

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07755

研究課題名(和文) 犬と猫の骨格筋由来因子マイオカインの分子構造と肥満に伴う変動の解析

研究課題名(英文) Analyses of molecular structures and obese-induced dynamics of myokines in dogs and cats.

研究代表者

石岡 克己 (Ishioka, Katsumi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：60409258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イヌFibroblast growth factor (FGF) 21の分子構造は他種と高い相同性を示し、調べた全ての臓器で発現していた。健常犬15頭における血中FGF21濃度は平均値0.21 ng/mL(最大値0.011-1.1 ng/mL)で、雌雄差、年齢差、日内および日差変動、食事の影響は見られなかった。ビーグル犬を最大速度7 km/hで計10分間、2週間運動(2日間の休み)させたところ、大きな変動は認められなかった。臨床例で血中FGF21濃度を測定したところ、腫瘍、炎症、肝臓疾患群で有意に高値を示した。FGF21は、イヌにおける新たな臨床検査項目としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor (FGF) 21 is expressed in many canine organs. The molecular structure is similar to those of other species including human beings, suggesting that canine FGF21 has similar functions also in dogs. We can measure blood FGF21 concentrations in dogs using a human ELISA kit (however, the data will be relative values). The average blood concentration of FGF21 in healthy dogs was 0.21 ng/mL (0.011-1.1 ng/mL). There was no gender or age difference. There was no diurnal or daily variations. Fasting and feeding did not cause any effect on blood FGF21 in dogs. Mild exercise did not change blood FGF21 concentrations in dogs. FGF21 showed slightly but significantly higher values in obese dogs. In dogs with tumor, inflammation and liver diseases showed significantly higher FGF21 values than healthy dogs (much higher in dogs with tumor and liver diseases). FGF21 might be a new blood test item which reflects tumor and liver diseases, and metabolic condition in dogs.

研究分野：獣医生化学、獣医内科学、動物看護学

キーワード：dog FGF21 myokine

1. 研究開始当初の背景

肥満は、医学・獣医学両方の領域において重大な課題である。ヒト医学において肥満はメタボリックシンドロームの要因として大きな社会問題となっており、マウスを使った基礎研究および医療現場での臨床研究が盛んに行われている。一方獣医領域においても、ヒトとはいくつか異なる点はあるものの、犬や猫の肥満は様々な疾患の誘因、または増悪因子となることが疫学的に証明されている。犬において肥満は脂質異常症や急性膵炎の危険因子であり (Hess et al., *J Am Vet Med Assoc*, 1999)、猫では2型糖尿病や脂肪肝の危険因子 (Feldhahn et al., *J Feline Med Surg*, 1999) である。犬や猫の肥満を対象とした研究は、伴侶動物としての犬・猫の獣医療に貢献することに加え、比較生理学・比較病態学のデータ蓄積に貢献し、犬や猫をヒト肥満の有用なモデルとして活用する事にも直結する。

肥満は長らく、エネルギーの過剰摂取や運動不足を発端とする単純な病態と考えられてきた。しかし、1992年に摂食行動を制御するサイトカインとしてレプチンが脂肪細胞から分泌されていることが見つかったのを契機に、分子レベルでの肥満のメカニズム解明がにわかに脚光を浴びるようになった。現在、脂肪細胞から血液中に分泌されるサイトカインはアディポカインと総称され、脂肪組織は体内最大の内分泌器官と見なされている。

申請者らは、1990年代後半より犬や猫のレプチン、アディポネクチンなど主要なアディポカインを世界に先駆けてクローニングし、その分子動態や肥満との関連について研究を進めてきた。その結果、犬においても肥満個体では血液中のレプチン濃度が増加し、ヒトと同様のレプチン抵抗性が生じていること (Ishioka et al., *J Vet Med Sci*, 2002)、また2型糖尿病のリスクを持つ肥満猫では血液中のアディポネクチン濃度が低下し、やはりヒトと同様にインスリン抵抗性に関与していること (Ishioka et al., *J Vet Med Sci*, 2009) などを明らかにしてきた。これらの成果はその後獣医栄養学の専門書でも引用され、犬や猫の代謝におけるアディポカインの重要性は世界的に注目されるようになった。

2. 研究の目的

肥満は、医学・獣医学の双方において重大な健康上の問題である。肥満の病態を説明するメカニズムとして、ヒト医学では近年骨格筋もまた内分泌臓器としてサイトカイン (マイオカイン, Myokine) を分泌し、エネルギー

消費や糖代謝の改善に関与していることが明らかとなってきた。本研究では、犬と猫の代表的なマイオカインをクローニングして分子構造を明らかにし、運動に伴う血中濃度の変化や代謝への影響を解析し、疾患犬における筋代謝の病態生理や運動療法の作用メカニズムについて明らかにする。

3. 研究の方法

ゲノムデータベース上の予想配列を参考にプライマーを設計し、イヌの骨格筋から Fibroblast growth factor (FGF) 21 の cDNA クローニングを行った。塩基配列とアミノ酸配列を明らかにし、分子構造について解析した。イヌ血清中 FGF21 濃度測定は ELISA 法によって行い、測定キットは FGF21(Human) ELISA Kit (KA-1849, Abnova, Taiwan) を用いた。このキットがイヌ FGF21 の測定に使用できるかを検討するため、希釈直線性試験、同時再現性試験、添加回収試験を行った。健常犬の血中 FGF21 濃度を調べるため、朝 8:00 に食事を与え、13:00 に全頭頸静脈より採取した。日内変動の血液サンプルを得るため、6、8、10、12、14、16、18 時の計 7 回、頸静脈より採血した。日差変動の血液サンプルを得るため、13 時のみ 3 日間連続で採血を行った。

運動試験にはヒト用トレッドミル装置 (REMARK FT-003、株式会社フジモリ、高岡) を使用し、条件はイヌが完走できる速度を予備試験にて検討し決定した。即ち、食後 5 時間後に室温 23-24℃、傾斜 0 度で 4 km/h の速度でスタートし、その後 1 分ごとに速度を 1 km/h ずつ上げて 7 km/h まで増加させ、計 10 分間の運動とした。これを週 5 日間連続で行い、2 日間の休息日を加えて 1 セットとし、続けて計 2 セット実施した。血液サンプルは、運動開始前、運動 5 日後、7 日後、8 日後、12 日後、14 日後の計 6 ポイントにおいて全頭頸静脈より採取した。

疾患との関係を調べるため、日本獣医生命科学大学附属動物医療センターに来院した疾患犬 33 頭 (雄 12 頭、雌 21 頭、5-16 歳、体重 1.85-52.1 kg) の血清を使用した。これらは当院に初診で来院し、血液検査時の残りの血液を試験目的に使用することに飼い主の同意が得られているものを使用した。患者動物のプロフィールや生化学検査の値は、カルテより情報を得た。

4. 研究成果

骨格筋からクローニングしたイヌ FGF21 は 630 bp の翻訳領域、209 個のアミノ酸からな

り、分子構造はゲノムデータベース上の予想配列と100%一致した。アミノ酸配列の相同性を他の動物種と比較したところ、74-90%の相同性を示した。臓器発現分布の解析では、16種類の臓器（肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、脾臓、視床下部、脊髄、骨髄、脂肪、骨格筋、皮膚）全てにおいて発現が確認された。イヌの腫瘍細胞株であるCOS-C、CMS-C、CMS-Jにおける発現を調べたところ、いずれの細胞株においてもFGF21は発現しており、また遺伝子の変異は認められなかった。これらの細胞株は、in vitroでのイヌFGF21研究への応用が期待される。

ヒトFGF21のELISAキットのイヌにおける有用性を確かめた希釈直線性試験、同時再現性試験、添加回収試験の結果はいずれも良好であり、本キットはイヌFGF21の測定に有用であると考えられた。

健常犬15頭における血中FGF21濃度は平均値0.21 ng/mL、最大値1.1 ng/mL、最小値0.011 ng/mL、中央値0.051 ng/mLであり、雌雄差および年齢差は見られなかった。日内および日差変動、食事の影響が見られなかったことから、採血にあたってこれらを考慮する必要はないと考えられた。

イヌにおいて、マイオカインであるFGF21の血中濃度に運動が及ぼす効果を検証した。3頭のビーグル犬をヒト用トレッドミルを用いて最大速度7 km/hで計10分間、2週間毎日運動（2日間の休みを含む）させたところ、血中FGF21濃度は1頭では1週目に上昇傾向、他の1頭では2週目に僅かながら有意な低下が見られたが、全般的に大きな変動は認められなかった。今後、運動強度のより高い条件下で追試を試行う事が必要と考えられた。

肥満犬で血中FGF21濃度を測定したところ、健常犬に比べて有意な高値が認められた。しかし値の差は非常に小さく、イヌにおいて肥満はFGF21にあまり影響しない可能性が高い。次に、さまざまな疾患を持つイヌで血中FGF21濃度を測定したところ、腫瘍、炎症、肝臓疾患群のいずれも健常群より有意に高値を示し、特に腫瘍と肝臓疾患での値が高かった。悪性度や予後との関連についてさらにデータを蓄積すれば、イヌにおける新たな臨床検査項目としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

小竹隼人、石岡克己

Analyses of molecular structure and kinetics of myokine FGF21 in dogs.

日本獣医生命科学大学研究報告、査読無、2018、印刷中

〔学会発表〕(計 1 件)

小竹隼人、河田 純、木嶋織子、

小野沢栄里、皆上大吾、石岡 克己、イヌのマイオカイン；FGF21の分子クローニングと血中変動の解析、2017年、第160回日本獣医学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石岡 克己 (ISHIOKA, Katsumi)

日本獣医生命科学大学・

獣医保健看護学科・教授

研究者番号：60409258

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()