

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

思春期芳香族炭化水素受容体 (AHR)欠損ラットにおいて精巣成長関連因子の発現に変動が見られたことから、本年度は AHR 欠損ラットの胎児期の精巣におけるそれら種々の因子についての解析を行った。解析の際、野生型と AHR 欠損型の比較を行うだけでなく、妊娠母体に gestational day (GD)15 で 1 µg/kg の 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) を経口投与し、GD20 でサンプリングを行うことでダイオキシンによる次世代毒性についても検討を行った。その結果、AHR 欠損により精巣や精子の形成に関わる因子である FGF (fibroblast growth factor) およびその受容体である FGFR (FGF receptor) に関して、思春期では FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 は mRNA 発現量が増加、FGF9 は mRNA 発現量が減少していた (R5 年度報告)。一方、胎児期においては、FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 は mRNA 発現量が減少、FGF9 は mRNA 発現量が増加と逆向きの変動が起こっていることが明らかとなった。また、胎児期の FGF 類の発現量に関しては TCDD による変動は見られなかった。加えて、コレステロールのミトコンドリアへの輸送に関する steroid genic acute regulatory protein (StAR) やテストステロン合成酵素についても胎児精巣で解析を行ったところ、StAR や 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) には TCDD により有意ではないものの抑制傾向があった。StAR は AHR 欠損により野生型の発現レベルより低下する傾向があり TCDD 依存性の変動はなくなった。3β-HSD については、AHR 欠損の影響は明確ではなかった。野生型において胎児精巣 17β-HSD、CYP11A1、CYP17 は、TCDD により有意に mRNA レベルが低下した。また、AHR 欠損により、TCDD による抑制作用が認められなくなった。従って、17β-HSD、CYP11A1、CYP17 は、AHR 依存的な変動をしていることが明らかとなった。胎児期のテストステロン合成酵素の発現低下には AHR が関与し、これが TCDD 母体曝露による胎児期のテストステロン低下、出生後の性未成熟に関与す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 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。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。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 レベルについても変動を明らかにした。

これらの結果はすべて精巣における解析であり、他の臓器でも同様の変動が起こるは明らかになっていない。そこで R5 年度は、これらの AHR 欠損による影響が他のステロイド産生臓器である副腎や上位制御器官の視床下部でも起こりうるのか、またその機構を明らかにすることを目的として研究を行い、精巣特異的であることを見出した。

R6 年度は、野生型と AHR 欠損型の胎児期での FGF 及び FGFR の発現の比較を行うだけでなく、TCDD による次世代毒性についても検討を行い、GD20 胎児精巣でのテストステロン合成系酵素の mRNA 発現を調べた。

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、翌朝膣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に、母ラットを自然に出産させたのち、生後 21 日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、AHR-Het ラットを交配して、系統維持を行った。

1.2 ダイオキシン次世代影響

雌雄の AHR-Het ラットを一晩交配し、翌朝膣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 15 日目に 1 µg/kg の TCDD を経口投与し、GD20 でサンプリングを行った。遺伝子型の判別は胎児の尾よりゲノム DNA を採取し、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。これらにより、野生型と AHR 欠損型の比較を行うだけでなく、ダイオキシンによる次世代毒性についても検討を行った。胎児より肝臓、視床下部、下垂体、精巣および血液を採取した。

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 (18)。これを鑄型とし、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：A22-068 及び A24-137-0。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：1-9 及び 6-7）。

C. 研究結果

AHR 欠損により精巣や精子の形成に関わる因子である FGF (fibroblast growth factor) およびその受容体である FGFR (FGF receptor) に関して、思春期では FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 は mRNA 発現量が増加、FGF9 は mRNA 発現量が減少していた（R5 年度報告）。一方、R6 年で検討した胎児期においては、AHR 欠損により精巣の FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 は mRNA 発現量が減少、FGF9 は mRNA 発現量が増加と逆向きの変動が起こっていることが明らかとなった（Figs. 1, 2）。また、胎児期の精巣 FGF 類の mRNA 発現レベルに関しては TCDD による変動は見られなかった。加えて、テストステロン合成酵素 mRNA レベルについても胎児精巣で解析を行ったところ、StAR や 3 β -HSD には TCDD により有意ではないものの抑制傾向があった。StAR は AHR 欠損により野生型の発現レベルより低下する傾向があり TCDD 依存性の変動はなくなった（Fig. 3）。3 β -HSD については、AHR 欠損の影響は明確ではなかった。野生型において胎児精巣 17 β -HSD、CYP11A1、CYP17 は、TCDD により有意に mRNA レベルが低下した。また、AHR 欠損により、TCDD による抑制作用が認められなくなった（Fig. 3）。従って、17 β -HSD、CYP11A1、CYP17 は、AHR 依存的な変動をしていることが明らかとなった。

D. 考察

精巣や精子の形成に関わる因子である

FGF (fibroblast growth factor) およびその受容体である FGFR (FGF receptor) に関して、AHR 欠損により、FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 は胎児期では減少（Fig. xx）、思春期では増加（R5 年度報告）、老齢期では有意差がない（R5 年度報告）という結果になった。思春期において AHR 欠損による精巣重量の減少や精子数の減少が当研究室の先行研究で明らかになっていることから、胎児期及び出生前後で FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 の発現量が減少し、そのフィードバックとして思春期にこれらの発現量が増加した可能性が考えられる。今後は出生後から思春期にかけての FGF 類の解析を行う必要があるだろう。

また、TCDD 低用量母体曝露による胎児精巣での StAR や CYP17 の GD20 での発現低下は、先行研究で明らかになっており、AHR 依存性についても検証されており（15）、その影響を支持した。本研究でも、StAR については、AHR 欠損により構成的な発現レベルが低下する傾向があった（Fig. 3）。以前の検討で AHR 欠損により構成的 LH の mRNA レベルが有意に半分程度まで低下することが分かっており、これが、性未成熟につながることを明らかにしている（15）。従って、本研究で観察された AHR 欠損による胎児期精巣 StAR mRNA 発現への影響は先行研究における下垂体 LH β の mRNA 発現変動と合致する。

また、胎児精巣の CYP17 だけでなく、CYP11A1, 3 β -HSD の mRNA 発現が TCDD 依存的に有意に抑制され、AHR 欠損ではこの抑制作用が認められなかったことから、これらの構成的な発現には AHR は影響しないと推定され、TCDD 依存的な抑制に AHR が関与することが強く示唆された。ラット胎児精巣におけるテストステロン合成系酵素のうち、CYP11A1, 3 β -HSD の発現に AHR が関与することを示したのは、筆者の知る限り本研究が初めてである。

E. 結論

- 1) AHR 欠損により胎児期においては、
FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR3 は mRNA 発現量が減少、FGF9 は mRNA 発現量が増加していることが明らかとなった。
- 2) 胎児期の FGF 類の発現量に関しては TCDD による変動は見られなかった。
- 3) コレステロールのミトコンドリアへの輸送に関与する StAR やテストステロン合成酵素についても胎児精巣で解析を行ったところ、StAR や 3 β -HSD には TCDD により有意ではないものの抑制傾向があった。StAR は AHR 欠損により野生型の発現レベルより低下する傾向があり TCDD 依存性の変動はなくなった。
- 4) 野生型において胎児精巣 17 β -HSD、CYP11A1、CYP17 は、TCDD により有意に mRNA レベルが低下した。また、AHR 欠損により、TCDD による抑制作用が認められなくなった。従って、17 β -HSD、CYP11A1、CYP17 は、AHR 依存的な変動をしていることが明らかとなった。

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。TCDD 非依存的な胎児期の FGF や FGFR への AHR 欠損の影響がこれに当たると考えられ、精巣の働きや精子形成への FGF 類の重要性とも合致する。また、胎児期のテストステロン合成系への影響のように、TCDD 依存的かつ AHR 依存的なものもあることも分かった。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 の構成的働きを搅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 41 回日本薬学会九州山口支部大会 (2024 年 11 月 23 日、熊本)。

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)

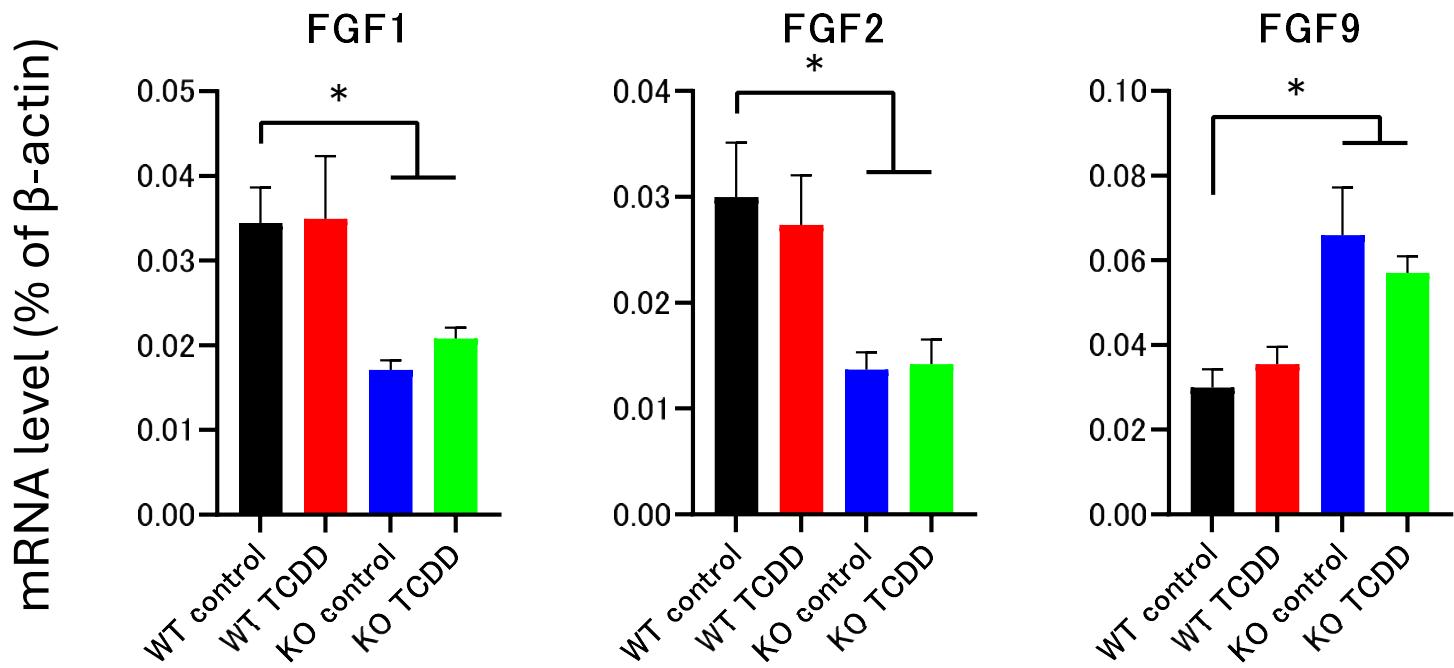


Fig. 1 The testicular expression levels of the FGF mRNA level in AHR deficient rat fetuses. Each bar represents the means \pm S.E.M. of 4-5 rats. Significantly different from the control: * $p<0.05$.

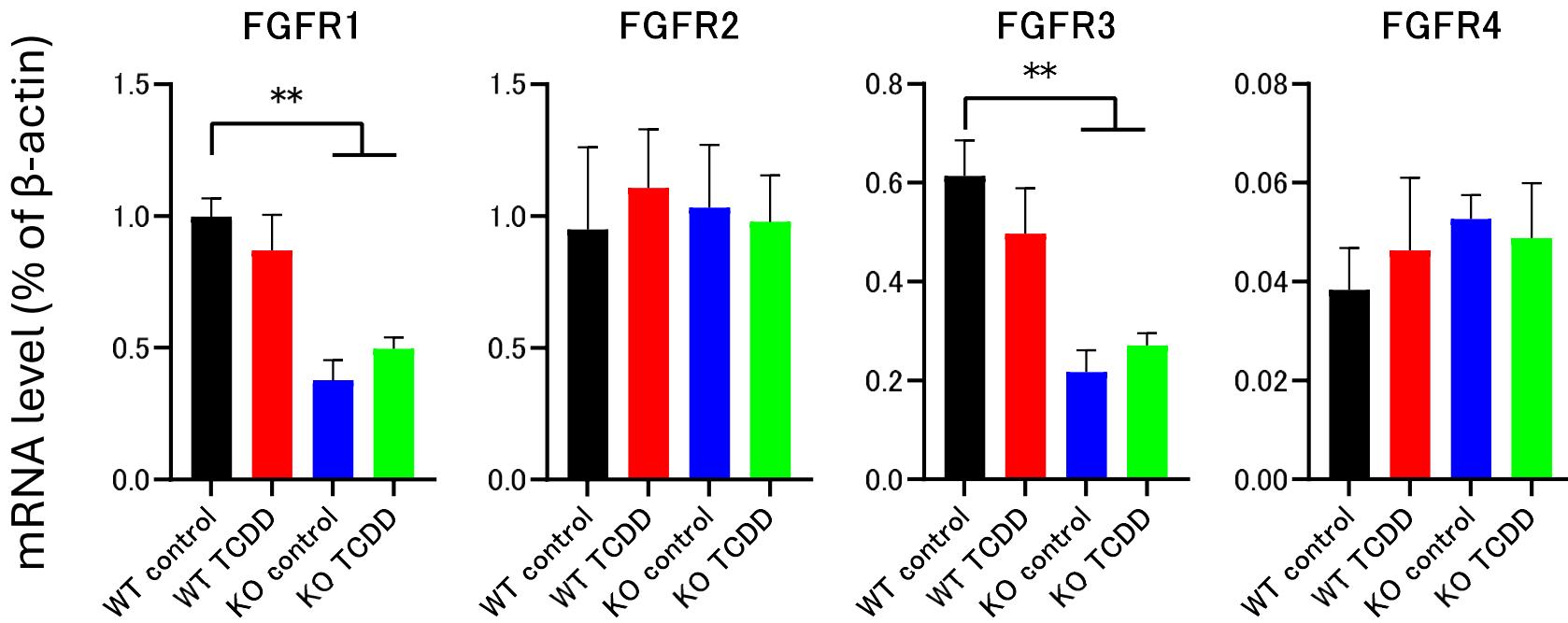


Fig. 2 The testicular expression levels of the FGF-receptor mRNA in AHR deficient rat fetuses. Each bar represents the means \pm S.E.M. of 4-5 rats. Significantly different from the control: ** $p < 0.01$.

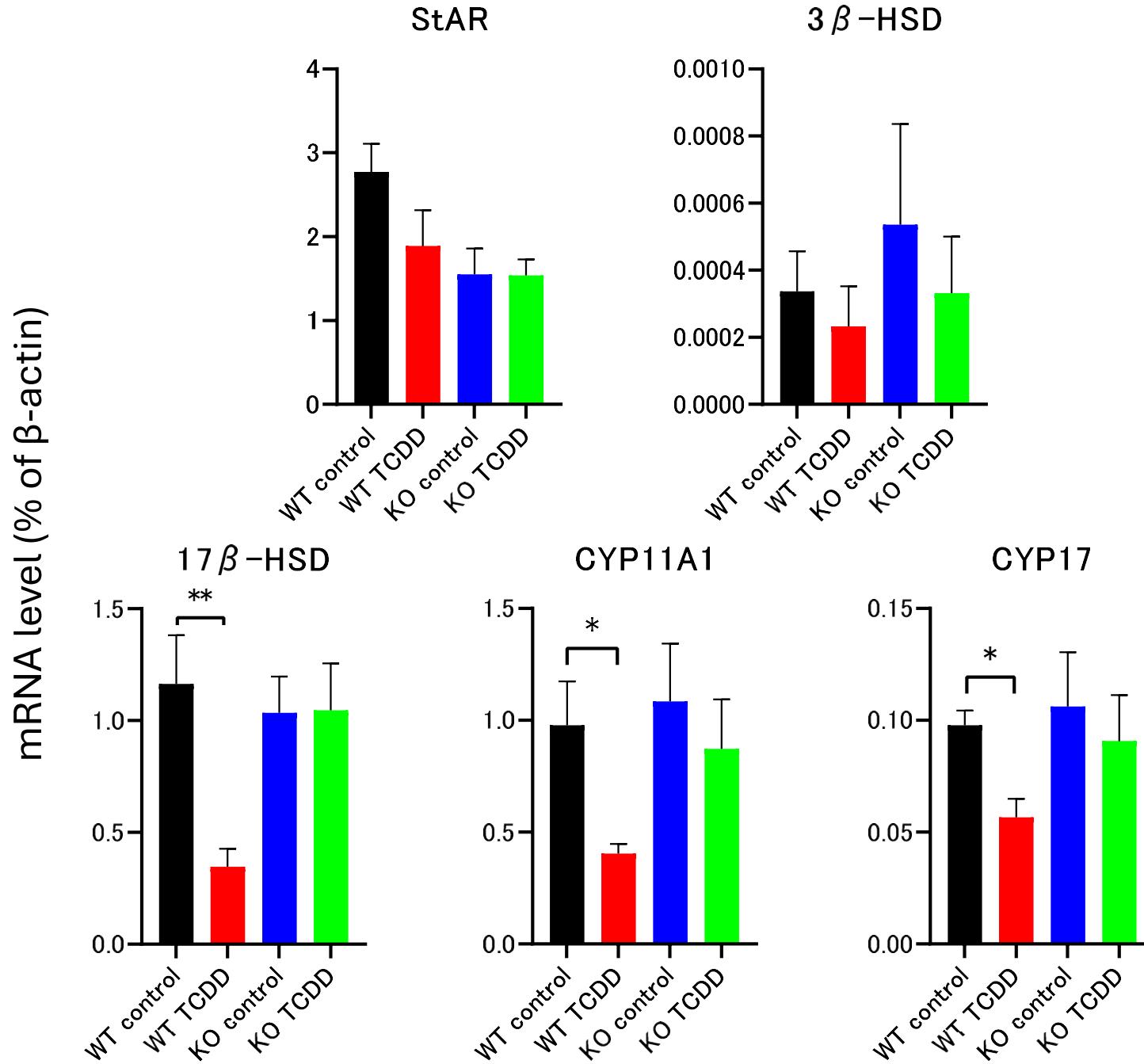


Fig. 3 The testicular expression levels of the mRNA for enzymes involved in testosterone production in AHR-deficient rat fetuses. Each bar represents the means \pm S.E.M. of 4-5 rats. Significantly different from the control: *p<0.05, **p<0.01.