, Katsaros D, Sasano H, Miller WR, Maudelonde T, Pujol P. Aromatase expression in ovarian epithelial cancers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.93:15-24.2005

29. Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. 3beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in human aorta. *Endocrine Journal*.52:111-115.2005
30. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Ishizuka M, Semba S, Gorai I, Sasano H. Analysis of gene expression induced by diethylstilbestrol (DES) in human primitive Mullerian duct cells using microarray. *Cancer Letters*.220:197-210.2005
31. Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Nakamura Y, Suzuki T, Sasano H. Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and Ad4BP/SF-1, in human common epithelial ovarian tumors: correlations with StAR and steroidogenic enzymes in epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*.24:153-63.2005
32. Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H. In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2005 12:101-107.2005
33. Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. StAR and progesterone producing enzymes (3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cholesterol side-chain cleavage cytochromes P450) in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and real-time PCR studies. *Cancer Science*.96:232-239. 2005
34. Nakamura Y, Suzuki T, Sasano H. Estrogen actions and in situ synthesis in human vascular smooth muscle cells and their correlation with atherosclerosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.93:263-268.2005
35. Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Ono K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. *Endocrine Journal*. 52:245-252.2005
36. Seely J, Amigh KS, Suzuki T, Mayhew B, Sasano H, Giguere V, Laganriere J, Carr BR, Rainey WE. Transcriptional regulation of Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase (SULT2A1) by Estrogen-Related Receptor {alpha} (ERR{alpha}). *Endocrinology*.146:3605-3613.2005
37. Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T, Sasano H. Urocortin 1, Urocortin 3/Stresscopin and Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Human Adrenal and Its Disorders. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.90:4671-4678.2005
38. Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H. Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides*.26:1196-1206.2005
39. Kariya Y, Moriya T, Suzuki T, Chiba M, Ishida K, Takeyama J, Endoh M, Watanabe M, Sasano H. Sex steroid hormone receptors in human skin appendage and its neoplasms. *Endocrine Journal*.52:317-325.2005

40. Sasano H, Anderson TJ, Silverberg SG, Santen RJ, Conway M, Edwards DP, Krause A, Bhatnagar AS, Evans DB, Miller WR. The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry-A correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.95:35-39.2005
41. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, Moriya T, Hayashi S, Handa M, Kondo T, Sasano H. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer--a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Research*.65:6450-6458.2005
42. Takahashi K, Totsune K, Saruta M, Fukuda T, Suzuki T, Hirose T, Imai Y, Sasano H, Murakami O. Expression of urocortin 3/stresscopin in human adrenal glands and adrenal tumors. *Peptides*.27:178-182 2006
43. Fukushima K, Funayama Y, Yonezawa H, Takahashi K, Haneda S, Suzuki T, Sasano H, Naito H, Shibata C, Krozowski ZS, Sasaki I. Aldosterone enhances 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in colonic epithelial cells in vivo. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.40:850-857.2005
44. Sakuma M, Akahira JI, Suzuki T, Inoue S, Ito K, Moriya T, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*.99:664-670.2005
45. Watanabe S, Suzuki T, Shizawa S, Endoh M, Tabayashi K, Sasano H. Heparin accelerates pulmonary artery development in neonate rabbits. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*.207:171-179.2005
46. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 11:6148-6154.2005
47. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Nakata T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Estrogen Inhibits Cell Proliferation through In situ Production in Human Thymoma. *Clinical Cancer Research*. 11:6495-6504.2005
48. Takahashi K, Arihara Z, Suzuki T, Sone M, Kikuchi K, Sasano H, Murakami O, Totsune K. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides*.27:871-877 2005
49. Saito S, Ito K, Suzuki T, Utsunomiya H, Akahira J, Sugihashi Y, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Orphan nuclear receptor DAX-1 in human endometrium and its disorders. *Cancer Science*.96:645-652.2005
50. Ito K, Suzuki T, Akahira J, Sakuma M, Saitou S, Okamoto S, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H, Inoue S. 14-3-3 σ in Endometrial Cancer-A Possible Prognostic Marker in Early-Stage Cancer. *Clinical Cancer Research*.11:7384-7391.2005

51. Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, Matsuda Y, Suzuki T, Krozowski ZS, Sasano H, Kondo T. Inflammatory Mediators Down-Regulate 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in a Human Lung Epithelial Cell Line BEAS-2B and the Rat Lung. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*.207:293-301.2005
52. Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocrine Journal*.52:605-611.2005
53. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H. Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocrine Related Cancer*.12:701-720.2005
54. Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, Imai Y, Murakami O, Totsune K. Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides*. 27:1383-1389.2005
55. Miki Y, Suzuki T, Kitada K, Yabuki N, Shibuya R, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Blumberg B, Sasano H. Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. *Cancer Research*.66:535-542.2006
56. Suzuki T, Miki Y, Fukuda T, Nakata T, Moriya T, Sasano H. Analysis for localization of steroid sulfatase in human tissues. *Methods in Enzymology*.400:303-316.2005
57. Ito K, Utsunomiya H, Suzuki T, Saitou S, Akahira JI, Okamura K, Yaegashi N. Sasano H. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium and its disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*.248:136-140.2006
58. Miki Y, Clyne CD, Suzuki T, Moriya T, Shibuya R, Nakamura Y, Ishida T, Yabuki N, Kitada K, Hayashi SI, Sasano H. Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: Possible regulator of insitu steroidogenesis. *Cancer Letters*. 244:24-33.2006
59. Sasano H, Suzuki T. Pathological evaluation of angiogenesis in human tumor. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.59:334-336.2005
60. Murakami M, Matsui H, Shiraiwa T, Suzuki T, Sasano H, Takahashi E, Kashiwayanagi M. Decreases in Pheromonal Responses at the Accessory Olfactory Bulb of Mice with a Deficiency of the alpha(1B) or beta3 Subunits of Voltage-Dependent Ca(2+)-Channels. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*.29:437-442.2006
61. Nakamura Y, Suzuki T, Fukuda T, Ito A, Endo M, Moriya T, Arai Y, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human prostate cancer. *The Prostate*.66:1005-1012.2006
62. Ito O, Nakamura Y, Tan L, Ishizuka T, Sasaki Y, Minami N, Kanazawa M, Ito S, Sasano H, Kohzuki M. Expression of cytochrome P-450 4 enzymes in the kidney and liver: Regulation by PPAR and species-difference between rat and human. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 284:141-148.2006

63. Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Sugawara A, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocrine Related Cancer*.13:233-250.2006
64. Sakurai N, Miki Y, Suzuki T, Watanabe K, Narita T, Ando K, Yung TM, Aoki D, Sasano H, Handa H. Systemic distribution and tissue localizations of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 99:174-181.2006
65. Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. *Journal of Pathology*. 209:522-531.2006
66. Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer*.13:129-136.2006
67. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science*.312:1656-1659.2006
68. Cheng YH, Imir A, Suzuki T, Fenkci V, Yilmaz B, Sasano H, Bulun SE. SP1 and SP3 Mediate Progesterone-Dependent Induction of the 17 β Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Gene in Human Endometrium. *Biology of reproduction*.75:605-614.2006
69. Nakamura Y, Shimada N, Suzuki T, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H. In situ androgen production in human gastric carcinoma— androgen synthesizing and metabolizing enzymes. *Anticancer Res*.26:1935-1939. 2006
70. Ota K, Ito K, Suzuki T, Saito S, Tamura M, Hayashi S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and growth inhibition by its ligands in uterine endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res*;12:4200-4208.2006
71. Sasano H, Suzuki T. Chemoprevention of breast cancer among Asian women-its perspective and problems. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 60:266-268.2006
72. Nakamura Y, Suzuki S, Suzuki T, Ono K, Miura I, Satoh F, Moriya T, Saito H, Yamada S, Ito S, Sasano H. MDM2: A Novel Mineralocorticoid-Responsive Gene Involved in Aldosterone-Induced Human Vascular Structural Remodeling. *The American journal of Pathology*.169:362-371.2006
73. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Sasano H, Oka Y. Cold exposure suppresses serum adiponectin levels through sympathetic nerve activation in mice. *Obesity* 14:1132-1141. 2006

74. Saito S, Ito K, Nagase S, Suzuki T, Akahira JI, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Progesterone receptor isoforms as a prognostic marker in human endometrial carcinoma. *Cancer science*. 97:1308-1314.2006
75. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira JI, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi SI, Sasano H. 5alpha-reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *International journal of cancer*.120:285-291.2007

H. 知的所有権の取得状況

特になし

H16-18 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

核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御への影響に関する研究

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所

研究要旨

内分泌かく乱化学物質が性生殖へ影響を及ぼす作用点の一つには、性ステロイドホルモン作用のかく乱が考えられている。本研究では、核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、内分泌かく乱化学物質の作用点を明らかにする。具体的には、男性、女性ホルモンレセプターの転写共役因子を同定するとともに、ダイオキシンレセプターの相互作用を解析した。その結果、ダイオキシンレセプターがホルモンレセプターと直接相互作用すること、さらに男性、女性ホルモンレセプターのユビキチン依存性分解を促進することで、女性ホルモン・男性ホルモン作用がかく乱されることが明らかになった。

A. 研究目的

低容量内分泌かく乱化学物質の性生殖へ影響を及ぼす作用点を分子レベルで解明する。すなわち、性生殖作用を担う性ステロイドホルモン作用へのかく乱効果を、ホルモンレセプターの転写制御機能について調べる。これまで継続してきた性ホルモンレセプター共役因子群の同定に加え、ダイオキシンレセプターを介した女性ホルモン・男性ホルモンレセプターへの影響について検討した。

B. 研究方法

男性ホルモン、女性ホルモンレセプターの転写機能を担う転写共役因子の同定及びダイオキシンレセプターとのクロストークを検討した。すなわち、性ホルモンレセプター群に結合する転写共役因子複合体を、生化学

的に精製及びその構成因子群を同定する。また、複合体としての機能を *in vitro* 系で評価する。また、ダイオキシンレセプターとの機能的相互作用を転写レベルで検討する。

C. 研究結果

男性ホルモン及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子のいくつかを同定した。また、ダイオキシンレセプターが女性ホルモンレセプターと核内で直接結合し、蛋白分解経路を制御することを見出した。すなわち、

1) ホルモン活性を規定するレセプター

転写共役因子の検索及び同定

女性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子複合体として、RNA のスプライシングに参与する複合体の構成因子

である SF3a p120 を含む新規転写共役因子複合体を同定した。この複合体は、女性ホルモンレセプターN 末端側の転写促進領域に Ser¹¹⁸ のリン酸化を認識して特異的に結合し、転写機能を活性化することが分かった。また、この複合体は、女性ホルモンレセプター依存的な RNA のスプライシングにも関与し、それには女性ホルモンレセプターの Ser¹¹⁸ のリン酸化が必須であることも明らかとなった。

さらに、精子形成に関与することが示唆されているが分子機能未知である因子 RBM が女性ホルモンレセプターの転写共役因子として機能することを見出した。

2) ダイオキシンレセプターを介したエストロゲン作用かく乱の分子メカニズム

ダイオキシンレセプターとエストロゲンレセプターとの関連を検討した結果、活性化されたダイオキシンレセプターが核内に移行し、結果として、女性ホルモンレセプターと会合することを見出した。興味深いことに、エストロゲンが結合していないエストロゲンレセプターは、ダイオキシンレセプター結合により、その転写促進機能が惹起された。一方、エストロゲンが結合した状態では、ダイオキシンレセプターはその機能を抑制することが明らかとなった。また、ダイオキシンレセプターの分解に関する新規複合体の同定に成功した。

さらにこの新規複合体を解析した結果興味深いことに、この複合体はダイオキシンレセプターへのリガンド結合に依存的に、エストロゲンレセプターをユビキチン化することを見出した。ユビキチン化複合体の形成はリガンド依存的であった。従ってダイオキシン

レセプターは、相互作用蛋白の分解促進という全く新規の分子機能を有することが示唆された。現在、複合体形成機構の解析を進めている。

3) 新たな染色体構造調節因子複合体の同定

転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、プローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の3つの転写共役因子複合体に加え、第4の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。更に、この複合体群の中にはヒストンメチル化酵素活性を持つものも見出された。そこで、この酵素活性を指標にこの複合体の精製を行っている。

4) ショウジョウバエを用いた男性、および女性ホルモンレセプター転写共役因子の機能解析

性ホルモンレセプターと転写共役因子との相互作用を *in vitro* 細胞系で解析を行ってきたが、これらの結果は、必ずしも個体での現象を反映しない。そこで、ショウジョウバエにヒト AR, ER を組織特異的に発現する系の構築に成功した。下流のリポーター遺伝子は GFP を用いたので、AR/ER のリガンド依存的な転写機能は GFP の発現に振り替えられるため、結果として蛍光として観察できる。エサに性ホルモンを加えると、GFP に

よる蛍光が観察された。また、このレセプターを介した転写促進能は、ARを強制発現させたいずれの組織においても観察されている。また、ER α の Ser¹¹⁸ のリン酸化が Cdk7 によってなされており、そのリン酸化によって ER の転写活性が増強されていることをショウジョウバエの個体レベルで証明した。

D. 考察

性ホルモンレセプターには、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが分かった。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われる。また、ダイオキシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた。さらに、今回見出した蛋白分解制御のかく乱が様々な内分泌かく乱作用機構につながる可能性は興味深い。

E. 結論

性ホルモンレセプターの転写制御能をレセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、男性及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、それらが内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。また、ダイオキシンレセプターとの会合による新たな性ホルモンかく乱作用を示し、その分子機構としてユビキチン依存的蛋白分解制御を明らかにした。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

2004 年度

©Murayama, A., Kim, M.-S., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S.: Trans-repression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, **23**, 1598-1608, 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.

©Kouzmenko, A., Takeyama, K., Ito, S., Furutani, T., Sawatsubashi, S., Maki, A., Suzuki, E., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Tabata, T., Kato, S.: Wnt/beta -catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40255-40258, 2004.

Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shiode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 262-267, 2004.

- Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shiode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosyl)ation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 268-272, 2004.
- ©Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shiode, 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.
- 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., Shiode, 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.
- 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, K., 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, Y., 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.

Peters, J. M., Kato, S., Gonzalez, F.: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol. Carcino-genesis*, **41**, 77-84, 2004.

Uchida, E., Kagawa, N., Sasaki, T., Urushino, N., Sawada, N., Kamakura, M., Ohta, M., Kato, S., Inouye, K.: Purification and characteraization 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/ β -catenin and estrogen signaling pathways.

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

【国際】

Keystone Symposia

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

S. Kato.

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

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

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

Classes of nuclear receptor coregulatory complexes.

S. Kato.

UT Forum 2004 in Sweden

Transcriptional controls by nuclear receptors.

S. Kato.

Azoospermic factor RBMY functions as a cofactor of ER α .

M. Sakari, S. Kato.

ASBMR 26th Annual Meeting

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

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

Vitamin D Workshop Working Group

The Williams Syndrome and the Vitamin D Receptor.

S. Kato.

2005 年度

©Masuhiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley, B. W., Kato, S.: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, **102**, 8126-8131, 2005.

Fujiki, R., Kim, M., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J.*, **24**, 3881-3894, 2005.

©Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J. Pharm. Experim. Therapeutics*, **315**, 545-552, 2005.

© Ogawa, S., Oishi, H., Mezaki, Y., Kouzu-Fujita, M., Matsuyama, R., Nakagomi, M., Mori, E., Murayama, E., Nagasawa, H., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: Repressive domain of unliganded human estrogen receptor associates with Hsc70. *Genes to Cells*, **10**, 1095-1102, 2005.

Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2236-2239, 2005.

Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res.*