

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 12 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450456

研究課題名(和文)ネコ肥満の早期遺伝子診断法の開発

研究課題名(英文)Development of diagnostic examination for cat obesity

研究代表者

山本 一郎 (Yamamoto, Ichiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00424763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年のヒトの全ゲノム関連解析の結果、肥満に関連するSNPが数多く発見されているが、ネコでは皆無に等しい。本研究は肥満に関する遊離脂肪酸の特異的受容体(FFAR1 / GPR40およびFFAR4 / GPR120)のネコでの機能解析を行うとともに、同遺伝子に存在するSNPが肥満に関連するか否かを検討した。結果、ネコGPR40は他動物と異なる21アミノ酸残基が付加され、特異なC末端構造であることが明らかとなった他、申請者が共同研究を行った結果、肥満イヌのGPR120遺伝子中にSNPが存在し、貴重なマーカーとして有用であることから、ネコでもSNP検出は更なる検討が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Obesity due to lifestyle changes in domestic animals has increased noticeably in the cat is known to significantly increase the risk of type 2 diabetes. It is definite advantage to use of genetic or biochemical examination for preventing obese in cats. In this research project, we challenged to develop a new diagnostic examination of free-fatty acid receptor 4 (FFAR4 / GPR120) gene for preventing cat obesity.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：ネコ GPR120 GPR40

1. 研究開始当初の背景

本大学の動物医療センターには過度の肥満の結果、糖尿病を発病するネコの来院が近年、特に増えている。この状況を踏まえ、申請者は以下からの研究を行っていた。肥満は生活習慣などの環境要因に加えて複数の遺伝素因が組合わされることが原因で発症し、連鎖的に多くの疾病の発症を招く。申請者はヒトの肥満感受性遺伝子の1つである *CDKAL1* がネコの肥満とも関連することを明らかにした (Yamamoto et al. Vet Med Res Rep 2012)。ヒトで肥満に関与する17個の遺伝子について、肥満および正常ネコゲノムの発現調節領域とエクソン部位のSNP解析(1個体あたり合計解析長63kb)を行い、差異の見られる4遺伝子(グレリン、レプチン、*SREBP1* およびインスリン受容体)のSNPを発見した(未発表データ)。ヒト新規肥満関連遺伝子の一つである遊離脂肪酸受容体(*GPR120/O3FAR1*)の遺伝子クローニングをネコで行い、成功した(未発表データ)。ヒトでは多くの肥満患者が *GPR120* 遺伝子にSNPを持つことが明らかにされており、近年特に注目を集めていた。

2. 研究の目的

これまで申請者はそれぞれのネコ遺伝子プロモーターおよびエクソン部位のみ解析したが、より詳細な探索・検討を行うため各遺伝子イントロン内のSNP検出を行う。

遊離脂肪酸は *GPR120* を介して *GLP-1*(インクレチン：インスリン分泌促進ホルモン)を分泌させるが、*GPR120* の機能不全によりヒトはインスリン分泌を抑制し肥満する。いわゆる脂質センサーである *GPR120* の詳細な mRNA・タンパク質発現および機能解析を行う。

ネコ肥満関連遺伝子の数をそれぞれ個体の遺伝素因スコアに置き換えて、高いスコアのネコオーナーに積極的な生活指導(食餌・エクササイズコントロール)を勧める新しい「診断と予防プロジェクト」を本大学獣医学部臨床部門、開業獣医師、臨床検査会社およびペット保険会社と共同して開発可能か検討する。

3. 研究の方法

[平成25年度]

ネコ *GPR120* の mRNA、タンパク質発現および機能解析

GPR120 はリガンドが不明な G タンパク質共役型受容体(オーファン受容体)であったが、近年、-3 遊離脂肪酸(DHA や EPA) に代表される遊離脂肪酸の特異的な受容体であることが明らかとなった。遊離脂肪酸は *GPR120* を介して *GLP-1* を分泌させ、インスリンを分泌させる。*GPR120* が機能不全の場合、肥満を呈する事がヒトで明らかにされ、抗肥満薬開発のターゲットとして注目されている。申請者はグレリン受容体などの G タンパク質共役

型受容体の研究を専門としていることから、受容体研究からアプローチする脂肪酸代謝解析を行う。まずネコ *GPR120* 発現ベクターを作成、HEK293 を用いた安定発現細胞株を樹立する。同細胞株に対し、各種遊離脂肪酸に対する細胞内 Ca^{2+} の上昇、あるいは細胞内情報伝達物質をモニターし、親和性測定を行う。

ネコ *GPR120* を含む新規肥満候補遺伝子 SNP の探索

長大なゲノムから疾病に関連する SNP を探索するためには大規模なゲノムシーケンス等を行う必要があるが、申請者は迅速かつ簡便に SNP をスクリーニングするために RFLP 法を改良したサーベイヤー法を用いている。正確な SNP 部位はシーケンス解析を行う必要があるが、迅速・低コストで SNP の有無が判明する。例として 96 検体のネコゲノム DNA を用い、10kb 以下の特定領域内の SNP を一日で検出・比較することができる。肥満ネコと正常ネコ群間で有意な SNP を発見した場合、PCR 断片を各個体精製、BigDye Terminator v3.1 にて反応および精製、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer にてシーケンス解析を行い、SNP を特定する。

[平成26および27年度]

平成25年度 新規 SNP 探索の継続

迅速な SNP 検出キットの開発

理化学研究所チームが開発した SmartAmp 法は来院時の採血から 30 分以内の遺伝子診断を可能とする方法で迅速なポイントオブケアを可能とし、様々な SNP のタイピングが可能かつ高額な検出器機を必要としない等メリットが多い。また同様のキットは Applied Biosystems 社の TaqMan Sample-to-SNP キットでも代用可能であり、採血から 1 時間以内の多検体 SNP タイピングをネコでも開発可能か検討する。

研究総括

研究総括は原著論文発表および学会発表により行う

4. 研究成果

ネコの遊離脂肪酸受容体 2 種 (*GPR40* と *GPR120*) の遺伝子クローニングの結果、ネコ *GPR40* は他動物と異なるユニークな構造を有していた。ネコ *GPR40* の C 末端部位は他動物にはない、特殊な 21 アミノ酸残基が付加され、これはネコ科動物(現在までにネコ、およびアムールタイガーの 2 種)に特異な C 末端構造であることが明らかとなった(雑誌論文発表 11)。

また申請者が共同研究を行った結果、肥満イヌの *GPR120* 遺伝子中に SNP が存在することを明らかにした。同 SNP は肥満犬を遺伝子診断により発見する貴重なマーカーとして有用であることが示唆された(雑誌論文発表 10)。

申請者が保有する健常および肥満ネコゲノム DNA を用いた GPR120 上の SNP 検出を行った結果、肥満マーカーとして有用な SNP は検出できなかった。今後、GPR120 遺伝子イントロン部位中の未知塩基配列中の SNP をマッピングする必要があると示唆された。また、SNP による肥満診断に SmartAmp 法を導入可能か検討した結果、主にコストが他法より高いことが判明したため実現には至らなかった。

ネコ GPR120 発現 HEK293 細胞を樹立した。同細胞を用い、特異的リガンドである DHA を培養液中に添加したところ、細胞内 MAPK / ERK1/2 / p44/p42 のリン酸化 (アミノ酸残基 Thr202/Tyr204) が誘導されることを明らかにした。ネコ GPR120 を介した同 MAPK のリン酸化誘導はヒトとは異なり、DHA 添加後 5 分で強く、15 分以降では急激に低下することが明らかとなった。

本申請課題の直接的な成果ではないが、申請者が共同研究として行った研究によれば、ネコに高脂肪食を与え続けて肥満させた場合、体重増加および血中遊離脂肪酸の組成が変化することを明らかにした (雑誌論文発表 13)。すなわち、ヒトと同様にネコでも遊離脂肪酸が肥満には重要であり、かつ血中遊離脂肪酸濃度を測定することにより早期肥満マーカーとして有用であることが明らかとなった。

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 14 件)

1. Changes in plasma fatty acid composition in hyperlipidemia dogs. Fujiwara M, Sato T, Tazaki H, Yamamoto I, Kawasumi K, Arai T. *Asia J Anim Vet Adv.* 2013. 8, 639-646.
2. Pilot Study to Determine Peripheral Blood Leukocyte mRNA Expression Profile of Energy Homeostasis Genes to Identify Potential Predictive Biomarkers of Obesity in Dogs Li G, Lee P, Yamamoto I, Mori N, Arai T. *J Anim Vet Advance.* 2012. 12, 69-75
3. Changes in expression levels of neurotensin precursor and receptor mRNA in chicken intestinal tissues and liver during late embryonic and early posthatching development. Tanaka M, Nakao N, Yamamoto I, Tsushima N, Ohta Y. *Poult Sci.* 2013. 92, 2765-2771.
4. Mechanism of insulin production in canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. Takemitsu H, Zhao D, Ishikawa S, Michishita M, Arai T, Yamamoto I. *Gen Comp Endocrinol.* 2013. 189, 1-6.
5. Change in mRNA expression of sirtuin 1 and sirtuin 3 in cats fed on high fat diet. Ishikawa S, Li G, Takemitsu H, Fujiwara M, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *BMC Vet Res.* 2013. 9, 187.
6. Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs. Kawasumi K, Kashiwado N, Okada Y, Sawamura M, Sasaki Y, Iwazaki E, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *BMC Vet Res.* 2014. 10, 57.
7. Comparison of plasma lipoprotein profiles and malondialdehyde between hyperlipidemia dogs with/without treatment. Li G, Kawasumi K, Okada Y, Ishikawa S, Yamamoto I, Arai T, Mori N. *BMC Vet Res.* 2014. 10, 67.
8. Lipotoxicity Observed at the Early Phase of Obesity in Cats Fed on High-fat Diet. Mori N, Li G, Fujiwara M, Ishikawa S, Kawasumi K, Yamamoto I, Arai T. *Asia J Anim Vet Adv.* 2014. 9, 134-143.
9. Effects of administration of Licorice flavonoid supplement on lipid metabolism in obese dogs. Kawasumi K, Okada Y, Kashiwado N, Iwasaki E, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *Asia J Anim Vet Adv.* 2014. 9, 721-726.
10. Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs. Miyabe M, Gin A, Onozawa E, Daimon M, Yamada H, Oda H, Mori A, Momota Y, Azakami D, Yamamoto I, Mochizuki M, Sako T, Tamura K, Ishioka K. *J Vet Med Sci.* 2015. 77, 1201-1206.
11. Identification of free fatty acid receptors GPR40/FFAR1 and GPR120/FFAR4 in a domestic cat. Habara M, Tamanuki M, Ishikawa S, Takemitsu H, Mori N, Okada Y, Nakao N, Kawasumi K, Ishioka K, Arai T and Yamamoto I. *Asia J Anim Vet Adv.* 2015. DOI: 10.3923/ajava.2015.
12. Sirtuin 1 suppresses nuclear factor B induced transactivation and pro-inflammatory cytokine expression in cat fibroblast cells. Ishikawa S, Takemitsu H, Habara M, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *J Vet Med Sci.* 2015. 77, 1681-1684.
13. Changes in fatty acid composition in tissue and serum of obese cats fed a high fat diet. Fujiwara M, Mori N, Sato T, Tazaki H, Ishikawa S, Yamamoto I, Arai T. *BMC Vet Res.* 2015. 11, 200.
14. Preliminary analysis of modified low-density lipoproteins in the serum of healthy and obese dogs and cats.

Mori N, Okada Y, Tsuchida N, Hatano Y, Habara M, Ishikawa S, Yamamoto I, Arai T. Front Vet Sci. 2015. doi: 10.3389/fvets.2015.00034

Kawasumi, Toshiro Arai. cDNA CLONING AND mRNA EXPRESSION OF CAT GPR40. 16th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Copenhagen, Denmark

〔学会発表〕(計 8件)

1. 2013/9/20-22 石川真悟、李格賓、武光浩史、藤原めぐみ、森伸子、山本一郎、新井敏郎 高脂肪食給与ネコにおける Sirtuin1, 3 遺伝子発現量の変動 第156回日本獣医学会 岐阜
2. 2014/2/7-9 新井敏郎、森伸子、川角浩、山本一郎 猫の肥満発症メカニズムとその対策 日本獣医内科学アカデミー第10回記念学術集会 横浜
3. 2014/9/9-12 石川真悟、羽原誠、武光浩史、森伸子、山本一郎、新井敏郎 イヌおよびネコ NF- κ Bp65 サブユニットの機能解析と Sirtuin1 の影響 第157回日本獣医学会 札幌
4. 2014/9/9-12 羽原誠、石川真悟、李格賓、武光浩史、岡田ゆう紀、森伸子、川角浩、山本一郎、新井敏郎 イヌとネコにおける脂肪酸受容体 GPR120 の cDNA クローニングおよび各組織における mRNA 発現量の解析 第157回日本獣医学会 札幌
5. 2014.6.25-29 Gebin Li, Peter Lee, Ichiro Yamamoto, Shingo Ishikawa, Nobuko Mori, Toshiro Arai. EFFECT OF HIGH FAT DIET ON PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE TRANSCRIPTOME OF RELEVANT ENERGY HOMOEOSTATIS GENES ON CATS. 16th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Copenhagen, Denmark
6. 2014.6.25-29 Shingo Ishikawa, Hiroshi Takemitsu, Ichiro Yamamoto, Toshiro Arai SIRTUIN 1 SUPPRESSES INFLAMMATION BY p65/RelA PATHWAY AND p65/RelA REDUCES THE EXPRESSION OF SIRTUIN 1 mRNA LEVELS IN CAT CULTURED CELLS. 16th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Copenhagen, Denmark
7. 2014.6.25-29 Nobuko Mori, Gebin Li, Nobuko Kashiwado, Koh Kawasumi, Yuki Okada, Shingo Ishikawa, Ichiro Yamamoto, Toshiro Arai CHANGES IN PLASMA LIPOPROTEIN PROFILES AND MALONDIALDEHYDE CONCENTRATIONS IN HYPERLIPIDEMIA DOGS 16th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Copenhagen, Denmark
8. 2014.6.25-29 Ichiro Yamamoto, Makoto Habara, Shingo Ishikawa, Gebin Li, Hiroshi Takemitsu, Yuki Okada, Nobuko Mori, Nobuhiro Nakao, Koh

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本一郎 (YAMAMOTO, Ichiro)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：00424763

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中尾暢宏 (NAKAO, Nobuhiro)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授
研究者番号：60377794