

図15

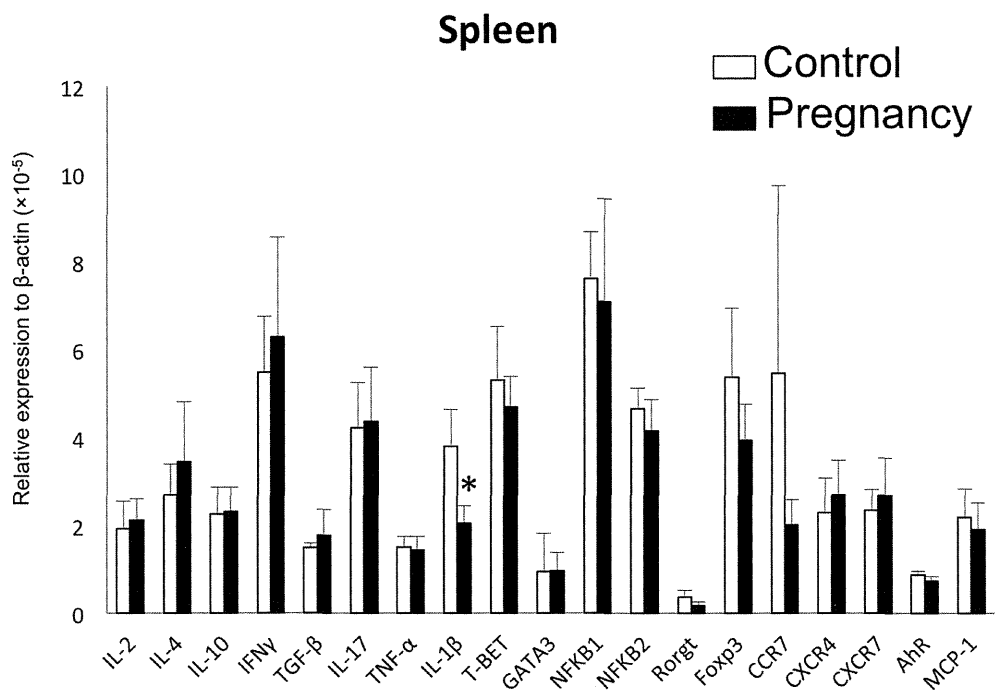


図15 妊娠(15日目)マウスおよび非妊娠マウスの脾臓における各種免疫関連因子の mRNA発現を定量RT-PCR法で解析した。結果は平均 \pm 標準偏差(n=4)で示す。 β -actinの mRNAに対する相対的な定量値で表す。* $p < 0.05$

図16

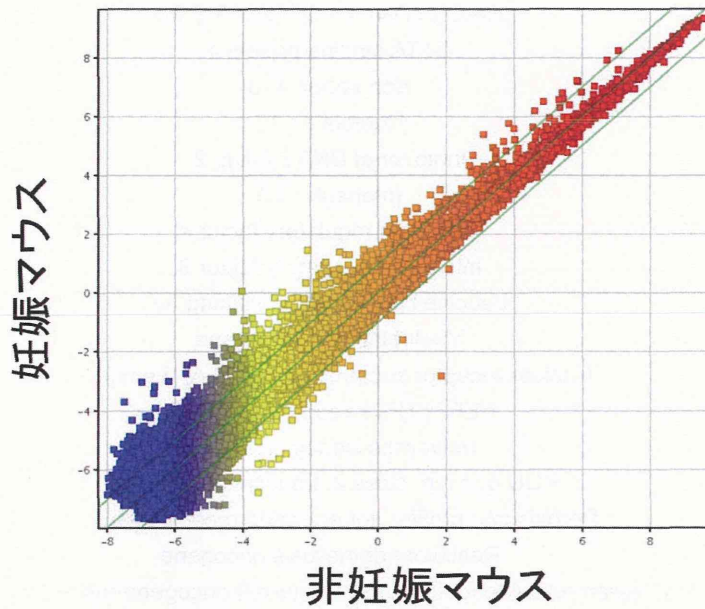


図16 妊娠マウス（妊娠15日目）と非妊娠マウスの胸腺組織におけるDNAマイクロアレイ解析による遺伝子の変動。非妊娠マウス（4匹）の遺伝子発現に対する妊娠マウス（4匹）の平均発現値を示す遺伝子発現比を示す。緑色線は2倍変化値（FC）を示す。

表1.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 (Xenopus laevis)
Fos1	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

表2.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: Intermediatedly methylated DNA fraction

表3 妊娠マウス胸腺組織で発現が上昇している主な遺伝子

ProbeName	FC (abs)	Regulation	GeneSymbol	Description
A_51_P141546	5.203756	up	Orm2	Mus musculus orosomucoid 2 (Orm2), mRNA [NM_011016]
A_52_P281702	5.104808	up	Igfbp5	Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5), mRNA [NM_010518]
A_51_P245090	3.923982	up	Aqp3	Mus musculus aquaporin 3 (Aqp3), mRNA [NM_016689]
A_52_P253179	3.667473	up	Igfbp3	Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3), mRNA [NM_008343]
A_51_P137452	3.4213557	up	Cyp2g1	Mus musculus cytochrome P450, family 2, subfamily g, polypeptide 1 (Cyp2g1), mRNA [NM_013809]
A_51_P201982	3.2864256	up	Angpt2	Mus musculus angiopoietin 2 (Angpt2), mRNA [NM_007426]
A_55_P1964960	3.2312324	up	Il33	Mus musculus interleukin 33 (Il33), transcript variant 1, mRNA [NM_001164724]
A_66_P124091	3.2102666	up	Chrdl1	Mus musculus chordin-like 1 (Chrdl1), transcript variant 2, mRNA [NM_031258]
A_52_P42269	3.2056398	up	Fgf10	Mus musculus fibroblast growth factor 10 (Fgf10), mRNA [NM_008002]
A_55_P2364768	3.139236	up	Mcpt-ps1	Mus musculus mast cell protease, pseudogene 1 (Mcpt-ps1), non-coding RNA [NR_028284]
A_52_P686785	3.121155	up	Lyve1	Mus musculus lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve1), mRNA [NM_053247]
A_51_P157083	3.0592566	up	Gas1	Mus musculus growth arrest specific 1 (Gas1), mRNA [NM_008086]
A_52_P489295	2.9858954	up	Adams1	Mus musculus a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1 (Adams1), mRNA [NM_009621]
A_51_P279552	2.933013	up	Cav2	Mus musculus caveolin 2 (Cav2), mRNA [NM_016900]
A_51_P356642	2.8929784	up	Krt19	Mus musculus keratin 19 (Krt19), mRNA [NM_008471]
A_51_P117739	2.8568933	up	Fgf	Mus musculus c-fos induced growth factor (Fgf), mRNA [NM_010216]
A_51_P145132	2.8136868	up	Mcpt4	Mus musculus mast cell protease 4 (Mcpt4), mRNA [NM_010779]
A_52_P175242	2.777105	up	Irs1	Mus musculus insulin receptor substrate 1 (Irs1), mRNA [NM_010570]
A_55_P1971889	2.7715304	up	F3	Mus musculus coagulation factor III (F3), mRNA [NM_010171]
A_55_P1990121	2.7109623	up	Aqp5	Mus musculus aquaporin 5 (Aqp5), mRNA [NM_009701]
A_51_P436652	2.6999686	up	Ccl7	Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 7 (Ccl7), mRNA [NM_013654]

表4 妊娠マウス胸腺組織で発現が低下している主な遺伝子

ProbeName	FC (abs)	Regulation	GeneSymbol	Description
A_55_P2003034	2.0148218	down	P4ha3	Mus musculus procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide III (P4ha3), mRNA [NM_177161]
A_55_P2205186	2.0611012	down	5830415G21Rik	Mus musculus adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 5830415G21 product:unclassifiable, full insert sequence. [AK017932]
A_51_P195598	2.4063785	down	Olf259	Mus musculus olfactory receptor 259 (Olf259), mRNA [NM_146770]
A_55_P1952304	2.0833826	down	Usp44	Mus musculus ubiquitin specific peptidase 44 (Usp44), transcript variant 1, mRNA [NM_001206851]
A_55_P1986781	3.0202398	down	Gm10694	PREDICTED: Mus musculus predicted gene 10694 (Gm10694), mRNA [XM_003084785]
A_52_P248013	2.0406182	down	Chsy3	Mus musculus chondroitin sulfate synthase 3 (Chsy3), mRNA [NM_001081328]
A_51_P267278	24.46408	down	Slc15a2	Mus musculus solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2 (Slc15a2), transcript variant 1, mRNA [NM_021301]
A_66_P125787	2.033159	down	Gm11292	PREDICTED: Mus musculus predicted gene 11292 (Gm11292), mRNA [XM_003084913]
A_55_P2082215	2.7741027	down	Ttbk1	Mus musculus tau tubulin kinase 1 (Ttbk1), mRNA [NM_001162864]
A_55_P2015949	2.2984664	down	Cpa5	Mus musculus carboxypeptidase A5 (Cpa5), mRNA [NM_144537]
A_66_P109080	2.0036366	down	Lrguk	Mus musculus adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230320P20 product:hypothetical L domain-like structure containing protein, full insert sequence. [AK045903]
A_55_P2073567	2.4099538	down	Epb4.114b	erythrocyte protein band 4.1-like 4b [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859149] [ENSMUST0000095076]
A_52_P667960	2.553187	down	Tcte2	Mus musculus t-complex-associated testis expressed 2 (Tcte2), mRNA [NM_022311]
A_55_P2089362	2.3977284	down	Wfdc13	Mus musculus WAP four-disulfide core domain 13 (Wfdc13), mRNA [NM_001012704]

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)

(平成 23～25 年度) 総合研究報告書

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前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、Wnt シグナルや PI3K/Akt シグナルに注目し、細胞増殖や細胞死、各種分化マーカーなどの発現解析を行い、発生前化学物質曝露によって誘導される形質との比較することにより、発生前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を解析した。その結果、 β -catenin を構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの膈上皮細胞において、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。また、PI3K/Akt シグナルは女性ホルモン存在下あるいは非存在下において異なる機能を持つことが示唆され、女性生殖器官のホメオスタシスに対して、きわめて大切な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、膈上皮細胞の ER は、その細胞増殖には影響はないが、角質化への分化に必須であることを明らかにした。これらは今後、遅発性影響における、組織レベルでの女性ホルモン受容体の寄与を解析する上で重要な知見である。これら一連の解析で得られた、周生期エストロゲン作用に関わるシグナル因子の関連遺伝子について、今後 DNA メチル化等のエピジェネティックな影響も検討することで、発生前個体に対するエストロゲン様物質の不可逆的作用のメカニズムを明らかにしていくことができると考えられる。

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前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・膈からなる女性生殖管は、生殖の場として生物の根源に関わる役割を担っており、その細胞増殖・分化は、女性ホルモンによってダイナミックに制御されている。女性生殖器官の細胞増殖は女性ホルモンによって一過性に、つまり女性ホルモン依存的に制御されているので、生殖器官の癌とは、いわば“女性ホルモン非依存の細胞増殖”といえる。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。通常マウスの膈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あるいは女性ホルモン様化学物質を投与すると、成熟後膈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 (Takasugi et al., 1962, *Science*, 138, 438-439)。この現象は、ヒトの DES シンドローム (DES; ジエチルスチルベストロールは合成女性ホルモンであり、1940-70 年にかけて主に欧米で流産防止薬として使用されていたが、後になって DES を服用した妊婦から産まれた女兒で腫瘍が見つかった (Herbst et al., 1971, *N. Engl. J. Med.*, 284, 878-881)。ヒトにおける女性ホルモン様化学物質の発生影響の典型的な例として挙げられる) を模したマウス実験系であり、化学物質の遅発性発生影響を解析するための優れたモデルある (Miyagawa et al., 2004, *Oncogene*, 23, 340-349, Miyagawa et al., 2011, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 51-57)。発生・発達段階にある個体の女性生殖器官に対する化学物質の発生影響は、BPA (ビスフェノール A) など、弱い女性ホルモン様化学物質でも表現型がでることから (Suzuki et al., 2002, *Reprod Toxicol*, 16, 107-116)、汎用性が高い実験系でもある。

現在のところ、女性生殖器官において、正常時あるいは腫瘍形成時 (あるいは“女性ホルモン非依存の細胞増殖”時) の女性ホルモンの細胞増殖や分化に対する作用をメディエイトする因子の実体やそのメカニズムは未だ明らかではない。我々はこの点において、遺伝子改変マウスを用いた解析からアプローチすることにより、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した。

B. 研究方法

膈上皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する K5-Cre マウスは大阪大学竹田潤二教授から供与いただいた。ER α ^{lox} マウスは Institute for Genetics and Cellular and Molecular Biology (フランス) シャンボン教授との共同研究として供与いただいた。Pten^{lox} マウス及び、 β -catenin^{EX3} マウスはジャクソン研究所 (アメリカ) より入手した。C57B6 マウス、ヌードマウス (CrIj: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。膈上皮細胞特異的 β -catenin 活性化マウス (K5Cre/+; β -catenin^{EX3/+}; β -catenin^{EX3/+} マウスは 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である) は出生直後で致死であるため、膈組織の表現型を解析するために、胎生 18.5 日の胚から膈組織を取り出

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。

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、DES (シグマ社) を新生仔期 (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。解析に用いたマウスは、基本的には卵巣を 6-8 週齢で除去し、視床下部-下垂体の影響をなくした状態で解析を行った。成獣への女性ホルモン投与は 0.1 μ g の 17 β -エストラジオール (シグマ社) を 3 日間投与した。これは卵巣除去をした野生型マウスの膈上皮の角質化に十分な投与である。

(倫理面への配慮)

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

我々は、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 -カテニン経路及び PI3K/Akt 経路に注目し、女性生殖器におけるそれらのシグナル因子の内在的な機能について研究をおこなった。

(1) Wnt/ β -カテニン経路について

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 (CKO) マウス解析が不可欠である。K5-Cre マウスは、膈上皮特異的に 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膈組織を解析した (図 2)。

コントロール (対照) 群の膈上皮組織は 2-3 層であり、薄い退縮した形態を示していた (図 3)。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 3)。また膈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 (図 4)。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 5)。

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 活性化マウスの膺上皮では、p63 陽性細胞の領域が上方に広がっていた (図 6)。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 (図 6)。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、少なくとも膺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膺の上皮細胞における β -カテニ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 -カテニタンパク質の核への局在が見られた (図 7)。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)、膺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。

(2) Pten/PI3K/Akt 経路について

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という観点から、多くの組織の発生・分化、細胞増殖、癌化に寄与している Pten/PI3K/Akt 経路に注目し (図 8)、女性生殖器における、Pten/PI3K/Akt 経路の内在的な機能を、膺上皮細胞特異的 Pten CKO マウス (K5Cre/+;PTEN^{flox/flox} マウス) を用いて解析した。Pten は PI3K/Akt 経路を抑制的に制御するタンパクであるため、このマウスは K5 プロモーター下で PI3K/Akt 経路が構成的に活性化している。

PI3K/Akt 経路は女性ホルモンシグナルの下流にあるとされており、したがって我々は卵巣を除去した Pten ミュータントマウスにおいて、女性ホルモン非依存に細胞増殖及び分化が起きることを予想した。しかし卵巣除去した Pten ミュータントマウスの膺上皮は、特に suprabasal cell

(基底細胞より上層の細胞) において過形成が起きており部分的に上皮層内に内胞を形成した、異常な組織像を示した (図 9)。この suprabasal cell は PAS あるいは Alcian blue 陽性であり、粘液を過剰に分泌していることが示された (図 9)。角質化細胞は見られず、各種分化マーカー解析からも、膺上皮細胞の適切な重層角質化への分化が行われていないことが明らかとなった。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、細胞増殖は Pten ミュータントマウスで亢進していた。 (図 10)。とくに、通常膺上皮の細胞増殖は基底膜に接した細胞しかしなが、ミュータントマウスでは基底膜を離れた細胞も BrdU を取り込んでいた (図 10)。細胞死に関してはミュータントと対照群で差は見られなかった。女性ホルモンを投与すると、膺上皮は正常に分化し、角質化した (図 11)。一方、E2 投与後 1 月放置すると、膺組織はまたもとの suprabasal cell の過形成及び粘液細胞分化が起きる。したがってこの Pten ミュータントマウスの表現型は、女性ホルモン依存的であるといえる。

Pten ミュータントマウスの異常な上皮の形態形成の原因をより詳細に調べた。mTOR は Akt の下流のシグナルであり、様々な細胞機能を制御する因子であり、ウェスタンブロットにより、ミュータントマウスでは Akt に加え mTOR のリン酸化も亢進していることがわかった (図 12)。mTOR のインヒビターであるラパマイシンを Pten ミュータントマウスに投与したところ、過形成を示す膺上皮細胞の一部が退縮したことから (図 12)、Pten ミュータントマウスの上皮の過形成の原因の一部は mTOR の活性化であることが示された。また、分泌細胞への分化については、MAPK のリン酸化が亢進していることが原因であることが示唆された (図 13;異常な粘液分泌と MAPK カスケードの活性化については、例えば Kurita et al., Development 2004, 131, 4955-4964)。

改めて、マウスの膺における Pten の発現部位を、調べた。女性ホルモンを投与したマウスの膺では、基底細胞からその上層まで発現が見られた (図 14)。Pten をノックアウトすると、これと同じ領域で Akt が活性化された (図 14)。一方卵巣を除去したマウスの膺では、Pten は基底細胞には発現して折らず、表層の suprabasal cell においてのみ発現が見られた (図 14)。Pten をノックアウトしても、基底細胞では Akt は活性化せず、suprabasal cell で活性化された (図 14)。このようにマウス膺では女性ホルモンの有無によって、Pten の発現細胞が異なり、そのホメオスタシス

に対する役割が異なることが明らかとなった (図 15)。これは、皮膚など一般的な重層扁平角質化上皮と比べると極めてユニークな現象である。

さらに Pten CKO マウスに、新生仔期 DES 投与を行い、その成長後に組織学的解析をすることで、ホメオスタシスを司る重要な因子である Pten を欠損した、発生途上の個体に対する遅発性影響を解析した。その結果、新生仔 DES 投与 Pten CKO マウス (卵巣を除去した成獣) において、1/9 匹が重層角質化上皮 (図 16A; 同様に新生仔期 DES 処理をしたコントロールマウスと同じ表現型)、3/9 匹が suprabasal cell の粘液化細胞化とその過形成が主な表現型のもの (図 16B; 無処理の Pten CKO マウスと似た表現型)、3/9 が上皮細胞の過形成を伴う重層化が優位であり粘液化がわずかなもの (図 16C, C'; 通常一部角質化している部位もある。さまざまなタイプの上皮細胞がみられるが、多くは分化マーカーである CK1 が低発現であり (data not shown)、過形成を起こしているのは少なくとも未分化な状態の細胞群であるといえる)、残りの 2 匹は、basal 及び suprabasal cell の過形成が同等に混合している個体が見られた。なお、これら個体は、過剰な粘液分泌に伴う炎症が重層化上皮にも作用するためと推察されるが、より重篤な症状を示す部位がある (図 16D)。このように、図 16B の状態のマウスを除いた少なくとも 9 匹中 6 匹のマウスは、DES の発生影響を受けているといえる。したがって、Pten 欠損下において、化学物質の発生影響は、より重篤な症状を個体に誘起することが分かった。

3) 膣上皮細胞特異的 ER α CKO マウスの解析

これまで、子宮、膣、乳腺などの女性生殖器官の女性ホルモン依存的な細胞増殖は、女性ホルモンがまず間質の ER α に作用し、それによって発現する分泌性増殖因子が上皮に作用して、その細胞増殖を誘導するというモデルが、Cunha らの上皮および間質組織の貼替え実験によって示されてきた。この実験は、生体の器官を摘出後にトリプシンなどで上皮と間質を分離し、さまざまな組み合わせで上皮と間質をくっつけ (例えばワイルドタイプマウス由来の上皮と ER α ノックアウトマウス由来の間質など)、これをヌードマウスの腎層皮下に移植して一定期間後に組織観察するという *ex vivo* の実験系である。しかしながら、この系は必ずしも生体で起こりうる反応、あるいは現象と一致するとは限らない。例えば、遺伝子改変技術を駆使して作製された子宮上皮細胞特異的 ER α CKO マウスを使った実験は組織貼替え *ex vivo* 実験の結果と

概ね一致したが、一方で乳腺上皮細胞特異的 ER α CKO マウスでは、上皮細胞に発現する ER α が、上皮の細胞増殖に不可欠であり、これは組織貼替え実験とは矛盾する。膣ではこのような生体を使った、上皮特異的 ER α CKO マウスの報告はない。今後の化学物質の生殖器官に対する晩発性影響を調べて行くうえでも、その化学物質のターゲットになり得る女性ホルモン受容体の組織レベルでの役割を解析することは重要であることから、膣上皮細胞特異的 ER α CKO マウスの解析を行った。

まず始めに、膣上皮特異的 ER α CKO マウスにおける ER α の発現を確かめた。コントロールマウスでは ER α は上皮、間質ともに発現していたが、膣上皮特異的 ER α CKO マウスでは、間質の ER α は発現しているものの、膣上皮での発現は消失していた (図 17)。

次に HE 染色による組織観察を行った。本実験でも、卵巣を 6 週齢で除去し (OVX)、視床下部-下垂体の影響をなくした状態で解析を行っている。OVX した状態では、コントロールマウスと膣上皮特異的 ER α CKO マウスは同様に 2-3 層の退縮した組織像を示した。一方、OVX マウスに女性ホルモンを投与すると、コントロールでは重層化及び角質化が見られたのに対して、膣上皮特異的 ER α CKO マウスでは、細胞増殖及び重層化は誘導されるものの、角質化には至らなかった (図 18)。事実、分化マーカーである CK1、最終分化マーカーであるフィラグリンは全く発現していなかった (図 19)。さらに細胞増殖を BrdU の取り込みを指標にして調べたところ、上皮細胞の BrdU 取り込み率 (すなわち細胞増殖率) は、コントロールマウスと膣上皮特異的 ER α CKO マウス間で差は見られなかった。しかしながら、通常膣上皮の細胞増殖は基底膜に接した細胞しかしなが、膣上皮特異的 ER α CKO マウスでは基底膜を離れた細胞も異所的に BrdU を取り込んでいた (図 20)。一方細胞死に関しては膣上皮特異的 ER α CKO マウスの間質で亢進していた (data not shown)。これらの結果から、膣組織において ER α は、細胞増殖には寄与しないが適切な分化 (角質化) に不可欠であり、さらにその欠損により異所的な細胞増殖が起きることから、能動的に膣組織のホメオスタシスに関与していることが明らかとなった。

D. 考察

(1) Wnt/ β -カテニン経路について

β -catenin 活性化マウスの膣上皮細胞において、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 投与マウスの膺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必要がある。

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ー領域のメチル化が、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膺組織の発生と分化、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。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が明らかにできると考えられる。

(2) Pten/PI3K/Akt 経路について

PI3K/Akt 経路は多くの組織で腫瘍形成に寄与している経路である。特に遺伝子改変マウスを用いた解析から、皮膚を含む多くの重層扁平上皮から構成される器官での発癌が報告されている。女性生殖器官においては、女性ホルモンシグナルの下流に位置し、子宮や膺上皮の細胞増殖及び分化に関与することが我々を含む研究室から報告されている。また、新生仔女性ホルモン曝露した膺の上皮細胞では、Akt が女性ホルモン非依存にリン酸化すなわち活性化されていることを示してきた。したがって、我々は Pten ミュータントマウスにおいて、女性ホルモン非依存に細胞増殖及び分化が起きることを予想していたが、卵巣除去した Pten ミュータントマウスの膺上皮は、特に suprabasal cell (基底細胞より上層の細胞)において過形成が起きており部分的に上皮層内に内胞を形成した、異常な組織像を示していた。さらに suprabasal cell において細胞増殖が起きており、これらのことから Pten は、卵巣除去、すなわち女性ホルモン非存在下において suprabasal cell の細胞増殖を抑え、角質化への正常な分化を誘導しているものと考えられる。実際卵巣除去した野生型マウスで Pten は基底細胞

ではなく、suprabasal cell に発現していた。また、卵巣を除去したミュータントマウスで Akt が活性化しているのも基底細胞ではなく、suprabasal cell である。興味深いことに、野生型マウスに女性ホルモンを投与すると Pten は、皮膚などの他の重層多層化上皮と同じように (data not shown)、基底細胞からその上層にかけて発現するようになった。さらにミュータントのリン酸化 Akt も同様の発現パターンを示した。したがって Pten は女性ホルモン非存在下と存在下では異なる発現動態を示し、女性ホルモン非存在下では suprabasal cell の細胞増殖を抑え、角質化への正常な分化を誘導する一方、女性ホルモン存在下では他の重層多層化と同様に主に基底細胞で機能し、過剰な細胞増殖を抑えていることが示唆される (図 16)。また、組織不可逆化の観点から言えば、PI3K/Akt シグナルの活性化だけでは、膺上皮細胞の完全な分化には不十分あり、女性ホルモンによる様々な因子の協調的な制御が、女性生殖器官の適切な細胞増殖・分化制御に必要であることが明らかとなった。

通常、マウスの膺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、成熟後膺上皮はホルモン非依存の増殖及び角質化が誘導される (発生個体に対する DES による晩発性影響)。このようなマウスの膺では、PI3K/Akt 経路が活性化されていることを我々は報告している。そこで今回我々は、PI3K/Akt 経路が構成的に活性化されている Pten CKO マウスの新生仔に、DES を投与することにより、「発途上の個体に対する遅発性影響」に対する「遺伝子のバックグラウンドの影響」について解析を試みた。その結果、新生児期 DES 投与した Pten CKO マウスの膺は、同様の投与を行ったワイルドタイプ (コントロール) マウスよりも重篤な症状を示した。特に basal cell において重篤な表現型がでていたことから、新生児期 DES 投与されたマウスの膺上皮では、主に basal cell において、Pten が過剰な PI3K/Akt シグナルを抑え、過形成 (腫瘍化) を抑えていることがわかった。したがって、膺における DES の晩発性影響としての PI3K/Akt シグナル活性化の主な標的は、basal cell であることが示唆される。一方で suprabasal cell も過形成している個体もいたことから、Pten CKO マウスへの新生児期 DES 投与によって、その作用は相加的というよりも相乗的に作用し、より重篤な症状が顕れることが明らかとなった。

3) 膺上皮細胞特異的 ER α KO マウスの解析

女性生殖器官に対する化学物質の晩発性影響

を理解するためには、内在的な女性ホルモンによる、細胞増殖及び分化に対する作用機序を明らかにすることが大切である。膣上皮特異的 ER α KO マウスの報告はまだないことから、今回我々はその解析を行った。

その結果、膣上皮特異的 ER α KO マウスは、女性ホルモンを投与しても、細胞増殖及び重層化は誘導されるものの、角質化には至らなかった。これは単に女性ホルモンに対する感受性が低下したためではない。なぜなら通常基底細胞よりも上層はすべて分化マーカーであるサイトケラチン 1 (CK1) を発現するが、それが全く発現していなかったためである。また、女性ホルモンの 2 ヶ月にわたる長期曝露によっても角質化は起きなかった(data not shown; しかしながら、上皮組織が間質に侵入した組織像が得られ、現在解析を進めている)。さらに、通常膣上皮の細胞増殖は基底膜に接した細胞しかしないが、膣上皮特異的 ER α KO マウスでは基底膜を離れた細胞も BrdU を取り込んでいた。したがって、膣上皮特異的 ER α KO マウスの膣では基底細胞が分化できずに、蓄積していることが示唆される。すなわち suprabasal cell は未分化性を保った状態であり、それゆえに異所的な細胞増殖が起きていることが考えられる。このように、上皮細胞の ER は、その細胞増殖には影響はないが、角質化への分化に必須であることが *in vivo* のレベルで証明することができた。

我々は以前、新生児期 DES 投与したマウスの膣上皮では、卵巣を除去し体内から女性ホルモンを除いても、女性ホルモン受容体が MAPK や Akt によりリン酸化されることにより、リガンド非依存的に活性化していることを報告している。すなわち、この膣組織では、女性ホルモン受容体が上皮組織自律的に細胞増殖している（通常のように間質を介さず）ことが考えられる。そこで今後、膣上皮特異的 ER α KO マウスに新生児期 DES 投与をおこない、上皮組織の女性ホルモン受容体の寄与を解析する。これにより、化学物質の生殖器官に対する晩発性影響を、そのターゲットになり得る女性ホルモン受容体の組織レベルでの役割という面から、明らかにすることができる。

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。通常マウスの膣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、成熟後膣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 -カテニン経路や PI3K/Akt シグナルを含む因子などが女性ホルモンシグナル下で協動的に関与することを明らかにした。今後これらのシグナルに関わる因子が、新生児期 DES 投与により、どのように遺伝子発現制御が変わっていくか、エピジェネティクスの観点から調べる分子基盤ができあがった。さらに我々がモデルとしている女性生殖器官は、組織レベルで遅発性影響を解析できる実験系である。新生仔期 DES 投与の標的分子であり、かつ遅発性影響による組織不可逆に大きく関与している ER α の女性生殖器官における作用機構についてもそのメカニズムの一端を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 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).
- Oda, S., Kato, Y., Watanabe, H., Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2011). Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30, 232-238.
- 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., Shiraiishi, 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).
- St John, J.A., Braun, E.L., Isberg, S.R., Miles, L.G., Chong, A.Y., Gongora, J., Dalzell, P., Moran, C., Bed'hom, B., Abzhanov, A., Burgess, S.C., Cooksey, A.M., Castoe, T.A., Crawford, N.G., Densmore, L.D., Drew, J.C., Edwards, S.V., Faircloth, B.C., Fujita, M.K., Greenwold, M.J., Hoffmann, F.G., Howard, J.M., Iguchi, T., Janes, D.E., Khan, S.Y., Kohno, S., de Koning, A.J., Lance, S.L., McCarthy, F.M., McCormack, J.E., Merchant, M.E., Peterson, D.G., Pollock, D.D., Pourmand, N., Raney, B.J., Roessler, K.A., Sanford, J.R., Sawyer, R.H., Schmidt, C.J., Triplett, E.W., Tuberville, T.D., Venegas-Anaya, M., Howard, J.T., Jarvis, E.D., Guillette, L.J.Jr., Glenn, T.C., Green, R.E. and Ray, D.A. (2012). Sequencing three crocodylian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes. *Genome Biol.*, 13, 415.
- 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. (2012). Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 109, 250-258.
- Hirakawa, I., Miyagawa, S., Katsu, Y., Kagami, Y., Tatarazako, N., Kobayashi, T., Kusano, T., Mizutani, T., Ogino, Y., Takeuchi, T., Ohta, Y. and Iguchi, T. (2012). Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol. *Chemosphere*, 87, 668-674.
- Nakamura, T., Miyagawa, S., Katsu, Y., Watanabe, H., Mizutani, T., Sato, T., Morohashi, K.-I., Takeuchi, T., Iguchi, T. and Ohta, Y. (2012). WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. *Toxicology*, 296, 13-19.
- Kakuta, H., Tanaka, M., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T. (2012). Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Reprod. Toxicol.*, 33, 35-44.
- Nakajima, T., Iguchi, T. and Sato, T. (2012). Hedgehog signaling plays roles in epithelial cell proliferation in the neonatal mouse uterus and vagina. *Cell Tiss. Res.*, 348, 239-247.
- Maekawa, T., Sakuma, A., Taniuchi, S., Ogo, Y., Iguchi, T., Takeuchi, S. and Takahashi, S. (2012). Transforming growth factor- α mRNA expression and its possible roles in mouse endometrial stromal cells. *Zool. Sci.*, 29, 377-383.
- Goto, Y., Kajiwar, M., Yanagisawa, Y., Hirose, H., Yoshimi, T., Uemura, M., Nakano, H., Takahashi, S., Shida, Y., Iguchi, T., Takahashi, Y. and Miura, T. (2012). 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., Soley, J.T., Booyse, D.G., Groenewald, H.B., Bekker, L.C., Iguchi, T. and Guillette, L.J.Jr. (2012). Technique for the collection of clean urine from the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *J. South African Vet. Assoc.*, 83, 83, E1-6.
- Kakuta, H., Matsushita, A., Arikawa, K., Iguchi, T.

- and Sato, T. (2013). Cholesterol homeostasis in the ovaries of neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Exp. Clin. Endocr. Diabetes*, 121, 94-101.
- Nakamura, T., Miyagawa, S., Katsu, Y., Mizutani, T., Sato, T., Takeuchi, T., Iguchi, T. and Ohta, Y. (2012). P21 and Notch signalings in the persistently altered vagina induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 74, 1589-1595.
- Takase, M., Shinto, H., Takao, Y. and Iguchi, T. (2012). Accumulation and pharmacokinetics of estrogenic chemicals in the pre- and post-hatch embryos of the frog *Rana rugosa*. *In Vivo*, 26, 913-920.
- Nakamura, T., Miyagawa, S., Katsu, Y., Sato, T., Iguchi, T. and Ohta, Y. (2012). Sequential changes in expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure. *In Vivo*, 26, 899-906.
- Brockmeier, E.K., Ogino, Y., Iguchi, T., Barber, D.S. and Denslow, N.D. (2013). Effects of 17 β -trenbolone on Eastern and Western mosquitofish (*Gambusia holbrooki* and *G. affinis*) and anal fin growth and gene expression patterns. *Aquat. Toxicol.*, 128-129C, 163-170.
- Katsu, Y., Lange, A., Miyagawa, S., Urushitani, H., Tatarazako, N., Kawashima, Y., Tyler, C.R. and Iguchi, T. (2013). Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio* estrogen receptors and their differential activations by estrogens. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 41-49.
- Kakuta, H., Matsushita, A., Arikawa, K., Iguchi, T. and Sato, T. (2013). Cholesterol homeostasis in the ovaries of neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Exp. Clin. Endocr. Diabetes*, 121, 94-101.
- Katoh, T., Hayashi, S., Iguchi, T. and Sato, T. (2013). Epithelial-stromal interactions in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo*, 27, 333-337.
- Toyota, K., Kato, Y., Sato, M., Sugiura, N., Miyagawa, S., Miyakawa, H., Watanabe, H., Oda, S., Ogino, Y., Hiruta, C., Mizutani, T., Tatarazako, N., Paland, S., Jackson, C., Colbourne, J.K. and Iguchi, T. (2013). Molecular cloning of doublesex genes of four cladocera (water flea) species. *BMC Genomics*, 14, 239.
- Miyakawa, H., Toyota, K., Hirakawa, I., Ogino, Y., Miyagawa, S., Oda, S., Tatarazako, N., Miura, T., Colbourne, J.K. and Iguchi, T. (2013). A mutation in the Methoprene tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. *Nature Commun.*, 4, 1856.
- Jeong, S.W., Lee, S.M., Yum, S.S., Iguchi, T. and Seo, Y.R. (2013). Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity. *Mol. Cell. Toxicol.*, 9, 149-158.
- Oka, T., Mitsui-Watanabe, N., Tatarazako, N., Onishi, Y., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Yatsu, R., Kohno, S., Takase, M., Kawashima, Y., Aoki, Y., Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T. (2013). Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 991-1000.
- Hirakawa, I., Miyagawa, S., Mitsui, N., Miyahara, M., Onishi, Y., Kagami, Y., Kusano, T., Takeuchi, T., Ohta, Y. and Iguchi, T. (2013). Developmental disorders and altered gene expression in the tropical clawed frog (*Silurana tropicalis*) exposed to 17 α -ethinylestradiol. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 1001-1010.
- Urushitani, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Shiraishi, H., Iguchi, T. and Horiguchi, T. (2013). Cloning and characterization of the retinoic acid receptor-like protein in the rock shell, *Thais clavigera*. *Aquat. Toxicol.*, 142-143C: 403-413.
- Hiruta, C., Toyota, K., Miyakawa, H., Ogino, Y., Miyagawa, S., Tatarazako, N., Shaw, J.R. and Iguchi, T. (2013). Development of a microinjection system for RNA interference in the water flea *Daphnia pulex*. *BMC Biotechnol.*, 13, 96.
- Toyota, K., Kato, Y., Miyakawa, H., Yatsu, R., Mizutani, T., Ogino, Y., Miyagawa, S., Watanabe, H., Nishide, H., Uchiyama, I., Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2013). Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*. *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- Nakamura, A., Takanobu, H., Tamura, I., Yamamuro, M., Iguchi, T. and Tatarazako, N. (2013). Verification of responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to antiandrogens, vinclozolin and flutamide, in short-term assays. *J. Appl. Toxicol.* (in press).
- Ogino, Y., Hirakawa, I., Inohaya, K., Sumiya, E., Miyagawa, S., Tatarazako, N., Denslow, N., Yamada, G. and Iguchi, T. (2013). Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. *Endocrinology*, (in press).
- Ichikawa, M., Murai, E., Hashiguchi, Y., Iguchi, T. and Sato, T. (2013). Effects of diethylstilbestrol (DES) on luteinizing hormone-producing cells in the mouse anterior pituitary. *Exp. Biol. Med.*, (in press).
- Nakamura, A., Takanobu, H., Tamura, I., Yamamuro, M., Iguchi, T. and Tatarazako, N. (2013). Fish multi-generation test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J. Appl. Toxicol.*, (in

- press).
- Abe, R., Watanabe, H., Yamamuro, M., Iguchi, T. and Tatarazako, N. (2013). Establishment of a short-term in vivo screening method for detecting chemicals having juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*. *J. Appl. Toxicol.*, (in press).
- Batia, H., Kumar, A., Ogino, Y., Du, J., Gregg, A., Chapman, J., McLaughlin, M., Iguchi, T. (2014). Adult male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) as a test model to assess anti-androgenic effects of flutamide in the Australian riverine environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
- Miyagawa, S., Sato, M., Sudo, T. Yamada, G. and Iguchi, T. (2014). Unique roles of estrogen-dependent Pten control in epithelial cell homeostasis of mouse vagina. *Oncogene*, (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).
- Tatarazako, N. and Iguchi, T. (2012). Evaluation of toxicities of herbicides using short-term chronic tests of alga, daphnid and fish. In: *Herbicides - Environmental Impact Studies and Management Approaches*, Alvarez-Fernandez, R. (ed.), ISBN: 978-953-307-892-2, InTech.
- Grau, E.G., Nishioka, R.S., Bern, A., Hirano, T., Borski, R., Clarke, C., Foskett, K., Guillette, L.J., Iguchi, T., Jones, L.A., Loretz, C., McCormick, S., MacLachlan, A., Mason, C.A., Mills, K.T., Nagahama, Y., Nicoll, C.S., Richman, N.H., Sheridan, M., Specker, J.L., Sullivan, J.J. and Young, G. (2012). In memory of Professor Howard A. Bern. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 176, 121-123.
- Miyagawa, S., Yatsu, R., Sudo, T., Igarashi, K., Kanno, J. and Iguchi, T. (2012). Irreversible effect of diethylstilbestrol on reproductive organs and current approach for epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals. In: *Toxicology and Epigenetics*, Sahu, S.C. (ed.), John Wiley & Sons, Ltd., pp. 357-364.
- Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T. (2012). Life in a contaminated world. *Science*, 337, 1614-1615.
- Bergman, Å, Heindel, J.J., Kidd, K.A., Jobling, S., Zoeller, R.T., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., Brian, J.V., Kortenkamp, A., Muir, D., Ochieng, R., Skakkebaek, N.E., Iguchi, T., Toppari, J. and Woodruff, T.J. (2013). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012. pp. 260, WHO and UNEP.
- Bergman, Å, Heindel, J.J., Kidd, K.A., Jobling, S., Zoeller, R.T., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., Brian, J.V., Kortenkamp, A., Muir, D., Ochieng, R., Skakkebaek, N.E., Iguchi, T., Toppari, J. and Woodruff, T.J. (2013). The impact of endocrine disruption: A consensus statement on the state of the science. *Environ. Health Perspect.*, 121, A104-106.
- Stolzenberg, H.-C., Frische, T., Dellarco, V.L., Timm, G., Gourmelon, A., Iguchi, T., Ingerslev, F. and Roberts, M. (2013). The regulatory need for tests to detect EDCs and assess their hazards to wildlife 59. In: *Endocrine Disruptors: Hazard Testing and Assessment Methods*, Matthiessen, P. (ed.) Wiley, pp. 59-99.
- Bergman, Å., Andersson, A.M., Becher, G., van den Berg, M., Blumberg, B., Bjerregaard, P., Bornhag, C.-G., Bornman, R., Brandt, I., Brian, J.V., Casey, S.C., Fowler, P.A., Frouin, H., Giudice, L.C., Iguchi, T., Hass, U., Jobling, S., Juu, A., Kidd, K.A., Kortenkamp, A., Lind, M., Martin, O.V., Muir, D., Ochieng, R., Olea, N., Norrgren, L., Ropstad, E., Ross, P.S., Rudén, C., Scheringer, M., Skakkebaek, N.E., Söder, O., Sonnenschein, C., Soto, A., Swan, S., Toppari, J., Tyler, C.R., Vandenberg, L.N., Vinggaard, A.M., Wiberg, K., Zoeller, R.T. (2013). *Science and*

policy on endocrine disrupters must not be mixed: a reply to a “common sense” intervention by toxicology journal editors. *Environ. Health*, 12, 69.

Hiruta, C., Toyota, K., Miyakawa, H., Sumiya, E. and Iguchi, T. (2013). Sexual reproduction is a key element in the life history strategy of water fleas, *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* - Casting a spotlight on male induction and its morphology -. In: El-Doma, M (ed.) *Daphnia: Biology and Mathematics Perspectives*, Nova Science Publishers, (in press).

Miyakawa, H., Iguchi, T., Miura, T. (2013) Developmental process of defensive morph in *Daphnia pulex*. In: El-Doma, M (ed.) *Daphnia: Biology and Mathematics Perspectives*. Nova Science Publishers, (in press).

Kohno, S., Parrott, B.B., Yatsu, R., Miyagawa, S., Moore, B.C., Iguchi, T. and Guillette, L.J. Jr. (2013). Gonadal differentiation in reptiles exhibiting environmental sex determination. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (in press).

その他

井口泰泉：岩波生物学辞典第5版、巖佐庸、倉谷滋、斎藤成也、塚谷雄一（編），2013.

宮川一志、蛭田千鶴江、豊田賢治、角谷絵里、荻野由紀子、宮川信一、鑪迫典久、井口泰泉：ミジンコ類における環境依存型性決定を制御する分子機構. 比較内分泌学, 39 (149), 106-111, 2013.

井口泰泉：巻頭言 内分泌かく乱物質問題の新たな動き. 環境ホルモン学会ニュースレター, 15 (1), 1, 2013.

井口泰泉：研究最前線：内分泌かく乱物質問題に対する WHO・UNEP の報告書. 環境ホルモン学会ニュースレター, 15 (1), 2, 2013.

宮川信一、井口泰泉：第4章 環境ホルモン. 排水・汚水処理技術集成 Vol. 2, エヌ・ティー・エス, 49-57, 2013.

宮川一志、豊田賢治、宮川信一、鑪迫典久、井口泰泉：研究最前線：ミジンコの幼若ホルモン受容体遺伝子の解明. 環境ホルモン学会ニュースレター, 16 (2), 2, 2013.

井口泰泉：共著「環境年表平成25・26年」国立天文台編，丸善，pp. 454, 2013.

2. 学会発表

勝義直，松原和純，松田洋一，鳥羽通久，岡香織，太田康彦，井口泰泉「爬虫類のエストロゲン受容体の単離と種・リガンド特異性の解析」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

岡香織，太田康彦，井口泰泉，勝義直「アメリカ

アリゲーターのコルチコイド受容体の単離と機能解析」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

宮川信一，平川育美，小林亨，勝義直，井口泰泉「メダカ精巣卵誘起時における遺伝子発現解析」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

中島忠章，井口泰泉，佐藤友美「新生仔期マウスの子宮分化に働く因子の探索」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

平川育美，勝義直，荻野由紀子，太田康彦，宮川信一，井口泰泉「環境化学物質に対する魚類エストロゲン受容体の種特異性」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

秋山美穂，高橋英也，荻野由紀子，宮川信一，御興真穂，井口泰泉，坂本竜也，坂本浩隆「メダカ脳におけるアンドロゲン受容体の発現と局在」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

角谷絵里，井口泰泉，荻野由紀子「オオミジンコのエクジクジステロイド生合成関連遺伝子群の単離及び発現解析」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

豊田賢治，宮川一志，小田重人，宮川信一，荻野由紀子，鑪迫典久，加藤泰彦，渡邊肇，井口泰泉「オオミジンコ *Daphnia magna* の性決定期における幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

宮川一志，井口泰泉，三浦徹「ミジンコ *Daphnia pulex* における捕食者カイロモンに応じた胚発生過程の変化」日本動物学会第82回大会，旭川市大雪クリスタルホール，2011年9月21-23日.

Kato, Y., Shiga, Y., Tokishita, S., Kobayashi, K., Yamagata, H., Iguchi, T. and Watanabe, H.: Development of an RNA interference method in the cladoceran *Daphnia magna*. 第34回分子生物学会，パシフィコ横浜，2011年12月13-16日.

Iguchi, T.: Amphibian development, growth and reproduction assay using *Xenopus tropicalis* and *in vitro* estrogen receptor transactivation assay. International Society of Amphibian and Reptilian Endocrinology (ISAREN 2011), University of Michigan, Ann-Arbor (USA), July 11-13, 2011.

Kohno, S., Katsu, Y., Ohta, Y., Iguchi, T. and Guillette, L.J.Jr.: Sex reverse induced by the

- specific agonist of estrogen receptor. International Society of Amphibian and Reptilian Endocrinology (ISAREN 2011), University of Michigan, Ann-Arbor (USA), July 11-13, 2011.
- Guillette, L.J.Jr. and Iguchi, T.: Symposium 7: Sex determination and differentiation. The Inaugural Meeting of the North America Society for Comparative Endocrinology (NASCE 2011), University of Michigan, Ann Arbor (USA), July 13-16, 2011.
- Iguchi, T.: Endocrine disruption in invertebrates: Sex determination of *Daphnia magna*. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors (Denmark), April 26-29, 2011.
- Iguchi, T. and Kawashima, Y.: Endocrine disruptors issues in Japan. 2nd International Conference on Endocrine Disruptors, Holiday Inn Frankfurt Airport (Germany), June 7-8, 2011.
- Iguchi, T.: Estrogens and sex determination: Cross-species investigations with alligators, medaka, and *Daphnia*. Mid-Continent Ecology Division, Duluth, MN (USA), September 13-15, 2011.
- Iguchi, T.: Harmonizing and optimizing fish testing methods: the OECD framework project. National BioResource Project-Medaka-The 1st Strategic Meeting for Medaka Research. Okazaki (Japan), November 23-24, 2011.
- 井口泰泉「内分泌かく乱物質研究の最新の動向」, 関西大学先端技術シンポジウム, 関西大学, 2011年1月14日.
- 井口泰泉「オオミジンコの性分化機構」, 琉球大学熱帯生物圏研究センター共同利用研究会, 動物の性決定機構, 2011年2月23-24日
- 井口泰泉、宮川信一「毒性とエピジェネティクス」第28回日本医学会総会, 東京, 2011年4月8-10日.
- 井口泰泉「化学物質と環境」, 東京医科歯科大学, 自然環境と人間社会, 2011年5月17日.
- 井口泰泉「内分泌かく乱物質の生物影響に関する研究」, 日本動物学会第82回大会、旭川, 2011年9月21-23日.
- Toyota, K., Miyakawa, H., Oda, S., Miyagawa, S., Ogino, Y., Tatarazako, N., Kato, Y., Iguchi, T.: Gene expression analysis of juvenile hormone-responsive genes during critical period for sex determination in *Daphnia magna*. Joint Meeting of The 59th Annual Meeting of ESJ and The 5th EAFES International Congress, Ryukoku University, Otsu, March 17-21, 2012.
- Iguchi, T.: Environmental endocrine disruptor molecular screening and the use of in vitro assays and toxicogenomics in fish, amphibians and daphnia. Special Symposium on Environmental Genomics 2012, in Shanghai, Shanghai, China, March 26-28, 2012.
- Lange, A., Sebire, M., Rostkowski, P., Miyagawa, S., Mizutani, T., Iguchi, T., Hill, E.M., Tyler, C.R.: Bioavailable environmental antiandrogens and their effects on reproduction relevant endpoints in fish. ESCPB (European Society of Comparative Physiology and Biochemistry) meeting. Spain.
- Anderson, E.K., Ogino, Y., Barber, D., Iguchi, T. and Denslow, N.D.: Non-aromatizable androgen exposure to mosquitofish (*Gambusia spp*): Links between molecular, physiological, and reproductive system changes. 6th World Congress and 22nd SETAC Europe, Berlin, Germany, May 20-24, 2012.
- Watanabe, H., Abe, T., Oda, S., Iguchi, T. and Tatarazako, N.: Multi-generational effects of endocrine disrupting chemicals on *Ceriodaphnia dubia*. 6th World Congress and 22nd SETAC Europe, Berlin, Germany, May 20-24, 2012.
- Tyler C.R., Hamilton, P., Lange, A., Filby, A., Soffka, M., Lee, O., Takesano, A., Kudoh, T., Paull, G. and Iguchi, T.: New systems (and adapting old ones) for understanding the wider health impacts of EEDs and their mixtures in fish. Gordon Research Conferences, Environmental Endocrine Disruptors, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA, June 3-8, 2012.
- Hirakawa, I., Miyagawa, S., Mitsui, N., Miyahara, M., Onishi, Y., Kagami, Y., Kusano, T., Takeuchi, T., Ohta, Y. and Iguchi, T.: Histology and gene expression analysis in testis of medaka and frog exposed by ethinylestradiol (EE2). Gordon Research Conferences, Environmental Endocrine Disruptors, Mount Snow Resort, West Dover, VT, USA, June 3-8, 2012.
- Ogino, Y., Yamada, G. and Iguchi, T.: Molecular analysis of androgen dependent sex characteristics development, western mosquitofish and medaka as model systems. The 2012 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology “Integrative, Experimental and environmental physiology of marine organisms” University of Hawaii, USA, July 26-27, 2012.
- Iguchi, T., Miyagawa, S. and Ogino, Y.: Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species used in the laboratory and field monitoring. The 2012 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology “Integrative, Experimental and environmental physiology of marine organisms” University of Hawaii, USA, July 26-27, 2012.
- Iguchi, T.: Temperature-dependent sex determination and sex differentiation: alligators, fish and daphnids. Summer School 2012: “Thermal Biology: from Plants to Humans” in Okazaki Institute for Integrative Bioscience, August 8-9, 2012.

- 角谷絵里、荻野由紀子、宮川信一、宮川一志、豊田賢治、井口泰泉：オオミジンコ脱皮ホルモン合成経路遺伝子の発現変動. 第 83 回日本動物学会、大阪大学、9 月 13-15, 2012.
- 勝義直、井口泰泉：無顎類ヤツメウナギのエストロゲン受容体. 第 83 回日本動物学会、大阪大学、9 月 13-15 日, 2012.
- 遠山早紀、宮川信一、荻野由紀子、勝義直、小林亨、井口泰泉：メダカのエストロゲン受容体サブタイプの機能解析. 第 83 回日本動物学会、大阪大学、9 月 13-15 日, 2012.
- 岡香織、太田康彦、井口泰泉、勝義直：アメリカアリゲーターのアリル炭化水素受容体の単離と機能解析. 第 83 回日本動物学会、大阪大学、9 月 13-15 日, 2012.
- 中島忠章、井口泰泉、佐藤友美：胎仔期から成熟期にかけての子宮と膈の分化におけるレチノイン酸シグナルの役割. 第 83 回日本動物学会、大阪大学、9 月 13-15 日, 2012.
- 中村 武志、宮川 信一、平川 育美、井口 泰泉、太田 康彦：新生時期に DES 暴露をうけた成熟マウスの膈における p21、p53 及び Notch 関連遺伝子の発現. 日本獣医学会. 岩手大学、9 月 14-16 日, 2012.
- Iguchi, T., Miyagawa S. and Ogino, Y.: Establishment of transactivation assays using hormone receptors from various animal species for screening of environmental chemicals. SETAC Asia Pacific, Special lecture, Kumamoto, Sept. 24-27, 2012.
- Volz, D., Villeneuve, D., Aladjov, H., Ankley, G., Belanger, S., Crofton, K., Embry, M., Hinton, D., Hornung, M., Hutchinson, T., Iguchi, T., Johnson, R., Léonard, M., Mount, D., Norberg-King, T., Ortego, L., Padilla, S., Tanguay, R., Tietge, J., Truong, L., Veith, G., Wehmas, L. and Whale, G.: Development of alternatives to the fish early life-stage test: a research strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways during early fish development. 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.
- Villeneuve, D., Volz, D., Aladjov, H., Ankley, G., Belanger, S., Crofton, K., Embry, M., Hinton, D., Hornung, M., Hutchinson, T., Iguchi, T., Johnson, R., Léonard, M., Mount, D., Norberg-King, T., Ortego, L., Padilla, S., Tanguay, R., Tietge, J., Truong, L., Veith, G., Wehmas, L. and Whale, G.: Discovering and annotating fish early life-stage (FELS) adverse outcome pathways: Putting the research strategy into practice. 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.
- Tatarazako, N., Takanobu, H., Watanabe, H., Sawai, A., Ohnishi, Y. and Iguchi, T.: Efficacy of medaka TG229 in the screening of endocrine-disrupting chemicals. 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.
- Embry, M., Villeneuve, D., Volz, D., Aladjov, H., Ankley, G., Belanger, S., Crofton, K., Hinton, D., Hornung, M., Hutchinson, T., Iguchi, T., Johnson, R., Léonard, M., Mount, D., Norberg-King, T., Ortego, L., Padilla, S., Tanguay, R., Tietge, J., Truong, L., Veith, G., Wehmas, L. and Whale, G.: Alternatives to the fish early life-stage test: developing a conceptual model for early fish development. 33rd SETAC North America, Long Beach, CA, November 11-15, 2012.
- 井口泰泉、豊田賢治、角谷絵里、宮川一志、蛭田千鶴江、宮川信一：脊椎動物から無脊椎動物の内分泌かく乱：オオミジンコの性分化遺伝子の解明. 日本比較内分泌学会シンポジウム、福井大学、11 月 29-12 月 1 日, 2012.
- Iguchi, T. Miyagawa, S., Ogino, Y., Ohta, Y., Kohno, S. and Guillet, L.J.Jr.: Establishment of transactivation assay systems using thyroid hormone receptors from various animal species and identification of marker genes of testis-ova in *Oryzias latipes* and *Silurana tropicalis*. International Symposium for Toxicity Assessment (IST16), Capetown, South Africa, February 22-25, 2013.
- Hiruta, C., Toyota, K., Miyakawa, H. and Iguchi, T.: Development of an RNA interference method using microinjection in the water flea *Daphnia pulex*. 日本発生生物学学会第 46 回大会、くにびきメッセ、2013 年 5 月 30 日.
- 荻野由紀子、井口泰泉：アンドロゲン受容体遺伝子の進化と雄性形質発現の分子機構. シンポジウム：性と生殖-魚類における性的二型の進化機構、第 84 回日本動物学会、岡山大学、9 月 26-29 日, 2013.
- 勝義直、岡香織、杉本章、井口泰泉：古代魚のコレチコイド受容体の単離. 第 84 回日本動物学会、岡山大学、9 月 26-29 日, 2013.
- 谷津遼平、宮川信一、勝義直、井口泰泉：有鱗目におけるエストロゲン受容体の機能解析、および進化的傾向. 第 84 回日本動物学会、岡山大学、9 月 26-29 日, 2013.
- 岡香織、佐々木麻衣、大田泰彦、井口泰泉、勝義直：ワニの抗ミューラー管ホルモン遺伝子の糖質コレチコイド受容体による発現制御. 第 84 回日本動物学会、岡山大学、9 月 26-29 日, 2013.
- 遠山早紀、宮川信一、荻野由紀子、水谷健、勝義直、小林亨、井口泰泉：魚類エストロゲン受容体サブタイプの化学物質に対する応答

- 性. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 9 月 26-29 日, 2013.
- 角谷絵里、宮川一志、荻野由紀子、蛭田千鶴江、豊田賢治、宮川信一、井口泰泉: オオミジンコ脱皮ホルモンによる脱皮と生殖周期の制御. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 9 月 26-29 日, 2013.
- 宮川信一、佐藤優、井口泰泉: マウス臙上皮における Pten の役割. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 9 月 26-29 日, 2013.
- 宮川信一、河野郷通、谷津遼平、勝義直、Louis Guillette Jr.、井口泰泉: ワニのアンドロゲン受容体の機能解析. 第 38 回日本比較内分泌学会第 38 回大会 (宮崎) 2013 年 10 月.
- 豊田賢治、宮川一志、蛭田千鶴江、角谷絵里、荻野由紀子、宮川信一、井口泰泉: ミジンコの性決定ホルモンとしての幼若ホルモンの新規機能の解明. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会, 第 38 回日本比較内分泌学会大会合同大会, 宮崎, 2013 年 10 月 [若手研究者最優秀発表賞 (Best presentation prize for under 40)].
- Toyota, K. and Iguchi, T.: Towards understanding the molecular mechanism of environmental sex determination in *Daphnia pulex*. The 10th SOKENDAI Student Seminar for Biological Science, 静岡, 2013 年 10 月.
- 豊田賢治、井口泰泉: ミジンコの環境依存型性決定の分子機構の解明に向けた取り組み. 山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム, 岡崎, 11 月, 2013.
- Tyler, C.R., Lange, A., Hamilton, P., Filby, A.L., Lee, O., Kudoh, T., Takesono, A., Moreman, J., Green, J., Paul, G.C., Miyagawa, S. and Iguchi, T.: Impacts of endocrine disrupting chemicals on fish and fish populations. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- Kumar, A., Bain, P., Bhatia, H., Gregg, A., Ogino, Y. and Iguchi, T.: An Australian perspective on EDCs in the environment. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 藤本成明、中村直樹、佐能正剛、太田茂、浦丸直人、北村繁幸、宮川信一、井口泰泉: 新生仔ラットの甲状腺ホルモン応答遺伝子発現への臭素化難燃剤の影響. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 中村中、田村生弥、高信ひとみ、山室真澄、井口泰泉、鑓迫典久: ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) に対するエストロンの多世代影響. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 阿部良子、渡部春奈、山室真澄、井口泰泉、鑓迫典久: 植物精油の幼若ホルモン様作用について. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 鑓迫典久、阿部良子、渡部春奈、井口泰泉: 内分泌かく乱の視点から蜂群崩壊症候群 (CCD) 問題を解く. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 遠山早紀、宮川信一、荻野由紀子、水谷健、勝義直、小林亨、井口泰泉: 化学物質に対する様々な魚類のエストロゲン受容体各サブタイプの反応性. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 田村生弥、中村中、高信ひとみ、井口泰泉、鑓迫典久: ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた抗アンドロゲン様作用検出法の検証. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 渡部春奈、阿部良子、井口泰泉、鑓迫典久: オオミジンコを用いた多世代試験法の開発. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 櫻井真紀、渡邊直子、後藤康之、大西悠太、伊藤祐生、小野田優、山本潤、長坂洋光、井口泰泉: 両生類パーシャルライフサイクル試験 (Larval Amphibian Growth and Development Assay) の検証. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 荻野由紀子、角谷絵里、宮川信一、井口泰泉: メダカにおけるアンドロゲン下流応答遺伝子の探索. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- Miyagawa, S., Kohno, S., Yatsu, R., Ogino, Y., Ohta, Y., Guillette, L.J.Jr., and Iguchi, T.: Cloning of alligator androgen receptor and its response to hormones and chemicals. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 小林亨、高瀬稔、熊倉雅彦、山本潤、長坂洋光、大西悠太、井口泰泉: トノサマガエルの生殖腺分化におけるエチニルエストラジオールの影響. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 太田泰彦、村田清香、宮川信一、井口泰泉: 妊娠中に投与したフルタミドの雄ラット生殖輸管系への影響. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13

- 日, 2013.
- 漆谷博志、勝義直、太田康彦、白石寛明、井口泰泉、堀口敏宏：軟体動物前鰓類 RXR の転写活性誘導における有機スズ化合物の影響。環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 高瀬稔、田澤一朗、矢尾板芳郎、井口泰泉：甲状腺ホルモンにより誘導されるネットイツメガエル甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現に対する化学物質抑制作用の肝臓と尾における違い。環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 宮川一志、井口泰泉：ミジンコ *Daphnia pulex* における 6 種類の幼若ホルモン様物質の暴露による幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的探索。環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- Sumiya, E., Ogino, Y., Miyakawa, H., Hiruta, C., Toyota, K., Miyagawa, S. and Iguchi, T.: Ecdysteroid in higher titer inhibits molting and reproduction cycle in *Daphnia magna*. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 豊田賢治、阿部良子、渡部春奈、岡智宏、宮川一志、宮川信一、荻野由紀子、鎌迫典久、井口泰泉：オオミジンコ仔虫における幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析。環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京大学山上会館, 12 月 12-13 日, 2013.
- 阿部良子、渡部春奈、岡智宏、山室真澄、井口泰泉、鎌迫典久：節足動物の内分泌かく乱化学物質に対する短期検出法の開発とその有効性の検証。第 47 回水環境学会, 大阪工業大学 大宮キャンパス, 3 月 11-13 日, 2013.
- Petersen, K., Cronin, M.T., Evensen, Ø., Falciani, F., Garcia-Reyero Vinas, N. Høgåsen, T., Iguchi, T., Langford, K., Lillicrap, A., Perkins, E.J., Salbu, B., Sylte, I. and Tollefsen, K.E.: Development of adverse outcome pathways for endocrine disruption in *Daphnia magna*. 17th Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO) Congress, University of Algarve, Faro, Portugal, May 5 to 8, 2013.
- Lange, A., Miyagawa, S., Corcoran, J., Rostkowski, P., Horwood, J., Hill, E.M., Iguchi, T. and Tyler, C.R.: Transactivation nuclear receptor bioassays inform on relative chemical potencies and interspecies differences for endocrine disrupting chemicals in teleosts. 17th Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO) Congress, University of Algarve, Faro, Portugal, May 5 to 8, 2013.
- Iguchi, T.: Aquatic environments and endocrine activity: The regulatory approach in Japan. SETAC Europe 23rd Ann. Meet. Glasgow, UK, May 12-16, 2013.
- Ohta, Y., Miyagawa, S. and Iguchi, T.: External genitalia development in male and female rats given flutamide *in utero*. SETAC Europe 23rd Ann. Meet. Glasgow, UK, May 12-16, 2013.
- Hiruta, C., Toyota, K., Miyakawa, H. and Iguchi, T.: Development of an RNA interference method using microinjection in the water flea *Daphnia pulex*. 46th Ann. Meet. Jap. Soc. Devel. Biol., Matsue, Shimane, May 28-31, 2013.
- Morita, S., Hiraga, C., Iguchi, T., Shiga, Y., Tokishita, S. and Ohta, T.: Single-minded regulates specification of ventral cell fates in *Daphnia magna*. 46th Ann. Meet. Jap. Soc. Devel. Biol., Matsue, Shimane, May 28-31, 2013.
- Iguchi, T., Toyota, K., Miyakawa, H., Hiruta, C., Ogino, Y., Miyagawa, S. and Tatarazako, N.: Environmental sex determination of water flea, *Daphnia magna*. 17th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE 2013), Facultat de Biologia at the Universitat de Barcelona, July 15-19, 2013.
- 井口泰泉：ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析。化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー, 東京国際交流会館, 12 月 13 日, 2013.
- Sumiya, E., Ogino, Y., Miyakawa, H., Hiruta, C., Toyota, K., Miyagawa, S. and Iguchi, T.: Ecdysteroids are involved in regulatory mechanism of a reproductive cycle in *D. magna*. Daphnia Genome Consortium, Birmingham University, January 20-22, 2014.
- Hiruta, C., Tochinnai, S. and Iguchi, T.: Abortive meiosis found in the oogenesis of parthenogenetic *Daphnia pulex*. Daphnia Genomics Consortium 2014 meeting, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22, 2014.
- Hiruta, C.: Reproductive modes in the water flea *Daphnia pulex*. Seminar 'Daphnia and zebrafish as models for understanding development and endocrine disruption', University of Exeter, UK, January 23, 2014.
- Hiruta, C., Toyota, K., Miyakawa, H., Miyagawa, S., Ogino, Y., Tatarazako, N., Shaw, J.R., Tanaka, D., and Iguchi, T.: Approach to establishing tools for gene functional analysis and cryopreservation in *Daphnia pulex*. Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22, 2014.
- Miyagawa, S., Toyota, K., Miyakawa, H., Hiruta, C., Kato, Y., Watanabe, H., Tatarazako, N., Paland, S., Jackson, C., Colbourne, J.K. and Iguchi, T.: Cloning and their expression pattern of doublesex genes of cladocera. EMBO Conference; Daphnia

Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22, 2014.

Toyota, K., Miyakawa, H., Hiruta, C., Sumiya, E., Ogino, Y., Miyagawa, S. and Iguchi, T.: Analysis of juvenile hormone as a sex-determining hormone in *Daphnia pulex*. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22, 2014.

Morita, S., Hiraga, C., Shiga, Y., Tokishita, S., Iguchi, T. and Ohta, T.: Single-minded gene is required

for specification of ventral cell by determining on ventral midline cell fate in *Daphnia magna*. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, Bramall Music Building, University of Birmingham, UK, January 20-22, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

なし