

称号及び氏名	博士（獣医学）	太田 祥弘
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	<i>Lepidium meyenii</i> （マカ）抽出物がラット精巣アンドロジェン産生に及ぼす影響に関する研究	
論文審査委員	主査	玉田 尋通
	副査	稲葉 俊夫
	副査	岡田 利也

論文要旨

緒言

近年、ヒトでは加齢に伴う精巣機能の減退が QOL 低下の一因として問題になっている。家畜においても精子形成が阻害される夏季不妊症や種雄畜の精液性状の劣化が繁殖率を低下している。精巣機能低下の原因として、加齢、肥満および暑熱ストレス等がホルモン分泌や精子形成を低下させることが報告されている。これらの障害に対してホルモン補充療法が試みられてきたが、副作用などの問題があり、より安全な対処法が求められている。

Lepidium meyenii（マカ）は南米原産のアブラナ科の植物であり、ペルーアンデス地域では主に食料として用いられている。また、古来より生殖機能を促進する効果が伝えられてきた。マカの特徴的な成分として、マカエン、マカミドといった不飽和脂肪酸類、香りの元となるグルコシノレート類等が含まれているが、生殖機能に影響を及ぼす成分は未だ不明である。

雄動物の生殖器には、精巣ホルモン産生と精子形成を担う精巣、副生殖腺である前立腺、精嚢腺、尿道球腺、精子の成熟や運動性獲得に重要な役割を果たす精巣上体等が含まれる。精巣ホルモンの中でも精子形成と副生殖腺の発育や機能を促進するホルモンとしてアンドロジェンが挙げられる。アンドロジェンは精巣のライディッヒ細胞で産生され、その代表的ホルモンはテストステロンである。血中の黄体形成ホルモン（LH）がライディッヒ細胞の LH 受容体に結合すると、アデニレートサ

イクラーゼの活性化により、cAMP の産生が促進される。増加した cAMP はミトコンドリアに存在する steroidogenic acute regulatory protein (StAR) の発現と活性を促進する。StAR はステロイド合成の基質となるコレステロールを細胞質からミトコンドリア内膜へと輸送し、コレステロールはミトコンドリア内膜の P450 side chain cleavage enzyme (P450scc)によりプレグネノロンへと変換される。プレグネノロンは滑面小胞体で 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)、17 α -hydroxylase、C₂₀-C₁₇ side chain cleavage enzyme (P450c17) および 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) などのステロイド代謝酵素により段階的に変換され、テストステロンが産生される。しかし、ステロイド産生に対するマカの影響については不明な点が多い。また、加齢による生殖機能の低下は精巣ライディッヒ細胞の機能低下によるアンドロジェン産生量の減少が一因であることが知られている。しかし、マカが加齢によるステロイド産生能の低下にどのような影響を及ぼすのかは明らかでない。

本研究では本邦で広く用いられている加水アルコール抽出マカエキス末 (MACAXS[®], TOWA CORPORATION, 東京) を用い、各種週齢の雄ラットの生殖機能に及ぼす影響について、精巣のステロイド合成に焦点を当てて調べた。

第 1 章 若齢雄ラットへのマカエキス末 6 週間給与が生殖器に及ぼす影響

げっ歯類にマカを給与した後の血中テストステロン濃度については、変化がみられないという報告が多いが、若齢マウスに 30 日間マカ粉末を給与した場合に血中テストステロン濃度が増加したことが報告されている。本実験ではマカエキス末を含む飼料もしくは含まない飼料を若齢雄ラット (8 週齢) に 6 週間給与し、生殖器、血中 LH およびテストステロン濃度に及ぼす影響、ならびに精巣の形態と機能の変化を調べた。

第 1 節 生殖器と血中テストステロン濃度の変化

マカエキス末給与群では精囊腺の重量が対照群に比べて有意に増加した。LH の血中濃度は群間で差はみられなかった。一方、血中テストステロン濃度は対照群に比べ、マカエキス末給与群で有意に増加した。これらの結果からマカエキス末の給与が、精巣におけるテストステロン産生を促進することにより、血中テストステロン濃度が増加し、増加したテストステロンにより精囊腺の重量が増加したものと考えられた。

第 2 節 精巣ライディッヒ細胞における形態的および機能的変化

精巣の 3 β -HSD を免疫組織化学染色し、ライディッヒ細胞の数と面積を調べたところ、マカ給与群のライディッヒ細胞の細胞数は対照群と比べて差がなかったが、細胞面積は増加した。また、ステロイド産生に関与する LH 受容体、StAR、P450scc、3 β -HSD、P450c17 および 17 β -HSD の精巣における mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法を用いて測定したところ、マカエキス末給与群では 3 β -HSD の発現量が対照群と比べて増加した。さらにパーコール密度勾配遠心法を用いてライディッヒ細胞を分離し、LH 活性を持つ人絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG)、細胞膜を通過して cAMP として作用する dbcAMP、P450scc の基質となる 22(R)-ヒドロキシコレステロールあるいは 3 β -HSD の基質となるプレグネノロンを添加し、2 時間培養後に培養液

中のテストステロン濃度を測定してライディッチ細胞のテストステロン産生量を調べた。マカエキス末給与群のライディッチ細胞では 22(R)-ヒドロキシコレステロールあるいはプレグネノロンを培養液に添加した際にテストステロン産生量が対照群と比べて有意に増加した。これらの結果から、マカエキス末給与によりライディッチ細胞におけるテストステロン産生能が増強されること、さらにこの効果にコレステロール以降のステロイド合成酵素、特に 3 β -HSD が関与している可能性が示唆された。

第 2 章 マカエキス末給与が加齢雄ラットに及ぼす影響

マカによるテストステロン産生増加作用が加齢による生殖機能の減退を緩和するか否かについては明らかでない。本章ではマカエキス末の老齢雄ラットへの 6 週間給与、ならびに若齢および成熟雄ラットへの長期給与が生殖器、血中テストステロン濃度およびライディッチ細胞のテストステロン産生能に及ぼす影響について調べた。

第 1 節 老齢雄ラットへのマカエキス末 6 週間給与後の生殖器重量と血中テストステロン濃度

老齢雄ラット (54 週齢) にマカエキス末を 6 週間給与し、精囊腺、精巣上部および精巣重量、血中テストステロン濃度について調べたところ、マカエキス末給与群の値はいずれの測定項目についても対照群と比べて差がなかった。これらの結果から老齢雄ラットへのマカエキス末 6 週間給与は血中テストステロン濃度や生殖器重量に影響を及ぼさないものと考えられた。

第 2 節 若齢および成熟雄ラットへのマカエキス末長期給与が血中テストステロン濃度と精巣ライディッチ細胞におけるテストステロン産生能に及ぼす影響

マカエキス末を若齢 (8 週齢) あるいは成熟 (18 週齢) 雄ラットに長期間 (27 あるいは 30 週間) 給与し、6 週間毎に血中テストステロン濃度を調べたところ、若齢雄ラットではマカエキス末給与 6 週間後に対照群と比べて、血中テストステロン濃度が有意に増加したが、それ以降の週齢では群間に差はなかった。一方、成熟雄ラットでは血中テストステロン濃度はいずれの週齢でも群間で差がなかった。若齢雄ラットへのマカエキス末の給与が一時的に血中テストステロン濃度を増加させたがそれ以降は LH 分泌のフィードバック調節等により、対照群と同等の血中テストステロン濃度が維持された可能性が考えられた。加齢によってライディッチ細胞におけるテストステロン産生能が低下することが分かっていることから、マカエキス末を長期間給与した加齢雄ラットから精巣ライディッチ細胞を採取し、ステロイド産生刺激因子と共に培養を行い、培養液中のテストステロン濃度を EIA 法で測定した。その結果、加齢によるライディッチ細胞のテストステロン産生能の著しい減退が確認され、マカエキス末を 8 週齢から給与した群では hCG 添加時に、18 週齢から給与した群では 22(R)-ヒドロキシコレステロール添加時にライディッチ細胞におけるテストステロン産生量が対照群に比べて有意に増加した。これらの結果から、雄ラットへのマカエキス末の長期給与が加齢によるライディッチ細胞におけるステロイド産生能の低下を軽減させる可能性が示唆された。また、マカエキス末給

与開始週齢あるいはライディッヒ細胞採取週齢の違いにより、その作用点が異なる可能性が示唆された。

第3章 マカエキス末およびその代謝物のライディッヒ細胞への直接作用

ライディッヒ細胞へのマカエキス末の直接作用を調べた報告はない。また、マカエキス末に含まれるベンジルグルコシノレートはミロシナーゼによりベンジルイソチオシアネートへと変換されて、血中に認められる。ベンジルイソチオシアネートは Nrf2-ARE シグナルを活性化し、抗酸化タンパク質を誘導することが様々な細胞で報告されている。そこで成熟雄ラットの精巣から分離したライディッヒ細胞をマカエキス末あるいはベンジルイソチオシアネートを添加して2日間培養し、培養液中のテストステロン濃度を測定して、ライディッヒ細胞のテストステロン産生量を調べた。さらに、培養後のライディッヒ細胞から mRNA を抽出し、ステロイド産生関連因子 (LHR、StAR、P450scc および 3 β -HSD) および Nrf2-ARE 経路の制御下にある NQO1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。その結果、ライディッヒ細胞によるテストステロン産生量はマカエキス末の添加に影響されなかったが、ベンジルイソチオシアネート添加により対照群と比べて有意に増加した。さらに StAR および NQO1 の mRNA 発現量がイソチオシアネート添加群で対照群に比べて有意に増加した。これらの結果から、マカによる精巣ライディッヒ細胞におけるステロイド産生能の増加にベンジルイソチオシアネートおよび Nrf2-ARE 経路が関与している可能性が示唆された。

結論

本研究はマカエキス末給与が若齢ラットのライディッヒ細胞におけるテストステロン産生能を増強すること、およびその長期給与が加齢によるライディッヒ細胞のテストステロン産生能の低下を軽減することを示した。また、マカに含まれるベンジルグルコシノレートの代謝物であるイソチオシアネートがライディッヒ細胞のステロイド合成および Nrf2-ARE 経路に関与する可能性を示唆した。

審査結果の要旨

近年、精液性状の劣化による生殖効率の低下や加齢に伴う精巣機能の減退がヒトと家畜で問題になっている。精巣機能低下に対してホルモン補充療法が試みられているが、副作用などの問題があり、より安全な対処法が求められている。一方、南米原産のアブラナ科の植物である *Lepidium meyenii* (マカ) は、古来より生殖機能を促進する効果が伝えられてきた。しかし、その作用機序や生殖機能改善に関与する成分は未だ不明な点が多い。

精子形成と副生殖腺の発育や機能を促進するホルモンとして精巣のライディッヒ細胞で産生されるアンドロジェンが挙げられ、その代表的ホルモンとしてテストステロンが知られている。ライディッヒ細胞におけるテストステロン産生に対するマカの影響については未だ明らかでない。また、加齢による生殖機能の低下は、酸化ストレスに起因する精巣ライディッヒ細胞のアンドロジェン産生能の低下が一因であることが知られている。本研究は、ライディッヒ細胞のテストステロン産生に焦点を当て、各種週齢の雄ラットの生殖機能に及ぼす加水アルコール抽出マカエキス末給与の影響について調べた。さらに、培養ライディッヒ細胞のテストステロン産生とステロイド関連因子の遺伝子発現に及ぼすマカエキス末とその代謝物の影響を調べた。

第1章ではマカエキス末の若齢雄ラットへの6週間給与が、血中テストステロン濃度を増加し、精嚢腺重量を増加すること、また、マカエキス末給与によりライディッヒ細胞におけるテストステロン産生能が増強されることを示し、さらにこの効果にコレステロール以降のステロイド合成酵素、特に 3β -hydroxy steroid dehydrogenase が関与する可能性を示唆した。

第2章ではマカエキス末の老齢雄ラットへの6週間給与は血中テストステロン濃度と生殖器重量に影響を及ぼさないこと、ならびに若齢および成熟雄ラットへのマカエキス末の長期(27~30週間)給与がライディッヒ細胞の加齢に伴うテストステロン産生能の低下を緩和することを明らかにした。さらに、若齢雄ラットではマカエキス末6週間給与後に対照群と比べて血中テストステロン濃度が有意に増加したが、それ以降の週齢では群間に差がないこと、また、成熟雄ラットでは血中テストステロン濃度はいずれの週齢でも群間で差がないことを示した。

第3章ではマカエキス末およびその代謝物のライディッヒ細胞への直接作用を調べている。マカエキス末に含まれるベンジルグルコシノレートはミロシナーゼによりベンジルイソチオシアネートへと変換されて血中に認められる。ベンジルイソチオシアネートは nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) - antioxidant response elements (ARE) 経路を活性化し、抗酸化タンパク質を誘導することが様々な細胞で報告されている。そこで、成熟雄ラットの精巣から分離したライディッヒ細胞にマカエキス末あるいはベンジルイソチオシアネートを添加して2日間培養し、テストステロン産生量を調べた。また、培養後のライディッヒ細胞におけるステロイド産生関連因子および Nrf2-ARE 経路の制御下にある NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。その結果、ライディッヒ細胞のテストステロン産生量は、マカエキス末の添加では影響を受けなかったが、ベンジルイソチオシアネート添加により対照群と比べて有意に増加した。さらにベンジルイソチオシアネート添加群ではステロイド産生律速因子の一つである steroidogenic acute regulatory protein および NQO1 の mRNA 発現量が対照群と比べて有意に増加した。これらの結果から、マカによる精巣ライディッヒ

細胞におけるステロイド産生能の増加にベンジルイソチシアネートおよび Nrf2-ARE 経路が関与する可能性が示唆された。

以上のように、本研究はマカエキス末給与が若齢雄ラットのライディッチ細胞におけるテストステロン産生能を増強し、血中テストステロン濃度を一時的に増加すること、ならびにマカエキス末の長期給与が加齢によるライディッチ細胞のテストステロン産生能の低下を緩和することを示した。また、マカに含まれるベンジルグルコシノレート代謝物であるベンジルイソチシアネートがライディッチ細胞のステロイド合成および Nrf2-ARE 経路の活性化に関与する可能性を示唆した。これらの研究成果は、ヒトや家畜の性機能改善に向けた基礎研究として重要な知見であり、また、医学・獣医学の発展に大きく貢献すると判断されるだけでなく、マカの応用に向けた基礎知見としての社会的貢献度も高い。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。