

## ダイオキシンによる出生児発育障害の新規機構：胎児期の成長ホルモン低下に着目した解析

服部, 友紀子

<https://hdl.handle.net/2324/1931846>

---

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名	服部 友紀子
論 文 名	ダイオキシンによる出生児発育障害の新規機構： 胎児期の成長ホルモン低下に着目した解析
論文調査委員	主 査 九州大学 准教授 石井祐次 副 査 九州大学 教授 田中嘉孝 副 査 九州大学 教授 藤田雅俊 副 査 九州大学 教授 植田正

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ダイオキシン類は、ゴミや産業廃棄物の焼却などの様々な生産活動において非意図的に産生され、現在も環境中に広く分布する環境汚染物質であり、生体に対して多岐にわたる毒性を引き起こす。中でも、妊娠期のダイオキシン曝露により出生児に出現する発育障害は、比較的低用量の曝露によって生じられ、影響が成長後にまで継続することから深刻な問題である。ダイオキシンによる出生児発育障害に関するこれまでの研究は、成熟後の動物や細胞を用いた限定的な障害の解析が多く、発生・発達期に焦点を当てた研究は十分ではない。当研究室では、このような問題点を踏まえ、最強毒性を有するダイオキシン同族体である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を用いて、これが胎児期のホルモン合成系を攪乱することで出生後に発育障害が起こるとの新規仮説の実証を目指し研究が実施されてきた。その結果、妊娠 15 日目 (gestational day 15; GD15) の Wistar ラットへの TCDD (1 µg/kg, 経口) 曝露により、出生前後の児の脳下垂体において成長ホルモン (growth hormone; GH) の mRNA 発現が低下し、これに付随して児の体重が減少することが見出された。GH は全身の発育に必須であることが、GH 欠失動物を用いた表現型解析により証明されている。従って、TCDD は発達期の GH 低下を起点として成長後に様々な発育障害を惹起する可能性が考えられる。そこで、本研究ではこの仮説の検証を目的とし、胎児期の GH 低下の毒性学的意義を検討するとともに、その機機構解析を行った。

第一章では、胎児期の GH 低下がどのような障害に直結するののかについて検討を行った。検討に先立ち、TCDD 母体曝露が児の GH タンパク質発現に及ぼす影響を解析した。その結果、TCDD により出生前後の児の血中 GH レベルが低下し、GH の下流で働く成長因子である insulin-like growth factor 1 (IGF-1) も同時期に減少することが明らかとなった。そこで、GH 低下の毒性学的意義を検討するため、胎児に直接 GH を注入し、様々な障害に対するその効果を検証した。その結果、TCDD 依存的な胎児 IGF-1 発現低下のみならず、生後早期に認められる児の低体重・低身長が GH 補給により正常レベルにまで回復した。さらに、成長後に生じる学習記憶障害に対しても一定の改善効果が認められた。以上の成果から、TCDD 母体曝露による出生前後の一過的な GH 発現低下とそれに基づく IGF-1 レベルの低下が、出生・成長後の発育障害の一端を担うことが実証された。

さらに、成長後の児の血液を用いてメタボローム解析を行い、胎児期の GH 発現低下に基づく障害の原因因子を網羅的に探索した。その結果、胎児期の TCDD 処理により 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) が増加し、胎児期の GH 補給により改善することが示唆された。このビタミンが過剰に存在すると、骨の発達を障害することが知られている。本研究においても TCDD 曝露児の成長後において、骨芽細胞マーカーである alkaline phosphatase (ALP) 活性の

低下および脛骨における骨細胞の減少が認められ、胎児期の GH 補給によって改善傾向を示した。従って、胎児期の GH レベルの低下が引き金となって成長後にまで 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> レベルの増加が継続し、骨形成抑制へと繋がる可能性が見出された。

第二章では、胎児期 GH 低下の機構解析を行った。本研究では、TCDD による胎児の GH 発現低下が、GH 産生細胞の分化、増殖および成熟が開始する GD18 より生じるとの事実に基づき、TCDD が胎児期の GH 産生細胞に及ぼす影響に着目した。フローサイトメトリー解析により、胎児脳下垂体における GH 産生細胞数を定量した結果、TCDD は雌雄胎児に共通して GH 陽性細胞数を減少させることが明らかとなった。そこで、GH 細胞の発達を刺激するコルチコステロンに着目し、TCDD による影響を検討した。その結果、母体および雄胎児では血中コルチコステロン濃度の有意な低下が確認された。そこで、ダイオキシン曝露母体にコルチコステロンを補給したところ、雄胎児では TCDD 依存的に低下する GH 産生細胞数が改善傾向を示した。従って、TCDD による雄胎児での GH 産生細胞数の減少の機構の一部には、母子のコルチコステロンレベルの低下が寄与することが示唆された。しかし、雄胎児での改善効果は完全でなく、雌胎児ではコルチコステロンレベルに対する影響が全く確認されなかったことから、TCDD による GH 低下の根幹には、雌雄胎児に共通する別の標的因子が存在すると推定された。

そこで、GH 産生細胞数の減少を引き起こすダイオキシンの標的因子を探索するため、雌雄胎児脳下垂体を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、雌雄に共通して変動が認められた遺伝子の中で、Death associated protein-like 1 (DAPL1) の発現のみが、雌雄胎児ともに GH 低下が出現する GD18 より TCDD 依存的に低下する事実が判明した。そこで、GH 低下に対する DAPL1 の寄与を明確にするため、DAPL1 siRNA を胎児脳下垂体細胞に導入し、GH を含む脳下垂体ホルモンの mRNA 発現量を定量した。その結果、DAPL1 発現抑制により、GH 発現が顕著に減少することが明らかとなった。さらに、TCDD は胎児脳下垂体において細胞周期関連タンパク質の mRNA 発現を減少させること、同様の影響が DAPL1 siRNA 処理によっても起こることも確認された。以上の成果から、TCDD は脳下垂体において DAPL1 発現抑制を標的として細胞周期関連タンパク質の発現を胎児期に低下させ、GH 産生細胞の増殖抑制ひいては GH 発現を低下させるとの新規毒性機構が見出された。

本研究では、ダイオキシンの妊娠期曝露が胎児期の GH 合成低下を引き金として成長後にまで低発育体質を定着させるという新たな仮説のもと研究を展開した。その結果、低体重・低身長や学習記憶能力低下ならびに骨形成異常などの様々な発育障害が、胎児期の一過的な GH レベルの低下に起因することを突き止めることができた。さらに、TCDD は胎児脳下垂体において GH 産生細胞数を減少させ、本ホルモンの合成を抑制すること、ならびにこれの新規標的因子として DAPL1 をも見出した。本研究では、TCDD による DAPL1 発現低下が GH 産生細胞数を低下させる詳細な機構を解明するには至らなかった。ダイオキシンによる発育障害に対する対処法の構築に向け、今後は、DAPL1 発現低下に着目した解析を進めていくことが重要である。しかし、これまで殆ど理解されていなかった胎児期における GH の生理学的意義とこの破綻がもたらす出生後の発育への影響、ならびに新たな責任因子を見出すことができた。また、本研究成果はこれまで十分に解析されていなかった胎児への影響の重要性を提唱した点で、今後の発達期毒性研究の新たな基盤となる可能性もある。当研究室ではより広範囲の化学物質を対象とする中で、すでにメチル水銀やビスフェノール A などの化学物質を妊娠母体が曝露することにより、胎児期に GH の発現が攪乱されることを見出している。従って、本研究成果を応用することで、多種多様な化学物質による発育障害の機構解明へと繋がるのが期待される。

これらのことから、申請者は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。