

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20700606
研究課題名 (和文) 母体および胎児に及ぼす必須微量元素栄養状態の影響
研究課題名 (英文) Effects of maternal nutrition for essential metals on fetal development in pregnancy
研究代表者
上田 英典 (UEDA HIDENORI)
大阪大谷大学・薬学部・助教
研究者番号：50419462

研究成果の概要 (和文)：食餌性の母体の必須金属欠乏や過剰状態が、胎児の発育に及ぼす影響を、ヒト胎盤および卵巣細胞株と妊娠マウスを用いて調べた。その結果、女性ホルモン合成酵素の発現が亜鉛欠乏で増加し、亜鉛過剰で減少した。また、鉄欠乏は、小腸と同様に胎盤における鉄輸送系の発現増加と、胎児重量の減少をもたらした。よって、亜鉛や鉄の母体栄養状態が胎児の発育に重要であり、特に、妊婦には鉄の十分な摂取が不可欠であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Effects of maternal deficiency or supplementation of essential metals on fetal development were studied in human placental choriocarcinoma cell line JEG-3, human ovarian granulosa cell line KGN, and mice. The synthesis of female sex hormones was up-regulated by zinc deficiency, but down-regulated by zinc supplement in both cells. Iron deficiency resulted in up-regulation of iron transport system in placenta as in small intestine and loss of fetus weight in mice. These results suggest that placenta is most important tissue for regulation of fetus nutrition for essential metals and maternal nutrition for zinc and iron is important for fetus development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：必須金属, 妊娠, 胎盤, 胎児, 栄養状態

1. 研究開始当初の背景

我が国ではライフスタイルの変化によって食生活が多様化し、その結果不足してしまう栄養素を補う目的で、健康食品やサプリメントの需要が急速に高まっている。種々の健康食品やサプリメントが流通する中、国が定めた安全性や有効性に関する基準を満たすものを『保健機能食品』とし、その規格や表示基準が定められた。保健機能食品は『栄養機能食品』と『特定保健食品』から成り、このうち栄養機能食品は、身体の健全な成長、発達、健康の維持に必要な栄養成分（ビタミン、ミネラル）の補給のために利用される食品で、栄養素の機能の表示が義務付けられている。栄養機能食品として定められているミネラル、すなわち必須金属は、鉄 (Fe)、カルシウム (Ca)、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu)、マグネシウム (Mg) の5種類であるが、最近の国民健康・栄養調査の結果では、特に Fe, Ca の摂取量が栄養摂取基準での各推奨量や目安量を下回っていることが明らかになった。また、妊娠中は妊婦自身の体調の維持のみならず、胎児の正常な発育を促すために、非妊娠時とは生理的・生化学的に異なった状態になることから、妊娠時における必須金属の適切な摂取量は、Fe や Zn では非妊娠時より高めに設定されている。さらに、実験動物において、必須金属の欠乏によって胎児の発育不全や貧血、中枢神経系の異常等が起こることが報告されている。

妊娠時に母体と胎児の間に形成される胎盤は、母体から胎児への栄養分の供給やガス交換、また物質代謝能が十分でない胎児に代わって外来異物の代謝を行い、胎児にとって不必要な物質の移行を防ぐ物理的関門としての機能も果たしている。さらに胎盤は、エストロジオールやプロゲステロンなどのステロイドホルモンなどの種々の生理活性物質を産生し、内分泌腺としての機能も有する。このように、胎盤は胎児の成長にとって必要不可欠なものであり、非妊娠時から活動している内分泌系に、胎盤からのホルモン分泌が加わり、母体のエネルギー源を確保しながら胎児発育のための栄養代謝システムが確立、維持される。

必須金属の栄養学的重要性は昨今認識されつつあるが、例えばその摂取基準を定めるには十分なデータに乏しく、また、特に妊娠時には胎盤、胎児といった新たな因子が加わることからその動態は未だ明らかでない。このように、妊娠期の栄養状態、ひいては現在の食生活が、母体、および胎盤を通して胎児にどのような影響を及ぼすのか、その解明が

望まれている。

2. 研究の目的

妊娠中は妊婦自身の個体維持のみならず、胎盤の形態、機能を介して胎児の正常な発育を同時に行なうために、非妊娠時とは生理的・生化学的に異なった状態になり、通常より多くのエネルギーが必要となる。その主要なエネルギー源は食事であるが、昨今のライフスタイルの多様化により不足する栄養素を、妊婦においても健康食品やサプリメントで補うことがある。しかし、その健康食品やサプリメントの摂取によって必須金属過剰状態になり、また、相互バランスが崩れたために他の必須金属の吸収に影響を及ぼす可能性もある。そこで、Fe, Ca, Zn, Cu, Mgといった必須金属の栄養状態が、母体と胎児を結ぶ胎盤の機能にどのような影響を及ぼすのかを調べ、妊娠期の栄養状態、ひいては現在の食生活が、胎児の成長に及ぼす影響を調べることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

母体および胎児に及ぼす必須金属栄養状態の影響を調べるために、母体小腸および胎盤における必須金属関連の各種金属トランスポーターの mRNA 発現量、また、妊娠期間中の母体および胎盤の性ホルモンバランスの維持に重要な働きをするアロマトーゼの発現量およびその活性を調べた。さらに、栄養状態による各種必須金属の臓器濃度の変動を調べた。

(1) 必須金属欠乏または過剰状態における胎盤細胞の金属トランスポーターおよびメタロチオネイン mRNA 発現量の測定

必須金属特異的キレート剤である DFO, BAPTA, TPEN, BCS, XB-I で処理した各種必須金属欠乏状態の培地中で、ヒト胎盤絨毛細胞株 JEG-3 を培養し、回収した細胞から total RNA を得た。同様の操作を、FeCl₃, CaCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, MgCl₂ を用いた必須金属過剰状態でも行った。さらに、得られた total RNA から cDNA を合成し、これを用いてリアルタイム RT-PCR を行い、Fe 輸送に関わる二価金属トランスポーター (DMT) 1, フェロポーチン (FPN) 1, トランスフェリンレセプター (TfR) 1, Zn 輸送に関わる亜鉛トランスポーター (ZnT) 1, Ca 輸送に関わるカルシウムトランスポーター (CaT) 1, Cu 輸送に関わる銅輸送タンパク質 (Ctr) 1, また Cu 含有 Fe 酸化酵素であるヘファエスチン (Heph), 重金属の生体内結合タンパク

質であるメタロチオネイン (MT) のmRNA発現量を調べた。

(2) 必須金属欠乏または過剰状態における胎盤および卵巣細胞のアロマトラーゼmRNA発現量およびアロマトラーゼ活性の測定

JEG-3およびヒト卵巣顆粒膜細胞株KGNを同様に培養し、アロマトラーゼのmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRにより調べ、さらにアロマトラーゼ活性を $^3\text{H}_2\text{O}$ 遊離アッセイ法により測定した。

(3) 必須金属欠乏または過剰状態における母体小腸、子宮および胎盤、胎児中の必須金属濃度の測定

妊娠マウス (ICR系, 10週齢) に、妊娠1日目よりFe, Ca, Zn, Cu, Mgの欠乏餌または過剰餌を自由摂取させ、妊娠17日目に母体臓器および胎盤、胎児を採取した。これらを硝酸で湿式灰化後、原子吸光光度計を用いて各必須金属濃度を測定した。

(4) 必須金属欠乏または過剰状態における母体小腸および胎盤の金属トランスポーターおよびメタロチオネインmRNA発現量の測定

同様に母体小腸、および胎盤を採取後、これらよりtotal RNAを得た。さらに、得られたtotal RNAからcDNAを合成し、これを用いてリアルタイムRT-PCRを行い、DMT1, FPN1, TfR1, ZnT1, CaT1, Heph, またMTのmRNA発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) 必須金属欠乏または過剰状態における胎盤細胞の金属トランスポーターおよびメタロチオネインmRNA発現量の測定

① JEG-3のDMT1発現量は、細胞外Feイオン濃度を低下させると有意に増加し、逆に上昇させると有意に減少した。

② ZnおよびCuイオン濃度を上昇させると、JEG-3のMT発現量はそれぞれ約180倍、約25倍と顕著に増加した。

③ Feを除く必須金属濃度の低下で、JEG-3のMT発現量は有意に減少した。

(2) 必須金属欠乏または過剰状態における胎盤および卵巣細胞のアロマトラーゼmRNA発現量およびアロマトラーゼ活性の測定

① Feイオン濃度を低下させると、ヘムタンパク質であるアロマトラーゼの活性が、JEG-3およびKGNのいずれの場合も有意に低下した。

② JEG-3では、Znイオン濃度を低下させるとアロマトラーゼ発現量は有意に増加し、Zn濃度を上昇させると発現量は有意に減少したが、その活性は変化しなかった。一方、KGN

ではZnイオン濃度を低下させるとアロマトラーゼ発現量は約24倍増加し、その活性も約2倍上昇した。また、Znイオン濃度を上昇させると、アロマトラーゼ発現量は約2/3に減少し、その活性も約1/4に低下した。

(3) 必須金属欠乏または過剰状態における母体小腸、子宮および胎盤、胎児中の必須金属濃度の測定

① 食餌からのFe摂取量を減少させると、各臓器および胎児Fe濃度が顕著に低下した。一方、Fe摂取量を増加させると、各臓器および胎児のFe濃度が有意に上昇した。また、Fe摂取量を低下させると、胎児重量が有意に減少した。

② 同様にCa摂取量を減少させると、各臓器および胎児Ca濃度が有意に低下した。一方、Ca摂取量を増加させると、Ca濃度が母体小腸で有意に上昇したが、胎盤では有意に低下した。

③ 同様にZn摂取量を減少させると、母体小腸、胎盤、胎児Zn濃度が有意に低下した。

④ 同様にCu摂取量を減少させると、各臓器および胎児Cu濃度が顕著に低下するとともに、胎盤および胎児のFe濃度が有意に低下した。また、Cu摂取量の増減のいずれの場合も胎盤重量が減少した。

⑤ 同様にMg摂取量を減少させると、胎児は確認されず、全て吸収胚であった。

(4) 必須金属欠乏または過剰状態における母体小腸および胎盤の金属トランスポーターおよびメタロチオネインmRNA発現量の測定

① 食餌からのFe摂取量を低下させると、母体小腸および胎盤のDMT1発現量が有意に増加した。

② 同様にCa摂取量を減少させると、母体小腸および胎盤のCaT1発現量が有意に増加した。

③ 同様にZn摂取量を減少させると、母体小腸および胎盤のMT発現量が有意に低下し、一方、Zn摂取量を増加させると、MT発現量は顕著に増加した。

④ 同様にCu摂取量を減少させると、小腸のHeph発現量が減少し、母体小腸および胎盤のDMT1発現量が有意に増加した。

(5) 総括

Feイオン濃度の変化により、胎盤細胞のDMT1発現量は既に報告されている小腸モデル細胞と同様の変化を示したことから、胎盤においてもDMT1はFe輸送に重要な役割を果たしていると考えられる。また、胎盤細胞では、ZnおよびCuの動態にMTが大きく関与している可能性が示唆された。さらにZnイオン濃度の低下によって、エストロゲン産生の

律速酵素であるアロマターゼの発現量が増加したことから、Zn イオン濃度の変動が、妊娠の維持に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。このエストロゲンは、Ca トランスポーターである CaT1 の発現調節を行っているとの報告もあり、Zn イオン濃度の変動が、Ca 代謝にも影響を及ぼす可能性がある。

また、妊娠マウスを用いた研究において、食餌からの Fe 摂取量を増減させると、臓器および胎児 Fe 濃度が増減し、DMT1 発現量は、母体小腸および胎盤で Fe 摂取量に対し負の相関を示した。特に Fe 摂取量を減少させると、胎児重量が有意に低下し、母体が Fe 欠乏状態に陥ると胎児の発育にも影響が及ぶことが示唆された。また、Cu 摂取量を減少させた場合にも、臓器および胎児の Fe 欠乏が見られた。一方、Zn 摂取量の変動に応じて、胎盤では母体小腸と同様に MT 発現量が Zn 量に応じて変動したことから、MT を介した Zn の恒常性維持が行われることが示唆された。

この様に、胎盤では必須金属栄養状態に応じて金属トランスポーターや MT が必須金属の恒常性維持を行っており、さらには、栄養状態によるエストロゲン産生の変動が、恒常性維持に大きな影響を与える可能性が示唆された。また、必須金属の欠乏や過剰摂取によって必須金属間のバランスが崩れることが明らかになり、現在の食生活による母体の栄養不良や、健康食品、サプリメントによる必須金属の過剰摂取が、胎児の発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

今後の展望として、非必須金属である Cd 等の食品汚染金属が、妊娠時の必須金属栄養状態の変動に伴う種々の金属トランスポーターの発現変動によって、その取り込みや蓄積が促進される可能性が考えられることから、本実験結果を、妊娠という特殊な状況下での Cd 等の食品汚染金属の毒性発現の研究に応用できればと考える。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 上田英典、関庚善、田中慶一、『必須金属欠乏および過剰摂取による妊娠マウスの必須金属代謝への影響』、日本薬学会 130 年会、平成 22 年 3 月 30 日、岡山県総合グラウンド 桃太郎アリーナ (岡山)。

② 上田英典、関庚善、田中慶一、『胎盤細胞の金属輸送系および性ホルモン合成系に対する必須金属栄養状態変化の影響』、メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2009、平成 21 年 10 月 17 日、東京大学 山上会館 (東京)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 英典 (UEDA HIDENORI)
大阪大谷大学・薬学部・助教
研究者番号：50419462