

学位論文題名

イヌの肥満に対する新しい予防・治療法の開発

－ β 3 アドレナリン受容体を介する脂肪細胞の活性化－

学位論文内容の要旨

肥満が高血圧や糖尿病など各種の成人病を誘発する最大の危険因子であることは広く認識されており、小動物臨床領域においても、肥満は重要な栄養性疾患として問題になりつつある。肥満はエネルギー収支の不均衡により引き起こされる病態であるため、その予防・治療法は、エネルギー摂取量の低減を目的とした制限給餌が第一選択となっている。しかし食餌療法の実行と効果については問題も多く、効果的かつ安全な肥満の予防・治療法の確立が求められている。

最近、肥満の成因のひとつとして、褐色脂肪組織（brown adipose tissue, BAT）の機能障害が注目されている。一般に脂肪組織といえば白色脂肪組織（white adipose tissue, WAT）のことを指しているが、哺乳類には形態も機能も異なるもう一つの脂肪組織である BAT が存在する。WAT が全身に広く分布し、大量の中性脂肪を蓄えるエネルギー貯蔵の場所であるのに対し、BAT はげっ歯類や冬眠動物によくみられ、冬眠からの覚醒時や寒冷暴露時の非ふるえ熱産生を行う部位であるとともに、過食後の余剰エネルギーを熱として消費する機能も持っている。BAT は脂肪酸を酸化分解することによって熱産生を行うが、この熱産生は褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に特異的に発現している脱共役タンパク質（uncoupling protein, UCP）の働きによるものである。従来、脂肪細胞での脂肪分解や熱産生の促進は、アドレナリンの β 受容体（ β -AR）、特に β 1-AR を介する作用と考えられていたが、その後の新しく合成された β -AR 作動薬（ β 作動薬）や

遺伝子クローニングの結果から $\beta 3$ -AR の存在が確認された。げっ歯類では、 $\beta 3$ 作動薬を長期間投与することで、体脂肪量の減少、酸素消費量の増加や UCP の発現増加がおり、肥満が軽減されることが報告されている。しかし、 $\beta 3$ -AR を介する効果には種差が見られ、現在までに開発されている選択的 $\beta 3$ 作動薬はげっ歯類には高い効果を示すが、ヒトやモルモットでは効果が低いことも知られている。

本研究では、 $\beta 3$ 作動薬をイヌの肥満予防および治療に応用することを目的として、イヌでの $\beta 3$ 作動薬の薬理学的効果の検討およびイヌ $\beta 3$ -AR の 1 次構造の解析を行い、以下の知見を得た。

(1) $\beta 3$ 作動薬の *in vivo* での脂肪動員効果を検討するために、ビーグル犬に選択的な $\beta 3$ 作動薬である CL316,243 と ICI D7114 を静脈内投与し、非選択的な β 作動薬であるイソプロテレノールの効果と比較した。 $\beta 3$ 作動薬は投与開始直後から急速な血中脂肪酸濃度の増加を示し、その効果はイソプロテレノールに比べてより持続的であった。また、等用量を用いた場合には、CL316,243 の方が ICI D7114 よりも作用が強く、少なくとも 2 桁は低用量で脂肪動員効果を示した。 $\beta 3$ 作動薬の投与はインスリン分泌も促進したので、脂肪動員効果は低インスリンによる二次的な反応ではなく、脂肪組織の $\beta 3$ -AR を介する直接作用であると考えられた。このように、 $\beta 3$ 作動薬はイヌにおいても *in vivo* での脂肪動員とインスリン分泌を促進するので、イヌの肥満・糖尿病の治療薬として利用できる可能性が示唆された。しかし、げっ歯類と異なり、循環器系への作用も有することが併せて判明した。

(2) 次に、 $\beta 3$ 作動薬を長期間にわたり経口投与し、抗肥満効果を検討した。

ビーグル犬に CL316,243 (0.1mg/kg) を 1 日 1 回経口投与し、5-7 週間にわたって観察すると、プラシーボ投与群に比べて体重や胴囲、胸囲が減少した。この間の摂食量はやや低下したが有意な差ではなかった。血液化学検査値および一般臨床所見ともに特記すべき異常は認められなかった。投薬終了後の剖検では、脂肪組織を除いて特記すべき

異常は認められなかった。CL316,243を投与したイヌでは脂肪組織は縮小しており、組織学的には細胞内の脂肪が減少し、多房性の脂肪滴を持った細胞が多数出現していた。この脂肪組織に、UCPが多量に発現していることが、RT-PCR法およびウエスタンブロット法や免疫組織化学的検索によって明らかとなった。一方、プラシーボ投与群のWATは、典型的な単房性の脂肪滴を持っている白色脂肪細胞が大部分であった。これらの結果から、イヌに対するCL316,243の長期投与は脂肪組織での脂肪分解とUCPの発現による熱産生を誘起すると結論した。従って、CL316,243は、イヌにおいて特に重大な副作用をおこすことなく肥満の予防・治療効果があることが示された。

(3) イヌ β 3-ARの機能をより詳細に解析するためにreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR法)により β 3-ARのcDNAクローニングを行い、その塩基配列の一部を決定し、他の動物種の β 3-ARと比較検討した。解析した部分は、開始コドンを含む650bpであり、他の動物種から予想される全長cDNAの約1/3であるが、翻訳領域では約1/2に相当する配列であると予想できた。この塩基配列および推定される206個のアミノ酸配列は他の動物種の β 3-ARの塩基配列と約85%の高い相同性を示すが、 β 1や β 2-ARの塩基配列とは50%前後の相同性しかなかった。イヌ β 3-ARのアミノ酸配列には、 β -ARに特徴的である、N末端側の糖鎖付加部位や膜貫通領域のリガンド結合部位のアミノ酸が保存されていた。イヌ β 3-AR cDNAでは、マウス、ラットと異なり、ヒトやウシと同様に48-50番目にVal-Leu-Alaの3つのアミノ酸残基の挿入が認められた。

さらに、RT-PCR法を用いて β 3-AR mRNAの組織分布を調べた結果、脂肪組織に強い発現が認められたが、脂肪組織以外にも肝臓、肺、脾臓および腎臓などで弱いながら発現が見られた。このように、イヌでは量的には少ないとはいえ、脂肪組織以外にも広範に β 3-ARが発現しており、げっ歯類などとは発現パターンが異なることが明らかとなった。

以上の知見より、イヌにも機能的な β_3 -ARが脂肪組織に発現しており、選択的な β_3 作動薬であるCL316,243は脂肪動員とエネルギー消費を促進することで、効果的な抗肥満薬となる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 橋 本 晃
副 査 助 教 授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

イヌの肥満に対する新しい予防・治療法の開発

－ β 3 アドレナリン受容体を介する脂肪細胞の活性化－

肥満は小動物臨床領域においても重要な栄養代謝疾患となりつつある。本研究は、以下のように、脂肪代謝の特性に注目して、薬物を用いて体脂肪の分解を起こしそれを熱として放散させることにより、イヌの肥満を予防・治療することを目指したものである。

1、白色脂肪細胞での脂肪分解と褐色脂肪細胞での熱産生は、いずれも β アドレナリン受容体を介して促進されるが、脂肪細胞には β 3 受容体が存在する。従って、この特異的な作動薬は、 β 1 や β 2 受容体を介する心臓や肺などへの作用無しに脂肪分解と熱産生を増やし、抗肥満効果を発揮することが期待される。事実、齧歯類ではこのような効果が報告されている。本研究ではまず、イヌ脂肪組織の β 3 受容体cDNAをクローニングしmRNA発現を調べて、イヌにも β 3 受容体が存在することを確認した。

2、 β 3 作動薬であるCL316,243(CL)をビーグル犬に投与して、その効果を調べた。まず、脂肪分解作用について血中遊離脂肪酸動態から検討したところ、投与15分後から脂肪酸濃度が上昇し少なくとも数時間は高値が続くことが明らかとなった。この効果はCLの用量依存的であり、非選択的作動薬であるイソプロテレノールよりもはるかに強かった。従って、 β 3 作動薬はイヌにおいても脂肪動員効果があることが確認された。

3、CL(0.1 mg/kg)を1日1回ビーグル犬に経口投与し、5-7週間にわたって観察したところ、プラセボ投与群に比べて体重や胴囲の減少が認められた。この期間の摂食量には両群間で有意差はなく、一般臨床所見や血液生化学検査値にも異常は見られなかった。投薬終了後の剖検によって、CL投与犬では細胞内脂肪の減少によって脂肪組織が縮小しており、褐色脂肪細胞に特異的な熱産生分子である脱共役蛋白質が多量に発現していることが明らかとなった。

以上のように、本研究は、イヌでも β 3 受容体が脂肪組織に存在しており、選択的な

作動薬が脂肪動員とエネルギー消費を促進することで効果的な抗肥満薬となることを示したものであり、獣医学とりわけ小動物臨床領域への貢献が大である。よって審査委員一同は佐々木典康氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。