

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10430

研究課題名（和文）カルニチン欠乏マウス雌性不妊：脂肪酸毒性と社会的ストレス脆弱性の関係性に着目して

研究課題名（英文）Female infertility in carnitine-deficient mice: focus on the relationship between fatty acid toxicity and social stress vulnerability.

研究代表者

牛飼 美晴（Ushikai, Miharu）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：70232816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂肪酸代謝異常モデル(JVS)マウスを用い、カルニチン欠乏状態での雌性不妊病態について、社会的ストレス脆弱性に着目して解析した。性ホルモン動態評価のために、体重・摂食量・摂水量・回転車による自発活動量の変動を測定し、非侵襲的な性周期評価法の確立を試みた。群飼育から単飼育にすると、メスJVSマウスは、摂食量低下による体重減少傾向が認められた。また、群飼育条件下での野生型マウスとJVSマウスの尿中カテコールアミン・血中ホルモンレベルを評価し、脂肪酸代謝異常症とストレス脆弱性の関係性について検討した。メスJVSマウスは、オスJVSマウスよりもストレスの影響を受けやすいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊の原因は様々であり、妊娠過程のどこに起因するかは不明な点も多く、男性・女性それぞれに妊孕性の評価が行われている。病態に応じた最適な介入法の開発のために、内的要因と外的要因の関与を明らかにすることが求められる。本研究で得られた知見から、脂肪酸代謝異常モデルマウスの雌性不妊は、内的要因（脂肪酸代謝異常）に外的要因（ストレス）が加わることにより発症する不妊病態の存在を明らかにする。また、脂肪酸代謝障害の病態に雌雄差の存在を示すことになり、脂肪酸代謝障害の新たな側面を明らかにする基盤的研究となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed female infertility focusing on social stress vulnerability in the juvenile visceral steatosis (JVS) mice with carnitine deficiency. To understand the influence of the sex hormones on the infertility, the change of body weight, food intake, water intake, and locomotor activity under a running wheel was measured as a noninvasive measure related to the estrus cycle in female mice. Female JVS mice showed a trend toward weight loss due to decreased food intake under the condition from group-rearing to single-rearing, one of the social stresses. We also evaluated urinary catecholamine and blood hormone levels (corticosterone and estrogen) of group-rearing wild type and JVS mice to examine the relationship between fatty acid metabolism abnormality caused by carnitine deficiency and stress vulnerability. As a result, female JVS mice were suggested to be more susceptible to social stress than male JVS mice.

研究分野：衛生学

キーワード：不妊 脂肪酸代謝異常 カルニチン ストレス脆弱性

1. 研究開始当初の背景

先進国における不妊の問題は、深刻化しており、要因別の対策が求められている。カルニチンは、精子の運動異常に起因する不妊と関係することが知られている (Int J Urol 2016; 13: 420-426.)。一方、女性不妊症へのカルニチン投与が行われ、5%程度妊娠率が高まったとする報告もあるが、現時点では、カルニチン低下と妊娠率低下の関連性については不明な状況とされている (Gynecol Endocrinol, 2018; 34: 684-688.)。

これまでヒト全身性カルニチン欠乏モデル (Juvenile Visceral Steatosis : JVS) マウスの病態として、末梢臓器病変である心肥大や脂肪肝、中枢神経病変としての疲労病態について解析を行ってきた。JVS マウスは、カルニチンの細胞膜輸送体である OCTN2 の遺伝子変異に基づく常染色体劣性 (潜性) の脂肪酸代謝障害を呈する遺伝性疾患モデルマウスである。カルニチン欠乏による脂肪酸代謝異常は、心肥大や脂肪肝、疲労の病態に関与し、その投与効果は、一時的または、継続的に認めることを明らかにした。また、JVS マウスは、雄性不妊であり、その原因として、精子の運動機能低下による精管移動時の停滞の結果、精管の機能不全が生じ、不妊となることが報告されていた (FEBS Lett, 1999; 446: 323-326)。本疾患マウスの繁殖、維持の過程で、JVS マウスの雌性不妊が存在し、カルニチン投与で妊娠・出産が可能となることを見出した。しかし、カルニチン欠乏が、妊娠過程のどこに起因するかは不明である。高脂肪食による雌性不妊の報告 (Endocrinology, 2010, 151: 4039 - 4046) や、社会的ストレス脆弱性の報告 (Sic Rep 2019; 9: 10551.) があることから、JVS マウスの雌性不妊について、社会的ストレス脆弱性に着目して解析を試みた。

2. 研究の目的

カルニチン欠乏症は、長鎖脂肪酸代謝障害をもたらす、男性不妊の要因であることが臨床および動物実験から明らかにされている。ヒト全身性カルニチン欠乏症モデル (JVS) マウスに、雌性不妊があり、カルニチン投与により妊娠・出産が可能であることを見出した。本研究では、オスによる社会的ストレスに対する脆弱性について、カルニチン欠乏モデル動物の雌性不妊病態を解析し、脂肪酸代謝の観点から、社会的ストレス脆弱性に雌雄差の存在することについて新たな知見を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メスマウスの性周期評価

メスマウス性周期評価は、膣スミアの顕鏡による膣スミア判定が用いられている。しかし、本研究がストレス負荷の影響を評価する実験ということを考慮し、より侵襲性が少ない非接触型の測定系の開発を試みた。具体的には、埋め込み型チップ (nano tag : 18.8×14.2×7.1 mm) による体温日内リズム測定や回転車による活動量測定について検討した。

自発活動量測定：げっ歯類メスは、性周期とともに、活動量・摂食量も変化することが報告されている (Physiology & Behavior 2000; 70: 397-405)。自発活動量を測定する回転車を設置したケージを用い、連続 14 日間、毎日 (午前 7 時・午後 19 時計測)：明期・暗期活動量、同時刻 (午前 9-10 時 1 回/日)：摂食量・摂水量・体重を測定する。

(2) ストレス脆弱性評価

摂食条件下での雌雄の野生型 (WT) マウスと JVS マウスを、群飼育 (複数匹 : 3-4 匹/ケージ) から単飼育 (新規ケージ) にし、1 日・3 日後の体重変化とその後の生存率を評価した。また、群飼育条件下 (絶食 6 時間後) での WT マウスと JVS マウスにおいて、ストレス指標となる尿中カテコールアミン・ホルモンレベル (コルチコステロン) を測定し、ストレス脆弱性について評価した。

4. 研究成果

性周期評価は、非接触型の低侵襲的な方法として、メス WT マウスに体温測定チップを埋め込み、体温日内リズムを測定した。頸部に測定チップを埋め込むよりも腹部に測定チップを埋め込むほうが体温のばらつきが少ないことが確認できた。しかし、体温のばらつきが大きく、体温日内リズムを用いた性周期を評価するためには、方法を再検討する必要があると考えられた。次に、メス WT マウスとメス JVS マウスを回転車つきケージに個別飼育し、自発活動量・体重・摂食量・飲水量を測定した。実験開始後、メス JVS マウスは、食欲低下による体重減少傾向が認められた。この結果は、群飼育から単飼育にすることによる社会的ストレスが原因なのではと考えた。そこで、環境変化(群飼育の雌雄の WT マウスと JVS マウスを単飼育にする)による摂食量・体重・飲水量を測定すると、メス JVS マウスは、WT に比べて、単飼育後 3 日後で有意に摂食量低下により体重が減少し(図 1)、単飼育後 1 週間で有意に生存率が低下した(図 2)。オス JVS マウスにおいては、このような異常の程度は小さい。また、群飼育条件下でストレス指標となる尿中 CA (NE: ノルエピネフリン・Epi: エピネフリン・DA: ドーパミン)・尿中コルチコステロンを測定した。オス WT マウスとオス JVS マウスに有意な差を認めなかったが、メス JVS マウスは、メス WT マウスと比較して、NE・Epi・コルチコステロンについて有意に高い値を示した(図 3)。これらのことから、脂肪酸代謝異常であるメス JVS マウスは、オス JVS マウスよりもストレスの影響を受けやすいということが示唆された。

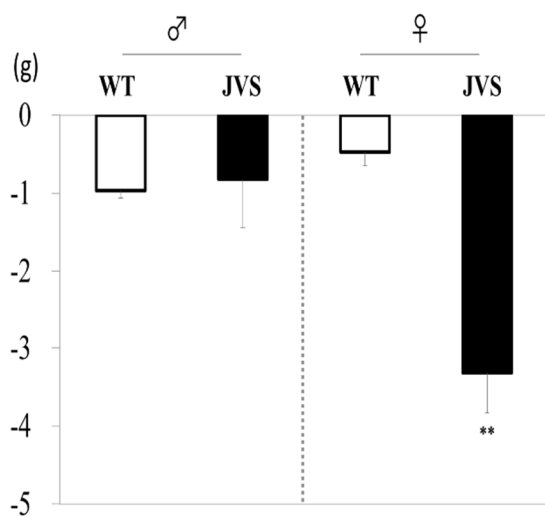


図1 群飼育から単飼育3日後の体重変化 Data are means \pm SE. ** $p < 0.01$

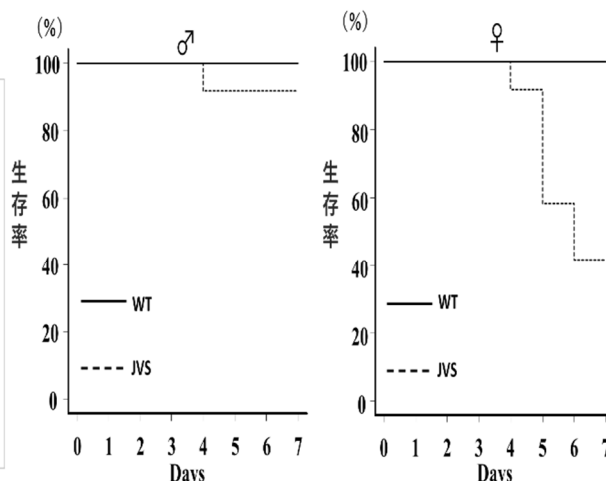


図2 群飼育から単飼育1週間の生存率

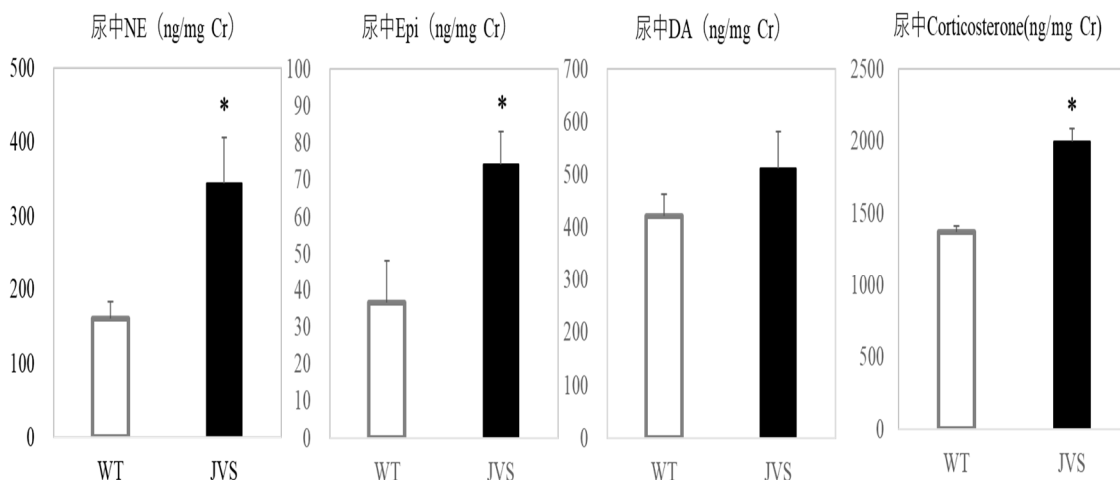


図3 群飼育におけるメス野生型・JVSマウスの尿中CA・Corticosterone Data are means \pm SE. * $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Kanako, Abe Masaharu, Masamoto Izumi, Ishii Chikako, Arimura Emi, Ushikai Miharuru, Oketani Kaoru, Hashiguchi Teruto, Horiuchi Masahisa	4. 巻 4
2. 論文標題 Comparison of dipstick and quantitative tests for proteinuria and hematuria in middle aged, male Japanese employees: A single center study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Health Science Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hsr2.267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ARIMURA EMI, USHIKAI MIHARU, HORIUCHI MASAHIISA	4. 巻 35
2. 論文標題 Higher Branched-chain Amino Acids and Lower Serine Exist in the Plasma of Nondiabetic Mice: A Comparison Between High- and Low-protein Diet Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀内正久, 有村恵美, 牛飼美晴
2. 発表標題 たんぱく質摂取量の血中アミノ酸への影響 : 野生型と2型糖尿病モデルマウスでの比較
3. 学会等名 第91回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛飼美晴, 小牧祐雅, 吉田剛一郎, 堀内正久
2. 発表標題 脂肪酸代謝障害におけるストレス脆弱性の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛飼美晴, 小牧祐雅, 堀内正久
2. 発表標題 脂肪酸代謝異常症におけるストレス脆弱性の解析
3. 学会等名 第92回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富宿小百合, 牛飼美晴, 小牧祐雅, 堀内正久
2. 発表標題 頻回の新規環境負荷に対するマウスの応答性について
3. 学会等名 第92回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小牧祐雅, 牛飼美晴, 堀内正久
2. 発表標題 一事業所の、勤労世代における喫煙者に関する現状
3. 学会等名 第95回 日本産業衛生学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本ビタミン学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672
3. 書名 ビタミン・バイオフィクター総合事典	

1. 著者名 分担執筆 牛飼美晴	4. 発行年 2022年
2. 出版社 株式会社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 545
3. 書名 ヒトを中心とした生理活性ペプチドハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	堀内 正久 (Horiuchi Masahisa) (50264403)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究 分担者	川口 博明 (Kawaguchi Hiroaki) (60325777)	北里大学・獣医学部・教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------