

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390034

研究課題名(和文)ダイオキシンによる性未成熟のインプリンティングとその機構

研究課題名(英文)Dioxin-induced imprinting of sexual immaturity and its mechanism

研究代表者

山田 英之 (YAMADA HIDEYUKI)

九州大学大学院 薬学研究院・教授

研究者番号：40142351

研究成果の概要(和文):環境汚染物質 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン(TCDD、ダイオキシン)を妊娠ラットへ投与後、胎児への影響を調べた。TCDD 曝露は胎児・性腺の男性/女性ホルモン合成を障害し、これが原因で出生、成長後の交尾行動能力を低下させることを明らかにした。また、これらの障害は TCDD が脳下垂体ホルモンである黄体形成ホルモンや卵胞刺激ホルモンを低下させることに起因することも実証できた。

研究成果の概要(英文): The effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), an environmental pollutant, on fetal maturation were studied in rats. The fetuses exposed to TCDD showed not only a reduction in the expression of gonadal proteins necessary for sex-steroid syntheses, but also impaired activity in sexual behaviors at adulthood. We also obtained evidence that above damages are due to a TCDD-produced reduction in fetal pituitary gonadotropins, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：衛生薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ダイオキシン、胎児、性腺ステロイドホルモン、脳下垂体ホルモン、後世代影響

1. 研究開始当初の背景

環境汚染物質ダイオキシンには種々の健康障害性が危惧されており、中でも低用量で発現する胎児や新生児への影響は問題が大きい。これまで、ダイオキシン類には性ステロイドホルモン(男性ホルモン=テストステ

ロンと女性ホルモン=エストラジオール)の作用を変動させることによって、種々の悪影響を惹起すると推定されていた。しかし、その詳細やホルモン変動と障害性の関係等、多くが未解明であった。

2. 研究の目的

一般に、哺乳動物の胎児が健全に成長し、雌雄に特徴的な形質を獲得するには、胎児期から新生児期にかけての臨界期と呼ばれる時期に、適切な性ステロイドホルモンの曝露を受ける必要があるとされている。ダイオキシンは、臨界期にステロイドホルモン合成を障害して発達障害や成長後の未成熟を引き起こす可能性が考えられた。そこで、本研究では、(1) ダイオキシンが胎児後期の性ステロイド合成系に及ぼす影響とその機構、並びに (2) ダイオキシン依存的な性ステロイドホルモン合成変動と性成熟の関連性に焦点を当てて研究を行った。

3. 研究の方法

最強毒性のダイオキシンと言われている2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) を妊娠ラット (妊娠 15 日目: gestational day15 = GD15) に体重 1 kg 当たり 1 µg の用量で経口投与し、GD20 の胎児から組織を切除して遺伝子発現を逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) 法で解析した。上記の TCDD 投与量では、母子ともに見かけ上は顕著な障害は観察されない。また、ラットの場合は妊娠は 20 日間で満了し、21 日目に殆どの児が出生する。

ラットの性成熟は、生殖器官の重量変化と成長後の交尾能力によって評価した。雄の交尾では、予め強制発情させた健康雌ラットと 1 : 1 で同居させ、雌への馬乗り行動 (マウント)、性器挿入回数、および最初の交尾行動を開始するまでの時間 (潜在性) を観察した。雌の交尾行動観察では、雄にマウントされた際ののけぞり行動 (=ロードシス) の出現の有無および強度 (のけぞりの程度) を観

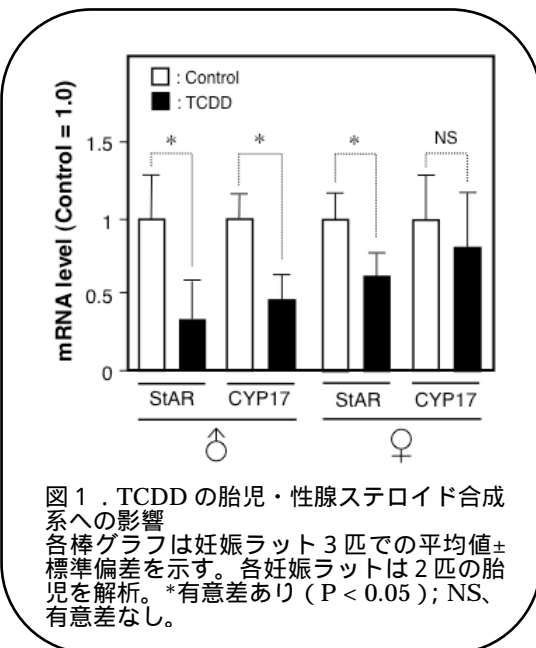


図1. TCDD の胎児・性腺ステロイド合成系への影響
各棒グラフは妊娠ラット3匹での平均値±標準偏差を示す。各妊娠ラットは2匹の胎児を解析。*有意差あり (P < 0.05); NS、有意差なし。

察した。健康な雌ではロードシスを起こし、その強度も強い。また、雌の特徴の一つとして、甘味料への欲求がある。そこで、雌の特徴獲得の指標として、サッカリン水への嗜好性をも観察した。

4. 研究成果

(1) TCDD が胎児生殖腺の性ステロイドホルモン合成系に与える影響

性ステロイドホルモンはコレステロールを原料として、種々のトランスポーターや酵素の働きを介して合成される。Steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) や cytochrome P450 17 (CYP17) 等は上記の一連の反応に必要な性ステロイドホルモン合成系タンパク質である。TCDD を投与された妊娠ラットの胎児でこれらの発現状況を観察した結果を図1に示す (観察組織は雄の精巣と雌の卵巣)。雄児では、対照群 (母親に TCDD を含まない溶媒のみを投与: control 群) と比べて、TCDD 投与群では StAR および CYP17 共に遺伝子転写産物である mRNA 発現量が低下した。雌胎児では、CYP17 には有意な変動は認められなかったが、StAR は雄と同様に TCDD によって抑制された。次に、TCDD の上記作用が胎児の生殖組織への直接的な作用か否かを確かめる目的で、培養した胎児生殖組織に TCDD を添加して効果を観察した。その結果、培養組織では TCDD の性ステロイドホルモン合成系抑制効果が再現できなかった (図表未掲載)。

(2) TCDD の胎児脳下垂体ホルモンに及ぼす影響

上記(1)の結果より、TCDD による胎児・性ステロイドホルモン合成系障害は、生殖腺に対する直接作用では説明ができない。古くから、末梢での性ステロイドホルモン合成は、

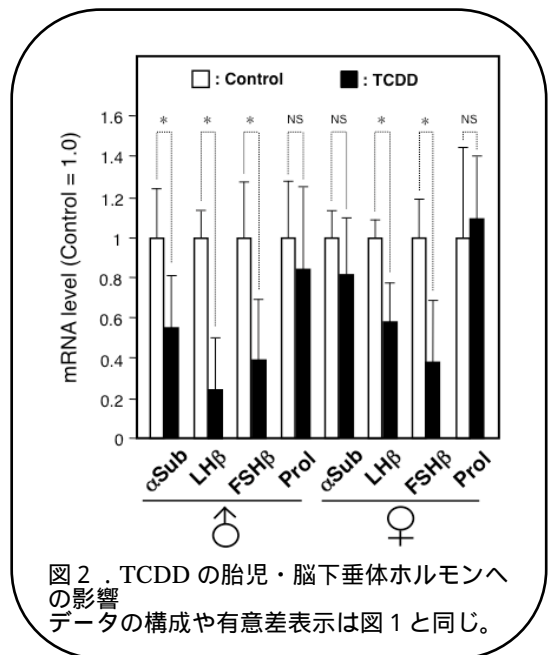


図2. TCDD の胎児・脳下垂体ホルモンへの影響
データの構成や有意差表示は図1と同じ。

脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) や卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) 等によって制御されることが知られている。そこで、我々は次に、TCDD の作用点がこれらの脳下垂体ホルモンである可能性に注目した。LH と FSH は共に 2 量体として働くペプチドホルモンである。α-サブユニット (α-Sub) は両者に共通であるが、β-サブユニットはそれぞれのホルモンで異なる。胎児脳下垂体中のホルモン mRNA を解析した結果 (図 2) 雄胎児で α-Sub、LHβ および FSHβ の 3 種が TCDD の母ラットへの投与によって低下することが判明した。同じ脳下垂体ホルモンでもプロラクチン (Prol) は TCDD によって変動しなかった。雌児においても、LHβ と FSHβ の低下が観察された。更に、血液中の LH と FSH 水準を測定しても、雌雄胎児共にこれらの 2 種のホルモンは TCDD の母体曝露で有意に低下した (図表未掲載)。これらのデータから、TCDD は LH や FSH の障害を起点として性ステロイドホルモン合成を低下させる機構が示唆された。

(3) 脳下垂体ホルモン低下と性ステロイドホルモン合成系低下との関連性

若し TCDD による LH/FSH 低下が性ステロイドホルモン合成障害の根源的機構であれば、LH/FSH が低下したラット胎児へのホルモン注入治療によって障害が回復するはずである。そこで、次にこれを試みた。すなわち、TCDD 曝露 (GD15) 母中の胎児 (GD17) に LH 様ホルモン作用を有することが知られるウマ絨毛性ゴナドトロピン (equine chorionic gonadotropin, eCG) を直接注入し、GD20 での StAR 遺伝子発現状況を観察した。その結

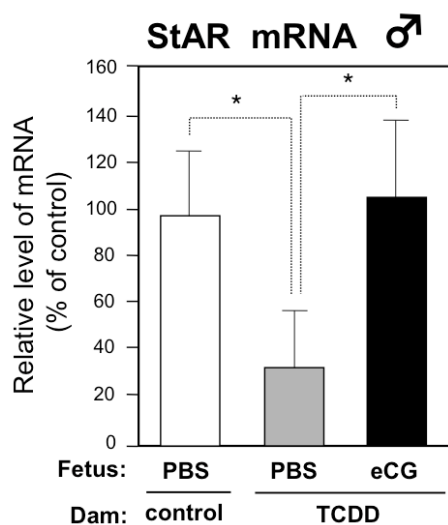


図 3 . TCDD による胎児精巣 StAR 発現低下に及ぼす eCG の保護効果
データの構成や有意差表示は図 1 と同じ。

果、雄胎児の精巣 StAR 発現は、TCDD による低下が eCG 処理によって完全に回復した (図 3)。雌卵巣における StAR の低下でも eCG 注入による回復傾向が認められた (図表未掲載)。この事実は、性ステロイド合成系への障害が脳下垂体ホルモンの抑制を介して発生することとよく符合する。

(4) 障害の胎児特異性に関する検討

TCDD による LH/FSH 低下や性ステロイド合成系への作用は、胎児後期や初期の新生児期に限定される。この理由として、未発達期では TCDD の脳移行性が高いためとも考え得る。成獣では物質の脳移行性を制限する血液・脳関門が発達しているために TCDD が脳へ移行できずに障害が起こらないとの考えである。これが事実であれば、成熟ラットでも TCDD を脳内に直接注入すれば、胎児等と同様な障害が発生しなければならない。しかし、TCDD の脳室内投与と実験においても、脳下垂体 LHβ/FSHβ および精巣 StAR の発現低下は生じなかった (図 4)。TCDD 依存的に発現増加することが知られている CYP11A1 遺伝子は、TCDD の脳内投与で脳下垂体での発現が増加することから (図 4) TCDD が脳下垂体に一定量到達していることは間違いない。従って、TCDD の脳下垂体ホルモン低下等の作用が胎児や新生児に特異的である理由は、TCDD の脳移行性の高さでは説明できないと考えられた。

(5) TCDD による脳下垂体ホルモン障害と発育不全との関連性

TCDD の母体曝露は、新生児の成長や生殖器官の発達に影響を及ぼし、TCDD 処理母からの出生児は雌雄共に生後 8 週あたりまでは対照群と比べて有意に体重が少なかった (図表

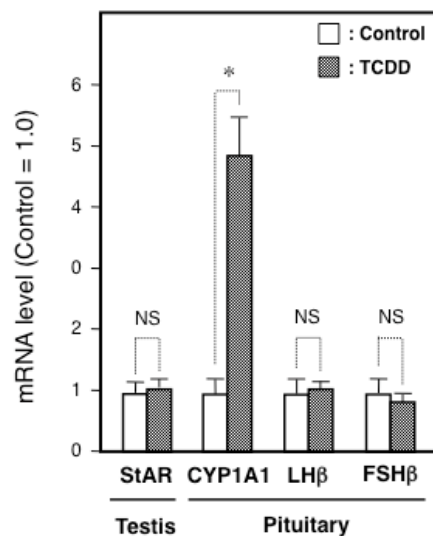


図 4 . TCDD の成熟ラット脳内投与が遺伝子発現に及ぼす影響
各棒グラフは 5 匹のラットでの平均値 ± 標準偏差。有意差に関する表示は図 1 参照。

未掲載)。しかし、TCDD 曝露児でも胎児期に eCG を注入した場合には低体重が回復した。また、前立腺(雄)や卵巣(雌)の発育に関しても、TCDD による遅延と eCG による回復ないしその傾向が観察された。これらのことから、TCDD による胎児期の脳下垂体ホルモン低下とそれに続く性ステロイドホルモン合成系低下は、雌雄新生児の健全な発育を抑制することが強く示唆された。

成長後の交尾行動を指標として、TCDD の影響とそれへの脳下垂体ホルモンの関与を調べた結果を図 5 に示す。この実験では、TCDD 曝露母ラットから出生した雄児を交尾可能年齢まで成長させ、強制発情雌ラットと同居させて性行動を観察した。その結果、マウント行動(パネル A)と性器挿入(C)までに要する時間は正常ラット(ダイオキシン未処理母から出生した児)よりも明らかに遅延した。また、マウント(B)と性器挿入(D)の回数は正常ラットよりも有意に減少した。このように、TCDD 曝露母から出生した場合は、明らかに交尾能力が低下していた。しかし、TCDD 曝露母の胎児に eCG の注入処理を行うと、出生/成長後の交尾能力が回復(B-D)、ないし回復傾向(A)が観察された。この結果は、TCDD は胎児期の LH/FSH 減少を起点として性ステ

ロイド合成を一過性に抑制し、これが成長後まで継続する性未成熟を規定することを示している。

雌においても同様なことが観察され、TCDD 曝露母から出生した児では、ロードシス発現が低下し(E)、その強度も正常雌と比べて減少した(F)。ただ、これらの変化は有意ではあるものの顕著ではなく、性行動に及ぼす胎児期のホルモン失調の影響は、雄の方が顕著に現れることが示唆された。上記2種のロードシス指標も、胎児期に eCG 処理を行うことによって、回復ないしその傾向が観察された(E, F)。このことから、雌の性行動でも TCDD による異常は、胎児期の脳下垂体ホルモン失調とそれを起点とする性ステロイドホルモン低下が原因であることが強く示唆された。

甘味料を好んで接種する性質は、雌の特徴の一つと考えられており、サッカリン含有水と非含有水のどちらを摂るかは、これを調べる方法である。図 5 G に示すように、TCDD 曝露母からの雌児では、サッカリン嗜好性が有意に減少した。しかし、この指標でも、TCDD 曝露母の胎児に eCG 処理を行うと、正常に復帰した。

以上の研究成果を要約すると、1) TCDD は胎児期の LH および FSH の合成を抑制し、こ

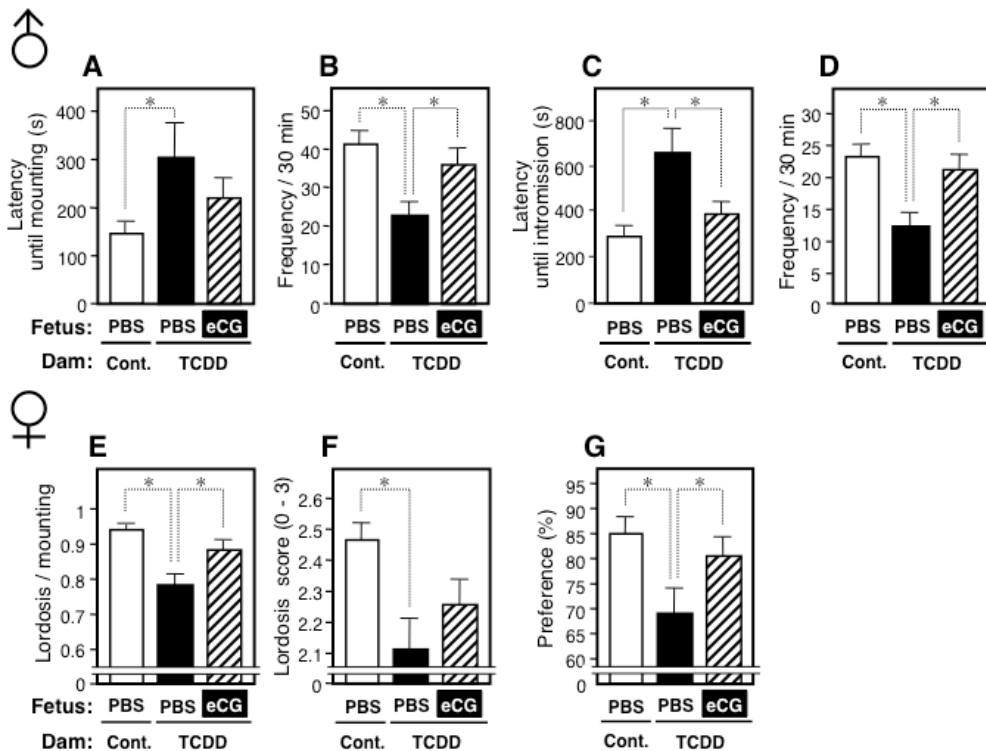


図 5. TCDD 曝露ラットより出生した雄児 (A-D) と雌児 (E, F) の交尾活性および雌児のサッカリン嗜好性 (G)、並びにそれらに及ぼす eCG 処理の影響。A, マウントまでの潜在性; B, マウント回数; C, 性器挿入までの潜在性; D, 性器挿入回数; E, ロードシス出現の有無 (出現 = 1.0); F, ロードシス強度 (最大 = 3.0); G, サッカリン嗜好性 (サッカリン水摂取量 / 全摂取量)。データ構成と有意差表示法は図 1 参照。PBS, eCG 溶解用の溶媒 (緩衝化生理食塩水)。

れによって生殖腺のステロイドホルモン合成系を抑制する、2)この障害は、雌雄特異的な形質の獲得を障害し、行動不全を固着させることを明らかにすることができた。今回の研究は実験動物のラットを用いた研究であり、同様の障害がヒトにも生起するか否かは不明である。胎児期の環境汚染物質曝露がヒトでの障害を惹起するか否かの大規模疫学研究が我が国のみならず、世界各国でも実施されている。本研究での基礎実験の成果とも照らし合わせながら、今後の更なる解析が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- 1 Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. J. Pharmacol. Exp. Ther., 査読有, 929: 1091-1099 (2009).

[学会発表](計13件)

- 1 武田知起, 藤井美彩紀, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之, ラット脳下垂体 luteinizing hormone の刺激合成に対するダイオキシンの影響とその胎児特異性. フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 沖縄, 2009年11月.
- 2 Takeda, T., Fujii, M., Ishii, Y., Ishida, T., Yamada, H., A reduction by TCDD in the expression of gonadotropin subunits: its perinatal age-specificity and the mechanism. HORIBA/CDBIM Symposium: 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Tokyo, Oct., 2009.
- 3 山田英之, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次, 石田卓巳, ダイオキシンの胎児・性ホルモン合成失調の分子機構. 第2回博多シンポジウム: 内・外環境と生物応答, 福岡, 2009年10月.
- 4 武田知起, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之, ダイオキシンのラット胎児脳下垂体 luteinizing hormone 合成系の障害: 培養脳下垂体を用いた機構解析. 日本薬学会第129年会, 2009年3月.
- 5 松本悠揮, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之. ダイオキシンの胎児特異的な性ホルモン合成障害の機構: 成獣への脳室内投与による検討. フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 熊本, 2008年10月.

- 6 武田知起, 武藤純平, 竹藤順子, 西村嘉雄, 古賀貴之, 松本悠揮, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之. ダイオキシンの曝露による雌雄特異的な性行動異常: 胎仔期の黄体形成ホルモン障害を起点とする機構と性差. 日本薬学会第128年会, 横浜, 2008年3月.
- 7 武田知起, 武藤純平, 竹藤順子, 西村嘉雄, 古賀貴之, 松本悠揮, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之. ダイオキシンのラット胎仔性ホルモン合成系の障害と雌雄特異的な性行動異常について. フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 大阪, 2007年11月.
- 8 武田知起, 武藤純平, 竹藤順子, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之. TCDD 母体曝露によるラット胎仔性ホルモン合成への影響: LH を介する機構. 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.

その他5件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 英之 (YAMADA HIDEYUKI)
九州大学大学院 薬学研究院・教授
研究者番号: 40142351

(2) 研究分担者

石井 祐次 (ISHII YUJI)
九州大学大学院 薬学研究院・准教授
研究者番号: 90253468
石田 卓巳 (ISHIDA TAKUMI)
九州大学大学院 薬学研究院・助教
研究者番号: 10301342

(3) 連携研究者

()

研究者番号: