

研究課題名=[マイクロアレイ基盤整備]

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立

分担研究者 五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。実際には、各班員との協議の下、共同研究を行い検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析結果を班員にフィードバックすることとした。加藤班員との破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析及び Androgen receptor 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索、同じく加藤班員との肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析、ChIP 後 DNA の増幅方法への T7 RNA polymerase を用いたリニア増幅法が適していることの確認、井口班員との DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析、および加藤班員との肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの ChIP on Chip による更なる解析、DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析、骨芽細胞特異的 ER α の骨組織網羅的遺伝子発現解析、などを実施した。

A. 研究目的

本研究は、当研究班での相互的関連研究分野に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、核内受容体作動性化学物質に関連する遺伝子の網羅的発現解析を行い、各班員の研究の基盤を支えることを目的とする。

核内受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多種多様であると考えられる。例えば、核内受容体活性化物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試験や Hershberger 試験における比較

的単純な endpoint でさえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方途が得られることが示されている。そこで本研究では、DNA マイクロアレイ技術を当班で活用可能とし、各班員が実施中の研究を網羅的遺伝子発現解析の側面からサポートする体制を整える。

B. 研究方法

各班員との協議の下、共同研究を行い、検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析

結果を班員にフィードバックすることとした。

すなわち、その概略は以下の通りとした。
各班員からの検体からの RNA 分離精製

生体組織を採取後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、臓器の場合は厚さが 5mm 以下となるように細切する。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存する。抽出に当たっては、RNAlater 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、破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施する。

Genechip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトックス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、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、ビオチン化 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。ハイブリダイゼーションは 45°C 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、専用スキャナーでスキャンしてデータを得る。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析する。

ChIP on Chip 解析

班員がクロマチン免疫沈降 (ChIP: Chromatin Immunoprecipitation) により得た DNA サンプルを必要量まで増幅し、3' 末端にビオチンラベルを入れ、Affymetrix promoter 1.0R array にハイブリシ、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得る。データは Genomatix 社の Chipinspector 及び Genomatix suite を利用して解析する。

C. 研究結果

平成 19 年度は、加藤茂明班員と、

1) 破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析追加解析、2) Androgen receptor 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索を実施した。1) については加藤班員より論文としてまとめた。

平成 20 年度は、加藤茂明班員と、肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析を実施した。また、基盤技術改良のために、ChIP 後の DNA 増幅方法の比較検討を行い、T7 RNA polymerase によるリニア増幅法を現時点で最もノイズが少ない方法として用いることが可能となった。

すなわち、肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析では、研究の概略は、以下の通りであった。

ファルネソイドX受容体(FXR)複合体精製により FXR 新規転写共役因子として加藤先生の研究室で同定された、PHF2/ARID5B 複合体の肝臓に於ける標的遺伝子を網羅的に解析するために、ChIP on Chip による検討を行った。PHF2/ARID5B 複合体形成はグルカゴン依存的であり、グルカゴン依存的な FXR 転写活性に対するコアクチベーターとして機能すること、グルカゴン依存的にヒストン H3K9 の脱メチル化を促進し、FXR 標的遺伝子の発現を誘導すること、PHF2 の発現量は一定であるものの、グルカゴン下流の PKA によってリン酸化され、複合体形成とプロモーター結合が促進されること、さらに肝臓においても、PHF2 は絶食依存的に FXR 標的遺伝子の SHP (胆汁酸代謝)、PEPCK (糖新生) のプロモーターにリクルートされることが、加藤研究室により明らかにされている。

ChIP on chip 解析実施にあたっては、PHF2 がゲノムワイドでグルカゴン (または絶食) 依存的に代謝関連遺伝子上に落ちてくること、またそれと平行して、ヒストン H3K9 メチル化修飾が減少していることを示すこと、をさしあたりの目標とした。

絶食、摂食条件のマウス肝臓から PHF2 抗体で ChIP した DNA サンプルを受け取り、PCR 法を用いたアフィメトリクス社公開プロトコルに従い、Promoter array にハイブリするために必要な量まで増幅したところ問題なく増幅されたので、PHF2 結合が確認されている SHP プロモーター領域に対する PCR によって、増幅に偏りが生じていないか検討したところ、同じサンプルでも増幅実験のロットによって偏りが生じることが明らかになった。そこで、同

一サンプルについて複数の増幅反応を行い、増幅後に偏りの有無を検討し、問題の無いものを選び、Promoter array にハイブリし、生データを得た。得られたデータを Genomatix 社の Chipinspector 及び Genomatix suite により解析した結果、PHF2 が絶食条件依存的に代謝遺伝子群のプロモーターにリクルートされること、そのプロモーターには FXR 結合配列が認められることなど、ゲノムワイドに FXR/PHF2/ARID5B 複合体が代謝関連遺伝子プロモーターにリクルートされることを示すデータが得られた。

一方で、アフィメトリクス社公開プロトコルによる増幅に伴う偏りへの対応に手間取り、ヒストン H3K9 メチル化についての ChIP on Chip 解析は実施が遅れている。ChIP 後の DNA 増幅方法の比較検討した。

アフィメトリクス社公開の ChIP 後の DNA 増幅方法は増幅に伴う偏りが生じることが多く、また、ノイズレベルも大きいと考えられた。そこで、現時点で実施可能な以下の3種類の ChIP 後の DNA 増幅方法を比較検討した。1) アフィメトリクス社法 (以下、Affy 法), 2) Whole genome amplification 法 (以下、WGA 法), 3) T7 RNA polymerase によるリニア増幅法 (以下、TLAD 法)。

サンプルとしては、マウス神経幹細胞のゲノム DNA をメチル化シトシンを標的に免疫沈降したものをを用い、増幅前後でメチル化シトシン含有断片の濃縮状態が維持されるか検討した。

WGA 法はシグマアルドリッチ社から販売されているゲノム DNA 増幅キットを用いた方法であり、Farnhamらにより ChIP on Chip 解析

用に推奨されている(Biotechniques, 2006 41:577-580)。一方、TLAD 法は増幅の偏りは少ないものの、増幅量が低いことが指摘されている(アフィメトリクステクニカル)。結果は、WGA 法も Affy 法同様、同じサンプルでも増幅実験のロットによって偏りが生じるというものであり、TLAD 法では偏りは生じないものの、増幅量が十分ではないというものであった。

そこで、TLAD 法を複数回繰り返すことによって必要な増幅量を得られるか検討したところ、3回増幅することで必要な 5~9ug の DNA を得ることが出来ることが分かった。増幅後の偏りも問題ないレベルであり、今後、TLAD 法を用いた解析が実施可能であると判断した。

平成 21 年度は、井口班員との DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析、加藤班員との肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析、DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析、骨芽細胞特異的 ERalphaKO の骨組織網羅的遺伝子発現解析などを行った。

すなわち、その概略は以下の通りである。

DES 新生児期暴露腫の DNA メチル化変化の網羅的解析 (井口班員)

出生直後のマウスへの DES 投与により、不可逆的な腫上皮の角質化・腫瘍化が誘起される現象と DNA メチル化変化の関係について、網羅的手法により解析している。メチル化 DNA 断片をメチル化シトシンに対する抗体で沈降し、遺伝子のプロモーター領域に対するプローブを配した DNA マイクロアレイにて網羅的検索を行った。実験群は、以下の 3 群とした。

Control : 8 週齢で卵巣を摘出し、10 週目か

ら 5 日間、ごま油を投与し翌日サンプリング。
NeoDES : 新生児 0 日目から 4 日目まで DES を 1.5 mg/kg BW 投与、8 週で卵巣を摘出し、10 週でサンプリング。

Adult DES : 8 週齢で卵巣を摘出し、10 週目から 5 日間、DES を 1.5 mg/kg BW 投与し、翌日にサンプリング。

その結果、NeoDES、AdultDES に特有の変化が捉えられており、現在井口先生、渡邊先生と詳細な解析を行っている。

肝臓における絶食シグナル依存的な転写コアクチベーターの機能解析に関する ChIP on Chip 解析 (加藤班員)

ファルネソイド X 受容体(FXR)複合体精製により FXR 新規転写共役因子として加藤先生の研究室で同定された、PHF2/ARID5B 複合体の肝臓に於ける標的遺伝子を網羅的に解析するために、ChIP on Chip による検討を行った。PHF2/ARID5B 複合体形成はグルカゴン依存的であり、グルカゴン依存的な FXR 転写活性に対するコアクチベーターとして機能すること、グルカゴン依存的にヒストン H3K9 の脱メチル化を促進し、FXR 標的遺伝子の発現を誘導すること、PHF2 の発現量は一定であるものの、グルカゴン下流の PKA によってリン酸化され、複合体形成とプロモーター結合が促進されること、さらに肝臓においても、PHF2 は絶食依存的に FXR 標的遺伝子の SHP (胆汁酸代謝)、PEPCK (糖新生) のプロモーターにリクルートされることが、加藤研究室により明らかにされている。

ChIP on chip 解析実施にあたっては、PHF2 がゲノムワイドでグルカゴン(または 絶食)依存的に代謝関連遺伝子上に落ちてくることを示すこと、を目標とした。

絶食、摂食条件のマウス肝臓から PHF2 抗体で ChIP した DNA サンプルを受け取り、PCR 法を用いたアフィメトリクス社公開プロトコールに従い、Promoter array にハイブリするために必要な量まで増幅したところ問題なく増幅されたので、PHF2 結合が確認されている SHP プロモーター領域に対する PCR によって、増幅に偏りが生じていないか検討したところ、同じサンプルでも増幅実験のロットによって偏りが生じることが明らかになった。そこで、同一サンプルについて複数の増幅反応を行い、増幅後に偏りの有無を検討し、問題の無いものを選び、Promoter array にハイブリし、生データを得た。得られたデータを Genomatix 社の Chipinspector 及び Genomatix suite により解析した結果、PHF2 が絶食条件依存的に代謝遺伝子群のプロモーターにリクルートされること、そのプロモーターには FXR 結合配列が認められることなど、ゲノムワイドに FXR/PHF2/ARID5B 複合体が代謝関連遺伝子プロモーターにリクルートされることを示すデータが得られた。

DNA 脱メチル化酵素 MBD4 の標的遺伝子の解析 (加藤班員)

加藤先生の研究室において、ビタミン D 受容体を含む核内蛋白複合体を精製した結果、DNA メチル化酵素が含まれていることが分かった。ビタミン D による CYP27B1 プロモーター制御を DNA メチル化について調べたところ、ビタミン D によりメチル化が促進され、PTH により脱メチル化が促進されることが分かった。さらに、蛋白複体内に含まれていた MBD4 が DNA 脱メチル化酵素であることが明らかになった (Nature. 2009;461

(7266):1007-12)。

そこで、MBD4 ノックアウトマウスを用い、網羅的発現解析により MBD4 の CYP27B1 以外の標的遺伝子を同定することを目的とした共同研究を行っている。野生型、MBD4KO マウスにビタミン D もしくは PTH (ビタミン D 処理後) 処理し、腎臓の遺伝子発現を網羅的に解析した。

その結果、ビタミン D による CYP27B1 の発現低下は確認されたものの、PTH による野生型マウスでの CYP27B1 発現回復は認められなかった。そのため、ビタミン D による発現変化のみに着目したデータ解析を先行させ、PTH による回復のデータを再取得する方針で進めている。

骨芽細胞特異的 ER α KO の骨組織網羅的遺伝子発現解析 (加藤班員)

加藤先生の研究室で、破骨細胞での ER α KO は雌特異的に骨量減少が認められる (Cell. 2007;130:811-23) が、骨芽細胞で ER α をノックアウトすると、雄特異的に骨量減少が認められることが分かった。この現象について網羅的遺伝子発現解析を実施したいとの依頼を頂き、共同研究を開始した。現在、サンプル到着を待っている段階で、今年度中にはっきりした結果が得られるよう進めていく予定である。

D. 考察

平成 19 年度の加藤班員との共同研究では、まずエストロゲンの骨代謝制御機構を解明する一助となる成果が得られた。すなわち、破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウスを用いることで初めて見出された ER α を介した破骨細胞抑制現象を説明する機構として、

エストロゲンが破骨細胞にアポトーシスを誘導するという加藤班員のモデルを支持する遺伝子発現パターンが得られ、加藤班員の研究に貢献し得た。この成果は今後核内受容体作動性物質の骨代謝への影響を解析する際に貴重な情報となる。Androgen receptor (AR) 変異体 (T877A) ノックインマウスを用いた前立腺癌増悪に関わる遺伝子の網羅的検索においては、特定のシグナル伝達系における変化の観点からデータの検討を進めている。発癌前後での発現の違いが大きいが、ART788AKI でそれが更に大きくなっている。すなわち、ART788A 依存的に発現変化する遺伝子が多数見出されており、それを元に重要なシグナル系を抽出できるものと考えた。

次いで平成 20 年度の加藤班員との共同研究では、PHF2 複合体が絶食条件依存的に代謝関連遺伝子群のプロモーター領域にリクルートされることがゲノムワイドに確認された。また、基盤技術改良として、TLAD 法が ChIP 後の DNA の増幅方法として使用可能であることを確認出来た。今後の ChIP on Chip 解析では TLAD 法を用いることでノイズの少ないデータが得られ、解析精度が増すことと考えられた。

ChIP on Chip 解析は網羅的遺伝子発現解析を補助する解析ツールとして重要である。特定の転写因子のゲノム DNA への結合やヒストン修飾状況、DNA メチル化状態の解析に用いることができ、化学物質の生体影響メカニズム解析に有力な情報をもたらす手法である。尚この時点で、ChIP on Chip 解析の精度の向上の目処も立てることができた。

平成 21 年度の井口班員との共同研究では、DES 投与により予想以上に DNA メチル化の変

化が誘発されていることが示唆された。これはこれまでに別途進めてきた DNA メチル化変化の網羅的解析ではほとんど変化が検出されないことと比べると、驚くべき結果であったと考えられる。今後は、DES により引き起こされる不可逆的変化と関連する DNA メチル化変化を同定することが重要と考えられる。加藤班員との共同研究においては、FXR-PHF2 複合体のリクルート、VDR-MBD4 の機能についての解析が進み、核内受容体を起点に生じるエピジェネティック変化のメカニズム解明にの手がかりが得られた。

ChIP on Chip 解析は網羅的遺伝子発現解析を補助する解析ツールとして重要である。特定の転写因子のゲノム DNA への結合やヒストン修飾状況、DNA メチル化状態の解析に用いることが出来、化学物質の生体影響メカニズム解析に有力な情報をもたらす手法であり、今後も活用されていくことが望まれる。

E. 結論

本研究は、網羅的遺伝子発現解析を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとして実施している。

網羅的遺伝子発現解析技術は、数万の遺伝子の発現を迅速に検討できる有効な技術である。本研究で示されてきたように、この技術は、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない核内受容体作動性化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有力な手法となる。

発現解析として数万の遺伝子の発現を迅

速に検討することに加え、クロマチン免疫沈降と組み合わせることで転写因子やヒストン修飾、DNAメチル化などのクロマチン制御メカニズムを網羅的に解析することも可能となった。本研究で示されてきたようにこの技術は、既知の情報から推測することが困難な新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に今後も有力な手法となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hypersensitivity of AhR-deficient mice to LPS-induced septic shock. Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. *Mol Cell Biol.* 2009 Dec;29(24):6391-400. [Epub 2009 Oct 12.]

Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP279-86.

2. 学会発表

脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析 -幼若期雄マウスへのトリアゾラム投与による学習記憶障害について-
種村 健太郎, 松上 稔子, 五十嵐 勝秀, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純
日本トキシコロジー学会学術年会, Vol. 36
pp. 1303-, 2009年, 岩手

ビスフェノールA経胎盤曝露によりマウス泌尿生殖洞で発現変動する性分化関連遺伝子群の同

定

荒瀬栄樹、石井健一朗、五十嵐勝秀、相崎健一、小倉友二、今村哲也、吉尾裕子、有馬公伸、菅野純、杉村芳樹

第97回日本泌尿器科学会総会, 巻:100号:2
頁:160, 2009年, 岡山

3. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

なし

B. 実用新案登録

なし

C. その他

なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Tsuruoka T, Fujimoto T, Shiota N, Monda M, Fuenta Y, Ishidao T, Hori H, <u>Aou S.</u>	Positive and negative effects of environmental chemicals on brain functions in rodents.	Brain-Inspired IT	266(-)	79-84	2010
Masuda A, Narikiyo, K, Shiota, N, <u>Aou S.</u>	Acquisition and extinction of avoidance response by social interaction in rat.	Brain-Inspired IT	266(-)	73-8	2010
Hirabayashi Y, <u>Inoue T.</u>	Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells.	Biochem Pharmacol	77(4)	521-35	2009
Kawasaki Y, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kanno J, Kodama Y, Matsushima Y, Ogawa Y, Saitoh M, Sekita K, Uchida O, Umemura T, Yoon BI, <u>Inoue T.</u>	Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice.	Toxicol Sci	110(2)	293-306	2009
Yi JY, Hirabayashi Y, Choi YK, Kodama Y, Kanno J, Han JH, <u>Inoue T.</u> , Yoon BI.	Benzene activates caspase-4 and -12 at the transcription level, without an association with apoptosis, in mouse bone marrow cells lacking the p53 gene.	Arch Toxicol	83(8)	795-803	2009
<u>Inoue T.</u> , Hirabayashi Y.	Hematopoietic neoplastic diseases develop in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure: Strain differences in bone marrow tissue responses observed using microarrays.	Chem Biol Interact Doi	Doi:10.1016/j.cbi.2009.12.005		2009
井上 達.	内分泌攪乱化学物質の低用量作用と毒性学のあたらしい課題.	科学 (Science Journal KAGAKU)	79(9)	1022-8	2009
Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R, Suzuki K, <u>Iguchi T.</u> , Taketo MM, Nakagata N, Matsumoto T, Takeyama K, Kato S, Yamada G.	Genetic integrations of the androgen and Wnt/ β -catenin pathways for the masculinization of external genitalia.	Mol Endocrinol	23(6)	871-80	2009
Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, <u>Iguchi T.</u> , Sato T.	Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries.	Biol Reprod	81(5)	1002-9	2009
Miyagawa S, Katsu Y, Ohta Y, Sudo T, Lubahn DB, <u>Iguchi T.</u>	Estrogen receptor α is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5 α -dihydrotestosterone exposure.	Biol Reprod	Doi:10.1095/biolreprod.109.081315		2009
井口泰泉	ビスフェノールAのリスク評価と研究に関する最近の話題.	Endocrine Disrupter News Letter (環境ホルモン学会ニュースレター)	12 (2)	3	2009
Kim M, Kondo T, Takada I, Youn M, Yamamoto Y, Takahashi S, Matsumoto T, Fujiyama S, Shiode Y, Yamaoka I, Kitagawa H, Takeyama K, Shibuya H, Ohtake F, <u>Kato S.</u>	DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression.	Nature	461(7266)	1007-12	2009
Fujiki R, Chikanishi T, Hashiba W, Ito H, Takada I, Roeder RG, Kitagawa H, <u>Kato S.</u>	GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis.	Nature	459(7245)	455-9	2009

Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, Takeyama, K, Minami Y, O'Malley BW, <u>Kato S.</u>	Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor.	Mol Cell	36(2)	340-7	2009
Kouzu-Fujita M, Mezaki Y, Mtsumoto T, Yamaoka I, Sawatsubashi S, Yano T, Taketani Y, Kitagawa H, <u>Kato S.</u>	Coactivation of Estrogen Receptor β by Gonadotropin-Induced Cofactor GIOT-4.	Mol Cell Biol	29(1)	83-92	2009
Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, <u>Kato S.</u>	Regulation of bone metabolism by nuclear receptors.	Mol Cell Endocrinol	310(1-2)	3-10	2009
Miki Y, Suzuki T, Nagasaki S, Hata S, Akahira J, <u>Sasano H.</u>	Comparative effects of raloxifene, tamoxifen and estradiol on human osteoblasts in vitro: estrogen receptor dependent or independent pathways of raloxifene.	J Steroid Biochem Mol Biol	113(3-5)	281-9	2009
Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, <u>Sasano H.</u>	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acid synthesis.	Cancer Res	69(4)	1392-9	2009
Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Shibata H, Ishida T, Ohuchi N, <u>Sasano H.</u>	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma: Possible regulator of lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor-C expression.	Cancer Sci	100(4)	639-45	2009
<u>Sasano H</u> , Nagasaki S, Miki Y, Suzuki T.	New developments in intracrinology of human breast cancer: estrogen sulfatase and sulfotransferase.	Ann N Y Acad Sci	1155(-)	76-9	2009
Nakamura Y, Xing Y, <u>Sasano H</u> , Rainey WE.	The mediator complex subunit 1 enhances transcription of genes needed for adrenal androgen production.	Endocrinology	150(9)	4145-53	2009
Nagasaki S, Miki Y, Akahira J, Suzuki T, <u>Sasano H.</u>	Transcriptional regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12 by SREBP-1.	Mol Cell Endocrinol	307(1-2)	163-8	2009
Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, <u>Kawato S.</u>	Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus.	Endocrinology	150(11)	5106-5112	2009
Munetsuna E, Hattori M, Komatsu S, Sakimoto Y, Ishida A, Sakata S, Hojo Y, <u>Kawato S</u> , Yamazaki T.	Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis.	Biochem Biophys Res Commun	379(2)	480-4	2009
Munetsuna E, Hojo Y, Hattori M, Ishii H, <u>Kawato S</u> , Ishida A, Kominami S, Yamazaki T.	Retinoic Acid Stimulates 17 β -Estradiol and Testosterone Synthesis in Rat Hippocampal Slice Cultures.	Endocrinology	150(9)	4260-9	2009
Higo S, Hojo Y, Ishii H, Kominami T, Nakajima K, Poirier D, Kimoto T, <u>Kawato S.</u>	Comparison of sex-steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus.	Biochem Biophys Res Commun	385(1)	62-6	2009
Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, Hojo Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Sato R, <u>Kawato S.</u>	Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus.	Biochem Biophys Res Commun	381(4)	728-32	2009
Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka S, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, <u>Kawato S.</u>	Estrogen synthesis in the brain – Role in synaptic plasticity and memory.	Mol Cell Endocrinol	290(1-2)	21-43	2008
Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, <u>Kawato S.</u>	Rapid Modulation of Synaptic Plasticity by Estrogens as well as Endocrine Disrupters in Hippocampal Neurons.	Brain Res Rev	57(2)	363-75	2008
Matsunaga N, <u>Kanno J</u> , Hamada C, Yoshimura I.	An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments.	Environmetrics	20(1)	1-13	2009

Kanno J.	Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects".	J Toxicol Sci	34 Suppl 2	SP199-200	2009
Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, <u>Kanno J.</u>	Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams.	J Toxicol Sci	34 Suppl 2	SP279-86	2009
Masuda A, <u>Aou S.</u>	Social transmission of avoidance behavior under situational change in learned and unlearned rats.	PLoS One	4(8)	e6794	2009
Oomura Y, <u>Aou S.</u> , Fukunaga K.	Prandial increase of leptin in the brain activates spatial learning and memory.	Pathophysiology	10.1016/j.pathophys.2009.04.004		2009 (Epub)
栗生修司	環境ホルモンと脳の性差.	Clinical Neuroscience	27(10)	1128-9	2009
Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, <u>Kawato S.</u>	Rapid Modulation of Synaptic Plasticity by Estrogens as well as Endocrine Disrupters in Hippocampal Neurons.	Brain Res Rev	57(2)	363-75	2008
Hideki K, Kenichiro I, Yuji O, Tetsuya I, Masahiro K, Kiminobu A, <u>Sugimura Y.</u>	Naftopidil, a selective α -1 adrenoceptor antagonist, inhibits growth of human prostate cancer cells by G1 cell cycle arrest.	Int J Cancer	122(2)	444-51	2008
Hirabayashi Y, <u>Inoue T.</u>	Principles of data-mining in toxicogenomics.	In: Sahu SC, ed. Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment. Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd.		57-84	2008
<u>Iguchi T.</u> , Watanabe H, Ohta Y, Blumberg B.	Developmental effects: estrogen induced vaginal changes and organotin induced adipogenesis.	Int J Androl	31(2)	263-8	2008
Okada M, Takezawa S, Mezaki Y, Yamaoka I, Takada I, Kitagawa H, <u>Kato S.</u>	Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor-alpha.	EMBO Rep	9(6)	563-8	2008
Shibuya R, Suzuki T, Miki Y, Yoshida K, Moriya T, Ono K, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Evans DB, <u>Sasano H.</u>	Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast.	Endocr Relat Cancer	15(1)	113-24	2008
<u>Sekizawa J.</u>	Low Dose Effects of Bisphenol A: A Serious Threat to Human Health?	J Toxicol Sci	33(4)	389-403	2008
Hirabayashi Y, <u>Inoue T.</u>	Implication of hemopoietic progenitor cell kinetics and experimental leukemogenesis: relevance to Gompertzian mortality as possible hepatotoxicological endpoint.	Exp Hematol	35(4) Suppl	SP125-33	2007
Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Otto T, Trosko JE, <u>Inoue T.</u>	Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state and leukemogenesis.	Exp Biol Med	232(5)	700-12	2007
<u>Sekizawa J.</u> , Ohtawa H, Yamamoto H, Okada Y, Nakano T, Hirai H, Yamamoto S, Yasuno K.	Evaluation of Human Health Risks From Exposures to Four Air Pollutants in the Indoor and the Outdoor Environments in Tokushima, and Communication of the Outcomes to the Local People.	J Risks Res	10(6)	841-51	2007

Suzuki A, Urushitani H, Sato T, Kobayashi T, Watanabe H, Ohta Y, <u>Iguchi T</u> .	Gene expression change in the Mullerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol in utero.	Exp Biol Med	232(4)	503-14	2007
Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriskin M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, <u>Iguchi T</u> , Jobling S, <u>Kanno J</u> , Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, Leblanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A.	Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Intergration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure.	Reprod Toxicol	24(2)	131-8	2007
Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, <u>Kato S</u> .	Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.	Nature	446(7135)	562-6	2007
Takeda I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn Min-Young, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, <u>Kato S</u> .	A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical wnt signalling supresses PPAR- γ transactivation.	Nat Cell Biol	9(11)	1273-85	2007

