

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 本田美穂

本研究は、アルコールによるインスリン抵抗性発現の分子機構を明らかにするため、正常ラットにアルコールを急性・慢性に負荷してインスリン抵抗性出現を確認し、その後アルコールがインスリン標的臓器におけるインスリンシグナル伝達機構へ及ぼす影響を調べたものであり、下記の結果を得ている。

1. 慢性アルコール投与モデルを作るために、オスの4週齢 Sprague-Dawley ラットを、2週間35%アルコール含有液状食またはアルコールと同カロリー分のマルトースデキストリンを含むコントロール食で飼育した。その結果、体重、血圧、空腹時の血糖値、インスリン値は両者に差を認めなかったが、GPT値、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸値はアルコール投与群で高値を示した。また急性アルコール投与モデルを作るために、実験の30分前に2.5g/Kg体重のアルコールを経口投与したところ、実験開始時の門脈血中エタノール、エピネフリン、ノルエピネフリン値は、コントロール群と比較して明らかに高値を示した。
2. 生体内のインスリン作用を高インスリン正常血糖クランプ法を用いて測定したところ、急性投与ラット・慢性投与ラット共に、全身的にも肝臓においても有意なインスリン抵抗性を示した。グルコース注入速度は、急性投与で30%、慢性投与で49%とコントロールと比較し明らかに低下した。その際のグルコース利用率も、急性投与で48%、慢性投与で69%と明らかに低下した。同時にアルコール負荷ラットの肝糖放出率は明らかに増加し、インスリンによる肝糖放出抑制作用が、急性投与でも慢性投与でも低下することが示された。
3. 各群のラットの骨格筋における糖取り込みを比較した。麻酔下のラットから摘出したヒラメ筋を2-deoxy glucose とインスリンの存在下で培養し、筋に取り込まれた2-deoxy glucose を測定したところ、コントロール群のヒラメ筋はインスリン刺激によって4.4倍糖取り込みが増加したが、急性アルコール投与群では取り込みが25%減少した。慢性アルコール投与群ではインスリン非刺激下での糖取り込みがコント

ロール群と比較して 198%と増加したが、インスリン刺激後では若干減少した。

4. 骨格筋・肝臓・精巣上脂肪組織におけるインスリン刺激によるインスリン受容体、IRS-1,2 のチロシンリン酸化を観察した。ラットの門脈からインスリンまたは生理食塩水を注射し、その後肝臓、下肢の筋肉、精巣上脂肪組織を摘出した。これらの組織をホモジナイズし、抗 IRS-1,2 抗体と抗ホスホチロシン抗体で免疫沈降を行った。生体内でのインスリン刺激後、各組織のインスリン受容体のチロシンリン酸化は明らかに増加した。筋肉、肝臓、脂肪組織の IRS-1 の蛋白量は、急性投与群・慢性投与群共にコントロール群とほぼ同じであった。インスリン非刺激下での IRS-1 のチロシンリン酸化レベルは 3 組織ともコントロール群と同程度であった。しかし、インスリン刺激後では急性投与群・慢性投与群共に 3 組織とも IRS-1 のチロシンリン酸化レベルが上昇した。肝臓、脂肪組織における IRS-2 のチロシンリン酸化も明らかに増加を認めた。
5. 4.と同様に抗 IRS-1,2 抗体、抗ホスホチロシン抗体を用いて免疫沈降した各組織のサンプルで PI 3-kinase 活性を測定した。抗 IRS-1 抗体で免疫沈降後のインスリン刺激後 PI 3-kinase 活性は急性投与群・慢性投与群共に明らかに増加を示した。抗 IRS-2 抗体で免疫沈降後のインスリン刺激後 PI 3-kinase 活性は急性投与群の脂肪組織で 2.3 倍、慢性投与群の肝臓で 3.2 倍、脂肪組織で 2.5 倍と高値を示した。抗ホスホチロシン抗体で免疫沈降後のインスリン刺激後 PI 3-kinase 活性は、急性投与群の骨格筋で 2.4 倍、脂肪組織で 3.4 倍、慢性投与群の骨格筋で 2.4 倍、肝臓で 4.5 倍、脂肪組織で 3.6 倍と上昇を認めた。これらの結果より抗 IRS-1,2 抗体、抗ホスホチロシン抗体に結合する PI 3-kinase 活性は、インスリン刺激後において急性投与、慢性投与両群で明らかに増加することが示された。また、同時に測定した PI 3-kinase の下流基質である Akt のリン酸化も、3 組織ともアルコール負荷群で明らかに亢進していた。

以上、本論文はアルコールが急性投与・慢性投与に関わらず全身のインスリン抵抗性を誘起し、その際初期のインスリンシグナル伝達系、特に PI 3-kinase と Akt のリン酸化亢進を伴うことが明らかとなった。本研究は、アルコールが糖代謝に及ぼす影響とその分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。