

(別紙1)

論文の内容の要旨

氏 名	中木（横田） 直子		
論文題目	(外国語の場合は、日本語で訳文を()を付して記入すること。) Estradiol replacement improves high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in postmenopausal model rats. (閉経モデルラットの高脂肪食誘発性肥満およびインスリン抵抗性に対するエストロゲンの改善効果とそのメカニズム)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	委員長		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
内 容 の 要 旨			
<p>閉経後女性では、女性ホルモンであるエストロゲンが著減するとともに、肥満やメタボリックシンドロームなどの罹患率が上昇する。一方、近年、中高年女性においてエネルギー摂取量に占める脂質摂取量の割合である脂肪エネルギー比率が増加しており、高脂肪食（HFD）が肥満に留まらず、代謝疾患のリスクファクターとなる可能性が懸念される。しかし、HFDが閉経後女性におけるエネルギー摂取調節や糖代謝に与える影響については不明な点が多い。さらに、それらの影響に対してエストロゲン補充はいかなる作用を発揮するののかも明確になっていない。そこで本研究では、閉経モデル動物として確立されている卵巣摘出（OVX）ラットを用い、HFDにて長期間飼育することによって生じる高脂肪食誘発性肥満および糖代謝障害に対するエストロゲンの改善効果とそのメカニズムについて検討した。</p> <p>第1章では、OVXラットへの慢性HFD投与によるエネルギー摂取量増加および体重増加をエストロゲン補充が抑制する可能性、およびそのメカニズムとして摂食亢進作用を持つ消化管ペプチドであるグレリンが関与する可能性について検討を加えた。</p> <p>実験では、雌性ラットの両側卵巣を摘出し、その4週間後に17β-estradiol（E₂）補充を行ったE₂群と偽薬を補充したプラセボ（Pla）群の2群を用いて、補充と同時に4週間のHFD投与を開始した。HFDによりPla群ではエネルギー摂取量および体重が増加したが、E₂群では短期的にエネルギー摂取量が減少した。HFD投与後4週間目には、E₂群のエネルギー摂取量はPla群と同じレベルにまで回復したが、体重および腹部内臓・単径部皮下脂肪重量はPla群の方が有意に高値を示した。つまり、E₂補充はHFD飼育下においてもエネルギー摂取量を調節し、抗肥満作用を発揮することが明らかになった。そのメカニズムを解明するため、主に胃の内分泌細胞で産生されるグレリンの摂食促進作用に与えるE₂の影響について検討を行った。その結果、グレリン受容体アゴニストであるGrowth hormone-releasing peptide（GHRP）-6の腹腔内投与は、Pla群のHFD摂取量を増加させ、摂食中枢である視床下部弓状核において、神経細胞活性化の指標であるc-Fos陽性細胞数を増加させたが、E₂群においてはHFD摂取量・</p>			

c-Fos 陽性細胞数ともに影響を与えないことが分かった。さらに、胃でのグレリンおよびグレリン受容体タンパク質レベルは、Pl_a 群よりも E₂ 群で有意に低かった。したがって、HFD 飼育下の閉経モデルラットに対する E₂ 補充は、胃のグレリンとその受容体を減少させることによって、グレリンの摂食促進作用を抑制し、HFD 誘発性肥満を改善することが示唆された。

第 2 章では、閉経モデルラットへの HFD 投与がインスリン感受性に与える影響、および HFD によるインスリン感受性の変化に及ぼす E₂ 補充の影響を検討している。さらに、骨格筋・肝臓におけるインスリン依存性シグナル伝達経路について検討を加え、E₂ の作用機序を詳細に分析している。実験では、17 週齢のラットに経静脈糖負荷試験を実施し、全身のインスリン感受性の指標としてグルコース・インスリン指数を測定した。その結果、Pl_a 群では普通食と比較して HFD ではインスリン感受性の低下が見られたが、E₂ 群では HFD による変化は見られず、E₂ 補充には HFD 誘発性インスリン抵抗性を改善する作用があると考えられた。さらに、*in vivo* にて肝門脈内インスリン投与後に摘出した腓腹筋では、インスリンシグナル経路におけるプロテインキナーゼ B (Akt) のサブタイプである Akt2 タンパク質量が普通食飼育下では Pl_a 群より E₂ 群の方が多かったが、インスリン刺激による Akt2 のリン酸化は両群とも同様に増加した。一方、高脂肪食飼育下では E₂ 群においても Akt2 タンパク質量の増加は観察されなくなったが、インスリンによる Akt2 リン酸化反応は、E₂ 群でのみ観察された。さらに、Akt の下流に存在する分子量 160 kDa の Akt 基質 (AS160) のインスリンによるリン酸化は普通食・高脂肪食を問わず、E₂ 群のみで観察され、両群間には統計学的に有意な差が認められた。これらの結果から、E₂ 補充は、HFD 飼育下の OVX ラットの腓腹筋において Akt2/AS160 経路を活性化することによりインスリン感受性を改善することが判明した。

第 3 章では、骨格筋へのグルコース取り込みに関与するインスリン非依存性経路と言われる AMP キナーゼ経路における E₂ の作用について検討を加えた。その結果より、HFD は AMP キナーゼやその下流にあり glucose transporter 4 (GLUT4) 輸送を調節する TBC1 (Tre2, BUB2, CDC16) domain family member 1 (TBC1D1) の発現や活性化に影響を与えず、GLUT4 のタンパク質レベルにも影響しなかった。また、E₂ もこれらに明確な作用を示さないことが判明した。

以上より、本研究は、閉経モデルラットへの E₂ 補充が HFD 飼育下においてグレリン作用の抑制による摂食抑制・抗肥満作用を示すとともに、腓腹筋のインスリンシグナル伝達において Akt2/AS160 経路の活性化によるインスリン感受性亢進作用を発揮し、HFD 誘発性の糖代謝障害を改善することを明らかにした。

(別紙2)

論文審査の結果の要旨

氏 名			
論文題目	(外国語の場合は、日本語で訳文を()を付して記入すること。) Estradiol replacement improves high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in postmenopausal model rats. (閉経モデルラットの高脂肪食誘発性肥満およびインスリン抵抗性に対するエストロゲンの改善効果とそのメカニズム)		
審査委員	区分	職 名	氏 名
	委員長		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
要 旨			
<p>本研究はその背景に閉経後女性が直面する課題として、女性ホルモンであるエストロゲンが著減するとともに、肥満やメタボリックシンドロームなどの罹患率が上昇することを挙げている。さらに、近年、中高年女性においてエネルギー摂取量に占める脂質摂取量の割合である脂肪エネルギー比率が増加しており、高脂肪食（HFD）が肥満に留まらず、代謝疾患のリスクファクターとなる可能性が懸念されることも言及している。しかし、HFD が閉経後女性におけるエネルギー摂取調節や糖代謝に与える影響については不明な点が多い。さらに、それらの影響に対してエストロゲン補充はいかなる作用を発揮するのかも明確になっていない。そこで本研究では、閉経モデル動物として確立されている卵巣摘出（OVX）ラットを用い、HFDにて長期間飼育することによって生じる高脂肪食誘発性肥満および糖代謝障害に対するエストロゲンの改善効果とそのメカニズムについて検討している。本論文は3章からなる。</p> <p>第1章では、OVX ラットへの慢性 HFD 投与によるエネルギー摂取量の増加と体重増加をエストロゲン補充が抑制する可能性、およびそのメカニズムとして摂食亢進作用を持つ消化管ペプチドであるグレリンが関与する可能性について検討を加えている。</p> <p>実験では、雌性ラットの両側卵巣を摘出し、その4週間後に 17β-estradiol (E_2) 補充を行った E_2 群と偽薬を補充したプラセボ ($P1a$) 群の2群を用いて、補充と同時に4週間の HFD 投与を開始している。HFD により $P1a$ 群ではエネルギー摂取量と体重が増加したが、E_2 群では短期的にエネルギー摂取量が減少した。HFD 投与後4週間目には、E_2 群のエネルギー摂取量は $P1a$ 群と同じレベルにまで回復したが、体重および腹部内臓・単径部皮下脂肪重量は $P1a$ 群の方が有意に高値を示した。つまり、E_2 補充は HFD 飼育下においてもエネルギー摂取量を調節し、抗肥満作用を発揮することを明らかにしている。そのメカニズムを解明するため、主に胃の内分泌細胞で産生されるグレリンの摂食促進作用に与える E_2 の影響について検討を行っている。その結果、グレリン受容体アゴニストである Growth hormone-releasing peptide (GHRP)-6 の腹腔内投与は、$P1a$ 群の HFD 摂取量を増加させ、摂食中枢である視床下部弓状核</p>			

において、神経細胞活性化の指標である c-Fos 陽性細胞数を増加させたが、E₂ 群においては HFD 摂取量・c-Fos 陽性細胞数ともに影響を与えないことを見出している。さらに、胃でのグレリンおよびグレリン受容体タンパク質レベルは、Pla 群よりも E₂ 群で有意に低かった。したがって、HFD 飼育下の閉経モデルラットに対する E₂ 補充は、胃のグレリンとその受容体を減少させることによって、グレリンの摂食促進作用を抑制し、HFD 誘発性肥満を改善することを示す結果と言える。本知見はこれまでに報告のなかった新たなもので学術的価値が高いと考えられる。また、本研究は生体での生理実験から摘出サンプルの標的遺伝子発現解析までの幅広い方法を使って結果を導き出しており信頼性が高い。

第 2 章では、閉経モデルラットへの HFD 投与がインスリン感受性に与える影響、および HFD によるインスリン感受性の変化に及ぼす E₂ 補充の影響を検討している。さらに、骨格筋・肝臓におけるインスリン依存性シグナル伝達経路について検討を加え、E₂ の作用機序を詳細に分析している。実験では、17 週齢のラットに経静脈糖負荷試験を実施し、全身のインスリン感受性の指標としてグルコース・インスリン指数を測定している。その結果、Pla 群では普通食と比較して HFD ではインスリン感受性の低下が見られたが、E₂ 群では HFD による変化は見られず、E₂ 補充には HFD 誘発性インスリン抵抗性を改善する作用があることを明らかにしている。さらに、*in vivo* にて肝門脈内インスリン投与後に摘出した腓腹筋において、インスリンシグナル経路におけるプロテインキナーゼ B (Akt) のサブタイプである Akt2 タンパク質量が普通食飼育下では Pla 群より E₂ 群の方が多かったが、インスリン刺激による Akt2 のリン酸化は両群とも同様に増加した。一方、高脂肪食飼育下では E₂ 群においても Akt2 タンパク質量の増加は観察されなくなったが、インスリンによる Akt2 リン酸化反応は、E₂ 群でのみ観察された。さらに、Akt の下流に存在する分子量 160 kDa の Akt 基質 (AS160) のインスリンによるリン酸化は普通食・高脂肪食を問わず、E₂ 群のみで観察され、両群間には統計学的に有意な差が認められた。これらの結果から、E₂ 補充は、HFD 飼育下の OVX ラットの腓腹筋において Akt2/AS160 経路を活性化することによりインスリン感受性を改善すると結論づけている。このような知見はこれまでに報告がなく、重要な結果と言える。

第 3 章では、骨格筋へのグルコース取り込みに関与するインスリン非依存性経路と言われる AMP キナーゼ経路における E₂ の作用について検討を加えた。その結果より、HFD は AMP キナーゼやその下流にあり glucose transporter 4 (GLUT4) 輸送を調節する TBC1 (Tre2, BUB2, CDC16) domain family member 1 (TBC1D1) の発現や活性化に影響を与えず、GLUT4 のタンパク質レベルにも影響しなかった。また、E₂ もこれらに明確な作用を示さないことを見出している。

以上より、本研究は、閉経モデルラットへの E₂ 補充が HFD 飼育下においてグレリン作用の抑制による摂食抑制・抗肥満作用を示すとともに、腓腹筋のインスリンシグナル伝達において Akt2/AS160 経路の活性化によるインスリン感受性亢進作用を発揮し、HFD 誘発性の糖代謝障害を改善することを明らかにしている。本研究結果は、女性における閉経後の肥満・糖代謝異常発症における高脂肪の食事のリスクに関する有用な基礎データを提供できると考えられ、女性のホルモン環境を考慮した健康増進への貢献が期待できる。

(論文発表状況)

本論文の第 1 章は、国際的学術誌、Nutrients (査読有) に原著論文 (筆頭著者) として掲載されている (2020 年 3 月)。また、第 2 章は同じく Nutrients に原著論文 (筆頭著者) として投稿中である。なお、第 3 章についても投稿準備中である。

よって、本学位申請論文は、奈良女子大学博士 (生活環境学) の学位を授与されるに十分な内容を有していると判断した。