

- Daphnia magna*. SETAC, May , 2005,
- 23) Watanabe, H. Evaluation of estrogenic chemicals by gene expression profile. The endocrine society's 87th annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego Endocrine Society
- 24) 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.
- 25) Watanabe, H.: Ecotoxicogenomics. Annual Meeting and International Conference on Toxicogenomics-2005. Promising Next Generation Technology of Toxicogenomics in Drug and Food Safety, and Environmental Health. Oct. 30-Nov. 1, 2005, KIST, Korea.
- 26) Watanabe, H.: Toxicogenomics approach on endocrine disruptor issue. Toxicogenomics. Nov. 2-5, 2005, Hotel Tirol, Muju, Korea.
- 27) 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
- 28) 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
- 29) Watanabe, H.: Evaluation of chemical contaminants by gene expression profiling of *Daphnia magna*. SETAC, May , 2005,
- 30) Watanabe, H. Evaluation of estrogenic chemicals by gene expression profile. The endocrine society's 87th annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego Endocrine Society
- G. 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  
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

成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究

分担研究者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長

研究要旨

化学物質の毒性評価を進める過程で、成体(成人)と幼若個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、我々が実際に毒性評価を進め成熟個体に対し精巣毒性を有することを見出したヒドロキシクエン酸(Hydroxycitric acid: HCA)、本研究班の種村班員による検討の結果、幼若期投与の方が成体期投与より、認知障害の程度が激しくかつ多動を伴う行動変化を引き起こすことが明らかとなった記憶喪失性貝毒ドーモイ酸(DA)、をモデルとして、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界を明らかにすることとした。

HCAについて、3週齢の幼若個体と5週齢および12週齢の暴露影響を比較検討した結果、3週齢暴露の方が精巣重量減少が大きい傾向が得られ、組織学的にもHCAに対し高い感受性を有することが確認された。Percellome適用網羅的遺伝子発現解析の結果、HCAの標的分子であるATP citrate lyaseの発現上昇に加え、脂肪酸合成系遺伝子群の発現上昇、分解系遺伝子群の発現低下、補体系分子、GST群の発現上昇が認められた。幼若個体が高い感受性を示す背景に、脂肪酸代謝を始めとする複数の遺伝子群が関与している可能性が示唆された。

DAについて、幼若個体として2週齢、成体として10週齢を選び、2週齢については投与後24時間および9週間(11週齢)、10週齢については投与後24時間および11週齢時点で、大脳、海馬を各々採取して得たPercellome適用網羅的遺伝子発現データを解析した。その結果、2週齢投与、10週齢投与で有意差があった遺伝子に重なりはほとんどなく、幼若個体、成体で遺伝子発現応答が異なっていることが確認された。また、幼若期投与では脳発達に関連する遺伝子発現変化が生じ、それを起点に、グルタミン酸受容体シグナル系に加え、グルココルチコイドシグナル系等のシグナルへの影響が固定化し、成体期投与よりも重篤な影響が起きている可能性が示唆された。成体期投与では、直接的にグルタミン酸受容体シグナル系が刺激され、脂肪代謝影響やアポトーシス影響が生じるものの、そ

れは収斂する傾向にあることが示唆された。

以上、HCA, DA を用いたモデル解析により、成人、子どもの感受性差について、その分子背景を解明することが可能であることが示された。一方で DA について、成体と幼若個体で共通していたのはグルタミン酸受容体シグナル系影響に限られたことから、成人でのリスク評価結果はその一部しか子どものリスク評価予測の外挿に用いることが出来ないという限界が具体的に示された。外挿精度を向上させるには、更なる基礎研究の積み重ねが必須であると考えられた。

## A. 研究目的

化学物質の毒性評価を進める過程で、成体(成人)と幼若個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、我々が実際に毒性評価を進め成体に対し精巣毒性を有することを見出したHCAおよび、子ども期投与の方が成人期投与より強い影響が生じることが明らかになった記憶喪失性貝毒ドーモイ酸(DA)をモデル化学物質として取り上げ、その原因となる分子メカニズムを網羅的遺伝子発現解析手法を用いて検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1) HCA 検討

#### 暴露実験

C57BL/6CrSlc 雄を日本エスエルシーから4週齢(5週齢暴露群)および11週齢(12週齢暴露群)で購入。3週齢暴露群については、妊娠14日母親を購入し分娩させ、3週時に雄20匹を選抜した。各群1週間の馴化期間を設け、1群10匹ずつ28日間混餌(飼料CRF-1、投与量3.31%)暴露した。コントロール群とHCA群を合わせて6群となった。

### 解剖、臓器採取

エーテル麻酔下で、腋下動脈放血により屠殺し剖検を実施する。精巣(左右別)、精巣上体(左右別、固定後)および肝臓について臓器重量を測定し、左精巣をRNA用(RNAlater保存)、右精巣を病理組織用(ブアン液固定)、精巣上体は病理組織用にリン酸緩衝10%ホルマリン溶液固定し、肝臓はRNA用(RNAlater保存)、Protein用、病理組織用(リン酸緩衝10%ホルマリン溶液固定)を採取した。

### 2) DA 検討

#### 暴露実験

C57BL/6CrSlc(日本エスエルシー)に2週齢及び10週齢時に、生理食塩水を溶媒としてDA 0.3mg/kgを腹腔内投与した。投与後24時間目、及び、2週齢時投与については11週齢時、10週齢時投与については11週齢時にエーテル麻酔下に放血後、解剖し脳から海馬、大脳皮質を採取した。1群5匹を用い、その内遺伝子発現解析に3匹ずつを用いた。

### 3) Percellome 手法を適用した Total RNA の分離精製

各群3匹をRNA解析に用いることとした。HCAについては精巣病理切片像を検討し、ヒドロキシクエン酸の影響が認められる3匹を選

別した。組織は採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に4℃一晩浸漬し、RNase を不活化した。精巣は左精巣全体を、肝臓は 5mm 径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット(キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10uL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、あらかじめ臓器毎に設定した割合で Spike cocktail(Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。

#### 4) GeneChip 解析

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターにより付されたオリゴ dT 配列をもとに逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ(ENZO 社キット)を用い、デオキシ UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip には Mouse Genome 430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。

#### 5) Percellome Data 解析

Percellome data は、当方が開発した各種ソフトウェアを用いてコピー数算出、統計解析を

行った。得られて遺伝子リストの既知情報との場合には Ingenuity pathway analysis (Ingenuity Systems)を用いた。

#### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国立医薬品食品衛生研究所が定める動物実験に関する規程を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会)の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成 19 年 4 月版))

### C. 研究結果

#### 1) HCA 検討

##### 臓器重量変化

離乳直後個体への暴露影響(3週齢暴露)を網羅的遺伝子発現解析により検討した。暴露方法は混餌とし、用量は 3.31%とした。1群当たりの匹数は 10 匹とした。暴露期間は4週間とし、5週齢、12週齢からの暴露(5週齢暴露、12週齢暴露)についても検討し、成熟個体への影響と比較した。

その結果、3週齢暴露で精巣重量減少がより大きい傾向が認められ、組織学的にも未成熟個体がヒドロキシクエン酸に対し高い感受性を有することが確認された。

##### 遺伝子発現変化

上記の条件で精巣、肝臓について網羅的遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現解析に供する固体を選別するため、精巣病理切片像を検討し、ヒドロキシクエン酸の影響が認められる3匹を選別した。

まず、コントロール群に対し、HCA 投与群を plot した scatter plot を描き検討したところ、精巣

において3週齢暴露群で発現が変化した遺伝子が多いことが明らかとなった。肝臓ではそのような傾向は認められず、3週齢暴露群はむしろ発現変化が少なかった。

次に、個々の遺伝子の発現変化を検討した。横軸に実験群を、3週齢暴露群、5週齢暴露群、12週齢暴露群、予備検討5週齢28日間暴露中影響群、予備検討5週齢28日間暴露高影響群、予備検討5週齢90日間暴露CAC群、予備検討5週齢90日暴露HCA群の順で7群を置き、縦軸にPercellome変換した発現コピー数をプロットしたグラフを描いた。予備検討の結果を踏まえて注目したのは、脂肪酸合成・分解系遺伝子群、補体系遺伝子群、GST遺伝子群、エストロゲン合成系遺伝子の発現変動である。これら変動が認められた遺伝子は3週齢暴露群と予備検討5週齢暴露高影響群で同様の変動を示す傾向にあった。以下、個々について記す。

#### ・脂肪酸合成・分解系遺伝子群

HCAの標的分子はAcly(ATP Citrate Lyase)である。Aclyは糖質を脂肪酸に変換する過程でクエン酸をアセチルCoAに変化させる反応を担う(Fig.3)。HCA暴露により、3週齢暴露群でAcly自身の遺伝子発現が精巣において上昇していた。一方、肝臓では発現上昇は認められなかった。他の脂肪酸合成系遺伝子については、AMPK beta1, Datty Acid Synthase, Thiolase, 3-Hydroxyaxyl-CoA Dehydrogenase, Enoyl-CoA Hydratase, Acyl-CoA Desaturase1, 2の発現が上昇しており、Acly以降の経路を担うほとんどの遺伝子で発現上昇を認めた。

分解系遺伝子群については、Glycerol-3-PO4 Dehydrogenase, Triosephosphate isomerase, Fatty Acid CoA Ligase2, 5, Carnitine Acetyltransferase,

Carnitine Palmitoyltransferase I, IIの発現が減少しており、脂肪酸分解が抑えられていることが示唆された。

#### ・補体系遺伝子群

発現変動を示した遺伝子群で、補体系の遺伝子発現が変動していた。発現が上昇した遺伝子として、Clr, Cls, Clqa, Clqb, Clqc, C2, C3が、発現が減少した遺伝子としてDaf1, Daf2が同定された。

#### ・GST遺伝子群

GSTについて、Gstm1, Gstm2, Gstm6, Gstm7, Gsta3, Gstm4の発現上昇が認められた。

#### ・エストロゲン合成系遺伝子

エストロゲン合成系の中で、EstronとEstradiolの間の変換を担うHydroxysteroid(17-beta)dehydrogenase12(HSD17b12)の発現上昇が認められた。

#### 2)DA検討

##### 2週齢投与と10週齢投与の比較

p値0.01未満の遺伝子を各群について抽出した。2週齢投与24時間では脳で530個、海馬で292個、2週齢投与11週齢時では脳で919個、海馬で548個、10週齢投与24時間では脳で1963個、海馬で608個、10週齢投与11週齢目では脳で436個、海馬で316個であった。

これらの重なり具合を当方が開発したMFGLMを用いて検討したが、いずれも重なる遺伝子がほとんど無いという結果を得た。幼若個体と成体とでは遺伝子発現応答が異なっていることが確認された。また、各々の遺伝子リストをIngenuity Pathway Analysis(IPA)に投入し、既知情報から抽出されるnetworkの主要なfunction categoryを比較したが、共通性は見出されな

った。

#### 既知情報による変動遺伝子リスト解析

以下に、各々の実験条件における遺伝子発現変化の既知情報との照合を IPA を用いて実施した。

#### 2 週齢投与 24 時間での変化(幼若暴露急性変化)

2 週齢投与 24 時間後の変動遺伝子リストから、グルタミン酸受容体系が直接刺激された事に対応する pathway は報告されず、Axonal guidance や Wnt signal 系といった、脳発達関連の遺伝子カスケードが抽出された。

#### 2 週齢投与 11 週齢での変化(幼若暴露慢性・遅発性変化)

2 週齢投与 11 週齢時の変動遺伝子リストでは、大脳での IL-4 シグナル活性化、海馬でのグルタミン酸受容体シグナル系低下に加え、グルココルチコイド受容体シグナルへの影響が示された。IL-4 は脳脊髄炎におけるミクログリア活性化に関わっていることが報告されており、幼若期投与により慢性的な炎症反応が惹起されていることが示唆され、表現型との関連が注目される。海馬で認められたグルココルチコイド受容体シグナルに関しては、受容体発現低下がストレス過敏を引き起こすとの報告があり、幼若期投与に伴う行動変化との関連が示唆される。

#### 10 週齢投与 24 時間での変化(成熟期暴露急性変化)

10 週齢投与 24 時間後の変動遺伝子リストでは、大脳で脂質代謝影響に加え、Fas-mitochondria 系を介したアポトーシス活性化が認められた。海馬では脂肪酸代謝低下と共に、グルタミン酸受容体シグナル系の低下が認められ、DA が直接グルタミン酸受容体系を叩

いていることが確認された。また、Ephrin 受容体や軸索ガイダンス系シグナルの低下も認められた。

#### 10 週齢投与、11 週齢目での変化(成熟期暴露亜急性変化)

10 週齢投与 11 週齢時の変動遺伝子リストでは、大脳で Ephrin 受容体シグナル影響が認められた。海馬では、p53 系(DNA damage)への影響が認められたが、変化は小さいものであった。

#### D. 考察

ヒドロキシエン酸暴露に伴い、精巢の遺伝子発現が脂肪酸合成を促進する方向に変化していることが明らかとなった。また、その傾向は3週齢暴露群でより顕著であった。これは、幼若個体が成体に比べ、脂肪酸新規合成に依存している可能性を示すものであり、高感受性の一因である可能性がある。

DA の幼若、成体感受性差については、次のように説明することが可能であると考えられた。すなわち、幼若期投与では Wnt signaling を始めとする脳発達に関連する遺伝子発現に変化が生じ、それを起点に、グルタミン酸受容体シグナル系に加え、GR シグナル系等のシグナルへの影響が固定化し、成体期投与よりも重篤な不可逆的影響が誘発される。一方、成体期投与では、直接的にグルタミン酸受容体シグナル系が刺激され、脂肪代謝影響やアポトーシス影響が生じ、一過性の障害が現れるが、その後、収斂する傾向にある。

以上、HCA、DA をモデルに得られた結果は、Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、成人、子どもの感受性差について、その分子背景を解明することが可能であることを示すものであると考えられる。

## E. 結論

成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究を進めるための題材として選んだ HCA、DA について、幼若個体に対しより大きな作用を示すことが明らかになり、HCA については、発達段階の精巢が脂肪酸新規合成により強く依存する可能性が、DA については、幼若期は影響の範囲が拡大し、不可逆性を示すことが神経行動学的観点および遺伝子発現変化の観点から示された。

DA に関し明らかになった、成体と幼若個体で共通して認められた遺伝子発現変化はグルタミン酸受容体シグナル系影響に限られるという結果は、成人でのリスク評価結果はその一部しか子どものリスク評価予測の外挿に用いることが出来ないという限界を具体的に示すものであると考えられる。この結果からも、子どものリスク評価の精度向上のためには、幼若動物を対照とした更なる基礎毒性学研究的の積み重ねが必須であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J,

McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 24:178-198, 2007

Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, Leblanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto

AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*,24:131-138, 2007

Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol*,35:1190-1200, 2007.

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol*. 2006 20(9):2141-55 (2006)

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development*. 2006 133(9):1625-34.

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103(10):3651-6.

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. PTOVI: a novel testosterone-induced atherogenic gene in

- human aorta. *Pathol.* 2006 209(4):522-31 (2006)
- Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics.* 2006 Mar 29;7:64.
- Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn.* 2006 235(2):395-402.
- Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 103(1):224-9.
- Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development,* 132, 787-796, 2005
- 菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、細胞工学、2007年1月号、株式会社秀潤社
- 菅野 純、毒性の高精細解析に向けてのトキシコゲノミクス、医学のあゆみ Vol.218 No.12 2006.9.16 p1035-6
2. 学会発表
- 菅野 純、Chemosphere-Biosphere Interaction 解析ツールとしての Percellome Toxicogenomics、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 特別講演 2007年6月27日、東京
- 北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、菅野 純、モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノミクス(Percellome 手法)解析、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月27-29日、東京
- 五十嵐勝秀、種村健太郎、中津則之、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月27-29日、東京
- 種村健太郎、五十嵐勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体  $\alpha$  型の非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳機能解析、第 24 回日本疾患モデル学会総会、2007年8月31日-9月1日、つくば、口演
- 菅野 純、相崎健一、中津則之、北嶋 聡、児玉幸夫、小川幸男、Percellome Toxicogenomics for the Development of Mechanism-based Predictive Toxicology 第 66 回日本癌学会総会、シンポジウム「がん創薬におけるイノベーション」2007年10月3日、横浜、口演
- 種村健太郎、五十嵐勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 ( $\alpha$  型) 非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析 第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007年10月19-22日、東京
- 五十嵐勝秀、北嶋 聡、種村健太郎、菅野純、エストロゲン受容体  $\alpha$  型の妊娠維持への関与 第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007年10月19-22日、東京
- 菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロジェ



クトの概要と基礎生物学への応用、明治薬科大学オープンカレッジ、2006年8月7日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、第33回日本トキシコロジー学会、2006年7月3-5日、名古屋

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第10回がん分子標的治療研究会総会、2006年6月15日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量PCRから細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、九州大学医師研セミナー、2006年4月17日、福岡

菅野 純、マイクロアレイや定量PCRから細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、第104回熊本大学発生研・拠点形成 A セミナー、2006年6月5日、熊本

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールとしての Percellome System、第95回日本病理学会総会、2006年4月30日-5月2日、東京

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第15回環境ホルモン学会講演会、2005年6月2日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Per cell” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference “Toxicogenomics”, Jun 5-10, 2005, NH, USA

菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害の Percellome トキシコゲノミクス研究、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1-3日、東京

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中植物性エストロゲンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1-3日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野 純、Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the “Percellome” system as a model for molecular developmental toxicity、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1-3日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋 聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上 達、菅野 純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1-3日、東京

中津則之、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野 純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1-3日、東京

菅野 純、WHO Chileren’s Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第17回神経行動毒性研究会、2005年8月5日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives”, August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on

Toxicogenomics, August 30 – September 2,  
2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi,  
Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama,  
“Percellome” mRNA normalization system for  
microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM  
Satellite Meeting on Toxicogenomics, August  
30 – September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野 純、  
Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現  
変動解析、第 64 回日本癌学会学術総会、  
2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、  
北嶋 聡、菅野 純、飼料中の植物エストロジェ  
ンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホ  
ルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月  
27-29 日、東京

菅野 純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北  
嶋 聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視床  
下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現の  
Percellome 解析、環境ホルモン学会第 8 回研  
究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to  
Reinforce the Screening and Testing Strategy  
for the Endocrine Disruptors, KFPA/NITR  
International Symposium, Oct 11-12, 2005,  
Korea

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関する  
課題、三菱安全化学研究所講演会、2005 年  
12 月 1 日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno,  
Mass Distributed Clustering : A New  
Clustering Algorithm for Repeated  
Measurements in Gene Expression Data, The  
16th International Conference on Genome

Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、  
菅野 純、Diethylnitrosamine 及び  
N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝子  
発現変動解析、第 28 回日本分子生物学会、  
2005 年 12 月 7-10 日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野 純、  
マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイ  
クロアレイ解析、第 28 回日本分子生物学会、  
2005 年 12 月 7-10 日、福岡

北嶋 聡、Glenn I. Fishman 、富田幸子 、井上  
達、菅野 純、相賀裕美子、転写因子 Mesp1  
非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与  
する、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12  
月 7-10 日、福岡

安彦行人、原口清輝、高橋 雄、菅野 純、相賀  
裕美子、Notch シグナルは Tbx6 依存的に  
Mesp2 発現を活性化する、第 28 回日本分子  
生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

#### G. 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

## 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

#### 細胞を用いた*in vitro*における化学物質・薬物の影響解析

分担研究者 田上昭人

国立成育医療センター研究所・薬剤治療研究部・部長

#### 研究要旨

バルプロ酸やカルバマゼピン等の抗けいれん剤の生殖発生毒性機構を解明するためにマウス胚性幹細胞(ES細胞)ならびにマウス神経芽腫由来 N1E-115細胞を用いて解析した。その結果、カルバマゼピンやバルプロ酸は、マウスES細胞の外胚葉系への分化を促進し、バルプロ酸は N1E-115細胞では Gadd45a 遺伝子や NF2 遺伝子の発現調節を介して神経細胞の分化を促進することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

バルプロ酸やカルバマゼピン等の抗けいれん剤は、神経管欠損などの生殖発生毒性を有することが知られているが、その詳細な毒性機構は明らかになっていない。本研究では、マウスES細胞や神経芽腫由来 N1E-115細胞を用いて神経発生に及ぼす抗けいれん剤の影響を行う。

#### B. 研究方法

##### 1. ES細胞を用いたカルバマゼピン等バルプロ酸の細胞毒性解析

EST法は、ES細胞が特別な誘導を行うことなく自然に心筋細胞に分化するという特性を利用した評価方法である。ES細胞を培養する際、薬物を加えることにより、心筋細胞への分化障害を指標としている。薬物によるES細胞分化抑制効果は、マウスES細胞株を用いて

行う。解析を行う化学物質・薬物を添加した試験液にES細胞を調整し、ディッシュの蓋の内面に700細胞/20 $\mu$ lの懸濁滴を。蓋を裏返してディッシュに被せ、湿潤状態で37 $^{\circ}$ C、3日間懸濁培養する。その後、液滴内に形成された胚様体(EBs)をさらに浮遊培養してEBsをさらに成熟させる。2日後、24穴マルチプレートにEBsを各ウェルに1個ずつ移し、各試験液で静置培養する。5日間経過後に倒立位相差顕微鏡にて各ウェル毎の心筋細胞の鼓動の有無を調べる。ES細胞の分化度は、細胞の鼓動を認めるウェル数の割合をすべてのウェル数の百分率から算出し、各濃度段階のウェル数の百分率からID<sub>50</sub>を求めている。さらに、ES細胞と3T3細胞の薬物による細胞毒性数値IC<sub>50</sub>を求め、ID<sub>50</sub>とともにモデル計算式に挿入して、薬物の毒性の指標とした。さらに、バルプロ酸を添加したES細胞を用いて未分化細胞、内

胚葉、中胚葉、外胚葉組織に特異的な遺伝子マーカーの発現解析を行い、カルバマゼピン、バルプロ酸の細胞分化に及ぼす影響を観察した。

## 2. N1E-115 細胞を用いたバルプロ酸の細胞毒性解析

神経生理の分野においては神経細胞の軸索や樹状突起の長さ、数、分岐数など形態の異常性を観察する手法は一般的である。N1E-115 細胞に血清を添加すると細胞の分化は起こらないが、血清を除去すると神経突起の伸長など細胞が分化することが知られている。血清を添加し細胞の分化を抑制した状態の N1E-115 細胞にバルプロ酸を添加すると神経突起の伸長がみられる。この薬物による神経細胞分化への影響について解析を行い、バルプロ酸による神経突起伸長の分子生物学的解析を行う。

### (倫理面への配慮)

直接ヒト検体の解析を行う場合には研究機関での倫理委員会に申請を行い承認が得られた後研究を行う。動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼養および保管の改善にも最大限努力する。

## C. 研究成果

### 1. マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いたカルバマゼピン (CBZ)、バルプロ酸 (VPA) の毒性評価ならびにその機序

EST 法にてカルバマゼピンおよびバルプロ酸

の毒性評価を行った。バルプロ酸は用量依存的に細胞の生存率を抑制し、50%細胞生存抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) は NIH3T3 細胞で、3.25 mM、ES 細胞で 0.56 mM であった。また、心筋細胞への分化抑制率 (ID<sub>50</sub>) は、150 μg/ml であり、毒性評価は弱毒性と評価された (表1)。カルバマゼピンの IC<sub>50</sub> は NIH3T3 細胞で、0.24mM、ES 細胞で 0.31mM、ID<sub>50</sub> は、28.24 μg/ml であり、毒性は弱毒性と評価された (表1)。ES 細胞の分化におけるカルバマゼピンおよびバルプロ酸の影響を観察するために薬物添加後10日目の ES 細胞より RNA を抽出し、内胚葉、中胚葉、外胚葉特異的マーカーの遺伝子発現量を RT-PCR 法にて解析した。その結果、バルプロ酸添加により ES 細胞は、内胚葉中胚葉特異的な分子マーカーの発現量は用量依存的に抑制されていたが、外胚葉特異的な分子マーカーは用量依存的に発現量が増加していることが明らかとなった (表1)。

表1 VPAとCBZの毒性比較

	VPA	CBZ
致死濃度	0.60 - 0.70 mM	0.02 - 0.03 mM
IC <sub>50</sub> -ES	0.56 mM	0.31 mM
IC <sub>50</sub> -NIH3T3	3.25 mM	0.24 mM
ID <sub>50</sub> -ES	150 μg/ml	28.24 μg/ml
IC <sub>50</sub> (毒性)	0.56 mM	0.31 mM
分化マーカー	量依存的抑制	量依存的抑制
内胚葉マーカー	GATA4, TTF1, AFP, Alβの発現量減少	胚芽分化マーカー (GATA4) の発現量増加、胚芽分化マーカー (AFP, Alβ) の発現量減少
中胚葉マーカー	MyoD, Hox2.5, MyoD, ANPの発現量減少	胚芽分化マーカー (MyoD, Hox2.5) の発現量増加、胚芽分化マーカー (ANP) の発現量減少
外胚葉マーカー	ニューロンマーカー-Dynactin, NFHの発現量増加、グリッパ細胞のマーカー-GFAP, Dlx2, Dlx5の発現量増加	胚芽分化マーカー (GFAP, Dlx2, Dlx5) の発現量増加
有害	治療的効果の低下、神経系への毒性、神経系への毒性、神経系への毒性	治療的効果の低下、神経系への毒性、神経系への毒性
発がん性	Total 25/28 (89%) Severe 21/28 (75%)	Total 48/70 (69%) Severe 24/70 (34%)

同様にカルバマゼピン添加により ES 細胞は、高濃度領域において内胚葉、中胚葉の初期の誘導に対しては、促進傾向がみられ、中興期発生に対しては抑制傾向がみられた。外胚葉系の神経細胞マーカーでは分化促進傾向がみられたが、その作用はバルプロ酸よりも軽

度であった(表1)。

## 2. N1E-115 細胞をバルプロ酸の細胞毒性解析

N1E-115 細胞はマウス神経芽腫由来細胞で培養液に血清を含んだ条件で培養を行うと未分化な細胞の状態が増殖するが、培養液から血清を除去すると神経突起の伸長がみられ、細胞分化が進行することが知られている。血清を含む培養液にて N1E-115 細胞を培養し、その細胞にバルプロ酸を添加したところ神経突起の伸長がみられた。バルプロ酸による N1E-115 細胞の神経突起伸長効果に関与する分子生物学的メカニズムを解明するためにジーンチップを用いて変動する遺伝子の解析を行った。その結果、Gadd45a 遺伝子の発現が上昇しているのが明らかとなった。RT-PCR 法にてバルプロ酸添加による Gadd45a 遺伝子の発現を解析したところ投与後その発現が上昇しているのが確認できた(図1)。Gadd45a 遺伝子の発現により N1E-115 細胞の神経突起の伸長作用を明らかにするために Gadd45a 遺伝子を発現させたところ N1E-115 細胞では神経突起の伸長が観察され、siRNA にて Gadd45a 遺伝子の発現を抑制した細胞では神経突起の伸長の抑制が観察された(図1)。以上の結果より、N1E-115 細胞ではバルプロ酸により Gadd45a 遺伝子の発現が亢進し、その結果神経突起の伸長が起こることが明らかとなった。次に、Gadd45a 遺伝子が JNK を介してバルプロ酸による N1E-115 細胞の神経突起伸長を誘導していることを証明するために、Gadd45a 遺伝子発現における SP600125 の抑

制効果を検討した。その結果、Gadd45a 遺伝子の発現による神経突起伸長効果は、U0126 (ERKのインヒビター)では抑制されず、SP600125 (JNKインヒビター)にて抑制されることより、Gadd45a 遺伝子の発現により JNK 活性化され活性化されることにより神経突起伸長が起こっているものと考えられた(図2)。さらに、178 番目のセリンをアラニンに変異させたパキシリンを発現させると Gadd45a 遺伝子の発現による神経突起伸長は抑制されることにより Gadd45a 遺伝子は JNK、パキシリンを介して神経突起伸長を起こしているものと考えられる(図2、3)。

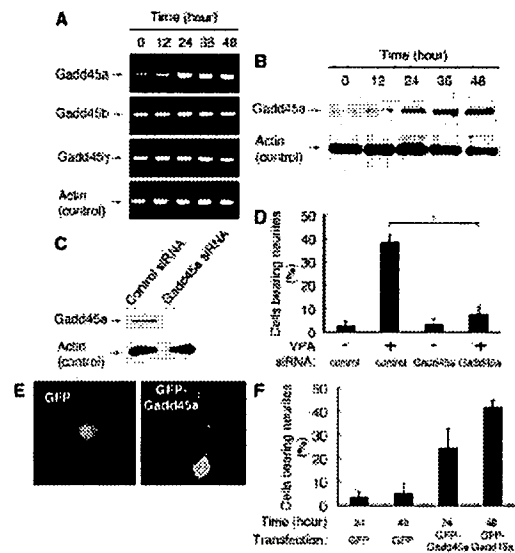


図1 Gadd45a 遺伝子による N1E-115 細胞の神経突起伸長効果

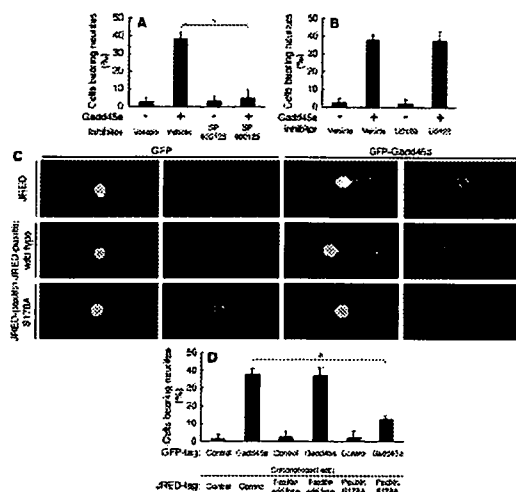


図2 Gadd45a 遺伝子発現におけるJNKインヒビターの抑制効果

次に Gadd45a 遺伝子発現による神経突起伸長作用にMEKK4遺伝子が関与しているかどうかについて検討した。

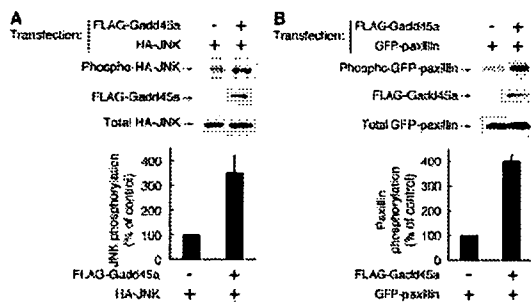


図3 Gadd45a 遺伝子発現によるJNKとパキシリンのリン酸化

Gadd45a 遺伝子発現またはバルプロ酸による神経突起伸長作用は、siRNA によるMEKK4 遺伝子の発現の抑制により抑制されることが明らかとなった(図4)。同様にMEKK4遺伝子の発現の抑制によりJNK、パキシリンのリン酸化が抑制されることが明らかとなった(図5)。

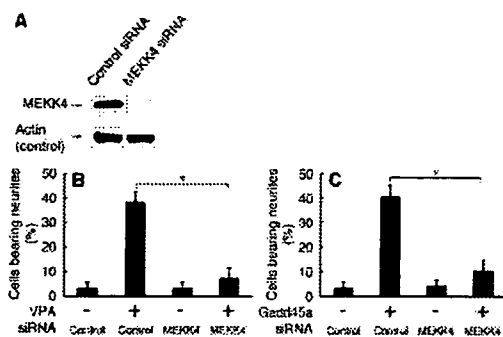


図4 Gadd45a 遺伝子およびバルプロ酸による神経突起伸長作用におけるMEKK4の解析

以上の解析の結果、N1E-115 細胞におけるバルプロ酸の神経突起伸長は、MEKK4, JNK, パキシリンの活性化を通して行われているものと考えられる(図6)。

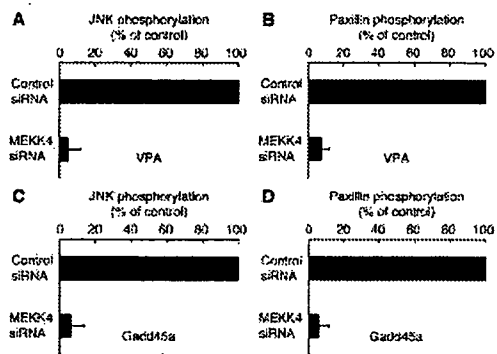


図5 Gadd45a 遺伝子およびバルプロ酸によるJNK、パキシリンリン酸化におけるMEKK4の解析

## N1E-115細胞の分化とVPA

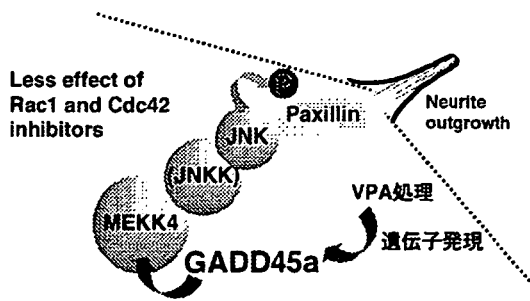


図6 N1E-115 細胞におけるバルプロ酸の神経突起伸長作用のメカニズム

さらに、ジーンチップによるバルプロ酸による遺伝子変動の解析を行った結果、NF2 遺伝子の発現 (merlin:NF2 遺伝子産物) が亢進することが明らかとなった(図7)。

### VPAはNF2遺伝子産物の発現を誘導する

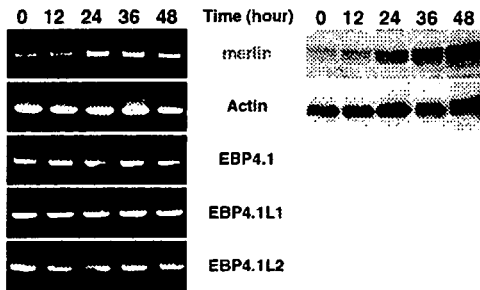


図7 N1E-115 細胞におけるバルプロ酸の神経突起伸長作用のメカニズム

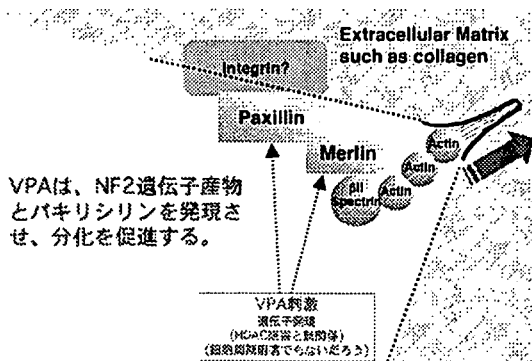


図8 N1E-115 細胞におけるバルプロ酸のNF2を介する神経突起伸長作用のメカニズム

N1E-115 細胞において Paxillin と NF2 を共に発現させると、神経突起が伸びてくることより、バルプロ酸は、Paxillin と NF2 の遺伝子発現を亢進させ、神経突起作用を有しているものと考えられた(図8)。

## D. 考察

1.カルバマゼピンおよびバルプロ酸による胎児への影響は、神経管欠損などの生殖発生毒性があることが知られている。今回マウス ES 細胞を用いた試験では、ともに弱毒性の評価であったが、マウス ES 細胞でのバルプロ酸の IC<sub>50</sub> が治療濃度域内(0.3-0.7mM)の 0.56mM であり、また神経系の発生により強く影響を及ぼしていることなどよりカルバマゼピンよりもバルプロ酸の方が奇形発症率が高いものと推定された。

2. N1E-115 細胞における神経突起作用に及ぼすバルプロ酸の作用は、Gadd45a 遺伝子や NF2 遺伝子等を介していることが明らかとなった。バルプロ酸の神経細胞の分化に影響を及ぼすことは個体レベルで報告されており、今回の N1E-115 細胞での結果はこれを裏付けるものと考えられる。

## E. 結論

マウスES細胞及びN1E-115細胞でバルプロ酸の細胞毒性効果ならびに細胞分化に及ぼす影響について分子生物学的手法により明らかにした。今後、この結果は個体レベルでのバルプロ酸の催奇形性の発症のメカニズムの解明に有用であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 村部麻由、山内淳司、藤原葉子、三部篤、田上昭人. マウス胚性幹細胞分化誘導系を用いたバルプロ酸による発生毒性解析 日本小児臨床薬理学会雑誌 印刷中 (2007)

2) Murabe M, Yamauchi Y, Fujiwara F, Hiroyama M, Sanbe A, Tanoue A. A novel embryotoxic estimation method of VPA using ES cells differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jan 5;352(1):164-9.

3) Yamauchi J, Miyamoto Y, Murabe M, Fujiwara Y, Sanbe A, Fujita Y, Murase S, Tanoue A. Gadd45a, the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate Paxillin in N1E-115 neuroblastoma cells. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 1886-1896.

4) Murabe M, Yamauchi J, Fujiwara Y, Miyamoto Y, Hiroyama M, Sanbe A, Tanoue A. Estimation of the embryotoxic effect of CBZ using an ES cell differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356:739-744.

5) 村部麻由、山内淳司、藤原葉子、三部篤、田上昭人. Embryonic Stem Cell Test (EST 法) による薬物毒性評価. 日本小児臨床薬理学会雑誌 19(1) 20-22 (2006)

### 2. 学会発表

1) 宮本幸、草川森士、三部篤、山内淳司、田上昭人. バルプロ酸による神経分化作用に関する新規誘導遺伝子 NF2 の同定 第 34 回日本小児臨床薬理学会、11 月 16 日～17 日、2007、熊本

2) 草川森士、田上昭人. マウス ES 細胞を用いた SSRI の安全性評価試験の確立とその応用 第 34 回日本小児臨床薬理学会、11 月 16 日～17 日、2007、熊本

3) 草川森士、宮本幸、藤原葉子、三部篤、小出寛、山内淳司、田上昭人. マウス ES 細胞を用いた SSRI の安全性評価試験の確立とその応用 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、12 月 11 日～15 日、2007、横浜

4) 村部麻由、王淑一、美留町潤一、山内淳司、三部篤、田上昭人 Embryonic Stem Cell test (EST 法) による薬物毒性評価 第 33 回日本小児臨床薬理学会、11 月 30 日～12 月 1 日、2006、東京

5) 山内淳司、宮本幸、藤原葉子、三部篤、村部麻由、田上昭人. バルプロ酸による新規誘導遺伝子 Gadd45a による神経分化作用の解析. 第 33 回日本小児臨床薬理学会、11 月 30 日～12 月 1 日、2006、東京

6) Murabe M, Tanoue A. Analysis of embryotoxicity induced by antiepileptic drugs



(AEDs) using mouse embryonic stem cells differentiation systems. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, Kyoto (Japan), 2006.

7) Murabe M, Fujiwara Y, Yamauchi J, Sanbe A, Tanoue A. Analysis of embryotoxicity induced by antiepileptic drugs (AEDs) using mouse embryonic stem cells differentiation systems. EuroStemCell International Conference Advances in Stem Cell Research, September 8-10, Lausanne (Switzerland), 2006.

8) 村部麻由、王淑一、美留町潤一、山内淳司、三部篤、田上昭人 Embryonic Stem Cell test (EST法)による薬物毒性評価 第32回日本小児臨床薬理学会、10月21日～22日、2005、東京

#### G. 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

なし

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E	Two-generation reproductive toxicity study of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide in rats	Reprod Toxicol	25	21-38	2008
Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M	Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats	Reprod Toxicol			in press
Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Ema M	Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats	Reprod Toxicol			in press
Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E	Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats	Reprod Toxicol	25	89-99	2008
Hirata-Koizumi M, Ogata H, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M	A 52-week repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl) benzotriazole in rats	Drug Chem Toxicol	31	81-96	2008
Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M	Gonadal influence of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in rats	Drug Chem Toxicol	31	115-126	2008
Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M	Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction	Regulat Toxicol Pharmacol	50	37-49	2008
Ema M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M	Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide in rats	Congenit Anom Kyoto	49	149-155	2007
江馬 眞	有機スズ化合物の生殖発生毒性	国立医薬品食品衛生研究所報告	125	35-50	2007
高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞	OECD 化学物質対策の動向(第13報)―第22回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2006年パリ)	国立医薬品食品衛生研究所報告	125	101-106	2007
松本真理子、大井恒宏、宮地繁樹、菅谷芳雄、江馬 眞	OECD 高生産量化学物質点検プログラム―第23回初期評価会議概要	化学生物総合管理学会誌	3	56-65	2007

松本真理子、山本展裕、宮地繁樹、菅谷芳雄、江馬 眞	OECD 高生産量化学物質点検プログラム—第24回初期評価会議概要	化学生物総合管理学会誌	3	180-189	2007
Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T	Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys	Reprod Toxicol	23	12-19	2007
Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E	Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats	Reprod Toxicol	22	672-678	2006
Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E	Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats	Reprod Toxicol	22	30-38	2006
Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M, Hasegawa R	Semi-quantative immunohistochemical analysis of male rat-specific a2u-glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation	J Toxicol Sci	31	35-47	2006
Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Enami T, Wada H, Ogata H, Yamamoto Y, Ito Y, Kamata E, Ema M, Hasegawa R	Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats	J Toxicol Sci	30	29-42	2005
Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T	Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells	Stem Cells	25	562-570	2007
Tanemura K, Chui DH, Fukuda T, Murayama M, Park JM, Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, Kudo T, Takeda M, Takashima A	Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1)	J Biol Chem	281	5037-5041	2006
Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, Tanaka K	Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development	Proc Natl Acad Sci USA	103	12161-12611	2006
Li, W., Sun, G., Yang, S., Qu, Q., Nakashima, K. & Shi, Y	Nuclear receptor TLX regulates cell cycle progression in neural stem cells of the developing brain	Mol Endocrinol	22	56-64	2008
Fukuda, S., Abematsu, M., Mori, H., Yanagisawa, M., Kagawa, T., Nakashima, K., Yoshimura, A.	Potentiation of astroglialogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural	Mol Cell Biol	27	4931-4937	2007

& Taga, T	stem cells				
Jessberger, S., Nakashima, K., Clemenson, G.D., Jr., Mejia, E., Mathews, E., Ure, K., Ogawa, S., Sinton, C.M., Gage, F.H. & Hsieh, J	Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline	J Neurosci	27	5967-5975	2007
Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T. & Nakashima, K	Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons	J Neurosci Res	84	969-979	2006
Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Rodriguez-Esteban, C. & Izpisua Belmonte, J.C	Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells	Proc Natl Acad Sci USA	103	10294-10299	2006
Muotri, A.R., Nakashima, K., Toni, N., Sandler, VM. and Gage, F.H	Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain	Proc Natl Acad Sci USA	102	18644-18648	2005
Shimozaki, K., Namihira, M., Nakashima, K. and Taga, T	Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells	J. Neurochem	93	432-439	2005
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
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 <i>Trypanosoma cruzi</i>	J. Immunol	177	7059-7066	2006
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
Takeda, K., and Akira, S	Toll-like receptors in innate immunity	Int. Immunol	17	1-15	2005
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	69	725-731	2007
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 <i>Daphnia magna</i>	Journal of Endocrinology	193	183-194	2007