

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350148

研究課題名(和文)生活リズム攪乱により惹起される生殖器官発達抑制の制御を目的とした栄養学的研究

研究課題名(英文) Nutritional research for controlling gonadal development suppression induced by disruption of daily rhythm

研究代表者

花井 美保 (Hanai, Miho)

神奈川県立大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：70337781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：連続暗黒飼育ラットは、生殖器官の発達が抑制される。本研究の目的は、連続暗黒飼育による生殖器官の発達抑制を「改善する飼料(G飼料)」、「改善しない飼料(B飼料)」の組成を確定し、その飼料組成がどのようなメカニズムで生殖器官の発達を制御しているかを解明することである。9%カゼイン食(C飼料)にメチオニン、ビタミンEおよびパントテン酸を添加したG飼料はC飼料に比較し精巣重量を増加させた。また、連続暗黒飼育ラットのC飼料による精巣の発達抑制は、アンドロゲンレセプターの低下、ジヒドロテストステロン合成の低下が関与していること、G飼料はこれらの低下を抑制し、精巣の発達抑制を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Suppression of gonadal development occurs in rats kept in constant darkness. The purpose of this study was to determine the composition of the “improved diet (G-diet)” or “non-improved diet (B-diet)” required for the suppression of gonadal development induced by the constant darkness and to clarify the mechanism of gonadal development control by the diet composition. The weights of testes from rats given the G-diet, which consists of the 9% casein diet (C-diet) and additional methionine, vitamin E, and pantothenic acid, were higher than those of rats given the C-diet. It is possible that the suppression of testes development in rats fed the C-diet and kept in constant darkness is related to low androgen receptor expression and low dihydrotestosterone synthesis. As such, it is possible that androgen receptor expression and dihydrotestosterone levels improved in rats kept in constant darkness when fed the G-diet.

研究分野：栄養学

キーワード：連続暗黒飼育 雄性器 テストステロン 生殖器官 栄養素 生活リズム

1. 研究開始当初の背景

労働形態・生活活動の多様化により不規則な生活をしている人々が増加している現在、健康に及ぼす悪影響が問題となっている。不規則な生活スタイルとして交替勤務があげられるが、交替勤務従事者は、従事期間が長いほど体調の不具合を訴える者が多いこと、食事内容が不適切であることが報告されている。また、乳癌、前立腺癌や心疾患、糖尿病などの生活習慣病の発症も交替勤務従事者に多いことも報告されている。

近年、生体リズムを制御する時計遺伝子に関する研究が進み、時計遺伝子と生活習慣病との関わりも明らかとなってきた。すなわち、交替勤務従事者と生活習慣病との関連に関して遺伝子レベルで解釈されるようになってきている。

これまで、生活リズムが不規則な人々の健康の維持・増進に寄与する基礎データを得るため、ラットを用いた動物実験を実施してきた。実験では「不規則な生活リズム」のモデルとして、「連続暗黒飼育」を取り入れている。ラットの生体リズムのペースとなる体内時計の周期は、ヒトと同様24時間より長く、光が24時間周期の生体リズムを形成するための強力な同調因子となっている。光情報のない連続暗黒飼育下では、ラットは自身のもつ体内時計に基づいて活動をするため、活動や摂食のリズムがフリーラン状態となる。また、ホルモンや酵素の分泌にも様々な変化が現れる。それゆえ、「連続暗黒」という飼育環境は生活リズムが24時間周期でない人々の1つのモデル系となると考えたのである。

連続暗黒下で飼育した幼若ラットでは、生殖器官の発達抑制が顕著に現れ、その抑制程度は、摂取する栄養素により影響を受けることはすでに報告してきた。これまでに検討した栄養素はタンパク質および11種のアミノ酸、脂質、ミネラル混合および5種のミネラル、ビタミン混合および13種のビタミンである。(Hanai et al. J Nutr Sci Vitaminol 2003;49:388、花井ら、必須アミノ酸研究 2003;167:61、Hanai et al. J Nutr Sci Vitaminol 2006;52:368、Hanai et al. J Nutr Sci Vitaminol 2007;53:138、花井ら、日本栄養・食糧学会誌 2010;63:143、Hanai et al. J Nutr Sci Vitaminol 2011;57:333、Hanai et al. J Nutr Sci Vitaminol 2012;58:230、Hanai et al. Exp Anim 2012;61:555)。連続暗黒飼育ラットと正常明暗飼育ラットでは、生殖器官に対する各種栄養素の影響が異なることも報告しており、連続暗黒飼育は栄養素の代謝調節機構を変化させることが推察される。

これまで得られた動物実験の結果から、生活リズムが規則正しい人と正しくない人では生体の発育や機能維持に必要な栄養素量が異なることが示唆される。特に成長期における不規則な生活リズムと不適切な栄養素摂取は、生殖器官の発達を抑制することが危

惧される。生殖器官の発達障害は生殖活動の面からも重要な問題である。それゆえ、生活リズムが不規則な人々、特に成長期にある者の健全な発育と健康の維持に寄与できる有効な栄養学的基礎データを得ることが必要と考える。

2. 研究の目的

連続暗黒飼育ラットの生殖器官発達抑制程度が摂取栄養素により顕著に変化することはすでに報告してきた。ただし、各種栄養素の影響は個別の実験で検討したものである。そこで、本研究ではこれまで得られてきた各種栄養素の結果を統合した飼料を調製し、連続暗黒飼育ラットの生殖器官の発達抑制を「解除する飼料(最良飼料)」、「促進する飼料(最悪飼料)」の組成を決定する。その後、連続暗黒飼育下での生殖器官の発達と性ホルモンの合成・機能発現との関連性について、そして、そこに各種栄養素がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 「最良飼料」の検討

フィッシャー系3週齢の雄ラットを5~7日間予備飼育後、正常明暗下(12時間明期、12時間暗期)、または連続暗黒下で4週間飼育した。飼料組成はAIN-93G飼料をベースに、これまでの実験より生殖器官の発達抑制を解除する栄養素として示された栄養素について、その添加量を変化させることとした。低タンパク質食(9%カゼイン食)をコントロール飼料とし、コントロール飼料に各種アミノ酸を標準レベル、または標準の2倍量添加、あるいは各種ビタミンやミネラルの添加量を変化させた。

飼料、飲料水は自由摂取とし、連続暗黒飼育群の世話は、写真用赤色ランプを用いて行った。

4週間飼育後、解剖し主要臓器および生殖器官を摘出した。

2) 「最悪飼料」の検討

「最良飼料」と同様に実施した。

3) 精巣と性ホルモン、性ホルモン受容体に関する検討

「最良飼料」摂取時の検討

1)の実験より決定した「最良飼料」を用いてラットを飼育し、生殖器官と血清を採取した。

血清はテストステロン(T)およびコレステロール濃度を測定した。

精巣は、総脂質をFolchの方法で抽出後、コレステロール量を測定した。また、RNAを抽出し、アンドロゲンレセプターのmRNAの発現量およびテストステロンをジヒドロテストステロン(DHT)に変換する酵素5 α リダクターゼのmRNAの発現量を測定した。

「最悪飼料」摂取時の検討

2)の実験より決定した「最悪飼料」を用いてラットを飼育した。測定項目は3)と同様である。

4. 研究成果

1) 「最良飼料」の検討

実験1として、コントロール飼料(C飼料)に、アミノ酸であるメチオニン、バリン、イソロイシン、スレオニンを添加して検討した。メチオニンは標準の2倍量、バリン、イソロイシン、スレオニンは標準量となるよう添加した。ミネラルに関しては、すべてのミネラルを標準量添加、ビタミンに関しては、ビタミンEを標準の3倍量、パントテン酸を標準の6倍量添加し、その他のビタミンは標準量とした。その結果、C飼料に比較し、精巣重量は有意に高値を示し、連続暗黒飼育による生殖器官の発達抑制を解除できる可能性がみられた。

そこで、さらなる生殖器官の発達抑制の解除を試み、実験2として、さらに含硫アミノ酸であるシスチンを標準量の2倍量添加、また、ビタミンEを6倍量、パントテン酸を9倍量添加した飼料を調製し、ラットに給与した。その結果、C飼料に比較し、正常明暗飼育群では、精巣重量は高値を示したが、連続暗黒群では、反対に低値を示した。

以上より、実験1の飼料組成を「最良飼料(G飼料)」とすることとした。

2) 「最悪飼料」の検討

実験3として、C飼料にアミノ酸であるトリプトファンを標準量、バリンを標準の2倍量添加した。脂質に関しては、大豆油の添加量を標準の1/3.5量とした。ミネラルに関しては、カルシウムとナトリウムを標準の1/3.5量、その他のミネラルは標準量とした。ビタミンに関しては、ビタミンDを標準の3倍量、ビタミンB1とビタミンB6を標準の6倍量添加し、その他のビタミンは標準量とした。その結果、C飼料に比較し、連続暗黒群の精巣重量は低値傾向を示したが有意な差はみられなかった。

そこで、実験4として、実験3の飼料を改変し、リン量を1.6倍量、ビタミンDを標準の6倍量、ビタミンB1とビタミンB6を標準の9倍量添加した飼料を調製し、ラットに給与した。その他の組成は、実験3と同様である。その結果、C飼料に比較し、正常明暗飼育群では、精巣重量は変化しなかったが、連続暗黒飼育群は、有意に低値を示し、連続暗黒飼育による生殖器官の発達抑制が促進された。

以上より、実験4の飼料組成を「最悪飼料(B飼料)」とすることとした。

3) 精巣と性ホルモン、性ホルモン受容体に関する検討

「最良飼料」摂取時

血清T濃度に、飼料および連続暗黒飼育の有意な影響はみられなかった(図1)

また、精巣中のコレステロール濃度は、DC群はC群に比較し高値を示す傾向がみられた。一方、血清コレステロール濃度には4群間の差はみられなかった。

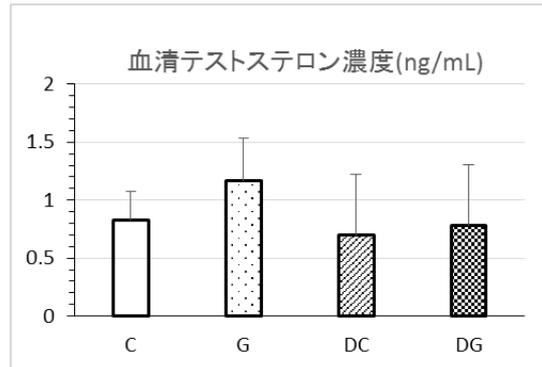


図1. 血清テストステロン濃度に対する連続暗黒飼育と最良飼料の影響

精巣のアンドロゲンレセプターの発現は、DC群はC群に比較し有意に低値を示したが、DG群とG群には差はみられなかった(図2)。

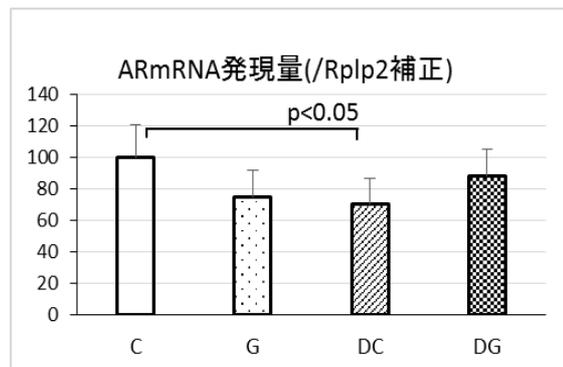


図2. 精巣 AR mRNA の発現に対する連続暗黒飼育と最良飼料の影響 (Rplp2 で補正し C 群を 100 とした)

また、5- α -リダクターゼである Srd5a1 の発現は、DC群はC群に比較し有意に低値を示したが、DG群とG群に差はみられなかった(図3)。同様に Srd5a2 の発現も Srd5a1 と同様の傾向を示した。

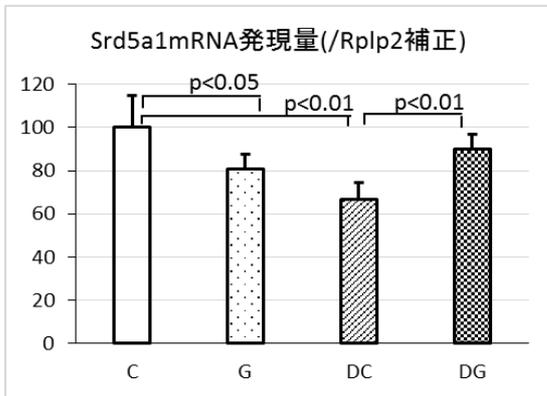


図3. 精巣 Srd5a1mRNA の発現に対する連続暗黒飼育と最良飼料の影響 (Rplp2 で補正し C 群を 100 とした)

以上のことより連続暗黒飼育により精巣の発達抑制は、アンドロゲンレセプターの低下、DHT 生成の低下が関与していること、メチオニン、ビタミンEおよびパントテン酸は、これらの低下を抑制し、精巣の発達抑制を改善する可能性が示唆された。

「最悪飼料」摂取時

精巣重量は、図4のようにDB群で低値を示し、連続暗黒飼育群では、B飼料により生殖器官の発達抑制が認められた。

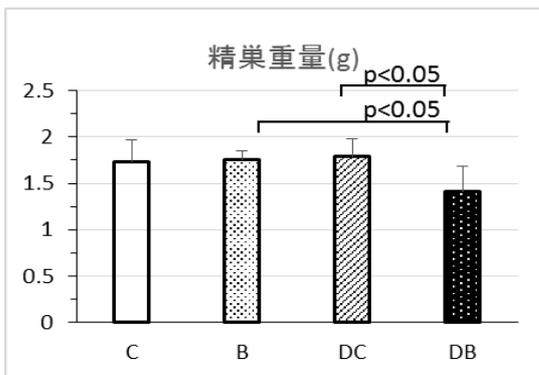


図4. 精巣重量に対する連続暗黒飼育と最悪飼料の影響

しかし、血清T濃度には4群間に有意な差は認められなかった。DB群は高値傾向を示したが、群内のばらつきが大きかった(図5)。

精巣中コレステロール濃度は、DC群がC群に比較し有意に高値を示したが、B群とDB群には差はみられなかった。また、血清コレステロール濃度は、DC群はC群より、DB群はB群より有意に高値を示した。血清アルブミン濃度は、DB群はB群およびDC群より低値を示し、タンパク質の栄養状態が低下していることが示された。

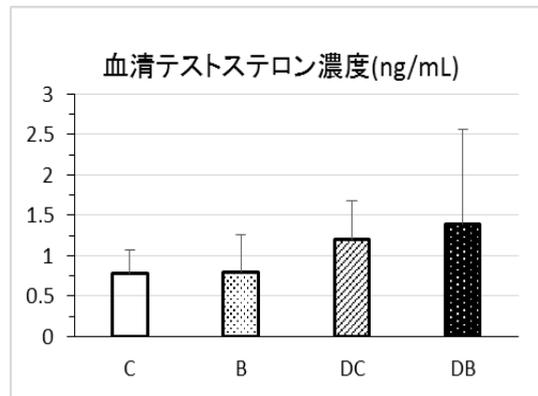


図5. 血清テストステロン濃度に対する連続暗黒飼育と最悪飼料の影響

精巣のアンドロゲンレセプターの発現は、明暗飼育条件の違いにより飼料の影響が異なっていた。正常明暗飼育群では、B飼料により低値を示したが、連続暗黒飼育群では、反対に高値を示した(図6)。

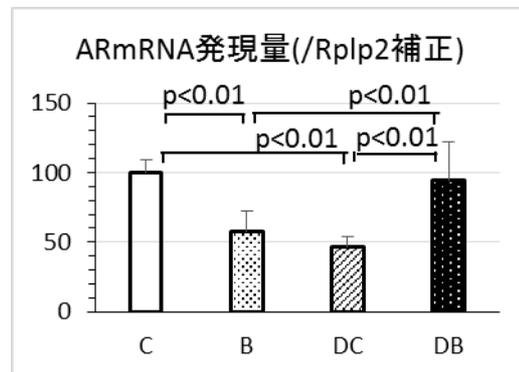


図6. 精巣 ARmRNA の発現に対する連続暗黒飼育と最悪飼料の影響 (Rplp2 で補正し C 群を 100 とした)

また、5 α -リダクターゼ(Srd5a1)の発現もアンドロゲンレセプターの発現と同様の結果であった(図7)。

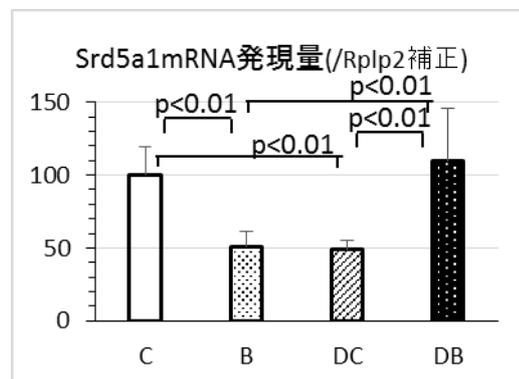


図7. 精巣 Srd5a1mRNA の発現に対する連続暗黒飼育と最悪飼料の影響 (Rplp2 で補正し C 群を 100 とした)

以上のことより、DB 群における精巢の発達抑制は、T 生成やアンドロゲンレセプターの発現とは関与していないことが示された。DB 群では、T を DHT に変換する酵素遺伝子の mRNA の発現が高まるという結果より、DHT の生成も高まっていると考えられる。DHT は、アンドロゲンレセプターとの結合の安定性が T より高いとされている。しかし、DB 群では精巢の発達抑制が起こっているという事実を考えると、T や DHT とのアンドロゲンレセプターの結合能の低下、また、結合したとしても標的とする遺伝子の DNA に結合できていない可能性も考えられる。

連続暗黒飼育による生殖器官の発達抑制は、バリン、リン、ビタミン D、ビタミン B1、ビタミン B6 を標準量より多く、脂質、カルシウム、ナトリウムを標準量より少なく、そしてトリプトファンを標準量摂取すると、促進されることが示された。これらの栄養素の摂取比率が、精巢におけるアンドロゲンレセプターとテストステロン、デヒドロテストステロンの働きを阻害している可能性が示唆された。

本研究より、正常明暗飼育と連続暗黒飼育では、テストステロンやデヒドロテストステロン、アンドロゲンレセプターに対する飼料栄養素の影響が異なることが示されたことから、このメカニズム解明に対する研究が必要であると考えられる。

当初は、時間制限給餌を実施し、連続暗黒飼育による生殖器官の発達抑制が解除できるか否かに関しても検討する予定であったが、「最良飼料」「最悪飼料」の組成の検討に時間をとられ実施できなかった。今後の研究課題としたい。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1)花井美保：「雌ラットの鉄栄養状態に及ぼす連続暗黒飼育と飼料タンパク質の影響」第 62 回日本栄養改善学会学術総会(2015 年 9 月、福岡)
- 2)花井美保、吉國未子、曳田遥菜、山田晶子、内田麻実：「成長期雌ラットに及ぼす連続暗黒飼育と飼料タンパク質量の影響」第 70 回日本栄養・食糧学会大会(2016 年 5 月、西宮、兵庫)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花井 美保(HANAI MIHO)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授
研究者番号： 70337781