

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 格 賓

犬や猫においても肥満は多くの健康障害の誘発要因となる。過体重動物のエネルギー代謝異常の初期には、インスリンやアディポネクチンシグナル伝達因子の変化が顕在化するので、これらは有用な早期診断マーカーとなりうる。こうした遺伝子発現の変化メカニズムを解析することは肥満動物において糖尿病など重篤な代謝障害の発症予防に有効であると考えられ、申請者は肥満、過体重の犬や猫における血液代謝産物、ホルモンおよび組織の遺伝子発現量の変化を調べ、それらが肥満、過体重の早期診断マーカーとなるか検討した。論文は5章から構成され、以下に各章の内容を示す。

### 1. 過体重犬の評価法としての体脂肪率とボディコンディションスコア

現在、日本では犬の肥満の判定には通常5段階評価のボディコンディションスコア (body condition score, BCS) が使用されているが、評価は判定者（多くは獣医師）の主観を伴うこともあり、また多くの獣医師は整数で表示することが殆どで0.5ポイントという中間スコアは付けないため、肥満状態を正確に判定できているとは言い難い。今回は、簡単な体尺測定値から算出される体脂肪率(%)とBCSを組み合わせ、血漿代謝産物濃度による評価と総合的に判定することで過体重の小型犬で脂肪蓄積の増加が検出できるかどうか検討した。非肥満の未去勢雄犬の体脂肪率は15~20%、雌犬および去勢雄では15~25%であった。BCSのみで過体重と判定された犬は有意に高い血漿遊離脂肪酸(NEFA)濃度を示した。これに対してBCSと体脂肪率の組合せで過体重と判定した犬ではNEFAに加えて総コレステロール(T-Cho)、トリグリセリド(TG)濃度が非肥満犬に比べ有意に高かった。体脂肪率を用いた肥満判定の信頼性は血漿代謝産物濃度との相関に反映されインスリン、NEFA、T-Cho、TG、尿素窒素(BUN)、クレアチニン、総タンパク質濃度と正に相関し総じてこれらの値は脂肪蓄積の増加に伴い上昇する傾向を示した。BCSと体脂肪率の組合せによる評価法は小型犬においては、脂肪蓄積の増加による脂質代謝の変化(代謝産物量の変化)を判定するのにBCS単独での判定法に比べ優れていると申請者は結論している。

## 2. 高脂血症犬の血漿リポプロテイン分画とマロンジアルデヒド濃度の変化

脂質過酸化マーカー・マロンジアルデヒド(MDA)と脂質代謝変化マーカーであるリポプロテインプロファイル(電気泳動分画)を健常犬、高脂血症犬で調べ、2つのマーカーが高脂血症の初期段階で有用な診断マーカーとなるか検討した。開業獣医師から提供された健常犬、軽度および重度高脂血症犬の3群の血液サンプルを用いた。軽度高脂血症犬では血漿TG値が健常犬に比べ有意に上昇、重度高脂血症犬では、人で一般的に脂肪肝マーカーとして用いられるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性が有意に高かった。血漿VLDL、LDLおよびTG値が軽度高脂血症犬で最も高かった。HDL1分画は重度高脂血症犬で健常犬、軽度高脂血症犬に比べ有意に高かった。血漿MDA濃度は軽度高脂血症犬で最も高かった。軽度高脂血症犬でも血液生化学検査の上では明らかな脂質代謝異常を示すことが分かった。重度高脂血症犬に抗高脂血症薬としてスタチン等を処置した場合、血漿MDA濃度は有意に低下した。以上のように、犬において血漿リポプロテインプロファイルおよびMDA濃度は軽度高脂血症を呈する初期肥満の判定に有効な診断マーカーであることを申請者は明らかにした。

## 3. 肥満したミニチュアダックスフンドの末梢血リンパ球のインスリン及びアディポネクチン遺伝子発現量

末梢血リンパ球(PBL)の動態は体の器官、組織の状態と密接な関係を持つ。PBLと他組織の遺伝子発現プロファイルには明らかな相関関係があることが人で報告されている。こうしたことから循環血液中のPBL遺伝子発現状態は代謝性疾患の早期診断ツールとなる可能性がある。申請者の研究室では肥満に関連して起こる体重変動がPBLの遺伝子発現、特にインスリンやアディポネクチンのシグナル伝達因子の遺伝子発現と関連することを報告してきた。PBLのインスリンおよびアディポネクチンシグナル伝達因子(アディポネクチン受容体ADIPOR1, 2; インスリン受容体基質IRS-1, 2; ホスファチジルイノシトールキナーゼPI3-K)、脂肪酸新生(脂肪酸合成酵素FAS)、エネルギーホメオスタシス関連酵素(グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼG6PDH; リンゴ酸デヒドロゲナーゼMDH)のmRNA発現を非肥満および過体重のミニチュアダックスフンドで測定し、これらのmRNA発現が犬の肥満判定のマーカーとなるか検討した。

過体重犬では血漿 NEFA、T-Cho、TG 濃度および ALT 活性が上昇、非肥満ミニチュアダックスフンドでは血漿アディポネクチン濃度の有意な減少を示した。過体重犬の PBL では IRS-1, 2、PI3-K、ADIPOR1 および FAS mRNA 発現の低下が明らかとなり、これらの知見は過体重犬の肥満に伴うエネルギー代謝異常は、PBL のインスリンシグナル伝達や脂質代謝に関連する遺伝子発現に影響を及ぼすこと示唆し、PBL 遺伝子発現プロファイルは犬の肥満を判定するマーカーのひとつとして有用であると申請者は結論している。

#### 4. 高脂肪食給与猫末梢血リンパ球およびインスリン感受性組織の遺伝子発現

インスリン感受性組織の遺伝子発現、特に転写因子発現量の変化は、生体で起こる代謝変化のマーカーとなる。本章では、PBL が猫で起こる肥満およびそれに伴って起こる疾病を診断するのに適切な細胞かどうかを調べた。インスリンシグナル伝達に関して、高脂肪食給与猫（肥満猫）では腹部脂肪組織と PBL の IRS-1 mRNA 発現が有意に低下し、肝の IRS-1 mRNA 発現は対照動物に比べ増加した。肥満猫では、皮下および内臓脂肪組織の IRS-2 mRNA 発現は著しく低下した。一方、PI3-K p85 $\alpha$  mRNA は肝、骨格筋で有意に増加したが、PBL で逆に有意に低下した。脂肪合成やアディポネクチンシグナル伝達に関しては、肥満猫の腹部脂肪組織で ADIPOR1 mRNA 発現は増加するが、肝、PBL で ADIPOR1 mRNA 発現は減少した。さらに皮下および内臓脂肪組織では ADIPOR2 mRNA 発現の有意な増加、PBL 以外の組織での FAS mRNA 発現の増加が認められた。最後に、肥満猫では肝、骨格筋における G6PHD mRNA 発現増加、PBL における FAS mRNA 発現の低下が認められた。腹部および皮下脂肪組織では MDH mRNA 発現の増加、肝、PBL における MDH mRNA 発現の低下が認められた。結論として、PBL はインスリン感受性組織の代替組織として診断への応用は可能であるが、その為にはいくつかの条件が付く。PBL 遺伝子発現を診断に利用する場合は、1) 対象とする遺伝子、2) インスリン感受性組織の病態、3) 疾病の程度（軽度、重度）を十分に考慮する必要があることが示唆された。前述の遺伝子発現プロファイルは画一的でないが PBL と多くの組織の間には様々な相関関係も認められた。肥満に対する反応性は、初期肥満の原因となる代謝性変化を限定してみれば対応する活性化経路とともに多くの場合、それぞれの組織において組織特異性を示したと

申請者は結論している。

## 5. 急性および慢性肥満猫の末梢血リンパ球におけるインスリンおよびアディポネクチン遺伝子発現

自然発生する（長期に及ぶ）肥満は短期間で食事性に誘発された実験的肥満に比べより典型的な炎症の初期臨床徴候を示す。本章の目的は短期間で高脂肪食給与により誘発した肥満（急性肥満）と自然発症し長期間に亘って肥満している（慢性肥満）猫のエネルギー恒常性に関わる遺伝子およびインスリン、アディポネクチンシグナル伝達因子の PBL における発現変動と血液代謝産物濃度との関連を明らかにすることである。血漿代謝産物濃度は肥満の型や期間により固有の変化を示した（急性肥満と慢性肥満では異なる変化を示した）。PBL の mRNA 発現プロファイルは、本研究で使用した PBL 遺伝子と非常に密接に関連し、急性および慢性肥満の影響を受け、PBL 遺伝子発現は、肥満の状態を敏感に反映して変動することを明らかにした。

本研究において、1) BCS と体脂肪率の組み合わせた評価基準は犬の過体重～肥満を正確に判定できること、2) 犬において血漿リポプロテインプロファイルと MDA は軽度肥満の初期段階における最も有用な脂質代謝異常の診断マーカーであること、3) 循環血液中の PBL のインスリンおよびアディポネクチンシグナル伝達に関わる遺伝子発現の変化は犬、猫の肥満時には種々の代謝異常の初期の警告となるサインとなり得ること、4) 犬と猫は人の肥満を研究するための良い動物モデルとなり得ること、特に自然発症した肥満では、その傾向が強いこと、を申請者は明らかにした。

以上のように本研究は、肥満した犬、猫の糖・脂質代謝の変化を血液生化学、遺伝子レベルで解析し、インスリン、コレステロール分画、アディポネクチンおよびそのレセプターが犬の肥満の早期診断マーカーとなり得る可能性を示した点で、肥満や糖尿病など糖・脂質代謝性疾患の診断に新たな知見をもたらすもので、学術上、臨床応用上、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。