

機関番号：32669
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580358
 研究課題名（和文） イヌの熱産生分子 UCP3 の発現解析とその活性化による新しい肥満治療法の開発
 研究課題名（英文） Expression analyses of canine UCP3 and development of a novel method for treatment of obesity in dogs.
 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・獣医保健看護学科・准教授
 研究者番号：60409258

研究成果の概要（和文）：イヌ腫瘍から樹立した細胞株はサイトケラチン、ビメンチン、デスミン陽性であり、骨格筋特異分子である myoD1 および myogenin、UCP3 の mRNA 発現が確認された。この細胞株は横紋筋肉腫と結論され、CMS（Canine Myogenic Sarcoma）と命名された。この細胞をオレイン酸存在下で培養すると、UCP3 の発現が増加した。UCP3 は余剰エネルギーを熱に変えるので、肥満犬の食事療法では脂肪源としてオレイン酸を用いることが有効と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Cell line developed from a canine tumor was proved to be myosarcoma and named "Canine Myogenic Sarcoma (CMS)" because cytokeratin, vimentin and desmin were positive, and MyoD1, myogenin and UCP3 mRNAs were expressed. When we cultured these cells with oleic acid, UCP3 expression was increased. UCP3 disseminates excess energy to heat, then it was suggested that oleic acid is effective for diet therapy of canine obesity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：内科、肥満

1. 研究開始当初の背景

(1) 都市部で飼われている犬の 3 分の 1 が肥満であり、高脂血症や膵炎など多くの代謝性疾患が見られる。しかし伴侶動物の肥満研究で分子レベルまで踏み込んだものは非常に少ない。

(2) 脱共役蛋白質（Uncoupling protein, UCP）は過剰なエネルギーを熱に変える作用を持ち、3 つのアイソフォームが知られてい

る。申請者はこれまでにイヌ UCP の cDNA クローニングを完了しており、分子構造や臓器発現分布がヒトのものと非常に似ていることも明らかにしてきた。

(3) 骨格筋の UCP3 を過剰発現させたラットでは体脂肪が減少し、肥満が解消されるという報告がある。また、UCP3 には脂肪酸結合部位があり、特に EPA や DHA などの多価不飽和脂肪酸によって発現・活性調節を受けることがマウス等の実験で示唆されている。

2. 研究の目的

(1) イヌ横紋筋肉腫細胞を用いて UCP3 をはじめとする代謝関連遺伝子の発現を確認し、さらにそれぞれの遺伝子についてリアルタイム PCR を用いた mRNA 発現量の定量系を確立する。様々な脂肪酸を培養液中に加えたときの各遺伝子の発現変動を比較して、特に多価不飽和脂肪酸が及ぼす効果について評価する

(2) イヌ白血球からゲノムを抽出し、UCP3 の翻訳領域および転写調節領域のゲノム配列について詳細に解析する。肥満傾向のある個体および犬種から抽出したゲノムについても同様に解析し、関与が疑われる SNP を探索する。

3. 研究の方法

(1) 横紋筋肉腫と診断された犬から採取、培養された cell line について、UCP3 をはじめ代謝に関わる遺伝子が発現していることを RT-PCR 法によって確認する。これらについて、リアルタイム PCR 法による定量解析法を確立する。

(2) イヌ横紋筋肉腫細胞の培養液に飽和脂肪酸としてステアリン酸、パルミチン酸、多価不飽和脂肪酸としてエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、オレイン酸 (OA) 等様々な種類の脂肪酸を添加する。UCP3 をはじめとする代謝関連遺伝子の発現量の変動を、リアルタイム PCR 法で測定する。

(3) さまざまな犬種の白血球からゲノム DNA を抽出し、代謝研究用 DNA データバンクを構築する。UCP3 の翻訳領域の塩基配列を解読し、犬種間、または肥満しやすい個体とそうでない個体間で SNP による違いが見られないか探索する。

4. 研究成果

(1) イヌ由来非上皮系悪性腫瘍から細胞株を樹立し、分子レベルでの性質を解析した。この細胞は病理組織学的に横紋筋肉腫が疑われており、インスリンの主な標的臓器が骨格筋であることからイヌの糖代謝を *in vitro* で研究するツールとしての可能性が期待された。培養開始から 2 ヶ月間は線維芽細胞の増殖が優位であったが、その後は紡錘形から円形の付着性細胞が優位となり、50 回の継代後も安定した増殖を示した (図 1)。この細胞

株を CMS (Canine Myogenic Sarcoma) 細胞と命名し、以下の解析を実施した。まず対数増殖期にある細胞を用いてアビジン-ビオチン法による免疫組織染色を行った。サイトケラチン、ビメンチン、デスミンの発現を確かめたところ、それぞれ陰性、強陽性、弱陽性という結果が得られた。さらに遺伝子レベルでの解析を行った。細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって骨格筋特異分子である myoD1 および myogenin、本研究の主なターゲット分子である UCP3 の mRNA 発現を解析したところ、この細胞では myoD1 と UCP3 が発現していることが確認された (図 2)。一方、myogenin の発現は確認されなかったが、これは横紋筋への分化段階の初期に発現する myoD1 とその後期に発現する myogenin の発現時期の違いによるものと推定された。これらの結果から、CMS 細胞は横紋筋分化の初期段階の特徴を備えた横紋筋肉腫細胞株であると結論された。

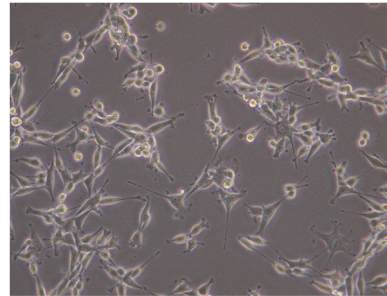


図 1 CMS 細胞

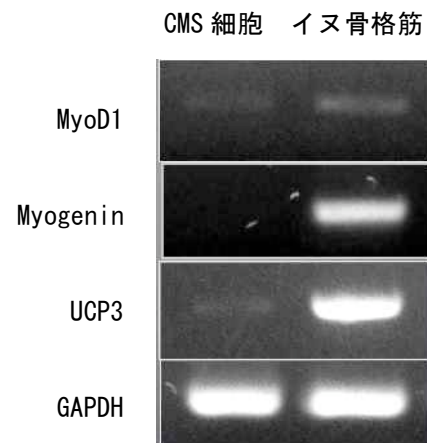


図 2 CMS 細胞の遺伝子発現

(2) イヌ UCP3 の full length cDNA の解析を行なったところ、950bp、700bp、500bp の3つバンドが検出されたが、サブクローニングの結果、950bp のバンド以外は非特異的な産物であった。イヌ UCP3 においては少なくともエクソンスキッピングによる truncated type の isoform は検出されなかったが、これまでの報告とは異なる非同義置換の存在が示唆された。

(3) イヌ横紋筋肉腫組織より株化・継代された CMS 細胞株を無処置で培養、または1mM の all-trans レチノイン酸 (RA) を加えて低栄養条件 (0.5% FBS) 下で分化誘導を行った。オレイン酸 (OA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、カルバサイクリンを濃度を変えて添加して3時間または6時間培養し、それぞれの脂肪酸が UCP3 の発現量に及ぼす影響を検討した。細胞から RNA を抽出して cDNA を作製し、定量 PCR 法で UCP3 の発現量を調べた。RA、脂肪酸を共に添加していないときの発現量を1として各条件と比較したところ、DHA、EPA 刺激では分化条件下でも変化しないかまたはわずかな変動だけが見られた。一方、オレイン酸を添加したところ、UCP3 の発現には大きな増加が見られ、この効果は分化条件下よりも未分化なものの方が高かった (図3)。従って、他の動物種で、DHA や EPA の有効性が高いと報告されているのとは異なり、犬では OA が骨格筋の UCP3 を効率よく増加させる可能性が示された。今回得られた結果は、これまであまり注目されることのなかった n-9 系列の脂肪酸がイヌの骨格筋に強い作用を持つ可能性を示唆するものである。UCP3 は余剰エネルギーを熱に変えることによって抗肥満効果を発揮することが齧歯類で実証されているので、イヌの肥満治療における食事療法の脂肪源としてオレイン酸を用いることが有効であると考えられた。また、今回得られた知見は、ヒトにおいて脂肪酸が代謝に及ぼす効果を調べる上でも n-9 脂肪酸をこれまで以上に重視すべきであることを示唆するものであり、臨床栄養学的見地から重要である。

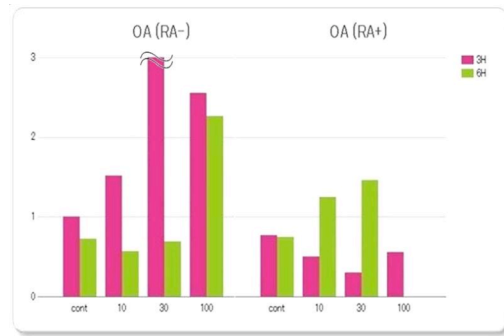


図3 CMS細胞をオレイン酸(OA)で3時間または6時間刺激したときのUCP3発現に及ぼす効果 (RA-:未分化、RA+:分化)

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)

Azakami, D., Shibutani, H., Dohi, M., Takasaki, M., Ishioka, K., Mori, A., Momota, Y., Bonkobara, M., Washizu, T., Michishita, M., Hatakeyama, H., Ogasawara, S. and Sako, T. Establishment and characterization of canine rhabdomyosarcoma cell line, CMS-C. *Journal of Veterinary Medical Science* 査読有り 2011 (印刷中)

〔学会発表〕(計4件)

洪谷葉菜、膀胱に発生した犬の横紋筋肉腫からの細胞株の樹立、第149回日本獣医学会、平成22年9月16日(帯広)

宇田川智野、イヌUCP2およびUCP3のcDNAクローニングと発現解析、第12回日本ペット栄養学会、平成22年7月25日(東京)

洪谷葉菜、自然発生した犬の横紋筋肉腫由来の細胞株の樹立とその性状解析、第148回日本獣医学会、平成21年9月26日(鳥取)

石岡克己、伴侶動物におけるアディポカイン、第8回国際バイオフィォーラム、平成21年7月2日(東京)

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・獣医学部・獣医保健看護学科・准教授
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：