九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ダイオキシン類母体曝露がマウス胎仔精巣の性ステロイドホルモン生合成系発現に及ぼす影響

武藤, 純平
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野 | 九州保健福祉大学薬学部

石田, 卓巳
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野

石井, 祐次
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野

山田, 英之
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野

https://doi.org/10.15017/6138

出版情報：福岡醫學雜誌. 98 (5), pp.203-207, 2007-05-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

ダイオキシン類母体曝露がマウス胎仔精巣の性ステロイドホルモン生合成系発現に及ぼす影響

[1] 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学専攻分野
[2] 現・九州保健福祉大学薬学部
武藤純平[1)2)]，石田卓巳[1)]，石井祐次[1)]，山田英之[1)]

The Effect on the Expression of Testicular Steroidogenic Enzymes in Fetal Mouse by Maternal Exposure to TCDD

Junpei MUTOH[1)2)], Takumi ISHIDA[1)], Yuji ISHII[1)] and Hideyuki YAMADA[1)]
[1)] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan*
[2)] *Present address : School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, Nobeoka, Miyazaki* 882-8508, *Japan*

Abstract　A number of studies have reported that reproductive and developmental disorders are produced by prenatal or postnatal exposure to dioxins such as 2,3,7,8-tertachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). These effects would be more serious compared with other toxicities with dioxins, because those injuries appear at much lesser doses than those needed for acute toxicity. Although the mechanisms regulating reproductive and developmental disorders are still unclear, we have recently reported that maternal exposure to TCDD causes the suppression of fetal testicular steroidogenic enzymes in rats. In the present study, we examined whether the same occurs in mice, using C57BL/6J and DBA/2N strains. The result showed that TCDD does not show any effect on the expression of steroidogenic acute regulatory protein mRNA in both strains. To the best of our knowledge, abnormal sexual behavior by fetal exposure to TCDD has never been reported in mice. Therefore, our result supports a possibility that abnormal sex behavior by exposure to TCDD at the fetal stages occurs in rats but not in mice. In addition, the data obtained suggest that the suppression of fetal testicular steroidogenic enzymes is, at least, one of the key mechanisms for impaired sex behavior induced by dioxin.

はじめに

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD）をはじめとするダイオキシン類による生体への影響は，消耗症[16)]や発ガンプロモーション作用[7)9)]など多岐に亘ることが知られている．ノックアウトマウスを用いた研究などから，細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体（AhR：aryl hydrocarbon receptor）への結合が，ダイオキシン類毒性発現における主な要因の一つであると考えられている[4)5)10)]．しかし，AhR により発現調節を受けるタンパク質の数は百数十種類にも及んでおり，かつ，それらと毒性との関連性については不明な点も多い．妊娠期にダイオキシン類への曝露を受けた場合，仔の生殖器官の発育遅延や性行動異常，さらに精子数減少等の生殖機能障害などが報告されている[3)15)]．これらは，その後の世代にも影響を及ぼし得ることから，問題が大きいと思われる．しかも，ダイオキシン類による生殖や後世代への影響は，他の毒性とは異なり，母体に影響が現れない低用量の曝露で惹起される[15)]．このような障害を回避して次世代の健全性を確保するため，早期の毒性発現機構の解明，並びにその予防法の開発が期待される．性行動異常などの後世代の障害は，ダイオキシン類曝露によってだけではなく，性ステロイドホルモン関連タンパク質合成酵素や受容体の欠損においても観察される．例えば，エストロゲン合成酵素である aromatase［cytochrome　P450（CYP）19］や androgen receptor，さらに estrogen receptor の

ノックアウトマウスにおいて，同様の障害が観察されている[6)14)18)]．Aromatase ノックアウトマウスにおいては，新生仔期からの継続的なエストロゲンの投与が，成長後の性行動を正常状態に回復させるとの報告もなされている[20)]．この回復は，成長後にエストロゲンを投与しても観察されない．このことから，成長後の性行動能獲得には，周産期および新生仔期の脳に性ステロイドホルモンが供給される必要があると考えられている．当研究室では，ダイオキシン類曝露により惹起される後世代の障害は，胎仔における性ステロイドホルモン生合成酵素の機能障害に起因していると考え，ラット母獣への TCDD 曝露が，胎仔精巣の性ステロイドホルモン生合成系へ及ぼす影響について検討した．その結果，トランスポーターおよび生合成酵素の多くに，発現量や機能の低下が起こることを既に明らかにしている[13)19)]．また，この低下が，脳下垂体において合成される黄体形成ホルモン（LH：luteinizing hormone）の血中濃度低下に起因する可能性を示す結果も得ている[13)19)]．本研究では，胎仔精巣のステロイドホルモン生合成抑制と後世代における障害との関連性について更に明らかにするため，ダイオキシン類母体曝露による仔の性行動異常が知られていないマウスを用い，胎仔期のステロイドホルモン生合成低下が起こるか否かを検証した．すなわち，ダイオキシン類に対して異なる親和性の AhR をもつ二系統のマウス（C57BL/6J マウス；高親和性 AhR，並びに DBA/2N 系マウス；低親和性 AhR）を用い，ステロイドホルモン生合成の律速過程に必須な steroidogenic acute regulatory protein（StAR）の発現に及ぼすダイオキシン類の影響を検討した．

実　験　方　法

1．実験材料

TCDD は，Acc Standard 社（New Haven, CT, USA）より購入した．Corn oil は，味の素（株）社製の市販品を使用した．その他の試薬は，実験に適した純度のものを使用した．

2．薬物処理

本検討における動物実験は，「九州大学大学院薬学研究院，大学院薬学府及び薬学部における実験動物に関する指針」に従い，実験計画の承認を受理されたのちに実施した．

TCDD 溶液の調製

あらかじめ調製し，−20°Cにて保存した TCDD 溶液（40 μg/mL アセトン溶液）を，corn oil に必要量加え混和した．N_2 ガスでアセトンを留去し，最終的に 1 μg TCDD/2 mL corn oil となるように調製し，実験に供した．

C57BL/6J および DBA/2N マウスへの薬物処理

C57BL/6J 系マウスおよび DBA/2N 系マウスは，日本チャールズリバー社より購入した．両系統とも妊娠 12 日目の母獣を購入し，妊娠 14 日目に TCDD 20 μg/kg を経口投与した．TCDD の投与量は，胎仔において口蓋裂，並びに水腎症が惹起される投与量を基準として決定した[10)]．投与後，妊娠 18 日目に母体を開腹し，胎仔より臓器を摘出した．コントロールとして，corn oil を投与し，同様の方法にて胎仔の臓器を摘出した．摘出した臓器は，液体窒素で凍結し，使用するまで−80°Cにて保存した．

3．半定量的 reverse transcriptional-polymerase chain reaction（RT-PCR）法

逆転写反応

凍結臓器からの total RNA の抽出は，RNeasy Mini Kit（QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany）を用いて行った．逆転写反応は，total RNA を DNase I（Amplification Grade；Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA）処理したのち，Super Script™ II RNase H⁻Reverse Transcriptase を用いて行った．

PCR 反応

調製した cDNA を template として，特異的 primer を用い（Table 1），PCR 反応を行った．すなわち，1 μL cDNA 溶液，5 μL 10 x Ex Taq™ buffer，4 μL 2.5 mM dNTP mixture，2 μL 10 μM primer 溶液および 1.25 units TaKaRa Ex Taq™（TaKaRa Bio Inc., Ohtsu, Japan）を含む 50 μL 溶液を反応溶液とし，サーマルサイクラーにて PCR 反応を行った．また，内標準として β-actin についても同様に PCR を行った．

Table 1　Primer sequences

Target		Primer sequences (5' → 3')	Product size (bp)
Cyp1a1	Sense	CTC ATT GAG CAT TGT CAG GAC AG	736
	Antisense	TGG TCT GGT GAG CAT CCT GGA CA	
StAR	Sense	GAC CTT GAA AGG CTC AGG AAG AAC	981
	Antisense	TAG CTG AAG ATG GAC AGA CTT GC	
β-actin	Sense	CAC CAT GTA CCC AGG CAT TGC	194
	Antisense	AGG GGC CGG ACT CAT CGT ACT	

Table 2　PCR program

Target	PCR program
Cyp1a1	95 °C, 3 min－(95 °C, 30 sec－64 °C, 60 sec－72 °C, 60 sec) x 29 cycles－72 °C, 5 min
StAR	94 °C, 3 min－(94 °C, 30 sec－60 °C, 60 sec－70 °C, 60 sec) x 30 cycles－70 °C, 5 min
β-actin	94 °C, 2 min－(94 °C, 30 sec－56 °C, 40 sec－72 °C, 30 sec) x 23 cycles－72 °C, 3 min

PCR は cDNA template 量，並びにサイクル数依存的に増幅する条件を予め決定し（Table 2），これに従って実行した．さらに，PCR による増幅産物にゲノム DNA 由来物が混在していないことを確認するため，逆転写を行わないサンプルをネガティブコントロールとして PCR による増幅が起こらないことを確認した．

アガロースゲル電気泳動

分析対象の PCR 産物のサイズに対応した濃度のアガロースゲルを作製し，上記方法にて得られた PCR 増幅産物を 1 x TBE buffer 中で泳動した．泳動後，ゲルは ethidium bromide 染色し，トランスイルミネーター［UVP, INC. (San Gabliel, USA)］上で UV（302 nm）を照射してバンドを検出し，ポラロイドカメラで撮影した．撮影した写真を GT-7000U flat scanner（SEIKO EPSON Co., Nagano, Japan）を用いて画像ファイルとしてコンピューターに取り込んだのち，各バンド強度を NIH image software（public domain, U.S.A.）により定量した．さらに，各バンド強度は，同様の方法で定量した β-actin のバンド強度により補正した．

統計処理

有意差検定は，Fischer's Protect Least Significant Difference（PLSD）test 法を用いて行った．

結　　果

TCDD などのダイオキシン類による機能性タンパク質の発現変動の中でも，肝臓における Cyp1a1 の誘導は最も sensitive な遺伝子変動の一つとして知られている[21]．そこで，TCDD 母体曝露時の胎仔性ステロイドホルモン生合成酵素への影響を検討する前段階として，妊娠 C57BL/6J マウスおよび DBA/2N マウスの雄胎仔肝臓における Cyp1a1　mRNA の発現量を半定量的RT-PCR 法で定量した．その結果，既報と同様に，両系統の胎仔において，肝 Cyp1a1　mRNA 量が TCDD 処理により有意に増加していた（データ未掲載）．このことから，マウス母体に投与した TCDD は胎仔の遺伝子発現に影響することが確認された．次に，TCDD 母体曝露時における胎仔性ステロイドホルモン生合成系への影響を検討するため，精巣における StAR mRNA の発現量を半定量的 RT-PCR 法にて定量した．

両系統マウスの胎仔精巣 StAR は，同一の PCR

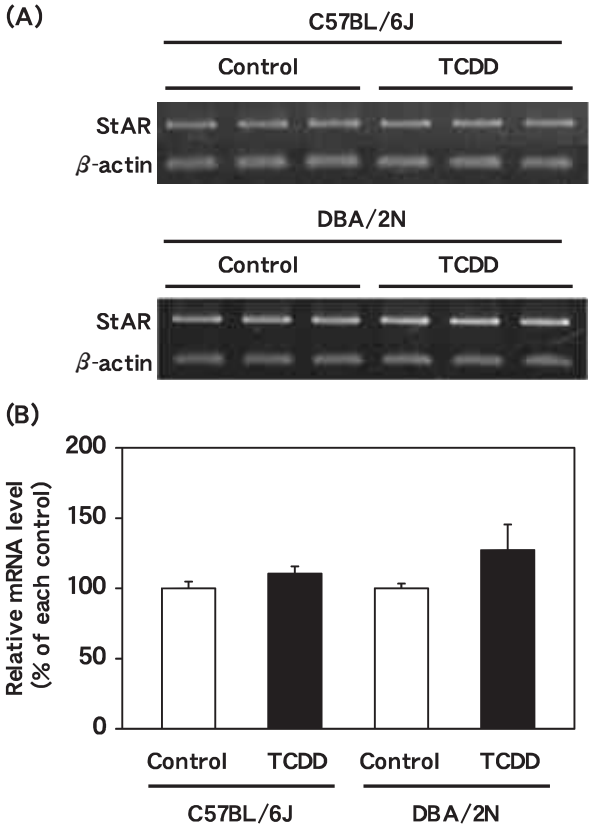

Fig. 1　Change in the expression of StAR mRNA in mouse fetal testis following exposure of the dams to TCDD. (A) Comparison of the mRNA profiles between control and TCDD exposure. (B) Relative level of the mRNA in the testes of mouse fetuses normalized to β-actin. The values represented are the mean ± S.D. of 3 mice.

条件下でバンドの観察が可能であったが，その強度はむしろダイオキシン類に低応答性のDBA/2N系統の方が強い傾向が観察された（Fig. 1A）．さらに，両系統のマウスにおいてTCDD曝露によるStAR mRNAの発現低下は認められなかった（Fig. 1A, B）．これらのことから，胎仔精巣StARの発現は，少なくともマウスではTCDD曝露で変動せず，またその基礎発現もAhRによって正の制御を受けないことが示唆された．

考　　察

ダイオキシン類曝露被害者を両親，ないし片親とする児の性比については，イタリアのセベソで起こった化学プラント事故に伴うTCDD曝露事件に関連して，曝露男性が父親である場合，男児出生率が低下することが報告されている[11)12)]．しかし，曝露女性を母親とする子の男女比については，異常は認められていない．一方，polychlorinated biphenylやpolychlorinated dibenzofuran曝露を主体とするカネミ油症事件，並びに台湾油症事件の場合では，被害者を親とする子の出生性比について異常は報告されていない[17)22)]．また，実験動物においては，例えばラットでは，母体中でダイオキシン類に曝露された雄を親とする仔の雌雄比は，コントロールに比べ低下することが報告されている[8)]．このように，ダイオキシン類曝露に伴う次世代の性比については，動物種，曝露した親の性別，さらに曝露されたダイオキシン類の種類によって大きく異なると考えられる．本検討でも，マウス母獣のTCDD曝露に対する胎仔の性比を検討したが，コントロール群との間に差は認められなかった（成績未掲載）．例数も少ないため（一群の胎仔数＝12〜24；母体数＝3），詳細な再検討を要するが，マウスでは胎仔の性比に異常を生じない可能性が高いと考えられた．

次に，胎仔精巣における性ステロイドホルモン生合成酵素の発現変動を観察した．その結果，ダイオキシン類に対して高感受性のC57BL/6Jマウスにおいてさえ，TCDDによるStAR mRNAの発現低下は見られなかった（Fig. 1）．一般的に，多くの哺乳動物において，成長後の正常な性行動の発現には，周産期において脳への性ステロイドホルモンの曝露が重要であると考えられている．しかし，この寄与の程度は，動物種によって異なることも知られている[2)]．例えば，C57BL系雄性マウスの場合，発達期におけるエストロゲンの欠損により成長後の性行動異常が惹起されるが，成体への外因性エストロゲンの投与で，完全ではないものの回復することが明らかとなっている[1)]．このように，マウスでは，成長後の正常な性行動の発現に対して周産期におけるエストロゲンの寄与はあまり大きくなく，このため同時期における性ステロイドホルモン生合成酵素の誘導を必要としていない可能性が考えられる．事実，これまでに，マウスにおいてTCDD曝露による性行動異常は報告されていない．このことも，我々の結果を支持するものと考えられる．また，本検討で採用した妊娠14日目は，ラット胎仔においては器官形成期にあたるが，マウス胎仔においては器官形成期後にあたる．このような発達における時期の違いが種差に反映された可能性も否定できない．TCDD曝露に伴う胎仔精巣の性ステロイドホルモン生合成酵素の発現変動におけるラットとマウスの違いを明らかにするためには，今後も更なる検討が必要であると考えられる．

参 考 文 献

1) Bakker J, Honda S, Harada N and Balthazart J: Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. Horm. Behav. 46: 1-10, 2004.
2) Couture LA, Harris MW and Birnbaum SL: Developmental toxicity of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in the Fischer 344 rat. Fundum. Appl. Toxicol. 12: 358-366, 1989.
3) Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ and Chahoud I: Effects on development landmarks and reproductive capability of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in offspring of rats exposed during pregnancy. Hum. Exp. Toxicol. 17: 365-372, 1998.
4) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ: Arylhydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 140: 173-179, 1996.
5) Fujii-Kuriyama Y, Ema M, Mimura J and Sogawa K: Ah receptor: a novel ligand-activated transcription factor. Exp. Clin. Immunogenet. 11: 65-74, 1994.

6) Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y and Maeda S : Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exon 1 and 2 of the cyp19 gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252 : 445-449, 2003.
7) Huff J, Lucier G and Tritscher A : Carcinogenicity of TCDD : experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 34 : 343-372, 1994.
8) Ikeda M, Tamura M, Yamashita J, Suzuki C and Tomita T : Repeated in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progency. Toxicol. Appl. Pharmacol. 206 : 351-355, 2005.
9) Luebeck EG, Buchmann A, Stinchcombe S, Moolgavkar SH and Schwarz M : Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on initiation and promotion of GST-p-positive foci in rat liver : A quantitative analysis of experiments data using a stochastic model. Toxicol. Appl. Pharmacol. 167 : 63-73, 2000.
10) Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nanao 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.
11) Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr and Needham LL : Change in sex ratio with exposure to dioxin. Lancet 348 : 409, 1996.
12) Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG Jr, Lieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P and Carreri V : Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offsprings. Lancet 355 : 1858-1863, 2000.
13) 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, 2005.
14) Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, Korach KS and Pfaff DW : Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors α and β ($\alpha\beta$ERKO). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 : 14737-14741, 2000.
15) Peterson RE, Theobald HM and Kimmel GI : Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-spicies comparisons. Crit. Rev. Toxicol. 23 : 283-335, 1993.
16) Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22 : 517-554, 1982.
17) Rogan WJ, Gladen BC, Guo YL and Hsu CC : Sex ratio after exposure to dioxin-like chemicals in Taiwan. Lancet 353 : 206-207, 1999.
18) Sato T, Matsumoto T, Kawano H, Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, Fukuda T, Aihara K, Krust A, Yamada T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Nakamura T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Metzger D, Chambon P and Kato S : Brain masculinization requires androgen receptor function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 : 1673-1678, 2004.
19) Taketoh J, Mutoh J, Takeda T, Ogishima T, Takeda S, Ishii Y, Ishida T and Yamada H : Suppression of fetal testicular cytochrome P450 17 by maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : A mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. Life Sci. 80 : 1259-1267 (2007).
20) Toda K, Okada T, Takeda K, Akira S, Saibara T, Shiraishi M, Onishi S and Shizuta Y : Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17β-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. J. Endocr. 168 : 455-463, 2001.
21) Vander Heuvel JP, Clark GC, Kohn MC, Trischer AM, Greenlee WF, Lucier GW and Bell DA : Dioxin-responsive genes : examination of dose-response relationships using quantitative reverse transcriptional-polymerase chain reaction. Cancer Res. 54 : 62-68, 1994.
22) 吉村健清，金子　聰，早渕仁美：油症における出生性比．小栗一太，赤峰昭文，古江増隆編，油症研究―30 年の歩み―，pp. 312-315，九州大学出版会，福岡，2000．

（受付　2007-4-2）