

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 29 日現在

機関番号：32507

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617023

研究課題名(和文) 肥満に伴う雄性不妊の機構解明と不妊を改善する栄養成分の探索

研究課題名(英文) Study of the mechanism of obesity-associated infertility in male and search for nutrient component improving obesity associated infertility

研究代表者

鈴木 敏和 (Suzuki, Toshikazu)

和洋女子大学・生活科学系・准教授

研究者番号：70270527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は不妊の一要因である。本研究では、高脂肪食マウス肥満モデルにおける雄性不妊の機構を解析した。また、雄性不妊の改善に効果が期待されている栄養素L-カルニチンの効果についても調べた。肥満に伴って、精子運動能の低下と交配させた雌マウスの妊娠率の低下が見られた。L-カルニチンによる肥満雄マウスの妊娠能改善はみられなかった。精巣上体尾部の遺伝子発現解析の結果、肥満マウスでは精子成熟の過程でDNA損傷が引き起こされていること、その一部にpiRNAが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human studies have shown a direct relationship between obesity and infertility in men and women. In the present study, we examined the mechanism of infertility by high fat diet-induced obesity in male mice. In addition, we examined whether L-carnitine can improve male infertility with diet-induced obesity. High fat diet-obesity resulted in decreased sperm motility and reduction in pregnancies of female partners. L-carnitine supplementation itself did not seem to improve obesity-associated male infertility in male mice. Gene expression analysis of cauda epididymides suggested that DNA damage is increased in the sperm cells during spermatogenesis and/or sperm maturation in diet-induced obesity male mice and decreased expression of piRNA might be involved in the increased DNA damage in sperm.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：雄性不妊 肥満 高脂肪食 精巣 精巣上体

1. 研究開始当初の背景

日本では、夫婦の8~10組中、1組が不妊(子供を望むが2年以上できない)の問題を抱えている。その原因は、遺伝的要因・環境的要因が複雑に絡み合っており、一概に述べることは困難であるが、近代化に伴って生じた食生活の欧米化を含むライフスタイルの変化が大きな環境要因のひとつとして注目されている。肥満は、女性においては多嚢胞性卵巣症候群による排卵障害の原因となり、男性においては、精液中の精子数を減少させ、精子運動能力を低下させるという報告があった。このように、肥満は生活習慣病やがんの危険因子のみならず、不妊の原因でもありと考えられていたが、不妊の機構まで言及した研究は非常に少なかった。一方で、精子形成における低分子RNAの役割が着目を浴びはじめていた。精巣や精子には、microRNA(miRNA)と呼ばれる低分子RNAの発現量が他の組織よりも多く、成体精巣や精原細胞に特異的に発現するmiRNAがある。miRNA前駆体のプロセッシングに必要なDicer-1遺伝子破壊マウスでは正常な精子が作られず、その結果雄性不妊となる。また、生殖期にあるオス生殖細胞特異的に発現するpiwi-interacting RNA(piwiRNA)と呼ばれる別種類の低分子RNAが存在し、その結合タンパク質である3種類のPiwi遺伝子(Piwil1, Piwil2, Piwil4)のうち一つを破壊すると精子形成ができない、等が報告されていた。

2. 研究の目的

本研究では、肥満に伴う雄性不妊には、miRNA、piRNA、およびこれらRNAの機能を付与するタンパク質の発現量や活性低下が関与していると仮説を立てた。低分子RNA量の変化や機能低下が肥満に伴う雄性不妊に関わるかを明らかにすることを目的とした。また、miRNAの遺伝子サイレンシングタンパク質複合体への装着や、piRNAを介したレトロトランスポゾン転写産物発現抑制にシャペロンタンパク質が関与することが報告されていたので、「肥満 酸化ストレス増加 シャペロン活性の低下 低分子RNA機能低下 正常な精子の形成能力低下 雄性不妊」という環境応答が精巣で生じているのではないかと考え、肥満モデルマウスにおける雄性不妊を確認しつつ、精巣における遺伝子発現の面から応答経路を明らかにすることを目的とした。さらに、この応答を減弱し、不妊を改善できるような栄養成分の探索も行うことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肥満雄マウスの作製と交配雌マウスの妊娠率の調査: C57Bl/6J雄マウスへ高脂肪食(エネルギーの60%が脂質由来)を25週間間投与し、肥満雄マウスを作製した。対照群へは、通常食(エネルギーの10%が脂質由来)

を投与し、同期間飼育した。飼育期間終了後、1匹の雄あたり2匹の雌マウスと5日間交配を行った。交配後15-18日目に雌マウスを安楽死させ、子宮内の胎児数、生存状態、大きさなどを確認した。

(2) L-カルニチンの投与: 雄性不妊の改善効果にL-カルニチンが報告されていたので、肥満モデルマウスにおけるL-カルニチンの不妊改善効果を調べた。14週目から25週目までの12週間、高脂肪食マウスを2群に分け、1群を水の代わりに10%L-カルニチンを含む水を投与した。平均のL-カルニチン摂取量は、0.6mg/g体重/日であった。

(3) 脂肪蓄積量、血液分析、および精子の質の測定: 肥満雄マウスおよび対照マウスを安楽死後、脂肪組織を分離し、脂肪蓄積量の差を調べた。また、血漿中の糖および脂質量をドライケム法で測定した。血清中のテストステロンおよびエストロゲン値は競合ELISA法を使用した。精子の質の測定は、安楽死させた雄マウスの精巣上体尾部(左側)を取り出し、精子を培養液中により精子を培養液中に分散させた。その後、精子の運動能力をComputer Aided Sperm Analysis装置を用いて調べた。

(4) RNA発現量の測定: 精巣や精巣上体より低分子RNAを含む全RNAを調製した。

精巣より調製したRNAサンプルを用いて、遺伝子マイクロアレイ解析(SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray, Agilent)およびマイクロRNA解析(miRCURY™ miRNA microarray, Exiqon)を行った。マイクロアレイ解析等の結果の再現性の確認は、定量逆転写PCR(QPCR)法を用いた。

精巣上体尾部より調製したRNAサンプルを用いて雄性不妊関連遺伝子を標的としたPCR array解析(RT² Profiler PCR Arrays, SA Biosciences)を行った。

(5) タンパク質発現量の測定: 精巣よりタンパク質ライゼートを調製し、ウエスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) 本実験で作成した肥満モデルマウスは、対照マウスと比べて、体重が1.6倍であった。L-カルニチンを投与した肥満マウスは、対照と比べて体重は1.5倍であった。肥満マウスは、L-カルニチン投与により血清のコレステロール値とグルコース値、肝臓の中性脂質値とコレステロール値を部分的に改善した。血清中のテストステロンおよびエストロゲン値は個体差が大きく、有意な差は見られなかった。精巣上体より取り出した精子数は、3群間で差が見られなかったが、肥満マウスの精子の運動率および前進運動率は対照マウスと比べて、それぞれ33%、46%減少した。L-カルニチンの投与は有意に精子の運動率や全身運動率を上げなかったが上昇の傾向は見られた。交配させた雌マウスの妊娠率は、対照マウスは80%、肥満マウスは0%、肥満

+カルニチン投与マウスは20%であった。一腹当たりの胎児数は、対照マウスと肥満+カルニチン投与マウスで差が見られなかった。以上の結果は、カルニチンが雄マウスの妊孕能を一部改善したと解釈することもできるが、雌マウスを妊娠させた肥満+カルニチン投与マウスは、1匹だけであり個体差も考えられる。今回は、はっきりとした改善効果が見られなかったと解釈した。

(2) 精巣のマイクロRNAアレイ解析の結果、1.5倍以上の差が見られた17種類のマイクロRNAを見いだした。コンピューター解析等により、精子形成や成熟に関係するような標的遺伝子を検索したが候補は見つからなかった。また、精巣の遺伝子マイクロアレイ解析では、脂質代謝に関連するいくつかの遺伝子について、肥満マウスで発現量が増加、肥満+カルニチン投与マウスで対照群と同じレベルに戻ることが示されたが、精子形成関連遺伝子やシャペロン遺伝子ではmRNAの発現量の差が見られるものは無かった。HSP70、HSP90などのシャペロンタンパク質の発現量も差は見られなかった。

(3) 精巣上体尾部より全RNAを抽出し、雄性不妊に関連している84遺伝子についてPCR-Array解析を行った。その結果、DNA組換え修復に関わる一遺伝子の発現量上昇とpiRNA産生に関わる一遺伝子の発現量低下、およびヌクレオソーム構成タンパク質のヒストンからプロタミン置換に関与する一遺伝子の発現量低下を見いだした。また有意差は見られなかったが、SOD1およびSOD2遺伝子の発現量の上昇傾向が観察された。これらの結果より、肥満に伴って活性酸素ストレス状態に有ること、piRNA産生量の低下に伴ってクロマチン凝集度やプロタミンタンパク質へのクロマチンの置換が正常に進んでいないこと、その結果精子染色体DNAの損傷が引き起こされ、DNA組換え修復に関わる遺伝子が増加していることが示唆された。piRNAの産生低下はエピジェネティックにトランスポゾン遺伝子を活性化させる。今後、肥満に伴う精子クロマチンの損傷との関連を調べる予定である。

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 8件)

1. 高橋美知代、鈴木敏和、高木亜由美、金子健彦、松本光、額田均、橋詰直孝. 入院高齢者における栄養アセスメント追跡調査. 和洋女子大学紀要 54, 25-34.2014.
2. Testuo Sato, Kazuko Kita, Shigeru Sugaya, Toshikazu Suzuki, Nobuo Suzuki. Extracellular release of annexin II from pancreatic cancer cells and resistance to anticancer drug-induced apoptosis by supplementation of recombinant annexin II.

Pancreas 41, 1247-1254. 2012.

3. 高木亜由美、本三保子、鈴木敏和. 緑茶抽出物はラットの血清 HDL-コレステロール値を増大させる. 和洋女子大学紀要 52, 23-33.2012.
4. 鈴木敏和、森瀬結実香、高橋沙由里、友木屋理美、野村純. ヒト線維芽細胞培養系を用いたセイヨウオトギリソウ抽出物の創傷治癒に及ぼす効果. 和洋女子大学紀要 52, 13-22.2012.
5. Qian Ren, Xia Jiang, Shi-Ping Chen, Masataka Yoshida, Xiao-Bo Tong, Wen-Zhi Guo, Toshikazu Suzuki, Shigeru Sugaya, Takeshi Tanaka, Kazuko Kita, Nobuo Suzuki. 11. Cytotoxicity of tap and first-class-river water in eastern Japan. Chiba Medical Journal 87, 189-194.2011.
6. Hiroshi Ihara, Toshikazu Suzuki, Naotaka Hashizume. Whole blood concentration of thiamine diphosphate requires correction for red blood cell count in the nutritional assessment of thiamine status. Journal of Analytical Bio-Science 34, 218-222. 2011.
7. Muhammed Zahed, Toshikazu Suzuki, Kazuko Kita, Shigeru Sugaya, Nobuo Suzuki. Screening of novel peptide ligands bound to the carboxy-terminal domain of GRP94 by phage display. Chiba Medical Journal 87, 61-68.2011.
8. Kazuko Kita, Katsuo Sugita, Shi-ping Chen, Toshikazu Suzuki, Shigeru Sugaya, Takeshi Tanaka, Testuo Sato. Xia-bo Tong, Nobuo Suzuki. Extracellular recombinant annexin II confers UVC resistance and increases the Bcl-xL to Bax protein ratios in human UVC-sensitive cells. Radiation Research 176, 732-742.2011.

[学会発表](計 11件)

1. Mayumi Nagata, Ayumi Takagi, Toshikazu Suzuki. L-Carnitine does not improve obesity associated reduced fertility in male mice. Metabolism, Diet and Disease Conference 2014. May 28-30, 2014. Washington DC, USA
2. Toshikazu Suzuki, Mayumi Nagata, Ayumi Takagi. Catechin-rich green tea extract increases the expression of genes of the cholesterol synthetic pathways in liver of normal diet- and high fat diet-fed rats. Metabolism, Diet and Disease Conference 2014. May 28-30, 2014. Washington DC, USA
3. Michiyo Takahashi, Toshikazu Suzuki, Hikaru Matsumoto, Hitoshi Nukada, Naotaka Hashizume. Long-term hospitalized elderly people have lowered L-carnitine and coenzyme Q10 in blood than independent elderly people. Metabolism, Diet and Disease Conference 2014. May 28-30, 2014. Washington DC, USA
4. 高橋美知代、鈴木敏和、金子健彦、松本光、

- 額田均、橋詰直孝. 長期入院高齢者における血中 L-カルニチンおよびコエンザイム Q10 レベル. 第 35 回日本臨床栄養学会総会・第 34 回日本臨床栄養協会総会 第 11 回大連合大会. 2013 年 10 月 4 日 . 京都 .
5. Michiyo Takahashi, Toshikazu Suzuki, Ayumi Takagi, Naotaka Hashizume, Hikaru Matsumoto. Blood levels of the micronutrients vitamin B1 and zinc decrease with advancing age in normally-nourished elderly aged 75 and over. The 20th Congress of the International Association of Gerontology. June 24-25, 2013. Seoul South Korea.
6. Koko Udagawa-Rusu, Toshikazu Suzuki, Yukie Yanagisawa. Assessing the situation of problems concerning meals and nutrition for the elderly under home care. The 20th Congress of the International Association of Gerontology. June 24-25, 2013. Seoul South Korea.
7. 高橋美知代、高木亜由美、鈴木敏和、松本光、額田均. 自立高齢者と入院高齢者の血液・生化学的栄養アセスメントの継時的変化の比較研究. 第 34 回日本臨床栄養学会総会・第 33 回日本臨床栄養協会総会 第 10 回大連合大会. 2012 年 10 月 7 日 . 東京 .
8. Toshikazu Suzuki, Ayumi Takagi, Michiyo Takahashi. Catechin-rich green tea extract increased serum cholesterol levels in normal diet- and high fat diet-fed rats. First Conference on Metabolism, Diet and Disease. May 29-31, 2012. Washington DC, USA
9. Michiyo Takahashi, Ayumi Takagi, Toshikazu Suzuki, Hikaru Matsumoto. Blood levels of the micronutrient zinc decrease with advancing age in normally nourished elderly persons. First Conference on Metabolism, Diet and Disease. May 29-31, 2012. Washington DC, USA
10. Koko Udagawa-Rusu, Toshikazu Suzuki, Yukie Yanagisawa. Appliance of domiciliary nutrition instruction method for the elderly people requiring long-term care in Japan. First Conference on Metabolism, Diet and Disease. May 29-31, 2012. Washington DC, USA
11. Toshikazu Suzuki, Jun Lu, Gaofeng Hu, Kazuko Kita, Nobuo Suzuki. Continuous approach for knockdown of GRP78 fails to downregulate GRP78 protein expression but increases sensitivity to cisplatin in HeLa cells. 16th World Congress on Advances in Oncology 14th International Symposium on Molecular Medicine. October 6-8, 2011. Rhodes Island, Greece.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 敏和 (Toshikazu Suzuki)
 和洋女子大学・生活科学系・准教授
 研究者番号：70270527

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

〔図書〕(計 0 件)