

「内分泌かく乱物質」

平成 11 年度採択研究代表者

黒田 洋一郎

((財)東京都神経科学総合研究所 参事研究員)

「内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム」

1. 研究実施の概要

内分泌かく乱物質が遺伝子発現などの攪乱などを介して脳神経系の機能発達に影響を与えることが憂慮される。ADHD(注意欠陥多動性障害)など最近の日本における青少年の異常な行動を考慮しつつ、神経科学の最先端の知識・研究方法を駆使して、分子・細胞・個体レベルで実験的研究を行い、リスク評価のため機能スクリーニング系の開発、それを支える分子メカニズムや毒性メカニズムの解明のための基礎データの積み上げを行う狙いを持つ。

本年度は、これまでに開発した各種アッセイ系を用いた分子、細胞、個体レベルの研究を継続するとともに、甲状腺ホルモンの脳機能発達に関係する標的遺伝子や臨界期の解明のために、小脳プルキンエ細胞に特異的に変異甲状腺ホルモン受容体を発現するトランスジェニックマウス、甲状腺機能低下マウスの作製、Transient transfection 法による in vitro で内分泌かく乱物質のホルモン核受容体を介する転写調節機構への関与を解析する方法などの新しい実験法を開発した。まず、甲状腺ホルモンの変異受容体を“ノック・イン”したトランスジェニック・マウスの解析により、本研究の基本コンセプトの証明として、甲状腺ホルモンは神経細胞に直接作用し脳機能発達に関与していることが明らかにされた。これらのトランスジェニック・マウスや甲状腺機能低下マウスは、甲状腺ホルモンと類似の構造をもち甲状腺機能低下と類似の知的障害を生じる PCB などの環境化学物質の解析に有用で今後使用される。

遺伝子発現では甲状腺ホルモンにより、シナプス機能に重要な蛋白質であるシナプトフィジン、シナプトタグミン、NMDA 受容体などの mRNA の発現に変化が見られることが新たに明らかになった。また培養神経細胞を用いた研究ではこれまでに開発した大脳皮質シナプス形成系や小脳プルキンエ細胞系を用い各種ホルモンや環境化学物質を投与し甲状腺ホルモン効果に対する影響とともに検討した。小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達をビスフェノール A (BPA) が低濃度で阻害すること、プロジェステロンにも促進効果が認められたが、その影響は甲状腺ホルモンに比べ比較的弱かったことなどが判明した。

樹状突起の発達に関する細胞骨格系の発達期による変化についても神経特異的な微小管結合蛋白タウの遺伝子の発現がシナプス形成が始まる時期にスプライシングを起こすことが判明した。これまでの研究でシナプス形成に重要と判明している MAP1b 蛋白も遺伝子発現、蛋白レベルで

多型性があることがわかり、これらの脳機能発達における変化に注目し、各種ホルモンや内分泌かく乱物質の影響のメカニズム研究を行う基礎ができた。

個体レベルの研究では胎生児・新生児期の曝露の影響の研究を続け12週令までの解析を行い、1)性差が無いと考えられる行動にも影響を与えること、2)BPA に対する感受性に性差がみられること、3)単純な用量依存性がみられないこと、4)次世代動物の発達ステージにより影響の表れ方が異なることが明らかとなった。またラットでの実験をふまえ、BPA 曝露量を実験的に検討し、サルの子行動、次世代行動実験を開始した。

このように本年度までに遺伝子・蛋白などの分子レベル、培養細胞を用いた細胞レベル、曝露ラット・サルなど次世代動物の行動を指標とした個体レベルと、階層性を網羅した実験・アッセイ系がそろって動き出し、さまざまな組み合わせで top down, bottom up の研究が可能になった。本研究などで明らかにされた甲状腺ホルモンや環境化学物質により脳内で変動する遺伝子の数も増えてきており、また細胞骨格系などのシナプス形成関連蛋白質の、シナプスの発達に伴う遺伝子発現の変化も判明しつつある。これらの情報を統合し、脳機能発達への化学物質の影響を探るスクリーニング専用のマーカー遺伝子を選択した、低コスト・高パフォーマンスのオリジナルな DNA マイクロアレイの開発を考え準備中である。

2. 研究実施内容

1. 甲状腺ホルモンの脳機能発達への影響の解析とモデル動物の開発

1) 甲状腺機能低下マウスの作成

一般的にラットに比べマウスは甲状腺機能低下になりやすく、発達期中枢神経系に及ぼす甲状腺ホルモン作用を調べる実験モデルとしては確立されていなかった。そこで、従来行なわれていた種類の抗甲状腺剤を用いる方法を改め、methimazole と sodium perchlorate を飲料水にまぜ服用させた。その結果、このマウスが甲状腺機能低下ラットと同様の小脳発達障害(ラットと同様のプルキンエ細胞樹状突起発達の低下や外顆粒層消失の遅れ、BDNF や NT3 など甲状腺ホルモン感受性の神経栄養因子遺伝子発現の低下、プルキンエ細胞特異的に発現する甲状腺ホルモン感受性遺伝子 ROR α 発現の低下)を生じた。

2) トランスジェニックマウスを用いた遺伝子工学的解析

特定の細胞特異的に TH 作用を阻害した結果、どのような発達異常が生じてくるかを解析するために、小脳プルキンエ細胞に特異的に変異 TR を発現するトランスジェニックマウスを、プルキンエ細胞特異的に発現する L7 遺伝子のプロモーター下流にヒト甲状腺不応症患者よりクローニングされた変異 TR cDNA を subcloning し、この DNA を受精卵に微量注入し作製した。出生したマウスには、成長障害等の全身的な周産期甲状腺機能低下症の症状は全く見られなかった。しかし小脳の発達は全身的な低下症とほぼ同様の異常が見られた。具体的には、以下の通りである。

- a. 甲状腺ホルモン感受性遺伝子である PCP-2 遺伝子の発現が mRNA レベルで低下していた。

b. プルキンエ細胞の樹状突起の進展が低下していた。また、外顆粒層が出生後 15 日目でもまだ残存しており、顆粒細胞の成熟が遅延している事が明らかになった。これらの形態学的異常は全身的な甲状腺機能低下動物でもみられる事が知られている。

c. Rota-rod を用いてこのトランスジェニックマウスの運動機能異常を調べた所、このマウスは軽度の小脳失調を生じていた。

以上から、TH はプルキンエ細胞に直接作用し、小脳発達に関与している事が明らかとなった。今後、このモデルマウスを用いて、正常群との間でかく乱物質の効果を調べて行きたい。

3) Transient transfection 法による解析

transient transfection 法を用いて *in vitro* で内分泌かく乱物質によるホルモン核受容体を介する転写調節機構への関与を解析する方法を確立した。特定のホルモン受容体感受性エンハンサー領域を thymidine kinase minimum promoter の上流域に組み込み、luciferase 遺伝子を下流域に有するレポータープラスミドをホルモン受容体遺伝子とともに calcium phosphate coprecipitation 法を用いて株細胞 (CV1) に導入した。今回用いたのは TR と同じスーパーファミリーに属する SXR である。SXR のリガンドとして、現在までリファンピシン等の薬物やエストロゲン、コルチゾルなどが知られていたが、今回、内分泌かく乱物質であるビスフェノール A やジエチルフタル酸もこれらの薬物と同様に SXR を介する転写を促進する事が明らかになった。また、転写促進の際にはコアクチベーター SRC-1 が関与している可能性がある事も判った。今後、この実験系を用いて TR を介する転写調節に及ぼす内分泌かく乱物質の作用を解析して行きたい。

4) 脳特異的甲状腺ホルモン受容体結合蛋白の同定

ラット小脳組織より核蛋白を抽出し、Far Western 法を用いて小脳特異的に発現し TR と結合する転写共役因子の同定を計った。具体的には、甲状腺ホルモン Ligand binding domain 蛋白をアイソトープで標識し、SDS page gel 電気泳動後ニトロセルロース膜上へトランスファーした小脳から抽出した核蛋白と hybridization を行なった。その結果、既知の大きさの蛋白群 (160 kDa 及び 220 kDa の大きさの T3 存在下で TR と結合する蛋白等) に加え、90kDa の大きさで、TH 非存在下に TR と結合する蛋白が同定された。この蛋白は小脳発達と共に発現が増加した。また、現在迄の所、脳以外の細胞での発現は見られない。今後この蛋白の同定をさらにすすめる予定である。現在 Yeast two hybrid system により解析を進めている。

2. 甲状腺ホルモンがシナプス形成関連遺伝子の発現に与える影響

生後の脳・神経系発達で、これまで報告した神経活動依存的な過程とともに、甲状腺ホルモンに依存した過程も存在する。ラット大脳皮質初代神経細胞培養系において、甲状腺ホルモン投与でシナプス形成数の増加が認められる (黒田ら)。そこで、この初代培養系において、神経機能発現に関わる遺伝子群の発現が甲状腺ホルモンによってどのような影響を受けるのか、について検討を加えた。その結果、シナプトフィジンなどの多くの遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。

1) 甲状腺ホルモンの遺伝子発現に与える影響

ラット大脳皮質初代神経細胞培養系において、甲状腺ホルモン T3, T4 を加えた所、神経突

起成長と生存・維持活性を増強した。この条件下でシナプトフィジンの発現をノザン法、RT-PCR法によって調べた所、mRNA レベル、蛋白質レベルでの増加が認められた。これら効果は、T4における場合の方が強かった。シナプトタグミンの mRNA 発現、及び、蛋白質合成も活性化されていた。また、NMDA レセプターNR2C サブユニット mRNA の合成も増加していた。しかし、他の NMDAレセプターサブユニット mRNA の合成には変化が認められなかった。現在、GABAレセプターの発現に関して検討中である。

さらに、APPmRNA 発現も増加することが明らかとなった。

2) BDNF 遺伝子発現制御系の解析

ラット大脳皮質初代神経細胞培養系で、DNAトランスフェクション法を用いてBDNF 遺伝子プロモーターI(BDNF-PI)のプロモーター解析を行った。その結果、カルシウム応答に関わる転写制御因子として、CREBとUpstream Stimulating Factor (USF)の関与が明らかとなった。また、この BDNF-PI の活性化を指標に、この発現制御系に影響を与える化学物質の多検体スクリーニング系を検討中である。

3) ニューロトロフィン遺伝子発現に与える影響

甲状腺機能低下ラットの生後の小脳発達では、生後1〜2週間に起こるニューロトロフィン-3(NT-3) mRNA の発現増加が全く認められなくなってくる。この事実は NT-3 の発現が大きく甲状腺ホルモンに影響を受けていることを示している。ラット大脳皮質初代神経細胞培養系において、T4 投与で NT-3 mRNA の発現が 2〜3 倍上昇した。そこで、NT-3 遺伝子発現の甲状腺ホルモンによる影響を、DNAトランスフェクション法によってプロモーター活性を測ることによって検討した。その結果、NT-3 プロモーター活性の有意な上昇は認められなかった。実際、NT-3 遺伝子プロモーター上には、TRE(Thyroid hormone-responsive element)が存在しない。一方、NT-3 遺伝子プロモーター解析から、プロモーター上-80~-100 に存在するタンデムな GC-box が NT-3 プロモーター活性に重要な働きをしていることを明らかにしている。また、この GC-box には転写制御因子 SP-3, SP-4 が結合していることも明らかにしている。これら GC-box 結合蛋白質の遺伝子発現が甲状腺ホルモンの直接的な影響を受ける事実を示す報告もなされており、現在、そのような観点から解析中である。このようにして、甲状腺ホルモンの一次ターゲット遺伝子を検索する。

3. 培養神経細胞を用いた機能スクリーニング系の開発

1) 大脳皮質初代培養細胞系

大脳皮質初代培養細胞が培養下でつくる神経細胞のネットワークが自発的に興奮・発火する性質を利用し、脳機能発達へのスクリーニング系とするために実験を続けた。甲状腺ホルモンの添加によりネットワークの興奮性が高まるので濃度依存性などを詳しく解析し、 a) T3, T4とも1 pMで既に有意な変化があらわれること b) T4, 100pMによる変化は100nMの amiodaroneにより有意に阻害されること c) 機能アッセイの適期は培養8日目あたりにあること などが明らかになった。この系にビスフェノールA(BPA)を添加したところ、甲状腺ホルモンの作用への弱い阻害効果を観察した。

2) 小脳プルキンエ初代細胞系

培養小脳プルキンエ細胞の樹状突起の発達に対する甲状腺ホルモン影響を調べた。5pM ~500nM の濃度の T4 もしくは T3 を添加した無血清培地で、約3週間培養した。固定した小脳細胞を特異抗体で染色し、プルキンエ細胞の樹状突起の発達を画像化し、定量的に解析した。その結果、甲状腺ホルモン添加群では、無添加群に比べ樹状突起が著しく発達し、50pM 以上を添加した群で有意な効果がみられた。この甲状腺ホルモンの効果は濃度依存性を示し、また、amiodarone により阻害された。さらに、甲状腺ホルモンはシナプス形成においても促進効果を示した。以上の結果から、プルキンエ細胞樹状突起の発達分化には甲状腺ホルモンが必須であることが *in vitro* で確認された。さらにこの系を用いて、脳神経系への関与が指摘されているステロイド系ホルモン及び内分泌かく乱物質の影響について調べた。甲状腺ホルモン、ステロイド系ホルモン、内分泌かく乱物質を単独、または複数同時に添加した。プルキンエ細胞自体に一過性に発現するプロジェステロンは、樹状突起伸展に促進効果が認められたが、その影響は甲状腺ホルモンに比べ比較的弱かった。一方、内分泌かく乱物質の1種であるビスフェノール A は、プルキンエ細胞の樹状突起伸展を促進する甲状腺ホルモンの効果を有意に抑えた。以上の結果より、プルキンエ細胞樹状突起の発達分化には甲状腺ホルモンやステロイド系ホルモンが関与し、さらにビスフェノール A などの内分泌かく乱物質が甲状腺ホルモンの機能に影響を与えている可能性が示唆された。

4. 脳機能発達における細胞骨格蛋白群の変化

細胞の形態形成、細胞内物質輸送、細胞分裂などを司る細胞骨格は、神経系においては、神経回路の基盤である神経突起群の形成と維持に中心的役割を果たしている。脳機能発達に対する内分泌かく乱物質の影響を細胞骨格を中心に評価することを目的として、正常発育過程における神経細胞細胞骨格およびその調節蛋白の構造的、機能的変化を検討した。

1) 微小管結合蛋白タウおよび MAP1B の発育に伴うスプライシング変化とその生理的意義

生後初期のラット小脳発育過程および胎生期 (E18) ラット大脳皮質由来の培養神経細胞の二種類の実験系を用いて、タウおよび MAP1B のスプライシング変化を mRNA レベルと蛋白レベルの両方で調べた。タウは、exon 2, 3, 10 の三カ所の択一的スプライシングにより脳では6種類のアイソフォームを生じる。このうち、C-端側に存在する exon 10 は、微小管結合部位を形成するリピート構造の一つに相当し、その有無によって3リピート型 (3R) と4リピート型 (4R) となる。幼若期には存在せず、発育とともに出現する4R型は、微小管結合力が強いことが示されている。一方、N 端側の exon 2, 3 はそれぞれ 29 アミノ酸を含むが、その生理的機能は不明である。本研究では、この exon 2, 3 に注目し、RT-PCR 法を用いて mRNA アイソフォームを調べるとともに、exon 特異ペプチドに対する抗ペプチド抗体を作製して蛋白レベルでもアイソフォームを検出した。小脳では生後7日目 (P7) まで exon 2, 3 を含まない最短アイソフォームのみで、exon 2 あるいは 2+3 を含むものは P11 ではっきりと検出された後、P14~P21 にかけて相対的に増加し、成熟動物と同じアイソフォーム組成を示すようになった。蛋白レベルでも、exon 2 あるいは 2+3 を含むものは P7 で初めて検出され、P10~P21 にかけて増加した。この系では、シナプシン I の抗体染色

によってモニターしたシナプス形成は、P10～P14 で最も盛んであった。培養神経細胞の系でも同様に、シナプス形成期(培養 6～8 日)に exon 2 あるいは 2+3 を含むアイソフォームが出現し、増加することから、軸索伸展が終わり、シナプス形成が始まる時期にタウのスプライシングが変化することが明らかになった。

また MAP1B は、MAP2/タウ・ファミリーとは異なる微小管結合部位を持ち、発育初期の神経細胞に発現する MAP である。N 末端の 126 アミノ酸の有無により二種類の蛋白アイソフォームが知られている。mRNA レベルでは更に、短い方の蛋白アイソフォームに対応するものとして、5' 側非翻訳領域(5'-UTR)の異なる二種類の分子(3A、3U)が存在するため、全長をコードするもの(full length, FL)とあわせて三種類となる。また、MAP1B の一部は、膜貫通蛋白として発現している可能性も示唆され、微小管安定化以外にも重要な機能を持つと考えられる。本研究では、ラット小脳の生後発育系を用い、蛋白レベル、mRNA レベルの MAP1B アイソフォームのそれぞれについて、その発現時期と発現量、細胞内局在を調べ、機能的な違いを明らかにしようとしている。RT-PCR 法で mRNA を調べたところ、量的には FL が大部分を占めるが、3A、3U も確実に発現しており、三種類とも発育に伴って単調に減少することがわかった。蛋白レベルでは、N-末端部および C 端側に特徴的なヘプタデカ・リピート部に対して、抗ペプチド抗体を作製し、Western Blot、免疫沈降、蛍光抗体染色などで MAP1B の細胞内分布を分析している。特に、ヘプタデカ・リピート部は、MAP1B が膜貫通蛋白として発現した場合には細胞外に出る部分であるため、細胞分画により分布を調べるとともに、培養細胞レベルで、いろいろな固定法や固定前処理を組み合わせ、細胞内分布の違いを検出する試みを行っている。

5. 胎生期および新生仔期におけるビスフェノール A 暴露がラット・サルの行動に及ぼす影響

ビスフェノール A(BPA)の胎生期および新生仔期暴露が中枢神経系発達に与える影響を明らかにする目的で、ラットを用い自発運動量、能動的忌避学習能力(シャトルボックス・アボイダンス・テスト)、および新奇場面での一般行動(オープンフィールド・テスト)について昨年度から検索を行い最終的に12週令まで観察した。また、カニクイザルでの実験を準備開始した。

1) ラットを用いた行動学実験

BPA に感受性が高い系統である F344 ラットに対し、妊娠 10 日目から離乳時まで BPA を 4、40、400 mg/kg/day で投与した。本実験における BPA 投与は母体に一過性の体重減少および、離乳時における胸腺重量減少をもたらしたが、出生仔数、性比、離乳時における母体の体重および体重との相対臓器重量(胸腺を除く)等には影響を与えなかった。次世代の個体は暴露濃度に依存して体重増加の減少がみられ、この傾向は生後 84 日までみられた。生後 62 日における臓器重量には暴露効果はみられなかった。

4 週齢時において通常飼育下における自発運動量を行動量が増加する暗期で 12 時間測定したが、暴露効果はみられなかった。次いで暗期 12 時間における不動時間を 5 分単位で計算した結果、メスの暴露群で有意に暗期不動時間の増加がみられた。この測定項目に明らかな性差はみられなかった。また、4 もしくは 8 週齢時にシャトルボックスを用いた能動的忌避学習能力の試験を行った。その結果、オスにおいて有意な暴露効果がみられた。4 週齢オスでは濃度依存

的に忌避率の有意な上昇がみられたが、8週齢オスでは4mg/kg/day 群のみが他群に比較し有意に低忌避率を示した。メスではこのような傾向はみられなかった。また、この試験に明らかな性差はみられなかった。8週齢時にオープンフィールド・テストを行った結果、オスの4mg/kg/day 群のみにおいてグルーミングの率が有意に高かった。メスでは有意な影響はみられなかった。この項目について明らかな性差はみられなかった。また、他の項目(ロコモーション、スニッフイング、レアリング)には、オス・メスともに影響はみられなかった。以前よりBPAは性差を反映する行動、例えば受動的忌避学習能力に対し影響を与える可能性が指摘されていたが、本実験の結果よりビスフェノールAの胎生期および新生仔期暴露は、測定項目によっては1)性差が無いと考えられる行動にも影響を与えること、2)BPAに対する感受性に性差がみられること、3)単純な用量依存性がみられないこと、4)次世代動物の発達ステージにより影響の表れ方が異なることが明らかとなった。

2) ビスフェノールAを妊娠カニクイザルに皮下投与したときの出生仔の発育ならびに母子行動、次世代行動に関する試験:暴露濃度の検討

ビスフェノールAは通常経口的に暴露される。しかしながら、平均156日の妊娠期間をもつカニクイザルに対し、厳密に規定された量を連日投与するのは困難である。また、連日の強制投与は母胎に対するストレスの大きさを考えると動物倫理上からも難しい。そこで本実験では表題の実験の準備として、ラット、カニクイザルのメスにBPAの単回経口投与(100mg/kg)ないし皮下投与(100mg/kg)を行い、吸収、代謝、排泄における種差について、市販ELISAキットによる経時的血中freeBPA残留濃度測定を行いCmax($\mu\text{g/L}$)およびAUC($\mu\text{g/L}\cdot\text{hr}$: 2-6時間)を算出し検討した。

それぞれのCmaxはラット経口投与(Ro)で115(1)(カッコ内は相対値)、ラット皮下投与(Rs)で4627(40)、カニクイザル経口投与(Mo)で5959(52)、カニクイザル皮下投与(Ms)で17847(155)であった。また、それぞれのAUCはRoで256(1)、Rsで6503(25)、Moで14069(55)、Msで54800(214)であった。本実験の結果より、異なる種で異なる投与方法をとる場合その体内BPAの薬理学的体内動態は全く異なる可能性が考えられた。つまり、カニクイザルに対し長期暴露実験を行うため皮下埋没型ポンプを用いる場合、先のラットでの実験における最小用量である経口4mg/kg/dayに相当するのは40 $\mu\text{g/kg/day}$ 程度ないしそれ以下になると考えられる。

今回の結果より、我々は母カニクイザルに対し皮下埋没型ポンプによりBPAを10 $\mu\text{g/kg/day}$ で暴露することに決定し、低濃度暴露実験を開始した。

3. 研究実施体制

・黒田グループ

① 黒田洋一郎(東京都神経科学総合研究所、参事研究員)

② 研究項目;培養神経細胞を用いたアッセイ系

リスク評価のための機能スクリーニング系として大脳皮質、海馬、小脳由来の初代培養系を

用い、各種ホルモン及び環境化学物質の影響を分子・細胞レベルで明らかにする。

・津田グループ

- ① 津田正明(富山医科薬科大学薬学部、教授)
- ② 研究項目;各種ホルモン、環境化学物質の遺伝子発現への影響
脳機能発達に重要と考えられる遺伝子群を中心に、それらの遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンや環境化学物質の影響を神経活動とホルモン作用との関わりを中心に明らかにする。

・吉川グループ

- ① 吉川泰弘(東京大学大学院、教授)
- ② 研究項目;行動実験学、行動解析
母ラット・母サルなどに環境化学物質を投与した次世代動物の行動を、母子行動、学習行動などを中心にビデオ・カメラ、コンピューター画像解析を組み合わせたやり方で調べる。

・田代グループ

- ① 田代朋子(青山学院大学理工学部、教授)
- ② 研究項目;脳機能発達における細胞骨格蛋白群の観察
シナプス形成の前後における、微小管結合蛋白群など、細胞骨格系の蛋白の動きを遺伝子・蛋白レベルで調べる。

・鯉淵グループ

- ① 鯉淵典之(群馬大学医学部、教授)
- ② 研究項目;甲状腺ホルモン・受容体と脳の機能発達
トランスジェニックマウス等遺伝子工学的手法を用いて甲状腺ホルモンの機能を明らかにし、内分泌かく乱物質の甲状腺ホルモン系への作用を解析するためのモデル実験系を開発する。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- 黒田洋一郎、内分泌攪乱物質の中樞神経系への影響、*最新医学*、第 57 巻第 2 号、40-44、2002.
- 鯉淵典之、神宮久香 中樞神経系発達に対する甲状腺ホルモンの作用 *内分泌・糖尿病科* 13: 208-215 2001.
- Koibuchi, N., Yamaoka, S. and Chin, W.W. Effects of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. *Thyroid* 11:205-210.2001
- Sajdel-Sulkowska, E.M., Ronca, A.E., Baer, L.A., Sulkowski, G.M., Koibuchi, N. and Wade, C.E. Effects of hypergravity exposure on the developing central nervous system: possible involvement of thyroid hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* 226: 790-798.2001.

- Takeshita, A., Koibuchi, N., Oka, J., Taguchi, M., Shishiba, Y. and Ozawa, Y. Bisphenol-A, an environmental estrogen-like substance, activates the human orphan nuclear receptor SXR/PXR-mediated transcription. *Eur J Endocrinol* 145: 513-517.2001.
 - Tabuchi A., Koizumi M., Nakatsubo J., Yaguchi T., and Tsuda M. : Involvement of endogenous PACAP expression in the activity-dependent survival of mouse cerebellar granule cells. *Neurosci. Res.*, 39: 85-93, 2001.
 - Tabuchi A., Koizumi M., and Tsuda M. : Novel splice variants of PACAP gene in mouse cerebellar granule cells. *Neuroreport* 12: 1181-1186, 2001.
 - Tabuchi A., Yamada T., Sasagawa S., Naruse Y., Mori N., and Tsuda M. : REST4-mediated modulation of REST/NRSF-silencing function during BDNF gene promoter activation. *Bioche, Biophys. Res. Commun.* 290: 415-420, 2002.
- (2) 特許出願
なし