

原 著

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) への 周産期曝露は胎仔脊椎脊髄におけるケモカイン 遺伝子 *Cxcl4*, *Cxcl7* の発現を増強させる

前 川 慎 吾¹⁾, 川 崎 晋 睦¹⁾, 谷 口 直 史¹⁾,
三 井 哲 雄²⁾, 浜 田 良 機¹⁾

¹⁾ 山梨大学大学院医学工学総合研究部整形外科学講座

²⁾ 同・生理学講座第1

要 旨：ベトナム戦争退役軍人の子どもの出生異常を解析した報告によると、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) を含む枯葉剤への曝露と、その子どもの二分脊椎を代表とする神経管閉鎖障害 (NTD) のリスクとの関連が示唆され、TCDD への曝露は NTD の発症危険因子の1つとなる可能性があると考えられている。

そこで我々は、NTD 発症に関与する遺伝子を解析する目的で、以下の実験を行った。低用量の TCDD (TCDD 曝露群) とコーン油 (対照群) を、妊娠 12.5 日目のマウス各 6 匹ずつに単回経口投与し、6 日後に 1 匹の妊娠マウス体内より雌雄の胎仔各 1 匹ずつ、各群 12 匹、計 24 匹の全脊椎脊髄を個別に採取し、RNA を抽出した。そして、Real-Time PCR 法にて 6 種類の遺伝子 (*SFRP2*, *S100A8*, *Cxcl4*, *Cxcl7*, *Cxcr2*, *Cxcr3*) につき、TCDD 曝露による胎仔脊椎脊髄内の RNA レベルでの発現量の変化を検討した。

その結果、発現量が増加する遺伝子として、*Cxcl4* と *Cxcl7* のケモカインを初めて見出した。さらに *Cxcl4* では *In situ hybridization* 法により発現の増強を認めた。

以上の結果は、*Cxcl4* や *Cxcl7* が、TCDD の脊椎脊髄発達毒性機構に重要な役割を果たすことを示唆するもので、二分脊椎を始めとする NTD の発症にも関与している可能性があると考えられる。

キーワード TCDD, ケモカイン, *Cxcl4*, *Cxcl7*, 脊椎脊髄

はじめに

ベトナム戦争退役軍人の子どもの出生異常を解析した報告で、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) を含む枯葉剤への曝露と、その子どもの二分脊椎 (spina bifida) を代表とする神経管閉鎖障害 (neural tube defects; NTD) のリスクとの関連が示唆された¹⁾。その後米国科

学アカデミー (National Academy of Sciences; NAS) は、枯葉剤曝露とベトナム戦争退役軍人の子どもの二分脊椎のリスクとの関連について、限られているが示唆的 (limited/suggestive) な証拠があると結論している²⁾。NTD は先天異常であり、複数のポリジーンと環境要因の相互作用による多因子遺伝と考えられており³⁾、TCDD への曝露は二分脊椎を始めとする NTD の発症危険因子の1つとなる可能性があると考えられている。

TCDD は、発癌性、免疫毒性、生殖毒性などヒトに種々の毒性をもつことが懸念されてい

る⁴⁾。また、疫学的にヒトの脳の発達や高次機能に影響することが示唆され⁵⁾、げっ歯類においては脳神経系に種々の生化学的変化を惹起することが確かめられている⁶⁻¹²⁾。さらに、妊娠ラットへの投与が胎仔脳の形態や成長後の行動に影響することも報告されているが¹³⁻¹⁷⁾、このような脳神経毒性が惹起される分子機構は未だ明らかでない¹⁸⁾。また、TCDDは母体に影響のない程度の低用量曝露でも、仔動物がこの曝露に対して極めて感受性の高い臨界時期に胎盤あるいは母乳を介して曝露されると、仔動物の生殖器官の発育や精神運動行動に影響を与えることが知られている¹⁹⁾。

そこで今回の研究では、TCDDによる脊椎脊髄の発達毒性機構を明らかにするため、妊娠マウスのTCDDへの周産期曝露が、体内の胎仔脊椎脊髄内の遺伝子発現をどのように変化させるかを検討した。また、胎仔全脊椎脊髄は頭尾側方向に約10mmと非常に小さく、得られるRNAが少ない。そのため、2004年に共同著者の川崎が、TCDDに周産期曝露した胎仔脳内に増強を見出したWntシグナルの抑制因子である*Secreted Frizzled Related Protein2 (SFRP2)*、脳の炎症過程やアルツハイマー病ならびに脳虚血障害において、活性化した常在ミクログリア細胞にも発現をみる*S100A8*^{20,21)}、2006年に共同著者の谷口が、TCDDに周産期曝露した胎仔脳内に増強を見出したケモカイン (chemokine) 遺伝子である*Cxcl4*と*Cxcl7*、以上4遺伝子に関して、Real-Time PCR法にて胎仔脊椎脊髄内のRNAレベルでの発現量の変化を検討した。本研究で同定した種々のTCDD応答遺伝子は、TCDDの脊椎脊髄発達毒性発現機構の解明に役立つだけでなく、TCDDの影響を評価するためのバイオマーカーとして、TCDDのリスクアセスメントの確立にも貢献し得ると考えられる。

材料および方法

(A) TCDD

Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, U.S.A.) から購入したTCDD (50 µg/ml, ノナン溶液) を、妊娠マウスに影響のない低用量TCDD¹⁹⁾ とするため、含量が0.5 µg/mlとなるようにコーン油に溶解し、5.0 µg/kgのTCDDをマウス用胃ゾンデにて経口的に単回投与した。対照には10 ml/kgのコーン油を同様に投与した。

(B) 実験動物

実験動物はC57BL/6Nマウスを用い、日本クレア株式会社から購入した。マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て動物実験施設内で行った。

低用量TCDD 5.0 µ/kgとコーン油 10 ml/kgを、胎仔のTCDDへの感受性が高いと考えられる妊娠12.5日目¹⁹⁾のC57BL/6Nマウス各6匹ずつに単回経口投与し、TCDD曝露群と対照群とした。投与後6日で1匹の妊娠マウス体内より雌雄の胎仔各1匹ずつ、各群12匹、計24匹の全脊椎脊髄を個別に採取した。

なお、両群とも実験に使用した胎仔は、子宮内で異性に挟まれていないものを選んだ。そして雌雄の判定は、各胎仔の一部からDNAを抽出し、Forward primer: 5'-TGCATTTATGGTGTGGTCCC-3', Reverse primer: 5'-GCTGCAGGTGCCAGTG-3'のプライマーを用いて、Y染色体上の*Sry*をPCR法で増幅し、*Sry*がある場合を雄と判定した。

(C) TCDDへの曝露による胎仔脊椎脊髄内の遺伝子発現の解析

TCDD曝露群、対照群とも、全脊椎脊髄より個別にRNAを抽出した。なお、RNA抽出に際しては、QIAGEN社製のRNeasy Lipid Tissue Mini Kitを用いた。

Real-Time PCR法 (TaKaRa社製SYBER RT-PCR Kit; Applied Biosystems社製7500 Real Time PCR system) での解析において、 β -actinやglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)と同様にどの組織でも発現量に変化のない内部コントロール遺伝子としてcy-

clophilin (Forward primer: 5'-TGGCAAAT-GCTGGACCAAAA-3', Reverse primer: 5'-TGC-CATCCAGCCATTTCAGT-3')²²⁾を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて以下のように発現量を比較した。

ΔCt : 目的遺伝子のサイクル数(Ct) - Cyclophilin の Ct

$\Delta\Delta Ct$: 対照群のサンプルの ΔCt - TCDD 暴露群のサンプルの ΔCt

目的遺伝子における対照群と TCDD 暴露群との発現量の比較: $2^{(\Delta\Delta Ct)}$

なお, Mann-Whitney's U test のノンパラメトリック検定にて, 統計的な有意差を検討し, $p < 0.05$ を有意と判定した。

(D) *In situ* hybridization 法による対象遺伝子の発現部位と発現量の解析

TCDD への曝露により発現量が増加した遺伝子について, cDNA 由来の cRNA プローブと脊椎脊髄切片を用いて *In situ* hybridization 法で, 脊椎脊髄内の RNA の局在と TCDD 曝露による発現量の変化を調べた。

cRNA プローブは, [³⁵S] UTP でラベルしたものを作製した。胎仔を摘出後, 直ちに胎仔の心臓に 4% パラホルムアルデヒドを注入し, 灌

流固定を行った。さらに 4°C 下で 1 週間浸透固定を行い, -20°C で保存。そして 20 μm の切片を Mikron 社製の凍結切片作成装置 (MICROM HM550) で作製し, 切片をスライドガラスに貼り付けて -80°C で保存。これを室温に戻し, proteinase K (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 30 分間・37°C で処理し, アセチル化・脱水を行った後, 55°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後, 切片を RNase A で 30 分処理し, 0.1 \times SSC で 60°C で 30 分間洗浄した。シグナルの検出は, X 線フィルムに約 4 日間曝露させて行った。

結 果

(A) Real-Time PCR 法による解析

妊娠 18.5 日目の TCDD 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露群 6 匹と対照群 6 匹の解析結果では, *SFRP2* は, TCDD 曝露群は対照群に比べて, 雌雄ともに発現量には有意差を認めなかった (雄 1.58 ± 0.30 (mean \pm S.D.); 雌 1.50 ± 0.25)。また, *S100A8* は, TCDD 曝露群は対照群よりも, 雌のみに約 2 倍の発現量増加を示したが, 雄では

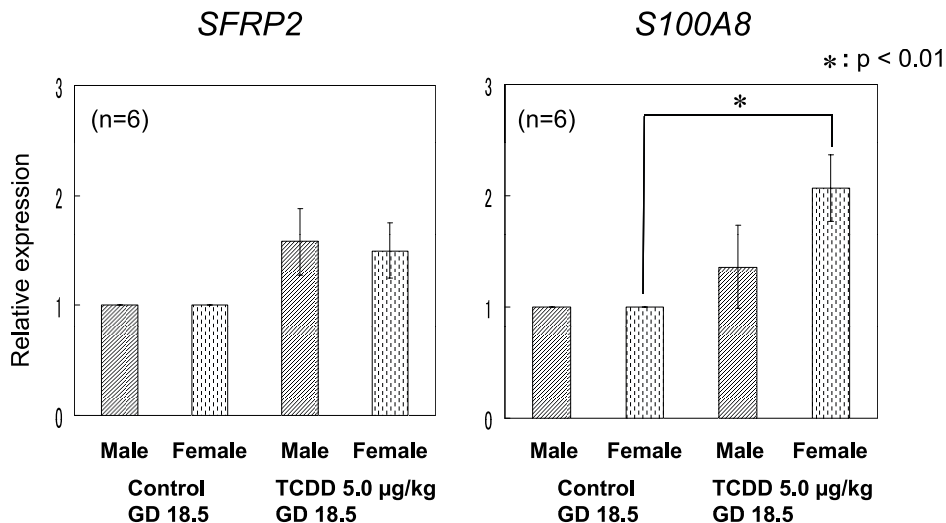


図 1. Real-Time PCR 法による *SFRP2* および *S100A8* 遺伝子発現の解析
SFRP2: TCDD 曝露群は対照群に比べて, 雌雄ともに発現量に有意差を認めなかった。
S100A8: TCDD 曝露群は対照群よりも, 雌のみに約 2 倍の発現量増加を示したが, 雄では発現量に有意差を認めなかった。縦軸は, relative expression である。

発現量には有意差を認めなかった (雄 1.36 ± 0.37 ; 雌 2.07 ± 0.30 , $p < 0.01$) (図1)。一方, *Cxcl4* は, TCDD 曝露群は対照群よりも, 雌雄ともに約2倍の発現量増加 (雄 1.90 ± 0.49 , $p < 0.01$; 雌 2.01 ± 0.52 , $p < 0.01$) を, また *Cxcl7* も, 雌雄ともに約7倍以上の発現量増加 (雄 7.10 ± 1.80 , $p < 0.01$; 雌 8.74 ± 1.74 , $p < 0.01$) を示した (図2)。なお, TCDD に用量依存性に増加することが知られている *Cyp1b1* についても, 約3.6倍の発現量増加 (雄 3.56 ± 0.47 , $p < 0.01$; 雌 3.62 ± 0.93 , $p < 0.01$) を認めた。

そこで, TCDD への周産期曝露により胎仔脊椎脊髄内で, 雌雄ともに発現量に増強を認めたケモカイン遺伝子である *Cxcl4* と *Cxcl7* のレセプターについて, Real-Time PCR法にて胎仔脊椎脊髄内での発現の差異を検討した。妊娠18.5日目のTCDD $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露群6匹と対照群6匹からの解析結果では, *Cxcl7* のレセプターである *Cxcr2* は, TCDD 曝露群は対照群に比べて, 雌雄ともに発現量には有意差を認めなかった (雄 1.22 ± 0.13 ; 雌 0.96 ± 0.32)。また, *Cxcl4* のレセプターである *Cxcr3* も, 雌雄とも

に発現量には有意差を認めなかった (雄 0.76 ± 0.13 ; 雌 0.90 ± 0.18) (図3)。

(B) *In situ hybridization* 法による解析

Real-Time PCR法にて, TCDDへの周産期曝露により胎仔脊椎脊髄内で, 雌雄ともに発現量に有意な増強を認めた *Cxcl4* と *Cxcl7* について, TCDD 曝露群と対照群の胎仔マウスの矢状断での脊椎脊髄切片を作製し, その発現部位を *In situ hybridization* 法で解析した。TCDD 曝露群では, 脊髄の最表層または軟膜, 椎体, 椎弓, 黄色靭帯に, 対照群と比して *Cxcl4* の発現の増強を認めた (図4)。Sense Probe では radioactivity を検出しなかった。

なお, Real-Time PCR法による解析で, TCDD 曝露群は対照群よりも約7倍以上の発現量増加をみる *Cxcl7* では, 両群とも *Cxcl7* のRNAの量が少なく, *In situ hybridization* 法では解析できなかった。

考 察

ケモカインは, 特定の白血球サブセットの遊

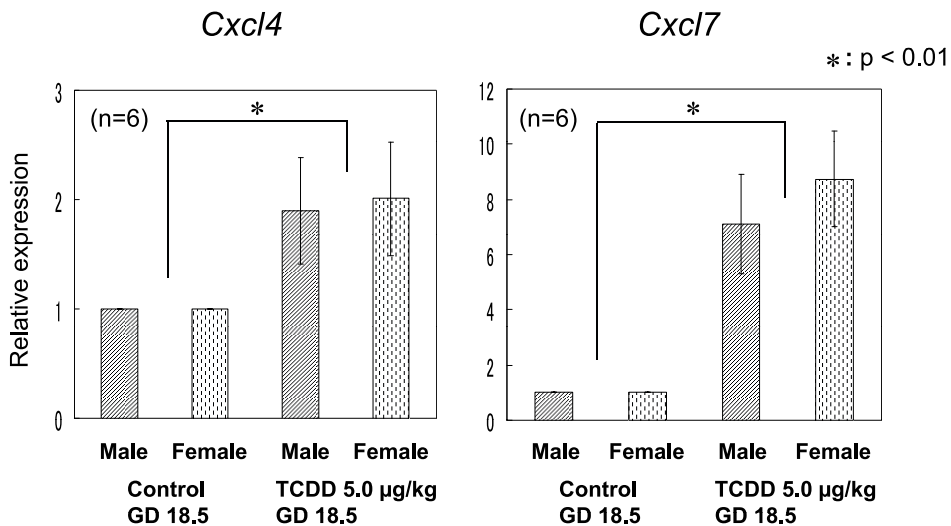


図2. Real-Time PCR法による *Cxcl4* および *Cxcl7* 遺伝子発現の解析
Cxcl4: TCDD 曝露群は対照群よりも, 雌雄ともに約2倍の発現量増加を示した。
Cxcl7: TCDD 曝露群は対照群よりも, 雌雄ともに約7倍以上の発現量増加を示した。
 縦軸は, relative expression である。

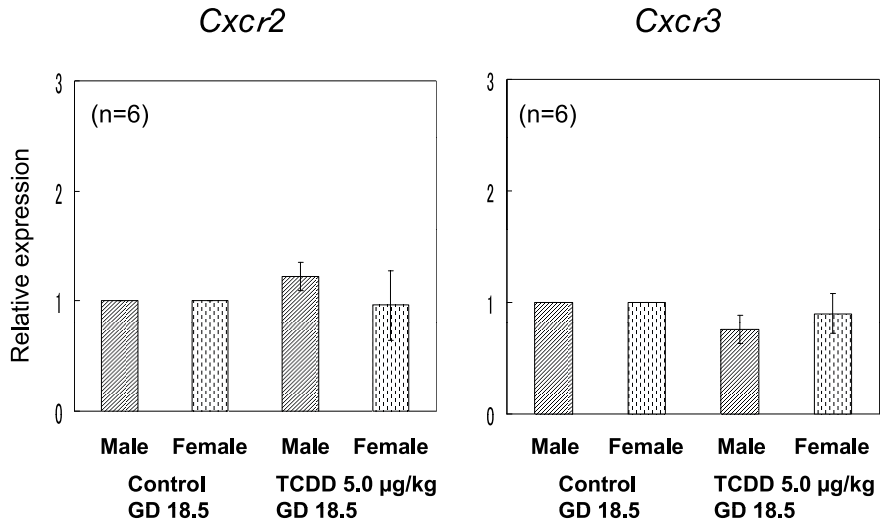


図3. Real-Time PCR法による *Cxcr2* および *Cxcr3* 遺伝子発現の解析
Cxcl7 のレセプターである *Cxcr2* : TCDD 曝露群は対照群に比べて、雌雄ともに発現量に有意差を認めなかった。*Cxcl4* のレセプターである *Cxcr3* : TCDD 曝露群は対照群に比べて、雌雄ともに発現量に有意差を認めなかった。縦軸は、relative expression である。

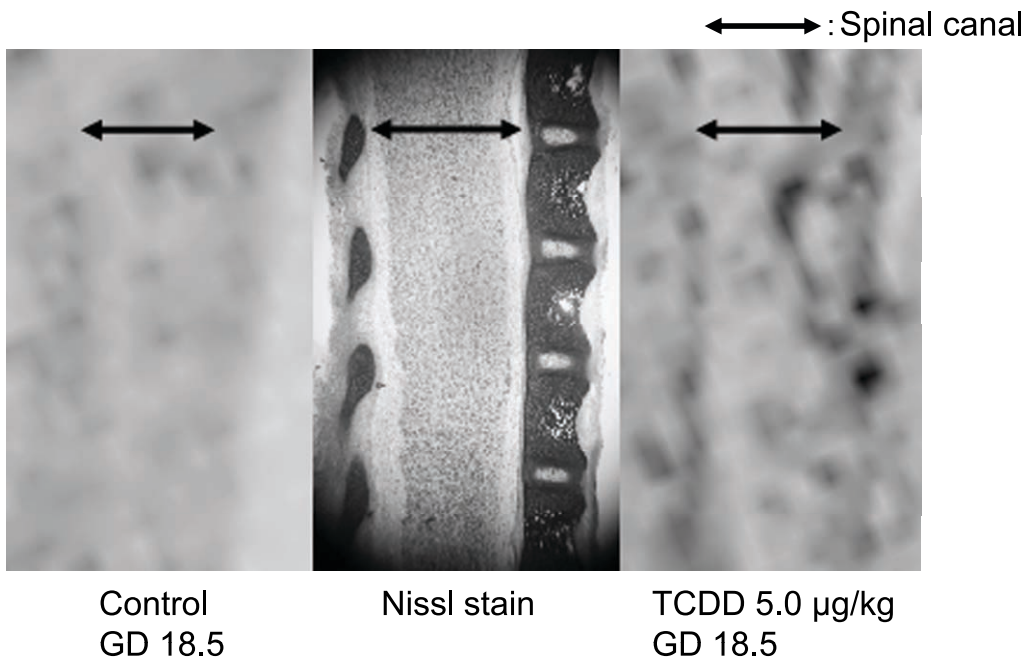


図4. 脊椎脊髄切片を用いた *In situ* hybridization 法による *Cxcl4* の発現部位と発現量の解析
Cxcl4 の cRNA プロブを用いて *In situ* hybridization を施行した。矢状断で作製された脊椎脊髄切片上に *Cxcl4* が強く発現しており、脊髄の最表層または軟膜、椎体、椎弓、黄色靭帯に、対照群と比して TCDD 曝露群では発現量が増強している。

走作用・活性化を支配する一連のサイトカインとして発見されたものの総称である。主に好中球や単球に作用し、急性や慢性炎症における白血球浸潤を誘導する因子として研究されてきた。近年、リンパ球や樹状細胞を主な標的細胞とするケモカイン群の存在が明らかになり²³⁾、リンパ球や樹状細胞の体内での移動や局在の制御に関して分子レベルで解明されつつある²⁴⁾。さらに、ケモカインは炎症や免疫応答での細胞遊走のみではなく、発生、自然免疫、癌、ウイルス感染などのさまざまな分野でも重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた²⁵⁻²⁷⁾。

ケモカインは分子内に保存されたシステイン残基 (Cys) をもち、この分子構造上の位置より CXC, CC, C, CX3C の4つの subfamily に分類されている。ヒトのケモカインとしては CXC family が15種類 (CXCL1 ~ 14,16), CC family が24種類 (CCL1 ~ 5,7, 8, 11, 13 ~ 28), C family が2種類 (XCL1, 2), CX3C family が1種類 (CX3CL1) の計42種類が知られている (The National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース)。また、マウスのケモカインは Cxc family が13種類 (Cxcl1, 2, 4, 5, 7, 9 ~ 16), Cc family が22種類 (Ccl1 ~ 9, 11, 12, 16, 17, 19 ~ 22, 24 ~ 28), C family が1種類 (Xcl1), Cx3c family が1種類 (Cx3cl1) の計37種類が見出されている (NCBI のデータベース)。

近年、ケモカインの中枢神経系でのさまざまな役割について報告されている。それによれば、Cxc family は脳における炎症や脳脊髄関門の破壊に対する消炎作用を有すること^{28,29)} や、Cxcl12 と Cxcr4 が海馬正常形成に重要な役割を果たすこと³⁰⁻³²⁾ や、Cxcl10 や Ccl5 などが中枢神経においてシナプス形成にかかわること^{33,34)} などが報告され、ケモカインは脳脊髄神経の可塑性と神経炎症や神経変性への防御に関与が強調されている³⁵⁾。さらに、単球走化性・活性化因子で、MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) として知られる Ccl2 は、ニ

分脊椎を始めとする NTD の発症に関与しているとの報告もある³⁶⁾。

今回、TCDD への周産期曝露により胎仔脊椎脊髄内で *Cxcl4*, *Cxcl7* の発現量が増強されることを初めて見出した。*Cxcl4* は Platelet factor-4 (PF-4) として知られており、生体内での機能は明らかにされていないものの、Intercellular adhesion molecule-1 の働きを阻害して血管内血栓形成に関与することが報告されている³⁷⁾。また、*Cxcl4* 欠損マウスでは出血傾向を示すことはなく、成長過程においても問題なく成獣となることや、また、プロタミン硫酸塩が存在すると *Cxcl4* 欠損マウスでは血栓形成が改善するが、逆に *Cxcl4* を過剰に発現するトランスジェニックマウスでは血栓形成が不良になるとの報告があり、血栓形成における *Cxcl4* の役割は詳細に解明されつつある^{38,39)}。一方、*Cxcl4* 欠損マウスにおいて中枢神経系の異常に関する報告はなく、*Cxcl4* の脊椎脊髄内における機能は不明である。しかし、*Cxcl4* のレセプターである *Cxcr3* に関連する報告⁴⁰⁻⁴²⁾ として、マウス脊髄損傷において *Cxcr3* のリガンドの1つである *Cxcl10* の発現の増強を認め、その抑制がマウス脊髄損傷の機能回復に関与しているとの報告もあり⁴³⁾、この報告と本実験結果を合わせ考えると、*Cxcl4* が脊髄機能に関与する可能性が示唆されたといえる。

Cxcl7 は Neutrophil activating peptide-2 (NAP-2) として知られており、微小血管内皮細胞に作用して血管新生作用などを示すが、脊椎脊髄内における機能は不明である。しかし、*Cxcl7* のレセプターである *Cxcr2* に関連する報告^{44,45)} として、胎生期の脊髄腹側に存在する希突起膠細胞前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell; OPC) に発現している *Cxcr2* に、そのリガンドの1つである *Cxcl1* が結合すると、OPC の白質での遊走が一時的に抑制され、OPC が増殖して希突起膠細胞へ分化し、髄鞘形成に関わることが知られている。さらに、*Cxcr2* 欠損マウスでは白質での OPC の減少・髄鞘形成障害を認めるとの報告もあり^{46,47)}、*Cxcl7*

が脊髄発生における OPC の遊走抑制や髄鞘形成に関わる可能性を示唆すると考えられる。

ダイオキシン類への周産期曝露により仔に行動異常や学習障害が生じること、神経形成に関与しているケモカインが存在すること、Cxcl4 のレセプターである Cxcr3 のリガンドの1つである Cxcl10 の抑制がマウス脊髄損傷の機能回復に関与していること、Cxcl7 のレセプターである Cxcr2 の欠損マウスでは脊髄白質での OPC の減少・髄鞘形成障害を認めることから、ダイオキシン類による脊椎脊髄の発達毒性に Cxcl4 と Cxcl7 のケモカインが関与していることが示唆された。

本来、二分脊椎は、背側正中部における椎骨の異常、特に椎弓の分離を意味しているが、臨床的には脊髄・脊椎の先天異常を広く包括し、脊髄における神経管の閉鎖障害による奇形全般を含む概念として用いられている。これは、二分脊椎が脊髄の異常に伴って二次的に生じるか、あるいはそれを合併する場合が多いためである。また、神経管と脊椎の形成から考えてみると、胎生期に表皮下で神経外胚葉の管状構造、すなわち神経管が形成され、その閉鎖障害が起こると、頭部では無脳症や脳瘤など、尾部では脊髄裂に代表される NTD が生じる。一方、体節から分かれた椎板細胞が遊走して神経管の左右の側面で椎弓の原基となり、背側へ広がって脊髄を取り囲むように左右の椎弓が形成され、その形成もしくは左右の椎弓の癒合がうまく行われないと二分脊椎が生じる。二分脊椎は脊髄が正常でも起こりうるが、多くの場合は、脊髄裂、脊髄髄膜瘤、髄膜瘤など NTD のために椎弓の形成が障害されることによって起こる。ダイオキシン類による脊椎脊髄の発達毒性に Cxcl4 と Cxcl7 の発現上昇が関与していることが示唆されたため、二分脊椎を始めとする NTD の発症にも Cxcl4 や Cxcl7 のケモカインが関与している可能性がある。

また、*In situ hybridization* 法において、胎仔脊椎脊髄内での TCDD 周産期曝露による Cxcl4 の発現増強が明らかになった。2006年に共同

著者の谷口が、胎仔脳皮質最表層または軟膜での TCDD 周産期曝露による Cxcl4 の発現増強を明らかにしているが、今後、その発現部位を詳細に特定し、さらに Cxcl4 の発現変化が惹起する他の遺伝子の発現変化を調べることなどにより、胎仔期脊椎脊髄形成における Cxcl4 の役割が解明されることが期待される。

結 論

周産期 TCDD 曝露による胎仔脊椎脊髄内遺伝子発現の変化を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、TCDD 周産期曝露で胎仔脊椎脊髄内に発現量が増加する遺伝子として、Cxcl4 と Cxcl7 のケモカインを初めて見出した。さらに Cxcl4 では *In situ hybridization* 法により発現の増強を認めた。以上の結果は、Cxcl4 や Cxcl7 が、脊椎脊髄系の発達や TCDD の脊椎脊髄発達毒性機構に重要な役割を果たすことを示唆しており、二分脊椎を始めとする神経管閉鎖障害の発症にも関与している可能性がある。(稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご協力を頂いた山梨大学大学院医学工学総合研究部生化学講座第1 前田秀一郎教授に陳謝いたします。)

文 献

- 1) Wolfe WH, Michalek JE, Miner JC, Rahe AJ, Moore CA, *et al*: Paternal serum dioxin and reproductive outcomes among veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*, **6**: 17-22, 1995.
- 2) Lawson CC, Schnorr TM, Whelan EA, Deddens JA, Dankovic DA, *et al*: Paternal occupational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and birth outcomes of offspring: birth weight, preterm delivery, and birth defects. *Environ Health Perspect*, **112**: 1403-1408, 2004.
- 3) van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, *et al*: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*, **346**: 1070-1071, 1995.
- 4) Tohyama C: Low-dose exposure to dioxin, its toxicities and health risk assessment. *Environ Sci*, **9**: 37-50, 2002.

- 5) Vreugdenhil HJ, Slijper FM, Mulder PG, Weisglas-Kuperus N: Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environ Health Perspect*, **110**: A593–A598, 2002.
- 6) Cheng SB, Kuchiiwa S, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, *et al*: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment induces c-Fos expression in the forebrain of the Long-Evans rat. *Brain Res*, **931**: 176–180, 2002.
- 7) Haavisto T, Nurmela K, Pohjanvirta R, Huuskonen H, El-Gehani F, *et al*: Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol Cell Endocrinol*, **178**: 169–179, 2001.
- 8) Hays LE, Carpenter CD, Petersen SL: Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. *Environ Health Perspect*, **110**: 369–376, 2002.
- 9) Ikeda M, Mitsui T, Setani K, Tamura M, Kakeyama M, *et al*: In utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol*, **205**: 98–105, 2005.
- 10) Kakeyama M, Sone H, Tohyama C: Changes in expression of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. *Neuroreport*, **12**: 4009–4012, 2001.
- 11) Pitt JA, Buckalew AR, House DE, Abbott BD: Adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion by perfused pituitary and adrenal glands from rodents exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology*, **151**: 25–35, 2000.
- 12) Unkila M, Pohjanvirta R, Tuomisto J: Biochemical effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol*, **27**: 443–455, 1995.
- 13) Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, *et al*: Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect*, **110**: 247–254, 2002.
- 14) Hojo R, Zareba G, Kai JW, Baggs RB, Weiss B: Sex-specific alterations of cerebral cortical cell size in rats exposed prenatally to dioxin. *J Appl Toxicol*, **26**: 25–34, 2006.
- 15) Zareba G, Hojo R, Zareba KM, Watanabe C, Markowski VP, *et al*: Sexually dimorphic alterations of brain cortical dominance in rats prenatally exposed to TCDD. *J Appl Toxicol*, **22**: 129–137, 2002.
- 16) Henshel DS, Martin JW, DeWitt JC: Brain asymmetry as a potential biomarker for developmental TCDD intoxication: a dose-response study. *Environ Health Perspect*, **105**: 718–725, 1997.
- 17) Mitsui T, Sugiyama N, Maeda S, Tohyama C, Arita J: Perinatal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses contextual fear conditioning-accompanied activation of cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal CA1 region of male rats. *Neurosci Lett*, **398**: 206–210, 2006.
- 18) Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, Antoniou-Lipfert P, Dietrich C, *et al*: Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 9218–9223, 2005.
- 19) Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE: In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol*, **114**: 118–126, 1992.
- 20) Donato R: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*, **1450**: 191–231, 1999.
- 21) Donato R: S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**: 637–668, 2001.
- 22) Weisinger G, Gavish M, Mazurika C, Zinder O: Transcription of actin, cyclophilin and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase genes: tissue- and treatment-specificity. *Biochim Biophys Acta*, **1446**: 225–232, 1999.
- 23) Uhlig HH, Mottet C, Powrie F: Homing of intestinal immune cells. *Novartis Found Symp*, **263**: 179–192, 2004.
- 24) Liu Y, Yang S, Lin AA, Cavalli-Sforza LL, Su B: Molecular evolution of CXCR1, a G protein-coupled receptor involved in signal transduction of neutrophils. *J Mol Evol*, **61**: 691–696, 2005.
- 25) Juarez J, Bendall L, Bradstock K: Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis. *Curr Pharm Des*, **10**: 1245–1259, 2004.
- 26) Murooka TT, Ward SE, Fish EN: Chemokines and cancer. *Cancer Treat Res*, **126**: 15–44, 2005.
- 27) Segal BM: CNS chemokines, cytokines, and dendritic cells in autoimmune demyelination. *J Neurol Sci*, **228**: 210–214, 2005.
- 28) Anthony DC, Walker K, Perry VH: The therapeutic potential of CXC chemokine blockade in acute inflammation in the brain. *Expert Opin Investig Drugs*, **8**: 363–371, 1999.

- 29) Anthony D, Dempster R, Fearn S, Clements J, Wells G, *et al*: CXC chemokines generate age-related increases in neutrophil-mediated brain inflammation and blood-brain barrier breakdown. *Curr Biol*, **8**: 923–926, 1998.
- 30) Klein RS, Rubin JB: Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol*, **25**: 306–314, 2004.
- 31) Tran PB, Ren D, Veldhouse TJ, Miller RJ: Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J Neurosci Res*, **76**: 20–34, 2004.
- 32) McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J: Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol*, **213**: 442–456, 1999.
- 33) Vlkolinsky R, Siggins GR, Campbell IL, Krucker T: Acute exposure to CXC chemokine ligand 10, but not its chronic astroglial production, alters synaptic plasticity in mouse hippocampal slices. *J Neuroimmunol*, **150**: 37–47, 2004.
- 34) Valerio A, Ferrario M, Martinez FO, Locati M, Ghisi V, *et al*: Gene expression profile activated by the chemokine CCL5/RANTES in human neuronal cells. *J Neurosci Res*, **78**: 371–382, 2004.
- 35) McGeer PL, McGeer EG: Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci*, **1035**: 104–116, 2004.
- 36) Toriello HV, Finnell RH: Report on and abstracts of the fourth international conference on neural tube defects: NTDs 2005 and beyond. *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology*, **76**: 143–144, 2006.
- 37) Griffioen AW, Damen CA, Mayo KH, Barendsz-Janson AF, Martinotti S, *et al*: Angiogenesis inhibitors overcome tumor induced endothelial cell anergy. *Int J Cancer*, **80**: 315–319, 1999.
- 38) Eslin DE, Zhang C, Samuels KJ, Rauova L, Zhai L, *et al*: Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood*, **104**: 3173–3180, 2004.
- 39) Slungaard A: Platelet factor 4: a chemokine enigma. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**: 1162–1167, 2005.
- 40) Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, *et al*: An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*, **197**: 1537–1549, 2003.
- 41) Romagnani P, Maggi L, Mazzinghi B, Cosmi L, Lasagni L, *et al*: CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*, **116**: 1372–1379, 2005.
- 42) Romagnani S: Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*, **36**: 1357–1366, 2006.
- 43) Jones TB, Hart RP, Popovich PG: Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J Neurosci*, **25**: 6576–6583, 2005.
- 44) Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI, Kelvin DJ: Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem*, **269**: 11065–11072, 1994.
- 45) Schenk BI, Petersen F, Flad HD, Brandt E: Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL) 7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J Immunol*, **169**: 2602–2610, 2002.
- 46) Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, Ffrench-Constant C, *et al*: The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell*, **110**: 373–383, 2002.
- 47) Padovani-Claudio DA, Liu L, Ransohoff RM, Miller RH: Alterations in the oligodendrocyte lineage, myelin, and white matter in adult mice lacking the chemokine receptor CXCR2. *Glia*, **54**: 471–483, 2006.