

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34307

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20165

研究課題名（和文）摂食亢進ホルモン・グレリンを介したエストロゲンの高脂肪食誘発性肥満予防作用

研究課題名（英文）Estrogen prevents high-fat diet-induced obesity by suppressing an orexigenic function of ghrelin.

研究代表者

中木 直子（NAKAGI, Naoko）

京都光華女子大学・健康科学部・講師

研究者番号：40804183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：閉経モデルである卵巣摘出ラットへのエストロゲン（E2）補充は、高脂肪食（HFD）飼育下において、胃のグレリンとその受容体を減少させることで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。また、HFDはE2欠乏下でインスリン感受性を低下させる一方、E2補充は骨格筋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とその下流にある分子量160kDaのAkt基質（AS160）の経路を活性化することで、インスリン感受性を改善することを明らかにした。一方、若年女性における血漿グレリン濃度は月経周期間での差がみられず、体脂肪率やBMIとの関連もないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性ホルモンであるエストロゲンがグレリンの産生やその受容体の発現に影響を与え、エネルギー摂取量（特に脂質摂取量）や体重を変動させるといった報告は国際的にも未だ知見がない中、本研究は、閉経モデルラットに対するエストロゲン補充はエネルギー摂取量の調節を介して肥満を予防することや、そのメカニズムとして胃でのグレリンとその受容体の発現を減少させることで摂食を抑制していることを明らかにした。本研究結果は、閉経後肥満や月経前症候群による体重増加といった女性特有の体重変化等のメカニズムに関する基礎データを提供し、エネルギー調節機構の一端を解明できる可能性を含むものと考えている。

研究成果の概要（英文）：I investigated the effects of 17 $\beta$ -estradiol (E2) replacement on the orexigenic action of ghrelin in ovariectomized (OVX) obese rats fed with a high-fat diet (HFD). HFD increased energy intake and body weight in the placebo-treated rats, while it temporarily reduced these in the E2-treated rats. I revealed that E2 replacement improves obesity by inhibiting the orexigenic action of ghrelin via downregulation of ghrelin and its receptor in stomach in HFD-fed OVX rats. In addition, E2 replacement improves HFD-impaired insulin sensitivity by activating the protein kinase B (Akt) 2/ the Akt substrate of 160 kDa (AS160, also known as TBC1D4) pathway in the insulin-stimulated muscles of OVX rats. However, plasma acyl ghrelin concentrations in young women did not change during the menstrual cycle. It was also shown that body fat percentage and body mass index had no effect on plasma acyl ghrelin levels.

研究分野：生活健康科学、環境生理学

キーワード：エストロゲン グレリン 高脂肪食 肥満 卵巣摘出ラット 閉経モデルラット インスリン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

体重に関連した女性特有の問題には、閉経後肥満や月経前症候群（日本産科婦人科学会において「月経前3～10日の間続く精神的あるいは身体的症状で、月経開始とともに軽快ないし消失するもの」と定義されている）に伴う体重増加などがあげられる。平成29年国民健康・栄養調査によると、女性の肥満者（body mass index; BMI $\geq$ 25kg/m<sup>2</sup>）の割合は閉経を迎えるであろう50歳代以降20%を超えているのに対し、20歳代の若年女性における痩せ（BMI $<$ 18.5kg/m<sup>2</sup>）の割合は21.7%であった。肥満は生活習慣病と深く関わっており、一方若年女性の痩せは骨量減少、低出生体重児出産のリスク等との関連が示されている。骨量の減少は寝たきりのリスクとなり、低出生体重児は糖尿病などの生活習慣病に罹りやすく、次世代への影響も懸念される。日本人女性を取り巻くこの両極端な体重に関する問題は、現在42兆円を超える医療費が今後さらに増大する可能性を示唆している。

これらの体重に関連した女性特有の問題の背景には、女性ホルモンであるエストロゲンが関与していると考えられる。エストロゲンはエネルギー代謝や自発的活動量に影響を与えるとともに、視床下部の摂食中枢に作用することで摂食量を抑制するといわれている。我々はこれまでに、高脂肪食摂食下の卵巣摘出ラットにエストロゲン補充を行うと、直後に顕著な摂食抑制が起こり、体重が一過性に減少することを見出したが、その作用機序を明確に示す科学的根拠は未だ得られていない。

2007年には、エストロゲンが摂食亢進ペプチドであるグレリンの摂食促進作用を抑制したと報告された（Clegg et al., *Diabetes*, 2007）。グレリンとは、1999年に児島ら日本人の研究者によって胃から発見されたホルモンである。迷走神経節で産生されたグレリン受容体は胃の神経線維末端に運ばれてグレリンと結合し、その情報が迷走神経を介して視床下部弓状核の neuropeptide Y (NPY)/agouti-related protein (AgRP)ニューロンを刺激し、NPY/AgRPの合成と分泌を増加させることによって摂食亢進作用を発揮していると考えられているが（Kojima et al., *Nature*, 1999/Nakazato et al., *Nature*, 2001）、この作用機序のどこにエストロゲンが関与しているのかは明らかでない。さらに、ヒトを対象にしたグレリンの研究は少なく、女性の月経周期によるエストロゲンの変動が与える体重の増減や食事量、食嗜好性の変化を、グレリンに着目して検討した報告は見当たらない。

### 2. 研究の目的

本研究は、転写調節因子であるエストロゲン受容体が胃におけるグレリンの産生、もしくはグレリン受容体の発現を抑制することで、視床下部弓状核における摂食亢進に関わる神経活性を抑制するとの仮説を実証し、女性ホルモンであるエストロゲンが高脂肪食摂食を抑制するメカニズムを解明することを目的とした。また、エストロゲンが糖代謝に及ぼす影響についても検討を加えた。そして、若年女性を対象に、月経周期によるエストロゲンの変動が体重の増減や食事量、食嗜好性に与える影響を明らかにし、グレリンをはじめとする摂食関連ホルモンの関与についても検討した。

### 3. 研究の方法

下記の（1）及び（2）に記載したすべての動物実験には、Wistar系雌性ラットを使用した。9週齢で両側卵巣摘出手術を実施した後、13週齢で偽薬（Placebo）を補充した Pla 群と 17 $\beta$ -estradiol を補充した E2 群に分けた。さらにこの2群を、普通食（SD: 360.0 kcal/100g、脂肪エネ

ルギー比 13.2%) 群と高脂肪食 (HFD: 515.7 kcal/100g、脂肪エネルギー比 60.7%) 群に分け、合計 4 群で比較を行った。飼育環境は、12h/12h の明暗サイクル、室温 26±1°C、水と食餌はいつでも食べられるようにした。ラットの体重と摂食量は、卵巣摘出後、週に 3 回同時刻に測定した。

### (1) 雌性ラットにおけるエストロゲンの高脂肪食摂食調節作用とグレリンの影響

#### ① グレリン受容体アゴニスト Growth hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) 投与実験

17 週齢で GHRP-6 (80 nmol/kg あるいは 400 nmol/kg) または生理食塩水の腹腔内投与を行い、投与前 1 時間から投与後 4 時間まで、1 時間ごとの HFD 摂食量を測定した。5 日間の回復期間をとった後、GHRP-6 (400 nmol/kg) または生理食塩水を腹腔内投与し、絶食させた 3 時間後に灌流固定を行い、脳を取り出した。摘出した脳の視床下部弓状核における c-Fos 発現に及ぼすエストロゲンの影響を免疫組織化学的に検討した。

#### ② 胃のグレリン・グレリン受容体のタンパク質・遺伝子レベルと血漿アシルグレリン濃度の測定

16 週齢で上大静脈に採血のためのカテーテルを埋め込み、5 日間の回復期間をとった後、血漿アシルグレリン濃度測定のための採血を行った。採取された血漿は、ELISA 法により測定した。また、①とは別のラットを用いて、19 週齢にて安楽死後、胃の採取を行った。このとき、腹部内臓脂肪組織と鼠径部皮下脂肪湿重量も測定した。胃粘膜におけるグレリンとグレリン受容体のタンパク質レベルをウェスタンブロット法で、胃のグレリン mRNA レベルを RT-PCR 法を用いて測定した。

### (2) 雌性ラットにおける高脂肪食摂食によるインスリン依存性グルコース代謝への影響とエストロゲンの作用

#### ① 経静脈糖負荷試験

16 週齢で上大静脈にカテーテルを埋め込み、5 日間の回復期間を経た後、17 週齢で経静脈糖負荷試験を行った。実験の 16 時間前から絶食させ、1 時間延長チューブに慣らした後、無麻酔・無拘束の状態で安静時採血を行った。次に、静脈カテーテルよりグルコース (1.0 g/1 kg 体重) を投与した。糖負荷後、5・10・30・60 分の時点で 0.3 ml ずつ採血を行った。尚、血漿を分離した後の血球はすべて戻した。

#### ② インスリン刺激実験

16 時間前から絶食を行い、門脈からヒトインスリン ( $10^{-5}$  mol/l, 1.0 ml/100 g 体重) を投与後、30 秒で肝臓、90 秒で腓腹筋を採取し、後日インスリンシグナル伝達分子であるプロテインキナーゼ B (Akt) 及びその下流分子をウェスタンブロット法によって測定した。

### (3) 若年女性における摂食・食欲への月経周期の影響

#### ① 月経周期における摂食関連ホルモンの変動

女子大学生を対象とし、実験日は月経周期の中で月経期、排卵前期、黄体中期のそれぞれの 1 日、計 3 日間とした。月経期は、月経開始から 7 日以内の 1 日、排卵前期は、排卵日検査薬を次回月経開始予定日より 17 日前から被験者に使用させ、陽性の線が出た当日あるいは翌日の 1 日、黄体中期は、排卵前期の実験日から 7 日後または次回月経開始日の 7 日前を目安として設定し、12 時間絶食時と栄養補給飲料 (400 kcal) 摂取後に採血を行った。回収した血漿を用いて、エストラジオール、プロゲステロン、グレリン濃度を測定した。また、摂食においてグレリンと拮抗する作用があるとされるレプチン濃度についても検討を加えた。

#### ② 月経周期における主観的食欲・食嗜好に関する調査

女子大学生計 420 名を対象に質問紙調査を実施した。月経随伴症状を測定する尺度である

Menstrual Distress Questionnaire に加え、食欲・食嗜好の変化、食物への渴望（特定の食べ物に対して我慢できないくらい強い欲求；Food Craving Inventory for Japanese [Komatsu, *Appetite*, 2008]）に関して月経前・月経中に分けて尋ねた。尚、月経前は「月経開始2週間前から前日」と定義した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 雌性ラットにおけるエストロゲンの高脂肪食摂食調節作用とグレリンの影響

HFD により、Pla 群ではエネルギー摂取量と体重が増加したが、E2 群では E2 と HFD の処置後1週間で著しくエネルギー摂取量が減少した。HFD 投与の4週間後には Pla 群と同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には両群間に差が認められた。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 (図1)。

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ける c-Fos 陽性ニューロンの数を増加させたが、E2 群では影響を与えなかった。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、Pla 群よりも E2 群で有意に低かった (図2)。尚、胃のグレリン m-RNA レベルと血漿アシルグレリン濃度においては、Pla 群と E2 群の間に有意な差はみられなかった。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。

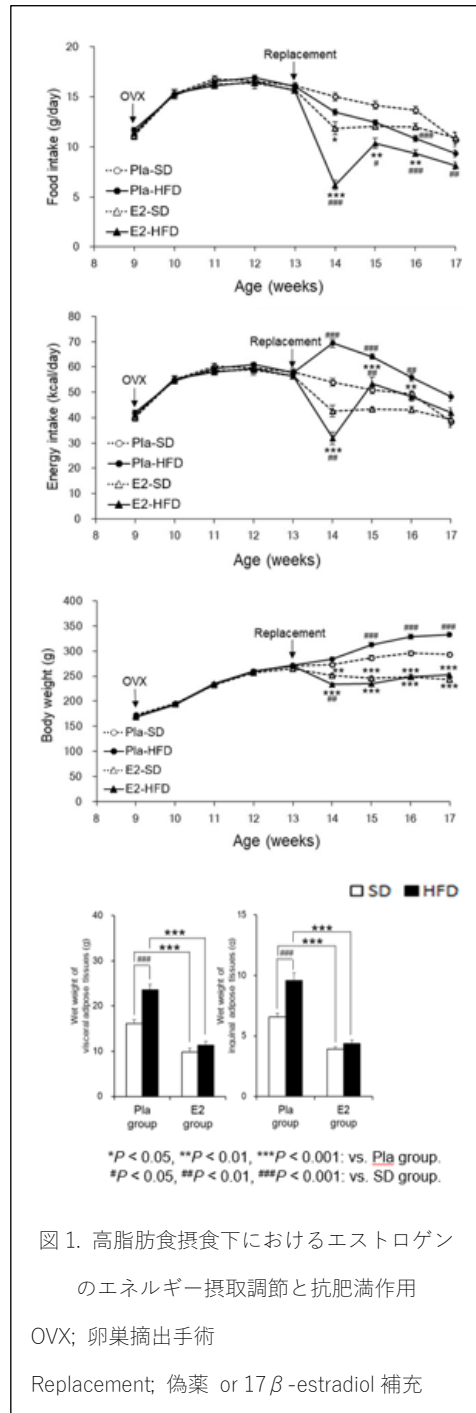


図1. 高脂肪食摂食下におけるエストロゲンのエネルギー摂取調節と抗肥満作用  
OVX; 卵巣摘出手術  
Replacement; 偽薬 or 17β-estradiol 補充

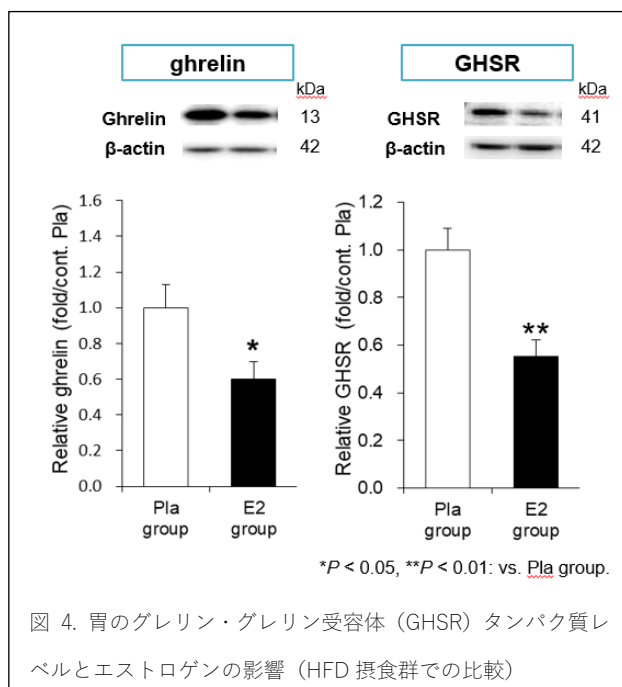


図4. 胃のグレリン・グレリン受容体 (GHSR) タンパク質レベルとエストロゲンの影響 (HFD 摂食群での比較)

※図はいずれも Yokota-Nakagi et al., *Nutrients*, 2020 より改変

## (2) 雌性ラットにおける高脂肪食摂食によるインスリン依存性グルコース代謝への影響とエストロゲンの作用

経静脈糖負荷試験では、インスリン抵抗性の指標であるグルコース・インスリン指数が、Pla群ではSD群と比較してHFD群で高値を示したが、E2群ではHFD群による変化はみられなかった。また、インスリン刺激実験で摘出した腓腹筋において、インスリンシグナリング経路におけるAktのサブタイプであるAkt2のリン酸化が、SD摂食下では両群でみられた一方で、HFD摂食下ではE2群でのみ観察された。さらに、その下流にある分子量160kDaのAkt基質(AS160)のインスリンによるリン酸化は、いずれの食餌においてもE2群のみで観察された。このことから、HFDはE2欠乏下でインスリン感受性を低下させるが、E2補充は骨格筋におけるAkt2/AS160経路を活性化することで、インスリン感受性を改善する可能性が示された。尚、グレリンには摂食亢進作用だけでなくインスリン分泌抑制作用もあることが知られているが、本研究においてグレリンがインスリン分泌に与える影響については明らかにならなかった。

## (3) 若年女性における摂食・食欲への月経周期の影響

月経周期の3時期とも、空腹時に比べて栄養補給飲料摂取後に血漿グレリン濃度は約半分まで低下することを確認した。しかし、血漿グレリン濃度は月経周期間での差は見られず、体脂肪率やBMIとの関連もないことが示された。一方、摂食抑制作用で知られるレプチンの血漿濃度は、月経期と比較して排卵前期に高値を示した。このことから、月経周期における女性ホルモン濃度の変化が、グレリン以外の摂食関連ホルモンに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、質問紙調査では、月経中と比較して月経前の食欲増進を訴える者が多く、とりわけケーキやチョコレート、アイスクリームといった甘い食べ物への欲求が高まることがわかった。

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 Naoko Yokota-Nakagi, Sayo Omoto, Shoko Tazumi, Mizuho Kawakami, Akira Takamata, Keiko Morimoto	4. 巻 10, e15193
2. 論文標題 Estradiol replacement improves high-fat diet-induced insulin resistance in ovariectomized rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiological Reports.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15193	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 Naoko Yokota-Nakagi, Haruka Takahashi, Mizuho Kawakami, Akira Takamata, Yuki Uchida, Keiko Morimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Estradiol Replacement Improves High-Fat Diet-Induced Obesity by Suppressing the Action of Ghrelin in Ovariectomized Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	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） 10.3390/nu12040907	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	森本 恵子  (MORIMOTO Keiko)		
研究協力者	鷹股 亮  (TAKAMATA Akira)		

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
---------	---------