

## 分担研究報告書

### 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による性未成熟に対するリボ酸とチアミンの保護効果とその機構

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** 我々は、妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露により、胎児脳下垂体の黄体形成ホルモン (LH) 低下を起点とする成長後の性未成熟が惹起することを明らかにしている。更に、TCDD は胎児視床下部において、TCA 回路の必須補酵素である  $\alpha$ -lipoic acid (LA) と共に ATP を減少させ、TCDD 曝露母体への LA の補給によって上記の胎児 LH 低下が回復することも見出している。本研究では、エネルギー産生停滞と LH 低下に対する LA の寄与をより明確にするため、他の TCA 回路補酵素である thiamine の保護効果を検証すると共に、LA の効果や減少の機構を解析した。その結果、TCDD 曝露母への thiamine 補給によっても、胎児の ATP および LH は有意に回復したが、その程度は LA よりも弱かった。すなわち、TCDD による胎児エネルギー産生攪乱と LH 抑制には、LA 低下の寄与が大きいことが確認できた。さらに、ATP 低下と合致して、TCDD は低エネルギー状態で活性化される AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化を亢進し、母体への LA 補給はこれを完全に抑制した。さらに、LH 合成の上位制御因子であるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) の受容体の発現低下も LA 補給によって改善した。AMPK は脳下垂体における LH 合成を抑制することから、TCDD はエネルギー減少を通じた AMPK 活性化に基づいて GnRH 受容体については LH 合成を低下させ、LA はこれに拮抗する可能性が考えられた。LA 減少の機構解析のため、胎児視床下部における LA 合成系酵素の発現変動を解析した結果、いずれの mRNA 発現量にも変化は観察されなかった。従って、TCDD は LA の合成に関わる酵素の発現変動以外の作用を通して LA を減少させ、児の障害を惹起する可能性が示唆された。

#### A . 研究目的

ダイオキシンの妊娠期曝露は、出生児に性未成熟等の様々な発育障害を惹起する (1)。これらの多くは、発現に要する用量が小さく、成長後も影響が継続するため問題が大きい。当教室ではこれまでに、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1  $\mu$ g/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露により、胎児脳下垂体において luteinizing hormone (LH) が低下し、出生・成熟後に交尾行動障害が惹起されることを明らか

にしている (2,3)。さらに、TCDD は TCA 回路の必須補酵素である  $\alpha$ -lipoic acid (LA) を胎児脳内において減少させること、さらには TCDD 曝露母体への LA 補給により胎児の LH 低下が改善する事実を見出している (4)。昨年度の研究では、LH 低下に対する LA の保護効果の特異性を調べるため、LA と共に TCA 回路の必須補酵素である thiamine を用いた検討を実施した。その結果、thiamine の補給による LH の発現回復は有意ではあったが充分

ではなかった（平成 26 年度分担研究報告書）。この検討では、単一用量での自由飲水法によって thiamine の効果を評価したため、この結果のみで結論づけることはできないが、TCDD による胎児障害とこれに対する LA の回復には、LA 特異的な作用の寄与が大きいことが示唆された。本年度の研究ではまず、エネルギー産生低下と LH 低下に対する LA の寄与をより明確に理解するため、生体利用率と胎児移行性の向上が期待できる尾静脈投与法に切り替えて、thiamine による保護効果の用量依存性を精査した。さらに、TCDD による胎児障害に対する LA 特異的作用とこれの減少の機構についても検討を実施した。

## 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）と一晚交配し、翌日朝に膣内に精子が確認された日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目の母ラットに LA（20 mg/kg/100  $\mu$ L DMSO）または thiamine 誘導体である thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide（以下 thiamine; 5, 50 および 250 mg/kg/100  $\mu$ L DMSO）を尾静脈内投与したのち、TCDD（1  $\mu$ g/kg/2 mL コーン油）を単回経口投与した。対照群には、それぞれの溶媒のみを投与した。妊娠 16~20 日目に、一日一回初回と同用量の LA あるいは thiamine 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。

### 2. リアルタイム RT-PCR 法

採取した組織より 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（5）。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 発量を解析した。標的遺伝子の mRNA の

threshold cycle (Ct) 値を  $\beta$ -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。

### 3. イムノプロット解析

採取した胎児視床下部をただちにホモジナイズしたのち、1,000 x g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を用いて、AMP-activated protein kinase (AMPK) とそのリン酸化体の発現量を解析した。一次抗体は、rabbit anti-human AMPK $\alpha$  IgG および rabbit anti-human phospho AMPK $\alpha$  (Thr172) IgG（ともに Cell Signaling Technology 社）を用いた。Horseradish peroxidase 標識二次抗体にて検出したのち、全 AMPK $\alpha$  に対するリン酸化 AMPK $\alpha$  の割合を活性化 AMPK の割合として算出した。

（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：A25-061-0~3。

## C. 研究結果

TCDD 依存的な胎児脳内の ATP 減少に対する thiamine および LA 補給の効果を比較検討した結果、50 mg/kg の thiamine 併用によって有意な回復が見られたが、LA に比較してその程度は小さかった (Fig. 1A)。また、thiamine 補給は脳下垂体の LH $\beta$  発現低下を有意に改善したが、LA とは異なり正常レベルにまでの回復は見られなかった (Fig. 1B)。

LA による保護効果の機構解析のため、低エネルギー状態によって活性化され、LH 合成を抑制するエネルギーセンサータンパク質である AMPK（6-8）に着目し、この活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、TCDD 母体曝露によって脳内の AMPK のリン酸化（活性化）が亢進し、これは LA の共処理により抑制されるこ

とが明らかになった (Fig. 2)。これと関連して、LH 合成の上位制御因子である gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の受容体の TCDD 依存的な減少に対して、LA は正常レベルにまで改善させた (Fig. 3)。視床下部における GnRH および LH 合成抑制因子である gonadotropin-inhibitory hormone の mRNA 水準に対しては、TCDD ならびに LA とともに影響を与えなかった (Fig. 3)。

LA 減少の機構解析の一環として、胎児視床下部における LA 合成系酵素群の発現変動を解析した。その結果、本検討で対象とした 4 種の酵素の発現水準 (mRNA 水準) に対しても、TCDD による影響は見られなかった (Fig. 4)。

#### D. 考察

本年度の研究では第一に、胎児脳におけるエネルギー減少と LH 合成低下に対する LA の寄与を明確にするため、LA と共に TCA 回路の必須補酵素である thiamine の保護効果を検討した。本検討に当たっては、マウスへの thiamine の尾静脈投与における半数致死量が 100~125 mg/kg であることに基づき (9)、効果が期待できる用量である 50 mg/kg を中心として用量依存性を評価した。その結果、TCDD 曝露母体への thiamine の補給により、50 mg/kg の用量においては胎児脳内の ATP ならびに LHβ の発現は有意に回復したが、LA に比較して効果の程度は明らかに小さかった。一方、最高用量である 250 mg/kg では thiamine の効果は消失したが、これは過量投与によって毒性が生じたためと思われる。関連して、胎生致死や生存児の低体重も同条件下で観察された (データ未掲載)。以上の結果から、TCDD による胎児脳内エネルギー低下ならびに LH 抑制は、LA 低下の寄与が大きいと考えられた。

LA は TCA 回路の必須補酵素として

の役割に加えて、AMPK の活性抑制作用を有する (7)。AMPK は、低エネルギー状態に反応してリン酸化 (活性化) され、GnRH 依存的あるいは脳下垂体への直接的な作用を通して LH 合成・分泌を抑制することが知られている (8, 9)。本研究により、1) TCDD 母体曝露による胎児脳内 AMPK のリン酸化の亢進、ならびに 2) LA 補給によるその消失の 2 点が確認された。このことから、TCDD 依存的な LH 抑制に対する LA の保護効果の機構の一つには、TCDD 依存的なエネルギー産生停滞を通じた AMPK 活性化の抑制が寄与する可能性が考えられる。現在のところ、AMPK 活性化によって LH 合成が抑制される詳細メカニズムは理解されていないため、今後の研究が望まれる。しかし、本研究において LA 補給が GnRH の受容体の発現低下を正常水準にまで回復させたことから、TCDD 依存的な AMPK 活性化が GnRH 受容体の発現低下に基づいて LH 合成を低下させ、LA はこれを抑制することで効果を示すという一連の機構が推定される。今後、この検証を通して TCDD による LH 抑制に対する LA 効果の機構を明らかにしていくことが重要と考えられる。

TCDD は胎児脳内の LA 合成系酵素群の発現自体には影響を与えなかった。また、昨年度の検討では、LA の分解酵素や利用に関わる酵素の mRNA 水準も検討しているが、これらも TCDD による影響は確認されていない (平成 26 年度分担研究報告書)。以上のことから、TCDD は、合成や分解・利用に関わる酵素の発現水準への影響以外の機構によって胎児脳内の LA を減少させ、LH を低下させると考えられる。LA 合成は、SH 供与体の存在下でオクタン酸を原料として LA 合成酵素によって触媒されるが (10, 11)、未だ本反応の制御機構に関しては不明な点が多い。現在、TCDD が SH 供与体や LA 合成酵

素の活性中心である鉄-硫黄クラスターに対して影響を及ぼすことで LA 合成を抑制する可能性に着目した取り組みを実施している。

## E. 結論

TCDD による胎児エネルギー産生攪乱と LH 抑制は、本ダイオキシン依存的な LA 抑制の寄与が大きいことが明らかになった。この回復機構の一つには、AMPK 活性化と GnRH 受容体の発現低下に対する拮抗作用が寄与する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

1. 第 32 回日本薬学会九州支部大会 (延岡、2015 年 11 月 28 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) 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).
- 6) 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).

- 7) Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J. M., Mellon, P. L., Webster, N. J. *Mol. Endocrinol.*, **22**: 760-771 (2008).
- 8) 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).
- 9) Zbinden, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **98**: 550-561 (1962).
- 10) Parry, R. J. *Tetrahedron*, **39**: 1215-1238 (1983).
- 11) Cronan, J. E., Zhao, X., Jiang, Y. *Adv. Microb. Physiol.*, **50**: 103-146 (2005).