

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006 年度～2008 年度
 課題番号：18790072
 研究課題名 (和文)
 雄性生殖機能の獲得・維持におけるビタミン D およびビタミン D 代謝酵素の役割
 研究課題名 (英文)
 The role of vitamin D and vitamin D-metabolizing enzymes in acquirement and maintenance of male reproductive function
 研究代表者
 鎌尾 まや (神戸薬科大学・薬学部・助手)
 研究者番号：40299087

研究成果の概要：

ビタミン D 代謝酵素である CYP2R1 が従来から知られた発現組織である肝臓のみならず、精巣にも強く発現していることを見出した。また、マウスの両組織における CYP2R1 発現量は、成長期に増加し、成熟期に低下するという特徴的なパターンを示すことを明らかにした。さらに、精巣由来細胞を用いた検討により、CYP2R1 の発現は成長ホルモン、性ホルモンにより誘導されること、ビタミン D 化合物が細胞増殖抑制作用、男性ホルモン産生亢進作用を有することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	900,000	0	900,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,700,000	240,000	2,940,000

研究分野：脂溶性ビタミンに関する生化学・栄養化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ビタミン D、CYP2R1、生殖機能、25 位水酸化、TM3、TM4、血中濃度、性差

1. 研究開始当初の背景

活性型ビタミン D は正常な骨組織の形成・維持に働くのみならず雌雄両性の生殖機能の発達にも重要な役割を担っている。ビタミン D 受容体欠損マウスは精巣や卵巣の発育不全により雌雄共に生殖能力を失っているが、これらの表現型はカルシウム補充では正常化しない。従って、活性型ビタミン D はカルシウム代謝調節作用を介さず、正常な生殖機能の発現に働くと考えられるが、その機序については明らかにされていなかった。当時研究代表者は、ビタミン D 活性化の第一ス

テップである肝臓での 25 位水酸化に関与する CYP2R1 が精巣にも強く発現していることを見出した。CYP2R1 は卵巣などの雌性生殖器にはほとんど発現していないことから、雄性成熟過程で何らかの必須の役割を担うと予想された。

2. 研究の目的

以上のような背景から、研究代表者は CYP2R1 の雄性成熟過程における役割を明らかにする目的で、まず、CYP2R1 発現の加齢変化について検討した。また、精巣に発現

する CYP2R1 がビタミン D 代謝能を有することを確認すると共に、産生したビタミン D 代謝物が細胞増殖や細胞機能に及ぼす影響について検討した。さらに、精巣に発現する CYP2R1 が全身のビタミン D 代謝物供給に寄与するか否かを検証するため、ヒトにおける血漿中ビタミン D および代謝物濃度の性差についても検討した。

3. 研究の方法

(1) CYP2R1 発現および酵素活性の加齢変化

胎生 15 日齢、生後 1 日齢、2、3、7、30 週齢の C57BL/6 雌雄マウスの肝臓、精巣、卵巣における CYP2R1 および CYP27A1 (CYP2R1 と同様にビタミン D の 25 位を水酸化する酵素) mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。また、肝臓および精巣のミクロソーム、ミトコンドリア画分における vitamin D₃ あるいは vitamin D₂ に対する 25 位水酸化活性を HPLC 法で測定した。さらに、血漿中ビタミン D 化合物濃度および性ホルモン濃度を LC-APCI/MS/MS 法あるいは EIA 法により測定した。

(2) 精巣由来細胞におけるビタミン D 代謝酵素の発現および酵素活性

マウス精巣ライディッシュ細胞由来 TM3 およびセルトリ細胞由来 TM4 におけるビタミン D 代謝酵素 mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で、vitamin D₃ に対する 25 位水酸化活性および 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃] に対する 1 α 位水酸化活性を LC-APCI/MS/MS 法で測定した。また、両細胞を成長ホルモン(GH)、副甲状腺ホルモン(PTH)、性ホルモン(testosterone、estradiol)、25(OH)D₃、1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25(OH)₂D₃]、dexamethasone 存在下で 24 時間培養し、CYP2R1 および CYP27A1 mRNA 発現量の変化を検討した。

(3) ビタミン D 化合物が精巣由来細胞の細胞機能に及ぼす影響

TM3 および TM4 細胞を 25(OH)D₃、1 α ,25(OH)₂D₃ および既に臨床応用されているビタミン D 誘導体 22-oxa-1 α ,25(OH)₂D₃ (OCT) 共存下で 48 時間培養し、WST-8 法で生細胞数を測定することにより、細胞増殖に及ぼす影響について検討した。また、同様のビタミン D 化合物が TM3 細胞の testosterone、cAMP 産生能および TM4 細胞の transferrin、cAMP 産生能に及ぼす影響についても検討した (EIA 法)。

(4) ヒト血漿中ビタミン D および代謝物濃度の性差

文書によるインフォームドコンセントを得た沖縄、兵庫、札幌に居住する男女 149 名

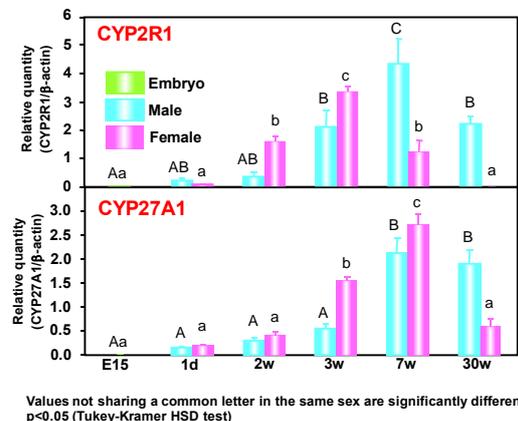
(平均年齢 70.1 歳) を対象として、vitamin D₃ とその代謝物である 25(OH)D₃ の血漿中濃度を LC-APCI/MS/MS 法で測定した。

4. 研究成果

(1) CYP2R1 発現および酵素活性の加齢変化

マウス肝臓における CYP2R1 mRNA 発現量は、雄では 2~7 週齢の成長期に増加し、成熟期に相当する 30 週齢には減少したのに対し、雌ではより早期の 3 週齢で最大となり、7 週齢では既に低値を示した (図 1)。マウス肝臓における CYP27A1 mRNA 発現量は雌雄共に 7 週齢で最大値を示し、性差は認められなかった。また、肝臓ミクロソーム、ミトコンドリア画分における 25 位水酸化活性は、雄では 7 週齢、雌では 3 週齢で最大となり、CYP2R1 mRNA の発現変化と同様の傾向を示した。

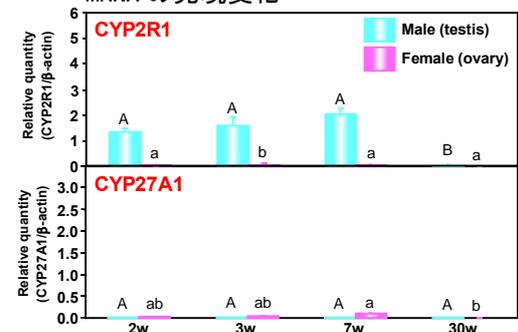
図 1. マウス肝臓における CYP2R1、CYP27A1 mRNA の発現変化



Values not sharing a common letter in the same sex are significantly different: p<0.05 (Tukey-Kramer HSD test)

精巣における CYP2R1 mRNA は、2~7 週齢の成長期で肝臓と同程度に発現していたが、30 週齢ではほとんど検出されなくなった (図 2)。一方、CYP2R1 mRNA は雌マウスの卵巣には全週齢を通してほとんど発現していなかった。また、精巣、卵巣共に CYP27A1 mRNA の発現はほとんど認められなかった。

図 2. マウス生殖器における CYP2R1、CYP27A1 mRNA の発現変化



Values not sharing a common letter in the same sex are significantly different: p<0.05 (Tukey-Kramer HSD test)

さらに、マウスの血漿中中性ホルモン濃度を測定したところ、testosterone、estradiol濃度はいずれも雌では3週齢、雄では7週齢で最大値を示し、CYP2R1 mRNA 発現量の加齢変化と一致した。

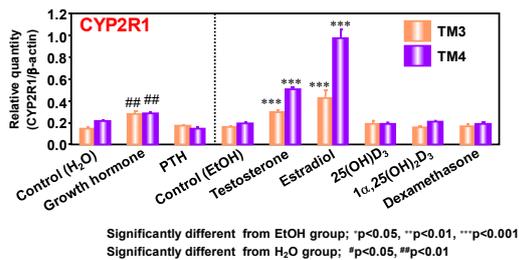
以上より、肝臓および精巣におけるCYP2R1の発現調節には性ホルモンが関与する可能性が示唆された。また、CYP2R1は雄性生殖期である精巣にのみ強く発現しており、特徴ある加齢変化を示したことから、雄性特異的な何らかの機能を有することが強く示唆された。

(2) 精巣由来細胞におけるビタミンD代謝酵素の発現および酵素活性

TM3 および TM4 細胞において CYP2R1 が発現していることを確認した。両細胞において、他のビタミンD代謝酵素であるCYP27A1、CYP27B1 および CYP24A1 はわずかしか発現していなかった。また、TM3 および TM4 細胞は、vitamin D₃ から 25(OH)D₃ を、25(OH)D₃ から 1α,25(OH)₂D₃ を産生することを明らかにした。

TM3 および TM4 細胞における CYP2R1 mRNA 発現量は、GH、testosterone および estradiol 添加により増加した(図3)。また、特に強い効果がみられた estradiol 添加により、25位水酸化活性の上昇も観察された。ヒト肝臓由来 HepG2 細胞においても同様の結果が得られたことから、精巣および肝臓における CYP2R1 の発現誘導因子は、成長ホルモンおよび性ホルモンであると考えられる。

図3. TM3 および TM4 細胞における CYP2R1 mRNA 発現量に及ぼす各種生理活性物質の影響

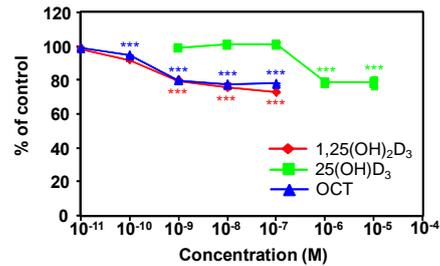


(3) ビタミンD化合物が精巣由来細胞の細胞機能に及ぼす影響

TM3 および TM4 細胞をビタミンD化合物存在下で培養したところ、ライディッヒ細胞由来の TM3 細胞については用量依存的な増殖抑制効果が認められた。一方、セルトリ細胞由来の TM4 細胞についてはビタミンD化合物を添加しても細胞数に変化は認められなかった(図4および5)。

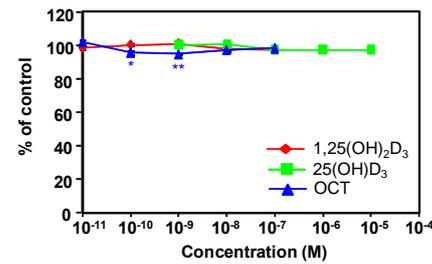
図4. TM3 細胞の増殖に及ぼすビタミンD化

化合物の影響



Significantly different from control group; ***p<0.001 (Dunnett's test)

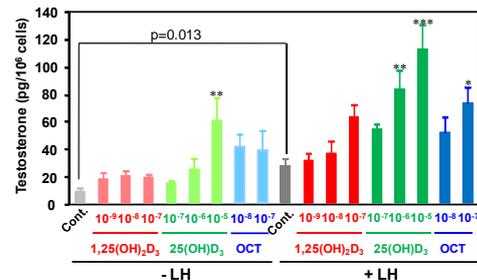
図5. TM4 細胞の増殖に及ぼすビタミンD化合物の影響



Significantly different from Control group; *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test)

また、ビタミンD化合物添加により、TM3細胞における testosterone 産生が亢進し、その作用は黄体ホルモン存在下で増強することを明らかにした(図6)。一方、TM4細胞の transferrin 産生能、TM3 および TM4 細胞の cAMP 産生能については、ビタミンD化合物添加による明確な影響は認められなかった。

図6. TM3 細胞の testosterone 産生能に及ぼすビタミンD化合物の影響



Significantly different from Control group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Dunnett's test)

従って、精巣組織内で産生した 25(OH)D₃ および 1α,25(OH)₂D₃ は、主としてライディッヒ細胞の増殖を抑制し、testosterone 産生を増大させると考えられた。

(4) ヒト血漿中ビタミンDおよび代謝物濃度の性差

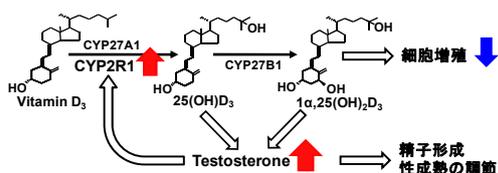
血漿中 25(OH)D₃ 濃度は、沖縄、兵庫、札幌の3地域共に女性に比べ男性で高い傾向を示した(男性 24.71±1.17 ng/mL、女性 22.12±0.86 ng/mL)。しかし、25(OH)D₃ の前駆体である vitamin D₃ も女性に比べ男性

で高濃度であり（男性 2.63 ± 0.31 ng/mL、女性 1.80 ± 0.22 ng/mL）、血漿中 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度と vitamin D_3 濃度の間には強い正相関 ($p < 0.0001$) が認められた。

よって、血漿中 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度が女性に比べ男性で高値であるのは、 25 位水酸化能の差異によるものではなく、紫外線被照射量等の影響による vitamin D_3 濃度の差異が影響していると判断された。

以上、(1)~(4)の研究結果より、精巣あるいは肝臓における CYP2R1 の発現誘導には、成長ホルモンおよび estradiol, testosterone などの性ホルモンが関与することが明らかとなった。また、精巣組織の特にライディッシュ細胞において CYP2R1 は CYP27B1 と共に、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ やそれに続く $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を産生し、細胞増殖の調節や testosterone 産生を介して精子形成や性成熟の調節に寄与しているものと考えられる (図 7)。

図 7. 本研究で明らかになったビタミン D および CYP2R1 の精巣組織における役割



現段階において、国内外共にビタミン D の生殖機能に対する作用の研究は不十分であり、本研究結果が与えるインパクトは少ない。今後、ビタミン D 栄養状態が精巣組織の発達や精子数、運動率に及ぼす影響を明らかにすると共に、ビタミン D が有する testosterone 産生亢進作用などのメカニズム解明が期待される。

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 4 件)

① 鎌尾まや、岡野登志夫、「ミクロソーム型ビタミン D-25 位水酸化酵素 CYP2R1 - 発見から最近の知見まで」、ビタミン、査読無、82、2008、612-614

② M. Kamao, N. Tsugawa, Y. Suhara, T. Okano, “Determination of fat-soluble vitamins in human plasma, breast milk and food samples -Application in nutrition survey for establishment of Dietary Reference Intakes for Japanese.”, *J. Health Sci.*, 査読無, 53, 2007, 257-262

③ 津川尚子、鎌尾まや、須原義智、岡野登志夫、「血中 25 -ヒドロキシビタミン D の新

規定量法の開発と臨床応用」、*Osteoporosis Japan*, 査読無、14、2006、13-18

④ M. Kamao, J. Kudose, T. Okano, “The role of microsomal CYP2R1 and CYP3A4 in C-25 hydroxylation of vitamin D.”, *J. Bone Miner. Res.*, 査読無, 21, 2006, S326

[学会発表] (計 9 件)

① 鎌尾まや、「沖縄・兵庫・札幌の 3 地域における血中ビタミン D 濃度調査」、日本薬学会第 129 年会、2009.3.26、京都

② 鎌尾まや、「日本人を対象とした血中ビタミン D 濃度調査：地域および季節の影響」、第 58 回日本薬学会近畿支部大会、2008.10.25、神戸

③ 鎌尾まや、「日本人血中ビタミン D 濃度の地域および季節差に関する検討」、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008.10.18、熊本

④ 鎌尾まや、「ビタミン D-25 位水酸化酵素 CYP2R1 発現誘導因子とマウス成長過程における発現変化発現量」、日本ビタミン学会第 60 回大会、2008.6.14、仙台

⑤ 鎌尾まや、「ミクロソーム型ビタミン D-25 位水酸化酵素 CYP2R1 の発現誘導因子」、フォーラム 2007 衛生薬学・環境トキシコロジー、2007.11.1、大阪

⑥ 岡野登志夫、「マウスの成長過程におけるビタミン D-25 位水酸化酵素の発現変化とその調節因子」、関西カルシウム懇話会、2007.3.24、大阪

⑦ 久戸瀬 純、「マウスにおけるビタミン D-25 位水酸化酵素 (CYP2R1) 発現量の加齢変化とその発現調節因子に関する研究」、第 56 回日本薬学会近畿支部大会、2006.10.28、京都

⑧ M. Kamao, “The role of microsomal CYP2R1 and CYP3A4 in C-25 Hydroxylation of Vitamin D”, 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2006.9.17, Philadelphia (USA)

⑨ 鎌尾まや、「肝ミクロソームおよびミトコンドリアにおけるビタミン D の 25 位水酸化活性」、第 24 回日本骨代謝学会、2006.7.6、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌尾 まや (神戸薬科大学・薬学部・助手)
研究者番号：40299087

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし