

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790152

研究課題名（和文）ダイオキシンによる性未成熟誘起の機構：GnRH 低下のインプリンティングの寄与

研究課題名（英文）A mechanism underlying the dioxin-produced sexual immaturity: an imprinting of the lowered expression of gonadotropin-releasing hormone

## 研究代表者

武田 知起 (TAKEDA TOMOKI)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：60596831

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、妊娠ラットへのダイオキシン (TCDD) 曝露が胎児期の性ホルモン合成系障害を起点として出生後にゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 低下を固定し、性未成熟を規定するとの新規機構を見出した。成果は以下の通り。1) TCDD による出生児の GnRH 低下は 4 日齢より成長後まで継続する。2) TCDD 曝露母より出生した雄児脳への GnRH 補給は TCDD 依存的交尾行動障害を改善する。3) TCDD は胎児期に性ホルモン合成を障害するが、TCDD 曝露胎児への生殖腺刺激ホルモンの補給により出生後の GnRH 低下が起こらなくなる。

## 研究成果の概要（英文）：

This study suggests the novel mechanism that maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) fixes the status of a reduction in the hypothalamic expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the offspring by reducing perinatal steroidogenesis, and this is the origin for imprinted defects in sexual behaviors at adulthood. The results obtained in this study were as follows: 1) A reduction in GnRH mRNA by TCDD emerges from postnatal day 4 to adulthood. 2) Intracerebroventricular infusion of GnRH into the TCDD-exposed pups after their growing up restored many defects in sexual behaviors. and 3) Direct supplementation of gonadotropin into TCDD-exposed fetuses at GD17 rescued a TCDD-produced attenuation of hypothalamic GnRH mRNA in the male pups.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境化学

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠期のダイオキシン曝露により出生児

に出現する交尾行動障害等の性未成熟は、障害発現に要する用量が小さく、世代を越えて

影響が及ぶことから問題が大きい。そのため、障害発生機構の解明や対処法の構築は早急に実現すべき課題であるが、未だ殆ど達成されていない。当研究室では、最強毒性を有するダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)の妊娠ラットへの投与によって、胎児脳下垂体のゴナドトロピン産生障害を起点として性ホルモン合成系が低下し、成長後の交尾能力が減退することを明らかにしている [1-3]。さらに、最近に実施したDNAマイクロアレイ解析により、TCDD曝露を受けた母ラットより出生した成熟雄児の視床下部においてgonadotropin-releasing hormone (GnRH)の発現低下が生じることを見出した。GnRHは生殖機能の発達や維持に必須のホルモンであるため、本ホルモンの失調は生殖能力の減退に直結することが危惧される。従って、GnRH低下の意義や機構を明確にすることは、性未成熟との関連性を論じる上で重要と考えられるが、これらの点に関しては全く解析されていなかった。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究ではダイオキシン胎児期曝露による成熟雄児のGnRH発現低下に着目し、GnRH低下と性特異的形質不全との関連性を明確にするとともに、その機構を明らかにすることを目的とした。GnRH低下の毒性的意義の検討は、TCDD曝露母体より出生した雄児に対して、低下するGnRHを脳室内に補給し、交尾行動を指標として障害改善効果を検証した。さらに、GnRH低下の機構解析では、はじめにGnRH低下の出現時期を明らかにし、低下が観察される時期に焦点を絞って以下の2つの可能性を検証した。1) エピジェネティック制御に対する影響、ならびに2) 胎児期のゴナドトロピン(性ホルモン)合成低下との関連性。1)では、バイサルファイトシーケンス法を用いたGnRH遺伝子上流のDNAメチル化解析、ならびにリアルタイムreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によるヒストン修飾酵素の発現変動解析を行った。2)では、低下するゴナドトロピンを胎児期に補給することで、出生後のGnRH mRNA発現低下が改善するか否かを検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物処理

全ての実験は、Wistar系ラットを購入して使用した。成熟雌雄ラットの交配により妊娠ラットを作製した。膈内に精子が確認された日を妊娠(GD)0日目としてのちの実験に供した。GD15の妊娠ラットに1 µg/kg TCDD

または対照群としてコーン油を経口投与したのち、GD18~21の胎児および生後(PND)0~70日目の出生児より組織を採取し種々の解析を行った。また、TCDD曝露母体より出生した9週齢雄児に対し、外科的手術により脳室内にカニューレを留置し、GnRH充填浸透圧ポンプ(100 ng GnRH/0.5 µL/時間)によりGnRHを持続的に供給した。手術後のラットの10および11週齢時に交尾行動試験を実施した。胎児へのゴナドトロピン補給実験は、GD17の母体を麻酔下開腹し、胎児背部より直接ゴナドトロピン(equine chorionic gonadotropin; eCG, 5 I.U./5 µL)を補給した。開腹部を縫合処理したのち自然に出生させ、PND30の雄児より視床下部を採取した。全ての動物実験は、本学の動物実験倫理審査委員会の審査を受け、その承認のもとに実施した。

### (2) 交尾行動試験

試験当日の朝、被験雄ラットを試験用ケージに移し、夜間に強制発情させた雌ラットを同居させて30分間の交尾行動を記録した。雌の強制発情は、あらかじめ卵巣摘出した雌ラットに、17β-estradiol (50 µg)およびprogesterone (1 mg)をそれぞれ試験開始の52時間前および4時間前に皮下投与することにより行った。雄特異的交尾行動の指標には、雌への乗駕ならびに生殖器挿入の回数および最初にそれらを行うまでの時間(潜在性)を用いた。

### (3) mRNAおよびタンパク質発現量

リアルタイムRT-PCR法によってmRNA発現量を分析した [4]。目的タンパク質のmRNA発現量は、β-actinで補正したのち解析した。GnRHタンパク質の発現状況は、市販のenzyme immunoassay kitを用いて測定した。

### (4) DNAメチル化解析

GnRH遺伝子上流のDNAメチル化状況は、バイサルファイトシーケンス法を用いて既報に従って解析した [3]。TCDD曝露母体より出生したPND14および30の雄児視床下部よりゲノムDNAを抽出し、バイサルファイト処理を行った。これを鋳型として、GnRH遺伝子上流の目的領域の増幅を行ったのち、JM109コンピテントセルを用いてクローニングを行った。対照群およびTCDD母体処理群を各3個体ずつ、1個体当たり10コロニーの配列解析を実施した。

## 4. 研究成果

はじめに、DNAマイクロアレイ解析により得られた結果を定量的に検証するととも

に、GnRH 低下の出現時期を明らかにするため、視床下部の GnRH mRNA 発現量を解析した。その結果、TCDD 曝露母体より出生した児では、PND4 より成長後に至るまで低い発現で推移することが明らかになった (図 1A)。これを支持して、GnRH タンパク質濃度は視床下部では低下傾向、大脳および小脳では有意な低下が観察された (図 1B)。続いて、脳内における GnRH 低下の意義を検証するため、低下する GnRH の脳室内への補給が障害を改善できるか否かを検討した。その結果、TCDD 依存的な交尾行動障害は、GnRH 補給によりほぼ正常水準に復帰した (図 2)。以上の結果から、TCDD 母体曝露による出生雄児の交尾行動障害は、成長過程で固定される低 GnRH 体質が主たる要因であることが強く示唆された。

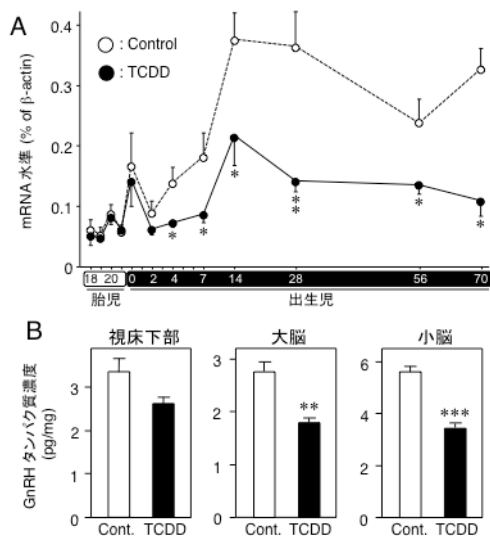


図 1. TCDD 母体曝露 (GD15) が雄児の GnRH 発現に与える影響  
A: mRNA (GD18~PND70)、B: タンパク質 (PND70)。各プロットおよびバーは平均値 ± S.E.M. (N=3~6)。\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ 。

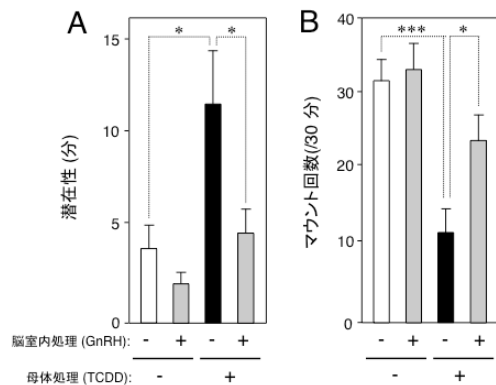


図 2. TCDD (GD15、母体処理) 依存的な成熟雄児の交尾行動障害に対する GnRH 脳室内補給の保護効果  
A: 最初のマウントを行うまでに要する時間 (潜在性)、B: 30 分間のマウント回数。各バーは平均値 ± S.E.M. (N=14)。\* $p<0.05$ ; \*\*\* $p<0.001$ 。

GnRH 低下が、ニューロンの成熟時期である生後早期より持続的に認められる事実から、TCDD が GnRH を低下させる機構として、1) エピジェネティック制御に対する影響、および 2) GnRH ニューロン成熟に対する影響の二つの可能性が想定された。第一に、エピジェネティック制御に対して影響する可能性を検討するため、DNA メチル化およびヒストン修飾酵素発現に対する影響を調査した。その結果、TCDD は出生雄児の GnRH 遺伝子上流の DNA メチル化ならびにヒストン修飾酵素の発現のいずれに対しても影響を及ぼさなかった。すなわち、TCDD はエピジェネティック制御への影響以外の機構により GnRH 低下を惹起させるものと推定された。ニューロンの成熟は、胎児/新生児期の性ホルモン刺激が必須であるが [6]、TCDD 母体曝露は出生前後のゴナドトロピン低下を介して性ホルモン合成を障害する [1-3]。従って、TCDD は性ホルモン合成低下を通して GnRH ニューロンの成熟を障害し、低 GnRH 発現体質を固定する可能性が考えられる。これを検証するため、TCDD 曝露胎児にゴナドトロピンを補給し GnRH 発現を解析したところ、胎児期のゴナドトロピン補給によって GnRH の発現は正常レベルにまでに復帰した (図 3)。

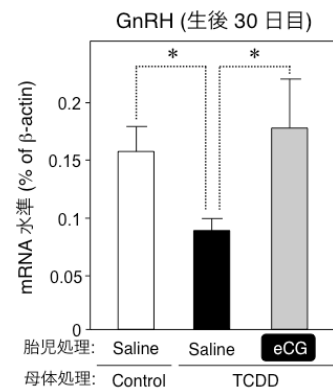


図 3. 胎児期のゴナドトロピン補給による出生雄児の GnRH 発現低下の回復  
eCG: 馬絨毛性ゴナドトロピン (=LH 様ホルモン)。各バーは平均値 ± S.E.M. (N=4-10)。\* $p<0.05$ 。

以上の成果から、TCDD 母体曝露により出生雄児において低 GnRH 発現体質が固定されることで、成長後に交尾行動障害等の性未成熟が惹起されること、ならびにこの障害固定機構には出生前後のゴナドトロピン低下を介する性ステロイド合成障害が主たる要因である可能性が新規に見出された (図 4)。本研究成果は、TCDD 母体曝露が出生児の性未成熟を固定する機構を示した初めての知見である。性ステロイド障害は多くの神経成熟と密接に関わることから、今後 GnRH を

はじめとする神経に対する影響を調査し、ダイオキシンによる後世代障害性の分子機構をより詳細に明らかにしていくことが重要である。

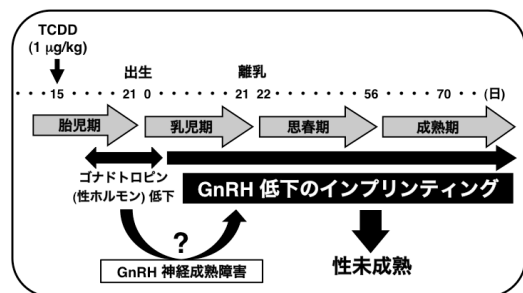


図 4. 本研究により推定されたダイオキシン母体曝露による出生児の障害固定機構

[引用文献]

1. Mutoh, J., et al., *Endocrinology*, **147**: 926 (2006).
2. Takeda, T., et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**: 1091 (2009).
3. Takeda, T., et al., *J. Biol. Chem.*, **287**: 18440 (2012)
4. Matsumoto, Y., et al., *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 363 (2010).
5. McCarthy, M. M. *Physiol. Rev.*, **88**: 91 (2008).

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0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 武田知起 他7名、ダイオキシンによる出生児の性成熟破綻の機構：ゴナドトロピン放出ホルモン低下のインプリンティング、日本薬学会第133年会、2013年3月30日、神奈川。
- ② 仮屋 蘭侑大 他8名、内分泌攪乱物質が次世代に及ぼす影響：胎児脳下垂体-生殖腺系に着目した比較検討、2013年2月1日、茨城。
- ③ 武田知起、ダイオキシン母体曝露による性未成熟のインプリンティングとその機構、第31回生体と金属・化学物質に関する研究会(チョークトーク2012)、2012年8月24日、広島(本学会にて第6回チョークトーク櫻井賞を受賞)。
- ④ 武田知起 他7名、ダイオキシン胎児期曝露による生殖障害のインプリンティング：gonadotropin-releasing hormone 合成攪乱を介する機構、日本薬学会第132年会、

2012年3月31日、北海道。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://eisei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 知起 (TAKEDA TOMOKI)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：60596831

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：