

201133005B

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟の
インプリンティングとその評価法開発

平成21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 山田 英之

平成24（2012）年5月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟の
インプリンティングとその評価法開発

平成21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 山田 英之

平成24（2012）年5月

目 次

I. 総合研究報告書

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングとその

評価法開発 1

研究代表者 山田 英之

II. 成果の刊行に関する一覧表 7

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングと
その評価法開発

研究代表者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授

研究要旨 食品汚染物質が胎児・新生児の脳下垂体ゴナドトロピンの障害を介して性未成熟を固着させる可能性や機構について、ラット *in vivo* での研究を行った。2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用いた解析から、本物質は胎児後期から出生後数日までの短期間に脳下垂体ゴナドトロピンを低下させ、これが性腺での性ステロイド合成抑制を介して性未成熟を惹起することが示唆された。脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子の抑制は、histone deacetylase (HDAC) の誘導によって遺伝子-ヒストン会合が強化される機構が推定された。また、ゴナドトロピン発現抑制には脳下垂体制御組織である視床下部に対する影響も示唆された。すなわち、TCDDは胎児視床下部のトリカルボン酸 (TCA) サイクルを停滞させ、ATP 生産を抑制することが見いだされた。TCA サイクル回転に必須な補酵素である α -リポ酸はこれらの変動の抑止のみならず、脳下垂体ゴナドトロピンや性腺ステロイド合成も完全に回復させた。これらの一連の成績から、TCDDは視床下部の活動や発達を抑制し、これが HDAC 誘導の要因となって脳下垂体-性腺系の障害を引き起こす機構が推定された。生体成分 α -リポ酸に優れた保護効果が見いだされたことから、本物質含有食品の摂取をダイオキシンの次世代影響排除用の予防措置として利用できる可能性が考えられた。また、TCA サイクルの障害と関連して、TCDDは脳神経特異的にエネルギー生産に利用される *N*-アセチルアスパラギン酸を顕著に蓄積させることも見い出された。この変動は、胎児・新生児の将来の性未成熟を予見するためのバイオマーカーとして利用できる可能性が考えられた。TCDDによる性未成熟の責任遺伝子（成熟期）の同定を目指して、マイクロアレイ解析を実施し、交尾障害の原因となり得るものとしては gonadotropin-releasing hormone が推定された。ダイオキシン以外の内分泌攪乱物質9種について、胎児・脳下垂体-性腺系への影響を調べた結果、精巣ステロイド合成を抑制させる物質は幾つか見いだされたが、TCDDと同様にゴナドトロピン抑制を起点とするものは確認できなかった。ただ、これらの検討は妊娠ラットへの高用量/単回処理条件であり、低濃度水を継続飲水させた場合には有意な効果を示す物質も観察されたことから、今後の追加検討を要すると考えられた。

A. 研究目的

ダイオキシンを始めとする種々の環境汚染物質が生殖や後世代の障害を惹起する可能性が危惧されている。しかし、ヒトや野生生物での障害に関する明確な因果関係や障害の機構は十分に理解されているとは言えない。本研究では、ラットを使用した基礎研究で内分泌攪乱物質の次世代への悪影響の機構を解明することを目指した。これらを基盤として、障害診断法や対処法の構築に関する有用情報が得られることを期待した。

哺乳動物の雌雄胎児・新生児の健全な分化、発育は、出生前後の一時期（臨界期と呼ばれる）における性ステロイドの曝露の有無で規定される。我々は内分泌攪乱物質がこのプロセスを障害して種々の未成熟をもたらす可能性に焦点を当てて研究を行ってきた。性ホルモンやその受容体の合成は、脳下垂体より遊離するゴナドトロピンによって制御される。当研究室では、ダイオキシンの妊娠ラットへの投与によって、胎児脳のゴナドトロピン産生と性ステロイドホルモン合成系タンパク質の発現が障害され、これを起点として、成長後の交尾能力低下がインプリントされることを明らかにしている。しかし、ダイオキシンがどのような機構で脳下垂体ゴナドトロピンを低下させるかについては不明である。また、胎児期の障害が何故、成長後にまで継続する性未成熟を引き起こすかについても多くが謎のままである。これらの疑問は障害対処法や診断法の確立に向けて解決する必要があると考えられた。

脳下垂体でのゴナドトロピン合成・分泌には、制御組織である視床下部の成熟や十分なエネルギーや神経伝達物質の供給、あるいは神経回路の発達等の多くの要素が満足されなければならない。従って、ダイオキシンによる胎児期特異的なゴナドトロピン抑制の機構を理解するには、上記の様々な要因に対する検討を要する。一方、古くから、ダイオキシンの毒性には酸化ストレス亢進の寄与が指摘されている。従って、ダイオキシンによる脳下垂体ホルモンの低

下に酸化ストレス上昇が寄与する可能性も考えられた。

これらの背景から、化学物質リスク研究事業の採択を受けて実施した平成21～23年度の研究では、最強毒性のダイオキシンと言われる2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を主な研究対象として、以下の検討を実施した：1) 脳下垂体ホルモンやステロイド合成系タンパク質の低下の時期特異性；2) TCDDが胎児・脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子の制御を変動させる機構；3) TCDDの胎児・性ステロイド生産抑制における酸化ストレスの影響；4) TCDDが脳下垂体制御組織である視床下部の活動に及ぼす影響と機構；5) TCDDによって固着される性未成熟の成熟期責任遺伝子の同定。更に、課題6)としてダイオキシン以外の内分泌攪乱物質が同様の機序で後世代影響をもたらすか否かについても検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物実験

成熟雌ラットを交尾させて妊娠させ、膈内に精子が確認された日を妊娠0日目 (GD0)として実験に供した。多くのTCDD処理実験では、GD15の妊娠ラットに1 µg/kgで投与後、GD20胎児より試料を摘出して種々の解析を行った。TCDD以外の化学物質についての検討も、基本的にはGD15での処理後にGD20胎児を解析した。全ての動物実験は、九州大学の動物実験倫理審査委員会の審査を受け、その承認の下に実施した。

2. 脳下垂体培養実験

薬物未処理母ラットの胎児 (GD20) より脳下垂体を摘出し、1 nM TCDDを始め、種々の薬剤処理を施したのちに遺伝子発現状況を観察した。

3. mRNAおよびタンパク質発現量解析

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によってmRNA発現量を分析した。個別のタンパク質の発現状況はWestern blotting法によって解析した。

4. 発現異常を示す遺伝子の網羅的探索

脳下垂体および視床下部よりmRNAを抽

出後、逆転写反応によってcDNAに変換してマイクロアレイ解析に付し、遺伝子発現状況を網羅的に調べた。

5. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

抗アセチル化ヒストン抗体で沈降したDNA-ヒストン複合体のDNAを鋳型としてRT-PCRを行うことにより、ゴナドトロピン遺伝子に結合するヒストンのアセチル化状況を解析した。

6. 遺伝子のメチル化解析

ゴナドトロピン遺伝子上流のメチル化感受性推定領域 (CpG領域) につき、メチル化領域感受性制限酵素法 (MSRE法)、並びにバイサルファイトシーケンス法によってDNAメチル化の程度を解析した。

7. メタボローム解析

脳下垂体と視床下部ホモジネートの水-methanol抽出物をgas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)、およびultra-performance liquid chromatography - time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)に付して解析した。

8. テストステロン含量測定

胎児精巣ホモジネートの*n*-pentane-ethyl acetate抽出物をUPLC-TOF-MSに付して分析を行った。

9. LAおよび還元型LAの定量

α -リポ酸 (LA)とその還元型 (dihydro-LA: DHLA) は、UPLC-TOF-MSを使用し、バルプロ酸ナトリウムを内標準物質として定量した。

10. その他の方法

細胞内ATP濃度は市販のルシフェリン/ルシフェラーゼ系を使用して測定した。有意差の検定はStudent *t*-test (2群間の比較)、ないしTukey-Kramer法 (3群以上の比較) によって行った。

C. 結果・考察

1. 生殖腺ステロイドホルモン合成に与えるTCDDの影響と周産期特異性

TCDDの母体曝露によって胎児・新生児の性ステロイド合成が障害される点は以前の研究から分かっていた。しかし、障害の時

期特異性は詳細には解析していなかったもので、この点の検討を行った。GD15の妊娠ラットにTCDD (1 μ g/kg、経口)を投与後、胎児および新生児の精巣ステロイド合成系タンパク質mRNAの発現状況を解析した。その結果、ステロイドホルモン合成の律速過程に関与するsteroidogenic acute-regulatory protein (StAR)および必須酵素の一つであるcytochrome P450 17 (CYP17)は、出生前後の一時期 (周産期) にのみTCDDによって低下し、出生4日後 (PND4) あたりで正常水準に復帰することが明らかとなった。これとよく符合して、GD20での胎児精巣および血清のテストステロン含量はTCDDの母体曝露によって顕著に低下した。生殖腺ステロイド合成は脳下垂体から分泌されるluteinizing hormone (LH) とfollicle-stimulating hormone (FSH) のゴナドトロピンによって制御される。これらのホルモンを構成する2種のサブユニットのうち、 β -サブユニットmRNAは、TCDD母体曝露によって、やはり周産期特異的に減少した (α -サブユニットには変動なし)。また、LHとFSHの胎児血清ホルモンレベルもTCDDによって有意に低下した。これらの成績は、TCDDが周産期児のゴナドトロピン抑制を起点として性ステロイドを低下させることをよく支持した。一過性の低下とはいえ、周産期の性ステロイドは児の性成熟や脳分化に必須であり、これが成長後の性未成熟を惹起する要因と考えられた。

2. 脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子の発現抑制機構

ゴナドトロピン発現には視床下部から脳下垂体へ投射する神経から分泌されるgonadotropin-releasing hormone (GnRH)の刺激が必要である。事実、培養胎児脳下垂体にGnRHを添加すると、LH β 等のゴナドトロピン発現が増加し、この誘導発現はTCDD添加によって有意に抑制された。ただ、TCDDはLH β のみならず、 α -サブユニットやプロラクチンのGnRH依存的発現も抑制し、*in vivo*で観察された内容とは異なる効果を示した。従って、TCDDは胎児脳下垂体のLH発現を直接的に抑制し得るが、他の間接的

機構が関与する可能性も考えられた（後述の4項参照）。

胎児のGnRH発現量自体はTCDD曝露によっても変動しないことを確認している。そこで次に、TCDDによる脳下垂体LHの抑制に寄与する要因を見出すため、マイクロアレイ解析を実施した。その結果、多くの遺伝子発現の増減が観察されたが、TCDD曝露胎児の脳下垂体では、histone deacetylase (HDAC)の幾つかのアイソフォームの発現が増加することを発見した。この成果は、TCDDがヒストン-遺伝子の会合を強化して遺伝子転写を抑制する機構を示唆する。そこで、ChIP assayにより種々の脳下垂体ホルモン遺伝子と会合するヒストンのアセチル化状況を解析した結果、TCDDはLHβ遺伝子に結合するヒストン特異的にアセチル化を抑制することが見いだされた。この変化は胎児に特異的であり、また母ラットのLHβ遺伝子等では生起せず、TCDDの障害発現状況とよく合致した。LHβ遺伝子のメチル化状況はTCDDによって変化しなかった。これらの成績から、TCDDはHDAC誘導を介して胎児のLHβ発現を低下させる機構が強く示唆された（図1）。

3. TCDDによる胎児ゴナドトロピン低下と酸化ストレスの関連性

古くから、ダイオキシン類の毒性の多くには酸化ストレスの亢進が寄与すると考えられてきた。そこで、TCDDによる胎児・脳下垂体-性腺制御系への影響にも酸化ストレスが関与する可能性を考えて検討を行った。TCDD処理妊娠ラットにLA、アスコルビン酸、BHAおよびエダラボンの4種の抗酸化物質を併用し、胎児の性ステロイド合成に及ぼす影響を観察した。その結果、TCDDによる胎児精巣StARやCYP17の低下、並びに脳下垂体LHβ等の抑制は、LAによってのみ完全に回復した。使用した4種の抗酸化物質はいずれも脳移行性が報告されている。しかし、保護効果を示したのはこれらのうちLAのみであることから、LAの作用は抗酸化ストレス以外の機構による可能性が考えられた。

4. TCDDが脳メタボロームへ及ぼす影響

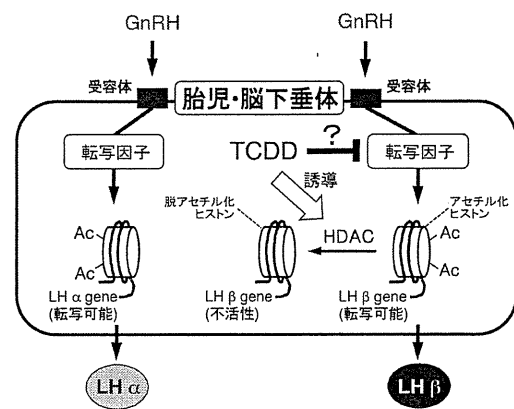


図1. TCDDによる胎児LHβ遺伝子発現の抑制：HDAC誘導を介する機構

LAはピルビン酸からのアセチルCoA生産等に必須な補酵素でもある。このことから、LAがTCDDに拮抗して脳下垂体ゴナドトロピン低下を回復させるのは、TCDDによるエネルギー生産等の中間体代謝系への障害を回復するためとも考えられる。そこで、LAの保護効果機構の解明を目指して、脳下垂体とその制御組織である視床下部を対象にメタボロミクスを実施した。その結果、TCDDの母体曝露は胎児の両組織のメタボロームプロフィールを顕著に変動させ、特に視床下部での変動が著しかった。変動成分を解析した結果、TCDDは多くのトリカルボン酸 (TCA) サイクル成分を増減させることが判明した（図2）。α-ケトグルタル酸とオギザロ酢酸は対照群の50倍および5倍にまで増加した。これらの2つのα-ケト酸はLA要求性ステップの基質ないし直近に位置する成分である（図2参照）。このこととよく符合して、TCDD処理母にLAを与えると、TCDDによるα-ケト酸の蓄積は解消された。TCAサイクルの停滞と一致して、TCDD曝露胎児の視床下部ではATP含量も顕著に低下したが、これもLAの補給によって完全に回復した。外来性LAの補給がTCDDの障害を回復させる事実より、TCDDは内因性LAを低下させることによって作用を表すとも考え得る。我々の解析はこれが真実であることを支持した。すなわち、TCDD曝露胎児の視床下部ではLAおよびその還元体 (DHHLA) のいずれもが有意に減少していた。これらの一連の成果から、TCDDの胎児・脳下垂体ゴナドトロピン抑制には、

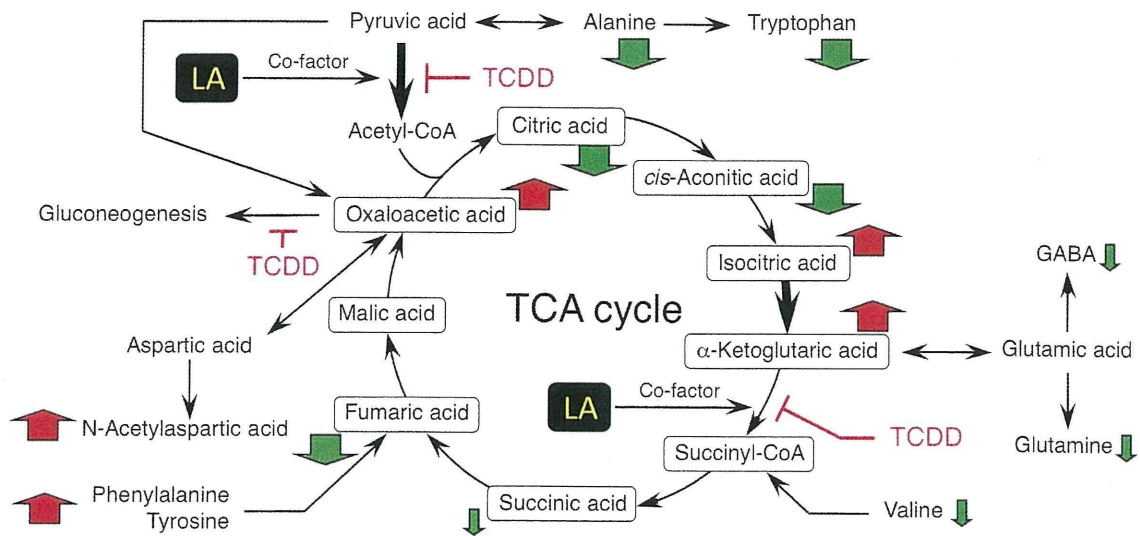


図2. TCDDが胎児・視床下部TCAサイクルおよび関連アミノ酸代謝に及ぼす影響
 太矢印は対照と比べて2倍以上の増加(赤)および1/2以下への減少(緑)を示す成分。
 緑細矢印は顕著ではないが有意な減少を示す成分。黒太矢印はTCAサイクルにおける被
 制御ステップ。

制御組織である視床下部の活動性低下も寄与すると推定された。前述の2項では脳下垂体HDACの誘導の寄与の可能性を述べた。これに関し、絶食処理は脳HDAC誘導をもたらすことが報告されており、HDAC誘導もTCDDによるエネルギー生産障害を起点に発生する可能性が考えられた。

メタボロミクス解析からは、胎児の障害性を評価する手法に応用できる可能性も見いだされた。N-アセチルアスパラギン酸(N-AcAsp)は、脳神経特異的にアセチルCoA合成のためのアセチル基供与体として働き、エネルギー生産に利用される。図2に示すように、TCDD母体曝露は胎児・視床下部のN-AcAspを顕著に増加させた。従って、胎児や新生児の体液中N-AcAspをバイオマーカーとして、臨界期脳のエネルギー生産障害、ひいては以後の発達障害や性未成熟を推定できる可能性が浮上した。

5. TCDDによって固着される性未成熟の責任遺伝子の推定

前述の通り、TCDDによる脳下垂体ホルモン低下は周産期に限定される一過性のものである。しかし、これが成長後の性行動不全等の性未成熟を固着させる原因であることが、我々の以前の研究で実証されている。性未成熟は、遺伝子の発現異常固着を通して惹起されると考えるのは自然な推論と思われる。そこで次に我々は、TCDD母体曝露

によって発現異常がインプリントされる遺伝子の探索を行った。すなわち、TCDD処理妊娠ラット(GD15、1 µg/kg)より出生・成長した雄児(10週齢)から脳下垂体と視床下部を単離し、遺伝子発現状況をマイクロアレイ法によって解析した。その結果、視床下部では148種もの遺伝子が対照と比較して1.2倍以上の有意な高発現、ないし0.8以下の有意な低発現を示すことが判明した。これらのうちのどれが性未成熟に強い寄与をするかは今後の課題であるが、低下するものの中にはGnRHが含まれていた。本ホルモンはゴナドトロピン制御に重要である一方、性行動を制御する因子の一つでもある。従って、GnRHが成長後に低下することは、性行動不全の形質と一致すると考えられた。

6. TCDD以外の内分泌攪乱物質が胎児脳下垂体-性腺系へ及ぼす影響

内分泌攪乱性が疑われている9種の被検物質をGD15妊娠ラットに単回経口投与したのち、GD20胎児の精巣StARおよび脳下垂体LHβ mRNA発現状況を観察した：検討物質：酢酸鉛、塩化カドミウム、塩化メチル水銀、ジ(エチルヘキシル)フタレート(DEHP)、ビスフェノールA(BPA)、トリブチルスズ(TBT)、2,2',4,4'-テトラブロモジフェニルエーテル(BDE47)、アトラジンおよびペルメトリン。その結果、TBT、BPA

およびDEHPに有意なStAR発現抑制が認められた。従って、これらは胎児の性ステロイド合成を抑制して、TCDDと同様な発達障害を引き起こす可能性が示唆された。しかし、上記の3種を含めて、脳下垂体LHβに有意な効果を示す化合物は存在せず、障害の機構はダイオキシンとは異なると推定された。今回の実験は、作用の有無の把握を目的としたため、非現実的な高用量を用いたものが多く、より低用量での追加検討が必要と思われた。また、今回はTCDDと同様な単回処理条件で検討を行ったが、体内半減期が極めて長いTCDDと同様な条件で他物質の影響を観察するには問題もあると考えられる。事実、CdCl₂は高用量/単回処理条件では、胎児精巣StARを変動させなかったが、1 ppmの低濃度含有水を母ラットに継続して飲水させた場合には（GD1-20の20日間）、GD20胎児のStARを有意に低下させた。従って、体内半減期の短い内分泌攪乱物質の胎児脳下垂体-性腺系に対する障害性の有無については、異なる処理条件での追加検討が必要である。

D. 結論

1. TCDDは胎児期特異的に脳下垂体のHDACを誘導し、LHβ遺伝子特異的にヒ

ストンの脱アセチル化を亢進してLHβの発現を抑制する。

2. TCDDは脳下垂体制御組織である視床下部のメタボロームを変動させ、TCAサイクルを停滞させてATP生産を抑制する。
3. TCDDによるTCAサイクル障害は本回路の作動に必須なLAが低下するためである可能性が高い。TCAサイクルの停滞が重要な機構であることは、LAの補給がTCDDによるゴナドトロピン障害を回復させる事実とよく符合する。
4. 上記1と2の関連性は、エネルギー生産抑制がHDAC誘導を惹起する研究例があり、このことと関連すると推定される。
5. N-AcAspの蓄積は、性未成熟を予見するためのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆される。
6. TBT、BPAおよびDEHPはTCDDとは異なる機構で胎児精巣のステロイド合成系を障害する。Cdは単回処理法では効果を示さないが、飲水による継続摂取では胎児精巣ステロイド合成系を障害する。従って、体内半減期の短い化学物質の評価では、飲水による長期投与方法での解析が望まれる。

E. 健康危険情報

特に新規な情報はなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

(2009～2011年)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeda, T., Fujii, M., Taura, J., Ishii, Y., and Yamada, H.	Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases: a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin	J. Biol. Chem.	287 (22)	18440 - 18450	2012
Takeda, T., Yamamoto, M., Himeno, M., Takechi, S., Yamaguchi, T., Ishida, T., Ishii, Y., and Yamada, H.	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin potentially attenuates the gene expression of pituitary gonadotropin β -subunits in a fetal age-specific fashion: a comparative study using cultured pituitaries	J. Toxicol. Sci.	36 (2)	221 - 229	2011
Matsumoto, Y., Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Fujii, M., Ishii, Y., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., and Yamada, H.	Maternal exposure to dioxin reduces hypothalamic but pituitary metabolome in fetal rats: a possible mechanism for a fetus-specific reduction in steroidogenesis.	J. Toxicol. Sci.	35 (3)	365 - 373	2010

