

## 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 TCDD による出生児の性未成熟の機構解析を目指して、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。そこで、R3 年度は精巣のサイズに影響を及ぼす機構をさらに検証した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) への抑制が示唆された。また、FGF の働きに必要な因子として、glypican および syndecan について検討したところ、glypican の一部の分子種に有意な抑制が観察された。AHR 欠損による FGF および FGFR の誘導は精巣重量低下に対する代償的な応答であると考えられた。先行研究において、思春期である 8 週齢で、AHR 欠損ラットの精巣重量の減少が明らかとなり、その代償的応答として、精巣の成長に関与する線維芽細胞成長因子 FGF (fibroblast growth factor) 及びその受容体である FGFR (FGF receptor) の発現が増加することが強く示唆された。しかしながら、精巣重量は有意に減少していることから、FGF の機能に重要な HSPG (heparan sulfate proteoglycan) の一種である、Gpc (glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られ、その他の HSPG には AHR による影響はほとんど見られなかった。また、HS (heparan sulfate) の発現や作用には、硫酸転移酵素やグルクロン酸転移酵素が重要である。HS6ST (Heparan-Sulfate 6-*O*-Sulfotransferase) による 6-*O*-硫酸化は FGF、FGFR、HSPG シグナル伝達複合体の形成に不可欠であ

り、Ogt (*O*-Glucuronosyl transferase) は HS 鎖の合成に必要である。この Ogt および HS6ST の mRNA レベルの解析を行った結果、AHR 欠損による影響はほとんど見られなかった。HDAC (histone deacetylase) はヒストンの脱アセチル化を触媒する酵素である。ヒストンの脱アセチル化は、遺伝子の転写を抑制する方向に働く。精巣での HDAC の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって HDAC2 および HDAC5 において、発現量が有意に低下することが明らかになった。また、その他の HDAC においても減少傾向を示した。思春期である 8 週齢では、FGF の増加にもかかわらず、精巣重量が低下していることは、HSPG 低下による FGF の機能不全であることが考えられ、これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。また、精巣でのエピジェネティックな影響として、HDAC が FGF や FGFR の発現を制御していることが示唆された。

## 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 欠損によりアロマト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 LH $\beta$  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結果から、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 $\beta$  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。また、令和 2 年度、AHR 欠損が PND28 において脳の雄優位の性的二型核 (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, SDN-POA) の体積を有意に低下させることも示唆された。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する中で、精巣重量の低下を見出した。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 (16)。FGF は精巣での発現が確認されており (16)、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 (17)。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。これらのことから、精巣重量の低下への代償的応答として、精巣の成長に関与する FGF 及び FGFR の発現が増加することが強く示唆された。

そこで、本年度は、FGF の機能に重要な HSPG (heparan sulfate proteoglycan) とその関連遺伝子の発現を解析した。また、FGF の調節に重要な HDAC (histone deacetylase) についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物実験

AHR-KO ラットは、XTN<sup>TM</sup> 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、8 週齢にて実験に供した。精巣を摘出し、遺伝子解析を行った。

### 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 (18)。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  $\beta$ -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

先行研究において、思春期である 8 週齢で、AHR 欠損ラットの精巣重量の減少が明らかとなり (Fig. 1)、その代償的応答として、精巣の成長に関与する FGF 及びその受容体である FGFR の発現が増加することが強く示唆された (Fig. 2)。しかしながら、精巣重量は有意に減少していることから、FGF の機能に重要な HSPG (heparan sulfate proteoglycan) の一種である、Gpc (glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られ、その他の HSPG には AHR による影響はほとんど見られなかった (Fig. 3)。

また、HS (heparan sulfate) の発現や作用には、硫酸転移酵素やグルクロン酸転移酵素が重要である。HS6ST (Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase) による 6-O-硫酸化は FGF、FGFR、HSPG シグナル伝達複合体の形成に不可欠であり (19-22)、Ogt (O-Glucuronosyl transferase) は HS 鎖の合成に必要である (23)。この Ogt および HS6ST の mRNA レベルの解析を行った結果、AHR 欠損による影響はほとんど見られなかった (Fig. 4)。

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) は線溶系に重要なタンパクとして知られており、in vitro において、Sdc ノックダウンにより、PAI-1 のタンパク発現がアッ

プレギュレートされることが分かっている (24)。そのため、PAI-1 の mRNA レベルの解析を行った。その結果、AHR 欠損で減少傾向を示した (Fig. 5)。

HDAC (histone deacetylase) はヒストンの脱アセチル化を触媒する酵素である。ヒストンの脱アセチル化は、遺伝子の転写を抑制する方向に働く。先行研究において、HDAC の発現が、TCDD 依存的に胎児脳下垂体において誘導されることを見い出しており (25)、HDAC は AHR によって制御されている。そこで、精巣での HDAC の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって HDAC2 および HDAC5 において、発現量が有意に低下することが明らかになった (Fig. 6)。また、その他の HDAC においても減少傾向を示した。

### D. 考察

本研究では、AHR の性成熟への寄与を遺伝子レベルで検討した。令和 2 年度の検討により、8 週齢で AHR 欠損による精巣重量の低下、およびその成長に関わる因子である FGF の発現増加が明らかとなった。FGF はその受容体 FGFR に結合することで作用を発揮する。しかし FGF は分解されやすいため、HSPG による相互作用が作用発現に必要であると考えられている。HSPG は糖タンパク質であり、コアタンパク質に 1 つまたは複数の共有結合した HS 鎖を含んでいる (26)。FGF が FGF、FGFR、HSPG 三元複合体の形態で FGFR と結合すると、FGFR の二量体化を形成し (27-29)、細胞内領域のチロシン残基がリン酸化され、シグナル伝達複合体が形成される。その後、RAS / MAP キナーゼ経路、PI3 キナーゼ / AKT 経路、PLC $\gamma$  経路などのシグナル経路が多数誘導され、特異的な細胞応答を引き起こすことが知られている (27, 28, 30-32)。そこで、精巣における、HSPG の一種である Gpc

(glypican) および Sdc (syndecan) の mRNA 発現量を解析した。その結果、AHR 欠損によって Gpc4 の発現量が有意に減少し、Sdc4 で減少傾向が見られた。その他の HSPG には AHR による影響はほとんど見られなかった。

また、HS 鎖の合成には グルクロン酸転移酵素が関わっており、HS 鎖は硫酸転移酵素によって硫酸化されている。硫酸化はヘパラン硫酸鎖上不均一になされ、種々の程度に修飾され複雑な硫酸化パターンを持った HS 鎖が形成される。この特定の硫酸化パターンが HS の生物学的活性に重要であることが報告されている (23)。この Ogt および HS6ST の mRNA レベルの解析を行った結果、AHR 欠損による影響はほとんど見られなかった。

PG (Proteoglycan) の硫酸転移酵素反応は、活性化されたヌクレオチド硫酸塩である PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) を普遍的な硫酸塩供与体として利用する (29)。この PAPS は PAPSS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase) により生合成される (33)。AHR 欠損で、HS6ST の mRNA 発現レベルに変動は見られなかったが、PAPS の変動による PG への硫酸転移が十分に行われていないことが考えられる。そのため、PAPS の合成酵素である PAPSS の変動を調べてみる必要がある。

次に、ヒストンを脱アセチル化することで、遺伝子発現を抑制する HDAC の mRNA について検討した。その結果、HDAC2 および HDAC5 の発現量が有意に低下し、その他の HDAC においても減少傾向を示した。従って、精巣においても、AHR が HDAC を介して遺伝子の発現調節を行っている可能性が示唆された。このことから、FGF および FGFR の発現増加が AHR による転写制御によるものかどうかを検討するため、思春期における野生型ラットと AHR 欠損ラットの精巣を用

いたクロマチン免疫沈降法により、FGF および FGFR 遺伝子の XRE への AHR 結合能の解析を行う必要がある。

また、性ステロイド合成に着目した検討も行いたい。思春期に分泌の増える男性ホルモンである testosterone は、精巣の発達、精子形成やその維持に関与する (34-35)。先行研究で、8 週齢の AHR 欠損ラットで精子数と testosterone の低下が明らかとなった。令和 2 年度の検討では、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 の合成および代謝酵素の mRNA 発現の解析を行った。その結果、合成酵素である CYP17 の mRNA レベルに減少傾向が見られたものの、その他の合成および代謝に関与する酵素に AHR による影響はさほど見られなかった。Testosterone の前駆体には DHEA (dehydroepiandrosterone) や androstenedione などが知られており、それらは主に副腎で生成される (36)。また、DHEA や androstenedione は、8 週齢の AHR 欠損ラットで減少傾向を示した CYP17 の代謝産物であるため、AHR 欠損によりこれらの量が減少したために、相対的に testosterone の合成が減少した可能性が考えられる。そのことから、testosterone 合成の中間生成物である DHEA や androstenedione の血中濃度の解析が望まれる。

## E. 結論

AHR の欠損は、思春期 8 週齢の精巣重量を低下させた。これが testosterone 低下、精子数の減少と関係する可能性がある。思春期である 8 週齢では、FGF の増加にもかかわらず、精巣重量が低下していることは、HSPG 低下による FGF の機能不全であることが考えられ、これらの制御に AHR が重要であることが示唆された。また、精巣でのエピジェネティックな影響として、HDAC が FGF や FGFR の発現を

制御していることが示唆された。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であろう。

## F. 研究発表

1. フォーラム 2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー (千葉、2021 年 9 月 10 日-11 日, オンライン)

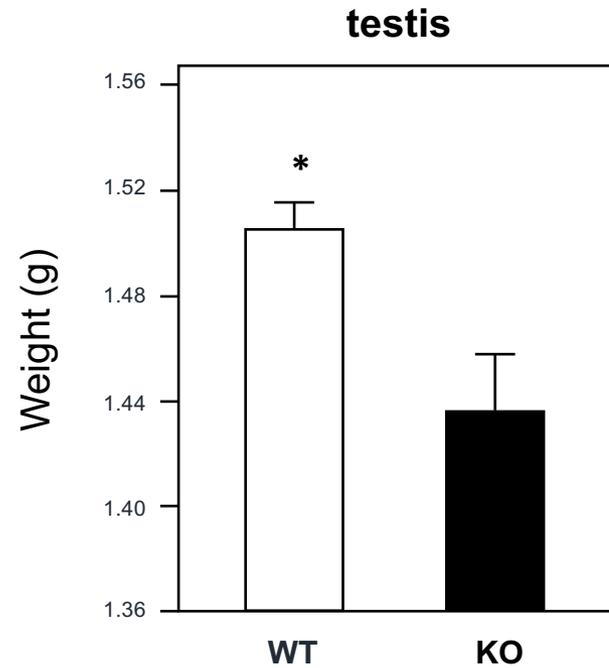
## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

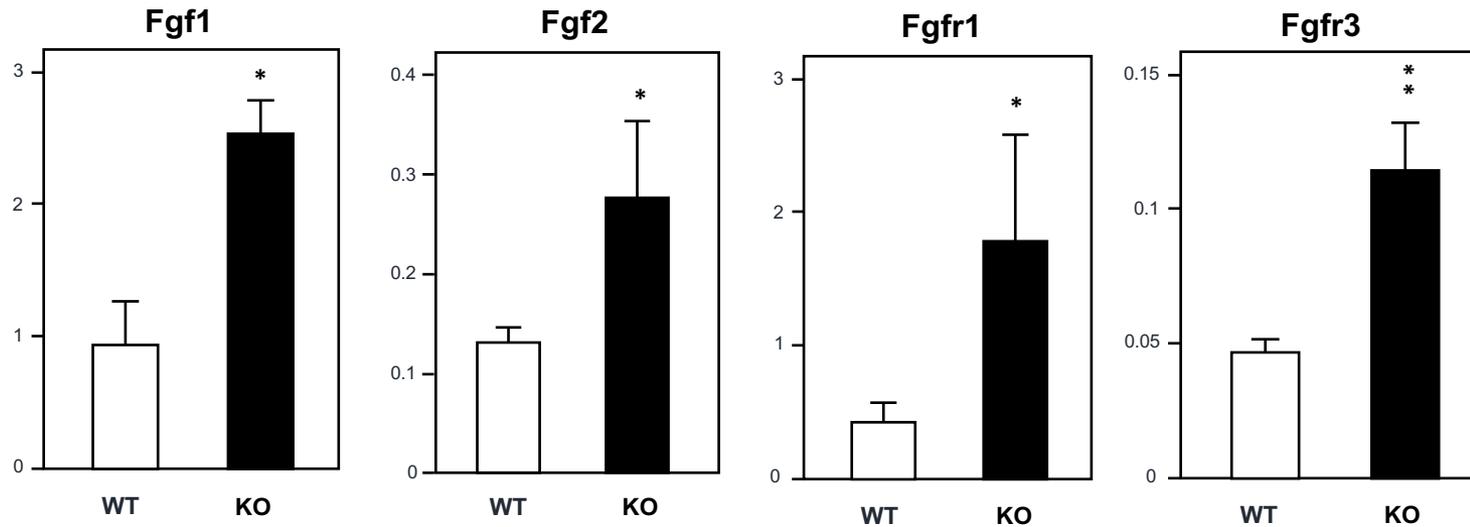
## H. 参考文献

- 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) Vera J M Nies, Gencer Sancar, Weilin Liu, Tim van Zutphen, Dicky Struik, Ruth T Yu, Annette R Atkins, Ronald M Evans, Johan W Jonker, Michael Robert Downes, Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 193 (2015)
- 17) Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J, Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**: 139-49 (2005)
- 18) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D,

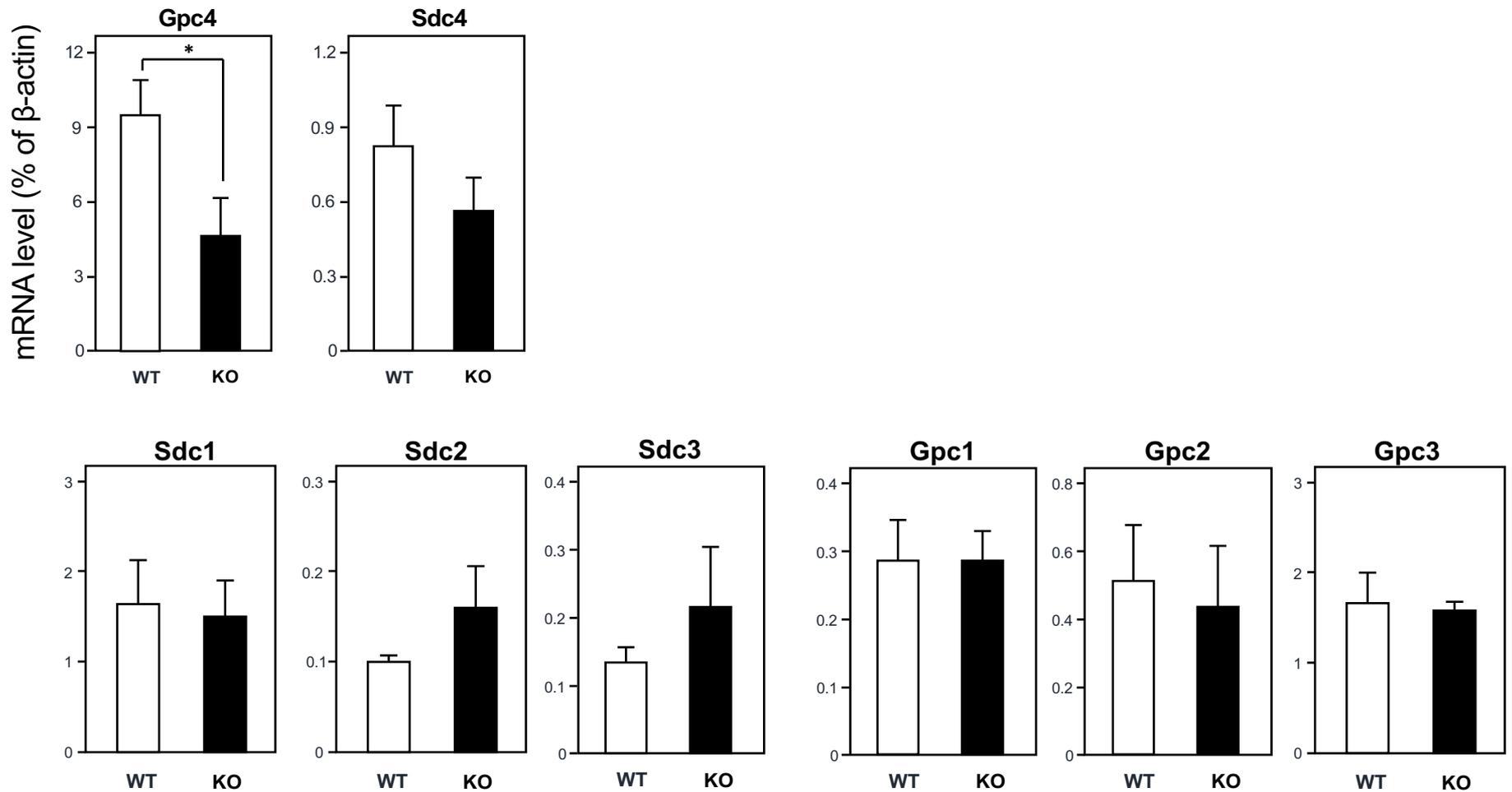
- Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
- 19) Ferreras C, Rushton G, Cole CL, Babur M, Telfer BA, Kuppevelt TH, Gardiner JM, Williams KJ, Jayson GC, Avizienyte E. *J Biol Chem*, **287**: 36132-36146 (2012).
- 20) Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, Gallagher JT. Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J Biol Chem*, **267**: 10337-10341 (1992).
- 21) Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. *J Biol Chem*, **268**: 23906-23914 (1993).
- 22) Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, Gallagher JT. Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J Biol Chem*, **273**: 22936-22942 (1998).
- 23) Lindahl U, Gullberg MK, Kjellen L. Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem*, **273**: 24979-24982 (1998).
- 24) Schneider C, Kässens N, Greve B, Hassan H, Schüring AN, Starzinski-Powitz A, Kiesel L, Seidler DG, Götte M. Fertil Steril. *Fertil Steril*, **99**: 871-881 (2013).
- 25) Takeda, T, Fujii, M, Taura, J, Ishii, Y, Yamada, H. *J Biol Chem*, **287**: 18440-18450 (2012).
- 26) Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**: a004952 (2011).
- 27) Groth C, Lardelli M. *Int. J. Dev. Biol.*, **46**: 393-400 (2002).
- 28) Bottcher RT, Niehrs C. *Endocr Rev*, **26**: 63-77 (2005).
- 29) Dick G, Akslen-Hoel LK, Grondahl F, Kjos I, Maccarana M, Prydz K. *Glycobiology*, **25**: 30-41 (2015).
- 30) Ornitz DM, Itoh N. *Rev Dev Biol*, **4**: 215-266 (2015).
- 31) Turner N, Grose R. *Nat Rev Cancer*, **10**: 116-129 (2010).
- 32) Harmer NJ, Ilag LL, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson CV, Blundell TL. *J Mol Biol*, **339**: 821-834 (2004).
- 33) Schroder E, Gebel Lena, Ereemeev AA, Morgner J, Grum D, Knauer SK, Bayer P, Mueller JW. *PLoS One*, **7**: e29559 (2012).
- 34) Wdowiak A, Raczkiwicz D, Stasiak M, Bojar I. *Neuro Endocrinol. Lett*, **35**: 73-79 (2014).
- 35) Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J. *Endocrinology*, **140**: 3938-3946 (1999).
- 36) Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, Honma S, Sasano H, Rainey WE. *J Clin Endocrinol Metab*, **98**: 1182-1188 (2013).



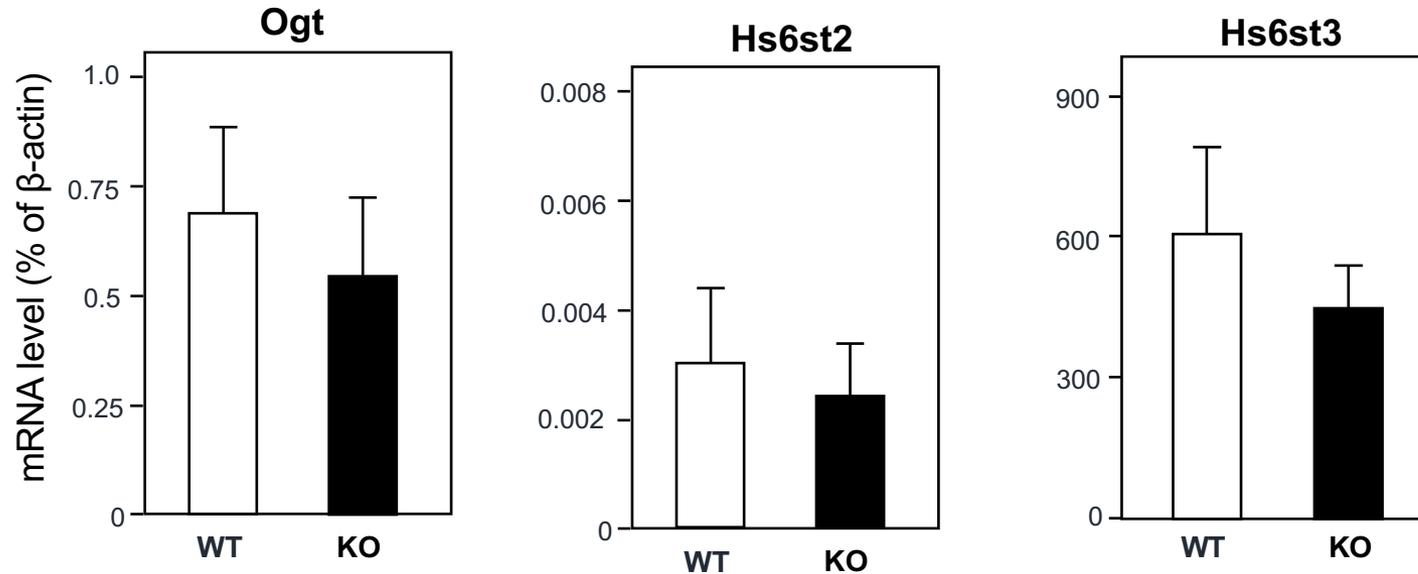
**Fig. 1 The comparison of testis weight between the wild-type and AHR-deficient rats (8 weeks old).** Each bar represents the means  $\pm$  S.E.M. of 6 rats. Significantly different from the control: \* $p < 0.05$ .  
(令和2年度研究報告より引用)



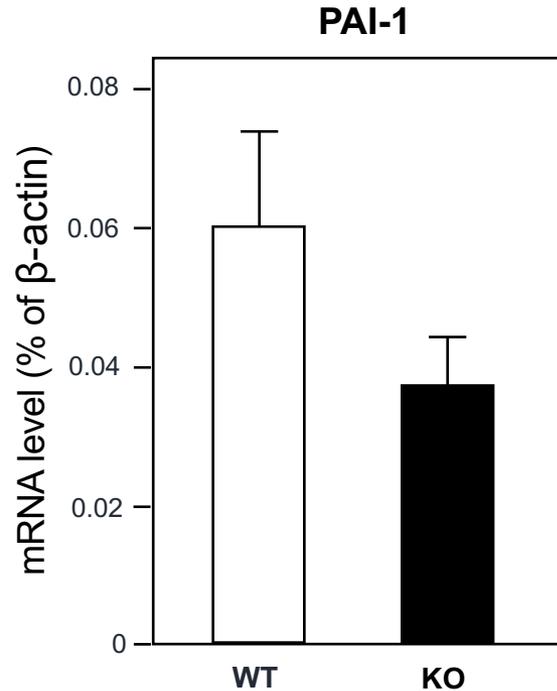
**Fig. 2. The testicular expression of fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old).** Each bar represents the means  $\pm$  S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Abbreviations used: fgf, fibroblast growth factor; fgfr, fibroblast growth factor receptor (令和2年度研究報告より引用)



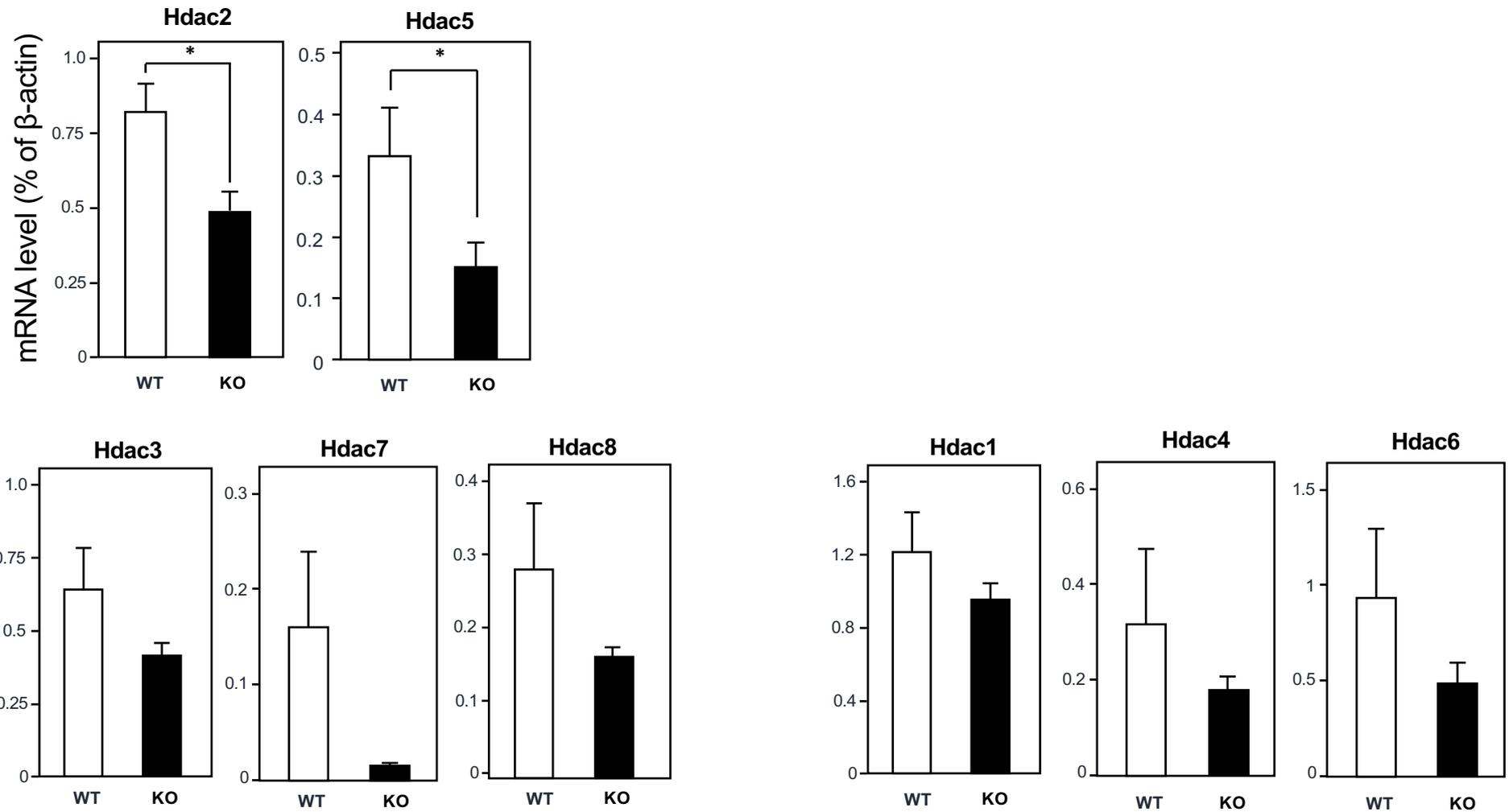
**Fig. 3. The testicular expression of glypican and syndecan mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old).** Each bar represents the means  $\pm$  S.E.M. of 5 rats. Significantly different from the control: \* $p$ <0.05. Abbreviations used: Gpc, glypican; Sdc, syndecan;



**Fig. 4** The testicular expression of *O*-GlcNAc transferase and heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old). Each bar represents the means  $\pm$  S.E.M. of 5 rats. Abbreviations used: Ogt, *O*-GlcNAc transferase; Hs6st, heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase.



**Fig. 5 The testicular expression of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old).** Each bar represents the means  $\pm$  S.E.M. of 5 rats. Abbreviations used: PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1



**Fig. 6. The testicular expression of histone deacetylase mRNA in AHR deficient rats (8 weeks old).** Each bar represents the means  $\pm$  S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: \* $p < 0.05$ . Abbreviations used: Hdac, histone deacetylase;