

## 機能保持細胞モデルの構築と網羅的遺伝子発現解析研究への応用

田 淵 圭 章

## Development of Cell Model with Specific Functions and Its Application to the Study of Global Gene Expression

Yoshiaki TABUCHI

Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

(Received January 21, 2004)

The use of *in vitro* cell culture models has been of central importance in the development of our understanding of the cellular and molecular biology of organs and tissues. Transgenic mice and rats harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen genes are useful for establishing cell lines from organs and tissues that have proved difficult to culture *in vitro*. Many conditionally immortalized cell lines with normal specific functions were generated from transgenic animals. DNA microarray technology has broad applications and is directed toward the study of global gene expression. Using established cell lines and DNA microarrays, we identified many genes that were up- and down-regulated in the process of the cell differentiation or cell death. In this review, the characteristics of established cell lines and possible applications of the study of global gene expression are discussed.

**Key words**—immortalized cell line; microarray; gene expression

## 1. はじめに

われわれの生体組織は、200種類を越える特異的に生理機能が分化した細胞集団から成る。分子レベルで各々の分化した細胞の詳細な機能解析を行うためには、機能を保持した不死化細胞株を用いることが非常に有用な方法である。以前、癌遺伝子を直接培養細胞に導入し機能細胞の株化を目指した実験がさかんに行われた。<sup>1-3)</sup> また、より正常に近い細胞株樹立を目的として癌遺伝子導入トランスジェニック (TG) マウスが作製され、その動物から細胞株が樹立された。<sup>4)</sup> しかしながら、これらの方法では機能を有しかつ形質転換していない細胞株が得られる確立が低く、また、細胞の増殖や分化を導入した遺伝子で制御することができない。これらの問題を解決する目的で、温度感受性 simian virus 40 (tsSV40) 大型 T 抗原遺伝子導入 TG マウスが考案された。<sup>5,6)</sup> このミュータント遺伝子の遺伝子産物で

ある温度感受性大型 T 抗原タンパク質は、許容温度 33°C ではタンパク質が正常に発現し、癌抑制遺伝子であるレチノブラストーマ結合タンパク質 (pRb) や p53 と結合し、それらの機能を消失させ、細胞増殖が誘導される。一方、非許容温度 39°C では T 抗原タンパク質が変成し、p53 との結合能がなくなり、続いて、変成 T 抗原タンパク質は速やかに分解され、p53 と pRb の機能が回復し、細胞増殖が停止する (Fig. 1)。<sup>7,8)</sup> 数多くの研究の結果、tsSV40 大型 T 抗原遺伝子導入 TG マウスは特異的機能を保持した不死化細胞株樹立に非常に有用であることが判明し、これまでに肝実質細胞、腎尿管細胞、消化管上皮細胞、<sup>9-12)</sup> 血管平滑筋細胞、骨髄ストローマ細胞、気道上皮細胞、<sup>13)</sup> 骨芽細胞、精巢細胞<sup>14,15)</sup> など多数の臓器から数々の機能を保持した有用な細胞株が樹立された。<sup>16)</sup> 同様に、同遺伝子を導入した TG ラット<sup>17)</sup> から種々の機能保持不死化細胞株が樹立された。<sup>18,19)</sup>

cDNA マイクロアレイは、スライドガラス上に多数の cDNA を高密度にスポットしたもので、網羅的に遺伝子発現を解析できることからポストゲノムシーケンス時代における非常に重要な技術として

富山医科薬科大学生命科学実験センターゲノム機能解析分野 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

e-mail: ytabu@ms.toyama-mpu.ac.jp

\*本総説は、平成 15 年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

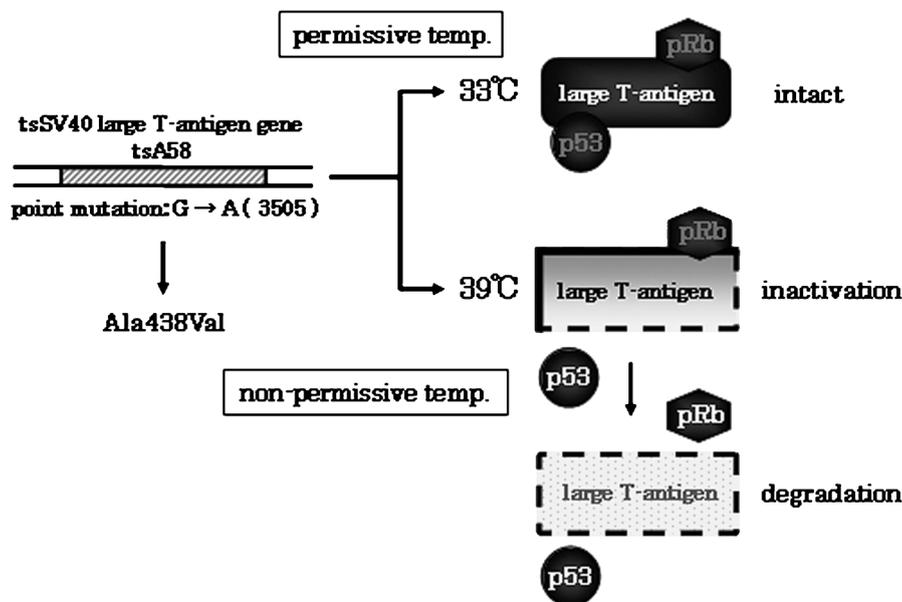


Fig. 1. Properties of Gene Product of Mutant Temperature-Sensitive Simian Virus 40 (tsSV40) Large T-Antigen Gene tsA58

The mutant gene product is formed complex with pRB (retinoblastoma binding protein) and p53 at permissive temperature 33°C but is rapidly inactivated and degraded and releases pRB and p53 from the complex at the nonpermissive temperature 39°C.<sup>7,8)</sup>

注目されている。この技術と構築した細胞モデルを用いて、細胞の機能変化によって発現変動する遺伝子群を詳細に解析した。<sup>20-22)</sup> 本稿では、樹立細胞の性質を紹介し、さらに、cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析研究の応用例を記述する。

## 2. 樹立細胞の性質

tsSV40 大型 T 抗原遺伝子導入 TG マウスと TG ラットから樹立した機能保持不死化細胞株とその性質のまとめを Table 1 に示す。大部分の樹立細胞は、33°C で増殖し、39°C で増殖が停止した。大型 T 抗原は、33°C で核に発現し、39°C では速やかに分解され、また、大型 T 抗原と p53 との結合は、39°C 培養で完全に消失した。すなわち、細胞増殖は大型 T 抗原タンパク質の機能に依存している。しかしながら、理由は明らかではないが、本 TG マウスからは温度非感受性細胞株が得られている。<sup>9,11)</sup> また、ヌードマウス皮下への移植や足場非依存性増殖実験から、すべての樹立細胞は癌原性を示さなかった。

胃の管腔側は上皮細胞と粘液層で覆われ、それらは胃内からの様々な刺激に対して防御的に機能している。成熟 tsSV40 大型 T 抗原遺伝子導入 TG マウスから樹立した胃粘膜上皮粘液細胞株 GSM06 と GSM10 細胞<sup>9)</sup> は、細胞の頂端膜側に正常胃粘膜で観察されるような periodic acid-Schiff (PAS) 陽性

の粘液層を形成した。透過電子顕微鏡を用いた観察から、これらの細胞は細胞表面に微絨毛様突起、細胞間には密着結合及び中隔接着斑を形成する典型的な上皮細胞様の形態を示した。<sup>23)</sup> GSM06 細胞において、PAS 陽性の粘液層形成は、培養時間、また、インスリンの濃度に依存して顕著に増大した。<sup>24)</sup> GSM06 細胞のドリコールリン酸を含む総リン脂質、コレステロール、コレステロール硫酸、総糖量などは培養時間に依存して増加した。<sup>25)</sup> 現在、GSM06 細胞株は国内外の数多くの研究機関で胃粘膜上皮の機能解析やヘリコバクター・ピロリの研究などに使用されている。

胃粘膜機能細胞は主に粘液質を分泌する上皮粘液細胞、胃酸を分泌する壁細胞とペプシノーゲンを分泌する主細胞から構成され、粘膜狭部に存在する胃幹細胞から移動を伴って各々の細胞へと分化する。<sup>26)</sup> 成熟 TG マウスから、上皮粘液細胞のマーカー遺伝子 (ムチンとカテプシン E) を発現する細胞株、上皮粘液細胞と主細胞のマーカー遺伝子 (ペプシノーゲン F) を発現する細胞株、及び、上皮粘液細胞、主細胞と壁細胞のマーカー遺伝子 (H, K-ATPase  $\alpha$  鎖) を発現する上皮様の細胞株が得られた。<sup>11)</sup> しかしながら、すべてのマーカーの発現は mRNA レベルのみで、タンパク質レベルでは検出

Table 1. Characteristics of Established Cell Lines from Transgenic Mice and Rats Harboring the tsSV40 Large T-Antigen Gene

Name	Origin	Morphology	Expression of cell-specific markers
Gastric cell lines			
pit cells GSM06 and GSM10 <sup>9,10)</sup>	adult mice	epithelial-like	PAS- and class I Con A-positive glycoproteins, dolichol-phosphate, etc., tight junctions and desmosomes, microvilli-like structures, PGE <sub>2</sub> , TER <sup>***23,25)</sup>
epithelial cells MGE509 etc. <sup>11)</sup>	adult mice	epithelial-like	mRNA for mucin and cathepsin E*; CBJ proteins <sup>**</sup>
epithelial cells MGE503 etc. <sup>11)</sup>	adult mice	epithelial-like	mRNA for mucin, cathepsin E and pepsinogen F*; CBJ proteins <sup>**</sup>
epithelial cells MGE507 and MGE727 <sup>11)</sup>	adult mice	epithelial-like	mRNA for mucin, cathepsin E, pepsinogen F and HK $\alpha$ *; CBJ proteins <sup>**</sup>
epithelial cells RGE1-01 etc. <sup>18)</sup>	adult rats	epithelial-like	mRNA for cathepsin E*; CBJ proteins <sup>**</sup> , TER <sup>***</sup>
epithelial cells RGE2-01 <sup>18)</sup>	fetal rats	epithelial-like	mRNA for cathepsin E*; CBJ proteins <sup>**</sup> , TER <sup>***</sup>
Colonic cell line			
epithelial cells MCE301 <sup>12)</sup>	fetal mice	epithelial-like	mRNA for mucin Muc2; tight junctions and desmosomes, microvilli-like structures, CBJ proteins <sup>**</sup> , alkaline phosphatase
Tracheal cell lines			
epithelial cells TM01 and TM02-3 <sup>13)</sup>	adult mice	epithelial-like	high-molecular-weight glycoconjugates, ICAM-1, desmosomes, microvilli-like structures
Testicular cell lines			
Sertoli cells TTE3 <sup>14)</sup>	adult mice	fibroblast-like	mRNA for steel factor, inhibin $\alpha$ , transferrin, FSH receptor and SGP-2; vimentin, ZO-1
Leydig cells TTE1 <sup>15)</sup>	adult mice	dendric shaped	mRNA for 17 $\beta$ -HSD type 1, 17 $\beta$ -HSD type 3 and inhibin $\alpha$ ; 3 $\beta$ -HSD, cytokeratin, vimentin
Sertoli cells RTS3-3 <sup>19)</sup>	adult rats	cuboidal shaped	mRNAs for steel factor, transferrin and SGP-2

\* : Mucin and cathepsin E, pit (surface mucous) cell markers; pepsinogen F, a zymogenic cell marker; H,K-ATPase  $\alpha$  subunit (HK $\alpha$ ), a parietal cell marker.  
 \*\* : CBJ proteins, cytoskeletal (cytokeratin and actin), basement membrane (laminin and collagen type IV) and junctional complex proteins (ZO-1 and desmoplakin I+II).  
 \*\*\* : TER, transepithelial resistance.

できなかったことから、樹立細胞はいまだに未分化状態であると考えられる。形態学的に胃粘膜幹細胞から前駆細胞を経て機能細胞へと分化することが明らかになっているが、この分子メカニズムはほとんど解明されていない。これらの胃粘膜細胞株が胃粘膜細胞の分化機構を研究する有用な細胞モデルになることを期待している。<sup>11)</sup> さらに、われわれは同遺伝子導入成熟及び胎児 TG ラットから上皮様形態を示す胃粘膜上皮細胞株の樹立に成功している。<sup>18)</sup>

胎児 TG マウスから結腸上皮 MCE301 細胞を樹立した。<sup>12)</sup> この細胞は、細胞表面に微絨毛様突起、細胞間には密着結合と隔壁を形成し、細胞内には中間径フィラメントや微小繊維を有し、上皮細胞特有の形態を示した。MCE301 細胞は、ムチン Muc2 の mRNA を発現したので、粘液分泌細胞（杯細胞）由来であることが示唆された。アルカリフォスファターゼ（AP）は刷子縁膜に存在する酵素の 1 つで、結腸上皮細胞の分化レベルを示すマーカー酵素である。酪酸は、MCE301 細胞の AP 活性を顕著に増大させ、分化誘導効果があることが示

された。<sup>12)</sup>

これらの細胞に加えて tsSV40 大型 T 抗原遺伝子導入 TG マウスや TG ラットから気道上皮粘液細胞、精巣セルトリ細胞及びライディッチ細胞株の樹立に成功した (Table 1)。<sup>13-15,19)</sup>

### 3. cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

2003 年ヒトゲノムプロジェクトが完了し、ヒトゲノム中に存在する遺伝子は三万数千個であることが示された。今後のポストゲノムシーケンス時代ではこれまでのように個々の遺伝子の機能を解析するだけでなく、すべての遺伝子の機能とそれらのネットワークを時間的、空間的に解析していかなければならない。cDNA マイクロアレイは、数百から数万個の遺伝子発現を一度に解析できることからポストゲノムシーケンス時代の網羅的遺伝子発現解析の非常に有用な技術として注目されている。<sup>27,28)</sup> 以前は、この技術の精度が懐疑的であり、また、実験に膨大な費用が必要であったので限られた施設での特殊技術であった。近年、実験技術が進歩し、精度が

向上したことや市販のマイクロアレイが入手できるようになり、汎用されるようになってきた。われわれは、市販の cDNA マイクロアレイと樹立した細胞株を用いて、細胞の機能変化によって誘導される遺伝子群を解析した。今回実施した cDNA マイクロアレイ実験の操作手順を Fig. 2 に示す。

**3-1. 結腸上皮細胞の分化の過程で発現変動する遺伝子群の解析** 結腸粘膜幹細胞はクリプト中間部に局在し、上部へ移動すると上皮や杯細胞に、下部へ移動するとクリプト深部分泌細胞に分化するが、この分化機構は全く解明されていない。他方、結腸管腔には mM 濃度の酪酸、酢酸及びプロピオン酸などの短鎖脂肪酸が存在し、その中でも酪酸は結腸の増殖・分化制御に重要な役割を担っている。<sup>29,30)</sup> われわれは結腸細胞の分化誘導機構を解明するために、結腸上皮 MCE301 細胞と cDNA マイクロアレイを用いて、酪酸による細胞分化の過程で発現変動する遺伝子群を解析した。MCE301 細胞において、酪酸 (2 mM) により細胞増殖が停止し、細胞が分化したがアポトーシスは誘導されなかった。本条件下、約 900 遺伝子を解析し、88 遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加、113 遺伝子の発現量が 1/2 以下に減少することが明らかとなった。<sup>21)</sup> サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21<sup>Waf1/Cip1</sup> は、細

胞の増殖停止や分化に密接に関係し、酪酸によって発現誘導されることが報告されている<sup>31)</sup>が、今回の実験では p21<sup>Waf1/Cip1</sup> の発現変動は観察されなかった。一方、細胞増殖に関連するサイクリン D1 と PCNA は酪酸によって発現量が減少し、これらは以前の報告<sup>32,33)</sup>と一致した。また、細胞周期に関与する Mad2, cdc2, cdk2- $\alpha$  や p34 cdc2 kinase の発現レベルが酪酸により減少することを見出した。これらの遺伝子発現量の減少が、酪酸による細胞増殖停止に密接に関与していると考えられる。<sup>21)</sup>

また、MCE301 細胞において酪酸によりオステオポンチン (OPN) とインテグリン  $\beta 1$  が顕著に誘導された。OPN は生体内に広く分布し、そのレセプターであるインテグリンファミリーや CD44 と結合することにより、細胞の分化、増殖、抗炎症作用など種々の生理活性を示す。<sup>34)</sup> MCE301 細胞が酪酸によって分化したとき、OPN がオートクリン又はパラクリンのにインテグリン  $\beta 1$  に結合し、OPN-インテグリン  $\beta 1$  を介したシグナル伝達系が活性化され、細胞の分化に影響を与えている可能性がある。また、ヒト胃粘膜において OPN は粘液質中に存在し、粘膜防御機構に関与していることが報告されている。<sup>35)</sup> 結腸上皮細胞が分化したとき、OPN の産生が亢進し、細胞の防御機構が亢進するのかも

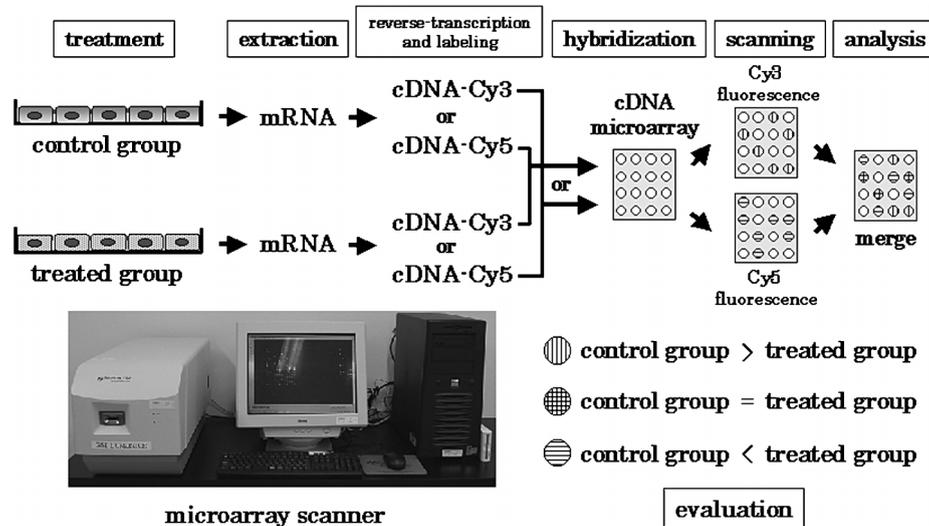


Fig. 2. Analysis of Differentially Expressed Genes Using a cDNA Microarray

cDNA probes were prepared by reverse-transcriptase reaction with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP from mRNAs from vehicle (control group) or compound treated cells (treated group), respectively. In some experiments, control sample was labeled with Cy5; and in others, it was labeled with Cy3, with essentially identical results. cDNA probe solutions containing both Cy3- and Cy5-labeled cDNA probes were applied to the microarrays, and placed in a humidified chamber at 65°C for 16 h. The microarrays were scanned in both Cy3 and Cy5 channels with a microarray scanner ScanArray Lite (Packard BioChip Technologies) and each image was analyzed using QuantArray software (Packard BioChip Technologies). G3PDH Cy3 and Cy5 signal gives a ratio that was used to balance or normalize the signals. Genes were considered up- or down-regulated, if the averaged fold change was 2.0 or greater in duplicate experiments.<sup>22)</sup>

しれない。これまでに、cDNA マイクロアレイを用いて酪酸によって発現変動する遺伝子の解析が行われている。<sup>36-38)</sup>しかしながら、これらの文献<sup>36-38)</sup>で報告された酪酸によって発現変動する遺伝子は、今回のわれわれの研究ではほとんど確認することができなかった。これは、使用しているマイクロアレイ、細胞、薬物濃度、薬物処理時間などの実験条件の差が原因であると考えられる。本研究により、結腸上皮細胞において酪酸による分化の過程で発現変動する遺伝子が数多く明らかとなった。これらの知見は、結腸上皮細胞の分化や酪酸の作用の詳細な分子機構を理解する有用な基礎情報になると考えられる。

**3-2. 精巣セルトリ細胞においてビスフェノール A 誘導細胞障害時に発現変動する遺伝子群の解析**  
現在、地球環境中に多種多量の化学物質が放出され、それは人類のみならず地球的にすべての生物種に多大な影響を与えている。この化学物質の中で特に内分泌系に影響を与える物質は“環境ホルモン”や“内分泌攪乱物質”と呼ばれ、近年、内分泌攪乱物質がヒトの精子数減少に影響していると言う衝撃的な成績が発表された。<sup>39)</sup>精子は精祖細胞から分裂・分化を繰り返して形成され、これには精巣内の構成細胞であるセルトリやライディッヒ細胞が深く関与しており、内分泌攪乱物質による精子形成障害にもこれらの細胞が密接に関与していることが考えられるが、その詳細な分子機構は明らかではない。

ビスフェノール A (BPA; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane) は、ポリカーボネイト、ポリスチレン樹脂などの原料として用いられ、多量に環境中に排泄されているのでその環境における内分泌攪乱作用が懸念されている。実験動物モデルにおいて、BPA はエストロゲン受容体 (ER) に作用し、雄性生殖機能障害を発現すると報告されている。<sup>40,41)</sup>しかしながら、BPA のエストロゲン様活性は  $17\beta$ -エストラジオールの約数千-数万分の一と非常に弱く、BPA の作用発現には ER を介する作用とは異なる機構が存在すると予測されている。<sup>42)</sup> BPA の作用発現機構解明を目的として、樹立した精巣セルトリ TTE3 細胞と cDNA マイクロアレイを用いて、BPA によって発現が変化する遺伝子群を解析した。<sup>21,22)</sup>

TTE3 細胞への BPA (200  $\mu$ M) の暴露により

Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害作用に基づく細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇に続いて小胞体ストレスが誘導され、時間依存的に細胞障害が惹起された。これらの変化は、ER の特異的な阻害剤で抑制できなかった。合計約 2000 種類の遺伝子の発現を検討した結果、BPA により 1/2 以下に発現量が減少する遺伝子が 3 種類、2 倍以上に増加する遺伝子が 39 種類同定された。<sup>21,22)</sup> その中の増加する遺伝子の発現量の時間依存的変化を Fig. 3 (A-C) に示す。これらの遺伝子は、6, 12 又は 24 時間に発現量がピークになる 3 グループに分けられ、各々 c-myc と fra-2、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 及び chop の発現変動が顕著であった。c-myc の転写制御のターゲット遺伝子として ODC<sup>43)</sup> や HSC70<sup>44)</sup> が報告されている。非常に興味深いことに、c-myc の発現上昇に続いて ODC や HSC70 の発現増加が観察された。BPA により c-myc が誘導され、ODC と HSC70 の転写活性を上昇させたと考えられる。BPA により ER $\alpha$  遺伝子レベルは減少し、これと同様に Aloisi らは同薬の長期連続投与によりラット脳弓状核の ER 発現細胞の減少を報告している。<sup>45)</sup> また、BPA は GRP78, HSP90, chop,<sup>46,47)</sup> 酸化ストレス誘導タンパク質、ODC などのストレス関連遺伝子の発現量を顕著に増加させた。近年、BPA により酸化ストレス<sup>48)</sup>や熱ショックタンパク質<sup>49)</sup>が誘導されることが動物モデルで相ついで報告された。このようにいくつかの遺伝子発現については、*in vivo* 動物モデルの報告と一致したことから、これらの遺伝子は動物培養細胞システムと動物モデルの間のブリッジングバイオマーカー<sup>28)</sup>に成り得る可能性がある。今回行った実験条件下において、BPA 暴露直後から最も発現が上昇する遺伝子は C/EBP 転写因子ファミリーに属する chop<sup>46,47)</sup>であった。本遺伝子の役割を検討するために、TTE3 細胞にアンチセンスの向きで chop の遺伝子の全長を安定発現し、chop タンパク質発現量が減少した chopR14 細胞を樹立した。chopR14 細胞において、BPA による chop タンパク質の発現は、mock 細胞 (ベクターのみ導入細胞) に比べて有意に減少した (Fig. 3 (D, E))。ChopR14 と mock 細胞を比較したとき、chop14 細胞では BPA による細胞障害が有意に低下したが、小胞体ストレスのマーカである GRP78 の遺伝子発現は両細胞間で差は認められなかつ

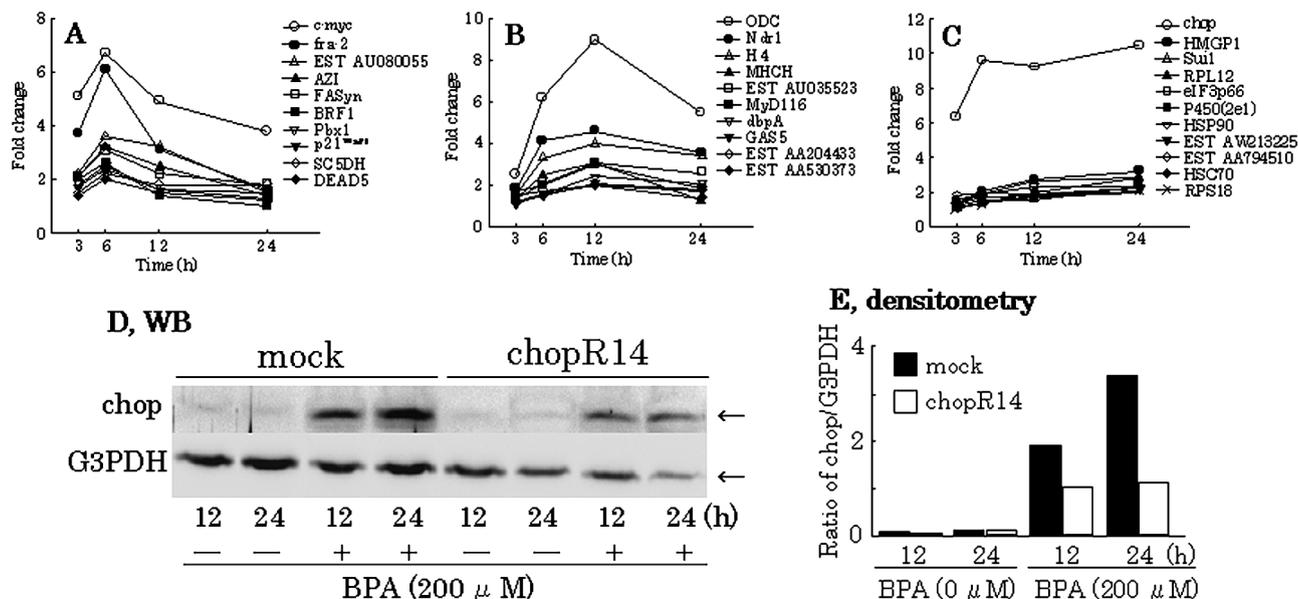


Fig. 3. (A-C) A Time Course cDNA Microarray Analysis

Mouse testicular Sertoli TTE3 cells were incubated with bisphenol A (BPA; 200 μM) for 3–24 h. (A) Genes with peak expression 6 h, (B) genes with peak expression 12 h, (C) genes with peak expression 24 h. Data indicate means of two different experiments. (D and E) Effects of BPA on chop protein expression in TTE3 (mock) and chopR14 cells (stable TTE3 cells overexpressing full-length chop antisense RNA). (D) Western blot (WB) analysis. (E) Bands were quantified by densitometry. Fold induction was normalized by G3PDH.<sup>22)</sup>

た.<sup>47)</sup> これらの成績から、BPAによる精巣セルトリ細胞の機能障害発現機構の少なくとも一部に chop が関与していることが示された。<sup>22)</sup>

#### 4. おわりに

tsSV40 大型 T 抗原遺伝子導入 TG マウスと TG ラットからは今回示した細胞以外にも種々の生体組織の機能を保持した細胞株が樹立されている。これらの樹立細胞を用いた生体組織機能の再構築の研究が着実に進んでおり、今後、基礎研究や医薬品の開発研究など幅広い領域に応用されるであろう。現在、医薬品開発のために大量の動物が使用され、社会問題になっている。樹立細胞を用いた細胞モデルは実験動物の代替法になり、動物倫理の観点からも非常に重要であると考えられる。

**謝辞** 本研究を実施するに当たり、終始御指導を賜りました東北大学加齢医学研究所 帯刀益夫教授、富山医科薬科大学薬学部 竹口紀晃教授、富山医科薬科大学医学部 近藤 隆教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を推進するに当たり御協力頂きました共同研究者の方々に深く感謝致します。

#### REFERENCES

- 1) Santerre R. F., Cook R. A., Crisel R. M., Sharp J. D., Schmidt R. J., Williams D. C., Wilson C. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4339–4343 (1981).
- 2) Chang S. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **823**, 161–194 (1986).
- 3) Frederiksen K., Jat P. S., Valtz N., Levy D., McKay R., *Neuron*, **1**, 439–448 (1988).
- 4) Paul D., Hohne M., Pinkert C., Piasecki A., Ummelmann E., Brinster R. L., *Exp. Cell Res.*, **175**, 354–362 (1988).
- 5) Yanai N., Suzuki M., Obinata M., *Exp. Cell Res.*, **197**, 50–56 (1991).
- 6) Jat P. S., Noble M. D., Ataliotis P., Tanaka Y., Yannoutsos N., Larsen L., Kioussis D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 5096–5100 (1991).
- 7) Jat P. S., Sharp P. A., *Mol. Cell Biol.*, **9**, 1672–1681 (1989).
- 8) Ray S., Anderson M. E., Tegtmeyer P., *J. Virol.*, **70**, 7224–7227 (1996).
- 9) Sugiyama N., Tabuchi Y., Horiuchi T., Obinata M., Furusawa M., *Exp. Cell Res.*,

- 209, 382–387 (1993).
- 10) Tabuchi Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **85**, 117–123 (2001).
  - 11) Tabuchi Y., Arai Y., Shioya H., Kuribayashi R., Ishibashi K., Sugiyama N., Obinata M., Takeguchi N., Asano S., *Digestion*, **67**, 71–81 (2003).
  - 12) Tabuchi Y., Ohta S., Arai Y., Kawahara M., Ishibashi K., Sugiyama N., Horiuchi T., Furusawa M., Obinata M., Fuse H., Takeguchi N., Asano S., *Cell Struct. Funct.*, **25**, 297–307 (2000).
  - 13) Sugiyama N., Tabuchi Y., Numata F., Uchida Y., Horiuchi T., Ishibashi K., Ono S., Obinata M., Furusawa M., *Cell Struct. Funct.*, **23**, 119–127 (1998).
  - 14) Tabuchi Y., Ohta S., Yanai N., Obinata M., Kondo T., Fuse H., Asano S., *J. Urol.*, **167**, 1538–1545 (2002).
  - 15) Ohta S., Tabuchi Y., Yanai N., Asano S., Fuse H., Obinata M., *Arch. Androl.*, **48**, 43–51 (2002).
  - 16) Obinata M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 667–672 (2001).
  - 17) Takahashi R., *Exp. Anim.*, **51**, 113–118 (2002).
  - 18) Tabuchi Y., Arai Y., Ohta S., Shioya H., Takahashi R., Ueda M., Takeguchi N., Asano S., Obinata M., *Cell Struct. Funct.*, **27**, 71–79 (2002).
  - 19) Tabuchi Y., Takahashi R., Ueda M., Obinata M., *Cell Struct. Funct.*, **28**, 87–95 (2003).
  - 20) Tabuchi Y., Arai Y., Kondo T., Takeguchi N., Asano S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1287–1294 (2002).
  - 21) Tabuchi Y., Zhao Q.-L., Kondo T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **89**, 413–416 (2002).
  - 22) Tabuchi Y., Kondo T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 54–61 (2003).
  - 23) Tabuchi Y., Sugiyama N., Horiuchi T., Furuhama K., Furusawa M., *Digestion*, **57**, 141–148 (1996).
  - 24) Tabuchi Y., Sugiyama N., Horiuchi T., Furuhama K., Furusawa M., *Digestion*, **58**, 28–33 (1997).
  - 25) Dohi T., Nakasuji M., Nakanishi K., Yasugi E., Yuyama Y., Sugiyama N., Tabuchi Y., Horiuchi T., Oshima M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1289**, 71–78 (1996).
  - 26) Karam S. M., *Anat. Rec.*, **236**, 259–279 (1993).
  - 27) Cheung V. G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R., Childs G., *Nat. Genet.*, **21**, 15–19 (1999).
  - 28) Aardema M. J., MacGregor J. T., *Mutat. Res.*, **499**, 13–25 (2002).
  - 29) Lupton J. R., Kurtz P. P., *J. Nutr.*, **123**, 1522–1530 (1993).
  - 30) Scheppach W., *Gut*, **35**, S35–S38 (1994).
  - 31) Xiao H., Hasegawa T., Miyaishi O., Ohkusu K., Isobe K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 457–460 (1997).
  - 32) Lallemand F., Courilleau D., Sabbah M., Redeuilh G., Mester J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 163–169 (1996).
  - 33) Ranganna K., Yatsu F. M., Hayes B. E., Milton S. G., Jayakumar A., *Mol. Cell Biochem.*, **205**, 149–161 (2000).
  - 34) Denhardt D.T., Noda M., O'Regan A.W., Pavlin D., Berman J. S., *J. Clin. Invest.*, **107**, 1055–1061 (2001).
  - 35) Qu-Hong, Brown L. F., Dvorak H. F., Dvorak A. M., *J. Histochem. Cytochem.*, **45**, 21–33 (1997).
  - 36) Mariadason J. M., Corner G. A., Augenlicht L. H., *Cancer Res.*, **60**, 4561–4572 (2000).
  - 37) Della Ragione F., Criniti V., Della Pietra V., Borriello A., Oliva A., Indaco S., Yamamoto T., Zappia V., *FEBS Lett.*, **499**, 199–204 (2001).
  - 38) Iacomino G., Tecce M. F., Grimaldi C., Tosto M., Russo G. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 1280–1289 (2001).
  - 39) Carlsen E., Giwerzman A., Keiding N., Skakkebaek N. E., *Br. Med. J.*, **305**, 609–613 (1993).
  - 40) Takahashi O., Oishi S., *Arch. Toxicol.*, **75**, 42–51 (2001).
  - 41) Takao T., Nanamiya W., Nagano I., Asaba K., Kawabata K., Hashimoto K., *Life Sci.*, **65**, 2351–2357 (1999).
  - 42) Gaido K. W., Leonard L. S., Lovell S., Gould J. C., Babai D., Portier C. J., McDonnell D. P., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205–212 (1997).
  - 43) Bello-Fernandez C., Packham G., Cleveland J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 7804–7808 (1993).

- 
- 44) Shoji W., Ohmori Y., Obinata M., *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 885–892 (1993).
- 45) Aloisi A. M., Della Seta D., Ceccarelli I., Farabollini F., *Neurosci. Lett.*, **310**, 49–52 (2001).
- 46) Kaufman R. J., *Genes Dev.*, **13**, 1211–1233 (1999).
- 47) Zinszner H., Kuroda M., Wang X., Bat-  
chvarova N., Lightfoot R. T., Remotti H.,  
Stevens J. L., Ron D., *Genes Dev.*, **12**, 982–  
995 (1998).
- 48) Chitra K. C., Latchoumycandane C., Mathur  
P. P., *Toxicology*, **185**, 119–127 (2003).
- 49) Papaconstantinou A. D., Fisher B. R., Um-  
breit T. H., Brown K. M., *Environ. Health  
Perspect.*, **110**, 1207–1212 (2002).