

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：脳の性分化と生殖腺の発達に対する芳香族炭化水素受容体の寄与

研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野 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。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、芳香族炭化水素受容体(AHR)欠損ラットで検討を行った。その結果、TCDD 母体暴露していない AHR 欠損雄ラットでは、脳の性分化が起こる周産期において、AHR 欠損により脳下垂体の LH β の mRNA 発現の低下、さらに、それを起点とした性ステロイド合成系タンパク質、および、性ステロイドである testosterone の低下およびその傾向を示すことが明らかになった。このことから、AHR が脳下垂体 LH β 遺伝子のエンハンサー配列である xenobiotic responsive element (XRE) 配列に直接結合し、転写を制御している可能性が考えられた。そこで、LH β 遺伝子に対して AHR が AHR 依存的に LH β の転写に有意な影響があるのか否かを検証するため、抗 AHR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて解析を行った。その結果、WT と AHR ヘテロ欠損雄胎児間で AHR の LH β の XRE 配列への結合能に有意な差は見られなかった。次に、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2, Pitx1 および Prop1 の発現の有意な低下を認めた。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。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。AHR 欠損により、思春期の血中 testosterone の減少が明らかになった。さらに、この結果に付随して、AHR 欠損により、精子数の減少も明らかとなった。すなわち、AHR は精巣の性ホルモン分泌や機能維持に関与する可能性が示唆された。出生 2 日目 (PND2) の雄では、AHR 欠損により著しく血中 testosterone 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 週齢および 8 週齢では、AHR 欠損雄ラットで、testosterone 濃度が野生型ラットに比べ著しく低かった。しかし、13 週齢および 20 週齢では、野生型と遜色ないレベルであった。AHR 欠損により、生殖器官に形態学的な影響がおよぶか否かを検討するため、精子形成が始まる思春期である 8 週齢雄ラットの精巣ならびに精巣上体を HE 染色により、観察した。野生型と比較して、欠損型は精巣上体内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された。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 testosterone の減少、およびその後の持続的な精子数の減少が引き起こされたことから、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 母体暴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。当研究室

の先行研究 (15)および平成30年度分担研究報告における経過報告を一部参照しつつ、令和元年度の知見を合わせて報告する。

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 (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 testosterone 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 μ m 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。

5. クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

WT および KO の雌ラット (7-10 週齢) のラットと WT の雄ラットを交配させ、妊娠ラットを作製した。そののち、GD20 の胎児より脳下垂体を採取して、定法に従って行った。LH β 遺伝子 (GenBank accession number: AC_000069)の XRE1 および XRE2 を解析対象とした。抗体には Anti-AHR antibody (Anti-Aryl hydrocarbon Receptor antibody [RPT9]-ChIP Grade: Aabcam, Inc.)および非感作ウサギ IgG を用い、沈降物から real-time PCR により定量を行った。

(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: 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 でも、差は大きくはないものの脳下垂体の LH β mRNA は有意に低下していた (Fig. 1B)。また、血液中の LH レベルも、GD20 にて有意に低下していたが (15)、PND2 では有意ではなかった (Fig. 1A)。一方、複数の脳下垂体ホルモンに共通の α -サブユニットである glycoprotein hormone α -subunit (α -GSU) の発現には AHR 欠損の影響はなかった (Fig. 1C)。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 StAR の mRNA 発現も、AHR-KO 雄児では WT 雄児に比べ GD18 で有意な減少、PND2 でも減少傾向を示した (Fig. 2B)。また、CYP17 の変動は GD18 および PND2 において減少傾向を示すに止まった (Fig. 2E)。ステロイド産生系酵素である 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) および CYP11A1 も GD18 において AHR-KO では有意な減少を示し、PND2 では前者にのみ僅かではあるが有意な減少が認められた (Fig. 2CD)。これらのことに合致して、血中 testosterone 濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 2A)。

下垂体前葉は、LH β 、成長ホルモン (GH)、thyroid-stimulating hormone β (TSH β)、propiomelanocortin (POMC)、および prolactin など、異なるホルモンを産生する細胞に分化していることが知られているが (Fig. 3)、LH β の場合とは異なり、これらホルモンの発現には AHR-KO の影響が見出されなかった (Fig. 4)。従って、AHR-KO の影響は LH β に特異的である可能性が浮上した。また、上位器官である視床下部で下垂体の LH β に影響し得る因子である gonadotropin-releasing hormone (GnRH)、Kisspeptin (Kiss1) および gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) の発現に AHR-KO の影響は見出せなかった

(Fig. 5)。そこで、LH β 遺伝子に対して AHR が AHR 依存的に LH β の転写に有意な影響があるのか否かを検証するため、抗 AHR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて GD20 の胎児脳下垂体の解析を行った。その結果、WT と AHR ヘテロ欠損雄胎児間で AHR の LH β の XRE 配列への結合能に有意な差は見られなかった (Fig. 6)。次に、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2 (GATA-binding factor 2)、Pitx1 (pituitary homeobox 1) および Prop1 (paired like homeodomain factor 1) の発現の有意な低下を認めた (Fig. 7)。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。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 testosterone 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 週齢および 8 週齢においては、血中 testosterone 濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった (Fig. 8)。一方、13 週齢および 20 週齢では、野生型と遜色ないレベルであった。testosterone の低下が顕著であった 6 週齢および 8 週齢において視床下部および下垂体の上位調節因子の変動を調べたところ、8 週齢において下垂体の LH β が僅かながら有意に低下していた (Fig. 9A)。視床下部の GnRH、Kiss1 および GnIH には影響がなかった (Fig. 9BCD)。そこで、AHR 欠損により、生殖器官に形態学的な影響がおよぶか否かを検討するため、精子形成が始まる思春期である 8 週齢雄ラットの精巢ならびに精巢上体管を HE 染色により、観察した。精巢の精細管を観察した結果を Fig. 10 左側に示す。上段の野生型と比較して、下段の欠損型は精細管内の細胞間隔が広く、細胞密度が低い傾向が観察された。続いて、精巢上体管を観察した結果を Fig. 10 右側に示す。こちらも、野生型と比較して、欠損

型は精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された。なお、同データは平成 30 年度報告書にて提示したものであるが、データ内容を再考して再提示するものである。これに合致して、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. 11)。また、同期間において体重、精巣重量、精巣上体の重量には有意な差は認められなかった (Fig. 12ABC)。なお、6 週齢、8 週齢において、下垂体の prolactin (PRL) および follicle-stimulating hormone β (FSH β) の発現には影響は認められなかった。

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、3 β -HSD ならびに CYP11A1 の mRNA レベルが減少ないし減少傾向を示すことを確認した (Figs. 1-2)。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。StAR、3 β -HSD ならびに CYP11A1 mRNA レベルは、GD18 において減少、また生後の PND2 においても LH β および 3 β -HSD への低下が認められた

(Figs. 1 and 2)。また、血中 testosterone 濃度は、PND2 において著しく低下していた (Fig. 2: 平成 30 年度報告参照)。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 欠損による臨界期の LH の低下機構は、現時点では明確ではない。ChIP 解析から、AHR が直接 LH 遺伝子を調節することを明確に示す結果は得ていないものの、GD18 において脳下垂体の LH 産生細胞への分化に関与する因子、GATA2, Pitx1 および Prop1 の発現の有意な低下を認めた (Fig. 7)。AHR は胎児期の脳下垂体に作用し LH 産生細胞への分化に重要な役割を示す可能性が浮上した。

AHR 欠損により周産期に低下した testosterone 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 testosterone 濃度は、AHR-KO 雄で著しく低かった (Fig. 8: 平成 30 年度報告参照)。この低下は 8 週齢でも顕著であったが、13 週齢および 20 週齢では AHR-KO においても遜色ないレベルであった (Fig. 8) また、8 週齢において精巣上体管内の精子数の減少傾向が観察され、AHR 欠損による精子数減少が想定された (Fig. 10)、これに合致して 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. 11: 平成 30 年度報告参照)。AHR-KO ラットでは、20 週齢において testosterone レベルは対照群と同程度であるにもかかわらず、精子数が減少していた。PRL や FSH β には変動はなかったことから、思春期における testosterone レベルの低下が成獣における精子低下の要因であることが強く疑われた。これまで、老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、血中 testosterone レベルの低下があること、および8週齢において精巣上体管内の精子数の減少傾向を伴って精子数の減少が起こっ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 testosterone 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。その働きは LH 産生細胞への分化の過程において重要と推定される。AHR の欠損は、思春期の testosterone 合成を低下させ、精巣上体管内の精子数の減少傾向を伴って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36回日本薬学会九州支部大会（長崎、2019年11月16-17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).