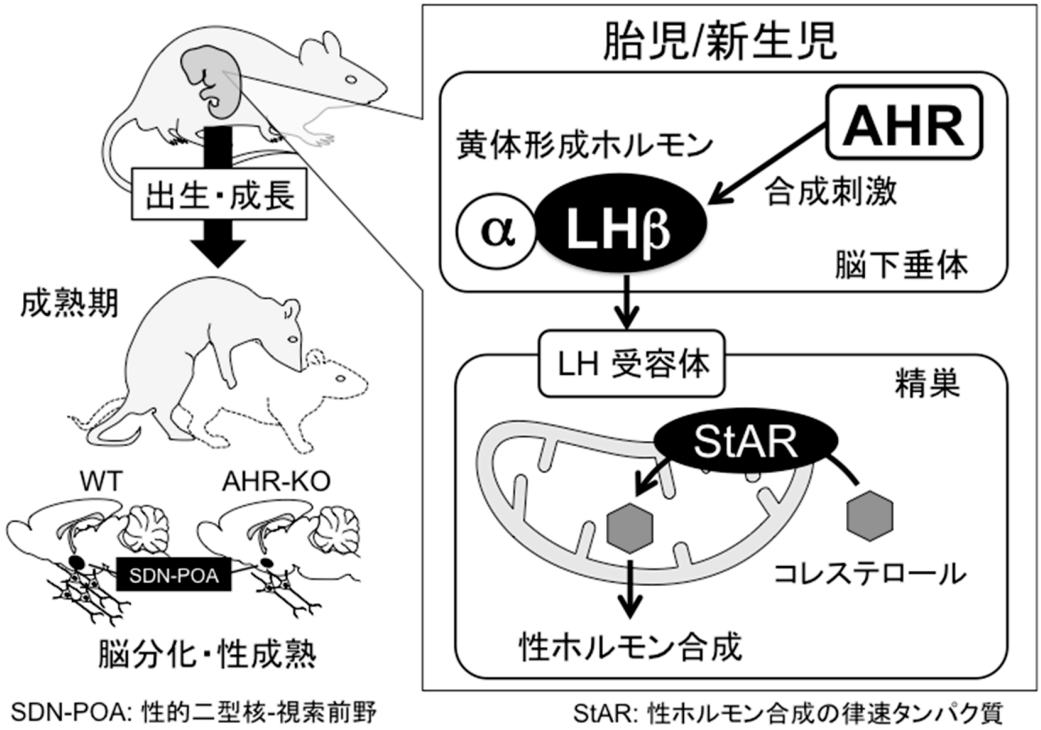
| 144　脳分化／性成熟に対する芳香族炭化水素受容体の役割 | 武田　知起 |
|---|---|

**【目的】**芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor：AHR）は、リガンド活性化型の転写因子である。欠損マウスを用いた表現型解析により、AHR は肝血管系、生殖腺および免疫機能の機能維持などの多彩な生理機能を有することが示唆されている。一方、AHR は発生期から恒常的に発現しており、未分化細胞で発現が高く分化に伴って低下する。すなわち、発生期の細胞分化・成熟過程に重要な役割を担うと推定されるが、胎児期における役割には不明な点が多い。本研究では、AHR が胎児脳下垂体における黄体形成ホルモン（luteinizing hormone：LH、性ホルモン合成の制御因子）の正常発現に重要であり、これによって生殖腺の性ホルモン合成を制御し、脳分化・性成熟に重要な役割を演じるとの新たな可能性に着目した検討を実施した。

**【方法】***AHR* 欠損ラット雄胎児および新生児より脳下垂体、精巣および血清を採取し、LH および性ホルモン合成系タンパク質の発現を解析すると共に、血中のホルモンレベルを定量した。さらに、成長後の *AHR* 欠損雄ラットを用いて交尾行動試験を行うと共に精巣および精巣上体の組織学的解析および精子数測定を行い、野生型との違いを比較した。

**【結果】***AHR* 欠損ラット胎児においては、野生型胎児に比較して LH 合成量が低下しており、これと符合して精巣における性ホルモンレベルが低値を示した。*AHR* 欠損による LH／性ホルモンレベルの低下は、新生児期までは同様に見られたが成長後には消失し、出生前後に一過的であることが確認された。出生前後の一過的な性ホルモン刺激は、脳の性分化に必須である。この事実と合致して、*AHR* 欠損雄ラットでは脳の性分化の指標である視床下部の神経集合核が縮小すると共に交尾行動能力が低下することが明らかになった。加えて、精巣および精巣上体の組織学的解析により、精巣細胞の萎縮と精子数および精子運動能の低下傾向も観察された。以上の成果から、AHR は出生前後の脳下垂体 LH の発現制御に重要であり、これによって精巣の性ホルモン合成系、ひいては脳の性分化・性成熟に寄与する可能性が見出された。

脳分化・性成熟への AHR の寄与：胎児期の脳下垂体-生殖腺軸における性ホルモン合成制御




SDN-POA: 性的二型核-視索前野　　StAR: 性ホルモン合成の律速タンパク質

# 144. 脳分化／性成熟に対する芳香族炭化水素受容体の役割

武田　知起

*九州大学 大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

Key words：芳香族炭化水素受容体，脳の性分化，胎児，黄体形成ホルモン，性ホルモン

## 緒　言

芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor：AHR）は、リガンドとの結合によって遺伝子発現を調節する受容体型転写因子である［1］。AHR は線虫から哺乳動物に至るまで広く保存されており、個体の発生初期より様々な組織で恒常的に発現している。*Ahr* 欠損マウスを用いた表現型解析により、AHR は肝血管系、生殖腺および免疫機能の機能維持などの多彩な生理機能を有することが示されている［2, 3］。一方、AHR は発生期から恒常的に発現しており、未分化細胞で発現が高く分化に伴って低下する［4］。このことから、AHR は発生期の細胞分化・成熟過程に重要な役割を担うと推定される。この推定のもと、筆者は *AHR*-knockout（*AHR*-KO）ラット［5］を用いて胎生期のホルモンレベルへの影響を解析した。その結果、*AHR*-KO ラット胎児では脳下垂体ホルモンの一種である黄体形成ホルモン（luteinizing hormone：*LH*）の β-サブユニットの mRNA ならびに生殖腺における性ホルモン合成系タンパク質である steroidogenic acute-regulatory protein（*StAR*）の mRNA 発現が低値を示す事実を発見した。

発達期における LH／性ホルモン刺激は、脳分化や性成熟に必須である［6］。ラットでは、胎児後期になると精巣から大量の testosterone が合成され、脳へと移行したのちに一部 17β-estradiol に変換されて作用することで脳の神経回路が雄性化する。例えば、視床下部に存在する神経集合体の一つである sexual dimorphic nucleus-preoptic area（SDN-POA）は、代表的な脳の性分化の標的であり、発達期特異的な性ホルモン刺激によって雄の方が数倍大きくなり、交尾行動の発現に重要な役割を持つ［6］。すなわち、胎児期においてホルモン刺激が不足した場合、脳の性分化が障害され、結果として成長後に交尾行動不全が生じる［7］。これらの事実と *AHR*-KO ラット胎児では性ホルモン合成能力が落ちるとの上記の先行結果を合わせると、AHR は胎児脳下垂体における LH の正常発現に重要であり、これによって脳分化や性成熟に重要な役割を演じるとの一連の可能性が浮上する。そこで、本研究ではこの可能性に着目し、*AHR*-KO ラットを用いて発達期のホルモン産生系における AHR の役割を精査すると共に、成長後の脳分化・性成熟における寄与を検討した。

## 方　法

### 1. 実験動物

本研究における動物実験は、九州大学における動物実験に関する指針に従い、九州大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。*AHR*-KO ラットは、XTN™ TAL nuclease ベクターを用いて作製した［5］。胎児は cDNA、出生児は尾あるいは耳小片より抽出したゲノム DNA を鋳型とし、*AHR* 遺伝子をコードするプライマーを用いた PCR によって遺伝子型を判別した［5］。雌雄の *AHR*-ヘテロ欠損（Het）ラットを交配して妊娠ラットを作製した。妊娠（gestational day：GD）20 日目の胎児、および生後（postnatal day：PND）2 日目ならびに 10 日目の出生児より組織および血液を採取した。一部の実験では、出生・成熟後の影響を調べるため、PND 21 に離乳させたのちに以下の解析に供した。

### 2. mRNA 発現解析

RNeasy kit（QIAGEN 社）を用いて組織より total RNA を抽出した。RNA 濃度を測定したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser（タカラバイオ社）を用いて cDNA を合成した。これを鋳型とし、Fast SYBR Green

*現在の所属：独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部

Master Mix（Thermo-Fisher Scientific 社）を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した［8］。得られたデータは、ターゲット mRNA の threshold cycle（Ct）値を *β-actin* mRNA の Ct 値で補正し、対照群に対する割合とした。

**3. タンパク質発現量**

血清 LH 濃度は、Rodent LH ELISA test kit（Endocrine Technologies 社）を用いた。測定にあたっては、添付の希釈用溶液にて 2 倍希釈した血清を用いた。血清 testosterone 濃度は、Testosterone ELISA kit（Cayman Chemical 社）を用い、血清を 10 倍希釈して測定した。StAR タンパク質の発現量は、胎児精巣より調製したミトコンドリア画分を用いてイムノブロット法にて解析した。電気泳動に用いたミトコンドリア画分のタンパク質量は、StAR は 20 μg、標準タンパク質である β-actin は 4 μg とした。一次抗体は、Rabbit anti-rat StAR antibody（Abcam 社）および Anti-β- Actin Mouse Mono antibody（BioVision 社）を用いた。StAR タンパク質の発現は、β-actin で補正し対照群に対する割合として算出した。

**4. SDN-POA 容積**

PND28 の雄ラットを 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し脳を摘出した。クリオスタット（CM3050S ; Leica Microsystems 社）を用いて凍結切片（切片厚：50μm）を作製した。Anti-Calbindin antibody（Abcam 社）、ビオチン化二次抗体（Vector Laboratories 社）および蛍光標識ストレプトアビジン溶液（Thermo-Fisher Scientific 社）にて反応を行ったのち、切片をスライドガラスに貼付けた。共焦点レーザー顕微鏡（LSM700 ; Carl Zeiss 社）を用いて蛍光画像を取得したのち、ZEN2011 Black edition（Carl Zeiss）を用いて蛍光領域を定量化した。

**5. 交尾行動試験**

出生雄児の 10 週齢および 11 週齢時に交尾行動試験を行った［8］。パートナー雌ラットは、試験に用いる 2 週間以上前に卵巣を摘出したのち、試験 2 日前に 17β-estradiol（50 ng）、試験 6 時間前に progesterone（1 mg）をそれぞれ皮下投与することで強制発情させた。雄特異的交尾行動は、マウントおよび生殖器挿入を指標とし、それぞれの 30 分間における実施回数および最初に行動を示すまでの時間（latency）を計測した。

**6. 精巣および精巣上体の組織学的解析、精子数および精子活力**

11 週齢の雄より精巣上体を採取し、2 mL の 10%スクロース溶液に浸潤させた。37℃で 30 分インキュベートしたのち、裁断して精子を取り出した。10%スクロース溶液にて 50 倍希釈したのち、血球計測板で精子数を計測した。全精子数に対する動いている精子数の割合を算出した。組織学的解析は、8 週齢の雄ラットを 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定したのちの精巣および精巣上体を用いた。5 mm で薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

## 結果および考察

**1．発達期の脳下垂体-生殖腺軸の性ホルモン合成系に対する AHR の役割**

AHR が発達期における脳下垂体-生殖腺軸の性ホルモン合成系に及ぼす影響を精査した。*AHR* 欠損によって mRNA レベルが低下するとの先行実験の結果と合致して、*AHR*-KO 雄胎児（GD20）では血清中の LH 濃度は低下し（図 1a）、精巣における性ホルモン合成系タンパク質である StAR のタンパク質レベルの有意な低下が認められた（図 1b）。これらを支持して、血清中のテストステロン濃度も低下した（図 1c）。そこで引き続き、出生後の雄児脳下垂体における *LHβ* mRNA 発現状況を解析した。その結果、*AHR* 欠損による *LHβ* mRNA の発現低下は、PND2 においては継続して認められたものの、PND10 および 13 週齢では消失した（図 1d）。精巣の *StAR* mRNA 発現についても、PND10 では *AHR* 欠損による影響は全く観察されず（図 1e）、LH レベルの低下の時期とほぼ一致した結果が得られた。また、雌胎児においても *AHR*-KO によって脳下垂体 *LHβ* の発現低下が認められ（データ未掲載）、AHR が胎児期の脳下垂体 LH 発現に与える影響は、雌雄に共通することが示唆された。これらの結果から、AHR は出生前後の限定された時期において脳下垂体 LH の発現ならびに生殖腺の StAR 発現を正に制御することで性ホルモン合成を促進することが明らかになった。これらの影響は、脳下垂体が 5 種のホルモン産生細胞に分化する胎生後期［9］に合致することから、AHR は胎児脳下垂体の分化や発達に影響を及ぼす可能性が示唆される。今後、胎生期の脳下垂体成熟に対する AHR の役割を詳細に解析することが重要であろう。

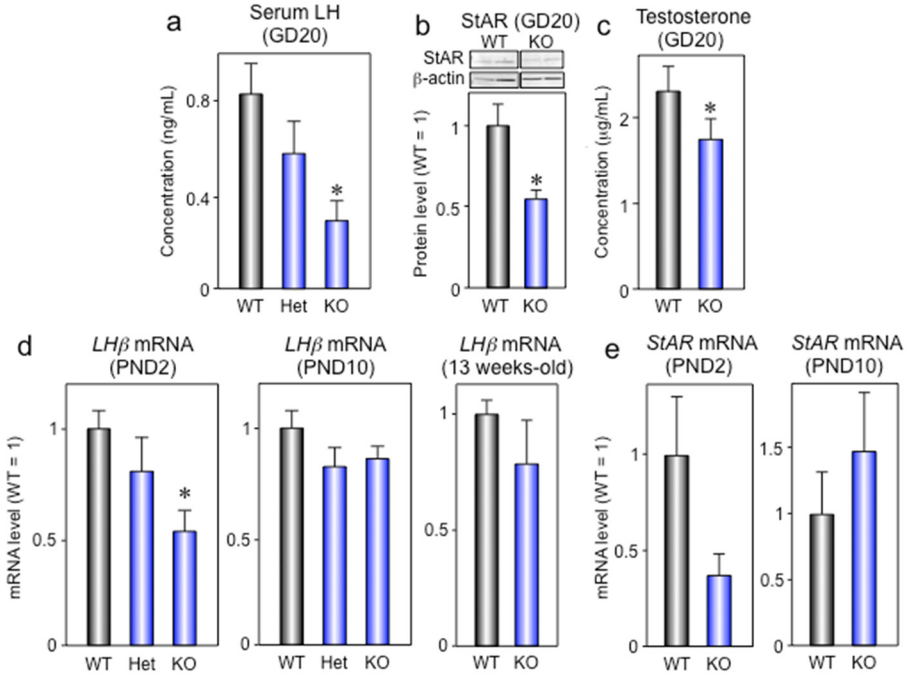



図 1. *AHR* 欠損が脳下垂体-生殖腺軸における性ホルモン合成系に及ぼす影響

胎生 20 日目(GD20)、生後 2 日目(PND2)、生後 10 日目(PND10)および 13 週齢時に、脳下垂体、精巣および血清を採取して解析した。WT:野生型、Het:*AHR* ヘテロ欠損型、KO:*AHR* 欠損型。各グラフは、平均±標準誤差。*$P < 0.05$:a および d は一元配置 ANOVA (Dunnett の多重検定)、b および c は Student's t-test による検定。各群 N = 5〜9

a) ELISA 法による血清中の LH 濃度の測定結果。*AHR*-KO 胎児では、血清 LH 濃度の有意な低下が観察された。

b) イムノブロット法による精巣 StAR タンパク質発現量の解析結果。上部のバンド写真は、各群の代表的な 2 サンプルの泳動結果を示している。標準タンパク質 β-actin も同様に解析し、StAR のバンド強度を β-actin のバンド強度で標準化してグラフ化した。 c) ELISA による血清中のテストステロン濃度の測定結果。 d) 脳下垂体における *LHβ* mRNA 発現解析。*β-actin* mRNA で標準化してグラフ化した。 e) 精巣の *StAR* mRNA 発現解析。*β-actin* mRNA で標準化してグラフ化した。

**2. 脳の性分化に対する AHR の役割**

次に、出生・成熟後の脳の性分化に対する AHR の役割を検証するため、胎生後期の性ホルモン刺激によって雄優位の神経集合体となる SDN-POA を指標として評価した。神経マーカーである calbindin を用いた蛍光抗体染色法によって PND28 の雄児脳における SDN-POA 容積を定量的に解析した結果、*AHR* 欠損によって有意に縮小することが確認された（図 2a)。すなわち、AHR は神経細胞レベルにおいて正常な脳の性分化の獲得に重要な役割を持つことが明らかになった。さらに、表現型についての評価を行うため、脳の性分化に依存して示す代表的行動である交尾行動に対する *AHR* 欠損の影響を解析した。その結果、SDN-POA の縮小と合致して、*AHR*-KO 雄ラットではマウントおよび生殖器挿入の回数は顕著に低下し（図 2b)、両行動を最初に起こすまでの時間も有意に遅延することが明らかになった（図 2c)。一方、自発運動量や不安様行動については *AHR* 欠損による影響は観察されず（データ未掲載)、AHR は性特異的行動に選択的に影響を及ぼすことが示唆された。先の本研究成果と合わせて考えると、AHR は出生前後の性ホルモン合成制御を通して神経・行動学的な脳の性分化に重要であるとの一連の可能性が見出された。

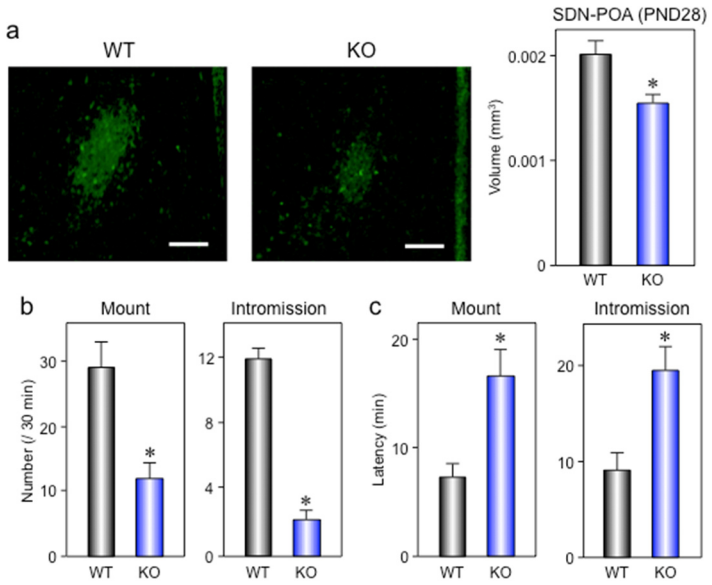



図 2. 出生・成熟後の脳の性分化における AHR の役割

a）組織蛍光抗体染色法による SDN-POA の解析結果。写真は、各群の代表的な脳切片について calbindin 抗体（ニューロンマーカー）を用いて染色した結果。緑色で染色された SDN-POA が AHR-KO による縮小が見られた。グラフは、平均±標準誤差［WT（N = 3）、KO（N = 3）］を示している。*$P$< 0.05：Student's t-test による検定。スケールバー：100 µm。

b）および c）雄ラットを用いて、10 週齢および 11 週齢時に 30 分間の交尾行動試験を行った。雄特異的交尾行動であるマウントおよび生殖器挿入を指標とした。パネル b は、両行動の 30 分間における実施回数を計測した結果。パネル c は、行動試験開始後、初めて行動を行うまでの時間を計測した結果。グラフは、平均±標準誤差［WT（N = 34）、KO（N = 30）］。*$P$< 0.05：Student's t-test による検定。

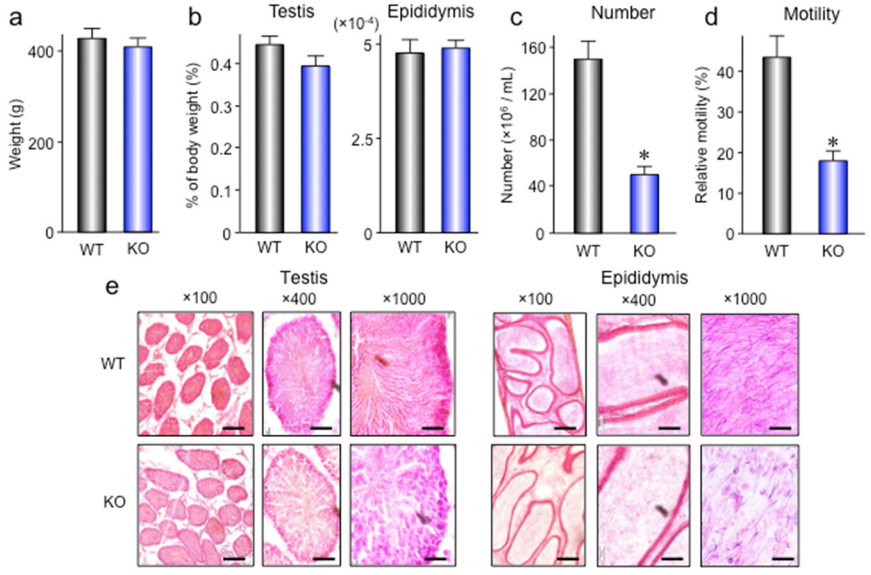



図 3. *AHR* 欠損が出生・成熟後の精巣に与える影響

a）13 週齢雄ラットの体重。平均±標準誤差［N = 9～11］。 b）13 週齢雄ラットの精巣および精巣上体重量。平均±標準誤差［N = 9～11］。 c） 8 週齢雄ラットの精巣上体における精子数の測定結果。平均±標準誤差［N = 5］。*$P$< 0.05: Student's t-test による検定。 d）8 週齢雄ラットの精巣上体における精子活力の測定結果。グラフは、平均±標準誤差［N = 5］。*$P$< 0.05: Student's t-test による検定。 e）8 週齢雄ラットの精巣および精巣上体のヘマトキシリン・エオジン染色結果。スケールバー：200 µm（×100）、50 µm（×400）および 20 µm（×1,000）。

### 3. 性成熟に対する AHR の役割

成熟後の雄児について体重、精巣および精巣上体重量を測定した結果、いずれも *AHR* 欠損による影響は見られなかった（図 3a および 3b）。しかし、精巣上体に含まれる精子数および精子運動能は、*AHR*-KO 雄ラットにおいて有意に低下することが判明した（図 3c および 3d）。このことを支持して、ヘマトキシリン・エオジン染色法を用いた組織学的解析により、精巣の細胞密度および精巣上体の精子数の減少傾向が観察された（図 3e）。これらの結果から、AHR は精巣細胞や精子の数および運動能の維持にも必要であることが示唆された。

## 文　献


1) Mimura J and Fujii-Kuriyama Y, Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim Biophys Acta. 2003 Feb 17;1619(3):263-8. PMID: 12573486
2) Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 25;93(13):6731-6. PMID: 8692887
3) Powell-Coffman JA, Bradfield CA, Wood WB. Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 17;95(6):2844-9. PMID: 9501178
4) Shimba S, Hayashi M, Ohno T, Tezuka M. Transcriptional regulation of the AhR gene during adipose differentiation. Biol Pharm Bull. 2003 Sep;26(9):1266-71. PMID: 12951469
5) Takeda T, Komiya Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. Dioxin-induced increase in leukotriene B4 biosynthesis through the aryl hydrocarbon receptor and its relevance to hepatotoxicity owing to neutrophil infiltration. J Biol Chem. 2017 Jun 23;292(25):10586-10599. Epub 2017 May 9. PMID: 28487374 DOI: 10.1074/jbc.M116.764332
6) McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. Physiol Rev. 2008 Jan;88(1):91-124. PMID: 18195084 DOI: 10.1152/physrev.00010.2007
7) Michael JB. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. Neurosci Biobehav Rev. 1979 Winter;3(4):265-84. PMID: 120519
8) Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Yamamoto M, Shimazoe T, Ishii Y, Himeno M, 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. 2014 Jan;85(1):74-82. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24132183 DOI: 10.1124/mol.113.088575
9) Savage JJ, Yaden BC, Kiratipranon P, Rhodes SJ. Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. Gene. 2003 Nov 13;319:1-19. PMID: 14597167