

〔研究ノート〕

レコンビナーゼ *CreERT2* 導入 BAC クローンによって作製した トランスジェニックラットの組織化学・細胞生物学的研究

加藤 幸雄^{1,2,3}・上春 浩貴²・後藤 哲平⁴・吉田 彩舟^{3*}・加藤たか子³・平林 真澄⁴

(2017年12月5日受理)

Histochemical and Cell Biological Studies of Transgenic Rats Prepared Using a Recombinase *CreERT2*-Introduced BAC Clone

Yukio KATO^{1,2,3}, Hiroki UEHARU², Tepei GOTO⁴, Saishu YOSHIDA^{3*},
Takako KATO³ and Masumi HIRABAYASHI⁴

Abstract

The pituitary gland is composed of the anterior and middle lobes, which are derived from the oral epithelium, and the posterior lobe, which is derived from the neuroectoderm. The anterior lobe comprises undifferentiated SOX2-positive cells, non-hormone-producing cells (mainly follicular stellate cells), and vascular cells, in addition to five types of hormone-producing cells. Recently, we have reported the following: (1) the expression of the pituitary-specific transcription factor *Prop1* in SOX2-positive cells initiates the differentiation of these cells into hormone-producing cells, (2) *Prrxs* (*Prrx1* and *Prrx2*), which are differentiation factors of limbs and vascular cells, are expressed in SOX2-positive cells, thereby replacing PROP1, and (3) the calcium-binding protein S100 β -positive stem cells differentiate into hormone-producing cells. Based on this background, analysis of the mechanism of development of the pituitary gland by fate tracing of cells expressing *Prop1*, *Prrx1*, *Prrx2*, and *S100b* was performed. In the present experiment, transgenic rats expressing *CreERT2* under the promoters of *Prrx1* and *S100b* were subjected to recombination so as to express the fluorescent protein gene (*Venus*), in the presence of tamoxifen. This project has been carried out as a collaborative research by the National Institute for Physiological Sciences from 2014 to 2017. As a result, it was possible to prepare transgenic rats incorporating *Prrx1* and *S100b*; however, the recombination of *CreERT2* did not occur in any of the rats. We could not fulfil the original purpose of this study. Nevertheless, this report was written to contribute to similar forthcoming studies.

Key words: Pituitary, Transcription Factor, Stem Cell, Differentiation, Cell-lineage

要 旨 下垂体は、口腔上皮由来の前葉・中葉と神経外胚葉由来の後葉から構成されている。なかでも、下垂体前葉には、ホルモンを分泌する5種類のホルモン産生細胞の他に、未分化な状態の細胞であるSOX2陽性細胞、非ホルモン産生細胞（主として濾胞星状細胞）、血管系細胞が存在している。最近、我々は、SOX2陽

¹ 明治大学農学部, ² 農学研究科, ³ 内分泌研究所

〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

⁴ 自然科学研究機構生理学研究所・行動・代謝分子解析センター

〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

* 現在：東京慈恵会医科大学医学部生化学教室

性細胞に下垂体特異的転写因子 PROP1 の発現が始まりホルモン産生細胞へと分化することや、四肢や血管系細胞の分化因子であるとされる PRRXs (PRRX1 と PRRX2) が PROP1 と置き換わりながら SOX2 陽性細胞に発現すること、カルシウム結合タンパク質 S100 β 陽性の成体幹細胞がホルモン産生細胞に分化すること、などを報告した。こうした研究背景から、*Prop1*, *Prrx1*, *Prrx2*, *S100b* を発現する細胞の運命追跡による、下垂体の発生機序の解析を計画した。本実験では、*Prrx1* と *S100b* のプロモーター下で *CreERT2* を発現し、タモキシフェン存在下で *CreERT2* による組換えを起こして蛍光タンパク質遺伝子 (*Venus*) を発現するトランスジェニックラットの作製実験を行った。本研究は、2014年度から2017年度まで自然科学研究機構生理学研究所の共同利用研究として遂行した。結果として、*Prrx1* と *S100b* を組込んだトランスジェニックラットを作製することは出来たが、*CreERT2* による組換えがいずれのラットでも起こらず、当初の目的を達成できずに終了することとなったが、本稿は今後の同様の研究に資するために研究ノートとしたものである。

キーワード：下垂体，転写因子，幹細胞，分化，細胞系譜

緒 言

下垂体は、口腔上皮由来の前葉・中葉と神経外胚葉由来の後葉から構成されている。なかでも、下垂体前葉には、ホルモンを分泌する5種類のホルモン産生細胞の他に、未分化な状態の細胞である SOX2 陽性細胞、非ホルモン産生細胞(主として濾胞星状細胞)、血管系細胞が存在している。近年、*Sox2-CreERT2* マウスを用いて成体下垂体 SOX2 陽性細胞の運命を追跡したところ、この細胞系譜の全ての前葉ホルモン産生細胞へと分化することが観察され (Andoniadou ら 2013)、成体下垂体の幹細胞として機能していることが明らかとなった。

一方、我々はこれまでに、ラット胎仔期中期(胎性13.5日)に全 SOX2 陽性細胞に下垂体特異的転写因子 PROP1 の発現が始まり、ホルモン産生細胞へと分化すること (Yoshida ら 2009; Yoshida ら 2011)、四肢や血管系細胞の分化因子であるとされる PRRXs (PRRX1 と PRRX2) が PROP1 と置き換わりながら SOX2 陽性細胞に発現すること (Higuchi ら 2014b)、S100 β 陽性の成体幹細胞がホルモン産生細胞に分化すること (Higuchi ら 2014a)、などを報告してきた。最近では、PRRXs や S100 β 陽性細胞群が、胎仔期中期以降に下垂体外から侵入することを報告している (Higuchi ら 2015; Horiguchi ら 2016)。

ところで、Cre recombinase (Cre) は特異的塩基配列 (2つの loxP 配列) を認識して DNA 組み換えを起こす酵素である。核移行シグナルをもつエストロゲ

ン受容体 (ER) をタモキシフェンのみに結合する様に改変し (ERT2) 核移行シグナルを欠損した Cre に融合したタンパク質 *CreERT2* が開発された (Feil ら 1996; Feil ら 1997)。特定の遺伝子のプロモーターの下流に *CreERT2* を連結した DNA コンストラクトを組み込んだマウスと、2つの loxP 配列を備え、その領域が Cre 依存的に欠失することで下流のレポーターである蛍光タンパク質遺伝子 (本稿では *Venus*) が発現するマウスをそれぞれ作製し、両マウスを交配させて両方の DNA コンストラクトを持つ個体を得る。この事で、in vivo で、任意の時期にタモキシフェンを投与することにより蛍光タンパク質による細胞の運命追跡 (系譜解析) が可能となるシステムである (Masahira ら 2006; Ono ら 2008)。

そこで、*Prop1*, *Prrx1*, *Prrx2*, *S100b* のプロモーター下で蛍光タンパク質遺伝子 (*Venus*) を特定の時期から発現させ、その発現細胞の運命を追跡し、下垂体の発生機序の解析を行う事にした。本法は、主としてマウスが用いられているが、上記の研究背景から、実施例の少ないラットを用いて本課題を計画した。

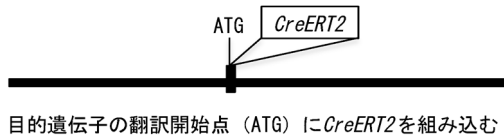
材料と方法

遺伝子材料

Prop1, *Prrx1*, *Prrx2*, *S100b* の遺伝子：目的遺伝子とその5'上流と3'下流域の200 kb以上を含む、*Prop1* (224 kb, RNB1-133G16), *Prrx1* (548 kb, RNB1-177J22), *Prrx2* (214 kb, RNB2-14N8), *S100b* (286 kb, RNB1-287B17) のラットの大腸菌人工染色

A. 目的遺伝子-*CreERT2* Tgラット

目的遺伝子の全長と 5'、3' 領域を持つ BAC クローン



B. *CAG-L2-Venus* Tgラット

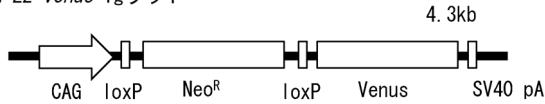


図 1 組換え体ベクターの模式図

A. 目的遺伝子 (*S100b* や *Prrx1* など) の全長を含む 5' と 3' 領域の約 200 Kb の BAC クローンに対して、転写開始点 ATG 部位に *CreERT2* を挿入したベクターの模式図。B. 蛍光タンパク質 *Venus* を *CreERT2* の発現条件下で発現するトランスジェニックラットを作製するための組換え体ベクターの模式図。Venus 遺伝子の upstream に、CAG プロモーター下で作用する組換えエレメント *LoxP* で挟まれた Neomycin (*Neo^R*) が位置している。

体 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) クローンを理化学研究所より入手した。

組換え体とトランスジェニックラットの作製

今回は、*Prrx1-CreERT2* と *S100b-CreERT2* ラットの作製を行った。上記の遺伝子領域内には *Prrx1* と *S100b* のプロモーター領域 (Itakura ら 2007; Martin と Olson 2000)、および、開始コドンを含むエクソンが含まれる事を確認している。Red/ET システムを用いて *CreERT2* への相同組換え体 BAC を作製し (図 1A)、ラット受精卵へ組換え体 BAC を顕微注入して、トランスジェニックラットを作出した。トランスジェニックラットを、レポーターラットである *CAG-L2-Venus* ラット (図 1B) と交配させ、タモキシフェン投与により目的遺伝子のプロモーター依存的に蛍光タンパク質 *Venus* を時期特異的に発現するトランスジェニックラットの作出を行った。

タモキシフェンおよび 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OH タモキシフェン) 投与実験

上記で作製した *Prrx1-CreERT2/CAG-L2-Venus* ラットと *S100b-CreERT2/CAG-L2-Venus* ラット (生後 60 日から 120 日) に対し、タモキシフェン 5 日間

(80 mg/kg 体重/1 日, 5 日間で 400 mg)、腹腔に投与し、あるいは、4-OH タモキシフェン (活性型とされ、体内でタモキシフェンが修飾を受け生成する) については、文献 (Matsuda と Cepko 2007) を参考に 5 日間 (20 mg/kg 体重/1 日, 5 日間で 100 mg)、腹腔に投与した。

トランスジェニックラットの判定と評価

トランスジェニックラットの判定には、尻尾から回収したゲノム DNA を用いた PCR 分析を行った。さらに、導入遺伝子の発現を評価するために、タモキシフェン投与前後のラットから採取した下垂体組織の免疫組織化学、ならびに尻尾から回収した Fibroblast の細胞免疫染色を行った。細胞免疫染色は、4% パラホルムアルデヒドを用いて室温で 30 分固定した後に、一次抗体反応 (Higuchi ら 2014b) を 4°C で一昼夜、二次抗体反応を室温で 1 時間反応させた後に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた核染色を行なった。免疫組織化学は、最終投与日より 1 週間後に下垂体を回収し、4% パラホルムアルデヒドに浸漬固定後、30% トレハロースで置換した。その後、Tissue Tek compound に包埋したブロックを凍結して切片を作製した。そして、切片を抗 GFP 抗体 (*Venus* を認識)、抗 *Cre* 抗体を用いて免疫組織化学による解析を行った。PCR では、尻尾の Fibroblast を含む細胞を複数のウェルで培養し、それぞれより調製した全 RNA から作製した cDNAs を用いて PCR 解析を行った。この時、細胞の均一性やその数は同じではない。

結 果

BAC クローンをを用いたトランスジェニック動物の作出

Prrx1-CreERT2 ラットの作出において、ラット受精卵 223 個へ組換え体 DNA を顕微注入し、生存卵 162 個を偽妊娠メスラットの卵管に移植を行い、産仔が 9 匹得られた。遺伝子判定の結果 1 匹が *Prrx1-CreERT2* ラットであった (表 1)。同様に、*S100b-CreERT2* ラットの作出において、ラット受精卵 1085

表1 受精卵移植による TG ラットの出生数

	DNA 濃度 (ng/ul)	顕微 注入数	生存/ 移植数	擬妊娠雌 ラット	出生数	TG ラット数
<i>Prrx1-CreERT2</i>	5	223	162	6	9	1
	1	181	150	14	23	0
	2.5	355	282	9	12	0
<i>S100b-CreERT2</i>	4	131	101	9	10	0
	2.5, 5	205	145	6	5	1
	2.5	213	167	6	0	0

個へ組換え体 DNA を顕微注入し、生存卵845個を偽妊娠メスラットの卵管に移植を行い、産仔が50匹得られた (表1)。遺伝子判定の結果1匹が *S100b-CreERT2* ラットであった。それぞれの TG ラットを野生型ラットと交配して F1 となる TG ラット (オス) を作出した。さらに、ノーマルとの交配を行い F2 となる TG ラットを作製し、それぞれレポーターラットである *CAG-L2-Venus* ラットと交配させ、*Prrx1-CreERT2 / CAG-L2-Venus* と *S100b-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラットを作出した (データ未掲載)。

タモキシフェン投与量の検討

正常ラットを用いて、成体ラットにおけるタモキシフェン投与量の検討を行った。タモキシフェンは、100 mg/kg 体重/1日 で4日間投与すると、鼻血や下痢などの症状を起こし、5日間投与すると、死亡する個体が確認された。このことから、ラットへのタモキシフェン投与量は、80 mg/kg 体重/1日 を5日間の投与に設定した。

タモキシフェン投与実験

Prrx1-CreERT2 / CAG-L2-Venus と *S100b-CreERT2 / CAG-L2-Venus* に関して、タモキシフェン (*Prrx1* では3匹、*S100b* では6匹)、あるいは4-OH タモキシフェン (それぞれ2匹) の最終投与日より1週間後に下垂体を摘出し、凍結切片を作製して、抗 GFP 抗体ならびに抗 Cre 抗体を用いて免疫組織化学による解析を行った。ポジティブコントロールとして、*CAG-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラット下垂体の凍結切片を用いた。その結果、作製した2種のトランス

ジェニックラットにおいて、タモキシフェンあるいは4-OH タモキシフェンの投与でも Venus の免疫陽性シグナルを得ることができなかった (図2)。

Fibroblast を用いたタモキシフェン誘導実験

Prrx1 は Fibroblast で発現している (Higuchi ら 2013)。そこで、*Prrx1-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラットの尻尾から Fibroblast を回収し、*in vitro* 系で、活性型タモキシフェンである4-OH タモキシフェンの添加により、Venus の免疫陽性シグナルが得られるかを調べた。

4-OH タモキシフェンを含んだ培養培地 (DMEM : F-12=1 : 1, 10% Horse Serum, 2.5% Fetal Bovine Serum, 4 µg/ml 4-OH タモキシフェン) を2日に一度交換し、培養1週間後に、抗 PRRX1 抗体、抗 GFP 抗体を用いた免疫細胞染色を行った。その結果、PRRX1 免疫陽性シグナルが得られた一方で、Venus の免疫陽性シグナルは得られなかった (図3)。また、培養した細胞から調製した全 RNA の cDNA を PCR で解析した結果でも、Venus 由来の増幅物は認められなかった。一方、*CreERT2* の発現は同培養細胞で確認できた (図4)。

考 察

本実験結果から、作製した *Prrx1-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラットと *S100b-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラットは、免疫組織染色、線維芽細胞を使った免疫細胞染色、ならびに RNA の RT-PCR の解析を行っても、Venus の陽性シグナルを示さなかった。従って、本課題が目標とした *Prop1*, *Prrx1*, *Prrx2*, *S100b* のプロモーター下で Venus を発現するラット下垂体の細胞運命の追跡による下垂体の発生の機序の解析は、現時点で達成できていないと判断した。

今回、Venus の発現が確認されなかった原因の一つとして、生物種による原因が考えられる。本実験では、タモキシフェン投与量限界まで投与しても Venus の免疫陽性シグナルが確認できなかった。*CreERT2* は、タモキシフェンが体内で代謝され、その水酸化物である4-OH タモキシフェンと結合して核

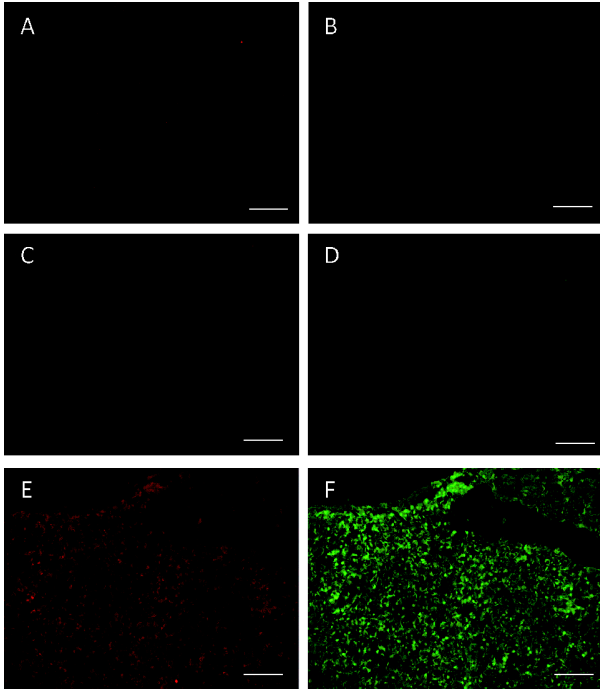


図2 タモキシフェン投与後の下垂体における CRE/GFP の2重免疫染色
 タモキシフェン投与後1週間での、*Prrx1-CreERT2/CAG-L2-Venus* (A, B), *S100b-CreERT2/CAG-L2-Venus* (C, D), *CAG-Cre/CAG-L2-Venus* (Positive Control; E, F) の Cre (赤色) と GFP 抗体による Venus (緑色) の局在。スケールバー：100 μ m

内移行することで、標的遺伝子部位の DNA リコンビネーションを行うとされている (Feilら 1997)。このことは、ラットでは、マウスと比べてタモキシフェンから活性型の 4-OH タモキシフェンへの代謝活性が低いことが示唆される。過去の成績を調べてみると、ラットはマウスに比べて、タモキシフェンを活性型の 4-OH タモキシフェンに代謝する効率が低い可能性を示唆する報告がある (Robinsonら 1991)。また、*Prrx1-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラット、*S100b-CreERT2/CAG-L2-Venus* ラットともに、生後20日 (P20) でタモキシフェンを 20 mg/kg (Matsuda と Cepko 2007) で投与したが、Venus の局在は確認できなかった。さらに、尻尾から調製した *Prrx1* を発現する線維芽細胞を 4-OH タモキシフェン存在下で培養しても、Venus の発現は確認できなかった。以上のことから、ラットではタモキシフェンの代謝が低いことが考えられる。それ以外にも、*CreERT2* に用いたプロモーターの発現効率、あるいは、構築した組換え体

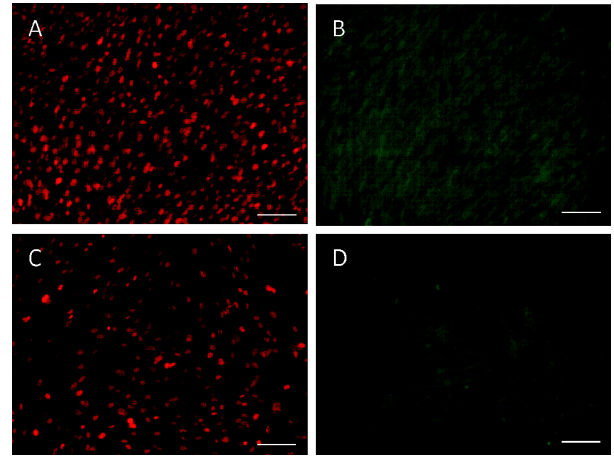


図3 *Prrx1-CreERT2/CAG-L2-Venus* ラットの線維芽細胞における Venus 局在の有無の検討
 4-OH タモキシフェン添加後1週間での、*Prrx1-CreERT2 / CAG-L2-Venus* ラット Fibroblast の PRRX1 抗体による染色像 (赤) と、GFP 抗体による Venus の局在 (緑)。上段 (A, B) は 4-OH タモキシフェン添加群、下段 (C, D) は溶媒のみの添加群。スケールバー：100 μ m

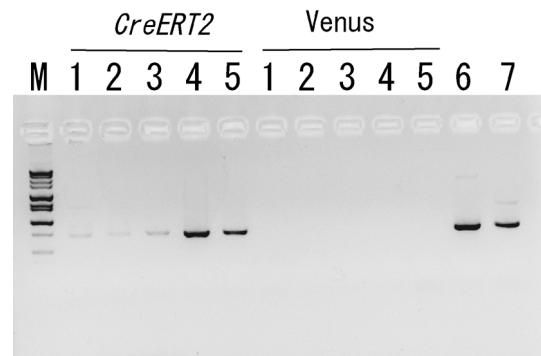


図4 *Prrx1-CreERT2 / CAG-CAT-Venus* ラットの Fibroblast における Venus 発現の有無の検討
 4-OH タモキシフェン添加後1週間経過した、*Prrx1-CreERT2/CAG-L2-Venus* ラット尻尾の Fibroblast より調製した全 RNA から cDNA を合成し、PCR により *CreERT2* と Venus の発現を解析した。1, 2, 3, 4, 5 はそれぞれ独立したウエルで培養した Fibroblast 由来 cDNA。6 と 7 は、それぞれ *CreERT2* と Venus のポジティブコントロール。

ベクターの問題 (例えば、DNA を受精卵に注入しゲノムに取り込まれる過程で塩基配列上の変異や欠失などが生じた可能性)、も否定できない。

世界的には、*CreERT2* を用いた細胞運命の追跡は、マウスの系で多くの成功例が報告されているが、ラットを用いた解析数は未だ少ない。過去の文献を調べてみると、その数は2報のみで、同じグループから報告されたものである (Schonigら 2012; Weber

ら 2011)。Weber らは (Weber ら 2011), *CreERT2* を組込んだ4系統のTGラットについて免疫組織化学と組込み遺伝子のコピー数の測定から, 1コピーをもつTGラットでは発現が僅かなものの, 2-3コピーが導入されたTGラットでは, 強いCreの発現を確認している。そして, マウスで確認されているように (Chandler ら 2007), コピー数が多いことと発現量の高いこととが関連すると考察している。本研究でも同様の事が起こっている可能性がある。また, タモキシフェン自体の毒性もあり, プロジェステロンレセプター (PR) とCreを融合させたCrePR (Vegeto ら 1992) を使用するの也不错かもしれない。

今回の実験では, 残念なことに2種のTGラットは, それぞれ1系統しか作製できていない (コピー数は未測定)。今後は少なくともコピー数の多い系統の作製を目指して, 複数の系統を作出し, その発現量を確認することが必要である。

謝辞

本研究は4年間にわたり自然科学研究機構生理学研究所の共同利用研究の助成を受けて行われたものである。明治大学における解析が遅々として進まず, 長期間にわたったことと, 目的が達成できなかったことを反省しつつ, この間の助成を生理学研究所に深謝いたします。また, 本研究は, 平成26年度 (2014年度) 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「大規模オミックスの活用による生殖内分泌組織の新たな機能制御法の確立」, 科学研究費B (加藤幸雄), 科学研究費C (加藤たか子), 特別研究員奨励費 (上春浩貴) の助成も受けたものであり, 記して深謝します。

参考文献

Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH and Martinez-Barbera JP (2013): Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell*, 13: 433-445. 2013.
Chandler KJ, Chandler RL, Broeckelmann EM, Hou Y, Southard-Smith EM and Mortlock DP (2007): Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations

with transgene integrity and expression. *Mammalian Genome*, 18: 693-708. 2007.
Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D and Chambon P (1996): Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 10887-10890. 1996.
Feil R, Wagner J, Metzger D and Chambon P (1997): Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237: 752-727. 1997.
Higuchi M, Kato T, Chen M, Yako H, Yoshida S, Kanno N and Kato Y (2013): Temporospatial gene expression of Prx1 and Prx2 is involved in morphogenesis of cranial placode-derived tissues through epithelio-mesenchymal interaction during rat embryogenesis. *Cell and Tissue Research*, 353: 27-40. 2013.
Higuchi M, Kanno N, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Yako H, Shibuya S, Sekita M, Tsuda M, Mitsuishi H, Kato T and Kato Y (2014a): GFP-expressing S100 β -positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. *Cell and Tissue Research*, 357: 767-779. 2014a.
Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T and Kato Y (2014b): PRRX1 and PRRX2 distinctively participate in pituitary organogenesis and cell supply system. *Cell and Tissue Research*, 357: 323-335. 2014b.
Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T and Kato Y (2015): PRRX1- and PRRX2-positive mesenchymal stem/progenitor cells are involved in vasculogenesis during rat embryonic pituitary development. *Cell and Tissue Research*, 361: 557-565. 2015.
Horiguchi K, Yako H, Yoshida S, Fujiwara K, Tsukada T, Kanno N, Ueharu H, Nishihara H, Kato T, Yashiro T and Kato Y (2016): S100 β -positive cells of mesenchymal origin reside in the anterior lobe of the embryonic pituitary gland. *PLoS One*, 11: e0163981. 2016.
Itakura E, Odaira K, Yokoyama K, Osuna M, Hara T and Inoue K (2007): Generation of transgenic rats expressing green fluorescent protein in S-100 β -producing pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *Endocrinology*, 148: 1518-1523. 2007.
Martin JF and Olson EN (2000): Identification of a prx1 limb enhancer. *Genesis*, 26: 225-229. 2000.
Masahira N, Takebayashi H, Ono K, Watanabe K, Ding L, Furusho M, Ogawa Y, Nabeshima Y, Alvarez-Buylla A, Shimizu K and Ikenaka K (2006): Olig2-positive progenitors in the embryonic spinal cord give rise not only to motoneurons and oligodendrocytes, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells. *Developmental Biology*, 293: 358-369. 2006.
Matsuda T and Cepko CL (2007): Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 1027-1032. 2007.
Ono K, Takebayashi H, Ikeda K, Furusho M, Nishizawa T, Watanabe K and Ikenaka K (2008): Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallidum. *Developmental Biology*, 320: 456-468. 2008.
Robinson SP, Langan-Fahey SM, Johnson DA and Jordan VC (1991): Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics

- ics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab Dispos*, 19: 36–43. 1991.
- Schonig K, Weber T, Frommig A, Wendler L, Pesold B, Djandji D, Bujard H and Bartsch D (2012): Conditional gene expression systems in the transgenic rat brain. *BMC Biol*, 10: 77. 2012.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP and O'Malley BW (1992): The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell*, 69: 703–713. 1992.
- Weber T, Schonig K, Tews B and Bartsch D (2011): Inducible gene manipulations in brain serotonergic neurons of transgenic rats. *PLoS One*, 6: e28283. 2011.
- Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai L-Y, Nakayama M and Kato Y (2009): PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385: 11–15. 2009.
- Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai LY, Osuna M, Inoue K and Kato Y (2011): Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem/progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*, 23: 933–943. 2011.