

軽度から中等度肥満のイヌにおける末梢血単核球  
細胞の遺伝子発現プロファイリング

2022. 3

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻

宮井 紗弥香

## 目次

第1章 緒論 .....	1
第2章 イヌの肥満について文献および実地調査 .....	8
第1節 イヌの肥満について文献調査	
第2節 イヌの肥満について実地調査	
図および表	
第3章 血中生化学データと BCS により軽度から中等度の肥満と分類されたイヌの PBMC を用いた RNA-seq 発現変動解析 .....	24
第1節 Miniature Dachshund の生化学データと RNA-seq による発現変動解析	
図および表	
第2節 第三章第一節で選別した Control 群および Obesity 群における追跡調査	
図および表	
第4章 同定したイヌの軽度から中等度肥満の代謝異常予知マーカーの他犬種における適 応 .....	67
第1節 Toy Poodle の生化学データと RNA-seq による発現変動解析	
図および表	
第5章 総合考察 .....	80
参考文献・図書 .....	84
謝辞 .....	101

# 第 1 章

## 緒論

## 1. 肥満について

肥満はエネルギー摂取量に対してエネルギー消費量が下回り、異常に脂肪細胞が蓄積することで生じる。WHOの報告によると、ヒトの肥満人口は1980年代と比較すると全世界で2倍以上に増加し続けている。一般的に、体重(kg)を身長の高さの二乗(m<sup>2</sup>)で除したBody Mass Index (BMI)で評価される場合が多く、BMIが30 kg/m<sup>2</sup>以上の場合には肥満と診断される (Pieńkowska J et al., 2019)。肥満自体はそれほど深刻ではないが、持続することにより心臓病やメタボリックシンドローム、2型糖尿病、痛風、骨関節炎などの重篤な疾患を引き起こすことが知られている (Sparks RP et al., 2019)。メタボリックシンドロームが内臓脂肪の蓄積と深い関係があることから、体全体の脂肪量以上に内臓脂肪の測定も重要視されており、CTやMRIにて内臓脂肪量が100cm<sup>2</sup>以上を内臓型肥満と定義している。腹囲、中性脂肪(TG)値、high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cho) 値、血圧値、空腹時血糖値などがその診断に用いられている (Pieńkowska J et al., 2019)。

脂肪組織は、ホルモンやシグナル伝達を介して脂質の生合成と脂質の分解とのバランスを保っている。内臓脂肪が蓄積した状態では adipokine と呼ばれる leptin や adiponectin などのホルモンや、interleukin (IL)-6 や tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などのサイトカインなどの生理活性物質が脂肪組織から分泌され、慢性的な炎症状態を引き起こす。また、肥満のヒトの脂肪組織や高脂肪食により肥満が誘導されたげっ歯類において、アポトーシスが著しく増加することが知られている (Sparks RP et al., 2019)。このように、肥満の病態生理については長年の研究により十分に理解されており、食事管理や運動量を増加させること、手術や薬物療法など様々な方法で対処はされているものの、肥満が世界の医療制度に及ぼす影響は非常に大きく、肥満に伴う複合的な疾患の併発は、治療が複雑化するため初期に予防することが最重要とされている (Apovian CM., 2016)。

肥満を制御するには、肥満に関連する様々な代謝を制御する必要がある。以下に記載する中枢神経系、ミトコンドリア、mTOR および AMPK シグナリングは、肥満との関連性が大きいことが知られている。

中枢神経系は視床下部の弓状核にある 2 種類の違ったニューロン集団を介して摂食とエネルギー消費をコントロールしている。主に、食欲を抑制する pro-opiomelanocortin (POMC) ニューロンと食欲亢進する neuropeptide Y (NPY) /agouti-related peptide (AgRP) ニューロンでエネルギーバランスが適切に維持さ

れているが、何らかの障害が生じると摂食亢進や肥満、もしくは食欲不振や飢餓となりうる。これらのニューロンの活動は、摂食調整物質により促進または抑制される。Serotonin (5-HT) や脂肪組織から分泌された leptin は、POMC ニューロンを興奮させ NPY/AgRP ニューロンを抑制することで食欲を抑制している。胃粘膜から放出される ghrelin は食欲促進ホルモンであり、POMC ニューロンを抑制し NPY/AgRP ニューロンを興奮させることで食欲を亢進させる。また、POMC ニューロンは食欲抑制作用をもつ melanocortin-4 receptors (MC4Rs) のアンタゴニストである  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) を放出することによって食欲を抑制する。POMC ノックアウトマウスや MC4R の欠損が過食や肥満を引き起こすことも報告されている (Sohn JW., 2015)。ペプチド YY (PYY) は、消化管内分泌細胞で産生されるペプチドであり POMC ニューロンを活性化し、NPY ニューロン抑制することで、摂食が抑制される。また、コレシストキニン (CKK) は腸管への脂肪酸や蛋白質の流入により上部小腸から分泌され、NPY ニューロンを抑制し、5-HT ニューロンを活性化し摂食抑制をする。このように、摂食調節は中枢神経系と末梢組織で摂食調節物質やニューロンネットワーク、迷走神経などが介在しコントロールされている (上野ら, 2007)。

ミトコンドリアは脂肪組織を含む代謝組織におけるエネルギー恒常性を維持する役割を担い、肥満や II 型糖尿病の脂肪組織ではミトコンドリアの機能異常が認められることが知られている (Lee JH et al., 2019)。ミトコンドリアの機能異常は脂肪細胞の分化、脂質代謝、インスリン感受性、酸化能、熱産生などに悪影響を及ぼし、結果として代謝性疾患を引き起こす。脂肪組織は主に白色脂肪組織 (WAT) と褐色脂肪組織 (BAT) があり、前者は過剰なエネルギーを中性脂肪 (TG) として蓄積し、後者はミトコンドリアを通して熱産生によりエネルギー消費をする。近年、通常時には WAT として作用するが、冷刺激などのエネルギー消費により熱産生の必要が生じた際に、BAT 様の機能と形態を呈するベージュ脂肪細胞も注目されている (Parl A et al., 2014)。ミトコンドリアは WAT よりも BAT やベージュ脂肪細胞に多く存在する。特に、ミトコンドリアで酸化的リン酸化を脱共益させるタンパクである Uncoupling protein-1 (UCP1) は、BAT や活性化されたベージュ脂肪細胞に発現が多く、ミトコンドリア内膜でプロトンを漏出させることで、電気化学的に熱変換し産生する (Lowell BB et al, 2000)。このように、ミトコンドリア機能を向上し肥満を抑制しようと様々な研究がなされている。PPAR $\gamma$  や CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBPs)、PPAR $\gamma$ -coactivator 1- $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) などの脂肪生成調節因子は、前脂肪細胞の分化を誘導し、ミトコンドリアの数を増加させ酸素消費率を向上させる (Roawn ED et al.,

2000)。しかしながら、ミトコンドリア機能異常は、PGC1 $\alpha$ などのレベル低下を引き起こし、脂肪組織の分化に悪影響をおよぼすため、脂肪酸酸化やエネルギー消費が低下する。そのため、PPAR $\gamma$ などの転写制御因子のアゴニストは脂肪細胞の分化を促進し、肝臓での脂質動員やグリセロール産生、糖新生の調整、および骨格筋や膵臓の $\beta$ 細胞での糖利用を促し、ミトコンドリアの機能やエネルギー消費を高めるため、臨床でも利用されている (Hauner H, 2002; Tonelli J et al., 2004)。ミトコンドリアの酸化リン酸化呼吸鎖によって生成された活性酸素種 (ROS) は、ミトコンドリア内外の多くのシグナル伝達経路の 2nd メッセンジャーとして作用し、主要な役割を果たす (Tormos KV et al., 2011)。しかしながら、慢性的な酸化ストレスによるミトコンドリアでの過剰な ROS 生成は、nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) や c-Jun N-terminal kinase、p38 mitogen-activated protein kinase などの免疫能や炎症反応を誘導するストレス経路を促進し、IL-6 や TNF- $\alpha$ 、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などの炎症促進サイトカインを増加させる。これに続いて、インスリンシグナル経路が活性化され、下流シグナルを抑制するために、インスリン抵抗が引き起こされる。そのため、酸化ストレスを標的とした抗酸化物質は、高血糖を改善し、酸素消費率や脂肪酸酸化を高め、ミトコンドリアの生合成にかかわる遺伝子の発現を増加させるため、ミトコンドリアの機能を高めるための様々な研究がなされている (Lee JH et al., 2019)。また、運動も 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性を高めることにより、PGC1 $\alpha$ のリン酸化を誘導し、結果として骨格筋におけるミトコンドリアの生合成、呼吸、量および密度を増加させることによってインスリン感受性を高めることが報告されている (Jager S et al., 2007)。食事によるカロリー制限も同様に、PGC1 $\alpha$ を誘導することでミトコンドリアの生合成、酸素消費量、ATP 合成など代謝率を高めることが知られている (Omodei D et al., 2011)。その他にも多価不飽和脂肪酸 (PUFA) やポリフェノールなどの天然化合物を摂取し、ミトコンドリアの機能を高め肥満抑制や代謝を高めようと様々なアプローチがなされている (Lee JH et al., 2019)。

グルコース、アミノ酸、脂肪酸の変化が伴う栄養過剰時には、セリン/スレオニンキナーゼであり栄養過剰シグナルである mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路が活性化され、エネルギー不足感受シグナルであるサーチュイン 1 (SIRT1) や AMPK が抑制される。これらのシグナル間に複雑なクロストークが存在し、相互的に作用している。mTOR は複数のアダプタータンパクと結合し、2 種類 (mTORC1 と mTORC2) の異なる機能を有する複合体を形成する。高脂肪食で肥

満を誘導させたマウスやラットの骨格筋や肝臓などの組織では、mTORC1の活性化が認められ、その下流分子である ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)を活性化し、さらに insulin receptor substrate 1 (IRS-1) のセリン残基のリン酸化により、IRS-1 そのものを分解しインスリンシグナル伝達を阻害することで、インスリン抵抗となりうる。その結果として、筋や脂肪への糖の取り込みが低下し、肝臓での糖新生が促され、血糖値が上昇する。また、mTORC1はTGやcholesterolなどの脂質代謝の調節で中心的な役割を担う転写因子の sterol regulatory element binding protein 1C (SREBP1) を活性化し、肝臓における脂肪合成を促す。高脂肪脂肪食を与えたマウスの脂肪組織では、SIRT1の発現が低下し、NF-κBを増加させることで炎症状態を促すことや、インスリン抵抗性と負の相関を示すことが報告されている (Yoshizaki T et al., 2009)。カロリー制限やエネルギー不足などによる AMPK の活性化は、肝臓での糖新生を抑制し、グリコーゲンの合成を抑制する。さらに、SREBP-1 の発現を低下させて、脂肪酸合成を抑制する。また、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素をリン酸化し、その活性を低下させることでコレステロール合成も低下させる。しかしながら、高脂肪食で誘発させた肥満モデルでは、AMPKの活性が低下し、インスリン抵抗をはじめとした糖脂質代謝異常を引き起こすことが報告されている (北田ら, 2013)。また、AMPの活性化はクロストークにより SIRT1の活性化を促し、mTORC1の活性化を抑制する。このように栄養過剰状態において引き起こされる栄養応答シグナル経路を是正し治療標的とした様々な研究がなされている。

## 2. イヌの肥満について

USAで飼育されているイヌの半数以上が過体重もしくは肥満であることが報告されているように (Association for Pet Obesity Prevention, 2021)、ヒトと同様にイヌにおいても肥満は深刻な問題となっている。Beagle, Cocker Spaniel, Dachshund, Rottweiler, Shetland Sheepdog, Dalmatian や Retriever などの犬種は肥満になりやすいことが報告されており、日本国内においても2006年から2016年間の調査で、過体重と肥満のイヌは54.9%であり、最も肥満が多い犬種として Miniature Dachshund、次いで Chihuahua が報告されている (Usui S et al., 2016)。また犬種だけでなく、年齢、性別、食餌などは肥満のリスクファクターとなりうる。イヌの肥満もヒトと同様に、糖尿病、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能亢進症、インスリンノーマなどの内分泌疾患、外傷性および変性性の整形外科的疾患、心呼吸器疾患、尿路疾患に罹患する危険性を高める。特に小型犬においては、肥満は気管虚脱などの心呼吸器疾患を悪化させる要因となりうることが知られている (Osto M et al., 2015)。肥満によるこれらの複合的な疾病の

併発は、治療を複雑化させ QOL や寿命を低下させるため、近年肥満予防に対する関心が高まっている。

イヌにおいては、体重 (BW) が適正 BW から 15%以上超過した場合に過体重、30%以上超過した場合を肥満と定義されている。しかしながら、純粋種では標準 BW の把握は容易であるが、交雑種においては体格の違いが認められるため、理想体重を定義することは非常に困難である。ヒトの BMI のように有効な形態計測法も確立されていない。そのため、イヌの肥満はアメリカ動物病院協会 (AAHA) や世界小動物獣医協会 (WSAVA) が推奨している Body Condition Score (BCS) を 9 段階 (1~3:痩せ、4 および 5:適正、6:過体重、7~9:肥満) もしくは 5 段階 (1: 痩せ, 2:やや痩せ, 3:適正, 4: 過体重、5:肥満) で視覚や触知により栄養評価をしている。BCS は場所を選ばず特別な機器を用いずに、非侵襲的に獣医師や動物看護師だけでなくオーナー達が診断できる利点がある。その一方で、非常に主観的な評価法であるため、評価するスタッフによりスコアのばらつきが生じやすく、精度と信頼性に問題が生じやすい。さらに、中～長毛の犬では視覚により体形を評価することが非常に難しい (動物臨床栄養学, 2019)。イヌの肥満治療法は確立されているわけではなく、食餌により肥満を管理し抑制することと、自発的に運動量を多くすることが重要視されている。しかしながら、これらの方法は成功率が低く、減量が困難なことも多い (Bjørn-vad CR et al., 2019; Osto M et al., 2015; Porsani MYH et al, 2020)。さらに、栄養状態、内分泌関連シグナル、エネルギーやグルコースホメオスタシス間の深い理解は、ペットの QOL や健康を改善する治療ターゲットとなりうる。それゆえに、臨床にて軽度から中等度の肥満をとらえる有用なマーカーや、その因子をターゲットとした治療法の確立が求められている。

### 3. 末梢血単核細胞 (PBMC: Peripheral blood mononuclear cells) を用いた遺伝子発現マーカー解析について

PBMC は主にリンパ球と単球で構成されている自然免疫および獲得免疫細胞である。これらは体内を循環し、栄養物、代謝および末梢組織に曝されるため、全身の健康状態を反映する。つまり、PBMC における遺伝子発現は、脂質代謝や炎症に関連した肝臓や脂肪組織の遺伝子発現を反映しているため、n-3 多価不飽和脂肪酸 (PUFA)、ポリフェノールや L-carnitine のような特異的な栄養物に反応することや、肥満や糖尿病のヒトの PBMC では *resistin*、*Tnfa* や *IL-6* のようなサイトカインの遺伝子発現が認められることが報告されている。また、*insulin*、*glucagon* や *leptin* などのホルモンに対するレセプターを保有して



いるので、臓器の代謝反応を反映したホルモン量の変化にも応答する (Rund-blad A et al., 2019)。肥満に関する遺伝子発現解析は、実験動物の肝臓や脂肪組織、骨格筋を用いて解析されることが多いが、イヌなどのコンパニオンアニマルにおいては動物愛護の観点から、直接動物の組織細胞を得るのは困難である。それゆえに、PBMCは組織のサンプルを得ることなく、簡便に血液サンプルから分離することができるため (Jung UJ et al., 2016)、早期肥満の分子バイオマーカーの探索に用いることが可能である。また、げっ歯類を用いた研究においても、PBMCは食餌に関連した肥満の変化や体重増加初期段階を反映し、食餌量を減らし減量させた場合の代謝回復を反映していることが報告されている (Reynes B et al., 2016)。そのため、肥満にともなう代謝反応を初期段階でとらえる有益なバイオマーカーの探索に利用されることが期待されている。

### 3. 本研究の目的

本研究では、深刻化するイヌの肥満、そして肥満により誘導される各種代謝疾病を予測する、あるいは適切に治療するための有効な臨床検査学的手法を確立するために、血液から採取できる PBMC を用いて、軽度から中等度肥満のイヌの遺伝子発現プロファイリングを行い、代謝異常予知マーカーの基盤研究とした。

### 4. 本論文の構成

本研究は、近年増加しているイヌの肥満に関する文献および実地調査 (第2章)、血中生化学データと BCS により軽度から中等度の肥満と分類されたイヌの PBMC を用いた RNA-seq 発現変動解析 (第3章)、同定したイヌの軽度から中等度肥満の代謝異常予知マーカーの他犬種における適応 (第4章)、総合考察 (第5章) で構成している。

## 第 2 章

### イヌの肥満について文献および実地調査

## 第 1 節 イヌの肥満についての文献調査

### 【緒言】

イヌの肥満も摂取エネルギーを消費エネルギーが上回り、体脂肪が過剰に蓄積した状態を示す。原発性肥満と二次性肥満に分類され、後者は何らかの一時要因があり、その症状の一つとして肥満となる場合であり、症候性肥満とも呼ばれる。その一方で、二次性肥満は内分泌疾患が原因となり、イヌにおいては甲状腺機能低下症や副腎皮質機能亢進症によることが知られている。原発性肥満は、過食や運動不足により生じるとされるが、体脂肪率が増加するメカニズムは十分に明らかにされていない (石岡ら, 2021)。

イヌの肥満もヒトと同様に多遺伝子性であるため、イヌはヒトの肥満に関連した疾患や障害の有用な生物医学モデルとして扱われている (Switonski M et al., 2014; Ost M et al, 2015)。しかしながら、肥満による遺伝的な背景を示す報告はヒトと比較して非常に少なく、ヒトの肥満関連候補遺伝子を基にいくつかの遺伝子が肥満のイヌで解析されているに過ぎない (Switonski M et al., 2014; Yeo GSH., 2017)。

また、第 1 章で示したように、イヌの肥満は USA や UK などにおいても深刻な問題であり、内分泌疾患、脂質代謝異常、整形外科疾患、心肺機能障害、腫瘍などの疾患を併発する。また、肥満は平均寿命の中央値を低下させることから (Kealy RD et al., 2002)、イヌの肥満を複合的な疾患を併発する前段階でとらえる検査法やその因子をターゲットとした診断法が必要とされている。

本節では、イヌの肥満に関して明らかになっていることを文献調査し、実際に臨床においてどのように対処されているのか明らかにすることを試みた。

### 【方法】

イヌの肥満に関する 1534 報の論文のうち、肥満を引き起こす要因、測定法、検査法、対処法および遺伝子が及ぼす影響について絞り込んだ 56 報の文献調査により明らかにした。

### 【結果】

#### 2-1-1 肥満を引き起こす様々な要因について

現代のイヌの飼育は、室内飼育が主体であり外気温による変化を受けないこと、必要以上に食餌を与えられること、最小限の生殖であることからエネルギー要求量が低下していることなど、肥満を誘導する環境的要因は多く存在する。さらに、犬種、年齢、性別など様々な要因が肥満を引き起こす (Loftus JP

et al., 2015)。

Labrador retriever、Boxers、Cairn terriers、Scottish terriers、Shetland sheep-dogs、Basset hound、Cavalier King Charles spaniels、Cocker spaniels、Dachs-hunds、Beagles、Poodle、Spitzなどの犬種は、肥満を引き起こしやすい犬種として知られている (Osto M et al., 2015)。

中型のイヌは小型のイヌに比べて肥満になりやすいことも報告されており (Usui S et al., 2016)、体の大きさと肥満との関連についても示唆されている。性腺摘出をした小型犬は無処置の小型犬と比較して肥満になりやすいこと、性腺摘出をしていない中型犬は肥満になりやすいことも明らかにされている。性腺摘出をした中型犬と小型犬は無処置のそれぞれのイヌと比較して過体重になりやすく、性腺摘出をした小型犬は大型犬と比較して過体重になりやすいことも報告されている (Usui S et al., 2016)。

また、12歳以上のイヌでは性別に関係なく40%程度が肥満という報告もあり、これは老化による代謝率の低下や身体活動の減少によるものと考えられている (Osto M et al., 2015)。また6~10歳の中間の年齢においては、10歳以上のイヌよりも肥満になりやすいことも報告されている (Bjornvad CR et al., 2019)。

イヌなどの小動物の性腺摘出手術は、性ホルモンに関連した疾患予防の観点などから推奨されており、近年は問題行動回避のため去勢や避妊の時期は性ホルモンに暴露される前の6~9ヶ月齢で手術することが多い。しかしながら、避妊去勢手術により食欲コントロールが損なわれるために食欲が増加し、基礎代謝も低下することで、肥満が引き起こされやすくなることが示唆されている (Kawauchi IM et al., 2017)。

雌は雄より肥満になりやすく、性腺摘出手術をしたイヌは無処置のイヌと比較して過体重を引き起こしやすいことが知られている (Lund EM et al., 2006; Usui S et al., 2016)。一部の報告では、雌より雄の方が去勢による肥満の影響を受けやすいことが報告されている (Bjornvad CR et al., 2019)。

獣医療においては、性ホルモンと体組成の関連についての報告は非常に少ないが、精巣摘出術前後のビーグル犬を対象に血中の生化学分析をした解析では、術後2~3日間はC-reactive protein (CRP)の上昇、2~7日間はhaptoglobinやceruloplasminが上昇し、急性相反応蛋白 (acute-phase proteins: APPs)による短期間の炎症性変化が認められた。さらに、術後3~4日間はadiponectinの著しく減少し、初期の変化以降3か月間有意な変化は認められなかった。インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor-1:IGF-1)は術後2~5日間は、著しく減少し、さらに術後8週および12週後では、有意な低下が認められたことが報告されている (Tvarijonaviciute A et al., 2011)。これらの術後の長期的な変動

は、androgen の減少や食事制限に関連しているものと考えられている。IGF-1 は、成長ホルモン (Growth Hormone: GH) の作用により肝臓で産生され、骨格筋や骨の成長を促進し、ヒトでは体脂肪率の上昇と負の相関を示すことが知られている (Iranmanesh A et al., 1998; 小林ら, 2018)。GH は若齢動物の成長促進だけでなく、筋肉量増加や体脂肪量の減少などに関与しており、肥満のヒトやげっ歯類では GH 濃度が低下することが明らかにされている (Luque RM et al., 2006; Scacchi M et al., 1999; 小林ら, 2018)。イヌにおいても、精巣摘出により血中 testosterone 濃度と骨密度が低下することが報告されており、testosterone は IGF-1 に影響をあたえることが知られている (Fukuda S et al., 2000; 小林ら, 2018)。雄犬を用い去勢後の体組成変化や肥満関連のサイトカインやホルモン変化を追跡した解析においても、イヌの去勢手術は体脂肪率を上昇させることは明らかであるが (小林ら, 2018)、これらのメカニズムに関しては十分に解明されてはいない。

健全な成体の哺乳類では、視床下部からゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH: gonadotropin-releasing hormone) が分泌され、下垂体前葉を刺激し黄体形成ホルモン (LH: luteinizing hormone) を放出する。さらに LH は、性腺ステロイドホルモン (testosterone や estrogen/progesterone) を刺激する。通常 GnRH や LH の放出がそれぞれに減少した際には、視床下部と下垂体前葉に負のフィードバック調節機構が作用する。しかしながら、性腺摘出により脳下垂体や視床下部における estrogen や testosterone のフィードバックが抑制され、その結果として LH が超生理学的濃度で継続的に健全な成犬と比較して 30 倍以上に高くなることが報告されている (Kutzler MA, 2020)。通常、食物摂取により CKK や glucagon などの消化管ホルモンの分泌が抑制され、結果として満腹となり空腹が和らぐが、去勢をして 1 週間以内のイヌでは、食物摂取が 20%ほど増加し、食欲が増加することが知られている (Jeusette I et al., 2004; Kutzler MA, 2020)。これらは、性腺摘出により消化管に存在する LH レセプターが刺激されたために、CKK や glucagon の放出が高まったことや、視床下部腹内側核内の障害が過食を引き起こすように、視床下部に存在する LH レセプターの刺激が食欲増加に関与している可能性が示唆されている (Kutzler MA, 2020)。その一方で、性腺摘出手術が食物摂取や ghrelin、insulin、CKK および PYY の濃度に変化が見られなかったという報告もある (Kawauchi IM et al, 2017)。

ヒトと同様に、肥満の動物においても脂肪細胞から adipokine の分泌が認められるが、内臓脂肪と皮下脂肪との代謝がどのような異なるのかについてはまだ明らかにされていない (Appleton DJ et al, 2000)。しかしながら、体脂肪量と leptin の濃度が正の相関を示すことや減量により循環している leptin の量が減少

し、肥満のイヌでは血液脳関門を介した leptin の輸送能が低下することも報告されている (Ishioka K et al., 2006; Nishi N et al., 2006)。また循環血中の adiponectin は体脂肪と負の相関を示すことや、肥満のイヌでは adiponectin の濃度が低下することも知られている (Grant RW et al., 2011)。肥満のイヌにおいても、TNF- $\alpha$ 、CRP、haptoglobin などの濃度が増加し、減量により濃度が低下する。過剰な摂食をしたイヌはインスリン抵抗を引き起こし、TNF- $\alpha$ 、IGF-1、non-esterified fatty acid (NEFA) の濃度を増加させること、ヒトとは対照的にインスリン抵抗のイヌでは CRP が有意に低下することも報告されている (Veiga AP et al., 2008; Osto M et al., 2015)。イヌにおいても肥満によりインスリン抵抗が誘導され、高インスリン血症が認められる。また、ヒトとは異なりイヌのインスリン抵抗が II 型糖尿病に進行することはほとんどないとされている (Osto M et al., 2015; Verkest KR et al., 2012)。肥満のイヌの血中 TG と総コレステロール (T-cho) の濃度は高値を示し、エネルギー密度の高い食餌の摂取により実験犬のリポタンパク、NEFA や TG の濃度が増加することも知られている (Bailhache E et al., 2003; Osto M et al., 2015)。

#### 2-1-2 イヌの肥満とその測定法や検査について

イヌにおける肥満を説明するために、獣医療で最も一般的に利用されている方法は BCS である。BCS は身体的に体脂肪を評価する方法であり、9 段階評価は二重エネルギー X 線吸収測定法 (DEXA: dual energy X-ray absorptiometry) を使用した体脂肪率と相関することが報告されている (Bjørnvad CR et al., 2017)。9 段階評価の BCS はスコアが増加するごとに体脂肪率の 5% 増加に匹敵し、5/9 以上ではスコアが上昇するごとに 10% ずつ過体重であることを示している。米国動物病院協会の栄養診断基準では BCS に加え Muscle Condition Score (MCS) を併用することを推奨している。MCS は側頭部、肩甲骨、肋骨、腰椎、骨盤の計 5 か所を触診し、触診部の筋肉量を主観的に診断する方法であるが、肥満診断に利用されている例は非常に少ない。そのため主に BCS が使用されているが、目視と触診により測定されるため測定者の主観で評価され、客観性に欠ける。BCS の 5 段階評価では 2.5~3.0、9 段階評価では 4~5 を目標値として設定されている。体脂肪率が 35% や 45% の場合も、BCS 5/5 (5 以上) と同様のスコアで評価されてしまうため、正確な評価は困難である。近年は BCS 5 以上の弱点を改善し Body Fat (BF) % と相関が高い Body Fat Index (BFI) も併用されつつある (大辻, 2019; Cline MG et al., 2021)。

また、相対的体重 (RBW: Relative body weight) は主観的に見積もった適正 BW や成長期を終えた体重を標準 BW として、現在の BW と比して表記したも

のであり、これも肥満の目安とする場合がある (石岡, 2012; 石岡, 2019)。

画像診断により肥満度を測定する方法として、コンピューター断層撮影 (CT) 法、超音波検査、BCS と相関のある二重エネルギー X 線吸収法 (DEXA) がある。特に CT 検査は、総体脂肪率だけでなく、皮下脂肪型であるか内臓脂肪型であるか見分けることが出来るため詳細に評価することが可能である (Nagao I et al., 2019)。しかしながら、イヌの内臓脂肪を評価した解析例は非常に少なく、CT 検査を実施する際は麻酔の使用が必要であることなど、臨床での肥満評価のためだけに CT 検査を利用するのは現実的ではない。海外では、DEXA 法は高額ではあるが非侵襲的であるため、正確かつ信頼性ある方法として用いられているが、日本では肥満評価のために臨床で DEXA 法の採用はほとんどなされていない。超音波検査は、無麻酔で測定できるが、肥満率や脂肪率の判定基準が確定されていない (大辻, 2019)。

重水希釈法は、安定同位体重水を経口もしくは静注して評価する方法であり、研究レベルでは用いられているが重水を測定するにはガスクロマトグラフィーや質量分析装置が必要であり、臨床で汎用されてはいない (大辻, 2019)。

また、生体電気インピーダンス法 (BI: Bioelectrical Impedance) は、生体の電気伝導度から体脂肪率を算出する方法であり、イヌでは BI と体脂肪率が高い相関を示したとの報告がある。イヌ用の体脂肪計は被毛をかき分けた腰背部に電極を押し当て電気伝導度から間接的に皮下脂肪量を測定する (大辻, 2019)。

### 2-1-3 肥満に対する対処法について

肥満と診断された場合には、食餌制限による減量と運動量を増やすことが推奨されているが、成功例は限られ、一度減量した後に体重増加してしまうこともあり、体型管理は非常に困難である (Bjørnvad CR et al., 2019; Osto M et al., 2015; Porsani MYH et al., 2019)。

食餌中の脂質や炭水化物の量は満腹中枢に関わるホルモンに影響を与えることが知られている (Schauf S et al, 2016)。高炭水化物食は、食欲抑制ホルモンである CKK と PYY のレベルを増加させるが、高プロテイン食は体重減少に必要とされるエネルギー制限を低下させ、結果として体重を維持する期間にエネルギー要求量 (MER) を増やすことが報告されている (Kawauchi IM et al., 2017)。臨床では食餌制限のために、特に脂肪分やカロリーを制限し、高タンパク食で満足感が得られるように高食物繊維が配合された市販の療法食への切り替えが推奨される (de Godoy MRC, 2018)。

栄養学的に肥満は、エネルギー代謝とエネルギー摂取、消化の主に 2 要因に分けることができる。エネルギー代謝は、安静時代謝率、活性代謝量、相対活

量によって影響を受ける。エネルギー摂取はホルモンや行動に基づく摂食行動、消化効率や栄養消化に影響を与える食餌に影響をうけるとされている (Loftus JP et al., 2015)。2006年に米国国家研究協議会 (NRC: National Research Council) は、イヌのMERは犬種や行動量、飼育条件 (実験室飼育もしくは家庭飼育) により異なり、成犬は  $95 \sim 200 \text{ kcal/kg}^{0.75}$  の範囲でMERを維持すべきであることが述べられている (Bermingham EN et al., 2014)。他の報告では、NRCとEuropean Pet Food Industry (FEDIAF) で推奨しているMERは、実際に運動をしないイヌのMERとは異なることが明らかにされている (Pedrine-Ili V et al., 2019)。さらに、内分泌疾患、整形外科疾患、神経学的疾患や腫瘍性疾患に罹患している動物や性腺摘出した動物のMERは低下し、BCSが上昇するごとにMERが  $9.8 \text{ kcal/BW}^{0.75}$  ずつ減少することも報告されている (Pedrinelli V et al., 2019)。小型のcolony犬を対象にした研究では、ChihuahuaのMERは小さく、Yorkshire terrierやDachshundのMERは大きいことが報告されているように、犬種はMERに影響を与える可能性があり、以前過体重であり減量したイヌのMERは健康なイヌと比較して著しく低下し、減量後のMERは減量中の一日当たりのエネルギー摂取量 (EI) と比較して10%以上高くなることが明らかにされている (Serisier S et al., 2013)。その一方で、減量したイヌのMERは減量が必要なイヌのMERと比較して15~30%以上高いという報告もあり (Serisier S et al., 2013)、減量期間中のエネルギー制限の結果として代謝率が増加したことが示唆されている。また、減量中の急激なエネルギー制限はリバウンドを引き起こす可能性が高く、急激な体重減少は除脂肪組織の損失が大きくなりうる (Serisier S et al., 2013)。

イヌの一日当たりのエネルギー要求量 (DER) は、安静時エネルギー要求量 (RER) =  $70 \times \text{体重}(W)^{0.75} \text{ kcal ME/日}$  を基準とし、ライフステージごとの係数を乗じて算出している (大島, 2019)。また、NRCは犬種により体格差があることから、成犬のMER =  $132 \times W^{0.75} \text{ kcal ME/日}$  を基準として、ライフステージに応じた係数を乗じてDERの推定することを提唱している (大島, 2019)。

また、海外ではミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質を阻害し食欲抑制や脂肪吸収抑制効果有するジロロタピドやミトラタピドなどの肥満治療薬が利用されているが (石岡, 2021)、日本では普及していない。

#### 2-1-4 遺伝子が肥満に及ぼす影響

イヌの肥満に関する遺伝子解析は、あらかじめ候補遺伝子を選定して機能的な遺伝子多型を探索、Genome wide association study (GAWs) により機能的な遺伝子多型の探索、機能的なゲノム科学としてトランスクリプトームを用いた発



現解析、DNAメチル化などのエピジェネミクス解析例がある (Switonski M et al., 2013)。イヌの脂肪組織における内分泌機能に関する研究はなされているが、遺伝子多型などの研究は非常に少ない (Ost M et al., 2015)。

近年、イヌの *MC4R* の一塩基多型 (SNPs: Single Nucleotide polymorphisms) が red fox や Chinese raccoon dog、arctic fox、Beagle において同定され、Beagle においては2種類のSNPsと体重との関連が示唆されている (Zeng R et al., 2014)。*MC4R* は主に視床下部に発現し、摂食行動や体重、エネルギーホメオスタシスを調整し、メラノコルチン-4レセプターをコードする遺伝子である。Beagle や Golden Retriever の小規模なコホート研究においては、*MC4R* と肥満や体重との相関が認められる一方で、*MC4R* のSNPsとイヌの肥満あるいは体重との関連は少なく、*MC4R* のメチル化のレベルも脂肪生成に影響を与えないことが報告されている (Mankowska M et al., 2017a)。ヒトやマウスなどではDNAメチル化などのエピジェネティック変化が、肥満や2型糖尿病などの疾患の病態に深く関係するという報告がなされているが (Desiderio A et al, 2016; Drummond EM et al, 2013)、イヌおいての報告はほとんどない。

Labrador Retriever では POMC 遺伝子の 14bp 欠失が  $\beta$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone) と  $\beta$ -endorphin の配列を妨げ、これらは体重や脂肪蓄積、食欲を増加させることが報告されている (Raffan E et al., 2016)。また、これらの変化は Labrador Retriever に特異的であることも報告されている (Mankowska M et al., 2017b)。

さらに、イヌの3型メラノコルチン受容体 (*MC3R*) の SNP が体重と有意に相関する結果も報告されている (Skorczyk A et al., 2011)。

Labrador Retriever の Fat-mass and obesity-associated protein (*FTO*) の2種類のSNPsは体重やBCSと関連が無く、iroquois homebox 3 (*IRX3*) の SNP は検出されなかった (Grzemski A et al., 2019)。*FTO* は体脂肪や肥満に関連したタンパクをコードし、*IRX3* は脂肪細胞の分化に関わり *FTO* のイントロンに結合している。

イヌにおいては、G protein-coupled receptor (GPR) 120 の非同義置換が検出されており、肥満と関連する可能性が示唆されている (Miyabe M et al., 2015)。GPR120 は、不飽和脂肪酸受容体であり、哺乳類の小腸に発現しCKKやglucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌や脂肪細胞の分化促進、抗炎症作用などの多様な生理機能を有することが知られている (Hirasawa A et al, 2005; Katsuma S et al., 2005)。また、脂肪細胞にも発現し脂肪生成とも関連することも報告されている (Gotoh C et al., 2007)。

*RETN*, *IL6* および *TNF* などの adipokine をコードする遺伝子は肥満に関連す

る候補遺伝子として知られており、SNPsが検出されている (Sassek M et al., 2013)。さらに Labrador Retriever においては、TNF が肥満のマーカー となりうる可能性が示唆されている (Mankowska M, 2016)。

イヌの Adiponectin が肥満を伴う代謝変化の指標となりうるか、血液生化学的および遺伝子学的な解析から、末梢血球 mRNA 上の Adiponectin receptor 1 (ADIPO-R1) と Adiponectin receptor 2 (ADIPO-R2) の発現が肥満群で有意に高いことが報告されており、肥満のイヌで減少した adiponectin に対して receptor が代償的に増加した可能性が示唆されている (森ら, 2013)。

高脂肪食を食べさせて肥満にした雌 beagle の脂肪組織を、マイクロアレイで解析し給与前と比較したところ、脂肪組織のホメオスタシスに関わる代謝系、酸化ストレス、ミトコンドリアホメオスタシス、細胞外マトリックス関連の変動遺伝子が検出された (Grant et al., 2011)。

肥満の雌の Beagle の骨格筋組織をマイクロアレイ解析により対象群と比較したところ、酸化ストレスや骨格筋の分化に関わる変動遺伝子が検出され、endocannabinoid 代謝、insulin シグナル、II 型糖尿病、carnitine 輸送に関わる遺伝子の関連が明らかにされた (Grant et al., 2013a)。

また、肥満の雌の beagle の皮下および性腺脂肪組織をマイクロアレイ解析により、リソソーム、細胞外マトリックスレセプター相互作用、renin-angiotensin 系、造血幹細胞系統経路に高いエンリッチメントを示すことが明らかになった (Grant et al., 2013b)。

また、高脂肪食を摂取させたイヌへの cannabinoid receptor 1 (CB1R) antagonist recombinant 投与は、脂質分解を高め、その制御因子である natriuretic peptide (NP) およびそのレセプターの NPRs,  $\beta$ -1 および  $\beta$ -3 adrenergic receptor などの遺伝子の発現を高めることが明らかにされた (Iyer et al., 2019)。さらに、これらの遺伝子に加え UCP1 に依存しない熱産生経路に関わることで、WAT のベージュ化によるミトコンドリア数の増加や、熱産生が高まることが報告された (Iyer et al., 2019)。他の同様の研究においても、高脂肪食を摂取させたイヌへの CB1R antagonist recombinant 投与は、肝臓での adiponectin 受容体の発現を高め脂肪酸酸化を誘導し、肝臓のインスリン感受性を高めることが明らかにされている (Kabir M et al., 2015)。

#### 2-1-5 イヌの肥満に関する研究の総括

以上に記載したように、イヌの肥満に関する研究は、その社会的な要請も強いことから、発症要因、検査法、対処法、そして遺伝的因子に関する研究が盛んに行われている。しかし、それに伴う代謝変動や他の疾病を誘導する体内応

答は十分に理解されているわけではない。また、一度肥満になると様々な疾患を併発する可能性が高く治療も複雑化することや、食餌や運動による減量も困難な場合があるなど、早期に肥満を捉える代謝異常予知マーカーが必要である。さらに、肥満には犬種や飼育環境など様々な要因が関わることから、飼い主から個別にカウンセリングし、一日あたりのエネルギー量 (DER) や摂取カロリーを計算して、減量プログラムを作成し対処していく必要があるが、日本においては、肥満に対処する明確なプロトコルや専門に指導する肥満外来に受診できる環境が必ずしもあるわけではない。このようは背景からも、イヌの肥満時の代謝メカニズムを明らかにし、体型変化よりも早期に捉え、肥満予防や治療が可能となる代謝異常予知マーカーが必要である。

## 第 2 節 イヌの肥満について実地調査

### 【緒言】

本節では、第 1 節で示した調査結果を基に、日本におけるイヌの肥満の現状が十分に調査されていないことから、実際に動物病院に来院するイヌの肥満率について調査し、その重要性を明らかにすることを試みた。

### 【方法】

2018 年の 1 月～12 月に、神奈川県川崎市の O 動物病院を来院したイヌ (N=94) と Team HOPE 健康診断を受診したイヌ (N=73) を対象として、BCS5 段階評価の調査をした。

また、動物病院に来院したイヌの犬種 (Miniature Dachshund, Chihuahua, Toy Poodle, Miniature Schnauzer, Pembroke Welsh Corgi, Yorkshire Terrier, Pug, Mix) および性別 (Male, Female, Cast, Spay) は一元配置分散分析にて、年齢 (Adult:10 歳未満、Old 群:10 歳以上) はマンホイットニーの U 検定を用いて解析した。さらに、健康診断を受診したイヌについても犬種 (Miniature Dachshund, Chihuahua, Toy Poodle, Shiba, Miniature Schnauzer, Yorkshire Terrier, Labrador Retriever, Shizu, Mix) および性別 (Male, Female, Cast, Spay) は一元配置分散分析にて、年齢 (Adult:10 歳未満、Old 群:10 歳以上) はマンホイットニーの U 検定を用いて解析した。

### 【結果】

2018 年に動物病院を来院したイヌにおける BCS ごとの割合では BCS4～5 で 28.5 %、であり (Table. 2-2-1A)、健康診断を受診したイヌにおける BCS ごとの割合は、BCS4～5 が 34.0 %であった (Table. 2-2-1B)。病院を受診したイヌでは BCS2～5 の間で推移していたが (Table. 2-2-1A)、健康診断を受診したイヌは BCS3～5 の範囲内であった (Table. 2-2-1B)。また、健康診断を受診した BCS4 および 5 のイヌの割合は、病院に来院した同じ BCS のイヌと比較して高かった (Table. 2-2-1)。

病院に来院したイヌにおける犬種ごと (Miniature Dachshund: n=11, Chihuahua: n=19, Toy Poodle: n=18, Shiba: n=7, Miniature Schnauzer: n=4, Pembroke Welsh Corgi: n=3, Yorkshire Terrier: n=5, Pug; n=3, Mix: n=9)、および健康診断を受診したイヌにおける犬種ごと (Miniature Dachshund: n=10, Chihuahua: n=9, Toy Poodle: n=12, Shiba: n=5, Miniature Schnauzer: n=3, Yorkshire Terrier: n=6, Labrador Retriever: n=4, Shizu: n=4, Mix: n=3) の BCS においても、平均値±標準誤差に有

意な差は認められなかった (Table 2-2-2)。病院に来院したイヌにおける性別ごと (Male: n=16, Female: n=15, Cast: n=23, Spay: n=40)、および健康診断を受診したイヌにおける性別ごと (Male: n=12, Female: n=4, Cast: n=34, Spay: n=23) の BCS においても、平均値±標準誤差に有意な差は認められなかった (Table 2-2-3)。また、病院に来院したイヌにおける年齢ごとの (Adult: n=42, Old: n=49)、および健康寝台を受診したイヌにおける年齢ごとの (Adult: n=26, Old: n=47) BCS においても、平均値±標準誤差に有意な差は認められなかった (Table 2-2-4)。

### 【考察】

動物病院に来院したイヌと健康診断を受診したイヌの半数以上が BCS3 であったが、健康診断を受診したイヌの方が BCS4~5 の割合が多かった (Fig. 2-2-1)。この結果は、病院への来院は十分に食餌の摂取ができない患畜の来院が想定されるが、健康診断は無症状の健康な動物が受診するケースが多いためではないかと考えられた。

また、肥満になりやすい犬種、年齢および性別についての報告はなされているが (Usui et al., 2016)、今回の解析ではすべてにおいて有意な差は認められなかった。犬種ごとの結果においては、BCS4 および 5 のイヌが各犬種に分散していたこと、性別ごとの結果においてもサンプル数がバラバラであり、少なかつたこと、年齢ごとの結果においても、両群の年齢にばらつきがあり、サンプル数が少ないことが要因として考えられた。また、1つの病院から調査した結果であったため、複数の病院での調査やサンプル数を増やして、さらなる検討が必要である。

本研究では、BCS と疾患との関連や他のパラメーターとの関連についての調査はできなかったが、病院で健康診断を受診した肥満と過体重のイヌは全体の 1/3 程度であることが明らかになり (Table. 2-2-1)、前節で述べたように、肥満は複合的な疾患併発の可能性もあり、臨床で軽度から中等度の肥満をとらえる有用な代謝異常予知マーカーや、その因子をターゲットとした治療法の確立が求められている。そのため第3章では、過体重~肥満のイヌと健常体型のイヌの生化学データや遺伝子発現を比較し、軽度から中等度の肥満時における代謝変動について明らかにする。

図および表

Table 2-2-1 2018年に神奈川県川崎市O動物病院に来院したイヌにおけるBCSの割合

(A) 病院に来院したイヌにおけるBCSの割合 (N=94)

BCS	イヌの割合 (%)
1	0.00
2	4.30
3	67.0
4	26.3
5	2.20

(B) 健康診断を受診したイヌにおけるBCSの割合 (N=73)

BCS	イヌの割合 (%)
1	0.00
2	0.00
3	66.0
4	30.0
5	4.00

Table 2-2-2 2018年に神奈川県川崎市O動物病院に来院したイヌにおける犬種ごとのBCSの割合

(A) 病院に来院したイヌ

	<b>N</b>	<b>BCS</b>
Miniature Dachshund	11	3.1±0.2
Chihuahua	19	3.2±0.2
Toy Poodle	18	3.0±0.1
Shiba	7	3.1±0.2
Miniature Schnauzer	4	3.5±0.5
Pembroke Welsh Corgi	3	3.7±0.2
Yorkshire Terrier	5	2.9±0.3
Pug	3	3.3±0.3
Mix	9	3.3±0.2

平均値±標準誤差, \*p < 0.05.

(B) 健康診断を受診したイヌ

	<b>N</b>	<b>BCS</b>
Miniature Dachshund	10	3.4±0.2
Chihuahua	9	3.6±0.2
Toy Poodle	12	2.9±0.1
Shiba	5	3.5±0.2
Miniature Schnauzer	3	2.8±0.2
Yorkshire Terrier	6	3.2±0.2
Labrador Retriever	4	3.4±0.2
Shizu	4	3.8±0.1
Mix	3	3.3±0.3

平均値±標準誤差, \*p < 0.05.

Table 2-2-3 2018年に神奈川県川崎市O動物病院に来院したイヌにおける性別ごとのBCSの割合

(A) 病院に来院したイヌ

	<b>N</b>	<b>BCS</b>
Male	16	3.0±0.2
Female	15	3.1±0.2
Cast	23	3.1±0.1
Spay	40	3.2±0.1

平均値±標準誤差, \*p < 0.05.

(B) 健康診断を受診したイヌ

	<b>N</b>	<b>BCS</b>
Male	12	3.1±0.1
Female	4	2.9±0.1
Cast	34	3.3±0.1
Spay	23	3.4±0.1

平均値±標準誤差, \*p < 0.05.



Table 2-2-4 2018年に神奈川県川崎市O動物病院に来院したイヌにおける年齢ごとのBCSの割合

(A) 病院に来院したイヌ

	<b>N</b>	<b>BCS</b>
Adult	42	3.2±0.1
Old	49	3.1±0.1

平均値±標準誤差, \*p < 0.05.

(B) 健康診断を受診したイヌ

	<b>N</b>	<b>BCS</b>
Adult	26	3.3±0.1
Old	47	3.3±0.1

平均値±標準誤差, \*p < 0.05.

## 第 3 章

血中生化学データと **BCS** により軽度から中等度の  
肥満と分類されたイヌの **PBMC** を用いた **RNA-seq**  
発現変動解析

## 第 1 節

### Miniature Dachshund の生化学データと RNA-seq による発現変動解析

#### 【緒言】

前章で示したように、肥満は腫瘍、心臓病や 2 型糖尿病などの慢性疾患、筋骨格系障害を引き起こし、生活の質を悪くすることが報告されている (Visscher TL et al., 2001)。西欧諸国においては、イヌの肥満が増加しており、ヒトと同様に深刻である (Grant RW et al., 2011; Switonski M., 2013; Usui S et al., 2016; Wallis N, et al., 2020)。いくつかの報告では、Beagle や Dachshund、Retriever などの犬種で肥満が多く、日本では小型犬である Miniature Dachshund の過体重および肥満が多いことが知られている (Switonski M et al., 2013; Usui S et al., 2016)。近年イヌの肥満も糖尿病、心臓病、脂質異常症、関節系の疾患などの罹患率と死亡率を増加させることや (Grant RW et al., 2011; Usui S et al., 2016)、理想的な体型を維持するための食事制限は寿命を延長させることが報告されている (Kealy RD et al., 2002)。それゆえに、獣医療においては軽度から中等度の肥満の段階で肥満に関連した複合的な疾患の併発を予防する方法や早期の有効な治療法が必要とされている。

肥満動物において脂肪細胞の多くを占める白色脂肪細胞は、内分泌器官として adipokine を分泌し炎症を引き起こす。また、様々な組織のミトコンドリア内で脂肪酸の $\beta$ 酸化が活性化され、過剰な活性酸素種 (ROS) が生成される (Grant RW et al., 2011; Kawasumi K et al., 2018; Mizunoe Y et al., 2019)。しかしながら、肥満は多遺伝子性疾患であることが知られているため、げっ歯類によるデータはヒトやイヌと必ずしも一致するとは限らない (Fuchs T et al., 2018)。

PBMC はリンパ球と単球で構成されており、生検サンプルの組織を用いることなく、血液サンプルから簡単に採取することが可能である (Jung UJ et al., 2016)。PBMC の遺伝子発現は、脂肪組織、筋組織、肝組織における遺伝子プロファイリングと相関を示し、肥満の臓器における炭水化物代謝や脂質代謝免疫応答を反映することが知られている (Jung UJ et al., 2016; Larsen SV et al., 2018)。いくつかのイヌを用いた研究では、疾患、代謝、栄養の素因を健康な状態と比較し一部の臓器の転写プロファイルを特定している (Anderson RC et al., 2018; Hulanicka M et al., 2014; Schnurr TM et al., 2015)。肥満のイヌの脂肪組織や筋組織を用いた遺伝子発現解析では、endocannabinoid 代謝、insulin シグナル伝達、酸化ストレス、ミトコンドリア恒常性、細胞外マトリックスなどに関連があることが報告されている (Grant RW et al., 2011; Grant RW et al., 2013a; Iyer et al., 2019)。しかしながら、イヌの肥満に関連する生物学的プロセスは十分に解

明されておらず、体全体の代謝状態を反映する PBMC を用いた遺伝子発現解析はなされていない。したがって、軽度から中等度の肥満犬と適正体重犬の遺伝子発現プロファイリングを RNA-seq 解析にて比較し、イヌの肥満発症に関連した分子メカニズムを特定した。

## 【対象および方法】

### 1. 対象

2017年5月～12月に、ヤマザキ学園大学（現ヤマザキ動物看護大学）動物実験委員会の承認を得て（承認番号：H29ヤ大動実第1号および10号）、1～8歳までの性別が様々な Miniature Dachshund を対象として、BCSを用いてBCS3をControl群（n=6）とし、BCS4と5をObesity群（n=6）に分類をした（Table3-1A および B）。各群より3mlの空腹時採血をし、そのうち2mlはEDTA（BDバキュテナ採血管）処理後、遺伝子解析に使用した。0.6mlは血清（BDマイクロテナ微量採血管）処理後、血液生化学項目の測定を実施し、残りの0.4mlはEDTA（BDマイクロテナ微量採血管）処理後、末梢血液一般血液検査（CBC）に使用した。また、各群のBWを測定した。

### 2. CBC

EDTA処理した血液をセルタックα（日本光電，東京）用いて赤血球数（RBC）、白血球数（WBC）、血小板数（PLT）、ヘマトクリット値（HCT）、ヘモグロビン濃度（HGB）を測定した。

### 3. 生化学項目の測定

DRI-CHEM 4000V（FUJIFILM，東京）を用いて血清のグルコース（GLU）、中性脂肪（TG）、総コレステロール（T-cho）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、C反応性蛋白（CRP）の測定をした。また、インスリン（Insulin）は、CANINE INSULIN ELISA（MERCODIA, Sweden）を用いて、レプチン（Leptin）は Canine Leptin Assay kit #EZCL-31K（Merck, USA）を用いて測定をした。

### 4. 遺伝子発現解析

EDTA処理した血液2mlをHistopaque-1.077（Sigma-Aldrich, USA）2mlの上に重層し、400 G 10℃条件下で50分間遠心した。遠心後の中間層にあるPBMCをパスツールピペットで回収し、PBSで3回洗浄した。洗浄したPBMCをTRIzol Regent（Thermo Fisher scientific, USA）に分散させ、-80℃で保存した。分散させたPBMCからメーカーの指示にしたがってtotal RNAを抽出し、Control

群と Obeisty 群の RNA-Seq 解析 (euofins genomics, Japan) をした。Control 群と比較して Obesity 群で、3.5 倍以上に上方制御および下方制御された発現変動遺伝子は、false discovery rate (FDR) < 5%、Prabavity (P) value < 0.05 で選択された。RNA の品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France) で決定され、RNA の完全性番号 (RIN) > 8.5 のサンプルのみが、RNA シーケンスおよび定量リアルタイム PCR で解析された。RNA-Seq ライブラリーは、北海道システムサイエンス (札幌, 日本) で、配列決定された。TruSeq Stranded mRNA キット (Illumina, San Diego, CA) を使用して、Control 群 (n = 6) および Obesity 群 (n = 6) の PBMC から抽出した total RNA サンプルから RNA-Seq のライブラリーを調製し、製造元のプロトコールに従って解析した。簡潔に示すと、SBS / Cluster Kit v2 でシーケンスキットを使用し、HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) のシングルエンドモードでシーケンス解析をした。Illumina BaseSpace で作成された FASTQ ファイルは、さらなる分析に使用した。

Control 群と比較して、Obesity 群で 3.5 倍以上に上方制御および下方制御された 9 遺伝子 (*NDUFV3*, *BCL2L15*, *NRCAM*, *LOC6511565* *LOC1008555400*, *ALAS2*, *FOLH1*, *PLAT* and *NTRK2*) を抽出し、これらの結果を評価するために、各サンプルの Total RNA から、RT-PCR 法 (Takara, Japan) にて増幅し cDNA を作成した。さらに TB Green premix Ex Taq II および Thermal Cycler Dice Real time system II (TAKARA, Japan) を使用して 9 遺伝子の Real Time PCR 解析をした。各プライマーは Table 3-2 に示した。

## 5. 発現変動遺伝子群の KEGG pathway 解析

Control 群と比較したときに、Obesity 群で上方制御および下方制御された遺伝子の機能について明らかにするために、GO および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway を DAVID (the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) を使用して解析した。さらにこれらの遺伝子に関する Heatmap は、MeV version 4.9 を用いて作製した。

## 6. 統計解析

実験データは means ± standard error of the mean (SEM) で表記し、Statcel 4 (The Publisher OMS Ltd., Japan) を用いて 5% の有意水準で対応のないスチューデントの t 検定あるいはマンホイットニーの U 検定にて検定をした。

### 【結果】

#### 1. BW と BCS、CBC、生化学項目の測定によるスクリーニング

Obesity 群の BW と BCS は Control 群と比較して大きく、マンホイットニーの U 検定で 5% 水準にて有意な差が認められた (Fig. 3-1)。

また、本研究で用いたイヌの CBC (RBC、WBC、PLT、HCT、HGB) 結果は、両群ともに基準範囲内であった (Table 3-3A および B)。

生化学項目においては、糖代謝指標である GLU は両群ともに有意な差は認められなかったが、Insulin では Obesity 群が Control 群と比較して高くスチューデ

ントの t 検定の 5%水準で有意に高い結果が得られた (Table. 3-4.)。脂質代謝の指標である TG では Obesity 群が Control 群と比較して高く、スチューデントの t 検定の 5%水準で有意な差が認められた T-cho では両群で有意な差は認められなかった (Table 3-4.)。肝機能の指標である AST と ALT、炎症を評価する CRP では両群ともに有意な差は認められず、adipokine である Leptin においてもスチューデントの t 検定では有意な差は認められなかったが、Obesity 群が Control 群と比較して高かった (Table 3-4.)。

## 2. 遺伝子発現解析と GO 解析

Obesity 群の発現変動を Control 群と比較した時に、3.5 倍以上で上方制御された遺伝子は 154 遺伝子、下方制御された遺伝子は 194 遺伝子が抽出され、これらの遺伝子のヒートマップを示した (Fig. 3-2A)。遺伝子の機能や pathway を明らかにするために、David 解析をしたところ、上方制御された発現変動遺伝子群からは pathway のヒットはしなかったが、下方制御された発現変動遺伝子群からは African trypanosomiasis pathway と Malaria pathway がヒットし、これらの pathway でヘモグロビン (Hb) に関する遺伝子として *LOC100855540* (hemoglobin subunit alpha-like)、*LOC100855558* (hemoglobin subunit alpha-like)、*LOC480784* (hemoglobin subunit beta-like)、*LOC609402* (hemoglobin subunit beta-like) がヒットした (Fig. 3 および 4)。これらの結果より、本研究で用いた Obesity 群は Hb 関連遺伝子に異常が生じていることが明らかになった。さらに、Control 群と比較した時に Obesity 群で 3.5 倍以上発現変動した遺伝子について確認をするために上方制御された遺伝子から *NDUFV3*: 5.1 fold change; *LOC611565*: 4.4 fold change; *BCL2L15*: 4.2 fold change; *NRCAM*: 8.2 fold change の 4 遺伝子と、下方制御された遺伝子から *FOLH1*: -25 fold change; *LOC100855540* (hemoglobin subunit alpha like): -5.9 fold change; *ALAS2*: -5.6 fold change; *NTRK2*: -4.9 fold change; *PLAT*: -4.3 fold change の 5 遺伝子を選択し (Table 3-5)、RT-PCR 解析をしたところ *BCL2L15* における Obesity 群の遺伝子発現が Control 群と比較してスチューデントの t 検定で有意に高いこと、*FOLH1* および *LOC100855540*、*ALAS2* における Obesity 群の遺伝子発現は Control 群と比較してスチューデントの t 検定で有意に低下していることが明らかになったが、それ以外の遺伝子では有意な差は認められなかった (Fig. 3-4 A および B)。

### 【考察】

Obesity 群の BW、BCS、Insulin および TG の値は Control 群と比較して有意に

高かったが (Fig. 3-1, Table 3-4)、Obesity 群の Insulin や TG の値は基準範囲内であり、糖代謝の指標である GLU、脂質代謝の指標である T-cho、肝機能の指標である AST と ALT、アディポカインである Leptin、炎症の指標である CRP の値においては両群において有意な差が認められなかった (Table 3-4)。さらにこれらの生化学項目は、肥満後期に上昇することが報告されていることから (Grant RW et al., 2011; Grant RW et al., 2013a; Ishioka K et al., 2007; Kabir M et al., 2015; Kawasumi K et al., 2018)、本研究で用いた Obesity 群は糖代謝や脂質代謝に異常を引き起こす前の段階、つまり軽度から中等度の肥満の段階であると考えられた。イヌの BCS と Leptin 濃度は正相関することが知られており (Ishioka K et al., 2007)、Obesity 群の Leptin 濃度が Control 群と比較して有意な差は認められず、3 倍程度高い傾向を示した結果においても (Table 3-4)、BCS と Leptin 濃度の正相関が示唆された ( $P=0.035$ ,  $R=0.610$ )。

次に、Control 群と Obesity 群の 2 群間の特徴的な代謝変動を明らかにするために、採取した PBMC の RNA-seq 解析を行った。その結果、Control 群と比較して Obesity 群で 3.5 倍以上に下方制御された 194 の発現変動遺伝子群より、African trypanosomiasis pathway と Malaria pathway との関連が新たに明らかになった (Fig. 3-2B)。さらにこれらの pathway の Hb に関する *LOC100855540* および *LOC100855558* の遺伝子発現に異常があることも明らかになり (Fig. 3-3)、real-time RT-PCR 解析にて *LOC100855540* と *ALAS2* の発現が有意に低下していた結果からも (Fig. 3-4B)、イヌの軽度から中等度の肥満では *LOC100855540* などの遺伝子 (Hemoglobin subunit alpha-like および beta-like) やヘム生合成における初段階の酵素との関連が示唆された。Hb は赤血球系および非赤血球系細胞に遺伝子発現が認められ、Hemoglobin subunit alpha-like は、ヒトの hemoglobin subunit alpha (HBA) と相同性が高い (Sangwung P et al., 2017)。成人の赤血球系細胞において、Hb は 2 つの  $\alpha$  グロビン鎖と 2 つの  $\beta$  グロビン鎖のそれぞれに 1 つずつヘムが結合した 4 量体分子を形成しており、組織に酸素を運搬し組織から二酸化炭素を肺に運搬する。また、マウスの  $\alpha$  グロビリン鎖と  $\beta$  グロビリン鎖の突然変異は、酸素に対する Hb の親和性と酸素利用の効率を低下させることが報告されている (Yang X et al., 2018)。このように、*LOC100855540* の発現低下は (Fig. 3-2B および 3-4B) は、酸素の運搬能に影響する可能性がある。しかしながら、本研究で用いた Obesity 群における Hemoglobin subunit alpha-like および beta-like の発現低下は、これらの寄生虫感染症 (African trypanosomiasis や Malaria) とは直接の関連はしない。

5-aminolevulinic acid synthase 2 (*ALAS2*) は、ヘムの生合成の過程で初期及び律速段階の反応を触媒する赤血球に特異的なミトコンドリア遺伝子である (Fig. 3-5)。赤血球分化中の *ALAS2* の発現は、Hb の要求を満たすために強く活性化される。以前の研究では、*ALAS2* の変異はヘム不足により前赤芽球期の赤血球分化が停止するため、深刻な貧血を引き起こすことが明らかにされている (Liu J et al., 2018)。よって *ALAS2* の低発現は、ヘムの生合成を阻害し、グロビンの生成や酸素の循環を制限する可能性があるが、イヌの肥満が *ALAS2* にどのような影響

を及ぼすのかについては明らかではない。さらに最近の研究では、BCS が理想的である健常群のイヌと比較して肥満であるイヌの動脈血酸素分圧 ( $\text{PaO}_2$ ) が低下し、吸気時間及び呼気時間が短くなるために呼吸数が増加することが報告されている (Pereira-Neto GB et al., 2018)。両群の HCT や HGB 差がみとめられなかったことから (Table 3-3)、軽度から中等度の肥満であるイヌの酸素に対する Hb の親和性変化は、貧血などの疾患を引き起こすほど深刻ではないことが考えられる。しかしながらこのわずかな変化が、ミトコンドリア代謝に影響を及ぼす可能性がある。また、これまでの研究で低酸素症は腎臓でエリスロポエチン (EPO) の産生増加を誘導し、血液中を循環し赤血球前駆細胞で豊富に発現するレセプターと結合し、赤血球前駆細胞の分化が促進され RBC を増加させることが知られている (Bunn HF, 2013)。これにより血液の酸素運搬能力が強化され、酸素分圧が増加しフィードバックにより EPO のさらなる発現が抑制される。イヌの肥満による酸素のわずかな減少が、*LOC100855540* や *ALAS2* の発現とその機能を低下させることにより、EPO の生成を促進し、赤血球数を維持することが考えられた。肥満のヒトを対象とした研究においては、脂肪細胞のミトコンドリアの酸化能力 (酸素消費率) とミトコンドリアの生合成が低下し、代謝変化、インスリン抵抗性、あるいは軽度の炎症が引き起こされることが報告されている (Bhatraju NK et al., 2017; de Mello AH et al., 2018)。肥満を誘導する活性酸素種 (ROS) と酸化ストレスは、クエン酸回路 (TCA 回路) とミトコンドリアの呼吸鎖を圧倒し、ミトコンドリアの機能障害を引き起こす可能性がある (de Mello AH et al., 2018)。よって、ミトコンドリア関連の遺伝子発現変化は、骨髄の造血と体内酸素循環レベルに悪影響を及ぼす可能性が考えられる。また、肥満のイヌの脂肪組織を使用したトランスクリプトーム解析では、ミトコンドリアの恒常性変化が認められたことが報告されている (Grant RW et al., 2011)。Hb 関連遺伝子が PBMC から検出された理由については明らかではないが、いくつかの研究においては、食餌誘発性肥満が骨髄の造血幹細胞と前駆細胞に変化をもたらし、脂肪生成や初期段階の血管新生と密接に関係していることが明らかにされている (Ambrosi TH et al., 2017; Emmons R et al., 2017; Grant RW et al., 2013b)。よって、Hb 関連遺伝子の発現低下の結果が、骨髄または他の脂肪細胞の脂肪生成効果を反映し、造血系を阻害する可能性がある。

本研究では Obesity 群における *BCL2L15* の発現が、Control 群と比較した時に有意な変化を示したが (Fig. 3-4A)、David 解析で明らかになった Hb に関する代謝経路に属してはいなかった。B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) -like protein 15 (*BCL2L15*) は、*BCL2 family kin (Bfk) isoform b* をコードする遺伝子であり、胃、卵巣、骨髄および脾臓で発現が認められることが知られている (Pujianto DA et al., 2007)。胃腸腫瘍の場合に発現が低下することや、妊娠中や授乳中の哺乳類で上方制御されていることから、雌の性ホルモンによって制御されている可能性が示唆されている (Dempsey CE et al., 2005)。*BCL* protein family はアポトーシス促進および抑制分子で構成されており、ミトコンドリア外膜透過能をコントロールすることによって、細胞死を制御している。Bfk の過剰発現は、弱くアポトーシスを促進し、*BCL2* の抗アポトーシス作用と拮抗することが知られている (Ban Y et al., 2016; Coultas L et al., 2003; Dempsey CE et al., 2005; Gurung P et al., 2015; Ozören N et al., 2009; Pujianto DA et al., 2007)。ヒトの Bfk はカスパーゼによって切断され、



アポトーシス促進タンパクとなり、イニシエーターとしてよりもアポトーシスシグナルを増幅器として作用する (Gurung P et al., 2015)。それゆえに、軽度から中等度の肥満である Obesity 群において、*BCL2L15* が上方制御されることにより、(Fig. 3-4A)、ミトコンドリアの膜電位が低下し、cytochrome C の放出が促進され、アポトーシスを誘導することが考えられた (Fig. 3-6)。

また、Obesity 群における *FOLH1* の発現は、Control 群と比較した時に有意な変化を示したが (Fig. 3-4B)、*BCL2L15* と同様に David 解析で明らかになった Hb に関する代謝経路に属してはいなかった。*FOLH1* は、glutamate carboxypeptidase II (GCPII)としても知られており、食事由来の polyglutamyl folates の末端γ結合グルタミン酸残基を逐時切断して加水分解する酵素をコードする遺伝子である。食事由来の葉酸は、monoglutamyl および polyglutamyl 型の両方で構成されているが、空腸刷子縁膜を通過する前にすべて monoglutamyl 型に加水分解される (Fig. 3-7)。一部の報告によると、*FOLH1* の下方制御によって、葉酸の吸収不良が生じ高システイン症となり糖や脂質代謝を変える可能性がある (Šilhavý J et al., 2018)。葉酸は DNA のメチル化、DNA の合成および細胞増殖に必要不可欠な補因子である (Martino J et al., 2018)。最近の報告では、血清中の葉酸濃度が低下すると肥満を引き起こし、慢性的な高脂肪食の継続は葉酸トランスポーターの発現を低下させ肝臓の葉酸貯留の減少を引き起こすことが知られている (Sid V et al., 2018)。よって、軽度から中等度の肥満である Obesity 群において、*FOLH1* が下方制御されることにより (Fig. 3-4B)、葉酸トランスポーターの発現や肝臓での葉酸貯蔵に影響を及ぼすことで、糖および脂質代謝の障害を引き起こす可能性が考えられる。しかしながら、本研究では基準範囲を超えた GLU、TG および T-cho の濃度上昇 (Table 3-4) や糖及び脂質代謝に関わる遺伝子の発現変動は認められなかった。また、今回用いた両群で RBC、HCT および HGB に大きな差は認められなかった (Table 3-3)。さらに、肥満による葉酸の不活化は赤芽球における DNA の合成やアポトーシスに影響を及ぼす可能性がある。これらの結果は前述したように、イヌの軽度から中等度の肥満による *LOC100855540* の発現低下結果 (Fig. 3-2B および 3-4B)との関連が示唆された。

PBMC に関するトランスクリプトーム解析では、組織特異的に発現する遺伝子があるため、PBMC と組織間で遺伝子の発現結果が異なることも報告されている (Afman LA et al., 2012; Brattbakk HR et al., 2013; Pinhel MAS et al., 2017)。その一方で、PBMC の遺伝子発現は肥満のヒトの組織における糖代謝や脂質代謝、炎症を反映することも明らかにされている (Jung et al., 2016)。今回、軽度から中等度の肥満のイヌの PBMC から、対照犬と比較した時の生理学的な変化と転写バイオマーカーを明らかにしたが、組織における発現変動についても確認する必要がある。

## 【まとめ】

BCS に従い PBMC の代謝変化と遺伝子発現プロファイリングを調査したところ、軽度から中等度の肥満である Obesity 群では Control 群と比較をして、TG と Insulin 濃度にのみに有意差が認められたが、基準範囲内であり、他のパラメーターには有意差は認められなかった。また、PBMC を用いた RNA-seq および RT-PCR 解析から、軽度から中等度の肥満の Obesity 群では Control 群と比較して、アポトーシスに関わる遺伝子の発現が促進されること、ヘモグロビンサブユニット、赤血球ミトコンドリアのヘム生合成および葉酸の加水分解に関わる遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。よって、本研究はこれらの遺伝子が軽度から中等度の肥満診断に有用である可能性が高いことを示唆している。本研究では、軽度から中等度の肥満犬と健康な体型のイヌとの比較を目的としており、ビーグルなどの実験犬ではなく、家庭で飼育されているイヌを対象として肥満により併発する疾患を予防または治療するために、血液をターゲットとして有用な情報を提示した。

しかしながら、本節で明らかになった遺伝子が Obesity 群のその後の健康状態にどのような影響を及ぼし、これらをターゲットとすることで肥満を制御することが可能であるのか明らかではない。そのため、次節では今回用いたイヌのその後の病態履歴を追跡調査し、軽度から中等度の肥満のその後に検出された遺伝子群がどのような影響を与えるのかを推察することを試みることにした。

## 第 2 節

### 第 3 章第 1 節で選別した Control 群および Obesity 群における追跡調査

#### 【緒言】

イヌは肥満により糖尿病、心臓病、脂質異常症、関節系の疾患などの罹患率が高くなり (Grant RW et al., 2011; Usui S et al., 2016)、寿命にも影響を与える (Kealy et al., 2002)。また、複合的な疾患の併発は治療を複雑化させるため、軽度から中等度の肥満を早期に捉える遺伝子マーカーやそのメカニズムを理解する必要がある。

前節にて *BCL2L15*、*FOLH1*、*LOC100855540* および *ALAS2* が Obesity 群で特徴的に発現変動することを明らかにした (Fig. 3-4)。*BCL2L15* の上方制御による弱いアポトーシス誘導、*FOLH1* の下方制御による葉酸代謝異常、*LOC10085540* の下方制御による Hb 代謝異常、*ALAS2* の下方制御によるポルフィリン代謝異常などが、その後肥満のイヌにどのような影響を及ぼすのかは明らかではない。また、これらの遺伝子を初期の代謝異常予知マーカーとして捉え、制御することで、肥満の予防や治療を可能となるのかについての解析の必要がある。

そのため本節では、前節で供試した Miniature Dachshund の 1~2 年後の健康状態を追跡調査し、検出された PBMC の肥満特異的遺伝子群の機能と有効性を明らかにするために、実際にその後の Obesity 群の健康状態にどのように影響を与えているのか再検討した。

#### 【対象および方法】

第 3 章第 1 節で選別した Miniature Dachshund の Control 群および Obesity 群のうち (n=5) の Miniature Dachshund を対象として、第 1 節の解析から 1~2 年後の BW、BCS、CBC および生化学データを調査した。

#### 【結果】

Control 群の 5 頭 (dog2~6) では、2017 年に実施した遺伝子発現解析から 1~2 年後の健康状態に変化はなく、一部のイヌでは TG が基準範囲を超える場合があったものの、ほとんどのイヌで健康診断結果は基準範囲内であり、前節の調査時と変化が認められなかった (Table 3-6 および 3-7)。Obesity 群の 5 頭 (dog7~11) については、dog8 や dog9 のように健康上にほとんど問題がない場合も認められたが、dog7 は BW や BCS は 2017 年度と変わらず高値を示しているだけでなく (Table 3-9A-1)、TP と Ca の数値がやや基準範囲より高く、ALP はかなり高値を示していたため (Table 3-9A-2)、肝・胆管系疾患の問題を考慮し、低

脂肪・高食物繊維の食餌療法にて経過観察が続けられていた。また、dog10は健康診断の数値上は問題ないが、以前より無菌性結節性脂肪織炎と考えられる病態を定期的に繰り返している (Table 3-8 および 3-9D)。dog11 においては、その後 2018 年に蛋白漏出性腸症 (PLE: Protein losing enteropathy) を発症し利尿剤とステロイドの投与がなされていた (Table 3-8 および 3-9E)。

### 【考察】

Control 群の dog3 と dog4 では TG が基準範囲を超えて測定されたが (Table 3-7B-3 および C-2)、体調など経過観察したところ特に問題がなかったとの診断がなされ、食餌などの影響により一過性に高値を示した可能性が考えられる。

Obesity 群の dog7 は、ALP の値は基準範囲よりはるかに高値を示していたが (Table 3-9A-2)、ALP はリン酸モノエステルを加水分解する酵素であり、肝臓や胆管だけでなく、腎臓や骨などの全身臓器にも分布するため、肝臓や胆道疾患以外の骨疾患やステロイドなどの薬剤によっても上昇することが知られている (Itoh H et al., 2002)。ALP のアイソザイム解析や他の検査の実施がなされていないため、どのアイソザイムが増加しているのかは明らかではないが、胆管に問題が生じている場合やクッシング症候群などの内分泌系の疾患、食餌の問題など様々な可能性が考えられる。BW や BCS の高値は、上記の疾患を引き起こす原因となるため早期に肥満を捉え改善する必要がある。

また、dog10 は以前より無菌性結節性脂肪織炎を発症している可能性があることが明らかになったが (Table 3-8)、本疾患群は感染、異物、外傷、膵炎あるいは血管炎などが原因となり、皮下脂肪組織に炎症を引き起こす。特発性の場合も多く不明な点が多いが、Miniature Dachshund が好発品種であることが報告されている (Shiga T et al., 2012)。

さらに、dog11 はその後 2018 年に PLE を発症し、生化学データにおいても ALB 値の低下や WBC の高値を示しており (Table 3-8 および 3-9E)、炎症反応を示している可能性が示唆された。PLE は、腸粘膜細胞からアルブミンが過剰に喪失することより発症し、慢性腸炎、感染症、腸リンパ腫、腸リンパ管拡張症 (ILE) などの病因より発症することが報告されている (Nagata N et al., 2020)。さらに、イヌの PLE は炎症性腸疾患 (IBD) と関連が高いことや、リンパ球減少および CD4<sup>+</sup>T 細胞の消費など詳細なメカニズムは明らかではないが、免疫能に問題が生じることが知られている (Craven MD., 2019)。また、最近の報告でも高脂肪食が PLE 引き起こす原因になることが明らかにされている (Mustafa T., 2019)。

以上の結果から、第 1 節で明らかになった発現変動遺伝子である *BCL2L15*,

*FOLH1*, *LOC100855540* および *ALAS2* とその後の病態には直接的な関連は認められなかったが、軽度から中等度の肥満である **Obesity** 群においては、一部を除いて肥満は改善されておらず、新たな疾患の発症や代謝異常が認められた。よって、PBMC における *BCL2L15*, *FOLH1*, *LOC100855540* および *ALAS2* の遺伝子発現の変動を検出することにより、肥満およびそれに由来する疾患を予測できる代謝異常予知マーカーとして使用できる可能性が明らかとなった。

#### 【まとめ】

軽度から中程度の肥満のイヌの PBMC で認められた *BCL2L15*, *FOLH1*, *LOC100855540* および *ALAS2* の遺伝子発現変動は、本節の追跡調査により、肥満およびそれに由来する疾患の発症を予測できる代謝異常予知マーカーとして使用できる可能性が明らかとなった。その一方で、これら遺伝子群とその後の病態には直接的な関連は認められなかったため、疾病治療のターゲットとしてこれらの遺伝子群を改善する用途に用いることは有効ではないことが推察された。

次章では、これら遺伝子群が肥満あるいはそれに由来する疾病を引き起こすことを予測する代謝異常予知マーカーとして、広範囲の犬種で使用できる可能性を探るため、**Miniature dachshund** 以外の他犬種においても、早期から中等度の肥満でこの変動が認められるのかを明らかにすることにした。

図および表

Table 3-1 (A) 第3章第1節の供試犬における Control 群の年齢および性別

	<b>Age</b>	<b>Gender</b>
<b>dog1</b>	3	Cast
<b>dog2</b>	8	Spay
<b>dog3</b>	8	Spay
<b>dog4</b>	6	Female
<b>dog5</b>	3	Spay
<b>dog6</b>	8	Male

Cast: 去勢雄, Spay: 避妊雌, Male: 雄, Female: 雌

Table 3-1 (B) 第3章第1節の供試犬における Obesity 群の年齢および性別

	<b>Age</b>	<b>Gender</b>
<b>dog7</b>	7	Cast
<b>dog8</b>	3	Female
<b>dog9</b>	5	Female
<b>dog10</b>	8	Cast
<b>dog11</b>	5	Cast
<b>dog12</b>	5	Cast

Cast: 去勢雄, Spay: 避妊雌, Male: 雄, Female: 雌

Table 3-2. 第3章第1節の RT-PCR で用いた primer 配列

Gene Symbol	Primer(5'→3')		amplicon size	Gene ID
<i>NRCAM</i>	F	CAACTCGACAAAAGCGTTCA	174	475881
	R	CACATAAGGCGACAGCTTCA		
<i>LOC611565</i>	F	TTGGCTTGCATATGTTGTTTGTG	248	611565
	R	CACAGATGACCTGGGCAGTAAGT		
<i>NDUFV3</i>	F	AGTTCCTCAGGAGAGCAAAGGAA	151	478421
	R	CATCATCTGAGGATCAACCTTGG		
<i>BCL2L15</i>	F	AGTTCCTCAGGAGAGCAAAGGAA	151	606767
	R	CATCATCTGAGGATCAACCTTGG		
<i>LOC100855540</i>	F	ACTTCAAGCTCCTGAGCCACTG	142	1.01E+08
	R	GCAGCTTAACGGTACTTGGAGGT		
<i>ALAS2</i>	F	CAGAGAAGGTCACACACCTGGTT	216	491498
	R	CATTACTGCACCAGACTGACACG		
<i>PLAT</i>	F	ATGCAACTGTGACCAAGGACATT	120	482840
	R	TACACTGTGTGATGGCTCAGCTC		
<i>FOLH1</i>	F	TTCAATCCCAGTGGAAGGAATTT	194	476775
	R	AGGTGGCACAACATCTGAAACAT		
<i>NTRK2</i>	F	ATTGGAATGACCAAGATCCCTGT	231	484147
	R	GTCACTGGCATCCTTCAGTGTCT		

F:フォワード, R: リバース



Table 3-3 (A) 第3章第1節の供試犬における Control 群の CBC 結果

	<b>RBC</b> ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	<b>HCT</b> (%)	<b>HGB</b> (g/dl)	<b>WBC</b> (/ $\mu\text{L}$ )	<b>PLT</b> ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )
<b>dog1</b>	855	52.7	17.1	13200	27.2
<b>dog2</b>	710	50.4	16.6	9900	25.6
<b>dog3</b>	720	47.5	14.8	7400	35.8
<b>dog4</b>	867	55.6	18.6	4400	15.7
<b>dog5</b>	811	57.8	18.9	5000	21.9
<b>dog6</b>	753	50.3	17.2	7700	32.0

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

Table 3-3 (B) 第3章第1節の供試犬における Obesity 群の CBC 結果

	<b>RBC</b> ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	<b>HCT</b> (%)	<b>HGB</b> (g/dl)	<b>WBC</b> (/ $\mu\text{L}$ )	<b>PLT</b> ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )
<b>dog7</b>	881	54.1	16.9	10700	39.7
<b>dog8</b>	877	55.9	18.4	14800	44.6
<b>dog9</b>	725	51.0	16.7	8700	26.1
<b>dog10</b>	784	52.0	17.4	8700	23.7
<b>dog11</b>	744	50.5	16.3	9600	22.3
<b>dog12</b>	880	57.0	19.7	7000	39.8

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

Table 3-4 第3章第1節の Control 群と Obesity 群における血清中の糖代謝 (GLU および Insulin), 脂質代謝 (TG および T-cho), 肝機能 (AST および ALT), 炎症 (CRP), アディポカイン (Leptin) の濃度

	<b>Control</b>	<b>Obesity</b>
GLU (mg/dL)	97.8 ± 4.18	92.7 ± 6.11
Insulin (mU/L)	7.05 ± 1.36	14.5 ± 2.96*
TG (mg/dL)	58.8 ± 4.22	102 ± 16.2*
T-cho (mg/dL)	148 ± 8.01	196 ± 23.8
AST (U/L)	31.3 ± 1.98	28.7 ± 2.11
ALT(U/L)	47.0 ± 3.89	43.8 ± 10.0
CRP (mg/dL)	0.92 ± 0.08	1.08 ± 0.19
Leptin (ng/mL)	2.47 ± 1.08	7.25 ± 2.26

平均値 ± 標準誤差, n= 6

スチューデントの t 検定 \* < 0.05

GLU: グルコース, TG: 中性脂肪, T-cho: 総コレステロール, AST: アスパラギン酸アミノトランスアミナーゼ, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, CRP: C 反応性タンパク

Table 3-5 第3章第1節のRNA-seq解析結果をControl群と比較した時にObesity群において3.5倍以上で上方制御した遺伝子 (n= 4) および下方制御した遺伝子 (n= 5)

Up-regulated genes	Fold change	Down-regulated genes	Fold change
<i>NDUFV3</i>	5.1	<i>FOLH1</i>	-25
<i>LOC611565</i>	4.4	<i>LOC100855540</i>	-5.9
<i>BCL2L15</i>	4.2	<i>ALAS2</i>	-5.6
<i>NRCAM</i>	8.2	<i>NTRK2</i>	-4.9
		<i>PLAT</i>	-4.3

FDR < 0.05, P < 0.05

*NDUFV3*: NADH デヒドロゲナーゼフラボタンパク質 3; *LOC611565*: WC1.1 様抗原; *BCL2L15*: BCL-2 様タンパク質 15; *NRCAM*: 神経細胞接着分子; *FOLH1*: 葉酸加水分解酵素 1; *LOC100855540*: グロビンドメイン含有タンパク質; *ALAS2*: 5'-アミノレブリン酸合成酵素 2; *NTRK2*: 神経栄養因子チロシンキナーゼ 2; *PLAT*: プラスミノゲンアクチベーター;をコードする遺伝子

Table 3-6 第3章第1節の Control 群における 2 年後および 3 年後の追跡結果

	2018 年・2019 年の健康状態	Table に示した結果
dog2	健康状態に問題がなかったため、 健康診断の実施はしていない	2018 年と 2019 年の BW・BCS Table 3-7 (A)
dog3	健康状態に問題はなく、 2019 年の健康診断結果も問題ない	2018 年と 2019 年の BW・BCS Table 3-7 (B-1) 2019 年の CBC・生化学 Table 3-7(B-2 および B-3)
dog4	健康状態は概ね問題はなく、 2018 年と 2019 年に健康診断を実施	2018 年と 2019 年の BW Table 3-7 (C-1) 2018 年と 2019 年の生化学 Table 3-7 (C-2)
dog5	健康状態に問題がなかったため、 健康診断の実施はしていない	
dog6	健康状態に問題はなく、 2019 年に健康診断を実施	2019 年の CBC・生化学 Table 3-7 (D-1 および D-2)

dog1 の結果は得られなかったため、dog2～6 までの 5 頭の追跡調査の内訳を示した。

Table 3-7 第3章第1節の Control 群における 2018 年および 2019 年度の BW および BCS、CBC、生化学検査結果

(A) Control 群 dog2 の BW および BCS

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	5.00	4.90
BCS	3	3

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア  
健康上時に問題が認められなかったため、他の検査を実施していない。

(B-1) Control 群 dog3 の BW および BCS

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	3.94	4.00
BCS	3	3

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア

(B-2) Control 群 dog3 の CBC 結果

	2019 年測定値
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	717
HTC (%)	44.2
HGB (g/dL)	15.5
WBC (/ $\mu\text{L}$ )	6930
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	39.4

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

(B-3) Control 群 dog3 の生化学検査結果

	2019 年測定値
TP (g/dL)	6.60
ALB (g/dL)	2.90
GLOB (g/dL)	3.70
A/G	0.80
T-Bil (mg/dL)	0.20
ALT (U/L)	42.0
ALP (U/L)	95.0
$\gamma$ -GTP (U/L)	1.00
BUN (mg/dL)	16.0
CRE (mg/dL)	0.90
T-cho (mg/dL)	170
TG (mg/dL)	144

NH <sub>3</sub> (μmol/L)	9.00
Ca (mg/dL)	9.30
IP (mg/dL)	3.80
GLU (mg/dL)	91.0
Na (mmol/L)	147
K (mmol/L)	4.70
Na/K	31.0
Cl (mmol/L)	113
CRP (mg/dL)	0.40

TP: 総タンパク; ALB: アルブミン; GLOB: グロブリン; A/G: アルブミン/グロブリン比; T-Bil: 総ビリルビン; ALT: アラニントランスアミナーゼ; ALP: アルカリフォスファターゼ; γ-GTP: γ-グルタミルトランスフェラーゼ; BUN: 尿素窒素; CRE: クレアチニン; T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪; NH<sub>3</sub>: アンモニア; Ca: カルシウム; IP: 無機リン; GLU: グルコース; Na: ナトリウム; K: カリウム; Na/K: ナトリウム/カリウム; Cl: クロール; CRP: C反応性タンパク



(C-1) Control 群 dog4 の BW および BCS

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	4.00	4.0 0
BCS		3

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア  
BCS の測定はしていない。

(C-2) Control 群 dog4 の生化学結果

	2018 年測定値	2019 年測定値
TP (g/dL)	6.40	5.60
ALB (g/dL)	2.90	3.10
A/G 比	0.83	1.20
T-Bil (mg/dL)	0.10	< 0.10
AST (U/L)	35.0	31.0
ALT (U/L)	61.0	76.0
ALP (U/L)	136	134
γ-GTP (U/L)	5.20	8.00
LIP (U/L)	75.0	61.0
BUN (mg/dL)	14.0	17.0
CRE (mg/dL)	0.60	0.65
T-cho (mg/dL)	242	146
TG (mg/dL)	185	70.0
Ca (mg/dL)	10.1	9.50
IP (mg/dL)	3.80	2.90
GLU (mg/dL)	79.0	86.0

TP: 総タンパク; ALB: アルブミン; GLOB: グロブリン; A/G: アルブミン/グロブリン比; T-Bil: 総ビリルビン; AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT: アラニントランスアミナーゼ; ALP: アルカリフォスファターゼ; γ-GTP: γ-グルタミルトランスフェラーゼ; LIP: リパーゼ; BUN: 尿素窒素; CRE: クレアチニン; T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪; Ca: カルシウム; IP: 無機リン; GLU: グルコース

(D-1) Control 群 dog6 の CBC 結果

	2019 年測定値
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	771
HCT (%)	52.6
HGB (g/dL)	17.4
WBC ( $/\mu\text{L}$ )	6000
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	27.1

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

(D-2) Control 群 dog6 の生化学結果

	2019 年測定値
T-cho (mg/dL)	187
TG (mg/dL)	84.0

T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪

Table 3-8 第3章第1節で分類した Obesity 群における 2 年後および 3 年後の追跡結果

	2018 年・2019 年の健康状態	Table に示した結果
<b>dog7</b>	体重と BCS が減少しないため、 療法食を処方されている ALP と Ca が年々増加している	2018 年と 2019 年の BW・BCS Table 3-9 (A-1) 2018 年の生化学 Table 3-9 (A-2)
<b>dog8</b>	減量し健康状態に問題が無い ため、健康診断はしていない	2018 年と 2019 年の BW・BCS Table 3-9 (B)
<b>dog9</b>	毎年健康診断をしている AST が高い年もあるが、 測定値は基準範囲内である	2018 年と 2019 年の BW・BCS Table 3-9 (C-1) 2018 年と 2019 年の生化学 Table 3-9 (C-2)
<b>dog10</b>	毎年健康診断をしている 夏場に皮膚炎症 (以前から無菌性結節性脂肪織炎と 考えられる皮膚症状)	2018 年と 2020 年の CBC・生化学 Table 3-9 (D-1 および D-2)
<b>dog11</b>	蛋白漏出性腸症を発症し ステロイド治療中	2018 年と 2019 年の体重 Table 3-9 (E-1) 2018 年と 2019 年の CBC・生化学 Table 3-9 (E-2 および E-2)

dog12 の結果は得られなかったため、dog7～11 までの 5 頭の追跡調査の内訳を示した。

Table 3-9 第3章第1節の Control 群における 2018 年および 2019 年度の BW および BCS、CBC、生化学検査結果

(A-1) Obesity 群 dog7 の BW および BCS

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	12.3	12.7
BCS	5	5

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア

(A-2) Obesity 群 dog7 の生化学結果

	2018 年測定値
TP (g/dL)	7.90
ALB (g/dL)	3.70
A/G 比	0.88
T-Bil (mg/dL)	0.10
AST (IU/L)	280
ALT (IU/L)	68.0
ALP (IU/L)	1158
γ-GTP (IU/L)	7.70
LIP (IU/L)	49.0
BUN (mg/dL)	17.0
CRE (mg/dL)	0.80
T-cho (mg/dL)	228
TG (mg/dL)	118
Ca (mg/dL)	11.9
IP (mg/dL)	3.10
GLU (mg/dL)	72.0

TP: 総タンパク; ALB: アルブミン; GLOB: グロブリン; A/G: アルブミン/グロブリン比; T-Bil: 総ビリルビン; AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT: アラニントランスアミナーゼ; ALP: アルカリフォスファターゼ; γ-GTP: γ-グルタミルトランスフェラーゼ; LIP: リパーゼ; BUN: 尿素窒素; CRE: クレアチニン; T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪; Ca: カルシウム; IP: 無機リン; GLU: グルコース

(B) Obesity 群 dog8 の BW および BCS

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	4.92	4.60
BCS	3	3

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア

(C-1) Obesity 群 dog9 の BW および BCS

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	6.96	6.44
BCS	4	4

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア

(C-2) Obesity 群 dog9 の生化学結果

	2018 年測定値	2019 年測定値
TP (g/dL)	6.50	5.70
ALB (g/dL)	3.20	3.30
A/G 比	0.97	1.40
T-Bil (mg/dL)	0.10	< 0.10
AST (U/L)	51.0	31.0
ALT (U/L)	32.0	21.0
ALP (U/L)	78.0	81.0
$\gamma$ -GTP (U/L)	7.60	7.00
LIP (U/L)	81.0	46.0
BUN (mg/dL)	17.0	11.1
CRE (mg/dL)	0.70	0.77
T-cho (mg/dL)	239	208
TG (mg/dL)	127	59.0
Ca (mg/dL)	10.3	9.60
IP (mg/dL)	2.00	3.10
GLU (mg/dL)	102	96.0

TP: 総タンパク; ALB: アルブミン; A/G: アルブミン/グロブリン比; T-Bil: 総ビリルビン; AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT: アラニントランスアミナーゼ; ALP: アルカリフォスファターゼ;  $\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ; LIP: リパーゼ; BUN: 尿素窒素; CRE: クレアチニン; T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪; Ca:カルシウム; IP: 無機リン; GLU: グルコース

(D-1) Obesity 群 dog10 の CBC

	2018 年測定値	2019 年測定値
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	788	826
Ht (%)	63.7	59.8
Hb (g/dL)	20.5	19.4
WBC (/ $\mu\text{L}$ )	8900	8000
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	35.6	34.2

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

(D-2) Obesity 群 dog10 の生化学結果

	2018 年測定値	2019 年測定値
TP (g/dL)	6.80	6.00
ALB (g/dL)	3.10	3.20
A/G	0.84	1.10
T-Bil (mg/dL)	0.10	< 0.10
AST (IU/L)	25.0	23.0
ALT (IU/L)	39.0	37.0
ALP (IU/L)	57.0	45.0
$\gamma$ -GT (IU/L)	5.10	4.00
LIP (IU/L)	31.0	19.0
BUN (mg/dL)	30.0	18.6
CRE (mg/dL)	0.60	0.44
T-cho (mg/dL)	135	159
TG (mg/dL)	102	126
Ca (mg/dL)	9.90	9.50
IP (mg/dL)	4.50	3.50
GLU (mg/dL)	86.0	80.0
Na (mEq/L)	150	146
Cl (mEq/L)	117	110
K (mEq/L)	4.60	5.10

TP: 総タンパク; ALB: アルブミン; GLOB: グロブリン; A/G: アルブミン/グロブリン比; T-Bil: 総ビリルビン; AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT: アラニントランスアミナーゼ; ALP: アルカリフォスファターゼ;  $\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ; LIP: リパーゼ; BUN: 尿素窒素; CRE: クレアチニン; T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪; Ca: カルシウム; IP: 無機リン; GLU: グルコース; Na: ナトリウム; Cl: クロール; K: カリウム



(E-1) Obesity 群 dog11 の BW

	2018 年測定値	2019 年測定値
BW (kg)	6.32	5.84
BCS		

BW: 体重; BCS: ボディーコンディションスコア

(E-2) Obesity 群 dog11 の CBC

	2018 年測定値	2019 年測定値
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	596	758
Ht (%)	41.4	47.6
Hb (g/dL)	15.3	17.0
WBC ( $/\mu\text{L}$ )	19000	17860
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	43	41.2

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

(E-3) Obesity 群 dog11 の生化学結果

	2018 年測定値	2019 年測定値
TP (g/dL)		5.90
ALB (g/dL)	1.30	2.80
GLOB (g/dL)		3.10
A/G		0.90
T-Bil (mg/dL)		0.10
ALT (U/L)	22.0	30.0
ALP (U/L)	75.0	36.0
$\gamma$ -GTP (U/L)		0.00
BUN (mg/dL)	21.1	15.0
CRE (mg/dL)	0.70	1.20
T-cho (mg/dL)	96.0	70.0
TG (mg/dL)	74.0	20.0
NH <sub>3</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	31.0	6.00
Ca (mg/dL)	8.50	9.10
IP (mg/dL)		4.10

GLU (mg/dL)	101	107
Na (mmol/L)	147	148
K (mmol/L)	4.30	4.30
Na/K		34.0
Cl (mmol/L)	114	116
CRP (mg/dL)		0.40

TP: 総タンパク; ALB: アルブミン; GLOB: グロブリン; A/G: アルブミン/グロブリン比; T-Bil: 総ビリルビン; ALT: アラニントランスアミナーゼ; ALP: アルカリフォスファターゼ;  $\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ; BUN: 尿素窒素; CRE: クレアチニン; T-cho: 総コレステロール; TG: 中性脂肪; NH<sub>3</sub>:アンモニア; Ca:カルシウム; IP: 無機リン; GLU: グルコース; Na: ナトリウム; K: カリウム; Na/K: ナトリウム/カリウム; Cl: クロール; CRP: C 反応性タンパク

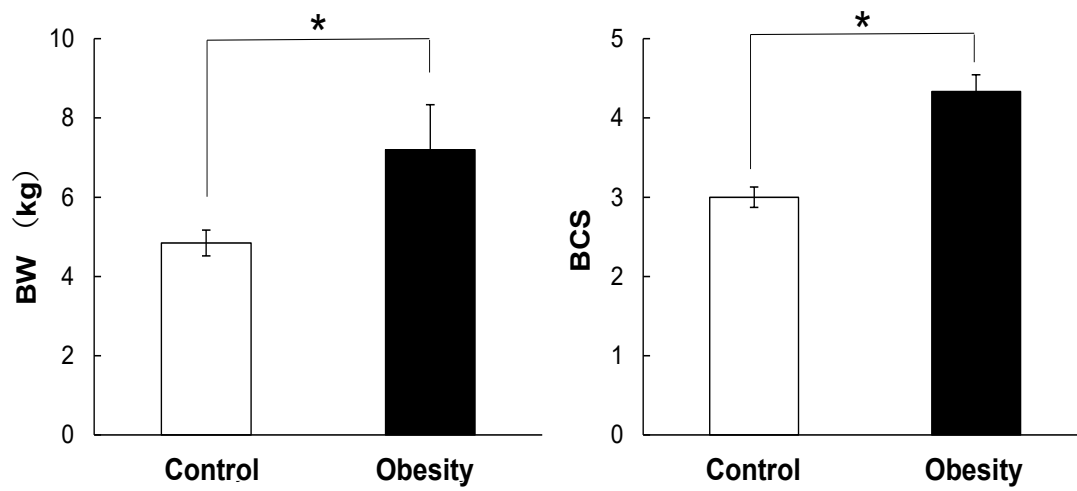


Fig. 3-1. Control 群と Obesity 群の BW および BCS  
 平均値±標準誤差, n= 6  
 マンホイットニーの U 検定\* P < 0.05  
 □: control 群, ■: obesity 群

(A)

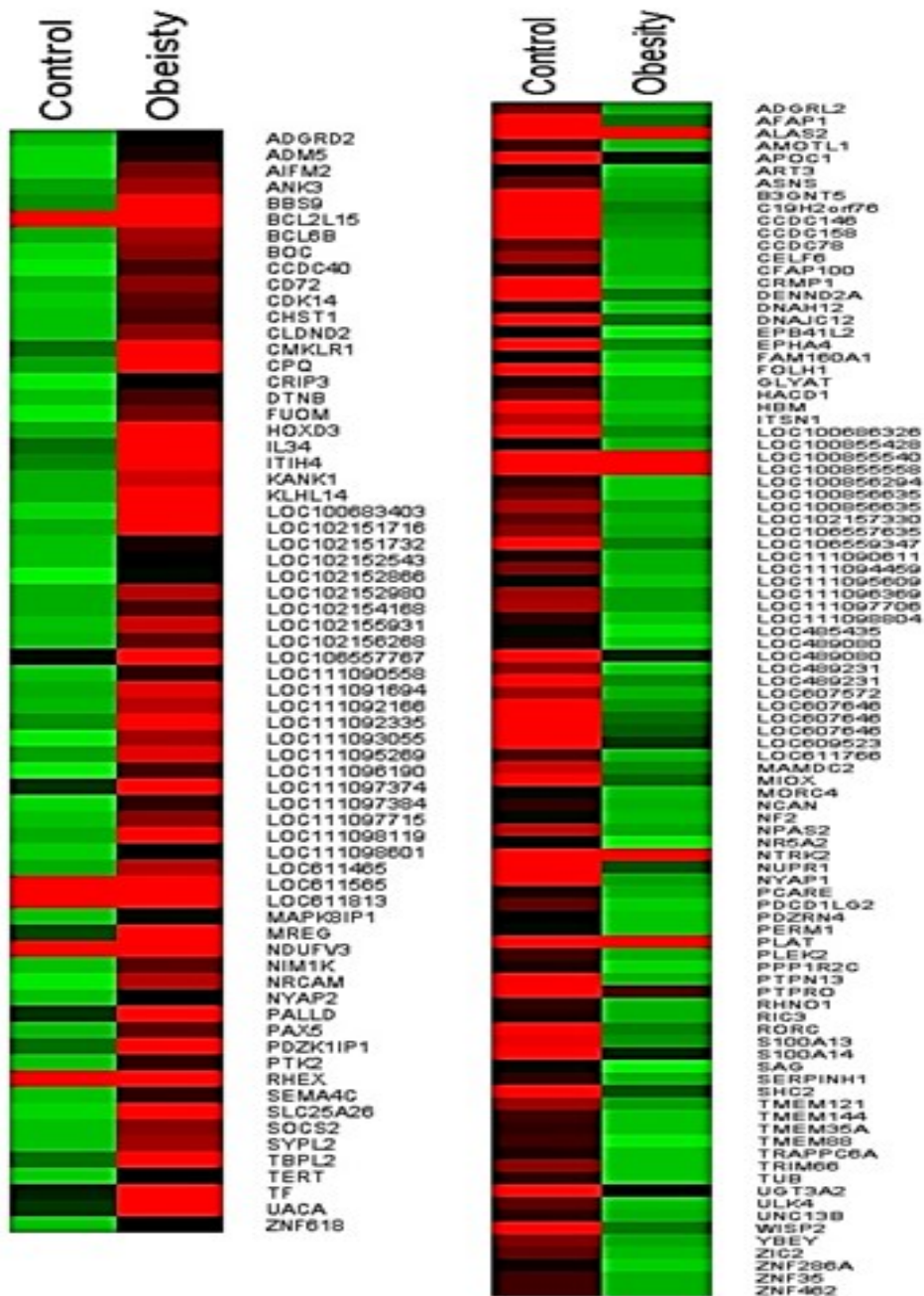


Fig. 3-2. Control 群と比較した時に Obesity 群で 3.5 倍以上発現変動した遺伝子  
(A) Control 群と Obesity 群において発現変動が認められた遺伝子のヒートマップ  
全てのサンプルの発現レベル中央値に対する各遺伝子の発現レベルを赤、黒、緑  
で表示した。  
緑: 中央値より下; 黒: 中央値と等しい; 赤: 中央値より上

(B)

KEGG pathway	Related gene
African trypanosomiasis Malaria	LOC100855540 (hemoglobin subunit alpha-like) LOC100855558 (hemoglobin subunit alpha-like) LOC480784 (hemoglobin subunit beta-like) LOC609402 (hemoglobin subunit beta-like)

(B) Obesity 群において下方制御された遺伝子について David の解析にて明らかになった KEGG pathway と関連遺伝子

(A)

AFRICAN TRYPANOSOMIASIS

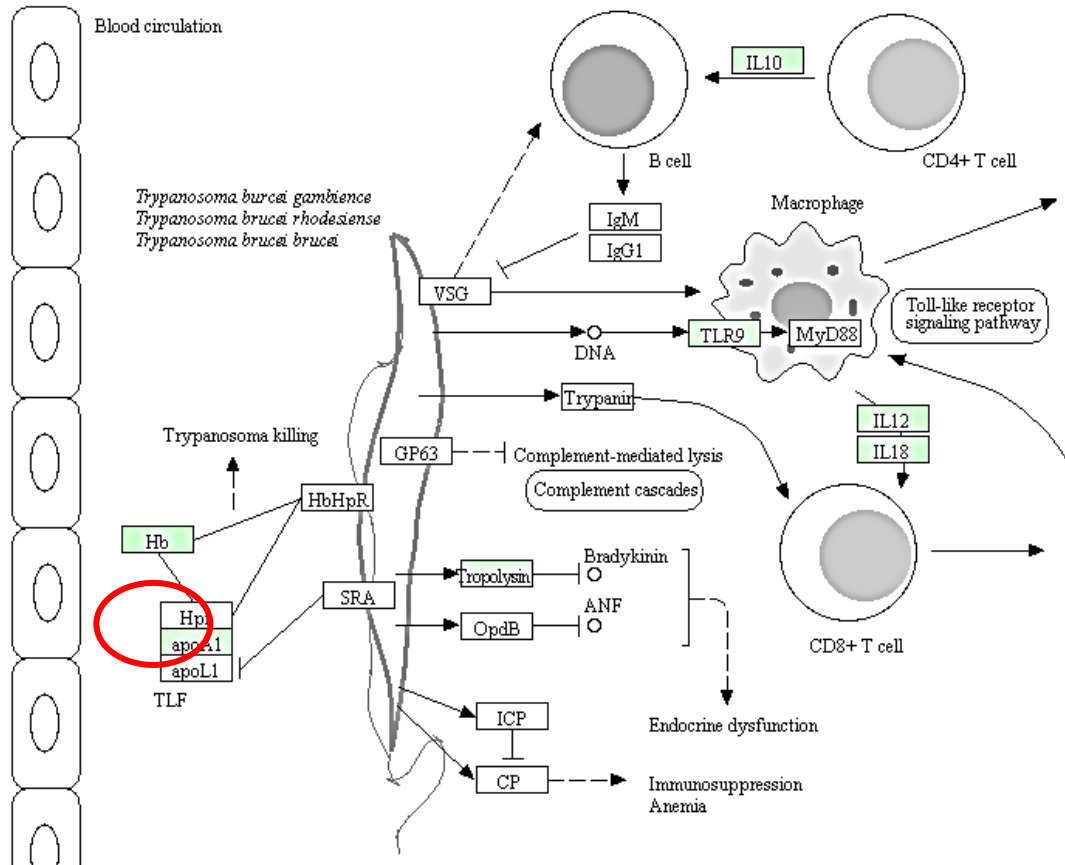


Fig. 3-3. (A) 3.5 倍以上で下方制御された遺伝子を David 解析し検出された Trypanpsomiasis pathway (KEGG pathway より) 発現変動がある部位として検出された Hb を赤で示した。

(B)

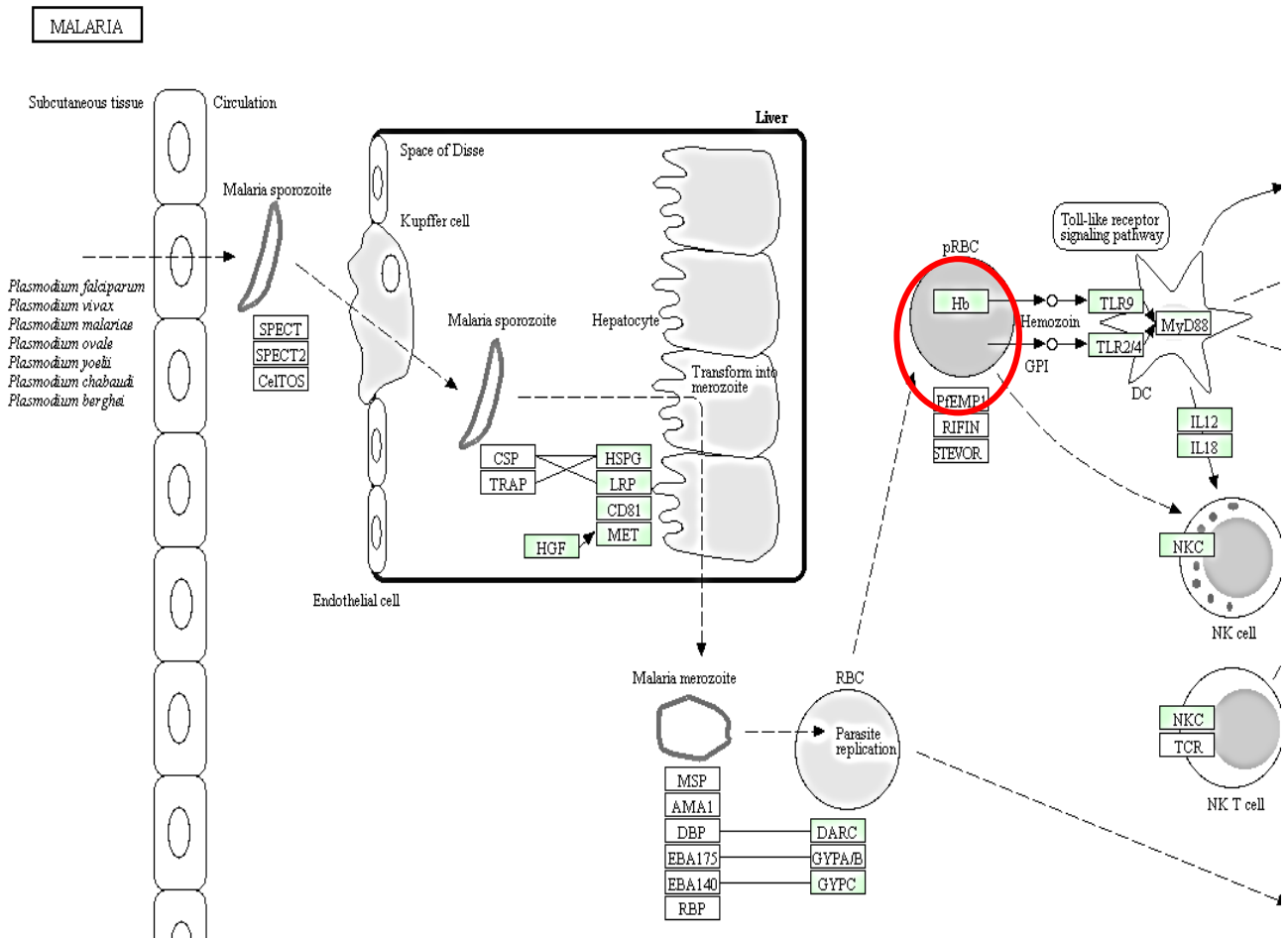


Fig. 3-3. (B) 3.5 倍以上で下方制御された遺伝子を David 解析し検出された Malaria pathway (KEGG pathway より)

発現変動がある部位として検出された Hb を赤で示した。

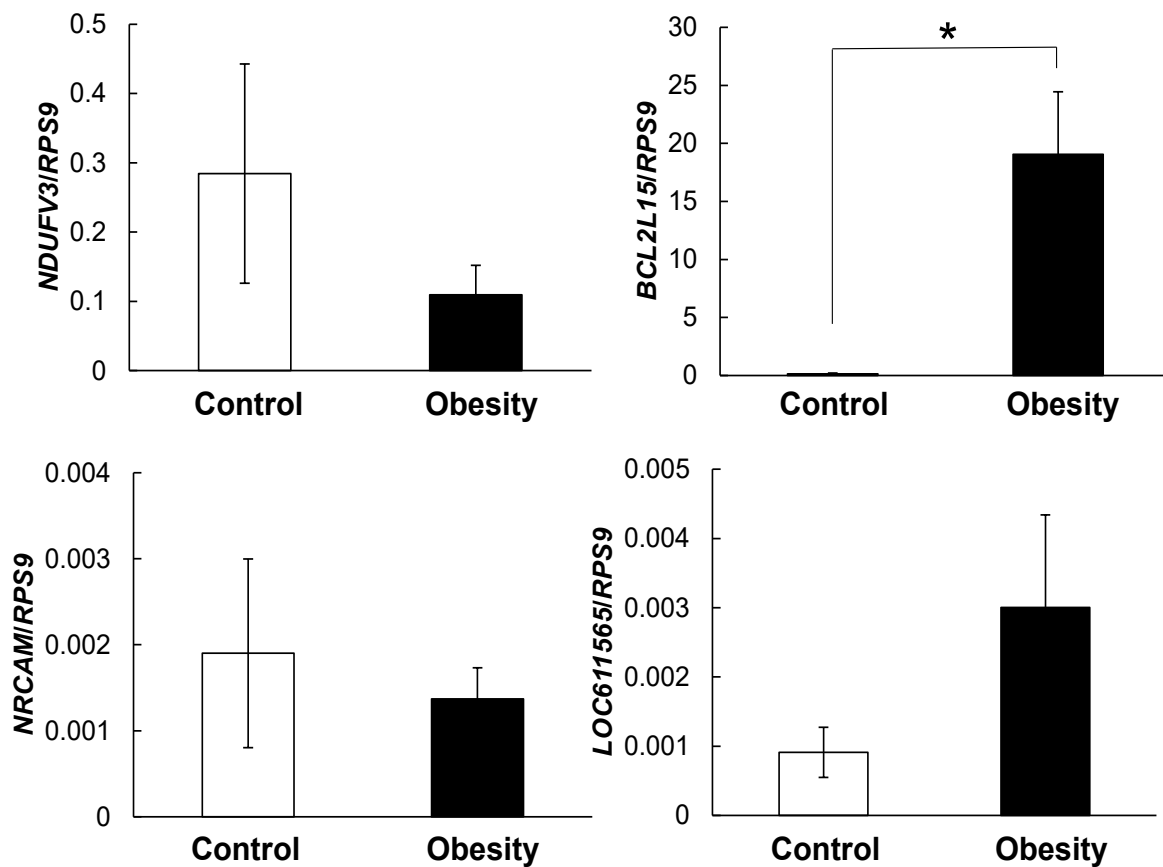


Fig. 3-4. (A) RNA-seq 解析にて Obesity 群で上方制御された遺伝子における real-time RT-PCR 解析による検証

平均値±標準誤差, n= 6

スチューデントの t 検定 \*P<0.05, \*\*P < 0.01

測定値を *RSP9* (40S ribosomal protein S9) で標準化した。

□: Control 群, ■: Obesity 群



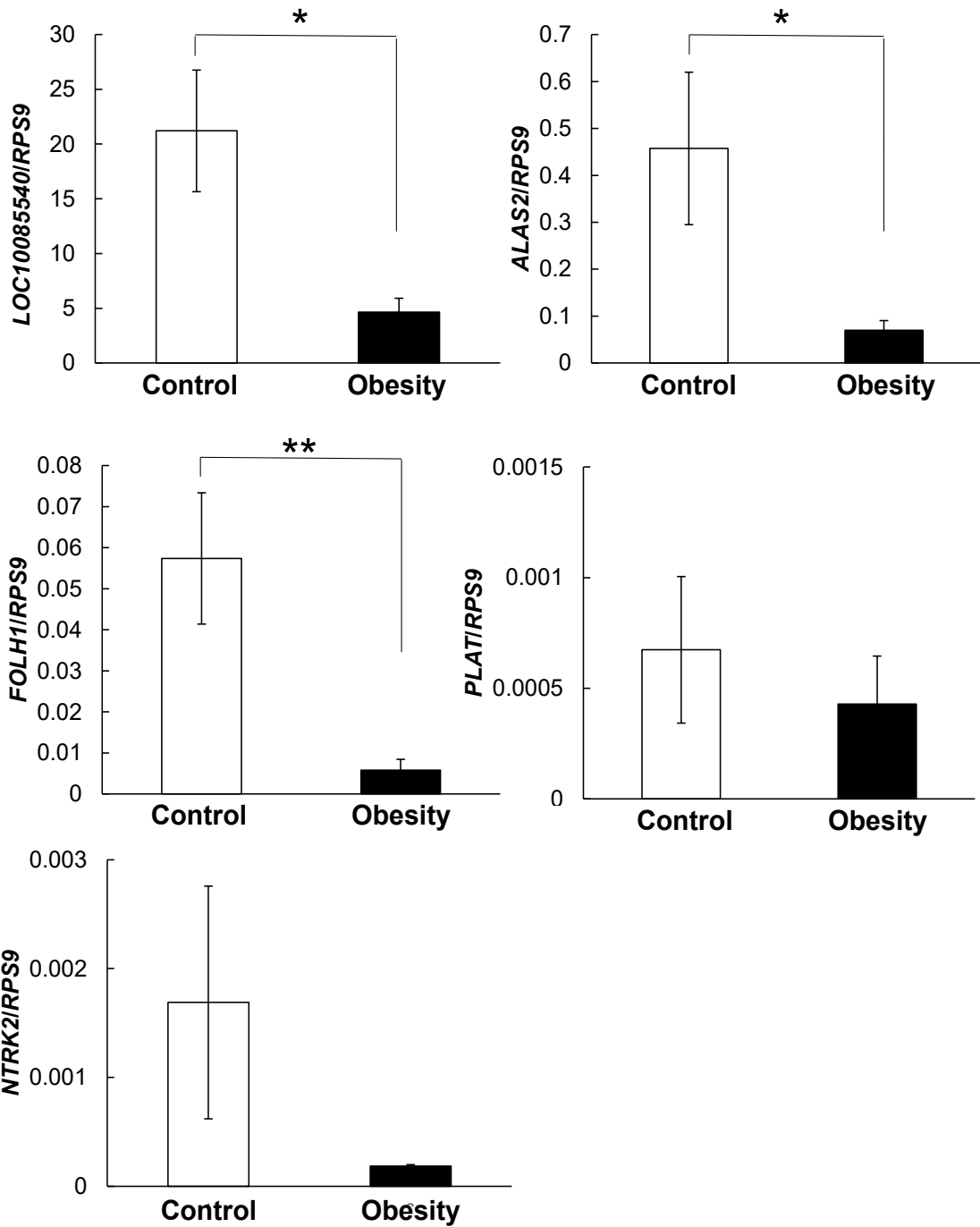


Fig. 3-4. (B) Control 群と比較した時に Obesity 群で下方制御された遺伝子の real-time RT-PCR 解析による RNA-seq 解析の検証

平均値 ± 標準誤差, n= 6

スチューデントの t 検定 \*P<0.05, \*\*P < 0.01

測定値を RSP9 (40S ribosomal protein S9) で標準化した。

□: Control 群, ■: Obesity 群

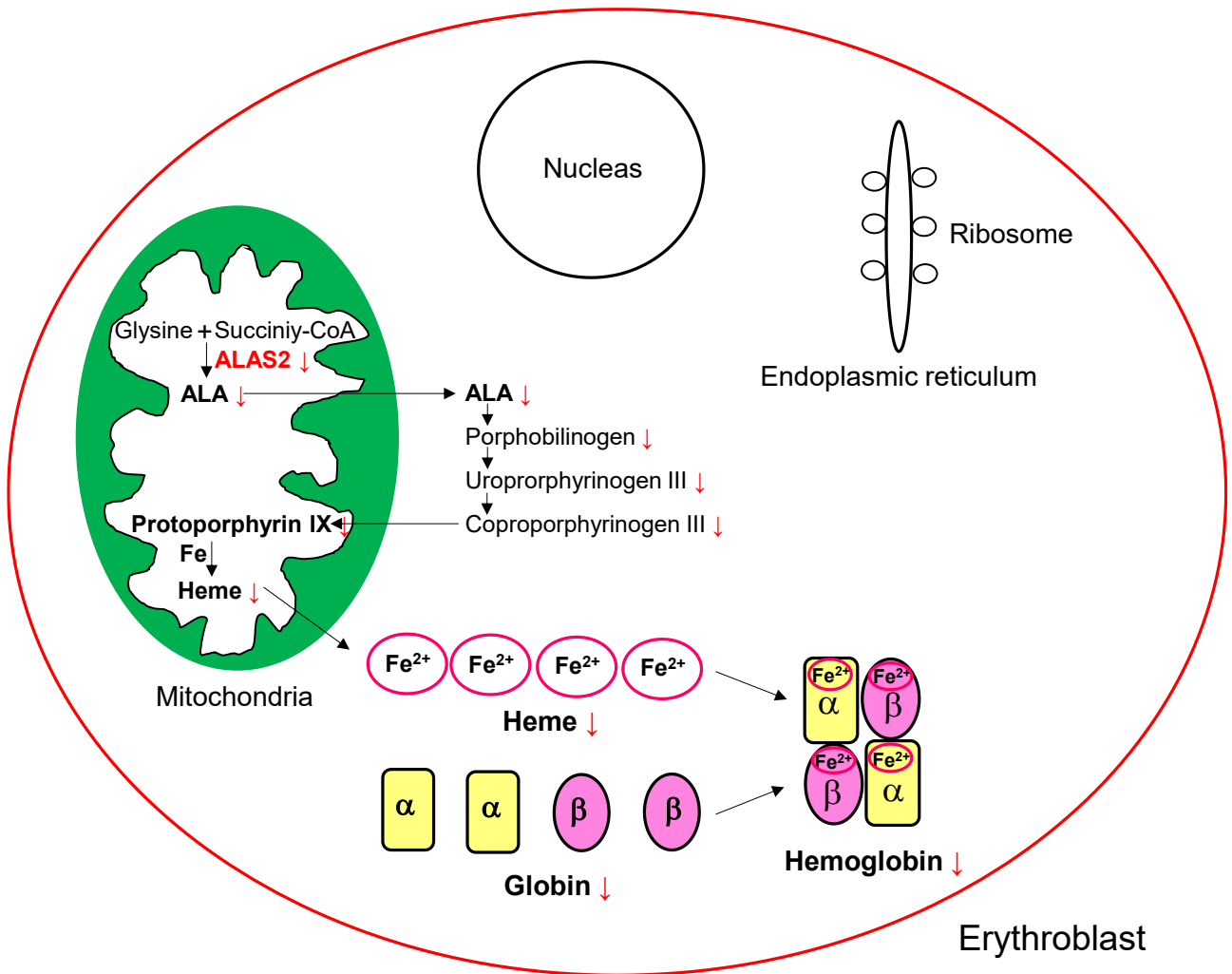


Fig. 3-5. *ALAS2* の下方制御がへム合成やへモグロビン生成に及ぼす影響  
*ALAS2*: 5'-アミノレブリン酸合成酵素 2; *ALA*: 5'-アミノレブリン酸

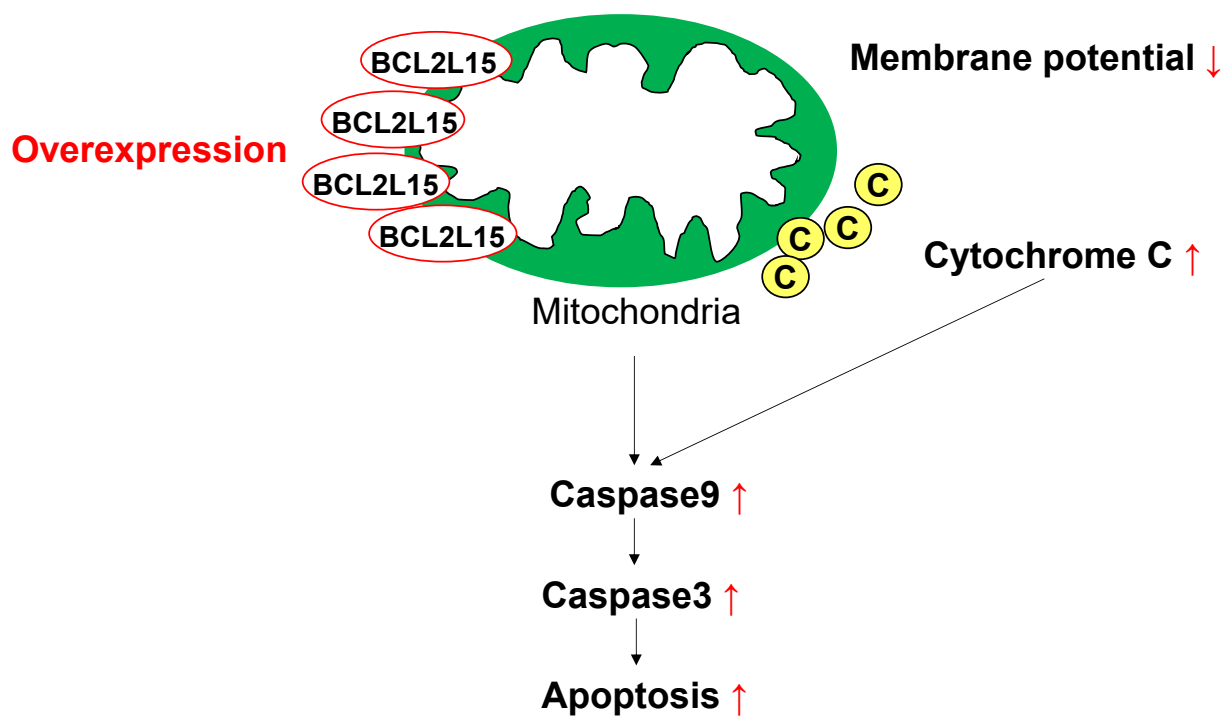


Fig. 3-6. *BCL2L15* の上方制御がミトコンドリアおよび細胞内に及ぼす影響  
*BCL2L15*: BCL-2 様タンパク質 15

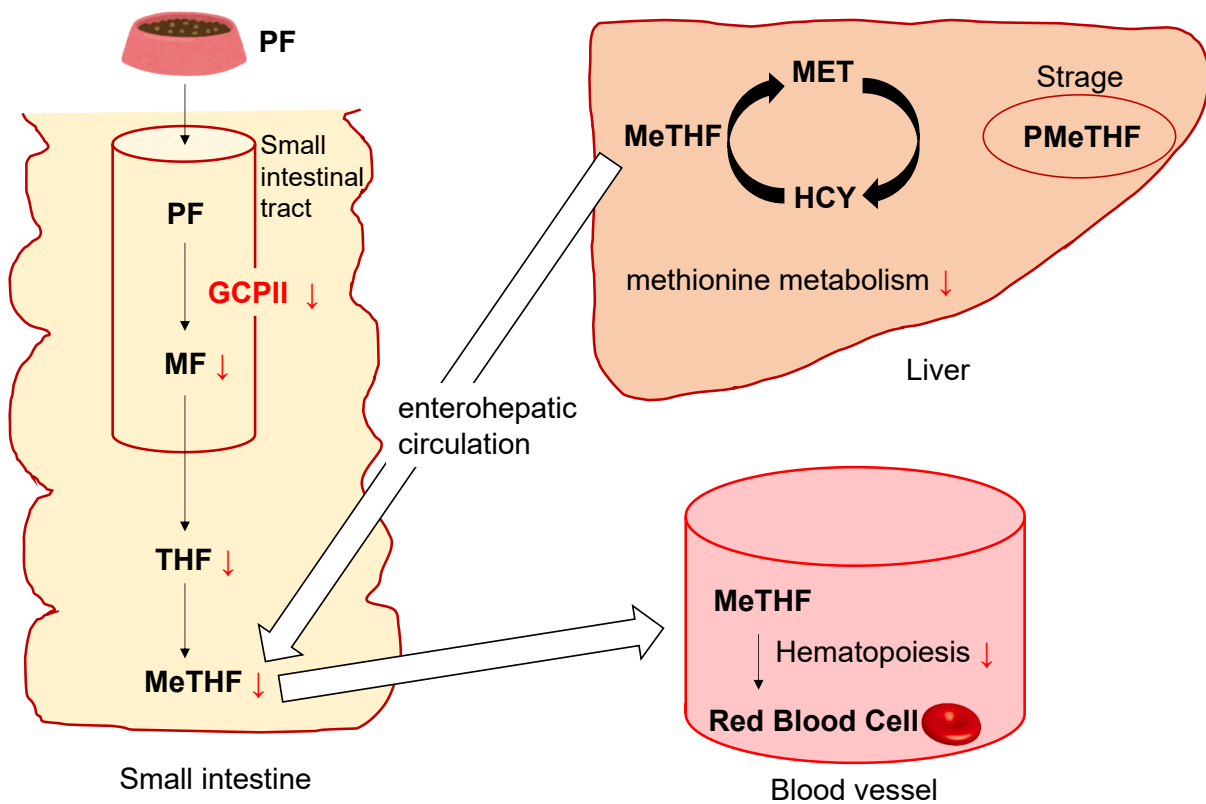


Fig. 3-7. *FOLH1* の下方制御が葉酸代謝に及ぼす影響

PF: ポリグルタミン酸型葉酸, MF: モノグルタミン酸型葉酸, GCPHII (*FOLH1*):  
 グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II (葉酸加水分解酵素 1), THF: テトラヒ  
 ドロ型葉酸, MeTHF: 5-メチル-テトラヒドロ葉酸, PMeTHF: ポリグルタミン酸型  
 5-メチル-テトラヒドロ葉酸, MET: メチオニン, HCY: ホモシステイン

## 第 4 章

同定したイヌの軽度から中等度肥満の代謝異常予知  
マーカーの他犬種における適応

## 第 1 節 Toy Poodle の生化学データと qPCR による発現変動解析

### 【緒言】

第 3 章第 1 節にて、PBMC を用いた遺伝子発現解析より、軽度から中等度の肥満の Miniature Dachshund では *BCL2L15*、*FOLH1*、*LOC100855540* および *ALAS2* に発現変動が認められ、特にヘモグロビンサブユニットに関わる遺伝子発現の低下が明らかになった (Fig. 3-4)。さらに、使用した個体の追跡調査によって、肥満およびそれに由来する疾病の発症を予測できる代謝異常予知マーカーとして使用できることが示唆された。

これらの発現変動遺伝子を臨床的に測定し、肥満およびそれに伴う疾病の発症を予測し、早期の治療や臨床応用に活用するには、他犬種においても同様であるのか、そしてこれらの因子が軽度から中等度の肥満での代謝異常予知マーカーになりうるのかについて明らかにする必要がある。そこで本章では、日本において飼育頭数が多く、肥満の臨床症状が多く認められる Toy Poodle を用いて、前章と同様に BCS スコアにより Control 群と Obesity 群に分類し、生化学データの測定および前章で抽出された 9 遺伝子の qPCR 解析をし、前章で同定した軽度から中等度肥満の代謝異常予知マーカーが Miniature Dachshund 以外の犬種にも適応できるかを検討した。

### 【対象および方法】

#### 1. 対象

ヤマザキ動物看護大学動物実験委員会の承認を得て (承認番号: 20190424-002)、1~8 歳までの性別が様々な Toy Poodle を対象として、BCS3 を Control 群 (n=6) とし BCS4 と 5 を Obesity 群 (n=3) に分類した。各群から 3ml の空腹時採血をし、そのうち 2ml は EDTA (BD バキュティナ採血管) 処理をし、遺伝子解析に使用した。0.6ml は血清 (BD マイクロティナ微量採血管) 処理をし、血液生化学項目の測定を実施した。残りの 0.4ml は EDTA 処理 (BD マイクロティナ微量採血管) を CBC) に使用した。また、各群の BW の測定もした。

#### 2. CBC

EDTA 処理した血液をセルタック $\alpha$  (日本光電, 東京) 用いて、第 3 章と同様に RBC、WBC、PLT、HTC および HGB を測定した。

#### 3. 生化学項目の測定

DRI-CHEM 4000V (FUJIFILM, 東京) を用いて、第 3 章と同様に血清の GLU、

TG、T-cho、AST、ALT および CRP の測定をした。

#### 4. 遺伝子発現解析

第3章と同様に測定した。EDTA 処理した血液 2ml を Histopaque-1.077 (Sigma-Aldrich, USA) 2ml の上に重層し、400 G 10°C 条件下で 50 分間遠心した。遠心後の中間層にある PBMC をパスツールピペットで回収し、PBS で 3 回洗浄した。洗浄した PBMC を TRIzol Regent (Thermo Fisher scientific, USA) に分散させ、-80°C で保存した。分散させた PBMC からメーカーの指示にしたがって total RNA を抽出し、Control 群と比較して、Obesity 群で 3.5 倍以上に上方制御および下法制御された 9 遺伝子 (*NDUFV3*, *BCL2L15*, *NRCAM*, *LOC6511565*, *LOC1008555400*, *ALAS2*, *FOLH1*, *PLAT* and *NTRK2*) について評価するために、各サンプルの Total RNA から、RT-PCR 法 (Takara, Japan) にて増幅し cDNA を作成した。さらに TB Green premix Ex Taq II および Thermal Cycler Dice Real time system II (TAKARA, Japan) を使用して 9 遺伝子の Real Time PCR 解析を行った。Table 3-2 に示した各プライマーを用いた。

#### 5. 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表記し、Statcel 4 (The Publisher OMS Ltd., Japan) を用いて 5% の有意水準で対応しない学生t検定あるいはマンホイットニーの U 検定にて解析した。

### 【結果】

#### 1. BW と BCS、CBC、生化学項目の測定によるスクリーニング

Obesity 群の BW は Control 群と比較してほとんど有意な差は認められなかったが、Obesity 群の BCS は高くマンホイットニーの U 検定で 5% の水準で有意な差が認められた (Fig 4-1)。

また、本研究で用いたイヌの CBC 結果の PLT 以外はすべて基準範囲内であった (Table 4-2A および B)。PLT は基準範囲より低かったが、血液塗抹上では分布を確認した。

生化学項目においては、すべてに有意な差は認められなかったが、Obesity 群の TG 濃度は Control 群と比較して高い傾向にあった (Table 4-3)。また、Obesity 群の TG 濃度と両群の CRP 濃度が基準範囲より高かった。

#### 2. 遺伝子発現解析

前章において、Miniature Dachshund の Obesity 群で発現変動が認められた 9 遺伝子について、Toy Poodle においても同様の傾向を示すのか RT-PCR 解析を行ったところ、上方制御された 4 遺伝子のうち発現上昇傾向を示したのは *NRCAM* のみであり、Miniature Dachshund の場合と異なり *BCL2L15* の発現は低下傾向を示した (Fig. 4-2A)。下方制御された遺伝子については、Miniature Dachshund の場

合と異なり *LOC855540* の発現低下は認められなかったが、*PLAT* の発現低下が認められた。さらに、*ALAS2* については *Miniature Dachshund* と同様に発現低下傾向を示した。

### 【考察】

*Miniature Dachshund* の場合と同様に、*Toy Poodle* における *Obesity* 群の *BCS* は *Control* 群と比較して有意に高く (Fig. 4-1)、*Obesity* 群の *TG* 濃度に有意な差は認められないものの、*Control* 群と比較して高い傾向を示した (Table 4-3)。このことから本研究で用いた *Toy Poodle* の *Obesity* 群も軽度から中等度の肥満である可能性が示唆されたが、*Obesity* 群の標本数が少なくばらつきが大きい可能性も考えられた。

また、*qPCR* 解析により *Control* 群と *Obesity* 群の *PBMC* における *mRNA* 発現を比較したところ、*Miniature Dachshund* と同様に *Toy Poodle* の *ALAS2* についても発現低下の傾向が認められた (Fig. 4-2B)。これらの結果より、犬種が異なっても、イヌの軽度から中等度の肥満においてはヘムの生合成過程の初期及び律速段階の反応を触媒する赤血球に特異的なミトコンドリア遺伝子である *ALAS2* の発現が低下し、*ALA* の生合成が減少することでヘムの合成が阻害され、さらには体内の酸素循環を制限する可能性が考えられた。*Toy Poodle* においても、*HCT* や *HGB* は基準範囲内であり造血異常などは生じていないが、*ALAS2* 発現低下に伴うヘム合成量のわずかな低下が、ミトコンドリアの代謝に影響をおよぼすことが示唆された。また、これらはイヌの早期から中等度の肥満で誘導される代謝変化に特異的な点であるものと考えられる。

*Toy Poodle* では、*Miniature Dachshund* と異なり *neuronal cell adhesion molecule* をコードする *NRCAM* で発現上昇傾向が認められた。*NRCAM* は、細胞間接着や細胞シグナル伝達および転写調節に関わる  $\beta$ -catenin のターゲットとなる遺伝子であり、この経路の活性化と腫瘍との関連が知られているため (Katho M, 2018)、*NRCAM* の上方制御は、発がんや細胞の異常増殖と関連する可能性が考えられる。すなわち、軽度あるいは中程度の肥満のイヌにおける *PBMC* の遺伝子発現変動は、犬種により異なる部分があることが確認された。様々な犬種におけるトランスクリプトームのデータが蓄積されれば、様々な犬種の肥満、およびそれに由来する疾病の特徴を把握することができる可能性が推察される。

*Plasminogen activator* をコードする *PLAT* は、*Miniature Dachshund* と同様に、*Toy Poodle* においても軽度あるいは中程度の肥満で発現低下傾向が認められた (Fig. 4-2)。*PLAT* 組織型プラスミノゲン活性化因子 (*t-PA*) をコードする。*t-PA* はプラスミノゲンを組織型プラスミンへと変換する酵素である。また、プラス



ミンは、フィブリンを可溶性フィブリンに分解する。高脂肪食で飼育されている t-PA 欠損マウスは体重と脂肪組織の形成が高く、脂肪組織の内皮細胞数と間質細胞数が増加することが報告されている (Lijnen HR, 2008)。PLAT の下方制御は、t-PA 不足によるフィブリンの増加を誘発し、脂肪組織の形成を促進する可能性がある。

本解析にて、*FOLH1* や *NTRK2* は増幅されなかった理由は明らかではないが、高脂血症になりやすい犬種があるように犬種により代謝などが異なるとことや (Xenoulis PG et al., 2015)、犬種ごとに遺伝子配列が異なることなど (Parker HG et al., 2004) が考えられた。Miniature Dachshund の *BCL2L15* や *LOC100855540* の発現変動が Toy Poodle と異なった点については、先にも述べたように Obesity 群の標本数が 3 と少なく、サンプル数が少なくばらつきが大きかったことも原因ではないかと考える。

本章の結果から、Toy Poodle においても *ALAS2* の発現低下が認められたことから、*ALAS2* はイヌの軽度から中等度の肥満を示す遺伝子マーカーとして有用であることが示唆された。*ALAS2* はヒトを含めた他の動物種では肥満と直接の関連が報告されていない因子であり、これがイヌの肥満の特徴を示していることを明らかにできたことは本研究の大きな成果であるといえる。

図および表

Table 4-1 (A) 第 4 章第 1 節の供試犬における Control 群の年齢および性別

	<b>Age</b>	<b>Gender</b>
<b>Dog1</b>	3	Spay
<b>Dog2</b>	5	Spay
<b>Dog3</b>	1	Female
<b>Dog4</b>	3	Female
<b>Dog5</b>	8~9	Cast
<b>Dog6</b>	8	Spay

Cast: 去勢雄, Spay: 避妊雌, Male: 雄, Female: 雌

Table 4-1 (B) 第4章第1節の供試犬における Obesity 群の年齢および性別

	<b>Age</b>	<b>Gender</b>
<b>dog7</b>	7	Female
<b>dog8</b>	5	Female
<b>dog9</b>	6	Spay

Cast: 去勢雄, Spay: 避妊雌, Male: 雄, Female: 雌

Table 4-2 (A) 第 4 章第 1 節の供試犬における Control 群の CBC 結果

	<b>RBC</b> ( $\times 10^6$ )	<b>HCT</b> (%)	<b>HGB</b> (g/dl)	<b>WBC</b>	<b>PLT</b> ( $\times 10^4$ )
<b>Dog1</b>	699	48.5	17.4	9600	13.0
<b>Dog2</b>	732	47.5	17.4	5700	20.4
<b>Dog3</b>	610	42.0	15.4	6300	0.10
<b>Dog4</b>	638	44.9	16.0	7800	19.7
<b>Dog5</b>	638	42.2	15.3	15900	16.3
<b>Dog6</b>	791	52.7	19.3	14100	8.00

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

PLT が基準範囲より少なかったが、塗抹上で凝集して認められた。

Table 4-2 (B) 第4章第1節の供試犬における Obesity 群の CBC 結果

	<b>RBC</b> <b>(<math>\times 10^4</math>)</b>	<b>HCT</b> <b>(%)</b>	<b>HGB</b> <b>(g/dl)</b>	<b>WBC</b>	<b>PLT</b> <b>(<math>\times 10^4</math>)</b>
<b>dog7</b>	625	42.6	15.0	7800	33.6
<b>dog8</b>	881	58.7	20.6	10200	23.2
<b>dog9</b>	661	46.8	16.8	10200	8.80

RBC: 赤血球数; HCT: ヘマトクリット値; HGB: ヘモグロビン濃度; WBC: 白血球数; PLT: 血小板数

PLT が基準範囲より少なかったが、塗抹上で凝集して認められた。

Table 4-3 第4章第1節の Control 群と Obesity 群における血清中の糖代謝 (GLU), 脂質代謝 (TG および T-cho), 肝機能 (AST および ALT), 炎症 (CRP) 濃度

	<b>Control</b>	<b>Obesity</b>
GLU (mg/dL)	105± 6.97	98.7 ± 8.45
TG (mg/dL)	43.5 ± 3.86	212 ± 144
T-cho (mg/dL)	244 ± 36.0	211 ±19.9
AST (U/L)	30.8 ± 4.01	39.3 ± 4.18
ALT(U/L)	51.7 ± 6.15	45.0 ± 3.79
CRP (mg/dL)	2.12 ± 0.44	1.23 ± 0.20

平均値±標準誤差, Control 群 (n= 6), Obesity 群 (n=3)

スチューデントの t 検定 \*P<0.05

GLU: グルコース; TG: 中性脂肪; T-cho:総コレステロール; AST:アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT:アラニンアミノトランスフェラーゼ; CRP: C 反応性タンパク

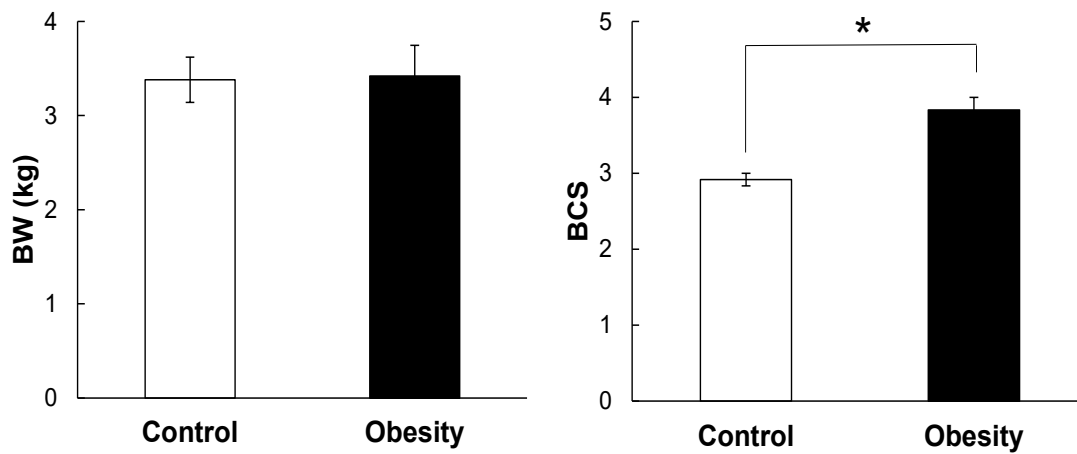


Fig. 4-1. Control 群と Obesity 群の BW および BCS  
 平均値±標準誤, Control 群 (n= 6), Obesity 群 (n=3 )  
 スチューデントの t 検定 \*P < 0.05  
 □:Control 群, ■: Obesity 群

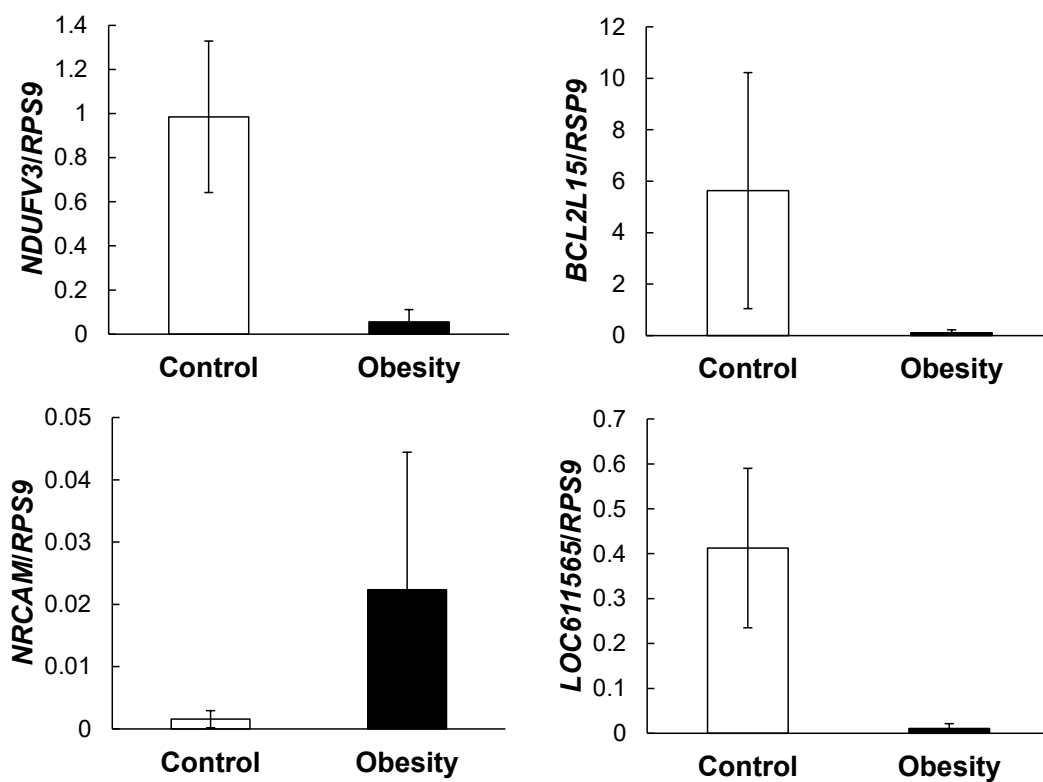


Fig. 4-2. (A) RNA-seq 解析にて Obesity 群で上方制御した遺伝子の real-time RT-PCR 解析

平均値±標準誤差, Control 群(n= 6), Obesity 群(n=6)

スチューデントの t 検定 \*P< 0.05, \*\*P <0.01

測定値を *RSP9* (40S ribosomal protein S9) で標準化した。

□:Control 群, ■: Obesity 群



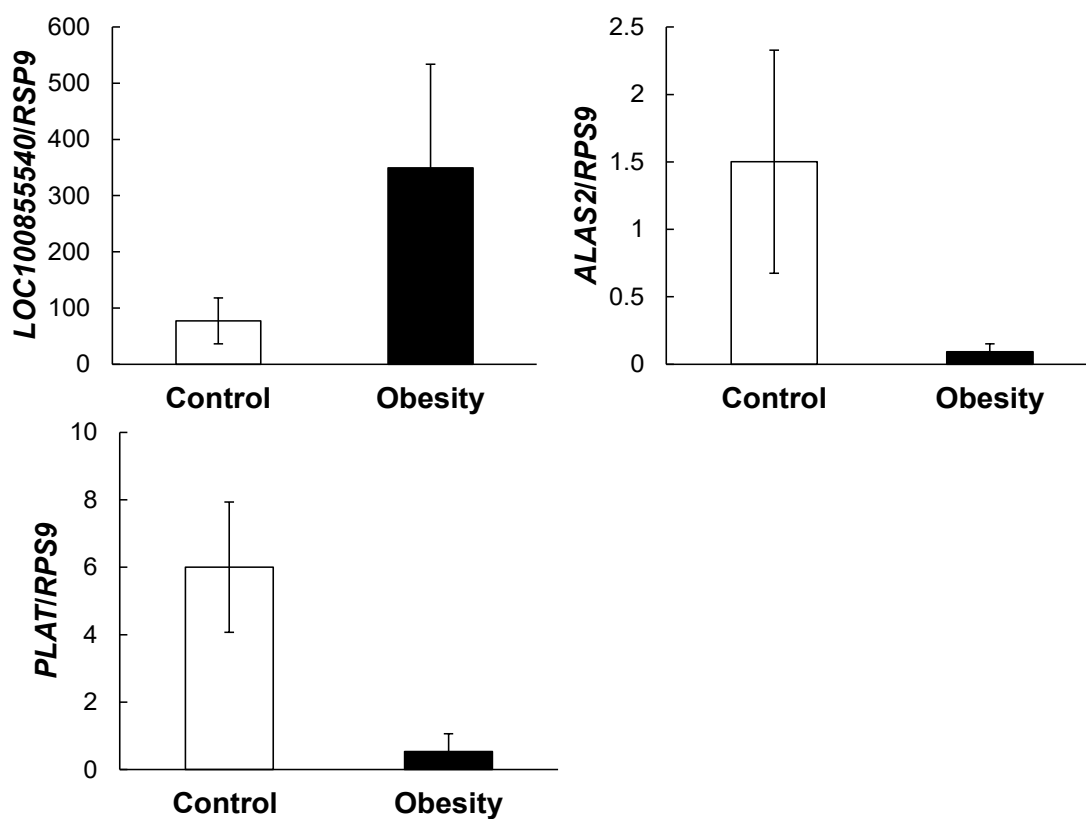


Fig 4-2. (B) RNA-seq 解析にて Obesity 群で下方制御した遺伝子の real-time RT-PCR 解析

平均値±標準誤差, Control 群(n= 6), Obesity 群(n=6)

スチューデントの t 検定 \*P< 0.05, \*\*P <0.01

測定値を *RSP9* (40S ribosomal protein S9) で標準化した。

□:Control 群, ■: Obesity 群

*FOLH1* は増幅せず、*NTRK2* はプライマーダイマーの生成が認められた。

## 第 5 章

### 総合考察

本研究では、深刻化するイヌの肥満、そして肥満により誘導される各種代謝疾病を予測する、あるいは適切に治療するための有効な臨床検査学的手法を確立するために、血液から採取できる PBMC を用いて、早期肥満のイヌの遺伝子発現プロファイリングを行い、代謝異常予知マーカーを探索することを目的とした。

第2章第1節より、イヌにおいてもヒトと同様に肥満が多く、一度肥満になると様々な疾患を併発しやすく治療が複雑化するが、それに伴う代謝変動や他の疾病を誘導する際の体内応答について十分に理解されていない。また、BCS など主観的な評価法ではなく、早期に客観的評価をする代謝異常予知マーカーや治療方法が求められている。第2節にて、病院に来院した肥満のイヌに関する実地調査からも肥満率が 1/3 程度であることや (Table. 2-2-1)、複合的な疾病を発症する可能性があることから、早期に代謝変化を捉え対処する必要があることが明らかになった。

第3章第1節にて軽度から中等度の肥満の Miniature Dachshund を用いた試験より、*BCL2L15*、*FOLH1*、*LOC100855540* および *ALAS2* の発現変動遺伝子を明らかにした (Fig. 3-4)。*ALAS2* の発現低下は、ポルフィリン代謝経路でのヘムの生成低下を引き起こし、同時に *LOC100855540* のグロビン代謝異常により Hb 生成率も低下するため、酸素に対する Hb 親和性に問題が生じ、酸素運搬能が悪くなることが推察された。また、*FOLH1* の発現低下はメチオニン代謝異常や肝臓での葉酸の蓄積量の低下を引き起こすだけでなく、赤芽球における DNA の合成障害による造血異常も引き起こす可能性がある。さらに、*BCL2L15* の発現低下はミトコンドリアの膜電位を低下させ、cytochrome C の放出を促進することより、アポトーシスが誘導される可能性が考えられた。このように、軽度から中等度の肥満は Hb による酸素運搬能低下やミトコンドリアでの機能障害を引き起こし、エネルギー代謝を低下させることが推測された。

第2節における Obesity 群の追跡調査では、BW や BCS は変わらず Control 群と比較して高値であり、代謝異常や疾患が引き起されていた (Table 3-8 および 3-9)。これらの結果より、肥満が持続すると肝・胆道系代謝異常により ALP が高値を示し、無菌性結節性脂肪織炎などによる炎症反応、蛋白漏出性腸症などの疾患を引き起こす可能性が高くなることが明らかになった。しかしながら、発現変動遺伝子である *BCL2L15*、*FOLH1*、*LOC100855540* および *ALAS2* とこれらの疾患との直接的な関連は認められなかった。そのため、上記の発現変動遺伝子の遺伝子群を改善し、疾患の治療のターゲットとして用いることは有効ではないものと考えられたが、肥満およびそれに由来する疾患の発症を予測できる代謝異常予知マ

ーカーとして使用できる可能性が明らかとなった。

さらに、第4章では *Miniature Dachshund* で明らかになった軽度から中等度肥満の代謝異常予知マーカーが、軽度から中等度の肥満である *Toy Poodle* においても有効であるのか解析したところ、*ALSA2* がイヌの軽度から中等度肥満の代謝異常を捉える有効な遺伝子マーカーであることが明らかになった (Fig. 4-2B)。

本研究で明らかとなったイヌの肥満による代謝異常予知マーカーである *ALAS2* は、赤血球のミトコンドリアに特異的かつ、ポルフィリン合成経路の初期段階を触媒する酵素をコードする遺伝子であるため、発現低下は酵素や生成される ALA を減少させることが考えられる。これにより最終的にヘムの量が減少し、Hb 合成に影響を及ぼすため、酸素交換率などに問題が生じる可能性が示唆される。しかしながら、HCT や HGB は基準範囲内であり貧血などは引き起こされるほど深刻ではなく、低酸素応答による EPO などの代償反応により改善されるレベルであるものと考えられる。したがって、このわずかな変化がミトコンドリア機能異常を引き起こし、基礎代謝量の低下を引き起こすことが推察される。

遺伝性鉄芽球性貧血の原因として、X 染色体上にある *ALAS2* の変異が知られている。ALA をヒトの赤血球や多能性幹細胞に加えると、hemoglobin alpha (HBA) や hemoglobin gamma (HBG)、heme oxygenase 1 (HMOX1) などのヘム関連遺伝子の発現を上方制御し、ALA のトランスポーターである solute carrier family 15 member (SLC15A1 および SLC15A2)、solute carrier family 6 member (SLC36A1)、solute carrier family 6 (SLC6A13) の赤血球細胞での発現が増加する (Fujiwara T et al., 2014)。特に、ALA は SLC36A1 によって赤血球に輸送され、ヘムを生成するために利用されることが示唆されている (Fujiwara T et al., 2014)。本研究では、早期肥満の *Miniature Dachshund* にて RNA-seq 解析の 3.5 倍以上で発現変動した遺伝子群からは、同様のトランスポーターの下方制御は認められなかった (未報告)。本研究の結果は、ALA やヘムの生成量のわずかな変化によるものであり、貧血ほど深刻ではないため、トランスポーター等には問題が生じなかったのではないかと考えられた。

ALA はラットなどのげっ歯類を用いた研究においても、エネルギー代謝を高めて内臓脂肪の蓄積を抑制することが知られており、糖尿病のヒトにおいても、血中 GLU 濃度や HbA1c などのレベルを低下させ、インスリン抵抗を改善することが報告されている (Rodriguez BL et al., 2012; Yu H et al., 2017)。また、高脂肪食で脂肪肝を誘発したマウスにおいても、ALA は AMPK シグナル伝達経路のリン酸化を誘導することで体重減少や肝臓の脂肪量を減少させ、GLU のホメオス

タシスを高めることが明らかにされている (Yu H et al., 2017)。さらに ALA を加え処理した肝臓細胞では、PGC-1 $\alpha$ などの脂質分解に関連した遺伝子が高発現であったことも報告された (Yu H et al., 2017)。このように、ALA の摂取はヘムを増加させ、ATP を作るために電子伝達系の補酵素として機能することでミトコンドリアの酵素活性を高める。また、食事から摂取した脂肪酸の種類によっては、 $\beta$ -酸化や ATP を用いた代謝がなされることが示唆される。イヌにおいても ALA を給与した場合に体重および体脂肪が減少し、エネルギー代謝の亢進や脂肪の消化率低下など結果が報告されている (Ozawa et al., 2015)。そのため、イヌの早期肥満を予防するためにも ALA の給与が有効ではないかと考えられた。

最近のマイクロアレイを用いた解析では、イヌの T 細胞を phytohemagglutinin (PHA) で刺激した場合の初期の遺伝子応答として、*ALAS2* と造血細胞の増殖に関わる *hemogen (HEMGN)* の下方制御が認められたことが報告されている (Mortlock et al., 2015)。またイヌとオオカミの血液をトランスクリプトーム解析により比較した際に、オオカミは *ALAS2* などの Hb の合成を制御する遺伝子の発現が高く、酸素要求量や低酸素耐性が高いことが明らかにされた (Yang X et al., 2018)。そのため、オオカミから家畜化されたイヌも *ALAS2* などの遺伝子やヘモグロビンに関する代謝に高い反応性を示す可能性が考えられ、これがイヌの脂質代謝や肥満の特徴を示しているものと考えられる。

本研究は、家庭で飼育されているイヌを対象として、肥満により併発する疾患を予防または治療するために、血液をターゲットとした有用な情報、すなわち肥満が改善しない、あるいは肥満に誘導される疾病を将来的に起こす可能性がある軽度あるいは中程度の肥満のイヌの PBMC では、*ALAS2* の発現が低下することを提示した。PBMC と組織間での遺伝子の発現結果の比較、犬種の比較、サンプル数を増やすなどのさらなる解析の必要はあるが、深刻化するイヌの肥満に対する新たな有効な知見を提示した本研究は、今後のイヌの臨床応用に寄与するものと期待できる。

## 参考文献

Afman LA, Müller M. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2012. 51(1):63-70. doi: 10.1016/j.plipres.2011.11.005. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22155512.

Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank AM, Bocian C, Woelk L, Fan H, Logan DW, Schürmann A, Saraiva LR, Schulz TJ. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell.* 2017. 20(6):771-784.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.02.009. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28330582; PMCID: PMC5459794.

Anderson RC, Armstrong KM, Young W, Maclean P, Thomas DG, Bermingham EN. Effect of kibble and raw meat diets on peripheral blood mononuclear cell gene expression profile in dogs. *Vet J.* 2018. 234:7-10. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.01.005. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29680397.

Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care.* 2016. 22(7):s176-85. PMID: 27356115.

Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, Siliart B, Magot T, Ouguerram K. Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism.* 2003. 52(5):559-64. doi: 10.1053/meta.2003.50110. PMID: 12759884.

Baldwin K, Bartges J, Buffington T, Freeman LM, Grabow M, Legred J, Ostwald D Jr. AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2010. 46(4):285-96.

Ban Y, Tozaki T, Nakano Y. Association Studies of the GPR103 and BCL2L15 Genes in Autoimmune Thyroid Disease in the Japanese Population. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016. 7:92. doi: 10.3389/fendo.2016.00092. PMID: 27486433; PMCID: PMC4949216.

Bermingham EN, Thomas DG, Cave NJ, Morris PJ, Butterwick RF, German AJ. Energy requirements of adult dogs: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014. 9(10):e109681. doi: 10.1371/journal.pone.0109681. PMID: 25313818; PMCID: PMC4196927.

Bhatraju NK, Agrawal A. Mitochondrial Dysfunction Linking Obesity and Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2017. 14(5):S368-S373. doi: 10.1513/AnnalsATS.201701-042AW. PMID: 29161084.

Bjørnvad CR, Nielsen ME, Hansen SEM, Nielsen DH. The effect of position on the precision of dual-energy X-ray absorptiometry and correlation with body condition score in dogs and cats. *J Nutr Sci*. 2017 May 15;6:e20. doi: 10.1017/jns.2017.16. PMID: 28630697; PMCID: PMC5468741.

Bjørnvad CR, Gloor S, Johansen SS, Sandøe P, Lund TB. Neutering increases the risk of obesity in male dogs but not in bitches - A cross-sectional study of dog- and owner-related risk factors for obesity in Danish companion dogs. *Prev Vet Med*. 2019. 170:104730. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104730. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31421500.

Brattbakk HR, Arbo I, Aagaard S, Lindseth I, de Soysa AK, Langaas M, Kulseng B, Lindberg F, Johansen B. Balanced caloric macronutrient composition downregulates immunological gene expression in human blood cells-adipose tissue diverges. *OMICS*. 2013. 17(1):41-52. doi: 10.1089/omi.2010.0124. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21679058.

Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013. 3(3):a011619. doi: 10.1101/cshperspect.a011619. PMID: 23457296; PMCID: PMC3579209.

Chandler M, Cunningham S, Lund EM, Khanna C, Naramore R, Patel A, Day MJ. Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. *J Comp Pathol*. 2017. 156(4):296-309. doi: 10.1016/j.jcpa.2017.03.006. Epub 2017 Apr 28.

Cline MG, Burns KM, Coe JB, Downing R, Durzi T, Murphy M, Parker V. 2021 AAHA Nutrition and Weight Management Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2021. 57(4):153-178. doi: 10.5326/JAAHA-MS-7232. PMID: 34228790.

Coultas L, Pellegrini M, Visvader JE, Lindeman GJ, Chen L, Adams JM, Huang DC, Strasser A. Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ*. 2003. 10(2):185-92. doi:

10.1038/sj.cdd.4401204. PMID: 12700646.

Craven MD, Washabau RJ. Comparative pathophysiology and management of protein-losing enteropathy. *J Vet Intern Med.* 2019. 33(2):383-402. doi: 10.1111/jvim.15406. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30762910; PMCID: PMC6430879.

de Godoy MRC. PANCOSMA COMPARATIVE GUT PHYSIOLOGY SYMPOSIUM: ALL ABOUT APPETITE REGULATION: Effects of diet and gonadal steroids on appetite regulation and food intake of companion animals. *J Anim Sci.* 2018. 96(8):3526-3536. doi: 10.1093/jas/sky146. PMID: 29982536; PMCID: PMC6095297.

de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci.* 2018. 192:26-32. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.019. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29155300.

de Mello VD, Kolehmanien M, Schwab U, Pulkkinen L, Uusitupa M. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? *Mol Nutr Food Res.* 2012. 56(7):1160-72. doi: 10.1002/mnfr.201100685. Epub 2012 May 18. PMID: 22610960.

Dempsey CE, Dive C, Fletcher DJ, Barnes FA, Lobo A, Bingle CD, Whyte MK, Renshaw SA. Expression of pro-apoptotic Bfk isoforms reduces during malignant transformation in the human gastrointestinal tract. *FEBS Lett.* 2005. 579(17):3646-50. doi: 10.1016/j.febslet.2005.05.050. PMID: 15961081.

Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, Raciti GA. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J Endocrinol Invest.* 2016. 39(10):1095-103. doi: 10.1007/s40618-016-0473-1. Epub 2016 May 14. PMID: 27180180.

Drummond EM, Gibney ER. Epigenetic regulation in obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013. 16(4):392-7. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283620f45. PMID: 23739626.

Emmons R, Niemi GM, De Lisio M. Hematopoiesis with Obesity and Exercise: Role



- of the Bone Marrow Niche. *Exerc Immunol Rev.* 2017. 23:82-95. PMID: 28224968.
- Fuchs T, Loureiro MP, Macedo LE, Nocca D, Nedelcu M, Costa-Casagrande TA. Animal models in metabolic syndrome. *Rev Col Bras Cir.* 2018. 45(5):e1975. Portuguese, English. doi: 10.1590/0100-6991e-20181975. PMID: 30379216.
- Fujiwara T, Harigae H. Biology of Heme in Mammalian Erythroid Cells and Related Disorders. *Biomed Res Int.* 2015. 2015:278536. doi: 10.1155/2015/278536. Epub 2015 Oct 18. PMID: 26557657; PMCID: PMC4628764.
- Fukuda S, Iida H. Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs. *J Vet Med Sci.* 2000. 62(1):69-73. doi: 10.1292/jvms.62.69. PMID: 10676893.
- Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, Choi KC, Adachi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Sasaki S, Roh SG. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007. 354(2):591-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.028. Epub 2007 Jan 16. PMID: 17250804.
- Grant RW, Vester Boler BM, Ridge TK, Graves TK, Swanson KS. Adipose tissue transcriptome changes during obesity development in female dogs. *Physiol Genomics.* 2011. 43(6):295-307. doi: 10.1152/physiolgenomics.00190.2010. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21224421.
- Grant RW, Vester Boler BM, Ridge TK, Graves TK, Swanson KS. Skeletal muscle tissue transcriptome differences in lean and obese female beagle dogs. *Anim Genet.* 2013a. 44(5):560-8. doi: 10.1111/age.12035. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23488938.
- Grant RW, Vester Boler BM, Ridge TK, Graves TK, Swanson KS. Subcutaneous and gonadal adipose tissue transcriptome differences in lean and obese female dogs. *Anim Genet.* 2013b. 44(6):728-35. doi: 10.1111/age.12060. Epub 2013 May 29. PMID: 23713485.
- Grzemeski A, Stachowiak M, Flisikowski K, Mankowska M, Krzeminska P, Gogulski M, Aleksiewicz R, Szydłowski M, Switonski M, Nowacka-Woszek J. FTO AND IRX3 GENES ARE NOT PROMISING MARKERS FOR OBESITY IN LABRADOR RETRIEVER DOGS *Ann. Anim. Sci.* 2019. 19(2): 343–357.

Gurung P, Lukens JR, Kanneganti TD. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol Med.* 2015. 21(3):193-201. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.008. Epub 2014 Nov 27. PMID: 25500014; PMCID: PMC4352396.

Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002. 2:S10-5. doi: 10.1002/dmrr.249. PMID: 11921433.

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005. 11(1):90-4. doi: 10.1038/nm1168. Epub 2004 Dec 26. PMID: 15619630.

Hulanicka M, Garncarz M, Parzeniecka-Jaworska M, Jank M. The transcriptomic profile of peripheral blood nuclear cells in dogs with heart failure. *BMC Genomics.* 2014. 15(1):509. doi: 10.1186/1471-2164-15-509. PMID: 24952741; PMCID: PMC4092214.

Iranmanesh A, South S, Liem AY, Clemmons D, Thorner MO, Weltman A, Veldhuis JD. Unequal impact of age, percentage body fat, and serum testosterone concentrations on the somatotrophic, IGF-I, and IGF-binding protein responses to a three-day intravenous growth hormone-releasing hormone pulsatile infusion in men. *Eur J Endocrinol.* 1998. 139(1):59-71. doi: 10.1530/eje.0.1390059. PMID: 9703380.

Ishioka K, Hosoya K, Kitagawa H, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res Vet Sci.* 2007. 82(1):11-5. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.06.002. Epub 2006 Aug 21. PMID: 16919691.

Itoh H, Kakuta T, Genda G, Sakonju I, Takase K. Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. *J Vet Med Sci.* 2002. 64(1):35-9. doi: 10.1292/jvms.64.35. PMID: 11853143.

Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 2007. 104(29):12017-22. doi: 10.1073/pnas.0705070104. Epub 2007 Jul 3. PMID: 17609368; PMCID: PMC1924552.

Jeusette I, Detilleux J, Cuvelier C, Istasse L, Diez M. Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2004. 88(3-4):117-21. doi: 10.1111/j.1439-0396.2003.00467.x. PMID: 15059235.

Jung UJ, Seo YR, Ryu R, Choi MS Differences in metabolic biomarkers in the blood and gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells among normal weight, mildly obese and moderately obese subjects. *Br J Nutr*. 2016. 116(6):1022-32. doi: 10.1017/S0007114516002993. Epub 2016 Aug 9.

Kabir M, Iyer MS, Richey JM, Woolcott OO, Asare Bediako I, Wu Q, Kim SP, Stefanovski D, Kolka CM, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Ionut V, Bergman RN. CB1R antagonist increases hepatic insulin clearance in fat-fed dogs likely via upregulation of liver adiponectin receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015. 309(8):E747-58. doi: 10.1152/ajpendo.00196.2015. Epub 2015 Aug 25. PMID: 26306598; PMCID: PMC4609878.

Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling activation (Review). *Int J Mol Med*. 2018. 42(2):713-725. doi: 10.3892/ijmm.2018.3689. Epub 2018 May 17. PMID: 29786110; PMCID: PMC6034925.

Katsuma S, Hatae N, Yano T, Ruike Y, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem*. 2005. 280(20):19507-15. doi: 10.1074/jbc.M412385200. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15774482.

Kawasumi K, Murai T, Mizorogi T, Okada Y, Yamamoto I, Suruga K, Kadokura K, Arai T. Changes in Plasma Metabolites Concentrations in Obese Dogs Supplemented With Anti-oxidant Compound. *Front Nutr*. 2018. 5:74. doi: 10.3389/fnut.2018.00074. PMID: 30246011; PMCID: PMC6137203.

Kawauchi IM, Jeremias JT, Takeara P, de Souza DF, Balieiro JCC, Pfrimer K, Brunetto MA, Pontieri CFF. Effect of dietary protein intake on the body composition and metabolic parameters of neutered dogs. *J Nutr Sci.* 2017. 6:e40. doi: 10.1017/jns.2017.41. PMID: 29152244; PMCID: PMC5672309.

Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Mantz SL, Biery DN, Greeley EH, Lust G, Segre M, Smith GK, Stowe HD. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2002. 220(9):1315-20. doi: 10.2460/javma.2002.220.1315. PMID: 11991408

Kutzler MA. Possible Relationship between Long-Term Adverse Health Effects of Gonad-Removing Surgical Sterilization and Luteinizing Hormone in Dogs. *Animals (Basel).* 2020. 10(4):599. doi: 10.3390/ani10040599. PMID: 32244716; PMCID: PMC7222805.

Larsen SV, Holven KB, Ottestad I, Dagsland KN, Myhrstad MCW, Ulven SM. Plasma fatty acid levels and gene expression related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells: a cross-sectional study in healthy subjects. *Genes Nutr.* 2018. 13:9. doi: 10.1186/s12263-018-0600-z. Erratum in: *Genes Nutr.* 2018 Jul 5;13:16. PMID: 29662553; PMCID: PMC5892037.

Lee JH, Park A, Oh KJ, Lee SC, Kim WK, Bae KH. The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019. 20(19):4924. doi: 10.3390/ijms20194924. PMID: 31590292; PMCID: PMC6801758.

Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res.* 2008. 78(2):286-93. doi: 10.1093/cvr/cvm007. Epub 2007 Aug 23. PMID: 18006485.

Liu J, Li Y, Tong J, Gao J, Guo Q, Zhang L, Wang B, Zhao H, Wang H, Jiang E, Kurita R, Nakamura Y, Tanabe O, Engel JD, Bresnick EH, Zhou J, Shi L. Long non-coding RNA-dependent mechanism to regulate heme biosynthesis and erythrocyte development. *Nat Commun.* 2018. 9(1):4386. doi: 10.1038/s41467-018-06883-x. PMID: 30349036; PMCID: PMC6197277.

Loftus JP, Wakshlag JJ. Canine and feline obesity: a review of pathophysiology, epidemiology, and clinical management. *Vet Med (Auckl)*. 2015. 6:49-60. doi: 10.2147/VMRR.S40868. PMID: 30101096; PMCID: PMC6067794.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000. 404(6778):652-60. doi: 10.1038/35007527. PMID: 10766252.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Klausner JS. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US Veterinary Practices. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2006. 4(2):177–186.

Luque RM, Kineman RD. Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology*. 2006. 147(6):2754-63. doi: 10.1210/en.2005-1549. Epub 2006 Mar 2. PMID: 16513828.

Mankowska M, Stachowiak M, Graczyk A, Ciazynska P, Gogulski M, Nizanski W, Switonski M. Sequence analysis of three canine adipokine genes revealed an association between TNF polymorphisms and obesity in Labrador dogs. *Anim Genet*. 2016. 47(2):245-9. doi: 10.1111/age.12390. Epub 2015 Dec 22. PMID: 26692319.

Mankowska M, Nowacka-Woszek J, Graczyk A, Ciazynska P, Stachowiak M, Switonski M. Polymorphism and methylation of the MC4R gene in obese and non-obese dogs. *Mol Biol Rep*. 2017a. 44(4):333-339. doi: 10.1007/s11033-017-4114-3. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28755272; PMCID: PMC5579139.

Mankowska M, Krzeminska P, Graczyk M, Switonski M. Confirmation that a deletion in the POMC gene is associated with body weight of Labrador Retriever dogs. *Res Vet Sci*. 2017b. 112:116-118. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.02.014. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28235700.

Martino J, Segura MT, García-Valdés L, Padilla MC, Rueda R, McArdle HJ, Budge H, Symonds ME, Campoy C. The Impact of Maternal Pre-Pregnancy Body Weight and Gestational Diabetes on Markers of Folate Metabolism in the Placenta. *Nutrients*. 2018.

10(11):1750. doi: 10.3390/nu10111750. PMID: 30428605; PMCID: PMC6266824.

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. Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs. *J Vet Med Sci*. 2015. 77(10):1201-6. doi: 10.1292/jvms.15-0031. Epub 2015 May 10. PMID: 25960032; PMCID: PMC4638284.

Mizunoe Y, Kobayashi M, Tagawa R, Nakagawa Y, Shimano H, Higami Y. Association between Lysosomal Dysfunction and Obesity-Related Pathology: A Key Knowledge to Prevent Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2019. 20(15):3688. doi: 10.3390/ijms20153688. PMID: 31357643; PMCID: PMC6696452.

Mortlock SA, Wei J, Williamson P. T-cell activation and early gene response in dogs. *PLoS One*. 2015. 10(3):e0121169. doi: 10.1371/journal.pone.0121169. PMID: 25803042; PMCID: PMC4372360.

Mustafa T, Li Q, Kelly LE, Gibbon A, Ryan I, Roffey K, Simonds S, Cowley MA, Sleeman MW. Food hypersensitivity-induced chronic gastrointestinal inflammation in a non-human primate model of diet-induced obesity. *PLoS One*. 2019. 14(4):e0214621. doi: 10.1371/journal.pone.0214621. PMID: 30947272; PMCID: PMC6448857.

Nagao I, Ohno K, Nagahara T, Yokoyama N, Nakagawa T, Fujiwara R, Yamamoto K, Goto-Koshino Y, Tomiyasu H, Tsujimoto H. Evaluation of visceral fat mass in dogs by computed tomography. *J Vet Med Sci*. 2019. 81(11):1552-1557. doi: 10.1292/jvms.19-0254. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31554745; PMCID: PMC6895622.

Nagata N, Ohta H, Yokoyama N, Teoh YB, Nisa K, Sasaki N, Osuga T, Morishita K, Takiguchi M. Clinical characteristics of dogs with food-responsive protein-losing enteropathy. *J Vet Intern Med*. 2020. 34(2):659-668. doi: 10.1111/jvim.15720. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32060974; PMCID: PMC7096654.

Nishii N, Takasu M, Ohba Y, Maeda S, Kitoh K, Ohtsuka Y, Honjo T, Saito M, Kitagawa H. Effects of administration of glucocorticoids and feeding status on plasma leptin concentrations in dogs. *Am J Vet Res*. 2006. 67(2):266-70. doi: 10.2460/ajvr.67.2.266. PMID: 16454631.

Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* 2011. 585(11):1537-42. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.015. Epub 2011 Mar 12. PMID: 21402069; PMCID: PMC3439843.

Osto M, Lutz TA. Translational value of animal models of obesity-Focus on dogs and cats. *Eur J Pharmacol.* 2015. 759:240-52. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.036. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25814247.

Ozawa Y, Miyanari S, Uetake M, Mizutani H, Kimura N. Influence of  $\delta$ -Amino levulinic acid on body fat, body weight, and blood property in diet induced obese dogs. *J. Pet Anim. Nutr.* 2013. 18 (1): 18-24.

Ozören N, Inohara N, Núñez G. A putative role for human BFK in DNA damage-induced apoptosis. *Biotechnol J.* 2009. 4(7):1046-54. doi: 10.1002/biot.200900091. PMID: 19557800.

Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014. 6(1):33-42. doi: 10.4252/wjsc.v6.i1.33. PMID: 24567786; PMCID: PMC3927012.

Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander EA, Kruglyak L. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science.* 2004. 304(5674):1160-4. doi: 10.1126/science.1097406. PMID: 15155949.

Pedrinelli V, Porsani MYH, Lima DM, Teixeira FA, Duarte CN, Vendramini THA, Brunetto MA. Predictive equations of maintenance energy requirement for healthy and chronically ill adult dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2021. 105(2):63-69. doi: 10.1111/jpn.13184. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31637773.

Penell JC, Morgan DM, Watson P, Carmichael S, Adams VJ. Body weight at 10 years of age and change in body composition between 8 and 10 years of age were related to survival in a longitudinal study of 39 Labrador retriever dogs. *Acta Vet Scand.* 2019. 61(1):42. doi: 10.1186/s13028-019-0477-x.

Pereira-Neto GB, Brunetto MA, Oba PM, Champion T, Villaverde C, Vendramini THA, Balieiro JCC, Carciofi AC, Camacho AA. Weight loss improves arterial blood gases and respiratory parameters in obese dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018. 102(6):1743-1748. doi: 10.1111/jpn.12963. Epub 2018 Jul 13. PMID: 30006938.

Pieńkowska J, Brzeska B, Kaszubowski M, Kozak O, Jankowska A, Szurowska E. MRI assessment of ectopic fat accumulation in pancreas, liver and skeletal muscle in patients with obesity, overweight and normal BMI in correlation with the presence of central obesity and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019. 12:623-636. doi: 10.2147/DMSO.S194690. eCollection 2019.

Pinhel MAS, Noronha NY, Nicoletti CF, Quinhoneiro DCG, Oliveira BAP, Cortes-Oliveira C, Salgado-Junior W, Silva-Junior WAD, Marchini JS, Souza DRS, Nonino CB. Comparison of gene expression profile between blood cells and white adipose tissue of patients with obesity. *Nutr Hosp*. 2017. 34(3):608-612. doi: 10.20960/nh.438. PMID: 28627196.

Pogány Á, Torda O, Marinelli L, Lenkei R, Junó V, Pongrácz P. The behaviour of overweight dogs shows similarity with personality traits of overweight humans. *R Soc Open Sci*. 2018. 5(6):172398. doi: 10.1098/rsos.172398. eCollection 2018 Jun.

Porsani MYH, Teixeira FA, Amaral AR, Pedrinelli V, Vasques V, de Oliveira AG, Vendramini THA, Brunetto MA. Factors associated with failure of dog's weight loss programmes. *Vet Med Sci*. 2020. 6(3):299-305. doi: 10.1002/vms3.229. Epub 2019 Dec 26. PMID: 31877241; PMCID: PMC7397924.

Pujianto DA, Damdimopoulos AE, Sipilä P, Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. Bfk, a novel member of the bcl2 gene family, is highly expressed in principal cells of the mouse epididymis and demonstrates a predominant nuclear localization. *Endocrinology*. 2007. 148(7):3196-204. doi: 10.1210/en.2007-0018. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17412810.

Raffan E, Dennis RJ, O'Donovan CJ, Becker JM, Scott RA, Smith SP, Withers DJ, Wood CJ, Conci E, Clements DN, Summers KM, German AJ, Mellersh CS, Arendt ML, Iyemere VP, Withers E, Söder J, Wernersson S, Andersson G, Lindblad-Toh K, Yeo GS, O'Rahilly S. A Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and



Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. *Cell Metab.* 2016. 23(5):893-900. doi: 10.1016/j.cmet.2016.04.012. Epub 2016 May 3. PMID: 27157046; PMCID: PMC4873617.

Reynés B, García-Ruiz E, Palou A, Oliver P. The intake of high-fat diets induces an obesogenic-like gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells, which is reverted by dieting. *Br J Nutr.* 2016. 115(11):1887-95. doi: 10.1017/S0007114516001173. Epub 2016 Apr 15.

Rodriguez BL, Curb JD, Davis J, Shintani T, Perez MH, Apau-Ludlum N, Johnson C, Harrigan RC. Use of the dietary supplement 5-aminiolevulinic acid (5-ALA) and its relationship with glucose levels and hemoglobin A1C among individuals with prediabetes. *Clin Transl Sci.* 2012. 5(4):314-20. doi: 10.1111/j.1752-8062.2012.00421.x. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22883608; PMCID: PMC5439781.

Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000. 16:145-71. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.145. PMID: 11031233.

Rundblad A, Larsen SV, Myhrstad MC, Ottestad I, Thoresen M, Holven KB, Ulven SM. Differences in peripheral blood mononuclear cell gene expression and triglyceride composition in lipoprotein subclasses in plasma triglyceride responders and non-responders to omega-3 supplementation. *Genes Nutr.* 2019. 14:10. doi: 10.1186/s12263-019-0633-y. eCollection 2019.

Sagols E, Hours MA, Daniel I, Feugier A, Flanagan J, German AJ. Comparison of the effects of different kibble shape on voluntary food intake and palatability of weight loss diets in pet dogs. *Res Vet Sci.* 2019. 124:375-382. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.04.023. Epub 2019 May 1.

Sangwung P, Zhou G, Lu Y, Liao X, Wang B, Mutchler SM, Miller M, Chance MR, Straub AC, Jain MK. Regulation of endothelial hemoglobin alpha expression by Kruppel-like factors. *Vasc Med.* 2017. 22(5):363-369. doi: 10.1177/1358863X17722211. Epub 2017 Aug 19. PMID: 28825355; PMCID: PMC5898218.

Sassek M, Pruszyńska-Oszmalek E, Nowacka-Woszek J, Szczerbal I, Szczepankiewicz

D, Kaczmarek P, Kolodziejski PA, Switonski M, Mackowiak P. Resistin - from gene expression to development of diabetes. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013. 27(3):647-54. PMID: 24152833.

Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F. Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999. 23(3):260-71. doi: 10.1038/sj.ijo.0800807. PMID: 10193871.

Schauf S, Salas-Mani A, Torre C, Bosch G, Swarts H, Castrillo C. Effect of sterilization and of dietary fat and carbohydrate content on food intake, activity level, and blood satiety-related hormones in female dogs. *J Anim Sci*. 2016. 94(10):4239-4250. doi: 10.2527/jas.2015-0109. PMID: 27898845.

Schnurr TM, Reynolds AJ, Komac AM, Duffy LK, Dunlap KL. The effect of acute exercise on GLUT4 levels in peripheral blood mononuclear cells of sled dogs. *Biochem Biophys Res*. 2015. 2:45-49. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.05.002. PMID: 26339686; PMCID: PMC4554329.

Serisier S, Weber M, Feugier A, Fardet MO, Garnier F, Biourge V, German AJ. Maintenance energy requirements in miniature colony dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2013. 97(1):60-7. doi: 10.1111/jpn.12044. PMID: 23639018.

Shiho Usui, Yuzo Koketsu. Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*  
Koizumi A., Aihara R., Asakawa H., Sakurada M., Otsuji K. Possibility of morphometric body condition scoring in dogs. *J. Pet Anim. Nutr*. 2018. 21(2): 89-94.

Sid V, Siow YL, Shang Y, Woo CW, O K. High-fat diet consumption reduces hepatic folate transporter expression via nuclear respiratory factor-1. *J Mol Med (Berl)*. 2018. 96(11):1203-1213. doi: 10.1007/s00109-018-1688-8. Epub 2018 Sep 4. PMID: 30178194.

Šilhavý J, Krijt J, Sokolová J, Zídek V, Mlejnek P, Šimáková M, Škop V, Trnovská J, Oliyarnyk O, Marková I, Hüttl M, Malínská H, Kazdová L, Liška F, Kožich V, Pravenec M. Dissecting the role of *Folr1* and *Folh1* genes in the pathogenesis of metabolic syndrome in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*. 2018. 67(4):657-662. doi:

10.33549/physiolres.933932. PMID: 30113208.

Skorczyk A, Flisikowski K, Szydlowski M, Cieslak J, Fries R, Switonski M. Association of MC3R gene polymorphisms with body weight in the red fox and comparative gene organization in four canids. *Anim Genet.* 2011. 42(1):104-7. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02075.x. PMID: 20477806.

Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep.* 2015. 48(4):229-33. doi: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.272. PMID: 25560696; PMCID: PMC4436859.

Sparks R, Lui A, Bader D, Patel R, Murr M, Guida W, Fratti R, Patel NA. A specific small-molecule inhibitor of protein kinase C $\delta$ I activity improves metabolic dysfunction in human adipocytes from obese individuals. *J Biol Chem.* 2019. 294(41):14896-14910. doi: 10.1074/jbc.RA119.008777. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31413114; PMCID: PMC6791326.

Switonski M, Mankowska M. Dog obesity--the need for identifying predisposing genetic markers. *Res Vet Sci.* 2013. 95(3):831-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.08.015. Epub 2013 Aug 29. PMID: 24034586.

Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, Scherer PE, Hawkins M. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004. 53(6):1621-9. doi: 10.2337/diabetes.53.6.1621. Erratum in: *Diabetes.* 2005 Feb;54(2):587. PMID: 15161771.

Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, Chandel NS. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 2011. 14(4):537-44. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.007. PMID: 21982713; PMCID: PMC3190168.

Tvarijonaviciute A, Martinez-Subiela S, Carrillo-Sanchez JD, Tecles F, Ceron JJ. Effects of orchidectomy in selective biochemical analytes in Beagle dogs. *Reprod Domest Anim.* 2011. 46(6):957-63. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01765.x. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21366720.

Usui S, Yasuda H, Koketsu Y. Characterization of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics. *Asian Pac.J.Troop.Biomed.*, 2016. 6(4):338-343. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.011>

Veiga AP, Price CA, de Oliveira ST, Dos Santos AP, Campos R, Barbosa PR, González FH. Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. *J Vet Diagn Invest.* 2008. 20(2):224-8. doi: 10.1177/104063870802000214. PMID: 18319438

Verkest KR, Rand JS, Fleeman LM, Morton JM. Spontaneously obese dogs exhibit greater postprandial glucose, triglyceride, and insulin concentrations than lean dogs. *Domest Anim Endocrinol.* 2012. 42(2):103-12. doi: 10.1016/j.domaniend.2011.10.002. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22130330.

Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health.* 2001. 22:355-75. doi: 10.1146/annurev.publhealth.22.1.355. PMID: 11274526.

Wallis N, Raffan E. The Genetic Basis of Obesity and Related Metabolic Diseases in Humans and Companion Animals. *Genes (Basel).* 2020. 11(11):1378. doi: 10.3390/genes11111378. PMID: 33233816; PMCID: PMC7699880.

Xenoulis PG, Steiner JM. Canine hyperlipidaemia. *J Small Anim Pract.* 2015. 56(10):595-605. doi: 10.1111/jsap.12396. PMID: 26456868.

Yang X, Zhang H, Shang J, Liu G, Xia T, Zhao C, Sun G, Dou H. Comparative analysis of the blood transcriptomes between wolves and dogs. *Anim Genet.* 2018. 49(4):291-302. doi: 10.1111/age.12675. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29953636.

Yeo GSH. Genetics of obesity: can an old dog teach us new tricks? *Diabetologia.* 2017. 60(5):778-783. doi: 10.1007/s00125-016-4187-x. Epub 2016 Dec 24. PMID: 28013339; PMCID: PMC6518377.

Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR, Olefsky JM. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves

insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2009. 29(5):1363-74. doi: 10.1128/MCB.00705-08. Epub 2008 Dec 22. PMID: 19103747; PMCID: PMC2643824.

Yu H, Zhang M, Ma Y, Lu J, Pan J, Pan P, Chen H, Jia W. 5-ALA ameliorates hepatic steatosis through AMPK signaling pathway. *J Mol Endocrinol.* 2017. 59(2):121-128. doi: 10.1530/JME-16-0260. Epub 2017 May 31. PMID: 28566408.

Zeng R, Zhang Y, Du P. SNPs of melanocortin 4 receptor (MC4R) associated with body weight in Beagle dogs. *Exp Anim.* 2014. 63(1):73-8. doi: 10.1538/expanim.63.73. PMID: 24521865; PMCID: PMC4160929.

石岡 克己. 犬と猫の肥満－2021 年度アップデート－. *ペット栄養学会誌.* 2021. 24(1): 46-56.

上野浩晶, 中里雅光. 摂食関連ペプチドと脳内ネットワークの機能関連-抗肥満薬への応用を含めて-. *日本内学会雑誌.* 2007. 96: 1491-1496.

北田宗弘, 古家大祐. 栄養センシングと細胞機能の制御 肥満・メタボリックシンドローム・糖尿病とのかかわり. 2013. *化学と生物.* 51(5): 294-301.

小林豊和、大辻一也、加隈良枝、 鯉江洋、金山喜一、渡部敏. 犬の去勢が脂質代謝関連物質に及ぼす影響に関する研究. *帝京科学大学紀要.* 2018. 14: 25-32.

志賀朋子, 松浦幹人, 関口麻衣子, 伊從慶太, 井手香織, 岩崎利郎, 西藤公司. 無菌性脂肪織炎との鑑別を要した異物肉芽腫のミニチュア・ダックスフンドの 3 例. *獣医臨床皮膚科.* 2012. 18(2): 107-110.

森 伸子, 酒井 美穂, 岡田 ゆう紀, 新井 敏郎. 犬におけるアディポネクチンの肥満マーカーの可能性. *ペット栄養学会誌.* 2013. 16 (2): 73-78.

## 参考図書

大島誠之助 著. 認定動物看護師コアカリキュラム 2019 準拠 臨床動物看護学 2 動物臨床栄養学. 第 2 章栄養評価法. 一般社団法人日本動物保健看護系大学協会カリキュラム委員会編. インターズー出版. 2019. P29-54.

大辻一也 著. 認定動物看護師コアカリキュラム 2019 準拠 臨床動物看護学 2 動物臨床栄養学. 第 4 章栄養指導 1 節一般社団法人日本動物保健看護系大学協会カリキュラム委員会編. インターズー出版. 2019. P99-103.

石岡克己 著. 認定動物看護師コアカリキュラム 2019 準拠 臨床動物看護学 2 動物臨床栄養学. 第 4 章栄養指導 4 節. 一般社団法人日本動物保健看護系大学協会カリキュラム委員会編. インターズー出版. 2019. p114-118.

## 参考 Web サイト

Association for Pet Obesity Prevention, 2021. Pet Obesity results. [https :  
//petobesityprevention.org/](https://petobesityprevention.org/)

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、全実験のご指導ならびに、数々の貴重なご意見を頂いた東北大学（前 東京農工大学）佐藤幹教授に心より深く感謝いたします。

また、研究面でご助言や学位審査にあたり様々なご調整を頂きました東京農工大学 新村毅教授、学位審査および本論文を再校正するにあたり数々の貴重なご助言を頂いた宇都宮大学 長尾慶和教授に心より深く感謝いたします。

学位審査の際に貴重なご助言とご教示を頂きました東京農工大学 新井克彦教授、茨城大学 豊田淳教授、東京農工大学 青木康浩教授に深く感謝いたします。

研究面や論文投稿時の英文校正にご協力を頂きました東京農工大学および Damanhour 大学 Ph.D. Amin Omar Hendaway、東京農工大学 畜産学研究室の皆様  
に感謝いたします。

血液検体の提供を頂いた飼い主の方々、ご協力を頂いた山田動物病院、矢敷動物病院、王禅寺ペットクリニック、南大沢どうぶつ病院、こうご動物病院の皆様には心から感謝いたします。

博士課程進学の際や本研究の遂行にあたり、貴重なご助言を頂いたヤマザキ動物看護大学 岡崎登志夫教授に感謝いたします。

学部生時から修士修了後も熱心にご指導を頂き、博士課程進学について貴重なご助言を頂いた北里大学 大槻健蔵名誉教授、前 北里大学 丸山弘子准教授に感謝いたします。

## 学位論文要旨

軽度から中等度肥満のイヌにおける末梢血単核球細胞の遺伝子発現プロファイリング

Gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells in mild to moderate obesity in dogs

生物生産科学専攻 動物生産科学大講座  
宮井 紗弥香

イヌの肥満もヒトと同様に深刻な問題となっており、Dachshund など特定の犬種では肥満になりやすいことが知られている。また、糖尿病、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能亢進症、内分泌疾患、整形外科的疾患、心呼吸器疾患、尿路疾患に罹患する危険性を高める。肥満により引き起こされる様々な疾病の併発は、治療を複雑化させるだけでなく、QOLや寿命を低下させるため、近年肥満予防に対する関心が高まっている。イヌの肥満評価は、主に **Body Condition Score (BCS)** でなされるが、視覚や触知による主観的な評価であるため、測定者によるばらつきが生じやすい。また、肥満による代謝異常を把握するために、臨床では糖・脂質代謝や肝機能に関わる生化学パラメーターが基準範囲内であるかどうかにより判断されているが、基準範囲を逸脱しないことも多く、肥満による代謝異常を確実にとらえることは現在の測定項目では困難である。それゆえ、臨床にて軽度から中等度の肥満をとらえる有用なマーカーや、その因子をターゲットとした治療法の確立が求められている。

末梢血単核球細胞 (PBMC) は主にリンパ球と単球で構成されており、体内を循環し栄養物や代謝、末梢組織に曝されるため、肥満のヒトやマウスにおける肝臓や脂肪組織、骨格筋の脂質代謝をよく反映することが報告されている。イヌなどの伴侶動物においては動物愛護の観点から、直接組織細胞を診断のために採取するのは困難である。それゆえ、組織サンプルを得ることなく、簡便に血液サンプルから分離出来る PBMC は、軽度から中等度の肥満の代謝異常予知マーカー探索に用いることが可能であると考えた。

本研究では、家庭で飼育されているイヌを対象として、深刻化するイヌの肥



満やそれにより誘導される各種代謝疾病を予測する、あるいは適切に治療するための有効な臨床検査学的手法を確立するために、軽度から中等度肥満のイヌの遺伝子発現プロファイリングを行った。

第2章では、イヌの肥満についての文献調査と実地調査を試みた。イヌの肥満は、環境要因、犬種、体の大きさ、年齢、性腺摘出の有無などの様々な要因が関わるということが報告されている。ヒトの肥満関連候補遺伝子を基にいくつかの遺伝子発現解析や一塩基多型 (SNPs) 解析はされているが、それに伴う代謝変動や他の疾病を誘導する体内応答は十分に説明出来てはいない。実地調査においても、動物病院に来院するイヌの約 1/3 が過体重もしくは肥満であることが明らかになり、イヌの肥満の診断やその対処法に対する社会的要請は高まっていることを明らかにした。

第3章では、BCS に従い Control 群と Obesity 群に Miniature Dachshund を分類し、代謝変化と PBMC 上の遺伝子発現プロファイルを調査した。Obesity 群では Control 群と比較して、体重 (BW) および BCS、中性脂肪 (TG) および Insulin 濃度の有意な増加が認められたが、すべての生化学パラメーターが基準範囲内であったことから、本試験で用いた Obesity 群は、軽度から中程度の肥満であると判断した。PBMC を用いた RNA-seq および RT-PCR 解析から、Obesity 群ではアポトーシスに関わる *BCL2L15* の上方制御、葉酸加水分解に関わる *FOLH1*、Hb 鎖に関わる *LOC100855540* およびポルフィリン代謝に関わる *ALAS2* の下方制御が明らかになった。また、追跡調査では Obesity 群のほとんどで以前と変わらず BW および BCS が高値を示し、新たな疾患を発症している場合があった。しかしながら、発現変動があった遺伝子と疾患との直接的な関連は見出せなかった。

第4章では、第3章と同様に Toy poodle を分類し、Control 群と比較したところ Obesity 群では BCS が有意に高く、TG 濃度も高い傾向を示した。前章で明らかになった PBMC における発現変動遺伝子を RT-PCR 解析したところ、Obesity 群で *ALAS2* の発現低下傾向が認められた。*ALAS2* はヘムの生合成過程の初期及び律速段階の反応を触媒する赤血球に特異的なミトコンドリア遺伝子である。そのため、*ALAS2* の発現低下はポルフィリン代謝経路でのヘムの生合成が減少し、さらには体内の酸素循環に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、肥満による *ALAS2* の低下は、他動物種では明示されておらず、これがイヌの肥満時の代謝の特徴を示していることが考えられた。

本研究は、家庭で飼育されているイヌを対象として肥満により併発する疾患を予防または治療するために、血液をターゲットとした有用な情報、すなわち肥満が改善しない、あるいは肥満に誘導される疾病を将来的に起こす可能性がある軽度あるいは中程度の肥満のイヌの PBMC で *ALAS2* の発現が低下することを提示した。深刻化するイヌの肥満に対する新たな有効な知見を提示した本研究は、今後のイヌの臨床応用に寄与するものと期待出来る。