

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：芳香族炭化水素受容体欠損ラットでの検討

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

研究要旨

妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起する。我々はこれまでに、本障害が出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた。さらに最近、芳香族炭化水素受容体 (AHR) 欠損ラットを用いた解析から、上位制御因子の黄体形成ホルモン (LH) の調節に AHR が関与する事実も突き止めつつある。本年度の研究では、発達過程における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与を、AHR 欠損ラットを用いて明らかにすることを目的とした。まず、AHR 欠損により脳の性分化の時期である周産期の脳下垂体における LHβ の mRNA 発現が低下、精巣の性ステロイド合成系タンパク質である、steroidogenic acute regulatory protein (StAR) ならびに cytochrome P450 17 (CYP17) が減少傾向を示すことを確認した。このことから、AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たす可能性が示唆された。次いで、AHR の生殖腺への影響を検証すべく、成長後の精子形成や生殖器官の成熟に重要なテストステロンの血中濃度への AHR 欠損の影響を調べた。その結果、出生 2 日目 (PND2) の雄では、AHR 欠損により著しく血中テストステロン濃度が低いものの、4 週齢では、野生型と同レベルになっていた。一方、思春期に当たる 6 週齢では、AHR 欠損雄ラットで、テストステロン濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。これに合致して、精巣での CYP17 タンパク質発現レベルが有意に低下していた。そこで、テストステロンの合成、分泌を担うライディッヒ細胞に着目し、AHR 欠損により、形態学的な変化が現れるか否かを 8 週齢を用いて検討したが、ライディッヒ細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった。一方、第 8 週、11 週、20 週において、AHR 欠損では精巣中の精子数が著しく少なかった。以上の結果から、1) AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期特異的なテストステロンの減少とこれに伴う精子数の減少から、AHR には思春期における重要な働きがあることが強く示唆された。

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報告している (2, 3)。更に、別の脳下垂体ホルモンである成長ホルモンの発現も TCDD 母体曝露により胎児期に減少させ、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)、周産期における胎児/新生児脳下垂体の LH 合成、精巣での性ホルモン合成については、未解明な点が多い。また、発達過程、思春期における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与については、分かっていない。

芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) は、細胞質に存在するリガンド活性化型の転写因子である。リガンドと結合することで活性化され核内に移行する。核内に移行した AHR は、AHR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成し、xenobiotic responsive element (XRE) に結合して、標的遺伝子の転写制御を行う (7)。AHR は全身の組織に発現し、この転写制御を介して、薬物代謝経路及び毒性発現経路を仲介する。

これまで行われた AHR 欠損動物を用いた研究から、AHR は脳 (8)、肝臓 (9)、腸 (10)、生殖腺 (11)、様々な組織において重要な役割を果たすと考えられている。その中でも、生殖腺は生殖機能の発達に重要であり、生殖機能は動物種の繁殖、生存にとって必要不可欠であるため、その機構の解明は非常に重要である。AHR 欠損が生殖腺に与える影響として、雌の卵巣の矮小化、性周期の異常、卵胞発達の異常、排卵数の低下など、卵巣への様々な影響が見られている (12)。その機構として、AHR 欠損によりアロマターゼの転写が抑制されることが考えられている (13)。一方、雄では、AHR が、老齢期での精子機能の老化に寄与することが示唆されているが (11)、発達過程における AHR の機能に関しては、まだ報告されていない。

当研究室では、AHR 欠損 (KO) ラットを作成し、ダイオキシンによる肝毒性発現における AHR の関与について研究を行っている (14)。また、同ラットを用いて、ダイオキシン非投与条件下においても、AHR 欠損による影響が解析されている。

その中で、成熟期における精巣の機能低下や形態学的異常、さらに交尾行動における異常が確認された (平成 27 年度分担研究報告)。また、胎児期において、脳下垂体ホルモンである LHβ および、性ステロイド合成の律速過程の中心的役割を担う StAR (steroidogenic acute-regulatory protein) の mRNA 発現が AHR 欠損により、胎生 20 日 (gestational day 20, GD20)において低下することが確認されたことから (15)、AHR には胎児期の性ステロイド合成を介して性成熟および生殖機能に重要な役割があることが示唆された。これまでの当研究室の研究成果から、AHR 欠損ラットでは上述のように雄の生殖機能の低下が顕著であることが示唆されている。しかし、その機構には未だ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、周産期の雄の脳下垂体、生殖腺に着目し、AHR の脳の性分化への影響を考察するとともに、思春期の生殖腺の発達への寄与と作用機構の解明を目指して検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物実験

AHR-KO ラットは、XTNTM TAL nuclease ベクターを用いて作出した (14)。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。妊娠 18 日目の胎児より組織および血液を採取した。また、出生後の成熟に対する影響を調べるため、母ラットを自然に出産させたのち、生後 21 目において離乳させた。遺伝子型を判別したのち、継続飼育を行い、4 週齢、6 週齢、8 週齢、11 週齢および 20 週齢にて実験に供した。また、生後 2 日目 (PND2)

にて試験に供する際は、サンプル採取と同時に組織から DNA を抽出し、遺伝子型を判別した。

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 (16)。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)

血清 テストステロン濃度は、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、滅菌水にて 5 倍希釈したのちに測定に用いた。

4. 精巣断面観察

8 週齢の雄ラットから定法に従って、4% パラホルムアルデヒドで固定を行い、O.C.T. Compound に包埋し、凍結ブロックとした。これをクライオスタットにより厚さ 14 μm で薄切し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

(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：A30-106。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

雌雄の AHR-Het ラットの交配によって得た 妊娠ラットを用いて、AHR 欠損が周産期の児に与える影響を調べたところ、新生児である PND2 において、AHR-KO 雄児では野生型 (WT) 雄児に比べ脳下垂体の LH β mRNA レベルが有意に低下していた。これまで検討していた GD20 よりも早い時期の GD18 では、脳下垂体の LH β mRNA は減少傾向はあるものの有意ではなかった (Fig. 1)。これと符合して、LH の下流で働く精巣の性ホルモン合成の律速タンパク質である StAR の mRNA 発現も、AHR-KO 雄児では WT 雄児に比べ減少傾向を示した (Figs. 2 and 3)。また、CYP17 は、PND2 において減少傾向を示した (Figs. 2 and 3)。これらのことに合致して、血中テストステロン濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 4)。続いて、成長後の性ホルモンレベルへの AHR-KO の影響を調べた。4 週齢においては、血中テストステロン濃度は、AHR-KO 雄と WT 雄間で差が認められなくなった。しかし、思春期に当たる 6 週齢においては、血中テストステロン濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった。このことと合致して、6 週齢においては、CYP17 のタンパク質発現レベルが有意に低かった (Fig. 5)。そこで、テストステロンの合成、分泌を担うライディッヒ細胞に着目し、AHR 欠損により、形態学的な変化が現れるか否かを 8 週齢で検討したが、ライディッヒ細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった (Fig. 6)。また、体重、精巣重量、精巣上体の重量にも差は認められなかった (Fig. 7)。一方、8 週齢、11 週齢、20 週齢において、AHR-KO では精巣中の精子数が著しく少なかった (Fig. 8)。

D. 考察

本研究では、発達過程における精巣と性ホルモン合成への AHR の関与を、AHR-KO ラットを用いて明らかにするこ

とを目的とし、脳の性分化の時期である周産期の脳下垂体における LH β の mRNA 発現が低下、精巣の性ステロイド合成系タンパク質である、StAR ならびに CYP17 の mRNA レベルが減少傾向を示すことを確認した (Figs. 1-3)。当研究室では、妊娠ラットへの TCDD の低用量曝露は、出生児に性未成熟を惹起することを見出し、本障害が出生前後の性ホルモン合成抑制に起因することを突き止めてきた (2, 3)。さらに最近、AHR-KO ラットを用いた解析から、上位制御因子の LH の調節に AHR が関与することが示唆された (15)。この先行研究は、GD20 で実施されていた。本研究では、ダイオキシンを処理しない条件下、AHR 自身のもつ働きを明らかにするために、これまで検討していた GD20 よりも早い時期の GD18、および周産期である出生後の PND2 での検討を行った。CYP17 mRNA レベルは、PND2 において減少傾向を示した (Figs. 2 and 3)。また、血中テストステロン濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 4)。これらのことは、脳の性分化の時期である周産期において AHR が重要な働きを有することを強く示唆した。

AHR 欠損により周産期に低下したテストステロンは、生後 4 週齢においては、WT 雄との間で差が認められなくなった。しかし、思春期に当たる 6 週齢においては、血中テストステロン濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった (Fig. 5)。このことは、8 週齢においてライディッヒ細胞に形態学的な変化は与えなかったものの (Fig. 6)、8 週齢、11 週齢、および 20 週齢において精子数に著しい差を与えた (Fig. 8)。これまで、高齢期での精子機能の老化に AHR が寄与することが、AHR-KO マウスを用いて示唆されているが (11)、発達過程における AHR の機能に関して、精子数に及ぼす影響を示す報告はされていない。本研究では、AHR-KO 動物で、思春期における

精子数が減少することを初めて明らかにした。当研究室の先行研究では、成熟期における精巣の機能低下や形態学的異常が確認されている (平成 27 年度分担研究報告)。さらに交尾行動における異常についても報告している (15)。しかし、本研究では、AHR-KO ラットで思春期初期の 6 週齢で、CYP17 の発現抑制と血中テストステロンレベルの低下があること、および 8 週齢においてライディッヒ細胞の形態学的異常を伴わない精子数の減少が起きていることを見出しており、これらは特筆すべき点である。

以上の結果から、1) AHR は周産期に脳下垂体-精巣系を制御し、性ステロイド合成に関与することで、脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期に特異的なテストステロンの減少とこれに伴う精子数の減少から、AHR には思春期における重要な働きがあることが強く示唆された

E. 結論

AHR は、ダイオキシンの存在しない条件下において、周産期の雄児脳下垂体での LH 産生に欠くことが出来ない働きを有することが支持された。AHR の欠損は、思春期のテストステロン合成を低下させ、精巣に明確な形態学的損傷を与えずに精子数を減少させる。AHR は、TCDD により活性化され、その次世代毒性に関与するが、そのような影響が現れるのは、AHR が構成的条件下に、性成熟において重要な役割を担っているためだと考えられる。当研究室の先行研究で観察された影響は、ダイオキシンが、AHR の働きを攪乱させることを示唆しているのであろう。

F. 研究発表

1. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (大阪、2018 年 7 月 17-20 日)

2. フォーラム 2018: 衛生薬学・環境トキシコロジー (佐世保、2018年9月9-10日)(4演題)
3. 日本薬学会第139年会 (幕張、2019年3月21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) 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) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
- 8) Latchney SE, Hein AM, O'Banion MK, DiCicco-Bloom E, Opanashuk LA. *J Neurochem*, **125**: 430-445 (2013).
- 9) Harrill JA., Hukkanen RR., Lawson M., Martin G., Gilger B., Soldatow V., Lecluyse EL., Budinsky RA., Rowlands JC., Thomas RS. *Toxicol Appl Pharmacol*, **272**: 503-518 (2013)
- 10) Ikuta T, Kurosumi M, Yatsuoka T, Nishimura Y. *Exp Cell Res*, **343**: 126-134 (2016).
- 11) Baba T., Shima Y., Owaki A., Mimura J., Oshima M., Fujii-Kuriyama Y., Morohashi K. *Sex Dev*, **2**: 1-11 (2008)
- 12) Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Miller KP, Meachum S, Paulose T, Flaws JA. *Biol Reprod*, **76**: 1062-1070 (2007).
- 13) Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y. *Mol Cell Biol*, **25**: 10040-10051 (2005).
- 14) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem*, **292**: 10586-10599 (2017).
- 15) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H, Ishii Y. *Biochem Pharmacol*, **154**: 213-221 (2018).
- 16) 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).