

論文審査の結果の要旨

申請者名 野 澤 聡 司

犬の糖尿病は治療に生涯のインスリン投与を必要とする、ヒトでは1型に分類されている糖尿病である。しかし、ヒトでは肥満が原因となり、相対的にインスリン作用が不足する2型糖尿病が主体であり、犬とヒトとでは糖尿病発症メカニズムが大きく異なっていると考えられている。

申請者は、インスリン抵抗性に続き糖尿病を発症することが報告されている犬の副腎皮質機能亢進症（HAC）と、インスリン抵抗性が生じるものの糖尿病の発症が報告されていない犬の肥満の違いを比較することで犬における糖尿病発症の特性を解析することを目的に、ポストゲノム研究の中で最もフェノタイプに近くホメオスタシスの破綻をより直接的に評価できる代謝産物を対象とするメタボローム解析を主に用い研究を行なった。

本論文は、得られた成績を以下の5章にまとめたものである。

第1章 副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量の解析

2章以降のメタボローム研究の予備実験の位置づけで、研究対象であるHAC症例犬の末梢血白血球を、グルココルチコイドの影響評価に利用できるか検討するため、遺伝子の定量に十分な量が確保できる末梢血好中球を用いて、インスリンシグナリング遺伝子（IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2、PKC-λ）の発現量の変化を調べた。

HAC症例犬の末梢血好中球においてIRS-1の発現量は軽度の低下傾向を示し、IRS-2、PI3-K、Akt2ではControl群の約半分に低下した。このことから、HAC群の末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量に変化していることが明らかであり、グルココルチコイドの影響を評価するために末梢血白血球を利用することは妥当であると考えられた。遺伝子発現量の変動から、その代謝も変動していると考え、第2章では、末梢血白血球を用いた、グルココルチコイド添加時の細胞内代謝産物の解析を進めた。

第2章 デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析

培養方法が確立されている末梢血単核球を使用して、*in vitro* の実験系でグルココルチコイドが細胞内の代謝産物に及ぼす影響を検討した。単核球にグルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンを追加、48 時間の培養後に代謝産物を抽出し、キャピラリー電気泳動ー飛行時間型質量分析計を用いて代謝産物を分析した。

分析の結果、96 個の代謝産物が同定され、パスウェイ解析の結果、デキサメサゾン添加群において主に TCA サイクルおよび解糖系／糖新生経路に変化が認められた。また、糖新生経路上流の代謝産物の増加傾向と、TCA サイクル中間体、ピルビン酸の減少傾向から、デキサメサゾンの添加は、培養犬末梢血単核球におけるグルコースの異化作用を減少させることが示唆された。デキサメサゾンによる糖取り込み能の変化は培養犬末梢血単核球で認められず、また細胞内での糖異化作用が減少していることから、細胞内のグルコース濃度が維持され、細胞への糖取り込みが不要であり、高血糖を招きやすい状態にあることが考えられた。

第3章 デキサメサゾンおよび TNF- α が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシグナル遺伝子発現に及ぼす影響の解析

HAC ではグルココルチコイドが、肥満では TNF- α がそれぞれ血液中で増加し、インスリン抵抗性を惹起する。そこで HAC と肥満が骨格筋に及ぼす影響を検討する目的で、デキサメサゾンと TNF- α の添加試験を正常骨格筋細胞に対して行った。犬正常骨格筋細胞の分化誘導により得られた筋管様細胞を対象とし、代謝産物をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を使用して測定した。糖取り込み能は LC-MS/MS を用いて細胞内の 2-デオキシングルコース-6-リン酸量により評価し、IRS-1、PI3-K、Akt2 の発現量は定量 PCR 法にて測定した。

デキサメサゾンの添加は、多くの代謝産物の減少と糖取り込み量の減少傾向を示し、第2章の培養犬末梢血単核の実験と同様に、細胞におけるグルコースの異化作用が減少していること示唆された。また、特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の減少は著しく、これはグルココルチコイドによる細胞内 BCAA の分解促進と、細胞内への BCAA 輸送減少の2つの作用により細胞内 BCAA の著しい低下が生じたと考えた。細胞内 BCAA 量の低下はタンパク質翻訳系を抑制することから、筋の萎縮が起こることが知られている。骨格筋は生体における最大の糖取り込み器官であることから、デキサメサゾンにより生じる筋萎縮は糖取り込み量の減少に繋がり、HAC において高血糖を引き起こす要因の一つとなると考えられた。

TNF- α の添加は、IRS-1 遺伝子発現量に減少傾向を示したものの、糖取り込み量に変化は認められなかった。げっ歯類の培養細胞に TNF- α を添加すると糖取り込みが抑制されるが、本研究で用いた犬筋管様細胞では、肥満で血液中に増加する TNF- α を添加しても糖取り込みが抑制されず、犬ではげっ歯類より糖取り込み抑制が起こりにくいことが示された。さらに、TNF- α の添加で筋管様細胞内の β -アミノイソ酪酸の顕著な増加を認めた。げっ歯類の筋管細胞の培養液中に β -アミノイソ酪酸を添加すると糖代謝異常が改善することが知られており、今回の TNF- α 添加による細胞内性 β -アミノイソ酪酸の増加は、犬が肥満しても糖代謝異常を引き起こしにくい要因の一つであると考えられた。

第4章 健康犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物変動の比較

本研究では、これまでに末梢血白血球と犬骨格筋培養細胞を用いて、グルコシルコリドや TNF- α によるインスリン作用抑制時のアミノ酸を含む代謝産物の変化について、細胞レベルで明らかにした。そこで本章では、健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、インスリン分泌を促した時の血清中アミノ酸を GC-MS にて測定した。

BCAA であるロイシン、イソロイシンおよびバリンとフェニルアラニンはインスリンがピークを示す 0-60 分で有意に減少しており、インスリン動態に鋭敏に反応するアミノ酸であると考えられた。これらのアミノ酸は、ヒトでも糖尿病リスク評価に有用であり、また BCAA はインスリン依存的に骨格筋への取り込みが促進されることから、犬においてもインスリン作用の低下を評価するのに有用なマーカーとなる可能性が示された。

第5章 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較検討

インスリン抵抗性から糖尿病へ進行するケースが知られる HAC 症例犬 (HAC 群) と、糖尿病の発症に至らない肥満犬 (Obesity 群) の血清中代謝産物の解析を行い、HAC および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを代謝産物レベルで比較した。

HAC 群では Obesity 群と比較し、ALP と ALT が有意に高値を示し、これらの変化は既報と一致する結果であった。血液中のシスチンは、ヒトでは肥満と強い正の相関があるとされているが、本研究において Control 群と比較して、HAC 群では有意な増加を認め、Obesity 群では減少傾向であるという、ヒトとは異なる動態が示された。ヒトでは、過剰なシスチンはインスリン分泌抑制とインスリンシグナリング抑制に繋がることが報告されている。また、HAC 群で、Obesity 群に対して有

意に血清中グルタミンが低下していたが、ヒトやマウスでのグルタミンの低下は、インスリン感受性の低下に繋がるとされている。さらに、stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性が HAC 群は Obesity 群より上昇していた。これはヒトにおいて肝臓での糖新生が亢進していることを示す指標である。BCAA であるバリンとイソロイシンは Control 群と比較し、HAC 群、Obesity 群ともに有意に高値であった。BCAA はヒトの 2 型糖尿病では血中で上昇するが、これはインスリン抵抗性が生じると細胞内への BCAA 取り込みが抑制されるからであると説明されている。したがって、本研究でも HAC 群、Obesity 群ともにインスリン抵抗性が生じていたと考えられた。しかし、HAC 群は、Obesity 群と比較してインスリン感受性が低下し、糖新生も亢進しており、より糖尿病を発症しやすい状態であると考えられた。

以上のように、本論文では、HAC で認められるが肥満では認められない代謝産物の違いは、犬の HAC が糖尿病発症に至る一方、犬の肥満が糖尿病に至らない一因を示しており、犬における糖尿病の発症機序を解明していく上で有用な知見となることを示した。また、犬骨格筋培養細胞を対象としたメタボローム研究が、犬特有の糖尿病発症機序を解明する有用な手段であることを示しており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

申請者氏名 野 澤 聡 司

成 績 : 合 格

審査委員一同は、平成 28 年 1 月 26 日、学位論文審査申請者に対し、論文の内容ならびに関連事項について試験を行った結果、本申請者が博士（獣医学）の学位を受けるに必要な学識を有するものと認め、合格と判定した。

論文目録

報告番号	博獣甲 第 号	申請者氏名	野澤聡司
学位論文			
1. 題目 ¹⁾			
犬におけるインスリン抵抗性と糖尿病発症に関するメタボローム研究 (Metabolome study on canine insulin resistance and diabetes onset)			
2. 印刷公表の方法及び時期 ^{2) 3)}			
以下の5編に分けて公表			
公表 (予定) 年月日	出版物の種類及び名称 ⁴⁾		
平成 26年 8月	Decreased gene expressions of insulin signal molecules in canine hyperadrenocorticism. Satoshi Nozawa, Hitomi Oda, Ran Akiyama, Kaori Ueda, Kaori Saeki, Saori Shono, Natsuki Maruyama, Atsuki Murata, Hiroyuki Tazaki, Akihiro Mori, Yutaka Momota, Daigo Azakami, Toshinori Sako, Katsumi Ishioka.		
公 表 内 容			
全 文 要 約	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i> 2014 76(8):1177-1182		
公表 (予定) 年月日	Metabolic analysis of canine peripheral blood mononuclear cells treated ex vivo with dexamethasone.		
平成 28年 1月	Satoshi Nozawa, Touko Sato, Kinya Katayama, Katsumi Ishioka, Toshinori Sako, Toshiro Arai, Hiroyuki Tazaki.		
公 表 内 容	<i>The Veterinary Journal</i> 2016 207(1):184-187		
全 文 要 約			
公表 (予定) 年月日	Influence on serum metabolite by serum insulin and glucose levels in dogs.		
平成 28年 10月	Satoshi Nozawa, Touko Sato, Kinya Katayama, Toshinori Sako, Hiroyuki Tazaki.		
公 表 内 容	<i>Journal of Veterinary Medical Science</i> 2016 78 (投稿予定)		
全 文 要 約			

公表（予定）年月日	Comparison of serum metabolites between hyperadrenocorticism and obese affected dogs. Satoshi Nozawa, Touko Sato, Hitomi Oda, Akihiro Mori, Koh Kawasumi, Kinya Katayama, Toshinori Sako, Toshiro Arai, Hiroyuki Tazaki. <i>Veterinary research communications</i> 2016 40（投稿予定）
平成 28年 12月	
公表内容	
全文 要約	
公表（予定）年月日	Influence of dexamethasone and TNF- α to cultured canine skeletal muscle cells. Satoshi Nozawa, Touko Sato, Kinya Katayama, Hiroyuki Tazaki. <i>The Veterinary Journal</i> 2017 211（投稿予定）
平成 29年 2月	
公表内容	
全文 要約	
3. 冊数	1 編
参 考 論 文 ⁵⁾	
公表 （予定） 年月日	出版物の種類及び名称 ⁴⁾
平成 28年 3月	Analyses of a satiety factor NUCB2/nesfatin-1; gene expressions and modulation by different dietary components in dogs. Satoshi Nozawa, Tomoko Kimura, Miyuki Kurishima, Kana Mimura, Kaori Saeki, Yohei Miki, Hitomi Oda, Akihiro Mori, Yutaka Momota, Daigo Azakami, Katsumi Ishioka. <i>Journal of Veterinary Medical Science</i> 2016 78(3):411-417
公表内容	
全文 要約	
冊数	1 編

- 注 1 学位論文の題目が外国語の場合は、日本語訳を併記する。
2 論文は公表予定を含め、すべて併記する。
3 論文は発表年代順に記載する。
4 共著者全員の氏名を記載する。和文の場合は姓だけでもよい。
5 参考論文がある場合は、学位論文の公表の記載に準じて表示する。