

NPnEOs) の代表として使用した。NP2EOは、親物質であるNPnEOsにも含まれているが、NPnEOsの水環境中での分解の最終産物の一つである。

エチレングリコール、チオ尿素、トルエン、2-アミノエタノール、DBS、1,3-ジクロロ-2-プロパノール、*p*-キシレンは和光純薬工業、N,N-ジメチルホルムアミド、 ϵ -カプロラクタム、テレフタル酸 (telephthalic acid; TPA)、1,4-ジオキサン、アニリン、フェノールはキシダ化学、NP2EO、エチレンジアミン四酢酸、ジエチレントリアミン、メタクリル酸、アクリル酸、ヘキサメチレンジアミンは東京化成工業、ピリジンは林純薬工業から購入した。

標準リガンド及び被検化学物質は、DMSOに溶解後4°Cで保存し、使用前にDMSOで段階希釈して用いた。

2.2 CoA-BAP法

本研究では、西川らが開発したCoA-BAP法¹⁸⁾を用いて、供試化学物質のNRへの結合を評価した。CoA-BAP法は、生細胞を使用せずに、リガンドに依存したNRとコアクチベーターの相互作用をマイクロプレート上で検出する *in vitro* 手法である。本手法では、大腸菌を用いて予め高発現させたNRリガンド結合領域 (NR-LBD) とコアクチベーター (CoA) を使用する。NR-LBDを固定したプレートにCoAとリガンドを加えると、リガンドに依存してNRの立体構造が変化し、CoAがNR-LBDに結合する。CoAにはBAPが融合されているため、NRとCoAの相互作用の強さは、BAPのアルカリフォスファターゼ (AP) 活性の強さとして測定できる。このAP活性は用量反応性を示し、検出感度が酵母two-hybrid法よりも高いことが確認されている¹⁸⁾。また本法は、マイクロプレート上で操作するため、一度に多数の化学物質を試験することができる。さらに、NR-LBDとCoAをタンパクとして用いているため、これまで環境汚染化学物質のホルモン様活性の検出に汎用されてきた酵母法で問題視されてきた酵母細胞膜への透過性や酵母細胞に対する毒性による影響を回避することが可能である。

CoA-BAP法は、上述した原理に則って作製されたNuLigandシリーズ (マイクロシステムズ) を用いて行った。0.1 M炭酸緩衝液に溶解させた受容体を96穴マイクロプレートに分注し、4°Cで一晩静置することでウェルに固定化させた。緩衝液A (Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 0.25 mM, glycerol 5%, dithiothreitol 0.5 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.2) でウェルを3回洗浄後、緩衝液Aに懸濁させた30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のTIF2-BAP (PPAR δ 以外) 或いはCBP-BAP (PPAR δ) を100 μl 分注し、適宜希釈した標準リガンド或いは被検物質を添加して、4°Cで1時間静置した。緩衝液B (Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Nonidet P-40 0.1%, pH 7.2) でウェルを3回洗浄後、発色基質 (*p*-nitrophenylphosphoric acid 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) を100 μl 添加して、30°C或いは37°Cで反応させ、405 nmの吸光度 (A_{405}) を測定した。実験は全て3連で行い、平均と標準偏差 (standard deviation; SD) を算出した。ある被検物質濃度における A_{405} 値の平均-SDがDMSOの A_{405} 値の平均+SDを上回り、それより高濃度で A_{405} 値がさらに上昇した場合に陽性と判定した。

3. 結果

CoA-BAP法により、 10^{-9} - 10^{-3} Mの範囲で、20種のPRTR

化学物質の各種NRに対する結合性を調べた。17種類の化合物では、いずれのNRに対しても有意な結合性を示さなかったが、NP2EO、TPA、DBSの3物質はそれぞれ2、3、4種類のNRに結合した (Table 1)。NRで見ると、RXR α 、PPAR α 、PPAR δ を除く5種類のNRに対して、少なくとも1種類の被検化学物質が結合した。活性を示した物質の用量反応曲線を受容体種ごとにFig. 1に示す。

NP2EOは、ER α とPPAR γ に対して結合性を示した。ER α では、標準リガンドであるE2に比べて 10^3 倍高濃度である 10^{-6} Mから結合性が確認された (Fig. 1A)。一方、PPAR γ への結合性が認められる濃度は標準リガンドに比べて 10^6 倍高濃度であり、活性は非常に低かった (Fig. 1E)。

TPAは、RAR γ 、VDR及びPPAR γ に対して結合性を示した。RAR γ に対する結合は 10^{-7} Mから認められ、それより高濃度では濃度依存的に活性が上昇した (Fig. 1C)。VDRに対しては、 10^{-8} Mで活性を示し、それより高濃度では、1,25(OH)₂D3と同様の割合で、濃度依存的に活性が上昇した (Fig. 1D)。PPAR γ においては、 10^{-6} M以上の濃度で結合したが、それより高濃度における活性の増大は緩やかであった (Fig. 1E)。

DBSは、TR α 、RAR γ 、VDR、PPAR γ の4種類のNRに結合した。TR α に対する結合性は、 10^{-4} M以上の濃度でのみ認められた (Fig. 1B)。PPAR γ に対しては、 10^{-6} Mで結合性を示した。その活性は 10^{-6} - 10^{-4} Mにおいて僅かずつ高まったが、 10^{-4} M以上では変化しなかった。RAR γ とVDRに対しては、それぞれ 10^{-6} M及び 10^{-7} Mで結合性を示した。また、これらより高濃度では、それぞれの標準リガンドの用量反応曲線に類似した割合で濃度依存的に活性が増大した (Fig. 1C, D)。

4. 考察

従来、内分泌攪乱活性に基づく環境汚染化学物質のリスク評価は、主にERとTRを対象として進められ、現在EDsとして疑いのある物質に挙げられているアルキルフェノール類やフタル酸エステル類、ビスフェノールA、農薬類などに対して数多くの知見が得られてきた。本研究で調べた20種類のPRTR化学物質の中で、NP2EOがER α に結合することが観察された。NP2EOは、酵母法¹⁹⁾やマスのピテロゲニン遺伝子発現試験²⁰⁾においてエストロゲン様活性が確認されている。また、本研究で得られたNP2EOのER α に対する最少活性発現濃度は、既往研究¹⁸⁾における4-ノニルフェノールのER α に対する最少活性発現濃度の1/100-1/10であり、これは酵母法における結果¹⁹⁾と同等である。これらより、CoA-BAP法で得られたNRに対する結合性はある程度妥当なものであると考えられた。他方、TR α には、 10^{-4} M以上の高濃度でDBSが結合する可能性のあることが示されたが、DBSを含むLASの甲状腺ホルモン様活性に関する報告はこれまでにない。

これまで、性ホルモン受容体とTR以外のNRは水環境中における化学物質のリスク評価に考慮されてこなかった。そこで本研究では、新たな試みとして、公共用水域に大量に排出されている化学物質を対象として、ER、TR以外のNRへの結合性を調べた。その結果、NP2EOがPPAR γ 、TPAがRAR γ 、VDR及びPPAR γ 、DBSがRAR γ 、VDR及びPPAR γ に結合する可能性のあることが確認された。特に、TPAとDBSのRAR γ 及びVDRに対する結合性は標準リガ

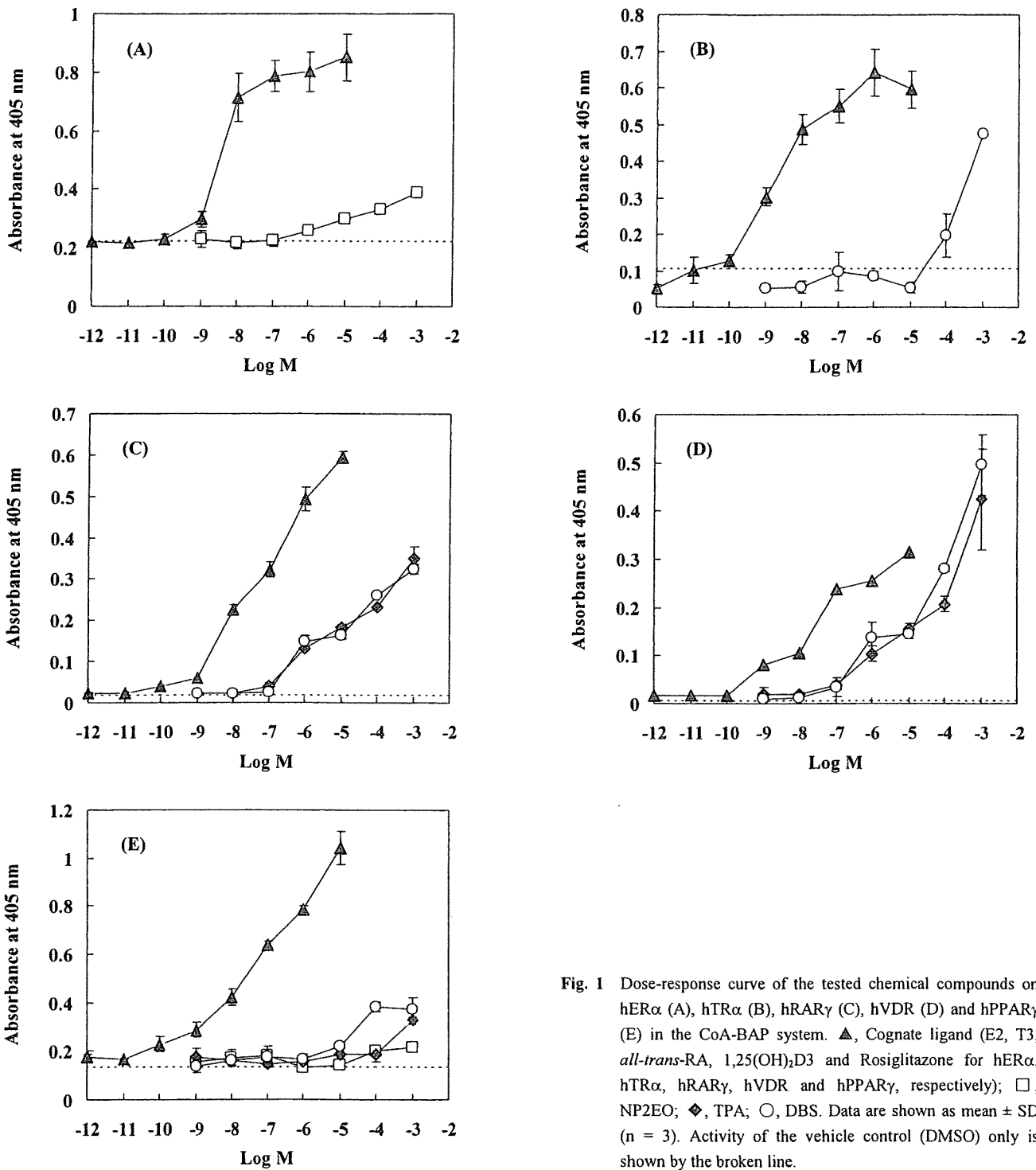


Fig. 1 Dose-response curve of the tested chemical compounds on hERα (A), hTRα (B), hRARγ (C), hVDR (D) and hPPARγ (E) in the CoA-BAP system. ▲, Cognate ligand (E2, T3, *all-trans*-RA, 1,25(OH)₂D3 and Rosiglitazone for hERα, hTRα, hRARγ, hVDR and hPPARγ, respectively); □, NP2EO; ◆, TPA; ○, DBS. Data are shown as mean ± SD (n = 3). Activity of the vehicle control (DMSO) only is shown by the broken line.

下に類似した割合で濃度依存的に増大した (Fig. 1C, D)。これらの結果は、現在使用されている多種多様な化学物質の中に、48種類存在するNRのいずれか或いは複数に作用して、内分泌攪乱活性を示すものが数多く存在していることを強く示唆するものである。このため、今後のEDsの評価では、種々のNRを介した内分泌攪乱活性のスクリーニングを実施していくことが重要である。

本研究は被検化学物質のNRに対する結合性をスクリーニングしたものであり、陽性と判定されたケースで必ず

しも生体影響が生じる訳ではない。しかし、本研究の結果はEDsによる内分泌攪乱作用の第一段階であるNRとの結合が生じる可能性を示すものであり、被検化学物質の潜在的な内分泌攪乱作用の可能性をある程度推測し得るものと言える。また、NRには種差があるため、ヒトNRを用いた本研究の結果が全野生生物種に当てはまる訳ではない。しかし、NRの種類によっては、異種間で高い保存性を示すものもあることから⁹⁾、本研究の結果に基づき、ヒト以外の野生生物種を含め、被検物質の生物への悪影

響の可能性をある程度推察できるものと考えられる。そこで、以下では、本研究で得られた結果を基に、幾つかのNRに対する結合性が確認されたNP2EO, TPA及びDBSの潜在的な内分泌攪乱作用に関する推察を試みた。

RARは、脊椎動物の視覚や形態形成、発生、細胞分化、組織の恒常性に重要な役割を果たしている。RARのリガンドであるRAは、脊椎動物の催奇形物質であり、その過剰摂取は多種多様な奇形を発生させる^{21,22)}。1990年代から北米で観察されているカエルの奇形にも、水環境汚染化学物質によるRARシグナル伝達系の攪乱が関係していることが指摘されている^{23,24)}。VDRは、カルシウムの恒常性、骨代謝、及び他の重要な生物作用（細胞分化の誘導、細胞増殖阻害、免疫修飾、他のホルモン系の制御など）において中心的な役割を担っている²⁵⁾。PPAR γ は、主に脂肪とグルコースの代謝に重要な役割を果たしており、種々の臓器において抗発癌作用を発現する²⁶⁾。また、そのアゴニストは、臨床でII型糖尿病の治療薬として使用されている。現在のところ、環境中でVDR或いはPPAR γ を介したものと考えられる悪影響の観察事例はない。

RAR γ ²⁷⁾とPPAR γ ²⁶⁾は、RXRとヘテロ二量体を形成し、各々の標的遺伝子を転写活性化する。しかし、これらの受容体への結合性が認められたNP2EO (PPAR γ)、TPA (RAR γ , PPAR γ)、DBS (RAR γ , PPAR γ)は、いずれもRXR α には結合しない (Table 1)。NRが二量体を形成して活性化されるシグナル経路においては、リガンドが二量体を成すNRの片方にしか結合しない場合の影響は、双方に結合する場合に比べて小さい可能性が指摘されている⁹⁾。このことから、NP2EO, TPA, DBSが単独でRARやPPAR γ を介するシグナル伝達系を攪乱する可能性は小さいことが示唆された。しかし、有機スズ化合物のようにRXR α に結合する化学物質が共存する環境下では、RARやPPAR γ のシグナル伝達系への悪影響が生じる可能性もあり得る。ただし、RARとPPAR γ に対する最少活性発現濃度が環境水中濃度に比べて高いことから (NP2EOで10⁴倍以上²⁸⁾、TPAで100倍以上²⁹⁾、DBSで5倍以上³⁰⁾)、現状ではこれらの物質が生物に悪影響を及ぼしている可能性は低いものと考えられる。

他方、VDRは、ホモ二量体、或いはRARかRXRとのヘテロ二量体を形成し、VD応答遺伝子を転写制御する^{31,32)}。VDRへの結合が確認されたTPAとDBSはRXRに結合しないことから、上述したRAR及びPPAR γ のケースと同様に、VDR-RXRヘテロダイマーを介するVDRシグナル伝達機能への悪影響の可能性は低いものと予想される。一方、TPAとDBSは、RAR γ とVDRの両受容体に対する結合性が濃度依存的に増大したことから、それぞれ単独でVDRホモ二量体或いはVDR-RARヘテロ二量体に強く作用する可能性がある。TPAは、混餌投与によって、Fischer-344ラット離乳児に対して、TPAカルシウムを主成分とする膀胱結石を形成し、膀胱移行上皮の肥厚化と高カルシウム尿症を引き起こすことが報告されている³³⁾。また、DBSを含むLASは、経口投与によって哺乳動物胎児に骨化遅延を引き起こすことが明らかにされている³⁴⁾。すなわち、両物質が有する生体毒性は、VDRシグナル伝達系に関わる生体内機能と興味深い一致を示している。以上のことから、TPAとDBSは、急性毒性を示さない濃度において、VDRホモ二量体或いはVDR-RARヘテロ二量体に作用するこ

とでVDRシグナル伝達機能を乱し、生体に悪影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。しかし、TPAは、環境水中濃度がRAR γ 及びVDRへの最少活性発現濃度よりもそれぞれ100倍及び10倍以上低く、また、生分解性が良好で残留性が低いことから²⁹⁾、実環境中で活性が発現する可能性は高くないものと推察される。他方、DBSは、環境水中濃度がRAR γ 及びVDRに対する最少活性発現濃度と同程度の場合もあることから³⁰⁾、活性発現の可能性を完全には否定できないが、水環境中での生分解性が高く、数時間～数日間で消失することから³⁰⁾、リスクはさほど高くないものと推定される。以上のように、現状のデータからでは、TPAやDBSが単独で野生動物のVDRシグナル伝達機能に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられるものの、これらが共存した場合には、相乗的な作用が生じることも否定できない。また、環境中への排出実態が明らかでない微量化学物質の中にもNRに結合性を示すものが存在すると推測されることから、多様なNRへの結合を介したリスクについて評価していくことが望まれる。

5. ま と め

本研究では、公共用水域への排出量の多いPRTR第1種指定化学物質20種のNR結合性を調査した。その結果、これまでに内分泌攪乱活性が疑われてこなかったTPAとDBSが複数のNRに結合する可能性のあることが示された。このことは、現在の評価体系で断定されている、或いは疑われているEDs以外の物質が、性ホルモン受容体やTR以外のNRを通じて、内分泌攪乱作用を示す可能性のあることを強く示唆している。今後の内分泌攪乱作用に関するリスク評価では、環境中に排出される可能性のある多様な人工化学物質を対象とし、種々のNRへの結合を介したリスクについて、網羅的、総合的に評価していくことが重要である。

謝 辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)提案公募型開発支援研究協力「環境負荷低減・高安全水処理システム技術の研究開発」の一環として実施したものである。ここに謝意を表します。

(原稿受付 2006年10月2日)

(原稿受理 2006年12月11日)

参 考 文 献

- 1) Bell, B., Spotila, J. R. and Congdon, J. (2006) High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife refuge, *Environ. Poll.*, **142**, 457-465.
- 2) Edwards, T. M., Moore, B. C. and Guillette, L. J. Jr. (2006) Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view, *Int. J. Androl.*, **29**, 109-121
- 3) Kingsford, M. J., Suthes, I. M. and Gray, C. A. (1996) Exposure to sewage plumes and the incidence of deformities in larval fishes, *Mar. Poll. Bull.*, **33**, 201-212
- 4) Houlihan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H. and Kuzmin, S. L. (2000) Quantitative evidence for global amphibian population declines, *Nature*, **404**, 752-755.
- 5) Vandenlangenberg, S. M., Canfield, J. T. and Magner, J. A. (2003) A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs), *Environ. Monit. Assess.*, **82**, 45-61.
- 6) Wake, D.B. (1991) Declining amphibian populations, *Science*, **253**, 860.

- 7) Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D. (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation, *Crit. Rev. Toxicol.*, **30**, 71-133.
- 8) 遠山千春, 大迫誠一郎, 石村隆太 (2000) 内分泌攪乱化学物質の健康リスクアセスメント, *日本臨床*, **58** (12), 2393-2400.
- 9) 西川淳一 (2004) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生態影響に関する研究, 環境省 平成15年度 内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究報告書, 83-99.
- 10) Clawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. and Mangelsdorf, D. J. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files, *Science*, **294**, 1866-1870.
- 11) Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L. and Holoubek, I. (2006) Environmental xenobiotics and nuclear receptors-Interactions, effects and in vitro assessment, *Toxicol. in Vitro*, **20**, 18-37.
- 12) Tabb, M. M. and Blumberg, B. (2006) New modes of action for endocrine-disrupting chemicals, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 475-482.
- 13) Bility, M. T., Thompson, J. T., McKee, R. H., David, R. M., Butala, J. H., Vanden Heuvel, J. P. and Peters, J. M. (2004) Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters, *Toxicol. Sci.*, **82**, 170-182.
- 14) Lovekamp-Swan, T. and Davis, B. J. (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system, *Environ. Health Perspect.*, **111**, 139-145.
- 15) Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F. and Horiguchi, T. (2004) Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 6271-6276.
- 16) Laughter, A. R., Dunn, C. S., Swanson, C. L., Howroyd, P., Cattley, R. C. and Corton, J. C. (2004) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in response to trichloroethylene and metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate in mouse liver, *Toxicology*, **203**, 83-98.
- 17) Zhou, Y.-C. and Waxman, D. J. (1998) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors by chlorinated hydrocarbons and endogenous steroids, *Environ. Health Perspect.*, **106** (Suppl. 4), 983-988.
- 18) Kanayama, T., Mamiya, S., Nishihara, T. and Nishikawa, J. (2003) Basis of a high-throughput method for nuclear receptor ligands, *J. Biochem.*, **133**, 791-797.
- 19) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 241-248.
- 20) White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P. and Parker, M. G. (1994) Environmental persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology*, **135**, 175-182.
- 21) Collins, M. D. and Mao, G. E. (1999) Teratology of retinoids, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 399-430.
- 22) Soprano, D. R. and Soprano, K. J. (1995) Retinoids as teratogens, *Annu. Rev. Nutr.*, **15**, 111-132.
- 23) Gardiner, D. M. and Hoppe, D. M. (1999) Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana setentrionalis*). *J. Exp. Zool.*, **284**, 207-216.
- 24) Gardiner, D., Ndayibagira, A., Grün, F. and Blumberg, B. (2003) Deformed frogs and environmental retinoids, *Pure Appl. Chem.*, **75**, 2263-2273.
- 25) Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E. (2005) Vitamin D, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **289**, 8-28.
- 26) Michalik, L., Devergne, B. and Wahli, W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories, *Nature Rev. Cancer*, **4**, 61-70.
- 27) Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, **10**, 940-954.
- 28) Hoai, P. M., Tsunoi, S., Ike, M., Kuratani, Y., Kudou, K., Viet, P. H., Fujita, M. and Tanaka, M. (2003) Simultaneous determination of degradation products of nonylphenol polyethoxylates and their halogenated derivatives by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry after trimethylsilylation, *J. Chromatogr. A*, **1020**, 161-171.
- 29) 環境省 (2005) 化学物質ファクトシート2004年度版57. テレフタル酸, 214-216.
- 30) 環境省 (2005) 化学物質ファクトシート2004年度版10. 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩, 39-42.
- 31) Schröder, M., Bendik, I., Becker-André, M. and Carlberg, C. (1993) Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17830-17836.
- 32) Schröder, M., Müller, K. M., Becker-André, M. and Carlberg, C. (1994) Response element selectively for heterodimerization of vitamin D receptors with retinoic acid and retinoid X receptors, *J. Mol. Endocrinol.*, **12**, 327-339.
- 33) Chin, T. Y., Tyl, R. W., Popp, J. A. and Heck, H. d'A. (1981) Chemical urolithiasis I. Characteristics of bladder stone induction by terephthalic acid and dimethyl terephthalate in weanling Fischer-344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 307-321.
- 34) IPCS. (1996) Environmental Health Criteria, 169.

Special Review

Percellome Projectによる毒性トランスクリプトミクスの新しい試み

Percellome Project as a New Approach to Toxicology Transcriptomics

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

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Yukio Kodama

身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、その被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である。この精度向上を目指したトキシコゲノミクス研究を実施する際に、マイクロアレイなどから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。90化合物のマウス肝初期応答データを採取し終え、新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectを展開している。

key words

トキシコゲノミクス, 分子毒性学, 遺伝子発現カスケード, 標準化, Percellome法, 3次元多層(Millefeuille) データ

1 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 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌かく乱関連などの分子毒性学研究、トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所学業務との有機的連携のもとに推進。

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 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

はじめに

医薬品, 食品, 化粧品, 生活関連用品など, 身の回りの物質が我々の身体に取り込まれた際に生じる可能性のある毒性(有害性)を予測し, それらの使用に際しての被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である^{注1}(図1)。具体的には, 人々の安全を確保するために使用法(用途)や使用量(残留量)を制限したり, 場合によっては禁止したりするための科学的根拠を提供するが, その際, 人の身代わりとして実験動物を用いる場合が多い。このような毒性学の精度向上の一環として, 従来からの毒性研究(毒性症候学, 毒性病理学, など)に加えてのトキシコゲノミクス(Toxicogenomics)研究が進められている。

トキシコゲノミクスでは, 物質が生体に及ぼす影響をトランスクリプトームとして観測・解析する。その際, ①分子毒性学を構築し種差や個体差の問題, 複合暴露の問題などを解決するためには, 遺伝子発現カスケードの全容解明を目指す必要がある, ②形態学的に変化が現れた段階のトランスクリプトームは, 遺伝子発現カスケードの最終段階に過ぎない, ③形態変化の現れないごく初期段階を含む遺伝子発現カスケードを描出するためにはまとまった量のデータの蓄積が必須である, との観点から, 筆者らは, マイクロアレイや定量PCRから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome手法と, そのデータ解析のための3次元多

層(Millefeuille)システムを開発・実用化した。遺伝子発現量が共通の尺度, すなわち“コピー数/細胞”で表現されることから, 検体間, 実験間, マイクロアレイのバージョン間, 異なったプラットホーム間, などのデータ比較が直接的に行えるようになり, 数年かけて蓄積したデータの有機的活用が可能となった。現在, 90種類の化学物質によるマウス肝の初期応答データを採取し終えたところである。新たな対象(反復投与, 胎児毒性, 吸入毒性, 多臓器連携)を加えたPercellome Projectの概要を紹介する。

I. Percellome法: 細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法

原理は単純である。サンプルの細胞数を計測し, 外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し, そしてRNA抽出, 測定に移る。サンプルのRNAの測定値を, スパイクRNAの値を基準に, 細胞1個当たりのコピー数に換算する。実際には細胞数を直接計測するのが困難なことが多いため, その代替指標として細胞核内のゲノムDNA量を用いる^{1), 2)}。定量性・直線性の検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B])を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルから成るセット)を用いる。なお, スパイクRNAは, 5種類の枯草菌遺伝子のmRNAを濃度公比3で混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。高精度を要求されるDNA定量法は手作業プロトコルおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコルを準備

注1 環境への配慮も含まれる。

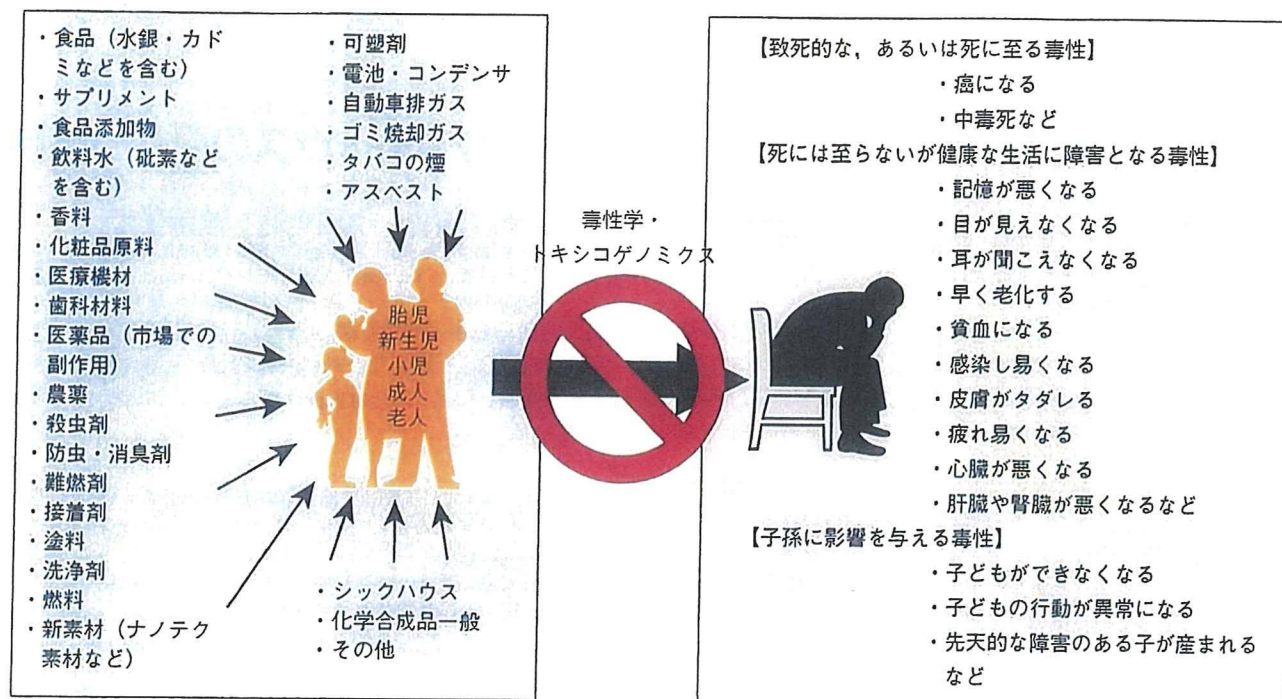


図1. 毒性学の対象

毒性学は、身の回りの物質が引き起こす障害を予測し、その発生を未然に防ぐことを目的としている。トキシコゲノミクス（毒性ゲノミクス）は、最先端の網羅的遺伝子発現解析技術を用いて、従来の毒性学の予測の精度を著しく向上、迅速化させることで、国民の健康安全の確保にさらに貢献することを目指している。

中である。カクテルとも共同研究ベースで供給可能である（連絡先：kanno@nihs.go.jp）。また、ERCC（The External RNA Control Consortium）と連絡をとるとともに、国際的標準化への関与を深めるため平成18年度厚労科研究費「医薬品などの有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究（H18-特別-指定-023）」を立ち上げた。現在、この他にシックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス、1匹のマウスから多臓器を採取しそれらの連携状況をトランスクリプトームから解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始し、特徴的な遺伝子について組織内の発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーションで確認する作業を並行している。また、下記の3次元データをweb公開するサーバを整備し、一部の化合物から3次元多層（Millefeuille）データを順次閲覧可能とした（<http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>）。

II. 3次元多層（Millefeuille）データシステム：生物系研究者に優しいデータ可視化と解析

医薬品を含む毒性既知の90化合物について単回経口投与後のトランスクリプトームデータを取得して、初期応答遺伝子カスケードを解析するための基盤データベースを構築した。現在、第二段階として反復暴露データ集積を開始し

た。データは、用量軸、時間軸、および遺伝子発現軸から成る3次元表示により、遺伝子発現の用量および時間に依存した変化を1枚の曲面として表すことで可視的に変化を判別しやすいように配慮した（図2）。これにより、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、特に、mRNAの合成分解のスピードなどの知見から生物学的にありえないパターン（用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など）を排除する際に威力を発揮している。

1つの実験から排出されるGeneChip約50枚のデータを一括処理する能力を持ったPercellome自動換算・データ品質管理（QC）に関わるソフトウェアに加えて、3次元多層（Millefeuille）データに最適化した、発現パターン類似性による候補遺伝子検索、およびそれを発展させた教師無しクラスタリング³⁾を中心とした解析システム（MF System, MFシリーズ, 開発：相崎 健一）を独自に実用化し、開発継続中である（図3）。これらにより、データQCはその日のうちに、基本的な発現情報検索から全遺伝子の教師無しクラスタリングまでを3日間で完遂できるものとなっている。

この基本解析を用いて、発現パターンによって分類された候補遺伝子リストが多数生成される。一部の幸運な例ではただちに新規と思われる毒性関連反応を見いだすことができた。またそうでない場合のための1つの補強手段とし

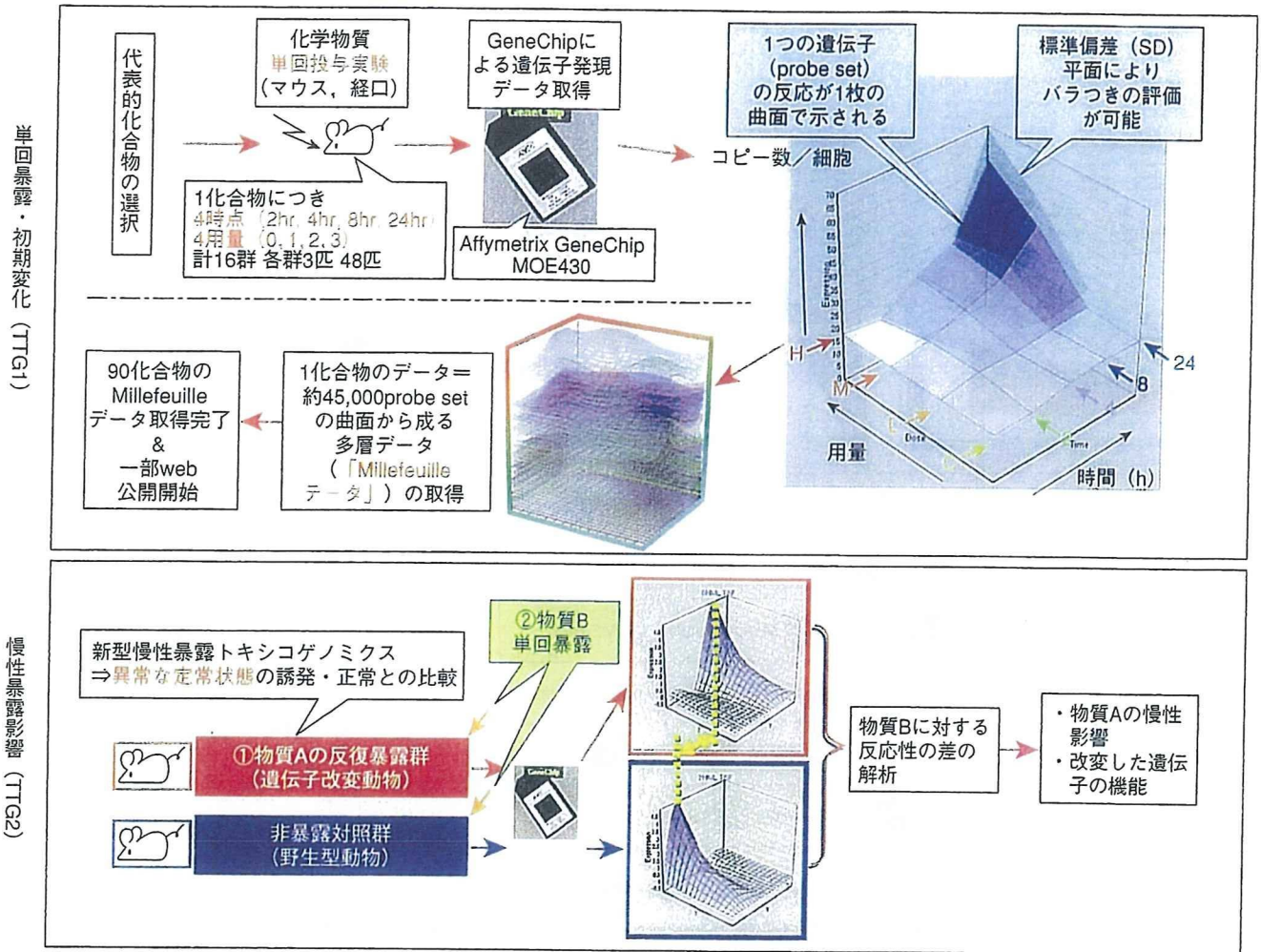


図2. Percellome 法と3次元表示による多層 (Millefeuille) データシステムを用いたプロジェクトの根幹部分の概要
単回投与による遺伝子発現初期変化データを90化合物について取得 (上段), 現在, 反復投与の影響を検討中 (下段), H; 高用量 (high), M; 中用量 (medium), L; 低用量 (low), C; コントロール (control).

て, Gene Ontology などの既存知識を利用して候補遺伝子リストの理解を支援するソフトウェア (MF GoPlot) を用意した. このツールは一種の化合物クラスタリングとしても利用することができる.

さらに候補遺伝子リストを基に複数化合物間比較を行い, 複数条件下においても同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである. 本システムで得られた同期遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性があり, データベース化しつつ, その解析を進めている (5TB規模のデータベース部分および, 大量計算アルゴリズム実装は (株) NTT コムウェアおよび (株) 日本NCR/Teradata との共同開発による).

Ⅲ. Percellome 手法のリアルタイム PCR を含む他のプラットフォームへの適用

Percellome 手法は, GSC の受け入れ条件を整えることに

より, 様々なプラットフォームに適用可能である. その1つとして最も定量性が高いとされるリアルタイム PCR (ABI PRISM 7900 HT・96 ウェルプレート) への適用例を示す. 現行の RT-PCR 絶対定量法では, 遺伝子ごとに検量線が必要であり, 多数のサンプルについて多数の遺伝子を検討するには不向きである. Percellome RT-PCR では, マイクロアレイと同様の原理を用いる. すなわち, サンプル破砕液に, その細胞数に比例する量のスパイクカクテル (GSC) を添加し, それらの Ct 値を PCR プレートごとの検量線とすることにより, 測定したい遺伝子の Ct 値を細胞1個当たりの mRNA コピー数に換算する. これにより, GAPDH や Actin などのハウスキーピング遺伝子の変動してしまう際の問題, 例えば, 少数の遺伝子を検討する際に Global normalization 法を適用し難い問題などが解決される. 共通サンプルを測定しデータを比較することにより, Affymetrix GeneChip の Percellome 結果と9割程度の整合性が確認され,

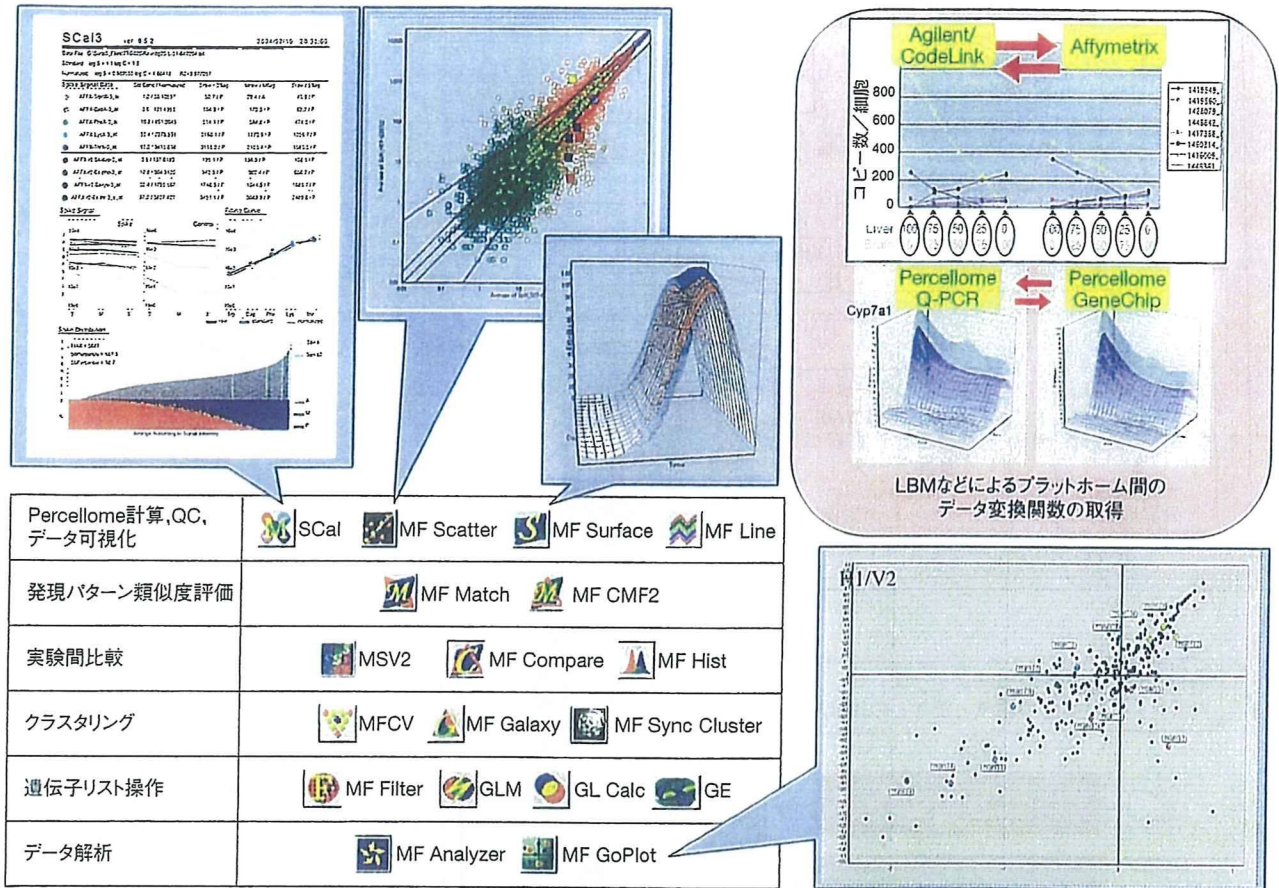


図3. 3次元多層 (Millefeuille) データの解析などに用いる独自開発プログラム群

品質管理とともにPercellome計算を自動的に実施するSCal, Plotソフトウェア, 3次元曲面の描画ソフト (MF Surface), など. 右上はプラットフォーム間のデータ変換情報の得方を示す. LBMを用いる方法 (上段) と, 実際の実験サンプルを用いる方法 (下段) がある. いずれも, 一度, 両方のプラットフォームでそれらのサンプルを測定する必要がある.

GeneChipとPercellome RT-PCRとの間でのコピー数の換算式がいくつかの遺伝子について得られている. この他に, Agilent社製の単色マイクロアレイとCodeLinkアレイにGSCを測定可能なカスタムアレイを用意し終え, LBMサンプルのデータなどをもとに, これらとの間の換算式も得つつある (図3右上).

Percellome法は, Affymetrixの新しいエクソンアレイの定量性・直線性の検討にも適応可能である. Affymetrix社のHuman Exon 1.0 ST Arrayと従来型の発現アレイHuman Genome U133 plus 2について, 性質の異なるヒト癌細胞株2株から調製したLBM様標準サンプル (100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100混合5サンプル) による比較を行い, 両アレイ間の相関性の高いprobe setを多数検出することができた. また, 既知のエクソンに対して設計されたprobe setでは発現が見られ, イントロンに対して設計されたprobe setでは発現が見られない, あるいは, 既知のsplicing variantに対応したprobe setの発現が検出された,

などの基本性能が確認された. しかし, Percellome法を適用して未知のsplicing variantの検出力を向上させるためには, 現状では各エクソン間の定量性に問題があることが示唆された. 定量値を算出する補正アルゴリズムの開発など, 何らかの対策が必要であることが考えられ, 現在, Affymetrix社に確認を行っている.

IV. 核内受容体原性毒性のPercellomeトキシコゲノミクス解析

受容体原性毒性とは, 化学物質が受容体 (リガンド依存的転写因子を含む) に選択的に結合してシグナルをかく乱し, その結果生じる有害性を指す. 代表例としてはダイオキシンが挙げられる. AhR (Arylhydrocarbon receptor) ノックアウトマウスでは, ダイオキシンを大量に投与しても毒性がほとんど観察されない. すなわち, 野生型マウスがダイオキシンで死ぬメカニズムには, AhRが必須であり, AhRからの異常なシグナルがマウスを死に至らせていることに

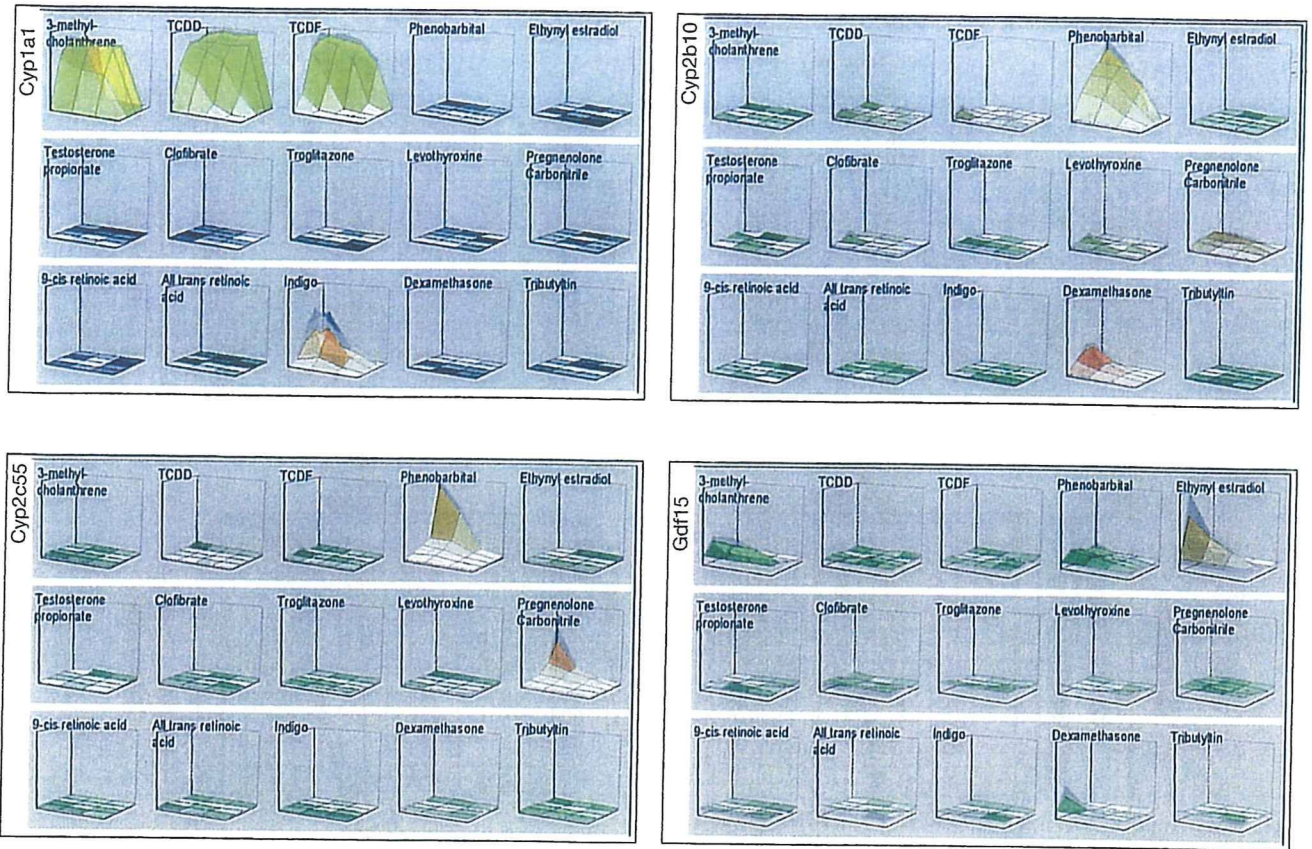


図4. 化合物間の発現比較

15種類の核内受容体リガンド化合物 (各3次元グラフ内に表示) によるCyp1a1 (左上), Cyp2c55 (左下), Cyp2b10 (右上) および, Gdf15 (右下) の遺伝子発現を3次元表示したもの. 各軸は, 図2のとおり. 縦軸のスケールは遺伝子ごとに共通. リガンドに選択的な遺伝子の発現が確認される.

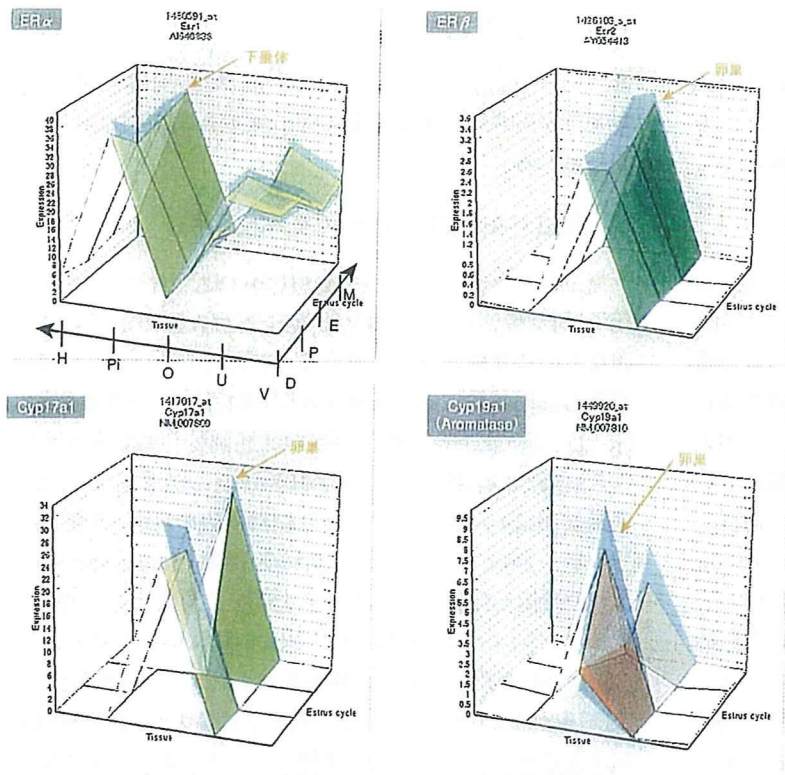


図5. 臓器間の発現比較

マウスの性周期 (Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus) の4日間で1周期) ごとの視床下部 (H), 下垂体 (Pi), 卵巣 (O), 子宮 (U) および膣 (V) における, ER α , ER β , Cyp17a1 (steroid-17 α -hydroxylase), およびCyp19a1 (Aromatase) の遺伝子発現変動を3次元表示したもの. 後二者の酵素は卵巣において周期性を持って発現している.

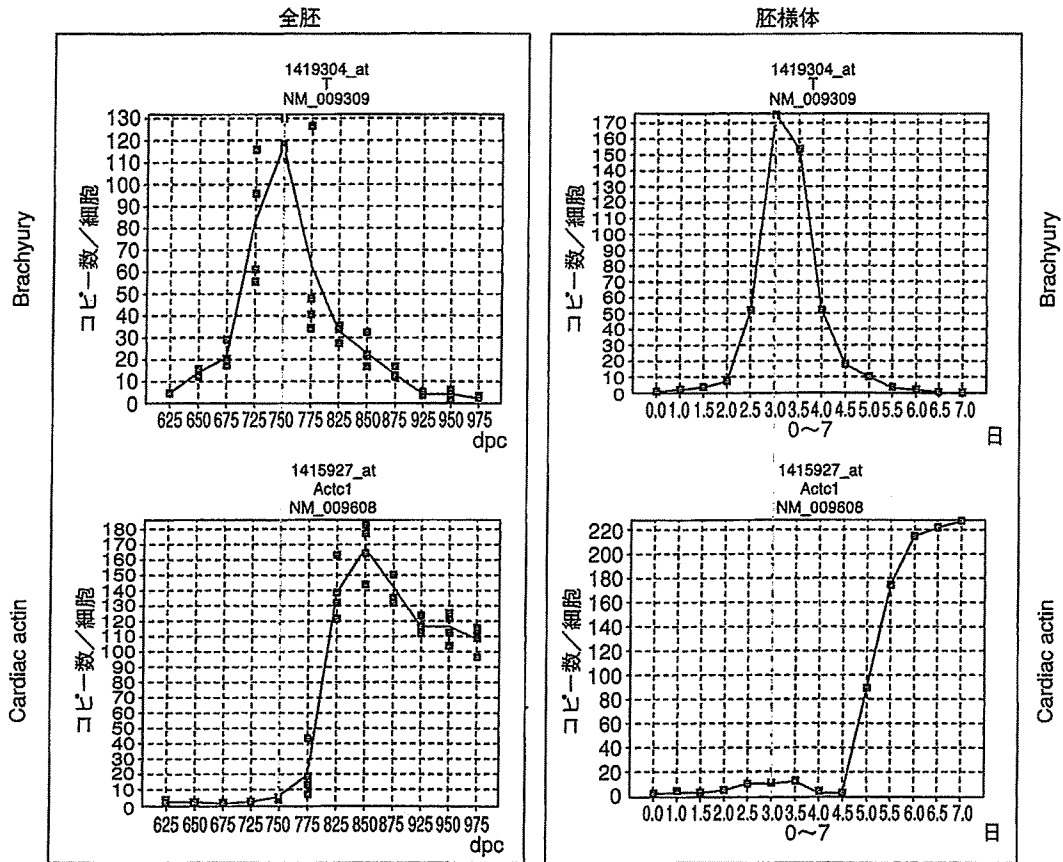


図6. マウス胎児（全胚）と胚様体の発現比較

マウス全胚の胎生6.25日～9.75日までの遺伝子発現と、胚様体の1日～7日目までの遺伝子発現の網羅的データベースから、初期中胚葉分化マーカーであるBrachyury遺伝子と、Cardiac actin遺伝子の経時変化を示す。

なる。エストロゲン活性化学物質による有害影響（内分泌かく乱化学物質問題）も同様にER (estrogen receptor) を介する受容体原性毒性と考えられ、胎生期にERを発現する組織が、低用量シグナルかく乱影響の重要標的であると考えられている。

ここでは、受容体原性毒性研究の基盤として、Percellome手法を適用して、①核内受容体作動性物質によるマウス雄肝臓の遺伝子発現変動、②性周期に伴うマウス雌生殖器遺伝子発現変動、③生後の発達過程におけるマウス雌生殖器遺伝子発現変動、の3種類のデータベースを構築した。例えば、①では10種類の核内受容体に作用する典型物質について、単回経口投与後、2, 4, 8, 24時間目の変動を解析し、Ethinyl-estradiolがGDF15, TCDDがCyp1a1, 9-cis Retinoic AcidがCyp26a1, DexamethasoneがCyp2b10, ClofibrateがCyp4a14, PCNがCyp2c55など、各々の受容体に特徴的な遺伝子発現を誘導するところがとらえられている(図4)。②の性周期データベースは視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膈を対象としており、性周期との関連が網羅的にとらえら

れている(図5)。これらのデータベースは、今後、各種の候補物質が引き起こす変化を詳細に解析する際の基準として利用される。

V. 発生トキシコゲノミクスへの応用

発生毒性学は、個体発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現調節の分子機構を把握することにより、さらに正確なものに補強されると考える。現在、C57BL/6マウス胚の器官形成期初期にあたる胎生6.5～9.5日（プラグ確認日：0.5日）の、①全胚の遺伝子発現変動解析、②遺伝子欠失マウス全胚との比較、および③標的が明らかな既知発生毒性物質投与による本データベースの具体的な適用、を実施している。①についてはすでに0.25日間隔（Time point 計12点）の遺伝子発現データベースを得て、②遺伝子欠失胚のデータといくつかの注目すべき遺伝子についてはwhole mount ISHを用いた発現の検証を加えた。これと並行して、ES細胞からhanging drop法で得た胚様体の0.5日間隔の遺伝子発現データとの比較を実施している。個体発生に関与

する遺伝子群の多くは経時的に激しく変化しており、既知発生毒性物質投与実験については標的遺伝子シグナルカスケードを解析中である (図6)。

おわりに

ノーザンブロットでは実験サンプルにだけバンドが見られ、対照サンプルには遺伝子発現がないという結果を得ても、細胞1個当たりで定量してみると、対照が10コピーに対して実験サンプルが20コピーである場合がある。“無”が“有”になったのではなく、“10”が“20”になったのである。

さて、筆者らの属する毒性学でも、医学の分野でも、疾患概念や毒性概念が整理され、患者や実験動物を診断する際には、まず、そのどれに当てはまるかを検討する。すなわち、どの“典型”に近い症例であるかを検討することから始まることが多い。

しかし、最近の医学・生物学には多因子疾患・多因子形質発現制御の概念が導入され、今から何年かの後には、“21世紀初頭までは、患者の遺伝子多型を調べずして治療を行っていた時代”として、“血液型を調べずに輸血していた時代”と並び称されるようになる可能性がある。このような多因子概念が定着すると、その多くは、“有 (100%)” “無 (0%)” の組み合わせではなく、“70%” “50%” “90%” といった半端な数の組み合わせであることが考えられる。すなわち、今までの離散値的な“典型”例を基準とするアプローチから、

連続値的な病態“スペクトラム”を直接扱うアプローチに変革していく可能性が考えられる。その際の網羅的データの解析とその蓄積の必要性を考えると、遺伝子発現データの定量化・標準化という問題は、今まで以上に重みを増すと考えられる。生命現象の網羅的解析にはトランスクリプトームだけでは不十分であることは自明であるが、この定量性を確保することは、これから実現されるであろう網羅的プロテオミクスなどの基盤としても重要ではないかと考える。

マイクロアレイなどから得られるトランスクリプトーム情報が、今後の医薬品審査や化学物質の安全性評価の際に必須なものとなる時代がすぐそこまで来ていることを念頭に、筆者らはPercellome法をさらに展開し、Percellome Projectデータベースを可能な限り高精度に保ちつつ毒性学的内容を充実させるべく最大限の活動を継続して行く所存であるが、この技術、あるいは研究内容が毒性学以外の研究分野にもお役に立つことができれば幸甚である。

謝辞 本システムの開発とプロジェクトの遂行に当たっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001, H15-化学-002, H18-化学-一般-001などによる。

文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194

Quantitative Determination of Lobe Specificity of mRNA Expression of Androgen-dependent Genes in the Rat Prostate Gland

TOMO HARU SUZUKI, NARIAKI FUJIMOTO*, SHIGEYUKI KITAMURA AND SHIGERU OHTA

Department of Xenobiotic Metabolism and Molecular Toxicology, Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

*Department of Developmental Biology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine (RIRBM), Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

Abstract. The rodent prostate has a complex structure, consisting of a ventral prostate (VP), lateral prostate (LP), dorsal prostate (DP) and anterior prostate (AP), and most studies so far have focused on the VP. Androgen-responsive prostatic secretory proteins, such as prostatein and kallikreins, are mainly produced in the VP, but others are abundant in the LP and DP, though little is known about differences of androgen regulation among the different lobes. Here, the mRNA expression levels of some representative androgen-responsive genes, including those encoding prostatic secreted proteins, were quantitatively determined in each of the prostatic lobes of intact rats and castrated rats treated with testosterone alone or plus flutamide. The results show that the transcriptional regulation of prostatic secretory proteins differs greatly among lobes, generally being more tightly regulated in the VP. A number of growth factor mRNAs were differentially expressed in separate lobes and were regulated by testosterone in a lobe-specific manner. Lobe-specific regulation by androgen was also found for other genes, including the DAD-1 and calreticulin genes. Thus, hormone-dependent transcriptional regulation of prostate genes differs among lobes, and there is also interlobar diversity of basal mRNA expression levels.

Key words: Rat prostate, Lobe-specific expression, Androgen regulation, Quantitative RT-PCR

(Endocrine Journal 54: 123–132, 2007)

RAT prostate models have been used to study androgen-regulated gene expression of several prostatic secreted proteins, such as probasin, cystatin-related protein-1 (CRP-1), PSP94 and kallikreins [1–5], and differential display PCR and micro-array analysis have recently been applied to identify novel androgen-responsive genes. However, induction of gene expression by androgen in the prostate is not simple, since androgen may directly regulate genes, as well as indirectly influence gene expression by stimulating growth or regeneration of the gland. In the prostate, ‘androgen-

dependent’ genes have generally been rather simply defined as those whose expression decreases following castration and recovers upon androgen replacement [6–8]. Moreover, the rodent prostate has a complex structure, consisting of a ventral prostate (VP), lateral prostate (LP), dorsal prostate (DP) and anterior prostate (AP, or coagulating gland) [9]. Most studies have focused on the VP, and the responses could be quite different in the other lobes. The best-characterized androgen-regulated gene is probably probasin in the rat [2, 5]. Although the genomic upstream regions contain consensus androgen-responsive elements (AREs) which are functional promoters in *in vitro* reporter assay [10–12], the mRNA level rapidly decreases after castration only in the VP, but not in the other lobes [4], suggesting a complexity in androgen-dependent expression *in vivo*. Other prostatic secretory proteins, including prostatein, PSP94, kallikreins,

Received: August 3, 2006

Accepted: October 16, 2006

Correspondence to: Dr. Nariaki FUJIMOTO, Department of Developmental Biology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

cystatin-related protein-1 (CRP1) and SVS2, are also known to be induced by androgen. DAD-1, calreticulin, estrogen receptor β (ER β) and a number of growth factors, such as IGF-1, EGF and SCGF, have been reported to be regulated by androgen [13, 14], but the details, such as lobe specificity and time dependency after testosterone administration, have not been examined. The rodent VP is considered to have no counterpart in primates, while the LP and the DP are histologically similar to the human prostate [12]. In experimental prostate carcinogenesis initiated with chemical carcinogens in Noble rats and other rat strains, hormone-dependent prostatic adenocarcinomas are found only in the LP, DP and AP [8, 15–17]. If the rat prostate is to be employed as a human model, more attention should be paid to androgen responses in these lobes.

We therefore examined the mRNA expression levels of androgen-responsive genes, including prostatic secreted proteins, growth factors and other recently identified genes, in the prostate of F344 rats. RNAs isolated from the different prostatic lobes, as well as the seminal vesicle (SV), were subjected to quantitative real-time RT-PCR to analyze the expression levels and to provide an outline view of the overall androgen responsiveness of genes expressed in the prostate gland.

Materials and Methods

Hormones

Testosterone propionate was purchased from Wako Junyaku KK, Osaka, Japan and flutamide from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Animals

Animal experiments were conducted according to 'A Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Hiroshima University'. Male F344 rats were purchased at 10 weeks of age from Charles River Japan Co. (Kanagawa, Japan) and maintained with free access to basal diet and tap water. All animals except those of the intact control group were surgically castrated at 11 weeks of age. To examine the effects of castration, the animals were divided into three groups (consisting of 6 animals each), *i.e.*, intact group and groups castrated 1 and 2 weeks previously. For the tes-

tosterone injection experiment, animals were castrated one week previously and divided into 5 groups (6 animals each). Testosterone and flutamide were injected ip and animals were sacrificed after 1, 4, and 24 h (T-1h, T-4h, T-24h and T plus flutamide-24h), along with intact control animals. Testosterone propionate and flutamide were dissolved in the vehicle oil, Panacete 810 (Nippon Oils and Fats Co., Ltd., Tokyo), and administered ip at 5 mg/kg body weight and 60 mg/kg body weight, respectively. After treatment, animals were sacrificed at the indicated time points under ether anesthesia and each of the prostate lobes, as well as the SV, was dissected under a microscope, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

Quantification of mRNAs by real-time RT-PCR

RNA preparation was carried out with a Total RNA Isolation kit (Promega Co., Madison, WI, USA). Total RNA (2 μg) was reverse-transcribed with 200 U of MMLV-RT (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) and 2.5 pmol of oligo-dT primer (Invitrogen) in 25 μl of buffer containing 1 mM dNTP, 100 mM TrisHCl (pH 8.3), 150 mM KCl, 6 mM MgCl_2 , 60 mM dithiothreitol and 5 U/ μl RNasin with incubation at 37°C for 60 min.

The real-time PCR method with a QuantiTect Sybr Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and an ABI Prism 7700 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) was employed for quantitative measurement, following the supplied protocol [18]. Specific primer sets with a T_m of about 59°C were designed for each mRNA (Table 1). The PCR conditions were 15 min of initial activation followed by 45 cycles of 20 sec at 94°C , and 30 sec at 58°C and 40 sec at 72°C . Prior to quantitative analysis, PCR products were prepared separately and purified by gel-electrophoresis. Extracted fragments were used as standards for quantification. The DNA sequences were confirmed with a capillary DNA sequencer, ABI 310 (PerkinElmer Life Sciences). All mRNA contents were normalized with reference to β -actin mRNA.

Serum testosterone levels

Serum testosterone levels were measured with an ELISA kit, purchased from Neogen Corp. (Lexington, KY, USA).

Table 1. Quantitative PCR primers for rat genes

Gene	GenBank Acc#	5'-Primer	3'-Primer
kallikrein S3	M11566	5'-AATTCCCAACCCTGGCAAGT-3'	5'-CGCTGAGCAAAGGGTTCATC-3'
CRP-1	S57980	5'-TGCTCCTACTGGCCATCTTTG-3'	5'-TGTCAGCACTGTGCGTGTG-3'
prostatein C3	M71245	5'-CAGTGGTCTGGCTGCAGTATT-3'	5'-CTAGAAAACACTGCTTGAATTGCTTC-3'
probasin	NM_019125	5'-CCTCCTGCTCACACTGGATGT-3'	5'-GCGACGGAAGTAGTCCCTCA-3'
PSP94	U65486	5'-GATCACCTGCTGCACCAAAAC-3'	5'-TTCCTGGGTTTCGTCCTTC-3'
SVS2	J05443	5'-GCGCAGACAAGTGTTCACAA-3'	5'-GGGATCCTCCAGATTTCCAGCT-3'
IGF-1	M15481	5'-GACCAGAGACCCCTTTCGGG-3'	5'-GCTCCGGAAGCAACTCA-3'
EGF	NM_012842	5'-GATTATGACCCCGTGGAAAGC-3'	5'-GCAAGACCTTCTGGCGTGTTC-3'
SCGF	XM_218611	5'-AGAGGAAACCACCACAACACCT-3'	5'-GTCCAAAACATGCAGACGGAT-3'
DAD-1	Y13336	5'-CGGCTACTGTCTCCTCGTGG-3'	5'-TCGCTCAGGAGAGATGCCTT-3'
calreticulin	X53363	5'-CCAAGATTGATGACCCACAG-3'	5'-TGAATCACTGGTGGTTCAC-3'
FPPS	M89945	5'-CATCATGGACTCTTCTACACTCG-3'	5'-GAACTTAAGCAGGCGGTAGATAGC-3'
ERβ	U57439	5'-TGCCAATCATCGCTCCTTAT-3'	5'-GGCACAACCTGCCACTAAG-3'
AR	NM_012502	5'-CACCATGCAACTTCTCAGCA-3'	5'-CGAATTGCCCTTAGGTAAGT-3'
β-actin	X03765	5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTGGTC-3'	5'-TGAGGTAGTCCGTCAGGTCCC-3'

Table 2. Body and prostate lobe weights and serum testosterone levels in intact and castrated rats treated with testosterone and flutamide

	Body w. (g)	VP w. (mg)	LP w. (mg)	DP w. (mg)	AP w. (mg)	SV w. (mg)	testosterone (pg/mL)
Intact	290 ± 11.6*	216 ± 42.1**	120 ± 27.2*	129 ± 14.6**	132 ± 5.7**	701 ± 56.4**	2340 ± 448**
Castration 1W	255 ± 3.85	46 ± 2.1	37 ± 5.1	48 ± 5.7	38 ± 8.5	163 ± 7.73	70 ± 8.4
+T 1 h	242 ± 5.53	49 ± 1.1	33 ± 2.0	48 ± 3.9	31 ± 3.4	140 ± 10.1	43200 ± 7280**
+T 4 h	244 ± 4.40	58 ± 5.0	30 ± 5.0	59 ± 3.9	47 ± 6.5	143 ± 10.1	32800 ± 10000**
+T 24 h	251 ± 2.80	54 ± 5.5	51 ± 5.5	61 ± 4.1	64 ± 7.9	180 ± 10.0	1480 ± 232**
+T + Flutamide 24 h	248 ± 9.37	50 ± 1.6	43 ± 3.6	55 ± 4.8	56 ± 4.0	171 ± 3.76	1380 ± 124**

11-week-old male F344 rats were castrated for 1 week previously and testosterone (T) and flutamide were injected (i.p.) at 5 mg/kg body weight and 60 mg/kg body weight, respectively. Values are mean ± S.E.M. (n = 5)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. castration

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using ANOVA followed by Scheffe's test.

Results

Body and prostate lobe weights and serum T levels

One week after castration, body weights as well as the weights of the prostatic lobes, especially the VP, were significantly decreased (Table 2). The weight of each lobe showed no significant change within 24 h of testosterone administration. Serum T levels were significantly decreased in the castration group and increased within 1 h of testosterone administration, reaching 18 times the intact control level and then decreasing to below the intact control level within 24 h.

Lobe-specific mRNA expression of androgen-responsive genes and androgen receptor (AR) in control prostate

Among the prostate-secreted proteins examined, prostatein C3, kallikrein S3 and CRP1 were preferentially expressed in the VP, although substantial amounts of mRNAs for these proteins were also detected in the other lobes (e.g., the prostatein C3 mRNA level was 150 mol/mol β-actin in the VP and 1.5 mol/mol in the DP) (Table 2). Prominent expression of probasin, PSP94 and SVS2 was noted in the LP and DP at 30–700 times the expression levels of β-actin. In the growth factor category, the SCGF mRNA levels were higher in the DP, while the expression of EGF was high in the AP (Table 2). Expression of DAD1 was equally higher in both the VP and LP compared with the other lobes. Calreticulin and farnesyl diphosphate synthase (FPPS) mRNA levels were 5–10 times higher in the VP than in the other lobes. The ERβ mRNA level in the

Table 3. Androgen regulation of mRNA levels

		kallikrein S3	CRP-1	prostatein C3	probasin	PSP94	SVS2	AR
VP	Intact	23 ± 5.2 ^{a)}	120 ± 19	180 ± 24	2.1 ± 0.62		0.030 ± 0.019	0.013 ± 0.0027
	Cast	0.041 ± 0.0055	0.0023 ± 0.0008	0.27 ± 0.019	0.032 ± 0.0027		0.035 ± 0.0081	0.018 ± 0.0023
	Cast + T 1 h	0.065 ± 0.014 (1.6) ^{b)}	0.0012 ± 0.0002 (0.50)	0.26 ± 0.053 (0.96)	12 ± 2.2 (380)**	n.d.	12 ± 3.5 (340)*	0.020 ± 0.0025 (1.1)
	Cast + T 24 h	0.41 ± 0.049 (9.9)**	3.8 ± 0.56 (1700)**	11 ± 1.9 (39)**	2.8 ± 0.73 (88)**		9.8 ± 2.0 (280)**	0.0090 ± 0.0013 (0.51)*
LP	Intact				50 ± 12	34 ± 8.2	640 ± 110	0.012 ± 0.0021
	Cast				17 ± 2.3	7.6 ± 1.6	32 ± 3.4	0.025 ± 0.0020
	Cast + T 1 h	n.d.	n.d.	n.d.	32 ± 6.0 (1.8)	14 ± 2.3 (1.8)	46 ± 8.4 (1.4)	0.016 ± 0.0054 (0.63)
	Cast + T 24 h				22 ± 2.7 (1.3)	18 ± 3.8 (2.4)**	150 ± 13 (4.6)**	0.0074 ± 0.0011 (0.30)**
DP	Intact				22 ± 5.3	15 ± 2.4	24 ± 6.9	0.012 ± 0.0023
	Cast				8.9 ± 1.2	2.1 ± 0.40	2.6 ± 0.43	0.017 ± 0.0008
	Cast + T 1 h	n.d.	n.d.	n.d.	9.9 ± 1.8 (1.1)	4.1 ± 0.44 (2.0)	5.5 ± 1.4 (2.1)	0.015 ± 0.0003 (0.88)
	Cast + T 24 h				8.1 ± 2.1 (0.91)	5.5 ± 1.1 (2.6)**	7.3 ± 1.2 (2.8)*	0.0056 ± 0.0008 (0.33)**
AP	Intact				2.3 ± 0.44		12 ± 3.4	0.0065 ± 0.0014
	Cast	n.d.	n.d.	n.d.	3.2 ± 0.51	n.d.	0.33 ± 0.075	0.016 ± 0.0037
	Cast + T 1 h				2.9 ± 0.30 (0.90)		0.33 ± 0.076 (0.99)	0.017 ± 0.0036 (1.1)
	Cast + T 24 h				0.76 ± 0.15 (0.23)**		2.5 ± 0.76 (7.8)	0.0036 ± 0.0008 (0.23)*
SV	Intact						150 ± 56	0.0022 ± 0.0003
	Cast	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15 ± 3.0	0.010 ± 0.0002
	Cast + T						79 ± 8.7 (5.1)	0.0053 ± 0.0011 (0.53)**

VP was three times that in the LP or DP, while the level was 1/10 in the AP, and ER β mRNA was not detectable in the SV. The AR mRNA showed no marked differences in expression among the prostatic lobes, although significantly lower values were obtained for the SV.

Lobe-specific changes in mRNA expression after castration

Castration reduced the mRNA expression of prostate secreted proteins, but the degree of change varied greatly among different lobes and genes (Table 3). The mRNAs of the VP-specific proteins, kallikrein S3, CRP-1 and prostatein C3, almost disappeared after castration. On the other hand, PSP94, SVS2 and probasin were moderately decreased in the LP and DP. IGF-1 and VEGF mRNAs were decreased in the VP, LP and DP, and a decrease in EGF mRNA was noted in all the lobes. SCGF mRNA was considerably reduced only in the DP and LP. DAD-1 was decreased in the VP and LP, while calreticulin and FPPS were prominently decreased only in the VP. ER β mRNA was significantly decreased in the VP, LP and DP, but not in the AP.

Castration roughly doubled the AR mRNA expression in every lobe.

Lobe-specific changes in mRNA expression after testosterone administration in castrated animals

Expression of mRNA and the fold increases over the castration group at 1 and 24 h after testosterone administration are summarized in Table 3, and graphs of time-dependent change in mRNAs for several genes are presented in Fig. 1. A VP-specific secreted protein, kallikrein S3, was increased 24 h after T treatment, but not after 1 or 4 h. Even though the expression increased by 10-fold, the absolute mRNA level reached only 1/56 of the intact control level. Similar time-dependent changes in mRNA were noted for CRP1 and prostatein C3 (data not shown). Among growth factors, IGF-1 and EGF mRNAs were elevated in a lobe-specific manner after testosterone administration. SCGF mRNA was increased in LP and DP at 1 h after testosterone administration, but reverted to the initial level within 24 h (Fig. 1). In castrated animals, T-dependent short-term induction of mRNA (in 1 or 4 h)

Table 3. Androgen regulation of mRNA levels (continued)

		IGF-1	EGF	SCGF	DAD-1	calreticulin	FPPS	ER β
VP	Intact	0.15 \pm 0.084 ^{a)}	0.088 \pm 0.036	0.0020 \pm 0.0005	4.6 \pm 0.75	54 \pm 12	53 \pm 4.4	0.027 \pm 0.0053
	Cast	0.055 \pm 0.0062	0.016 \pm 0.0029	0.0030 \pm 0.0002	0.75 \pm 0.15	1.6 \pm 0.36	0.82 \pm 0.25	0.0041 \pm 0.0013
	Cast + T 1 h	0.038 \pm 0.0078 (0.70) ^{b)}	0.017 \pm 0.0032 (1.1)	0.0009 \pm 0.0001 (0.31)**	0.35 \pm 0.075 (0.46)	4.6 \pm 0.62 (2.9)**	0.83 \pm 0.15 (1.0)	0.0047 \pm 0.0009 (1.1)
	Cast + T 24 h	0.16 \pm 0.031 (2.9)*	0.027 \pm 0.015 (1.7)	0.0023 \pm 0.0008 (0.77)	1.9 \pm 0.29 (2.5)*	38 \pm 0.59 (24)**	11 \pm 0.99 (13)**	0.0079 \pm 0.0017 (1.9)
LP	Intact	0.19 \pm 0.022	0.15 \pm 0.038	0.0065 \pm 0.0022	4.4 \pm 0.71	14 \pm 5.9	2.5 \pm 0.45	0.0086 \pm 0.0014
	Cast	0.026 \pm 0.0037	0.066 \pm 0.014	0.0005 \pm 0.0001	1.4 \pm 0.15	5.0 \pm 0.38	1.4 \pm 0.18	0.0090 \pm 0.0028
	Cast + T 1 h	0.046 \pm 0.0073 (1.8)	0.065 \pm 0.011 (0.98)	0.0023 \pm 0.0004 (4.3)**	1.8 \pm 0.23 (1.3)	11 \pm 2.7 (2.2)	0.98 \pm 0.20 (0.70)	0.0055 \pm 0.0022 (0.61)
	Cast + T 24 h	0.10 \pm 0.018 (3.9)**	0.075 \pm 0.0030 (1.4)	0.0008 \pm 0.0001 (1.6)	3.8 \pm 0.55 (3.1)**	150 \pm 33 (29)*	12 \pm 1.6 (9.0)**	0.0073 \pm 0.0012 (0.82)
DP	Intact	0.10 \pm 0.031	0.16 \pm 0.040	0.013 \pm 0.0040	1.7 \pm 0.15	12 \pm 1.9	2.4 \pm 0.36	0.0092 \pm 0.0004
	Cast	0.031 \pm 0.0072	0.036 \pm 0.0058	0.0005 \pm 0.0001	1.4 \pm 0.15	4.6 \pm 0.46	0.74 \pm 0.13	0.0055 \pm 0.0006
	Cast + T 1 h	0.032 \pm 0.0045 (1.0)	0.056 \pm 0.014 (1.6)	0.0019 \pm 0.00037 (4.0)**	1.4 \pm 0.19 (1.0)	3.3 \pm 0.67 (0.70)	0.57 \pm 0.24 (0.77)	0.0039 \pm 0.0020 (0.71)
	Cast + T 24 h	0.051 \pm 0.014 (1.6)	0.15 \pm 0.018 (4.1)**	0.0004 \pm 0.00004 (0.88)	1.5 \pm 0.19 (1.1)	20 \pm 4.6 (4.4)*	6.3 \pm 1.0 (8.6)**	0.0038 \pm 0.0006 (0.68)
AP	Intact	0.091 \pm 0.023	0.028 \pm 0.0064	0.0061 \pm 0.0017	0.65 \pm 0.13	7.0 \pm 2.3	3.4 \pm 0.77	0.0012 \pm 0.0004
	Cast	0.067 \pm 0.0082	0.0057 \pm 0.0018	0.0061 \pm 0.0016	0.39 \pm 0.059	1.7 \pm 0.14	0.76 \pm 0.099	0.0026 \pm 0.0010
	Cast + T 1 h	0.058 \pm 0.0047 (0.86)	0.020 \pm 0.0038 (3.5)*	0.0035 \pm 0.0005 (0.58)	0.77 \pm 0.040 (2.0)**	4.6 \pm 0.64 (2.7)**	1.2 \pm 0.44 (1.6)	0.0035 \pm 0.0012 (1.4)
	Cast + T 24 h	0.14 \pm 0.028 (2.1)*	0.0040 \pm 0.0007 (0.70)	0.0050 \pm 0.0017 (0.82)	0.42 \pm 0.080 (1.1)	1.8 \pm 0.38 (1.0)	1.1 \pm 0.14 (1.5)	0.0065 \pm 0.0002 (0.25)
SV	Intact	0.32 \pm 0.21		0.0058 \pm 0.0010	0.89 \pm 0.33	1.5 \pm 0.34		
	Cast	0.045 \pm 0.010	n.d.	0.0015 \pm 0.0002	0.59 \pm 0.091	4.6 \pm 1.2	n.d.	n.d.
	Cast + T	0.14 \pm 0.017 (3.2)**		0.0021 \pm 0.0006 (1.4)	0.94 \pm 0.16 (1.6)	13 \pm 0.29 (2.8)**		

^{a)} Mean \pm SEM (n = 5). Values are mRNA levels divided by β -actin mRNA levels (mol/mol β -actin), n.d.: not detected

^{b)} Values in parentheses are fold changes in mRNA over the castrated group (Cast).

11-week-old male F344 rats were castrated and maintained for a week (Cast). They were killed 1 h (Cast + T 1 h) or 24 h (Cast + T 24 h) after testosterone (T) administration at 5 mg/kg bw, ip. Total RNA was isolated from each prostate lobe and amounts of mRNA were measured by means of real-time RT-PCR.

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Cast

was found for some genes in some lobes, e.g., probasin and SVS2 in the VP, SCGF in the LP/DP and calreticulin in all the lobes. Co-administration of flutamide with T for 24 h reversed the T-induced mRNA expression in all cases.

Discussion

The rodent prostate, consisting of four or five separate lobes, is anatomically very different from the human organ [9, 19]. Developmentally, the rodent VP arises from buds in the ventral region of the urogenital sinus and there is no corresponding portion in the adult prostate in humans or other primates [4]. The LP and DP are considered to be homologous to the peripheral zone of human prostate and the AP is similar to the central zone, these lobes being most susceptible to

androgen-induced carcinogenesis [16, 20, 21]. Recently, an expression profile study of the mouse prostate revealed that the gene expression pattern of the dorsolateral prostate was closest to that of the human prostate peripheral zone [22]. Despite this, the rodent ventral prostate has been most intensively investigated and only limited attention has been paid to other lobes in studies on androgen regulation of genes.

AR is distributed in the target tissues, including the prostate, and mediates androgen regulation of gene expression. Our results confirm that AR mRNA expression is substantial throughout the prostatic lobes. A previous western blotting study showed that different prostatic lobes contain significantly different amounts of AR protein, i.e., the level was 4–7 times higher in the VP than in the LP and DP [23], whereas the present data indicate that AR mRNA is equally expressed among the lobes. Although AR is primarily under pos-

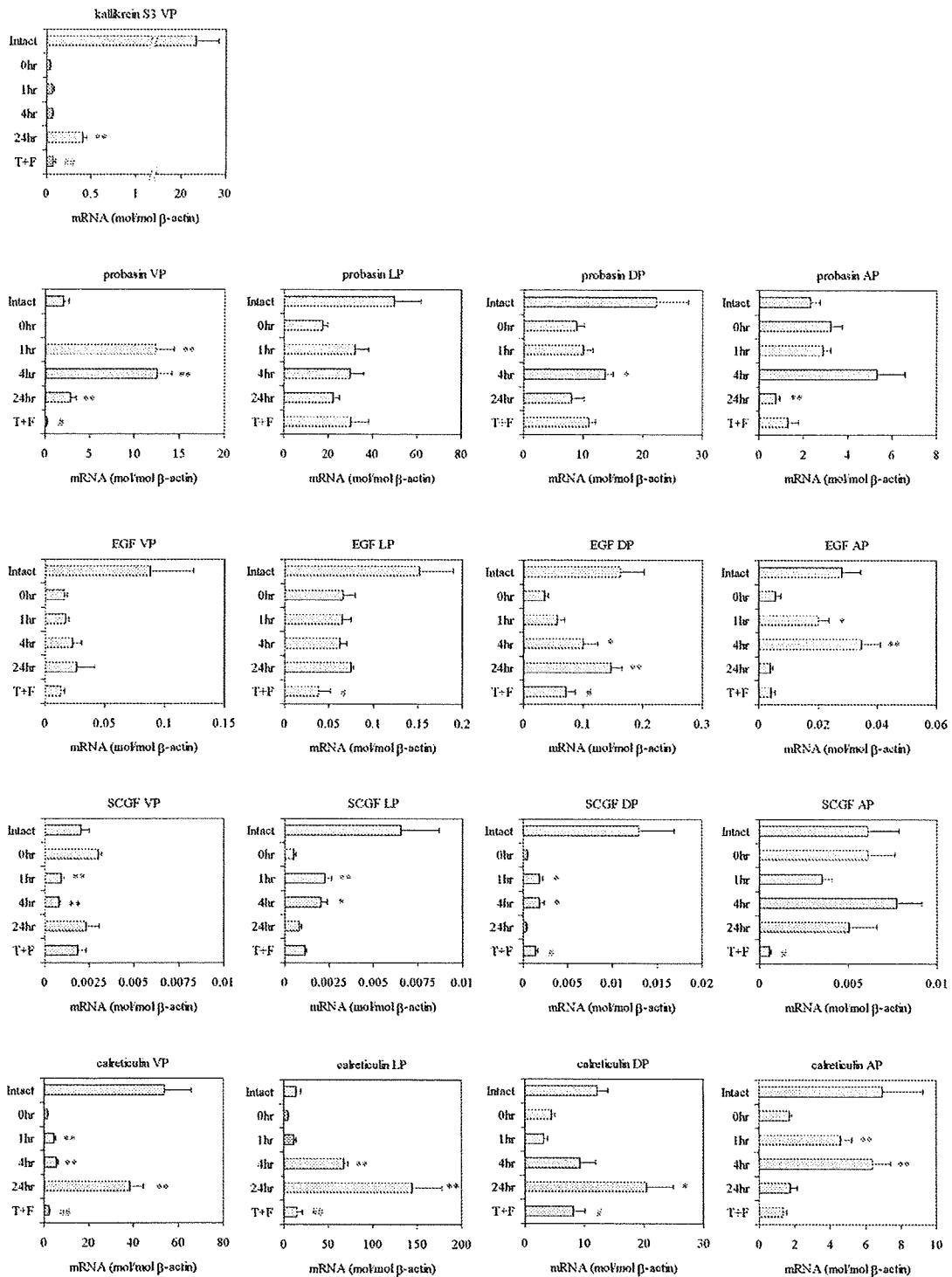


Fig. 1. The mRNA levels of prostatic proteins, growth factors and other androgen-responsive genes in different prostatic lobes at 0, 1, 4 and 24 h (0, 1, 4, 24 h) after a testosterone (T) injection (5 mg/kg body weight, ip) in rats castrated a week previously. The castrated rats were treated with T plus flutamide (F, 60 mg/kg body weight, ip) for 24 h and intact control animals were also examined. Bar indicates mean \pm SEM, n = 6. *: p<0.05 and **: p<0.01 vs. 0 hr; #: p<0.05 and ##: p<0.01 vs. 24 hr.

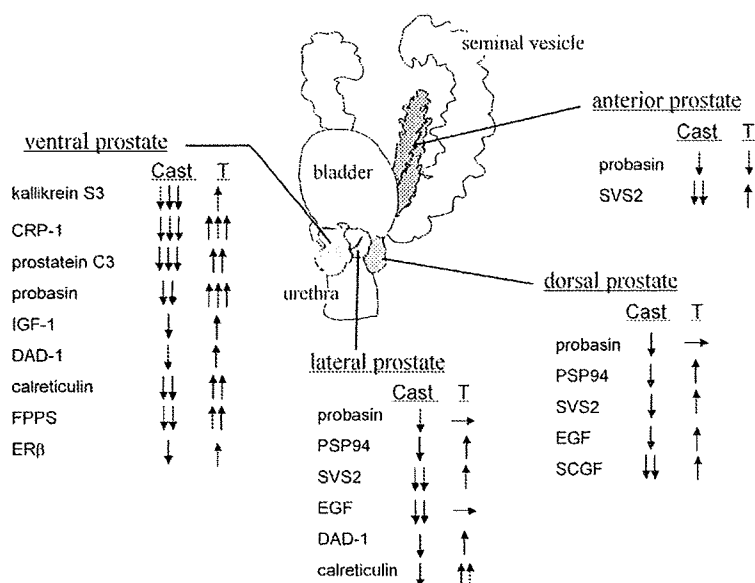


Fig. 2. A summary of differential expression of the examined mRNAs with schematic lateral view of the rat prostate. Androgen responsive genes with higher basal mRNA expression are listed in each lobe. The changes in mRNA level after castration (Cast) and the effects of testosterone (T) administration are summarized.

itive androgen control in prostatic tissues, based on ligand-binding assays [24, 25], the mRNA was down-regulated by testosterone administration according to northern blotting analysis, in agreement with our mRNA data. Discrepancy between protein and mRNA levels probably indicates that AR protein levels are partly regulated at the post-translational level in a lobe-specific manner.

Prostatein, CRP-1 and kallikreins are ventral-specific proteins. Prostatein, known as PBP or prostatic binding protein, consists of two non-identical subunits, each containing three peptides, C1, C2 and C3 [5]. Although PBP was first recognized on the basis of its low binding affinity to steroids, and accounts for 30–50% of secreted proteins in the rat VP, its *in vivo* function is still unclear. CRP-1 and -2 have been reported to make up 5–10% of the VP secretion [1]. Kallikrein S3, one of the tissue kallikreins (serine proteases), is also abundantly expressed in VP [26], and has been suggested as a counterpart for human prostatic-specific antigen or PSA [27]. Our data indeed demonstrated high levels of expression of these genes, with about 100 fold higher amounts of mRNA than that of a housekeeping gene, β -actin, used as an internal control in the present study. Similarly, mRNAs of probasin, SVS2 and PSP94 were preferentially expressed in the LP and DP, while sub-

stantial amounts of these mRNAs were also expressed in the AP.

Several growth factor families have been implicated in normal prostatic growth and differentiation, as well as in malignant changes, with interaction between stromal and epithelial cells [28]. Among them, IGF-1, EGF and SCGF have been reported to be regulated by androgen [7, 29, 30]. IGF-1 produced by stromal cells, stimulate epithelial cell growth, while TGF β has the opposite effect. EGF is an autocrine/paracrine factor involved in epithelial cell growth. SCGF, originally found as a growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells, was found in the DP [31], though its function is unknown. The determined values of mRNA of growth factors seem to be very low but should be significant, since the levels are normalized by abundant expression of β -actin. The present data demonstrate that mRNA levels of these growth factors greatly differ among the prostatic lobes, though they are generally lower in the VP. The other androgen dependent genes examined were calreticulin, an intercellular Ca²⁺-binding protein that may be involved in the prevention of apoptosis of prostatic cells [32], FPPS, an essential enzyme catalyzing the synthesis of farnesyl diphosphate [33], DAD-1, a defender against apoptotic cell death [7] and ER β [13]. Several lines of evidence suggest

that ERs are involved in regulating cell proliferation and in carcinogenesis in the prostate gland [34, 35].

To examine androgen-responsive transcription, changes in mRNA levels at one week after castration were first determined. Castration decreased most of the mRNA levels examined, although the degrees of change were most profound in the VP. For instance, probasin expression was almost shut down in the VP by castration, while it remained at one-third of the intact level in the LP and DP, and no change was noted in the AP. The different sensitivities of the lobes to castration might be related to the manner of involution in the different lobes. Androgen abbreviation by castration causes massive apoptotic death of both epithelial and stromal cells in the VP, but it only reduces epithelial cells in the other lobes [36], so that the cell population could be changed differentially among lobes. However, since the mRNA levels in the present study were normalized to β -actin, the results should be comparable.

To assess the responses more directly regulated by androgen, changes in mRNA levels at 1, 4 and 24 h after testosterone administration were determined. Induction of mRNA within 1 h was found for probasin, EGF, SCGF and calreticulin, which may suggest direct transcriptional regulation through AR. Previous studies have identified AREs in the promoter region of the genes of prostatic proteins. The probasin gene has two distinct AR-binding sites in the 5' flanking region of the genome, both of which are required for androgen responses in *in vitro* assay [37]. This promoter function probably defines the androgen response of probasin in the VP, though the gene expression could be maintained without androgen in the other lobes. Androgen-dependent induction of EGF mRNA has been reported in the salivary gland of mice [38], in addition to the prostate. The 5' flanking region contains several motifs with partial homology to ARE, which may be involved in the transcriptional regulation through AR. Calreticulin protein is expressed abundantly in epithelial cells in the VP [32]. Our results quantitatively confirmed the abundance in terms of mRNA level, which is about 50 times higher than that of β -actin. It was indeed regulated by androgen in the LP/DP/AP, as well as the VP. The regulation of SCGF mRNA seems to be rapidly and tightly regulated by testosterone, since the level was increased at 1 and 4 h and then decreased at 24 h, corresponding to the change in the serum T levels after

an injection. ER β was induced only in the VP. We previously reported that ER β in the VP was under androgen regulation [13]. Subsequently, the promoter function was identified in the 5' flanking region of the gene and was proved to account for the androgen-dependent regulation [39].

In contrast to probasin, the VP secretory proteins prostatein C3, kallikrein S3 and CRP-1 increased only after 24 h, with the mRNA levels remaining far less than the intact control levels, while the serum testosterone level rose well above the intact control level. The prostatein C3 gene contains ARE-like motifs in the upstream region and the first intron, but only the latter apparently accounts for the androgenic responses in *in vitro* reporter assay [40]. The response may not be due to a direct interaction of AR and the ARE-like motif *in vivo*. Other androgen-responsive genes examined, including IGF-1, DAD-1 and FPPS, showed similar androgen responses. In summary, with a few exceptions such as probasin in the VP, the transcriptional induction of most of the examined genes was slow and low after a testosterone injection. Castration might cause the reduction of sensitivity to androgen, or more simply, these genes may not be under the direct transcriptional regulation of androgen. The regulation is complex, and may involve androgen-dependent regeneration of prostatic cells.

In conclusion, our present analysis has outlined the lobe and gene specificities of androgen regulation of gene expression in the prostate. Our data indicate that relatively few genes seem to be directly regulated by androgen, even though many of the prostatic proteins have been considered as androgen-dependent. The present results provide a basis for exploration of the biological regulation of individual genes in the rodent prostate, as well as improving our understanding of how rodent models can best be utilized to investigate human prostate disorders.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grants-in-Aid (H16-Seikatsu) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan and a Grant-in-Aid (#17510046) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

Reference

1. Vercaeren I, Vanaken H, Devos A, Peeters B, Verhoeven G, Heyns W (1996) Androgens transcriptionally regulate the expression of cystatin-related protein and the C3 component of prostatic binding protein in rat ventral prostate and lacrimal gland. *Endocrinology* 137: 4713–4720.
2. Spence AM, Sheppard PC, Davie JR, Matuo Y, Nishi N, McKeehan WL, Dodd JG, Matusik RJ (1989) Regulation of a bifunctional mRNA results in synthesis of secreted and nuclear probasin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7843–7847.
3. MacDonald RJ, Southard-Smith EM, Kroon E (1996) Disparate tissue-specific expression of members of the tissue kallikrein multigene family of the rat. *J Biol Chem* 271: 13684–13690.
4. Imasato Y, Onita T, Moussa M, Sakai H, Chan FL, Koropatnick J, Chin JL, Xuan JW (2001) Rodent PSP94 gene expression is more specific to the dorsolateral prostate and less sensitive to androgen ablation than probasin. *Endocrinology* 142: 2138–2146.
5. Heyns W (1990) Androgen-regulated proteins in the rat ventral prostate. *Andrologia* 22 (Suppl 1): 67–73.
6. Desai KV, Michalowska AM, Kondaiah P, Ward JM, Shih JH, Green JE (2004) Gene expression profiling identifies a unique androgen-mediated inflammatory/immune signature and a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)-mediated apoptotic response specific to the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 18: 2895–2907.
7. Jiang F, Wang Z (2003) Identification of androgen-responsive genes in the rat ventral prostate by complementary deoxyribonucleic acid subtraction and microarray. *Endocrinology* 144: 1257–1265.
8. Leav I, Ho SM, Ofner P, Merk FB, Kwan PW, Damassa D (1988) Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Natl Cancer Inst* 80: 1045–1053.
9. Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR (1991) Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod* 45: 308–321.
10. Claessens F, Celis L, Peeters B, Heyns W, Verhoeven G, Rombauts W (1989) Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 833–840.
11. Devos A, De Clercq N, Vercaeren I, Heyns W, Rombauts W, Peeters B (1993) Structure of rat genes encoding androgen-regulated cystatin-related proteins (CRPs): a new member of the cystatin superfamily. *Gene* 125: 159–167.
12. Rennie PS, Bruchovsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, MacDonald BS (1993) Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol* 7: 23–36.
13. Asano K, Maruyama S, Usui T, Fujimoto N (2003) Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocr J* 50: 281–287.
14. Liu XH, Wiley HS, Meikle AW (1993) Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor (EGF)/TGF-alpha receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1472–1478.
15. Drago JR (1984) The induction of NB rat prostatic carcinomas. *Anticancer Res* 4: 255–256.
16. Noble RL (1977) The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. *Cancer Res* 37: 1929–1933.
17. Powell CE, Soto AM, Sonnenschein C (2001) Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen-target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77: 97–108.
18. Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF (1998) Real-time homogeneous assay of rapid cycle polymerase chain reaction product for identification of *Leptonema illini*. *Anal Biochem* 259: 112–117.
19. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8: 338–362.
20. Shirai T, Tamano S, Kato T, Iwasaki S, Takahashi S, Ito N (1991) Induction of invasive carcinomas in the accessory sex organs other than the ventral prostate of rats given 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone propionate. *Cancer Res* 51: 1264–1269.
21. Shirai T, Takahashi S, Cui L, Futakuchi M, Kato K, Tamano S, Imaida K (2000) Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. *Mutat Res* 462: 219–226.
22. Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ (2005) Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280: 36442–36451.
23. Prins GS (1989) Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: androgen independent expression in the lateral lobe. *J Steroid Biochem* 33: 319–326.
24. Steinsapir J, Evans AC Jr, Bryhan M, Muldoon TG (1985) Androgen receptor dynamics in the rat ventral prostate. *Biochim Biophys Acta* 842: 1–11.
25. Van Doorn E, Bruchovsky N (1978) Mechanisms of replenishment of nuclear androgen receptor in rat ventral prostate. *Biochem J* 174: 9–16.