

2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxinによる出生児の性未成熟の機構解析：ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響

西田, 恭子
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

武田, 知起
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

山田, 英之
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

石井, 祐次
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

<https://doi.org/10.15017/4483203>

出版情報：福岡医学雑誌. 112 (2), pp.148-157, 2021-06-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による 出生児の性未成熟の機構解析： ゴナドトロピン放出ホルモン神経への影響

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

西田 恭子¹⁾, 武田 知起¹⁾, 山田 英之¹⁾, 石井 祐次¹⁾²⁾

Mechanism Whereby Maternal Exposure to Dioxin Causes Sexual Immaturity of the Offspring : Effects on Neurons Secreting Gonadotropin-Releasing Hormone

Kyoko NISHIDA¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾ and Yuji ISHII¹⁾²⁾

¹⁾Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

²⁾Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

Abstract

Our previous studies have revealed that maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) attenuates the hypothalamic biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in male offspring, thereby imprinting sexual immaturity. To clarify the mechanisms underlying such reductions in GnRH, we examined the effects of TCDD on the number and/or form of GnRH neurons. Maternal exposure to TCDD was found to have little effect on the number or location of GnRH neurons in male offspring at gestational day 20 (GD20), postnatal day 4 (PND4), PND7, PND14, or PND28. However, maternal exposure to TCDD was observed to attenuate the number of bipolar GnRH neurons in the male offspring at PND14 and PND28, although no similar effect was observed for unipolar neurons. Furthermore, we detected no obvious effect of TCDD on the axonal length of GnRH neurons. These findings indicate that TCDD reduces the number of bipolar GnRH neurons beginning at PND14 when it causes GnRH attenuation. TCDD may thus elicit the attenuation of GnRH neurons in a bipolar neuron-selective manner.

Key words : Dioxin, GnRH neuron, LHRH, next generation, hypothalamus

はじめに

妊娠期母体が、比較的低用量のダイオキシンに曝露することによって、出生児に成長遅延や性特異的行動障害などの様々な発育障害を惹起する¹⁾。カネミ油症の被害者追跡調査や出生コホート研究からも、ダイオキシンがヒトこどもの発達に及ぼ

す影響が懸念され²⁾³⁾、早期の治療・予防法の確立が待たれている。そのためにも、この毒性発現機構の解明が必要である。

一般に、ダイオキシン毒性には、受容体型転写因子である芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AHR) が重要な役割を演じることが明らかにされている^{4)~6)}。すなわち、AHR

Corresponding author : Yuji ISHII

Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Tel : +81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

はダイオキシンとの結合により核内に移行し、cytochrome P450 (CYP) 1A1 等の標的遺伝子の転写調節領域に存在する xenobiotic responsive element への結合を介して、これらの発現を変動させる。変動遺伝子は数百種類も存在し^{7)~9)}、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられている。妊娠期のダイオキシン曝露は、出生児に交尾行動障害などの性未成熟を惹起する¹⁾。これらは低用量で発現し、一生涯にわたって影響が定着するため問題である。筆者らはこれまでの一連の研究によって、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 1 μ g/kg, 経口) の妊娠ラットへの曝露が、出生前後の児の luteinizing hormone (LH) の合成を低下させ、これを起点として成長後に交尾行動が障害されること実証している¹⁰⁾¹¹⁾。これらの影響は、AHR を介して引き起こされること、また、AHR が性的二型性に必要不可欠なものであることも報告している¹²⁾。さらに、上記の障害は視床下部より分泌される神経ペプチドホルモンである gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の合成抑制が成長後にまで定着するためであることも見出した¹³⁾。しかし、GnRH 発現低下が固定化する原因は不明である。

GnRH ニューロンは、鼻板で発生し脳内を遊走することで、胎生後期には視床下部に到達する¹⁴⁾。また、出生後より軸索成長やシナプス増加などの形態学的な変化が始まるが、GnRH が生体で明確な役割を担うと考えられているのは思春期 (4~6 週齢) 以降である¹⁵⁾¹⁶⁾。TCDD 依存的な GnRH 発現低下は、出生後早期より出現することから、胎生後期から新生児期の GnRH ニューロンの発生、遊走および軸索成長などの初期成熟過程に及ぼす影響が想定される。そこで本研究では、組織免疫染色法を用いた細胞レベルでの解析を行うことで、TCDD が胎児期から思春離乳期にかけての雄児の GnRH ニューロンに与える影響を検討した。

実験方法

1. 動物実験

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した。雌雄の Wistar 系ラットを一晩交配し、翌朝陰内に精子

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、TCDD (1 μ g/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。胎生 20 日 (GD20) の雄児は母体から摘出したのち、頭部を切除してパラホルムアルデヒドに浸し、固定を行った。10~30% のスクロース溶液 (in 0.1 M PBS) で置換したのち、脳を OCT compound で包埋し、-80℃ にて凍結保存した。生後 4 日 (PND4), PND7, PND14 および PND28 の雄児はパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) にて灌流固定した。4℃ のパラホルムアルデヒド (4% in 0.1 M PBS) 中で 1~2 日浸したのち、同様にスクロース置換ならび包埋を行った。

2. 免疫染色

(1) 脳切片の作製

脳の凍結ブロックを背側から腹側に向かって冠状面を削り出したのち、連続して薄切した。脳切片は適切な大きさのプレート内に一枚ずつ入れ、各穴に 50 mM PBS を 1 mL 入れたのち、室温に出し不要な OCT compound を溶かした。

(2) GnRH 単染色

(1)によって得られた脳切片は、50 mM PBS で 15 分間×3 回洗浄したのち、10% normal goat serum (NGS) 中で 37℃ 30 分間静置した。次に、50 mM PBS で 5 分間×3 回洗浄し、一次抗体液中で 4℃ 60 時間静置した。その後、50 mM PBS で 10 分間×3 回洗浄し、二次抗体液中で 25℃ 2 時間静置した。再度、50 mM PBS で 10 分間×3 回洗浄したのち、脳切片をスライドガラスに貼りつけた。作製したスライドガラスを共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて観察した。画像取得のためのソフトウェアは ZEN 2011 Black edition (Carl Zeiss) を用いた。使用した抗体の希釈倍率は以下の通りである。

一次抗体: Anti-LHRH antibody (1 I.U./1 L) を 1% NGS にて 400 倍希釈。

二次抗体: Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 647 conjugate を 1% NGS にて 200 倍希釈。

(3) 多重染色

GnRH 単染色の二次抗体液の組成に、さらに anti-neuronal nuclei (NeuN) Alexa Fluor 488 (100 倍希釈) および 4',6-diamidino-2-phenylin-

dole (DAPI) solution (1,000 倍希釈) を加えたものを二次抗体液として用いた。二次抗体液以外は、(2)に記載した操作および条件と同様に行った。

実 験 結 果

検討に先立ち、幼若ラットの脳において GnRH ニューロンが検出できることを確認するため、GnRH 抗体に加えてニューロンマーカーである NeuN 抗体および細胞核マーカーである DAPI の多重染色を行った。PND7 雄児での検討の結果、GnRH と NeuN の陽性領域が完全にマージし、これが GnRH ニューロンであることが確認できた (Fig. 1A)。さらに、本手法では、細胞体から出る主な突起が2本の双極性ニューロンと (Fig. 1B)、1本のみの単極性ニューロン (Fig. 1C) というそれぞれ形態の異なる GnRH ニューロンが明確に分離可能であることも確認した。そこで、TCDD 母体曝露が胎児ならびに出生雄児の GnRH ニューロンの発達 (= 発生, 遊走, 形態および軸索長) に影響を及ぼすか否かを検討した。GnRH ニューロンが比較的高密度で分布する organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) を中心に 1.28 mm 四方の領域で検討を行った。GD 20 から PND 28 にかけて切片ごとの GnRH 陽性細胞数を計測した結果を Fig. 2 に示す。グラフの縦軸が測定領域に含まれる細胞数、横軸が OVLT からの距離について吻側を負、尾側を正として示す。GnRH ニューロンは吻側にある嗅球から視床下部がある尾側方向に遊走するため、遊走不良が起きた場合は分布が吻側にずれる。検討の結果、PND28 の OVLT + 200 μ m では総細胞数が減少する傾向が見られたが、いずれの日齢においても両群のグラフの形がよく一致していることが確認された (Fig. 2)。従って、少なくとも TCDD は発達児における GnRH ニューロンの発生や遊走には影響は小さいことが明らかになった。

一方、PND7 から PND28 にかけて単極性および双極性それぞれのニューロン数を計測した。その結果、PND14 では OVLT + 200 μ m 付近のニューロン局在領域で TCDD 依存的な双極性ニューロンの減少ないし減少傾向が認められた (Fig. 3)。単極性ニューロンには有意な影響は観察されなかった (Fig. 3)。さらに、これらの傾向はニューロン成熟が完了する PND28 でも継続し

た (Fig. 3)。なお、TCDD は GnRH ニューロンの軸索長には影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。これらの結果から、TCDD 母体曝露は雄児における GnRH ニューロンの遊走や軸索伸張には影響を及ぼさないが、出生後に双極性ニューロン数を減少させることが明らかになった。

考 察

本研究では、GD15 の母ラットへの 1 μ g/kg TCDD 単回投与が、発達期の GnRH 神経成熟に及ぼす影響を検討した。雄児の GnRH ニューロンの数や形態に及ぼす影響を解析した結果、PND14 ならびに PND28 では双極性 GnRH ニューロンが有意に減少することが明らかになった。胎児期から新生児期の性ステロイド刺激は、軸索成長やシナプス形成などの形態的な成熟化にも重要であるため¹⁷⁾¹⁸⁾、本研究の知見と成熟期に見られる形態異常は共に性ステロイド合成低下によって生起する可能性がある。今後、性ステロイド刺激との関連性を追求し、GnRH ニューロンの成熟過程への影響を明確にすることが重要である。

GnRH プロモーターに enhanced green fluorescent protein (EGFP) を連結した遺伝子を導入した GnRH-EGFP ラットでは、思春期前の EGFP 発現が低い時期は単極性ニューロンの比率が高いが、GnRH 発現が高まる思春期には EGFP 陽性の双極性ニューロンが高比率で検出される¹⁹⁾。従って、双極性ニューロンの方が恒常的に GnRH プロモーター活性が高いために、この減少が GnRH 発現低下に関与する可能性が考えられる。双極性 GnRH ニューロンの有意な減少が認められたのは、OVLT から尾側に 200 μ m のニューロン局在領域に限定された。OVLT には血液脳関門が存在しないため、OVLT 近辺の GnRH ニューロンは末梢からの刺激を受けやすく、他領域のニューロンよりもスパインの分枝構造が複雑であると言う²⁰⁾。また、GnRH ニューロンは、 γ -aminobutylic acid (GABA) およびセロトニンなどの神経伝達物質の制御を受けることが知られている²¹⁾²²⁾。ダイオキシンは GABA ニューロンを標的として性分化を障害する可能性²³⁾、ならびに母マウスへの TCDD 曝露によって児のセロトニン陽性細胞数が減少することが報告されている²⁴⁾。これらを総合すると、TCDD による発達

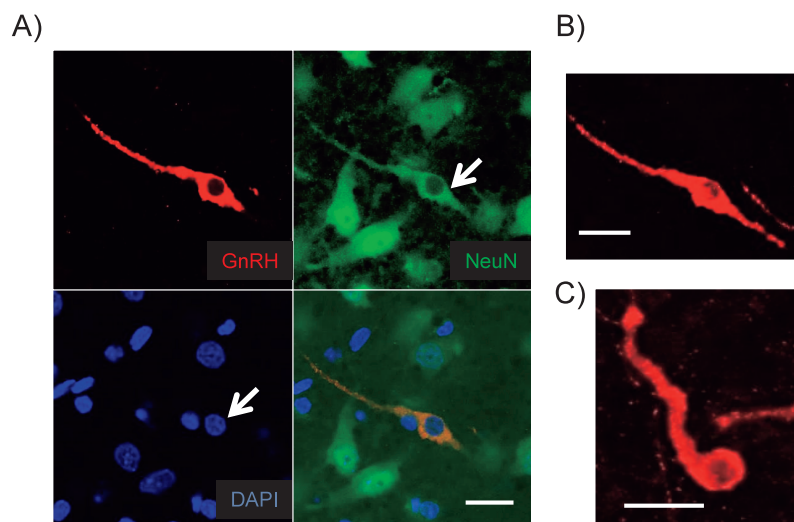


Fig. 1 Detection of GnRH neurons in the male offspring at PND 7 using an immunofluorescence
(A) Each confocal image ($\times 40$) is as follows : GnRH (red), NeuN (green) and DAPI (blue). Panels (B) and (C) represent the bipolar and unipolar neuron, respectively. Scale bar : 20 μm .

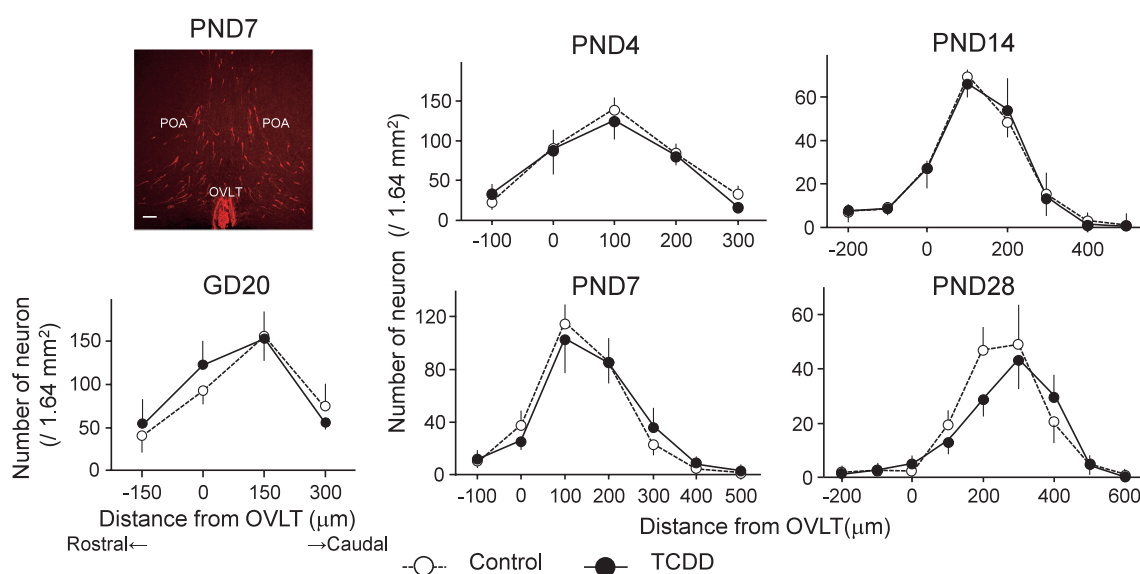


Fig. 2 Little effect of maternal exposure to TCDD on the number and location of GnRH neurons in the male offspring at GD20, PND4, PND7, PND14 and PND28. Pregnant dams were exposed to TCDD (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, orally) at GD15, and brain sections of the male offspring were immunostained for detection of GnRH neurons. Each plot represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3-6 male offspring which were removed (born) from different dams. Scale bar : 100 μm . Abbreviations used : OVLT, organum vasculosum lamina terminalis ; POA, preoptic area.

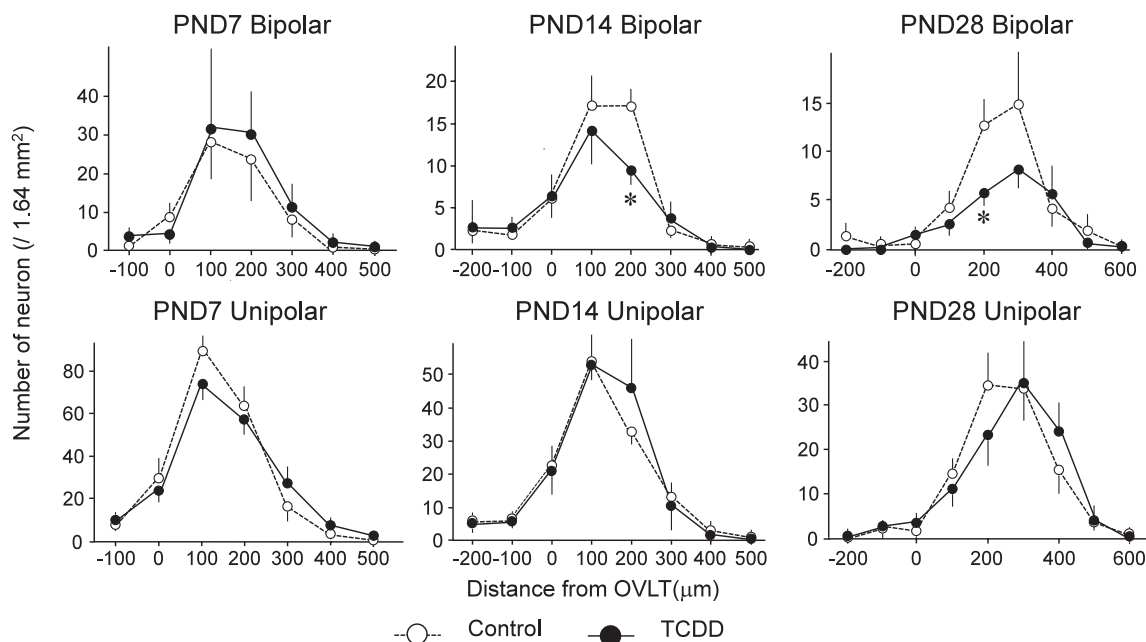


Fig. 3 Effect of maternal exposure to TCDD on the number of bipolar and unipolar GnRH neurons in the male offspring at PND7, PND14 and PND28.

The number of bipolar and unipolar neurons was counted per section. Each plot represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3-6 male offspring which were born from different dams. Significantly different from the control: * $p < 0.05$.

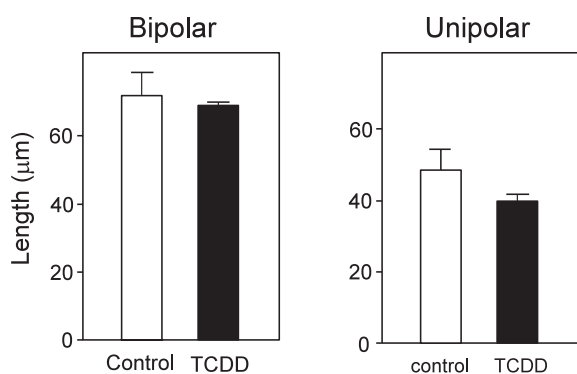


Fig. 4 Failure of the effect of TCDD on the axonal length of GnRH neurons.

The length of GnRH neuronal axon of the male offspring at PND14 were measured using 3D images of immunofluorescence. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3 male offspring which were born from different dams.

TCDD の影響を検証することが重要であろう。

結 論

胎生期から離乳期にかけての雄児脳を対象として、GnRH 抗体を用いて組織免疫染色を行った結果、TCDD 母体曝露によって生後 14 日目および 28 日目の雄児において双極性 GnRH ニューロン数が有意に減少することが明らかになった。一方、胎生期においては目立った影響は観察されず、GnRH ニューロンの分布や軸索長についても TCDD による変化は認められなかった。これらの結果から、TCDD 胎児期曝露によって出生後に起こる GnRH 発現低下には、双極性 GnRH ニューロンの選択的な減少が寄与する可能性が見出された。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）（課題番号：H24-食品-指定-014, H27-食品-指定-017）、（食品の安全確保推進研究事業）（課題番号：H30-食品-指定-005）、科学研究費補助金基盤研究 A（17H00788）および（財）日本科学協会平成 29 年

期の性ステロイドや GABA およびセロトニンなどの GnRH 神経成熟に関わる因子の発現を抑制し、双極性ニューロンへの成熟化を障害する可能性が想定される。GnRH ニューロンの発達障害の実態を明らかにするため、引き続き性ステロイドや神経伝達物質との相互作用とこれに対する

度笹川科学研究助成学術研究部門研究番号29-603
(西田恭子) によった。

参 考 文 献

- 1) Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GL : Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-species comparisons. Crit. Rev. Toxicol. 23 : 283-335, 1993.
- 2) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N and Furue M : Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. Environ. Int. 38 : 79-86, 2012.
- 3) Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H, Honda R, Kido T, Nishijo H and Saito S : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 18 : 246-251, 2008.
- 4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 140 : 173-179, 1996.
- 5) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M and Fujii-Kuriyama Y : Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. Genes Cells 2 : 645-654, 1997.
- 6) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T : Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97 : 779-782, 2000.
- 7) Hankinson O : The aryl hydrocarbon receptor complex. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35 : 307-340, 1995.
- 8) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim. Biophys. Acta 1619 : 263-268, 2003.
- 9) Whitlock JP Jr : Induction of cytochrome P4501A1. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39 : 103-125, 1999.
- 10) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y and Yamada H : Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. Endocrinology. 147 : 927-936, 2006.
- 11) 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. 329 : 1091-1099, 2009.
- 12) Hattori Y, Takeda T, Nakamura A, Nishida K, Shioji Y, Fukumitsu H, Yamada H and Ishii Y : The aryl hydrocarbon receptor is indispensable for dioxin-induced defects in sexually-dimorphic behaviors due to the reduction in fetal steroidogenesis of the pituitary-gonadal axis in rats. Biochem. Pharmacol. 154 : 213-221, 2018.
- 13) Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M and Yamada H : Maternal exposure to dioxin imprints sexual immaturity of the pups through fixing the status of the reduced expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. Mol. Pharmacol. 85 : 74-82, 2014.
- 14) Daikoku S and Koide I : Spatiotemporal appearance of developing LHRH neurons in the rat brain. J. Comp. Neurol. 393 : 34-47, 1998.
- 15) Clarkson J and Herbison AE : Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. Mol. Cell. Endocrinol. 254-255 : 32-38, 2006.
- 16) Clarkson J, Han SK, Liu X, Lee K and Herbison AE : Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. Mol. Cell. Endocrinol. 324 : 45-50, 2010.
- 17) Mong JA, Roberts RC, Kelly JJ and McCarthy MM : Gonadal steroids reduce the density of axospinous synapses in the developing rat arcuate nucleus : An electron microscopy analysis. J. Comp. Neurol. 432 : 259-267, 2001.
- 18) Wilson CA and Davies DC : The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. Reproduction. 133 : 331-359, 2007.
- 19) Xue H, Gai X, Sun W, Li C and Liu Q : Morphological changes of gonadotropin-releasing hormone neurons in the rat preoptic area across puberty. Neural. Regen. Res. 9 : 1303-1312, 2014.
- 20) Herde MK, Geist K, Campbell RE and Herbison AE : Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. Endocrinology.

- 152 : 3832-3841, 2011.
- 21) Watanabe M, Fukuda A and Nabekura J : The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front Neurosci.* 8 : 387, 2014.
- 22) Kim HS, Yumkham S, Choi JH, Son GH, Kim K, Ryu SH and Suh PG : Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC γ pathway in GT1-7 hypothalamic cells. *J. Endocrinol.* 190 : 581-591, 2006.
- 23) Petersen SL, Krishnan S and Hudgens ED : The aryl hydrocarbon receptor pathway and sexual differentiation of neuroendocrine functions. *Endocrinology.* 147 : 33-42, 2006.
- 24) Kuchiiwa S, Chenga SB, Nagatomo I, Akasaki Y, Uchida M, Tominaga M, Hashiguchi W and Kuchiiwa T : *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin decreases serotonin-immunoreactive neurons in raphe nuclei of male mouse offspring. *Neurosci Lett.* 317 : 73-76, 2002.

(Received for publication March 9, 2021)