

ネコ組織の炎症抑制におけるサーチュイン機能に関する研究

(Study on function of sirtuins in inflammation suppression
of feline tissues)

日本獣医生命科学大学大学院獣医応用生命科学研究科
石川 真悟

(指導教授:新井敏郎)

目次

序論	3
第1章 ネコサーチュイン1およびサーチュイン3 cDNA クローニングと組織発現解析	
1.1 緒論	7
1.2 材料および方法	9
1.3 結果	12
1.4 考察	20
1.5 小括	22
第2章 高脂肪食給与ネコにおける脂肪毒性とサーチュインの連関	
2.1 緒論	23
2.2 材料および方法	25
2.3 結果	28
2.4 考察	31
2.5 小括	33
第3章 ネコ NF- κ B p65 cDNA クローニングと機能解析	
3.1 緒論	34
3.2 材料および方法	36
3.3 結果	41
3.4 考察	50
3.5 小括	53

第 4 章 ネコ線維芽細胞においてサーチュイン 1 が NF- κ B p65 による転写活性 および炎症性サイトカイン産生に与える影響

4.1 緒論	54
4.2 材料および方法	56
4.3 結果	60
4.4 考察	63
4.5 小括	65
総括	66
文献	70
謝辞	86
英文要約	87

序論

1. 小動物において増加する代謝性・加齢性疾病

近年、獣医療の進歩によりイヌやネコなど家庭動物においても寿命が延伸し、それに伴い肥満や糖尿病といった代謝性疾病や、心・肝・腎疾患および癌といった加齢性疾病がヒト同様に増えてきており大きな問題となっている。特にネコにおいては、飼い主が病気の罹患に気づかず病態が進行し、末期状態になってから動物病院を受診することが多く、治療が難しい場合が多い。これら病因の解明、その知見を基にした早期診断・予防法の確立は獣医療の急務の課題と考えられる。

脂肪組織は実質細胞である成熟脂肪細胞以外に、マクロファージをはじめとする様々な間質細胞を含んでおり、余剰エネルギーを貯蓄する貯蔵器官としての機能だけでなく、アディポサイトカインと総称される生理活性物質を活発に産生・分泌する生体内で最大の内分泌器官として様々な生理現象に関わっている (Kershaw and Flier, 2004)。しかし、肥満に伴って脂肪組織のリモデリングが起こり、構成する細胞成分が大きく変化すると、その恒常性は破綻し、炎症性サイトカインといった悪玉アディポサイトカインの過剰産生とアディポネクチンといった善玉アディポサイトカインの産生減少が起こり、血中遊離脂肪酸を上昇させ、脂肪毒性を引き起こす (Hotamisligil, 2006)。肥満により細胞のインスリン抵抗性が惹起され糖尿病を発症することはよく知られているが、脂肪毒性は炎症やミトコンドリア機能不全の原因となり、代謝性疾病だけでなく心・肝・腎疾患及び癌といった加齢性疾病の基礎病態となっていることが近年ヒトやマウスにおいて明らかとなってきた (Bray and Bellanger, 2006)。ネコにおいても肥満により2型糖尿病、脂肪肝および慢性腎不全の発症リスクが高まることから、肥満は代謝性・加齢性疾病の重要な基礎病態となっている (German, 2006)。

このように、ヒトにおいては代謝性・加齢性疾病の分子機構が詳しく研究されているが、ヒトと同様に過栄養や運動不足により同様の疾病が発症している

と考えられるネコにおいて、代謝性・加齢性疾病について多くの未解明な事象が残っている。

2.代謝・加齢を制御するサーチュイン

代謝性・加齢性疾病の発症機序について、カロリー制限と酸化ストレスの二仮説が昔から提唱され様々な研究がなされてきた (Masoro, 2006; Valko M et al., 2007)。近年、これらの仮説に関わる長寿遺伝子としてサーチュインが重要な役割を果たしていることが明らかにされ (Frye, 1999)、様々な疾病の治療標的としてヒトやマウスで研究が進められている。

サーチュインは 1984 年にクローニング、特徴づけられた酵母のサイレントクロマチンに必要な遺伝子 Silent information regulator 2 (Sir2) のタンパク質ファミリーである (Shore D et al., 1984)。哺乳類では Sir2 のホモログとしてサーチュイン 1-7 (SIRT1-7) の 7 つのサーチュインファミリーが同定されている (Frye, 1999)。Sir2 は酵母の老化に関わる extrachromosomal ribosomal DNA circle (ERC) の蓄積を rDNA 領域における相同組換えを抑制することにより阻害し、酵母の寿命を延伸させる (Kaeberlein et al., 1999)。高等真核生物である線虫やショウジョウバエにおいても Sir2 ホモログが寿命の延伸に関わることが明らかとされ (Tissenbaum and Guarente, 2001; Rogina and Helfand, 2004)、哺乳類においても、SIRT6 遺伝子を過剰発現させた雄マウスにおいて寿命が延伸したことが報告されている (Kanfi et al., 2012)。

生化学的にサーチュインは nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) 依存性リジン脱アシル化酵素群として働く。サーチュインは基質を脱アセチル化する過程において NAD^+ を nicotinamide と O-acetyl-ADP-ribose に分解する (Avalos et al., 2005)。産生された nicotinamide は産生阻害物としてとどまり、高い nicotinamide 濃度はサーチュインの活性を阻害する。こうした NAD^+ 依存性活性によりサーチュインは食事や代謝に反応し、カロリー制限による生理活性に関わっている。例えば、酵母においては 0.5% から 2% のグルコース濃度の減少によって Sir2 が活性化し寿命を延伸する (Lin et al., 2000)。哺乳類において

も、絶食やカロリー制限、高脂肪食給与等のカロリー変動によりサーチュインの活性が変化する (Rodgers and Puigserver, 2007; Verdin et al., 2010)。哺乳類のサーチュインファミリーの中では SIRT1 と SIRT3 が最もカロリー変動に対する応答性が高く、これらのノックアウトマウスではカロリー制限による有益な生理活性が阻害されることが報告されている (Cohen et al., 2004; Hebert et al., 2013)。

SIRT1 の機能活性は当初ヒストン脱アセチル化酵素としての活性が解明され、直接ヒストン H1、H3 および H4 を脱アセチル化することにより転写を抑え、テロメアのクロマチンを保護することによって老化現象を制御すると考えられてきた (Oberdoerffer et al., 2008)。近年 SIRT1 はヒストンだけではなく、多くの転写因子、シグナル伝達物質、代謝酵素タンパク質を脱アセチル化することが明らかとなり、酵母 Sir2 と構造や機能が最も類似していることからサーチュインファミリーの中で最も研究が進んでいる (Chen et al., 2012)。また、SIRT3 はミトコンドリアに局在し、多くのミトコンドリア代謝酵素を脱アセチル化の標的としている。特に抗酸化酵素を活性化することから、酸化ストレスから細胞を保護している (Newman et al., 2012)。

以上から、ヒトと発症機序が類似していると考えられるネコの代謝性・加齢性疾病においても、サーチュインが重要な役割を果たしていることが予想されるが、ネコサーチュインは遺伝子配列が明らかにされておらず、ネコのサーチュインに関する報告はほとんどない。

3. 疾病に関わる慢性炎症とサーチュイン

内因性・外因性ストレスへの応答によって、低レベルの生理的炎症が持続することで、多様な間質細胞の相互作用が遷延化し、適応の破綻により不可逆的な組織リモデリングを生じて臓器の機能不全をもたらす。これは慢性炎症と呼ばれ、様々な疾病の基礎病態となっていることが近年明らかとなってきた

(Multhoff et al., 2012)。慢性炎症を惹起する主因として、肥満による脂肪細胞の恒常性破綻があり、慢性炎症は特に代謝性・加齢性疾病における標的とし

て注目を集めている (Franceschi et al., 2014)。炎症において中心的役割を果たす分子として転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) があり、慢性炎症制御のためには、NF- κ B の活性制御が重要であると考えられている (Baker et al., 2011)。

ワインに含まれるポリフェノールの一成分であるレスベラトロールは、フランス人は飽和脂肪酸が豊富に含まれる食事を摂取しているにも関わらず、冠状動脈性心臓病に罹患することが比較的低いというフレンチパラドックスに関わる分子として注目を集め、NF- κ B 転写活性を抑制し、抗炎症作用を有することが報告されていた (Manna et al., 2000)。その後、レスベラトロールが SIRT1 に対するエフェクター活性を有し (Howitz et al., 2003; Price et al., 2012)、NF- κ B 転写活性の調節に SIRT1 が直接関わっていることが明らかとなった (Yeung et al., 2004)。SIRT1 の NF- κ B 制御による炎症調節作用は急速に研究が進み、SIRT1 が肥満に伴う炎症を抑制していることや (Wang et al., 2013)、逆に炎症性刺激による SIRT1 活性の低下が慢性炎症の基盤となっていることが報告され (Shinozaki et al., 2014)、慢性炎症による代謝性・加齢性疾病発症において SIRT1 と NF- κ B の関連が中心的な役割を果たしていることが明らかとなってきた。しかし、ネコにおいては NF- κ B ファミリーの遺伝子配列が明らかとされておらず、その分子生物学的特性およびサーチュインとの関連は不明である。

以上から、本研究はネコにおける代謝性・加齢性疾病の病態解明および早期発見、治療法開発のために、ネコサーチュインの機能、特に NF- κ B と関わる炎症抑制作用について明らかとすること目的とし、一連の試験を行った。

第1章 ネコサーチュイン 1 およびサーチュイン 3 cDNA クローニングと組織発現解析

1.1 緒論

獣医療の進歩により家庭動物においても高齢化が進んでおり、現在日本で飼育されているネコの4頭に1頭が10歳以上であると言われている（平成26年 全国犬猫飼育実態調査）。その結果、運動不足による肥満の割合も増加し、2型糖尿病、肝リポドーシス、慢性腎不全および肥大型心筋症といった代謝性・加齢性疾病に罹患するネコが顕著に増加している（German, 2006）。しかし、その分子機構については明らかにされていないことが多く、早期診断、予防の障害となっている。

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) のホモログとして同定され、7つのサーチュインがファミリータンパク質として含まれており、それらは異なった基質特異性と機能を有している（Park et al., 2013）。サーチュイン 1 (SIRT1) は主に核に局在し、forkhead transcription factors (FOXOs) (Brunet et al., 2004)、peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, coactivator 1-alpha (PCG-1 α) (Rodgers et al., 2005)、および nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (Zhang et al., 2010) といった基質を脱アセチル化することにより代謝機構および炎症、免疫応答に関わっている。サーチュイン 3 (SIRT3) はミトコンドリアに局在し、isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) (Someya et al., 2010) や superoxide dismutase 2 (SOD2) (Qiu et al., 2010) といった基質を脱アセチル化することにより、細胞を酸化ストレスから保護する。サーチュインは補酵素として nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) を必要とすることから、その遺伝子発現や活性は代謝状態や加齢によって調節されている。このため、代謝性・加齢性疾病における機能が注目され、ヒトやマウスにおいて、2型糖尿病 (Banks et al., 2008; Jing et al., 2011)、脂肪肝 (Deng et al., 2007; Kendrick et al., 2011)、慢性腎疾患 (Kitada et al., 2014) および心疾患 (Tanno et al., 2010; Pillai et al., 2010) に SIRT1 およ

び SIRT3 が関わっていることが報告されている。

ネコの 2 型糖尿病や肝リピドーシスは肥満から誘導され (O'Brien, 2002; Armstrong and Blanchard, 2009)、その臨床・生理・病理学的側面から、ヒトの病態と類似していると考えられている (Henson and O'Brien, 2006)。ネコの代謝性・加齢性疾病においてもサーチュインは重要な役割を果たしていることが予想されるが、現時点においてネコのサーチュインに関する報告はほとんどない。そこで、第 1 章ではネコ SIRT1 および SIRT3 に関する基礎的な知見を得ることが必要と考え、ネコ SIRT1 および SIRT3 完全長 cDNA クローニングおよびシーケンスを行い、その結果から推測されるアミノ酸配列を他種動物サーチュインと比較した。また、成熟個体組織由来の各組織における mRNA 発現解析を行った。

1.2 材料と方法

ネコ SIRT1 および SIRT3 cDNA のクローニング

Total RNA は Zyagen (Zyagen, San Diego, CA, USA) から購入したネコ大脳皮質 (雑種、3 歳、オス) RNA を用いた。分光光度計を用いて 260nm で RNA の量を測定、260/280 比および 260/230 比により品質を確認した。cDNA ライブラリーの作製は SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, mountain View, CA, USA) を用い、指示書に従って行った。プライマーはヒトの SIRT1

(GenBank accession number NM_012238) および SIRT3 (GenBank accession number NM_012239) cDNA シークエンスとネコのゲノム DNA シークエンスを参考に作製した。まず、プライマー1 と 2 およびプライマー7 と 8 を用いて SIRT1 と SIRT3 の PCR 断片を得た後にシークエンスを行い、部分的な塩基配列を決定した (Table 1)。得られた部分シークエンスを参考に、3'末端シークエンスのためにプライマー3 と 9 を、5'末端シークエンスのためにプライマー4 と 10 を作製し RACE-PCR を行った。PCR は各プライマーを 0.2 μ M ずつと、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Shiga, Japan) を用いて 30 サイクル 98°C 10 秒、60°C 15 秒、68°C 1 分の条件で行った。この反応で得た増幅産物は pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にクローニングし、シークエンスは FASMAC (FASMAC Co., Ltd., Kanagawa, Japan) のシークエンスサービスを用い塩基配列を決定した。

リアルタイム PCR によるネコの各組織における SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現の解析

Zyagen から購入した Total RNA (1 μ g)を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて逆転写反応を行い、サンプルとした。

リアルタイム PCR は Perfect Real Time SYBR Premix Ex Taq II (Takara)を用いて、ABI 7300 Real Time PCR Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)で 2 μ l のサンプル cDNA、0.8 μ l の各プライマー、10 μ l の SYBR Premix Ex Taq II、0.4 μ l の ROX Reference Dye および 6.0 μ l の滅菌水を含む反応液を 95°C 30 秒加熱の後、95°C 5 秒、60°C 35 秒、40 サイクル行い、測定した。プライマー 5、6 を SIRT1 に、プライマー 11、12 を SIRT3 に、プライマー 13、14 を Beta-actin mRNA 測定用に設計した。定量はそれぞれの遺伝子断片を含んだプラスミド DNA を段階希釈したものを使い、検量線を作製して算出した。

統計処理

数値は平均 \pm 標準誤差で表した。すべての統計は GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った。

Table 1. PCR に用いたプライマー

Primer	Kind	Sequence (5'-3')	Position	Accession Number
SIRT1				NM_001290246.1
1	Sense	GAGAGGCAGTTGGAAGATGG	47 – 66	
2	Antisense	CTGTTGCTTCCTGTTTCACG	2275 – 2256	
3	Sense	CAACGGTTTGGGAAGACGATGCTG	2156 – 2179	
4	Antisense	TCTTCCTCCTCTTCGCCCTCGTCGT	452 – 427	
5	Sense	CGCCTTGCAATAGACTTCCC	897 – 916	
6	Antisense	TGAATTTGTGACAGAGAGATGGTTG	1042 – 1017	
SIRT3				NM_001290245
7	Sense	AGGACCTAGCTGAGCTGATTCG	349 – 371	
8	Antisense	TGTGTGTAGAGCCGCAGAAG	656 – 636	
9	Sense	CTATTTCTCCTCCGCCTGCTCCACGAC	603 – 626	
10	Antisense	AGGCCGCTCCTTGGAGACCTGAAGT	464 – 439	
11	Sense	TGCTTCTGCGGCTCTACAC	635 – 653	
12	Antisense	TGTCTCCCCAAAGAACACGA	864 – 855	
Beta-actin				AB051104.1
13	Sense	GCCAACCGTGAGAAGATGACT	152 – 172	
14	Antisense	CCCAGAGTCCATGACAATACCAG	280 – 257	

1.3 結果

ネコ SIRT1 および SIRT3 cDNA のクローニング

ネコ大脳皮質 cDNA ライブラリーから得た SIRT1 および SIRT3 クローニングの結果を Figure 1, 2 に示す。SIRT1 は 5′末端に非翻訳領域 63bp、746 のアミノ酸をコードする翻訳領域 2241bp、3′末端に非翻訳領域 1781bp で構成されていた。ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)を用いてその分子量を計算したところ 81.8kDa であると予想された。SIRT3 は 5′末端に非翻訳領域 54bp、372 のアミノ酸をコードする翻訳領域 1119bp、3′末端に非翻訳領域 481bp で構成されていた。ExPASy を用いてその分子量を計算したところ、40.9kDa であると予想された。ネコゲノム情報(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)を用いたコンピューター解析により、ネコ SIRT1 は cDNA 最初の塩基を 1 としての塩基番号 484、485 番間に 1.4kb、601、602 番間に 3.4kb、843、844 番間に 1.7kb、996、997 番間に 7.1kb、1144、1145 番間に 1.2kb、1224、1225 番間に 1.3kb、1441、1442 番間に 1.4kb、1975、1976 番間に 5.3kb のイントロンを含む 9 つのエキソンで構成され、ネコ SIRT3 は 109、110 番間に 3.9kb、257、258 番間に 1kb、446、447 番間に 0.1kb、679、680 番間に 1.5kb、780、781 番間に 5.2kb、942、943 番間に 3.6kb、1152、1153 番間に 1.4kb のイントロンを含む 8 つのエキソンで構成されていることが予想された。イントロンの 5′および 3′末端配列はスプライシングの GT-AG ルールに従っていた (Breathnach and Chambon P, 1981)。また、SIRT1 および SIRT3 はともに 3′末端近傍にポリアデニル化シグナルを有していた。


```

                                M A R W V R P A L C A L
GGACACGTGGCCCTCGGGGACAAAGGTCGCGAGCGGGCGGAGCAGCTGGGACATGGCACGGTGGGTTCGGCCTGCTCTTTGCGCCCTC 90
R L W G P A G W R S L Y T E V R D V P G K G H Q G P S P G R
AGGCTCTGGGGCCCGGCAGGCTGGAGGAGTCTCTATACGGAAGTCAGAGATGTCCCGGGGAAGGGTCATCAAGGGCCTTCCCTGGAAGA 180
▲1

T D A V A A S L W G V R K A S C A V G L A A L N S G I T G G
ACAGACGGGTGGCCGCGCAGCCTTTGGGGTGTGAGAAAGCGCTCCTGTGCAGTGGGGCTGGCAGCCCTGAACTCTGGCATTACAGGTGGA 270
▲2

R R P V S S S A S A S S I F G S G G N G K E K L F L Q D L A
AGAAGACCTGTATCTTCTCTAGTGCCTCAAGCATCTTTGGAAGCGGAGGCAACGGCAAGGAGAAGCTTTTCTCCAGGACCTAGCT 360
E L I R A G A C R K A V V M V G A G V S T P S G I P D F R S
GAGCTGATTGAGCCGGAGCCTGCCGGAAGGCAGTGGTCATGGTGGGGGCGGCGTCAGCACGCCAGCGGCATTCCGGACTTCAGGTCT 450
▲3

P R S G L Y S N L Q R Y D L P Y P E A I F E L T F F H H N P
CCAAAGGAGCGGCTGTACAGCAACCTGCAGCGGTACGACCTCCCATACCTTGAGGCCATTTTCGAGCTCACTTTCTTCCATCACAAACCC 540
K P F F A L A K E L H P G S Y R P N V I H Y F L R L L H D K
AAGCCCTTTTTCGCTCTGGCCAAAGGAGCTGCACCCCGGAGCTACAGGCCCAATGTCATACACTATTTCTCCGCTGCTCCAGACAAG 630
G L L L R L Y T Q N I D G L E R A A G I P A S K L V E A H G
GGGCTGCTTCTCGGCTCTACACACAGAACATCGATGGGCTCGAGAGAGCGGCTGGCATCCCTGCCTCCAAGCTGGTTGAAGCTCACGGA 720
▲4

S F A S A T C T V C R R P F F P G K D V W D E V M V D R I P R
TCCTTTGCCTCTGCCAGTGCATGTCTGCCGAAGGCCCTTCCAGGGAAGGACGTTTGGGATGAAGTGATGGTGACAGGATCCCCGC 810
▲5

C P V C T G I V K P D I V F F G E T L P Q R F L L H V V D F
TGTCAGTCTGCAGTGGCATCGTGAAGCCCGACATCGTGTCTTTGGGGAGACTGCCCCAGAGGTTCTTGCTACATGTGGTTGATTTC 900
P M A D V L L I L G T S L E V E P F A S L S E A V R S S V P
CCCATGGCAGATGTGCTGCTTATCCTCGGGACCTCCCTGGAGGTAGAACCTTTTGCCAGCTTGCTGAGGCCGTGCGGAGCTCGGTGCC 990
▲6

R L L I N R D L V G P F A W R P R S R D V V Q L G D M V H S
CGACTGCTCATCAACCGGACCTGGTGGGGCCCTTTGCTTGGCGTCTCGCAGCAGGGACGTGGTCCAGCTGGGGGATATGGTTTCACAGC 1080
V E R L V E L L G W T E E L R D L M R Q E A E K L N G R D R
GTGGAAGGCTGGTGGAGCTTCTAGGCTGGACAGAAGAGTTGCGGGACCTCATGCGGCAGGAAGCCGAGAAGCTCAATGGACGGGACAGA 1170
▲7

*
TAGGGTGATGGCTGGTCCCCCACCCTCCCGGGACAGAAATGGTTCCATGGAGTCACTGCCACCCTAAGGAAACAGTTTGGCTGG 1260
ACTGGAACCTGCGGCCTAAGGACGAATGAGGCTGCCAGGTCATGAGCCCTGTGCCAGCAGTCATGTTGTGCTCACACCACAGGCCACC 1350
CGTCACACTGGCACCTTTTCTGCTGTTGGGACTCTTCAGTCTGCTGAAGCTGACTGCAAAAGCTTTGACAGCTTGAACCTCAACAGACCAA 1440
CGGAAAGCCCGACTGGATCAGCCATGTGTCCAGGTCTCCATCTGAAGGGCTTGGCATCTCGGTCTGTTAGAAGGACCCAGTCTCTGGCT 1530
GAGTGGCCTTAGTCACTCCCAAGGCATGGTCCCGGGTCCCAAGTAATAGAATAGGTCCTTTAGTATGTTGGTCCCTTAGTAATGTTAT 1620
TTTGAATTAAAGAAACTTTTATTCATTTCTGGCAT 1710

```

Figure 2. ネコ SIRT3 の cDNA と予想アミノ酸配列

開始コドンを太線、終止コドンをアスタリスク、イントロンの位置を矢頭で示し、ポリアデニル化シグナルは黒枠で囲っている。右の数字は cDNA 最初の塩基を 1 としての塩基番号を示している。矢頭はイントロンの位置を示し、ポリアデニル化シグナルは黒枠で囲っている。このヌクレオチド配列は GenBank にて Accession No. NM_001290245 として公開されている。

ネコ SIRT1 および SIRT3 予想アミノ酸配列の他動物との配列相同性

ネコ SIRT1 および SIRT3 予想アミノ酸配列は触媒コア領域を有し、他の Sir2 ファミリーとコア領域において非常に高い相同性を有していた(Figure 3)。加えて、他の動物と同様に、ネコ SIRT1 および SIRT3 の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。ネコ SIRT1 および SIRT3 の予想アミノ酸配列を他の動物と比較したところ SIRT1 は 95.3% [イヌ]、91.4% [ブタ]、91.3% [ウシ]、88% [ヒト]、83.2% [マウス]、67.4% [ニワトリ]、61.3% [ゼブラフィッシュ]、SIRT3 は 83.0% [イヌ]、78.3% [ブタ]、76.6% [ヒト]、73.7% [マウス]、68.9% [ウシ]、66.0% [ニワトリ]、65.9% [ゼブラフィッシュ]と高い相同性を示した。分子系統樹解析の結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 はそれぞれ哺乳類の SIRT1 および SIRT3 の枝に位置しイヌと進化距離が近いことが示された(Figure 4)。

また、ジンクフィンガー (+)、NAD⁺結合部位 (*) および基質結合部位 (-) をそれぞれの記号で示した。

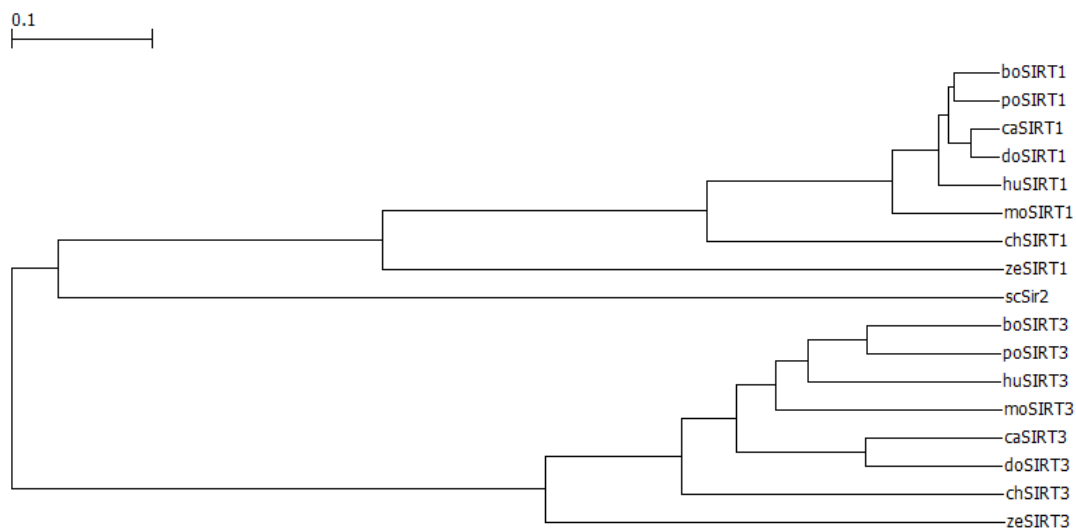


Figure 4. Sir2 ファミリーの分子系統樹

それぞれ酵母 (sc) Sir2、ウシ(bo)、ブタ(po)、イヌ(do)、ネコ(ca)、ヒト(hu)、マウス(mo)、ニワトリ(ch)およびゼブラフィッシュ(ze)SIRT1、SIRT3 について GENETYX-win Ver.9.1.0 (GENETYX Corp, Tokyo, Japan)を用いて unweighted pair group method with arithmetic mean method により分子系統樹を作製した。Accession Number は Figure 3 に示した。バーおよび 0.1 の数値は進化距離を示している。

各組織におけるネコ SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現量の比較

各組織における SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現を、リアルタイム PCR により定量解析した(Figure 5)。3 歳オス雑種ネコにおいては両 mRNA ともに大脳皮質、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋、膵臓、十二指腸、脾臓及び胃と調べた全ての組織で発現が検出された。特に SIRT1 は肝臓と骨格筋において、SIRT3 は心臓において高い発現が検出された。

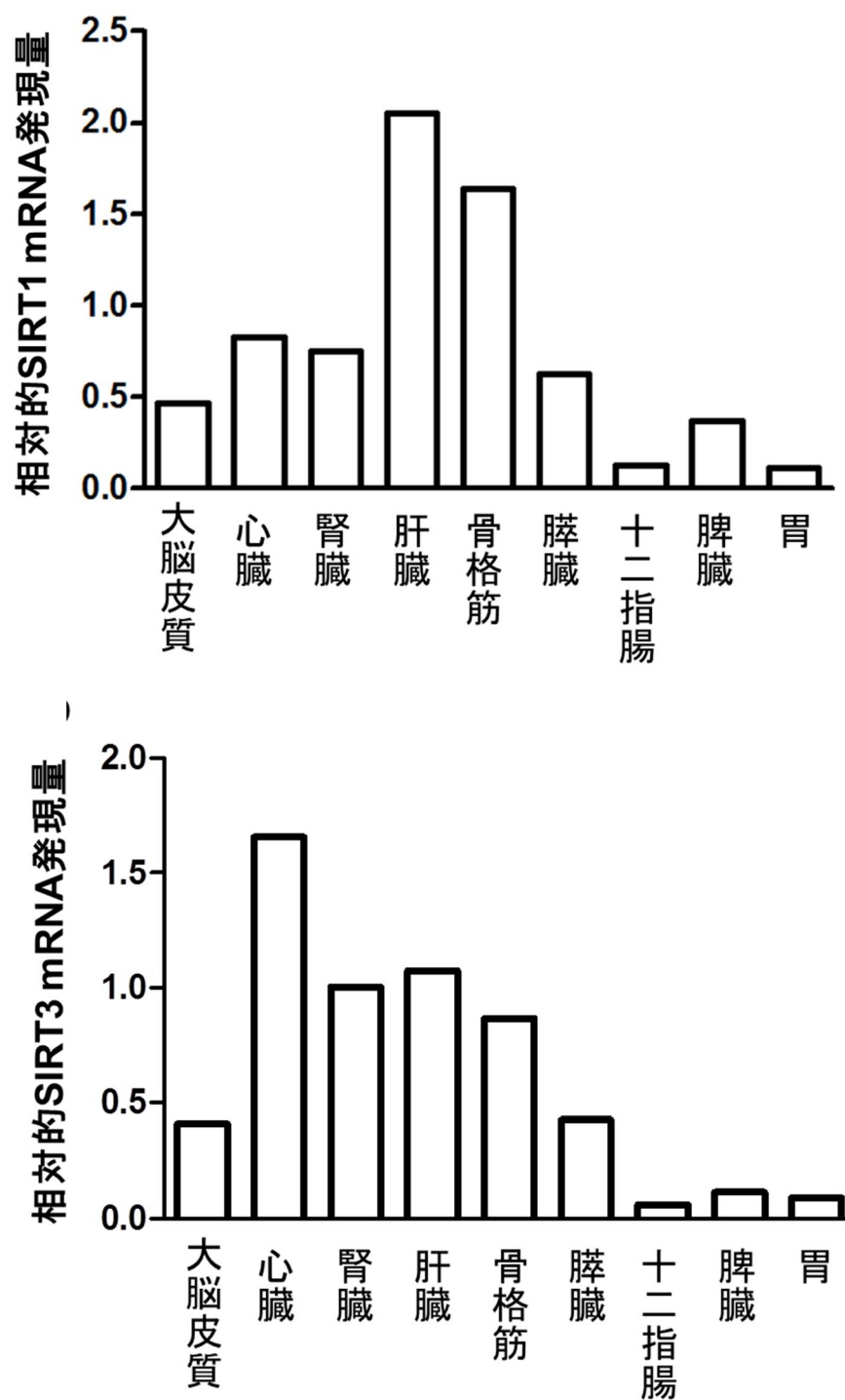


Figure 5. 3歳オス雑種ネコ SIRT1、SIRT3 の各組織における mRNA 発現量

mRNA 発現量はリアルタイム PCR によって測定した。各々SIRT1、SIRT3 発現量は、Beta-actin mRNA 発現量に対する比で表されている。

1.4 考察

ネコ大脳皮質 cDNA ライブラリーから、ネコ SIRT1 および SIRT3 cDNA クローニングに成功した。シーケンスで得たネコ SIRT1 および SIRT3 の塩基配列をネコゲノムデータベース (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) で検索を行った結果、ネコ SIRT1 遺伝子はヒトやマウスと同様 9 つのエキソンと 8 つのイントロンで構成されていた。一方、ネコ SIRT3 遺伝子は 8 つのエキソンと 7 つのイントロンで構成されており、ヒトやマウスと異なっていた。ヒトにおいてはいくつかの遺伝子のイントロンに存在する single nucleotide polymorphism (SNP) 多型が 2 型糖尿病の発症と関連しており (Zeggini et al., 2007)、イントロンにおける転写調節や発現調節機構がその遺伝子の働きに影響を及ぼしていると考えられている。従ってネコ SIRT3 の遺伝子構成がヒトやマウスと異なることは、その調節機構が他の動物と異なる可能性を示唆している。

ネコ SIRT1 および SIRT3 cDNA の配列を基に予想したそれぞれのアミノ酸配列を酵母、イヌ、ヒト、マウス、ウシ、ブタ、ニワトリおよびゼブラフィッシュと相同性解析を行った結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 は哺乳類と高い相同性を示した。特に、Sir2 ファミリーに共通して存在する機能部位である触媒コア領域において高い相同性を示し、ネコ SIRT1 および SIRT3 も触媒コア領域を有していることが分かった。このコア領域に含まれるジンクフィンガーとして知られるモチーフである CxxC-(18-20)x-CxxC (Sherman et al., 1999)、NAD⁺結合部位を形成するモチーフである GAG(I/V)SxxxG(I/V)PDFRS、TQNID、HG(S/T)および各基質結合部位は完全に保存されていた (Min et al., 2001)。また、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たことから、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る。

SIRT1 および SIRT3 mRNA は様々な組織で普遍的に発現していることがヒト (Frye, 1999; Onyango et al., 2002)、マウス (Shi et al., 2005)、ウシ (Ghinis-Hozumi et al., 2011) およびブタ (Jin et al., 2009) で報告されている。今回の実

験によりネコ SIRT1 および SIRT3 mRNA も他の哺乳類と同様に様々な組織で発現し、SIRT1 は肝臓と骨格筋で、SIRT3 は心臓において高く発現していた。SIRT1 のヘテロノックアウトマウスでは、肝臓に脂肪変性が起こり炎症性遺伝子発現の上昇、および SIRT1 標的タンパク質のアセチル化が起こると報告されており (Xu et al., 2010)、ネコ SIRT1 の肝臓における高い mRNA 発現は肝リピドーシスに関連している可能性がある。また、インスリン抵抗性を有する脂肪細胞は異所性脂肪として骨格筋に蓄積するが、SIRT1 が骨格筋におけるインスリン感受性を高めることがマウスで報告されている (Schenk et al., 2011)。ネコ SIRT1 の骨格筋における高い mRNA 発現は、糖・脂質代謝を調節し 2 型糖尿病の発症に関連している可能性がある。一方、SIRT3 ノックアウトマウスは 8 週齢になると心筋肥大の兆候を示す (Sundaresan et al., 2009)。肥大型心筋症はネコの心疾患で最も高い罹患率および死亡率を示し、突然死に関わる重要な疾患であるが (Abbott, 2010)、ネコ SIRT3 の心臓における高い mRNA 発現はネコの肥大型心筋症の病態に関連していると考えられる。

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ことが予想され、その機能解析および疾病との関連について詳しく検討する必要があると考えられる。

1.5 小括

本章では cDNA クローニングによりネコ SIRT1 および SIRT3 の完全長 cDNA 塩基配列を決定した。アミノ酸相同性解析を行った結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 は他の哺乳類と高い相同性を示した。特に Sir2 ファミリーに共通して存在する機能部位である触媒コア領域において高い相同性を示し、ジンクフィンガー、NAD⁺結合部位および基質結合部位は完全に保存されていた。

組織 Total RNA を用いて行った mRNA 発現解析の結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 mRNA も他の哺乳類と同様に様々な組織で発現し、SIRT1 は肝臓と骨格筋で、SIRT3 は心臓において特に高く発現していた。

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ことが予想され、両 mRNA とともに多様な組織で発現し、特に代謝性・加齢性疾病に関わる組織において高く発現していた。よって、ネコ SIRT1 および SIRT3 は代謝性・加齢性疾病に深く関わっていることが予想される。

第2章 高脂肪食給与ネコにおける脂肪毒性とサーチュインの連関

2.1 緒論

近年、ネコにおいても肥満の罹患率が増加しており、アメリカの調査では25%の飼育ネコが肥満していると報告されている (Scarlett et al., 1994)。肥満は栄養性の疾病であり、家庭動物においても様々な続発性疾病の基礎病態となり (Trinh et al., 2009)、寿命短縮の要因となっている (Lawler et al., 2008)。

ネコの2型糖尿病も肥満を基礎病態としており、高脂肪・高炭水化物食給与や運動量減少によりその発病リスクが増大する (Backus et al., 2007)。その結果、糖・脂質代謝が変化し、インスリン抵抗性が惹起されるという臨床・生理・病理学的観点から、ネコの2型糖尿病の病態はヒトの2型糖尿病と類似しており、ネコはヒトの糖尿病モデル動物としても注目されている (Henson and O'Brien, 2006)。肥満がインスリン抵抗性を惹起する分子機構としては、脂肪酸合成・コレステロール代謝調節に関わる転写因子 sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C)を活性化させ、皮下以外の脂肪蓄積および脂肪細胞の肥大化を促進することが挙げられる (Brown and Goldstein, 1997)。脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵庫ではなく、様々な生理活性物質を分泌する体内最大の内分泌器官として働くが、肥満によって脂肪細胞が肥大化すると、糖・脂質代謝を亢進する。結果、いわゆる善玉アディポサイトカインに分類されるアディポネクチンやレプチンの分泌が減少し、悪玉アディポサイトカインに分類される TNF- α 、IL-6 といった炎症性サイトカインや、遊離脂肪酸の分泌が促進される (Okuno et al., 1998)。同時に ATP 合成のための β 酸化が過度に行われるため、組織の処理能力を超える活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) が産生され、ミトコンドリア機能不全及びアポトーシスを惹起する (Furukawa et al., 2004)。このように、肥満の分子機構が明らかとなるにつれて、善玉アディポサイトカインの減少による糖・脂質代謝異常だけでなく、脂肪細胞の産生する悪玉アディポサイトカインによって炎症が全身に波及する脂

肪毒性が惹起され、肥満が代謝性疾患だけではなく様々な疾患の基礎病態となっていることがわかってきた (Hotamisligil, 2006)。

サーチュインは nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) 依存性活性を有することから、栄養センサーとして働き、様々なターゲットタンパク質への作用を介して多様な生体機能を制御する。特にサーチュイン 1 (SIRT1) およびサーチュイン 3 (SIRT3) はカロリー制限によりその発現と活性が増加し、糖・脂質代謝を調節することがヒトやマウスで明らかとなっている。例えば、SIRT1 は SREBP-1C の機能を阻害することにより脂肪細胞の肥大化を抑制する (Ponugoti et al., 2010)。また、アディポネクチンの産生を亢進したり (Qiao and Shao J, 2006)、炎症性サイトカインの産生を抑制する等 (Yeung et al., 2004)、アディポサイトカインの産生も調節している。また、SIRT3 はミトコンドリア機能を改善し、ROS の産生を抑える (Choudhury et al., 2011)。よって、SIRT1 および SIRT3 は肥満による脂肪毒性から生体を保護する分子機構において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やサーチュインとの関連について、ほとんど報告されていない。そこで第 2 章ではネコの脂肪毒性およびそれに関わるサーチュインについて明らかにすることを目的とし、ネコに 8 週間高脂肪食の給与を行い、その影響を炎症性マーカー、炎症性サイトカインおよび SIRT1、SIRT3 mRNA 発現量を測定することにより解析した。

2.2 材料と方法

供試ネコ

本試験では平均 14.0 ± 1.4 ヶ月齢（10 から 30 ヶ月齢）、平均体重 $2.5 \pm 0.1\text{kg}$ の 5 頭の雑種メスネコを用いた。これらのネコは獣医師が健康で何れの臨床徴候も認められないことを確認している。ネコは株式会社 AQS（Chiba, Japan）において個別ケージで 8 週間飼育され食事は株式会社日本ペットフード（Tokyo, Japan）が調整した高脂肪食を給与した。高脂肪食の組成は水分（7.0%）、粗蛋白（32.7%）、粗脂肪（23.9%）、粗繊維（0.9%）、粗灰（5.5%）および可溶無窒素物（29.9%）でカロリー含量は 4660kcal/kg であった。給与は、AM9:00 から翌 AM8:30 までの間、1 日エネルギー要求量(daily energy requirement : DER)のもとで自由摂食とし、DER は $1.4 \times$ 安静時エネルギー要求量(resting energy requirement : RER) ($BW^{0.75} \times 70$) で計算した。RER は AM9:00 の時点での体重をもとにしている。採血前の残った食事は前日の PM4:00 の時点で取り除いた。飲水は自由飲水として与えた。飼育舎は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ で AM8:00 から PM8:00 まで照明を点灯し、残りの時間を消灯する明暗 12 時間サイクルで維持した。

採血

食前採血(4-5ml)は頸静脈から無鎮静下で行った。高脂肪食給与前および 8 週間の高脂肪食給与後に採血を行い、2.5ml の血液を RNA 安定、保存、輸送のために PAX gene RNA tube（PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland）に、残量をヘパリンチューブに採取した。ヘパリンチューブに採取した血液は直ちに 4°C 下で $1500 \times g$ で 10 分遠心し血漿を得て、血漿は解析まで -30°C で保存した。

血漿中代謝産物および肝逸脱酵素の解析

血漿中総コレステロール、総タンパク、血糖、血中尿素窒素およびクレアチニン濃度と、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) および乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は、AU680 autoanalyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて指示書に従い測定した。

リアルタイム PCR による末梢血白血球 mRNA 発現量の解析

白血球の Total RNA は TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて指示書に従い抽出した。抽出した Total RNA は分光光度計で吸光度を測定・濃度産出し、逆転写反応液中に Total RNA が 1 μ g となるように調整し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて逆転写反応を行い、サンプルとした。

リアルタイム PCR は Perfect Real Time SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Shiga, Japan) を用いて、ABI 7300 Real Time PCR Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で 2 μ l のサンプル cDNA、0.8 μ l のそれぞれのプライマー、10 μ l の SYBR Premix Ex Taq II、0.4 μ l の ROX Reference Dye および 6.0 μ l の滅菌水を含む反応液を 95 $^{\circ}$ C 30 秒加熱の後、95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 35 秒、40 サイクルを行い測定した。プライマー 1、2 を IL-1 α に、プライマー 3、4 を IL-1 β に、プライマー 5、6 を IL-2 に、プライマー 7、8 を IL-6 に、プライマー 9、10 を IL-8 に、プライマー 11、12 を TNF- α に、プライマー 13、14 を SIRT1 に、プライマー 15、16 を SIRT3 に、プライマー 17、18 を Beta-actin 測定用に設計した (Table 2)。定量はそれぞれの遺伝子断片を含んだプラスミド DNA を段階希釈したものを使い、検量線を作製して算出した。

統計処理

数値は平均 \pm 標準誤差で表し、統計は *t*-検定を用いて行った。すべての統計は GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。

Table 2. リアルタイム PCR に用いたプライマー

Primer	Kind	Sequence (5'-3')	Position	Accession Number
IL-1 α				NM_001009351
1	Sense	ACTGTTTCGTGAGTGCCCAA	579 – 589	
2	Antisense	GCCATGACGTTCCCAGAAGA	684 – 665	
IL-1 β				NM_001077414.1
3	Sense	TGGCACCAGTACCTGAACTC	46 – 65	
4	Antisense	GCAACTGGATGCCCTCATCT	195 – 175	
IL-2				NM_001043337
5	Sense	AAACTCTCCAGGATGCTCACA	214 – 224	
6	Antisense	ACTTCCTCCAGAGGTTTGAGT	307 – 286	
IL-6				NM_001009211.1
7	Sense	GCTACTGCTTTCCCTACCCC	69 – 88	
8	Antisense	GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC	259 – 240	
IL-8				NM_001009281
9	Sense	CGAAAGCACCTTGCGTCAAC	3 – 22	
10	Antisense	GCACTGGCATCGAAGTTCTG	130 – 110	
TNF- α				NM_001009835.1
11	Sense	CCCACTCTTCTGCCTGCT	134 – 152	
12	Antisense	GAGTTGCCCTTCAGCTTCGG	305 – 287	
SIRT1				NM_001290246.1
13	Sense	CGCCTTGCAATAGACTTCCC	897 – 917	
14	Antisense	TGAATTTGTGACAGAGAGATGGTTG	1042 –	
SIRT3				NM_001290245
15	Sense	TGCTTCTGCGGCTCTACAC	635 – 653	
16	Antisense	TGTCTCCCCAAAGAACACGA	864 – 845	
Beta-actin				AB051104.1
17	Sense	GCCAACCGTGAGAAGATGACT	152 – 172	
18	Antisense	CCCAGAGTCCATGACAATACCAG	280 – 257	

2.3 結果

高脂肪食給与前後の体重、血漿中代謝産物および肝逸脱酵素の比較

高脂肪食給与前後における体重、血液代謝産物および肝逸脱酵素の測定値を Table 3 に示す。総コレステロール、乳酸脱水素酵素、総タンパク、血糖、血中尿素窒素およびクレアチニンの測定値は、有意な変化は認められなかった。一方、体重、肝逸脱酵素である ALT、ALP および AST の測定値は有意に上昇していた ($P < 0.01$)。

Table 3. 高脂肪食給与前後における臨床徴候、血漿代謝産物および肝逸脱酵素

	給与前		給与後		
体重 (kg)	2.6	± 0.2	3.2	± 0.3	**
総コレステロール (mg/dL)	100.6	± 4.3	100.6	± 9.4	
ALT (U/L)	41.6	± 4.7	69.6	± 6.8	**
ALP (U/L)	76.6	± 14.5	101.2	± 12.2	**
AST (U/L)	24.8	± 1.3	32.2	± 1.1	**
乳酸脱水素酵素 (U/L)	141.8	± 21.9	131.4	± 19.9	
総タンパク (g/dL)	6.5	± 0.2	6.7	± 0.2	
血糖 (mg/dL)	72.6	± 3.1	77.3	± 0.6	
血中尿素窒素 (mg/dL)	20.0	± 1.5	21.4	± 0.9	
クレアチニン (mg/dl)	0.9	± 0.2	1.0	± 0.1	

平均値 ± 標準誤差

** $P < 0.01$

高脂肪食給与前後における炎症性サイトカイン mRNA 発現量の比較

高脂肪食給与前後における、末梢血白血球炎症性サイトカイン mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって測定した(Figure 6)。高脂肪食給与によって末梢血白血球における IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 および TNF- α mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。

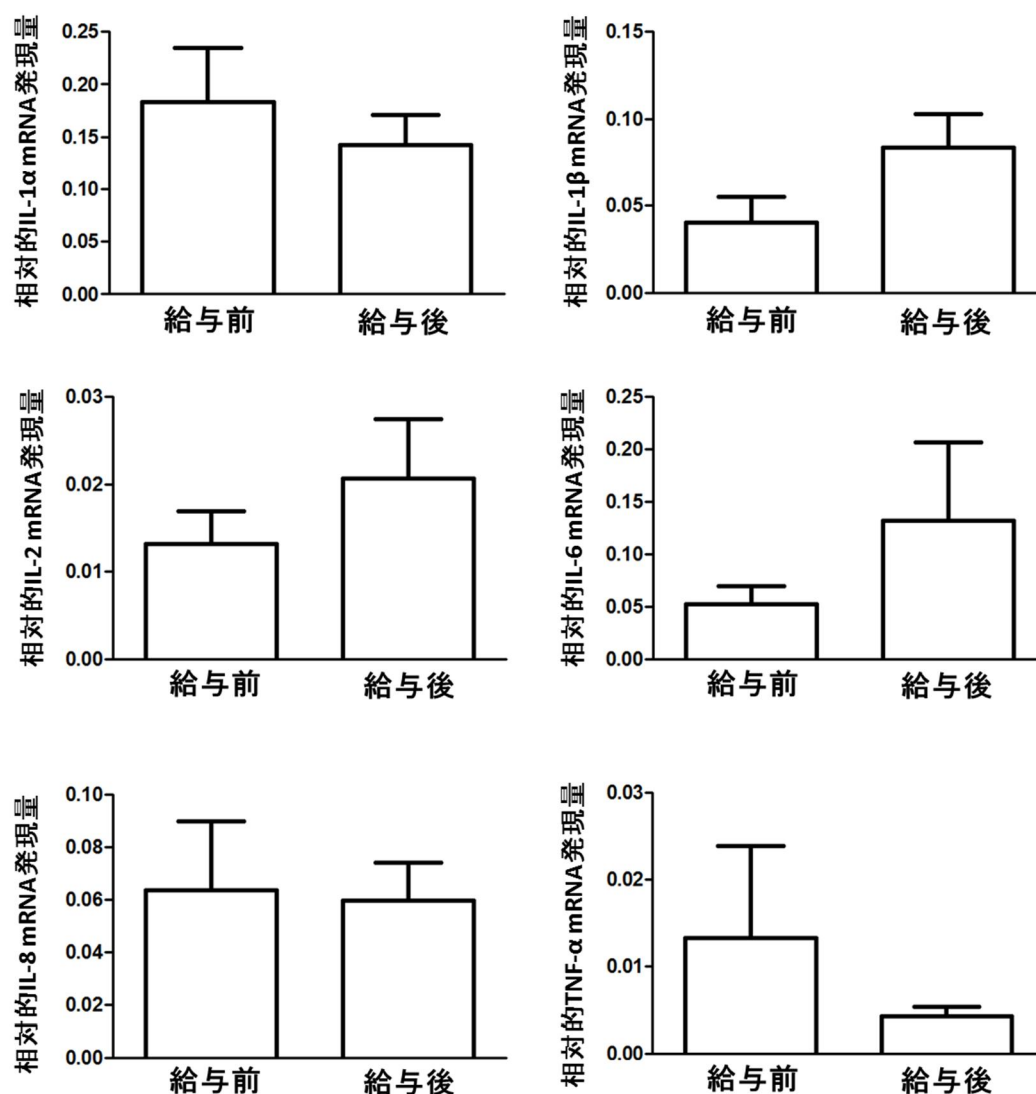


Figure 6. 末梢血白血球における IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 および TNF- α mRNA 発現量

各グラフ左の縦棒が高脂肪食給与前、右の縦棒が給与後を示す。各 mRNA 発現量は、Beta-actin mRNA 発現量に対する比とし、平均値±標準誤差 (n=5) で表している。群間の測定値は *t*-検定により検定した。

高脂肪食給与前後における SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現量の比較

高脂肪食給与前後における末梢血白血球 SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって測定した(Figure 7)。ネコ末梢血白血球 SIRT1 mRNA 発現量は高脂肪食給与後に有意に増加した($P < 0.05$)。一方、SIRT3 mRNA 発現量は高脂肪食給与前後で有意な変化は認められなかった。

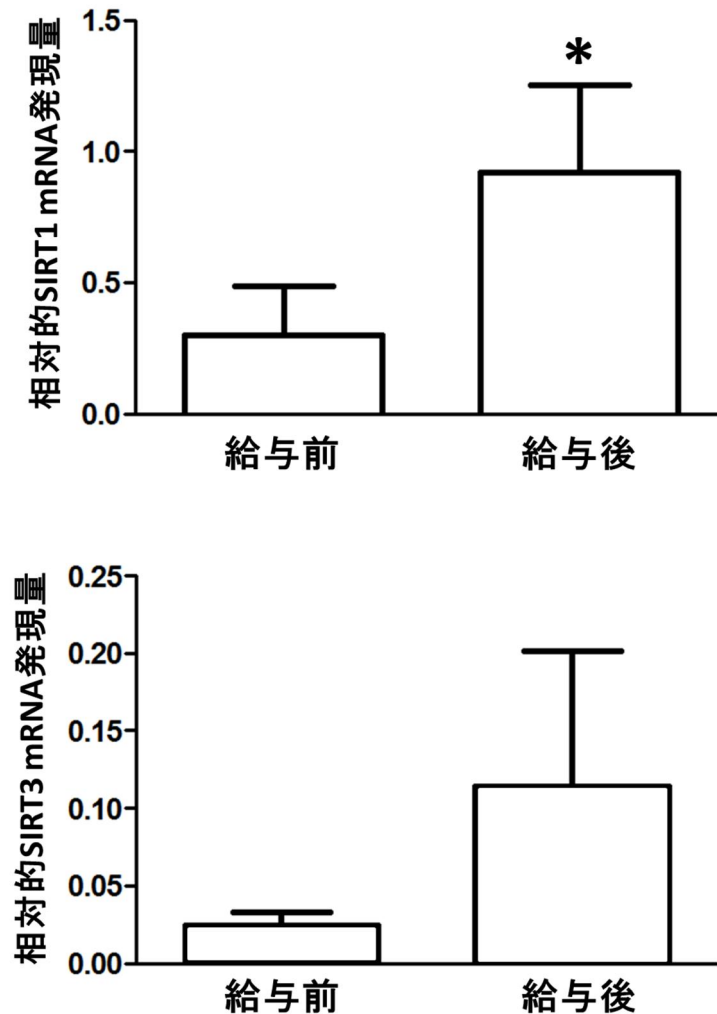


Figure 7. 末梢血白血球における SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現量の変化

各グラフ左の縦棒が高脂肪食給与前、右の縦棒が給与後を示す。各 mRNA 発現量は、Beta-actin mRNA 発現量に対する比とし、平均値±標準誤差 ($n=5$) で表している。群間の測定値は t -検定により検定した。* $P < 0.05$

2.4 考察

ネコに 8 週間高脂肪食を給与し、給与前後における体重、血漿中代謝産物および肝逸脱酵素と、末梢血白血球の炎症性サイトカインおよび SIRT1、3 mRNA 発現量について解析した。高脂肪食給与は疫学的に肥満と相関関係があることが示されており、様々な動物においてメタボリックシンドロームや脂肪毒性の解析に用いられることから (Hariri et al., 2010)、今回の実験においてネコの脂肪毒性解析のために用いた。

8 週間の高脂肪食給与により、体重が有意に増加したが、総コレステロール、乳酸脱水素酵素、総蛋白、血糖、血中尿素窒素およびクレアチニンの測定値は有意な変化は認められなかった。一方、ALT、ALP および AST 測定値が高脂肪食給与により有意に増加していた。ALT、ALP および AST は主に肝臓に存在する酵素で、炎症により細胞自体が破壊されたり、細胞膜の透過性が亢進したりすることによって血液中に流出することから、逸脱酵素と呼ばれており (Downs et al., 1997)、肝臓における炎症を反映する。2014 年に Mori らはネコにおいても 8 週間の高脂肪食給与により、肝臓に脂肪が蓄積し、酸化ストレスマーカーの値が変化することを報告している。以上から、ネコにおける脂肪毒性は、肝臓に蓄積した脂肪による炎症によって惹起されることが推測される。更なる脂肪毒性の解明のために、組織における詳細な解析や長期間の高脂肪食給与について検討することが必要と考えられる。

肝臓や脂肪組織で産生された炎症性サイトカインや遊離脂肪酸は末梢血白血球に作用し、炎症性サイトカイン mRNA の発現を上昇させることが肥満・糖尿病モデルである *db/db* マウスで報告されている (Fujimoto et al., 2010)。今回、我々は高脂肪食給与 8 週間後のネコ末梢血白血球における炎症性サイトカイン mRNA 発現量を測定したが、給与前と比較して有意な変化は認められなかった。マウスにおける高脂肪食給与による炎症は、短期間給与では抑制性機構により発現せず、長期間給与によって抑制性機構が破綻することで発現する (Lee et al., 2011)。よって、今回の高脂肪食給与 8 週間後のネコでは、マウス

同様末梢血白血球においては抑制性機構が働き、炎症性サイトカイン mRNA 発現が抑制されていたと推測される。

サーチュインの発現は栄養状態によって調節されており、哺乳類においてはカロリー制限により上昇し (Cohen et al., 2004; Hebert et al., 2013)、高脂肪食により低下する (Deng et al., 2007; Kendrick et al., 2011)。今回、ネコにおいて 8 週間の高脂肪食給与後の末梢血白血球における SIRT1 および SIRT3 mRNA 発現量を解析した結果、SIRT3 mRNA では有意な変化は認められなかったが、SIRT1 mRNA の発現が有意に上昇していた。本来サーチュインの発現は飢餓状態によって上昇するが、今回、血漿中総コレステロールや血糖値といった栄養代謝測定値が変化していないことから、末梢血白血球における SIRT1 mRNA 発現は栄養状態ではない別の因子によって制御されたと考えられる。マウスでは、高脂肪食給与により肝臓等のインスリン感受性組織において SIRT1 mRNA 発現が低下し、炎症反応を惹起させるが (Deng et al., 2007)、血管内皮細胞や白血球等においては、SIRT1 mRNA 発現が上昇し炎症を抑制することが報告されている (Zhang et al., 2010)。したがって、肥満ネコの末梢血白血球における SIRT1 mRNA 発現の上昇は、高脂肪食給与によって惹起された肝臓や脂肪組織等からの炎症性刺激に対する抑制反応であると考えられる。マウスにおける高脂肪食給与時の NF- κ B 応答が SIRT1 上昇によって抑制され、インスリン抵抗性が抑制されたとの報告からも (Pfluger et al., 2008)、肥満による脂肪毒性の抑制にネコ SIRT1 による炎症抑制機構が重要な役割を果たしていると考えられる。

以上から、ネコ SIRT1 は炎症抑制機構を介して肥満による脂肪毒性を抑制していることが考えられ、その詳細な分子機構について詳しく検討する必要があると考えられる。

2.5 小括

本章ではネコに高脂肪食を 8 週間給与することによって、血漿中栄養代謝測定値は有意な変化が認められないが、肝逸脱酵素測定値が有意に上昇することから、脂肪毒性によって肝臓において炎症が惹起されることを明らかにした。

末梢血白血球においては高脂肪食によって炎症性サイトカイン mRNA 発現量は変化しない一方で、SIRT1 mRNA 発現が有意に上昇することを明らかにした。ネコの脂肪毒性は肝臓における脂肪蓄積および炎症から惹起され、その脂肪毒性抑制に SIRT1 が関わっていることが示唆された。これは SIRT1 の炎症抑制機構を介していると考えられる。

第 3 章 ネコ NF- κ B p65 cDNA クローニングと機能解析

3.1 結論

NF- κ B は転写因子として免疫・細胞生存・分化・増殖において重要な役割を果たしている (Li and Verma., 2002; Courtois and Gilmore., 2006)。NF- κ B シグナル伝達経路はサーチュイン同様、軟体動物から哺乳類にいたる幅広い生物種において機能しており (Montagnani et al., 2004)、哺乳類では、RelA (p65)、RelB、c-Rel、p50 (NF- κ B1) および p52 (NF- κ B2) の 5 種類の NF- κ B ファミリーが存在する (Caamaño and Hunter, 2002)。すべてのサブユニットは N 末端 Rel ホモロジー領域(Rel homology domain : RHD)を共有し、RHD はホモおよびヘテロ二量体化、核移行、阻害タンパク質との結合およびシスエレメントとの結合に必要とされる (Ghosh and Karin, 2002)。p65、c-Rel および RelB はトランス活性化領域 (transactivation domain : TAD1 および TAD2)を有しており、転写活性化能を有する。一方、p50 および p52 は TAD を有さないため、そのホモ二量体は転写活性化能を持たないが、他の NF- κ B サブユニットとのヘテロ二量体形成および、他の転写因子との相互作用により転写を調節する (Hayden and Ghosh, 2008)。NF- κ B 二量体の阻害タンパク質として Inhibitor of κ B (I κ B) が重要な役割を果たしており、I κ B は I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ 、I κ B ϵ 、Bcl-3、前駆タンパク p100 および p105 のファミリーが存在する。I κ B は NF- κ B の RHD に存在する核局在シグナル(nuclear localization signal : NLS)を覆い隠すことにより NF- κ B 二量体を細胞質に留め、シスエレメントへの結合を阻害している。炎症性シグナル等の刺激が起こることにより、I κ B が I κ B キナーゼ複合体によりリン酸化、ユビキタス化され 26S プロテアソームにより分解されることにより NF- κ B の NLS が露出され、NF- κ B 二量体は核に移行し炎症性サイトカインなどの標的遺伝子の転写を活性化する (Ghosh and Karin, 2002)。

p50/p65 ヘテロ二量体は、最も多くの組織で発現している NF- κ B 二量体であり、p65 は TAD を有する NF- κ B タンパク質の中で唯一普遍的に存在するサブ

ユニットである。他のサブユニット欠損マウスは免疫不全を引き起こすのみであるが (Li and Verma, 2002)、p65 欠損マウスは肝細胞のアポトーシスにより 15 日胚で胚致死となることから最も重要な NF- κ B サブユニットであると考えられている (Beg et al., 1995)。近年、p65 の機能には翻訳後修飾が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。p65 には多くのリン酸化アミノ酸残基やアセチル化アミノ酸残基が存在し、それらのリン酸化、アセチル化は NF- κ B 転写活性化能を様々な形で調節している (Perkins, 2006)。p65 の翻訳後修飾において、サーチュイン 1 (SIRT1) による p65 リジン残基の脱アセチル化は重要な役割を果たしており (Yeung et al., 2004)、骨髄細胞特異的に SIRT1 をノックアウトしたマウスにおいては、アセチル化 p65 の増加により NF- κ B 転写活性および炎症性サイトカインの産生が亢進する (Schung et al., 2010)。

NF- κ B による炎症性サイトカイン転写の活性化は慢性炎症や自己免疫異常を惹起し、様々な疾病に関与している。特に、代謝性・加齢性疾病の病因形成における働きは大きな注目を集めている (Ben-Neriah and Karin, 2011; Baker et al., 2011)。ネコにおいても同様であると考えられ、ネコ p65 に関する臨床研究が近年報告されているが (Tamamoto et al., 2013)、ネコ p65 の完全長 cDNA 塩基配列を含め、その分子的特性はほとんど報告されていない。

第 3 章ではネコ p65 に関する基礎的な知見を得るために、ネコ p65 の完全長 cDNA クローニング、成熟個体組織由来の各組織における mRNA 発現解析、ネコ p65 の NF- κ B 転写活性の解析および炎症性サイトカイン mRNA 発現解析を行った。

3.2 材料と方法

組織材料と細胞培養

Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) は 10% FBS (HyClone Laboratories, Utah, USA) および 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含んだ F-12 Ham's medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で、human embryonic kidney epithelial cells (HEK293) は 10% FBS および 1% antibiotic-antimycotic solution を含んだ D-MEM (Wako) で、湿度 95%、5%CO₂、37℃の環境下で培養した。

子宮組織は 5～8 ヶ月齢の健康な雑種猫から避妊手術の際に摘出された。飼い主からは記載されたインフォームドコンセントを得た。摘出された子宮組織は外科用メスによって細片化し、PBS で洗浄を数回行った後、100-mm ディッシュに 10%FBS および 1% antibiotic-antimycotic solution を含んだ D-MEM で湿度 95%、5%CO₂、37℃の環境下で培養した。2～3 日で線維芽細胞が接着細胞片から遊走し、接着していない細胞片は取り除いた。初代細胞が 70 から 80% コンフルエントになった後、0.25%トリプシン、1mM EDTA (Invitrogen) を用いて 2.0×10^6 個/dish になるように継代した。継代数 3 から 6 の細胞を実験に用いた。

ネコ p65 cDNA のクローニング

Total RNA は Zyagen (Zyagen, San Diego, CA, USA) から購入したネコ大脳皮質 (雑種、3 歳、オス) RNA を用いた。分光高度計を用いて 260nm で RNA の量を測定し、260/280 比および 260/230 比で品質を確認した。cDNA ライブラリーの作製は SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, mountain View, CA) を用い、指示書に従って行った。プライマーは GenBank のネコ p65 の mRNA 予想配列 (GenBank Accession number XM_006937605) を参考に作製した。まずプライマー 1 および 2 を用いて p65 の PCR 断片を得た後にシーケンスを行い、部分的な塩基配列を決定した (Table 4)。得られた部分シーケンスを参考に、3' 末端シーケンスのためにプライマー 3 を、5' 末端シーケンスのためにプライマー 4 を作製しそれぞれ RACE-PCR を行った。PCR は各プライマー 0.2 μ M ずつと、Ex Taq DNA Polymerase (Takara, Shiga, Japan) を用いて 30 サイクル 98 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分の条件で行った。この反応で得た断片は T-Vector pMD19 (Takara) にクローニングし、シーケンスは FASMAC (FASMAC Co., Ltd., Kanagawa, Japan) のシーケンスサービスを用い塩基配列を決定した。

ネコ p65 哺乳類細胞タンパク発現ベクターの作製

ネコ p65 の哺乳類細胞タンパク質発現ベクターを作製するために、前述の cDNA ライブラリーからプライマー 5 および 6 を用いて翻訳領域を PCR で増幅した。PCR は各プライマーを 0.2 μ M ずつと、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) を用いて 30 サイクル 98 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、68 $^{\circ}$ C 2 分の条件で行った。続いて pcDNA3.1/V5-His B (Invitrogen) を *Hind* III (Takara) および *Bam*HI (Takara) を用いて制限酵素処理し、直線化したベクターに PCR で得た断片を In-Fusion HD cloning kit (Clontech) を用いて指示書に従ってサブクローニングした。クローニングされた発現ベクター (pcDNA3.1-p65) はシーケンスを行い、塩基配列を確認した後に実験に使用した。

リアルタイム PCR によるネコの各組織における p65 mRNA 発現の解析

Zyagen から購入した Total RNA (1 μ g) を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen, Hilden, Germany)を用いて逆転写反応を行い、サンプルとした。

リアルタイム PCR 反応は Perfect Real Time SYBR Premix Ex Taq II (Takara)を用いて、ABI 7300 Real Time PCR Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で 2 μ l のサンプル cDNA、0.8 μ l の各プライマー、10 μ l の SYBR Premix Ex Taq II、0.4 μ l の ROX Reference Dye および 6.0 μ l の滅菌水を含む反応液を 95 $^{\circ}$ C 30 秒加熱の後、95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 35 秒、40 サイクルを行い、測定した。プライマー7、8 を p65 に、プライマー9、10 を Beta-actin 測定用に設計した。定量はそれぞれの遺伝子断片を含んだプラスミドを段階希釈したものを使い、検量線を作製し算出した。

ルシフェラーゼアッセイ

CHO-K1 細胞、HEK293 細胞およびネコ線維芽細胞はそれぞれ 3×10^4 個/well (CHO-K1 および HEK293)、 2×10^4 個/well (線維芽細胞)で 96well プレートに播種し、指示書に従い lipofectamine 2000 (Invitrogen) 0.5 μ l/well を用いて、それぞれのベクター遺伝子を導入した。導入効率は pEGFP-N1 (Clontech) を同時に導入することにより問題がないことを確認した。それぞれの細胞には発現ベクターを 40ng/well (mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B, pcDNA3.1-p65) およびレポーターベクター pGL4.32 [*Luc2P*/NF- κ B-RE/Hygro] (Promega) を 40ng/well の濃度で導入した。また、標準化のために、pGL4.73 [*hRluc*/SV40] (Promega) を 20ng/well の濃度ですべての細胞に導入した。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を使い、導入 48 時間後に指示書に従って行った。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性により標準化した。

線維芽細胞における p65 過剰発現による炎症性サイトカイン mRNA 発現量の解析

ネコ線維芽細胞を 1×10^5 個/well で 12-well プレートに播種し、lipofectamine 2000 4.0 μ l を用いてそれぞれのベクター(mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B, pcDNA3.1-p65)を 4 μ g/well となるように導入した。導入効率は pEGFP-N1 (Clontech) を同時に導入することにより問題がないことを確認した。導入 48 時間後に Total RNA を TriPure Isolation Regent (Boehringer, Mannheim, Germany) を用いて指示書に従って抽出し、Quantus™ Fluorometer (Promega) を用いて RNA 量を測定した。その後、抽出した RNA を前述のように逆転写し、リアルタイム PCR を行い、炎症性サイトカイン mRNA 発現量を測定した。プライマー 11、12 は IL-1 β に、プライマー 13、14 は IL-6 に、プライマー 15、16 を TNF- α 測定用に設計した。定量はそれぞれの遺伝子断片を含んだプラスミドを段階希釈したものを使い検量線を作製し算出した。

Table 4. PCR に用いたプライマー

Primer	Kind	Sequence (5'-3')	Position	Accession Number
p65				AB930130
1	Sense	TGTTTCCCCTCATCTTCCC	126 – 144	
2	Antisense	GAGAAGTCTTCATCCCCTGAG	1731 – 1710	
3	Sense	GCTGCTGAACCAGGGTGTATCTGTGG	1555 – 1580	
4	Antisense	TGCTCCAGGTCCCGCTTCTTTACAC	498 – 474	
5	Sense	CTGGCTAGTTAAGCTCATGGACGACCTGTTTCC	115 – 132	
6	Antisense	CTGGACTAGTGGATCTTAGGAGCTGATCTGACTC	1784 – 1765	
7	Sense	TGTAAAGAAGCGGGACCTGG	475 – 494	
8	Antisense	AGAGTTTCGGTTCACCTCGGC	724 – 705	
Beta-actin				AB051104.1
9	Sense	GCCAACCGTGAGAAGATGACT	152 – 172	
10	Antisense	CCCAGAGTCCATGACAATACCAG	280 – 257	
IL-1 β				NM_001077414.1
11	Sense	TGGCACCAGTACCTGAACTC	46 – 65	
12	Antisense	GCAACTGGATGCCCTCATCT	195 – 175	
IL-6				NM_001009211.1
15	Sense	GGCTACTGCTTTCCTACCC	69 – 88	
16	Antisense	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT	259 – 240	
TNF- α				NM_001009835.1
17	Sense	CCACACTCTTCTGCCTGCT	134 – 152	
18	Antisense	GAGTTGCCCTTCAGCTTCGG	305 – 287	

3.3 結果

ネコ p65 cDNA 遺伝子のクローニング

ネコ十二指腸 cDNA ライブラリーからの p65 全長クローニングの結果を Figure 8 に示した。ネコ p65 は 5' 末端側に 115bp の非翻訳領域、555 のアミノ酸をコードする 1665bp の翻訳領域、3' 末端側に 793bp の非翻訳領域で構成されていた。ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)を用いてその分子量を計算したところ 59.3kDa であると予想された。ネコゲノム情報 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)を用いたコンピューター解析により、ネコ p65 は cDNA 最初の塩基を 1 としての塩基番号 122、123 番間に 0.6kb、149、150 番間に 0.2kb、301、302 番間に 0.5kb、450、451 番間に 0.9kb、542、543 番間に 0.6kb、674、675 番間に 1.0kb、779、780 番間に 0.5kb、992、993 番間に 2.5kb、1073、1074 番間に 0.2kb、1148、1149 番間に 2.2kb のイントロンを含む 10 のエキソンで構成されていることが予想され、イントロンの 5' および 3' 末端はスプライシングの GT-AG ルールに従っていた (Breathnach and Chambon P, 1981)。また、ネコ p65 は 3' 末端近傍にポリアデニル化シグナルを有していた。

```

GCAGTGACGCGGCGGCGGCGCGCGCGCATTTCCGCCTCTGGCGAATGGCTTGGCTGTAGCGCGCGCGCGGCCAGCTGCGACCC 90
      M D D L F P L I F P T E P A Q A S G P Y V E
CGGCCCCGCCCCCGGACCGTGGCCATGGACGACCTGTTCCCTCATCTTCCGACTGAGCCGCGCCAGGCTCTGGCCCTTATGTGGA 180
      ▲1 ▲2

I I E Q P K Q R G M R F R Y K C E G R S A G S I P G E R S T
GATCATCGAGCAGCCCAAGCAGCGGGGATGCGCTTCCGCTACAAGTGCAGGGTGCCTCCGCGGGCAGTATCCCGGCGAGAGGACAC 270
D T T K T H P T I K I N G Y T G P G T V R I S L V T K D P P
GGATACCACCAAGACCCACCCCATCAAGATCAATGGCTACACCGGGCCAGGGACGTTGCGATCTCATTGGTCACCAAGGACCCCC 360
      ▲3

H R P H P H E L V G K D C R D G F Y E A E L C P D R C I H S
TCATCGGCCTCACCCCATGAGCTGGTGGGAAAGACTGCCGGGATGGCTTCTATGAGGCTGAGCTCTGCCAGACCGCTGCATCCACAG 450
F Q N L G I Q C V K K R D L E Q A I S Q R I Q T N N N P F Q
CTTCCAGAACCTGGGGATCCAGTGTGTAAAGAAGCGGACCTGGAGCAGGCCATCAGTCAACGTATCCAGACCAACAACATCCCTTCCA 540
      ▲4

V P I E E Q R G D Y D L N A V R L C F Q V T V R D P A G R P
AGTTCCCATAGAAGAACAGCGTGGGGACTACGACCTGAATGCGGTGCGGCTCTGCTTCCAGGTGACGGTGCGGGACCCGCGCAGGCAGGCC 630
      ▲5

L R L P P V L S H P I F D N R A P N T A E L K I C R V N R N
CCTCCGCTTGCCACCTGTCTCTCGCATCCCATCTTTGACAACCGTGCCCCAACACCCCGAGCTCAAGATCTGCCAGTGAACCGAAA 720
      ▲6

S G S C L G G D E I F L L C D K V Q K E D I E V Y F T G P G
CTCTGGGAGCTGCCTCGGGGGGATGAGATCTTCTGCTGTGTGACAGGTGCAGAAAGAGGACATCGAAGTGTATTTACGGGACCCAGG 810
      ▲7

W E A R G S F S Q A D V H R X V A I V F R T P P Y A D P S L
CTGGGAGGCCCGAGGCTCCTTTTCTCAAGCTGACGTACCCGAC-AGTGCCATTGTGTTCCGGACACCTCCCTATGCCGACCCCGACCT 900
Q A P V R V S M Q L R R P S D R E L S E P M E F Q Y L P D T
GCAGGCCCCCGTGCCTGTCTCCATGAGCTGCGGCGGCTTCAGATCGGGAGCTCAGCGAGCCCATGGAATTTAGTACTTGCAGACAC 990
D D R H R I E E K R K R T Y E T F K S I M K K S P F N G P T
AGATGATCGTACCCGGAATTGAGGAGAAACGCAAAAGGACATATGAGACCTTCAAGAGCATCATGAAAAAGAGTCTTTCAATGGACCCAC 1080
      ▲8 ▲9

D P R P P P R R I A V P S R S S A A V P K P A P Q P Y P F T
CGACCCCGGCTCCACCCCGCGCATTTGCTGTGCTTCCGGAAGCTCAGTGCCGTCCCCAGCCAGCTCCCCAGCCCTATCCCTTTAC 1170
      ▲10

P S L S T I N F E E F S P M V F P S G Q I P S Q T P A L A P
GCCATCCCTCAGCACCATCACTTCGAGGAGTTCTCCCCATGGTCTTCCCTTCCGGGAGATCCCAAGCCAGACCCCTGCCTTGGCACC 1260
A P A P I L A P A S V P A P A P V P A P A P A P A P A P A P
AGCCCTGCCCCAATCTGGCCCCAGCCCTGCCTCTGTCCCGGCCCTGCCCTGTCCCCGCCCTGCCCGGCCCGAGCCCGGCCCC 1350
A P I L A P G L A Q A V V P P A P K T T Q A G E G T L T E A
TGCCCCAATCTTAGCCCCAGGCCCTTGTCTCAGGCTGTGGTCCCGCTGTCTCCAGACCCAGGCTGGGGAAGGGACGCTGACGGAGGC 1440
L L H L Q F D A D E D L G A L L G N S A D P A V F T D L A S
CCTGTGACCTGCAGTTTGAGCGTGAAGACCTGGGGCCCTGCTTGGCAACAGCGCCGACCCAGCAGTGTTACAGACCTTGGCATC 1530
V D N F Q Q L L N Q G V S V A P H P A E P M L M E Y P E
CGTCGACAACTCTGAGTTTTCAGCAGCTGCTGAACAGGCTGTATCTGTGGCCCCCAGCCAGCTGAGCCCATGCTGATGGAATACCTGA 1620
A I T R L V T G S Q R P P D P A P A P L G A S G L P N G L L
GGCAATAACTCGCTGGTACGGGATCCAGAGGCCCTGACCCAGCTCCCGCTCCCTGGGGGCTCTGGGCTTCCCAACGGCCTCT 1710
S G D E D F S S I A D M D F S A L L S Q I S S *
CTCAGGGGATGAAGACTTCTCTTCCATTGCCGACATGGACTTCTCAGCCCTTCTGAGTCAGATCAGCTCCTAAGGGGGTGACACTTACCC 1800
TGCTGGGGTACTGGGTGCGAGGGGATTGAAGCCCTCCCAAGCAAGCACTTATGGATTGCGGGAGGGGGGTGTGCTCCAAGTGCCTTCC 1890
ACTTCTTTGGGTGATGTCTTCCGGGGGCTGCATTTTATCCCTTTTACTGGCAGCGTCTATCTCTCTCTCTTTTGGAGGTGCTTAAGCAGA 1980
AGCATTAACTTCTCTGGAAGCGGGGAGCAGGGAGGACTCAAACCTCCTCCCTATCTCTGATGTTCCGCTCCCTTCTTTACAGGGAATT 2070
CTGGGGCCCCCATCCCTACCTTCCAGCTTCTAATACTCTCTAGAGAGAGGGACAGGCTGGAGCTGTGGCCTTTGAGGCCACAAAGCCT 2160
TATCACCAGTGTCTTACATGATGGAATCAITCACATCTTGTGCCAAATAGTGCTGTATACCAGCTCCTCTGTGGTGTGGCAGCTTG 2250
TCCTTGAACATAACACAGCATTGAGGGCCTGGCCTTCTGGCCCTGAGAGGCTCTGCGAGCTCTCCTTGTCTCAGCTGTGGCTGTAAGG 2340
GAAGTGGCGGACAGCACTGGCCCTGTCCGGGATCCCGGGAGGTTTCGGTTTGAACCTTTCTGTTCCCTTTCTCAAGTGCCTTAAT 2430
AGTAGGGCTAGTTGTTGGAGAGTAGGGGGAGGGCAGGCTGGCAGCTCTCCAATCAAGAGGCTCAGTTTTTACTGAAGAAATCAAAGCA 2520
GTTGGACTCTTGCTCTTTTATTTTGAATTAATAAATTGTTGCCAAGCTGGC 2610

```

Figure 8. ネコ p65 の cDNA と予想アミノ酸配列

開始コドン、終止コドン、イントロンの位置を矢頭で示し、ポリアデニル化シグナルは黒枠で囲っている。右の数字は cDNA 最初の塩基を 1 としての塩基番号を示している。このヌクレオチド配列は GenBank に Accession No. AB930130 として公開されている。

ネコ p65 予想アミノ酸配列の他動物との配列相同性

ネコ p65 の全長アミノ酸配列を他の動物と比較した (Figure 9)。ネコ p65 は 94.2% [イヌ]、91.1% [ウシ]、90.3% [ヒト]、87.5% [マウス] と哺乳類の p65 と非常に高い相同性を示し、54.8% [カエル]、51.9% [ゼブラフィッシュ]、49.2% [ニワトリ]と他の脊椎動物 p65 とは約 50%のアミノ酸配列が相同性を示した。相同性比較によってネコ p65 は RHD、NLS、TAD1 および TAD2 を有していることが予想され、RHD が哺乳類間では 97.4-99.2%、他の動物間では 72.1-78.1%、NLS はすべての動物間で 100%、TAD1 および TAD2 が哺乳類間では 89.2-96.6%、他の動物間では 19.2-35.3%と、哺乳類間で非常に高い相同性で保存されていることが分かった。加えて、哺乳類においてリン酸化標的とされるセリンおよびトレオニン残基、アセチル化標的とされるリジン残基は、ネコ p65 でも完全に保存されていた。

分子系統樹解析の結果、ネコ p65 は哺乳類 p65 の枝に位置しイヌと進化距離が近いことが示された (Figure 10)。

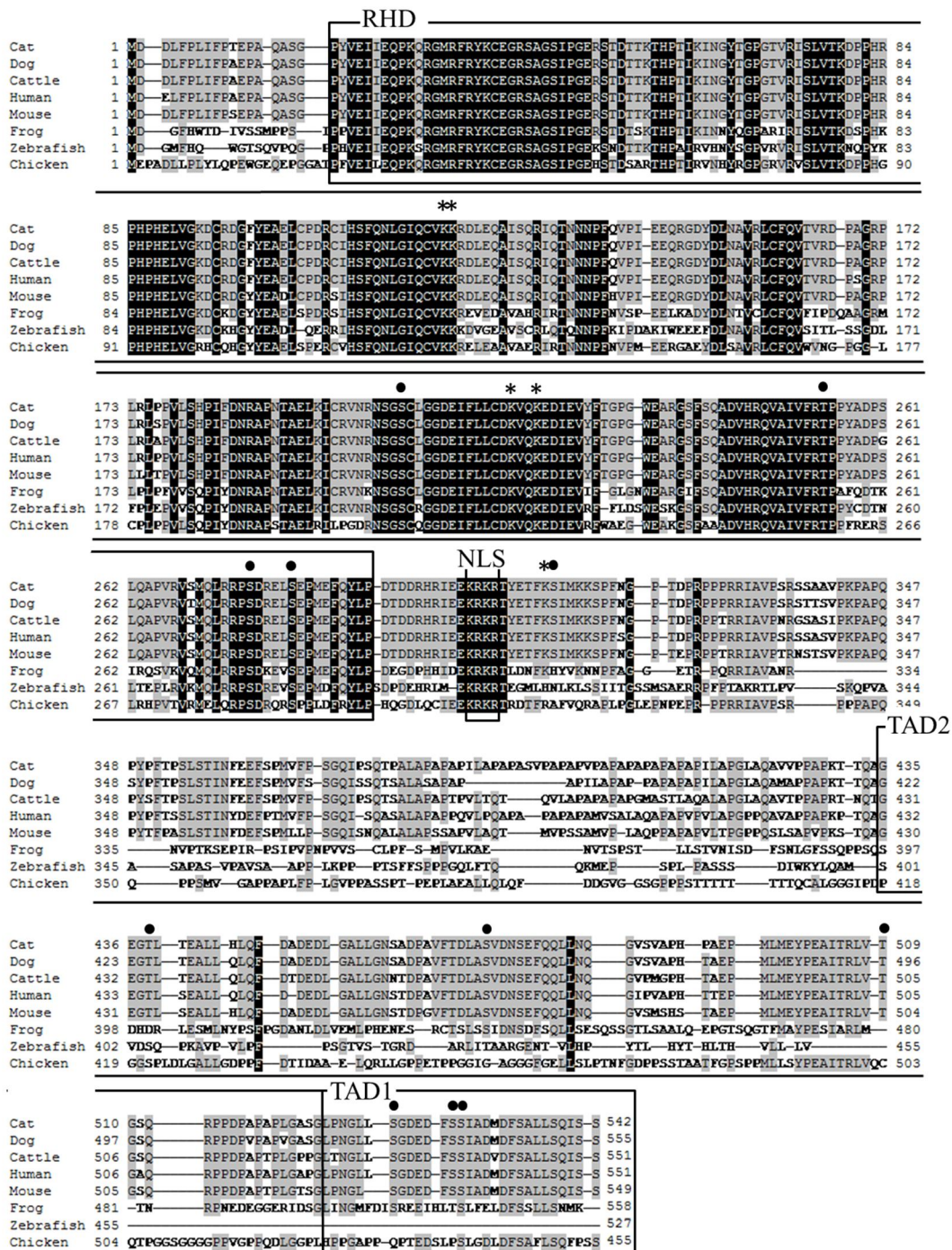


Figure 9. ネコ (Cat) p53 予想アミノ酸配列

他のイヌ (Dog; AB930129)、ウシ (Cattle; NP_001073711.1)、ヒト (Human; NP_068810.3)、マウス (Mouse; NP_033071.1)、カエル (Frog; NP_001081048.1)、ゼブラフィッシュ (Zebrafish; NP_001001839.2) およびニワトリ (Chicken; NP_990460.1) p53 との相同性を示す。各数字はアミノ酸番号を示している。黒地白字はアミノ酸配列が 100% 一致することを示し、灰地黒字のものは 50% 以上相同であることを示している。RHD、NLS、TAD1 および TAD2 を黒枠で囲い示している。リン酸化標的セリンおよびトレオニン残基 (●)、アセチル化標的リジン残基 (*) をそれぞれの記号で示した。

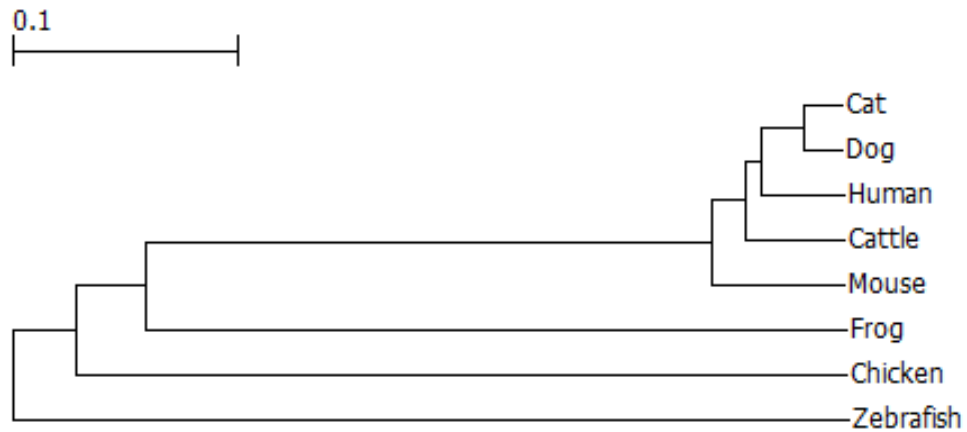


Figure 10. p65 の分子系統樹

ネコ (Cat)、イヌ (Dog)、ヒト (Human)、ウシ (Cattle)、マウス (Mouse)、カエル (Frog)、ニワトリ (Chicken) およびゼブラフィッシュ (Zebrafich) の p65 について GENETYX-win Ver.9.1.0 (GENETYX Corp, Tokyo, Japan)を用いて unweighted pair group method with arithmetic mean method により分子系統樹を作製した。Accession number は Figure 9 に示した。バーおよび 0.1 の数値は進化距離を示している。

ネコ組織における p65 mRNA 発現量の比較

各組織における p65 mRNA 発現解析は、リアルタイム PCR を用いて行った (Figure 11)。3 歳オス雑種ネコにおいて p65 mRNA は脂肪組織、骨髓、大脳皮質、十二指腸、心臓、腎臓、肝臓、膵臓、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓及び胃と解析した全ての組織で発現が検出された。特に脂肪組織、心臓および骨格筋において高い発現が認められ、腎臓、肝臓および膵臓において比較的高い発現が検出された。

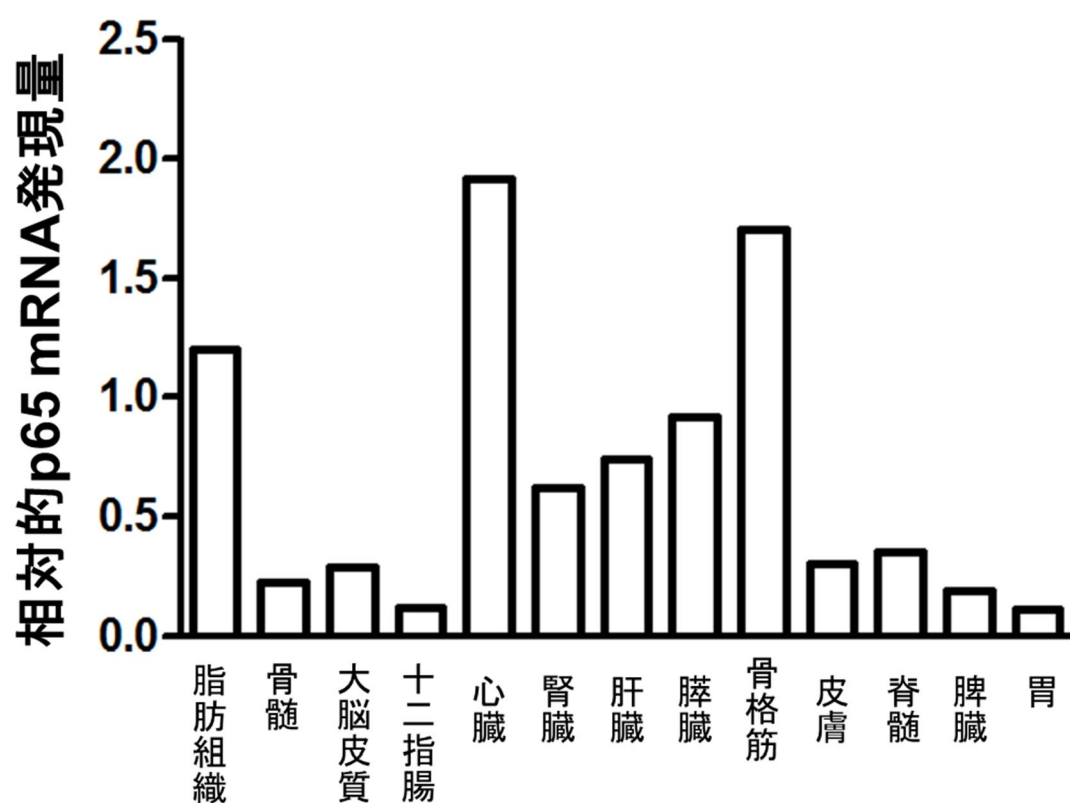


Figure 11. ネコ各組織における p65 の発現量

3 歳オス雑種ネコにおける p65 mRNA 発現量はリアルタイム PCR によって測定した。p65 mRNA 発現量は、Beta-actin mRNA 発現量に対する比で表されている。

ルシフェラーゼアッセイによるネコ p65 の NF- κ B 転写活性の解析

得られた cDNA が機能的な蛋白をコードし、NF- κ B 転写活性能を有しているかをルシフェラーゼアッセイによって解析した。CHO-K1、HEK293 およびネコ線維芽細胞にコントロールとネコ p65 を含むタンパク質発現ベクター (mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B および pcDNA3.1-p65) と、5 つの NF- κ B 結合部位を含む最小プロモーターの制御下にルシフェラーゼコード配列を持つ pGL4.32 [Luc2P/NF- κ B/ Hygro] レポーターベクターを一過性に導入し、そのルシフェラーゼ活性を測定した (Figure.12)。ルシフェラーゼ活性は、すべての細胞において p65 を一過性に発現させることによりコントロールと比較して 100 倍以上に上昇した。

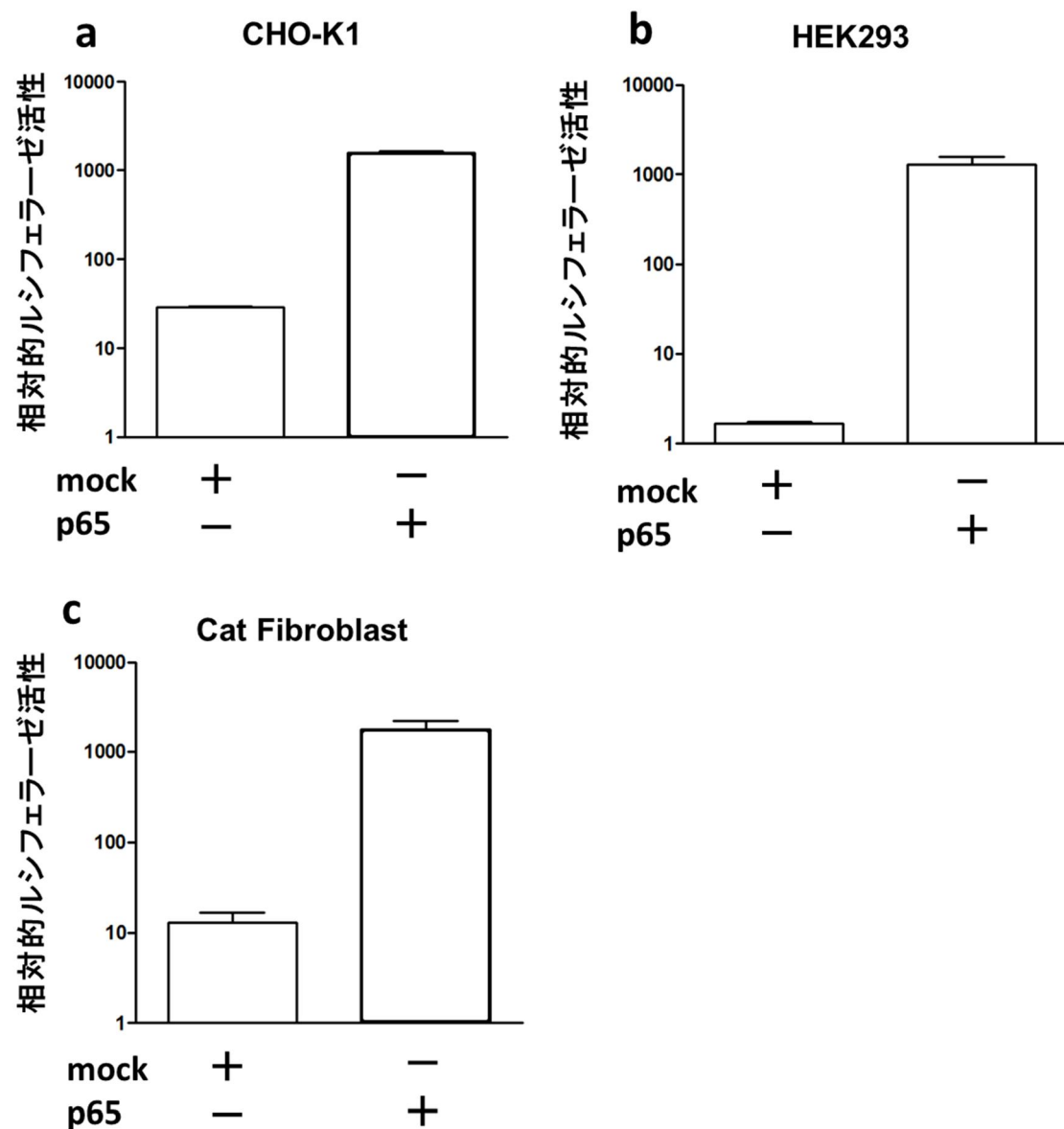


Figure 12. CHO-K1 (a)、HEK293 (b) およびネコ線維芽細胞 (c) のルシフェラーゼ活性

すべての細胞には pGL4.32 [*Luc2P*/NF- κ B/Hygro]ベクターが導入されている。mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B (mock) および pcDNA3.1-p65 (p65) 発現ベクターを一過性に発現させ、発現させたベクターはプラス (+) で示した。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性によって標準化した。結果は 5 つのルシフェラーゼアッセイの結果を平均±標準偏差で表し、同様の結果が 2 つの独立した実験系で得られた。

ネコ p65 の炎症性サイトカイン mRNA 発現に与える影響の解析

ネコ p65 が炎症性反応に与える影響を解析するために、p65 を一過性に発現させたネコ線維芽細胞における炎症性サイトカイン（IL-1 β 、IL-6 および TNF- α ） mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって解析した(Figure 13)。p65 を一過性に発現させることによって、ネコ線維芽細胞におけるすべての炎症性サイトカイン mRNA 発現量は 20 倍以上に上昇した。

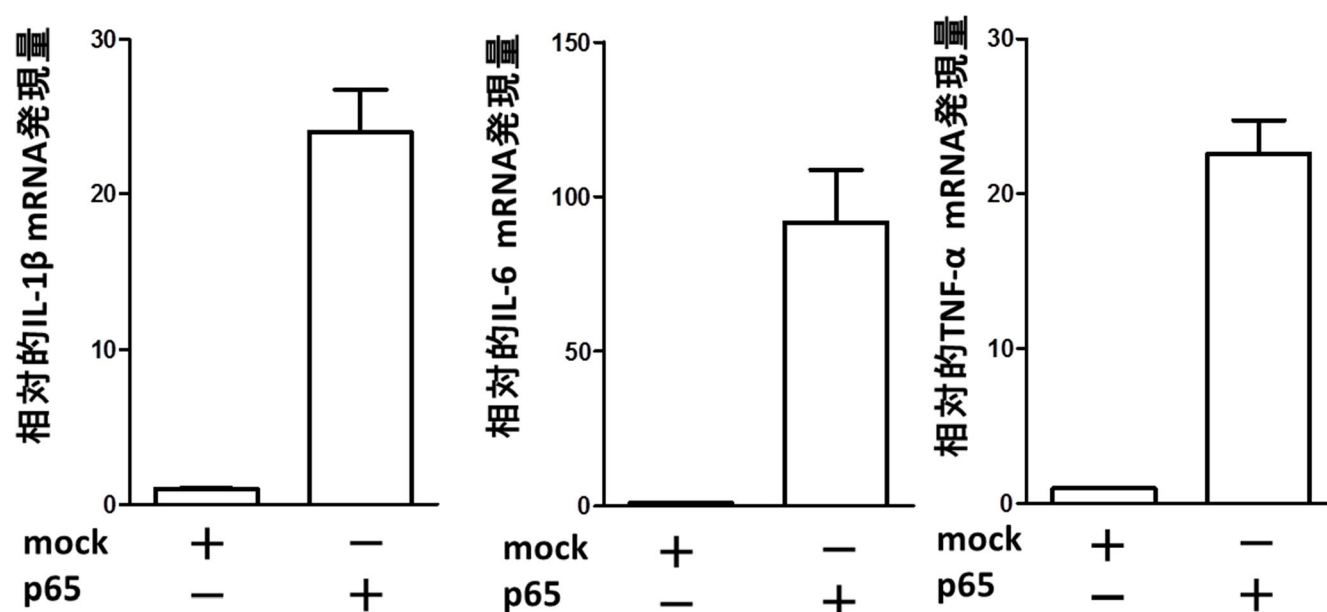


Figure 13. ネコ線維芽細胞における炎症性サイトカイン（IL-1 β 、IL-6 および TNF- α ） mRNA 発現量

各々の細胞には mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B (mock) および pcDNA3.1-p65 (p65) 発現ベクターを一過性に発現させ、発現させたベクターはプラス (+) で示した。それぞれの mRNA 発現量は、Beta-actin mRNA 発現量に対する比で表している。結果は 3 つの PCR の結果を平均 \pm 標準偏差で表し、同様の結果が 2 つの独立した実験系で得られた。

3.4 考察

全長 p65 をネコ cDNA ライブラリーからクローニングすることに成功した。ネコゲノムデータベース (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) においてシークエンスで得たネコ p65 の塩基配列について検索を行った結果、ヒト同様 10 のエキソンと 9 のイントロンで構成され、翻訳エキソンのサイズとイントロンの挿入位置は哺乳類の間で保存されていることが分かった (Nolan et al., 1991)。また、p65 の予想アミノ酸配列解析の結果、非常に高い相同性で RHD、NLS、TAD1 および TAD2 が保存されていた (Ghosh and Karin, 2002; Hayden and Ghosh, 2008)。さらに、哺乳類において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 にも保存されていた (Perkins, 2006)。これらのリン酸化およびアセチル化残基は p65 の機能調節において重要な役割を果たしていることが予想され、ネコにおいても SIRT1 が NF- κ B 機能調節を行っていることが示唆される。

ネコ p65 mRNA は測定したすべての組織で発現しており、他の動物同様に生体において普遍的に発現していると考えられた (Nolan et al., 1991; Li et al., 2011)。p65 は特に脂肪組織、心臓および骨格筋において高く発現し、腎臓、肝臓および膵臓において比較的高い発現が認められた。一方、これまで他の哺乳類においては、ヒトでは肺と肝臓で、マウスでは肺と脾臓で、ブタでは小腸で高い発現が見られるというネコとは異なる発現様式を示すことが報告されている (Li et al., 2011)。p65 サブユニットの発現様式の違いは、それぞれの動物種において炎症が関連する疾病の発症機序や病態および病理形成の違いに影響を与えているかもしれない。脂肪組織、骨格筋、膵臓および肝臓はインスリン感受性組織であり、ネコに特徴的な 2 型糖尿病の発症において重要な役割を果たしている (Tilg and Moschen, 2010; O'Brien, 2002)。これらインスリン感受性組織における p65 の発現が高いことから、p65 による炎症がネコの 2 型糖尿病の発症に関わっていることが予想される。また、心臓において p65 が高く発現していたが、ヒトにおいては p65 が肥大型心筋症の病理形成において重要な役割

を果たしていることが報告されている (Kuusisto et al., 2012)。肥大型心筋症はネコにおいて最も高い罹患率を示す心疾患であり (Abbott, 2010)、その病態形成に p65 が関わっている可能性がある。さらに、腎臓において p65 が比較的高く発現していたが、ネコの腎臓における疾病として、慢性腎不全が老齢ネコにおいて最も多く存在する疾患として知られている。近年、その病態発生機序として炎症と線維化が重要な役割を果たしていることが明らかとなっており (Lawson et al., 2014)、p65 による慢性炎症が深く関わっているかもしれない。ネコ p65 と疾病の関わりについてはさらなる検討を重ねていくことが必要と考えられる。

NF- κ B ホモおよびヘテロ二量体は核移行し、標的遺伝子転写のプロモーターおよびエンハンサー領域のシスエレメント 5'-GGGRNWYYCC-3' (R はいずれかのプリン塩基、N はいずれかの塩基、W はアデニンかチミン、Y はいずれかのピリミジン塩基) で構成される NF- κ B 結合部位と呼ばれるシスエレメントに結合し下流の遺伝子の転写を活性化する (Kunsch et al., 1992; Hoffmann et al., 2006)。今回、上記の NF- κ B 結合部位を含んだレポーターベクターとネコ p65 発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイによって、NF- κ B 転写活性を解析した。他の哺乳類と同様に (Doleschall et al., 2007; Li et al., 2011)、様々な哺乳類細胞においてネコ p65 を一過性に発現させることにより NF- κ B 転写活性の上昇が確認され、我々がクローニングした p65 cDNA は転写活性能を有する p65 タンパク質をコードすることが証明された。

NF- κ B 転写活性によって、多くの自然および適応免疫や、炎症、細胞生存および増殖因子といった下流の標的遺伝子の発現が亢進される (Pahl, 1999)。それらの中でも炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6 および TNF- α は炎症環境を形成するキーファクターであり、癌 (Multhoff et al., 2012) や糖尿病 (Tilg and Moschen, 2010) といった病態に深く関わっている。今回、ネコ p65 を一過性に発現させた線維芽細胞の炎症性サイトカイン mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析した。結果、ネコ線維芽細胞において、IL-1 β 、IL-6 および

TNF- α mRNA 発現がネコ p65 の一過性発現により上昇したことから、p65 は炎症調節機構において重要な役割を果たしていることが考えられる。

以上から、ネコ p65 は他の哺乳類同様に NF- κ B 転写活性を有し、炎症性サイトカイン発現を亢進することから、炎症に深く関わっていることが分かった。さらに、ネコ p65 は他の哺乳類において翻訳後修飾を受けることが解明されているすべてのアミノ酸残基が保存されていたことから、SIRT1 により調節されている可能性があり、ネコにおける p65 と SIRT1 の関わりについて詳しく検討する必要があると考えられる。

3.5 小括

本章では cDNA クローニングによりネコ p65 の完全長 cDNA 塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸配列は哺乳類間で高く保存されており、特に RHD、NLS、TAD1 および TAD2 といった機能領域において、高く保存されていた。また、哺乳類において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 において保存されていた。

組織 mRNA 発現量解析の結果、ネコ p65 mRNA は様々な組織において普遍的に発現しており、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。ルシフェラーゼレポーターアッセイによって、ネコ p65 cDNA は機能活性を有するタンパク質をコードすることが証明され、ネコ線維芽細胞において炎症性サイトカイン mRNA 発現量を増加させることが分かった。

以上から、p65 はネコの炎症に深く関わっていることが予想され、さらに翻訳後修飾を受けると予想されているアミノ酸残基が保存されていたことから、SIRT1 により調節されていることが考えられる。

第 4 章 ネコ線維芽細胞においてサーチュイン 1 が NF- κ B 転写活性および炎症性 サイトカイン発現に与える影響

4.1 緒論

ヒトにおいて肥満や加齢は免疫機能の破綻および慢性炎症へ繋がり、代謝性・加齢性疾病を惹起する(Hotamisligil, 2006; Franceschi and Campisi, 2014)。肥満は完全屋内飼育の増加や寿命の延伸により、近年ネコにおいても大きな社会問題となっている (German, 2006)。Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)は炎症性サイトカインの産生を亢進することにより慢性炎症の形成に関わり、代謝性・加齢性疾病において重要な役割を果たしている (Barker et al., 2011; Chung et al., 2009)。第 3 章においてネコにおいて NF- κ B サブユニットの一つである p65 が、他の哺乳類と同様に様々な組織で発現し、培養細胞中で NF- κ B 転写活性を有すること、および炎症性サイトカイン発現を亢進することを示した。よって、ネコにおいても NF- κ B 機能の調節は代謝性・加齢性疾病の病態解明や、早期診断・治療法開発のための標的となることが考えられる。

サーチュイン 1 (SIRT1) は nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) 依存性に広い範囲の細胞応答を調節し、代謝や免疫機構を調節する。その NAD⁺依存性活性から、SIRT1 は代謝と加齢に深く関わっている (Imai et al., 2013)。SIRT1 は多くの基質を有しており、それらの中でも NF- κ B を標的とした転写調節は免疫調節において中心的な役割を果たしている (Kong et al., 2012)。SIRT1 による NF- κ B の調節は、p65 を直接脱アセチル化することにより NF- κ B 転写活性を調節するだけでなく (Yeung et al., 2004)、活性化補助因子の脱アセチル化を介した経路や (Bouras et al., 2005)、脱アセチル化を介さない様々な分子機構があることが明らかとされ (Ghosh et al., 2007)、多様な経路により調節される重要な応答であると考えられている。第 2 章においてネコ SIRT1 が *in vivo*

において炎症抑制に関わっている可能性を示したが、*in vitro* におけるネコ SIRT1 と NF- κ B の関わりについては不明である。

線維芽細胞は細胞外マトリックス(ECM)の産生によって、損傷した組織の結合およびリモデリングをつかさどる細胞である (Kalluri and Zeisberg, 2006)。線維芽細胞はさらに IL-1 β 、IL-6 および TNF- α といったサイトカインやケモカインを産生する能力を有しており、炎症反応を誘導し、その程度・期間をコントロールしている (Parsonage et al., 2005)。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、治療標的として注目されている (Flavell et al., 2008)。しかし、ネコにおいては線維芽細胞の炎症に関わる役割は、ほとんど明らかにされていない。

第 4 章ではネコにおける SIRT1 の炎症制御機構および慢性炎症への関わりについて明らかにするために、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 が与える影響を解析した。

4.2 材料と方法

組織材料と細胞培養

子宮組織は 5～8 ヶ月齢の健康な雑種猫から避妊手術の際に摘出された。詳細な手順は第 3 章の材料と方法に示す（本文 36 ページ）。得られた細胞は、10%FBS (HyClone Laboratories, Utah, USA)および 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を含んだ D-MEM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)で湿度 95%、5%CO₂、37℃の環境下で培養した。細胞が 70 から 80%コンフルエントになったのち、0.25%トリプシン、1mM EDTA (Invitrogen)を用いて 2×10^6 個/dish になるように継代した。実験には継代数 3 から 6 代の細胞を用いた。

哺乳類細胞タンパク発現ベクターの作製

ネコ p65 発現ベクターは第 3 章で作製したものをを用いた。

ネコ SIRT1 は、第 1 章で作成した cDNA ライブラリーを鋳型にし、プライマー 1, 2 (Table 5)を用いて翻訳領域を PCR 増幅した。PCR は各プライマーを 0.2μM ずつと、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Shiga, Japan)を用いて 30 サイクル 98℃10 秒、60℃15 秒、68℃2 分の条件で行った。続いて pcDNA3.1/V5-His B (Invitrogen)を *Hind* III (Takara) および *Bam*H I (Takara) を用いて制限酵素処理し、線状化したベクターに PCR で得た断片を In-Fusion HD cloning kit (Clontech, mountain View, CA, USA)を用いて指示書に従ってサブクローニングした。クローニングされた発現ベクター (pcDNA3.1-SIRT1) はシーケンスを行い、塩基配列を確認した後に実験に使用した。

ルシフェラーゼアッセイ

ネコ線維芽細胞を 2×10^4 個/well で 96well プレートに播種し、指示書に従い lipofectamine 2000 (Invitrogen) 0.5 μ l/well を用いて各々のベクター遺伝子を導入した。導入効率は pEGFP-N1 (Clontech) を同時に導入することにより問題がなことを確認した。それぞれの細胞には mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B (mock) , pcDNA3.1-p65 (p65) , pcDNA3.1-SIRT1 (SIRT1) 発現ベクターを 30ng/well およびレポーターベクター pGL4.32 [*Luc2P*/NF- κ B-RE/Hygro] (Promega) を 30ng/well の濃度で導入した。標準化のために pGL4.73 [*hRluc*/SV40] (Promega) を 10ng/well の濃度ですべての細胞に導入した。また、p65 を共導入せずに mock および SIRT1 を導入した細胞において、導入 12 時間後に 5 μ g/ml の lipopolysaccharide (LPS ; Escherichia coli 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, USA)を用いて刺激培養を行った。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用い、導入または LPS 刺激 48 時間後に指示書に従って行った。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性により標準化した。

リアルタイム PCR

ネコ線維芽細胞を 1×10^5 個/well で 12-well プレートに播種し、lipofectamine 2000 4.0 μ l を用いて 4 μ g/well となるようにそれぞれのベクター(mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B, pcDNA3.1-p65, pcDNA3.1-SIRT1)を導入した。導入効率は pEGFP-N1 (Clontech) を同時に導入することにより問題がないことを確認した。また、p65 を共導入せずに mock および SIRT1 を導入した細胞において、導入 12 時間後に 5 μ g/ml の LPS (Sigma)を用いて刺激培養を行った。導入または刺激 48 時間後に Total RNA を TriPure Isolation Regent (Boehringer, Mannheim, Germany)を用いて指示書に従って抽出し、RNA の量を測定した。その後、Total RNA (1 μ g) を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて逆転写した。リアルタイム PCR は Perfect Real Time SYBR Premix Ex Taq II (Takara)を用いて、ABI 7300 Real Time PCR Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)で 2 μ l のサンプル cDNA、0.8 μ l のそれぞれのプライマー、10 μ l の SYBR Premix Ex Taq II、0.4 μ l の ROX Reference Dye および 6.0 μ l の滅菌水を含む反応液を 95 $^{\circ}$ C 30 秒加熱の後、95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 35 秒、40 サイクル行い、測定した。プライマー 3、4 を Beta-actin に、プライマー 5、6 を IL-1 β に、プライマー 7、8 を IL-6 に、プライマー 9、10 を TNF- α 測定用に設計した。定量はそれぞれの遺伝子断片を含んだプラスミドを段階希釈したものを使い、検量線を作製し算出した。

Table 5. PCR に用いたプライマー

Primer	Kind	Sequence (5'-3')	Position	Accession Number
SIRT1				AB930130
1	Sense	CTGGCTAGTTAAGCTAGCAGAGGAGGCGAGGGA	21 – 38	
2	Antisense	CTGGACTAGTGGATCCTGGACAACTATTACATTATG	2321 – 2299	
Beta-actin				AB051104.1
3	Sense	GCCAACCGTGAGAAGATGACT	152 – 172	
4	Antisense	CCCAGAGTCCATGACAATACCAG	280 – 257	
IL-1β				NM_001077414.1
5	Sense	TGGCACCAGTACCTGAACTC	46 – 65	
6	Antisense	GCAACTGGATGCCCTCATCT	195 – 175	
IL-6				NM_001009211.1
7	Sense	GGCTACTGCTTTCCCTACCC	69 – 88	
8	Antisense	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT	259 – 240	
TNF-α				NM_001009835.1
9	Sense	CCACACTCTTCTGCCTGCT	134 – 152	
10	Antisense	GAGTTGCCCTTCAGCTTCGG	305 – 287	

4.3 結果

ルシフェラーゼアッセイによる解析

SIRT1 による NF- κ B 転写活性に与える影響を解析するために、ネコ線維芽細胞において NF- κ B ルシフェラーゼ活性を測定した。線維芽細胞に p65 と SIRT1 発現ベクターを共導入した結果、mock プラスミドと共導入した結果と比較して NF- κ B ルシフェラーゼ活性は約 50%に抑制された。また、LPS 刺激によって NF- κ B ルシフェラーゼ活性が上昇したが、SIRT1 発現ベクターを導入した細胞では、mock プラスミドを導入した細胞と比べて LPS 刺激による NF- κ B ルシフェラーゼ活性の上昇は、約 50%に抑制された。

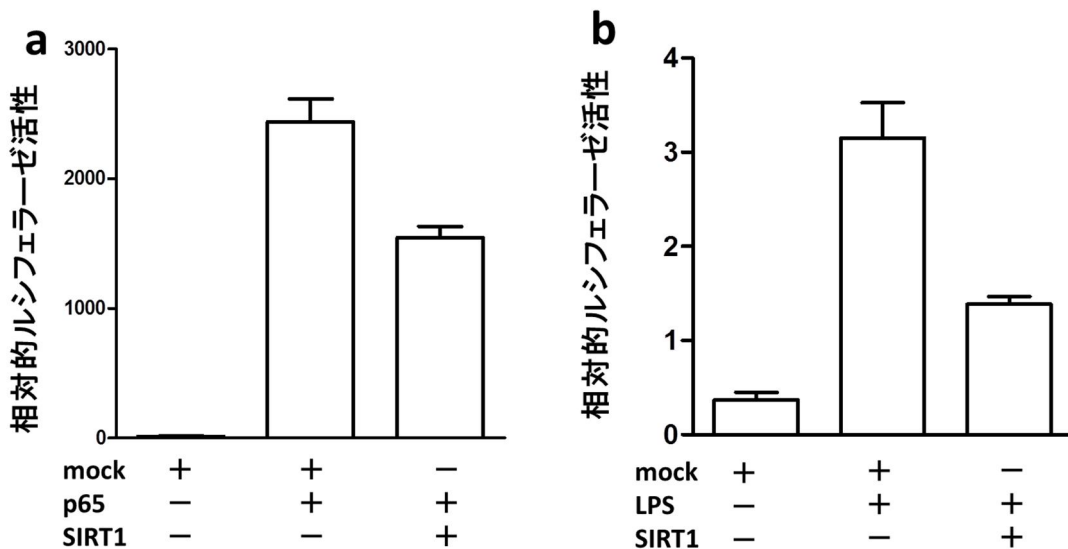


Figure 14. ネコ線維芽細胞における NF- κ B ルシフェラーゼ活性

すべての細胞には pGL4.32 [*Luc2P*/NF- κ B/Hygro]ベクターが導入されている。(a) は p65 を共導入した結果、(b) は LPS により刺激した結果を示す。

各々の細胞には mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B (mock)、pcDNA3.1-p65

(p65) および pcDNA3.1-SIRT1 (SIRT1) を一過性に発現させ、発現させたベクターおよび LPS で刺激培養した結果はプラス (+) で示した。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化した。結果は 3 つのルシフェラーゼアッセイの結果を平均±標準偏差で表し、同様の結果が 2 つの独立した実験系で得られた。

リアルタイム PCR による解析

ネコ p65 による炎症性サイトカイン発現上昇に与える SIRT1 の影響を解析するために、ネコ線維芽細胞においてリアルタイム PCR により炎症性サイトカイン mRNA 発現量解析を行った。線維芽細胞に p65 と SIRT1 発現ベクターを共導入した結果、mock プラスミドと共導入した結果と比較してすべての炎症性サイトカイン mRNA 発現が 50%以下に抑制された。また、LPS 刺激によって炎症性サイトカイン mRNA 発現が上昇したが、SIRT1 発現ベクターを導入した細胞では、mock プラスミドを導入した細胞と比べて LPS 刺激による炎症性サイトカイン mRNA 発現の上昇は 50%以下に抑制された。

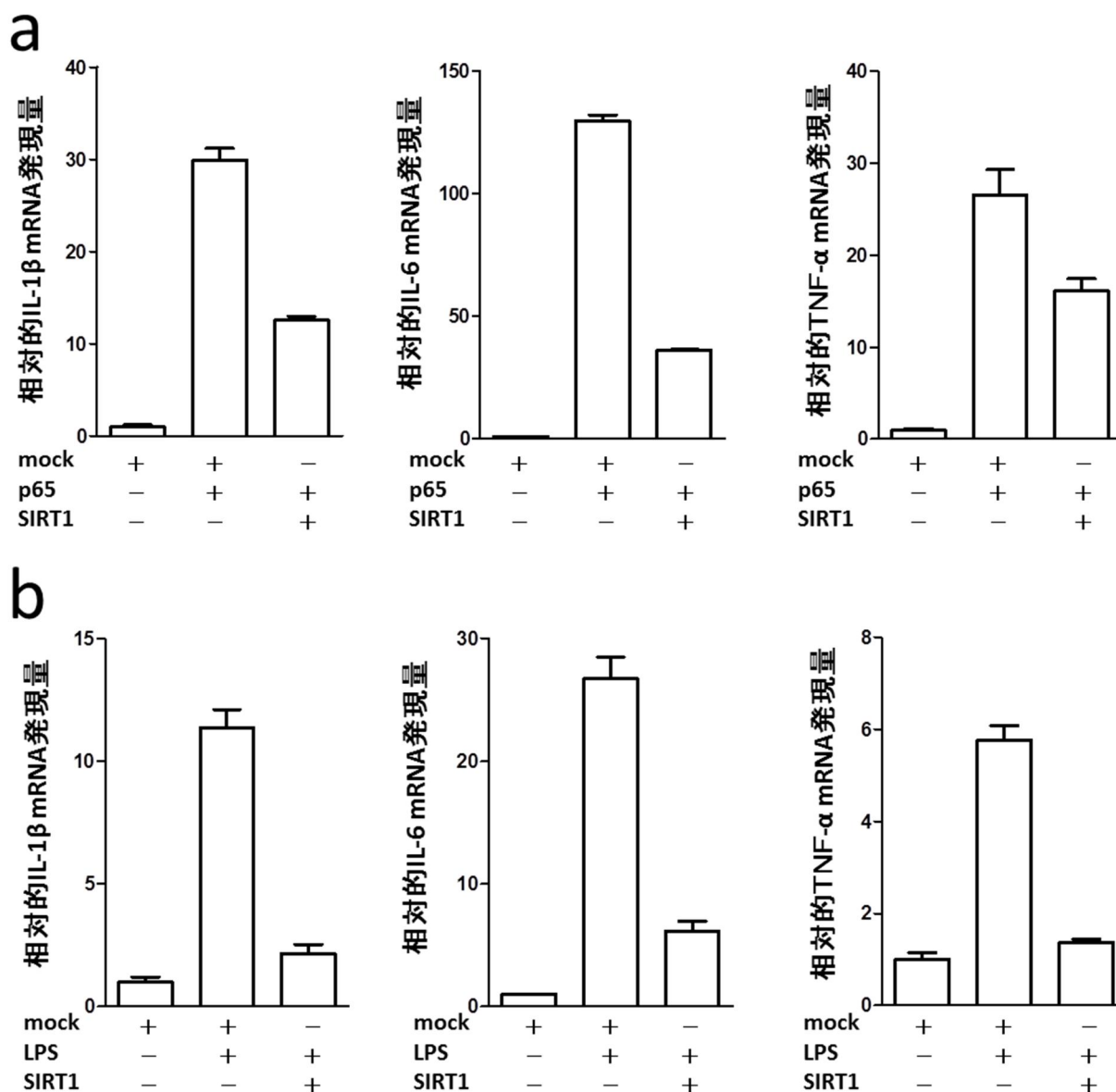


Figure 15. ネコ線維芽細胞における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) mRNA 発現量

(a) は p65 を共導入した結果、(b) は LPS により刺激した結果を示す。

各々の細胞には mock plasmid pcDNA3.1 V5-His B (mock)、pcDNA3.1-p65

(p65) および pcDNA3.1-SIRT1 (SIRT1) を一過性に発現させ、発現させたベクターおよび LPS で刺激培養した結果はプラス (+) で示した。それぞれの mRNA 発現量は、Beta-actin mRNA 発現量に対する比で表している。結果は 3 つの PCR の結果を平均 \pm 標準偏差で表し、同様の結果が 2 つの独立した実験系で得られた。

4.4 考察

SIRT1 を遺伝子導入したネコ線維芽細胞において、p65 を共導入または細胞を LPS 刺激することにより炎症を誘導し、SIRT1 の NF- κ B 転写活性および炎症性サイトカイン mRNA 発現に与える影響について解析した。LPS はグラム陰性菌の細胞外壁を構成する分子で、強力なエンドトキシン作用や免疫応答誘導作用を有しており、NF- κ B を介した炎症モデル実験において頻繁に使用される (Burke et al., 2010)。子宮線維芽細胞はヒトおよびネコにおいて LPS のレセプターである Toll-like receptor 4 を発現しており、LPS に応答して様々な炎症性サイトカインを産生することが報告されている (Fukuyama et al., 2012; Jursza et al., 2014)。以上から、LPS を今回の実験において炎症誘導のために用いた。

SIRT1 は p65 アミノ酸配列中の 310 番目リジン残基を脱アセチル化し、NF- κ B の転写活性を低下させる (Yeung et al., 2004)。その後の研究で、SIRT1 による NF- κ B 転写調節は脱アセチル化活性のみならず、様々な分子機構により制御されていることが明らかとなり、その相互作用はヒトやマウスにおいて研究されている (Bouras et al., 2005; Ghosh et al., 2007)。その分子機構の解明と並行して、臨床医学においても SIRT1 と NF- κ B の連関は自己免疫性疾患や慢性炎症に対する治療標的として研究されている (Kong et al., 2012)。今回、ネコ線維芽細胞において、p65 による NF- κ B 転写活性の上昇が SIRT1 を共導入することにより抑制された。また、LPS 刺激によって NF- κ B 転写活性が上昇したが、ネコ SIRT1 を導入することによって転写活性の上昇が抑制された。NF- κ B 転写活性の上昇は、様々な細胞内応答を引き起こし、炎症やアポトーシスといった応答を惹起する (Li and Verma, 2002; Sen, 2006)。ヒト細胞においては、SIRT1 は TNF- α が惹起する NF- κ B 転写活性を抑制し、細胞をアポトーシスから保護する (Wang et al., 2013)。さらに、いくつかのマウス疾患モデルにおいて、SIRT1 により NF- κ B 活性を抑制することで細胞を保護し、症状を軽減することが示されている (Lee et al., 2009; Nimmagadda et al., 2013)。以上から、ネコに

においても NF- κ B による細胞や生体に対する負の影響に対して、SIRT1 が保護的に働くことが示唆される。

炎症性サイトカインは NF- κ B によって転写が活性化される主要な因子で、産生された炎症性サイトカインがそれらの受容体を介して NF- κ B 活性をさらに高めることから、NF- κ B と炎症性サイトカインは炎症性病態において中心的な役割を果たしている (Baker et al., 2011)。今回、ネコ線維芽細胞において、p65 による炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6 および TNF- α) mRNA 発現の上昇が SIRT1 を共導入することにより抑制された。また、LPS 刺激によって炎症性サイトカイン mRNA 発現が上昇したが、ネコ SIRT1 を導入することによって発現の上昇が抑制された。ヒト線維芽細胞では、今回の結果と同様に SIRT1 の過剰発現や SIRT1 活性化物質であるレスベラトロール処置によって、p65 導入や LPS 刺激による炎症性サイトカイン発現の上昇が抑制されることが報告されている (Wang et al, 2013; Park et al., 2013)。炎症性サイトカインは慢性炎症部位においても高い発現が認められることが知られているが (Gabay, 2006; Popa et al., 2007)、近年、この慢性炎症部位における炎症性サイトカイン産生の中心を担っているのが線維芽細胞であることが明らかとなってきた (Flavell et al., 2008)。また、線維芽細胞における LPS の応答は血液循環を介して全身に波及し、他の組織においても炎症性サイトカインのレベルを上昇させることから、慢性炎症を形成するうえで LPS もまた、重要な役割を果たしている (Quin et al, 2007; Flavell et al., 2008)。よって、ネコ SIRT1 が線維芽細胞における炎症性サイトカインの発現を抑制した今回の結果は、SIRT1 がネコの慢性炎症性疾病に対して有用な標的となる可能性を示唆している。ネコ SIRT1 が NF- κ B 転写活性を抑制する詳細な分子機構や、慢性炎症における SIRT1 の働きについて更なる検討を重ねることで、ネコ代謝性・加齢性疾病の病態解明および治療法開発に繋がると考察される。

4.5 小括

本章では、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 NF- κ B 転写活性を抑制し、炎症性サイトカイン発現量を低下させることを明らかにした。

以上から、ネコ SIRT1 は線維芽細胞において NF- κ B が活性化する炎症応答を抑制することが示され、慢性炎症による障害からの保護に関わっていると考えられる。

総括

本研究は、ネコにおける代謝性・加齢性疾病の病態解明および早期発見・治療法開発のために、ネコサーチュインの機能、特に Nuclear factor kappa B (NF- κ B) と関わる炎症抑制作用を明らかにすることを目的として、一連の実験を行った。

第 1 章では、ネコサーチュインについて基礎的知見を得るための実験を行った。cDNA クローニングによりネコサーチュイン 1 (SIRT1) およびサーチュイン 3 (SIRT3) の完全長 cDNA 配列を明らかにし、他動物の SIRT1 および SIRT3 と相同性解析を行った結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 は高い相同性を示し、特に Sir2 ファミリーに共通して存在する機能部位である触媒コア領域において高い相同性を示した。加えて、他の動物と同様にネコ SIRT1 および SIRT3 の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ことから、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示唆される。組織 Total RNA を用いて行ったリアルタイム PCR の結果、ネコ SIRT1 および SIRT3 mRNA も他の哺乳類と同様に様々な組織で発現が認められた。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ことが予想される。さらに、ネコ SIRT1 は肝臓と骨格筋、SIRT3 は心臓といった代謝性・加齢性疾病に関わる組織で特に高く発現しており、ネコ SIRT1 および SIRT3 が代謝性・加齢性疾病に深く関わっていることが予想され、その分子機構および疾病との関わりについて詳しく検討する必要があると考えられる。

第 2 章では、サーチュインの代謝性・加齢性疾病における働きを *in vivo* で検討するために、高脂肪食給与によって肥満させたネコを用いて解析を行った。高脂肪食給与 8 週間という比較的短い期間であったため、栄養代謝測定値や臨床症状に異常は認められなかったが、肝臓での炎症を反映する肝逸脱酵素の測定値が有意に上昇していた。この結果から、ネコにおける脂肪毒性が肝臓における炎症から始まることが考えられる。炎症部位において産生された炎症性サイトカインは末梢血白血球に作用し炎症性サイトカイン mRNA 発現量を

上昇させることが知られているが、本実験では測定したすべての炎症性サイトカインで、高脂肪食給与前後で変化は認められなかった。一方で、末梢血白血球における SIRT1 mRNA 発現量が有意に上昇していた。サーチュインの発現は栄養状態によって調節されていることが知られており、高脂肪食給与により減少すると考えていたが、予想に反して SIRT1 の mRNA 発現量は上昇していた。マウスでは末梢血白血球において炎症性の刺激に対するフィードバック機構として SIRT1 の発現が上昇することが報告されており、今回 SIRT1 発現が上昇したのは、炎症性の刺激に SIRT1 が応答した結果であることが考察される。以上から、ネコサーチュイン、特に SIRT1 と代謝性・加齢性疾病との関わりにおいて、炎症抑制機構が重要な役割を果たしていることが考えられる。

ヒトやマウスでは、SIRT1 による炎症抑制機構において 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報告されていることから、SIRT1 と NF- κ B の連関について詳細に検討する必要があると考えられる。しかし、ネコ NF- κ B に関する知見はほとんど報告されていない。そこで第 3 章では、最も重要な NF- κ B のサブユニットで、ヒトやマウスにおいて SIRT1 との連関が報告されている p65 について、ネコにおける基礎的知見を得るための実験を行った。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、他の哺乳類と相同性解析を行った結果、ネコ p65 は高い相同性を示し、特に RHD、NLS、TAD1 および TAD2 といった機能的ドメインにおいて非常に高い相同性を示した。また、哺乳類において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。組織 mRNA 発現量解析の結果、ネコ p65 mRNA は様々な組織において普遍的に発現しており、特に脂肪組織、心臓および骨格筋において高く発現し、腎臓、肝臓および脾臓において比較的高い発現が認められた。これらの組織はネコにおける主要な代謝性・加齢性疾病である 2 型糖尿病、肥大型心筋症および慢性腎不全に関わる組織であり、その病態形成に p65 が関わっている可能性が示唆される。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイによってネコ p65 cDNA は NF- κ B 転写活性を有する p65

タンパク質をコードすること、およびリアルタイム PCR によってネコ線維芽細胞において炎症性サイトカイン発現量を増加させることが分かった。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になり、その調節に SIRT1 が関わっていることが予想される。

SIRT1 の NF- κ B を介した代謝性・加齢性疾患への関わりとして、慢性炎症が重要な役割を果たしていると考えられている。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、多様な間質細胞の相互作用が遷延化し、適応の破綻により不可逆的な組織リモデリングを生じて機能不全をもたらす。線維芽細胞は、損傷治癒に関わる主要な細胞であるが、炎症性サイトカインを産生する能力も有しており、炎症反応の誘導やその程度・期間をコントロールすることから、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ている。第 4 章では、ネコにおける SIRT1 の炎症制御機構および慢性炎症への関わりについて明らかにするために、ネコ線維芽細胞における SIRT1 と NF- κ B の連関について解析を行った。結果、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量の上昇が抑制された。よって、ネコ SIRT1 は線維芽細胞において NF- κ B が活性化する炎症応答を抑制することが示され、慢性炎症を抑制することが考えられる。

PubMed において“サーチュイン (Sirtuins)”を検索すると現在 4000 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・加齢性疾患をつかさどるキーファクターとして、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が、獣医学領域におけるその知見は非常に少ない。一方、獣医療においても代謝性・加齢性疾患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。本研究により、ネコ SIRT1 の NF- κ B を介した炎症抑制機能が示され、代謝性・加齢性疾患の基礎病態となる脂肪毒性に随伴する慢性炎症とネコサーチュインの連関が示唆された。その詳細な分子機構の解明のためには研究を継続していく必

要があると考えられる。一方で、本研究を基盤としてサーチュインの各種疾病診断におけるバイオマーカー候補としての活用や、レスベラトロールといったサーチュインを標的とした分子の予防・治療薬としての応用といった臨床応用に繋がっていくことが期待される。本研究の成果が、ネコにおける代謝性・加齢性疾病の病態解明および早期発見・治療法開発に少しでも寄与することを期待する。

引用文献

- Abbott J.A., 2010. Feline hypertrophic cardiomyopathy: an update. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 40, 685-700.
- Armstrong, P.J., Blanchard, G., 2009. Hepatic lipidosis in cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 39, 599-616.
- Backus, R.C., Cave, N.J., Keisler, D.H., 2007. Gonadectomy and high dietary fat but not high dietary carbohydrate induce gains in body weight and fat of domestic cats. *British Journal of Nutrition* 98, 641-650.
- Baker, R.G., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism* 13, 11-22.
- Banks, A.S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutiérrez-Juárez, R., Rossetti, L., Gu, W., Accili, D., 2008. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metabolism* 8, 333-341.
- Barger, J.L., Kayo, T., Vann, J.M., Arias, E.B., Wang, J., Hacker, T.A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J.D., Leeuwenburgh, C., Allison, D.B., Saupe, K.W., Cartee, G.D., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2008. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 3, e2264.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D., 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature.*, 376, 167-170.
- Ben-Neriah, Y., Karin, M., 2011. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology* 12, 715-723.
- Bouras, T., Fu, M., Sauve, A.A., Wang, F., Quong, A.A., Perkins, N.D., Hay, R.T., Gu, W., Pestell, R.G., 2005. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory

- domain 1. *Journal of Biological Chemistry* 280, 10264-10276.
- Breathnach, R., Chambon, P., 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annual Review of Biochemistry* 50, 349-383.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1997 The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., Alt, F.W., Greenberg, M.E., 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- Burke, J.P., Cunningham, M.F., Watson, R.W., Docherty, N.G., Coffey, J.C., O'Connell, P.R., 2010. Bacterial lipopolysaccharide promotes profibrotic activation of intestinal fibroblasts. *British Journal of Surgery* 97, 1126-1134.
- Bray, G.A., Bellanger, T., 2006. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*. 29, 109-117.
- Caamaño, J., Hunter, C.A., 2002. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 414-429.
- Choudhury, M., Jonscher, K.R., Friedman, J.E., 2011. Reduced mitochondrial function in obesity-associated fatty liver: SIRT3 takes on the fat. *Aging* 3, 175-178.
- Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P. and Leeuwenburgh, C. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing. Res. Rev.* 8: 18-30.

- Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R., Sinclair, D.A., 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.
- Courtois, G., Gilmore, T.D., 2006. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25, 6831-6843.
- Deng, X.Q., Chen, L.L., Li, N.X., 2007. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver International* 27, 708-715.
- Denu, J.M., 2012. Fortifying the link between SIRT1, resveratrol, and mitochondrial function. *Cell Metabolism* 15, 566-567.
- Doleschall, M., Mayer, B., Cervenak, J., Cervenak, L., Kacskovics, I., 2007. Cloning, expression and characterization of the bovine p65 subunit of NFkappaB. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 945-961.
- Downs, L.G., Crispin, S.M., LeGrande-Defretin, V., Pérez-Camargo, G., McCappin, T., Bolton, C.H., 1997. The influence of lifestyle and diet on the lipoprotein profile of border collies. *Research in Veterinary Science* 63, 35-42.
- EJ, M., 2006. Role of hormesis in life extension by caloric restriction. *Dose Response* 5, 163-173.
- Elmali, N., Baysal, O., Harma, A., Esenkaya, I., Mizrak, B., 2007. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation* 30, 1-6.
- Flavell, S.J., Hou, T.Z., Lax, S., Filer, AD., Salmon, M., Buckley, C.D., 2008. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *British Journal of Pharmacology* 153, S241-S246.
- Franceschi, C., Campisi, J., 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology Series A* 69, S4-9.

- Fransson, B.A., Lagerstedt, A.S., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J.S., Chew, B.P., Evans, M.A., Ragle, C.A., 2007. C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17, 373-381.
- Frye, R.A., 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, 273-279.
- Fujimoto, S., Mochizuki, K., Goda, T., 2010. Gene expression of inflammatory cytokines in peripheral leukocytes in db/db mice rose with progression of diabetes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 1488-1490.
- Fukuyama, A., Tanaka, K., Kakizaki, I., Kasai, K., Chiba, M., Nakamura, T., Mizunuma, H., 2012. Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts. *Life Sciences* 90, 484-488.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 114, 1752-1761.
- Gabay, C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis. Res. Ther.* 8: S3.
- German, A.J., 2006. The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr* 136; 1940S-1946S.
- Ghinis-Hozumi, Y., González-Gallardo, A., González-Dávalos, L., Antaramian, A., Villarroja, F., Shimada, A., Varela-Echavarría, A., Mora, O., 2011. Bovine sirtuins: initial characterization and expression of sirtuins 1 and 3 in liver, muscle, and adipose tissue. *Journal of Animal Science* 89, 2529-36.

- Ghosh, H.S., Spencer, J.V., Ng, B., McBurney, M.W., Robbins, P.D., 2007. Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *Biochemical Journal*, 408, 105-111.
- Ghosh, S., Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109, S81-96.
- Hariri, N., Thibault, L., 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23; 270-299.
- Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hayashi, J., Masaka, T., Saito, I., Ishikawa, I., 1996. Soluble CD14 mediates lipopolysaccharide-induced intercellular adhesion molecule 1 expression in cultured human gingival fibroblasts. *Infection and Immunity* 64, 4946-4951.
- Hayden, MS., Ghosh, S., 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 132, 344-362.
- Hebert, A.S., Dittenhafer-Reed, K.E., Yu, W., Bailey, D.J., Selen, E.S., Boersma, M.D., Carson, J.J., Tonelli, M., Balloon, A.J., Higbee, A.J., Westphall, M.S., Pagliarini, D.J., Prolla, T.A., Assadi-Porter, F., Roy, S., Denu, J.M., Coon, J.J., 2013. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell*, 49, 186-199.
- Henson, M.S., O'Brien, T.D., 2006. Feline models of type 2 diabetes mellitus. *ILAR Journal* 47, 234-242.
- Hoffmann, A., Natoli G., Ghosh G., 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B.,

- Sinclair, D.A., 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Imai, S. and Yoshino, J. 2013. The importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing. *Diabetes. Obes. Metab.* 15: 26-33
- Jin, D., Tan, H.J., Lei, T., Gan, L., Chen, X.D., Long, Q.Q., Feng, B., Yang, Z.Q., 2009. Molecular cloning and characterization of porcine sirtuin genes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 153, 348-358.
- Jing, E., Emanuelli, B., Hirschey, M.D., Boucher, J., Lee, K.Y., Lombard, D., Verdin, E.M., Kahn, C.R., 2011. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14608-14613.
- Jursza, E., Szóstek, A.Z., Kowalewski, M.P., Boos, A., Okuda, K., Siemieniuch, M.J., 2014. LPS-challenged TNF α production, prostaglandin secretion, and TNF α /TNFRs expression in the endometrium of domestic cats in estrus or diestrus, and in cats with pyometra or receiving medroxyprogesterone acetate. *Mediators of Inflammation* 689280, 12.
- Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L., 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development* 13, 2570-2580.
- Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., Bar-Joseph, Z., Cohen, H.Y., 2012. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* 483, 218-221.
- Kalluri, R. and Zeisberg, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 6: 392-401.

- Kendrick, A.A., Choudhury, M., Rahman, S.M., McCurdy, C.E., Friederich, M., Van Hove, J.L., Watson, P.A., Birdsey, N., Bao, J., Gius, D., Sack, M.N., Jing, E., Kahn, C.R., Friedman, J.E., Jonscher, K.R., 2011. Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *Biochemical Journal*. 433, 505-514.
- Kershaw, EE., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 89, 2548-2556.
- Kitada, M., Kume, S., Koya, D., 2014. Role of sirtuins in kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 23, 75-79.
- Kong, S., McBurney, M.W., Fang, D., 2012. Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunology & Cell Biology* 90, 6-13.
- Kunsch, C., Ruben, S.M., Rosen, C.A., 1992. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12; 4412-4421.
- Kuusisto, J., Kärjä, V., Sipola, P., Kholová, I., Peuhkurinen, K., Jääskeläinen, P., Naukkarinen, A., Ylä-Herttuala, S., Punnonen, K., Laakso, M., 2012. Low-grade inflammation and the phenotypic expression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 98, 1007-1013.
- Lawler, D.F., Larson, B.T., Ballam, J.M., Smith, G.K., Biery, D.N., Evans, R.H., Greeley, E.H., Segre, M., Stowe, H.D., Kealy, RD., 2008. Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades. *British Journal of Nutrition* 99, 793-805.
- Lawson, J., Elliott, J., Wheeler-Jones, C., Syme, H., Jepson, R., 2014. Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: Known mediators and mechanisms of injury. *The Veterinary Journal* 14, S1090-0233.
- Lee, J. H., Song, M. Y., Song, E. K., Kim, E. K., Moon, W. S., Han, M. K., Park, J. W., Kwon, K. B. and Park, B. H. 2009. Overexpression of SIRT1

- protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 58: 344-351.
- Li, H., Ma, G., Gui, D., Zhao, S., Wang, P., He, K., Wang, X., Ruan, J., Cao, J., Yang, S., Li, K., 2011. Characterization of the porcine p65 subunit of NF- κ B and its association with virus antibody levels. *Molecular Immunology*, 48, 914-923.
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2, 725-734.
- Lee, Y.S., Li, P., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Lu, M., Kim, J.I., Ham, M., Talukdar, S., Chen, A., Lu, W.J., Bandyopadhyay, G.K., Schwendener, R., Olefsky, J., Kim, J.B., 2011. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 60; 2474-2483
- Li, X., 2013. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45, 51-60.
- Lin, S.J., Defossez, P.A., Guarente, L., 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.
- Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B.B., 2000. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of Immunology* 164, 6509-6519.
- Matsushita, K., Motani, R., Sakuta, T., Nagaoka, S., Matsuyama, T., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H., Torii, M., 1999. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infection and Immunity* 67, 1633-1639.
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., Xu, R.M., 2001. Crystal structure of a SIR2

- homolog-NAD complex. *Cell*. 105, 269-79.
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M., Escoubas, J.M., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters* 561, 75-82.
- Mori, N., Li, G., Fujiwara, M., Ishikawa, S., Kawasumi, K., Yamamoto, I., Arai, T., 2014. Lipotoxicity Observed at the Early Phase of Obesity in Cats Fed on High-fat Diet. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 134-143.
- Multhoff, G., Molls, M., Radons, J., 2012. Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in Immunology* 12, 98.
- Nemchinov, L.G., Paape, M.J., Sohn, E.J., Bannerman, D.D., Zarlenga, D.S., Hammond, R.W., 2006. Bovine CD14 receptor produced in plants reduces severity of intramammary bacterial infection. *FASEB Journal* 20, 1345-1351.
- Newman, J.C., He, W., Verdin, E., 2012. Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: regulation by sirtuins and implications for metabolic disease. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 42436-42443.
- Nimmagadda, V. K., Bever, C. T., Vattikunta, N. R., Talat, S., Ahmad, V., Nagalla, N. K., Trisler, D., Judge, S. I., Royal, W 3rd., Chandrasekaran, K., Russell, J. W. and Makar, T. K. 2013. Overexpression of SIRT1 protein in neurons protects against experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of multiple SIRT1 targets. *J. Immunol.* 190: 4595-4607.
- Nolan, G.P., Ghosh, S., Liou, H.C., Tempst, P., Baltimore, D., 1991. DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, a rel-related polypeptide. *Cell*. 64, 961-969.
- Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.K.,

- Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., Wright, S.M., Mills, K.D., Bonni, A., Yankner, B.A., Scully, R., Prolla, T.A., Alt, F.W., Sinclair, D.A., 2008. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135, 907-918.
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1998. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *Journal of Clinical Investigation* 101, 1354-1361.
- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J.M., Boeke, J.D., Feinberg, A.P., 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13653-13658.
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Park, G.J., Kim, Y.S., Kang, K.L., Bae, S.J., Baek, H.S., Auh, Q.S., Chun, Y.H., Park, B.H., Kim, E.C., 2013. Effects of sirtuin 1 activation on nicotine and lipopolysaccharide-induced cytotoxicity and inflammatory cytokine production in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 48, 483-492.
- Parsonage, G., Filer, A. D., Haworth, O., Nash, G. B., Rainger, G. E., Salmon, M. and Buckley, C. D. 2005. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends. Immunol.* 26, 150-156.
- Pepys, M.B., Hirschfield, G.M., 2003. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation* 111, 1805-1812.
- Perkins, N.D., 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25, 6717-

6730.

Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., Tschöp, M.H., 2008.

Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage.

Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 9793-9798.

Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S.B., Pillai,

J.B., Samant, S., Ravindra, P.V., Isbatan, A., Gupta, M.P., 2010.

Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* 285, 3133-3144.

Ponugoti, B., Kim, D.H., Xiao, Z., Smith, Z., Miao, J., Zang, M., Wu, S.Y.,

Chiang, C.M., Veenstra, T.D., Kemper, J.K., 2010. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 285, 33959-33970.

Popa, C., Netea, M. G., van Riel, P. L., van der Meer, J. W. and Stalenhoef, A.

F. 2007. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid. Res.* 48: 751-762.

Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North,

B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., Hubbard, B.P.,

Varela, A.T., Davis, J.G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo,

A.P., Coppari, R., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2012. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism* 15, 675-690.

Qiao, L., Shao, J., 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through

Foxo1-C/enhancer-binding protein α transcriptional complex.

Journal of Biological Chemistry 281, 39915-39924.

Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J.,

Crews, F.T., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and

- progressive neurodegeneration. *Glia*, 55, 453-462.
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, MD., Verdin, E., Chen, D., 2010. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metabolism* 12, 662-667.
- Raynes, R., Pombier, K.M., Nguyen, K., Brunquell, J., Mendez, J.E., Westerheide, S.D., 2013. The SIRT1 modulators AROS and DBC1 regulate HSF1 activity and the heat shock response. *PLoS One* 8, e54364.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., Puigserver, P., 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.
- Rodgers, J.T., Puigserver, P., 2007. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12861-12866.
- Rogina B, Helfand SL. (2004, Nov 9). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(45), 15998-16003.
- Scarlett, JM., Donoghue, S., Saidla, J., Wills, J., 1994. Overweight cats: prevalence and risk factors. *International Journal of Obesity* 18, S22-S28.
- Schenk, S., McCurdy, C.E., Philp, A., Chen, M.Z., Holliday, M.J., Bandyopadhyay, G.K., Osborn, O., Baar, K., Olefsky, J.M., 2011. Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *Journal of Clinical Investigation* 121, 4281-4288.
- Schug, T.T., Xu, Q., Gao, H., Peres-da-Silva, A., Draper, D.W., Fessler, M.B., Purushotham, A., Li, X., Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Molecular and Cellular*

- Sen, R. 2006. Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 25: 871-883.
- Sherman, J.M., Stone, E.M., Freeman-Cook, L.L., Brachmann, C.B., Boeke, J.D., Pillus, L., 1999. The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing. *Molecular Biology of the Cell* 10, 3045-59.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E., Tong, Q., 2005. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280, 13560-13567.
- Shore, D., Squire, M., Nasmyth, K.A., 1984. Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *The EMBO Journal* 3, 2817-2823.
- Shinozaki, S., Chang, K., Sakai, M., Shimizu, N., Yamada, M., Tanaka, T., Nakazawa, H., Ichinose, F., Yamada, Y., Ishigami, A., Ito, H., Ouchi, Y., Starr, M.E., Saito, H., Shimokado, K., Stamler, J.S., Kaneki, M., 2014. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Sci Signal* 7; ra106.
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M., Prolla, T.A., 2010. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*. 143, 802-812.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Showell, H.J., Marks, R.M., 1988. Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derived neutrophil chemotactic factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 156, 1340-1345.
- Sundaresan, N.R., Gupta, M., Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. (2009, Sep). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by

- augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *Journal of Clinical Investigation* 119, 2758-2771.
- Tamamoto, T., Ohno, K., Goto-Koshino, Y., Tsujimoto, H., 2013. Feline serum amyloid A protein as an endogenous Toll-like receptor 4 agonist. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 155, 190-196.
- Tanaka, T., Shibazaki, A., Ono, R., Kaisho, T., 2014. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor κ B to inhibit inflammatory signaling. *Science Signaling* 7, ra119.
- Tanno, M., Kuno, A., Yano, T., Miura, T., Hisahara, S., Ishikawa, S., Shimamoto, K., Horio, Y., 2010. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *Journal of Biological Chemistry* 285, 8375-8382.
- O'Brien T.D., 2002. Pathogenesis of feline diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197, 213-219.
- Tilg, H., Moschen, A.R., 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836-1846.
- Tissenbaum, H.A., Guarente, L., 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.
- Trinh, O.T., Nguyen, N.D., Phongsavan, P., Dibley, M.J., Bauman, A.E., 2009. Prevalence and risk factors with overweight and obesity among Vietnamese adults: Caucasian and Asian cut-offs. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 18, 226-233.
- Tsukada, S., Tanaka, Y., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kawamori, R., Maeda, S., 2006. Intronic polymorphisms within TFAP2B regulate transcriptional activity and affect adipocytokine gene expression in differentiated adipocytes. *Molecular Endocrinology* 20, 1104-1111.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- Verdin, E., Hirschey, M.D., Finley, L.W., Haigis, M.C., 2010. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 669-675.
- Wang, W., Yan, C., Zhang, J., Lin, R., Lin, Q., Yang, L., Ren, F., Zhang, J., Ji, M., Li, Y., 2013. SIRT1 inhibits TNF- α -induced apoptosis of vascular adventitial fibroblasts partly through the deacetylation of FoxO1. *Apoptosis* 18, 689-701.
- Watanabe, A., Takeshita, A., Kitano, S., Hanazawa, S., 1996. CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infection and Immunity* 64, 4488-4494.
- Xu, F., Gao, Z., Zhang, J., Rivera, C.A., Yin, J., Weng, J., Ye, J., 2010. Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1^{+/-} mice: a role of lipid mobilization and inflammation. *Endocrinology* 151, 2504-2514.
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gurney, A.L., Godowski, P.J., 1999. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor. *The Journal of Immunology* 163, 639-643.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., Mayo, M.W., 2004. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal* 23, 2369-2380.
- Zeggini, E., Weedon, M.N., Lindgren, C.M., Frayling, T.M., Elliott, K.S., Lango, H., Timpson, N.J., Perry, J.R., Rayner, N.W., Freathy, R.M., Barrett, J.C., Shields, B., Morris, A.P., Ellard, S., Groves, C.J., Harries,

L.W., Marchini, J.L., Owen, K.R., Knight, B., Cardon, L.R., Walker, M., Hitman, G.A., Morris, A.D., 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336-1341.

Zhang, H.N., Li, L., Gao, P., Chen, H.Z., Zhang, R., Wei, Y.S., Liu, D.P., Liang, C.C., 2010. Involvement of the p65/RelA subunit of NF-kappaB in TNF-alpha-induced SIRT1 expression in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, 569-575.

Biochemical and Biophysical Research Communications 397, 569-575.

「平成 26 年 全国犬猫飼育実態調査」（一般社団法人ペットフード協会）、
<http://www.petfood.or.jp/data/chart2014/index.html>、アクセス日時：2015.08.22
15:00

謝辞

本研究を行うに当たり、懇篤なご指導とご高配を賜りました日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門、新井敏郎教授に深く御礼申し上げます。遺伝子クローニング、遺伝子発現の解析およびレポーターアッセイの解析に当たり、ご指導、ご助言を賜りました日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門、山本一郎准教授に深く御礼申し上げます。高脂肪食給与実験の構築および各種生化学的検査について、ご指導、ご助言を賜りました日本獣医生命科学大学動物医療センター、川角浩准教授に深く御礼申し上げます。子宮組織の採材に当たりご協力賜りました、ライオン動物病院のスタッフ一同に深く御礼申し上げます。

並びに、本研究に関わる各種実験およびその解析などにご尽力を賜りました日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門の在籍教室員の方々、並びに大学院生、博士研究員、大学院研究生、教室室員の皆様に御礼申し上げます。

Summary

A quick PubMed search for articles containing the keyword “Sirtuins” generates more than 4,000 papers, and the number has rapidly increased in recent years. The role of sirtuin biochemistry, physiology and clinical medicine has been noticed as a key factor for metabolic and age-related diseases. However, there is little information about sirtuins in veterinary field. On the other hand, increasing in metabolic and age-related diseases is also a major problem in veterinary medicine in recent years, and development of the early diagnosis and prevention method for the above diseases is urgent subject for veterinary medicine. The aim of this study was to reveal the molecular mechanisms of sirtuins in inflammation of animal tissues.

1. Mammalian sirtuins have been identified as homologs of the yeast silent information regulator 2 (Sir2), which included seven mammalian sirtuins in the family and each has different target proteins. Most tellingly, SIRT1 and SIRT3 are induced by calorie restriction (CR) in many tissues, and revealed that they are involved prevention of metabolic and age-related disease via various physiological effects in human and mouse. However, very little information is available on cat SIRT1 and SIRT3. Therefore, we considered it is necessary to obtain the basic knowledge of cats SIRT1 and SIRT3, we determined the cDNA sequences, predicted the amino acid sequence, compared with Sirtuins of other species, and examined the SIRT1 and SIRT3 mRNA expression in several tissues. We successfully cloned the cat SIRT1 and SIRT3 cDNAs. Cat SIRT1 and SIRT3 showed high sequence homology with other vertebrate SIRT1 (>61.3%) and SIRT3 (>65.9%). Cat SIRT1 and SIRT3 were highly conserved, and it showed especially high homology in the catalytic core domain, functional sites with Sir2 family. This core domain included the motifs which are known to be involved in

zinc fingers, and NAD⁺ binding sites. SIRT1 and SIRT3 were genetically conserved in the phylogenetic tree, and may have functions similar to those of other animals. The result of real time PCR using tissue total RNA, cat SIRT1 and SIRT3 mRNA was expressed in various tissues similar to other animals, and high expression were observed in the liver and skeletal muscle for SIRT1 and in the heart for SIRT3. From the above, cat SIRT1 and SIRT3 is expected to have various physiological activities as well as other animals, and it was thought to be necessary to examine detail functional and relationship with disease.

2. Recently, prevalence of obesity has increased in cats, and it is revealed that lipotoxicity is fundamental pathogenesis of various diseases, including diabetes mellitus (DM). SIRT1 and SIRT3 have been considered to play important role in mediation of obesity molecular mechanisms. However, very little information is available on mechanism of lipotoxicity, especially the role of sirtuins via inflammation in cats. So we conducted feeding a HFD for 8 weeks to cats, and investigated inflammatory makers, inflammatory cytokine and SIRT1 and SIRT3 expression in peripheral leukocyte. After 8 week HFD feeding, despite weight was significantly increased, the value of other metabolic markers did not change. On the other hand, HFD caused significant increases in hepatocellular injury markers, ALT, ALP and AST activity. Although peripheral leukocyte inflammatory cytokine mRNA expression levels did not increase, SIRT1 mRNA expression significantly increased in obese cats. From the above, although inflammation is occurred in the liver by lipotoxicity, it is predicted that inflammatory signal of peripheral leukocyte is suppress by SIRT1. We consider that SIRT1 suppress the inflammation and the onset of metabolic and age-related diseases.

3. It is reported that regulation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) is central role

by the anti-inflammatory function of SIRT1. Post translational modification of p65 subunit of NF- κ B (p65) is the main route of regulation of NF- κ B transcriptional activity by SIRT1. NF- κ B contributes to various diseases through chronic inflammation and autoimmunity by activating pro-inflammatory cytokine production. In particular, NF- κ B forms an etiological mechanism linking metabolic and age-related diseases. As described above, studies on cat p65 would be important in understanding the various diseases, and clinical pathology research targeting cat p65 has been reported. However, very little information is available about cat p65. Therefore, we considered it is necessary to obtain the basic knowledge of cat p65, we cloned cat p65, examined mRNA expression level in various tissue and examined influence to NF- κ B transcriptional activity and pro-inflammatory cytokine gene expression. Cat p65 was successfully cloned from a cat cDNA library. The deduced amino acid sequence was highly conserved in mammal p65 (>87.5%), in particular functional domains were conserved very well. The amino acid residues, which undergo post-translational modifications in mammals, were completely conserved. The cat p65 mRNAs were expressed in all examined tissues, similar to other animals. In particular, high expression levels of cat p65 were observed in adipose tissue, heart and skeletal muscle. Transiently expressed cat p65 significantly up-regulated NF- κ B transcriptional activity and pro-inflammatory cytokine expression. Therefore, cat p65 may have important roles in regulating inflammation, and we expect that cat SIRT1 related to the inflammation by p65.

4. In the development mechanism of metabolic and age-related diseases through the NF- κ B via SIRT1, it has believed that chronic inflammation plays an important role. Chronic inflammation, which occur persistent low level of physiological inflammation by the response to the endogenous-exogenous stress, caused dysfunction of irreversible organ by tissue remodeling. Fibroblasts are

responsible for the synthesis and remodeling of extracellular matrix in tissues and production of cytokines and chemokines. Therefore, they modify the quality, quantity and duration of the inflammatory infiltrate during the induction of inflammatory responses, and play important role in chronic inflammation. Although the SIRT1 ability of regulating inflammation through NF- κ B and activity in fibroblast is important in various diseases, there is little information in cats. Therefore, we analyzed the effect of NF- κ B transcriptional activity and inflammatory cytokine production by SIRT1 in cat fibroblast cells. Transiently expression of SIRT1 suppressed the NF- κ B transcriptional activity and pro-inflammatory cytokine expression levels by cat p65 and LPS in cat fibroblast. Therefore, SIRT1 inhibit the NF- κ B signals and suppress the inflammation in cat fibroblast cells, and suppress chronic inflammation.

In conclusion, cat SIRT1 has anti-inflammatory function via NF- κ B plays important roles in chronic inflammation induced by lipotoxicity underlying metabolic and age-related diseases. Elucidation of the detailed molecular mechanisms and clinical applications is necessary by continue research. On the other hand, we expect that it will lead to the clinical application, such as the utilization of sirtuins as a biomarker candidate in various diseases diagnosis, and a medicine targeting sirtuins such as resveratrol for the prevention and treatment as a foundation of this study. We expect that the result of this study contribute even a little to the clarification of pathogenesis and early detection and treatment development of metabolic and age-related diseases in cats.