

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石川 真悟

PubMedにおいて“サーチュイン”を検索すると現在 4,000 以上の論文が検索され、その数は年々増加している。代謝性・加齢性疾病を調節する主要因子として、その機能は生化学、生理学および臨床医学において大きな注目を集めている。獣医療においても代謝性・加齢性疾病の増加は近年大きな問題となっており、その早期診断・予防法の確立は獣医療の急務の課題と考えられることから、申請者は、ネコ組織の炎症抑制におけるサーチュイン機能について明らかにすることを目的として本研究を行った。

1. 哺乳類のサーチュインは長寿に関連した酵母 Silent information regulator 2 (Sir2) のホモログである。7つのサーチュインがファミリーを構成し、特に、SIRT1 および SIRT3 はカロリー制限によって誘導され、代謝性・加齢性疾病に関わっていることがヒトやマウスで明らかにされているが、ネコにおいてサーチュインに関する報告は少ない。ネコ SIRT1 および SIRT3 に関する基礎的知見を得るために完全長 cDNA クローニングを行い、各組織における mRNA 発現解析を行った。他種動物のサーチュインアミノ酸配列との比較において、ネコ SIRT1 は 61.3%以上、SIRT3 は 65.9%以上と高い相同性を示した。ネコ SIRT1 および SIRT3 は、特に触媒コア領域において高い相同性を示した。触媒コア領域はジンクフィンガーと NAD⁺結合領域を有していた。系統樹解析においてもネコ SIRT1 および SIRT3 はそれぞれ哺乳類と進化距離が近いことが示され、ネコ SIRT1 および SIRT3 が他の動物と同様の機能を有していることが予想された。組織 Total RNA を用いた解析の結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 mRNA は他の哺乳類と同様に様々な組織で発現が認められ、特に SIRT1 は肝臓と骨格筋で、SIRT3 は心臓において強く発現していた。以上から、ネコ SIRT1 および SIRT3 は他の動物と同様に様々な生理活性を有すると申請者は考察した

2. 近年、ネコにおいても肥満罹患率は増加し、肥満に随伴する脂肪毒性は、糖尿病をはじめとする様々な疾患の基礎病態となっている。SIRT1 および SIRT3 は特に炎症を介して肥満発生の分子機構に重要な役割を果たしていると考えられるが、ネコにおいては脂肪毒性の発現機構、炎症におけるサーチュインの役割についてはほとんど報告がない。ネコに 8 週間高脂肪食を給与して肥満を誘発し、炎症性マーカー、末梢白血球の炎症性サイトカインおよび SIRT1、SIRT3 発現量の変化を調べた。高脂肪食給与によって、体重は有意に（約 30%）増加したが、血漿中代謝産物の値はほとんど変化しなかった。一方、肝逸脱酵素である ALT、ALP および AST の血中の活性は高脂肪食給与により有意に増加した。高脂肪食給与によって末梢血白血球における炎症性サイトカイン mRNA 発現量は変化しないが、SIRT1 mRNA 発現が有意に上昇することが明らかとなった。以上から高脂肪食給与によって誘発された肥満ネコにおいて、脂肪毒性により軽度の炎症が肝臓で起こるが、末梢血白血球における炎症性シグナルは SIRT1 によって抑制されたと考えられた。ネコサーチュイン(SIRT1)は、代謝性・加齢性疾病発症に関して、炎症抑制機構を担う分子として重要な役割を果たしていると申請者は結論した。

3. SIRT1 による炎症抑制機構では NF- κ B 転写活性の調節が中心的な役割を果たしていることがヒトやマウスで報告されている。SIRT1 による NF- κ B 転写活性調節の主な経路は、NF- κ B p65 サブユニット（p65）の翻訳後修飾である。NF- κ B は、炎症性サイトカインの産生を増加させることにより慢性炎症を引き起こすことで様々な疾病発症に関与し、特に代謝性・加齢性疾病の原因となることがヒトやマウスの研究から明らかにされている。ネコにおいても NF- κ B は様々な疾病の病因を解明する上で重要であると考えられるが、ネコ p65 の遺伝子配列は明らかにされておらず、その分子特性はほとんど報告されていない。ネコ p65 について基礎的知見を得るためにネコ p65 のクローニングし、その特徴を明らかにし、免疫調節機能について解析を行った。cDNA クローニングによりネコ p65 の完全長 cDNA 配列を明らかにし

た。その予想アミノ酸配列は哺乳類間で 87.5%以上と高い相同性を示した。特に機能的ドメインは非常に高い相同性を示した。哺乳類の p65 中の翻訳後修飾を受けると考えられているアミノ酸残基はすべてネコ p65 においても保存されていたことから、ネコ p65 も SIRT1 による調節を受けることが予想される。他の動物の p65 と同様、ネコ p65 mRNA は様々な組織において普遍的に発現していた。特に脂肪組織、心臓および骨格筋において高く発現していた。ネコ p65 を一過性に発現させることにより、ネコ線維芽細胞において NF- κ B 転写活性および炎症性サイトカイン発現量を増加させることが明らかとなった。以上から、p65 はネコの炎症に深く関わっていることが明らかとなり、その調節に SIRT1 が関わっていると申請者はが予想した。

4. SIRT1 の NF- κ B を介した慢性炎症との関わりが代謝性・加齢性疾病発症に影響を及ぼすことが知られている。慢性炎症は、内因性・外因性ストレスへの応答が持続することで発生する。慢性炎症が続くと、適応の破綻により組織の機能不全をもたらす。線維芽細胞は、組織中の細胞外マトリックスを合成し、損傷治癒に関わる主要な細胞で、炎症性サイトカインを産生し、炎症を調節する。以上から、線維芽細胞は慢性炎症病態の形成において重要な役割を果たしていると考えられる。線維芽細胞における SIRT1 の NF- κ B を介した炎症調節は、様々な疾患において重要であると考えられるが、ネコにおける報告はほとんどない。ネコ線維芽細胞における NF- κ B 転写活性および炎症性サイトカイン産生に SIRT1 が与える影響を調べた。ネコ線維芽細胞において SIRT1 を一過性に発現させることにより p65 および LPS による NF- κ B 転写活性が抑制され、炎症性サイトカイン発現の上昇が抑制された。以上の結果から、ネコ線維芽細胞において SIRT1 が NF- κ B により活性化される炎症応答を抑制することが示された。ネコにおいて SIRT1 が慢性炎症を抑制し、加齢性・代謝性疾病の発症に関わっていることが考えられる。

本研究において、ネコ SIRT1 は NF- κ B を介して炎症反応を抑制する機能を有することが明らかとなった。代謝性・加齢性疾病は脂肪毒性を基盤とする慢

性炎症が原因となって発症することが明らかとなってきた。慢性炎症の発生に関わる SIRT1 は、ネコの代謝性・加齢性疾病の発症にも関連することが示唆された。その詳細な分子機構の解明には、さらなる研究が必要である。一方、サーチュインをバイオマーカーとした各種疾病の早期発見・診断法がヒトで応用されている。また、高いサーチュイン活性化能を有する分子が同定され、創薬に向けた開発が進んでいる。本研究の結果が、ネコにおけるサーチュインの臨床応用に少しでも寄与することを期待し、申請者は本論文をまとめている。

以上のように、本論文は、ネコのサーチュインが炎症抑制に関与することを分子生物学的手法により明らかにし、サーチュインが肥満をはじめとする代謝性疾病の早期診断マーカーとして応用できることを示した点で、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。