

Ⅱ. 分担研究報告書

Ⅱ. 基盤研究

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

核内受容体作動性化学物質の雌性生殖器官への作用メカニズムの解明

分担研究者 井口 泰泉 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター教授

研究要旨

臨界期における核内受容体作動性化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的として、出生直後のマウスに合成エストロゲン、エストロゲン受容体(ER) α および β の特異的リガンド投与し、ERのどちらのサブタイプがエストロゲン作用を媒介するかを調べた。合成エストロゲンおよびER α リガンドの投与では、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、卵巣非依存の膣上皮の増殖、子宮筋の乱れが誘起されたが、ER β リガンドではこれらの異常は誘起されなかったことから、エストロゲン活性を有する物質による組織異常はER α を介して誘起されることが明らかとなった。

A. 研究目的

エストロゲン作用物質はエストロゲン受容体 α あるいは β タイプのどちらを介して作用するかを明らかにする。

内分泌かく乱化学物質の胎児曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにするために、原点に立ち返って、エストロゲン作用を及ぼす物質はエストロゲン受容体(ER) α あるいは β のどちらを主として介して作用しているのかを解析するために、合成エストロゲンのジエチルstilbestrol(DES)、ER α およびER β 特異的リガンドを出生直後のマウスに投与し、膣スメアの観察、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋の乱れ、卵巣非依存の膣上皮の増殖を組織学的に調べるとともにいくつかの遺伝子の発現も合わせて解析する。出生直後にDESを投与されたマウス雌性生殖器官の遺伝子のメチル化の変動も解析する。

B. 研究方法

出生直後から5日間、C56BL系雌マウスに合成エストロゲン(DES)、ER α およびER β 特異的リガンドを投与して、雌性生殖器官への影響を調べた。

合成エストロゲン(DES)、ER α 特異的リガンド: propyl pyrazole triol (PPT) およびER β 特異的リガンド: diarylpropionitrile (DPN) を用いた。

マウスのER α およびER β 遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子アッセイ系を用いて、DESおよび受容体特異的リガンドのエストロゲン活性を調べて、投与量を算出し、DES 0.025-2.5 $\mu\text{g/g bw}$ に対して特異的リガンドは10倍量の0.25-25 $\mu\text{g/g bw}$ とした。

膣スメアを観察し記録した。生後13週目に卵巣摘出し、15週目に組織を摘出し、卵巣、子宮および膣の組織学的解析および定量PCRにより、膣を用いていくつか

の遺伝子の発現を解析した。

また、出生直後の DES 投与により卵巣非依存の上皮の増殖を示している膣において、ゲノム DNA のメチル化状態が変化している遺伝子の解析を行った。ゲノム DNA を調整した後に、バイサルファイト法により DNA を化学修飾・変換を行い、PCR によりメチル化されているゲノム領域を決定した。

(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

出生直後の DES および ER α リガンド投与では、無排卵、子宮筋の乱れ、恒久的な遺伝子発現を伴う卵巣非依存の膣上皮の増殖が誘起されたが、ER β リガンドでは異常は起こらなかった。ER を介した雌性生殖器官の異常の誘起は、主として ER α を介していることが明らかとなった。

マウスのエストロゲン受容体遺伝子を組み込んだレポータージーンアッセイから、今回用いた ER 特異的リガンドは、DES に対して 10 倍量を用いれば DES とほぼ同様のエストロゲン活性を持つことが明らかとなった。

臨界期である出生直後に投与した DES は 0.025-2.5 $\mu\text{g/g}$ bw の全てのマウスにおいて卵巣には黄体が認められず無排卵であり、子宮筋層の乱れが認められた。0.25-2.5 $\mu\text{g/g}$ では前例に卵巣非依存の膣上皮の増殖が認められた。ER α リガンドでは、2.5-25 $\mu\text{g/g}$ で無排卵と子宮筋層の

乱れが起こり、25 $\mu\text{g/g}$ でのみ卵巣非依存の膣上皮の増殖が認められた。ER β リガンドでは、25 $\mu\text{g/g}$ で無排卵および卵巣非依存の膣上皮の増殖を示す個体も数匹認められたが、統計学的には有意でなかった。したがって、臨界期である出生直後のエストロゲン類似物質投与により誘起される、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、卵巣非依存の膣上皮の増殖は、ER α を介して誘起されていることが明らかとなった。

さらに、最高濃度の DES (2.5 $\mu\text{g/g}$ bw)、ER α および ER β リガンド (25 $\mu\text{g/g}$ bw) を出生直後から投与したマウスの膣で、amphiregulin、epiregulin、heparin-binding EGF、Wnt4、Wnt5a、Wnt7a、Wnt11、Notch1、Notch3、p21 の発現を定量 PCR 法により解析したところ、卵巣非依存の増殖を示している DES および ER α リガンド投与の膣では、amphiregulin、epiregulin、heparin-binding EGF、Wnt4、Wnt5a、Notch1、Notch3、p21 の発現が高く、ER β 投与では対照群と同様、膣上皮の増殖は認めれず、Wnt7a と Wnt11 の発現が高かった。

出生直後の DES 投与により、卵巣非依存の上皮の増殖を示す膣の遺伝子のメチル化状態を解析しているが、現時点では、メチル化に変異が認められる遺伝子は見出せていない。

D. 考察

内分泌をかく乱する可能性のある物質の多くはエストロゲン作用を有すると考えられている。そのため、化学物質のエストロゲン作用は 2 種類存在する ER α および ER β のどちらを介して作用する可能性があるのかを明らかにする目的で、そ

それぞれの受容体の特異的リガンドとして開発されている物質を、出生直後のマウスに投与して、その後の影響を調べた。その前に、マウスエストロゲン受容体遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子アッセイを用いて、特異的リガンドの DES に対するエストロゲン作用の非活性を調べ、各リガンドは DES の 10 倍量必要であることを確認した。

視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、膣上皮細胞の卵巣非依存の増殖は、臨界期のエストロゲン作用の標的となっている。今回の実験結果からは、エストロゲン作用を持つ物質が悪影響を及ぼすとすれば、少なくとも今回調べた標的臓器に対しては、主として ER α を介して作用を及ぼすことが明らかとなった。

卵巣非依存的に上皮の増殖が継続している膣では、今まで明らかにしている、amphiregulin, epiregulin, heparin-binding EGF に加えて、Wnt4、Wnt5a、Notch1、Notch3、p21 の恒常的発現が明らかとなった。今後は、これらのシグナル系のカスケードを明らかにすることにより、不可逆的増殖するメカニズムに迫ることができると思われる。

このような恒久的な変化においては、ゲノムがエピジェネティックな変化をしている場合もあり、引き続きエストロゲン曝露とゲノム状態の変化の解析を行う必要がある。

E. 結論

エストロゲン作用物質は主として ER α を介して、雌性生殖器官に影響を及ぼすことが明らかとなった。

エストロゲン作用を持つ物質が臨界期

のマウスに作用する場合、視床下部下垂体卵巣系の無排卵、子宮筋層の乱れ、膣上皮の不可逆的増殖といった影響は、エストロゲン受容体 α を介して作用する可能性が高いことが明らかとなった。また、不可逆的に上皮が増殖している膣ではいくつかの遺伝子が恒久的に発現していることを明らかにした。今後の詳細な解析が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Urushitani, H., Y. Katsu, Y. Kato, O. Tooi, N. Santo, Y. Kawashima, Y. Kisaka, Y. Ohta, A. Lange, C.R. Tyler, R.D. Johnson and T. Iguchi: Medaka (*Oryzias latipes*) for use in evaluating developmental effects of endocrine active chemicals with special reference to gonadal intersex (testis-ova). Environ. Sci. (in press).
2. Tyler, C.R., A. Lange, G.C. Paull, Y. Katsu and T. Iguchi: The roach (*Rutilus rutilus*) as a sentinel for assessing endocrine disruption. Environ. Sci. (in press).
3. Takase, M., N. Mitsui, T. Oka, O. Tooi, N. Santoh, D. Pickford and T. Iguchi: Development of biomarkers for endocrine disrupting activity in the emerging amphibian model, *Silurana (Xenopus) tropicalis*. Environ. Sci. (in press).
4. Kato, Y., K. Kobayashi, S. Oda, J.K. Colbourn, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi: Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*. Genomics, (in press).
5. Katsu, Y., R. Ichikawa, T. Ikeuchi, S.

- Kohno, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (*Pseudemys nelsoni*). *Endocrinology*, (in press).
6. Tyler, C.R., A.L. Filby, T. Iguchi, V. Kramer, J. Larsson, G. van Aggelen, K. van Leeuwen, M. Viant and D. Tillet: Chapter 3 - Application of Genomics to Tiered Testing. In: Ankley, G. and G. Daston (Eds.): *Molecular Biology and Risk Assessment: Evaluation of the Potential Roles of Genomics in Regulatory Ecotoxicology*. (in press)
7. Cook, J., T. Iguchi, E. Linney, A. Miracle, J. Shaw, M. Viant and T. Zacharewski: "Omic" Approaches in the context of environmental toxicology. In Benson, W.H. and Di Giulio, R.T. (eds.) *Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology*. Taylor and Francis, CRC Press, pp. 1-31, 2007.
8. Kato, Y., K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi: Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. *J. Endocrinol.*, 193: 183-194, 2007.
- © 9. Suzuki, A., H. Urushitani, T. Sato, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol *in utero*. *Exp. Biol. Med.*, 232: 503-514, 2007.
10. Watanabe, H., E. Takahashi, Y. Nakamura, S. Oda, N. Tatarazako and T. Iguchi: Development of *Daphnia magna* DNA microarray for the evaluation of toxicity of environmental chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26: 669-676, 2007.
11. Takase, M. and T. Iguchi: Molecular cloning of two isoforms of *Xenopus (Silurana) tropicalis* estrogen receptor mRNA and their expression during development. *Biophys. Biochem. Acta*, 1769: 172-181, 2007.
- © 12. 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.
13. Sumi, M., Y. Kawashima, T. Fukumaki, H. Ishibashi, K. Arizono, T. Iguchi and M. Shimizu: Comparison of serum vitellogenin, steroid hormone, gonad histopathology and bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) between two rivers and a lake in Japan: Potential for endocrine disruption. *Environ. Sci.*, 14: 41-54, 2007.
14. Iguchi, T.: What are the data on environmental contaminants disrupting reproductive function? Examples of mosquitofish, roach and medaka. In: Kruger, T.F., van der Spuy, Z. and Kempers, R.D. eds. *Advances in Fertility Studies and Reproductive Medicine*, pp.361-373, 2007.

15. Katsu, Y., A. Lange, R. Ichikawa, H. Urushitani, G.C. Paull, L.L. Cahill, S. Jobling, C.R. Tyler and T. Iguchi: Functional associations between two estrogen receptors, environmental estrogen and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*). Environ. Sci. Technol., 41: 3360-3374, 2007.
16. Oda, S., N. Tatarazako, M. Dorgerloh, R. Johnson, O. Kusk, D. Leverett, S. Marchini, T. Nakari, T. Williams and T. Iguchi: Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 67: 399-405, 2007.
17. Hara, A., K. Hirano, M. Shimizu, H. Fukada, T. Fujita, F. Itoh, H. Takada, M. Nakamura and T. Iguchi: Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: characterization of yolk proteins, development of immunoassays and use as a biomarker of exposure to environmental estrogens. Environ. Sci., 14: 95-108, 2007.
18. Kobayashi, T., T. Iguchi and Y. Ohta: A betalipoproteinemia induced by ORP150 over-expression in mice. Comp. Med., 57: 247-254, 2007.
- © 19 Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Toxicogenomics and ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption and basic biology in vertebrates and invertebrates. Gen. Comp. Endocr., 153: 25-29, 2007.
- © 20. Suzuki, A., Urushitani, H., Watanabe, H., Sato, T., Iguchi, T., Kobayashi, T. and Ohta, Y. Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland. J. Vet. Med. Sci. 69: 725-731, 2007.
21. Katsu, Y., M. Hinago, M., K. Sone, L.J. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Analysis the ligand-specificity of the estrogen and androgen receptors of mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*. Mol. Cell. Endocr., 276: 10-17, 2007.
22. Iguchi, T., Y. Katsu, H. Urushitani, A. Lange and C.R. Tyler: Developmental reproductive effects of exposure to pharmaceutical steroids in the aquatic environment: Studies on mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*), roach (*Rutilus rutilus*) and medaka (*Oryzias latipes*). J. Marine Sci. Technol., 15: 29-36, 2007.
23. vom Saal, F.S., B.T. Akingbemi, S.M. Belcher, L.S. Birnbaum, D.A. Crain, M. Eriksen, L.J. Guillette, R. Hauser, J.J. Heindel, S.-K. Ho, T. Iguchi, S. Jobling, J. Kanno, R.A. Keri, K.E. Knudsen, G.A. LeBlanc, M. Marcus, J.A. McLachlan, J.P. Myers, A. Nadal, R.R. Newbold, N. Olea, G.S. Prins, C.A. Richter, B.S. Rubin, C. Sonnenschein, A.M. Soto, C.E. Talsness, J.G. Vandenberg, L.N. Vandenberg, D.R. Walser-Kuntz, C.S. Watson, W.V. Welshons, Y. Wetherill and R.T. Zoeller: Capel 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.

24. Crain, D.A., M. Eriksen, T. Iguchi, S. Jobling, H. Laufer, G.A. LeBlanc and L.J. Guillette, Jr.: An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod. Toxicol.*, 24: 225-239, 2007.
25. Chojnowski, J.L., J. Franklin, Y. Katsu, T. Iguchi, L.J. Guillette Jr, R.T. Kimball and E.L. Braun: Patterns of vertebrate isochore evolution revealed by comparison of expressed mammalian, avian and crocodilian genes. *J. Mol. Evolution*, 65: 259-266, 2007.
26. 井口泰泉、勝義直: 内分泌かく乱物質. ホルモンハンドブック 新訂 eBook2版 日本比較内分泌学会編. 南江堂. 2007.
27. 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)
28. 井口泰泉: 化学物質による内分泌かく乱の幾つかのメカニズムについて. *日本リスク学会誌*, 17: 61-64, 2007.
29. 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.
30. 佐藤友美、金翰那、桐ヶ谷明子、井口泰泉、林しん治: 出生直後のDiethylstilbestrol投与による多卵性卵胞誘導とエストロゲンレセプターβ. *日本生殖内分泌学会誌*, 12: 9-13, 2007.
31. 井口泰泉、勝義直: 内分泌かく乱物質. ホルモンハンドブック 新訂 eBook2版 日本比較内分泌学会編. 南江堂. 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.: Recent studies using *Xenopus laevis* and American alligators - Adipogenesis in *Xenopus laevis* induced by organotin compounds and temperature-dependent sex determination of alligators. *International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology*. March 26-28, 2007, Berkeley, CA, USA.
3. Katsu, Y., R. Ichikawa, H. Urushitani, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen, and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (*Pseudemys nelsoni*). *International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology*. March 26-28, 2007, Berkeley, CA, USA.
4. Urushitani, H., Y. Katsu, S. Kohno, L.J. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning of *Alligator Mississippiensis* anti-Mullerian hormone gene. *International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology*. March 26-28, 2007, Berkeley, CA, USA.
5. Ohta, Y., Y. Katsu, T. Iguchi, S. Kohno, M.

- Brandon and Guillette, L.J.Jr.: Immunohistochemical demonstration of estrogen receptor in American alligator oviduct. International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology. March 26-28, 2007, Berkeley, CA, USA.
6. Iguchi, T.: What are the data on environmental contaminants disrupting reproductive function? Examples of mosquitofish, roach and medaka. International Federation of Fertility and Sterility, 2007. April 29-May 3, 2007, Durban, South Africa.
 7. Iguchi, T., H. Watanabe, Y. Ohta and B. Blumberg: Developmental effects of chemicals: TBT-induced adipogenesis and DES-induced persistent vaginal changes in mice. 4th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters. May 28-31, 2007, University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.
 8. 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.
 9. Iguchi, T.: *Daphnia magna*: Ecotoxicogenomics, Basic Biology and Risk Assessment. ICT July 15-19, 2007 Le Palais des Congres de Montreal, Canada. (S-18 Innovations in Ecotoxicology).
 10. 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. 岡崎コンファレンスセンター, 2007 年 3 月.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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膣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.

16. 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膣上皮細胞不可逆的増殖はエストロゲンレセプター α 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, 大宮ソニックシティー, 2007 年 12 月 10-11 日.
17. 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膣上皮増殖と 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.

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核内受容体作動性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 bisphenol A (BPA) の Steroid Xenobiotic Receptor (SXR) を介した骨芽細胞に対する影響を検討することを目的とした。検討には、ヒト骨芽細胞株 hFOB に SXR を安定発現させた株を作成し、BPA の影響（増殖、遺伝子発現及びコラーゲンの蓄積）を確認した。さらに BPA による hFOB の微細構造の変化を電子顕微鏡にて観察した。結果、SXR を安定発現した hFOB では BPA の細胞増殖作用が強く認められた。また、BPA の添加によって SXR 応答遺伝子群の発現が誘導され、細胞内のコラーゲンが蓄積する傾向が認められた。本検討によって、hFOB に対する BPA 添加による細胞増殖とコラーゲン蓄積に SXR が関与することが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では bisphenol A (BPA) の Steroid Xenobiotic Receptor (SXR) を介した骨芽細胞に対する影響を検討することを目的とした。

すなわち、近年、骨芽細胞様細胞 (MG-63) における SXR を介したビタミン K2 の作用が報告された。我々は、この骨芽細胞における SXR と内分泌攪乱化学物質 bisphenol A の関係に注目し、ヒト正常骨芽細胞株 hFOB を用い、分子生物学的及び形態学的検討を行った。

B. 研究方法

ヒト骨芽細胞株 hFOB に SXR を安定発現させ、BPA の影響（増殖、遺伝子発現及びコラーゲン

の蓄積）を確認した。さらに BPA による hFOB の微細構造の変化を電子顕微鏡にて観察した。

すなわち、以下の方法で実験を行った。

化合物

Bisphenol A, rifampicin (以上、和光純薬工業)。

溶媒は DMSO (和光純薬工業) を用いた。

ヒト正常骨芽細胞

ヒト正常骨芽細胞として hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372) を使用した。

SXR 安定発現骨芽細胞株

SXR cDNA 全長を含むインサートを pcDNA3.1 にサブクローニングした。

pcDNA3.1/SXR プラスミドをリポフェクション法により hFOB に遺伝子導入した。Hygromycin に

て処理後、作製した3株(D3、D6及びD7)を実験に使用した。MockとしてpcDNA3.1プラスミドのみを導入したhFOB細胞を樹立して使用した(D12及びD13)。

細胞増殖解析

Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)にて評価した。

定量的PCR

LightCycler(Roche)を用い、CYP3A4、TSKU及びMATN2の定量的PCRを行った。

コラーゲン測定

コラーゲン・ステイン・キット(コラーゲン技術研修会)にて評価した。

超微形態観察

スライドガラス上にhFOBを培養し、グルタルール固定後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片(約80nm)作成後、透過型電子顕微鏡(日立)にて観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は株化細胞を用いて実施したため、本項目には該当しない。

C. 研究結果

SXRを安定発現したhFOBではBPAの細胞増殖作用が強く認められた。また、BPAの添加によってSXR応答遺伝子群の発現が誘導され、細胞内のコラーゲンが蓄積する傾向が認められた。

すなわち、

1. 細胞増殖に対する影響

いずれの細胞(hFOB、D3、D6、D7、D12及びD13)においてもBPA(10^{-7} 及び 10^{-6} M)の添加(72時間)にて、コントロールと比して有意な細胞数の増加を確認した。株間の比較では、

SXRを導入したD3、D6及びD7での増殖が高かった。

2. SXR応答遺伝子の発現

hFOBでの検討では、RIF(10^{-5} M)及びBPA(10^{-7} M)添加によってSXR応答遺伝子であるCYP3A4、TSKU及びMATN2の有意な発現誘導が認められた。また、骨肉腫細胞株MG-63においても、RIF(10^{-5} M)及びBPA(10^{-7} M)の添加にて同様な発現誘導を認めた。

3. コラーゲンの蓄積

hFOB、D3、D6及びD7では、RIF(10^{-5} M)添加によって有意なコラーゲンの蓄積を認めた。BPA(10^{-7} M)添加によってもhFOB、D3及びD6に有意なコラーゲンの蓄積を認めた。SXR導入株D7では、BPAによるコラーゲンの有意な蓄積を確認できなかった。

4. 超微形態観察

hFOBにRIF(10^{-5} M)を添加した細胞では、細胞質に繊維状の構造物(未同定)が蓄積する傾向が認められた。この構造物はコントロール細胞やBPA添加細胞では明らかではなかった。

D. 考察

骨基質はコラーゲンと非コラーゲン性タンパク質で構成され、骨基質の約90%がコラーゲンで、残りの10%がオステオカルシン、オステオネクチン、オステオポンチンなどの非コラーゲン性タンパク質である。コラーゲンは骨の石灰化の基質として重要な役割をしている。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Ichikawaら(2006, *J Biol Chem*)はビタミンK₂がSXRのactivatorであるRIFと同様にSXRを介してコラーゲン蓄

積に重要な遺伝子 (TSKU) を増加させることを報告した。以上のことから、SXR を介した骨芽細胞の活性化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 K と同様に SXR を介するものと示唆される。今回の検討では、BPA が hFOB に対して TSKU などの遺伝子発現を誘導することを確認したが、コラーゲンの蓄積及び超微形態においては RIF ほどの効果を認めることができなかった。このことは BPA の SXR に対する結合性が RIF よりも低いことが原因として考えられる。以上の結果、BPA が骨芽細胞の SXR を介した機能を攪乱する可能性が示唆された。

Xenobiotics の代謝に関しては、SXR を介した代謝・排泄機構の他、核内受容体 aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与する経路も古くから注目されている。AhR はラット骨芽細胞様細胞 (ROB、UMR-106)、Preosteoblastic 細胞 (MC3T3-E1) での発現が報告されている (Mandal, 2005, *J Comp Physiol*; Wejheden et al., 2006, *Biochem Biophys Res Commun*)。UMR-106 では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 添加によって、AhR の応答遺伝子である CYP1A1 の発現が増加することが確認されている (Wejheden et al., 2006, *Biochem Biophys Res Commun*)。一方、近年、BPA が核内受容体 estrogen-related receptor γ (ERR γ) と強く結合することが報告された (Takayanagi et al., 2006, *Toxicol Lett*) が、ERR γ の骨芽細胞を含めた骨組織での発現は現時点での報告はない。以上のことから、内分泌攪乱化学物質の骨芽細胞に対する影響についてこれら核内受容体を中

心に、ヒト骨組織での発現状況を含めて更なる解析を行っていくことが今後の課題である。

E. 結 論

本検討によって、hFOB に対する BPA 添加による細胞増殖とコラーゲン蓄積に SXR が関与することが明らかとなった。

すなわち、今後、深刻化することが懸念される内分泌攪乱化学物質のヒト健康に対する影響について、我々は内分泌攪乱化学物質の標的としての骨粗組織への影響を、骨芽細胞を中心に検討してきた。今後、内分泌攪乱化学物質の主な標的組織 (生殖器系、神経系、免疫系など) への影響と骨組織への影響について、それらの作用機序を比較・検討していくことも重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) ◎ Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: a possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H. *Bone*. 2007 40(4):876-887.
- 2) ◎ Aromatase inhibitor and bone. Miki Y, Suzuki T, Sasano H. *Biomed Pharmacother*. 2007 61(9):540-542.
- 3) ◎ Sex steroid receptors expression and hormone induced cell proliferation in human osteosarcoma Dohi O, Hatori M, Suzuki T, Ono K,

Hosaka M, Akahira J, Miki Y, Nagasaki S, Itoi E, Sasano H. *Cancer Sci.* 2007 in press

4) Biological Roles of Estrogen and Progesterone in Human Endometrial Carcinoma - New Developments in Potential Endocrine Therapy for Endometrial Cancer - Ito K, Utsunomiya H, Yaegashi N, Sasano H. *Endocr J.* 2007

5) Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sasano H. *Endocr Relat Cancer.* 2007 14(2):279-292.

6) Controversies of aromatase localization in human breast cancer--stromal versus parenchymal cells. Miki Y, Suzuki T, Sasano H. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 106(1-5):97-101

7) Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Yamaguchi Y, Kitada K, Honma S, Moriya T, Hirakawa H, Evans DB, Hayashi S, Ohuchi N, Sasano H. *Cancer Res.* 2007 15;67(8):3945-3954.

8) Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Horie K, Inoue S, Sasano H. *Cancer Sci.* 2007 98(5):644-51.

2. 学会発表

1) ◎ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質の影響 三木康宏、長崎修治、赤平純一、五十嵐勝秀、菅野 純、鈴木 貴、笹野公伸 第 34 回日本トキシコロジー

学会学術年会 2007 年 東京都

2) ◎ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質 Bisphenol A の細胞増殖作用 三木康宏、長崎修治、赤平純一、鈴木貴、笹野公伸 第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007 年 東京都

3) ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor -related receptor (ERR)β の発現と臨床病理学的因子との関連について 赤平純一、鈴木貴、鈴木史彦、三浦伊久美、三木康宏、長崎修治、鴨川由紀子、伊藤潔、森谷卓也、林慎一、八重樫伸生、笹野公伸 第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007 年 東京都

4) 前立腺癌における Estrogen Receptor β 及び β cx の機能解析 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木貴、林慎一、笹野公伸 第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007 年 東京都

5) ◎骨芽細胞に対する SERMs の直接作用の比較 三木康宏、長崎修治、赤平純一、鈴木 貴、笹野公伸 第 3 回 SERM 学術研究会学術集会 2007 年 東京都

6) ◎ヒト骨芽細胞に対するビスフェノール A の影響 三木康宏、長崎修治、赤平純一、鈴木 貴、笹野公伸 第 14 回 日本内分泌学会東北地方会 2007 年 仙台市

7) ◎Sex Steroids and human osteosarcoma - Hormone dependent cell proliferation and its clinicopathological significance - 土肥修、赤平純一、鈴木 貴、三木康宏、笹野公伸 第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 横浜市

8) The Expression of Estrogen – Related Receptors in Human Epithelial Ovarian Cancer : The Clinical Significance of ERR α in Clear Cell Adenocarcinoma. J. Akahira, T. Suzuki, F. Suzuki,, I. Miura, N. Kamogawa, Y. Miki, K. Ito, S. Hayashi, N. Yaegashi, H. Sasano. THE ENDOCRINE SOCIETY'S 89th Annual Meeting ENDO 07, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に無し

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 教授

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およびダイオキシンレセプターに相互作用する複合体を解析した。その結果、ダイオキシンレセプターが蛋白質分解系を誘導することで、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。さらにダイオキシンレセプターの脂肪細胞分化制御を担う複合体を同定した。

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およびダイオキシンレセプターに結合する転写共役因子複合体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、これら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

性ホルモンレセプターに結合する新しい転写共役因子を同定した。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の蛋白分解を促進することをすることを見出した。さらに脂肪細分化制御におけるダイオキシンレセプター複合体を同定した。すなわち、

1) ฮอร์โมน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関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。

さらに本年度は、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。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。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、ダイオキシン類の作用の一部が分解経路によって発揮される可能性の解析を進めている。

3) ダイオキシンレセプターを介した脂肪細胞分化制御機構

ダイオキシン類の脂肪細胞分化に対する阻害作用が知られている。一方脂肪細胞分化は核内レセプターの一つである PPAR γ によって誘導される。そこで、脂肪細胞分化制御におけるダイオキシン類の毒性作用機構の解明を目指し、ST2 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、再構築ダイオキシン受容体蛋白質を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、いくつかの構成成分を同定した。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、転写制御機構を介した脂肪細胞分化制御機構の解析を進めている。

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。しかしながら、これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは判断できなかった。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。

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の分子機構を明らかにした。

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

© Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Igarashi, M., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Kato, S. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR- γ transactivation. **Nat. Cell. Biol.** 9, 1273-1285, 2007.

©Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H. and Kato, S. Vitamin K induces osteoblast differentiation through PXR-mediated transcriptional control of the Msx2 gene. **Mol. Cell. Biol.** 27, 7947-7954, 2007.

Kitagawa, H., Ray, W. J., Glantschnig, H., Nantermet, P. V., Yu, Y., Leu, C. T., Harada, S. I., Kato, S. and Freedman, L. P. A regulatory circuit mediating convergence between nurr1 transcriptional regulation and Wnt Signaling. **Mol. Cell. Biol.** 27, 7486-7496, 2007.

©Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T. J., Chambon, P. and Kato, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell** 130, 811-823, 2007.

- ©Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. **Nature** 446, 562-566, 2007.
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B. W. and Kato, S. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs. **Nat. Cell Biol.** 9, 604-611, 2007.
- Sato, S., Kojima, M., Hanada, R., Kimura, A.I., Abe, T., Matsumoto, T., Iwasaki, M., Inose, H., Ida, T., Mieda, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., Kato, S., Kangawa, K., Shinomiya, K. and Takeda, S. Central control of bone remodelling by Neuromedin U: a mediator of the leptin-dependent regulation of bone formation. **Nat. Med.** 13, 1234-1240, 2007.
- Takezawa, S., Yokoyama, A., Okada, M., Fujiki, R., Iriyama, A., Yanagi, Y., Ito, H., Takada, I., Kishimoto, M., Miyajima, A., Takeyama, K., Umesono, K., Kitagawa, H. and Kato, S. A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor function. **EMBO J.** 26, 764-774, 2007.
- ©Miyamoto, J., Matsumoto, T., Shiina, H., Inoue, K., Takada, I., Ito, S., Itoh, J., Minematsu, T., Sato, T., Yanase, T., Nawata, H., Osamura, R. Y. and Kato, S. Pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. **Mol. Cell. Biol.** 27, 4807-4814, 2007.
- Kim, M.-S., Fujiki, R., Kitagawa, H. and Kato, S. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. **Mol. Cell. Endocrinol.** 265-266, 168-173, 2007.
- Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K. and Kato, S. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. **Mol. Endocrinol.** 21, 334-342, 2007.
- Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. **Arch. Biochem. Biophys.** 460, 166-171, 2007.
- Memezawa, A., Takada, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S. and Kouzmenko, A. P. Id2 Gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling

- regulates proliferation in human keratinocytes. **Oncogene** 26, 5038-5045, 2007.
- Kimura, S., Matsumoto, T., Matsuyama, R., Shiina, H., Sato, T., Takeyama, K. and Kato, S. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. **Trends Endocrinol. Metab.** 18, 183-189, 2007.
- Kato, S., Fujiki, R., Kim, M.-S. and Kitagawa, H. Ligand-induced transrepressive function of VDR requires a chromatin remodeling complex, WINAC. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 103, 372-380, 2007.
- Matsumoto, T., Kawano, H., Shiina, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female reproduction. **Reproductive Med. Biol.** 6, 11-17, 2007.
- Fuse, H., Korenaga, S., Sakari, M., Hiyama, T., Ito, T., Kimura, K. and Kato, S. Non-steroidal antiandrogens act as AF-1 agonists under conditions of high androgen-receptor expression., **Prostate.**, 67, 630-637, 2007.
- Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S. and Matsumoto, T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. **J. Clin. Invest.** 117, 1514-1526, 2007.
- Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T. and Itoh, H. Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. **J. Biol. Chem.** 282, 1998-2010, 2007.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Okabe, T., Nomura, M., Daitoku, H., Fukamizu, A., Kato, S., Takayanagi, R. and Nawata, H. IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. **J. Biol. Chem.** 282, 7329-7338, 2007.
- Mukai, H., Tsurugizawa, T., Murakami, G., Kominami, S., Ishii, H., Ogiue-Ikeda, M., Takata, N., Tanabe, N., Furukawa, A., Hojo, Y., Ooishi, Y., Morrison J. H., Janssen, W. G., Rose, J. A., Chambon, P., Kato, S., Izumi, S., Yamazaki, T., Kimoto, T. and Kawato, S. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. **J. Neurochem.** 100, 950-967, 2007.
- Kittaka, A., Saito, N., Honzawa, S., Takenouchi, K., Ishizuka, S., Chen, T. C.,

Peleg, S., Kato, S. and Arai, M. A. Creative synthesis of novel vitamin D analogs for health and disease. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 103, 269-276, 2007.

Hirata, T., Fujioka, M., Takahashi, K. A., Asano, T., Ishida, M., Akioka, K., Okamoto, M., Yoshimura, N., Satomi, Y., Nishino, H., Hirota, Y., Nakajima, S., Kato, S. and Kubo, T. Low molecular weight phenotype of Apo(a) is a risk factor of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplant. **J. Rheumatol.** 34, 516-522, 2007.

Arai, M. A., Takeyama, K., Ito, S., Kato, S., Chen, T. C. and Kittaka, A. High-throughput system for analyzing ligand-induced cofactor recruitment by vitamin D receptor. **Bioconjug. Chem.** 18, 614-620, 2007.

Hirata, T., Fujioka, M., Takahashi, K. A., Arai, Y., Asano, T., Ishida, M., Kuribayashi, M., Akioka, K., Okamoto, M., Yoshimura, N., Satomi, Y., Nishino, H., Fukushima, W., Hirota, Y., Nakajima, S., Kato, S. and Kubo, T. ApoB C7623T polymorphism predicts risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation. **J. Orthop. Sci.** 12, 199-206, 2007.

Indra, A. K., Castaneda, E., Antal, M. C., Jiang, M., Messaddeq, N., Meng, X., Loehr, C. V., Gariglio, P., Kato, S., Wahli, W., Desvergne, B., Metzger, D. and Chambon, P.

Malignant transformation of DMBA/TPA-induced papillomas and nevi in the skin of mice selectively lacking retinoid-X-receptor alpha in epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.** 127, 1250-1260, 2007.

2. 学会発表

【国内】

2007 年度日本農芸化学会大会

筋芽細胞を用いた PPAR δ 転写共役因子の精製と同定

村上友浩、高田伊知郎、北川浩史、山岡一良、加藤茂明

Notch シグナル伝達依存的な新規転写抑制因子の同定と機能解析

武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、Alexander Kouzmenko、鈴木絵里子、山形薫、趙越、田辺真彦、木村周平、上田崇、村田拓也、藤山沙理、加藤茂明

Wnt シグナル依存的な PPAR γ 活性制御機構の解析

高田伊知郎、三原政朋、加藤茂明

未知クロマチンバウンダリー制御因子の新たな探索法確立の試み

鈴木絵里子、沢津橋俊、伊藤紗弥、田辺真彦、木村周平、趙越、山形薫、上田崇、村田拓也、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明

Y染色体遺伝子TSPYと男性ホルモン受容体の機能的相互作用の解析

秋本千央、井上和樹、松本高広、盛真友、