

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

Studies on expression of obesity-related gene in canine
health status and adipocytes

2023年3月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

分子生物学

DV1861 杉山由貴奈

目次

緒論	3
第1章 イヌ <i>Ucp1</i> 遺伝子発現	
1 序論	6
2 材料と方法	
2-1 材料	8
2-2 方法	8
3 結果	9
4 考察	10
第2章 イヌ白色脂肪細胞における肥満関連遺伝子発現	
1 序論	11
2 材料と方法	
2-1 材料	13
2-2 方法	14
2-3 統計解析	15
3 結果	16
4 考察	18
総括	23
General Overview	25
謝辞	26
参考文献	27
図および表	32

緒論

獣医療において肥満は深刻な問題である。アメリカでは2008年から2018年の10年間で犬は12%、猫は3%の割合で肥満が増加しており、2018年時に飼育されていた犬の56%、猫の60%が肥満であると報告されている(Megan 2021)。犬が肥満になる要因として最も重要なことは飼い主の意識であり、肥満の犬の飼い主は肥満が病気に関連することを理解していないことが多い(Munoz-Prietoら、2018)が、肥満はヒト同様に糖尿病や循環器疾患、関節疾患などを引き起こすこと、肥満はQOLの低下につながることを報告されている(Lavieら、2009; van der KlaauwとFarooqi、2015; Megan 2021)。さらに、人では大腸癌などは肥満関連癌と呼ばれ、肥満と腫瘍の関連も注目されている(DumasとBrisson、2020)。これらの疾患の予防の観点からもヒトにおいて肥満の治療は注目されており、多くの研究が行われている。

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(Lvieら、2009; van der Klaauw and Farooqi、2015)。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が、褐色・ベージュ脂肪細胞はエネルギーを熱として利用することができる

(HarmsとSeale、2013; KajimuraとSaito、2014)。この熱産生には脱共役タンパク質(*Ucp1*)が関与している(Echtay、2007; Krauss、2005)。褐色脂肪細胞は、マウスやハムスターなどの小型齧歯類の非震え熱産生部位として知られている組織である(HarmsとSeale、2013; KajimuraとSaito、2014; Wuら、2009)。非震え熱は冬眠動物が冬眠からの覚醒時に体温を上昇させる時や、齧歯類や小型動物が寒冷環境で体温を維持する際に重要になる。そのほかの哺乳類においても、母親の体内から出生した直後は外界の急激な気温の変化に対応

するために褐色脂肪細胞による熱産生が必要になる。そのため褐色脂肪細胞が存在しているが、成長するに伴い、基礎代謝量の増加や筋肉による震え熱産生により体温上昇が可能となる (Harms と Seale, 2013 ; Kajimura と Saito, 2014)。このことから多くの動物は褐色脂肪細胞による非震え熱産生の需要が低下することで、褐色脂肪細胞が退化していくと考えられている (Kajimura と Saito, 2014)。ヒトにおいても、乳幼児にしか褐色脂肪細胞が存在しないと考えられていたが、近年 FDG-PET による臨床観察時に成人のヒトにおいても褐色化した脂肪細胞が存在することがわかった (Harms と Seale, 2013 ; Kajimura と Saito, 2014)。

肥満解消においてはもともと抗肥満薬として食欲減退薬や腸での脂肪吸収を抑える薬などがヒト医療では使用されている。しかしこれらはうつ病などを引き起こすことがわかっている (Kajimura と Saito, 2014)。そのため、新たな方法として脂肪細胞に働きかけエネルギー消費を増加させることで肥満を解消する方法が注目されている。実際にレズベラトロールというポリフェノールの1つは白色脂肪細胞を褐色化し *Ucp1* を増やすことにより、脂肪燃焼を促すことが報告されており (Wang ら, 2015)、サプリメントとして発売されている。しかし、イヌにおいては肥満や脂肪燃焼に関する薬やサプリメントはまだ一般的ではない。イヌにおいては成犬では褐色脂肪細胞がヒトと同様ほとんど見当たらないことや $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬を投与すると全身の脂肪組織に *Ucp1* が発現し、体脂肪も減少すること (Sasaki ら, 1998 ; Omachi ら, 2007)、*Ucp1* と BMP シグナルに関する一部の遺伝子間に正の相関があること (Motomura ら, 2019) などが報告されているが、現在イヌの肥満を解消するための方法は食事のコントロールと運動に頼ることが多い。しかし実際には運動や食事のコントロールだけでは肥満を解消することは困難である。(Megan, 2021)。そこで脂

肪組織に注目し、*Ucp1*をはじめとする肥満関連遺伝子の発現を調べ、肥満と健康状態の関連を明らかにすることを目的とし、第1章ではイヌ *Ucp1* 遺伝子発現について、第2章ではイヌ白色脂肪細胞における肥満関連遺伝子の発現について調べた。

第1章 イヌ *Ucp1* 遺伝子発現

1 序論

Ucp1 はミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質であり、肥満との関連が注目されている。肥満の個体では *Ucp1* の機能が低下していること、多食しても肥満しない個体では *Ucp1* が増加していること、*Ucp1* を高発現させたマウスでは肥満しないことなどがわかっている (Dalgaard ら、2001)。

体内の脂肪細胞は、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の3種類がある。白色脂肪細胞は内臓や皮下に分布し余分なエネルギーを脂肪として蓄積する。一方、褐色脂肪細胞は肩甲骨や腎臓付近に分布しエネルギーを熱として利用する (Harms と Seale、2013 ; Kajimura と Saito、2014)。ベージュ脂肪細胞は白色脂肪細胞が寒冷刺激などを受けた際に褐色化した細胞であり、褐色脂肪同様にエネルギーを熱として利用することができる (Harms と Seale、2013 ; Kajimura と Saito、2014)。

褐色・ベージュ脂肪細胞における熱産生は、*Ucp1* が関わっている。*Ucp1* は、ミトコンドリア内膜に存在する6回膜貫通型のタンパク質である (Echtay、2007 ; Krauss 2005)。ミトコンドリアでは通常、膜の内外に形成されたプロトン濃度勾配は、 F_0F_1 -ATPase により解消され、それと共役して ADP と無機リン酸から ATP が合成される。ところが、褐色・ベージュ脂肪細胞のように *Ucp1* を多く含むミトコンドリアでは、*Ucp1* がプロトン濃度勾配を積極的に解消するため、 F_0F_1 -ATPase における共役反応が脱共役される。プロトンの電気化学勾配が小さくなると、ミトコンドリアは電気化学勾配をもとのレベルに戻そうとするために呼吸が活発になり、プロトンの電気化学ポテンシャル差として蓄えられたエネルギーは熱として放出されると考えられている (Echtay、2007 ; Krauss、2005)。

イヌでは β アドレナリン受容体刺激により白色脂肪細胞が褐色化することがわかっている(Omachi ら、2008)。しかし白色脂肪組織をはじめとする各組織における *Ucp1* 遺伝子発現についてはわかっていない。ウシでは白色脂肪組織にも *Ucp1* が存在することがわかっており(Diao ら、2022)、イヌの白色脂肪組織や各組織にも *Ucp1* が存在しているのかについて第1章では調べることにした。健全なイヌの *Ucp1* 遺伝子の組織分布を調べるのは倫理上困難であるため、イヌ由来の各組織（脳、心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮膚、精巣、骨髄、白色脂肪）の RNA を購入し、RT-PCR 法を用いて *Ucp1* 遺伝子発現レベルを調べた。

2 材料と方法

2-1 材料

大学内にて採取した採取したウシ、マウス、ラットの白色脂肪組織、動物病院にて採取したイヌ、ネコの白色脂肪組織を使用した。

ZYAGEN 社(アメリカ)より購入したビーグルの脳、心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮膚、精巣、骨髄、白色脂肪細胞の RNA を使用した。

本実験は、麻布大学の動物実験委員会の承認を得ている（承認番号：200109-2）。

2-2 方法

2-2-1 RNA の抽出および RT-PCR 法による cDNA の作製

各動物種の脂肪は、ISOGEN(ニッポンジーン)を用いてプロトコールに従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度を Quantus™ Fluorometer を用いて Quantus®RNA System 試薬にて測定した。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を作製した。

2-2-2 RT-PCR

TaKaRa Ex Taq® Hotstart Version(タカラバイオ)のプロトコールに従い、10ng の total RNA に相当する cDNA を鋳型として行った。熱変性 98°C 10 秒 55°C、アニーリング温度 30 秒、伸長反応 PS-GXL を用いて 72°C 1 分のセットを 35 サイクルの条件で行った。内部標準は 30 サイクルの条件で行った。脳、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、骨格筋、皮膚、精巣、白色脂肪細胞の RNA においては 2 回 PCR を行った。

3 結果

4 考察

Ucp1 は褐色脂肪細胞に存在し、白色脂肪細胞には存在していない。今回白色脂肪組織において *Ucp1* 遺伝子の発現が認められたことは、この白色脂肪組織に *Ucp1* を持つベージュ脂肪細胞が多く含まれていることを示唆している。

脳や心臓などの臓器においても微量であるが *Ucp1* 発現が認められた。今回は mRNA からの *Ucp1* 遺伝子発現を調べたため、組織の周囲に存在していた脂肪を検出している可能性も考えられる。今後は組織の免疫染色など他の方法も検討し *Ucp1* 遺伝子の発現を検討する必要があると考えられる、しかし、ラットによる報告では心臓組織に *Ucp1* が発現していること、心筋ストレスを引き起こした心臓では *Ucp1* の発現がコントロール群に比べ増加していること、*Ucp1* ノックアウトラットでは、心筋の肥大など心臓へのダメージがコントロール群に比べ大きいことがわかっている (Daorong ら、2022)。このことよりイヌの脂肪組織以外の組織においても *Ucp1* 遺伝子が発現している可能性があり、重要な役割を担っている可能性、疾患の発生や改善に関与する可能性が示唆される。

第2章 イヌ白色脂肪細胞における肥満関連遺伝子発現

1 序論

第1章では褐色・ベージュ脂肪細胞が持つ *Ucp1* 遺伝子の発現について調べ、イヌの *Ucp1* 遺伝子はヒトや実験動物と同様ではないことが考えられた。第2章では筆者が勤務する動物病院を中心にイヌの脂肪組織を採取し、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、褐色脂肪細胞形成と脱共役タンパク質 (*Ucp*) に関わる遺伝子、BMP シグナルに関わる遺伝子の合計 23 遺伝子の肥満関連遺伝子について調べた。

23 遺伝子の中でいくつかについて詳細を記載する。脂肪細胞と機能に関わる遺伝子については、*PR domain containing 16 (Prdm16)* や *Ppar γ* 、脂肪酸合成酵素 (*Fasn*) などがある。*Prdm16* や *Ppar γ* は褐色・ベージュ脂肪細胞への分化誘導スイッチとして重要な役割を担う転写調節因子である。*Fasn* は余剰なエネルギーを脂肪酸へと変換し脂肪量の増加に影響するとされている (Migita ら、2009)。さらに、*Fasn* の高発現は腫瘍の形成に関与するとも言われている (Migita ら、2009)。BMP シグナルは間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に重要な役割を担うとされてきたが、*Ppar γ* の転写制御に関与することで褐色・ベージュ脂肪細胞への分化を促すことがわかってきた (Chen ら、2018)。脱共役タンパク質 *Ucp* には *Ucp1* を始め *Ucp2*、*3* なども存在している。*Ucp1* は褐色・ベージュ脂肪細胞に存在し脂肪を燃焼することで熱産生を行う一方、*Ucp2*、*Ucp3* は骨格筋などに存在し、活性酸素の発生を抑えて生体内の酸化ダメージを防ぐ役割を担っていると考えられている (Vidal-Puig ら、2000)。アディポカインは脂肪細胞から分泌されるホルモンの総称であり、近年脂肪細胞は内分泌臓器としても注目されている。アディポカインには *Adipoq*、*Leptin*、*TNF- α* などがある。*Adipoq* は、脂肪細胞から特異的に分泌されるにも関わらず、肥満および内臓脂

肪蓄積時に低下し、体重減少時に増加する。抗炎症作用、抗糖尿病、抗動脈硬化作用などを有しており、様々な疾患に関連があると考えられている (Ricci と Bevilacqua, 2011)。 *Leptin* は脂肪組織から分泌され、視床下部に直接作用して強力な摂食抑制および交感神経亢進によるエネルギー消費亢進をもたらす、肥満や体重増加の制御に関与する。しかし肥満が進行すると、 *Leptin* 耐性となり食欲減退作用も耐性を示すようになり、ますます肥満になることがわかっている (Ricci と Bevilacqua, 2011)。 *TNF- α* は脂肪組織に浸潤したマクロファージから分泌される。 GLUT4 の発現を抑制することでインスリン抵抗性を示すため、炎症性アディポカインと呼ばれている (Ricci と Bevilacqua, 2011)。

過去に、入院中のイヌ 29 頭の脂肪細胞における褐色、ベージュ脂肪細胞形成と脂肪細胞に関連する遺伝子の mRNA 発現を予備的に評価した研究がある

(Motomura ら、2019)。その結果、ボディコンディションスコア (BCS) と *UCP1* との関連はわからなかったが、 *Prdm16* と BMP シグナルの受容体の発現量とは関連していた (Motomura ら、2019)。

本研究では 129 頭のイヌの皮下脂肪・内臓脂肪を採取し肥満関連遺伝子の発現量を評価した。さらに、129 頭の中には健康な症例や腫瘍などの疾患を持つ症例が混在していたため、遺伝子発現量と症例の性別や健康状態などのプロフィールとの関係も検討した。

2 材料と方法

2-1 材料

動物病院に来院した犬 129 頭（メス 110 頭、オス、19 頭）を使用した(表 3)。メスの多くは避妊手術の際に脂肪組織を採取したが、子宮蓄膿症や乳腺腫瘍の疾患症例も含まれる。サンプルは臨床的に健康群（81 頭）、疾患群（48 頭）と分類した(表 4)。また、標準的な成犬のサイズに応じて、雑種犬を除く犬種を小型（n=89）、中型（n=14）、大型（n=13）の 3 群に分類した(Salt ら、2017;Jimenez ら、2018)(表 5)。また、年齢においても 2 歳未満の子犬（n=44）、2 歳以上 9 歳未満の成犬（n=36）、9 歳以上の老犬（n=49）の 3 群に分類した(Panek ら、2020)(表 6)。肥満度はボディコンディションスコア（BCS）に基づき 1～5 の範囲で獣医師が判定した。BCS は 3 が理想体系、理想体型より痩せている場合数字が 1 に近づき、理想体型より太っている場合数字が 5 に近づくことで肥満度を表す(American Animal Hospital Association 2010)。BCS2 は 18 頭、BCS3 は 67 頭、BCS4 は 34 頭、BCS5 は 10 頭であった。

サンプルを採取した犬種は、秋田犬（n=1）、アメリカンコッカースパニエル（n=1）、バセットハウンド（n=2）、ビーグル（n=1）、ボーダーコリー（n=1）、ボルゾイ（n=1）、ボストンテリア（n=1）、キャバリアキングチャールズスパニエル（n=1）、チワワ（n=11）、コーギー（n=4）、ドーベルマン（n=1）、イングリッシュコッカースパニエル（n=3）、フラットコーテッドレトリバー（n=1）、フレンチブルドッグ（n=3）、ゴールデンレトリバー（n=2）、グレートデーン（n=1）、イタリアングレーハウンド（n=2）、ジャックラッセルテリア（n=1）、日本テリア（n=1）、カニヘンダックスフンド（n=1）、紀州犬（n=1）、ラブラドルレトリバー（n=5）、マルチーズ（n=2）、ミニチュアダックスフンド（n=18）、ミニチュアシュナウザー（n=4）、ノーフォークテリア（n=1）、

ポメラニアン (n=3)、シェットランドシープドッグ (n=1)、柴犬 (n=10)、シーズー (n=2)、セントバーナード (n=1)、トイプードル (n=20)、ホワイトシェパード (n=1)、ヨークシャーテリア (n=1)、ミックス (n=17) である。各犬の詳細(犬種、性別、犬種のサイズ、健康な症例か疾患の症例か、手術を行う疾患名または避妊・去勢手術、手術、BCS、体重、年齢)は表 1 に示す。

内臓および皮下脂肪組織は手術中に採取した。手術の主な理由は、健康な症例は避妊・去勢手術、腸管閉塞(避妊手術：76 頭、去勢手術：3 頭、腸管閉塞：2 頭)であった。疾患の症例は、腫瘍が 26 頭(乳腺腫瘍：15 頭、脂肪腫：3 頭、脾臓腫瘍：3 頭、肝臓腫瘍：2 頭、リンパ腫：2 頭、皮膚腫瘍：1 頭)で最も多く、腫瘍以外の疾患は、22 頭(子宮蓄膿症：7 頭、消化器疾患：4 頭、下部尿路疾患：4 頭、ヘルニア：4 頭、結節性過形成：3 頭)であった。脂肪採取に関しては獣医師から飼い主に説明し、同意を得た。動物病院にて採取した脂肪組織は RNAlater の入ったチューブにて RNA 安定化処理を行い、冷凍保存、大学へ送付した。本実験は、麻布大学の動物実験委員会の承認を得ている(承認番号：200109-2)。

2-2 方法

2-2-1 RNA の抽出および cDNA の作成

内臓および皮下脂肪組織は、ISOGEN(ニッポンジーン)を用いてプロトコールに従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度を Quantus™ Fluorometer を用いて Quantus®RNA System 試薬にて測定した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)により cDNA を作製、2.5ng/ul total RNA に相当するように cDNA を滅菌蒸留水で希釈した。

2-2-2 リアルタイム RT-PCR

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix(東洋紡株式会社)および Thermal Cycler

Dice[®] Real Time System TP800(タカラバイオ)を用い、5ngの total RNAに相当する cDNA を鋳型として RT-qPCR を行った。熱変性 98°C 10 秒 55°C、アニリング温度 30 秒、伸長反応 PS-GXL を用いて 72°C 1 分のセットを 35 サイクルの条件で行った。

RT-qPCR に用いたプライマーは当研究室で作成した。プライマーのオリゴヌクレオチド配列を表 2 に記載した。

遺伝子の発現量は、ヒポキサンチンホスホリボジルトランスフェラーゼ 1(Hprt1) の発現量に対して正規化し、全サンプルの平均値を 1 として比較した。

2-3 統計解析

BCS に影響を与える因子を評価するために、SAS ver 9.4(SAS Institute 2001)を用いて多重共線性解析、ステップワイズ法を選択した。p<0.15 で有意差ありと判定した。

遺伝子の発現量の相互関係はピアソンの相関関係で調べ、p<0.05 で有意差ありと判定した。

症例の性別、健康状態、犬種のサイズによる遺伝子発現の比較を SAS ver 9.4(SAS Institute 2001)を用いて分散分析を行った。3種類による比較は、Tucky-Kramer 法を用いて行い、p<0.05 で有意差ありと判定した。

3 結果

Hprt 遺伝子を補正遺伝子として脂肪細胞分化・機能に関わる 23 種類の遺伝子発現量をみたところ、全平均より 20 倍多い発現を示したのは *UCP1* で 2 サンプル、*Ucp3* で 1 サンプルであった。*Ucp1* の発現量が高かった 2 サンプルは共に BCS 3 であり、特別痩せ型ではなかった(図 5)。

23 種類の遺伝子を脂肪細胞分化・機能に関わる遺伝子、アディポカイン、褐色脂肪細胞形成と *Ucp* に関する遺伝子、BMP シグナルに関わる遺伝子の 4 つのカテゴリーに部類し、評価した (図 6)。

BCS を従属変数、遺伝子の相対発現を独立変数とし、統計的に有意な独立変数を検出するためにステップワイズ法を用いて検討した結果、BCS と *Ucp1* の相関が認められなかったが、BCS は年齢、*Leptin*、*Opn3* と正の相関、*Ppar γ* と *Fasn* と負の相関を示した。年齢は *Leptin*、*Ucp2* とは正の相関、*Ppar γ* 、*Fabp4*、*Fasn*、*Hsl*、*Insr*、*Adipoq*、BCS に関する遺伝子の一部と負の相関を示した。遺伝子間の相関は、*Ucp1* と *Ucp3* を除く 21 遺伝子間には正の相関が認められた。第 1 章で *Ucp1* には Exon2 のバリエントがあることがわかったが、第 2 章で測定した *Ucp1* は機能しているバリエント 1 と機能していないと考えられるバリエント 2 が両方含まれているため、追加実験としてバリエント 1 とバリエント 2 の相関を調べた結果、2 検体を除いて相関が認められた(図 11)。

雌雄差について遺伝子発現を比較すると、*Ppar γ* 、*Fasn*、*Adipoq*、*Inh β b* においては雄の方が高く、*Ucp2*、*Ucp3* は雌の方が高かった(図 7)。

次に健康状態による影響を検討した。疾患群 (n=48) のうち、腫瘍が半数以上 (n=26) を占め、主要疾患であった。そこで、まず、健康群と腫瘍群との差を調べた。*Ppar γ* 、*Fasn* の発現量は健康群に比べ腫瘍群で低く、*Leptin*、*Ucp2*、*Ucp3*、*Inh β b* は腫瘍群で高発現していることがわかった。*Adipoq* の発

現は、有意差は認められなかったが腫瘍群で低い傾向にあった ($P = 0.06$) (図 8)。健康な犬と全疾患の犬との比較も同様で、全疾患群では *Ppar γ* 、*Fasn*、*Adipoq* の発現が低く、*Leptin*、*Ucp2* の発現が高くなることが示された (図 9)。犬の体格は、脂肪細胞の分化や機能に関連する遺伝子、BMP シグナル成分の発現量に影響を与えなかったが、*Tnf α* 、*Opn3* は大型犬の方が小型犬より発現量が高かった (図 10)。

4 考察

Hprt 遺伝子を補正遺伝子として 23 種類の遺伝子発現量をみたところ、全平均より 20 倍多い発現を示したのは *Ucp1* で 2 サンプル、*Ucp3* で 1 サンプルであった。*Ucp1* の発現量が高かった 2 サンプルは共に BCS 3 であり、特別痩せ型ではなかった。*Ucp1* の発現量と肥満の発症には負の関係があることがマウスやウシで報告されている (Kontani ら、2005 ; Cypess ら、2009 ; Chen ら、2018)。ウシの脂肪細胞の研究において *Ucp1* を調べた研究によると、腸管膜脂肪の *Ucp1* 発現を比較した結果 1500 倍以上の *Ucp1* を発現するウシは、他のウシに比べ飼料効率が低かったことが報告されている (Chen ら、2018)。このことより、*Ucp1* の発現量が 20 倍程度では効果的な脂肪燃焼には不十分であることが示唆された。どの程度 *Ucp1* が高い値であれば BCS に影響を与えるのかは今後症例数を増やして検討する必要がある。*Ucp3* で高い発現を示した症例は、B 細胞性悪性リンパ腫の症例だった。*Ucp3* は活性酸素の発生を抑制し生体内の酸化ダメージを防ぐことが役割の 1 つである。*Ucp3* ノックアウトマウスの骨格筋ミトコンドリアでは、酸化ストレスによって誘導される活性酸素 (ROS) などの産生物が増加することが明らかになっている (Vidal-Puig ら、2000)。また腫瘍と酸化ストレスの関係も報告されている (Reuter ら、2010) ことから、*Ucp3* の発現増加は B 細胞性悪性リンパ腫の発生に関わる酸化ストレスによるものの可能性が示唆される。

次に BCS と肥満関連遺伝子発現との関連を確認するために重回帰分析を行い、23 種類の遺伝子を脂肪細胞分化・機能に関わる遺伝子、アディポカイン、褐色脂肪細胞形成と *Ucp* に関わる遺伝子、BMP シグナルに関わる遺伝子の 4 つのカテゴリーに部類し、①BCS、年齢と遺伝子の相関②23 遺伝子間の相関に分けて検討した。①BCS と *Ucp1* の相関は認められなかったが、BCS は年齢、

Leptin、*Opn3*と正の相関、*Ppar γ* と*Fasn*と負の相関を示した。年齢は *Leptin*、*Ucp2*とは正の相関、*Ppar γ* 、*Fabp4*、*Fasn*、*Hsl*、*Insr*、*Adipoq*、BCS に関する遺伝子の一部と負の相関を示した。29頭のイヌを対象に行われた先行研究では、年齢と *Leptin* または *Ucp2* の発現量の間には正の相関があること (Motomura ら、2019)、また年齢は *Adipoq* の発現量と負の相関があることが明らかになっており (Ishioka ら、2007年 ; Kawasumi ら、2014年)、今回も同様の結果が得られた。BMP シグナルに関する遺伝子や *Prdm16* は加齢による発現量の低下がこれまでの研究でも明らかになっており (Moerma ら、2004 ; Félix-Soriano ら、2021)、加齢により BMP シグナルに関する遺伝子である *Bmp4* は増加し、*Alk6* は減少したと報告されている (Moerman ら、2004)。また BMP シグナルは褐色・ベージュ脂肪細胞分化を促進し (Tseng ら、2008)、褐色・ベージュ脂肪細胞への分化誘導には *Prdm16* が必要であることも報告されている (Seale ら、2011)。加齢に伴う褐色脂肪細胞の活性低下は BMP シグナル活性の低下と *Prdm16* の発現低下に起因するものと考えられ、その結果加齢に伴い BCS が増加するものと考えられる。今回 BCS は *Ppar γ* 、*Fasn* と負の相関が認められた。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、ヒト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 (Jernås ら、2006 ; Kubota ら、1999)。そして、その肥大化した脂肪細胞はより多くの *Leptin* を発現していることも報告されている (Jernås ら、2006 ; Kubota ら、1999)。今回イヌの加齢に伴う BCS の増加は、脂肪細胞の肥大化が起こっており、そのため *Leptin* が増加したと考えられる。また、*Ppar γ* と *Fasn* の減少は脂肪細胞の肥大化に対する防御反応であることが示唆される。

②遺伝子間の相関は、*Ucp1* と *Ucp3* を除く 21 遺伝子間に正の相関が認められた。先行研究でも BMP シグナルの受容体である *ActR II B* と *Alk2*、*Bmpr2* と

Alk3、*ActR2B*と*Prdm16*、*Alk2*と*Prdm16*は正の相関が認められた(Motomuraら、2019)。今回も同様にこれらの遺伝子には正の相関が認められた。

今回の脂肪採取では避妊手術によるものが多かったが、腫瘍などの疾患による開腹時に採取した脂肪も含まれていたため性別や疾患別などイヌのプロファイル別に遺伝子の発現量を比較した。雌雄差について遺伝子発現を比較すると、*Ppar γ* 、*Fasn*、*Adipoq*、*Inh β b*においては雄の方が高く、*Ucp2*、*Ucp3*は雌の方が高かった。*Ucp1*、*Ucp2*、*Ucp3*においてはラットにおいて性ホルモンであるエストロゲンとの関連が報告されている(Dalgaardら、2001)。しかし、これらの遺伝子発現を網羅的に解析したヒトの研究では性差を示さなかったことから(Andresonら、2020)、雌雄差による遺伝子発現には種差があるのかもしれない。

次に健康状態による影響を検討した。疾患群(n=48)のうち、腫瘍が半数以上(n=26)を占め、主要疾患であった。そこで、まず健康群と腫瘍群との差を調べた。*Ppar γ* 、*Fasn*の発現量は健康群に比べ腫瘍群で低く、*Leptin*、*Ucp2*、*Ucp3*、*Inh β b*は腫瘍群で高発現していることがわかった。*Adipoq*の発現は腫瘍群で低い傾向にあった。健康な犬と全疾患の犬との比較も同様で、全疾患群では*Ppar γ* 、*Fasn*、*Adipoq*の発現が低く、*Leptin*、*Ucp2*の発現が高くなることが示された。*Inh β b*の発現は、腫瘍を有する犬では発現が上昇することが示唆された。*Inh β b*についてはまだ不明な点が多く、脂肪細胞との関連も含め生理機能の解明が今後の検討課題である。近年、腫瘍と肥満、アディポサイトカインの関係は注目されている。特にレプチンは、腫瘍の成長を刺激するシグナルになることもわかっている(Angelicciら、2020)。肥満と腫瘍の関係はとても興味深く、寿命も伸び腫瘍も増えているイヌにおいても注目していきたい。

また成犬の犬種の大きさの違いによる比較では、脂肪細胞の分化や機能に関連する遺伝子、BMP シグナル成分の発現量に影響を与えなかったが、*Tnf α* 、*Opn3*は大型犬の方が小型犬より発現量が高かった。*Opn3*は目以外の様々な組織に存在しており脂肪組織にも存在することがわかっている (Sato, 2020)。*Opn3*ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、高脂肪食飼育下で易肥満性を示し、インスリン抵抗性を生じること、さらにエピネフリン刺激による熱産生脳が低下していることが報告されている (Sato, 2020)。ヒトでは光照射により脂肪を溶解する光痩身という施術が行われ効果があることから、*Opn3*を介した光刺激が脂肪組織の代謝制御機構に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。今回 *Opn3*はBCSとも正の相関を示しており、大型犬の方が肥満の制御に *Opn3*が影響を与える可能性が大きいかもしれないことが示唆された。

ヒトの肥満に関する遺伝子の包括的解析はゲノムワイド研究 (Loos と Yeo, 2022) によって肥満に関連する遺伝子報告されており、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 (Yoganathan ら, 2012)。今後イヌにおいても大規模なゲノムワイド関連解析を行い、その結果得られた肥満関連遺伝子と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。

今回はBCSと *Ucp1*との明確な関連は認められなかった。しかしBCSと *Leptin*など一部の遺伝子とは関連があることや、調べた多くの遺伝子の間には正の相関が認められ、性別や健康群、疾患群、腫瘍群、成犬の体格により差が認められる遺伝子もあり、これらはイヌの肥満の予防や解消、治療に向けた候補遺伝子の同定のための基礎情報になると考えている。

第2章の内容は以下に公表した。

Sugiyama Y, Shimokawa F, Sugiyama K, Kobayashi T, Yamashita Y, Kazama K, Funaba M, Murakami M (2022) Relationships between the expression of adipose genes and profiles of hospitalized dogs. *Vet Res Commun* 46:1239–1244.

総括

医療において肥満は深刻な問題である。肥満は糖尿病や循環器疾患などの疾患を引き起こすとされており、近年では腫瘍との関連も報告されている。肥満とは脂肪細胞の過形成と肥大化を特徴としており、脂肪細胞には白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の3種類の脂肪細胞がある。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、ベージュ・褐色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。この熱産生には *Ucp1* が関与しており、ヒトでは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。しかしイヌの肥満解消法は食事のコントロールと運動に頼ることが一般的である。そこで今回、イヌの脂肪組織に注目し、*Ucp1* をはじめとする肥満関連遺伝子について調べ、肥満と健康状態の関連について明らかにすることとした。

第1章では、脂肪細胞の中でエネルギーを熱として産生する褐色・ベージュ脂肪細胞が持つ *Ucp1* について調べた。5種類の動物種における白色脂肪組織の *Ucp1* 遺伝子発現について調べた結果、イヌは白色脂肪組織における *Ucp1* の発現量が他の動物種よりも高いことがわかった。また、イヌの各組織における *Ucp1* の発現について調べた結果、微量だが脂肪組織だけではなく心臓や脳など多くの組織で *Ucp1* が発現していること、*Ucp1* には Exon2 を欠失したバリエーションがあることがわかった。これらのことよりイヌの *Ucp1* はマウスやラットなどとは異なる特徴を持っており、*Ucp1* の制御が褐色・ベージュ脂肪細胞に影響を与えることが考えられた。

第2章では動物病院にて開腹を行うイヌの皮下または内臓の脂肪組織を採取し、肥満や脂肪細胞に関連する合計23遺伝子の発現量を調べ検討した。その結果、BCSと *Ucp1* を始め褐色脂肪細胞との関連は認められなかった。しかし

BCS は年齢と共に増加し、*Leptin* や *Opn3* とは正の相関、*Ppar γ* や *Fasn* とは負の相関があることがわかった。このことは、脂肪細胞の肥大化により *Leptin* の発現量の増加したこと、また *Ppar γ* と *Fasn* の発現量減少は、脂肪細胞の肥大化に対する防御反応であると推察された。今回は避妊手術だけではなく腫瘍などの疾患のために開腹した症例からも脂肪を採取したため性別や疾患などのプロファイルに応じて遺伝子発現量を比較した。性別や疾患による遺伝子発現量の変化をみたところ差が認められた。特に腫瘍と肥満の関連はヒトにおいて研究が進んでおり、大腸癌や乳癌は肥満関連癌と呼ばれ、*Leptin* や *Adipoq* などが腫瘍の進行に関連していることも報告されている。高齢化が進み腫瘍も増えているイヌにおいても腫瘍と肥満の関係は今後検討すべき課題であると考えられる。また、雌雄差や犬種の大きさにおいても遺伝子発現量に差が認められた。

本研究はイヌの *Ucp1* 発現、様々な背景を持つイヌの脂肪組織における肥満関連遺伝子について検討した結果、イヌの *Ucp1* は Exon2 欠失バリエントがあること、*Ucp1* 遺伝子はイヌの白色脂肪組織にも発現していることから、イヌの *Ucp1* は他の動物とは異なる特徴を持っており、このことは褐色・ベージュ脂肪細胞の制御に影響を与える可能性があることがわかった。しかし *Ucp1* と BCS の関連は認められず、*Ucp1* だけで肥満解消を期待することは難しいことが示唆された。一方、*Leptin* など多くの肥満関連遺伝子がイヌの肥満や疾患と関連していること、*Ucp1*、*Ucp3* を除く 21 遺伝子間では正の相関が認められたことから、本研究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と考える。

General overview

Canine obesity has been increasing in recent years and is an inducer of various diseases such as arthritis and diabetes. Moderate exercise and dietary restriction can eliminate obesity, but its management is difficult. In humans, activation of brown fat cells has attracted attention as a new method of obesity reduction, and deconjugated protein (*Ucp*) 1 has been reported to hold the key, but not many studies have been conducted in dogs.

The expression of *UCPI* in adipose tissues of various animal species showed high expression in dogs. Furthermore, the expression of *UCPI* in RNA from various canine tissues revealed that *UCPI* is expressed in trace amounts in tissues other than adipose tissue, such as brain and heart, and that there is an exon2 variant of *UCPI*.

Adipose tissue was collected during surgery at a veterinary clinic, and the expression of obesity-related genes in fat cells of a total of 129 dogs was examined. We found that the body condition score (BCS), a measure of obesity, was not a reliable multiple regression equation when used as the objective variable; positive correlations were found between the expression levels of most genes except *Ucp1* and *3*. BCS increased with age and was negatively correlated with the expression levels of *Ppar* γ and *Fasn* and with the expression levels of *Leptin* and *Opn3* showed a positive correlation. Differences in expression were also observed between sexes and between healthy and diseased groups.

These findings suggest that canine *UCPI* may differ from other animal species, and that gene expression in canine adipose tissue in relation to BCS, age, and tumor may provide a basis for elucidating the etiology of canine obesity. We believe that the gene expression in canine adipose tissue in relation to BCS, age, and tumor will provide basic knowledge for the elucidation of the etiology of canine obesity.

謝辞

本研究を行うにあたり、及び本論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なる指導とご鞭撻を受け賜りました麻布大学分子生物学研究室 村上賢教授に深く感謝の意を表します。

また本研究を行うにあたり、多大なご協力をいただいた麻布大学分子生物学研究室 下河史枝様、皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に検体採取にご協力いただいた あおい動物病院 山下祐輔先生、こばやし動物病院 小林孝先生、杉山獣医科 スタッフの皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- Angelucci A, Clemmanti L, Alesse E (2020) Leptin in Tumor Microenvironment. *Adv Epo Med Biol* 1259:89-112
- Chen HJ, Ihara T, Yoshioka H, Itoyama E, Kitamura S, Nagase H, Murakami H, Hoshino Y, Murakami M, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M (2018) Expression levels of brown/beige adipocyte-related genes in fat depots of vitamin A-restricted fattening cattle. *J Anim Sci* 96:3884-3896.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509-1517
- Daorong H, Heling F, Yuan Z, Dan L, Yuanwu M, Yuan Y, Lianfeng Z, Dan B (2022) Uncoupling protein 1 Knockout aggravates isoproterenol-induced acute myocardial ischemia via AMPK/mTOR/PPAR γ pathway in rats. *Transgenic Res* 31:107-118
- Dalgaard LT, Pedersen O (2001) Uncoupling proteins : functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia* 44:946-965
- Diao Z, Murakami M, Sato R, Shimokawa F, Matsumura M, Hashimoto O, Onda K, Shirai M, Matsui T, Funaba M (2022) Identification and expression of bovine Ucp1 variants. *Mol cell Biol* 1867:159111
- Dumas J, Brisson L (2021) Interaction between adipose tissue and cancer cells : role of for cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 40(1):31-46
- Echtay S K (2007) Mitochondrial uncoupling proteins-what is their physiological role?. *Free Radic Bio Med* 43(10):1351-1371
- Félix-Soriano E, Sáinz N, Gil-Iturbe E, Collantes M, Fernández-Galilea M, Castilla-Madrigal R, Ly L, Dalli J, Moreno-Aliaga MJ (2021) Changes in brown adipose tissue lipid mediator signatures with aging, obesity, and DHA supplementation in female mice. *FASEB J* 35:e21592.

- Harms M, Seale P (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 19:1252-1263.
- Ishioka K, Hosoya K, Kitagawa H, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M (2007) Plasma leptin concentration in dogs : effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res Vet Sci* 82:11-15
- Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, Levin M, Sjögren A, Rudemo M, Lystig TC, Carlsson B, Carlsson LM, Lönn M (2006) Separation of human adipocytes by size : hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J* 20:1540-154
- Jimenez AG, Winward J, Beattie U, Cipolli W (2018) Cellular metabolism and oxidative stress as a possible determinant for longevity in small breed and large breed dogs. *PLoS One* 13:e0195832
- Kajimura S, Saito M (2014) A new era in brown adipose tissue biology : molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu Rev Physiol* 76:225-249
- Kawasumi K, Kashiwado N, Okada Y, Sawamura M, Sasaki Y, Iwazaki E, More N, Yamamoto I, Arai T (2014) Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs. *BMC Vet Res* 10:57
- Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N, Yamashita H (2005) UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4:147-155.
- Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Net Rev Cell Bio* 6(3):248-261
- Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T (1999) PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*

4:597-609.

Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO (2009) Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* 53:1925-1932

Loos RJJ, Yeo GSH (2022) The genetics of obesity : from discovery to biology. *Net Rev Genet* 23:120-133

Megan S (2021) Canine and feline obesity. *Management Vet Clin Small Anim* 51:653-667

Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zador G, Inazaka F, Grisanzio C, Palescandolo E, Shin E, Fiore C, Xie W, Kung AL, Febbo PG, Subramanian A, Mucci L, Ma J, Signoretti S, Stampfer M, Hahn WC, Finn S, Loda M (2009) Fatty acid synthase : a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 101(7):519-532

Moerman E J, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B (2004) Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrowstroma/stem cells : the role of PPAR- γ 2 transcription factor and TGF- β /BMP signaling pathway. *Aging Cell* 3:379-389

Motomura M, Shimokawa F, Kobayashi T, Yamashita Y, Mizoguchi I, Sato Y, Murakami Y, Shimizu I, Matsui T, Murakami M, Funaba M (2019) Relationships between expression levels of genes related to adipogenesis and adipocyte function in dogs. *Mol Biol Rep* 46:4771-4777.

Okamatsu-Ogura Y, Saito M (2021) Brown fat as a regulator of systemic metabolism beyond thermogenesis. *Diabetes Metab J* 45:840-852.

Omachi A, Matsushita Y, Kimura K, Saito M (2008) Role of uncoupling protein 1 in the anti-obesity effect of β 3-adrenergic agonist in the dog. *Res. Vet. Sci* 85:214-219

Pederson B S, Bruun M J, Kristensen K, Richelsen B (2001) Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *BBRC* 288:191-197

- Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY, Huang HY, Xue RD, Yu HY, Guo L, Gao HD, Liu Y, Sun X, Li YM, Jia WP, Tang QQ (2013) BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E798-E807.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer : how are they linked?. *Free Radic Biol Med* 49:1603-1616
- Ricci R, Bevilacqua F (2012) The potential role of leptin and adiponectin in obesity : a comparative review. *Vet J* 191:292-298
- SAS Institute (2001) SAS User' s Guide: Statistics, Ver. 9.2. SAS Institute
- Sasaki N, Uchida E, Niiyama M (1998) Anti-obesity effects of selective agonists to the 3-adrenergic receptor in dogs. II. Recruitment of thermogenic brown adipocytes and reduction of adiposity after chronic treatment with a 3 - adrenergic agonist. *J Vet Med Sci* 60:465-469
- Sato M, Tsuji T, Yang K, Ren X, Dreyfuss JM, Huang TL, Wang CH, Shamsi F, Leiria LO, Lynes MD, Yau KW, Tseng YH (2020) Cell-autonomous light sensitivity via Opsin3 regulates fuel utilization in brown adipocytes. *PLoS Biol* 18:e3000630
- Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121:96-105.
- Shigemizu D, Asanomi Y, Akiyama A, Mitsumori R, Niida S, Ozaki K (2022) Whole-genome sequencing reveals novel ethnicity-specific rare variants associated with Alzheimer' s disease. *J Mol Psychiatry* 27:2554-2562
- Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR (2008) New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454:1000-1004.

Van der Klaauw AA, Farooqi IS (2015) The hunger genes: pathway to obesity. *Cell* 161:119-132

Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275:16258-16266.

Yoganathan P, Karunakaran S, Ho MM, Clee SM (2012) Nutritional regulation of genome-wide association obesity genes in a tissue-dependent manner. *Nutr Metab (Lond)* 9:65.

Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Zhu M, Rodgers BD, Jiang Q, Dodson MV, Du M (2015) Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. *Int J Obes* 39:967-976

図および表

図 1 5種類の動物における白色脂肪組織の *Ucp1* 発現の比較

図 2 イヌの各臓器における *Ucp1* 発現の比較

図 3 *Ucp1* 遺伝子の塩基配列

図 4 *UcpI* 遺伝子の推定アミノ酸配列

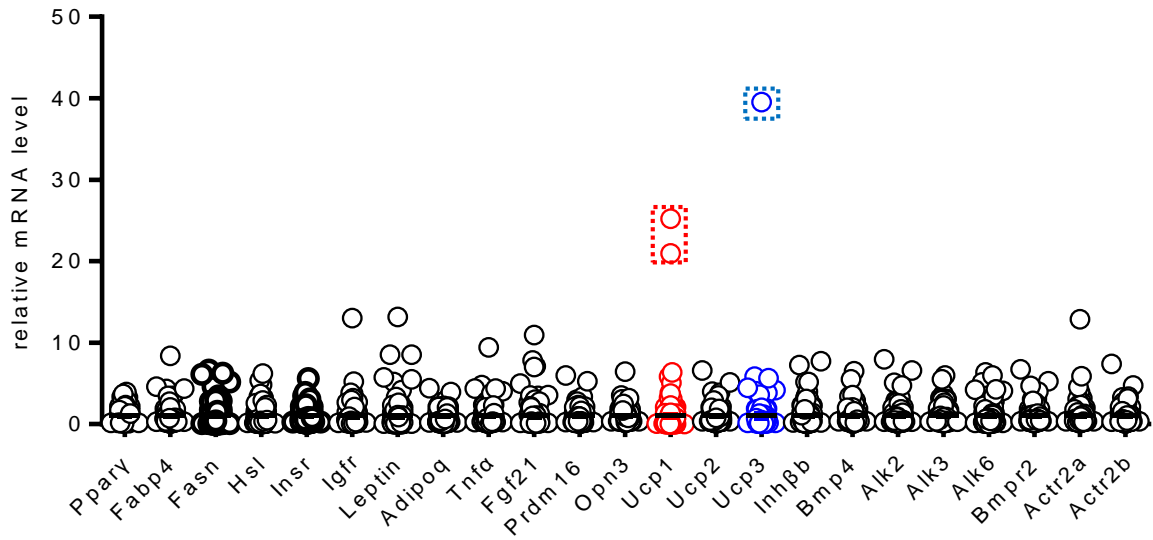


図5 全サンプルの相対的な遺伝子発現量

採取したイヌの脂肪組織における遺伝子発現量を比較した。

各サンプルの遺伝子発現量を丸で示し、平均発現量より20倍以上の発現量が認められたサンプルは点線の四角で囲んでいる。20倍以上の発現が認められたサンプルは *Ucp1*、*Ucp3* で認められ、*Ucp1* は赤、*Ucp3* は青で示している。

	adipocyte differentiation and function										adipokine										brown adipogenesis and Ucp										signal components for the BMP pathway									
	Age	BCS	Ppary	Fabp4	Fasn	Hsl	Insr	Igf1r	Leptin	Adipoq	Tnfa	Fgf21	Pdfrm16	Opm3	Ucp1	Ucp2	Ucp3	Inh1b	Bmp4	Alk2	Alk3	Alk6	Bmpr2	Actr2a	Actr2b															
Age	1	0.223 0.0111	-0.562 -0.0001	-0.146 0.0642	-0.408 -0.0001	-0.206 0.0084	-0.247 0.0016	-0.116 0.1414	0.1542 0.0501	-0.352 -0.0001	-0.01 0.9021	-0.074 0.3515	-0.203 0.0095	0.048 0.544	-0.082 0.3005	0.255 0.0011	-0.046 0.5625	-0.106 0.1812	-0.174 0.0265	-0.119 0.1316	-0.173 0.028	-0.128 0.1046	-0.086 0.2742	-0.164 0.0365	-0.202 0.0098															
BCS		1	-0.163 0.0376	-0.028 0.7218	0.0604 0.6575	0.7982 0.8047	-0.02 0.7439	-0.013 0.8713	-0.036 0.6518	0.3072 0.0001	0.0259 0.8047	-0.013 0.8713	-0.036 0.6518	0.002 0.98	0.1619 0.0395	-0.072 0.1027	0.1271 0.7301	-0.027 0.0559	-0.089 0.2868	0.2399 0.0842	0.2664 0.0864	0.3675 0.0964	0.2458 0.075	0.1403 0.1915	0.403 0.1833	0.292 0.3292														
Ppary			1	0.4682	0.6671	0.5106	0.5365	0.0474	0.6987	-0.056	-0.031	0.4122	-0.036	0.6533	0.0023	0.1675	0.2584	0.0708	0.0021	0.2222	0.0016	0.075	0.1915	0.403	0.1833	0.292														
Fabp4				1	0.4682	0.6671	0.5106	0.5365	0.0474	0.6987	-0.056	-0.031	0.4122	-0.036	0.6533	0.0023	0.1675	0.2584	0.0708	0.0021	0.2222	0.0016	0.075	0.1915	0.403	0.1833														
Fasn					1	0.6977	0.5956	0.1516	0.4544	0.6671	0.5106	0.5365	0.0474	0.6987	-0.056	-0.031	0.4122	-0.036	0.6533	0.0023	0.1675	0.2584	0.0708	0.0021	0.2222	0.0016														
Hsl						1	0.8739	0.3303	0.6688	0.7563	0.1981	0.1409	0.4979	0.3095	0.2472	0.2368	0.0186	0.0051	0.3179	0.7354	0.7864	0.4812	0.7206	0.38	0.347	0.269														
Insr							1	0.4388	0.6737	0.8097	0.3323	0.2822	0.6615	0.3035	0.1137	0.3336	0.1054	0.6109	0.4334	0.7941	0.8455	0.5823	0.8276	0.5016	0.4991															
Igf1r								1	0.2403	0.2784	0.6565	0.5915	0.596	0.2225	0.1006	0.3013	0.1205	0.3852	0.4033	0.7161	0.611	0.7761	0.712	0.8191	0.6661															
Leptin									1	0.4544	0.2221	0.1292	0.3385	0.5156	-0.013	0.3535	0.0483	0.4338	0.2755	0.6476	0.4023	0.7069	0.2733	0.2473	0.7069															
Adipoq										1	0.0885	0.0871	0.532	0.211	0.1546	0.0892	-0.032	0.3381	0.3196	0.5987	0.6865	0.4757	0.6191	0.2642	0.2831															
Tnfa											1	0.8831	0.5541	0.2351	0.0477	0.3443	0.197	0.2956	0.3241	0.5666	0.529	0.5901	0.6177	0.715	0.8217															
Fgf21												1	0.54	0.1765	0.0368	0.2069	0.2315	0.302	0.2571	0.4447	0.4299	0.5503	0.4957	0.6063	0.8657															
Pdfrm16													1	0.0486	0.2051	0.269	0.106	0.3635	0.3894	0.6913	0.6541	0.4914	0.6928	0.6754	0.6674															
Opm3														1	-0.063	0.1519	0.0282	0.3327	0.3142	0.3821	0.2728	0.3049	0.3776	0.127	0.2364															
Ucp1															1	0.0771	-0.015	0.1014	0.0045	0.1682	0.1773	0.019	0.1414	0.1482	0.0821															
Ucp2																1	0.0707	0.2177	0.2006	0.4536	0.3899	0.2062	0.4797	0.3579	0.2289															
Ucp3																	1	0.1836	0.0263	0.1241	0.108	0.1043	0.1256	0.144	0.3455															
Inh1b																		1	0.0193	0.7402	0.1155	0.1715	0.1865	0.1113	0.0675	<0.001														
Bmp4																			1	0.483	0.4934	0.3318	0.4856	0.4244	0.4708															
Alk2																				1	0.9176	0.7059	0.9667	0.7762	0.6418															
Alk3																					1	0.7086	0.945	0.7159	0.6077															
Alk6																						1	0.7501	0.6687	0.5565															
Bmpr2																							1	0.7689	0.6564															
Actr2a																								1	0.7367															
Actr2b																									1															

図6 イヌの脂肪組織における各遺伝子の発現量の関係性

23 遺伝子の発現量を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、褐色脂肪細胞形成と *UCP* に関わる遺伝子、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、評価した。

正の相関は赤色 ($0.05 \leq p < 0.10$ 、 $p < 0.05$)、負の相関は緑色 ($0.05 \leq p < 0.10$ 、 $p < 0.05$)、相関が認められなかった場合は黒色で示している。

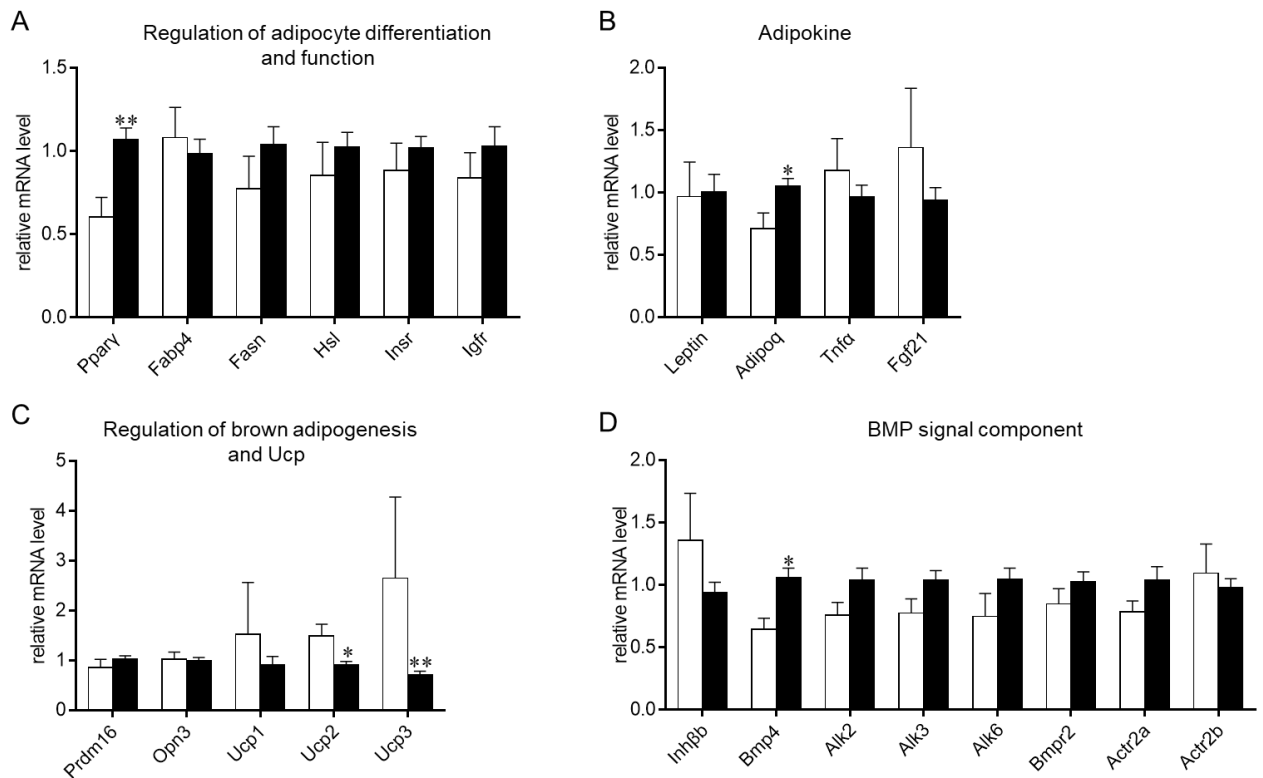


図7 イヌ脂肪組織における遺伝子発現量の性別による比較

イヌの脂肪組織における遺伝子発現量を性別で比較した結果を示している。*Pparγ*、*Adipoq*、*Bmp4*はオスの方が高く、*Ucp2*、*Ucp3*はメスの方が増加していた。

白がメス(110頭)、黒がオス(19頭)を示している。

A:脂肪細胞分化・機能に関わる遺伝子、B:アディポカイン、C:褐色脂肪細胞形成と *UCP*に関わる遺伝子、D:BMPシグナルに関わる遺伝子

*: $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

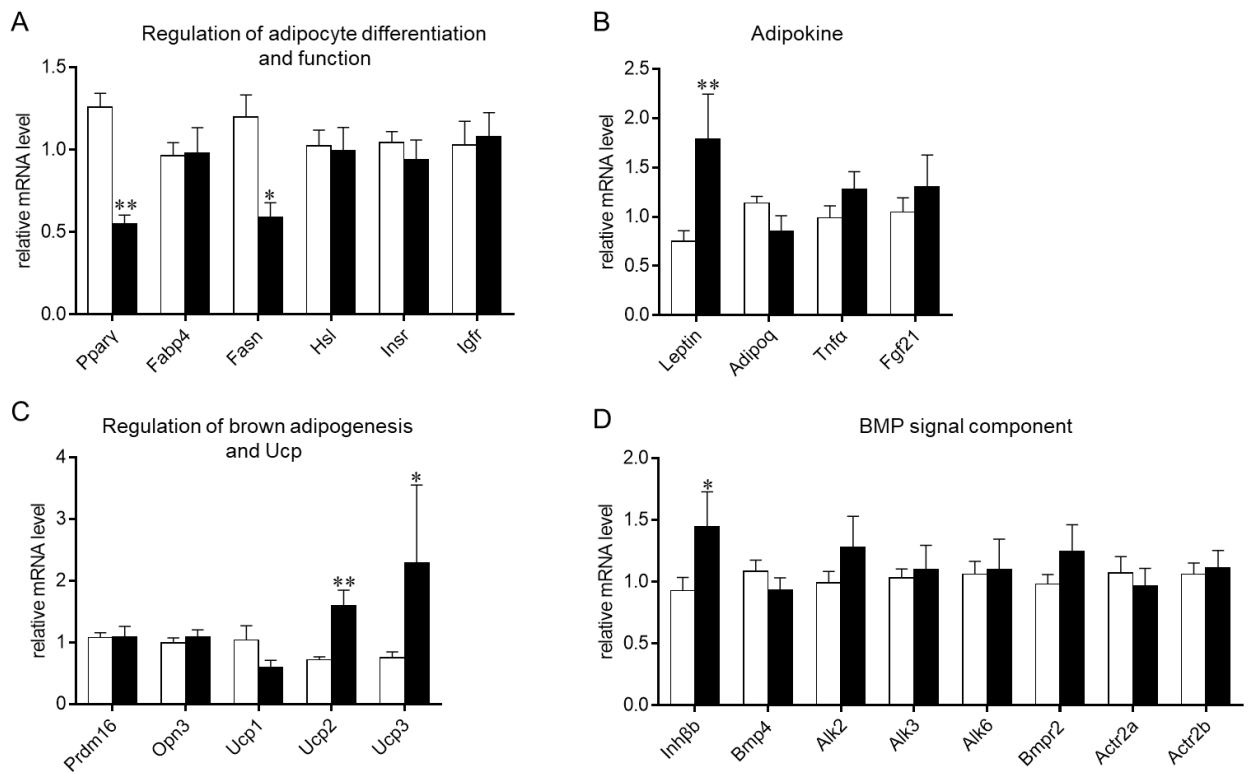


図 8 イヌの脂肪組織における遺伝子発現量の健康群と腫瘍群の比較

イヌの脂肪組織における健康群と腫瘍群の遺伝子発現量を比較した。*Pparγ*、脂肪酸は腫瘍群で低く、*Leptin*、*Ucp2*、*Ucp3*、*Inhβb*の発現量は腫瘍群の方が増加していた。

白が健康群(103頭)、黒が腫瘍群(26頭)を示している。

A:脂肪細胞分化・機能に関わる遺伝子、B:アディポカイン、C:褐色脂肪細胞形成と *UCP*に関わる遺伝子、D:BMP シグナルに関わる遺伝子

*: $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

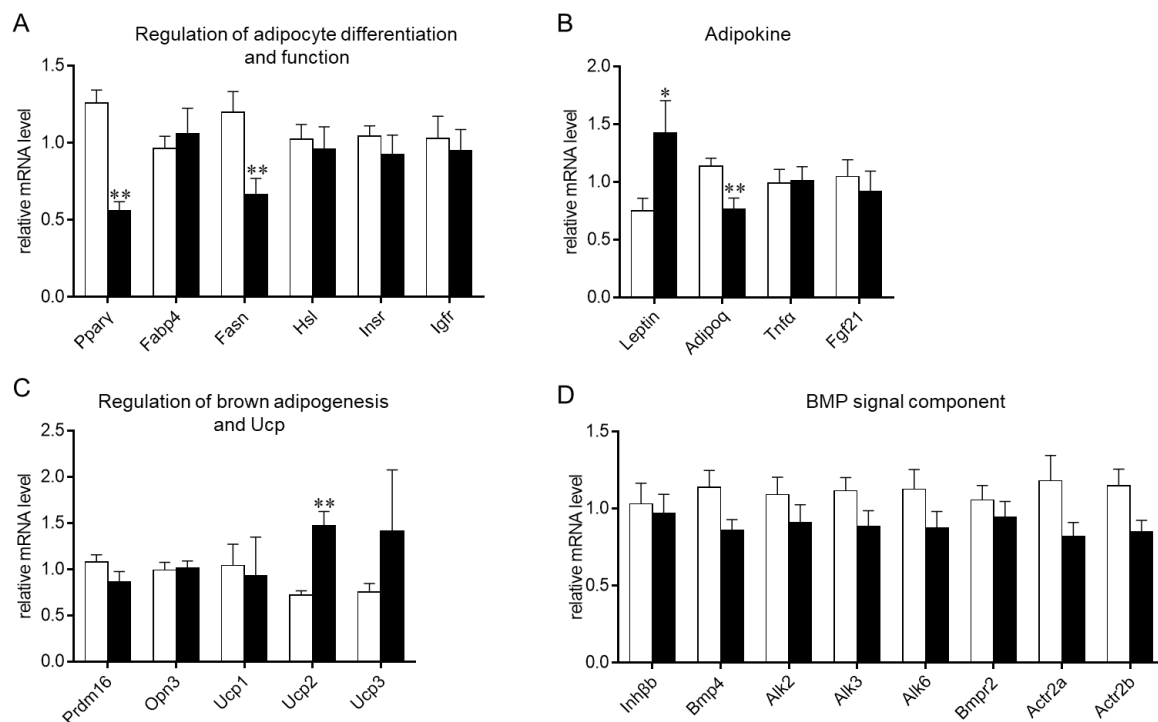


図9 イヌ脂肪組織における遺伝子発現量の健康群と疾患群の比較

イヌの脂肪組織における健康群と疾患群の遺伝子発現量を比較した。白が健康群(81頭)、黒が疾患群(48頭)を示している。

Pparγ、*Fasn*、*Adipoq*の発現量が疾患群で低く、*Leptin*、*Ucp2*の発現量は疾患群で増加していた。

A:脂肪細胞分化・機能に関わる遺伝子、B:アディポカイン、C:褐色脂肪細胞形成とUCPに関わる遺伝子、D:BMPシグナルに関わる遺伝子

*: p<0.05

** : p<0.01

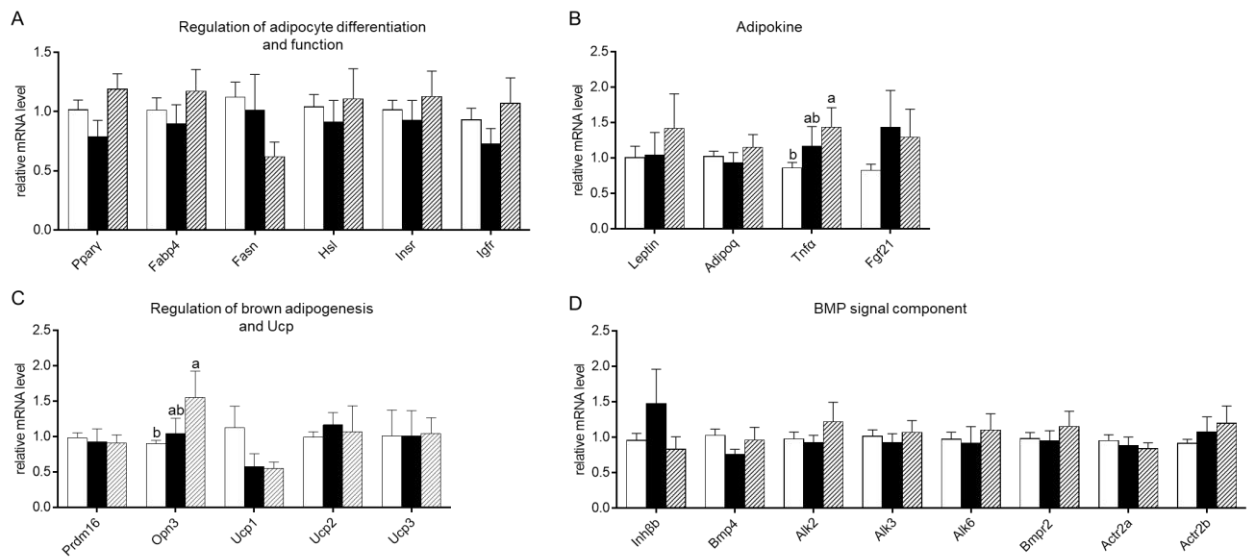


図 10 イヌの脂肪組織における遺伝子発現量の体格による比較

イヌの脂肪組織における遺伝子発現量を小型、中型、大型の3種類の体格に分け比較した。白が小型(89頭)、黒が中型(14頭)、波線が大型(13頭)を示している。

大型犬になる程 *Tnf α* 、*Opn3*の発現量が増加していた。

A:脂肪細胞分化・機能に関わる遺伝子、B:アディポカイン、C:褐色脂肪細胞形成と *UCP*に関わる遺伝子、D:BMPシグナルに関わる遺伝子

a、b: 共通の文字における有意差はなかったことを表す。(p<0.05)

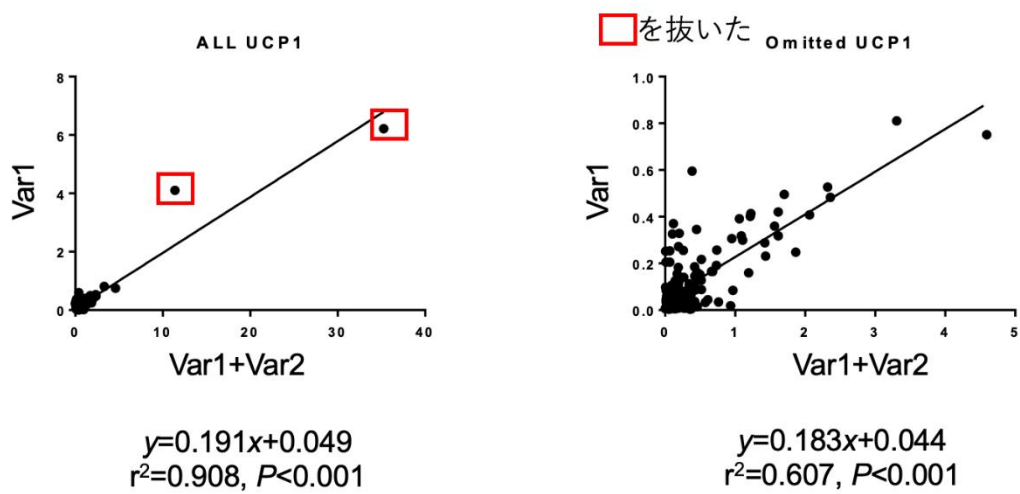


図 11 *Ucp1* 遺伝子のバリエント 1 とバリエント 2 の相関

Ucp1 遺伝子のバリエント 1 とバリエント 2 は 2 検体を除いて相関していた。

表 1 使用した 129 頭の症例情報

No	Breed	Sex	Size	Reason Category of disease	Reason	Age (yr ¹)	BW ² (kg)	BCS
1	Akita	Male	Large	Healthy	Intestinal obstruction by accidental ingestion	2.3	33.9	3
2	American Cocker Spa	Female	Small	Disease Tumor	Mammary grand tumor	10.8	12.6	5
3	Basset Hound	Female	Medium	Healthy	Spaying	0.7	19.1	4
4	Basset Hound	Female	Medium	Disease Female genital disea	Pyometra	9.3	23.0	4
5	Beagle	Female	Medium	Disease Tumor	Mammary grand tumor	11.7	7.4	3
6	Border Collie	Male	Medium	Disease Tumor	Liver tumor	9.5	19.7	4
7	Borzoi	Female	Large	Healthy	Spaying	0.8	30.5	3
8	Boston Terrier	Female	Small	Healthy	Spaying	2.0	9.0	3
9	Cavalier King Charles Spaniel	Female	Small	Healthy	Intestinal obstruction by accidental ingestion	3.8	9.6	4
10	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	4.0	1.8	3
11	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	0.9	1.6	3
12	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	1.2	2.3	3
13	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	0.5	1.7	2
14	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	1.9	1.9	2
15	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	6.9	5.0	5
16	Chihuahua	Female	Small	Healthy	Spaying	10.8	1.7	2
17	Chihuahua	Female	Small	Disease Female genital disease	Pyometra	10.4	4.2	4
18	Chihuahua	Female	Small	Disease Tumor	Liver tumor	8.6	5.3	5
19	Chihuahua	Female	Small	Disease Hernia	Ventral hernia	5.2	4.0	4
20	Chihuahua	Female	Small	Disease Lower urinary tract disease	Bladder stones	9.8	3.0	3
21	Corgi	Female	Medium	Healthy	Spaying	0.9	12.1	4
22	Corgi	Female	Medium	Disease Tumor	Skin mass	11.8	20.0	5
23	Corgi	Female	Small	Healthy	Spaying	0.6	10.0	3
24	Corgi	Male	Medium	Disease Tumor	Lipoma	15.3	16.6	4
25	Doberman	Female	Large	Disease Tumor	Splenic tumor	8.6	35.0	2
26	English Cocker Spaniel	Female	Medium	Healthy	Spaying	0.6	8.9	3
27	English Cocker Spaniel	Female	Medium	Healthy	Spaying	1.3	9.0	3
28	English Cocker Spaniel	Female	Medium	Disease Tumor	Mammary grand tumor	10.8	15.0	5
29	Flat Coated Retriever	Female	Large	Healthy	Spaying	2.6	29.0	4
30	French Bulldog	Female	Medium	Healthy	Spaying	0.6	5.3	3
31	French Bulldog	Female	Medium	Healthy	Spaying	0.8	6.6	3
32	French Bulldog	Female	Medium	Disease Digestive system disease	Gastric incision by accidental ingestion	2.7	9.5	3
33	Golden Retriever	Female	Large	Disease Tumor	Splenic angiosarcoma	6.3	23.0	3
34	Golden Retriever	Male	Large	Healthy	Castration	8.4	32.5	4
35	Great Dane	Female	Large	Healthy	Spaying	3.4	43.3	2
36	Italian Greyhound	Female	Small	Healthy	Spaying	3.3	5.2	3
37	Italian Greyhound	Female	Small	Healthy	Spaying	0.8	3.3	2
38	Jack Russell Terrier	Female	Small	Healthy	Spaying	4.1	6.2	4
39	Jack Russell Terrier	Female	Small	Healthy	Spaying	9.0	8.2	4
40	Jack Russell Terrier	Female	Small	Disease Tumor	Lymphocytic plasmacytic enteritis	13.0	5.6	3
41	Japanese Terrier	Female	Small	Healthy	Spaying	5.9	3.9	3
42	Kanin Hendax	Female	Small	Healthy	Spaying	4.3	2.6	3
43	Kishu	Female	Medium	Healthy	Spaying	11.1	20.0	3
44	Labrador Retriever	Female	Large	Healthy	Spaying	3.3	34.0	4
45	Labrador Retriever	Female	Large	Healthy	Spaying	1.4	30.0	5
46	Labrador Retriever	Female	Large	Healthy	Spaying	8.2	31.5	5
47	Labrador Retriever	Female	Large	Disease Tumor	Mammary grand tumor	11.1	20.3	4
48	Labrador Retriever	Male	Large	Healthy	Castration	0.5	17.7	3
49	Maltese	Female	Small	Disease Tumor	Mammary grand tumor	10.7	3.4	3
50	Maltese	Male	Small	Disease Digestive system disease	Gastric atony	10.3	3.5	3
51	Miniature Dachshund	Female	Small	Healthy	Spaying	1.0	3.5	3
52	Miniature Dachshund	Female	Small	Healthy	Spaying	5.4	6.6	4
53	Miniature Dachshund	Female	Small	Healthy	Spaying	0.7	4.4	3
54	Miniature Dachshund	Female	Small	Healthy	Spaying	0.7	4.7	4
55	Miniature Dachshund	Female	Small	Healthy	Spaying	14.0	3.2	2
56	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Hernia	Ventral hernia	15.6	3.6	3
57	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Tumor	Mammary grand tumor	10.8	4.7	3
58	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Tumor	Mammary grand tumor	14.4	4.5	3
59	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Tumor	Lipoma	11.0	7.0	5
60	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Female genital disease	Pyometra	9.5	5.0	3
61	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Hyperplasia	Splenic nodular hyperplasia	15.6	4.0	2
62	Miniature Dachshund	Female	Small	Disease Tumor	Mammary grand tumor	15.4	7.7	4

63	Miniature Dachshund	Male	Small	Disease	Digestive system disease	Gastric twist	12.3	6.6	3
64	Miniature Dachshund	Male	Small	Disease	Digestive system disease	Gallbladder mucocele	14.2	6.5	3
65	Miniature Dachshund	Male	Small	Disease	Hyperplasia	Splenic nodular hyperplasia	14.9	6.2	4
66	Miniature Dachshund	Male	Small	Disease	Hernia	Cervical disc hernia	9.2	5.6	4
67	Miniature Dachshund	Male	Small	Disease	Tumor	Lipoma	12.9	7.4	4
68	Miniature Dachshund	Male	Small	Disease	Hyperplasia	Splenic nodular hyperplasia	15.0	7.8	5
69	Miniature Schnauzer	Female	Small	Healthy		Spaying	1.3	4.0	3
70	Miniature Schnauzer	Female	Small	Healthy		Spaying	7.3	5.1	3
71	Miniature Schnauzer	Female	Small	Healthy		Spaying	0.9	6.5	4
72	Miniature Schnauzer	Female	Small	Disease	Lower urinary tract disease	Bladder stones	10.3	8.0	4
73	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	4.5	4.0	3
74	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	0.8	18.8	3
75	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	0.8	4.5	3
76	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	0.5	13.0	2
77	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	12.8	9.3	3
78	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	0.6	3.1	3
79	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	12.9	10.0	3
80	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	0.8	3.7	3
81	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	3.9	2.4	3
82	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	4.0	14.0	4
83	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	4.8	5.0	4
84	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	6.6	2.9	4
85	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	0.7	2.8	2
86	Mix	Female	-	Healthy		Spaying	3.0	3.5	4
87	Mix	Female	-	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	9.9	4.5	3
88	Mix	Male	-	Healthy		Castration	0.5	2.6	2
89	Mix	Male	-	Disease	Hernia	Inguinal hernia	10.9	12.4	4
90	Norfolk Terrier	Female	Small	Healthy		Spaying	6.5	4.2	3
91	Pomeranian	Female	Small	Healthy		Spaying	8.3	3.3	3
92	Pomeranian	Female	Small	Healthy		Spaying	1.0	3.6	4
93	Pomeranian	Female	Small	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	12.7	5.6	4
94	Shetland Sheepdog	Female	Small	Healthy		Spaying	8.6	8.3	3
95	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	1.1	8.3	3
96	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	0.8	7.4	3
97	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	0.8	6.9	2
98	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	0.6	7.0	3
99	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	8.0	4.1	2
100	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	10.5	6.3	4
101	Shiba	Female	Small	Healthy		Spaying	8.8	13.5	5
102	Shiba	Female	Small	Disease	Female genital disease	Pyometra	10.3	10.0	4
103	Shiba	Female	Small	Disease	Female genital disease	Pyometra	6.9	9.0	3
104	Shiba	Male	Small	Disease	Lower urinary tract disease	Bladder stones	3.7	10.0	3
105	Shih Tzu	Female	Small	Healthy		Spaying	1.0	4.9	4
106	Shih Tzu	Male	Small	Disease	Lower urinary tract disease	Bladder stones and urethral obstruction	10.3	6.8	4
107	St. Bernard	Female	Small	Healthy		Spaying	1.1	1.9	3
108	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	0.6	3.2	3
109	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	15.0	2.3	3
110	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	1.0	2.9	3
111	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	1.0	3.6	3
112	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	0.6	4.0	3
113	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	0.5	1.9	2
114	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	1.0	5.4	3
115	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	16.8	3.7	3
116	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	5.3	3.0	3
117	Toy Poodle	Female	Small	Healthy		Spaying	1.7	1.0	2
118	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	11.3	6.9	3
119	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Female genital disease	Pyometra	12.0	3.3	3
120	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	11.8	3.7	2
121	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	9.8	3.4	3
122	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	12.4	3.6	3
123	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Female genital disease	Pyometra	13.3	2.2	2
124	Toy Poodle	Female	Small	Disease	Tumor	Mammary grand tumor	12.3	4.7	3
125	Toy Poodle	Male	Small	Healthy		Castration	0.8	3.6	2
126	Toy Poodle	Male	Small	Disease	Tumor	B cell malignant lymphoma	3.8	3.8	3
127	Toy Poodle	Male	Small	Disease	Tumor	Splenic hemangioma	14.3	6.6	4
128	White Shepherd	Female	Large	Healthy		Spaying	1.1	30.6	3
129	Yorkshire Terrier	Female	Small	Healthy		Spaying	0.5	3.3	3

¹yr: years, ²BW: body weight.

6 23 27 41 43 44 45 48 52 54 60 61 77 79 81 91 93 101 102 112 113 114 123 129 は内臓脂肪、皮下脂肪共に採

取

表 2 使用した 23 遺伝子のプライマーの塩基配列

Gene	5'-Primer	3'-Primer	NCBI accession number
<i>Actr2a</i>	AGCTGCTCAATGAGTACGTGGC	CCTCGTTTTTCTGCACCAATGA	XM_038426219
<i>Actr2b</i>	AGGTGGAGCTCTGGCTCAT	CCCTTGAGGTAATCCGTGA	XM_038431913
<i>Adipoq</i>	AGAGATGGCACCCCTGGTGAAAA	CAGTGTACCCTTAGGACCAACAAGAC	XM_038445379
<i>Alk2</i>	CGCCTTCCCTTCCCCTAGTATG	CACAATGGTCCCTCGTTCCCAC	XM_038446783
<i>Alk3</i>	GGCCGACATCTACAGCTTTGGC	GGATCGTTGGGCACCATATTG	NM_001145150
<i>Alk6</i>	AAAGCTACGTCCCTCGTTCCC	AGGGCTGTCAGTCTTGATGCAG	NM_001145151
<i>Bmp4</i>	AGTAGGGCCAACACCGTGAG	GGGATGTTCTCCAATGTTCTT	NM_001287170
<i>Bmpr2</i>	GTGCCGTCGCTCCTGTGGAC	GCACATAGACGTTCTGTGTTCTGA	XM_038447635
<i>Fabp4</i>	GGGTACCTGGAACCTAGCTCCAG	CCACTTTCCTGGTGGCGAAG	XM_038441472
<i>Fasn</i>	GTCCCCTCTGGTTCATCTGCTCTGGGA	CTCACGAAGGCATGGACGATGTCG	XM_038675370
<i>Fgf21</i>	GACAGCGGTACCTCTACACC	AATGACCCCTGGCTTTAGGG	XM_038653776
<i>Hprt1</i>	AAGGACCCCTCGAAGTGTTG	GCTTCCAACTCAACTTGAACCTCT	NM_001003357
<i>Hsl</i>	GGAGGAGTGCTTCTACGCTTAC	GCATATCCGTTCCCCTGTCG	XM_005616535
<i>Igf1r</i>	TCATCACGTGGCACCGTTAC	TCTGCCCCATCATACTCCGTA	XM_038661229
<i>Inhbb</i>	CTTCGCCGAGACAGATGGCCT	GGTTCCTTCGTTGGAGACG	XM_038426021
<i>Insr</i>	GGAACCCAATGGTCTGATCGTG	CTCCAGAGCAAAATGCCTCC	XM_038428732
<i>Leptin</i>	GCTGTGCCAATCCGAAAAGT	AATGAAGTCCAGACCAGCGA	NM_001003070
<i>Opn3</i>	ACCTTTTGTCTAAATCAAGCACTGTAT	TTGGCTGGTAGGTCCTTAGCAGG	XM_038671508
<i>Pparγ</i>	CCTCTCCATGCTGTTATGGGT	CTGATTCCAAAGTTGGTGGGC	NM_001024632
<i>Prdm16</i>	CAGCGGGGGCAGTGAGCAGG	CCTGGGGCACTGATCACACTTGTA	XM_038666470
<i>Tnfa</i>	ATGGCCTCCAATAATCAGC	CTTGGGGTTCGAGAAGATGAT	NM_001003244
<i>Ucp1</i>	AATGTCATCATCAATTGTACGGAGC	GCAACAAGAGCTGATAGGAAGTGGC	NM_001003046
<i>Ucp2</i>	CCTCTCCCAATGTTGCTCGT	CCCGAAGGCAGAAGTGAAGT	NM_001003048
<i>Ucp3</i>	CCATCCGCATTGGCCTCTAT	CTGGCCTGAAATCGGACCTT	NM_001003047

表 3 サンプルングしたイヌの雌雄差の比較

	Male	Female	
n	19	110	
Age (yr)	8.90 ± 5.3	5.92 ± 4.9	*
Body weight (kg)	11.04 ± 9.2	8.41 ± 8.4	
BCS	3.5 ± 0.8	3.2 ± 0.5	

Mean ± SD. *: $P < 0.05$ vs. male dogs.

BCS:ボディコンディションスコア

表 4 サンプルングしたイヌの健康群と疾患群の比較

	Healthy	Disease	
n	81	48	
Age (yr)	3.68 ± 4	10.88 ± 3.1	**
Body weight (kg)	8.92 ± 9.5	8.58 ± 6.7	
BCS	3.1 ± 0.8	3.5 ± 0.8	*

Mean ± SD. * and **: $P < 0.05$ and $P < 0.01$

表 5 サンプルリングした犬の年齢層による比較

	Young	Middle	Old
n	44	36	49
Age (yr)	0.85 ± 0.3 c	5.37 ± 2.13 b	12.03 ± 2.1 a
Body weight (kg)	7.52 ± 7.7 b	11.86 ± 11.97 a	7.69 ± 5.4 ab
BCS	3.0 ± 0.7 b	3.4 ± 0.8 a	3.4 ± 0.8 a

Mean ± SD. a, b, c: $P < 0.05$.

表 6 サンプルリングした犬の成犬の対体格差による比較

	Small	Medium	Large
n	89	14	13
Age (yr)	6.84 ± 5.2	6.21 ± 5.5	4.49 ± 3.6
Body weight (kg)	5.03 ± 2.5 c	13.72 ± 6.01 b	30.10 ± 6.7 a
BCS	3.2 ± 0.8	3.6 ± 0.7	3.5 ± 1.0

Mean ± SD. a, b, c: $P < 0.05$.