



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アンドロゲンの異常を背景とした肥満に対するオキシトシンを用いた治療アプローチの研究
Author(s)	山本, 祥太
Description	配架番号 : 2880
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16156号
Issue Date	2024-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16156
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93446
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Shota.pdf



学 位 論 文

アンドロゲンの異常を背景とした肥満に対する

オキシトシンを用いた治療アプローチの研究

(Treatment approaches with oxytocin for obesity due to abnormal testosterone balance)

2024 年 9 月

北海道大学

山本祥太

学 位 論 文

アンドロゲンの異常を背景とした肥満に対する

オキシトシンを用いた治療アプローチの研究

(Treatment approaches with oxytocin for obesity due to abnormal testosterone balance)

2024 年 9 月

北海道大学

山本祥太

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	3
略語表	6
緒言	7
方法	11
結果	21
考察	36
結論	41
謝辞	43
利益相反	44
引用文献	45

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文にて発表したものである。

- Shota Yamamoto, Hiroki Noguchi, Asuka Takeda, Ryosuke Arakaki, Maimi Uchishiba, Junki Imaizumi, Saki Minato, Shuhei Kamada, Tomohiro Kagawa, Atsuko Yoshida, Takako Kawakita, Yuri Yamamoto, Kanako Yoshida, Masafumi Kon, Nobuo Shinohara and Takeshi Iwasa. Changes in Endogenous Oxytocin Levels and the Effects of Exogenous Oxytocin Administration on Body Weight Changes and Food Intake in Polycystic Ovary Syndrome Model Rats. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 26; 23(15):8207. PMID: 35897783 PMCID: PMC9330807 DOI: 10.3390/ijms23158207

投稿先 : International Journal of Molecular Sciences

- Shota Yamamoto, Ryosuke Arakaki, Hiroki Noguchi, Asuka Takeda, Maimi Uchishiba, Shuhei Kamada, Ayuka Mineda, Masafumi Kon, Takako Kawakita, Riyo Kinouchi, Yuri Yamamoto, Kanako Yoshida, Nobuo Shinohara, Takeshi Iwasa. New discoveries on the interaction between testosterone and oxytocin in male rats - Testosterone-mediated effects of oxytocin in the prevention of obesity. *Physiol Behav.* 2023 Jul 1; 266:114199. PMID: 37062515 DOI: 10.1016/j.physbeh.2023.114199

投稿先 : Physiology and Behavior

本研究の一部は以下の学会または雑誌にて発表した。

- 山本祥太、野口拓樹、内芝舞実、湊沙希、鎌田周平、山本由理、岩佐武、『PCOS モデルラットに対するオキシトシンのダイエット効果の検討』、第 27 回日本生殖内分泌学会学術集会、2022 年 12 月 17 日～12 月 18 日、広島コンベンションホール
- 山本祥太、新垣亮輔、野口拓樹、武田明日香、内芝舞実、鎌田周平、峯田あゆか、今雅史、河北貴子、木内理世、山本由理、吉田加奈子、篠原信雄、岩佐武、「ラットにおけるテストステロンとオキシトシンの関係について

て新しい知見—テストステロンのオキシトシンを介した抗肥満作用」、北海道医学雑誌、2023 年、第 98 巻 2 号、116.

要旨

【背景と目的】肥満の原因として食生活の乱れ、運動不足、ストレスをはじめとしたさまざまな要因があり、そのうちのひとつとして血清アンドロゲンのバランス異常にともなうものがある。女性においては、多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic Ovary Syndrome: PCOS)においてアンドロゲンが上昇することにより肥満のリスクが上昇する。一方、男性においては男性更年期や前立腺癌に対するホルモン治療といった要因でアンドロゲンが減少することにより、肥満のリスクが上昇する。今回、抗肥満治療薬の候補としたオキシトシン(oxytocin: OT)は視床下部室傍核、視索上核で合成される神経ペプチドで、近年では肥満のげっ歯類、サル、ヒトにおいて中枢における食欲抑制作用、末梢における脂肪燃焼作用があることが報告されており、抗肥満治療薬としての利用が期待されている。また、肥満の個体において血清 OT が低下していることがわかっている。以上を踏まえ、本検討では次の仮説を立てた。仮説①：肥満リスクのある PCOS では内因性の OT が低下しているのではないかと。OT は PCOS の抗肥満治療薬として有用ではないだろうか。仮説②-1：肥満リスクのある男性更年期では内因性の OT が低下しているのではないかと。OT は男性更年期において抗肥満治療薬として有用ではないだろうか。仮説②-2：さらに仮説①の結果にもとづき男性更年期に対してアンドロゲンを補充することにより内因性 OT に変化を与えるのではないかと。以上2つの仮説を検証すべく、アンドロゲンと OT の関係性について雌ラット、雄ラットを用いて実験し、アンドロゲン関連の肥満に対する OT の抗肥満効果を調査することとした。

【材料と方法】仮説①を検証すべく、Wistar 系ラットの雌におけるアンドロゲン作用について PCOS モデルラットを用いて検討した。28 日齢の雌ラットにジヒドロテストステロン(dihydrotestosterone: DHT)を充填したシリコンチューブを埋め込むことで PCOS モデルラット(PCOS 群、n=8)を作成し、空のシリコンチューブを埋め込んだ雌ラットをコントロール(CON 群、n=8)とした。49 日齢より 9 日間毎日生理食塩水とパスツールピペットで採取した膣スメアをギムザ染色し、顕微鏡で性周期を観察した。84 日齢まで摂食量と体重経過を 1 週間毎に測定した。途中、70 日齢頃に 3 日間明期または暗期に生食を腹腔投与したことによる摂食量と体重変化の平均を、明期または暗期に OT を単回投与したことによる変化と比較した。90 日齢において断頭し脳、内臓脂肪、皮下脂肪、卵巣、子宮、血液を採取した。液体窒素にて凍結した脳から視床下部を切り出し、RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法と Real-time PCR 法にて摂食因子の mRNA(messenger ribonucleic acid)発現を調べた。内臓脂肪、皮下脂肪は単一検者にて採取し重量測定後、組織片を 2 つずつ採取し、1 つは凍結、もう 1 つは 4% - パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液につけて組織固定をした。卵巣

は左卵巢を採取し、重量を測定したあと同様に組織固定をした。子宮は摘出後に重量測定のみ行った。凍結した脂肪片の OT 受容体(OT receptor: OTR)の mRNA 発現を調べた。組織固定した脂肪片から作成した Hematoxylin-Eosin (HE)染色標本を観察し、脂肪細胞の平均サイズを測定した。組織固定した卵巢の HE 染色標本を作成した。血液は遠心分離し、血清を採取した。採取した血清の OT 濃度測定を株式会社あすか製薬メディカルに依頼した。さらに、OT の反復投与による変化を検討するため、同様に PCOS 群(n = 8)と CON 群(n = 8)を作成し、70 日齢より生理食塩水を 7 日間暗期に腹腔投与後、77 日齢より OT を 7 日間暗期に腹腔投与し、摂食量と体重の変化を比較した。

仮説②-1 検証のため、8 週齢の Wistar 系の雄ラットを精巣摘除(Orchidectomy : ORX)して男性更年期ラット(ORX 群、n = 8)を作成し、偽手術を行ったラットをコントロール(CON 群、n = 8)とした。仮説②-2 検証のため、ORX 後にテストステロン充填チューブを留置したテストステロン補充療法モデル(ORX-T 群、n = 7)を作成し、ORX 後に空のシリコンチューブを留置したラットをコントロール(ORX-non T 群、n = 7)とした。すべてのラットの摂食量、体重経過を 1 週間毎に測定した。男性更年期ラットに対する OT 投与の効果を検討するため、ORX 群と CON 群において 70 日齢から 7 日間ずつ生食、OT を夜間に腹腔投与し摂食量と体重の変化を測定した。すべてのラットを 16 週齢で断頭し、脳、内臓脂肪、皮下脂肪、血液を採取した。前述と同様の方法で、視床下部摂食因子の mRNA 発現を調べた。内臓脂肪、皮下脂肪についても同様に単一検者にて重量を計測したのち、組織片を採取し OTR、leptin、adiponectin の mRNA 発現を調べた。また、HE 染色を行って脂肪細胞サイズを測定した。血液は遠心分離して血清を採取し、OT 濃度の測定を株式会社あすか製薬メディカルに、アルブミン、肝機能酵素、中性脂肪、コレステロール、adiponectin 濃度の測定をオリエンタル酵母工業株式会社に依頼した。

【結果】本検討で作成した PCOS モデルラットにおいて、PCOS の臨床像と同様に性周期の不規則化、卵巢の多発性嚢胞が観察された。過去報告と同様に、PCOS 群において体重、摂食量、体脂肪量が有意に増加した。血清 OT は PCOS 群において有意に減少した。OT 単回投与については、PCOS 群においてのみ夜間投与をした場合に限り摂食量と体重が有意に減少した。OT 反復投与については、PCOS 群と CON 群いずれにおいても摂食量を低下させたが体重は変化しなかった。

体重と摂食量は ORX 群より CON 群、ORX-non T 群より ORX-T 群で有意に多く、脂肪サイズはそれぞれ ORX 群より CON 群、ORX-non T 群より ORX-T 群において有意に小さかった。血液生化学検査は、それぞれ ORX 群より CON 群、ORX-non T 群より ORX-T 群において有意にコレステロールが低く、OT が高か

った。食欲抑制因子の mRNA 発現については、ORX-T 群で視床下部の OTR 発現が増加していること、内臓脂肪の adiponectin 発現が上昇していることがわかった。OT 反復投与により、CON 群、ORX 群両方において体重増加と摂食量が抑制され、特に体重増加への影響はテストステロンの存在する CON 群でより大きかった。

【考察】雌においてはアンドロゲン高値である PCOS モデルラットにおいて血清 OT が低下していることがわかった。PCOS モデルラットに対して夜間 OT 投与をした場合に限り摂食量と体重が有意に減少したことから、OT の不足を夜間に外因的に補うことで、抗肥満作用が得られることがわかった。雄においてはテストステロンが減少すると血清 OT が低下することが示された。OT は男性更年期における抗肥満作用が期待できるほか、テストステロンによる抗肥満作用を補助する役割もあると考えられた。また、テストステロンによる adiponectin を通じた動脈硬化の予防効果は OT を介している可能性が考えられた。以上から、肥満リスクの上昇する PCOS や男性更年期のモデルラットでは血清 OT が低下すること、また OT 投与が抗肥満に貢献できる可能性が示唆された。一方、現時点では OT 製剤には静注薬や点鼻薬しか存在しない。抗肥満を目的に OT を投与する場合は最も侵襲の少ない経口摂取がふさわしいと考えられるが、OT 自体が古くから知られる物質であるため物質特許が切れていることなどの事情で内服 OT 薬の開発を手掛ける企業がおらず難抗している。また、このように雌と雄においてアンドロゲンと血清 OT の関係が異なる根拠は明らかではなく、エストロゲン、アンドロゲン、OT の分子学的相互作用について検討していくことが望まれる。

【結論】PCOS や男性更年期による肥満に対して、OT を外部から補うことで抗肥満に貢献できる可能性が示唆された。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通り。

AgRP	agouti-related protein
Alb	Albumin
DHT	dihydrotestosterone
E-CHO	esterified cholesterol
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HE	Hematoxylin-Eosin
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
mRNA	messenger ribonucleic acid
NPY	neuropeptide Y
ObRb	leptin receptor
ORX	Orchidectomy
OT	Oxytocin
OVX	Ovariectomy
PCOS	polycystic ovary syndrome
POMC	pro-opiomelanocortin
pporexin	prepro-orexin
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
T-CHO	total cholesterol
TG	Triglycerides
TP	total protein
two-way ANOVA	two-way repeated-measures analysis of variance
18S rRNA	18S ribosomal ribonucleic acid

緒言

肥満はメタボリックシンドローム、高血圧、脂質異常症、耐糖能異常などさまざまな生活習慣病の原因となる。肥満は摂取エネルギー量が消費エネルギー量を上回り続けることによって生じるが、その原因としては食生活の乱れ、運動不足、ストレスなど生活習慣が原因となるもののほか、遺伝的要因、疾患にともなうものなど多彩である。肥満の原因のひとつとして、性ホルモンバランスの異常にともなうものがある。例えば、エストロゲンに関するものとしては女性の閉経後の肥満が挙げられる。アンドロゲンに関するものとしては、女性であれば多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic Ovary Syndrome: PCOS)、男性であれば男性更年期にともなう肥満リスクの上昇が挙げられる。本研究では、これらのうちアンドロゲンに関連した肥満に着目した。なお、本研究において肥満とは、単に摂食量や体重が増加するだけではなく、脂肪代謝異常により内臓脂肪や皮下脂肪など体脂肪が増大することを指す。

アンドロゲンは、主に男性の精巣のライディッヒ細胞で分泌されるステロイドホルモンであり、一般に男性の健康維持に重要とされる物質である。男性、女性において、アンドロゲンのバランスが崩れることにより肥満のリスクが上昇することが知られている。すなわち、女性においては PCOS のようにアンドロゲンが上昇することにより、肥満のリスクが上昇する(Ehrmann, 2005)。一方、男性においては更年期障害や前立腺癌に対するホルモン治療といった要因でアンドロゲンが減少することにより、肥満のリスクが上昇する(Nikolaenko et al, 2014)。本研究はこのようなアンドロゲンのバランスが崩れる病態の疾患モデル動物を利用し、OT(oxytocin: OT)の変化を中心に検証し、OT が抗肥満治療薬の候補になり得るものか検証したものである。

今回、抗肥満治療薬の候補とした OT は 9 つのアミノ酸により構成される神経ペプチドであり、視床下部室傍核、視索上核で合成され、下垂体後葉から分泌される(Du Vigneaud V et al, 1953)。射乳や子宮収縮作用が古くから知られているが、近年では肥満のげっ歯類、サル、ヒトにおいて OT 投与によって迷走神経の求心性ニューロンの活性化により中枢における食欲抑制作用が得られるほか、末梢における内臓脂肪の β 酸化を促進することによって脂肪を燃焼させる作用があることが報告されており、実際に OT を投与することにより減量効果が得られることがわかっている(Blevins et al, 2015; Iwasaki et al, 2015; Thienel et al, 2016; Maejima et al, 2018)。加えて、肥満においては血清 OT が低下しており、肥満なラットやヒトに対して OT 投与による減量がより効果的であることがわかっている(Altirriba et al, 2014; Maejima et al, 2017; Thienel et al, 2016)。

PCOS は生殖年齢の女性に頻発し、有病率は 5-16%であると言われている (Lauritsen et al, 2014; Rosenfield et al, 2016; Ding et al, 2017)。しかし、その病態についてはよくわかっていない。PCOS は排卵障害による不妊の原因になる (Rotterdam, 2004)ほか、肥満やインスリン抵抗性・2 型糖尿病、脂質異常症といった代謝異常のリスクが上昇することがわかっており、またこのような生殖・代謝異常は肥満によってさらに悪化に拍車がかかることが知られている (Ehrmann, 2005; Moran et al, 2010)。また、PCOS においては血液の白血球数の上昇が見られるなど低悪性度炎症性疾患であるともされており (Gonzalez, 2012)、その原因は主に蓄積した内臓脂肪によるものだと言われている (Escobar-Morreale, 2018; Hu et al, 2020)。すなわち、PCOS の内臓脂肪では脂肪細胞が低酸素により壊死することによって多数の炎症細胞を集め、様々な炎症性サイトカインを産生する (Gershon, 2020; Rostamtabar, 2021)。このような、肥満をもつ PCOS 患者に対しては栄養指導を中心とした食事療法が勧められる (Ladson et al, 2011; Bates et al, 2013)。しかし、栄養指導のドロップアウト率は 50-70%にもものぼるため、減量に成功する PCOS 患者はほとんどいないのが現状である (Ladson et al, 2011; Foster et al, 2010)。PCOS の病態がインスリン抵抗性により悪化することを防ぐため、インスリン抵抗性が見られる場合はメトホルミンが投与されることもある。しかしメトホルミンは、悪心、嘔吐、下痢、便秘などの副作用の頻度が 4%程度と報告されているほか、重篤な合併症として乳酸アシドーシスがあり、治療中断を余儀なくされることがある (久保田ほか, 2009)。以上の臨床的背景から、効果的かつ安全で継続され得る抗肥満治療薬の開発が待望されている。

一方、男性更年期などにより男性においてアンドロゲンが減少すると骨密度が低下する (Finkelstein et al, 1989)ほか、除脂肪体重 (脂肪以外の組織 — 筋などの重量) が低下することで基礎代謝量が減少し、高脂肪食による脂肪肝リスクが上昇するなど肥満のリスクが上昇するが、これらはいずれもテストステロン補充療法によって改善することが知られている (Tenover, 1992; Young et al, 1993; Bhasin et al, 1994)。また、精巣切除 (Orchidectomy: ORX) を施行した雄ラットは摂食量と体重が減少するものの、テストステロン補充療法によって回復することが報告されている (Nunez and Grundman, 1982; Borst and Conover, 2006)。さらに、ORX を施行した雄ラットは高脂肪食による脂肪肝発症リスクが上昇するものの、テストステロン補充療法によりこのリスクが改善することも知られている (Nikolaenko et al, 2014)。ヒトにおける検討では、中年の肥満男性にテストステロン補充を行うと内臓脂肪が減少することがわかっている (Mårin et al, 1993)。しかし特にわが国のリアルワールドにおいては、抗肥満という目的だけのためにテ

テストステロン補充をむやみに行うハードルは高く、またアンドロゲン依存性に増殖する性質をもつ前立腺癌によりテストステロン補充が行えない患者も少なからず存在する。そこで、テストステロンの代替として抗肥満に貢献する薬剤の開発が望まれる。

OT と性ホルモンの関係については、さまざまな報告がされている。雌ラットにおいてエストロゲンが減少すると血清 OT も減少し、さらにエストロゲンの補充によって低下した血清 OT が回復することが知られている。この機序ははっきりとはわかっていないが、視床下部室傍核の OT ニューロンにエストロゲン受容体が存在していることと関係している可能性がある(Sloan et al, 2018)。卵巣切除(ovariectomy: OVX)によりエストロゲンが除去され、血清 OT が低下した雌ラットは肥満をきたすことが知られるが、OVX を施行した雌ラットに対して OT を投与すると摂食と体重増加が抑制されることが報告されている(Iwasa et al, 2019)。また、過去に DHT を雌ラットに補充することで作成した肥満を呈する PCOS モデルラットに対して OT を投与すると、摂食と体重増加が抑制されることが報告されている(Iwasa et al, 2020)。しかし、この報告における PCOS モデルラットは DHT の作用が強く、子宮や卵巣の萎縮が見られ性周期が消失するなどの問題点があった。これに対し、2021 年に再度開発された後述の新しい PCOS モデルラット(Kamada et al, 2021)では子宮萎縮を起こさず、多嚢胞性卵巣を呈し、性周期の不規則化が見られるなどより実際の PCOS の病態に近いものとなった。そこで、本研究においては Kamada らによるこの新しい PCOS モデルラットを用いて OT 投与の効果を再度検証する必要があると考えた。一方、1980 年代の報告において、雄ラットや雄ヤギに対して ORX を施行することでテストステロンを除去したとしても血清 OT に影響は与えなかったとする報告がなされている(Kirilov et al. 1987; Thornton et al, 1988)が、それ以降アンドロゲンと OT の関係を論じた報告は見られない。現代では血清 OT の測定技術がかなり進歩しているため、雄においてアンドロゲンと OT の関係について再度検証する必要があると考えた。

このように、アンドロゲンは女性において増加したり、男性において減少したりすることによって肥満のリスクが高まることがわかっている。そこで本研究では、アンドロゲンと OT の関係性を調査することを通じて PCOS や男性更年期の肥満治療・予防に OT が使用することができないか、次の仮説に基づいてラットを用いて実験を進めた。仮説①：肥満リスクのある PCOS では内因性の OT が低下しているのではないかと。OT は PCOS の抗肥満薬として有用ではないだろうか。仮説②-1：肥満リスクのある男性更年期では内因性の OT が低下しているのではないかと。OT は男性更年期において抗肥満薬として有用ではな

いだろうか。仮説②-2：さらに、仮説①の検証結果にもとづき、男性更年期に対してアンドロゲンを補充することにより内因性 OT に変化を与えるのではないか。以上仮説を検証すべく、アンドロゲンと OT の関係性について雌ラット、雄ラットを用いて実験し、アンドロゲン関連の肥満に対する OT の抗肥満効果を調査した。

方法

【動物に対する処置】

本検討で使用したラットは、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社 (Kanagawa, Japan) より購入した Wistar 系ラットであり、搬入後、室温 24° C、12 時間の明暗サイクル(8 時点灯、20 時消灯)の環境にて 1 匹ずつ個飼いとした。水と餌についてはおのの自由アクセスできるようにした。本研究で使用する餌はオリエンタル酵母工業株式会社(Tokyo, Japan)より購入した一般的な普通飼料の type MF(100 g 中、水分 8.1 g、粗蛋白質 23.2 g、粗脂肪 4.9 g、粗灰分 5.9 g、粗繊維 3.3 g、可溶性無窒素物 54.7 g、カロリー 355.7 kcal)である。ラットに対して手術を行う際は、セボフルラン(富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan))のほか、三種混合麻酔薬も使用した。三種混合麻酔薬はメデトミジン(日本全薬工業株式会社(Fukushima, Japan)) 0.15 mg/kg、ミダゾラム(丸石製薬株式会社(Osaka, Japan)) 2.0 mg/kg、ベトルファール(明治アニマルヘルス株式会社(Kumamoto, Japan)) 2.5 mg/kg の三薬を生理食塩水と混合して作成した。実際には、メデトミジン 3 mL、ミダゾラム 8 mL、ベトルファール 10 mL、生理食塩水 29 mL を混合した三種混合麻酔薬液を作成しておき、これをラット 100 g あたり 0.25 mL 皮下注射して使用した。本研究における動物実験は、すべて徳島大学動物実験管理規則に基づいて施行された。また、本研究は徳島大学動物実験委員会によって承認された上で施行された(動物実験計画書番号: T2022-102)。

仮説①を検証するため、雌ラットを 16 匹購入し、PCOS 群(n = 8)と CON 群(n = 8)に分けた。事前にアズワン株式会社より内径 3 mm、外径 5 mm のシリコンチューブを購入した。次に、80%ピーナツオイル、20%エタノールの溶液に DHT(東京化成工業株式会社(Tokyo, Japan))を 16 mg/mL となるよう溶解して DHT 溶液を作成した。シリコンチューブを 1 本あたり 20 mm 切り出し、DHT 溶液を満たされた部分の長さが 10 mm となるよう注入し、両端を市販のシリコンボンンドで封じた(DHT 充填チューブ)。DHT 充填チューブの模式図を、図 1 に示した。同様に、DHT 溶液を注入していないシリコンチューブを作成した(空チューブ)。

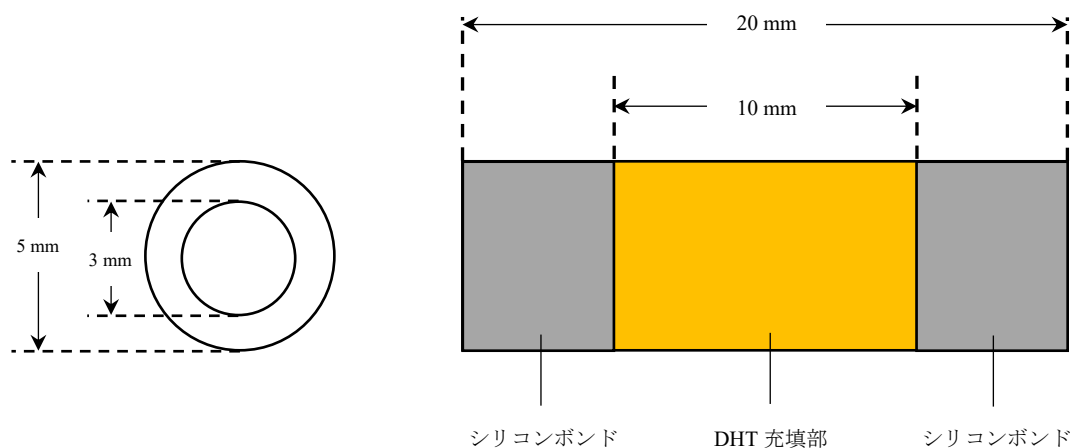


図 1. DHT 充填チューブの模式図

28 日齢において、PCOS 群のラットに対してセボフルラン麻酔下に頸部背側皮下に DHT 充填チューブを 1 本留置することで PCOS モデルラットを作成した。この手法により、PCOS モデルラットが作成できることは過去の検討において証明されている(Kamada et al, 2021)。一方、CON 群に対しては同様の手法で空チューブを留置した。以降、28 日齢から 84 日齢まで毎週体重と摂食量を測定した。

49 日齢から 9 日間にわたり毎日、すべての雌ラットの膺にパスツールピペットを 5 mm 程度挿入し、生理食塩水で 3 回以上洗浄した膺スメア液をスライドグラスに置き、室温にて自然乾燥させた。自然乾燥後、生理食塩水で 3 倍希釈したギムザ染色液(富士フイルム和光純薬株式会社)に 1 分ほどつけ、流水で洗い流すことでギムザ染色を施行した。これを顕微鏡で観察することで、性周期を観察した。ラットの性周期はおおよそ 4-5 日であり、大きく分けて proestrus、estrus、metestrus、diestrus の順で推移する。本検討では、膺スメアを施行した 9 日間における PCOS 群と CON 群の estrus 数を比較した。

次に OT(株式会社ペプチド研究所(Osaka, Japan))の単回投与の効果を調べるため、70 日齢において、すべてのラットに明期(8 時投与)において生理食塩水を 3 日間にわたって 0.4 mL ずつ 27 G 針を用いて腹腔投与し、その後の体重変化率

と摂食量の 1 日あたりの平均を観察した。続いて、明期に OT 溶液(生理食塩水で 1 mg/mL になるよう溶解)を 0.4 mL 腹腔投与し 1 日の体重変化率と摂食量を観察した。暗期(20 時投与)においても、同様の実験を行った。OT の投与量は、過去の報告をもとに決定した(Maejima et al, 2011; Iwasa et al, 2019)。

90 日齢においてセボフルラン麻酔下にすべてのラットを断頭し脳、内臓脂肪、皮下脂肪、卵巣、子宮、血液を採取した。脳は液体窒素にて凍結保存した。腹腔内脂肪を尾側は骨盤底、頭側は腎中部の高さまで見える範囲で採取し内臓脂肪とした。さらに、表皮と筋の間の脂肪を体幹部中央より尾側、鼠径部周囲から可能な限り採取し皮下脂肪とした。脂肪は検者間の個人差によるバイアス可能な限り少なくするため単一検者にて採取し、重量測定を行った。内臓脂肪、皮下脂肪はそれぞれ 5 mm x 5 mm 程度の大きさの組織片を 2 つずつ採取し、1 つは凍結、もう 1 つは 4% - パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(富士フイルム和光純薬株式会社)につけて保存・組織固定をした。液体窒素で凍結保存した検体は、-80° C にて冷凍保存した。卵巣は左卵巣を採取し、重量を測定したあと同様の方法で保存・組織固定をした。子宮は摘出後に重量を測定のみ行った。血液は 4° C、3600 rpm にて 20 分間遠心分離し、血清を採取し、300 μ L ずつ小分けにして -20° C にて冷凍保存した。

さらに、OT の反復投与の効果を調べるため、新たに 28 日齢の DHT 充填チューブを埋め込んだ PCOS モデルラットと、空チューブを埋め込んだコントロールラットを 8 匹ずつ準備した。チューブの埋め込みから 10 週間後、すべてのラットに対して 7 日間にわたって毎日生理食塩水を 0.4 mL ずつ腹腔投与したあと、続けて次の 7 日間にわたって毎日 OT 溶液を 0.4 mL ずつ腹腔投与した。このとき、毎日の体重と摂食量の推移を観察した。

以上、本研究では PCOS モデルラットの体重と摂食量の推移、体脂肪、性周期、卵巣組織を観察することにより PCOS モデルラットがモデルとして妥当であるかどうかを既報(Kamada et al, 2021)と照らし合わせて確認するとともに、新規に血清 OT の測定や組織における遺伝子発現を調査し、さらに OT 末梢投与を行って体重や摂食量の推移を観察した。

仮説②-1 を検証するため、テストステロン除去を行った男性更年期モデルラットにおける影響から調べることにした。8 週齢の雄ラットを 16 匹搬入し、ORX 群(n = 8)、CON 群(n = 8)に分けた。同週齢において、三種混合麻酔下に ORX 群に対しては ORX を施行し、CON 群に対しては開腹後に精巣に鉗子で接

触するのみの偽手術を施行した。手術後より、16 週齢に至るまで毎週体重と摂食量を測定した。

途中、13 週齢においてすべてのラットに対して 7 日間にわたって毎日生理食塩水を 0.4 mL ずつ腹腔投与したあと、続けて次の 7 日間にわたって毎日 OT 溶液(前述と同様、1 mg/mL になるよう生理食塩水に溶解)を 0.4 mL ずつ腹腔投与した。このとき、毎日の体重と摂食量の推移を観察した。

16 週齢において、セボフルラン麻酔下に ORX 群、CON 群のラットをすべて断頭し脳、内臓脂肪、皮下脂肪、血液を採取した。脳は液体窒素にて凍結、内臓脂肪と皮下脂肪は前述と同様の方法で単一検者にて重量を測定したのち、組織片を 2 つずつ切り出して組織固定、および凍結検体を作成した。凍結させた検体は -80°C で保存した。血液は 4°C 、3600 rpm にて 20 分間遠心分離し、血清を採取し、300 μL ずつ小分けにして -20°C にて冷凍保存した。

次に、仮説②-2 の検証のためテストステロン除去後に外因性にテストステロンを補充したテストステロン補充療法モデルラットにおける影響を調べることにした。アズワン株式会社(Osaka, Japan)から購入したシリコンチューブを 1 本あたり 40 mm 切り出し、テストステロン粉末(富士フイルム和光純薬株式会社)を満たされた部分の長さが 30 mm となるよう充填し、両端をシリコンボン드로封じた(テストステロン充填チューブ)。テストステロン充填チューブの模式図を、図 2 に示した。同様に、空チューブも作成した。テストステロン充填チューブの長さや設計は、過去の検討を参考に作成した(De Vries et al, 1994)。

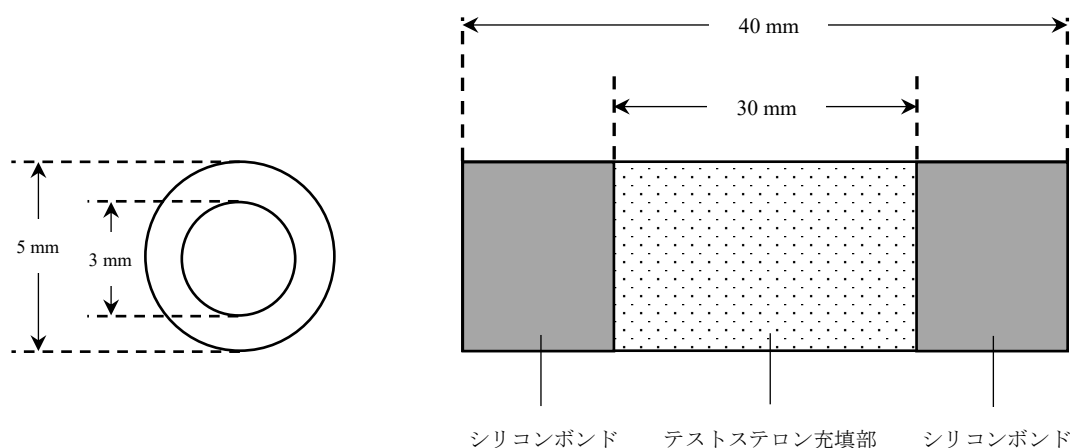


図 2. テストステロン充填チューブ

あらたに 8 週齢の雄ラットを 16 匹搬入し、ORX-T 群(n = 8)と ORX-non T 群(n = 8)に分けた。同週齢において、三種混合麻酔下に ORX-T 群に対しては ORX 施行後に頸部背側皮下にテストステロン充填チューブを留置し、ORX-non T 群に対しては ORX 施行後に空チューブを留置した。この際、ORX-T 群、ORX-non T 群において 1 匹ずつ死亡したため、両群とも n = 7 で実験を続けた。16 週齢にいたるまで毎週体重と摂食量を測定した。

16 週齢において、セボフルラン麻酔下に ORX-T 群、ORX-non T 群のラットをすべて断頭し脳、内臓脂肪、皮下脂肪、血液を採取した。脳は液体窒素にて凍結、内臓脂肪と皮下脂肪は単一検者にて重量を測定したのち、組織片を 2 つずつ切り出して組織固定、および凍結検体を作成した。凍結させた検体は-80° C で保存した。血液は 4° C、3600 rpm にて 20 分間遠心分離し、血清を採取し、300 μ L ずつ小分けにして-20° C にて冷凍保存した。

以上、本研究では男性更年期モデルラットやテストステロン補充療法モデルラットの体重や摂食量、体脂肪の変化を観察することで、雄の体重、摂食、体脂肪に対するテストステロンの作用を既報(Nunez and Grundman, 1982; Borst and Conover, 2006)を照らし合わせて再検証するとともに、新規に血清 OT の測定や組織における遺伝子発現を調査し、さらに OT 末梢投与を行って体重や摂食量の推移を観察した。

【組織学的評価】

本検討で組織固定した卵巣、内臓脂肪、皮下脂肪は、徳島大学総合研究支援センター先端医療研究部門に依頼し、検体の中央にて 4 μ m にスライスした切片の HE 染色標本を作成した。

卵巣 HE 染色像にて、PCOS モデルラットにおいて多嚢胞性となっていることを確認した。脂肪細胞 HE 染色像においては、検体 1 つあたりランダムに脂肪細胞(ただし細胞膜が保たれ、緊満を維持したもの)を 80-100 個選出し、その平均面積を計測した。

【血清生化学検査】

血清 OT 濃度は、株式会社あすか製薬メディカル(Kanagawa, Japan)に冷凍送付し測定を依頼した。血清 total protein (TP)、albumin (Alb)、total cholesterol (T-CHO)、free cholesterol (F-CHO)、esterified cholesterol (E-CHO)、triglycerides

(TG)、low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)、high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)、そして adiponectin の濃度は、オリエンタル酵母工業株式会社に冷凍送付し測定を依頼した。血清 leptin 濃度は、Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA Kit (株式会社 R&D(Minneapolis, United States of America))を用いて下記のごとく測定した。

Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA Kit に付属の standard 乾燥粉末を 1 mL 精製水に溶解し、Calibration 溶液にて希釈することで 2000 pg/mL、1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.25 pg/mL、0 pg/mL の 8 種類の standard 溶液を作成した。次に、付属の control 乾燥粉末を 1 mL 精製水に溶解し control 溶液を作成した。96-well プレートにて、使用予定の well に Assay Diluent RD1-55 を 50 μ L ずつ入れたあと、8 種類の standard 溶液、2 倍希釈した各検体、control 溶液を 3 well ずつ、各 well 50 μ L ずつ入れていった。96-well プレートに付属のシートでカバーをし、プレートシェイカーを用いて 500 $\pm$ 50 rpm で 2 時間振盪した。2 時間後、各 well の溶液を除去し、wash 液(付属の wash 濃縮液 40 mL を精製水 960 mL と混合して作成)で合計 3 回洗浄した。洗浄後、各 well に Conjugate を 100 μ L ずつ入れ、先ほどと同様に 1 時間振盪した。振盪後、各 well の溶液を除去して wash 液で 3 回洗浄した。洗浄後、HRP1 を 100 μ L ずつ入れて 30 分振盪した。その後、color Reagents A と B を混合して作成した substrate solution を 100 μ L ずつ各 well に入れたのち、アルミホイルで遮光し 30 分間卓上で静置した。その後、stop solution を各 well に 100 μ L ずつ入れて酵素反応を修了させたのち、マイクロプレートリーダー SpectraMax i3x(モレキュラーデバイスジャパン株式会社(Tokyo, Japan))を用いて吸光度を測定した。standard から作成した検量線をもとに、各検体の leptin 濃度を計算した。

【mRNA 発現の測定】

凍結保存した脳から視床下部を切り出すため、凍結脳の視交叉の前縁で冠状切断、視床下部との境界で後方切断、視床下部との境界に沿って矢状切断、腹面から 2.5 mm の部分で切断し、視床下部を切り出した。

切り出した視床下部、内臓脂肪、皮下脂肪は 3mm Stainless Steel Beads(Qiagen)を 2 つと TRIzol reagent (Invitrogen) 800 μ L が入った 1.5 mL マイクロチューブに入れ、TissueLyser II System(Qiagen)を用いて 20 回/sec、5 分間粉砕した。粉砕後、クロロホルム(富士フイルム和光純薬株式会社)を 160 μ L ずつ入れて混合し、4 $^{\circ}$ C、3600 rpm で 20 分間遠心後に脂肪除去された上澄みを 300 μ L ずつ回収し、DEPC(diethylpyrocarbonate)処理水(ニッポンジーン株式会社(Tokyo, Japan))で希釈した 70%エタノール 300 μ L と混合した。

mRNA の抽出を行うため、RNeasy mini kit (Qiagen(Hilden, Germany))を使用した。上記で作成した溶液をスピncラムにすべて入れ、4° C、8000 rpm で1 分間遠心し、コレクションチューブを外してカラムの下に落ちた液を破棄した。次に、Buffer RW1 を 700 µL ずつスピncラムに入れ、4° C、8000 rpm で1 分間遠心し、カラムの下に落ちた液を破棄した。さらに、Buffer RPE を 500 µL ずつスピncラムに入れ、4° C、8000 rpm で2 分間遠心してカラムの下に落ちた液を破棄する操作を2 回繰り返した。コレクションチューブを新しいものに切り替え、4° C、8000 rpm で1 分間遠心しカラムを完全に乾燥させた。コレクションチューブを破棄し、新しい 1.5 mL マイクロチューブに切り替えた後、カラムに RNAase free water を 30 µL ずつ染み込ませ、4° C、6500 rpm で1 分間遠心し mRNA を 1.5 mL マイクロチューブの中へ抽出した。

mRNA から cDNA を精製するため、SuperScript III First-Strand Synthesis System for Real-Time PCR (Invitrogen)とその製造元プロトコールに従い操作した。各検体において、抽出した mRNA 溶液 4 µL と RNAase free water 4 µL を混合し、Oligo dT、dNTP を 1 µL ずつ混ぜたあと 65° C に設定したヒーターに 5 分間乗せた。5 分後、氷台で 1 分以上冷却した。次に、各 1.5 mL マイクロチューブに下記の組成にて作成した逆転写反応液を混和した。

逆転写反応液の組成

10xRT buffer	2 µL
25mM MgCl ₂	4 µL
0.1M DTT	2 µL
RNase OUT	1 µL
Super Script III	1 µL
合計	10 µL

逆転写反応液を混和後、50° C に設定したヒーターに 50 分間乗せた。50 分後、85° C に設定したヒーターに 5 分間乗せた。5 分後、氷台に 1 分以上乗せて冷却した。最後に、RNase H を 1 µL ずつ検体に入れ、37° C に設定したヒーターに 20 分間乗せることで余分な mRNA が除去された cDNA を精製した。

次に、精製した cDNA の濃度を調べるために Nano Drop 1000(サーモフィッシュヤーサイエンティフィック株式会社(Tokyo, Japan))を用いた。まず、Nano Drop 1000 の測定台に精製水を 1.2 μL 乗せ、Blank を設定した。その後、各検体を測定台に乗せ、濃度と吸光度を測定した。波長 260 nm と 280 nm の吸光度比はほぼ 1.8 であり、成分が DNA であることを確認した。各検体から 1 μL とり、測定できた cDNA の濃度をもとに算出した量の DEPC 処理水と混和しすべての検体の cDNA 濃度を 10 ng/ μL に揃えた。

Real time-PCR 用の 96-well プレートに cDNA 濃度 10 ng/ μL に揃えた各検体を 2 wells ずつ入れた。standard として、代表検体を 1 つ選んで DEPC 処理水を使用して 5 ng/ μL 、10 ng/ μL 、20 ng/ μL 、40 ng/ μL の溶液を作成し、それぞれ 96-well プレートに 2 wells ずつ入れた。続いて、各 well に下記の組成で作成した PCR 溶液を入れた。Master Mix には Fast SYBR Green(富士フイルム和光純薬株式会社)を使用し、測定する物質の forward primer と reverse primer はペプチド研究所株式会社より購入し使用した。

PCR 溶液の組成

Master Mix(Fast SYBR green)	10 μL
forward primer	0.4 μL
reverse primer	0.4 μL
ddH ₂ O	8 μL
合計	18.8 μL

RT-PCR にあたり、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems)を使用して mRNA の発現を測定した。PCR の条件は下記の通りである。

95 ° C 20 秒間

95 ° C 3 秒間 + 各アニーリング温度にて 30 秒間 → 45 サイクル

本検討において、RT-PCR で測定した項目は leptin、leptin receptor(ObRb)、neuropeptide Y(NPY)、pro-opiomelanocortin(POMC)、agouti-related protein(AgRP)、prepro-orexin(pporexin)、OT、OTR、adiponectin、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)、18S ribosomal RNA(18S rRNA)である。PCR

に使用した各プライマーの配列とそのアニーリング温度は下記の通り表 1 にまとめた。

表 1. 本検討での RT-PCR に使用したプライマーの配列とアニーリング温度

Primer	Sequence	Annealing T (°C)
leptin forward	GGT CAC CGG TTT GGA CTT CAT	66
leptin reverse	CTG GTC CAT CTT GGA CAA ACT CA	66
ObRb forward	GCA GCT ATG GTC TCA CTT CTT TTG	63
ObRb reverse	GTT CCC TGG GTG CTC TGA	63
NPY forward	GGG GCT GTG TGG ACT GAC CCT	66
NPY reverse	GAT GTA GTG TCG CAG AGC GGA G	66
POMC forward	CCT CAC CAC GGAAAG CA	66
POMC reverse	TCA AGG GCT GTT CAT CTC C	66
AgRP forward	TGA AGA AGA CAG CAG CAG ACC	63
AgRP reverse	AAG GTA CCT GTT GTC CCAAGC	63
pporexin forward	GCC GTC TCT ACG AAC TGT TG	60
pporexin reverse	CGA GGA GAG GGG AAA GTT AG	60
OT forward	GAA CAC CAA CGC CAT GGC CTG CCC	62
OT reverse	TCG GTG CGG CAG CCA TCC GGG CTA	62
OTR forward	CGA TTG CTG GGC GGT CTT	67
OTR reverse	CCG CCG CTG CCG TCT TGA	67
adiponectin forward	GGG AGA CGC AGG TGT TCT TG	61
adiponectin reverse	CGC TGA ATG CTG AGT GAT ACA TG	61
GAPDH forward	ATG GCA CAG TCA AGG CTG AGA	64
GAPDH reverse	CGC TCC TG GAA GAT GGT GAT	64
18S rRNA forward	GAC GGA CCA GAG CGA AAG C	64
18S rRNA reverse	AAC CTC CGA CTT TCG TTC TTG A	64

以上の条件において測定した mRNA 発現は、reference gene として視床下部に関しては GAPDH、脂肪組織に関しては 18S rRNA を用い、それぞれのコントロールとの比率を比較することで評価した。男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの研究においては、それぞれ、テストステロンの除去された ORX 群、ORX-non T 群をコントロールとした。

【統計学的解析】

すべてのデータは平均値±標準誤差で表した。各群間の比較には、母集団の分散が等しいものについては Student の t 検定、そうでないデータについては Welch の t 検定を使用した。OT 単回投与の効果比較には、paired t 検定を使用した。体重や摂食量の推移については二元配置反復測定分散分析(two-way repeated-measures analysis of variance : two-way ANOVA)を用いて検定した。p<0.05 を有意差ありと判断した。

結果

【PCOS モデルラットの体重、累積摂食量、体脂肪、卵巣病理】

図 3 に示したとおり、DHT 充填チューブ、空チューブをそれぞれ PCOS 群、control 群に留置後、84 日齢までの体重は PCOS 群において有意に増加した (two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 77.7973$, $p < 0.001$; Day, $F(8,112) = 1440.8274$, $p < 0.001$; interaction, $F(8,112) = 23.6745$, $p < 0.001$)。累積摂食量は PCOS 群で有意に増加した (two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 20.4643$, $p < 0.001$; Day, $F(7,98) = 4452.0044$, $p < 0.001$; interaction, $F(7,98) = 17.6306$, $p < 0.001$)。

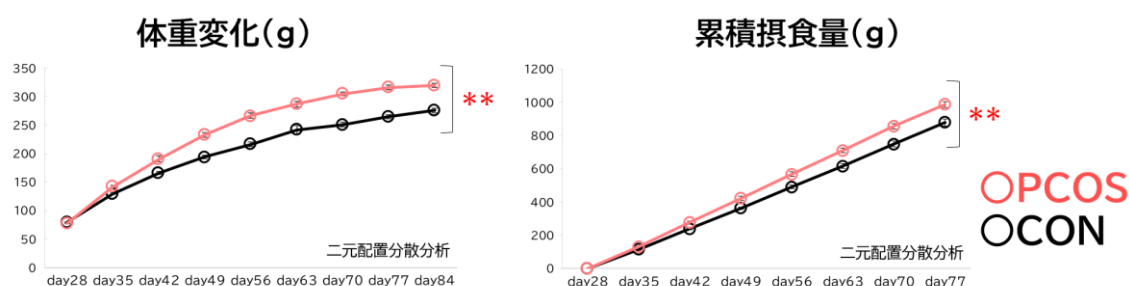


図 3. PCOS 群と control 群における体重(g)、累積摂食量(g)の推移(** $p < 0.01$)

図 4 に示したとおり、体重 100 g あたりの内臓脂肪量は PCOS 群で 3.28 ± 0.253 g、control 群で 2.35 ± 0.120 g で PCOS 群において有意に多かった (Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -3.33$)。体重 100 g あたりの皮下脂肪量は PCOS 群で 0.856 ± 0.0561 g、control 群で 0.561 ± 0.0533 g で PCOS 群において有意に多かった (Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -3.80$)。体重 100 g あたりの総脂肪量(内臓脂肪と皮下脂肪の合算)は PCOS 群で 4.14 ± 0.165 g、control 群で 2.91 ± 0.283 g で PCOS 群において有意に多かった (Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -3.33$)。

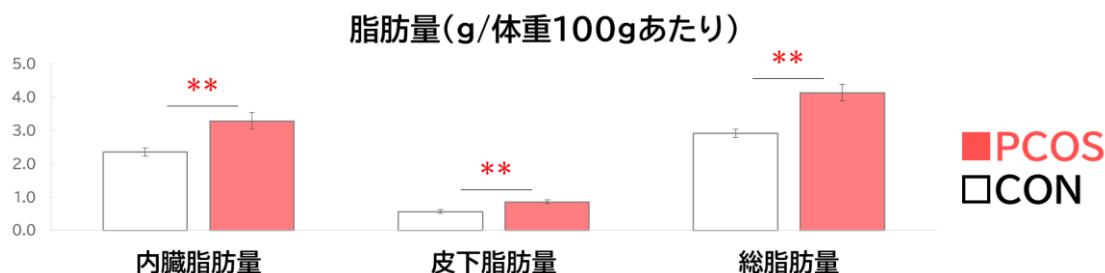


図 4. PCOS 群と control 群における体重 100 g あたりの内臓脂肪量(g)、皮下脂肪量(g)、総脂肪量(g) (** $p < 0.01$)

図 5 にて示したとおり、両群から代表として 2 例ずつ性周期を確認すると、CON 群ではおおむね 4-5 日の規則的なサイクルとなっているのに対し、PCOS 群においては不規則または無反応であった。estrus(発情期)の回数は、CON 群で 2.125 ± 0.125 回、PCOS 群で 0.875 ± 0.227 回と PCOS 群で有意に減少していた (Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = 4.830$)。

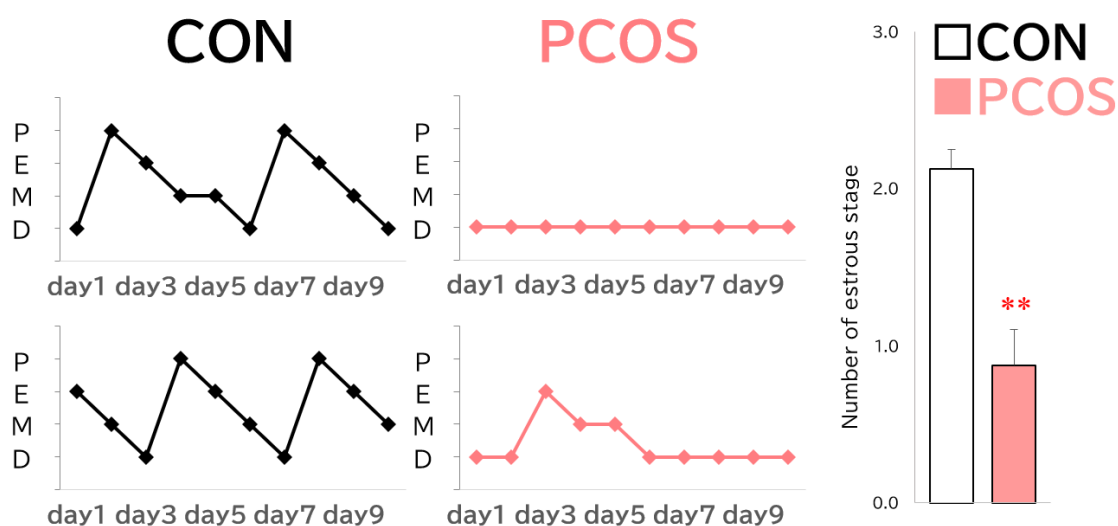


図 5. PCOS 群、CON 群における代表 2 例ずつの性周期(P = proestrus, E=estrus, M=metestrus, D=diestrus)、および estrus の回数

図 6 にて示したとおり、両群から代表として 2 例ずつの卵巢 HE 染色組織像を確認すると、CON 群と比較して PCOS 群では多嚢胞性卵巢を認めた。卵巢重量は CON 群で 172.5 ± 9.956 mg、PCOS 群で 201.3 ± 9.149 mg と PCOS で増量傾向であったが、両群間の統計学的有意差はなかった (Student's t-test: $p = 0.052$)。子宮重量は、CON 群で 523.8 ± 56.535 mg、PCOS 群で 442.5 ± 35.695 mg で両群間の有意差はなかった (Student's t-test: $p = 0.24$)。

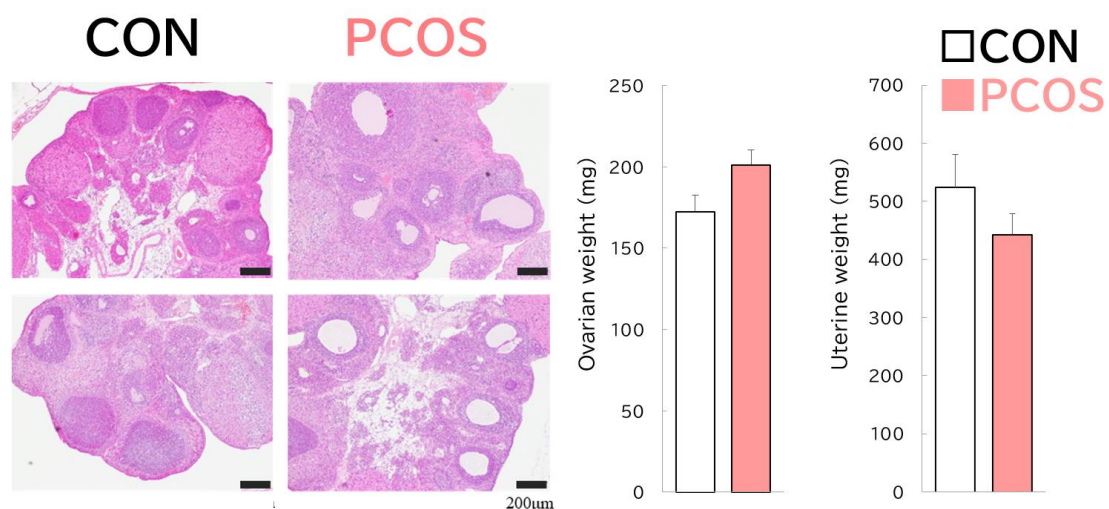


図 6. PCOS 群、CON 群における代表 2 例ずつの卵巣 HE 染色、および卵巣重量 (mg)、子宮重量(mg)

【PCOS モデルラットの血清 OT】

血清 OT は、PCOS 群で 24.2 ± 2.63 pg/mL、CON 群で 46.0 ± 9.27 pg/mL と PCOS 群において有意に低下していた(Student's t-test: $p < 0.05$; $df = 14$, $t = 2.39$)。

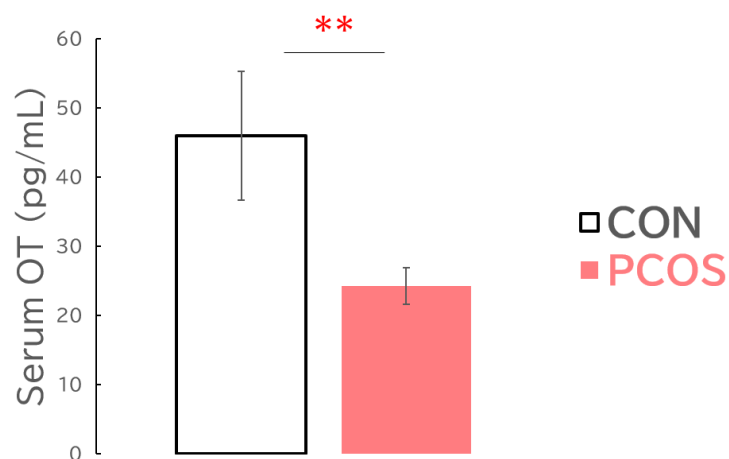


図 7. PCOS 群および CON 群における血清 OT(pg/mL)

【PCOS モデルラットの視床下部、内臓脂肪の遺伝子発現】

視床下部については、GAPDH と OT、OTR、NPY、AgRP、POMC、pporexin との比を算出し、CON 群の平均を 1 としたときの比率を両群間で比較した。PCOS 群は、CON 群を 1 としたとき OT は 0.953 ± 0.056 (Student's t-test: $p = 0.71$)、OTR は 1.05 ± 0.0988 (Student's t-test: $p = 0.68$)、NPY は 1.05 ± 0.103 (Student's t-test: $p = 0.66$)、AgRP は 1.17 ± 0.119 (Student's t-test: $p = 0.22$)、POMC は 1.24 ± 0.167 (Student's t-test: $p = 0.23$)、pporexin は 1.07 ± 0.084 (Student's t-test: $p = 0.46$) であり、いずれも有意な変化を認めなかった。

内臓脂肪については、18SrRNA と OTR との比を算出し、CON 群の平均を 1 としたときの比率を両群間で比較した。PCOS 群の OTR mRNA 発現は、CON 群を 1 としたとき 2.14 ± 0.566 (Student's t-test: $p = 0.13$) で統計学的有意差を認めなかった。

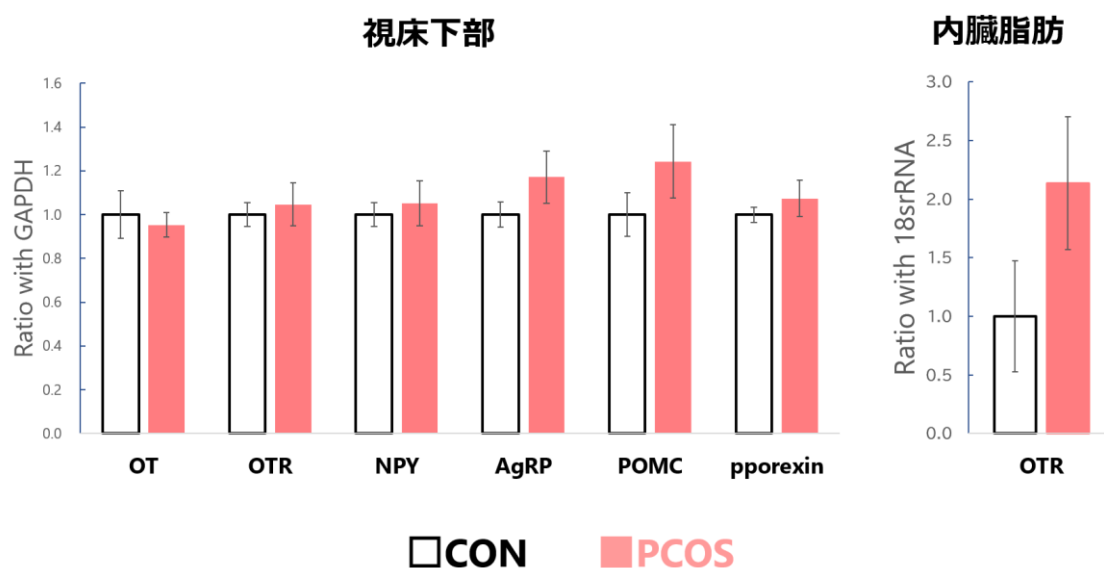


図 8. 視床下部、内臓脂肪における mRNA 発現

【PCOS モデルラットに対する単回 OT 投与の影響】

明期に生理食塩水、OT を単回投与した結果をまとめる。CON 群の体重変化率は、生理食塩水で $98.1 \pm 0.150\%$ 、OT で $97.6 \pm 0.868\%$ と生理食塩水と OT の間に有意差はなく (paired t-test: $p = 0.61$)、摂食量は生理食塩水で 4.06 ± 0.429 g、OT で 3.58 ± 0.654 g と生理食塩水と OT の間に有意差はなかった (paired t-test: $p = 0.14$)。PCOS 群の体重変化率は、生理食塩水で $97.1 \pm 0.211\%$ 、OT で $97.4 \pm 0.526\%$ と生理食塩水と OT の間に有意差はなく (paired t-test: $p = 0.67$)、摂食量は

生理食塩水で 3.45 ± 0.244 g、OT で 3.70 ± 0.458 g と生理食塩水と OT の間に有意差はなかった(paired t-test: $p = 0.63$)。

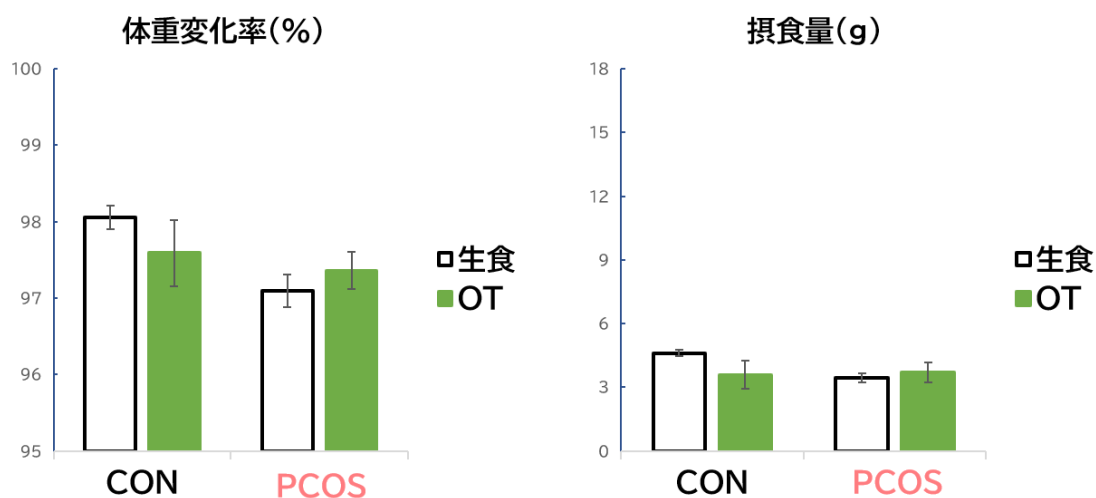


図 9. 明期における OT 単回投与の結果

暗期に生理食塩水、OT を単回投与した結果をまとめる。CON 群の体重変化率は、生理食塩水で $102.5 \pm 0.308\%$ 、OT で $101.6 \pm 0.439\%$ と生理食塩水と OT の間に有意差はく(paired t-test: $p = 0.10$)、摂食量は生理食塩水で 13.99 ± 0.531 g、OT で 13.06 ± 0.661 g と生理食塩水と OT の間に有意差はなかった(paired t-test: $p = 0.17$)。PCOS 群の体重変化率は、生理食塩水で $103.1 \pm 0.227\%$ 、OT で $101.3 \pm 0.513\%$ と OT 投与において有意に減少させ(paired t-test: $p < 0.05$; $df = 7$, $t = 3.21$)、さらに摂食量は生理食塩水で 16.63 ± 0.399 g、OT で 14.30 ± 0.872 g と OT 投与において有意に減少させた(paired t-test: $p < 0.05$; $df = 7$, $t = 2.63$)。

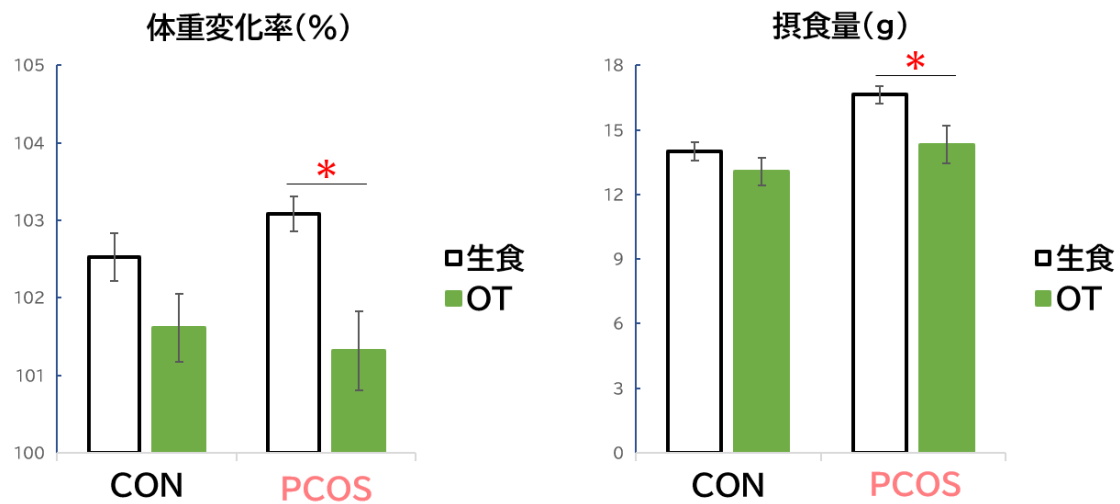


図 10. 暗期における OT 単回投与の結果(* $p < 0.05$)

【PCOS モデルラットに対する反復 OT 投与の影響】

図 11 に示したとおり、CON 群に対して 7 日間連続で暗期に OT を投与したが、体重に変化は観察できなかった(two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 0.1273$, $p = 0.72$; Day, $F(7,98) = 6.3456$, $p < 0.001$; interaction, $F(7,98) = 5.5687$, $p < 0.001$)。同様に、PCOS においても体重に変化は観察できなかった(two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 0.0040$, $p = 0.95$; Day, $F(7,98) = 1.8106$, $p = 0.093$; interaction, $F(7,98) = 2.5914$, $p = 0.058$)。

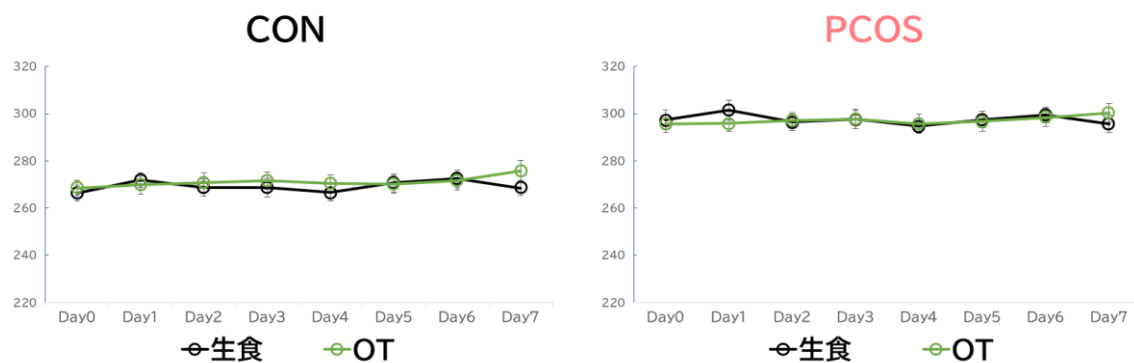


図 11. OT 反復投与による体重(g)への影響

図 12 に示したとおり、CON 群に対して 7 日間連続で OT を投与すると有意に累積摂食量が減少した(two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 13.9552$, $p < 0.001$; Day, $F(6,84) = 2908.0172$, $p < 0.001$; interaction, $F(6,84) = 25.7905$, $p < 0.001$)。同様に、PCOS 群においても累積摂食量が減少した(two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 20.4643$, $p < 0.001$; Day, $F(7,98) = 4452.0044$, $p < 0.001$; interaction, $F(7,98) = 17.6306$, $p < 0.001$)。

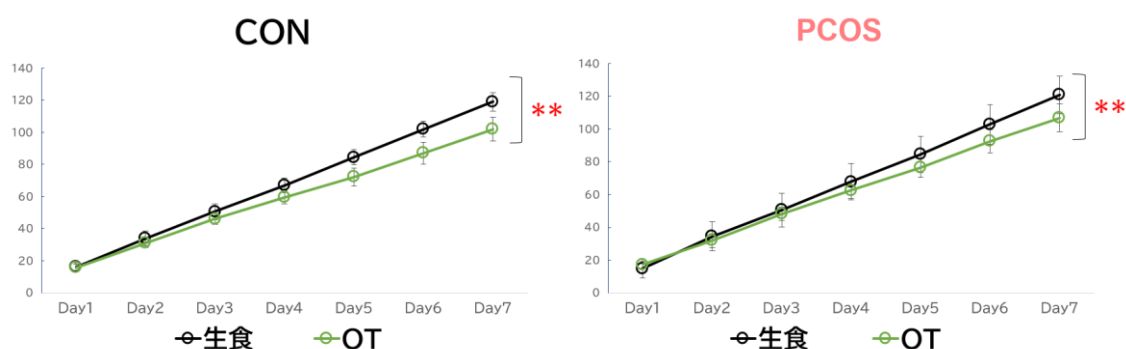


図 12. OT 反復投与による累積摂食量(g)への影響

【男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの体重、累積摂食量、内臓脂肪】

図 13 に示したとおり、ORX を施行された男性更年期モデルラットである ORX 群は、偽手術を施行したのみの CON 群と比較して体重が軽くなった(two-way ANOVA: group, $F(1,14) = 25.1593$, $p < 0.001$; Day, $F(5,70) = 636.6836$, $p < 0.001$; interaction, $F(5,70) = 14.8517$, $p < 0.001$)。ORX 後にテストステロン充填チューブを埋め込まれた ORX-T 群は、ORX 後に空チューブのみ埋め込まれた ORX-non T 群と比較して体重が重くなった(two-way ANOVA: treatment, $F(1,12) = 12.2825$, $p < 0.001$; Day, $F(5,60) = 723.4713$, $p < 0.001$; interaction, $F(5,60) = 9.4088$, $p < 0.001$)。

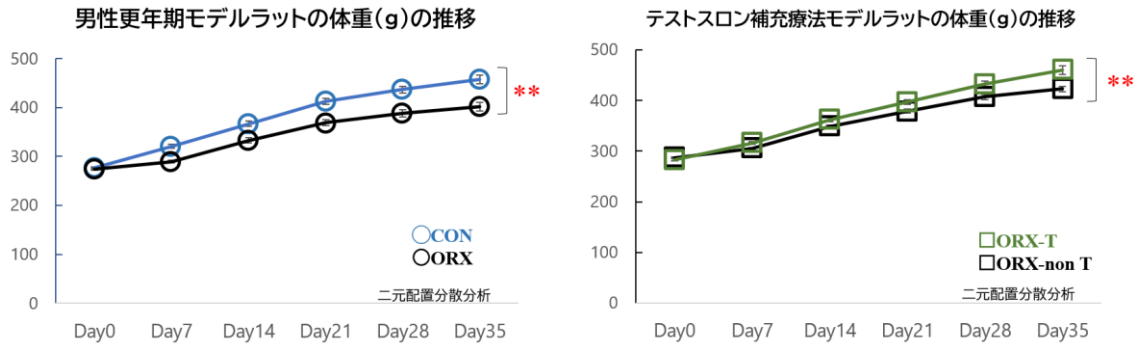


図 13. 男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの体重 (g)の推移 (** $p<0.01$)

さらに、図 14 に示したとおり、ORX 群は CON 群と比較して累積摂食量が低下した(two-way ANOVA: treatment, $F(1,14) = 16.5692$, $p < 0.01$; Day, $F(4,56) = 3695.7483$, $p < 0.001$; interaction, $F(4,56) = 12.3608$, $p < 0.001$)。ORX-T 群は ORX-non T 群と比較して Day 35 までに累積摂食量が増加した(two-way ANOVA: treatment, $F(1,12) = 0.0909$, $p = 0.091$; treatment on Day35, $F(1,12) = 5.8460$, $p < 0.05$; Day, $F(4,48) = 5259.6317$, $p < 0.001$; interaction, $F(4,48) = 5.4985$, $p = 0.17$)。

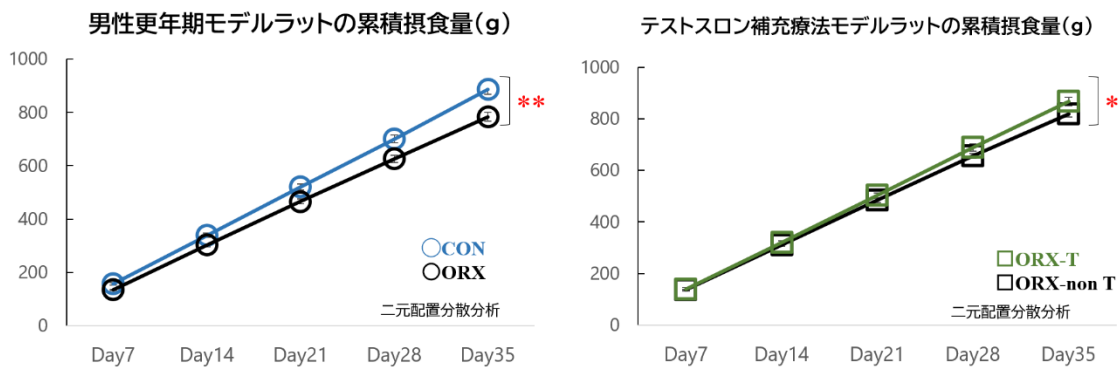


図 14. 男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの累積摂食量(g) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

図 15 に示したとおり、男性更年期モデルラットにおいて、体重 100 g あたりの内臓脂肪重量は ORX 群で 1.84 ± 0.173 g、CON 群で 2.89 ± 0.244 g と CON 群で有意に重かった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = 3.485$)。体重 100 g あたりの皮下脂肪重量は ORX 群で 1.76 ± 0.131 g、CON 群で 0.798 ± 0.0894 g と ORX 群

で有意に重かった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -6.080$)。体重 100 g あたりの総脂肪重量は ORX 群で 3.61 ± 0.273 g、CON 群で 3.69 ± 0.279 g で両群間に有意差はなかった(Student's t-test: $p = 0.84$)。内臓脂肪細胞サイズは ORX 群で $7946.81 \pm 320.92 \mu\text{m}^2$ 、CON 群で $6159.55 \pm 450.61 \mu\text{m}^2$ と ORX 群で有意に大きかった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -3.230$)。皮下脂肪細胞サイズは ORX 群で $7571.50 \pm 408.61 \mu\text{m}^2$ 、CON 群で $5705.06 \pm 238.33 \mu\text{m}^2$ と ORX 群で有意に大きかった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -3.946$)。また、テストステロン補充療法モデルラットにおいて、体重 100 g あたりの内臓脂肪重量は ORX-T 群で 1.43 ± 0.167 g、ORX-non T 群で 1.70 ± 0.143 g と両群間における有意差はなかった($p = 0.26$)。体重 100 g あたりの皮下脂肪重量は ORX-T 群で 1.08 ± 0.102 g、ORX-non T 群で 1.86 ± 0.134 g と ORX-non T 群で有意に重かった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = -4.659$)。体重 100 g あたりの総脂肪重量は ORX-T 群で 2.51 ± 0.229 g、ORX-non T 群で 3.55 ± 0.270 g と ORX-non T 群で有意に重かった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = -2.955$)。内臓脂肪細胞サイズは ORX-T 群で $5837.48 \pm 473.66 \mu\text{m}^2$ 、ORX-non T 群で $9079.40 \pm 361.14 \mu\text{m}^2$ と ORX-non T 群で有意に大きかった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = 5.443$)。皮下脂肪細胞サイズは ORX-T 群で $4915.63 \pm 263.48 \mu\text{m}^2$ 、ORX-non T 群で $8383.47 \pm 386.70 \mu\text{m}^2$ と ORX-non T 群で有意に大きかった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = 7.411$)。

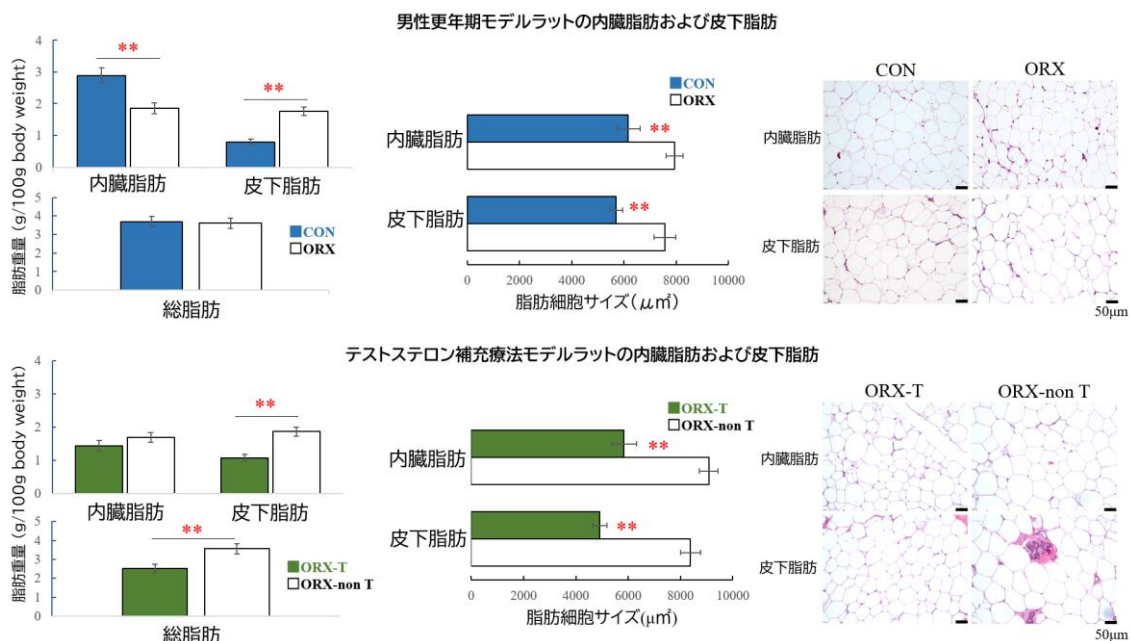


図 15. 男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの体重 100g あたりの内臓脂肪および皮下脂肪の重量(g)、脂肪細胞サイズ($\mu\text{ m}^2$)、HE 染色像(** $p < 0.01$)

【男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの血清 OT、leptin、adiponectin】

図 16 に示したとおり、男性更年期モデルラットにおいて、血清 OT は ORX 群で $48.63 \pm 7.82\text{ pg/mL}$ 、CON 群で $97.53 \pm 14.10\text{ pg/mL}$ で CON 群において有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = 3.038$)。血清 leptin は ORX 群で $2401.63 \pm 139.19\text{ pg/mL}$ 、CON 群で $2495.38 \pm 121.70\text{ pg/mL}$ と両群間に有意差はなかった(Student's t-test: $p = 0.81$)。血清 adiponectin は ORX 群で $5.63 \pm 0.26\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、CON 群で $4.21 \pm 0.23\text{ }\mu\text{g/mL}$ で ORX 群において有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = -4.028$)。また、テストステロン補充療法モデルラットにおいて、血清 OT は ORX-T 群で $55.09 \pm 7.83\text{ pg/mL}$ 、ORX-non T 群で $26.17 \pm 1.83\text{ pg/mL}$ で ORX-T 群で有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = -3.595$)。血清 leptin は ORX-T 群で $2386.03 \pm 231.35\text{ pg/mL}$ 、ORX-non T 群で $2329.22 \pm 91.28\text{ pg/mL}$ と両群間に有意差はなかった(Student's t-test: $p = 0.82$)。血清 adiponectin は ORX-T 群で $3.59 \pm 0.32\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、ORX-non T 群で $5.44 \pm 0.33\text{ }\mu\text{g/mL}$ で ORX-non T 群において有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = 4.002$)。

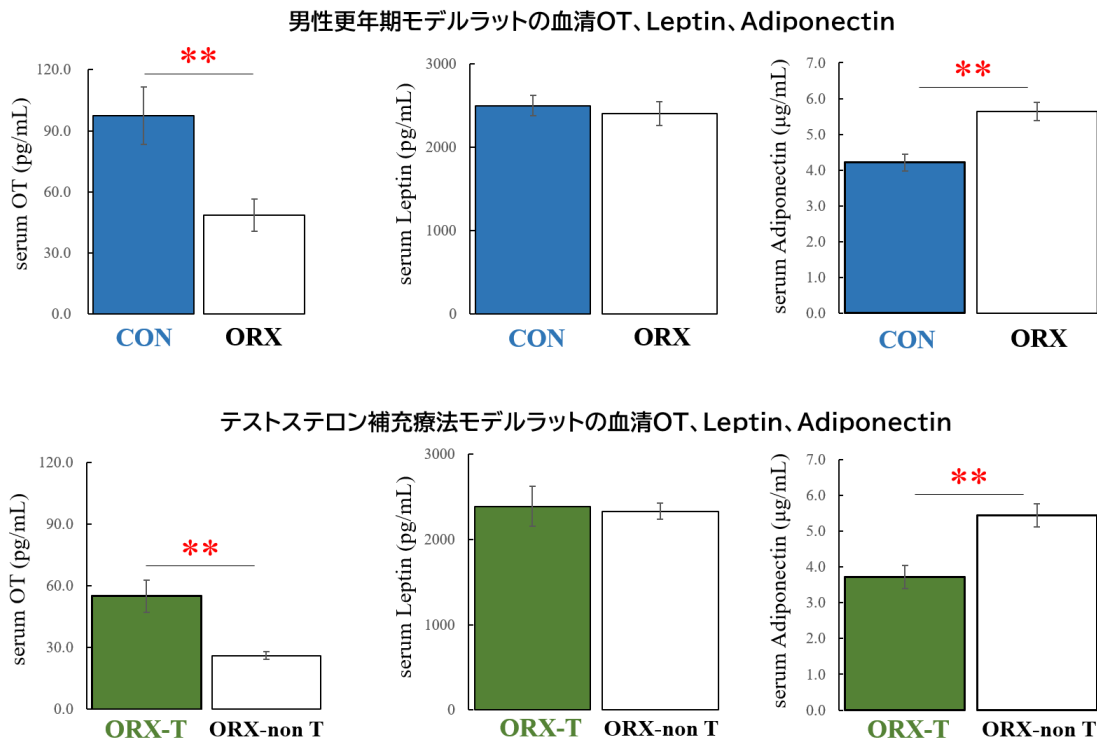


図 16. 男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの血清OT(pg/mL)、leptin(pg/mL)、adiponectin(μ g/mL) (** $p < 0.01$)

【男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの血清生化学検査】

図 17 に示したとおり、男性更年期モデルラットにおいて、血清 TP は ORX 群で 6.8 ± 0.108 g/dL、CON 群で 6.7 ± 0.143 g/dL と両群間に有意差はなかった (Student's t-test: $p = 0.68$)。血清 Alb は ORX 群で 4.5 ± 0.0648 g/dL、CON 群で 4.3 ± 0.0906 g/dL と両群間に有意差はなかった (Student's t-test: $p = 0.14$)。血清 T-CHO は ORX 群で 94.8 ± 4.37 mg/dL、CON 群で 88.6 ± 4.41 mg/dL と両群間に有意差はなかった (Student's t-test: $p = 0.34$)。血清 F-CHO は ORX 群で 24.6 ± 1.52 mg/dL、CON 群で 20.4 ± 1.19 mg/dL と ORX 群で有意に高値だった (Student's t-test: $p < 0.05$; $df = 14$, $t = -2.196$)。血清 E-CHO は ORX 群で 70.1 ± 2.95 mg/dL、CON 群で 68.3 ± 3.28 mg/dL と両群間に有意差はなかった (Student's t-test: $p = 0.68$)。血清 TG は ORX 群で 124.3 ± 13.60 mg/dL、CON 群で 175.8 ± 23.33 mg/dL と有意差まではなかったが CON 群の方が高めだった (Student's t-test: $p = 0.07$)。血清 LDL-C は ORX 群で 9.3 ± 0.56 mg/dL、CON 群で 13.1 ± 1.59 mg/dL と CON 群で有意に高値だった (Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 14$, $t = 2.304$)。血清 HDL-C は ORX 群で 34.8 ± 1.59 mg/dL、CON 群で 32.6 ± 0.800 mg/dL と両群間に有意差

はなかった(Student's t-test: $p = 0.25$)。また、テストステロン補充療法モデルラットにおいて、血清 TP は ORX-T 群で 6.3 ± 0.139 g/dL、ORX-non T 群で 6.8 ± 0.130 g/dL と ORX-non T 群で有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = 2.400$)。血清 Alb は ORX-T 群で 4.2 ± 0.170 g/dL、ORX-non T 群で 4.5 ± 0.0869 g/dL と両群間に有意差はなかった(Student's t-test: $p = 0.098$)。血清 T-CHO は ORX-T 群で 81.7 ± 5.44 mg/dL、ORX-non T 群で 108.7 ± 5.45 mg/dL と ORX-non T 群で有意に高値だった (Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = 3.506$)。血清 F-CHO は ORX-T 群で 22.4 ± 1.43 mg/dL、ORX-non T 群で 27.3 ± 1.46 mg/dL と ORX-non T 群で有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.05$; $df = 12$, $t = 2.378$)。血清 E-CHO は ORX-T 群で 59.3 ± 4.07 mg/dL、ORX-non T 群で 81.4 ± 4.08 mg/dL と ORX-non T 群で有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.01$; $df = 12$, $t = 3.841$)。血清 TG は ORX-T 群で 205.3 ± 23.18 mg/dL、ORX-non T 群で 143.4 ± 16.91 mg/dL と有意差まではなかったが ORX-non T 群の方が高めだった(Student's t-test: $p = 0.052$)。血清 LDL-C は ORX-T 群で 9.3 ± 0.68 mg/dL、ORX-non T 群で 10.3 ± 0.68 mg/dL と両群間に有意差はなかった(Student's t-test: $p = 0.31$)。血清 HDL-C は ORX-T 群で 32.4 ± 1.89 mg/dL、ORX-non T 群で 40.7 ± 1.97 mg/dL と ORX-non T 群で有意に高値だった(Student's t-test: $p < 0.05$; $df = 12$, $t = 3.034$)。

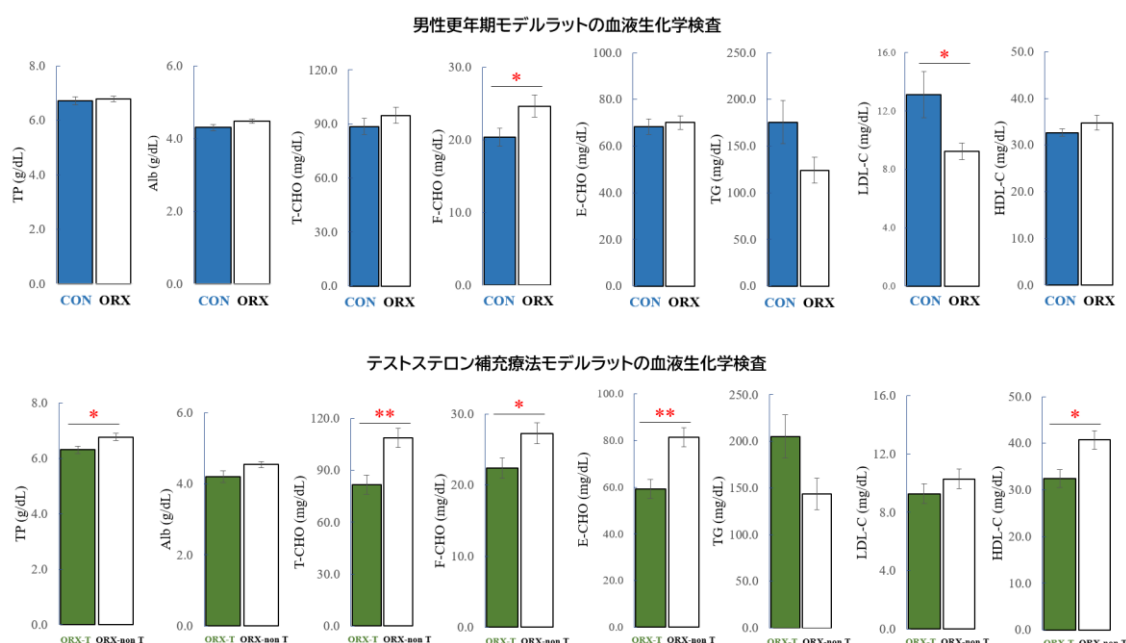


図 17. 男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの血清生化学検査(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

【男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの視床下部、内臓脂肪、皮下脂肪の遺伝子発現】

図 18 に示したとおり、男性更年期モデルラットの視床下部 mRNA 発現について、NPY の発現は CON 群で 1.13 ± 0.069 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.48$)。POMC の発現は CON 群で 0.66 ± 0.152 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.089$)。OT の発現は CON 群で 1.12 ± 0.080 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.28$)。OTR の発現は CON 群で 1.36 ± 0.241 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.14$)。ObRb の発現は CON 群で 0.77 ± 0.159 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.20$)。内臓脂肪 mRNA 発現について、OTR の発現は CON 群で 0.61 ± 0.103 倍と有意に減少した(Welch's t-test: $p < 0.05$; $df = 12$, $t = -2.244$)。leptin の発現は CON 群で 1.00 ± 0.202 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.71$)。adiponectin の発現は CON 群で 1.21 ± 0.214 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.75$)。皮下脂肪 mRNA 発現について、OTR の発現は CON 群で 3.15 ± 2.09 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.36$)。leptin の発現は CON 群で 0.93 ± 0.236 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.59$)。adiponectin の発現は CON 群で 4.02 ± 3.22 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.27$)。

次に、テストステロン補充療法モデルラットの視床下部 mRNA 発現について、NPY の発現は ORX-T 群で 0.98 ± 0.084 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.91$)。POMC の発現は ORX-T 群で 0.58 ± 0.048 倍と有意に低下した(Welch's t-test: $p < 0.01$; $df = 9$, $t = -3.719$)。OT の発現は ORX-T 群で 1.01 ± 0.056 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.94$)。OTR の発現は ORX-T 群で 1.51 ± 0.056 倍と有意に上昇した($p < 0.01$)。ObRb の発現は ORX-T 群で 1.11 ± 0.054 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.22$)。内臓脂肪 mRNA 発現について、ORX-T 群の検体のうち 1 検体のみ mRNA の抽出がうまくされておらず除外した。内臓脂肪における OTR の発現は ORX-T 群で 2.73 ± 0.950 倍と有意差はなかった(Welch's t-test: $p = 0.13$)。leptin の発現は ORX-T 群で 3.34 ± 1.046 倍と有意差はなかった(Welch's t-test: $p = 0.06$)。adiponectin の発現は ORX-T 群で 3.01 ± 0.912 倍と有意に上昇した(Welch's t-test: $p < 0.05$; $df = 6$, $t = 2.527$)。皮下脂肪 mRNA 発現について、OTR の発現は ORX-T 群で 0.59 ± 0.316 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.77$)。leptin の発現は ORX-T 群で 0.064 ± 0.056 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.26$)。adiponectin の発現は ORX-T 群で 1.85 ± 0.985 倍と有意差がなかった(Welch's t-test: $p = 0.43$)。

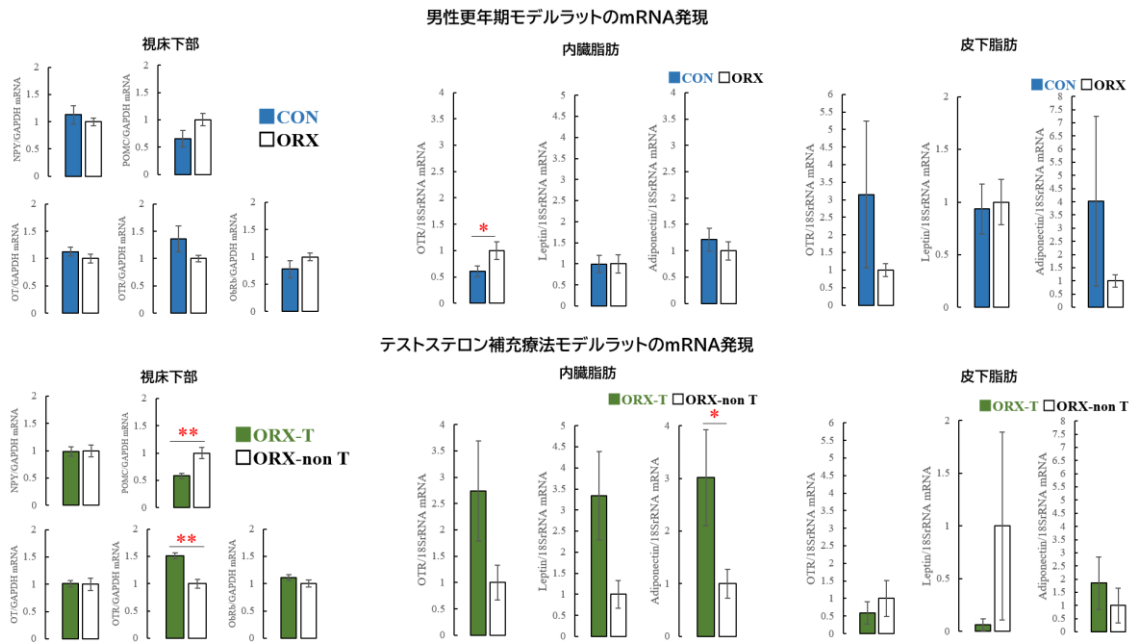


図 18. 男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットの視床下部、内臓脂肪、皮下脂肪の mRNA 発現

【男性更年期モデルラットに対する反復 OT 投与の影響】

図 19 に示したとおり、男性更年期モデルラットに対する 7 日間の反復 OT 投与による体重変化をまとめる。CON 群においては、生理食塩水投与で 21.41 ± 1.86 g の増加、OT 投与で 3.27 ± 1.27 g の増加で OT 投与によって有意に体重増加が抑制された ($p < 0.01$)。ORX 群においては、生理食塩水投与で 7.28 ± 1.73 g の増加、OT 投与で 0.561 ± 2.59 g の増加で OT 投与によって有意に体重増加が抑制された ($p < 0.05$)。累積摂食量についてまとめると、CON 群において、生理食塩水投与と比べて OT 投与によって有意に累積摂食量が少なくなった (two-way ANOVA: treatment, $F(1,14) = 18.7597$, $p < 0.001$; Day, $F(6,84) = 2868.9612$, $p < 0.001$; interaction, $F(6,84) = 22.0521$, $p < 0.001$)。ORX 群においても同様で、生理食塩水投与と比べて OT 投与によって有意に累積摂食量が少なくなった (two-way ANOVA: treatment, $F(1,14) = 13.3466$, $p < 0.01$; Day, $F(6,84) = 1007.5925$, $p < 0.001$; interaction, $F(6,84) = 15.8768$, $p < 0.001$)。

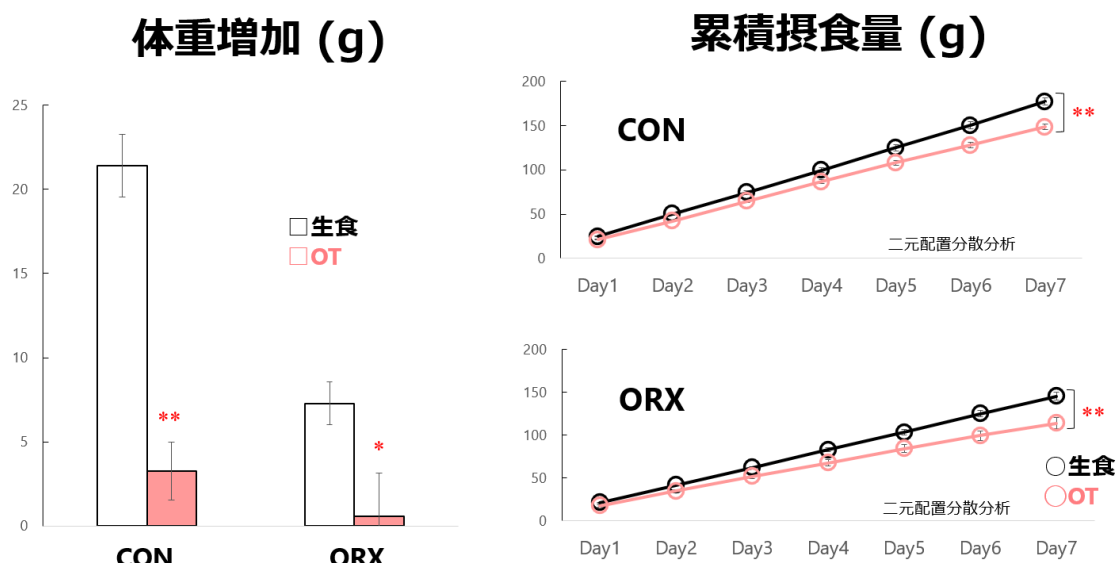


図 19. 男性更年期モデルラットに対する OT 投与後の体重増加(g)、累積摂食量 (g) (* $p<0.05$ ** $p<0.01$)

以上、PCOS モデルラット、男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットとアンドロゲン、OT に関する結果について要点を図 20 にまとめた。

モデル	アンドロゲン	mRNA発現	血清OT	OT単回投与	OT反復投与
PCOS	上昇	有意なし	低下	PCOSのみ体重増加と摂食を抑制	PCOSもコントロールも体重不変、摂食は抑制
男性更年期	低下	視床下部：OTR低下傾向 内臓脂肪：OTR上昇	低下		男性更年期もコントロールも体重増加と摂食を抑制
T補充療法	上昇	視床下部：OTR上昇 内臓脂肪：Adiponectin上昇	上昇		

図 20. PCOS モデルラット、男性更年期モデルラット、テストステロン(T)補充療法モデルラットとアンドロゲン、OT に関する結果の要点

考察

本研究では、アンドロゲンのバランス異常にともない肥満のリスクが上昇する疾患のモデル、すなわち女性であればアンドロゲンののはたらきが上昇する PCOS、男性であればアンドロゲンの働きが低下する男性更年期に着目し、抗肥満治療薬として OT の有用性を念頭に、疾患のモデルラットを使用して検討したものである。

過去の検討(Iwasa et al, 2020)において使用されていた従来型 PCOS モデルラットは、本検討とは異なり DHT 充填チューブを、DHT 粉末を充填することで作成したものであった。従来型 PCOS モデルラットは肥満を呈するものの、性周期は停止してしまう、また卵巣が萎縮するといった実際の臨床像とは異なるという問題点があったが、本検討で使用した新しい PCOS モデルラットは、従来の PCOS モデルラットよりもマイルドに体重や摂食量、体脂肪の増加が見られることに加え、性周期の不規則化、多嚢胞性卵巣を呈するなど実際の臨床像により近いものとなっていた(Kamada et al, 2021)。本研究において作成した PCOS モデルラットは、Kamada らの既報と同様、体重と摂食量の増加、体脂肪の増加、性周期の不規則化(発情期の減少)、卵巣の多嚢胞化(排卵障害)が見られており、PCOS モデルラットとして意図した表現型を呈していたと考えられた。従来型 PCOS モデルラットに対して OT を投与することで体重増加と摂食の抑制が得られ、抗肥満効果が期待できることはすでに報告されていた(Iwasa et al, 2020)。本研究では、より臨床像に近く改良を加えた新しい PCOS モデルラットにおいて血清 OT が低下し、また OT 投与による抗肥満効果を証明することができた。PCOS モデルラットにおいて内因性の OT が低下している直接的原因はいまだ不明であるが、肥満のラットやヒトにおいて血清 OT が低下すること(Qian et al, 2014; Gajdosechova et al, 2014; Yuan et al, 2016; Zhang et al, 2020)、また肥満であるほどより OT 投与による抗肥満効果が得られることが示されており(Altirriba et al, 2014; Maejima et al, 2017; Thienel M, 2016)、肥満の個体における OT と同様の生理学的機序が PCOS においても関係している可能性が高いと考えられる。PCOS モデルラットにおいて血清 OT が減少していた一方で、視床下部における OT、OTR、その他の摂食関連因子の発現に変化は得られず、中枢における内因性 OT の合成増加は証明できなかった。肥満を呈する PCOS モデルラットにおいては中枢における OT 合成増加ではなく、生成された OT の血液中への分泌が減少している可能性や、内臓脂肪の OTR 発現について明らかな変化は得られなかったものの、末梢における OT の消費が増加している可能性が考えられた。本検討では OT の分泌を担う下垂体における検証ができておらず、今後の課題である。

本検討において、PCOS モデルラットに対する単回 OT 投与による実験により、OT 投与の抗肥満効果は明期では得られず、暗期に得られることがわかった。こ

れは、元来ラットが夜行性動物であり、夜行性動物は夜間に活動が活発になり、摂食量が増加すること(Balagura et al, 1975)が関係していると考えられる。さらに、暗期における単回 OT 投与による抗肥満効果はコントロールの雌ラットにおいては確認されず、OT による抗肥満効果がより PCOS モデルラットにおいて特異的であることを示している。PCOS モデルラットにおいて OT 投与による抗肥満効果が特異的であった根拠としては、血清 OT が低下している PCOS モデルラットにおいて OT の補充がより効果的であった可能性のほか、PCOS モデルラットにおいて夜間のトータルのエネルギー摂取量が健常雌ラットと比較して多いために OT の投与効果がより顕著だった可能性が考えられ、今後 PCOS モデルラットと健常雌ラットにおける明期・暗期の摂食量と体重増加量の違いを比較した研究がまず必要となる。さらに、本研究における単回 OT 投与は明期における検証を暗期における検証より先に行っており、明期・暗期の投与の順番を入れ替えた実験を行うことによる時期効果の除外が不十分である点は留意すべきである。一方、暗期における反復 OT 投与による実験の結果では、連続した OT の投与による摂食量の抑制は PCOS モデルラットとコントロールラットの両群で観察されたものの、減量効果まで得られなかった。この結果の原因は、OT 投与期間が7日間では短かった可能性や、生理食塩水投与期間と OT 投与期間の間で実験者(筆者)の当時の腹腔投与手技の熟練度に差があり、バイアスがあった可能性、なども考えられる。さらに、最新の知見では PCOS モデルラットはストレスに対する反応をより起こしやすいことがわかっており(Kamada et al, 2024)、PCOS モデルラットに対する連日の手技によるストレスが、強く影響を与えることで OT だけでなく生理食塩水投与によっても体重増加が抑制されてしまった可能性も考慮する必要がある。また、OT 投与による体脂肪への影響を調査するにはさらに長期間にわたり OT を慢性投与する必要があると考えられる。今後、より侵襲やストレスの少ない方法で半減期の短い OT を慢性投与する方法を模索する必要性がある。

PCOS モデルラットにおいては、アンドロゲンの働きが肥満や性周期の不規則化等の悪影響にはたらいっていた一方で、テストステロンは男性の健康維持に必要な不可欠な物質であるとされ、動物実験上も ORX を施行した雄ラットに対するテストステロン補充療法により体重と摂食量の減少が回復すること、脂肪肝のリスクを減らすことが報告されている(Nunez and Grundman, 1982; Borst and Conover, 2006)。ヒトにおいても、中年肥満男性に対するテストステロン補充療法により内臓脂肪を減少させたとする報告もある(Mårin et al, 1993)。さらに、興味深いことに、若い雌ラット、高齢雌ラットの双方にテストステロン補充療法を行ったところ、高齢雌ラットにおいてのみ内臓脂肪を減少させたと報告されており(Iwasa et al, 2017)、このようなアンドロゲンの作用は女性ホルモンの存在下

においては発揮されないことがわかる。本検討においては、体重と摂食量に関してテストステロンを除去された男性更年期モデルラットにおいて減少し、またその効果はテストステロン補充によって改善するという結果となり、既報と同様の結果となった。体脂肪の検討について、脂肪重量については CON 群と ORX 群の間で内臓脂肪・皮下脂肪の局在が変化する一方、ORX-T 群と ORX-non T 群の間ではテストステロン補充療法により皮下脂肪重量・総脂肪重量が減少するといったように、テストステロンの脂肪重量に対する効果は内因性と外因性で異なる可能性が示された。一方で、脂肪細胞サイズを検討したところ既報と同様にテストステロン除去により脂肪サイズが増大し、テストステロン補充によって縮小するという結果となった。脂肪重量の結果と脂肪細胞サイズの結果は一部矛盾しているように思われるが、調査しきれなかった細胞数や体積・密度の違いが関与した可能性がある。これまでは脂肪細胞に対してテストステロンはアンドロゲン受容体を介して脂肪を燃焼させる作用をもたらすことが報告されており (Sato et al, 2003)、本検討の結果はアンドロゲン受容体が関与したものであると考えられる。血清 OT については男性更年期モデルラットにおいて低下し、テストステロン補充療法モデルラットで回復していることからテストステロンには内因性であれ、外因性であれ、血清 OT を上昇させる作用があることが本研究で初めてわかった。この結果は、テストステロン除去は血清 OT に影響しないとする過去の報告 (Kirilov et al, 1987; Thornton et al, 1988) を覆すものである。雄においてテストステロンが血清 OT を上昇させる機序についてはいまだ不明である。本検討において、CON 群と ORX 群に対する OT 投与により、両群において摂食量と体重増加を抑制し、その効果はより CON 群において顕著であった。これまでの報告から、OT 投与によって迷走神経の求心性ニューロンの活性化により中枢における食欲抑制作用が得られることがわかっている (Iwasaki et al, 2015)。このことから、雄においてテストステロンが視床下部における OT の感受性に影響を与えた可能性を考えた。ORX-T 群では ORX-non T 群と比較して視床下部 OTR の遺伝子発現が高く、CON 群では ORX 群と比較して統計学的有意差はないもののわずかに高かったことを踏まえると、テストステロンには視床下部 OTR の遺伝子発現を上昇させて雄ラットの OT に対する視床下部の感受性を高める可能性が考えられた。このことから、テストステロンは視床下部 OTR を高めることで血清 OT を高めることに貢献している可能性を考えたが、視床下部 OTR と血清 OT 分泌の関係はまだ解明されていないため、機序の特定には至らなかった。機序の特定を目指し、今後免疫組織染色を用いて視床下部の OT や OTR、アンドロゲン受容体を染色しその局在をみる研究や、OT た OTR のアゴニスト、アンタゴニスト、アンドロゲンを視床下部へ局所投与することにより血清 OT 分泌に変化が現れるか観察する研究などが期待される。

本検討ではまた、食欲に関与するホルモンの leptin についても調査した。leptin は obese gene の産物であり (Zhang et al, 1994)、大きさは 16 kDa で 167 個のアミノ酸(うち 21 個は分泌配列)からなる分子であり、球状タンパク質の三次元構造をとる (Munzberg and Morrison, 2015)。視床下部室傍核における OT の合成細胞には leptin 受容体である ObRb が発現しており、leptin は食欲中枢において OT の上流分子であるとされている (Hakansson et al, 1998)。ヒトにおける検討で、空腹やエネルギー制限によって血清 leptin が低下すること (Boden et al, 1996; Dubuc et al, 1998)、またその後の食事再開や過食によって血清 leptin が上昇すること (Kolaczynski et al, 1996a; Kolaczynski et al, 1996b) がわかっており、leptin は満腹ホルモンとして知られている。ただし、高脂肪食を与えたマウスを用いた実験において、血清 leptin が上昇するもののカロリー摂取量が減少せず肥満になっていることから、高脂肪食の投与は leptin 抵抗性を増加させることが示唆されている (Frederich et al, 1995)。一方、テストステロンには leptin のターンオーバーを促進し leptin 抵抗性を改善する作用があることが知られている (Castrogiovanni et al, 2003) もの、本検討においてはテストステロンと血清 leptin、視床下部 ObRb、脂肪組織 leptin の発現との間にはいずれも有意な関係性が見いだせなかった。

本検討ではさらに、テストステロンと adiponectin、OT の関係性についても示された。血清 adiponectin は CON 群と比較して ORX 群で、ORX-T 群と比較して ORX-non T 群で減少していたが、これはテストステロンによる脂肪組織縮小作用によって、脂肪細胞から分泌される adiponectin の総量が減少したためと考えられた。一方で、ORX-T 群においては ORX-non T 群と比較して内臓脂肪の adiponectin 発現が増加していた。adiponectin には脂肪代謝、体重減少、脂肪細胞サイズの縮小、インスリンへの感受性増加、そして抗動脈硬化作用がある (Ashima, 2006)。また、炎症性サイトカインは脂肪細胞における adiponectin の発現を減少させることが知られている (Bruun et al, 2003)。さらに、OT には抗炎症作用により脂肪細胞における adiponectin の分泌を増加させる作用があることが知られている (Szeto et al, 2020) ことから、テストステロンには脂肪細胞に対する直接的な脂肪燃焼作用のみならず、OT を介して adiponectin の発現を増加させ、肥満や動脈硬化を予防する間接的な作用もあると考えられた。本検討において ORX 群と比べて CON 群が、ORX-non T 群と比べて ORX-T 群において血清コレステロール値が低下しており、これは前述のテストステロンによる内臓脂肪 adiponectin の発現上昇が関与している可能性がある。

以上のように、本検討では、女性においてアンドロゲンのはたらきが上昇する PCOS、男性においてアンドロゲンのはたらきが低下する男性更年期という病態のモデルを作成し、いずれも内因性 OT のはたらきが低下すること、また OT の補充によって抗肥満効果が期待できることを示した。一方で現状、OT 製剤は注

射薬ないし経鼻薬しか存在しない。抗肥満治療として使用する場合はより侵襲の少ない経口薬が望ましい。しかし、古くから知られる OT は物質特許の取れないことから、OT の経口薬開発には難渋しているという背景がある。今後、内因性 OT のはたらきを高めることにより、抗肥満をはじめとした健康の維持に貢献する治療方法を研究したいと考えている。

最後に、本研究の **limitation** を何点か挙げる。本検討で用いた PCOS モデルラットは過去の PCOS モデルラットの代謝・肥満に関する検証に基づいて極めてシンプルな方法で作成した疾患モデルであるが、実際の PCOS は多数の遺伝的要素が関与していると考えられており、必ずしも臨床上の PCOS の代謝異常を反映しているとは限らない。さらに実際の病態に近い PCOS モデルラットを作成するためには、PCOS そのものの病態解明がさらに進む必要がある。また、本検討で作成した男性更年期モデルラットは性成熟期に去勢することで作成しており、実際には血清アンドロゲンが漸減する男性更年期と異なりアンドロゲンの喪失が急激であり、必ずしも実際の男性更年期の病態を反映しているとは限らない。老化ラットを用いた検討等が考慮されるが、時間、労力、費用が膨大となる。加えて、各モデルラットにおいて血中アンドロゲン濃度の測定を試みたものの測定がうまくできず、シリコンチューブ留置によりアンドロゲン投与がなされていることの裏付けができていない。さらに、本研究は各疾患モデルラットにおける内因性 OT の変化や OT 投与が体重や摂食量に与える影響を調査したものであるが、OT 投与後の遺伝子発現の変化については調査できておらず分子生物学的な裏付けができていない。OT は半減期が非常に短いため、OT 投与後の遺伝子発現の変化を観察するためには浸透圧ポンプ等を利用した OT 慢性投与モデルを使用した研究が考慮され、今後の課題である。また、本研究では遺伝子発現の変化を PCR でしか観察できておらず、PCOS モデルラット、男性更年期モデルラット、テストステロン補充療法モデルラットにおけるエストロゲン、エストロゲン受容体、アンドロゲン、アンドロゲン受容体、OT、OTR の分子学的相互作用に関する詳細なデータが得られていないが、ウエスタンブロットや ELISA、免疫組織染色を利用した研究を行うことでさらに詳細な考察が可能となると思われ、エビデンスレベルが高まると考えられる。

結論

【本研究から得られた新知見】

- ・雌ラットに対して DHT を補充することによって作成した PCOS モデルラットでは、健常ラットと比べて血清 OT が低下する。また、OT を投与することによって体重増加の抑制および摂食量の抑制効果が得られる。
- ・雄ラットの精巣を切除することによって作成した男性更年期モデルラットでは、健常ラットと比べて血清 OT が低下する。この作用はテストステロンの補充によって回復する。また、男性更年期モデルラットに OT を投与することによって体重増加の抑制および摂食量の抑制効果が得られる。

【新知見の意義】

女性においてアンドロゲンが高まるPCOS、男性においてアンドロゲンが低まる男性更年期のような、血清アンドロゲンのバランス異常を背景とした疾患では肥満のリスクが上昇するが、本研究では疾患モデルを利用することで内因性OTのはたらきが低下していることがわかった。さらに、その疾患モデルにおいてOTを補充することにより、抗肥満作用が得られることがわかった。これにより、PCOSや男性更年期といった病態において、副作用の懸念される抗アンドロゲン薬やアンドロゲン剤を使用することなく、副作用のほぼないOTを利用することでより安全に抗肥満治療に貢献できる可能性がある。

【今後の研究の展開】

OT の臨床応用の課題点として、考察にて述べた通り、古くから知られる OT は物質特許がとれないことが挙げられる。現状、OT 製剤は注射薬ないし経鼻薬しか存在しないが、抗肥満治療として使用する場合はより侵襲の少ない経口薬が望ましい。しかし、物質特許が取れないことから OT の経口薬開発には難渋しているという背景がある。そこで、内因性の OT を高めることによって間接的に OT による抗肥満効果に期待ができる薬剤のリサーチを進めている。

【今後の課題】

考察にて述べた通り、本研究で用いた PCOS モデルラットや男性更年期モデルラットは実際の PCOS、男性更年期の病態を必ずしも反映しているとは限らない。したがって、実際の遺伝子多型をより表現した PCOS モデルラットを開発したり、血清アンドロゲンが漸減した雄ラット(老年雄ラット)を用いたりすることでより実際の病態をふまえた研究が可能と考えられる。また、本研究はアンドロゲン投与と OT の関係性に関する観察までで終始しており、OT を投与したことによる遺伝子発現変化までのデータは得られておらず、アンドロゲンと OT の

分子生理学的を追求できていない。今後は、OT 慢性投与後の遺伝子変化を PCR のみならずウエスタンブロット、ELISA、免疫組織染色等を利用することにより OT を用いた抗肥満に対する治療の意義についてさらなる裏付けが可能となる。

謝辞

本研究において、研究の機会を与えてくださいました北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室 篠原信雄名誉教授、安部崇重准教授、今雅史助教授、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武富紹信教授に厚く御礼申し上げます。また、北海道からやって来た私を快く受け入れてくださり、1 から基礎実験の組み立てや遂行、また論文作成の御指導をしてくださいました徳島大学大学院医歯薬学研究部産婦人科学分野 岩佐武教授に心より御礼申し上げます。ならびに、本研究にあたりましてあらゆる局面において暖かくご協力くださいましたすべての皆様に、この場をお借りしまして深く御礼申し上げます。

利益相反

この研究において利益相反関係にある企業や団体はありません。

引用文献

Altirriba J, Poher AL and Rohner-Jeanrenaud F (2015) Chronic oxytocin administration as a treatment against impaired leptin signaling or leptin resistance in obesity. *Front. Endocrinol* 6, 119.

Ahima RS (2006) Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin, *Obesity* 14, 9S–15S

Balagura S, Harrell LE and Roy E (1975) Effect of the light-dark cycle on neuroendocrine and behavioral responses to scheduled feeding. *Physiol. Behav* 15, 245–247.

Bates GW and Legro RS (2013) Longterm management of polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Mol Cell Endocrinol* 373, 91–97.

Bhasin S, Storer T, Strakova J, Phillips J, Phillips C, Berman N, Burrnell T and Casaburi R (1994) Testosterone increases lean body mass, mass size and strength in hypogonadal men. *Clin Res* 42, 74A.

Blevins JE and Graham JL, Morton GJ, Bales KL, Schwartz MW, Baskin DG and Havel PJ (2015) Chronic oxytocin administration inhibits food intake, increases energy expenditure, and produces weight loss in fructose-fed obese rhesus monkeys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308, R431–R438.

Boden G, Chen X, Mozzoli M and Ryan I (1996) Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3419–3423.

Borst SE and Conover CF (2006) Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state. *Life Sciences*. 79, 411-415.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A and Richelsen B (2003) Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285 (3), E527–E533.

Castrogiovanni D, Perelló M, Gaillard RC and Spinedi E (2003) Modulatory Role of Testosterone in Plasma Leptin Turnover in Rats. *Endocrine* 22(3), 203–210.

De Vries GJ, Wang Z, Bullock NA and Numan S (1994) Sex differences in the effects of testosterone and its metabolites on vasopressin messenger RNA levels in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *J Neurosci* 14, 1789–1794.

Ding T, Hardiman PJ, Petersen I, Wang FF, Qu F and Baio G (2017) The prevalence of polycystic ovary syndrome in reproductive-aged women of different ethnicity: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8, 96351-96358.

Du Vigneaud DV, Ressler C and Trippett S (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205, 949–957.

Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS and Havel PJ (1998) Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism* 47, 429–434.

Ehrmann DA (2005) Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 352, 1223–1236.

Escobar-Morreale HF (2018) Polycystic Ovary Syndrome: Definition, Aetiology, Diagnosis and Treatment. *Nat Rev Endocrinol* 14(5), 270–284.

Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, Doppelt SH, Rosenthal DI, Segre GV and Crowley Jr WF (1989) Increases in body density during treatment of men with idiopathic hypothalamic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 69, 776-783.

Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, Makris AP, Rosenbaum DL, Brill C, Stein RI, Mohammed BS, Miller B, Rader DJ, et al (2010) Weight and metabolic outcomes after 2 years on a low-carbohydrate versus low-fat diet: a randomized trial. *Ann Intern Med* 153, 147–157.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB and Flier JS (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1, 1311–1314.

Gajdosechova L, Krskova K, Segarra AB, Spolcova A, Suski M, Olszanecki R and Zorad S (2014) Hypooxytocinaemia in obese Zucker rats relates to oxytocin degradation in liver and adipose tissue. *J Endocrinology* 220, 333–343.

Gershon E and Dekel N (2020) Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *Int J Mol Sci* 21(12), 4565.

Gonzalez F (2012) Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Underpinning of Insulin Resistance and Ovarian Dysfunction. *Steroids* 77(4), 300–305.

Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC and Meister B (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18, 559–572.

Hu C, Pang B, Ma Z and Yi H (2020) Immunophenotypic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome. *Mediat Inflamm* 2020, 1–10.

Iwasa T, Matsuzaki T, Yiliyasi M, Yano K and Irahara M (2017) The effects of chronic testosterone administration on body weight, food intake, and fat weight were age-dependent. *Steroids* 127, 18–23.

Iwasa T, Matsuzaki T, Mayila Y, Yanagihara R, Yamamoto Y, Kawakita T, Kuwahara A and Irahara M (2019) Oxytocin treatment reduced food intake and body fat and ameliorated obesity in ovariectomized female rats. *Neuropeptide* 75, 49–57.

Iwasa T, Matsuzaki T, Mayila Y, Kawakita T, Yanagihara R and Irahara M (2020) The effects of chronic oxytocin administration on body weight and food intake in DHT-induced PCOS model rats. *Gynecol Endocrinol* 36, 55-60.

Iwasaki Y, Maejima Y, Suyama S, Yoshida M, Arai T, Katsurada K, Kumari P, Nakabayashi H, Kakei M and Yada T (2015) Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308, R360-369.

Kamada S, Yamamoto Y, Aoki H, Tamura K, Takeda A, Minato S, Masaki R, Yanagihara R, Hayashi N, Yano Y, et al (2021) A novel PCOS rat model and an evaluation of its reproductive, metabolic, and behavioral phenotype. *Reprod Med Biol* 21, e12416.

Kamada S, Noguchi H, Yamamoto S, Tamura K, Aoki H, Takeda A, Uchishiba M, Minato S, Arata M, Arakaki R, et al (2024) Stress responses to bacterial and viral mimetics in polycystic ovary syndrome model rats. *Brain Behav Immun Health*. 38, 100772.

Kirilov G, Lang RE, Kraft K and Ganten D (1987) The effects of orchidectomy and testosterone replacement therapy on plasma and brain oxytocin in normal rats. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 13(2), 30-35.

Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, Myint M and Caro JF (1996a) Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45, 1511–1515.

Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC and Caro JF (1996b) Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 4162–4165.

Ladson G, Dodson WC, Sweet SD, Archibong AE, Kunselman AR, Demers LM, Williams NI, Coney P and Legro RS (2011) The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind study. *Fertil Steril* 95, 1059–1066.

Lauritsen MP, Bentzen JG, Pinborg A, Loft A, Forman JL, Thuesen LL, Cohen A, Hougaard DM and Andersen AN. (2014) The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod* 29, 791-801

Maejima Y, Iwasaki Y, Yamahara Y, Kodaira M, Sedbaxar U and Yada T (2011) Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. *Aging* 3, 1169–1177.

Maejima Y, Aoyama M, Sakamoto K, Jojima T, Aso Y, Takasu K, Takenoshita S and Shimomura K (2017) Impact of sex, fat distribution and initial body weight on oxytocin's body weight regulation. *Sci Rep* 7, 8599.

Maejima Y, Yokota S, Nishimori K and Shimomura K (2018) The anorexigenic neural pathways of oxytocin and their clinical implication. *Neuroendocrinology* 107, 91–104.

Mårin P, Holmtäng S, Gustafsson C, Jönsson L, Kvist H and Elander A (1993) Androgen treatment of abdominally obese men. *Obesity Research* 1(4), 245–251.

Moran LJ, Misso ML, Wild RA and Norman RJ (2010) Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 16, 347–363.

Munzberg H and Morrison CD (2015) Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* 64, 13–23.

Nikolaenko L, Jia Y, Wang C, Diaz-Arjonilla M, Yee JK, French SW, Liu PY, Laurel S, Chong C, Lee K, et al (2014) Testosterone Replacement Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Castrated Male Rats. 155, 417-428.

Nunez AA and Grundman M (1982) Testosterone affects food intake and body weight of weanling male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 16(6), 933–936.

Qian W, Zhu T, Tang B, Yu S, Hu H, Sun W, Pan R, Wang J, Wang D, Yang L, et al (2014) Decreased circulating levels of oxytocin in obesity and newly diagnosed type 2 diabetic patients. *J Clin. Endocrinol Metab* 99, 4683–4689.

Rosenfield RL and Ehrmann DA (2016) The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocr Rev* 37, 467-520.

Rostamtabar M, Esmailzadeh S, Tourani M, Rahmani A, Bae M, Shirafkan F, Saleki K, Mirzababayi SS, Ebrahimpour S, Nouri HR (2021) Pathophysiological Roles of Chronic Low-Grade Inflammation Mediators in Polycystic Ovary Syndrome. *J Cell Physiol* 236(2), 824–38.

Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004 81, 19–25.

Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H and Kato S (2003) Late onset

of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice, *Biochem Biophys Res Commun* 300(1), 167–171.

Sloan DK, Spencer DS and Curtis KS (2018) Estrogen effects on oxytocinergic pathways that regulate food intake. *Horm Behav* 105, 128–137.

Szeto A, Cecati M, Ahmed R, McCabe PM and Mendez AJ (2020) Oxytocin reduces adipose tissue inflammation in obese mice. *Lipids Health Dis* 19 (1), 188.

Tenover JP (1992) The effect of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1092-1098.

Thienel M, Fritsche A, Heinrichs M, Peter A, Ewers M, Lehnert H, Born J and Hallschmid M (2016) Oxytocin's inhibitory effect on food intake is stronger in obese than normal-weight men. *Int J Obes* 40, 1707–1714.

Thornton SN, Delaney CE and Chapman C (1988) Plasma vasopressin and oxytocin levels in intact goats and in castrated goats given testosterone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 117(2), 260-264.

Young NR, Baker HWG, Liu G and Seeman E (1993) Body composition and muscle strength in healthy men receiving testosterone enanthate for contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1028-1032.

Yuan G, Qian W, Pan R, Jia J, Jiang D, Yang Q, Wang S, Liu Y, Yu S, Hu H, et al (2016) Reduced circulating oxytocin and high-molecular-weight adiponectin are risk factors for metabolic syndrome. *Endocr J* 63, 655–662.

Zhang G, Bai H, Zhang H, Dean C, Wu Q, Li J, Guariglia S, Meng Q and Cai D (2022) Neuropeptide exocytosis involving synaptotagmin-4 and oxytocin in hypothalamic programming of body weight and energy balance. *Neuron* 69, 523–535.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and its Human Homologue. *Nature* 372, 425–432.

久保田俊郎, 苛原稔, 小辻文和, 原田省, 藤原敏博, 松崎利也, 吉木尚之 (2009)

生食・内分泌委員会報告「本邦における多嚢胞性卵巣症候群の治療法に関する治療指針の作成のための小委員会」報告. 日本産婦人科学会雑誌 61, 902-912.