

論文題目 エストロゲンの肥満抑制作用とその中枢機序について

指導教官 大内 尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 梁 一強

【目的】

エストロゲン (E2) は動脈硬化症、骨粗鬆症などの疾患の病因に深く関与していることが知られている。一方、肥満は複数の生活習慣病の危険因子を併せ持つ病態として注目されている。肥満のコントロールに関与するものとして食欲の調節機構が重要である。

閉経後の女性は肥満する傾向があり、ホルモン補充療法により体重と体脂肪の増加が抑制されることが報告されている。E2の肥満抑制作用の機序の一つとして、中枢神経系では視床下部にある摂食中枢と満腹中枢の関与が注目されている。また、エストロゲンレセプター (ER)としてこれまで知られていたER- α とは別の、 β タイプ (ER- β) が発見され、脳では広い範囲での存在が確認されている。

今回、これらの報告を背景として、E2による肥満抑制効果とその機序を明らかにするため、その肥満モデル動物の摂食量に対する影響について検討した。特に中枢におけるE2の肥満抑制作用の機序の解明を目的とした。

【方法】

(1) 自由摂食でのE2の皮下補充

雌性 Wistar ラット 8 週齢 24 匹を Sham operation 群 (Sham)、両側卵巣の摘除群 (OVX)、OVX 後に E2 を補充する群 (OVX+E2) の 3 群に分けた。E2 補充は OVX の 1 週間後、corn oil で希釈した estradiol dipropionate を皮下注射により投与した。他の 2 群には corn oil のみを投与した。

(2) 制限摂食でのpair-feeding のE2の皮下補充

雌性 Wistar ラット 8 週齢 24 匹を自由摂食群と同様の 3 群に分けた。E2 補充は OVX の 1 週間後、corn oil で希釈した estradiol dipropionate を皮下注射により投与し、他の 2 群には corn oil のみを投与した。

(3) E2 脳室内投与

雌性 Wistar ラット 8 週齢 20 匹に OVX を行い、水溶性 β -estradiol (E2) 群と 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (vehicle) 群の 2 群に分け脳室内投与した。頭蓋内に、Alzet Brain infusion キットを挿入、カニューラを皮下に通して Osmotic minipump を接続し、側腹部皮下に埋め込んだ。術後回復後、Osmotic minipump を交換し、E2 群には 0.25ug/0.5ul/hr の E2 を投与、vehicle 群には同量の 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin を 2 週間持続投与した。

(4) E2+ER アンチセンス ODN 脳室内投与

雌性 Wistar ラット 8 週齢 53 匹に OVX を行い、E2+ER- α アンチセンス ODN、E2+ER- α スクランブル ODN、E2+ER- β アンチセンス ODN、E2+ER- β スクランブル ODN の 4 群に分けた。E2 の脳室内投与と同様の手法で、E2 とアンチセンス ODN (1 μ g/0.5ul/hr) もしくは スクランブル ODN (1 μ g/0.5ul/hr) を投与した。

(6) ノーザンブロット解析

ラットの皮下脂肪組織及び脳を摘出後、acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 法により total RNA を抽出した。次に、total RNA 20 μ g あるいは 40 μ g を 1% アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写した。ラット cDNA プロブを PCR プライマーを用い、RT-PCR により作成しシーケンスを確認後、 $[\alpha$ -³²P]-dCTP でラベリングし、ハイブリダイズした。プロブのラベリングは、ランダムプライム法により行った。メンブレンは 2 \times SSC - 0.1% SDS、0.2 \times SSC - 0.1% SDS で処理し、Kodak X 線フィルムに -80 $^{\circ}$ C 下で 2 日間から 10 日間感光し、現像した。

(7) ウェスタンブロット解析

摘出後のラットの脳を、4 $^{\circ}$ C の生理食塩水で洗浄後、濾紙で水分を取り除き、Complete protease inhibitor cocktail 錠を添加した PBS を加え、4 $^{\circ}$ C でホモジナイズし、さらに 3,000 rpm 30 分遠心分離後、その上清を蛋白サンプルとして分注し、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。次に、組織蛋白上清サンプルを使用直前に 4 $^{\circ}$ C で溶かし、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を組織抽出液のサンプルとして用い、蛋白濃度は Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて測定した。サンプルバッファーを加え、5 分間 95 $^{\circ}$ C で熱処理後 10% SDS-polyacrylamide ゲルで電気泳動後、蛋白をニトロセルメンブレンに転写した。その後、TBS に 5% fat free milk と 1% BSA を添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体には ER- α 抗ラット抗体または ER- β 抗ラット抗体を用い、4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。TBS Tween-20 で 20 分間 3 回洗浄を繰り返してから、TBS に二次抗体 horseradish-peroxidase 標識抗 rabbit IgG 抗体を添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。なおメンブレンを TBS-T にて 20 分間 3 回洗浄後、蛋白の発現は ECL 法により検出した。

【結果】

(1) 自由摂食下での OVX および E2 の皮下補充のラット体重・体脂肪及び摂食量に対する効果

OVX 後 1 週間では、Sham 群より体重が有意に増加していた。E2 補充群ラットでは、補充 1 週間後に体重の増加が有意に抑制され、さらに補充 2 週間後に体重が Sham 群と同水準まで減少した。OVX 群で

は OVX 後 3 週間まで、Sham 群と比較して有意な体重増加が認められた。腹部皮下脂肪重量は OVX 群が Sham 群に比して、有意に増加しており、E2 補充によりその影響は消失した。また、内臓脂肪（大網）でも、OVX 群が Sham 群に比して有意に増加し、E2 の補充によりその影響は消失した。

摂食量は、術後 2 日目まで 3 群とも一時的な摂食量の低下が認められた。その後全群で摂食量の増加があったものの、5 日目以後は OVX 群では Sham 群に比して有意な増加が認められた。さらに E2 補充群においては、E2 補充 9 日目から OVX 群に比して摂食量が有意に抑制され、Sham 群とほぼ同量となった。血圧は、3 群間での血圧の差は認められず、血中エストラジオール濃度は OVX では低値を示し、E2 皮下投与群では OVX 群の 2 倍程度に上昇した。また、皮下脂肪中の PAI-1、TNF- α について、ノーザンブロットで mRNA レベルでの発現を確認したところ、いずれも 3 群間での差は認められなかった。

(2) 制限摂食での pair-feeding の OVX および E2 皮下補充のラット体重・体脂肪及び摂食量に対する効果
制限摂食では自由摂食の OVX 群で認められた体重増加が消失し、皮下脂肪重量および内臓脂肪（大網）重量も増加が認められなかった。

(3) E2 の脳室内持続投与によるラット体重・体脂肪及び摂食量に対する影響

摂食量は vehicle 群と比較して有意に抑制され、形態的な変化としても、E2 投与ラットでは非投与ラットと比べ明らかに肥満が解消された。体重の増加は、摂食量と同様に E2 投与群では vehicle 群に比較して有意に抑制された。血圧は両群の差は投与中の全過程で認められなかった。皮下投与群と脳室内投与群の比較でも差は認められなかった。血中エストラジオール濃度は、3 群で差は認められなかった。

また、皮下脂肪重量および内臓脂肪（大網）重量に対する影響は、皮下脂肪重量は E2 投与群では有意な増加抑制が見られたが、内臓脂肪重量での増加抑制作用は有意ではなかった。

(4) ER アンチセンス ODN の脳室内持続投与によるラット体重・体脂肪及び摂食量に対する効果

ER- α アンチセンス ODN の投与では、E2 の体重抑制作用の減弱作用は見られなかった。ER- β アンチセンス ODN の投与により、E2 の体重抑制作用は有意に減弱された。ノーザンブロットでは、ER- β の遺伝子発現は ER- α アンチセンス ODN、ER- α スクランブル ODN、ER- β アンチセンス ODN、ER- β スクランブル ODN 群の 4 群とも差が認められなかった。また、ER- α の遺伝子発現も 4 群間の差は認められなかった。ウエスタンブロット法では、ER- β の発現は、ER- β アンチセンス ODN 脳室内の投与により ER- β スクランブル ODN 群と比較し有意な減弱は認められず、ER- α アンチセンス ODN、ER- α スクランブル ODN および ER- β スクランブル ODN の脳室投与では差が認められなかった。さらに、ER- α の発現は ER- α アンチセンス ODN の脳室内投与により ER- α スクランブル ODN 群と比して有意な減弱は認められず、ER- β アンチセンス ODN、ER- β スクランブル ODN および ER- α スクランブル ODN の脳室内投与では差が認められなかった。

【考察】

近年、肥満は複数の動脈硬化危険因子を併せ持つ病態として注目されており、また、性ホルモンと肥満や動脈硬化についても様々な報告がなされている。

閉経後女性では動脈硬化のリスクが増加し、心血管疾患の発病率が高くなるということが知られている。

一方ホルモン補充療法によって動脈硬化性疾患の発症は、約50%に抑制されたという報告がある。閉経後女性における動脈硬化の進展に、E2 欠乏そのもののリスクだけではなく、E2欠乏による肥満の促進が関与している可能性も示唆されている。

閉経後女性の肥満では内臓脂肪が著しく増加するとの報告から、E2 が内臓脂肪の蓄積を抑制する可能性が考えられた。そこで、OVX ラットを用いて、その体重、脂肪量の変化を計量した。さらに、OVX 後に肥満をきたしたラットで、内臓脂肪と皮下脂肪の蓄積の相違についても検討した。3 週間後、OVX ラットでは体重が Sham の1.2 倍 (OVX : 208.75 ± 3.87g vs. Sham : 240.63 ± 2.58g) に増加していたが、E2 の補充により、その増加は抑制された (OVX+E2 : 214.22 ± 2.26g)。OVXラットでは体重が増え、E2 補充で体重の減少が見られたとの報告とも一致しており、これは従来の報告にあった閉経後女性が肥満をきたすことを説明できる現象と考えられる。

さらにその時点での脂肪重量の変化について検討した。前腹部から採取した皮下脂肪と内臓脂肪(大網脂肪)を採取し、それぞれの重量を計量した。その結果、皮下脂肪、内臓脂肪とも OVX 3 週間後に有意に増加し、2 週間の E2 補充でその増加が抑制された。E2 の脂肪重量に対する影響は、内臓脂肪と皮下脂肪の間では有意な差は認められなかった。その他の臨床研究でも、5 年間以上の長期的な検討では、閉経後女性に対する E2 補充により体重減少するとともに脂肪の蓄積も減少し、特に体幹部の脂肪は減少し、肥満型に比して非肥満型の方が E2 の補充による脂肪組織の減少は著明であったという報告がある。一方、短期間の E2 補充では、placebo 群の方が補充群に比べ、体重は有意に増加していたが、体脂肪のパーセンテージ (% body fat) や BMI や W/H は変化が見られなかったとの報告がある。E2は、短期間ではまず体重に影響し、脂肪には遅れて作用する可能性が考えられる。

次に、E2 の低下とともに肥満をきたす要因について検討を加えたところ、OVX 後 3 週間で 3 群間での体重の差は認められず、OVX 群の体重増加が抑制された。また皮下脂肪と内臓脂肪重量の変化の検討では、群間差が認められなかった。これらの結果から、OVX ラットの体重および脂肪重量の増加は摂食量の増加が原因と考えられた。

Pair-feeding での検討から、E2 が食欲中枢に作用して摂食量を抑制し、肥満が抑制された可能性があると考えられたので、水溶性の E2 を直接中枢核内に投与する実験を行ったが、対照群との差は見られなかった。そこで次に脳室全体に E2 を投与する検討を行った。OVX ラットに Vehicle群と E2 群に分けて脳室内持続投与を行ったところ、E2 投与群の摂食量は有意に抑制された。E2 が中枢に作用していることが確認できたので、次に ER- α 、ER- β いずれのレセプターを介しているのかを検討した。E2 と同時に ER アンチセンス ODN を脳室内投与した結果、ER- β アンチセンス ODN の投与により E2 の摂食及び体重抑制作用が減弱されたにもかかわらず、ER- α アンチセンス ODN では減弱作用は認められなかった。本実験により E2 の肥満抑制作用は中枢の ER- β を介していると考えられた。

以上、エストロゲンは中枢を介した摂食抑制作用があると考えられ、その摂食抑制の機序として中枢神経に存在する ER- β の関与が示唆された。VMHはER- α は存在するがER- β は存在しないようである。また今回の基礎検討ではVMHに対するE2の投与では摂食は低下しなかった。これらの結果も、E2の摂食抑制作用がER- β を介している可能性を支持する。