

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、AHR には、脳の性分化が起こる周産期及び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。そこで、さらに、ダイオキシンによる出生児性未成熟の機構における AHR の役割を明らかにするため、ダイオキシン暴露しない AHR 欠損ラットを調べ、脳の雄優位の性的二型核 (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA) の体積が AHR 欠損雄児において有意に小さいことが分かった。次いで、思春期の血中 testosterone 低下の機構を調べるために、精巣における testosterone 合成酵素と testosterone 代謝酵素の発現レベルを調べた。合成酵素に関しては、有意な変動はなかったものの、cytochrome P450 17 (CYP17) に減少傾向があった。これは、testosterone の低下と同じ方向性のものである。一方、代謝酵素では、検討したいずれの酵素にも AHR 欠損による著しい発現変動は認められなかった。そこで、精巣重量に着目したところ、AHR 欠損ラットにおいて、思春期の精巣サイズが小さい可能性が浮上した。精巣のサイズに関係する遺伝子について、線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF) および FGF 受容体 (FGFR) の発現レベルが有意に増加していることが明らかになった。これらのことから、AHR は FGF および FGFR を直接あるいは間接的に調節している可能性がある。このように、AHR の脳性分化と性腺成熟における重要性が示されつつある。

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 (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 LH β 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。平成 30 年度および令和元年度の検討により、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。一方、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。このように、AHR には臨界期及び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。

そこで、本研究では、AHR 欠損が脳の雄優位の性的二型核 (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA) の体積へ及ぼす影響を調べ、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、testosterone 低下の機構について検証した。当研究室の先行研究 (15) および平成 30 年度、令和元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 2 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、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。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 週齢及び 8 週齢にて実験に供した。生後 (PND) 28、4 週齢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、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。

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、50 μ m 厚に連続して薄切した。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) Calbindin 染色

(1) によって得られた脳切片は、0.1 M PBS で 15 分間×3 回洗浄したのち、10% HS 中で 37°C 30 分間静置した。次に、0.1 M 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、0.1 M PBS で 10 分間×3 回洗浄し、ビオチン化二次抗体液中で 25°C 1 時間静置した。再度、0.1 M PBS で 10 分間×3 回洗浄したのち、スเตรプトアビジン溶液中で 25°C、1 時間静置した。再度、0.1 M 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 20 倍レンズで Zstack (ピッチ: 4.0 μ m) 撮影を行い観察した。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。

10% HS (10% donor horse serum, 0.05% triton X-100, 10 mM NaN₃, PBS)

1% HS (1% donor horse serum, 0.05% triton X-100, 10 mM NaN₃, PBS)

一次抗体: Anti-Calbindin antibody 原液を 1% HS にて 1,000 倍希釈した。

ビオチン化二次抗体: Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) antibody 原液を 1% HS にて 250 倍希釈した。

スเตรプトアビジン液: 使用時に Streptavidin Alexa Fluor® 488 conjugated 原液を 1% HS にて 500 倍希釈した。

3. 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。

(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 及び A20-060。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 及び 1-9)。

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 欠損が出生児に与える影響を調べた。AHR 欠損により、神経レベルで脳の性分化に障害を及ぼすか否かを検証するため、視床下部に存在する雄優位の性的二型核である SDN-POA 体積を定量した。成熟ニューロンマーカーである calbindin の抗体を用いて脳切片 (50 μ m 厚) を染色したのち、共焦点顕微鏡を用いて観察した。神経成熟が完成する時期である PND28 の雄児について解析した。その結果、SDN-POA の体積は AHR 欠損により有意に縮小した (Fig. 1)。したがって、AHR は神経レベルで脳の性分化に寄与することが示唆された。

平成 31 年度及び令和元年度の研究により AHR 欠損により testosterone レベルの低下と精子数の減少が観察された 8 週齢において、AHR の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、testosterone 低下の機構について検証した。男性の性ステロイドである testosterone は、下垂体ゴナドトロピン LH の制御下にある精巣ライディッシュ細胞の cholesterol から合成される (17)。そのため、cholesterol を出発物質として合成される testosterone の合成及び代謝に関する各酵素の精巣における mRNA レベルの解析を行った。合成酵素に関しては、シトクロム P450 11A1 (CYP11A1) が AHR-KO ラットにおいて増加傾向、CYP17 が AHR-KO ラットにおいて減少傾向を示し、StAR, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD, Hsd3b1), 17 β -HSD (Hsd17b1, Hsd17b3) においては AHR-KO による影響はほとんど見られなかった (Fig. 2)。また、代謝酵素に関しては、5-alpha-reductase (type I, Srd5a1; type II, Srd5a2; type III, Srd5a3) 及び aldo-keto reductase1d1 (Akr1d1)いずれにおいてもほとんど変動

は見られなかった (Fig. 3)。これらのことから、有意ではないものの、AHR-KO ラットにおける testosterone 合成酵素としての CYP17 の減少傾向は testosterone レベルの低下と符合すること、また、精巣における testosterone の代謝には AHR 欠損の影響は大きくないことが分かった。

次に、AHR-KO ラットの精巣重量について、更なる検討を行ったところ、8 週齢の KO ラットの精巣の重量は WT と比べ減少が示唆されたため (Fig. 4)、精巣重量に影響を及ぼす可能性のある遺伝子について検討した。線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF) は、発生、細胞増殖、代謝調節、創傷治癒および修復など、複数の生物学的機能を有していることが報告されている (18)。FGF は精巣での発現が確認されており (18)、FGF はその受容体である FGF 受容体 (FGFR) に作用して効果を発揮する (19)。このため、FGF 及び FGFR の発現への AHR-KO の影響を調べた。その結果、精巣に発現する FGF1, FGF2, FGFR1 及び FGFR3 すべてにおいて AHR-KO ラットで有意に増加することが明らかになった (Fig. 5)。

D. 考察

本研究では、AHR 欠損による脳の性分化への影響を神経レベルで明らかにするために、脳の性分化の中心を担う雄優位な神経核である SDN-POA 体積を測定した。その結果、AHR 欠損により、PND28 の雄児における SDN-POA 体積の縮小が明らかになった (Fig. 1)。性的に未経験な雄ラットの SDN-POA を破壊すると、雄性行動の発現が遅くなり、その頻度も低下すること (20) から、AHR 欠損による SDN-POA 縮小が引き金となって、成長後の交尾行動障害を引き起こしたことが示唆された。しかし、本研究で、SDN-POA 縮小時期の解析は PND28 のみに止まっており、この縮小開始の時期は未解明であ

る。そのため、AHR 欠損による SDN-POA 縮小時期を明らかにすることで、脳の性分化へのさらなる機構解明へと繋げていくことが重要である。SDN-POA の体積が雄優位であるのは、発達期にアポトーシスを起こして死んでいく細胞が、雌に比べて雄では少ないからである (21-23)。アポトーシスの分子機構は複雑であるが、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ファミリーに属する Bcl-2 はアポトーシスを誘導する cytochrome c の放出を抑制して、細胞死を防ぐことが報告されている (22)。反対に、Bcl-2 associated X protein (Bax) は cytochrome c 放出を促進して、アポトーシスの誘導を促進する (23)。また、発達期におけるラットの SDN-POA で、Bcl-2 と Bax の発現に性差がある (Bcl-2; 雄>雌、Bax; 雄<雌) (21)。この事実から AHR 欠損により SDN-POA における Bcl-2, Bax 発現に影響が及んだ可能性が考えられる。また、雄児 SDN-POA 体積増加は出生前後の性ステロイド刺激による (24, 25)。その性ステロイドに関連して、AHR は転写因子としてだけでなく、ユビキチンリガーゼとして働き、性ステロイド受容体である ER α および、androgen receptor (AR) の働きを負に制御することが報告されている (26, 27)。SDN-POA 縮小の原因として、性ステロイドのみにとどまらず、それら受容体に着目した検証も必要である。

次に、平成 30 年度及び令和元年度の検討により 8 週齢 AHR-KO ラットにおいては testosterone レベルの低下と精子数の減少を伴うことが明らかになった。男性ホルモンである testosterone は、下垂体ゴナドトロピン LH の制御下にある精巣ライディッヒ細胞の cholesterol から合成される (17)。そのため、cholesterol を出発物質として合成される testosterone の合成及び代謝に関与する各酵素の精巣における mRNA レベルの解析を行った。

Testosterone 合成酵素に関しては、CYP11A1 が、AHR-KO ラットにおいて増加傾向、CYP17 が、AHR-KO ラットにおいて減少傾向を示したものの、StAR, Hsd3b1, Hsd17b1, Hsd17b3 については、AHR-KO による影響はほとんど見られなかった。CYP11A1 は cholesterol から pregnenolone の生成を担い (28)、CYP11A1 の発現に増加傾向があることは、testosterone 減少による正のフィードバックが起こったのではないかと推察されるが、令和元年度の結果から、8 週齢において下垂体の LH β は僅かながら有意に減少している。従って、この CYP11A1 の増加傾向の理由は脳下垂体への影響ではない可能性もあるが、現時点では原因は明らかではない。また CYP17 には減少傾向があり、これは、前述の令和元年度に得た、AHR-KO による下垂体の LH β の低下と符合する。先行研究において、AHR-KO により、胎児期に LH 低下が引き起こされることが分かっており (29)、これとも矛盾しない。また、testosterone 合成過程での中間生成物である dehydroepiandrosterone や androstenedione は主に副腎において生成されるため (30)、副腎でのこれらのステロイド合成に関わる酵素の発現を調べることも必要であろう。

Testosterone は、SF-1 (Steroidogenic factor-1) と相互作用することにより LH β サブユニットの転写を抑制し、下垂体での LH の合成を減少させることが分かっている (31)。また testosterone は、下垂体を刺激して LH の合成および放出をするシグナルである視床下部 gonadotropin releasing hormone (GnRH) の放出も調節できると考えられている (32)。平成 30 年度及び令和元年度の検討では、GnRH の増加はなく、また、LH β はむしろ低下することが示唆されており、testosterone 減少による正常なフィードバックが起こっていない

いことが推定される。このため、視床下部-下垂体-性腺のフィードバック軸、下垂体での SF-1 などの因子の発現や、これらの制御機構への影響についての検討が必要であろう。

Testosterone の代謝酵素に関しては、精巣の Srd5a1, Srd5a2, Srd5a3, Akr1d1 のいずれにおいても AHR-KO における影響は見られなかった (Fig. 3)。精巣における代謝酵素の発現には変動が見られなかったが、testosterone の代謝には前立腺も重要であり、男性ホルモン受容体 (androgen receptor, AR) シグナル伝達の重要な酵素である Srd5 は testosterone をより強力な dihydrotestosterone に代謝する (33)ため、前立腺における Srd5 発現についての検討も課題である。

本研究では、AHR-KO による精巣重量の低下が示唆された (Fig. 4)。そこで、精巣重量に影響を及ぼす因子として、FGF と FGFR に着目した。FGF は、発生、細胞増殖、代謝調節、創傷治癒および修復など、複数の生物学的機能を有していることが報告されている。8 週齢 AHR-KO ラット精巣において、FGF1, FGF2, FGFR1 及び FGFR3 の発現が有意に増加することが分かった (Fig. 5)。FGF は、精巣重量を増加させる働きがあることを考えると、AHR-KO ラットで FGF 及び FGFR が増加したにも関わらず精巣重量は減少していることから、この FGF 及び FGFR の増加は、精巣重量の低下に対する応答の可能性がある。また、FGF 及び FGFR 増加は精巣の重量増加に寄与できていないと推定された。FGF が効果を発揮するには細胞表面受容体の一つである、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(Hspg)が重要である (34)ことから、今後は Hspg の発現についても検討する必要がある。

また、FGF は幹ライデッヒ細胞の増殖を促進する働きを有している。(35)。Testosterone の合成及び分泌の機能を有

するライデッヒ細胞は、その分化発育過程で4つの異なる過程(ライデッヒ幹細胞、ライデッヒ前駆細胞、ライデッヒ未成熟細胞、ライデッヒ成熟細胞)があり、ライデッヒ成熟細胞が testosterone の合成を担う。このことから testosterone の減少には、FGF による幹細胞の分化の抑制や、分化を誘導する因子への影響の可能性が考えられる。幹細胞の分化にはレチノイン酸(RA)が必要であることが知られており(36)、3つのRA受容体アイソタイプのうち、レチノイン酸受容体 γ (RARG)がこのプロセスに特異的に寄与することが報告されている(29)。そのため、これらの発現の検討が望まれる。

また、FGF 及び FGFR の増加はライデッヒ幹細胞の増殖を促す FGF へのポジティブフィードバックだと考えることもできるため、このフィードバック機構における AHR の役割を調べることが重要であろう。

以上の結果から、1) AHR 欠損が PND28 の性的二型核の体積低下を引き起こすことから、AHR が脳の性分化に重要な働きを果たすこと、ならびに 2) 思春期である 8 週齢では、testosterone の減少と精子数の減少だけでなく、精巣重量の減少が伴うことから、これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。また、精巣重量低下への応答として FGF 及び FGFR の発現が増加す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、脳の性分化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 8 週齢の精巣重量低下させた。これが testosterone 低下、精子数の減少と関係する可能性がある。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. フォーラム 2020:衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋、2020 年 9 月 4 日-5 日, オンライン)

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).
- 17) Eacker SM, Agrawal N, Qian K, Dichek HL, Gong EY, Lee K, Braun RB. Hormonal Regulation of Testicular Steroid and Cholesterol Homeostasis. *Mol Endocrinol*, **22**: 623-635 (2008)
- 18) Nies VJM, Sancar G, Liu W, Zutphen TV, Struik D, Yu RT, Atkins AR, Evans RM, Jonker JW, Downes MR. Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 193 (2015)
- 19) Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J.

- Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**: 139–49 (2005)
- 20) De Jonge FH, Louwse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, Van De Poll NE. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male wistar rats. *Brain Res Bull*, **23**: 483-492 (1989)
- 21) Tsukahara S, Kakeyama M, Toyofuku Y. Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. *J Neurobiol*, **66**: 1411-1419 (2006)
- 22) Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**: 1132-1136 (1997)
- 23) Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, **111**: 331-342 (2002)
- 24) Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res*, **148**: 333-346 (1978)
- 25) Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is determined by the perinatal hormone environment. *Neurosci Lett*, **33**: 295-298 (1982)
- 26) 佐久間 康夫. 『脳の性分化』 *日生誌*, **68**: 355-367 (2006)
- 27) Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science*, **211**: 1278-1284 (1981)
- 28) Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod*, **99**: 101-111 (2018)
- 29) Gely-Pernot A, Raverdeau M, Célébi C, Dennefeld C, Feret B, Klopfenstein M, Yoshida S, Ghyselinck NB, Mark M. Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor γ . *Endocrinology*, **153**: 438-439 (2012)
- 30) Turcu A, Smith JM, Auchus R, Rainey WE. Adrenal androgens and androgen precursors-definition, synthesis, regulation and physiologic actions. *Compr Physiol*, **4**: 1369-1381 (2014)
- 31) Jorgensen JS, Nilson JH. AR suppresses transcription of the LH β subunit by interacting with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol*, **15**: 1505–1516 (2001)
- 32) Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod*, **64**: 735–742 (2001)
- 33) Zhu YS, Imperato-McGinley JL. 5 α -Reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci*, **1155**: 43–56 (2009)
- 34) Laslett AL, McFarlane JR, Risbridger GP. Developmental response by Leydig cells to acidic and basic fibroblast growth factor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**: 171-179 (1997)
- 35) Chen L, Li X, Wang Y, Song T, Li H, Xie L, Li L, Chen X, Ma L, Chen Y, Lv Y, Li X, Ge RS. Fibroblast Growth Factor 1 Promotes Rat Stem Leydig Cell Development. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **10**: 118 (2019)
- 36) Hogarth CA, Amory JK, Griswold MD. Inhibiting vitamin A metabolism as an approach to male contraception. *Trends*

Endocrinol Metab, **22**: 136-144 (2011)

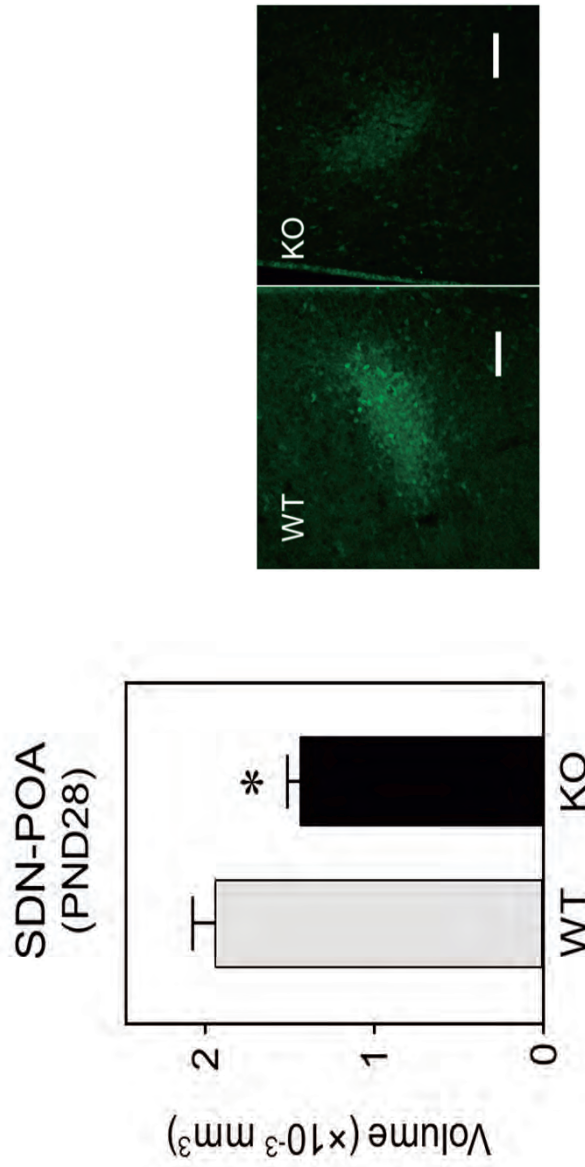


Fig. 1. Effect of AHR ablation on the volume of SDN-POA in the male offspring at PND28. The SDN-POA was detected using anti-calbindin antibody (green), and observed with a confocal microscope ($\times 10$). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 3-4 offspring. Significantly different from the control: * $p < 0.05$. Scale bar: 100 μm .

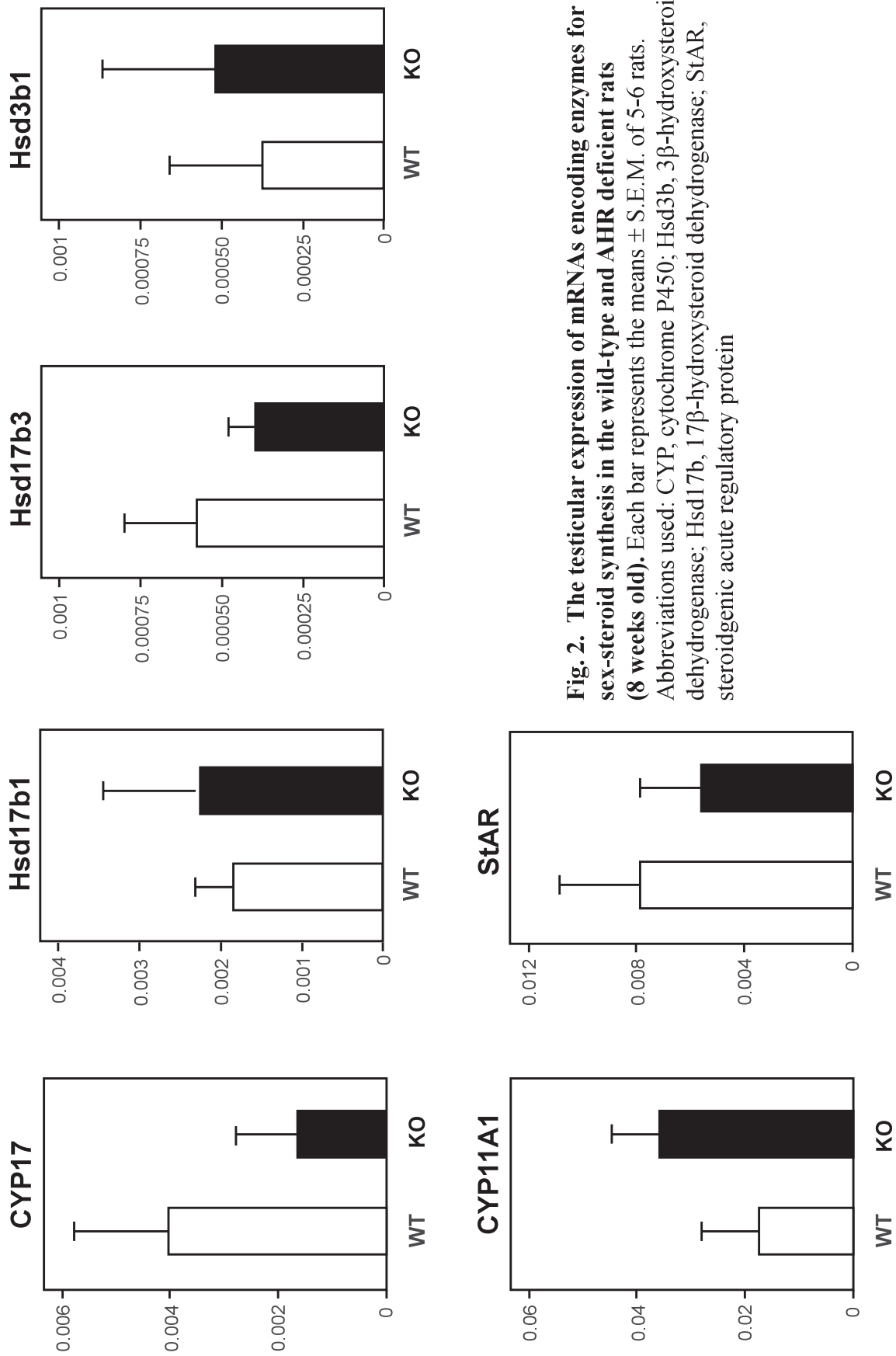


Fig. 2. The testicular expression of mRNAs encoding enzymes for sex-steroid synthesis in the wild-type and AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5-6 rats. Abbreviations used: CYP, cytochrome P450; Hsd3b, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; Hsd17b, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; StAR, steroidogenic acute regulatory protein

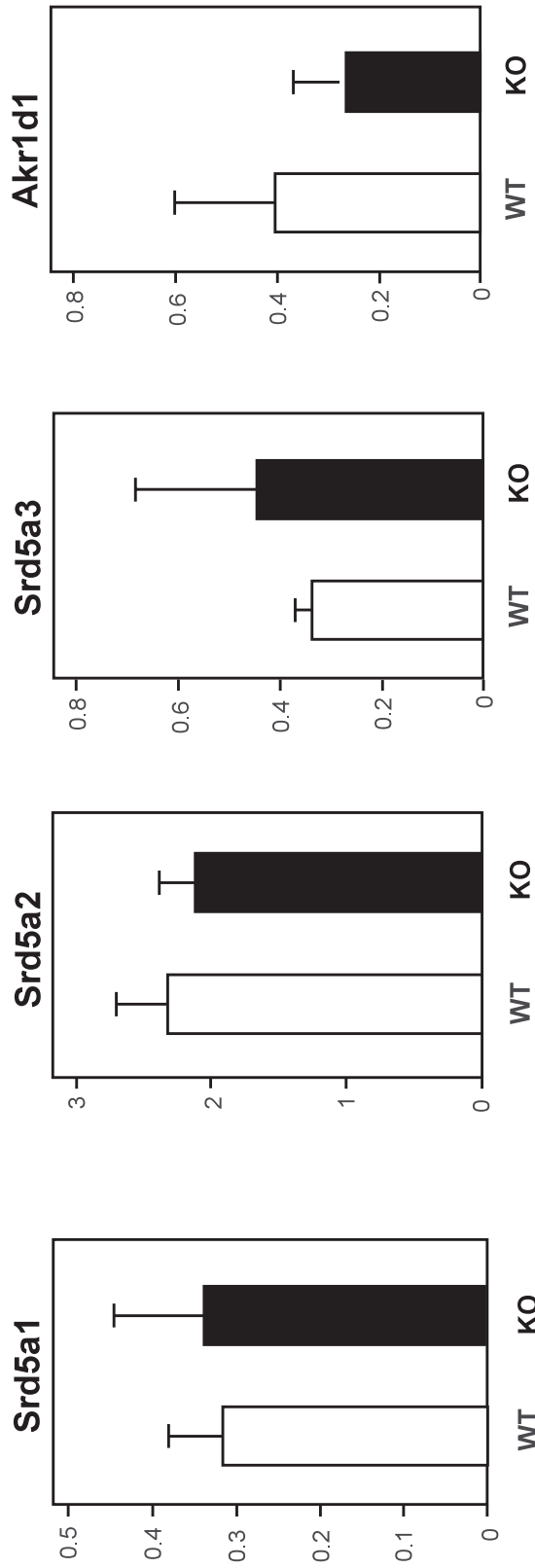


Fig. 3. The testicular expression of mRNA encoding enzymes for metabolism of sex steroids in the wild-type and AHR deficient rats (8 weeks old).
 Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5-6 rats. Abbreviations used: 5 α -reductase (type I, Sr5a1; type II, Sr5a2; type III, Sr5a3); Akr1d1, aldo-keto reductase 1d1.

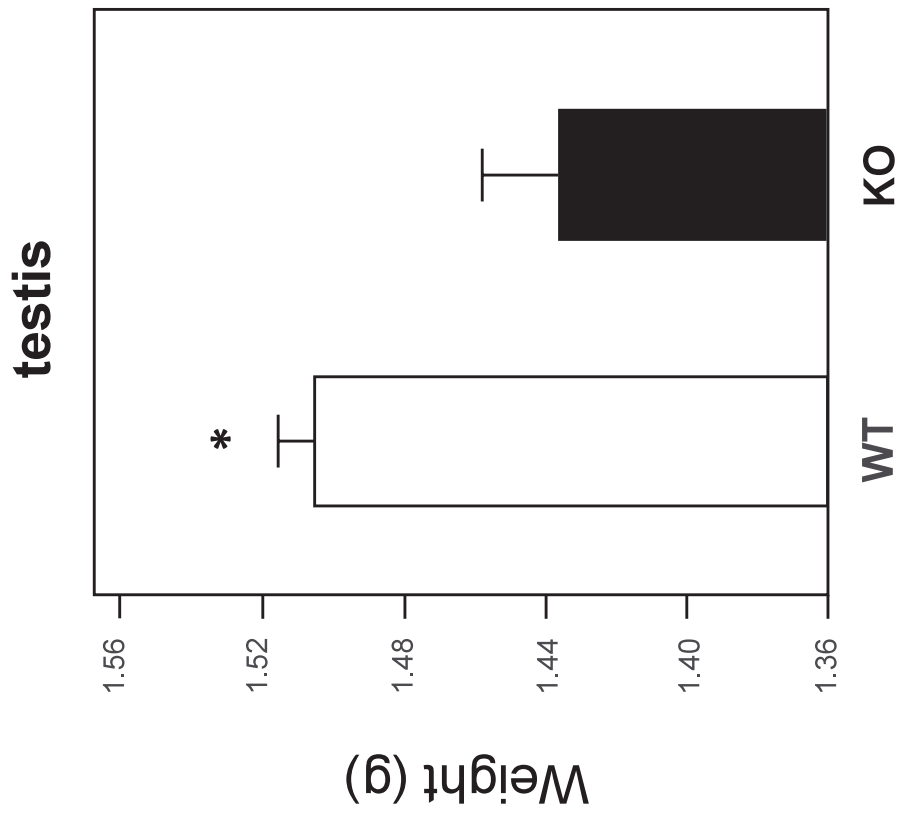


Fig. 4. The comparison of testis weight between the wild-type and AHR-deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 6 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$.

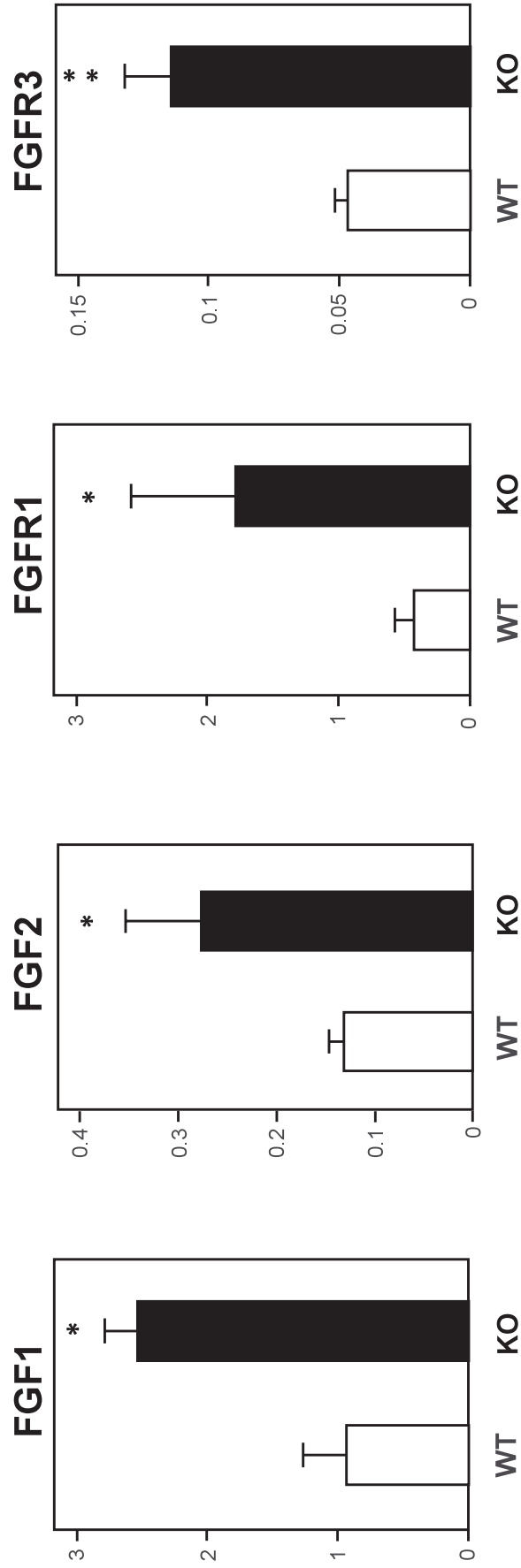


Fig. 5. The testicular expression of mRNA encoding fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor in the wild-type and AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means ± S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Abbreviations used: FGF, fibroblast growth factor; FGFR, FGF receptor