

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 杉山 由貴奈(静岡県) |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 甲第 178 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 5 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 3 条第 2 項該当 |
| 学位論文題名 | イヌの健康状態と脂肪細胞における肥満関連遺伝子の発現 |
| 論文審査委員 | (主査) 村 上 賢 (副査) 折 戸 謙 介 恩 田 賢 舟 場 正 幸 (京都大学) |

論文内容の要旨

獣医療において肥満は深刻な問題である。アメリカの報告では 2018 年時に飼育されていた犬の 56%、猫の 60%が肥満であるとされており、最も一般的な栄養障害とされている。肥満はヒト同様に糖尿病や循環器疾患、関節疾患、尿路感染症を引き起こすこと、さらに肥満は QOL の低下につながる事が報告されている。また近年ではヒト医療において大腸癌や乳癌は肥満関連癌と呼ばれ、腫瘍と肥満の関連も注目されている。イヌにおいても腫瘍の発生率は増加しており、腫瘍と肥満の関連も報告されているため、これらの予防の観点からも肥満の予防・解消は重要であると考えられている。

肥満とは、食物摂取量が慢性的にエネルギー消費量を超えると発生するもので、白色脂肪細胞の過形成と肥大を特徴とする。脂肪細胞には、白色、褐色、ベージュ脂肪細胞の 3 種類がある。白色脂肪細胞は余剰なエネルギーを脂肪として蓄積する。一方、褐色・ベージュ脂肪細胞はエネルギーを熱として産生することができる。褐色・ベージュ脂肪細胞の熱産生には脱共役タンパク質(*Ucp1*) が関わっている。ヒトやマウスではこの *Ucp1* と肥満に関する研究が多く行われており、肥満解消のためのサプリメントとして *Ucp1* を増加させる作用を持つものも発売されている。しかしイヌにおける肥満の解消は食事のコントロールと運動療法に頼るのが一般的である。食事のコントロールと運動療法は効果を得るまでに時間がかかるため、成功率が低いのが現状である。イヌにおいても *Ucp1* を持つベージュ脂肪細胞を増やすことで肥満解消・予防、さらには腫瘍などの疾患の予防ができるのではないかと考えている。そこで今回、イヌの脂肪組織に注目し、肥満やその他の健康状態における脂肪細胞での遺伝子発現、つまり *Ucp1* をはじめとする脂肪細胞の分化や機能に関する遺伝子発現を調べた。

第1章 イヌ *Ucp1* 遺伝子の発現

褐色・ベージュ脂肪細胞が持つ *Ucp1* はミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパク質である。*Ucp1* を高発現させたマウスでは肥満を予防できることが報告されており、*Ucp1* は肥満の解消において重要な因子と考えられている。本章ではまず、ウシ、ラット、マウス、イヌ、ネコの 5 種類の動物種の脂肪組織における *Ucp1* の発現を RT-PCR により比較した。その結果、イヌは脂肪組織における *Ucp1* の発現量が他の動物種よりも多いことがわかった。さらに、イヌの各組織（脳、心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮膚、精巣）由来の RNA を用いて *Ucp1* 遺伝子の発現を調べたところ、2nd PCR による微量検出ではあるものの、脂肪組織だけではなく心臓や脳など多くの臓器で *Ucp1* が発現していることがわかった。また、目的とするサイズの *Ucp1* mRNA（バリエント 1）のほかに、やや小さいサイズの *Ucp1* バリエント 2 が存在していることもわかった。このバリエント 2 の塩基配列を調べたところ、本来の大きさをもつ *Ucp1* mRNA（バリエント 1）の Exon2 領域を欠失したバリエントであった。バリエント 2 の推定アミノ酸配列はナンセンス変異が生じるなど、*Ucp1* として機能していないタンパク質を生じていると考えられた。このようなバリエントはヒトやマウス、ラットなど他の動物種では報告がなく、イヌに特徴的であるかもしれない。存在意義については今後の検討が必要である。イヌの *Ucp1* 遺伝子が他の動物種より高発現していることや脂肪組織以外の臓器にも発現していることは、イヌにおいて *Ucp1* 遺伝子の発現制御は、肥満予防やその他の健康状態に影響を与えることが推察される。

第2章 イヌ白色脂肪細胞における肥満関連遺伝子発現

筆者が勤務する動物病院を中心に複数の動物病院で、開腹手術を実施した 129 頭のイヌの皮下または内臓の脂肪組織を採取し、cDNA を作製した。脂肪細胞分化と機能に関わる調節遺伝子、アディポカイン、褐色脂肪細胞形成や脱共役タンパク質 (*Ucp*)、BMP シグナルに関わる遺伝子の 4 つのカテゴリーに分類した合計 23 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR を用いて測定した。発現量について、各遺伝子間および BCS や年齢、健康状態との関連を解析した。その結果、まず各個体でのそれぞれの遺伝子発現についてみると、調べた 23 遺伝子のうち *Ucp1* と *Ucp3* の 2 つの遺伝子において、顕著に高い値を示す個体がみられた。褐色・ベージュ脂肪細胞の熱発生に関与する *Ucp1* 遺伝子の発現が平均より 20 倍高い検体であったものの、その個体の BCS は 3 であり特別痩せてはいなかった。ウシにおいて、*Ucp1* の発現量が通常より 1500 倍以上高かった個体では飼料効率が低く、体重が増加しにくいことが報告されており、今回のイヌの 20 倍程度では、BCS に影響を与える変化ではないのかもしれない。次に、肥満の指標であるボディコンディションスコア (BCS) を目的変数として解析したところ、信頼性の高い重回帰式は得られなかった。*Ucp1* と *Ucp3* を除く 21 の遺伝子間の発現量に正の相関が認められた。BCS は年齢とともに増加し、*Ppar γ* および *Fasn* の遺伝子発現量と負の相関を示し、*Leptin* および *Opn3* の発現量と正の相関を示した。加齢に伴い、脂肪細胞分

化と機能に関わる調節遺伝子のカテゴリーに属する *Ppar γ* 、*Fabp4*、*Fasn*、*Hsl* と *Insr* 遺伝子、およびアディポカインの一つである *Adipoq* 遺伝子の発現量は減少した。これらに加えて加齢は、褐色脂肪細胞形成に関与する *Prdm16* 遺伝子や BMP シグナルに関わる遺伝子に分類される *Bmp4*、*Alk3*、*Actr2a*、*Actr2b* 遺伝子の発現量と負の相関を示した。一方で、加齢により *Leptin* と *Ucp2* の遺伝子発現量は増加した。雌雄について見てみると、*Ppar γ* 、*Adipoq*、*Bmp4* 遺伝子発現はメスで高く、*Ucp2* と *Ucp3* 遺伝子発現はオスで高かった。腫瘍疾患のイヌについて見てみると、健康なイヌに比べ *Ppar γ* と *Fasn* の遺伝子発現は低く、*Leptin*、*Ucp2*、*Ucp3* および *Inh β b* の発現は高かった。また、体格で見ると、*Tnf α* と *Opn3* の遺伝子発現は小型犬に比べ大型犬で高かった。

肥満は、脂肪細胞数の増加と脂肪細胞の肥大化を特徴とするが、成人での肥満は脂肪細胞の肥大化が主な原因と考えられている。そしてその肥大化した脂肪細胞はより多くの *Leptin* 遺伝子を発現していることが知られている。今回のイヌの加齢による BCS の増加では、脂肪細胞の肥大化が起こっており、そのため *Leptin* 遺伝子の増加がみられたと考える。一方、*Ppar γ* と *Fasn* の遺伝子発現の減少は脂肪細胞の肥大化に対する防御的反応と推測する。

最近、褐色脂肪細胞に光を照射すると光受容体である *Opn3* 遺伝子産物を介して熱発生が活性化されることが報告された。*Opn3* 遺伝子発現制御は不明であるが、今回、BCS に伴い *Opn3* 遺伝子の発現が増加をしたり、大型犬で高い発現量がみられたりしており、肥満との関連で今後注目をする必要がある。

BMP シグナルは褐色・ベージュ脂肪細胞分化の誘導に関与しており、また *Prdm16* 遺伝子産物は褐色・ベージュ脂肪細胞分化に必要な因子であることから、今回のイヌでの加齢によるこれら遺伝子の発現の減少は、加齢に伴う褐色・ベージュ脂肪細胞活性の減少を引き起こし、それが BCS の増加へつながっているのかもしれない。

肥満と腫瘍の関連については、アディポカインである *Leptin* の増加や *Adipoq* の低下などが炎症反応に影響を与え腫瘍を発生していることが知られている。今回のイヌの腫瘍群においても、*Leptin* は有意に増加しており、*Adipoq* は減少傾向であった。

本研究の結果からは BCS と調べた 23 の遺伝子の脂肪細胞における発現との明確な関連を示すことはできなかった。しかし、多くの遺伝子間では正に相関をしていた。*Leptin* や *Opn3*、*Ppar γ* 、*Fasn* は BCS と関連していることから、肥満の予防・解消には *Ucp1* 以外にも多くの遺伝子が関与している可能性も考えられた。ヒトではゲノムワイド関連解析から肥満に関連する遺伝子が報告されており、それらの遺伝子発現が、高脂肪食を与えたマウスの脂肪組織で変化することも知られている。今後イヌにおいても大規模なゲノムワイド関連解析を実施してそこから得られた関連遺伝子の脂肪細胞における発現解析を行うことが必要になるかもしれない。本研究は BCS、年齢、腫瘍などイヌのプロファイルと脂肪組織における遺伝子発現の関連を調べた。これらの結果はイヌの肥満の予防や治療に向けた候補遺伝子同定のための基礎的情報となる。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は、伴侶動物の獣医療において深刻な問題となっている肥満およびその他の健康状態に注目し、将来の効果的な肥満の予防や解消法を目指して、イヌの脂肪組織での肥満関連遺伝子の発現を調べた基礎的、疫学的研究である。

論文は2章から構成されている。第1章では、肥満の解消において重要な因子と考えられている脱共役タンパク質(*Ucp1*) 遺伝子の単離をした。*Ucp1* は褐色・ベージュ脂肪細胞のミトコンドリア内膜に存在し、エネルギーを熱として産生することができるタンパク質である。イヌの白色脂肪組織では *Ucp1* 遺伝子が他の動物種より高発現していることや脂肪組織以外の臓器にも微量ではあるが発現していること、また他の動物種には見られないイヌに特徴的な *Ucp1* 遺伝子バリエーション 2 を検出し、イヌにおける *Ucp1* 遺伝子の発現制御の可能性を示した。第2章では、動物病院に来院した129頭のイヌからの皮下または内臓の脂肪組織を用いて、脂肪細胞分化と機能に関わる調節遺伝子、アディポカイン、褐色脂肪細胞形成や *Ucp*、BMP シグナルに関わる遺伝子の4つのカテゴリーに分類した合計23遺伝子の発現量を調べ、ボディコンディションスコア(BCS)、年齢、腫瘍などイヌのプロファイルとこれら遺伝子の発現の関連を解析した。BCSと調べた23の遺伝子の脂肪細胞における発現との明確な関連を示すことはできなかったが、多くの遺伝子間では正に相関をしていた。これらの成果はイヌの肥満やそれに関連する疾患の予防や治療に向けた候補遺伝子同定のための有用な基礎的情報となる。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、小動物病院に勤務する臨床獣医師であり、日々の診療現場で増加を実感している伴侶動物の肥満とその関連疾患について興味をもち、科学的根拠に基づいた、イヌの肥満の新たな予防・解消について、現場での獣医療への貢献を目指したものである。現場で直面している問題であり、実現可能な明確なテーマが設定されている。

2) 研究の背景

肥満は糖尿病や循環器疾患、関節疾患、尿路感染症を引き起こし、さらに大腸がんや乳がんなど腫瘍との関連も注目される一般的な栄養障害である。この肥満は獣医療においても深刻な問題となっている。イヌにおいても腫瘍と肥満の関連も報告されている。肥満の解消や予防は重要であるが、イヌにおける継続した食事のコントロールや運動療法による改善方法には限界があり、新たなイヌの肥満の解消法が期待される。これらの背景を踏まえ、目的に向けて本研究に取り組んでいる。

3) 研究の方法

第1章では、イヌの白色脂肪組織から RNA を抽出し、RT-PCR により *Ucp1* 遺伝子発現を検出した。増幅産物のクローニングを行い塩基配列を決定した。また、イヌの各組織（脳、心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮膚、精巣）由来の RNA を用いて高 GC 含量を考慮した 2nd RT-PCR により *Ucp1* 遺伝子の発現を調べた。第2章では、動物病院に開腹手術のために来院した 129 頭のイヌから採取した皮下または内臓の脂肪組織 162 検体を用いて、RNA を抽出し cDNA を作製した。脂肪細胞分化と機能に関わる調節遺伝子、アディポカイン、褐色脂肪細胞形成や *Ucp*、BMP シグナルに関わる遺伝子の 4 つのカテゴリーに分類した合計 23 遺伝子のプライマーを設計し、それらの発現量を定量的 RT-PCR を用いて測定した。発現量について、各遺伝子間および BCS や年齢、健康状態との関連を統計的に解析した。

このように、研究の目的とテーマにふさわしい複数の研究方法を用いて、分析している。

4) 研究の結果

第1章では、イヌ白色脂肪組織に本来の *Ucp1* mRNA（バリエント 1）の他に、Exon2 領域を欠失したバリエント 2 を検出した。また微量検出ではあるものの、脂肪組織だけではなく心臓や脳など多くの臓器で *Ucp1* mRNA が発現していることを示した。第2章では、調べた 23 遺伝子それぞれの発現について各検体でみると、*Ucp1* と *Ucp3* の 2 つの遺伝子において、顕著に高い値を示す個体があったが痩せてはいなかった。次に、肥満の指標である BCS を目的変数として解析したところ、信頼性の高い重回帰式は得られなかった。*Ucp1* と *Ucp3* を除く 21 の遺伝子間の発現量に正の相関が認められた。BCS は年齢とともに増加し、*Ppar γ* および *Fasn* の遺伝子発現量と負の相関を示し、*Leptin* および *Opn3* の発現量と正の相関を示した。加齢に伴い、脂肪細胞分化と機能に関わる調節遺伝子のカテゴリーに属する *Ppar γ* 、*Fabp4*、*Fasn*、*Hsl* と *Insr* 遺伝子、およびアディポカインの一つである *Adipoq* 遺伝子の発現量は減少した。これらに加えて加齢は、褐色脂肪細胞形成に関与する *Prdm16* 遺伝子や BMP シグナルに関わる遺伝子に分類される *Bmp4*、*Alk3*、*Actr2a*、*Actr2b* 遺伝子の発現量と負の相関を示した。一方で、加齢により *Leptin* と *Ucp2* の遺伝子発現量は増加した。*Ppar γ* 、*Adipoq*、*Bmp4* 遺伝子発現はメスで高く、*Ucp2* と *Ucp3* 遺伝子発現はオスで高かった。腫瘍疾患のイヌは健康なイヌに比べ *Ppar γ* と *Fasn* の遺伝子発現は低く、*Leptin*、*Ucp2*、*Ucp3* および *Inh β b* の発現は高かった。また、*Tnf α* と *Opn3* の遺伝子発現は小型犬に比べ大型犬で高かった。

いずれも十分なデータをまとめて解析している。

5) 考察と結論

第1章での、イヌの *Ucp1* 遺伝子が他の動物種より高発現していることや脂肪組織以外の臓器にも発現していることは、イヌにおいて *Ucp1* 遺伝子の発現制御は、肥満予防やその他の健康状態に影響を与えることが推察される。また、イヌに特徴的である *Ucp1* 遺伝子バリエント 2 の存在意義について

ては今後の検討課題としている。第2章での、20倍程度の高い *Ucp1* 遺伝子発現では、BCS に影響を与える変化ではないとしている。イヌの加齢による BCS の増加では、脂肪細胞の肥大化が起こっており、そのため *Leptin* 遺伝子の増加がみられたと考え、一方、*Ppar γ* と *Fasn* の遺伝子発現の減少は脂肪細胞の肥大化に対する防御的反応と推察している。BCS の増加や大型犬による *Opn3* 遺伝子の発現増加は肥満との関連で今後注目をする必要がある。イヌでの加齢に伴う *Prdm16* 遺伝子や BMP シグナル遺伝子の発現の減少は、褐色・ベージュ脂肪細胞活性の減少を引き起こし、それが BCS の増加へつながっていると推察している。イヌの腫瘍群における *Leptin* の有意な増加と *Adipoq* の減少傾向は炎症反応に影響を与えているかもしれない。

いずれも研究結果から明らかになったことを踏まえ、論理的に丁寧に説明できている。

6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容、専門分野と発表会での質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上、意義ある業績として評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。