

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05963

研究課題名(和文) UCP1発現調節を介したイヌ肥満予防に向けた分子・細胞生物学的検討

研究課題名(英文) Molecular and cell biological studies on the regulation of UCP1 gene expression aiming to prevent obesity in dogs

研究代表者

村上 賢 (Murakami, Masaru)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：80271360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ獣医療において肥満は解消すべき深刻な問題となっている。肥満解消の切り札の一つは褐色・ベージュ脂肪細胞活性化であり、その責任遺伝子としてUCP1がカギを握っている。本研究では、イヌのUCP1は様々な組織で発現していることを示し、UCP1遺伝子のバリエーションの単離も行った。さらにUCP1転写調節をする候補制御因子を探った。動物病院に来院した129頭のイヌの皮下または内臓の脂肪組織を用いて、肥満関連遺伝子を含む合計23遺伝子の発現量を調べ、BCS、年齢、腫瘍などイヌの健康状態とこれら遺伝子の発現の関連を詳細に解析した。また、正常なイヌ脂肪幹細胞から初代脂肪前駆細胞株を培養した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満はペット犬が健康を維持する上で最大の関心事である。肥満は様々な疾病の誘発因子であり、その制御は重要な獣医学的課題である。ヒトの肥満解消の切り札として、褐色・ベージュ脂肪細胞の活性化が注目され、脱共役タンパク質1(UCP1)がそのカギを握っている。我々は、イヌのUCP1発現パターンは実験動物やヒトとは異なり、ユニークであることを見つけ、イヌのUCP1を介したエネルギー代謝調節は独特である可能性を示した。本研究でのイヌ個体及び細胞培養系の解析から得られた、イヌの脂肪組織でのUCP1を含む脂肪関連遺伝子の発現と制御に関する成果は、イヌの肥満やその関連疾患の予防や治療に向けた基礎的知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a serious problem in canine veterinary medicine that must be resolved. One of the trump cards to eliminate obesity is the activation of brown and beige adipocytes, and UCP1 is the key gene responsible for this. In this study, we showed that canine UCP1 was expressed in a variety of tissues, and we also isolated a new variant of the UCP1 gene. We also explored candidate regulators that modulate UCP1 transcription. Using subcutaneous or visceral adipose tissues from 129 dogs hospitalized at veterinary clinics, we examined the expression levels of a total of 23 genes including obesity-related genes, and analyzed in detail the relationships between the expression of these genes and canine health conditions such as BCS, age, and tumor. Primary adipose progenitor cell lines were also cultured from normal canine adipose stem cells.

研究分野：基礎獣医学、分子・細胞生物学

キーワード：イヌ UCP1 脂肪細胞 肥満 遺伝子発現制御 エネルギー消費

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肥満はペット犬が健康を維持する上で最大の関心事である。肥満は様々な疾病の誘発因子となるのでその制御は重要な獣医学的課題である。
- (2) 伴侶動物として確固たる地位を築いているイヌの「生活の質 (QOL: Quality Of Life)」確保は、ヒトの QOL 向上にもつながる。肥満は高血圧、糖尿病、脂質異常症の誘発因子となるので、イヌの QOL を確保する上で肥満は問題となる (Vet Clin North Am Small Anim Pract, 36: 1345. 2006)。
- (3) 肥満は、エネルギーバランスが正に傾くことによって生じるので、摂取エネルギーを抑制すれば (つまり、食べなければ) 肥満は起きない。しかし、長期間に亘る食餌制限は現実的でない上、種々の栄養素の不足を惹起する可能性もあるので避けたほうが良い。したがって、エネルギー消費の持続的亢進が肥満問題解消に向けた現実的な方策である。
- (4) 白色脂肪細胞は過剰のエネルギーを脂肪として蓄積するのに対して、褐色 (ベージュ) 脂肪細胞は白色脂肪細胞から放出された脂肪酸、自身が蓄えている脂肪、ならびに糖を消費する。褐色 (ベージュ) 脂肪細胞は、特異的に脱共役タンパク質 1 (UCP1: プロトン輸送体) を発現することにより、エネルギーの熱変換が可能となり、エネルギーを消費する (Physiol Rev, 84: 277. 2004)。UCP1 発現量は褐色 (ベージュ) 脂肪細胞におけるエネルギー消費量とある程度相関するので、UCP1 発現量の制御が肥満問題の解消の切り札と理解されている。
- (5) UCP1 を介したエネルギー消費調節に関する研究は、主として実験動物 (マウス・ラット) とヒトで解析がされており、他の哺乳動物でも同様の調節が予測されている。
- (6) 我々は、予備的な実験から、イヌにおける UCP1 発現が実験動物やヒトと比べて、特徴的であることを見つけた。これは、イヌの UCP1 を介したエネルギー代謝調節は独特である可能性を示唆する。UCP1 を介したエネルギー代謝制御に関して、実験動物やヒトでの知見を必ずしもイヌに適用できない可能性がある。

2. 研究の目的

イヌ肥満予防・解消法に向けた基礎知見を提供するため、イヌ個体ならびに細胞培養系の解析から、UCP1 発現制御と機能を明らかにする。すなわち、

1. イヌの UCP1 遺伝子発現パターンにはどのような特徴があるのか?
 2. 脂肪組織におけるイヌ UCP1 遺伝子発現はどのように制御されているのか?
- という学術的「問い」を解明することを目的とする。

- (1) イヌ UCP1 の組織分布とバリエーション解析
- (2) イヌ脂肪組織における UCP1 関連遺伝子の発現
- (3) イヌ褐色脂肪前駆細胞株の樹立
- (4) UCP1 発現における BMP シグナルならびにオプシン 3 (OPN3) の役割
- (5) 新奇発現調節因子によるイヌ UCP1 発現調節

3. 研究の方法

- (1) イヌの白色脂肪組織から RNA を抽出し、RT-PCR により Ucp1 遺伝子発現を検出した。
- (2) 増幅産物のクローニングを行い塩基配列を決定し、Ucp1 mRNA のバリエーションを単離した。

- (3) イヌの各組織（脳、心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮膚、精巣）由来の市販の RNA を用いて高 GC 含量を考慮した 2nd RT-PCR により Ucp1 遺伝子の発現を調べた。
- (4) 動物病院に開腹手術のために来院した 129 頭のイヌから採取した皮下または内臓の脂肪組織 162 検体を用いて、RNA を抽出し cDNA を作製した。
- (5) 脂肪細胞分化と機能に関わる調節遺伝子、アディポカイン、褐色脂肪細胞形成や Ucp、BMP シグナルに関わる遺伝子の 4 つのカテゴリーに分類した合計 23 遺伝子のプライマーを設計し、それらの発現量を定量的 RT-PCR を用いて測定した。
- (6) 発現量について、各遺伝子間および BCS や年齢、健康状態との関連を統計的に解析した。UCP1 発現レベルに影響を及ぼす要因を、カルテ情報も含めて重回帰分析により推定した。
- (7) 正常なイヌ脂肪組織から脂肪前駆（幹）細胞の培養増殖を試みた。
- (8) イヌ UCP1 プロモーター領域をもつレポーターベクターを構築し、UCP1 遺伝子の転写に影響を及ぼす内在性因子を新奇スクリーニング系 (SSRT) を使って解析した。

4. 研究成果

- (1) イヌの白色脂肪組織では Ucp1 遺伝子が他の動物種より高発現していることや脂肪組織以外の臓器（心臓や脳など）にも微量ではあるが発現していることを示した。
 - (2) イヌ白色脂肪組織に本来の Ucp1 mRNA（パリアント 1）の他に、他の動物種には見られないイヌに特徴的な Exon2 領域を欠失したパリアント 2 を検出し、単離した。イヌにおける Ucp1 遺伝子の発現制御の可能性を示した。
 - (3) BCS と調べた 23 の遺伝子の脂肪細胞における発現との明確な関連を示すことはできなかったが、多くの遺伝子間では正に相関をしていた。
 - (4) 褐色脂肪細胞分化や BMP シグナリングに関連した遺伝子発現は年齢とともに減少した。
 - (5) BCS (ボディコンディションスコア) は年齢とともに増加し、Ppar および Fasn の遺伝子発現量と負の相関を示し、Leptin および Opn3 の発現量と正の相関を示した。
 - (6) 加齢に伴い、脂肪細胞分化と機能に関わるいくつかの調節遺伝子およびアディポカインの一つである Adipoq 遺伝子の発現量は減少し、Leptin と Ucp2 の遺伝子発現量は増加した。
 - (7) 腫瘍疾患のイヌは健康なイヌに比べ Ppar と Fasn の遺伝子発現は低く、Leptin、Ucp2、Ucp3 および Inh b の発現は高かった。
 - (8) Tnf と Opn3 の遺伝子発現は小型犬に比べ大型犬で高かった。
- BCS や腫瘍（病態）などに関連した遺伝子の脂肪細胞における発現を示したこれらの成果（(3)～(8)）はイヌの肥満やそれに関連する疾患の予防や治療に向けた候補遺伝子同定のための有用な基礎的情報となるため、学会で口頭発表するとともに、国際学術雑誌に公表した。
- (9) 正常なイヌ脂肪組織から脂肪前駆（幹）細胞を培養増殖し、多くの細胞株のストックを作ることができた。
 - (10) SSRT スクリーニング系を用いて解析した 71 因子のうち、対照と比べて 1/4 以下に減少させた因子を 1 つ、4 倍以上の増加を示した因子を 12 個見出した。一部は、ヒトやマウスの既知の UCP1 制御因子であったが、UCP1 遺伝子の転写に影響を及ぼす新たな制御因子も見つかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugiyama Yukina, Shimokawa Fumie, Sugiyama Kazutoshi, Kobayashi Takashi, Yamashita Yusuke, Kazama Kei, Onda Ken, Funaba Masayuki, Murakami Masaru	4. 巻 46
2. 論文標題 Relationships between the expression of adipose genes and profiles of hospitalized dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Research Communications	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11259-022-09989-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山 由貴奈、下河 史枝、杉山 和寿、小林 孝、山下 祐輔、風間 啓、恩田 賢、舟場 正幸、村上 賢
2. 発表標題 イヌの健康状態と脂肪細胞における肥満関連遺伝子発現との関連
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	舟場 正幸 (Funaba Masayuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------