

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

自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤に関する研究

分担研究者 竹田 潔

大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

生体の恒常性維持に重要な役割を果たす免疫系で、自然免疫系の活性化機構が近年明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。この自然免疫系の活性制御機構を解析した。その結果、TLR を介した NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I $\kappa$ BNS と同じ I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ Bzeta を同定した。

また、子どもの自然免疫系の活性を解析するため、2週齢と8週齢のマウスの腹腔マクロファージの機能を解析した。TLR 刺激による TNF- $\alpha$  や IL-6 産生は両週齢のマウス間で差はないが、IL-12 産生は2週齢マウスのマクロファージで有意に低下していた。また、マクロファージの重要な機能である細菌の貪食能も2週齢マウスのマクロファージでやや低下していた。また、貪食後の貪食胞の形成も2週齢マウスのマク

ファージで遅れていた。それに伴い、大腸菌の殺菌能力も2週齢マウスのマクロファージで低下していた。これらの結果は、自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達する可能性を示唆している。

#### A. 研究目的

生体の恒常性維持において、病原体などの外界異物の生体内侵入を非自己として感知し、排除する免疫系が重要な役割を果たしている。この免疫系は、大きく自然免疫系と獲得免疫系から成り立っている。外界異物を抗原として認識するリンパ球を主体とする獲得免疫系の活性化機構がこれまで詳細に解析されてきたのに比して、自然免疫系の活性化機構は永年不明のままであった。しかし、近年、病原体の構成成分を特異的に認識する Toll-like receptor (TLR)の機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになった。そして、TLR による病原体認識が、自然免疫系の活性化のみならず、抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも制御していることが明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、自然免疫系の活性を制御する分子機構を解析し、さらに子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、マウスを用いて解析し、生体の恒常性維持に関わる自然免疫系の活性制御機構を明らかにする。

#### B. 研究方法

自然免疫系の活性制御機構を解析する過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として IkbNS を同定した。そして、IkbNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、IkbNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF- $\kappa$ B の活性を制御することにより抑制していることを見出している。

そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。

また、同じ核に発現する I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ B $\zeta$  の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

また、子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、2週齢と8週齢のマウスの腹腔に存在するマクロファージを用いて解析した。まず、両週齢のマウスの腹腔を Hanks 液で洗浄し、細胞を回収し、CD11b 陽性細胞を単離し実験に用いた。TLR4 リガンドである LPS で刺激し、TNF- $\alpha$ , IL-6 および IL-12p40 の産生を ELISA 法で解析した。次に、これらマクロファージの貪食能を蛍光ラベルした非病原性大腸菌を用いて flowcytometry で比較解析した。また、貪食後の貪食胞の成熟について、貪食胞の pH 測定、Lamp1 の発現集積を指標に、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて解析した。さらに、各マクロファージにおける殺菌能を、非病原性大腸菌の CFU を測定し、解析した。さらに、貪食胞の成熟に関わる細胞内シグナルを伝達する MAP キナーゼ p38 の活性化を western blot 法で、また p38 の標的遺伝子の発現誘導を real time PCR 法で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、

麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

### C. 研究結果

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF- $\kappa$ Bp65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、

MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスしやすい状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスしやすく、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでに I $\kappa$ BNS と同じ核に発現する I $\kappa$ B 分子である I $\kappa$ Bzeta が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示したきた。実際、I $\kappa$ Bzeta

欠損マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。I $\kappa$ Bzeta は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに I $\kappa$ Bzeta を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。I $\kappa$ Bzeta を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、I $\kappa$ Bzeta は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

2週齢と8週齢のマクロファージを LPS 刺激し、TNF- $\alpha$ , IL-6 産生を解析したところ、両週齢のマクロファージ間で差は認められなかった。しかし、IL-12p40 の産生は2週齢マウスのマクロファージで有意に低下していた。非病原性大腸菌の取り込み能を flowcytometry で解析したところ、2週齢マウス由来のマクロファージで低下が認められた。貪食胞の成熟を、電子顕微鏡を用いた Lamp1 の免疫染色解析したところ、Lamp1 の貪食胞膜への集積が2週齢マウスのマクロファージでは不十分であった。また、貪食胞の pH 低下も2週齢マウス由来マクロファージでは障害されていた。このように、2週齢マウス由来マクロファージでは、

細菌の取り込み、およびその後の貪食胞の成熟に障害を認めた。これらの障害に伴い、2週齢マウス由来のマクロファージでは、大腸菌の殺菌能も低下しており、大腸菌の感染後のマクロファージ内の大腸菌の生菌数は2週齢マウスのマクロファージで有意に増加していた。さらに、貪食胞の成熟に関与する細胞内シグナルを伝達する p38 の活性化を p38 のセリン残基のリン酸化を指標に解析したところ、2週齢マウス由来マクロファージでは、5分後のリン酸化誘導が8週齢マウス由来マクロファージに比較すると有意に低下していることが明らかになった。また、p38 の標的遺伝子でマクロファージの貪食に関わる SR-A や LOX-1 遺伝子の大腸菌感染による発現誘導も、2週齢マウス由来マクロファージでは低下していた。

#### D. 考察

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変

換に IkBzeta が関与することも明らかになった。しかし、IkBzeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IkBzeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行っていききたい。

2週齢、8週齢マウスの腹腔マクロファージを用いた解析から、子どものマクロファージでは、貪食能が有意に低下していることが明らかになった。獲得免疫系に比べて原始的な自然免疫系も、獲得免疫系に属するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達していくことが示された。

#### E. 結論

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。また、2週齢のマウスのマクロファージでは、貪食能の発達が不十分であることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh,

- T., Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
2. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi, N.: STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
3. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 132, 176-189 (2007).
4. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).
5. Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962-970 (2006).
6. Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 - 874 (2006).
7. Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553-2563 (2006).
8. Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia

- through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435–1440 (2006).
9. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615–622 (2006).
10. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148–154 (2006).
11. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8<sup>+</sup> and TCR<sup>g</sup> intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180–6185 (2006).
12. Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267–75 (2006).
13. Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995–4002 (2006). Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166–173 (2006).

14. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773–2780 (2006).
15. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IkbNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41–51 (2006).
16. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105–113 (2006).
17. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042–6049 (2005).
18. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087–1095 (2005).
19. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042–6049 (2005).
20. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673–675 (2005).
21. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175,



- 3354–3359 (2005).
22. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19–28 (2005).
23. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412–421 (2005).
24. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137–5143 (2005).
25. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956–1964 (2005).
26. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177–1183 (2005).
27. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023–2033 (2005).
28. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly

- induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
29. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
30. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
31. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
32. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
33. Hirotsani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
34. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
35. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
36. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang,

- X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
37. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
38. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
39. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197-3207 (2004).
40. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-1762 (2004).
41. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
42. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory

- for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
43. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
44. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
45. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear I $\kappa$ B proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007.10.25, Sendai, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10.29, Tsukuba, Japan
3. 竹田潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会、2007.10.12、長崎
4. Kiyoshi Takeda, Lipocalin 2 mediates host defense against Mycobacterial infection. 42th US-Japan Conference on Tuberculosis and leprosy, 2007.9.11-14, Henan, China
5. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会、2007.8.2、東京
6. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan
7. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and leprosy research conference, 2006.7.19-21, Kagoshima, Japan
8. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006.6.1, San Francisco, USA
9. Kiyoshi Takeda, Nuclear I $\kappa$ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
10. 香山尚子、竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集

- 会、2006.12.11-13、大阪
11. 財賀大行、竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
  12. 古賀律子、竹田潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪
  13. 竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第 59 回日本寄生虫学会、2006.10.28、福岡
  14. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構(シンポジウム), 第 2 回食品免疫学会、2006.10.23、東京
  15. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構(特別講演), 第 43 回補体シンポジウム、2006.8.19、福岡
  16. 竹田潔, 粘膜免疫の今後の展望(イブニングセミナー), 第 43 回日本消化器免疫学会総会、2006.8.3-4、青森
  17. 竹田潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会、2006.7.13-14、東京
  18. 竹田潔, I 型 IFN による細胞内寄生性原虫の感染防御機構, 第 71 回インターフェロンサイトカイン学会、2006.7.7-8、兵庫
  19. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
  20. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
  21. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear I $\kappa$ B proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
  22. 竹田 潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第 78 回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京
  23. 竹田潔, Toll-like receptor と結核感染(シンポジウム)第 80 回日本結核病学会、2005.5.12-13、埼玉
  24. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構(ワークショップ、招待講演)第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡
  25. 竹田潔, Toll-like receptor を介した自然

- 免疫系の制御(特別講演)第45回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
26. 竹田潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患(シンポジウム、招待講演)第42回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
27. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium)第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
28. 桑田啓貴、竹田潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
29. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
30. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
31. 竹田潔, IκBNSによる自然免疫系の活性制御と消化管炎症(シンポジウム、招待講演), 第79回日本薬理学会年会、2006.3.9、横浜
32. 竹田潔, 脊椎動物の自然免疫系の活性制御機構(シンポジウム、招待講演), 第141回日本獣医学会学術集会、2006.3.21、つくば
33. 竹田潔, 細胞内寄生菌に対する宿主自然免疫応答の分子機構(シンポジウム、招待講演), 第79回日本細菌学会総会、2006.3.29、金沢

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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

子どもに対する化学物質曝露影響の内分泌的観点からの解明

分担研究者 渡邊 肇

自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教授

研究要旨

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なり、胎仔期や子どもへのホルモン様化学物質の曝露は標的器官において不可逆的な影響を及ぼす事が知られている。本研究では、マウスをモデルとして新生仔期にホルモン様作用を有する化学物質の曝露を行い、その内分泌学的影響について遺伝子発現変化のレベルから解析を行った。ゲノミクス解析の導入により、新生仔期にホルモン影響を受ける遺伝子の探索を行い、これら遺伝子の一部は成熟期まで発現が変化していることを明らかにした。さらにこの分子メカニズムを明らかにするためにエピジェネティックな変化からの解析を行った。

A. 研究目的

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なることが知られており、胎児期を含む子どもへの化学物質曝露は不可逆的な影響を及ぼす事が懸念されている。本研究では、マウスをモデルとして胎仔期、新生仔期にホルモンまたは化学物質曝露を行い、その内分泌学的影響について解析を行う。

マウス新生仔期のホルモン作用による悪影響は比較的多数の報告があるが、その作用機序はいまだ不明であり、的確なリスク評価ができていない。マウスを用いて胎仔期、新生仔期のホルモン影響解明し、その長期的な悪影響に至る過程を解明することにより、化学物質によるリスクに関して総合的な評価をするための知見を得る。

B. 研究方法

本研究では、周生期の化学物質曝露により通常ホルモン制御から逸脱する際の作用メカニズムについて、膈上皮への影響を中心に遺伝子レベルからの解明を行う。

まず、マウスの新生仔期にエストロゲン曝露を行い、発達段階に応じたマウス膈における遺伝子発現プロファイルを取得する。解析段階としては、出生直後、臨界期直後、思春期前、成熟後の4点を基本とする。それぞれの段階で、新生仔期に曝露群と対照群において発現レベルが異なっている遺伝子を明らかにする。

さらに、発現レベルが異なっていた遺伝子について、発達段階を追って発現を解析することにより、発現異常が見出される時期を特定し、遺伝子発現異常に至る要因を特定する。この解析には主として、遺伝子をコードしている DNA 自体の解

析とそれに作用する因子の解析を行う。前者については、DNA のメチル化を中心として、恒常的に遺伝子発現に影響を及ぼす変化が生じている可能性について検討を加える。

後者については、化学物質曝露により発現が大きく異なる転写関連因子について検討を加えるとともに、クロマチン構造の変化などエピジェネティックな変化について解析を行う。これらの解析から新生仔期のホルモン曝露により恒常的に遺伝子発現に影響を及ぼす分子メカニズムについて明らかにする。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた実験においては、自然科学研究機構動物実験委員会の「自然科学研究機構における動物実験に関する指針」に準拠した。(使用する動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法を用いた。)

### C. 研究結果

マウスの成育過程におけるエストロゲンの影響を明確にするために、様々な生育段階にあるマウスにエストロゲン(DES)を投与し、雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生仔期(0日、5日)と成熟期(70日)ではエストロゲン曝露による初期応答遺伝子が子宮や膣において大きく異なることが明らかになった。

一方で、新生仔期のエストロゲン曝露を5日間行った場合、成熟期にエストロゲン非依存的な膣上皮の増殖を確認できた。この場合、5日間曝露後のエストロゲン応答遺伝子は、初期応答遺伝子に比べてその応答遺伝子数が増加していることが明らかになった。さらに、これら新生仔期にエストロゲン応答した遺伝子の一部は、その活性化状

態が成熟期まで続くことが明らかになった。こうした長期的な遺伝子発現変化に関する要因として、エピジェネティックな変化が考えられたため、発現変化が顕著な遺伝子の制御領域を中心として、ゲノムレベルでのメチル化、ヒストンの修飾状態の解析を進めている。

一連の解析から、膣で特異的にメチル化されている遺伝子などを同定しており、これら遺伝子が個体の発生、発達段階でどのようなエピジェネティックな変化をうけているのか、解析を進めている。

### D. 考察

エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエストロゲンを産生するのは思春期以降である。思春期以前のエストロゲン受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。しかし本研究の結果、新生仔期にエストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていること、さらに新生仔期の遺伝子発現状態の変化が成熟期まで続くことが示された。すなわち、臨界期(出生5日以内)においてエストロゲンに応答する遺伝子の一部は、その発現制御において長期的な影響をうけ、これにより、最終的に不可逆的な影響が引き起こされる可能性が考えられた。

マウスの新生仔期によるエストロゲン影響は既に多くの報告があるが、不可逆的な影響を受けるのは、出生後一定の期間に限定される。こうした感受性の高い期間は臨界期とよばれ、膣上皮のエストロゲン非依存的な増殖は、出生後5日以内にエストロゲン曝露があると誘発される。こうした臨界期のメカニズムについては不明であったが、本研究によりエストロゲン曝露によりエピジェネティク



クなプログラムに変化が生じている可能性が示唆された。

## E. 結論

マウスの新生仔期のエストロゲン曝露による影響を遺伝子発現レベルの変化から解析した。すなわち、エストロゲンが不可逆的な影響を及ぼしうる出生直後の臨界期に、エストロゲンに応答する遺伝子の一部は、その発現が長期的に継続し、成獣でもその遺伝子発現レベルが上昇していた。これら新生仔期特異的にエストロゲンに応答する遺伝子は、エピジェネティックな影響により発現が変化している可能性が高く、現在その解析を進めている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Watanabe H, Tatarazako N, Kato Y, Oda S, Iguchi T.

Transcriptome profiling in crustacean as a tool for ecotoxicogenomics

Cell Biology and Toxicology (2007) (in press)

- 2) Suzuki A, Urushitani H, Watanabe H, Sato T, Iguchi T, Kobayashi T, Ohta Y. Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland.

Journal of Veterinary Medical Science (2007) 69:725-31.

- 3) Kato Y, Kobayashi K, Oda S, Tatarazako N, Watanabe H and Iguchi T. Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. Journal of Endocrinology (2007) 193:183-194

- 4) Iguchi, T., Y. Katsu, T. Horiguchi, H.

Watanabe, B. Blumberg and Y. Ohta: Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of imposex in gastropods and adipogenesis in vertebrates. Mol. Cell. Toxicol., 3: 1-10, 2007.

- 5) Watanabe H., Takahashi E., Nakamura Y., Oda S., Tatarazako N. and Iguchi T.

Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals.

Environmental Toxicology and Chemistry (2007) 26:669-76

- 6) Suzuki A., Urushitani H., Sato T., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T.

Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol in utero.

Experimental Biology and Medicine (2007) 232-503-14

- 7) Kabe Y., Ohmori M., Shinouchi K., Tsuboi Y., Hirao S., Azuma M., Watanabe H., Okura I. and Handa H.

Porphyrins Accumulate in Mitochondria via 2-oxoglutarate Carrier

Journal of Biological Chemistry (2006) 281:31729-35

- 8) Grun F., Watanabe H., Zamanian Z., Maeda L., Arima K., Cubacha R., Gardiner D.M., Kanno J., Iguchi T. and Blumberg B.

Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Molecular Endocrinology (2006) 20:2141-55

- 9) Kobayashi M., Takahashi E., Miyagawa S., Watanabe H. and Iguchi T.

Chromatin immunoprecipitation-mediated

- target identification proved aquaporin 5 is regulated directly by estrogen in the uterus. *Genes to Cells* (2006) 11:1133-43
- 10) Kato H, Naito K, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T.  
Ontogenic expression of estrogen receptor- $\alpha$  in female rat corneas. *Ophthalmic Research* (2006) 38:361-5
- 11) Kato H., Furuhashi T., Tanaka M., Katsu Y., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T.  
Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reproductive Toxicology* (2006) 22:20-29.
- 12) Ogura Y., Azuma M., Tsuboi Y., Kabe Y., Yamaguchi Y., Wada T., Watanabe H. and Handa H.  
TFII-I down-regulates a subset of estrogen-responsive genes through its interaction with an initiator element and estrogen receptor  $\alpha$ . *Genes to Cells*. (2006) 11:373-81.
- 13) Suzuki A., Watanabe H., Mizutani T., Sato T., Ohta Y. and Iguchi T.  
Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages. *Experimental Biology and Medicine* (2006) 231:632-40.
- 14) Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T.  
Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*. (2006) 63:1477-84
- 15) Watanabe H., Takahashi E., Kobayashi M., Goto M. and Iguchi T.  
The estrogen-responsive adrenomedullin gene identified by DNA microarray analysis is directly regulated by estrogen receptor  
*Journal of Molecular Endocrinology* (2006) 36:81-9
- 16) Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T.  
Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere*. (2005) 61:1168-74.
- 17) Watanabe H., Tatarazako N., Oda S., Nishide H., Uchiyama I., Morita M., and Iguchi T.  
Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome*. (2005) 48:606-9.
- 18) Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T.  
Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. *Chemosphere*. (2005) 60:74-8
- 19) Shimizu N., Ouchida R., Yoshikawa N., Hisada T., Watanabe H., Okamoto K., Kusuhara M., Handa H., Morimoto C. and Tanaka H.  
HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005) 102:8555-60.
- 20) Sone K., Hinago M., Itamoto M., Katsu Y., Watanabe H., Urushitani H., Tooi O., Guillette L.J. Jr. and Iguchi T.

- Effects of an androgenic growth promoter 17beta-trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *General and Comparative Endocrinology* (2005) 143:151-60.
- 21) Ohtsu Y., Ohba R., Imamura Y., Kobayashi M., Hatori H., Zenkoh T., Hatakeyama M., Manabe T., Hino M., Yamaguchi Y., Kataoka K., Kawaguchi H., Watanabe H. and Handa H. Selective ligand purification using high-performance affinity beads *Analytical Biochemistry* (2005) 338:245-52
- 22) 井口泰泉、菊池直香、渡邊肇:環境化学物質とエピジェネティクス. *細胞工学*, 26: , 2007. (印刷中)
- 23) 井口泰泉、渡邊肇、勝義直:3章 環境物質の内分泌現象. シリーズ21世紀の動物科学10. 内分泌と生命現象、長濱嘉孝・井口泰泉共編. 77-115, 2007.
- 2.学会発表
- 1) Kato, Y., T. Baba, K. Kobayashi, Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Molecular cloning of a putative membrane ecdysteroid receptor from the crustacean, *Daphnia magna*. *Electro-Chemical Signaling by Membrane Proteins - Biodiversity and Principle*. March 14-16, 2007, Okazaki Conference Center.
- 2) Iguchi, T., H. Watanabe, Y. Ohta and B. Blumberg: Developmental effects of chemicals: TBT-induced adipogenesis and DES-induced persistent vaginal changes in mice. 4<sup>th</sup> Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters. May 28-31, 2007, University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.
- 3) Iguchi, T., H. Watanabe, Y. Kato and N. Tatarazako: Toxicogenomics, Risk Assessment and *Daphnia magna*. *Daphnia Genomics Consortium 2007*, June 7-9, 2007, Indiana University, USA.
- 4) Kato, Y., Baba, T., Kobayashi, K., Katsu, Y., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Molecular cloning of a putative membrane ecdysteroid receptor from the crustacean, *Daphnia magna*. 第37回生理研国際カンファレンス 2007. 岡崎カンファレンスセンター, 2007年3月.
- 5) Kato, Y., Kobayashi, K., Colbourne, J.K., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Cloning and characterization of three DM domain genes from the water flea, *Daphnia magna*. *The Daphnia Genomics Consortium Meeting 2007*, Indiana, USA, 2007年7月.
- 6) 加藤泰彦 小林かおる 勝義直 渡邊肇 井口 泰泉: ミジンコにおける脱皮ホルモン膜受容体オーソログの単離と発現解析. 日本動物学会第78回大会, 弘前, 2007年9月.
- 7) Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. 第32回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム・第8回日本比較3学会合同シンポジウム. 日光, 2007年10月.
- 8) Kato, Y., K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi: Development of a reporter gene assay system using the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea, *Daphnia magna*. 第

- 10 回環境ホルモン学会研究発表会 2007年12月10-11日.
- 9) 中村武志・勝 義直・渡邊 肇・井口泰泉: エストロゲン受容体 (ER) 特異的リガンドによる無排卵と膈上皮細胞増殖の誘起. 日本動物学会第78回大会, 弘前大学, 2007年9月20-22日.
- 10) 中村武志・勝 義直・渡邊 肇・井口泰泉. 周生期のエストロゲン様物質暴露による無排卵または膈上皮細胞不可逆的増殖はエストロゲンレセプター $\alpha$ によって制御されている. 第10回環境ホルモン学会研究発表会, 大宮ソニックシテイー, 2007年12月10-11日.
- 11) 中村武志・勝 義直・渡邊 肇・井口 泰泉: 合成エストロゲン投与によるマウス不可逆的膈上皮増殖と Wnt ファミリー遺伝子発現. 変動との関連. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜, 2007年12月11-15日.
- 12) 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
- 13) 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 ドメイン遺伝子のcDNA単離と発現解析. 日本動物学会第77回大会 島根 2006年9月21-24日
- 14) 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膈における 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
- 15) Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Application of Toxicogenomics for Studying Endocrine Disruption and Basic Biology in Vertebrates and Invertebrates. 23rd Congress of European Comparative Endocrinologist, Manchester, UK. 2006年9月1日
- 16) Watanabe, H., Tatarazako, N., Oda, S. and Iguchi, T.: Toxicogenomic approach on *Daphnia magna*. Gordon Research Conference 2006: Environmental Endocrine Disruptors, Il Ciocco, Italy, June 4-9, 2006.
- 17) Oda, S. N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita, and T. Iguchi Genetic differences in production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. The SETAC North America 26th Annual Meeting Nov. 13-17, 2005. Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA.
- 18) Watanabe, H.: Ecotoxicogenomics. Annual Meeting and International Conference on Toxicogenomics-2005. Promising Next Generation Technology of Teoxicogenomics in Drug and Food Safety, and Environmental Health. Oct. 30-Nov. 1, 2005, KIST, Korea.
- 19) Watanabe, H.: Toxicogenomics approach on endocrine disruptor issue. Toxicogenomics. Nov. 2-5, 2005, Hotel Tirol, Muju, Korea.
- 20) Watanabe, H. and Iguchi, T.: Tissue dependent effects of estrogenic chemicals estimated by gene expression profile. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
- 21) Iguchi, T. and Watanabe, H. Focused array for evaluation of estrogenic effect of chemicals on mice. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
- 22) Watanabe, H.: Evaluation of chemical contaminants by gene expression profiling of