

研究課題名=ヒト消化管、肝組織におけるエストロゲン代謝の検討

—環境ホルモンに対する生体防御機構の解明—

分担研究者 笹野公伸 東北大学大学院・医学系研究科・医科学専攻病理学

講座・

診断病理学分野 教授

### 研究要旨

我々は、Estradiol (E2) と Estrone (E1) を相互に変換することにより局所におけるエストロゲン活性の調節に重要な役割を果たしている  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $17\beta$ -HSD) に注目し、この酵素がヒト胎児においてどのように発現しているのかに関し種々の検討を行った。肝臓、消化管では  $17\beta$ -HSD2 を発現し、E2 を E1 へ変換してエストロゲン活性を弱めることによって局所におけるエストロゲン活性を制御し過剰のエストロゲンへの曝露に対するバリアとしての役割を果たしているものと推察された。

#### A. 研究目的

$17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $17\beta$ -HSD) は、生物学的活性の高いエストロゲンである estradiol (E2) と低い estrone (E1) とを相互に変換することにより、局所におけるエストロゲン活性のレベルを制御している酵素である。 $17\beta$ -HSD の type 1 アイソザイム ( $17\beta$ -HSD1) は、C18ステロイドに特異性が高く、主として E1 をエストロゲン活性の高い E2 へ変換している。一方、 $17\beta$ -HSD の type 2 アイソザイム ( $17\beta$ -HSD2) は、E2 を E1 へ変換してエストロゲ

ン活性を弱めるだけでなく、アンドロゲンに関しても生物学的活性の高い Testosterone から低い Androstenedione に変換する働きを持っている。すなわち  $17\beta$ -HSD2 は、エストロゲンやアンドロゲンの活性を弱めることによって、これらの性ステロイドの局所における活性を制御している。さらに  $17\beta$ -HSD2 は、C21ステロイドの  $20\alpha$ -oxidation にも関与しており、 $20\alpha$ -dihydroprogesterone から progesterone に変換してプロゲステロン活性を高める役割も果たしている。

ヒト胎児においては、臍帯血から移行するエストロゲンに加え、嚥下した羊水中に含まれているエストロゲンが消化管から吸収されたり、皮膚から浸透することによってもエストロゲンを取り込んでいることになる。このようにヒトの胎児は、子宮内において大量のエストロゲンに曝露されている。それゆえ、エストロゲンは、妊娠の維持のみならず、胎児の発育に対しても重要な役割を果たしていると考えられる。しかし一方、過剰のエストロゲンへの曝露は、胎児の発育に悪影響を及ぼすともいわれている。例えば、流産の予防のためにエストロゲン製剤である Diethylstilbestrol (DES) を投与された妊婦から生まれた児において数多くの異常を生じていることが報告されている。従って、胎児においてこの大量のエストロゲンがどのように代謝されるのかを知ることは大変重要である。

これまでのところ、マウスやヒト成人の組織で  $17\beta$ -HSD の発現を検討した報告は出されているが、ヒト胎児組織においてどのように発現しているのかに関しては知られていない。そこで今回ヒト胎児組織における  $17\beta$ -HSD1 と  $17\beta$ -HSD2 の発現を検討することにより、妊娠時に増加し続けるエストロゲンがどのように代謝されているのかに関して検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 対象

胎生 11 週から 21 週までのヒト胎児組織は、合併症のない健常な妊婦に対して施行された elective termination の際に採取した。胎児の年齢は、妊婦の最終月経、胎児の体重及び頭殿長より評価した。胎生 26、30、36 及び 38 週のヒト胎児組織は、東北大学医学部附属病院で行われた autopsy の際に採取した。標本採取は、elective termination の場合は 1 時間以内、autopsy の場合は 2~6 時間以内に行った。これらの標本はいずれも病理組織学的には異常を認めなかった。Enzyme assay 及び RNA 抽出のための標本は採取後素早く凍結させ使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。免疫組織学的検索のための標本は、10% 中性ホルマリンにて室温で 18 時間固定し、パラフィンに包埋した。

### 2. ヒト胎児組織における $17\beta$ -HSD 活性の検討

ヒト胎児の各組織のホモジネートに、E2 あるいは E1 と補酵素を加えてインキュベートし、E1 あるいは E2 へどの程度変換されるのかを検討することにより、ヒト胎児組織における  $17\beta$ -HSD 活性の検討を行った。この検討では、胎生 20 週 (男児)、20 週 (女児)、及び 21 週 (女児) の 3 例の胎児より採取した組織を使用した。

まず、これらのヒト胎児組織をリン酸バッファー(100mM KCl、10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1mM EDTA、pH7.5)中で、Potter-Elvehjam glass-Teflon homogenizerを用いてホモジナイズした。それを軽く遠心して残渣を沈殿させた後、その上清を、1 $\mu$ Mの14Cでラベルされた基質(E2またはE1)と10mMの補酵素(NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>、NADH、NADPHのうちどれかひとつ)を含んだリン酸バッファー0.5ml中に加え、37°Cで30分間インキュベートした。反応は2mlのジエチルエーテルを加えて攪拌することにより停止させた。有機層を分離し、溶媒を蒸発させ、その沈渣をcyclohexane/ethyl acetate(1:1, v/v)へ溶解して薄層クロマトプレートへスポットした後、cyclohexane/ethyl acetate(1:1, v/v)をdeveloping solventとして薄層クロマトグラフィーを施行した。プレートを乾燥させ室温で18時間感光させた後、GS-250 MOLECULAR IMAGER (BIO-RAD Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA)を用い、生成されたE1あるいはE2の検出、定量を行った。ホモジネートの蛋白量は、ウシ血清アルブミンを標準とし、Lowry法にて測定した。ヒト胎児組織間における17 $\beta$ -HSD活性の差異は、Bonferroni法により検定した。また、補酵素間の17 $\beta$ -HSD

活性の差異は Student's t-test により検定した。いずれも p 値が 0.01 以下の場合を有意とみなした。

### 3. 17 $\beta$ -HSD1 と 17 $\beta$ -HSD2 の Northern blot analysis

ヒト胎児組織における 17 $\beta$ -HSD1 と 17 $\beta$ -HSD2 の mRNA レベルにおける発現を検討するために Northern blot analysis を施行した。この検討では胎生 20 週(女児)より採取した組織を使用した。

まず GTC 溶液 (4M guanidium isothiocyanate, 1% 2-mercaptoethanol) 中でヒト胎児の各組織をホモジナイズした後、塩化セシウム超遠心法にて total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度は 260nm 吸光度より求めた。10 $\mu$ g の total RNA を 1% アガロースゲルにて電気泳動した後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、UV クロスリンクを行った。次にメンブレンをハイブリダイゼーションバッファー [ 50%(v/v)formamide, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(250mM,pH7.2), NaCl(250mM), 7%(wt/vol)SDS, denatured salmon sperm (100 $\mu$ g/ml)] で 4 時間、42°Cにてプレハイブリダイゼーションを行った後、上述のハイブリダイゼーションバッファーに [ $\alpha$ -32P] でラベルした 17 $\beta$ -HSD type 1 cDNA あるいは 17 $\beta$ -HSD

type 2 cDNA プローブを加え、42°C で 18 時間、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄を 2×SSC + 0.1%SDS で室温、15 分間、次に 0.1×SSC + 0.1%SDS で室温、20 分間、最後に 0.1×SSC + 0.1%SDS で 55°C、30 分を 3 回行った後、-80 °C にて autoradiography を行った。

#### 4. 17β-HSD1 と 17β-HSD2 の RT-PCR

蛍光プライマー (fluorescent dye-labeled primer) を用いて RT-PCR を施行し、画像解析装置を利用することにより、ヒト胎児の各組織における 17β-HSD1 と 17β-HSD2 mRNA の半定量を行った。

今回の検討では、胎生 13 週(男児)と胎生 20 週(女児)の 2 例の胎児組織より抽出した total RNA と、17β-HSD1、17β-HSD2 及び β-actin の standard RNA を用いて RT-PCR を行った。ヒト胎児組織からの total RNA は上述と同じ塩化セシウム超遠心法にて抽出し、17β-HSD1、17β-HSD2 及び β-actin の standard RNA はこれらの cDNA を鋳型とし、T7 RNA polymerase により合成した。total RNA (0.2~2 μg) と standard RNA (0.02 ~ 2 amol) から SUPERSRIPT reverse transcript (Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.) を用いて cDNA を合成し、続いて 23

~28 サイクルの PCR を施行した。PCR 産物は 2% agarose gel に電気泳動した後、Gene Scanner 362 Fluorescent Fragment Analyzer (Perkin-Elmer Co., Foster City, CA) を用いてバンドの検出、定量を行った。

### 5. 免疫組織化学

#### (1)1 次抗体

17β-HSD2 の免疫組織化学には、Dr. Stefan Andersson (Cecil H. and Ida Green Center for Reproductive Biology Sciences, University of Texas Southwestern medical Center, Dallas, Texas) より供与されたマウス抗ヒト 17β-HSD2 モノクローナル抗体、mAb-C2-12 (subclass IgG1/κ) を用いた。これは、17β-HSD2 の C 末端の 375 番から 387 番のアミノ酸残基の合成タンパクに対する抗体である(20)。17β-HSD1 の免疫組織化学には、Dr. Vihko (Dept. Clinical Chemistry, University of Oulu, Oulu, Finland) より供与されたウサギ抗ヒト 17β-HSD1 ポリクローナル抗体を用いた。この抗体は、ヒト胎盤より抽出した 17β-HSD1 に対する抗体である。

#### (2)免疫組織化学

今回検討した症例は、胎盤に関しては胎生 4 週から 40 週までの計 31 例

(Table 5)、胎児に関しては胎生 11 週から 38 週までの計 10 例 (Table 4) である。免疫組織学は Histofine Kit (Nichirei Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用い、Avidin-biotin complex 法にて施行した。

まず、パラフィン包埋された組織を  $3.0\mu\text{m}$  に薄切し、シランコートされたスライドガラスにのせた。脱パラフィン後、 $17\beta\text{-HSD2}$  に使用する切片は、抗原賦活化のため、 $10\text{ mmol/L}$  のクエン酸バッファー (pH6.0) に浸し、 $120^\circ\text{C}$ 、5 分にてオートクレーブ処置を施行した(23)。その後、0.3%過酸化水素含メタノールに 30 分間浸して内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、つづいて非特異的な反応を阻止するため、正常ウサギ血清 ( $17\beta\text{-HSD2}$ ) あるいは正常ヤギ血清 ( $17\beta\text{-HSD1}$ ) と 30 分間反応させた。次に一次抗体を至適濃度に調製し、滴下、 $4^\circ\text{C}$  で約 18 時間反応させた。各抗体の希釈倍率は、 $17\beta\text{-HSD1}$  (1:500)、 $17\beta\text{-HSD2}$  (1:5) である。洗浄後、biotin 標識抗マウス IgG 抗体 ( $17\beta\text{-HSD2}$ )、あるいは biotin 標識ウサギ IgG 抗体 ( $17\beta\text{-HSD1}$ ) を 30 分反応させた後、peroxidase 標識 ストレプトアビジンを 30 分反応させた。最後に、 $0.06\text{mM}$  3,3' diaminobenzidine (DAB) +  $2\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $0.05\text{M}$  Tris (pH7.6) で発色させた後、ヘマトキシリンにて核染し、透徹封入した。

(倫理面への配慮)

なお、今回の実験プロトコールに関しては、東北大学医学部倫理委員会 の了承を得ている。

## C. 研究結果

### 1. 酵素活性

結果を表 1 にまとめる。肝臓における  $17\beta\text{-HSD}$  活性が他臓器に比較して有意に高く ( $p < 0.0001$ )、さらに胎盤の方が肝臓に比べ有意に高かった ( $p < 0.0001$ )。また、消化管、腎臓にも強い  $17\beta\text{-HSD}$  活性を認め、小腸における  $17\beta\text{-HSD}$  活性は脳、心臓、肺、副腎のものより有意に高かった ( $p < 0.01$ )。脳と副腎における  $17\beta\text{-HSD}$  活性は極めて低く、心と肺においては  $17\beta\text{-HSD}$  活性を全く検出できなかった。補酵素に関する検討では、肝、消化管、腎において、NAD(H) を用いた場合の方が NADP(H) を用いた場合よりも有意に高かった ( $p < 0.001$ )。

### 2. Northern blot analysis

$1.3\text{kb}$  の  $17\beta\text{-HSD1}$  mRNA の発現は胎盤においてのみ認められた (Figure 1)。一方、 $1.5\text{kb}$  の  $17\beta\text{-HSD2}$  mRNA は、胎盤、肝臓、空腸、回腸、及び直腸において強い発現を認めたほか、胃、十二指腸、S 状結腸、

子宮、腎臓及び膀胱においても弱い発現を認めた。

### 3. RT-PCR

結果を表2に示す。数値は、 $\beta$ -actin の発現量を基準とし、各組織において発現している  $17\beta$ -HSD1 と  $17\beta$ -HSD2 の mRNA 量を相対的に表したものである。 $17\beta$ -HSD1 は、胎盤で最も強い発現を認め、脳、肺、心臓、腎臓においても弱い発現を認めた。 $17\beta$ -HSD2 は、胎盤、肝臓、消化管、腎臓において強い発現を認めた。アイソザイム間での比較では、胎盤、脳、心臓、肺、副腎では  $17\beta$ -HSD1 が優位に発現しており、逆に肝臓、消化管、腎臓では  $17\beta$ -HSD2 が優位に発現していることが示された。

### 4. 免疫組織化学

胎児組織における  $17\beta$ -HSD2 の免疫染色の結果を表3に示す。肝臓と小腸においては、胎生早期から末期まで通して強い発現が認められた。胃、大腸、及び腎臓においては、胎生初期には発現が見られなかったが、胎生中期頃より発現し始め、胎生末期にかけて発現が増強した。胃では、 $17\beta$ -HSD2 は表層上皮細胞に染色が認められ、胃底腺には染色を認めなかった。小腸及び大腸では、吸収上皮細胞に染色を認め、粘膜下層や筋層には染色を認めなかった。肝臓では、肝細

胞に強い染色を認めた。腎臓では、髄質の尿細管周囲の間質細胞にのみ染色を認め、尿細管や糸球体には染色を認めなかった。胎生 20 週の胎児から採取した皮膚組織において  $17\beta$ -HSD2 の免疫染色を施行したところ、表皮には染色は認めず、皮脂腺に染色を認めた。 $17\beta$ -HSD1 に関しては、胎児組織では特異的な染色像は得られなかった。

### D. 考察

$17\beta$ -HSD1 は、NADPH を補酵素として E1 を E2 へと還元し、エストロゲン活性を高める役目をしている。一方  $17\beta$ -HSD2 は、NAD<sup>+</sup> を補酵素として E2 を E1 へ、あるいは Testosterone を Androstenedione に酸化し、エストロゲンやアンドロゲンを生物学的活性の低い方へ変換する働きをしている。従って、 $17\beta$ -HSD1 と  $17\beta$ -HSD2 の発現のパターンは、組織におけるエストロゲン活性の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

今回のヒト胎児を用いた検討では、肝臓、消化管、腎臓において E2 から E1 へと変換する活性が強く認められ、またこれらの組織では Northern blot analysis において  $17\beta$ HSD2 mRNA の発現を強く認めた。このことは、 $17\beta$ -HSD2 が mRNA 及び蛋白レベルで発現しており、これらの組織中で

E2 が E1 へと変換されていることを示すものである。しかし一方、これらの組織では E1 から E2 へと変換する活性も認められ、しかも Northern blot analysis では  $17\beta$ -HSD1 mRNA の発現は認められなかった。これに対する理由は現在のところ明らかではない。文献的には、intact cell を使った検討では E1 から E2 または E2 から E1 への一方にしか反応が進まないのに、それをホモジネートにして検討すると両方向に反応が進むことが報告されている。Intact cell を用いた場合には酵素活性が細胞中に存在する補酵素の量に依存するのに対し、ホモジネートの場合は過剰量の補酵素が加えられる点、ホモジネートにして細胞を砕いてしまうと細胞内環境が変わってしまうことなどが理由として考えられている。いずれにせよ、Enzyme assay において  $17\beta$ -HSD1 様の反応 (E1 から E2 への変換) が起きているにもかかわらず  $17\beta$ -HSD1 mRNA が Northern blotting で検出できないことに関しては、今後検討が必要である。

今回、蛍光プライマーを用いて RT-PCR を行うことにより、胎児各組織における  $17\beta$ -HSD1 と  $17\beta$ -HSD2 mRNA の定量を行った。RT-PCR は非常に感度が高く、Northern blot analysis では検出することのできなかったレベルの mRNA の発現も

検出された。脳、心臓、肺、副腎においては  $17\beta$ -HSD1 が優位に発現していた。このことは、これらの臓器において局所的に E1 が E2 へ変換されてエストロゲンが活性化され、それによって組織の増殖及び分化に関わっている可能性が考えられた。一方、肝臓、消化管、腎臓においては  $17\beta$ -HSD2 が優位に発現しており、これは Northern blot analysis の結果と一致した。

我々は又免疫組織学によってヒト胎児における  $17\beta$ -HSD1 と  $17\beta$ -HSD2 の局在を明らかにした。ヒト胎児組織では、Northern blot analysis で  $17\beta$ -HSD2 mRNA の発現を認めた消化管において、胃の表層上皮細胞と、小腸及び大腸の吸収上皮細胞に発現を認めた。消化管上皮における  $17\beta$ -HSD2 は、吸収する前に E2 を不活化するのに関わっていると考えられてきた。胎生早期より小腸の吸収上皮に強い発現を認めたが、これは飲み込まれた羊水中に含まれる E2 を吸収前に不活化しているものと考えられた。胃及び大腸では、胎生中期から後期にかけて発現が増強してきたが、これは羊水中のエストロゲン濃度が高くなるにつれて発現が増えてくるものと思われた。肝臓では、胎生初期より強い発現を認めたが、これにより消化管から吸収された E2 が門脈を通じて肝臓へと運ばれ、そこで E1 へと変換、

不活化されるものと考えられた。このように大量の E2 は、胎児循環に入って様々の組織に達する前に、胎盤、消化管上皮、肝臓において E1 へと変換され、エストロゲン活性が弱められている。これまで、DES を投与された妊婦から生まれた児で見られるように、過剰なエストロゲンへの曝露は胎児の発育に悪影響を及ぼすと考えられてきた。通常の妊娠時において、胎児は母体血あるいは羊水中に含まれる大量のエストロゲンを体内にとりこんでおり、それをいかに代謝しているのかに関して非常に興味深いところであった。今回明らかにしたこの 17 $\beta$ -HSD2 の胎児各組織における発現は、過剰なエストロゲンに対するバリアとしての機能を果たしている可能性が考えられた。

腎臓では、髄質の尿細管周囲の間質細胞において強い発現を認めたが、その生物学的意義としては、おそらく尿細管が未熟なために間質へと漏れだしてくる E2 を不活化するのに働いているのであろうと考えている。また皮膚においては、皮脂腺において発現を認め、表皮には発現を認めなかった。従って、羊水中に含まれている E2 は皮膚から浸透して入り込む可能性が考えられる。また、成人の皮膚では、17 $\beta$ -HSD2 は皮脂の産生に関与していることが報告されており、今回の結果から、胎児の皮膚においてすでに皮脂が産生されている可能性が示唆された。

17 $\beta$ -HSD は、現在のところ 6 つのアイソザイムが報告されている。これらに関してはまだ明らかになっていない部分が多いが、胎児における性ステロイド代謝に何らかの役割を果たしていることが予想される。これまでのところ、マウスの胎児で 17 $\beta$ -HSD の type 1, 2, 4, 5 が発現しているという報告が出されている。胎児におけるエストロゲン代謝に関しては、これらのアイソザイムや、エストロゲンレセプターの発現などに関し、さらなる検討が必要と思われる。

## E. 結論

ヒト胎児組織では、増殖及び分化にエストロゲンを必要とする局所では 17 $\beta$ -HSD1 を発現し、エストロゲン活性を高めていると考えられた。また肝臓、消化管では 17 $\beta$ -HSD2 を発現し、E2 を E1 へと変換してエストロゲン活性を弱めることによって局所におけるエストロゲン活性を制御していると考えられた。またそれは、過剰のエストロゲンへの曝露に対するバリアとしての役割を果たしているものと推察された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takeyama j, Suzuki T, Hirasawa G, Muramatsu Y, Nagura H, Iinuma K, Nakamura J, Kimura

K,

Yoshihama M, Harada N, Andersson S, **Sasano H**

17  $\beta$  -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 expression in the human fetus

The Journal of Clinical Endocrine Society 2000 85:410-416

2. Amari M, Suzuki A, Moriya T, Yoshinaga K, Amano G, **Sasano H**, Ohuchi N, Satomi S, Horii A.

LOH analyses of premalignant and malignant lesions of human breast: frequent LOH in

8p, 16q, and 17q in atypical ductal hyperplasia.

Oncology Report 1999 6:1277-80

3. Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, **Sasano H**.

Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical

localization and characterization.

Fertility and Sterility 1999 72:720-6

4. Coulter CL, Smith RE, Stowasser M, **Sasano H**, Krozowski ZS, Gordon RD.

Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11betaHSD-2) in the

developing human adrenal gland and human adrenal cortical carcinoma and adenoma.

Molecular and Cellular Endocrinology 1999 20:71-7

5. Fukushima K, Sasaki I, Sato S, **Sasano H**, Krozowski Z, Matsuno S.

Induction of mineralocorticoid receptor by sodium butyrate in small intestinal (IEC6) and colonic (T84) epithelial cell lines.

Digestive Disease and Science 1999 44:1571-8

6. Ohashi Y, **Sasano H**, Yamaki H, Shizawa S, Kikuchi A, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H.

Topoisomerase II alpha expression in esophageal squamous cell carcinoma.

Anticancer Research 1999 19:1873-80

7. Ohashi Y, **Sasano H**, Yamaki H, Shizawa S, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H.

Cell cycle inhibitory protein p27 in esophageal squamous cell carcinoma.

Anticancer Research 1999 19:1843-8

8. Suzuki T, Kimura N, Shizawa S, Yabuki N, Yamaki T, **Sasano H**, Nagura H.

Yolk sac tumor of the stomach with an adenocarcinomatous component: A case report with immunohistochemical analysis.

Pathology International 1999 18;49:557-562

9. **Sasano H**, Murakami H, Shizawa S, Satomi S, Nagura H, Harada N.

Aromatase and sex steroid receptors in human vena cava.

Endocrine Journal 1999 ;46:233-42

10. Shimono K, Tsutsumi K, Yaguchi H, Omura M, **Sasano H**, Nishikawa T.

Lipoprotein lipase promoting agent, NO-1886, modulates adrenal functions: species

difference in effects of NO-1886 on steroidogenesis.

Steroids 1999 64:453-9

11. Midorikawa S, Hashimoto S, Kuriki M, Katoh K, Watanabe T, **Sasano H**, Nishikawa T.

A patient with preclinical Cushing's syndrome and excessive DHEA-S secretion having

unilateral adrenal carcinoma and contralateral adenoma.

Endocrine Journal 1999 46:59-66

12. Watanabe F, Oki Y, Ozawa M, Masuzawa M, Iwabuchi M, Yoshimi T, Nishiguchi T, Iino K, **Sasano H**.

Urocortin in human placenta and maternal plasma.

Peptides 1999 20:205-9

13. Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, **Sasano H**, Coulter C, Cole T, Sheppard KE.

The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular and Biology 1999 69:391-401

14. Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, **Sasano H**, Shirato K, Shibahara S.

Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of

macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis.

Clinical Science 1999 97:247-251

15. Kato K, **Sasano H**, Ohara S, Sekine H, Mochizuki S, Mune T, Yasuda K, Nagura H, Shimosegawa T, Toyota T, Krozowski Z.

Coexpression of mineralocorticoid receptors and 11beta-hydroxysteroid

dehydrogenase 2

in human gastric mucosa.

Journal of Clinical Endocrinology  
and Metabolism 1999 84:2568-73

16. Harada N, Sasano H,  
Murakami H, Ohkuma T, Nagura H,  
Takagi Y.

Localized expression of  
aromatase in human vascular  
tissues.

Circulation Research 1999  
11;84:1285-91

17. Iino K, Sasano H, Oki Y,  
Andoh N, Shin RW, Kitamoto T,  
Takahashi K, Suzuki H, Tezuka F,  
Yoshimi T, Nagura H.

Urocortin expression in the  
human central nervous system.

Clinical Endocrinology (Oxf)  
1999 50:107-14

18. Matsuzaki S, Fukaya T,  
Suzuki T, Murakami T, Sasano H,  
Yajima A.

Oestrogen receptor alpha and  
beta mRNA expression in human  
endometrium throughout the  
menstrual cycle. Mol Hum  
Reprod 1999 5:559-564

19. Konno R, Igarashi T,  
Okamoto S, Sato S, Moriya T,  
Sasano H, Yajima A.

Apoptosis of human  
endometrium mediated by perforin

and granzyme B

of NK cells and cytotoxic T  
lymphocytes.

Tohoku Journal Experimental  
Medicine 1999 187:149-55

20. Imai T, Tobinaga J, Morita-  
Matsuyama T, Kikumori T, Sasano  
H, Seo H,

Funahashi H.

Virilizing adrenocortical  
adenoma: in vitro steroidogenesis,  
immunohistochemical studies of  
steroidogenic enzymes, and gene  
expression of corticotropin  
receptor.

Surgery 1999 125:396-402

21. Boman F, Vantyghem MC,  
Querleu D, Sasano H. Virilizing  
ovarian dermoid cyst with  
peripheral steroid cells. A case  
study with immunohistochemical  
study of steroidogenesis.  
International Journal of  
Gynecological Pathology 1999  
18:174-7

22. Hirasawa G, Sasano H,  
Suzuki T, Takeyama J, Muramatu Y,  
Fukushima K,

Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H,  
Krozowski ZS. 11Beta-  
hydroxysteroid dehydrogenase  
type 2 and mineralocorticoid  
receptor in human fetal

development. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999; 84:1453-8

23. Morohashi K, Tsuboi-Asai H, Matsushita S, Suda M, Nakashima M, Sasano H, Hataba Y, Li CL, Fukata J, Irie J, Watanabe T, Nagura H, Li E. Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 gene-disrupted mouse. Blood 1999;93:1586-94

24. Sasano H, Suzuki T, Matsuzaki Y, Fukaya T, Endoh M, Nagura H, Kimura M.

Messenger ribonucleic acid in situ hybridization analysis of estrogen receptors alpha and beta in human breast carcinoma. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999;84:781-5

25 笹野公伸

環境ホルモンと疾患

仙台医師会報 1999;420:3-6

26 笹野公伸、鈴木貴

Endocrinology から  
Intracrinologyへ

最新医学 1999;54:65-69,

27 笹野公伸、鈴木貴

液性内分泌学 (Endocrinology)から細胞組織内分泌学 (Incrinology)へ  
病理と臨床 1999;17:239

28 笹野公伸、金子智香、井上絢子

内分泌細胞の鑑別染色法 グリメリ

ウス法 (銀親和性反応)

月刊 Medical Technology 別冊  
新染色法のすべて 1999;185-186

29 笹野公伸、金子智香、井上絢子  
内分泌細胞の鑑別染色法 ゴモリのアルデヒド・フクシン染色 (井上の変法)

月刊 Medical Technology 別冊  
新染色法のすべて 1999;189-190

30 笹野公伸、金子智香、井上絢子  
内分泌細胞の鑑別染色法 五重染色法 (井上の変法)

月刊 Medical Technology 別冊  
新染色法のすべて 1999;193-194

31 笹野公伸、鈴木貴、伊達文子  
内分泌細胞の鑑別染色法 酵素抗体法

月刊 Medical Technology 別冊  
新染色法のすべて 1999;195-196

32 笹野公伸

病理組織診断

からだの科学 (増刊) がん検診  
1999;90-93

33 笹野公伸、鈴木貴

in situ hybridization 法の簡易法及び自動化

組織培養工学 1999;25:41-48

34 笹野公伸、並木恒夫

子宮体部類内膜癌と分化度

腫瘍鑑別診断アトラス子宮体部  
1999;71-82

35 笹野公伸、伊藤潔

婦人科病理における細胞周期蛋白検

索

病理と臨床 1999 ; 17: 817-822

36 鈴木貴、武山淳二、笹野公伸

ステロイド合成に関する転写制御

因子 : Ad4BP と COUP- TF

病理と臨床 1999 ; 17:851- 855

37 笹野公伸、木村憲治、下瀬川徹

糖質コルチコイドとアポトーシス

内分泌・糖尿病科 1999 ; 9:19-25

38 笹野公伸、伊達文子

免疫組織化学 : 方法論- 市販染色キットを用いた場合の注意点を中心として-

組織細胞化学 1999 ; 22-28

39 笹野公伸、鈴木貴、深谷孝夫、

松崎幸子、木村道夫

ヒト乳癌におけるエストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  mRNA の発現と局在

ホルモンと臨床 (増刊) 1999 ;

47:116- 117

40 鈴木貴、鈴木聡、坪地宏嘉、平澤元、武山淳二、村松康成、小池加保児、

立野紘雄、Zygmunt S Krozowski、笹野公伸

ヒト肺組織における  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type2 および

corticosteroid receptor の局在

ホルモンと臨床 (増刊) 1999 ;

47:186-187

41 笹野公伸、鈴木貴、坂元和宏、森谷卓也

婦人科領域に発生する神経内分泌腫瘍

病理と臨床 1999 ; 17:1279-1282

2. 学会論文

1 Immunohistochemistry of aromatase- a recent new development

Sasano H.

Anomatase Inhibition into the new Millennium, Nice, France; November 12- 13;1999

2 Correlation between hsp70 and DNA single-strand breaks increase in postischemic gerbil brain

Tobita M, Kawagoe J, Ogino M, Suga S, Yabuki N, Sasano H, Itoyama Y, Kogure K.

Brain PET'99 Second announcement Copenhagen, Denmark; June 13- 17;1999

3 Single-strang breaks increase in adult respiratory distress syndrome

Tobita M, Sasano H, Iwasaki Y, Itoyama Y, W.W.Tourtellotte.

Brain PET'99 Second announcement Copenhagen, Denmark; June 13- 17;1999

4  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type and in human fetus