

では、クエン酸回路停滞の寄与を検討するために、L□□ と共にクエン酸回路の必須補酵素である thiamine を用いて、LH 低下に対する効果を検証した。さらに、胎児脳における LA 低下の機構に関する検討も加えた。

B . 研究方法

1. 実験動物および薬物処理

Wistar 系雌性ラット (7-10 週齢) を、雄性ラット (10-30 週齢) と一晩交配し、翌日膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目に LA を 20 mg/kg/100 μ L DMSO の用量で尾静脈内投与したのち、TCDD (1 μ g/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。また、対照群には、L□□の代わりに DMSO、ダイオキシンの代わりにコーン油を投与した。妊娠 16~20 日目に、一日一回初回と同用量の L□□を尾静脈内投与したのち、妊娠 20 日目の雄胎児より組織を採取した。Thiamine 投与群については、妊娠 14 日目の夕方より妊娠 20 日目までの間、thiamine 誘導体である thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide (以下 thiamine, 1 mg/mL) 含有水を自由に摂取させた。同様に、GD20 に胎児より組織を採取し、解析に供した。

2. 組織中 ATP 濃度

組織をホモジナイズしたのち、1,000 x g で 10 分間遠心分離した。上清を H₂O にて 100 倍希釈したのち、ATP 測定キット (東洋ビーネット社) を用いて測定した。

3. リアルタイム RT-PCR 法

抽出した組織より total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (9)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を

β -actin mRNA の Ct 値で補正したのち、対照群に対する割合として解析した。

4. イムノプロット解析

胎児視床下部をホモジナイズしたのち、1,000 x g にて 10 分間遠心分離した。得られた上清を用いて、LA 合成酵素タンパク質の発現量を解析した。一次抗体は、rabbit anti-rat LA synthase IgG (GeneTex 社) および mouse anti- β -actin monoclonal antibody (BioVision 社) を用いた。LA 合成酵素の発現は β -actin で補正したのち、対照群に対する割合として算出した。

5. LA 定量

胎児視床下部を 50 μ L の氷冷水にてホモジナイズし、6 倍量のアセトニトリルを加えて激しく攪拌した。11,400 x g で 10 分間遠心分離したのち、上清を回収した。ペレットは、再度アセトニトリルによる抽出を行い、一回目の上清と合わせて遠心エバポレーターを用いて溶媒を留去した。残渣を 40% アセトニトリルに再溶解させたのち、UPLC-TOF-MS 装置に付して LA 含量を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号:A25-061-0~3。

C. 研究結果

まず、thiamine 処理により胎児視床下部においてエネルギー産生が促進されることを確認するため、TCDD 依存的な ATP 減少に対する thiamine および LA 補給の効果を検討した。検討の結果、thiamine の併用によっても、LA と同様に TCDD 依存的な ATP 減少は正常水準にまで復帰した (Fig. 1)。また、TCDD による ATP 減少が他の組織においても起こるか否かを検討したところ、全脳においても有意な低下が認められたが、末梢組織である脳下

垂体、肝臓および腎臓においては変動しなかった (Fig. 1)。これらの結果から、TCDD による胎児 ATP 減少は脳・視床下部に特異的であり、thiamine 補給によっても LA と同様にエネルギー産生を改善することが明らかになった。

次に、性ホルモン合成系低下に対する thiamine 併用の効果を検討するため、脳下垂体 LH ならびに精巣の性ホルモン合成系タンパク質の発現を解析した。LH 水準に対する影響を解析した結果、thiamine 補給によって胎児脳下垂体 LH ならびに血中 LH 濃度の低下は有意に改善したが、正常水準にまでは回復しなかった (Fig. 2)。さらに、同様の改善傾向は、精巣の性ホルモン合成の律速段階に關与するタンパク質である steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) の mRNA 低下に対しても確認された (Fig. 3)。一方、過去の成果 (4) と合致して、LA の補給は LH および StAR を共に正常水準にまで改善させた (Figs. 2 and 3)。

LA 濃度を定量した結果、本検討においても全脳において LA の低下が観察された (Fig. 4A)。そこで、LA 低下の機構解析のため、LA 合成酵素ならびに LA の利用に關わる酵素の発現変動を解析した。その結果、TCDD は胎児視床下部の LA 合成酵素 (Fig. 4B) ならびに LA 利用酵素の発現 (Fig. 4C) 共に影響を与えず、LA 低下はこれらの変動以外によって起こることが示唆された。

D. 考察

本年度の研究では、LA による胎児のホルモン合成低下に対する回復機構にエネルギー産生賦活化が寄与するか否かを明らかにするため、LA と共にクエン酸回路の必須補酵素である thiamine を用いて検討した。その結果、TCDD 曝露母体への thiamine の補給によっても、胎児 LH ならびに StAR 低下に対する有意な効果が

認められた。しかし、TCDD による胎児視床下部 ATP 産生低下は、thiamine の補給によってほぼ正常レベルにまで回復したが、LH や StAR の回復は完全ではなかった。一方、LA 補給によっても、ATP のみならず LH 低下も正常レベルに改善した。これらの結果から、LA による LH 減少に対する回復効果は、1) クエン酸回路賦活化を通じた ATP 産生促進、ならびに 2) thiamine に依存しない LA 特異的作用の複合的な機構に基づくことが示唆された。

LA はクエン酸回路の必須補酵素としての機能以外に、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性抑制 (5)、tumor necrosis factor (TNF) α および nuclear factor (NF)- κ B 経路の阻害 (6)、グリシン開裂反応 (7)、ならびに抗酸化作用 (8) 等の多彩な機能を有する。当教室ではこれまでに、数種類の抗酸化物質を用いた比較検討によって、LA による効果には抗酸化作用の寄与は小さいことを示している (4)。最近我々は、TCDD が胎児視床下部において AMPK を活性化することを示唆する結果を得ている (成績未掲載)。AMPK は、LH 発現および分泌を抑制することが報告されており (10, 11)、TCDD は AMPK 活性化に基づいて LH 発現を低下させ、LA はこれを抑制することで効果を示す可能性が考えられる。また、ダイオキシンは TNF α 誘導によって NF- κ B 経路を活性化し細胞障害性を示すが (12)、脳内における TNF α 増加は LH 合成 / 分泌を低下させると言う (13)。従って、LA は TCDD による脳内の TNF α 増加に対して拮抗することで LH 低下を抑制した可能性もある。今後、これらの点に着目して、TCDD による LH 抑制とこれに対する LA 効果の機構を明らかにしていくことが重要である。

LA 減少の機構解析のため、LA 合成酵素ならびに利用酵素の発現水準に対する

影響を解析したが、いずれも TCDD による変動は観察されなかった。従って、TCDD はこれらの酵素水準への影響以外によって胎児脳内の LA を減少させ、性ホルモン合成系低下を惹起することが示唆された。LA は、ミトコンドリアにおける脂肪酸酸化によって供給されるオクタン酸を原料として LA 合成酵素等によって生合成される (14, 15)。思春期ラット脳下垂体を用いて行ったメタボローム解析において、TCDD によるオクタン酸レベルの増加が推定されており (H24 年度分担研究報告)、TCDD はオクタン酸からの変換活性を低下させることで LA を減少させる可能性が考えられる。現在のところ、LA 合成酵素の活性制御に関しては不明な点が多いが、少なくとも活性中心に鉄-硫黄クラスターを有することが明らかにされている (15)。TCDD は、腎臓細胞において貯蔵や取り込み異常によって鉄の恒常性を破綻させるため (16)、胎児脳においても同様のことが起こることで酵素活性が抑制される可能性がある。また、LA は胎盤に発現する sodium-dependent multivitamin transporter によって胎児への循環が起こるため (17)、TCDD が母体の LA 量に及ぼす影響についても無視はできない。いずれにせよ、TCDD は LA 減少に基づいて胎児障害性を惹起すると考えられるため、引き続き LA 減少の機構解析を行うことが重要である。

E. 結論

TCDD 依存的な胎児・性ホルモン合成障害に対する LA の保護効果は、クエン回路賦活化によるエネルギー産生促進と LA 特異的な他の作用の複合的な機構に基づくことが示唆された。

F. 研究発表

1. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー (つくば、2014 年 9 月

19 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

H. 参考文献

- 1) Peterson, R. E., Theobald, H. M., Kimmel, G. L. *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**: 283-335 (1993).
- 2) Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y., Yamada, H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 3) Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T., Yamada, H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**: 1091-1099 (2009).
- 4) Koga, T., Ishida, T., Takeda, T., Ishii, Y., Uchi, H., Tsukimori, K., Yamamoto, M., Himeno, M., Furue, M., Yamada, H. *PLoS ONE*, **7**: e40322 (2012).
- 5) Kim, M. S., Park, J. Y., Namkoong, C., Jang, P. G., Ryu, J. W., Song, H. S., Yun, J. Y., Namgoong, I. S., Ha, J., Park, I. S., Lee, I. K., Viollet, B., Youn, J. H., Lee, H. K., Lee, K. U. *Nat. Med.*, **10**: 727-733 (2004).
- 6) Vig-Varga, E., Benson, E. A., Limbil, T. L., Allison, B. M., Goebel, M. G., Harrington, M. A. *Gynecol. Oncol.*, **103**: 45-52 (2006).
- 7) Fujiwara, K., Motokawa, Y. *J. Biol. Chem.*, **258**: 8156-8162 (1983).
- 8) Rosenberg, H. R., Culik, R. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**: 86-93 (1959).
- 9) Matsumoto, Y., Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Fujii, M., Ishii, Y., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., Yamada, H. *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 365-373 (2010).
- 10) Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J. M., Mellon, P. L., Webster, N. J. *Mol. Endocrinol.*, **22**: 760-771 (2008).
- 11) Wen, J. P., Lv, W. S., Yang, J., Nie, A. F.,

- Cheng, X. B., Yang, Y., Ge, Y., Li, X. Y., Ning, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**: 756-761 (2008).
- 12) Fan, F., Yan, B., Wood, G., Viluksela, M., Rozman, K. K. *Toxicology*, **116**: 9-16 (1997).
- 13) Watanobe, H., Hayakawa, Y. *Endocrinology*, **144**: 4868-4875 (2003).
- 14) Parry, R. J. *Tetrahedron*, **39**: 1215-1238 (1983).
- 15) Cronan, J. E., Zhao, X., Jiang, Y. *Adv. Microb. Physiol.*, **50**: 103-146 (2005).
- 16) Santamaria, R., Fiorito, F., Irace, C., De Martino, L., Maffettone, C., Granato, G. E., Di Pascale, A., Iovane, V., Pagnini, U., Colonna, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**: 704-712 (2011).
- 17) Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Ganapathy, V. *Placenta*, **18**: 527-533 (1997).