

氏名(本籍)	西飯直仁(三重県)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第258号
学位授与年月日	平成20年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Study on Leptin Resistance in Dogs with Obesity (肥満のイヌにおけるレプチン抵抗性に関する研究)
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 北川 均 副査 帯広畜産大学 教授 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 安田 準 副査 東京農工大学 教授 岩崎 利郎 副査 岐阜大学 教授 鬼頭 克也

### 論文の内容の要旨

肥満は過剰に脂肪組織が増加した状態であり、ヒトおよびイヌにおいて様々な疾患の危険因子となることが知られている。しかし、肥満の病態については不明な部分が多い。エネルギーの恒常性に関わる様々な分子のうち、最も重要な分子の一つとしてレプチンがある。レプチンは脂肪組織から分泌され、視床下部の受容体に結合することによって食欲の抑制などの作用を示す。肥満の齧歯類やヒトおよびイヌでは血中レプチン濃度は増加するが、食欲は抑制されない。そのため肥満ではレプチン抵抗性が起こっていると考えられている。レプチンの作用低下は食欲の増加やエネルギー消費の減少につながるため、レプチン抵抗性は肥満の原因となる。レプチン抵抗性の原因としてグルココルチコイドやトリグリセリドなどが挙げられており、受容体以前、受容体およびシグナル伝達など様々な部位での異常が考えられているが、現在のところ明確な結論には至っていない。本研究の目的はイヌの肥満におけるレプチン抵抗性の病態を解明することである。

肥満ではグルココルチコイドの分泌が増加する。グルココルチコイドはレプチンの作用を阻害することが齧歯類で明らかとなっており、イヌの肥満においてもレプチン抵抗性の原因となっている可能性がある。第1章ではグルココルチコイドが血漿レプチン濃度に与える影響を検討する目的で、以下の条件において血漿レプチン濃度を24時間測定した。1) デキサメサゾン投与+摂食条件では、血漿レプチン濃度の著明な増加がみられた。2) 生理食塩水投与+摂食条件でも血漿レプチン濃度は増加した。これらの血漿レプチン濃度の増加は血漿インスリン濃度の増加に伴ってみられた。3) デキサメサゾン投与+絶食条件では血漿レプチン濃度は少しくつ徐々に増加した。4) 生理食塩水投与+絶食条件では血漿レプチン濃度は変化しなかった。デキサメサゾンと摂食はそれぞれが血漿レプチン濃度を増加

させるだけでなく、相乗的に作用した。この相乗効果はグルココルチコイドとインスリンによって起こった可能性がある。このようにグルココルチコイド投与は血漿レプチン濃度を増加させるが、レプチンによる食欲減少作用はみられず、レプチン抵抗性が起こっていると考えられる。肥満のイヌではグルココルチコイドとインスリンの過剰分泌が起きていることを考慮すると、イヌの肥満におけるレプチン抵抗性にはグルココルチコイドが関与している可能性がある。

レプチンがその作用を発現するためには血液脳関門 (BBB) を通過して視床下部の受容体に結合する必要があるが、BBB におけるレプチンの輸送障害はレプチン抵抗性につながる。第 2 章ではイヌの肥満における BBB のレプチン輸送について、血漿および脳脊髄液 (CSF) のレプチン濃度から評価した。4 頭のビーグル犬を使用し、体重を増加させて消瘦、適正体重、肥満の各状態で検討した。肥満度の評価には X 線 CT による第 3 腰椎レベルの脂肪面積を用いた。血液および CSF は食前、給餌 7 および 13 時間後に採取した。消瘦時には CSF レプチン濃度は給餌 7 時間後に一過性に増加した。適正体重時には CSF レプチン濃度は変化しなかった。肥満時には CSF レプチン濃度は給餌 7 から 13 時間後へと徐々に増加した。給餌 7 時間後には CSF/血漿レプチン濃度比と脂肪面積との負の相関がみられた。これらの結果より、BBB におけるレプチンの輸送障害がイヌの肥満におけるレプチン抵抗性の原因のひとつである可能性が考えられた。しかし、この輸送障害は短時間であり、肥満の発生の原因としてはあまり重要でないと思われた。

レプチンの作用発現には視床下部のレプチン受容体が重要である。この受容体の異常や受容体以降のシグナル伝達異常は直接レプチン抵抗性につながる。第 3 章ではイヌの肥満におけるレプチン受容体の発現について調べた。正常および肥満のイヌそれぞれ 4 頭の組織を採取し、RT-PCR、免疫染色、リアルタイム PCR によってレプチン受容体の発現を評価した。RT-PCR および免疫染色により、視床下部を含む脳全体にレプチン受容体の発現を認めた。これは、レプチンが視床下部の満腹中枢を介した食欲の抑制やエネルギー恒常性の維持に重要な役割を果たすという仮説を裏付けるデータである。また、視床下部におけるレプチン受容体の発現量は肥満のイヌで少なかった。この結果より、イヌの肥満におけるレプチン抵抗性にはレプチン受容体の減少が関与していると考えられた。

本研究によりイヌの肥満におけるレプチン抵抗性の原因として、グルココルチコイドによるレプチン作用の阻害、BBB におけるレプチン輸送の低下、視床下部のレプチン受容体の減少という 3 つの要因が明らかとなった。これらの結果はイヌの肥満の病態の理解を助けるだけでなく、新規の治療、予防法の開発に貢献することが期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

肥満は過剰に脂肪組織が増加した状態であり、様々な疾患の危険因子となるが、その病態については不明な部分が多い。肥満関連分子の一つであるレプチンは脂肪組織から分泌され、食欲抑制作用を示す。肥満の動物では血中レプチン濃度は増加するが食欲は抑制されず、レプチン抵抗性となる。イヌの肥満におけるレプチン抵抗性の病態解明を目的として以下の実験を実施した。

肥満ではグルココルチコイド分泌が増加する。その影響を検討する目的で、以下の条件で血漿レプチン濃度を 24 時間測定した。1) デキサメサゾン投与+摂食では血漿レプチン濃度が著明に増加した。2) 生理食塩水投与+摂食でも血漿レプチン濃度は増加した。これら

のレプチン濃度増加は血漿インスリン濃度増加を伴っていた。3) デキサメサゾン投与+絶食では血漿レプチン濃度は徐々に増加した。4) 生理食塩水投与+絶食では血漿レプチン濃度は変化しなかった。デキサメサゾンと摂食は血漿レプチン濃度の増加に相乗的に作用し、肥満のイヌではレプチン抵抗性にグルココルチコイドが関与している可能性がある。

レプチンは血液脳関門 (BBB) を通過し、視床下部の受容体に結合して作用を発現する。イヌの体重を増加させ、血漿と脳脊髄液 (CSF) のレプチン濃度から BBB のレプチン輸送を評価した。削瘦時には CSF レプチン濃度は給餌 7 時間後に一過性に上昇した。適正体重時には CSF レプチン濃度は変化しなかった。肥満時には CSF レプチン濃度は給餌 7 から 13 時間後まで徐々に増加し、CSF/血漿レプチン濃度比と肥満度は負の相関関係にあった。BBB におけるレプチンの輸送障害は、レプチン抵抗性の原因の一つであると考えられるが、短時間であり、主たる原因ではないと思われた。

第 3 章では正常および肥満のイヌにおいてレプチン受容体の発現を検討した。視床下部を含む脳全体でレプチン受容体が発現していたが、肥満のイヌでは視床下部におけるレプチン受容体の発現量が少なかった。これらの所見は、レプチン抵抗性にレプチン受容体減少が関与していることを示す。

イヌの肥満におけるレプチン抵抗性の原因として、グルココルチコイドによるレプチン作用阻害、BBB のレプチン輸送低下、視床下部のレプチン受容体減少の 3 要因が明らかとなった。これらの結果は新規性があり、イヌの肥満の病態理解を深め、治療・予防法の開発に貢献することが期待される。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Effects of administration of glucocorticoids and feeding status on plasma leptin concentrations in dogs  
著 者 名 : Nishii, N., Takasu, M., Ohba, Y., Maeda, S., Kitoh, K., Ohtsuka, Y., Honjo, T., Saito, M. and Kitagawa, H.  
学術雑誌名 : American Journal of Veterinary Research  
巻・号・頁・発行年 : 67 (2) : 266-270, 2006
- 2) 題 目 : Postprandial changes in leptin concentrations of cerebrospinal fluid in dogs during development of obesity  
著 者 名 : Nishii, N., Nodake, H., Takasu, M., Soe, O., Ohba, Y., Maeda, S., Ohtsuka, Y., Honjo, T., Saito, M. and Kitagawa, H.  
学術雑誌名 : American Journal of Veterinary Research  
巻・号・頁・発行年 : 67 (12) : 2006-2011, 2006

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Serum growth hormone and insulin-like growth factor-1 concentrations in Japanese black cattle with renal tubular dysplasia  
著 者 名 : Nishii, N., Ohba, Y., Takasu, M., Katoh, K., Kitoh, K., Sasaki, Y. and Kitagawa, H.

- 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 67 (4) : 399-402, 2005
- 2) 題 目 : Japanese black cattle with ateliosis showed lower insulin responses during glucose tolerance test  
著 者 名 : Takasu, M., Ohba, Y., Hagiwara, Y., Hosoda, I., Nishii, N., Kitoh, K., Miyazawa, K. and Kitagawa, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 67 (6) : 635-637, 2005
- 3) 題 目 : Endocrine patterns in two strains of Japanese black cattle with growth retardation  
著 者 名 : Takasu, M., Hagiwara, Y., Ohba, Y., Nishii, N., Hosoda, I., Kitoh, K., Katoh, K. and Kitagawa, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 67 (11) : 1149-1153, 2005
- 4) 題 目 : 活性化トロンボプラスチン時間の延長を認めた発育不良の黒毛和種の1例  
著 者 名 : 高須正規, 武田枝理, 西飯直仁, 大場恵典, 前田貞俊, 宮澤清志, 小川博之, 北川 均  
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌  
巻・号・頁・発行年 : 58 (12) : 820-822, 2005
- 5) 題 目 : Results of metabolic profile test in Japanese black cattle with growth retardation  
著 者 名 : Takasu, M., Yayota, M., Nakano, M., Nishii, N., Ohba, Y., Okada, K., Maeda, S., Miyazawa, K. and Kitagawa, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 67 (12) : 1269-1271, 2005
- 6) 題 目 : A case of protein-losing enteropathy treated with methotrexate in a dog  
著 者 名 : Yuki, M., Sugimoto, N., Takahashi, K., Otsuka, H., Nishii, N., Suzuki, K., Yamagami, T. and Ito, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 68 (4) : 397-399, 2006
- 7) 題 目 : 右-左短絡の先天性心疾患による二次性多血症に対しハイドロキシウレアを使用した犬の2例  
著 者 名 : 西飯直仁, 鈴木清美, 杉本典子, 大塚宏美, 高橋邦昭, 金本 勇, 湯木正史  
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌  
巻・号・頁・発行年 : 59 (5) : 336-338, 2006
- 8) 題 目 : Pericardial mesothelioma in a neonatal calf  
著 者 名 : Takasu, M., Shirota, K., Uchida, N., Iguchi, T., Nishii, N., Ohba, Y., Maeda, S., Miyazawa, K., Murase, T. and Kitagawa, H.

- 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
 巻・号・頁・発行年 : 68 (5) : 519-521, 2006
- 9) 題 目 : Enterolithiasis in a cat  
 著 者 名 : Yuki, M., Sugimoto, N., Takahashi, K., Ohtsuka, H., Nishii, N. and Suzuki, K.
- 学術雑誌名 : Journal of Feline Medicine and Surgery  
 巻・号・頁・発行年 : 8 (5) : 349-352, 2006
- 10) 題 目 : 黒毛和種の発育不良牛における発育と血清インスリン様成長因子-1濃度  
 著 者 名 : 高須正規, 大場恵典, 荒井宏幸, 河島孝典, 西飯直仁, 前田貞俊, 宮澤清志, 北川 均
- 学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌  
 巻・号・頁・発行年 : 59 (9) : 603-606, 2006
- 11) 題 目 : Insulin and glucagon secretory patterns during propionate and arginine tolerance tests in Japanese black cattle with growth retardation  
 著 者 名 : Takasu, M., Kishima, Y., Nishii, N., Ohba, Y., Maeda, S., Miyazawa, K., Murase, T. and Kitagawa, H.
- 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
 巻・号・頁・発行年 : 69 (1) : 69-72, 2007
- 12) 題 目 : Japanese black cattle with orotic aciduria detected by gas-chromatography/mass-spectrometry  
 著 者 名 : Ohba, Y., Takasu, M., Nishii, N., Hosoda, I., Kitoh, K., Matsumoto, I., Zhang, C. and Kitagawa, H.
- 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
 巻・号・頁・発行年 : 69 (3) : 313-316, 2007
- 13) 題 目 : ELISA を用いた猫の血漿インスリン濃度測定  
 著 者 名 : 西飯直仁, 高須正規, Soe, O., 前田貞俊, 大場恵典, 小島正章, 蜂巢達之, 北川 均
- 学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌  
 巻・号・頁・発行年 : 60 (4) : 290-293, 2007
- 14) 題 目 : 慢性腎不全猫の尿アルブミン測定における人用分析機器の応用  
 著 者 名 : 桑原康人, 大場恵典, 加藤晶子, 前田貞俊, 高須正規, 西飯直仁, オッカーソー, 北川 均
- 学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌  
 巻・号・頁・発行年 : 60 (7) : 505-509, 2007
- 15) 題 目 : Cloning, expression and investigation for polymorphisms of canine peroxisome proliferator-activated receptors  
 著 者 名 : Nishii, N., Takasu, M., Soe, O., Maeda, S., Ohba, Y., Inoue-Murayama, M. and Kitagawa, H.
- 学術雑誌名 : Comparative Biochemistry and Physiology, Part B  
 巻・号・頁・発行年 : 147 (4) : 690-697, 2007

- 16) 題 目 : 僧帽弁閉鎖不全症の犬における塩酸テモカプリル長期投与の安全性  
著 者 名 : 北川 均, 大場恵典, 前田貞俊, 加藤晶子, 高須正規, 西飯直仁,  
オッカーソー, 寺本圭志  
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌  
巻・号・頁・発行年 : 60 (9) : 655-661, 2007
- 17) 題 目 : Propionate tolerance test for determination of insulin secretion in a  
hyperglycemic Japanese black steer  
著 者 名 : Takasu, M., Ohba, Y., Iguchi, T., Nishii, N., Maeda, S. and Kitagawa, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 69 (9) : 985-987, 2007
- 18) 題 目 : Recovery of a dog from aplastic anaemia after treatment with  
mycophenolate mofetil  
著 者 名 : Yuki, M., Sugimoto, N., Otsuka, H., Tanahashi, S., Katoh, M., Hirano, T.,  
Nishii, N. and Suzuki, K.  
学術雑誌名 : Australian Veterinary Journal  
巻・号・頁・発行年 : 85 (12) : 495-497, 2007