

Feminization

Endocrine system

Dioxin (-) Dioxin (+)
Atrophy of gonadal gland

Immune system

Environmental Hormone

Development

Carcinogenesis

Prostate cancer

Breast cancer

Days Post DMSA	TCDD - DMSA (Tumors per Rat)	Sesame Oil - DMSA (Tumors per Rat)
0	0	0
100	~1.5	~0.5
250	~4.5	~1.5

新生児期でのダイオキシン暴露による 自己免疫疾患の誘導

NFS/sld mice

Birth

Day 0 1 2

TCDD 0 ng

TCDD 10 ng

2 mo

6 mo

Analysis

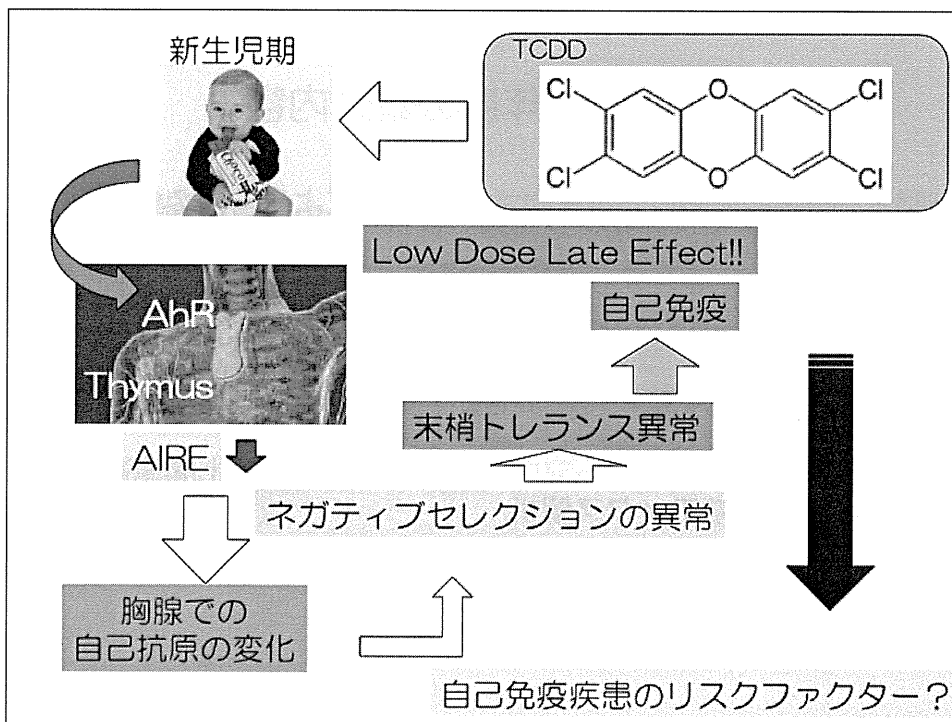
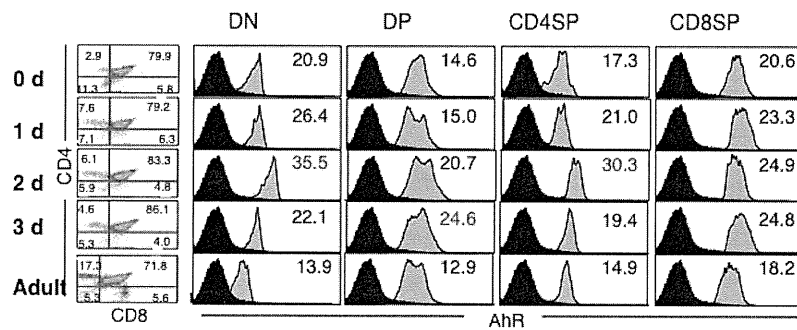
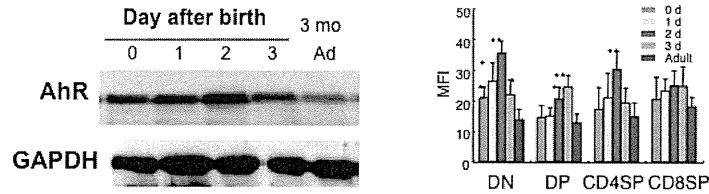
Analysis

Dioxin (TCDD)

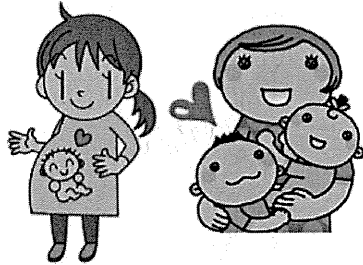
ClC1=C(Cl)C2=C(Cl)C(=C1)OC3=C(Cl)C=CC(=C3)O2

新生児期の胸腺T細胞におけるAhRの発現

AhR: Aryl hydrocarbon receptor; TCDDのレセプター

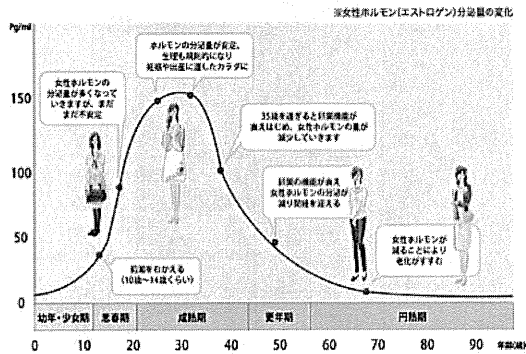


周産期での免疫システムへの影響は？

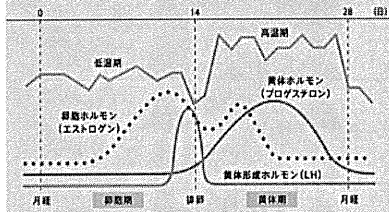


性ホルモンと免疫システム

女性のライフステージと女性ホルモンのグラフ



女性ホルモンのバランス



平成23年度の研究内容

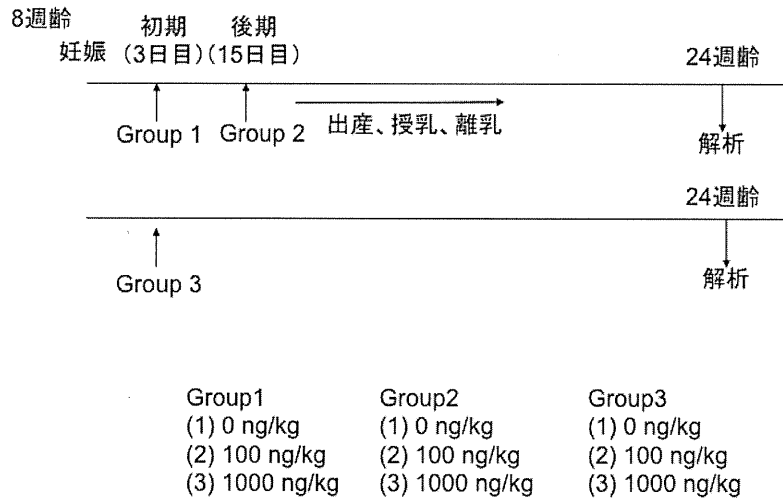
実験1：妊娠期におけるダイオキシン暴露による自己免疫疾患発症
(前年度より継続)

実験2：妊娠期における免疫システムとAhRの発現

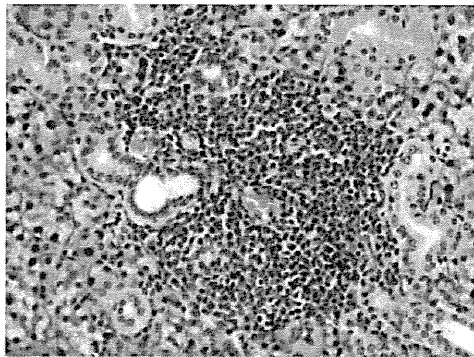
実験3：アロマトーゼノックアウトマウスにおけるAhRの発現

実験4：AhRノックアウトマウスにおけるT細胞分化関連遺伝子の
エピジェネティクス解析

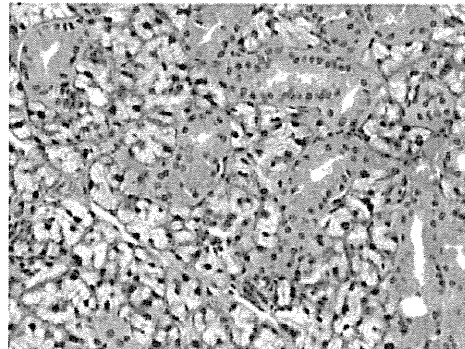
実験プロトコール NFS/sld マウス

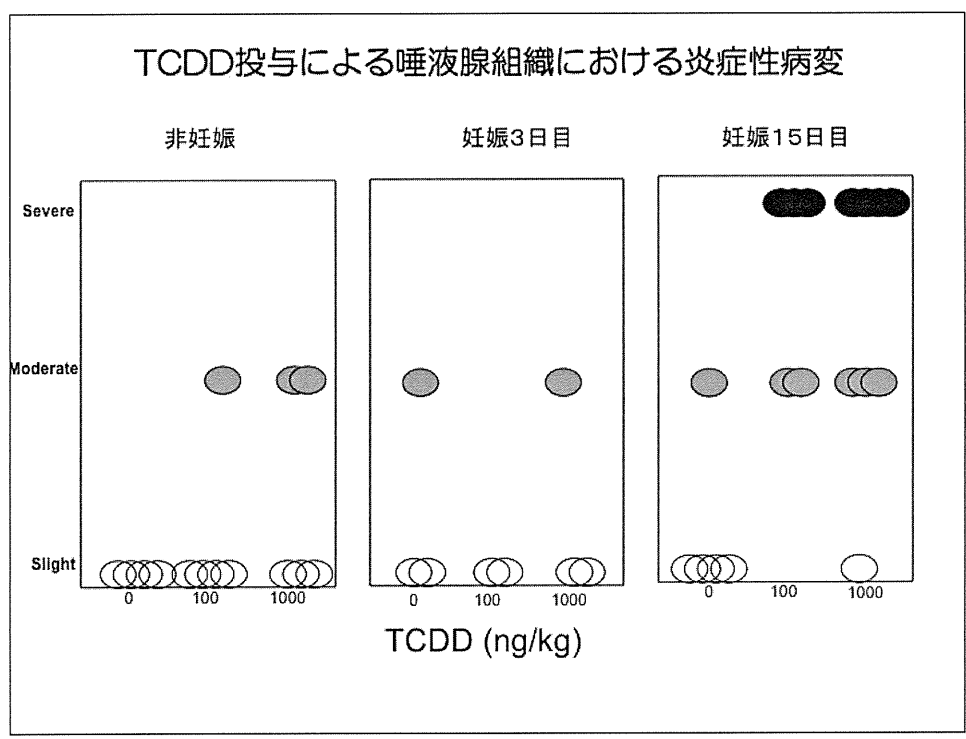
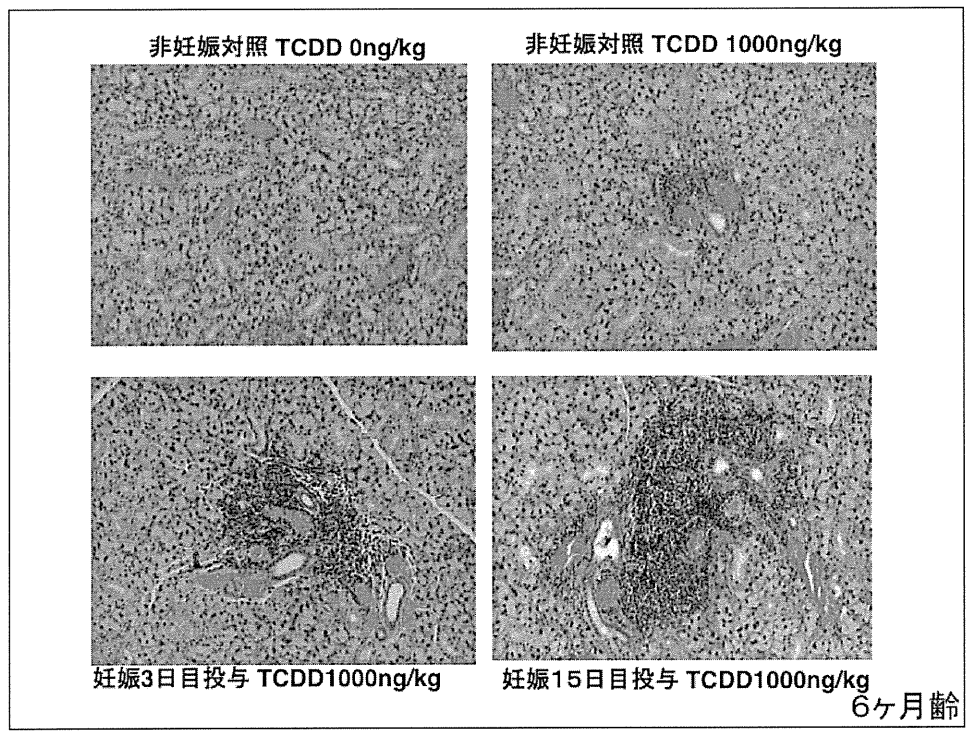


妊娠15日目にTCDDを投与したときの母体（7ヶ月齢）

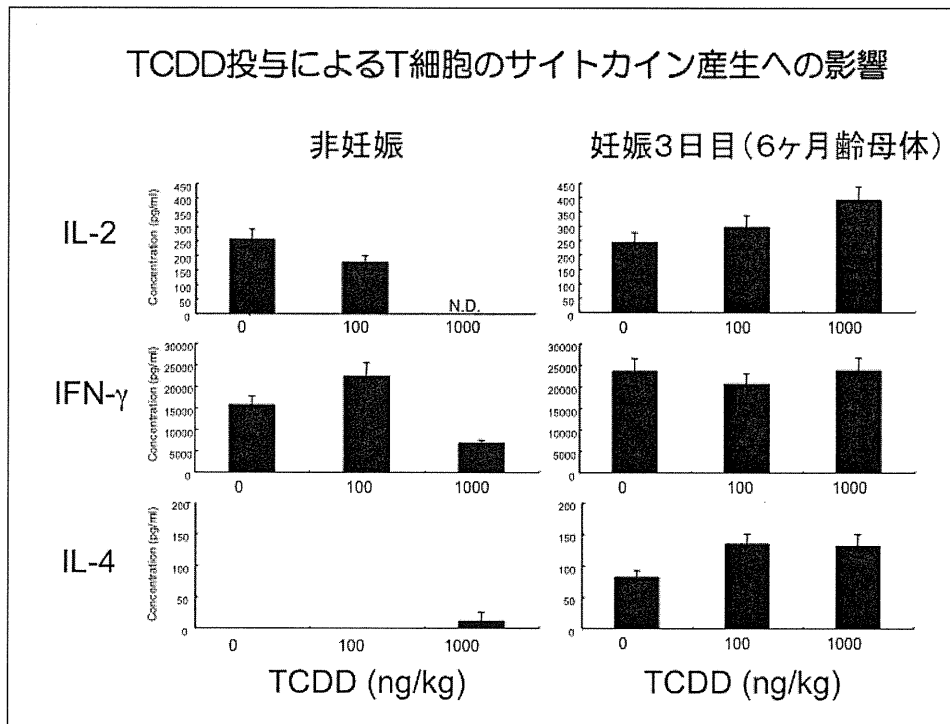


非妊娠



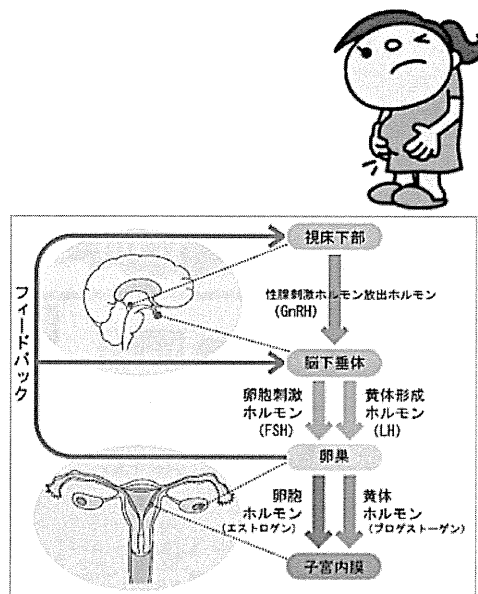
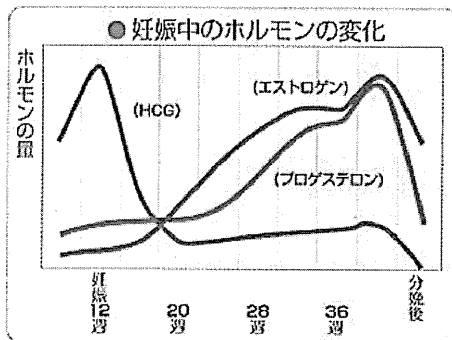


TCDD投与によるT細胞のサイトカイン産生への影響



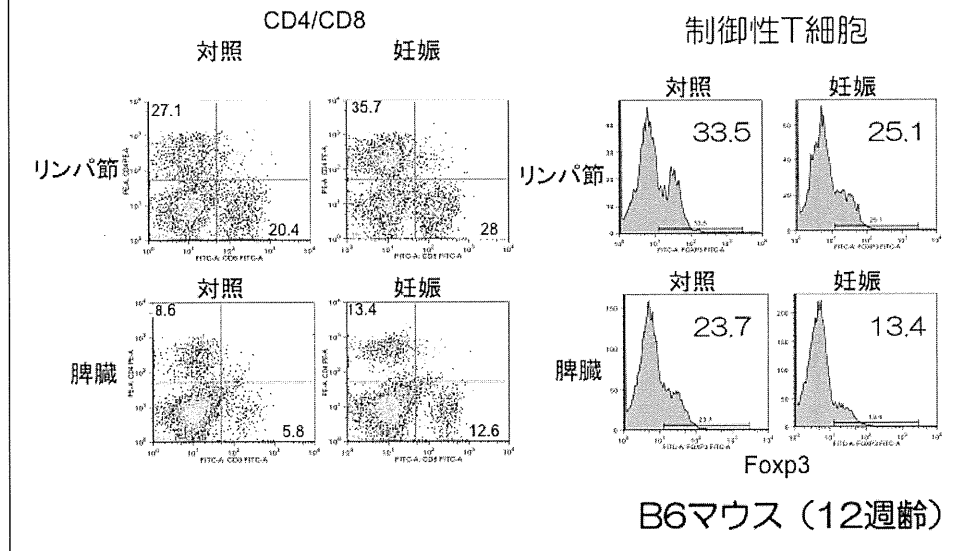
周産期における免疫システム

女性ホルモンと免疫

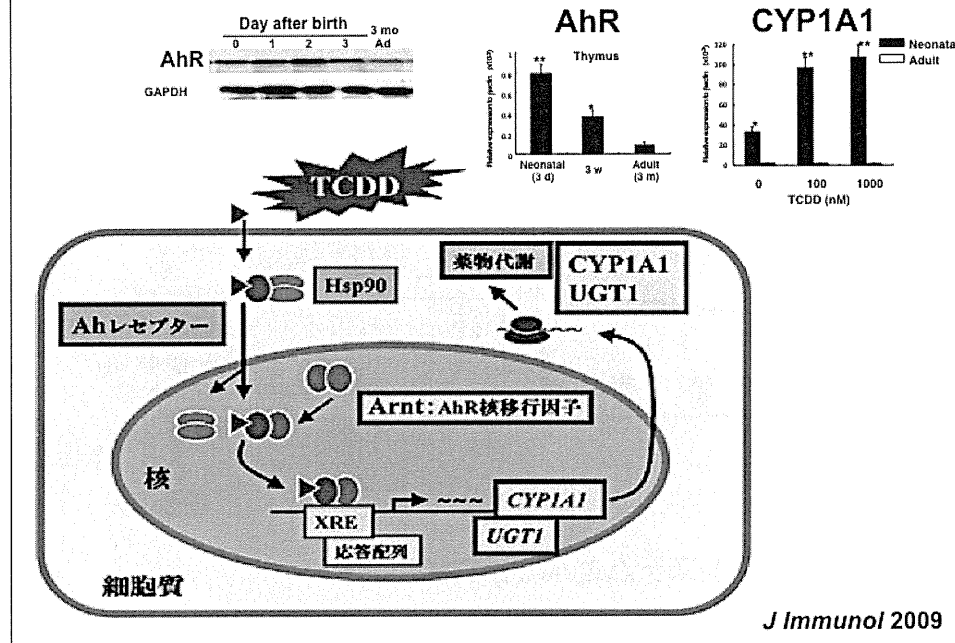


妊娠中の免疫システムとAhR発現?

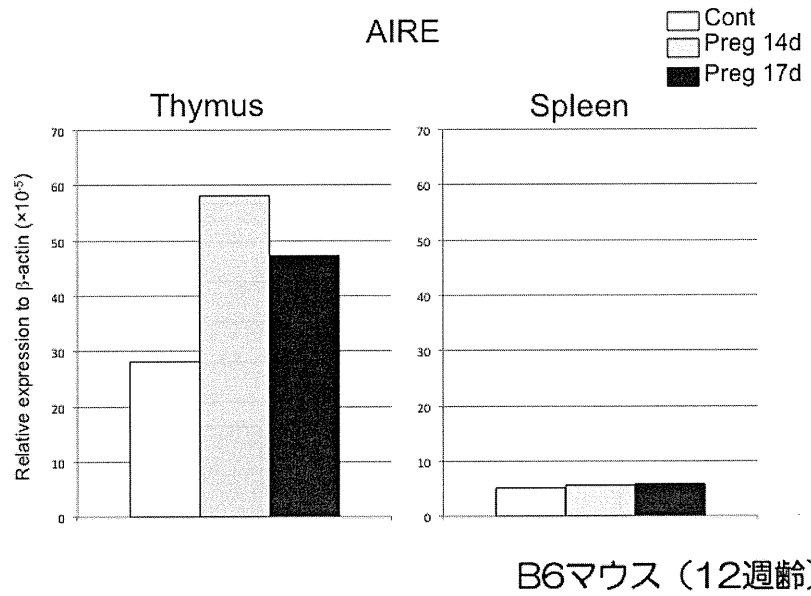
妊娠期における末梢T細胞分画



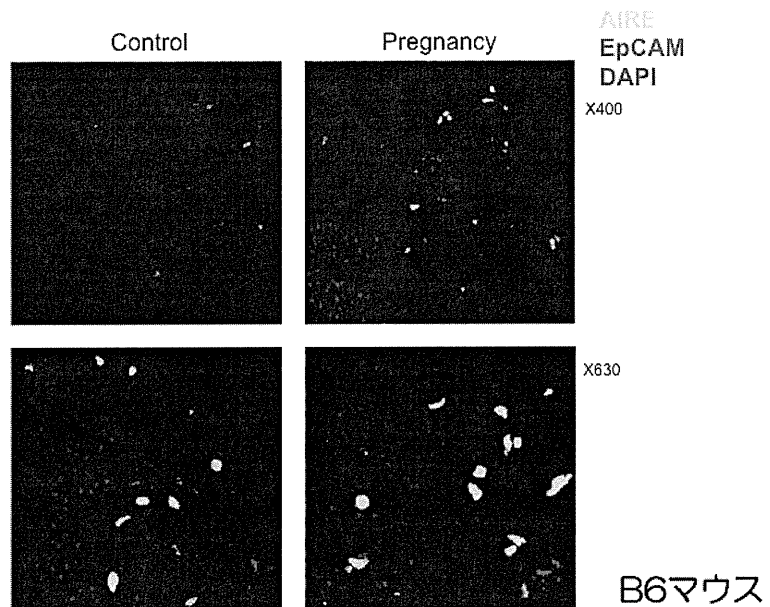
胸腺におけるAhRの発現と自己免疫



妊娠期におけるAIREの発現

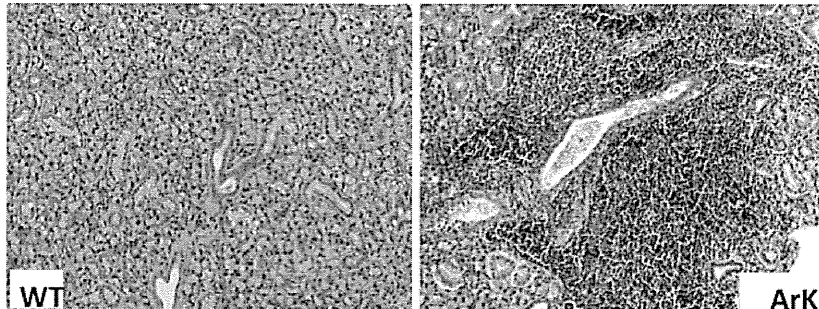
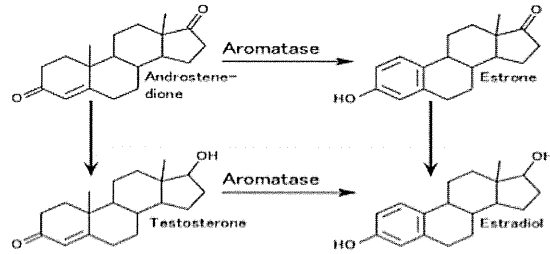


妊娠期における胸腺組織でのAIREの発現



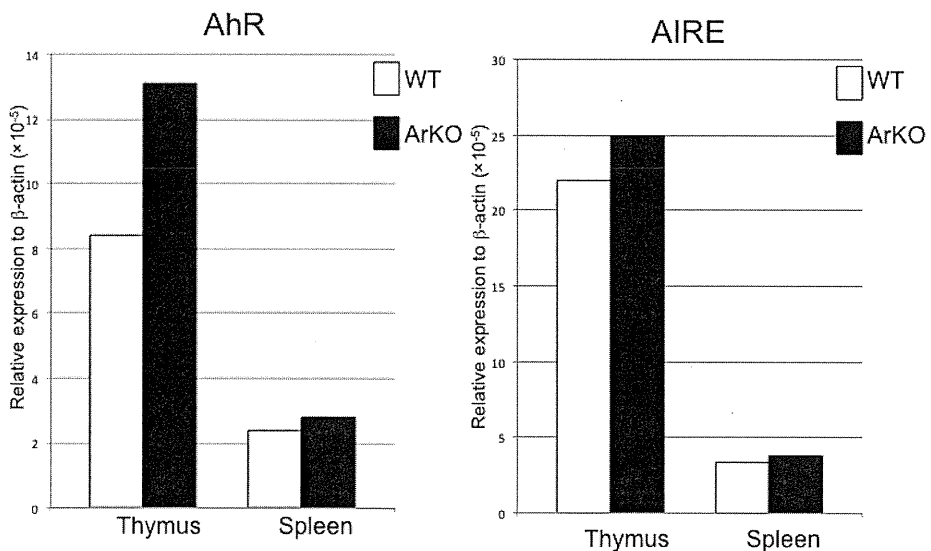
アロマトラーゼノックアウトマウス

Aromatase is an enzyme converting testosterone to estrogen



ArKO
PNAS 2004

アロマトラーゼノックアウトマウスにおけるAhR、AIREの発現

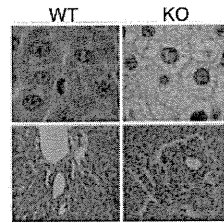


AhRノックアウトマウス

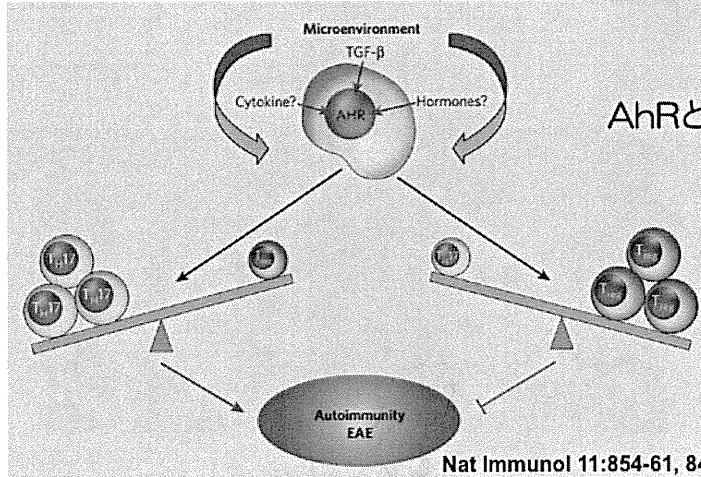
Aryl hydrocarbon receptor (Ahr): TCDD (ダイオキシン) 受容体

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, Vol. 93, pp. 6731-6736

AhRのノックアウトマウスの表現系として肝臓の発達や血管形成などに異常が報告されている



AhRを介したTregとTh17への分化



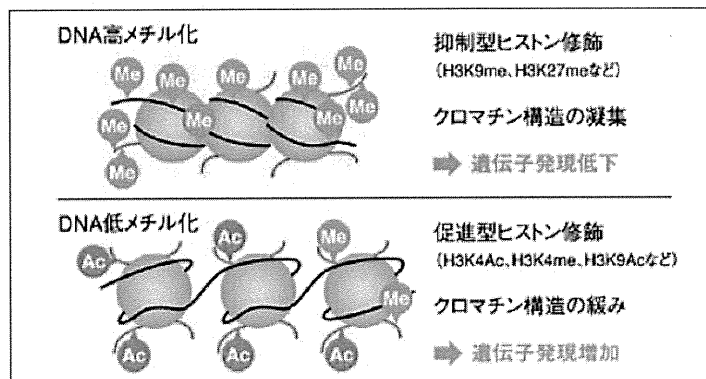
Nat Immunol 11:854-61, 845-53, 2010

ダイオキシン暴露と免疫細胞における エピジェネティックな影響？

AhRを介したT細胞への影響は？

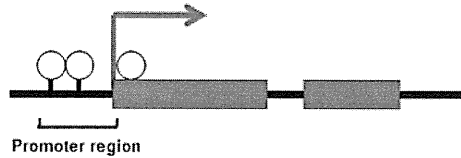
基本的な仕組み

- ・DNA修飾-----メチル化
- ・ヒストン修飾-----アセチル化, メチル化

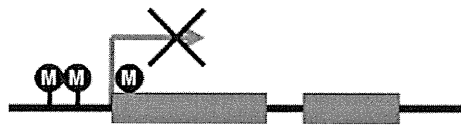


DNAメチル化について

Genes that can be expressed



Genes inactivated by DNA methylation



● Methylated
○ Unmethylated

- DNAメチル化はシトシン、アデニンに起こる。遺伝子発現制御には主としてCpG部位のシトシンのメチル化が重要である。
- DNA複製の際にはDNAメチル基転移酵素により複製される。その複製の忠実度は高く、細胞の情報維持機構としての役割を担っている

メチル化感受性制限酵素によるDNAメチル化検出

一部の制限酵素はCpG部位を認識配列に含み、メチル化された場合には切断しなくなる。特定の制限酵素部位について、切断されたDNA量と、切断されていないDNA量とを定量的PCRにて測定し、メチル化の有無を検出するのが今回用いた方法の原理である。

バイサルファイト処理

MSP法は、CpGジヌクレオチドの非メチル化シトシンをウラシル (UpG) に変換する。メチル化シトシンはこの処理では変換されないため、プライマーを興味のあるCpG部位に重なるように設計することで、メチル化されているかいないかを決定することができる。

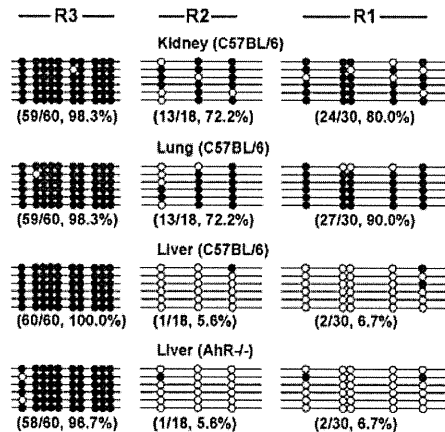


Fig. 1. CpG methylation of the CYP1A2 promoter in 4-week-old male C57Bl/6 mouse tissues and AhR-null mouse liver, as analyzed by bisulfite sequencing. PCR primers (Table 1) specific for bisulfite-modified DNA were designed for three separate domains, R1, R2, and R3, within the 5' flanking region of the *Cyp1a2* gene. Each row of circles represents cytosine methylation from individual clones of the CYP1A2 promoter, as well as the position of each CpG site relative to the transcription start. Filled circles indicate methylated cytosines; open circles indicate unmethylated cytosines.

T細胞分化関連遺伝子

遺伝子名(略)

Chd7	Chromodomain helicase DNA binding protein 7
Eomes	Eomesodermin homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
Fosl1	Fos-like antigen 1
4930412O13Rik	RIKEN cDNA 4930412O13 gene
Gata4	GATA binding protein 4
Hoxa10	Homeobox A10
Hoxa5	Homeobox A5
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
Il13	Interleukin 13
Irf4	Interferon regulatory factor 4
Irf8	Interferon regulatory factor 8
Lrrc32	Leucine rich repeat containing 32
Myb	Myeloblastosis oncogene
Nr4a3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
Perp	PERP, TP53 apoptosis effector
Pkd2	Polycystic kidney disease 2
Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Rel	Reticuloendotheliosis oncogene
Relb	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B
Rora	RAR-related orphan receptor alpha
Tbx21	T-box 21
Tgif1	TGFB-induced factor homeobox 1
Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11

DNAメチル化

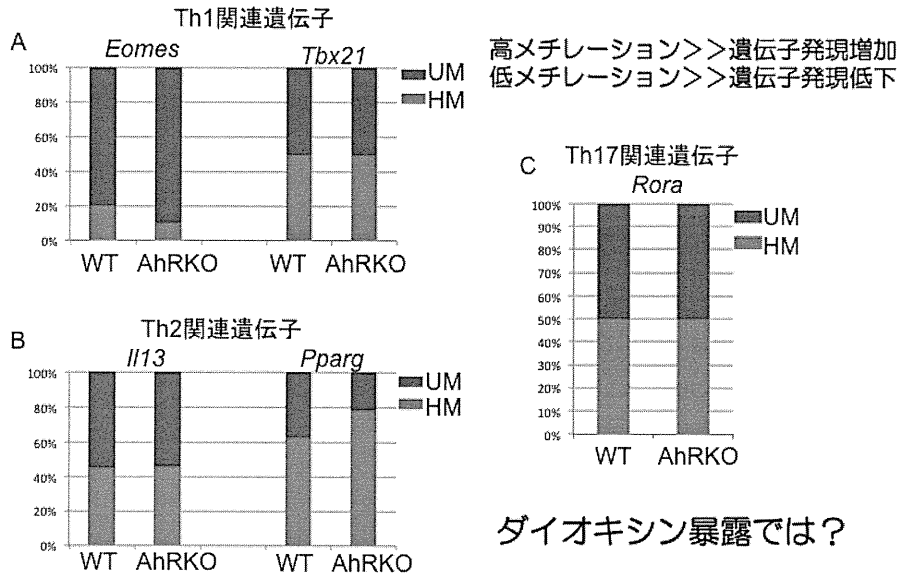
	WT			KO		
	HM (%)	UM (%)	IM (%)	HM (%)	UM (%)	IM (%)
Chd7	50	50	0	50	50	0
Eomes	20.7	79.3	0	10.61	89.39	0
Fosl1	23.7	76.3	0	24.06	75.94	0
Gata4	17.16	82.84	0	15.8	84.2	0
Hoxa10	50	50	0	50	50	0
Id2	50	50	0	50	50	0
Id3	44.89	55.11	0	45.82	54.18	0
Id4	50	50	0	49.09	50.91	0
Irf8	0.4	99.6	0	0.89	99.11	0
Nr4a3	50	50	0	50	50	0
Perp	38.71	61.29	0	29.35	70.65	0
Pkd2	66.14	33.86	0	74.54	25.46	0
Pou2f2	50	50	0	50	50	0
Pparg	62.88	37.12	0	78.11	21.89	0
Rel	17.98	82.02	0	13.21	86.79	0
Rora	50	50	0	50	50	0
Tbx21	50	50	0	50	50	0
Tgif1	50	50	0	50	50	0
Tnfsf11	71.5	28.5	0	76.94	23.06	0

HM:Hypermethylated DNA fraction

UM:Unmethylated DNA fraction

IM: Intermediately methylated DNA fraction

AhRノックアウトマウスにおける 胸腺CD4⁺細胞のエピジェネチクス解析



まとめ

1. NFS/*slc*マウスを用い妊娠中にTCDDを投与すると6ヶ月齢にてSS様の炎症性病変が観察され、特に、妊娠後期（15日目）にTCDDを投与すると、激しい炎症性病変が唾液腺に認められた。T細胞のサイトカイン産生パターンもTCDD投与により非妊娠、妊娠期で大きく異なっていた。
2. 非妊娠マウスに比較して妊娠期のT細胞分化は進んでいたが、制御性T細胞の割合は妊娠期の方が減少していた。
3. アロマトラーゼノックアウトマウスの胸腺におけるAhR mRNAの発現は対照よりも増加していた。
4. AhRノックアウトマウスの胸腺T細胞における、分化関連遺伝子ではEomes（Th1関連遺伝子）のメチル化が対照に比較して減少していた。
5. 妊娠期におけるAhRを介した免疫システムへの影響が示され、周産期でのダイオキシン暴露と自己免疫疾患が関連する可能性が示唆された。

共同研究者

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

菅野 純

高木篤也

徳島大学大学院口腔分子病態学分野

新垣理恵子

山田安希子

片山 愛

木野倫子

堅田聡子

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

分担研究報告書

マウス雌性生殖器官の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構

研究分担者 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

研究協力者 宮川 信一 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター 助教

研究要旨

内分泌かく乱物質の発生期における影響として、晩発性あるいは継世代性の影響が示唆されてきている。未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答について、女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としての Wnt シグナルとのクロストークの解析を行った。β-catenin を構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの膺上皮細胞において、女性ホルモン作用非依存の細胞増殖が誘導されることが明らかとなった。さらに周生期 DES 投与マウスの膺上皮の基底細胞の一部や腺様疾患部でもβ-カテニンは高発現し、蓄積していることが分かった。以上の結果から、発生期女性ホルモン曝露によるホルモン応答システムの破綻時において、Wnt/β-カテニン経路の関与が明らかとなった。

A. 研究目的

女性ホルモン(エストロゲン)は生体の恒常性維持、生殖、発生・分化をはじめとした様々な局面で重要な機能を果たしている。それゆえ女性ホルモンシステムの破綻は、乳がんや子宮癌、不妊、骨粗しょう症や肥満などを引き起こし、生物の様々な活動に影響を及ぼす。こうしたホルモン関連の疾患の増加は近年社会問題化しているが、その発症メカニズムは不明な点が多い。さらに近年では、内分泌かく乱物質の発生期における影響として、晩発性あるいは継世代性の影響が示唆されてきている。成熟した動物への影響はホメオスタシスに基づいた応答により長期的な影響を示さないが、未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答はほとんど理解が進んでいない。

輸卵管・子宮・膺などの女性生殖器官は、胎児期にミューラー管及び尿生殖洞を起源として発

生・発達する。このミューラー管の発生過程では様々な分泌性シグナル因子が関与することが報告されており、特に Wnt シグナルは不可欠である(例えば Wnt4 ノックアウトマウスは女性生殖管を完全に欠失する)。一方ヒトを含めた多くの成熟動物の組織において、Wnt/β-カテニンシグナルの亢進は腫瘍形成に関与していることが報告されている。しかし、女性生殖器官における Wnt シグナルの作用や、女性ホルモンとの相互作用についてはよく分かっていない。

本研究は女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としての Wnt シグナルとのクロストークの解析を通じて、周生期の女性ホルモン曝露による標的器官の不可逆的かつ長期的な影響の分子生物学的基盤を明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

生命現象の様々な局面で重要な働きを担っている Wnt シグナルの、女性生殖器官の発生・分化への影響を、遺伝子改変マウスを使って解析するために、臍上皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス(K5-Cre)と、 β -catenin^{EX3} マウス(Cre が作用すると、 β -カテニンの分解に必要なセリン残基を含むエクソン 3 が切り出され、構成的活性型 β -カテニンを発現する機能獲得型ミュータント)を掛け合わせ、臍上皮細胞特異的 β -catenin 活性化マウスを作成した(K5Cre/+; β -catenin^{EX3/+})。このマウスは出生直後で致死であるため、臍組織の表現型を解析するために、胎生 18.5 日の胚から臍組織を取り出し、ヌードマウス(内在性の女性ホルモンの影響を除くために 2-3 週間前に卵巣を摘出してある)の腎臓皮膜下に移植し、約 4 週間後に移植組織片の組織学的解析を行った。なお、K5-Cre マウスは大阪大学竹田潤二教授、 β -catenin^{EX3} マウスは京都大学武藤誠教授との共同研究として供与されたものである。

周生期の女性ホルモン曝露による不可逆的かつ長期的な影響は、ジエチルスチルベストロール(DES;合成女性ホルモン)を C57B6 マウスの新生仔期(DES 3 μ g を出生日より 5 日間投与)あるいは胎児期(DES 2mg を胎生 15.5 日から 18.5 日まで、母獣に投与)に投与したマウスを用いた。必要に応じて、出生後約 8 週齢で卵巣を摘出し、組織は 10 週齢で採材した。

C57B6 マウス、ヌードマウス(Crlj:CD1-Foxn1^{nu})は、日本エスエルシー、日本チャールズリバーよりそれぞれ入手した。動物実験に関しては、自然科学研究機構動物実験委員会及び自然科学研究機構組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、関連する法令に従い、動物愛護の精神をもって行った。

C. 研究結果

本年度は、発生期化学物質曝露が誘導する組織不可逆化の発症メカニズムを、発生期化学物質曝露によって誘導される形質の原因遺伝子の同定およびその遺伝子の発現制御メカニズムの解析を行った。特に多くの組織の発生・分

化、細胞増殖、癌化に寄与している Wnt/ β -カテニン経路に注目し、女性生殖器における、Wnt/ β -カテニン経路の雌性生殖管における内在的な機能を、臍上皮細胞特異的 β -catenin 活性化マウスを用いて解析した。

本研究では遺伝子改変マウスを用いて Wnt/ β -カテニン経路の解析を試みるが、そのためには、上皮組織特異的な Cre 活性を有するマウスを用いたコンディショナルノックアウトマウス解析が不可欠である。K5-Cre マウスは、臍上皮特異的に Cre を発現するマウスである(図 1)。このマウスと β -catenin^{EX3} マウスを掛け合わせ、Wnt/ β -カテニンシグナルを構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの臍組織を解析した。なお、方法の項にも記したとおり、このマウスは出生後まもなく死亡するため、臍組織はヌードマウスに移植し、約 4 週間後に採材し、解析に供した。

コントロール(対照)群の臍上皮組織は 2-3 層であり、薄い退縮した形態を示していた(図 2)。これは卵巣を除去した成獣マウスの表現型と概ね一致している。一方 β -catenin 活性化マウスでは、上皮組織は多層化しており、また内腔は分泌物で満たされていた(図 2)。また臍本来の内腔上皮から分離した腺構造に似た形態も対照群に比べ有意に多く見られた。組織片は卵巣を除去したヌードマウスに移植しているため、この表現型は女性ホルモン非依存的であるといえる。

細胞増殖やアポトーシスを BrdU 免疫染色法及び TUNEL 法で解析したところ、細胞増殖や細胞死ともに β -catenin 活性化マウスでは亢進していた。一方間質領域ではこれらに差は見られなかった(図 3)。

さらに細胞分化マーカーを用いた解析を行った。p63 は通常多層化上皮の基底細胞、あるいはそれに近い層に発現する未分化細胞マーカーである。 β -catenin 活性化マウスの臍上皮では、p63 陽性細胞の領域が上方に広がっていた。また、CK1 は多層化上皮組織における分化マーカー、ロリクリンは角質化の最終分化マーカーである。これらは対照群では発現は見られない。一方 β -catenin 活性化マウスでは、ごくわずかに発現が見られた。これらの組織学

的マーカー解析から、 β -カテニンの活性化は、少なくとも膾上皮細胞の女性ホルモン非依存の細胞増殖には十分であることがわかった。

新生仔女性ホルモン曝露によって、女性ホルモン非依存の細胞増殖誘導した膾の上皮細胞における β -カテニンタンパク質の発現を解析したところ、上皮基底細胞の一部において、 β -カテニンタンパク質の核への局在が見られた(図 4)。さらに、胎生期女性ホルモン曝露によって誘導した腺様疾患においても、 β -カテニンタンパク質はその他の領域よりも高発現していたことから (data not shown)、膾組織における発生途上の未成熟な時期に対する女性ホルモン曝露と、そのホルモン応答システムの破綻について、Wnt/ β -カテニンシグナルが関与していることが推測された。

D. 考察

以上の結果から、 β -catenin 活性化マウスの膾上皮細胞において、女性ホルモン作用非依存の細胞増殖(と一部分化)が誘導されることが明らかとなった。すなわち、 β -カテニンの活性化は女性ホルモン非依存の細胞増殖に十分である。さらに新生仔期 DES 投与マウスの膾上皮の基底細胞でも β -カテニンが蓄積していた。今後、さらなる女性ホルモン応答遺伝子や各種分化マーカーなどの発現解析から、女性ホルモンによる細胞増殖・分化状態との差異を明らかにし、異常な細胞増殖の分子メカニズムを明らかにする予定である。

さらに我々は、メチル化 DNA 特異的抗体とタイリングアレイを用いた ChIP-on-chip 解析を行っており、周生期女性ホルモン曝露によるゲノムワイドなクロマチン状態の変化を網羅的に解析している。その過程で、Wnt/ β -カテニンシグナルの抑制因子である Tle1 遺伝子のプロモータ領域のメチル化が、周生期ホルモン曝露群で亢進している可能性があるという結果を得ている。このことは Tle1 を含む Wnt シグナル関連遺伝子の、クロマチン状態の正しい制御が正常膾組織の発生と分化、成熟後の細胞増殖・分化に必須であること、そして不適切な時期の女性ホル

モン曝露が適切なクロマチン構造変換を妨げた結果、女性ホルモン非依存の遺伝発現と表現型を誘導することを示唆している。次年度以降、Tle1 をはじめ Wnt 関連遺伝子を中心とした解析を進め、組織分化のメカニズムや、その制御破綻から顕れる形質の分子生物学的基盤を確立する。

E. 結論

我々は、女性生殖器官におけるホルモンシステムの破綻モデルとして、発生途上の未成熟な時期(臨界期)に対する女性ホルモン曝露と、そのホルモン応答システムの破綻について解析を進めてきた。通常マウスの膾上皮は女性ホルモン依存的な細胞増殖を示すが、出生前後の周生期ないし生後5日目までに女性ホルモンを投与すると、成熟後膾上皮はホルモン非依存の増殖を示すようになり、加齢に伴い腫瘍化する。本研究から、このホルモン非依存の細胞増殖において Wnt/ β -カテニン経路が活性化していることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chakraborty, T., Katsu, Y., Zhou, L.Y., Miyagawa, S., Nagahama, Y. and Iguchi, T.: Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: an *in vitro-in vivo* correlation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 123, 115-121 (2011).

Chakraborty, T., Shibata, Y., Zhou, L.Y., Katsu, Y., Iguchi, T. and Nagahama, Y.: Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*. Mol. Cell. Endocrinol., 333, 47-54 (2011).

Lange, A., Paull, G.C., Hamilton, P.B., Iguchi, T. and Tyler, C.R.: Implications

- of persistent exposure to treated wastewater effluent for breeding in wild roach (*Rutilus rutilus*) populations. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 1673-1679 (2011).
- Urushitani, H., Katsu, Y., Miyagawa, S., Kohno, S., Ohta, Y., Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T.: Molecular cloning of anti-Müllerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 333, 190-199 (2011).
- Urushitani, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Shiraishi, H., Iguchi, T. and Horiguchi, T.: Cloning and characterization of retinoid X receptor (RXR) isoforms in the rock shell, *Thais clavigera*. *Aquat. Toxicol.*, 103, 101-111 (2011).
- Kato, Y., Shiga, Y., Kobayashi, K., Tokishita, S., Yamagata, H., Iguchi, T. and Watanabe, H.: Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Devel. Genes Evol.*, 220, 337-345 (2011).
- Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: Deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genetics*, 7, e1001345 (2011).
- Southam, A.D., Lange, A., Hines, A., Hill, E.M., Katsu, Y., Iguchi, T., Tyler, C.R. and Viant, M.R.: Metabolomics reveals target and off-target toxicities of a model organophosphate pesticide to roach (*Rutilus rutilus*): Implications for biomonitoring. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 3759-3767 (2011).
- Bermudez, D.S., Skotko, J.P., Ohta, Y., Boggs, A.S.P., Iguchi, T. and Guillette, L.J.Jr.: Sex steroid and thyroid hormone receptor expressions in the thyroid of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) during different life stages. *J. Morphol.*, 272, 698-703 (2011).
- Nakajima, T., Iguchi, T. and Sato, T.: Involvement of activin signaling in abnormalities of the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Cell Tiss. Res.*, 344, 527-538 (2011).
- Nakajima, T., Hayashi, S., Iguchi, T. and Sato, T.: The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. *Differentiation*, 82, 28-37 (2011).
- Miyagawa, S., Matsumaru, D., Murashima, A., Omori, A., Satoh, Y., Haraguchi, R., Motoyama, J., Iguchi, T., Nakagata, N., Hui, C.C. and Yamada, G.: The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology*, 152, 2894-2903 (2011).
- Moore, B.C., Milnes, M.R., Kohno, S., Katsu, Y., Iguchi, T., Woodruff, T.K. and Guillette, L.J.Jr.: Altered gonadal expression of TGF- β superfamily signaling factors in environmental contaminant-exposed juvenile alligators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 58-63 (2011).
- Katsu, Y., Lange, A., Miyagawa, S., Urushitani, H., Tatarazako, N., Kawashima, Y., Tyler, C.R. and Iguchi, T.: Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio* estrogen receptors and their differential activations by estrogens. *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushitani, H., Kobayashi, T., Hirai, T., Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R. and Iguchi, T.: Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish

species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquat. Toxicol.*, (in press).

Kakuta, H., Tanaka, M., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T.: Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Reprod. Toxicol.*, (in press).

Goto, Y., Kajiwara, M., Yanagisawa, Y., Hirose, H., Yoshimi, T., Uemura, M., Nakano, H., Takahashi, S., Shida, Y., Iguchi, T., Takahashi, Y. and Miura, T.: Detection of vertebrate-type steroid hormones and their converting activities in the neogastropod *Thais clavigera* (Kster, 1858). *J. Molluscan Studies*, (in press).

Myburgh, J.G., Huchzermeyer, F.W., Groenewald, H.B., Soley, J.T., Bekker, L.C., Booyse, D.G., Iguchi, T. and Guillette, L.J.Jr.: Technique for the collection of clean urine from the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *J. South African Vet. Assoc.*, (in press).

Hirakawa, I., Miyagawa, S., Katsu, Y., Kagami, Y., Tatarazako, N., Kobayashi, T., Kusano, T., Mizutani, T., Ogino, T., Ohta, Y. and Iguchi, T.: Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol. *Chemosphere*, (in press).

著書、総説

Celander, M.C., Goldstone, J.V., Denslow, N.D., Iguchi, T., Kille, P., Meyerhoff, R.D., Smith, B.A., Hutchinson T.H. and Wheeler, J.R.: Species extrapolation for the 21st century. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30, 52-63 (2011).

Watanabe, H., Kato, Y. and Iguchi, T.:

Application of ecotoxicogenomics for understanding mode of action of chemicals and species extrapolation. In: *Handbook of Systems Toxicology*. Eds. Casciano, D.A. and Sahu, S.C., John Wiley & Sons, Ltd. pp.67-72 (2011).

Ogino, Y., Miyagawa, S., Katoh, H., Prins, G.S., Iguchi, T. and Yamada, G.: Essential functions of androgen signaling emerged through the developmental analysis of vertebrate sex characteristics. *Evol. Devel.*, 13, 315–325 (2011).

Blumberg, B., Iguchi, T. and Odermatt, A.: Editorial: Endocrine disrupting chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 1-3 (2011).

Miyagawa, S., Sato, M. and Iguchi, T.: Molecular mechanisms of induction of persistent changes by estrogenic chemicals on female reproductive tracts and external genitalia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 51-57 (2011).

Hayes, T.B., Beasley, V.R., de Solla, S., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V.S., Luque, E.H., McCoy, K.A., Muñoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C.A., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L.E., Trudeau, V.L., Victor-Costa, A.B. and Willingham, W.: Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 64-73 (2011).

Miyagawa, S., Yatsu, R., Sudo, T., Igarashi, K., Kanno, J. and Iguchi, T.: Irreversible effect of diethylstilbestrol on reproductive organs and current approach for epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals. In: *Toxicology and Epigenetics*. Ed. Sahu, S.C., John Wiley & Sons, Ltd. (in press).

Tatarazako, N. and Iguchi, T.: Evaluation