

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、R4 年度は、精巣における testosterone 合成酵素の mRNA 発現レベルを 8 週齢および 13 週齢において調べた。合成酵素に関しては、8 週齢において、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 (17 β -HSD3) mRNA が有意に低下した。また、13 週齢において、cytochrome P450 11A1 (CYP11A1) および CYP17 の mRNA に有意な減少があった。これらは、testosterone の低下と同じ方向性のものである。AHR 欠損における血中 testosterone レベルの低下は、先行研究で見出しているが、その前駆体である androstenediol、dehydroepiandrosterone、androstenedione については、これまで検討していなかった。R4 年度は、これらの血中レベルを調べた。いずれも有意な影響はなかったものの、8 週齢で androstenedione の低下傾向があった。次に、ステロイドホルモンの硫酸化に関する検討を行った。ステロイドの硫酸転移酵素には有意な変動はなかったものの、補酵素である活性硫酸 PAPS の合成酵素の発現が有意に低下し、また硫酸化ステロイドを脱抱合してステロイドの供給をする脱硫酸化酵素は 8 週齢で有意に低下した。これらのことから、ステロイドの硫酸化が抑制され、ステロイド合成中間体としての原料供給も抑制されることが示唆された。R3 年度までに、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 (fibroblast growth factor 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、HS6ST (Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase) による HS の 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ることから、R4 年度は、HS の硫酸化と脱硫酸化酵素に着目した。AHR 欠損ラットの 8 週齢では HS6ST1 が有意に低下し、脱硫酸化酵素 sulfatase 1 (SULF1), SULF2 には低下傾

向があった。思春期である 8 週齢では、FGF および FGFR 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 低下および硫酸化の抑制による FGF の機能不全であることが考えられた。

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。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LHβ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、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。

R3年度は、FGFの機能に重要なHSPG (heparan sulfate proteoglycan)とその関連遺伝子 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。

そこで、R4年度は、ステロイドホルモンの合成に関与する酵素およびステロイド硫酸化の調節に重要な酵素について検討

した。また、HSPGの硫酸化酵素に着目するとともに、これらに共通な硫酸供与体PAPSの合成酵素 mRNA レベル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™ 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週齢および13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 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,

A20-060 及び A22-068。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

まず、精巣における性ステロイドの合成酵素の mRNA 発現について、思春期にあたる 8 週齢および生殖能力が成熟していると考えられる (19) 13 週齢の期間を対象にし、AHR 欠損による影響を解析した。性ステロイド合成の出発物質であるコレステロールは、性ステロイド合成の律速過程の中心的役割を担う StAR によって、ミトコンドリア内に運ばれステロイドホルモンへと代謝される (20-23)。Testosterone の合成には、コレステロールの側鎖を切断し、プレグネノロンを産生する反応を触媒する CYP11A1 (20-22, 24)、 3β の水酸基を酸化しカルボニル基へ変換する、 3β -HSD、17 位を酸化してカルボニル基へ変換する CYP17、17 位のカルボニル基を水酸基へと還元し testosterone を合成する 17β -HSD が関与している (21,22)。これらの mRNA 発現解析の結果、AHR 欠損により、8 週齢においては、 17β -HSD3 で有意な減少、CYP17 において減少傾向を示した (Fig. 1)。また 13 週齢においては、CYP11A1、CYP17 において有意な減少が見られた (Fig. 1)。その他の合成酵素においては AHR 欠損による影響は見られなかった (Fig. 1)。

Testosterone は精巣において DEHA や androstenedione, androstenediol といった前駆体ホルモンから合成される。思春期における testosterone 低下を受け、これらのステロイドホルモン量の変動している可能性も考えられる。そこで、特に思春期で大きな変動が見られた酵素により合成される DEHA, androstenedione, androstenediol の 3 つのステロイドホルモンの血中濃度

の測定を行った。その結果、思春期における androstenediol の血中濃度において若干の減少傾向は見られたが、いずれのステロイドホルモンにおいても、各週齢において AHR 欠損による大きな影響は見られなかった (Fig. 2)。

ステロイドホルモンは硫酸化され、血中を循環している硫酸化体が精巣で取り込まれることで、testosterone の合成が促進される (25)。この硫酸化には、硫酸転移酵素 (sulfotransferase, SULT) が関与し、補酵素として生体内で唯一の硫酸供与体である活性硫酸 PAPS が合成されることが必要である。この PAPS の合成は ATP sulfurylase と APS kinase の 2 つの酵素反応が関与しているが、ヒトやラットなどの哺乳動物においては 2 つの酵素の機能を併せ持つ PAPSS という酵素がこの反応を担う (26)。合成された PAPS は硫酸転移酵素によって、ステロイドを含む多様な生体分子中の多くの水酸基とアミノ基の硫酸化に使用される (27,28)。また、精巣での活性アンドロゲンの合成には、取り込まれた不活性型の硫酸化ステロイドが脱硫酸化されることが必要であり、脱硫酸化酵素の STS がそれを担う (29)。これらのことを踏まえ、精巣でのステロイドホルモンの硫酸化に関わる各酵素の mRNA 発現の解析を行った。その結果、AHR 欠損により、思春期において PAPSS の mRNA 発現が減少することが明らかとなり (Fig. 3A, B)、硫酸供与体 PAPS の濃度低下が推測された。また、ヒドロキシステロイドの硫酸抱合に主に関与する SULT2A1 においてはいずれの期間においても、AHR 欠損による影響は見られず、STS に関しては、思春期において有意な減少が見られた (Fig. 3C,D)。

次に、AHR 欠損により精巣重量の低下が見られたことから、精巣の成長や精子のもととなる精子幹細胞の増殖に関する因子である FGF およびその受容体 FGFR の

mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって解析した結果、思春期において AHR 欠損で、FGF1,2 および FGFR1,3 では有意に増加することが分かっていた (Fig. 4A,B,D,E, 令和3年度報告参照)。令和4年度は、FGF9 についても検討を行い、有意に減少することが明らかになった (Fig. 4C)、一方、FGFR2, R4 には変動がなかった (Fig. 4F, G)。

令和3年度の検討により、FGF の機能発現に重要な HSPG の発現低下が明らかになっている。HSPG を構成している HS 鎖は 硫酸転移酵素によって硫酸化されているが、この硫酸化は HS 鎖上で不均一になされ、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 (30)。HS 合成に関与する硫酸修飾酵素には、Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase (HS6ST) や Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase1 (HS2ST1) が知られている (31,32)。

また、sulfatase (SULF) は、HS 鎖のグルコサミン残基の硫酸エステル結合の加水分解を触媒することで、細胞の増殖や分化などに重要な役割を果たしていると考えられている (33-38)。そこで、精巣における HS 鎖の硫酸化及び脱硫酸化を担う酵素の mRNA 発現の解析を行った。その結果、思春期において、HS6ST1 で減少、その他の硫酸転移酵素および SULF において減少傾向が見られた (Fig. 5)。このことから、AHR が HS 鎖の硫酸化を制御している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、AHR 欠損が雄の生殖腺の発達に及ぼす影響を検討した。先行研究で、生殖器官の重量を解析した結果、AHR 欠損により体重ならびに思春期での精巣重量が有意に減少することが明らかになっ

た (令和2年度報告書)。不妊症の原因となる、男児において精巣が増大しないという性分化疾患が問題となってきている。ヒトにおいて、精巣容積が低下すると、精液量、精子濃度、および正常な形態の精子の割合が低いことが報告されている (39)。ヒトにおいて、精液中の精子数が 20~40% 減少している男性では、約 50% が不妊であり、20% 以下の男性は全てが不妊である (40)。一概に、ラットにこの知見を当てはめることはできないが、先行研究において、AHR 欠損により、30~50% 程度の精子数の減少が見られている (令和元年年度報告)。これらのことから、AHR 欠損による精巣重量の低下はラットにおける不妊症につながる可能性がある。実際、本研究においても、繁殖維持には AHR ホモ欠損雄ラットではなく、AHR ヘテロ雄欠損ラットを主に用いている。それは、AHR ホモ雄ラットでは経験的に妊娠動物を得にくく、ヘテロ欠損動物であっても野生型と比べると交配での妊娠動物を得にくい傾向がある。また、ヒトの AHR 遺伝子多型は男性不妊のリスクファクターと推定されている (41) ことから、AHR がヒトの性成熟にも関与することが十分に考えられる。したがって、AHR 欠損ラットの性的未成熟の解明は、将来的にヒトにおける性成熟や不妊問題の解決策となる可能性が考えられる。その上で、AHR を欠損させるというヒトでは行うことの出来ない条件下において、さらなる解析を行うことは意義があると考えられる。不妊という観点では、精子数という量的要素も重要であるが、精子の運動率や正常形態率などの質的要素も重要視される (42)。精子の運動性が低下することを『精子無力症』といい、男性不妊の原因のひとつである (43)。また、異常な形態の精子のことを『奇形精子』といい、この「奇形精子」が増加することで、男性の生殖能力低下の最も一般的な原因である『奇

形精子症』となるとされている (43)。このことから、AHR 欠損による精子への質的影響として、精子の活性測定や形態解析を行うことは今後の検討課題であろう。次に、AHR 欠損により精巣重量の低下が見られたことから、精巣の成長や精子のもととなる精子幹細胞の増殖に関する因子である FGF およびその受容体 FGFR の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって解析した結果、思春期において AHR 欠損で、FGF 9 では有意な減少、それ以外の FGF および FGFR では有意に増加することが明らかとなった (Fig. 4)。FGF は、精子形成をつかさどるセルトリ細胞や、testosterone 分泌を行うライディッヒ細胞、生殖細胞など、精巣全体の多くの細胞に局在している (44, 45)。FGF 1 と FGF 2 の両方が、ライディッヒ細胞による testosterone 産生を刺激すること、in vitro において、FGF 2 はラット生殖細胞の増殖活性を有意に刺激することや、セルトリ細胞の増殖に関与することが報告されており、FGF 2 が精子形成開始における重要な因子であることが示唆されている (46)。これらのことから、FGF および FGFR の遺伝子発現が増加したことは、思春期において精巣重量低下や精子数減少による、FGF および FGFR へのポジティブフィードバックが起こっていることが考えられる。また、FGF 9 に関しては、FGF 9 シグナル伝達が、精巣の間質コンパートメントの形成に寄与することが示されている (47)。FGF 9 の発現が低下した理由としては、AHR 欠損による XRE 配列に対する結合および転写の抑制が考えられる。FGF 9 について XRE 配列の有無を確認したところ、転写開始点から 5000 bp までに 4 か所の XRE 配列が確認された。このことから、AHR 欠損による転写抑制により、FGF 9 の遺伝子発現が低下したことが推測される。一方、FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 については、AHR

欠損によって発現が上昇しており、FGFR1 以外はこれらの遺伝子の転写開始点から 5000 bp までに各 1 か所の XRE 配列はあるものの、それだけでは説明が難しい。先行研究で HDAC は、ダイオキシン母胎暴露した胎児の脳下垂体で発現誘導が認められている (48)。そこで、HDAC の発現を調べたところ、HDAC 2,7 の発現が減少した (令和 3 年度報告書)。FGF2-FGFR1 シグナル伝達は HDAC により抑制されていると報告されており (49)、FGF2 の発現上昇は AHR 欠損による HDAC の発現抑制によって、HDAC による FGF2 抑制が解除されたことによると推察された。他の FGF および FGFR に関しては、HDAC による制御の報告は筆者の知る限り存在しない。しかし、AHR 欠損により、HDAC の mRNA 発現が全体的に減少していることから、HDAC による FGF および FGFR の発現抑制が解かれ、遺伝子発現が上昇した可能性は十分に考えられる。

また、これまでの結果から、精巣での FGF および FGFR が十分に機能していないことが推定された。FGF および FGFR が正常に機能しない要因として、FGF の作用発現に必要な HSPG (50) の変動が疑われ、令和 3 年度に HSPG の遺伝子発現の解析を行った。その結果、思春期において、AHR 欠損で GPC4 の減少、SDC4 の減少傾向が見られた (令和 3 年度報告書)。FGF は、HSPG に対して高い親和性を有しており、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 (51-53)、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 γ 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 (51-54)。また、HSPG の合成に必要な硫酸転移酵素

および脱硫酸酵素の発現の解析も行ったところ、AHR 欠損で硫酸転移酵素である HS6ST1 で有意な減少、その他の硫酸転移酵素で減少傾向が見られた。脱硫酸酵素 SULF においては、AHR 欠損で減少傾向が観察された (Fig. 5)。HS6ST は、N-アセチルグルコサミン残基の 6 位に硫酸基を転移する (55)。HS2ST1 は、PAPS から グルクロン酸の 2-OH 位置への硫酸基の転移を触媒する (31, 32)。SULF は、N-アセチルグルコサミン残基の 6 位の硫酸基を脱硫酸し、*in vitro* または SULF 過剰発現系を利用した実験では、SULF による 6-O-硫酸の酵素的除去が、FGF 活性に大きな影響を与えることが実証されている (36, 56-58)。これらの結果から、HS 鎖の生合成調節はまだ未解明な部分が多いが、AHR が HS 鎖の硫酸化の制御や HSPG 発現制御を通じて、HSPG を介した、FGF-FGFR の作用発現に影響を及ぼしていることが推測された。また、HS 鎖の硫酸化に関しては、推測された AHR 欠損による PAPS 低下がこの HS 鎖の硫酸化に影響を及ぼしている可能性が考えられる。硫酸供与体 PAPS は細胞質か核で PAPSS によって合成される (59)。しかし、HS 鎖の硫酸化はゴルジ体で行われることから (60)、PAPS がゴルジ内腔へ輸送されることが必要である。この PAPS のトランスporter として、PAPS transporter (PAPST1,2) が知られており (61-63)、AHR 欠損による PAPS トランスporter の変動の有無を調べる必要がある。以上、本研究の結果から、AHR 欠損により、思春期の精巣重量が低下し、精巣の発達に関与する因子への影響が示唆された。

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、testosterone 低下

には、合成系酵素である CYP17 および 17 β -HSD の低下が関与していることが示唆された。また、硫酸化ステロイドの生成に重要な活性硫酸 PAPS 量の低下も推察された。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たが、これには、HSPG の HS 鎖の硫酸化酵素と PAPS の低下も併せて示唆された。これらの制御に AHR が重要であ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、すなわち AHR 欠損させた場合に、ダイオキシン低用量暴露と類似の性未成熟作用が現れることから、ダイオキシンが AHR の構成的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. 日本薬学会九州・山口支部大会 2022 (佐世保、2022 年 11 月 19 日-20 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) Nies VJ, Sancar G, Liu W, van Zutphen T, Struik D, Yu RT, Atkins AR, Evans RM, Jonker JW, Downes MR. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 193 (2015)
- 17) Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. *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) Takakura I, Creasy DM, Yokoi R, Terashima Y, Onozato T, Maruyama Y, Chion T, Tahara T, Tamura T, Kuroda J, Kusama H. *J Toxicol Sci*, **39**: 269-279 (2014)
- 20) Waterman M. *Science*, **267**: 1780-1781 (1995)
- 21) Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. *Endocr Rev*, **30**: 883-925 (2009)
- 22) Zirkin BR, Papadopoulos V. *Biol Reprod*, **99**: 101-111 (2018)
- 23) Lin D, Sugawara T, Strauss J, Clark B, Stocco D, Saenger P, Rogol A, Miller W. *Science*, **267**: 1828-1831 (1995)
- 24) Hume R, Kelly RW, Taylor PL, Boyd GS. *Eur J Biochem*, **140**: 583-591 (1984)
- 25) Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA. *Endocr Rev*, **36**: 526-563 (2015)
- 26) Kamiyama S, Nishihara S. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **16**: 109-123 (2004)
- 27) Mueller JW, Shafqat N. *FEBS J*, **280**: 3050-3057 (2013)
- 28) Markovich D. *Pflugers Arch*, **466**: 131-137 (2014)
- 29) Hobkirk R. *Trends Endocrinol Metab*, **4**: 69-74 (1993)
- 30) Lindahl U, Gullberg MK, Kjellen L. *J Biol Chem*, **273**: 24979-24982 (1998)
- 31) Kobayashi M, Habuchi H, Yoneda M, Habuchi O, Kimata K. *J Biol Chem*, **272**: 13980-13985 (1997)

- 32) Bai X, Esko JD. *J Biol Chem*, **271**: 17711–17717 (1996)
- 33) Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CP Jr. *Science*, **293**: 1663–1666 (2001)
- 34) Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. *J Biol Chem*, **277**: 49175–49185 (2002)
- 35) Ohto T, Uchida H, Yamazaki H, Keino-Masu K, Matsui A, Masu M. *Genes Cells*, **7**: 173–185 (2002)
- 36) Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr. *J Cell Biol*, **162**: 341–351 (2003)
- 37) Nagamine S, Koike S, Keino-Masu K, Masu M. *Brain Res Dev Brain Res*, **159**: 135–143 (2005)
- 38) Ai X, Do AT, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CP Jr. *J Biol Chem*, **281**: 4969–4976 (2006)
- 39) Condorelli R, Calogero AE, Vignera SL. *Int J Endocrinol*, **2013**: 145792 (2013)
- 40) 佐久間康夫. 『内分泌生理学講義』第10版 2015
- 41) Gu A, Ji G, Long Y, Shi X, Song L, Wang X. *Toxicol Sci*, **122**: 415–421 (2011)
- 42) Fainberg J, Kashanian JA. *F1000Res.*, **8**: F1000 (2019)
- 43) Hirsh A. *BMJ*, **327**: 669–672 (2003)
- 44) Segretain D, Gilleron J, Carette D, Denizot J, Pointis G. *Developmental Dynamics.*, **239**: 1113–1123 (2010)
- 45) Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. *J Diabetes Res*, **2013**: 489095 (2013)
- 46) Van Dissel-Emiliani FM, De Boer-Brouwer MD, De Rooij DG. *Endocrinology*, **137**: 647–654 (1996)
- 47) Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. *Cell*, **104**: 875–889 (2001)
- 48) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, Yamada H. *J Biol Chem*, **287**: 18440–18450 (2012)
- 49) Lee TW, Lee TI, Lin YK, Kao YH, Chen YJ. *J Biomed Sci*, **25**: 42 (2018)
- 50) Laslett AL, McFarlane JR, Risbridger GP. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**: 171–179 (1997)
- 51) Ornitz DM, Itoh N. *Rev Dev Biol*, **4**: 215–266 (2015).
- 52) Turner N, Grose R. *Nat Rev Cancer*, **10**: 116–129 (2010).
- 53) Harmer NJ, Ilag LL, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson CV, Blundell TL. *J Mol Biol*, **339**: 821–834 (2004).
- 54) Groth C, Lardelli M. *Int J Dev Biol*, **46**: 393–400 (2002).
- 55) Nagai N, Kimata K. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Second Edition*, **2**: 1067–1080 (2014)
- 56) Viviano BL, Paine-Saunders S, Gasiunas N, Gallagher J, Saunders S. *J Biol Chem*, **279**: 5604–5611 (2004)
- 57) Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 4833–4838 (2004)
- 58) Narita K, Staub J, Chien J, Meyer K, Bauer M, Friedl A, Ramakrishnan S, Shridhar VH. *Cancer Res*, **66**: 6025–6032 (2006)
- 59) Besset S, Vincourt JB, Amalric F, Girard JP. *FASEB J*, **14**: 345–354 (2000)
- 60) Lane N, Caro L, Otero-Vilardebo LR, Godman GC. *J Cell Biol*, **21**: 339–351 (1964)
- 61) Clement A, Wiweger M, von der Hardt S, Rusch MA, Selleck SB, Chien CB, Roehl HH. *PLoS Genet*, **4**: e1000136 (2008)
- 62) Kamiyama S, Sasaki N, Goda E, Ui-Tei K, Saigo K, Narimatsu H, Jigami Y, Kannagi R, Irimura T, Nishihara S. *J Biol Chem*, **281**: 10945–10953 (2006)
- 63) Kamiyama S, Suda T, Ueda R, Suzuki M,

Okubo R, Kikuchi N, Chiba Y, Goto S,
Toyoda H, Saigo K, Watanabe M,
Narimatsu H, Jigami Y, Nishihara S. *J*
Biol Chem, **278**: 25958-25963 (2003)

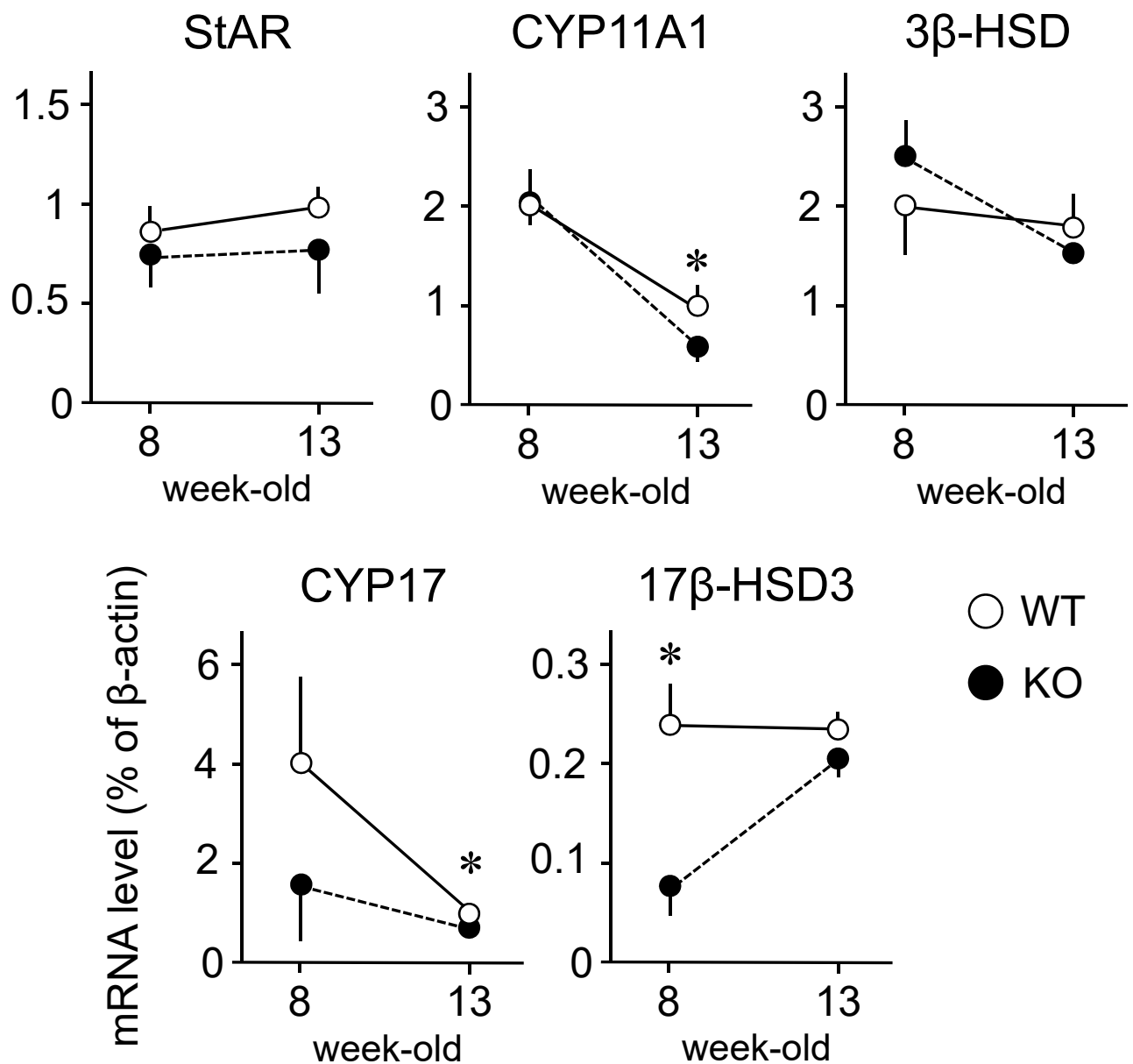


Fig. 1 The testicular expression of mRNAs coding for sex-steroid synthesis protein in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: $*p < 0.05$. Abbreviations used: StAR, steroidogenic acute-regulatory protein; CYP, cytochrome P450; 3 β -HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 17 β -HSD, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

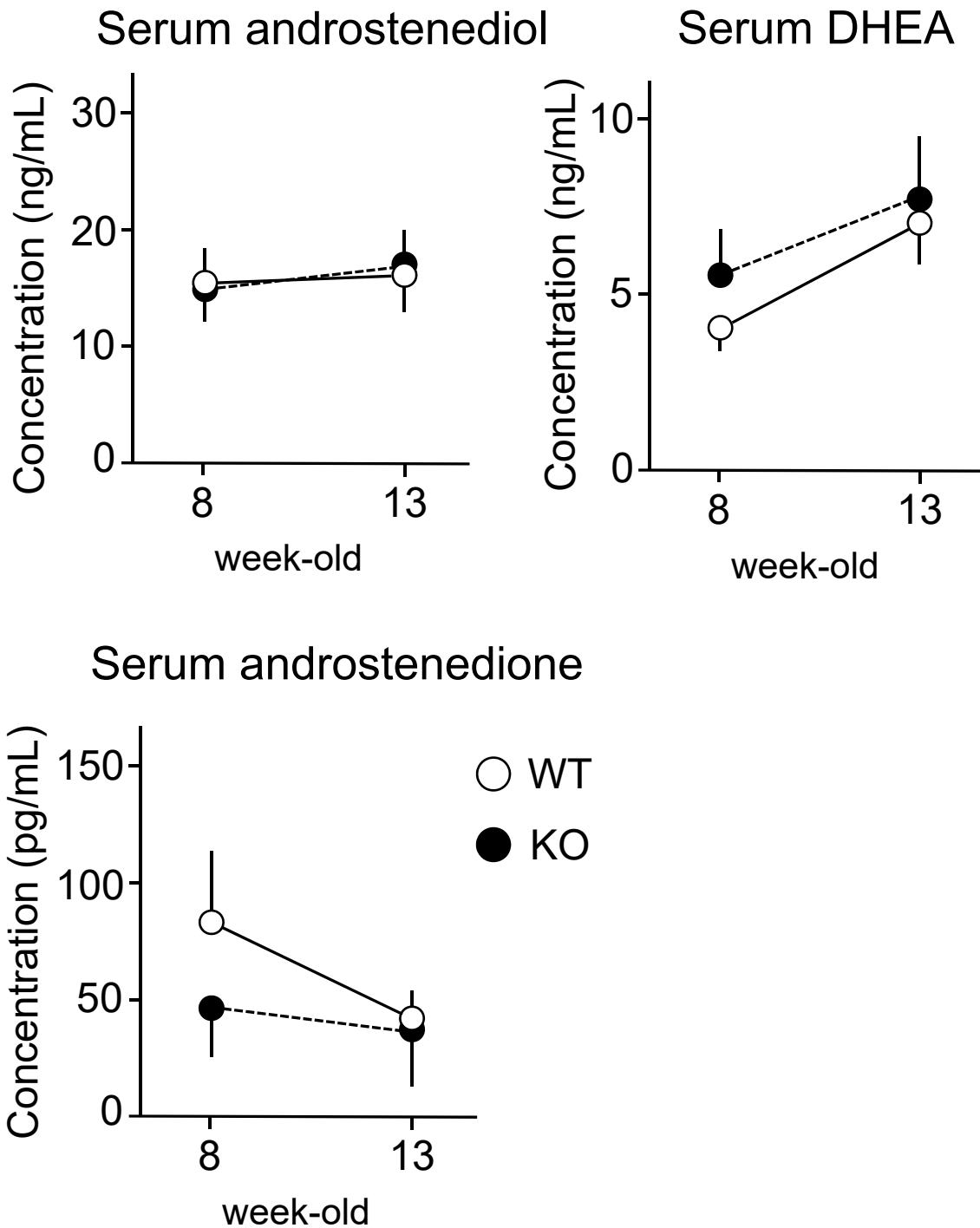


Fig. 2 The circulating level of steroid hormone in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5 rats. Abbreviations used: DHEA, Dehydroepiandrosterone.

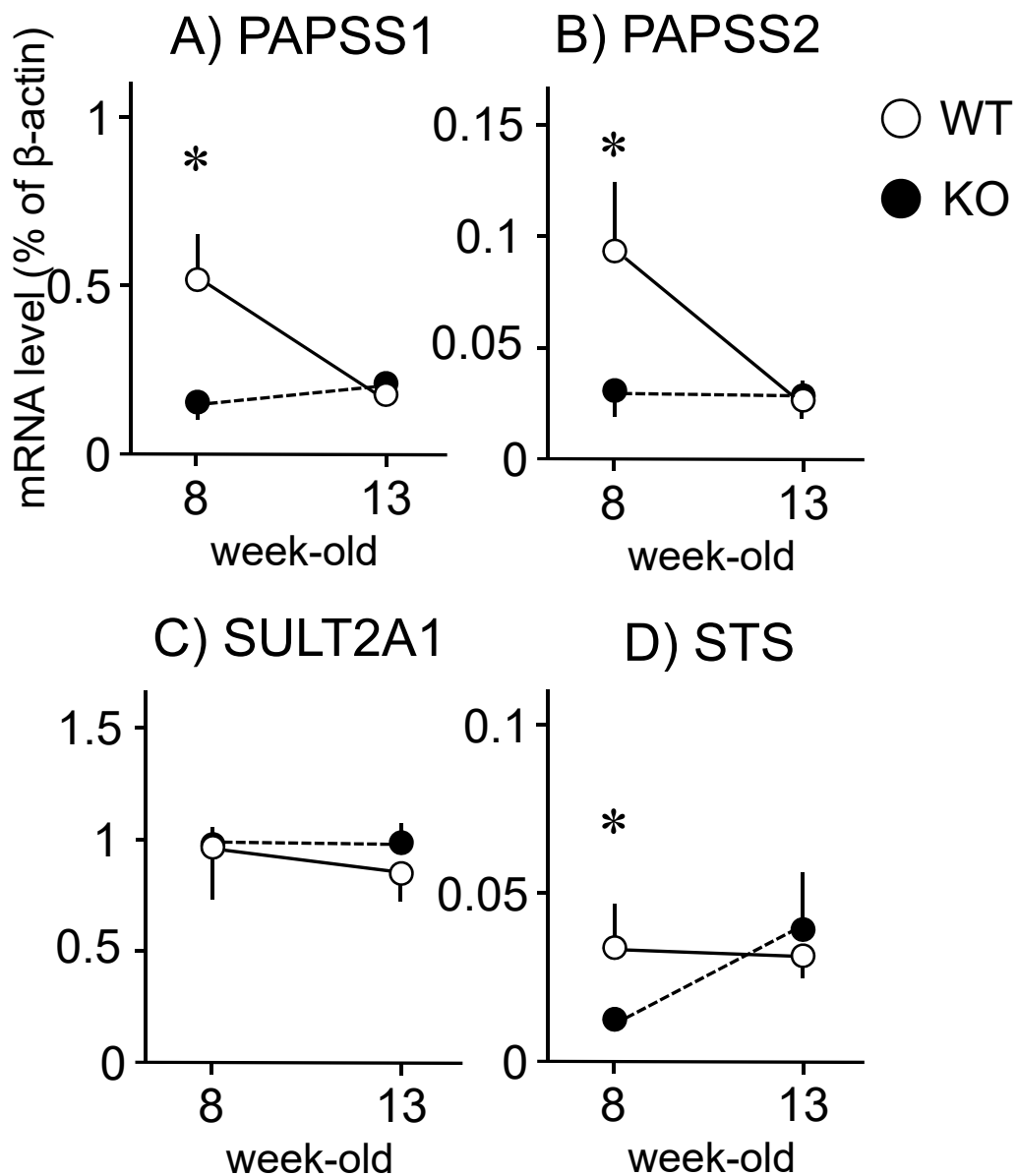


Fig. 3 The testicular expression of mRNAs coding PAPS synthase (A-B), sulfotransferase (C) and steroid sulfatase (D) in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5 rats. Significantly different from the control: * $p < 0.05$.

Abbreviations used: PAPS, 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthase; SULT, sulfotransferase; STS: Steroid Sulfatase.

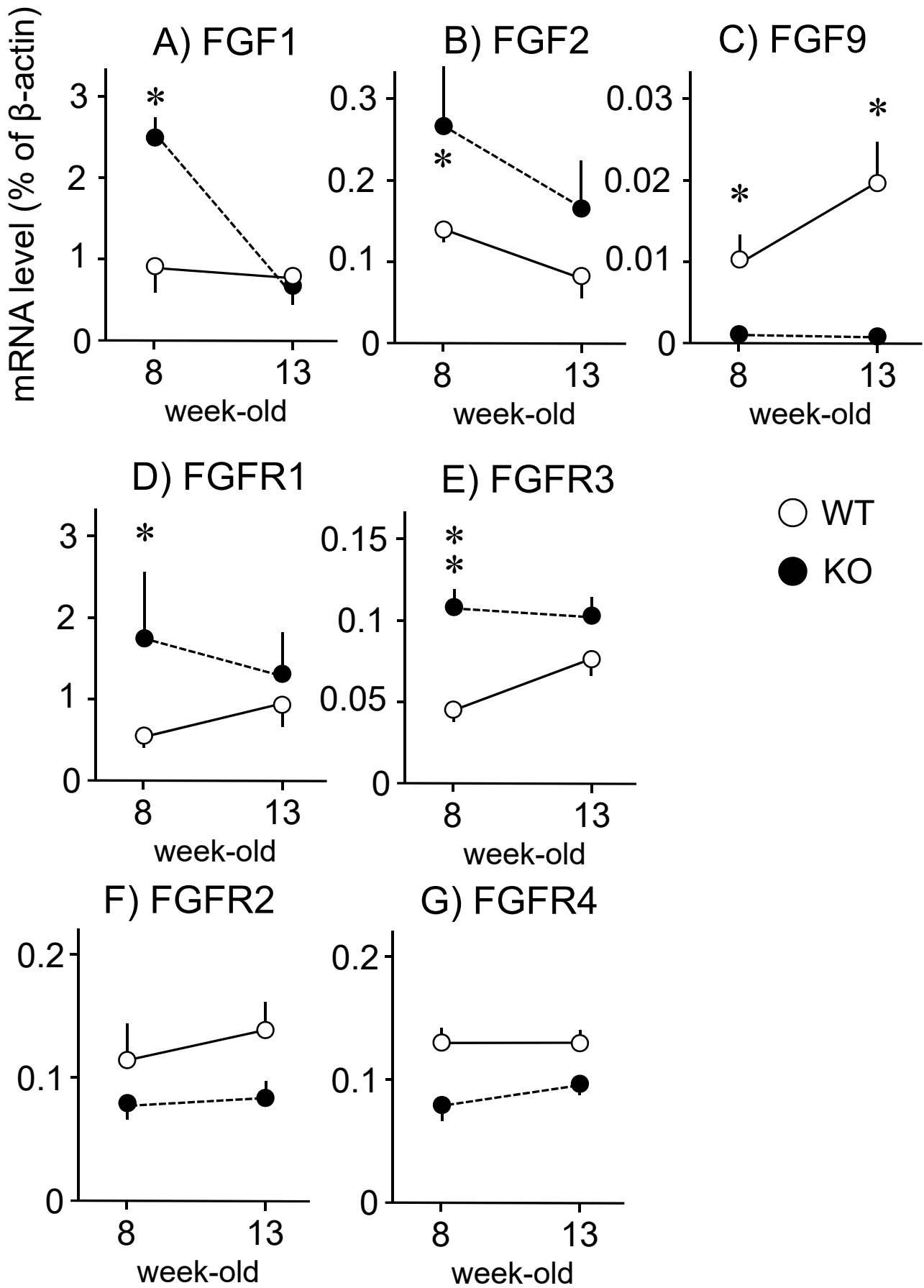


Fig. 4 (Continue to the next page)

Fig. 4 The testicular expression of fibroblast growth factor (A-C) and fibroblast growth factor receptor (D-G) mRNA in AHR deficient rats (8,13 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, FGF receptor. (8 week FGF1, FGF2, FGFR1およびFGFR3は、R3年度報告より引用)

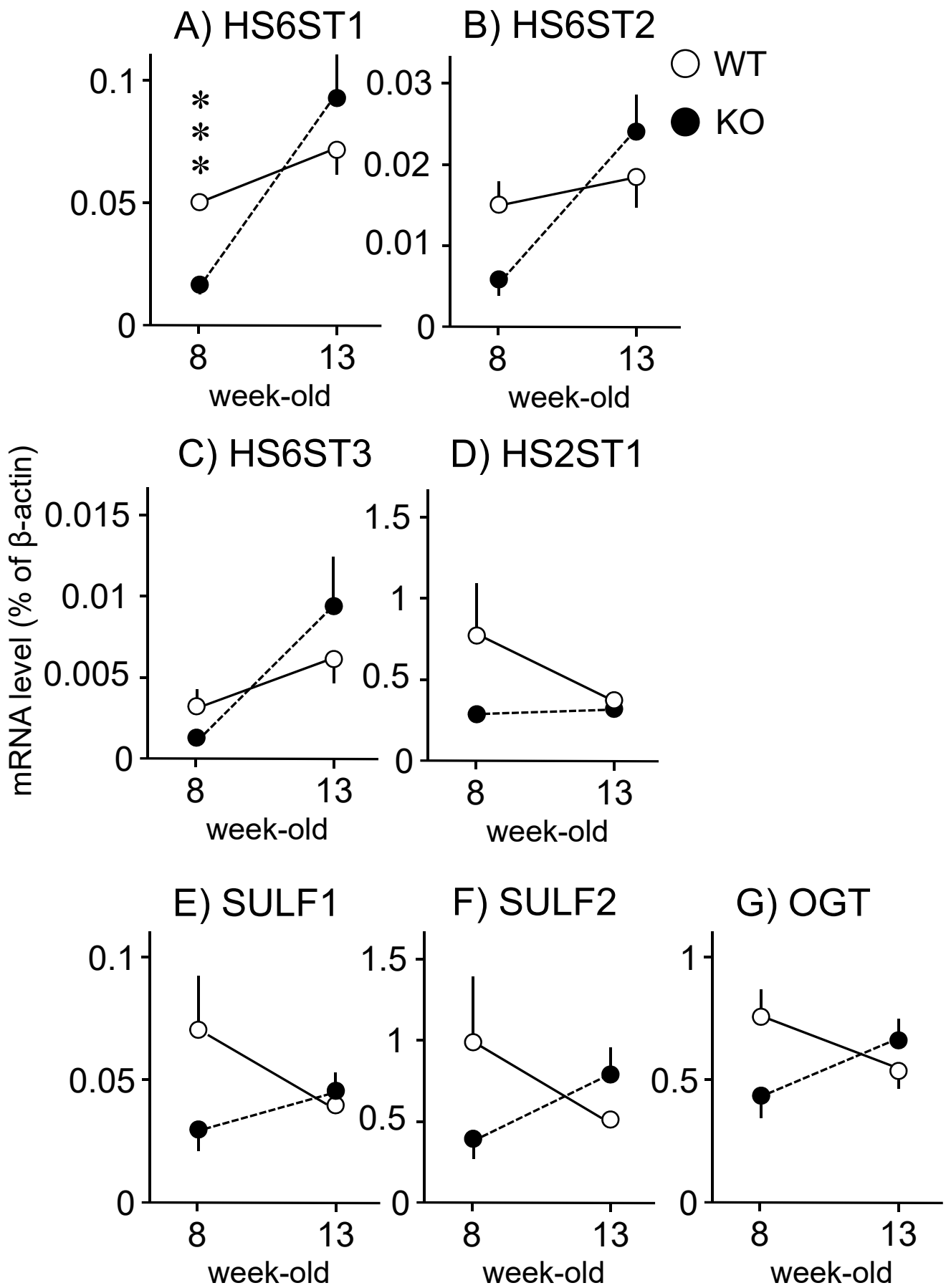


Fig. 5 (Continue to the next page)

Fig. 5 The testicular expression of Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase (A-C), Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase (D), sulfatase (E-F) and O-linked N-acetylglucosamine transferase (G) mRNA in AHR deficient rats (8,13 weeks old). Each bar represents the means \pm S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from the control: *** $p < 0.001$. Abbreviations used: HS6ST, Heparan-Sulfate 6-O-Sulfotransferase; HS2ST, Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase; SULF, sulfatase; OGT, O-linked N-acetylglucosamine transferase. (8 week B, C, およびGは、R3年度報告より引用)