

## 分担研究報告書

### 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による出生児の性未成熟の機構解析：ゴナドトロピン 放出ホルモン神経への影響

研究分担者 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** 私たちの研究室では、実験動物としてラットを用いたこれまでの一連の解析によって、妊娠期の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露によって出生児に見られる性未成熟の一端が、出生後の成長過程で定着する視床下部 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の発現低下に起因することを見出している。本年度は、出生児の GnRH 発現低下の原因を明らかにするための取り組みとして、発達期の GnRH ニューロンに対する TCDD の影響を調査した。胎生期から離乳期にかけての雄児脳を対象として、GnRH 抗体を用いて組織免疫染色を行った結果、TCDD 母体曝露によって生後 14 日目および 28 日目の雄児において双極性 GnRH ニューロン数が有意に減少することが明らかになった。一方、胎生期においては目立った影響は観察されず、GnRH ニューロンの分布や軸索長についても TCDD による変化は認められなかった。これらの結果から、TCDD 胎児期曝露によって出生後に起こる GnRH 発現低下には、双極性 GnRH ニューロンの選択的な減少が寄与する可能性が見出された。

#### A . 研究目的

妊娠期のダイオキシン曝露は、出生児に交尾行動障害などの性未成熟を惹起する (1)。これらは低用量で発現し、一生涯にわたって影響が定着するため問題である。我々はこれまでの一連の研究によって、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 µg/kg、経口) の妊娠ラットへの曝露が、出生前後の児の luteinizing hormone (LH) の合成を低下させ、これを起点として成長後に交尾行動が障害されること実証している (2, 3)。さらに、上記の障害は視床下部より分泌される神経ペプチドホルモンである gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の合成抑制が成長後にまで定着するためであることも見出した (4)。しかし、GnRH 発現低下が固定化する原因は不明である。

GnRH ニューロンは、鼻板で発生し脳内を遊走することで、胎生後期には視床下

部に到達する (5)。また、出生後より軸索成長やシナプス増加などの形態学的な変化が始まるが、GnRH が生体で明確な役割を担うと考えられているのは思春期 (4-6 週齢) 以降である (6, 7)。TCDD 依存的な GnRH 発現低下は、出生後早期より出現することから、胎生後期から新生児期の GnRH ニューロンの発生、遊走および軸索成長などの初期成熟過程に及ぼす影響が想定される。そこで本研究では、組織免疫染色法を用いた細胞レベルでの解析を行うことで、TCDD が胎児期から思春期離乳期にかけての雄児の GnRH ニューロンに与える影響を検討した。

#### B . 研究方法

##### 1. 動物実験

雌雄の Wistar 系ラットを一晩交配し、翌朝腔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、

TCDD (1 µg/kg/2 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。GD20 の雄児は母体から摘出したのち、頭部を切除してパラホルムアルデヒドに浸し、固定を行った。10 - 30% のスクロース溶液 (in 0.1 M PBS) で置換したのち、脳を OCT compound で包埋し、-80°C にて凍結保存した。生後 (PND) 4、PND7、PND14 および PND28 の雄児はパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) にて灌流固定した。4°C のパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) 中で 1 ~ 2 日浸したのち、同様にスクロース置換ならび包埋を行った。

## 2. 免疫染色

### (1) 脳切片の作製

脳の凍結ブロックを背側から腹側に向かって冠状面を削り出したのち、連続して薄切した。脳切片は適切な大きさのプレート内に一枚ずつ入れ、各穴に 50 mM PBS を 1 mL 入れたのち、室温に出し不要な OCT compound を溶かした。

### (2) GnRH 単染色

(1) によって得られた脳切片は、50 mM PBS で 15 分間 × 3 回洗浄したのち、10% normal goat serum (NGS) 中で 37°C 30 分間静置した。次に、50 mM PBS で 5 分間 × 3 回洗浄し、一次抗体液中で 4°C 60 時間静置した。その後、50 mM PBS で 10 分間 × 3 回洗浄し、二次抗体液中で 25°C 2 時間静置した。再度、50 mM PBS で 10 分間 × 3 回洗浄したのち、脳切片をスライドガラスに貼りつけた。作製したスライドガラスを共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて観察した。画像取得のためのソフトウェアは ZEN 2011 Black edition (Carl Zeiss) を用いた。使用した抗体の希釈倍率は以下の通りである。

一次抗体: Anti-LHRH antibody (1 I.U. / 1 L) を 1% NGS にて 400 倍希釈

二次抗体: Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 647

conjugate を 1% NGS にて 200 倍希釈

### (2) 多重染色

GnRH 単染色の二次抗体液の組成に、さらに anti- neuronal nuclei (NeuN) Alexa Fluor 488 (100 倍希釈) および 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (1,000 倍希釈) を加えたものを二次抗体液として用いた。二次抗体液以外は、(2) に記載した操作および条件と同様に行った。

(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: A27-014-0。

## C. 研究結果

検討に先立ち、幼若ラットの脳において GnRH ニューロンが検出できることを確認するため、GnRH 抗体に加えてニューロンマーカーである NeuN 抗体および細胞核マーカーである DAPI の多重染色を行った。PND7 雄児での検討の結果、GnRH と NeuN の陽性領域が完全にマージし、これが GnRH ニューロンであることが確認できた (Fig. 1A)。さらに、本手法では、細胞体から出る主な突起が 2 本の双極性ニューロンと (Fig. 1B)、1 本のみ単極性ニューロン (Fig. 1C) というそれぞれ形態の異なる GnRH ニューロンが明確に分離可能であることも確認した。そこで、TCDD 母体曝露が胎児ならびに出生雄児の GnRH ニューロンの発達 (= 発生、遊走、形態および軸索長) に影響を及ぼすか否かを検討した。GnRH ニューロンが比較的高密度で分布する organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) を中心に 1.28 mm<sup>2</sup> 四方の領域で検討を行った。GD 20 から PND 28 にかけて切片ごとの GnRH 陽性細胞数を計測した結果を Fig. 2 に示す。グラフの

縦軸が測定領域に含まれる細胞数、横軸が OVLT からの距離について吻側を負、尾側を正として示す。GnRH ニューロンは吻側にある嗅球から視床下部がある尾側方向に遊走するため、遊走不良が起きた場合は分布が吻側にずれる。検討の結果、PND28 の OVLT+200  $\mu\text{m}$  では総細胞数が減少する傾向が見られたが、いずれの日齢においても両群のグラフの形がよく一致していることが確認された (Fig. 2)。従って、少なくとも TCDD は発達児における GnRH ニューロンの発生や遊走には影響は小さいことが明らかになった。

一方、PND7 から PND28 にかけて極性および双極性それぞれのニューロン数を計測した。その結果、PND14 では OVLT+200  $\mu\text{m}$  付近のニューロン局在領域で TCDD 依存的な双極性ニューロンの減少ないし減少傾向が認められた (Fig. 3)。単極性ニューロンには有意な影響は観察されなかった (Fig. 3)。さらに、これらの傾向はニューロン成熟が完了する PND28 でも継続した (Fig. 3)。なお、TCDD は GnRH ニューロンの軸索長には影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。これらの結果から、TCDD 母体曝露は雄児における GnRH ニューロンの遊走や軸索伸張には影響を及ぼさないが、出生後に双極性ニューロン数を減少させることが明らかになった。

#### D. 考察

本研究では、GD15 の母ラットへの 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TCDD 単回投与が、発達期の GnRH 神経成熟に及ぼす影響を検討した。雄児の GnRH ニューロンの数や形態に及ぼす影響を解析した結果、PND14 ならびに PND28 では双極性 GnRH ニューロンが有意に減少することが明らかになった。胎児期から新生児期の性ステロイド刺激は、軸索成長やシナプス形成などの形態的な成熟化にも重要であるため (8, 9)、本研究

の知見と成熟期に見られる形態異常は共に性ステロイド合成低下によって生起する可能性がある。今後、性ステロイド刺激との関連性を追求し、GnRH ニューロンの成熟過程への影響を明確にすることが重要である。

GnRH プロモーターに enhanced green fluorescent protein (EGFP) を連結した遺伝子を導入した GnRH-EGFP ラットでは、思春期前の EGFP 発現が低い時期は単極性ニューロンの比率が高いが、GnRH 発現が高まる思春期には EGFP 陽性の双極性ニューロンが高比率で検出される (10)。従って、双極性ニューロンの方が恒常的に GnRH プロモーター活性が高いために、この減少が GnRH 発現低下に関与する可能性が考えられる。双極性 GnRH ニューロンの有意な減少が認められたのは、OVLT から尾側に 200  $\mu\text{m}$  のニューロン局在領域に限定された。OVLT には血液脳関門が存在しないため、OVLT 近辺の GnRH ニューロンは末梢からの刺激を受けやすく、他領域のニューロンよりもスパインの分枝構造が複雑であると言う (11)。また、GnRH ニューロンは、 $\gamma$ -aminobutylic acid (GABA) およびセロトニンなどの神経伝達物質の制御を受けることが知られている (12, 13)。ダイオキシンは GABA ニューロンを標的として性分化を障害する可能性 (14)、ならびに母マウスへの TCDD 曝露によって児のセロトニン陽性細胞数が減少することが報告されている (15)。これらを総合すると、TCDD による発達期の性ステロイドや GABA およびセロトニンなどの GnRH 神経成熟に関わる因子の発現を抑制し、双極性ニューロンへの成熟化を障害する可能性が想定される。GnRH ニューロンの発達障害の実態を明らかにするため、引き続き性ステロイドや神経伝達物質との相互作用とこれに対する TCDD の影響を検証することが重要であろう。

## E. 結論

妊娠期の TCDD 曝露は、PND14 ならびに PND28 の雄児では双極性 GnRH ニューロンが有意に減少することが明らかになった。

## F. 研究発表

1. 第 34 回日本薬学会九州支部大会 (熊本、2017 年 11 月 25 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 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) Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M, Yamada H. *Mol Pharmacol*, **85**: 74-82 (2014).
- 5) Daikoku S, Koide I. *J Comp Neurol*, **393**: 34-47 (1998).
- 6) Clarkson J, Herbison AE. *Mol Cell Endocrinol*, **254-255**: 32-38 (2006).
- 7) Clarkson J, Han SK, Liu X, Lee K, Herbison AE. *Mol Cell Endocrinol*, **324**: 45-50 (2010).
- 8) Mong JA, Roberts RC, Kelly JJ, McCarthy MM. *J Comp Neurol*, **432**: 259-267 (2001).
- 9) Wilson CA, Davies DC. *Reproduction*, **133**: 331-359 (2007).
- 10) Xue H, Gai X, Sun W, Li C, Liu Q. *Neural Regen Res*, **9**: 1303-1312 (2014).
- 11) Herde MK, Geist K, Campbell RE, Herbison AE. *Endocrinology*, **152**: 3832-3841 (2011).
- 12) Watanabe M, Fukuda A, Nabekura J. *Front Neurosci*, **8**: 387 (2014).
- 13) Kim HS, Yumkham S, Choi JH, Son GH, Kim K, Ryu SH, Suh PG. *J Endocrinol*, **190**: 581-591 (2006).
- 14) Petersen SL, Krishnan S, Hudgens ED. *Endocrinology*, **147**: 33-42 (2006).
- 15) Kuchiiwa S, Chenga SB, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, Hashiguchi W, Kuchiiwa T. *Neurosci Lett*, **317**: 73-76 (2002).