

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による胎児脳下垂体ホルモンへの影響とその機構解析：aryl hydrocarbon receptor 欠損ラットを用いた検討

研究分担者 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
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 准教授
研究協力者 武田 知起 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野 助教

研究要旨 当教室ではこれまでに、妊娠ラットへのダイオキシン曝露による性未成熟等の出生児発育障害の一端が、胎児脳下垂体の luteinizing hormone (LH) および growth hormone (GH) の発現低下に起因することを明らかにしている。本年度の研究では、ダイオキシンの毒性発現に重要である aryl hydrocarbon receptor (AhR) の遺伝子欠損ラットを用いて、上記の胎児脳下垂体ホルモンの低下とそれに付随する発育障害に対する AhR の寄与を母体と胎児の遺伝子型の両面から検討した。ヘテロ欠損型の妊娠ラットに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を処理し、同腹に混在する異なる遺伝子型の胎児それぞれについて TCDD の影響を比較した。その結果、野生型胎児においては TCDD により脳下垂体 LH および GH レベルは低下したが、欠損型胎児では影響は認められなかった。さらに、胎児精巣の性ホルモン合成系タンパク質の発現に対する TCDD の影響も AhR 欠損によって消失した。これらの胎児期への影響と合致して、成長後の雄児の交尾行動および雌児のサッカリン嗜好性は TCDD 曝露母体より出生した野生型の児において障害されたが、AhR 欠損児では TCDD による影響は認められなかった。さらに、低体重や低体長も AhR 欠損によって消失した。続いて、母体側の AhR の寄与を検討するため、野生型あるいは欠損型母体に TCDD を処理し影響を比較した。その結果、野生型母体への TCDD 曝露によって生じる雄胎児の GH mRNA 減少は、欠損型母体への同処理では低下傾向に止まった。以上の結果から、1) TCDD は胎児自身の AhR を介して胎児 LH/GH 合成を低下させ、成長後に性未成熟等の発育障害を惹起すること、ならびに 2) 雄胎児の GH 発現抑制には母体の AhR も寄与することが明らかになった。

A . 研究目的

妊娠期のダイオキシン曝露による性未成熟等の出生児発育障害は、低用量で発現し、影響が長期間持続するため問題である (1)。当教室では、最強毒性ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 µg/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露により、出生前後の限定された時期に脳下垂体 luteinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として成長後の性未成熟が固着することを明らかにしている (2, 3)。更に、TCDD は別の脳下垂体ホルモンで

ある growth hormone (GH) の発現も胎児期に減少させ、これと付随して低体重や低体長が生じることも見出している (4, 5)。多くのダイオキシン毒性発現には、aryl hydrocarbon receptor (AhR) 活性化が重要であるが (6)、出生児発育障害に対して AhR が寄与するか否かは不明である。そこで本年度の研究では、上記の胎児 LH/GH 低下に基づく障害性に対して AhR が寄与するか否かを、AhR 遺伝子欠損ラットを用いて検討した。本研究ではまず、児自身の AhR の重要性を明らかにす

るため、ヘテロ欠損型 (Het) の妊娠ラットに TCDD を処理したのち、同腹内に混在する野生型 (WT) 胎児、Het 胎児、ならびにホモ欠損型 (KO) 胎児の 3 者間で、TCDD による影響の違いを比較した。さらに、母体自身の AhR が寄与する可能性を検討するため、WT 母体および KO 母体への TCDD 曝露が胎児 LH/GH 発現に及ぼす影響も比較した。

B . 研究方法

1. 動物実験

AhR-KO ラットは、XTN™ TAL nuclease ベクターを用いて作出した (平成 26 年度分担研究報告書)。遺伝子型の判別は、出生児の尾あるいは耳小片よりゲノム DNA を抽出し、AhR 遺伝子をコードするプライマーを用いた PCR によって行った。

1-1. 児の AhR 遺伝子型間での比較

雌雄の AhR-Het ラットを一晩交配し、翌朝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。得られた AhR-Het 妊娠ラットの妊娠 15 日目に、TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。妊娠 20 日目の胎児より組織および血液を採取した。一部の実験では、出生後の成熟に対する影響を調べるため、TCDD 処理後の母ラットを自然に出産させたのち、生後 21 日目において離乳させた。遺伝子型を判別したのち、継続飼育を行った。7 週齢時に、体重、体長、肛門生殖突起間距離 (AGD) ならびに尿道膈間距離 (UVD) を測定したのち、以降の行動試験に供した。

1-2. 母体の AhR 遺伝子型間での比較

本解析では、児の AhR 遺伝子型の影響を排除するため、全ての児が AhR-Het となるように妊娠ラットを作成した。すなわち、WT 雌 x AhR-KO 雄あるいは AhR-KO 雌 x WT 雄の組み合わせでの交配によって WT および KO の妊娠ラッ

トを得た。それぞれ妊娠 15 日目に TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/2 \text{ mL}$ コーン油) あるいはコーン油を単回経口投与したのち、妊娠 20 日目の胎児より脳下垂体を採取した。

2. リアルタイム RT-PCR 法

組織より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (7)。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。

3. Enzyme immunoassay (EIA)

胎児血清 LH および GH 濃度は、市販のキットを用いて、添付説明書に従って測定した。血清は、LH については添付の希釈用溶液にて 2 倍希釈、GH は 5 倍希釈したのちに測定に用いた。

4. 交尾行動試験

既報 (3) に従って、出生雄児の 10 および 11 週齢時に雄特異的交尾行動試験を行った。指標には生殖器挿入を用い、30 分間における実施回数を計測した。

5. サッカリン嗜好性試験

既報 (3) に従って、出生雌児の 8 週齢時に実施した。0.01% のサッカリンナトリウム溶液および水を満たした 2 本の給水瓶を用意し、自由に摂取させた。一日あたりの飲水量を給水瓶の重量変化として測定し、全飲水量に対するサッカリン溶液の飲水量を嗜好性として算出した。

(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:A26-151-0~3。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行っ

た (承認番号: 26-4)。

C. 研究結果

AhR-Het 妊娠ラットへの TCDD 曝露によって、これまでの成果と同様に WT 雄胎児では脳下垂体の LH β mRNA ならびに血中 LH レベルが減少した (Fig. 1A and B)。しかし、Het 胎児では減少傾向に止まり、KO 胎児においては影響が完全に消失した (Fig. 1A and B)。これと符合して、LH の下流で働く精巢の性ホルモン合成の律速タンパク質である steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) の mRNA 発現も、WT 胎児のみで TCDD によって低下した (Fig. 1C)。さらに、TCDD は WT 胎児において脳下垂体 GH mRNA および血中 GH 濃度を減少させたが、同様の現象は KO 胎児では認められなかった (Fig. 2)。ただ、LH β /StAR と異なり、TCDD による血中 GH 濃度の低下は、Het 胎児でも有意差が検出された (Fig. 2B)。続いて、成長後の雄児の成熟に対する AhR の寄与を検討した。性成熟に対する影響を検討した結果、雄特異的交尾行動である生殖器挿入の回数は WT の出生雄児では減少したが、KO の出生雄児においては全く減少せず (Fig. 3A)、胎児期の LH 低下と合致した結果が得られた。形態的な性成熟の指標である AGD は、本条件においては TCDD による影響は観察されなかった (Fig. 3B)。一方、WT の出生雄児では、胎児期の TCDD 曝露によって体重および体長の減少ないし減少傾向も認められた (Fig. 3C and D)。

同腹胎児間での LH/GH 発現への影響について、雌胎児も同様に解析した。その結果、WT では TCDD 依存的な脳下垂体 LH β ならびに GH の mRNA 発現低下が認められたが、KO においてはこれらの影響は消失した (Fig. 4)。GH mRNA については、雌胎児では Het においても WT と同様に低下した (Fig. 4B)。さらに、胎

児期の LH 低下と符合して、成長後の雌特異的行動形質であるサッカリン嗜好性は WT 出生児のみで低下した (Fig. 5A)。また、形態的な性成熟の指標である UVD ならびに AGD は、WT および Het 出生雌児において短縮ないしその傾向を示した (Fig. 5B and C)。体重・体長も、TCDD 曝露母より出生した WT 児のみで減少した (Fig. 5D and E)。

次に、母体の AhR 遺伝子型の寄与を検討するため、WT および KO 母ラットに TCDD を処理したのち、胎児脳下垂体 LH β ならびに GH の発現水準に対する影響を比較した。その結果、胎児脳下垂体の LH β mRNA に関しては、母体の AhR 遺伝子型の違いに関わらず TCDD による有意な影響は生じなかった (Fig. 6)。一方、GH mRNA に関しては、雄胎児では WT 母への曝露によってのみ有意な低下が観察され、KO 母への曝露では低下傾向に止まった (Fig. 6)。一方、雌胎児においては母体の AhR の有無に関わらず、TCDD による GH mRNA の減少はほぼ同様に生じた (Fig. 6)。

D. 考察

本研究では、AhR-Het 母ラットの同腹内に混在する WT、Het および KO 児の 3 者間でダイオキシンによる LH/GH 低下を起点とする次世代障害に対する AhR 活性化の寄与を検討した。次世代への影響を論じる上では様々な要因を考慮する必要があるが、今回の検討においては、母親の遺伝子型ならびに胎児移行性は少なくとも配慮すべきであると思われる。例えば、トリプトファン水解酵素-2 の KO 母の出生児 (KO 型) と Het 母の出生児 (KO 型) では、同じ KO 児であっても生存率等の発育に明確な違いが生じる (8)。Cytochrome P450 1a2-KO 妊娠マウスへのダイオキシン曝露は、WT 妊娠マウスへの同処理よりも胎児移行性が高いと言う

(9). 今回の検討ではこれらの問題点を念頭に置き、同腹胎児間での比較を行うことによって、母の遺伝子型の違いに起因する効果を排除し、児の AhR 遺伝子型に由来する現象の把握に努めた。検討の結果、雌雄共に WT 胎児で生じる TCDD 依存的な LH および GH 低下は、KO 胎児では全く認められなかった。さらに、胎児精巢の StAR の発現低下のみならず、成長後の交尾行動障害 / サッカリン嗜好性低下ならびに低体重等の種々の出生後の成熟抑制も AhR 欠損によって消失した。以上の結果から、TCDD は胎児の AhR 活性化を通して LH/GH の発現を減少させ、出生後の発育を障害することが明らかになった。

本研究では、WT および KO それぞれの妊娠ラットの胎児を用いて TCDD 依存的な LH/GH 低下に対する母体 AhR の寄与も検討した。この検討では、いずれの母体においても TCDD による胎児 LH β の低下は認められなかったが、これは解析した胎児が必然的に Het 遺伝子型であったことが原因と思われる。逆に言えば、母親の AhR に関わらず、胎児の遺伝子型が WT から Het に変わるだけで影響が消失する事実より、TCDD が胎児 LH β の発現に及ぼす影響は胎児 AhR の発現・機能への依存度が極めて大きいと考えられる。一方、GH mRNA への影響はこれとは異なっており、WT 母への TCDD 曝露により、雌雄胎児の GH mRNA の発現は減少したが、Het および KO 母の雄胎児では減少傾向に止まった。このことから、TCDD による雄胎児の GH 低下には母体の AhR 活性化も一定の寄与を果たすことが示唆された。我々は最近、TCDD が母体と共に雄胎児のコルチコステロンレベルを減少させ、これが GH 低下に寄与することを見出している(4)。本検討結果はこれをよく支持しており、TCDD は母体の AhR 活性化を通し

てコルチコステロンを低下させ、雄胎児のみで GH 低下に寄与するとの機構が推定される。母体のコルチコステロン低下が AhR 依存的に生起するか否かは、今後の課題である。

E. 結論

TCDD 依存的な胎児脳下垂体 LH 減少を起点とする性未成熟は、胎児の AhR 活性化に基づいて生起することが明らかになった。胎児 GH 抑制にも胎児 AhR が重要であるが、雄児では母体の AhR も寄与することが示された。

F. 研究発表

1. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー (神戸、2015 年 9 月 17-18 日)(2 演題)
2. 日本薬学会第 136 年会 (横浜、2016 年 3 月 29 日)(2 演題)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *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) Hattori Y, Takeda T, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *Endocrine*, **47**: 572-580 (2014).
- 5) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**: 48-57 (2014).
- 6) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM,

Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ.
Toxicol Appl Pharmacol, **140**: 173-179
(1996).

7) 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).

8) Angoa-Pérez M, Kane MJ, Sykes CE,
Perrine SA, Church MW, Kuhn DM.
Genes Brain Behav, **13**: 579-591 (2014).

9) Dragin N, Dalton TP, Miller ML, Shertzer
HG, Nebert DW. *J Biol Chem*, **281**:
18591-18600 (2006).