

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350117

研究課題名(和文) エストロゲンの新機能-脂肪酸受容体を介した脂質嗜好性調節による摂食制御-の検討

研究課題名(英文) New effects of estradiol on oral fat perception and preference via fatty acid receptors

研究代表者

森本 恵子 (Morimoto, Keiko)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：30220081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：若年女性では、オレイン酸の口腔内感受性が排卵前期でもっとも高く、月経周期性変動を示すことが明らかになった。また、排卵前期に口腔内の脂肪酸受容体遺伝子発現が増加する可能性が示唆された。一方、中高年女性では、閉経前に比べ閉経後は口腔内オレイン酸感受性が低く、オレイン酸感受性と体脂肪率との間には負の相関があった。しかし、脂質摂取量には月経周期性変動や閉経の影響は見られなかった。卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充は口腔への脂肪乳剤刺激で高脂肪食の摂取を抑制するが、胃内・静脈内投与ではその作用は発揮されなかった。これにはエストロゲンによるコレシストキニン分泌促進の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether menstrual phases and menopause influence oral fat taste perception, fat preference, and fat intake in young and middle-aged women. Oral detection thresholds for oleic acid varied cyclically, with decrease in the periovulatory phase. In addition, menopause increased the threshold. These findings suggest that oral sensitivity to oleic acid varies depending on ovarian hormones. In addition, we investigated the effects of estradiol replacement on high-fat diet intake via fat sensing pathway in ovariectomized (OVX) rats. In placebo-treated (Pla) rats, energy intake and body weight were increased after the high fat diet (HFD), while these were decreased in the estradiol-treated (E2) rats. Estradiol replacement suppressed the HFD intake of 30 min only after an administration of lipid emulsion to oral cavity. Plasma cholecystokinin (CCK) was increased in E2 compared with Pla group. These results suggest that estradiol may inhibit HFD intake via CCK secretion in OVX rats.

研究分野：生活健康科学、環境生理学、循環内科学

キーワード：エストロゲン 高脂肪食 口腔内脂肪酸感受性 脂質嗜好性 月経周期 閉経後女性 卵巣摘出ラット 脂肪酸受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化による脂質摂取量の増加は、肥満やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病の原因となっている。女性は同年代の男性に比べてこれらの罹患率が低い。閉経後には腹部内臓脂肪の蓄積に伴い罹患率が増加する。雌性ラットでも、卵巣摘出により摂取量が増加し脂肪蓄積による体重増加が起こるが、エストロゲン補充により改善する。我々は、糖・脂質代謝に対するエストロゲン作用として、卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充がインスリン抵抗性を改善し、骨格筋のエネルギー代謝に寄与する AMP キナーゼの活性化を促進すること、中年女性において、閉経後では閉経前に比べ精神性ストレスや高血糖による血管機能低下が顕著であることを報告した。

一方、遊離脂肪酸を天然のリガンドとする新たな G タンパク質共役受容体 (GPR) ファミリーが発見され、脂肪酸がシグナル伝達物質として働くことが明らかになった。GPR120 ノックアウトマウスの機能解析やヒトにおける遺伝子解析結果により、GPR120 は全身の糖・脂質代謝を制御する脂質センサーであると報告された (Ichimura A et al. Nat, 2012)。

我々は、閉経モデルの卵巣摘出ラットでは、高脂肪食を投与しても摂取量は変化せず、このためエネルギー摂取量が増大し、体重が増加することを確認している。しかし、エストロゲン補充を行うと、高脂肪食投与下において摂食抑制が強く起こり、摂食効率の低下も加わって体重はむしろ一過性に減少した。さらに、卵巣摘出ラットに対して普通食と高脂肪食の自由選択摂食を行わせると、高脂肪食を選択するという脂質嗜好性の増大が見られたが、エストロゲン補充を行なうと脂質嗜好性が著しく低下することを観察した。これは、エストロゲンが脂質代謝に影響を与えることと密接に関連している可能性がある。しかし、エストロゲンの脂肪摂食抑制作用およびそのメカニズムについてはほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

女性ホルモンであるエストロゲンには抗肥満作用がある。その機序として、エストロゲンは摂食中枢への直接作用、あるいは糖・脂質代謝を介した間接作用によって摂食を抑制していると考えられる。最近、脂肪酸トランスポーターの CD36、あるいは GPR40 や GPR120 が遊離脂肪酸を内因性的リガンドとし、口腔内・消化管・脂肪組織において脂質センサーとして機能することが分かってきた。本研究は、女性において、月経周期や閉経によるエストロゲン濃度の変化が脂質代謝や脂肪酸の味の感受性に影響を与え、脂質嗜好性を調節して、摂食を制御する可能性を検討した。さ

らに、卵巣摘出ラットにおける高脂肪食誘発性肥満がエストロゲン補充により改善する機序として、口腔及び消化管の GPR や CD36 などの脂質センサーを介したエストロゲンの摂食抑制作用が関与する可能性について詳細に検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 女性における口腔内脂肪酸の味の感受性・脂質嗜好性に対する月経周期や閉経の影響

健康な若年女性 (20-25 歳) 及び閉経前後の中年女性 (45-55 歳) を対象とした。若年女性と閉経前中年女性においては、月経周期のうち、月経期、排卵前期、黄体期中期、黄体後期の 4 期に、12 時間の絶食後に採血を行なうと共に、オレイン酸の濃度を変えたサンプル溶液を用い、全口腔法にて、3 肢強制選択法による脂肪酸の味の閾値を調べ、感受性を評価した。加えて、パン・バター・スープを自由摂取させ、エネルギー摂取量を測定するとともに、脂肪エネルギー比によって脂質嗜好性を評価した。さらに、脂肪酸の感受性試験の前日と翌日に食事・活動量調査を行い、日常生活でのエネルギー摂取量、脂肪エネルギー比、栄養バランスを調査した。また、閉経後女性では、任意の 1 日に同様のプロトコルにて測定・調査を行った。

なお、得られた血漿を用いて、高比重リポタンパク質 (HDL)、低比重リポタンパク質 (LDL)、中性脂肪、遊離脂肪酸、グルコース濃度を測定した。さらに、エストラジオール、プロゲステロン濃度などの測定を加える。以上の結果より、女性において、口腔内脂肪酸感受性、脂質嗜好性、脂質摂取量における月経周期、加齢、閉経の影響を明らかにし、口腔内の脂肪酸センシングと摂食との関連から見たエストロゲンの作用について検討した。

(2) 雌性ラットにおけるエストロゲンの脂肪摂食調節作用

雌性ラットに卵巣摘出やエストロゲン補充を行い、高脂肪食投与下でエストロゲンのエネルギー摂取量、脂質代謝、摂食関連ペプチド、脂質嗜好性に対する調節作用について検討した。

高脂肪食投与下のエネルギー摂取量に及ぼすエストロゲンの影響

実験にはウィスター系雌性ラットを使用し、9 週齢で両側卵巣摘出術群を実施した。卵巣摘出後、13 週齢で偽薬 (Placebo) を補充した Pla 群、及び 17 $\beta$ -estradiol ペレット 1 錠を頸部皮下に埋め込む E2 (1 錠) 群、2 錠補充した E2 (2 錠) 群に分けた。この 3 群に対して、それぞれ高脂肪食投与群と普通食投与群に分け、最終的には、合計 6 群に分けた。普通食群には固形飼料 (脂肪エネルギー比 13%) を、高脂肪食群には、高脂肪飼料 (脂肪エネ

ルギー比 58%)を与えた。

卵巣摘出術後、摂食量、飲水量を週に 6 回同時刻に測定した。また、体脂肪率も経時的に測定した。

高脂肪食投与による脂質代謝の変化におけるエストロゲンの作用

上記 6 群は 17 週齢にて麻酔下で心腔内採血後、安楽死させ、腹部内臓脂肪組織（腸間膜脂肪、腎生殖器周囲脂肪、後腹膜脂肪）と単径部皮下脂肪組織湿重量を測定した。さらに、肝臓、腸間膜脂肪、腓腹筋、舌、胃、上部小腸などを摘出した。血漿・組織は直ちに液体窒素で凍結させ、-45℃で保存した。摘出した臓器は、肝臓、腸間膜脂肪、腓腹筋のアセチル CoA カルボキシラゼ (ACC) とリン酸化 ACC (pACC)、脂肪酸合成酵素 (FAS)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 型 (CPT-1M) などのタンパク質・遺伝子発現をウェスタンブロット法・RT-PCR 法を用いて測定した。

さらに、凍結保存した血漿を用いて、エストラジオール、プロゲステロン、活性型グレリン、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1)、コレシストキニン (CCK) などを測定した。さらに、HDL、LDL、中性脂肪、遊離脂肪酸、グルコースなどの測定を加えた。

高脂肪食と普通食の自由選択摂食に対するエストロゲンの影響

卵巣摘出していない正常な雌 (Sham) 群、Pla 群、E2 (1錠) 群の 3 群に対して、普通食と高脂肪食を自由に選択して摂食させる“自由選択摂食”を 4 週間行なった。

Pla 群と E2 群には 9 週齢で卵巣摘出を行い、13 週齢で各ペレット皮下投与と自由選択摂食を開始し、摂食量、飲水量を毎日測定した。17 週齢に同様の方法で、腹部内臓脂肪組織と皮下脂肪組織湿重量を測定した。さらに、肝臓、腸間膜脂肪組織、腓腹筋を摘出し、-45℃で保存した。後日、ACC、pACC、FAS、CPT-1M などの蛋白質発現を Western blot 法により測定した。

凍結保存した血漿を用いて、エストラジオール、HDL、LDL、中性脂肪、遊離脂肪酸、グルコースなどの測定を加えた。

エストロゲンの口腔・消化管の脂肪酸受容体 (CD36 や GPR120) を介した脂肪摂食抑制作用

Pla 群と E2 群に脂肪乳剤の経口・胃内投与および留置カテーテルによる静脈内投与を行い、その後の高脂肪食の摂食量を測定した。実験終了後に、心腔内採血と舌上皮、胃、上部小腸粘膜の摘出を行った。得られた血漿の GLP-1、CCK など摂食関連ホルモンの変化を調べ、エストロゲンの影響について検討した。また、舌・消化管粘膜サンプルを用いて、CD36・GPR120 タンパク質や遺伝子発現をウェ

スタンブロット法・RT-PCR 法により測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 女性の脂質摂取における月経周期・閉経の影響

若年女性における口腔内脂肪酸の感受性・脂質嗜好性・脂質摂取量に対する月経周期の影響

若年女性 16 名を対象に月経期・排卵前期・黄体中期の 3 期で、オレイン酸の口腔内閾値から評価した脂肪酸の味の感受性は月経周期性に変動した。特に血中のエストロゲンのみが高濃度である排卵前期では、黄体中期に比べてオレイン酸の味の感受性が増加した。また、キャノラ油添加スープにより測定した脂質嗜好性は、排卵前期では黄体期に比べて低値を示す傾向があった。さらに、自由摂食および実験前後 3 日間の食事調査により、排卵前期では脂肪摂取量が減少する傾向が示された。

また、若年女性 21 名を対象に月経期・排卵前期・黄体中期に、月経前である黄体後期を加えた 4 期で同様の実験を行った。口腔内オレイン酸閾値、脂肪嗜好性・脂肪濃度ランキング試験を実施した結果、口腔内オレイン酸感受性の月経周期性変動が認められ、排卵前期は黄体期後期に比べて脂肪酸感受性が増加した。さらに、頬粘膜の CD36 遺伝子発現は排卵前期で他の時期よりも高値を示し、エストロゲン受容体との間に正の相関があった。しかし、脂肪嗜好性や脂質摂取量には 4 期で有意な変化は見られなかった。

中高年女性における口腔内脂肪酸感受性・脂質嗜好性・脂質摂取量に対する閉経の影響  
中高年女性 (閉経前 9 名、閉経後 11 名) を対象に、口腔内オレイン酸閾値、脂肪嗜好性を測定し、脂肪濃度ランキング試験を実施した結果、閉経後女性は閉経前女性に比べ、口腔内オレイン酸感受性が低値を示すことが分かった。しかし、脂肪嗜好性には差がなかった。また、自由摂食および実験前後 2 日間の食事調査により脂質摂取量にも両群で差はなかった。一方、体重は同程度であったが、体脂肪率は閉経後女性の方が高い値を示した。また、口腔内オレイン酸の閾値と体脂肪率の間には負の相関関係が認められた。従って、閉経は口腔内オレイン酸閾値を低下させ、体脂肪率を増やす可能性が示唆された。しかし、脂質摂取量との関係は明らかではなかった。

(2) 雌性ラットにおけるエストロゲンの脂質代謝を介した摂食調節作用

高脂肪食投与下のエネルギー・摂取量に及ぼすエストロゲンの影響

普通食では、E2 群では、エネルギー摂取量の減少に伴う体重減少が見られた。このエストロゲンの摂食抑制作用は高脂肪食投与下では

より強く、一過性に体重減少したのに対し、Pla群ではエネルギー摂取量が増え、腹部内臓脂肪の増加による体重増加を引き起こした。

高脂肪食投与による脂質代謝の変化におけるエストロゲンの作用

普通食では、Pla群に比べE2群において、腸間膜脂肪組織のACC、pACC、CCPT-1 mRNAタンパク質発現量が増加していた。一方、高脂肪食の短期投与(72時間)では、Pla群でACCが低下した。また、E2群では腸間膜のACCの低下、腓腹筋のFASの低下が見られ、脂肪酸合成が抑制されたと考えられた。さらに、長期投与(4週間)では、肝臓や腸間膜脂肪組織のACC、FASが減少し脂肪酸合成が抑制された。また、脂肪組織においてエストロゲン補充は普通食、高脂肪食ともにpACC、CPT1を増加させ、酸化を促進すると考えられた。

すなわち、エストロゲンは卵巣摘出ラットの高脂肪食誘発性肥満を抑制したが、短期的には、脂肪組織・骨格筋の脂肪合成系酵素の減少と長期的には肝臓・脂肪組織の脂肪酸酸化系酵素の増加によることが判明した。

なお、血中活性型グレリンおよび胃のグレリン受容体には高脂肪食やエストロゲンは影響しなかった。

高脂肪食と普通食の“自由選択摂食”に対するエストロゲンの影響

Sham群、Pla群、E2群のラットに4週間、高脂肪食と普通食を自由に摂食させた。Pla群は高脂肪食、E2群は普通食を嗜好し、前者は腹部内臓脂肪量・体重の増加、後者は減少を示した。

(3)雌性ラットにおけるエストロゲンの口腔・消化管における脂肪酸センシングを介した摂食調節作用

口腔内、胃内、静脈内への脂肪乳剤投与による脂肪摂食抑制に対するエストロゲンの作用

卵巣摘出ラットを用い、胃内ゾンデ、留置カテーテルを介して口腔・胃・上大静脈へ脂肪乳剤(イントラリボス)を投与し、その後30分間の高脂肪食摂取における抑制効果をPla群とE2群で比較した。その結果、エストロゲンは口腔内の脂肪乳剤刺激で高脂肪食の摂食抑制を増大させるが、胃内・静脈内投与ではその作用が発揮されないことが示唆された。

脂肪酸受容体CD36、GPR40・120の発現におけるエストロゲンの作用

舌粘膜のCD36遺伝子発現、GPR120タンパク質発現、上部小腸粘膜のGPR120タンパク質発現量にはPla群とE2群の間に差がなかった。

口腔内脂肪乳剤刺激後の血漿GLP-1・CCKの変化

血漿GLP-1濃度は、安静時レベルに両群間の差はなかったが、摂食開始後30分目ではE2群

でのみ上昇した。また、血漿CCK濃度は両群とも30分目に増加したが、E2群では増加反応が大きく、エストロゲンの摂食抑制作用におけるCCK/GLP-1の関与が示唆された。

## 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3件)

摂食調節における性差と性ホルモンの役割(特集:食欲と食嗜好のサイエンス) 鷹股亮、森本恵子、実験医学、945-950頁、35巻、2017

Effects of estrogen replacement on stress-induced cardiovascular responses via renin-angiotensin system in ovariectomized rats. Tazumi S, Yokota N, Kawakami M, Omoto S, Takamata A, Morimoto K. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, R898-R905, 311, 2016, doi: 10.1152/ajpregu.00415.2015.

「要支援・軽度要介護高齢者における活動量計を活用した歩行支援プログラムの有用性の検討」 宮永真澄、藤井将彦、酒井宏和、森本恵子、須藤元喜、仁木佳文、時光一郎、体力科学 233-242頁、64巻(2号)、2015年

[学会発表](計17件)

Estradiol attenuates cardiovascular reactivity in ovariectomized rats exposed by chronic psychological stress. Mariko Kawahara, Yu Nagatomo, Naoko Namiki, Miho Nishimura, Yumi Kojyo, Shoko Tazumi, Yuki Uchida, Akira Takamata, Keiko Morimoto. The 94th annual meeting of the physiological society of Japan. 2017年3月28日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Estradiol replacement after ovariectomy inhibits high-fat diet intake via oral fat sensing pathway. Haruka Takahashi, Hitomi Sato, Nanako Doi, Naoko Yokota, Yuki Uchida, Akira Takamata, Keiko Morimoto. The 94th annual meeting of the physiological society of Japan. 2017年3月28日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Effects of estrogen replacement on hedonic sweet intake and the regulation of energy intake in ovariectomized rats. Konomi Kanamori, Sayaka Kondo, Keiko Morimoto, Akira Takamata. The 94th annual meeting of the physiological society of Japan. 2017年3月28日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Involvement of plasma glucose in the estrogen-induced enhancement of hedonic sweet intake in ovariectomized rats. Sayaka Kondo, Konomi Kanamori, Keiko Morimoto, Akira Takamata. The 94th annual meeting of the physiological society of Japan. 2017年3月28日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

卵巣摘出ラットの高脂肪食摂取におけるエストロゲンの抑制作用. 高橋春花、土井菜々子、永友優、川原真理子、横田直子、森本恵子. 第1回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会. 2016年6月17日 生理学研究所(愛知県岡崎市)

若年女性の口腔内脂肪酸感受性および脂質摂取量における月経周期性変動. 上島恭子、水上友里、相葉茜、森本恵子. 日本家政学会第68回大会. 2016年5月29日 金城学院大学(愛知県名古屋市)

Estradiol replacement attenuates psychological stress-induced pressor response by inhibiting renal sympathetic nerve and renin-angiotensin system in ovariectomized rats., Yu Nagatomo, Mariko Kawahara, Naoko Namiki, Shoko Tazumi, Misa Yoshimoto, Akira Takamata, Keiko Morimoto. 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Variations in oral sensitivity to fatty acid and fat preference during the menstrual cycle in young women., Yuri Mizukami, Xin Chen, Kyoko Ueshima, Akane Aiba, Aya Yaegashi, Keiko Morimoto. 第93回日本生理学会大会(札幌), 2016年3月22日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

若年女性の脂肪嗜好性および脂質摂取量における月経周期性変動. 上島恭子 森本恵子. 第36回日本肥満学会, 2015年10月2日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Suppressive effects of estradiol replacement on stress-induced pressor response mediated by renal sympathetic nerve in ovariectomized rats. Yu Nagatomo, Shoko Tazumi, Risa Itoh, Akira Takamata, Keiko Morimoto. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月21日 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

Variations in endothelial function of peripheral artery during the menstrual cycle in young women exposed to mild mental stress. Xin Chen, Kyoko Ueshima, Mika Omokute, Akira Takamata, Keiko Morimoto. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月23日, 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

Impairment of cognitive function during passive heat stress. Shibasaki Manabu, Nanba Mari, Morimoto Keiko, Nakata Hiroki. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月22日, 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

卵巣摘出ラットの高脂肪食誘発性肥満とインスリン抵抗性に対するエストロゲンの影響. 横田直子, 河上瑞穂, 森本恵子. 日本家政学会第66回大会, 2014年5月24日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)

Estradiol replacement attenuates stress-induced pressor response by regulating renin-angiotensin system in ovariectomized rats. Yu Nagatomo,

Shoko Tazumi, Risa Itoh, Misa Yoshimoto, Akira Takamata, Keiko Morimoto. Experimental Biology 2015, April 1, 2015, Boston (USA)

The effects of menstrual phase on brachial artery endothelial function after mental stress in young women. Xin Chen, Kyoko Ueshima, Mika Omokute, Akira Takamata, Keiko Morimoto. Experimental Biology 2015, March 30, 2015, Boston (USA)

Estradiol-Modification of Blood Pressure Regulatory Response to Systemic and Central Angiotensin II Administration in Rats. A. Takamata, N. Omura, Y. Nishimura, A. Igarashi and K. Morimoto. Experimental Biology 2015, March 30, 2015, Boston (USA)

The Effect of Hyperthermia on Cognitive and Auditory Processing. M. Shibasaki, M. Nanba, K. Morimoto and H. Nakata. Experimental Biology 2015, March 31, 2015, Boston (USA)

〔図書〕(計1件)

「メンタルヘルスを学ぶ」, 村井俊哉、森本恵子、石井信子(編著) ミネルヴァ書房、75-122頁(第二章:こころとからだ) 2015年4月10日

〔その他〕

ホームページ:

<http://koto10.nara-wu.ac.jp/Profiles/6/0000570/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森本 恵子 (Keiko Morimoto)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号: 30220081

### (2)研究分担者

小城 勝相 (Kojyo Shosuke)

放送大学・教養学部・教授(平成27年度まで)

研究者番号: 10108988