

氏 名	磯 田 雅 代
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 586 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	1,3-ブタンジオールによるレプチン抵抗性改善効果とその作用メカニ ズム
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 遠 藤 仁 司 (委 員) 教 授 田 島 敏 広 教 授 尾 仲 達 史

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

レプチンは主に視床下部を介してエネルギー恒常性を調節する脂肪由来ホルモンである。血中レプチンは視床下部の弓状核で高濃度に発現するレプチン受容体に結合し、摂食量と体重を低下させる。血中レプチンレベルは体脂肪量に比例して増加するため肥満者では血中レプチン濃度が高いが、レプチンの増加は肥満の進行を抑制することはできない。このような状態はレプチン抵抗性と呼ばれる。視床下部の小胞体(ER)ストレスがレプチン抵抗性の病因に重要な役割を果たしていることが報告されている。ER ストレス下では、誤って折り畳まれたタンパク質の蓄積により、小胞体ストレス応答が促進され、相当量の ATP が消費される。したがって、視床下部 ATP 濃度を上昇させることにより ER ストレスとレプチン抵抗性に対して保護効果が期待できる。今回、中枢神経系における ATP 濃度を上昇させることが実証されている外因性ケトン体生成物である 1,3-ブタンジオール(BD)を用いて、視床下部 ATP 濃度の上昇が視床下部における ER ストレスとレプチン抵抗性に対する改善効果を持つかどうかを検討した。

### 2 研究方法

血中ケトン体濃度を上昇させるために、BD を外因性ケトン体生成物として使用した。具体的には食餌誘発性肥満(DIO)に対するケトン体の予防効果を調べるために、マウスに通常食(SD)もしくは高脂肪食(HFD)を自由摂食させ、高脂肪食を摂食させるのと同時に BD を 5g/kg の用量で gavage 法にて経口投与した。また DIO に対するケトン体の治療効果を調べるために、HFD を 8 週間かけた DIO マウスに BD を投与した。レプチン感受性を調べるために、マウスに生理食塩水または 150μg/kg の用量のレプチンを腹腔内注射し、24 時間の食餌摂取量を測定した。視床下部における STAT3 のリン酸化をウェスタンブロット解析にて評価した。また ER ストレスに対する BD の効果を評価するため、視床下部における CHOP の発現および PERK のリン酸化をウェスタンブロット解析した。その際の視床下部 ATP 濃度を測定した。

### 3 研究成果

BD 投与により、血中  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸濃度および視床下部 ATP 濃度は効果的に上昇した。BD

投与は、視床下部のERストレスマーカーであるCHOPの発現およびPERKのリン酸化を抑制し、レプチンによる摂食抑制作用および視床下部STAT3のリン酸化を著明に増強させた。その結果、BD投与はC57BL/6Jマウスにおける食餌誘発性肥満(DIO)に対する予防効果と治療効果の両方を発揮した。

#### 4 考察

本研究では体重と摂食量に対するケトン体の効果を調べるために、血中ケトン体濃度を上昇させる外因性ケトン体生成物として、BDを使用した。さらに、食餌組成の変化を避けるために混餌ではなくgavage法にてマウスに経口投与した。BD投与は血中 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸濃度と視床下部ATP濃度を上昇させると同時に、ERストレスマーカーを抑制し、レプチンの視床下部に対する感受性を改善させた。これらの結果はBDによるレプチン感受性改善効果が視床下部ATP濃度の上昇を介して生じることを示唆している。また、体重に対するBDの効果の違いはレプチン抵抗性の強度の違いによる可能性が考えられた。

#### 5 結論

本研究は視床下部におけるERストレスとレプチン抵抗性に対するBDの改善効果を明らかにした初めての報告である。BD投与により血中ケトン体濃度および視床下部ATP濃度は効果的に上昇し、ERストレスとレプチン抵抗の改善が認められた。BDによるERストレスとレプチン抵抗性の改善は視床下部ATP濃度の上昇を介した作用であると考えられた。視床下部ATPは、肥満とその合併症の治療標的として有望であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、外因性ケトン体生成物として1,3-ブタンジオール(BD)を投与することにより、食餌誘導性肥満(DIO)により生じる視床下部のレプチン抵抗性が改善する効果とその作用メカニズムについて研究を行った。その結果、DIOにより生じたレプチン抵抗性については、BD投与によりレプチンシグナルの下流にあるSTAT3のリン酸化の反応性に改善が認められることを示して、レプチン抵抗性を改善したことを示した。さらに、BD投与により視床下部のERストレスマーカーの上昇を改善させ、また視床下部ATP濃度を増加させることを示し、これらがレプチン抵抗性の改善に関与することを示唆した、新規性の高い論文である。

論文においては、BDを投与する時間やサンプル採取時間の詳細な方法を明示すること、DIOマウスにおけるBDの短期投与実験における摂食量やSTAT3のリン酸化比率において2群分散比較を行いBD投与の効果を検討すること、摂食量の初期値を再検討することなどが指導され、さらに考察にはケトン体の上昇における全身性の因子についての可能性を追記し、ケトン体の視床下部に対する直接作用のみを強調せず、論理性を保持しつつ記載するよう指導された。また、論文中の誤字を訂正するよう指導された。

全般として、本論文は学位論文として相応しいと全員一致で認められた。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は、学位論文の内容の準じ、スムーズに発表を行った。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめた通りである。各審査委員から、実験方法、データ解釈、考察等について多くの質問がなされた。いずれの質問についても適切な返答がなされ、有意義な質疑応答が行われた。以下に質疑応答の抜粋を示す。

- ・ 1,3-ブタンジオール(BD)の投与による血中ケトン体の増加が示されたが、脳脊髄液でも上昇するのか、また、BD の予防投与で視床下部 ATP 濃度が実際増加しているのかの質問があったが、ob/ob などの別の系で検証しているとの回答があった。

- ・ BD 投与によるケトン体の増加によって生じる摂食量の減少やレプチン抵抗性の改善は、視床下部のみを標的として作用するのか、全身性の因子を介して作用するのか、ER ストレスマーカーの改善が、すなわち摂食量の低下を意味するのかとの質問があり、不明である旨の回答がなされた。学位論文の考察にケトン体の上昇における全身性の因子についての可能性を追記し、ケトン体の視床下部に対する直接作用のみを強調せず、論理性を保持しつつ記載するよう指導された。

- ・ BD を投与する際の投与時間やサンプル採取の時間などについて、実験方法の詳細についての質問があった。BD の投与時間は、一回投与の場合は9時、二回投与の場合は、9時と17時とのことで、投与後4時間後にサンプル採取を行なったとの回答があった。学位論文にはこれらの詳細な方法を記載するよう指導された。

以上、申請者の発表および質疑応答から、審査員全員が最終試験に合格と判断した。