

氏 名	金崎 めぐみ
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第697号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 3月10日
学位論文題目	Ketogenic essential amino acids replacement diet ameliorated hepatosteatosis withaltering autophagy-associated molecules (ケト原性必須アミノ酸置換食による脂肪肝改善効果はオートファジー 関連分子の変化を伴う)
審査委員	主査 教授 縣 保年 副査 教授 等 誠司 副査 教授 木村 隆英

論文内容要旨

※整理番号	703	(ふりがな) 氏名	金崎 めぐみ
学位論文題目	Ketogenic essential amino acids replacement diet ameliorated hepatosteatosis with altering autophagy-associated molecules (ケト原性必須アミノ酸置換食による脂肪肝改善効果はオートファジー関連分子の変化を伴う)		
<p>【目的】脂肪肝は、肥満、脂質異常、2型糖尿病の発症や進展の要因となる。近年、増加傾向にあるが生活習慣の改善のほか効果的な治療法がなく、病態生理に基づいた治療法の開発が望まれている。脂肪肝では細胞内で不要なタンパクを分解するシステムの1つであるオートファジーが阻害されているとの報告や、アミノ酸組成と肥満、耐糖能障害に関連がみられるとの報告をふまえ、高ケト原性アミノ酸置換食が脂肪肝を改善する、そしてオートファジーにも関与しているとの仮説のもと、食餌性脂肪肝モデルマウスに独自のアミノ酸配合食を与えその効果を検討した。</p> <p>【方法】高ケト原性アミノ酸置換食が脂肪肝モデルマウスの代謝に与える影響を以下の方法で検討した。①肝臓の代謝調節に与える影響の検討：8週齢雄性 C57/B16 を3群にわけ、それぞれコントロール食（以下C群：7%w/w 脂肪）、高脂肪食(HFD：30%w/w 脂肪)、ケト原性アミノ酸置換高脂肪食(HFD^{KAAR}：30%w/w 脂肪、アミノ酸置換食)を8週間与え飼育した。その後、HFD群はHFD食続行とHFD^{KAAR}食へ変更(HFD^{HFD-KAAR})の2群にわけ、さらに4週間または8週間飼育した。タンパク/総アミノ酸は3群とも23%w/wのうち15%w/wはカゼインを模したアミノ酸配合、残りの8%w/wはC食とHFD食のアミノ酸組成は同じカゼイン様で、HFD^{KAAR}はイソロイシン、ロイシン、リジン、スレオニン、バリンを強化した組成となっていた。①-a 体重、組織重量、摂取カロリー：体重、食餌摂取量、(屠殺後)臓器の重量を測定した。①-b 耐糖能：糖負荷試験を行い血糖値、インスリン濃度を測定した。①-c 脂肪肝に対する効果：オイルレッドOを用いて脂肪染色した。①-d 栄養応答シグナル：関連分子の発現をウェスタンブロット法で解析した。②オートファジー機構の評価：8週齢雄性 LC3-GFP マウスまたは C57/B16 を用い上記のプロトコールで飼育した。②-a LC3-GFP 陽性ドットの発現：蛍光顕微鏡で観察した。②-b オートファジー関連分子の発現：関連分子の発現をウェスタンブロット法で解析した。③マクロファージ集積：免疫蛍光染色し F4/80 陽性細胞を観察した。④既存の脂肪肝の改善効果：HFD群とHFD^{HFD-KAAR}群を①~③と同様の方法で比較検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】①-a 体重は16週でC群に比しHFD群で有意に増加し、HFD^{KAAR}群とHFDからHFD^{KAAR}に切り替えた群はHFD群より低下した。同様の傾向が肝臓、精巣上体周囲脂肪の重量でも見られた。摂取カロリーは12週以降HFD群で増加した。①-b 耐糖能テストでは8週以降HFD群は耐糖能異常を示しHFD^{KAAR}群は改善を認めた。①-c HFD群で認められた脂肪肝はHFD^{KAAR}群では改善していた。①-d C群に比してHFD群では肝のLKB1、pAMPK、sirt1の発現の低下をみとめHFD^{KAAR}群では改善していた。

②-a LC3-GFP陽性ドット数はHFD群で減少、HFD^{KAAR}群でHFD群に比し増加を認めた。②-b C群に比しHFD群でLC3-II/I比、Atg13は低下、HFD^{KAAR}群でHFD群に比し増加を認めた。LC3-I、Atg7、Atg9、Beclinの発現に差は認めず、p62SQTM1はHFD^{KAAR}群で低下を認めた。③16週のHFD群でC群と比しF4/80陽性細胞集積増加を認めHFD^{KAAR}群で低下を認めた。④-a HFD^{HFD}-^{KAAR}群は既存の脂肪肝を改善した。④-b HFD群に比しHFD^{HFD}-^{KAAR}群ではLKB1、pAMPK、sirt1の増加、pmTOR、Foxo3aの減少、またLC3-II/I比、Atg13の増加、p62SQTM1の減少が認められた。④-c HFD^{HFD}-^{KAAR}群では耐糖能の改善を認めた。

【考察】高脂肪食摂取によりマウスの体重増加、耐糖能異常、インスリン抵抗性、脂肪肝の発症が認められた。他の構成栄養素は同一でケト原性アミノ酸を強化した食餌を与えたところ、いずれも改善した。また栄養応答シグナル、オートファジー関連分子の変化も伴っていた。8週間高脂肪食投与後アミノ酸置換食に切り替えてさらに8週間飼育すると既存の体重増加、耐糖能障害、インスリン抵抗性および脂肪肝の改善が認められた。この結果から食事時のアミノ酸バランスの改変が脂肪肝発症の予防と治療に対して栄養応答シグナルの正常化とオートファジー機構の誘導を介して有効な手段となる可能性が示唆される。

【結論】ケト原性必須アミノ酸置換食による脂肪肝改善効果はオートファジー関連分子の変化を伴う。

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	703	氏名	金崎 めぐみ
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>脂肪肝は2型糖尿病等の発症要因となるが、効果的な治療法がなく、病態生理に基づいた治療法の開発が望まれている。脂肪肝では、不要なタンパク質を分解するシステムであるオートファジーが阻害されているとの報告や、アミノ酸動態と肥満、耐糖能障害に関連がみられるとの報告をふまえ、本研究では、高脂肪食(HFD)により惹起される脂肪肝に対する、ケト原性アミノ酸置換食(HFD^{KAR})の効果について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) HFDにより、マウスの体重増加、耐糖能異常、インスリン抵抗性、脂肪肝の発症が認められたが、HFD^{KAR}によりいずれも改善した。 2) HFDにより、栄養応答シグナルに関わる肝のLKB1、p-AMPK、Sirt1の低下が認められたが、HFD^{KAR}で改善した。 3) HFDにより、オートファジーに関わる肝のLC3-II/I比、Atg13の低下が認められたが、HFD^{KAR}で改善した。 4) HFDを8週間投与後、HFD^{KAR}に切り替えさらに8週間飼育しても、体重増加、耐糖能障害、インスリン抵抗性および脂肪肝の改善が認められた。 <p>本論文は、ケト原性アミノ酸置換食による脂肪肝の改善における栄養応答シグナルやオートファジーに関わる分子の変化について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 596字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26年 1月28日)</p>			