



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	佐々木, 典康
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第4460号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137176
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51478
Type	doctoral thesis
File Information	000000322366.pdf



イヌの肥満に対する新しい予防・治療法の開発
— $\beta 3$ アドレナリン受容体を介する脂肪細胞の活性化 —

佐々木 典康

イヌの肥満に対する新しい予防・治療法の開発 ー $\beta 3$ アドレナリン受容体を介する脂肪細胞の活性化 ー

佐々木 典康

目 次

略語一覧	iv
緒 言	1
第1章 $\beta 3$ 作動薬の急性投与による脂肪動員効果	
序 文	5
材料および方法	
1. 供試動物	6
2. 薬 物	6
3. 急性投与実験	6
4. 血中遊離脂肪酸 (FFA) および血中グルコース, 血中インスリン濃度の測定	7
5. 統計処理	7
結 果	
1. $\beta 3$ 作動薬の脂肪動員効果	8
2. $\beta 3$ 作動薬の心拍数への影響	8
3. $\beta 3$ 作動薬の血中インスリン, グルコースへの影響	9
考 察	17
小 括	19
第2章 $\beta 3$ 作動薬の長期投与による体脂肪減少効果	
序 文	20
材料および方法	
1. 供試動物	21
2. 薬 物	21
3. 長期投与実験	21
4. ウエスタンブロット法によるUCPタンパク質の検出	22
5. RT-PCR法によるUCP mRNAの検出	22
1) 組織からのtotal RNAの抽出	22

2) 相補的DNA (complementary DNA : cDNA) の合成	23
3) polymerase chain reaction (PCR)	23
6. 免疫組織化学的手法によるUCPタンパク質の検出	23
7. 血液生化学的検査	24
8. 統計処理	24
結 果	
1. CL316, 243の長期投与による体重、胸囲および胴囲の変化	25
2. 血液生化学的パラメーターへの影響	26
3. 剖検所見と脂肪組織の病理学的変化	26
4. 脂肪組織でのUCP mRNAおよびUCPタンパク質の検出	26
考 察	33
小 括	35

第3章 イヌ β 3-AR cDNAの塩基配列の解析と mRNA の組織分布

序 文	36
材料および方法	
1. イヌ β 3-AR cDNAのクローニングと塩基配列の決定	37
1) 脂肪組織からのRNA抽出およびpoly(A) RNAの精製	37
2) Rapid amplification of cDNA ends (RACE法) による イヌ β 3-ARのクローニング	37
(1) イヌ脂肪組織cDNAライブラリーの作成	37
(2) PCR法によるイヌ β 3-AR cDNA断片の作製	37
(3) 3'-RACE法によるイヌ β 3-AR cDNAの 3'-cDNA末端のクローニング	38
(4) 5'-RACE法によるイヌ β 3-AR cDNAの 5'-cDNA末端のクローニング	38
3) 塩基配列の決定	39
2. RT-PCRによるイヌ β 3-AR mRNAの組織分布の検討	39
結 果	
1. イヌ β 3-AR cDNAのクローニングと 部分塩基配列の決定	40

2. RT-PCRによるイヌ $\beta 3$ -AR mRNAの組織分布の検討	41
考 察	45
小 括	47
総 括	48
謝 辞	50
引用文献	51
英文抄録	57

略語一覧

AR (アドレナリン作動性受容体)

ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ)

AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)

BAT (褐色脂肪組織)

BSA (ウシ血清アルブミン)

BUN (血中尿素窒素)

cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate)

Cre (クレアチニン)

FFA (遊離脂肪酸)

MMLV (Moloney murine leukemia virus)

RACE (rapid amplification of cDNA ends)

RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

T-CHO (総コレステロール)

TG (トリグリセリド)

UCP (脱共役タンパク質)

WAT (白色脂肪組織)

使用頻度の少ない略語については、文中に記載した。

アミノ酸および核酸の略号は、International Union of Pure and Applied Chemistry

(IUPAC) の方式に基づいて表記した。

緒 言

肥満とは『過剰な体脂肪が蓄積した状態』と定義され、全身の脂肪組織に中性脂肪が多量に蓄積した病的な状態のことである。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、イヌやネコなどの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。とくにイヌでは犬種にもよるが、飼育されているイヌの25~50%が過体重であるという報告[18, 48, 49]もあり、またヒトと同様に、肥満により糖尿病[38]や高血圧[57]、骨関節炎、肝疾患[30]などが誘発されたり、感染症に対する感受性が増大する[55]ことが知られている。

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り、単純な過食や運動不足が主因とされている。つまり、エネルギー摂取量が過剰になるか、エネルギー消費量が減少すれば肥満へと進展していくのである。従って、肥満の予防・治療法が、エネルギー摂取量の低減を目的とした絶食、あるいは低カロリーの処方食による制限給餌が第一選択となっているのはいうまでもない。しかし絶食は、脂肪組織以外の筋肉などの損失が大きいという欠点があり、また動物愛護という観点からも好ましくない。処方食による食餌管理では、飼い主が獣医師の処方を守らずに間食を与えてしまったり、処方食の嗜好性の点から途中で挫折してしまう例も見受けられる。従って、ヒトと同様に小動物臨床領域においても、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が皮下や内臓周囲など全身に広く分布し、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多くみられ、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臓器として知られていた[26]。熱産生はエネルギー消費を伴うため、その増減が全体としてのエネルギー収支に影響するのは当然である。実際に1980年代になってからBATが非ふるえ熱産生のみならず食餌性熱産生も含めて広く調節性の熱産生に寄与し[58, 59]、その機能低下が肥満の一因となることが明らかとなってきた。

BATは血液中のグルコースを取り込んで脂肪合成を行うだけでなく、細胞内に貯蔵している中性脂肪から生成した脂肪酸 (free fatty acid, FFA)、あるいは血中からの脂肪酸

を酸化分解することによって熱産生を行う。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) の働きによっている。UCPはミトコンドリアのATP/ADPキャリアー (ATP/ADP carrier, AAC) や無機リン酸キャリアー (phosphate carrier, PiC) と同じファミリーに属するが、AACやPiCがすべての細胞のミトコンドリア内膜に存在するのに対して、UCPは褐色脂肪細胞に限って存在する [32, 33]。UCPは約300アミノ酸より構成されるタンパク質で、6つの膜貫通領域が存在し、これらがプロトンチャネルを構成している。このプロトンチャネルは通常は閉じているが交感神経刺激により活性化される (図1)。すなわち、交感神経終末より分泌されたノルアドレナリンが細胞膜上のアドレナリン作動性 β 受容体 (β -adrenergic receptor, β -AR) を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMP濃度を上昇させる。cAMPはプロテインキナーゼAの活性化、ホルモン感受性リパーゼの活性化を経て中性脂肪を分解しFFAを生成する。このFFAはUCPに結合すると、閉じていたプロトンチャネルを開放させると共に熱産生基質として働く。通常ミトコンドリアでは、脂肪酸酸化により生じた呼吸基質 (NADHやFADH₂) からの電子伝達に伴ってミトコンドリア内膜の膜を挟んでプロトン勾配が形成され、このプロトンがマトリックスに戻る際にATP合成酵素を駆動させることでエネルギーをATPの形に変える。しかし褐色脂肪細胞では、呼吸基質の酸化により得られたプロトンはUCPのプロトンチャネルを濃度勾配に従って透過してしまうために、ATP合成と共役できず熱となり消費されるのである。従って、交感神経活動が亢進する条件下、例えば寒冷暴露や自発的な過食の時にはBATでの熱産生が増加し、体温低下を防いだり [26]、余剰エネルギーを消費してエネルギー収支の乱れを制御したりする [58, 59]。逆に、交感神経活動が低下したり、UCPや褐色脂肪細胞の機能障害があるとエネルギー消費が減少し肥満の成因となるのである。

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、特に β_1 -ARを介する作用と考えられていた [41]。しかし、 β_1 , β_2 -ARの作動薬と拮抗薬を組み合わせた実験から脂肪細胞には β_1 , β_2 とは異なる別の β -ARの存在が示唆されていた [64]。その後の新しく合成された β -AR作動薬 (β 作動薬) [2] や遺伝子クローニングの結果 [3, 19, 24, 43, 52, 54, 56] から β_3 -ARの存在が確認された。以来、げっ歯類やヒトの分離脂肪細胞 [14]、あるいは β_3 -ARを発現させた細胞系 [7, 8, 51, 56, 65] などを利用して薬理的、生化学的な実験がおこなわれ、その機能の解明がなされてきた。ラットやマウスでは、 β_3 -ARはBATおよびWATに分布しているので [24, 52, 54]、 β_3 作動薬はWATでの脂肪分解とBATでの熱産生を増大させ [27, 69]、結果的に体脂肪の減少、即ち肥満の

予防・治療が可能であると思われる。実際に、肥満モデルマウスに β_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（熱産生の指標のひとつ）の増加や熱産生タンパク質であるUCPの発現増加がおり、肥満を軽減することが報告されている [53, 69]。しかし、一方で β_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 β_3 作動薬はげっ歯類には高い効果を示すが、ヒト、霊長類やモルモットでは効果が低いことも知られており [40]、ヒト医学領域では新たな研究が展開されている。

いずれにせよ、 β_3 -ARは脂肪分解と熱産生における重要な受容体の一つであることは疑いないので、これをターゲットにすれば、食餌や運動などを中心とした従来の肥満治療とは全く異なる新しい予防・治療法が開発できると思われる。

そこで本研究では、選択的 β_3 作動薬をイヌの肥満治療および予防に利用することを目的として、ビーグル犬を対象として以下のような実験を行った。（1） β_3 作動薬の急性投与効果について、2種類の β_3 作動薬、CL316,243およびICI D7114を静脈内投与して血中FFA濃度を指標に脂肪動員作用を調べ、心拍数を指標とした循環器系への作用と比較検討した。（2）急性投与の結果から、脂肪動員効果の高かった β_3 作動薬（CL316,243）を1日1回長期間にわたり経口投与し、体重や胸囲、胴囲の減少を指標として抗肥満効果を検討し、その時の脂肪組織でのUCPの発現について調べた。同時に長期投与による副作用の有無についても確認した。（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。さらにイヌ β_3 -AR mRNAの組織分布についてもRT-PCR法を用いて調べた。

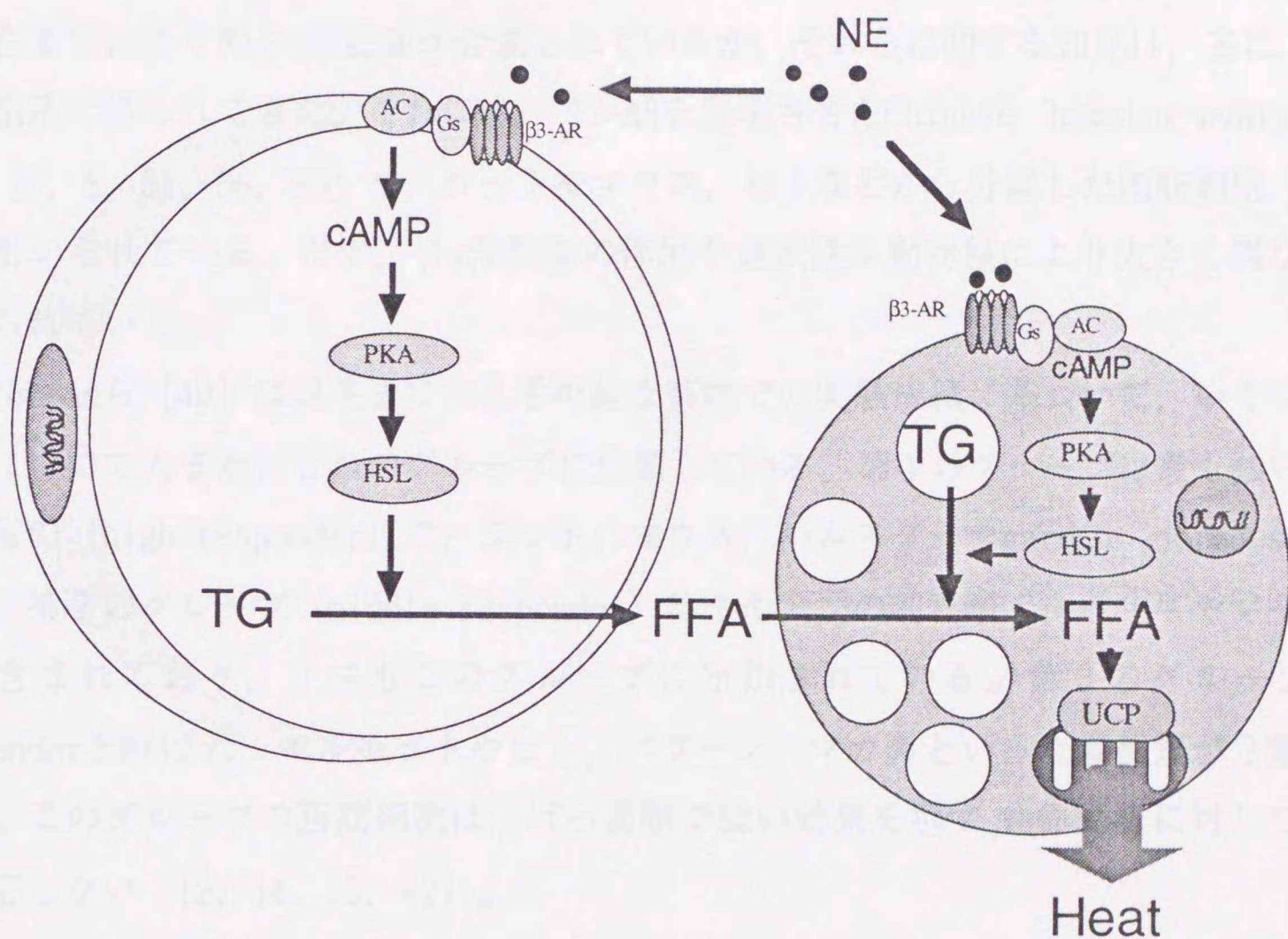


図 1 交感神経による脂肪分解と熱産生の促進

脂肪分解により放出されたFFAはUCPを活性化させるとともに、酸化分解され熱産生の基質となる。

AC：アデニル酸シクラーゼ， $\beta 3$ -AR：アドレナリン作動性 β 受容体，cAMP：サイクリックAMP，FFA：遊離脂肪酸，Gs：Gタンパク質，HSL：ホルモン感受性リパーゼ，PKA：プロテインキナーゼ A，TG：中性脂肪，UCP：脱共役タンパク質

第1章 β_3 作動薬の急性投与による脂肪動員効果

【序文】

現在までに多くの β_3 作動薬が合成されているが、それらに関する知見は、主に *in vitro* の細胞系で得られてきた。これには、 β_3 -ARを発現させたChinese hamster ovary (CHO) 細胞 [7, 8, 51, 56, 65] や、ラットやマウス、ヒトなどから分離した脂肪細胞 [14] がよく用いられている。だが、 β_3 作動薬の作用や選択性は動物種により大きく異なることが知られている。

Lafontanら [40] は現在までに入手可能な薬物での実験成績に基づいて、いくつかの動物種について大まかに3つのグループに分類している。第1のグループは最も強い反応を示すもの (high responder) で、ラット、マウス、ハムスターやgarden dormouseなどである。第2のグループ (middle responder) はやや大型の哺乳類で、ウサギやマーモセットが含まれており、イヌもこのグループに分類されている。第3のグループはlow responderと呼ばれ、モルモットやヒト、バブーン、マカカといった霊長類が分類されている。このグループの脂肪細胞は、げっ歯類で強い効果を示す β_3 作動薬に対してほとんど反応しない [12, 14, 15, 42]。

このように、 β_3 作動薬の *in vitro* での効果は動物種差が大きいので、*in vivo* ではそれがより顕著となり、さらには他の β -ARを介する作用も起こる可能性もあり、単純には評価できない。従って、主にげっ歯類で検索・開発され、効果が確認された薬物が、イヌでも同様の効果を示すとは限らない。

そこで、現在入手可能な β_3 作動薬のうちで、げっ歯類で最も選択性が高いとされているphenylethanolamine系の化合物のひとつであるCL316,243 [9] と、aryloxypropanolamine系の化合物である, ICI D7114 [28] を用いて、イヌに対する *in vivo* での急性投与効果を調べ、同時に非選択的な β 作動薬であるイソプロテレノールの効果との比較を行った。即ち、これらの薬物を無麻酔・無拘束下のイヌに静脈内投与し、数時間にわたって血中FFA濃度を追跡して脂肪動員効果を検討した。また、 β_1 -ARを介する循環器系への作用についても、心拍数を指標として検討した。

【 材料および方法 】

1. 供試動物

4歳齢以上のビーグル成犬（雄1頭，雌7頭）を使用した。通常は，市販の固形飼料を1日1回午前8～9時に与え，水道水を自由に摂取させ飼育した。実験に使用する時は，前日より12時間の絶食を行った。

なお動物実験は，『北海道大学における動物実験に関する指針』に基づいて行った。

2. 薬 物

β 3作動薬であるCL316,243, disodium(R,R)-5[2-{3-chlorophenyl}-2-hydroxyethyl]-aminopropyl)-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate [9] は，American Cyanamid Co. (Pearl River, NY, USA) より，ICI D7114 (acid metabolite), [(S)-4-(2-hydroxy-3-phenoxypropylaminoethoxy)-N-(2-methoxyethyl)phenoxyacetamide] [28] は，ICI Pharmaceuticals (Macclesfield, UK) より提供された。非選択的な β 作動薬である(-)-イソプロテレノールはSigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。これらの作動薬の化学構造を，ノルアドレナリンと併せて図1-1に示した。

薬物は使用直前に，滅菌生理食塩水（大塚製薬，徳島）に溶解して使用した。

3. 急性投与実験

実験には12時間絶食させたビーグル犬を無麻酔，無拘束の状態で使用した。まず，薬物投与のために橈側皮静脈に23ゲージの静脈内留置針（テルモ，東京）を挿入し，固定した。また，心拍数の測定のために心電計（501 AX-D；フクダ エム・イー 工業，東京）の導出電極を前肢および左後肢に，アースを右後肢にそれぞれ装着した。

被検薬物投与に先立ち，コントロールとして生理食塩水 20ml を30分かけて橈側皮静脈より投与し，投与の前後で頸静脈より採血を行った。続いてイソプロテレノール(0.2 nmol/kg/min)あるいは CL316,243および ICI D7114を各種の濃度 (0.02-2nmol/kg/min) で30分間かけて静脈内に投与した。投与開始より120分まで経時的 (15, 30, 45, 60, 90, 120分) に頸静脈より採血を行った。同時に各採血時点で標準肢誘導法により心電図を取り，P波を計測して心拍数を算出した。

なお，同一の個体で再度実験を行う場合は，1週間の休止期間を置いた。

4. 血中遊離脂肪酸 (FFA) および血中グルコース, 血中インスリン濃度の測定

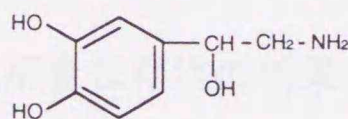
血液はヘパリン処理した試験管に採取し, 3,500rpmで15分間遠心した後, 得られた血漿を -20°C で保存した。血中FFA濃度はACS・ACOD法 (NEFA C-test Wako kit; 和光純薬, 大阪) で, 血中グルコース濃度はGOD法 (Glucose B-test Wako kit; 和光純薬) で測定した。血中インスリン濃度はラジオイムノアッセイキット (Insulin RIAビーズ II; ダイナボット, 東京) を用い, ヒトインスリンを標準として測定した。

5. 統計処理

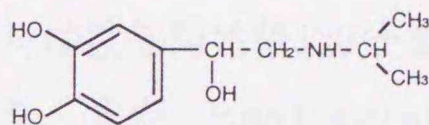
全ての値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。有意差の検定は, 二元配置分散分析法により行った。また, 2群間の値の有意差の検定はStudent's *t*-testによって行った。

β -adrenergic receptor agonists

noradrenaline

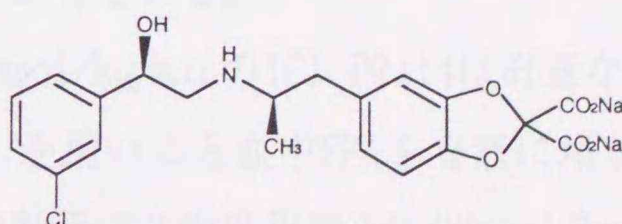


isoproterenol



β_3 -adrenergic receptor agonists

CL316,243



ICI D7114

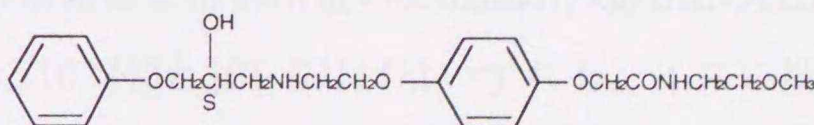


図1-1. 選択的 β_3 作動薬, CL316,243とICI D7114の化学構造

選択的な β_3 作動薬であるCL316,243とICI D7114の化学構造を示した。比較のために非選択的な β 作動薬であるノルアドレナリンとイソプロテレノールの構造も示した。

【 結 果 】

1. β_3 作動薬の脂肪動員効果

選択的な β_3 作動薬であるCL316,243およびICI D7114と、非選択的な β 作動薬であるイソプロテレノールの脂肪動員効果を、静脈内投与してからの血中FFA濃度の変化を指標にして調べた。図1-2に、12時間絶食させたイヌに等量(0.2nmol/kg/min)の β 作動薬を投与した際の血中FFA濃度の増加量を経時的に示した。

この用量では、イソプロテレノールとCL316,243は、投与開始直後から血中FFAを有意に増加させたが、ICI D7114ではほとんど変化しなかった。イソプロテレノールとCL316,243の脂肪動員効果は急速であり、投与開始後15分までに最大あるいは最大に近い増加を示した(各々の増加量は、 1.2 ± 0.3 mmol/l および 2.1 ± 0.2 mmol/l)。その後はイソプロテレノールの効果が一過性で薬物の投与終了時にはもとの低いレベルまで戻っているのに対し、CL316,243の効果は持続的であり、少なくとも120分まで高いレベル(1.7 ± 0.2 mmol/l)を維持していた。

次に、CL316,243とICI D7114の用量依存性の効果を0.02-2nmol/kg/minの範囲で調べた。図1-3のように、0.02nmol/kg/minのCL316,243ではFFAの増加量は30分で最大の 1.5 ± 0.1 mmol/lであり、この高いFFAレベルは投与開始後120分まで持続したが、前述の0.2nmol/kg/minと比較すると効果は低かった。また、2nmol/kg/minでは投与開始後15分が最大の 2.2 ± 0.2 mmol/lであり、0.2nmol/kg/minとほとんど同じ程度の作用しか示さなかった(図1-3)。この結果は、CL316,243の脂肪動員作用には薬物の用量依存性があり、0.2nmol/kg/minで最大の効果が得られることを示している。

一方、図1-4に示すように、0.2nmol/kg/minのICI D7114は有意なFFAの増加を起さなかったが、高用量(2nmol/kg/min)を用いると血中FFAを有意に増加させた(投与後30分で 1.4 ± 0.2 mmol/l)。しかし、この効果は2桁低用量の0.02nmol/kg/minのCL316,243とほぼ同程度であった。このように、CL316,243とICI D7114はいずれも、イヌに投与すると脂肪動員を起し血中FFAレベルを増加させるが、その効果はCL316,243の方がはるかに強力であることを示している。

2. β_3 作動薬の心拍数への影響

循環系に与える作用を、CL316,243、ICI D7114およびイソプロテレノールを静脈内投与

してからの心拍数の変化を指標にして調べた。図1-5Aに示すように、イソプロテレノールは投与開始直後から急激な心拍数の増加を起し、その増加は投与開始後15分で最大の 83.8 ± 18.8 beats/minとなった。しかし、血中FFAの場合と同様に、その効果は一過性であり薬物の投与終了時点で、ほぼ元の心拍数にまで回復していた。一方、 β_3 作動薬であるCL316,243の投与によっても心拍数の増加が見られ、その増加量は投与開始後15分で 60.0 ± 2.0 beats/minであった。この心拍数の増加は血中FFAの場合と同様に持続的であり、投与開始後120分でも 38.8 ± 4.3 beats/minと高い値のままであった。

ICI D7114を 0.2 nmol/kg/minで投与した場合にはわずかな心拍数の変化がみられただけだが、 2 nmol/kg/minの投与ではCL316,243の場合と同様の増加が見られた（投与開始後30分で 40.0 ± 10.0 beats/min, 図1-5B）。この効果はCL316,243の 0.02 nmol/kg/minとほぼ同程度であり、CL316,243とICI D7114では、脂肪動員効果と同様にその効果には2桁の用量差が認められた。

このように今回用いた β_3 作動薬は、イヌにおいて脂肪動員効果のみならず循環器系へも作用することが明らかになった。そこで、最も脂肪動員効果の大きい薬物、用量を検討するために、血中FFAの増加量と心拍数の増加量を比較した。まず、各個体毎に0分（薬物投与前）の値を基準値として、そこからの血中FFAあるいは心拍数の変動量を、グラフより0-120分までの曲線下面積（area under curve : AUC）として算出した。イソプロテレノール（ 0.2 nmol/kg/min）の投与で得られた心拍数と血中FFAのAUCの値をそれぞれ1としてグラフに表したものが図1-6である。CL316,243の 2 nmol/kg/minおよび 0.2 nmol/kg/minでは、イソプロテレノールに比べると心拍数でそれぞれ2.2倍、2.4倍であるが、血中FFAでは12.1倍、16.7倍効果が高かった。ICI D7114の 2 nmol/kg/minおよび 0.2 nmol/kg/minでは、イソプロテレノールに比べてそれぞれ心拍数では1.1倍、0.1倍、血中FFAでは5.1倍、0.6倍であった。これらの結果は、イソプロテレノールに比べて、CL316,243やICI D7114は循環器系への効果より脂肪動員効果の方が高いこと、および、CL316,243を 0.2 nmol/kg/minの用量で投与した時に最も効果的であることを示している。

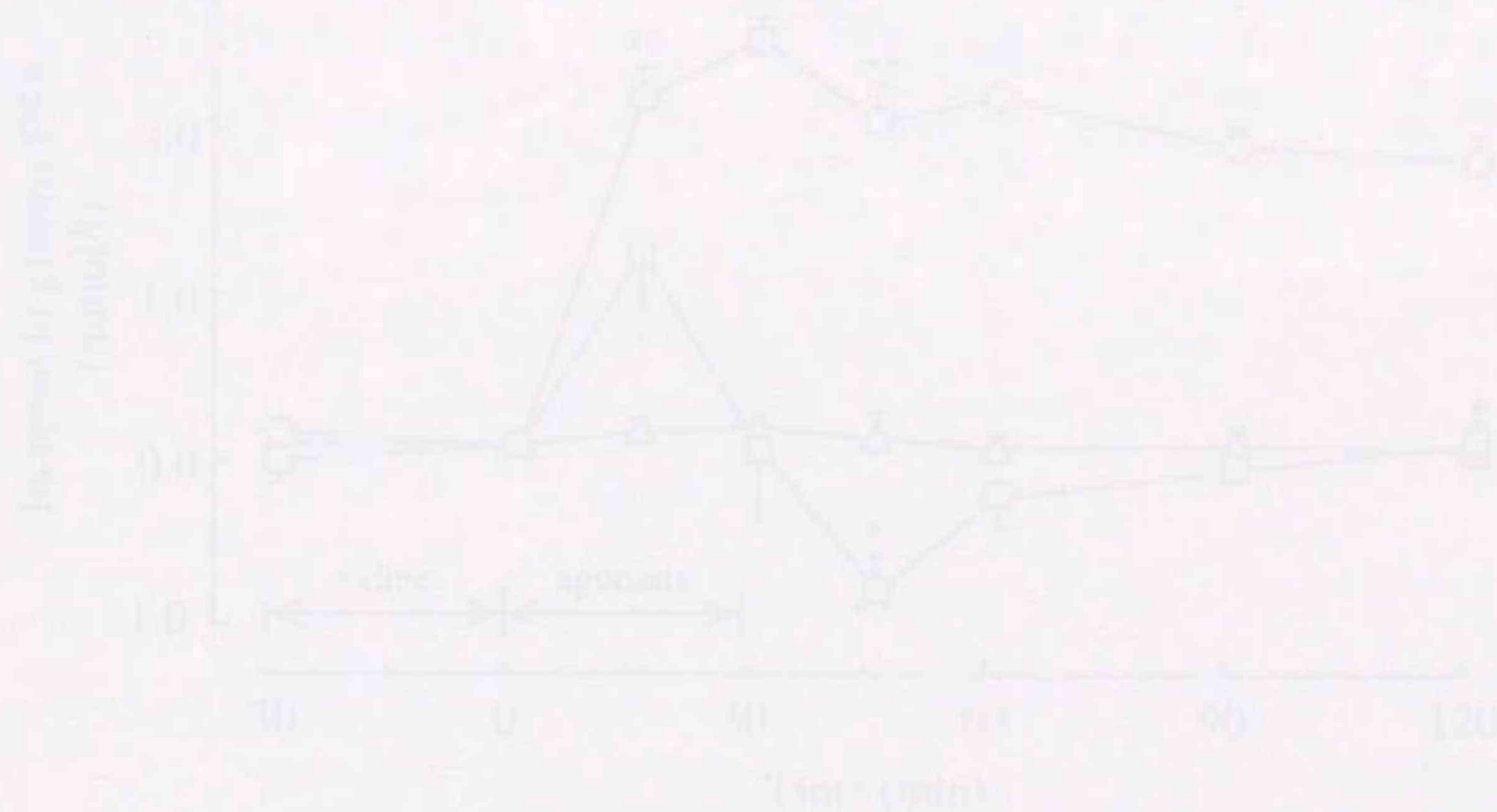
3. β_3 作動薬の血中インスリン、グルコースへの影響

血中FFAレベルはカテコールアミンに加えて、インスリンによっても強く影響を受けることが知られている。そこで、 β 作動薬の投与中におけるインスリンならびにグルコースの血中濃度変化を調べた。イソプロテレノール（ 0.2 nmol/kg/min）では、投与開始後に血中インスリンが著しく増加した（投与開始後15分で 170.5 ± 40.7 μ U/ml の増加）が、一過

性であり、すぐに元のレベルまで戻った（結果は図示せず）。 CL316,243 (0.2nmol/kg/min) の投与によっても急速な血中インスリンの増加が見られ、投与開始後15分で $25.2 \pm 8.9 \mu\text{U/ml}$ の増加であったが、イソプロテレノールに比べるとその効果は約15%程度であった（図1-7A）。

この時の血中グルコースの変化をみると、CL316,243 (0.2nmol/kg/min) の投与では、インスリンの分泌増加に引き続いた緩やかな低下が観察された（図1-7B）。つまり、インスリンの増加が投与開始後15分で最大となるのに対し、グルコースは投与開始後30分から減少し、45分で最大 $29.5 \pm 7.3\text{mg/ml}$ の低下を示した。

ICI D7114 (2nmol/kg/min) の投与においてもCL316,243と同様の反応が見られたが、インスリン、グルコースのいずれも、その変動の程度は弱かった。すなわち、インスリンの増加は、やはり投与開始後15分で最大の $12.4 \pm 2.5 \mu\text{U/ml}$ となったが、グルコースは投与開始後30分から低下傾向を示したものの有意な低下はみられなかった。



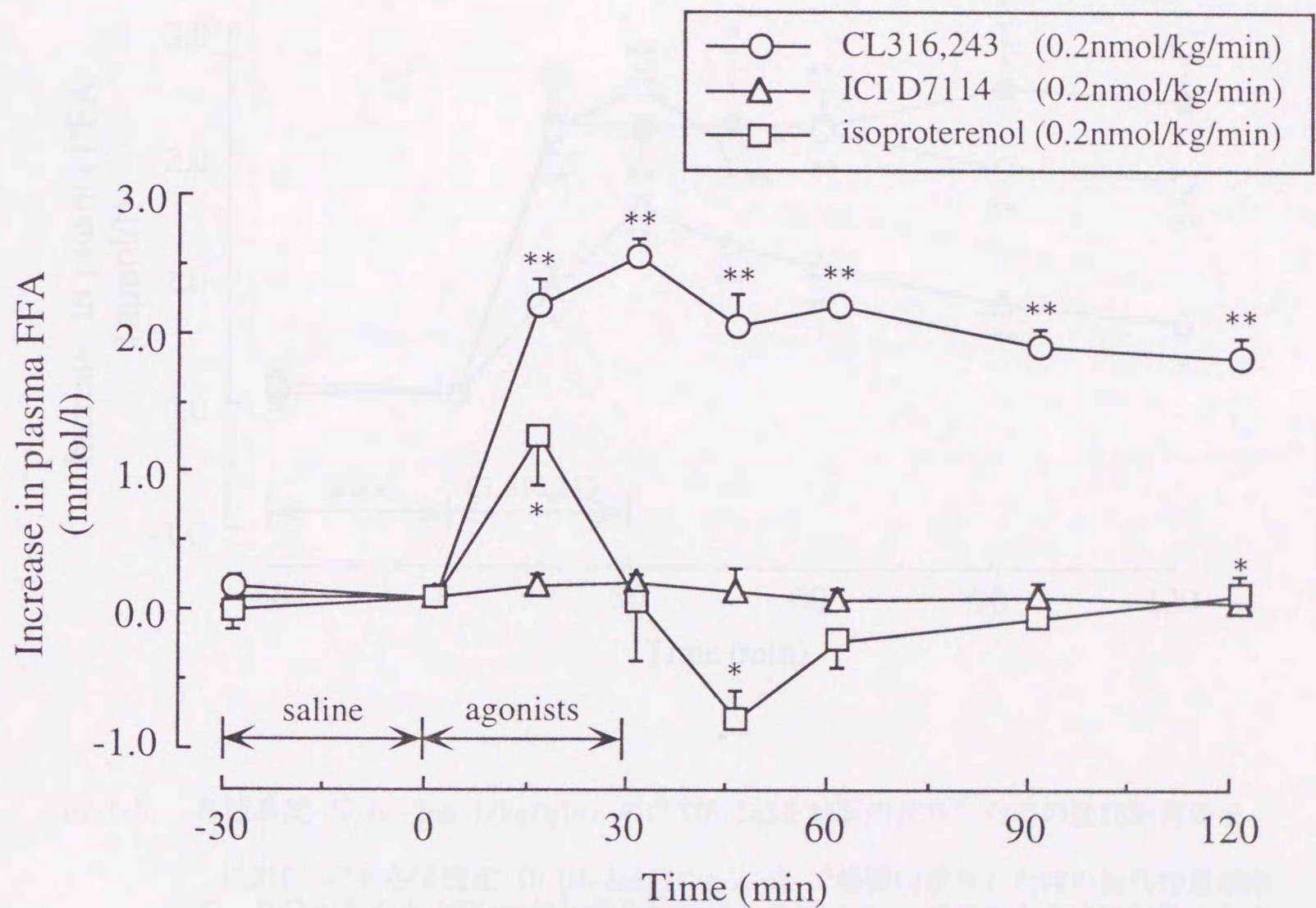


図 1-2. 選択的 β_3 作動薬 (CL316,243, ICI D7114) および非選択的 β 作動薬 (イソプロテレノール) を静脈内投与した時の脂肪動員効果

CL316,243, ICI D7114, イソプロテレノールをそれぞれ0.2nmol/kg/minで静脈内投与した時の脂肪動員作用を, 0分を基準とした血中 FFA の増加量を指標に調べた。-30分から0分は対照として生理食塩水を投与し, 0分から30分に薬物を投与した。値は4頭の平均値±標準誤差で示した。*および**はそれぞれ各群の0分値との有意差, $p < 0.05$, $p < 0.01$ を示す。

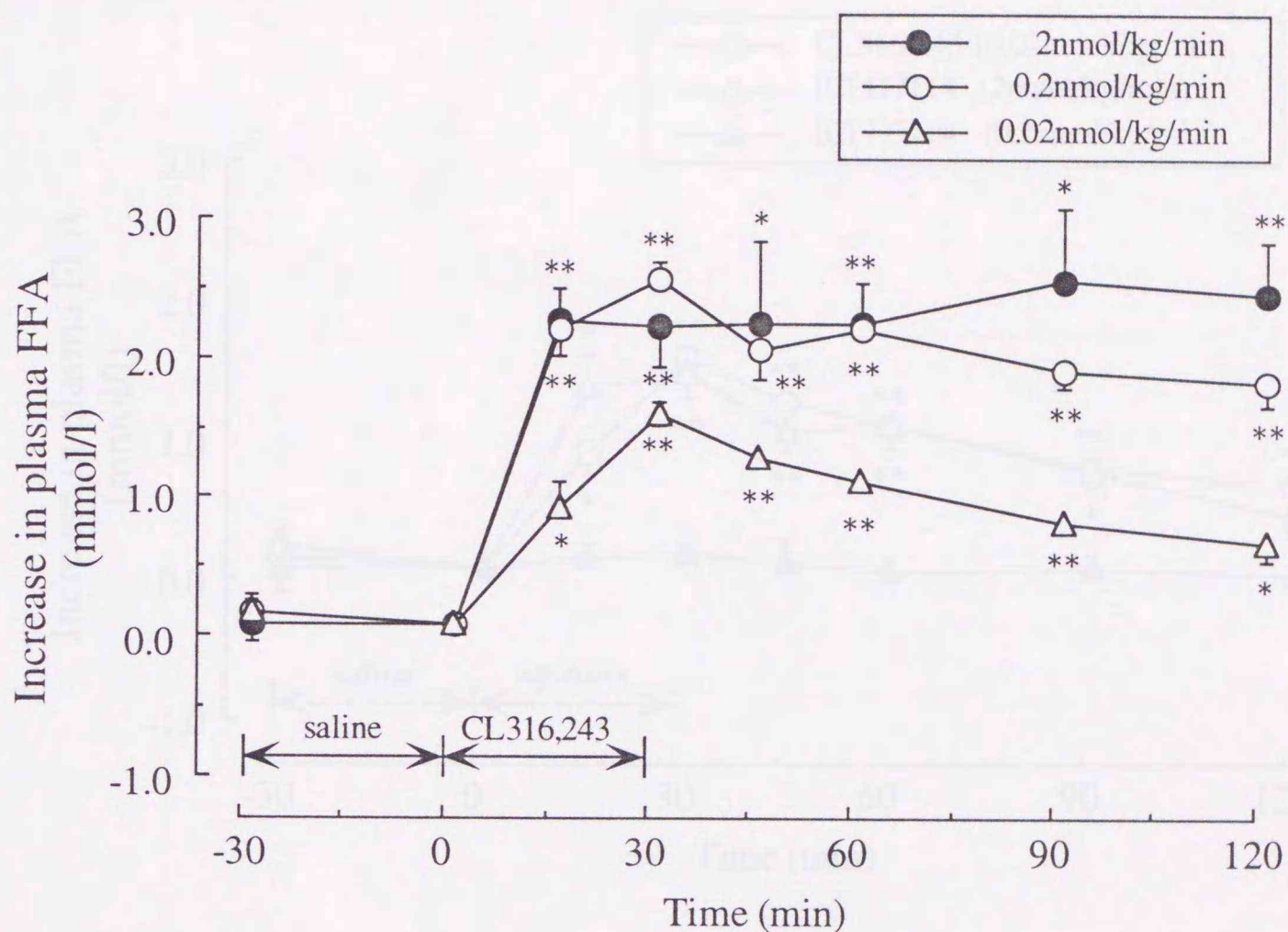


図 1-3. 各種濃度 (0.02-2nmol/kg/min) のCL316,243を静脈内投与した時の脂肪動員効果

CL316,243を各種濃度 (0.02-2nmol/kg/min) で静脈内投与した時の脂肪動員効果を, 0分からの血中FFAの増加量を指標にして調べた。-30分から0分は対照として生理食塩水を投与し, 0分から30分にCL316,243を投与した。値は4頭の平均値±標準誤差で示した。*および**はそれぞれ各群の0分値との有意差, $p<0.05$, $p<0.01$ を示す。

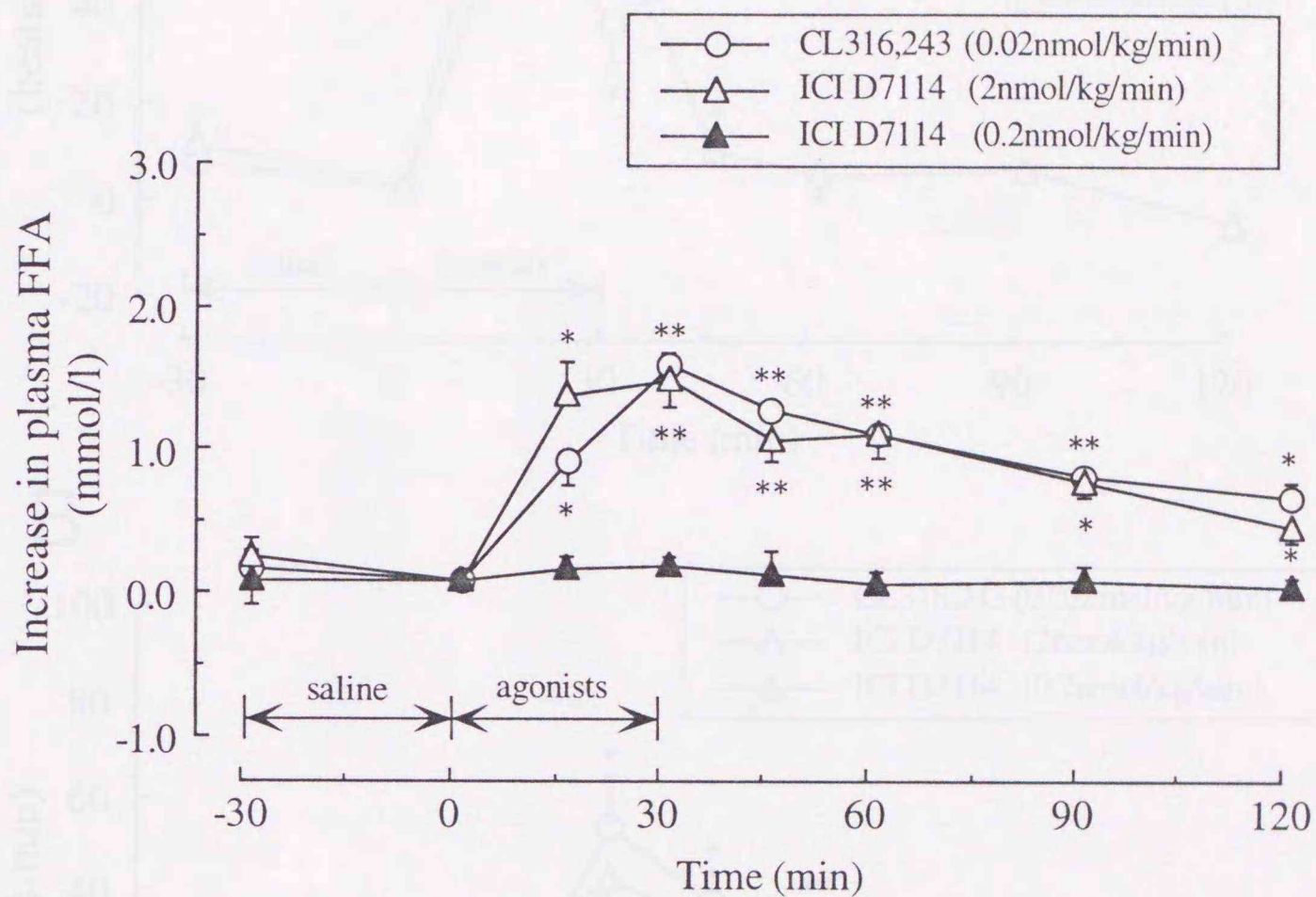


図 1-4. ICI D7114を0.2-2nmol/kg/minで静脈内投与した時の脂肪動員効果

ICI D7114を0.2-2nmol/kg/minで静脈内投与した時の脂肪動員作用を、0分からの血中FFAの増加量を指標にして調べた。比較のためCL316,243 (0.02 nmol/kg/min) で投与した時の値を記載した。-30分から0分は対照として生理食塩水を投与し、0分から30分にICI D7114を投与した。値は4頭の平均値±標準誤差で示した。*および**はそれぞれ各群の0分値との有意差、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ を示す。

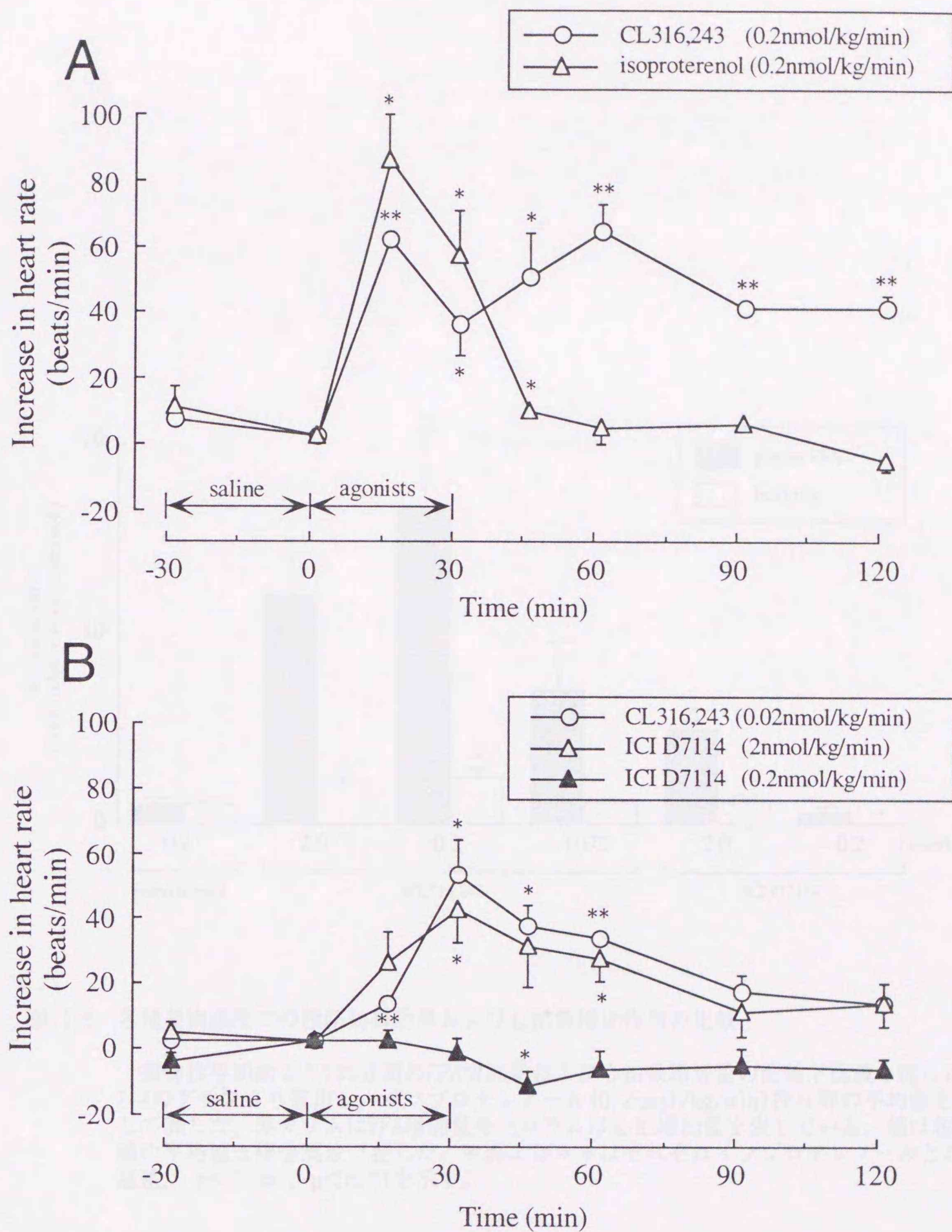


図 1-5. β 作動薬を静脈内投与した時の心拍数増加作用

β 作動薬を静脈内投与した時の心拍増加作用を 0 分からの心拍数の増加量を指標にして調べた。(A) : 等量 (0.2nmol/kg/min) のイソプロテレノール, CL316,243 を投与した時の変化。(B) : CL316,243 と ICI D7114 の効果の比較。-30 分から 0 分は対照として生理食塩水を, 0 分から 30 分に β 作動薬を投与した。値は 4 頭の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。* および ** はそれぞれ各群の 0 分値との有意差, $p < 0.05$, $p < 0.01$ を示す。

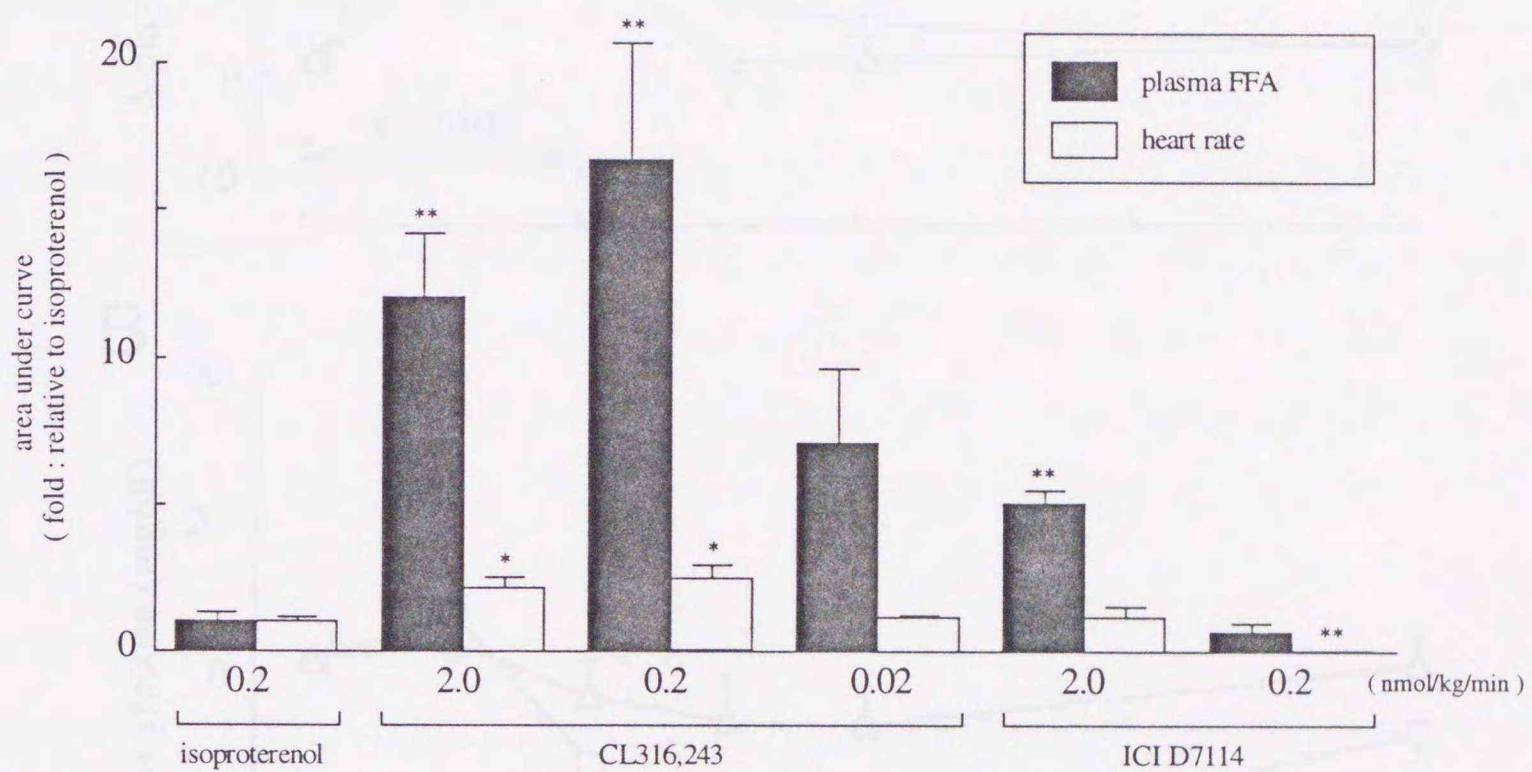


図 1-6. 各種薬物濃度での脂肪動員効果および心拍数増加作用の比較

薬物投与開始より120分間のFFA増加量および心拍数増加量の曲線下面積を図1-1～1-4のグラフより算出し、イソプロテレノール(0.2nmol/kg/min)投与群の平均値を1として表した。黒カラムはFFA増加量を白カラムは心拍増加量を表している。値は各群4頭の平均値±標準誤差で表した。*および**はそれぞれイソプロテレノールとの有意差， $p<0.05$ ， $p<0.01$ を示す。

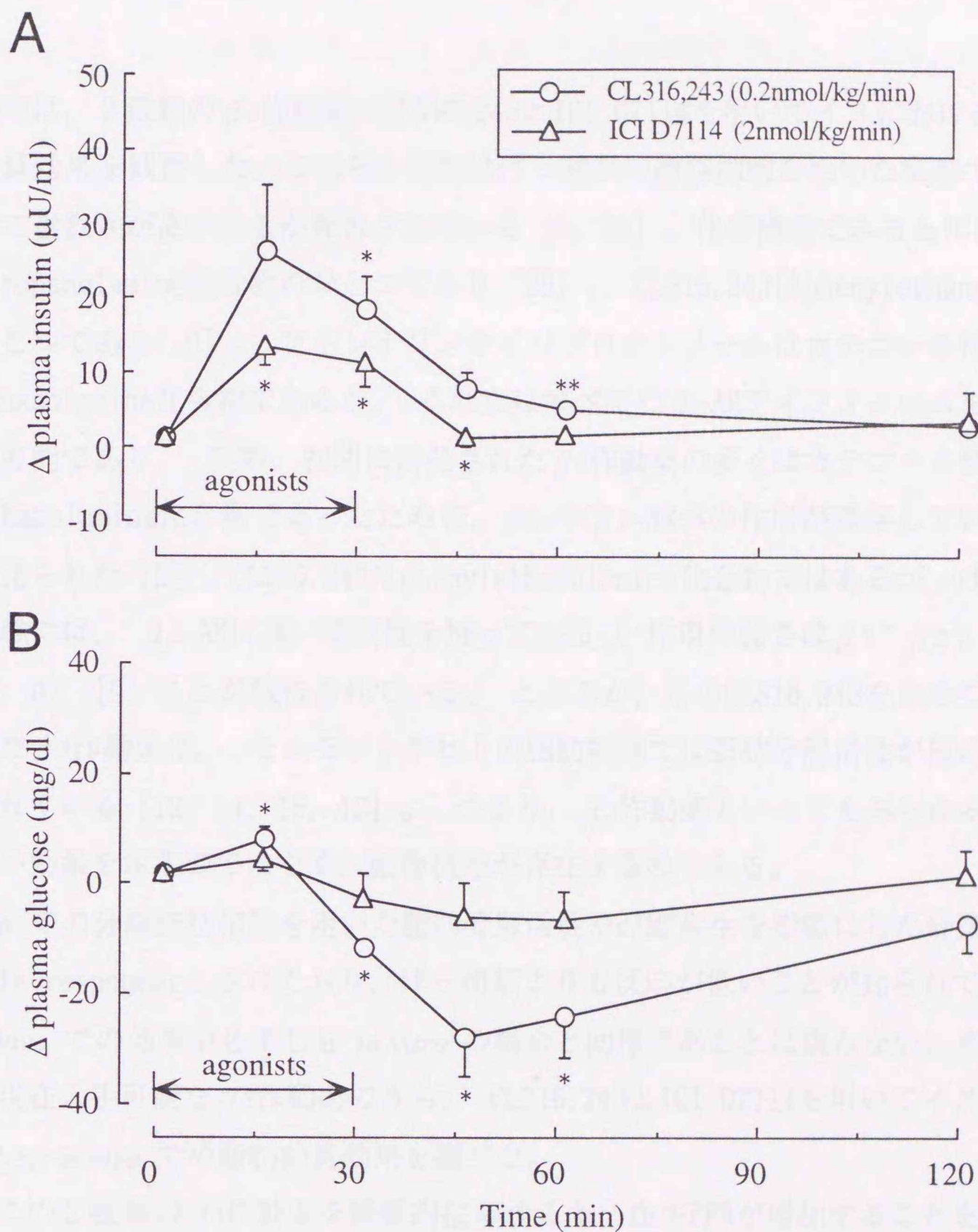


図 1-7. β 3作動薬 (CL316,243, ICI D7114) を静脈内投与した時の血中インスリン (A) および血中グルコース (B) の変化

CL316,243 (0.2nmol/kg/min) あるいはICI D7114 (2nmol/kg/min) を静脈内投与し、血中インスリン (A) と血中グルコース (B) 濃度を測定して、0分値からの変化量として表した。0分から30分に β 3作動薬を投与した。値は4頭の平均値±標準誤差で示した。*および**はそれぞれ各群の0分値との有意差、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ を示す。

【 考 察 】

本実験では、2種類の β_3 作動薬、CL316,243とICI D7114を用いてイヌにおける *in vivo* の脂肪動員効果を観察した。これらの薬物はげっ歯類の脂肪細胞を用いた実験では、 β_3 -ARに対して選択性が高いことが報告されている [9, 28]。化学構造でみるとICI D7114は, aryloxypropanolamine化合物のひとつであり [28], CL316,243はphenylethanolamine化合物のひとつである [9]。アドレナリンやイソプロテレノールはカテコール核を有するphenylethanolamine化合物であるが、これらはすべての β -ARアイソフォームを活性化することが可能であり、実際、初期に開発された β_3 作動薬の多くはカテコール核を持ったphenylethanolamine化合物であったために、 β_1 -や β_2 -ARへの作用が残存しているものもいくつか見られた [2]。CL316,243はphenylethanolamine化合物ではあるが、げっ歯類を用いた実験では、 β_3 -ARに高い選択性を持っている（作用の強さは $\beta_3 : \beta_2 : \beta_1 = 100, 000 : 1 : 0$ ） [9] ことが報告されている。ところが、このCL316,243を含めて今までに開発された β_3 作動薬は、モルモットやヒトの脂肪細胞では脂肪分解活性が極めて低いことが知られている [12, 14, 15, 42]。つまり、 β_3 作動薬といってもあらゆる動物種において高い効果を示すのではなく、動物種差が存在するのである。

in vitro での分離脂肪細胞を用いた脂肪分解活性やcAMP産生を指標にした分類では、イヌはmiddle responderとされており、げっ歯類よりも反応が低いことが知られている。しかし、*in vivo* での効果が必ずしも *in vitro* の場合と同様であるとは限らない。そこで本実験では、現在入手可能な β_3 作動薬のうち、CL316,243とICI D7114を用いてイヌに静脈内投与を行い、*in vivo* での脂肪動員効果を調べた。

まず、この2種類の β_3 作動薬を静脈内投与すると、血中FFAが増加することを確認した。特にCL316,243では、非選択的な β 作動薬であるイソプロテレノールと同程度の血中FFA濃度の上昇がみられた。イソプロテレノールはすべての β -ARを活性化することから、静脈内投与により生じた脂肪動員効果は、従来の報告どおりに β -ARを介する反応であると考えられる。

血中FFAレベルの変化はカテコールアミンの作用だけでなく、インスリンによっても影響を受けることがよく知られている。即ち、インスリンレベルが低下すると、脂肪組織からの二次的な脂肪動員が起こり、血中FFAの増加が起こる。しかし、 β_3 作動薬の投与では、まず投与直後からインスリンとFFAの両者共に速やかに増加し、血中グルコースはこのイ

ンスリンの増加に引き続いて低下した。従って、 β_3 作動薬による脂肪動員作用は、インスリンを介する二次的な作用ではなくて、脂肪細胞の β_3 -ARへ直接作用した結果と考えられる。なおここで、 β_3 作動薬によるインスリン分泌作用は、膵島への直接作用なのかあるいは間接作用なのかという疑問が生じる。膵灌流系では β_3 作動薬によりインスリン分泌が促進され [68]， β_3 -ARの欠損マウスでは β_3 作動薬の投与によってもインスリン分泌がおこらなかったとの報告 [63] はあるが、マウスやヒトでの β_3 -AR mRNA の組織分布を調べた報告では、膵臓には β_3 -ARの存在は確認されていない [5, 37] ので、今後の検討課題である。いずれにせよ、このようなインスリン分泌作用は、 β_3 作動薬が単に肥満の治療のみならず肥満をとまなう糖尿病の治療にも利用できる可能性を示しており、大変興味深い。

今回用いた2つの β_3 作動薬は、どちらも *in vivo* での脂肪動員作用を持っていることを確認したが、その有効濃度は異なっており、本実験ではCL316,243がICI D7114よりも低い濃度で有効であった。同様な結果は、イヌの分離脂肪細胞を用いた実験でも報告されており、CL316,243 (phenylethanolamine化合物) = BRL37344 (phenylethanolamine化合物) > CGP 12177 (aryloxypropanolamine化合物)とされている [12, 22]。これらの結果より、少なくともイヌにおいては、aryloxypropanolamine化合物よりもphenylethanolamine化合物のほうが、より効果的な β_3 作動薬であると考えられる。

β_3 作動薬は、 β_3 -ARに対する選択性が高く β_1 -や β_2 -ARへはごく弱い作用しか持たないことは言うまでもない。実際、今回用いたCL316,243をラットに静脈内投与しても、血中FFA濃度は速やかに上昇するのに対して、心拍数は全く変化しないことを予備実験で確認している。しかし、イヌに投与すると脂肪動員効果と同時に心拍数も増加した。非選択的な β 作動薬であるイソプロテレノールの投与でも同様に強い応答がみられたが、これは心臓の β_1 -ARを介しているものと考えられる。それでは、CL316,243に対する応答も同様であろうか。いくつかの可能性が考えられる。まず、今回用いた β_3 作動薬は、イヌではげっ歯類ほど選択性が高くなく β_1 -ARにも作用するという考えである。しかし、今のところイヌの β_1 -ARの薬理的性質、特に β_3 作動薬の作用についての知見はほとんどない。別の可能性として、イヌの心臓には β_3 -ARが存在するという考えである。しかし、第3章で述べるように、たとえ存在していたとしても、その発現量は脂肪組織に比べてはるかに少ないと思われるので、このような *in vivo* での大きな応答を全て説明するのは難しいと思われる。

イヌでは、 β_3 作動薬の投与により末梢血管拡張作用を示すことが報告されており、薬

理学的には末梢血管にも β_3 -ARが存在しているのではないかと推察されている [6, 61]。従って、今回みられた心拍数の増加作用は、末梢性の血管拡張による血圧低下にともなう反射性の反応 [6] である可能性が高い。しかし、実際に β_3 -ARがイヌの末梢血管に存在するののかも不明である。いずれにせよ、今回用いた β_3 作動薬の *in vivo* での効果は、げっ歯類とはかなり異なり、特に循環器系への作用があることが明らかとなった。この点は、今後 β_3 作動薬を肥満治療に応用していく際の副作用となる危惧を示唆しており、注意深い検討が必要である。

循環器への影響がみられたにせよ、やはり β_3 作動薬による脂肪動員作用が非選択的な β 作動薬よりも強力であることは見逃せない。脂肪動員効果と心拍数増加効果を比較した場合には、明らかに β_3 作動薬では脂肪動員効果が大きいことがわかる。特に、CL316,243の0.2nmol/kg/minでは心拍増加効果もイソプロテレノールの2.4倍あるが、脂肪動員効果では16.7倍と最も強いことがわかった。

これらの結果をふまえて、第2章では最も脂肪動員効果の高かったCL316,243を実際にイヌに長期投与し、その抗肥満効果と副作用に注目して検討した。

【 小 括 】

イヌにおける β_3 作動薬の脂肪動員効果を *in vivo* で検討するために、ビーグル犬に選択的な β_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。 β_3 作動薬を静脈内投与すると、血中FFA濃度は急速に上昇し、その効果は数時間にわたり持続した。また、等用量を用いた場合には、CL316,243の方がICI D7114よりも、はるかに作用が強く、少なくとも2桁は低用量で同程度の脂肪動員効果を示した。 β_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 β_3 -ARに対する直接作用であると考えられた。 β_3 作動薬の投与によって心拍数も増加したが、脂肪動員効果と比較するとその作用は弱く、 β_3 -ARに対する選択性がイヌでも存在することが明らかとなった。このように、 β_3 作動薬はイヌにおいても *in vivo* で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、今回用いた β_3 作動薬はげっ歯類の場合と異なり、循環器系への作用も有することが併せて判明した。

第2章 $\beta 3$ 作動薬の長期投与による体脂肪減少効果

【序文】

第1章では、 $\beta 3$ 作動薬であるCL316,243をイヌに投与することにより、*in vivo*での脂肪動員効果がみられることを述べた。しかし、脂肪組織から脂肪動員を起こしただけでは、必ずしも体脂肪は減少しないはずである。なぜなら、血中に放出されたFFAはエネルギーとして消費されない限りは再び脂肪細胞に取り込まれ、中性脂肪に再合成されるか、あるいは肝臓に取り込まれることになるからである。つまり、脂肪の再分布が起こるだけで抗肥満効果には結びつかない。従って、この脂肪組織より放出されたFFAを消費するメカニズムが抗肥満効果の鍵となる。

筋肉はFFA消費の最大組織であるが、ここでのFFA分解は基本的には運動に必要なATP産生である。従って、随意的に運動量を増加させない限りFFAは消費されない。別のFFA消費のメカニズムが、BATでの熱産生である。この熱産生は交感神経によって支配されており、神経終末から放出されるノルアドレナリンの刺激により脂肪分解が起こり、遊離したFFAを基質として、褐色脂肪細胞のミトコンドリアに存在するUCPにおいて熱産生が起こる。褐色脂肪細胞でも白色脂肪細胞と同様に、 β -ARが主であるので、 β 作動薬は、脂肪分解と熱産生を同時に亢進させることになる。特に、 $\beta 3$ -ARは脂肪細胞に特異的に分布するので[24, 52, 54]、 $\beta 3$ -ARの選択的な作動薬は $\beta 1$ -ARを介する循環器系への作用や $\beta 2$ -ARを介する呼吸器系への作用などの重大な副作用なしに、体脂肪の減少のみを起こすことが期待されている。実際にいくつかの $\beta 3$ 作動薬を、げっ歯類に長期投与すると、UCP発現の増加、BATの増生、熱産生の亢進が起こり、効果的に体脂肪のみを減少させることが報告されている[2, 27]。

しかし $\beta 3$ 作動薬をイヌの肥満治療に応用するには、検討すべきいくつかの問題がある。その一つは、成長したイヌにおけるBATの役割についてである。ラットやマウスでは成獣でもBATが一定量存在しているが、ヒトやイヌのような大型の動物では、出生時にはBATが認められるが、加齢にともない漸減し、成長後には肉眼ではほとんど確認できないという事実である。もう一つの問題は、副作用である。第1章で述べたように、イヌでは $\beta 3$ 作動薬の投与により、心拍数が増加することが明らかとなった。治療の効果を上げるために

長期にわたって投与した場合には、循環器を含め全身諸臓器に機能的ならびに器質的变化が生じる危険性がある。

これらの問題を考慮しつつ、急性投与で脂肪動員効果が高かったCL316,243をビーグル犬に長期的に投与し、体格の変化を経日的に追跡するとともに、脂肪組織中の白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の変化、特に熱産生分子である、脱共役タンパク質（UCP）の発現についてタンパク質とmRNAの両面から調べた。また、投薬期間中の血液検査ならびに実験終了後の病理解剖により、副作用の有無について検索した。

【 材料および方法 】

1. 供試動物

4歳齢以上の8頭のビーグル成犬（雄1頭と雌7頭）を使用した。イヌは、市販の固形飼料を1日1回定時（午前8～9時）に与え、水道水を自由に摂取させ飼育した。

薬物投与実験の開始1週間前より、給与飼料を約2100kcal/dayとし、毎給餌時に残量を測定し、摂食量を計算した。

なお動物実験は、『北海道大学における動物実験に関する指針』に基づいて行った。

2. 薬物

CL316,243, disodium(R,R)-5[2-{3-chlorophenyl}-2-hydroxyethyl]-aminopropyl)-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylateは、賦形剤のラクトース（ナカライテスク、京都）と混合し、ゼラチンカプセル No. 4（小林カプセル、兵庫）に充填し使用した。また、プラシーボには、ラクトースのみをゼラチンカプセルに充填したものを使用した。

3. 長期投与実験

ビーグル成犬8頭（10.0～14.0kg）を無作為に4頭ずつA, Bの2群に分けた。最初の5週間（第I相：0-5週）は、A群にはCL316,243（0.1mg/kg/day）のカプセル剤を、B群にはプラシーボとしてラクトースのみを入れたカプセル剤を1日1回、給餌時（午前8～9時）に経口投与した。次の7週間（第II相：6-12週）は、それぞれの群に対する処置を交替し、A群にはプラシーボを、B群にはCL316,243（0.1mg/kg/day）を経口投与した。投与期間中

は3～4日毎に体重と胸囲（前肢の直後の胸囲）および胴囲（後肢の直前の胴囲）を測定し、7日毎に頸静脈より採血を行った。

全ての投与実験終了後に、イヌを過剰量のペントバルビタールナトリウム（ネンブタール；ダイナボット，大阪）の投与により安楽死させ、脂肪組織および各種臓器の採材を行った。免疫組織化学に供する組織片は10%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液－生理食塩水（phosphate buffer saline：PBS）で固定した。UCP タンパク質およびmRNAの検出に供する組織は、採材後ただちに液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

4. ウエスタンブロット法によるUCPタンパク質の検出

採材した脂肪組織に10倍量の氷冷したホモジネート緩衝液（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH7.4]）を加え、ポリトロン（KINEMATICA, Switzerland）にてホモジナイズした。1,500rpm, 5分間の遠心分離により得られた、脂肪層を含まない中間層を分析用の試料とした。試料中のタンパク質濃度はLowry法 [45] に従い、ウシ血清アルブミン（BSA fraction V; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA）を標準として測定した。ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmliの方法 [39] に準じて、12.5%アクリルアミドゲルを用いて行った。電気泳動終了後、セミドライブロッターを用いてポリビニリデンジフルオリド膜（Immobilon; MILLIPORE, 東京）にタンパク質を電氣的に転写した。この膜を5%スキムミルク（森永乳業，東京），0.5% tween 20を含むTBS溶液（20mM Tris-HCl [pH7.4], 150mM NaCl）でブロッキングを行った後、ラットUCPに対するウサギ抗血清（京都大学大学院農学研究科，河田照雄博士より分与）と37℃で2時間反応させた。次に、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（ZYMED, San Francisco, CA, USA）と反応させ、ECLウエスタンブロッティング検出試薬（Amersham, Buckinghamshire, UK）によりシグナルをX線フィルム（X-OMAT; Kodak, Rochester, NY, USA）に感光させて検出した。

5. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるUCP mRNAの検出

既に報告されているラットUCP cDNAの塩基配列 [11] をもとに、PCRのプライマー（上流側：5'-GTGAAGGTCAGAATGCAAGC-3'，下流側：5'-AGGGCCCCCTTCATGAGGTC-3'）を設計した。

1) 組織からのtotal RNAの抽出

組織からのtotal RNAの抽出はChomczynskiの方法 [17] に準じて以下のように行った。

まず、凍結したままの組織に組織重量の10倍量のTRIzol試薬 (Gibco BRL, 東京) を加え、ポリトロンでホモジナイズした。4℃, 3,000rpmで5分間の遠心分離を行い、脂肪層と沈殿物を含まない中間層を回収した。室温に5分間静置した後、TRIzol試薬 1ml あたり 300 μ l のクロロホルム-イソアミルアルコール (混合比24:1) を加え、混和した。2分間室温に放置した後、4℃, 12,000rpmで15分間の遠心分離を行い、水層を回収した。この水溶液にイソプロパノールをTRIzol試薬 1ml あたり 600 μ l 加えて混和し、10分間室温に静置してから、4℃, 12,000rpmで20分間の遠心分離を行った。得られた沈殿を70%エタノールで洗浄した後、エタノールを除き沈殿を乾燥させた。この沈殿をdiethylpyrocarbonateで処理した蒸留水に溶解した。RNA濃度は260nmの吸光度により測定した。

2) 相補的DNA (complementary DNA : cDNA) の合成

1 μ gのtotal RNAを用いてcDNA合成を行った。まず、RNA溶液を70℃で10分間の加熱処理を行い、その後ただちに氷冷した。逆転写のプライマーとして100pmolのoligo(dT)₁₅および0.5mM dNTP, 10units リボヌクレアーゼ阻害剤 (和光純薬, 東京), 200units MMLV逆転写酵素 (Gibco BRL) を含む最終容量20 μ l の緩衝液 (75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 50mM Tris-HCl [pH7.5]) 中で37℃, 1時間の逆転写反応を行った。

3) polymerase chain reaction (PCR)

PCRは2.5units Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, USA), 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTPと0.5 μ M プライマーを含む最終容量50 μ l のPCR緩衝液 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3]) 中で、94℃で30秒間の熱変性、60℃で30秒間のプライマーのアニーリング、72℃で1分間の伸長反応を30回行った。得られたPCR産物はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動し確認した。さらにこのPCR産物を精製し、Taq DNA polymeraseを用いた反応系 (Dye terminator cycle sequencing kit: Perkin-Elmer Applied Biosystems) により蛍光式自動シーケンサー (Model 373A: Perkin-Elmer Applied Biosystems) で塩基配列を解析し、UCPであることを確認した。

6. 免疫組織化学的手法によるUCPタンパク質の検出

10%パラホルムアルデヒドで固定した組織片をエタノールで脱水、パラフィンに包埋し、4 μ mの厚さに薄切した。脱パラフィン処理を行った切片を、0.5%過ヨウ素酸で10分間インキュベートし、内在性のペルオキシダーゼを失活させた。免疫染色にはヒストファイン (ニチレイ, 東京) を使用した。まず、10%正常ヤギ血清 (キットに付属のもの) を切片にのせ、ブロッキングを行った。次に、抗ラットUCPウサギ抗血清を加え30分、室温で反

応させた。PBSで洗浄した後、ヤギ抗ウサギIgG（キットに付属のもの）を30分、室温で反応させた。再びPBSで洗浄してから、ABC溶液で反応させ、ジアミノベンチジンを含む発色溶液で検出した。切片はヘマトキシリンで対比染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

7. 血液生化学的検査

血液サンプルは頸静脈より採血し、ヘパリン処理をした試験管に採取した。遠心後、得られた血漿は-20℃で保存した。血漿中の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), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cre), 血糖, 総コレステロール (T-CHO), トリグリセリド (TG) は, 自動分析器 (スポットケム; 京都第一化学, 京都) で定量した。

8. 統計処理

全ての値は平均値±標準誤差で示した。体重, 胸囲および胴囲の変化については各実験群内で, 薬物投与前と5週後, 12週後の値についてpaired *t*-testを用いて有意差検定を行った。また, 2群間の摂食量については, Student's *t*-testを用いて有意差検定を行った。

【 結 果 】

1. CL316,243の長期投与による体重, 胸囲および胴囲の変化

第1章で, CL316,243の脂肪動員効果は, 0.2nmol/kg/minで最大であったので, これを参考にビーグル成犬に毎日1回, 朝の給餌時に0.1mg/kg (215nmol/kg/24hours, 0.15nmol/kg/min) のCL316,243を長期間経口投与することとした. 投与開始前の初期体重, 胸囲および胴囲は, A群が 13.0 ± 0.9 kgと 53.0 ± 1.1 cm, 45.9 ± 1.5 cmであり, B群が 12.1 ± 0.8 kgと 52.6 ± 0.6 cm, 45.3 ± 0.5 cmであった. 最初の投薬期間 (第I相: 0-5週) では, A群にCL316,243を, B群にはプラシーボをそれぞれ経口投与した. 図2-1に見られるように, プラシーボを投与したB群では体重と胸囲, 胴囲はともに増加傾向を示すが, CL316,243を投与したA群では体重と胸囲, 胴囲は増加が抑制された. この第I相終了時点での, A群 (CL316,243投与群) とB群 (プラシーボ投与群) の体重, 胸囲, 胴囲の増加量を比較すると, 体重で 0.3 ± 0.4 kgと 1.5 ± 0.4 kg, 胸囲で 0.4 ± 0.6 cmと 1.5 ± 0.9 cm, 胴囲で -1.5 ± 1.1 cmと 3.1 ± 0.8 cmであった (図2-2). 体重, 胸囲ともにCL316,243の投与により増加が抑制される傾向を示したが, 有意な差ではなかった (それぞれ, $p=0.058$, $p=0.32$). しかし, 胴囲はCL316,243の投与により有意に増加が抑制された ($p<0.05$).

また第I相での摂食量を測定したところ, A群の一日の平均摂取カロリー量 (91.2 ± 12.6 kcal/kg/day) は, B群 (99.2 ± 7.9 kcal/kg/day) よりもやや低かったが, 有意な差ではなかった ($p=0.61$). しかし, この摂取カロリー量はどちらも成犬の維持エネルギー量 (約75kcal/kg/day) よりも約22-24%過剰であった.

次の7週間 (第II相: 6-12週) では, 両群に対する処置を交替し, A群にプラシーボを, B群にはCL316,243を投与した. 第I相と同様に, プラシーボ投与のA群は体重と胸囲, 胴囲が増加し, 逆にCL316,243を投与したB群では減少した.

第II相終了時点での増加量を, CL316,243投与群とプラシーボ投与群でそれぞれ比較すると, 体重は 0.8 ± 0.3 kgと 2.1 ± 0.6 kg, 胸囲は -1.7 ± 0.7 cmと 3.9 ± 0.9 cm, 胴囲は 1.1 ± 0.5 cmと 5.4 ± 1.4 cmであった (図2-2). 第II相では, CL316,243の投与により, 体重, 胸囲, 胴囲のいずれもが有意に減少した (それぞれ, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.05$).

以上の結果より, CL316,243 (0.1mg/kg) を毎日, 経口投与することで, 成犬での体重および胸囲, 胴囲の増加が抑制されることが明らかとなった.

2. 血液生化学的パラメーターへの影響

CL316,243の長期投与が、全身機能に与える影響について、血液生化学的パラメーターを指標にして調べた。表2-1に、実験開始時（0 week）と第I相終了時（week 5）、第II相終了時（week 12）での血液生化学成分の検査値をまとめた。各々、各時点で多少の変動はみられるが、正常範囲内であった。また、TGは投薬期間とともに増加傾向を示したが、やはり正常範囲内の値であった。いずれの値も、各時点において、CL316,243投与群とプラシーボ投与群で有意差は認められなかった。

3. 剖検所見と脂肪組織の病理学的変化

12週間の薬物投与終了時に、イヌに過剰の麻酔薬を投与して安楽死させ、種々の部位より脂肪組織を採材するとともに、病理解剖を行った。剖検時の全体的な所見としては、脂肪組織を除いては肉眼的な異常所見は特に見られず、心肥大も認められなかった。第II相にCL316,243を投与していたイヌ（B群）の脂肪組織は、プラシーボを投与していたA群のイヌに比べて量が少なく、全体にやや薄い褐色を呈していた（図2-3）。この脂肪組織を組織学的に観察すると、プラシーボ投与をしたイヌの脂肪細胞は単一の大きな単房性の脂肪滴を含む細胞であり、典型的な白色脂肪細胞像を呈していた。しかし、CL316,243投与のイヌの脂肪細胞は、褐色脂肪細胞によく似た、多房性の脂肪滴を持つ細胞が多数みられた（図2-4）。

この多房性の脂肪滴を持った細胞が本当に褐色脂肪細胞かどうかを調べるために、褐色脂肪細胞の特異的マーカーであるUCPの検出を試みた。組織切片を、抗UCP抗体で免疫染色を行ったところ、図2-5にみられるように、単房性の脂肪滴を有する細胞はすべて陰性であった。しかし、CL316,243の投与により出現した多房性の脂肪滴を持つ細胞は、UCP抗体で強く染色された。このように、CL316,243を投与したイヌの脂肪組織には、UCPを発現している多くの定型的な褐色脂肪細胞が認められた。

4. 脂肪組織でのUCP mRNAおよびUCPタンパク質の検出

脂肪組織でのUCPの発現をさらに確かめるために、異なる部位から採取した脂肪組織についてUCP mRNAをRT-PCR法で、UCPタンパク質をウエスタンブロット法で、それぞれ調べた。図2-6の上段は脂肪組織の粗ホモジネートを用いたウエスタンブロットの結果である。陽性対照のラットのBATでは、UCPが32kDaのバンドとして確認された。プラシーボ投与のイヌでは、ラットUCP抗体に反応する32kDaのバンドは腎周囲脂肪組織に見られたが、大網

や皮下（肩甲間）脂肪組織には見られなかった。しかしながら、CL316,243を投与したイヌでは腎周囲脂肪組織のみならず、大網や皮下脂肪組織にもUCPの発現が見られた。

RT-PCR法によるUCPmRNAの解析でも、UCPタンパク質の発現と基本的に同じ結果が見られた（図2-6下段）。すなわち、プラシーボ投与のイヌでは、UCP cDNAの塩基配列から予想されるサイズ（196bp）のバンドは腎周囲脂肪組織に存在するのみで、他の部位ではほとんど検出されなかった。一方、CL316,243を投与したイヌでは、明瞭なバンドが、全ての脂肪組織で認められた。この196bpのPCR産物を回収し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を確認したところ、ラットのUCP [11] の対応する部分と約80%の相同性があることが判明した（結果は図示せず）。



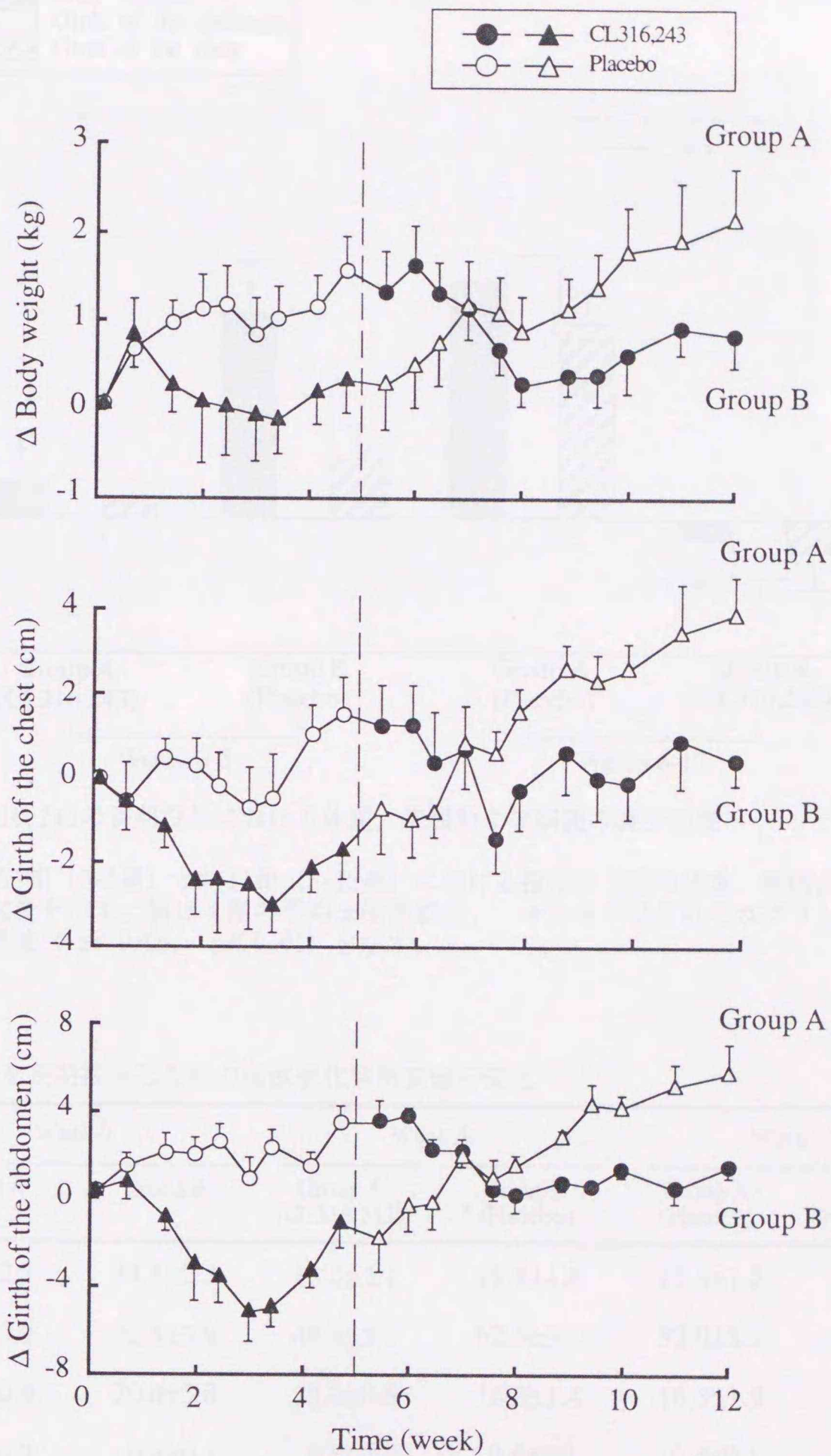


図 2-1. CL316,243 (0.1mg/kg/day) を長期投与した時の体重と胸囲, 胴囲の変化

CL316,243 (0.1mg/kg/day) を経口投与した時の, 体重および胸囲, 胴囲の変化を 0 週からの増加量で示した。A 群は三角印, B 群は丸印で表してあり, CL316,243 投与は黒塗り (▲, ●) で, プラシーボ投与は白抜き (△, ○) でそれぞれ示した。0-5 週は A 群に CL316,243 を B 群に プラシーボ を投与し, 6-12 週は A 群に プラシーボ を, B 群に CL316,243 を投与した。値は 4 頭の平均値 $\pm$ 標準誤差。

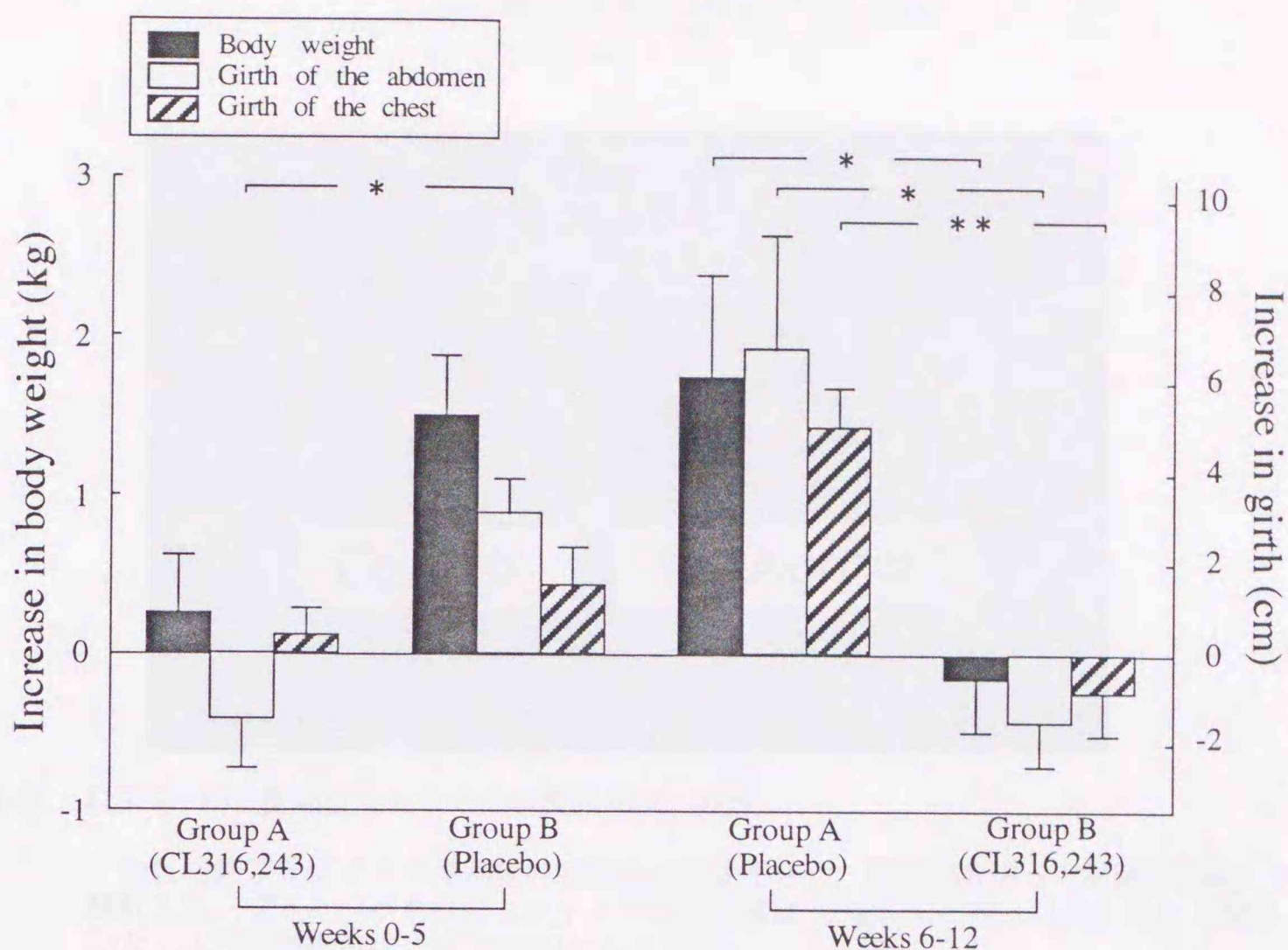


図 2-3. CL316,243の長期投与における体重、胸囲および胴囲の減少効果

第I相（0-5週）と第II相（6-12週）における投薬終了後の体重、胸囲および胴囲の増加量を示す。値は4頭の平均±標準誤差。*、**はそれぞれプラシーボ群との有意差（ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ）を示す。

表2-1. CL316,243を長期投与した時の血液生化学検査値の変化

	Week 0		Week 5		Week 12	
	Group A	Group B	Group A (CL316,243)	Group B (Placebo)	Group A (Placebo)	Group B (CL316,243)
AST (IU/l)	17.0±2.1	14.5±2.3	18.0±2.1	18.8±4.8	12.5±1.2	13.3±2.0
ALT (IU/l)	31.8±9.9	32.5±3.9	48.3±5.2	62.5±33.9	32.0±8.2	32.8±7.8
BUN (mg/dl)	18.8±0.9	20.0±3.8	18.0±0.6	16.3±1.4	16.3±1.9	16.0±1.4
Cre (mg/dl)	1.1±0.7	0.4±0.1	0.5±0.0	0.6±0.1	0.4±0.1	0.4±0.0
Glc (mg/dl)	109.3±2.1	108.0±3.8	119.0±3.4	118.0±4.4	120.5±4.7	119.3±3.0
T-Chol (mg/dl)	225.5±7.1	165.0±28.0	278.0±45.7	181.3±38.4	240.0±35.0	204.3±24.6
TG (mg/dl)	34.0±4.2	29.0±3.3	38.8±4.9	42.8±6.8	45.0±6.6	50.5±4.1

投与前、第I相終了時および第II相終了時の各時点での血液生化学検査値を示す。

値は各群4頭の平均値±標準誤差。

略語：ALT；アラニンアミノトランスフェラーゼ，AST；アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ，BUN；血中尿素窒素，Cre；クレアチニン，Glc；血糖，T-CHO；総コレステロール，TG；トリグリセリド

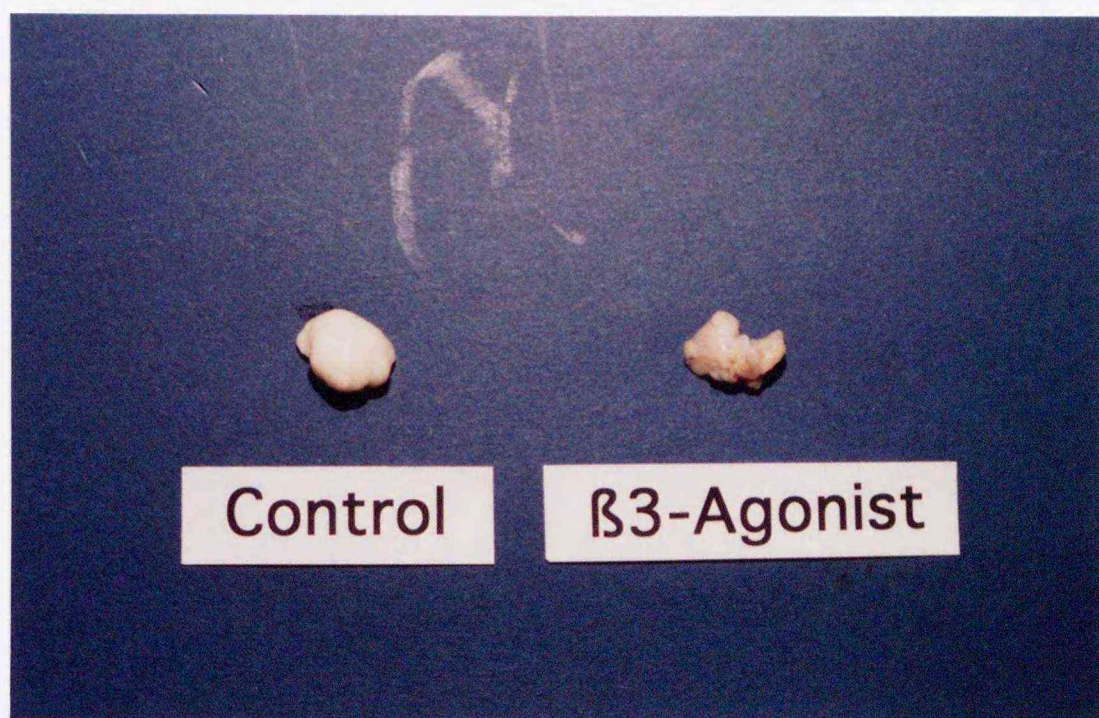


図 2-3. CL316,243を長期投与したイヌの腹腔内脂肪組織

第II相終了後にイヌを過剰量の麻酔薬で安楽死させ、腹腔内脂肪（大網脂肪組織）を採取した。プラシーボを投与したイヌの脂肪組織は「control」で、CL316,243 を投与したイヌの脂肪組織は「 $\beta 3$ -agonist」で示す。

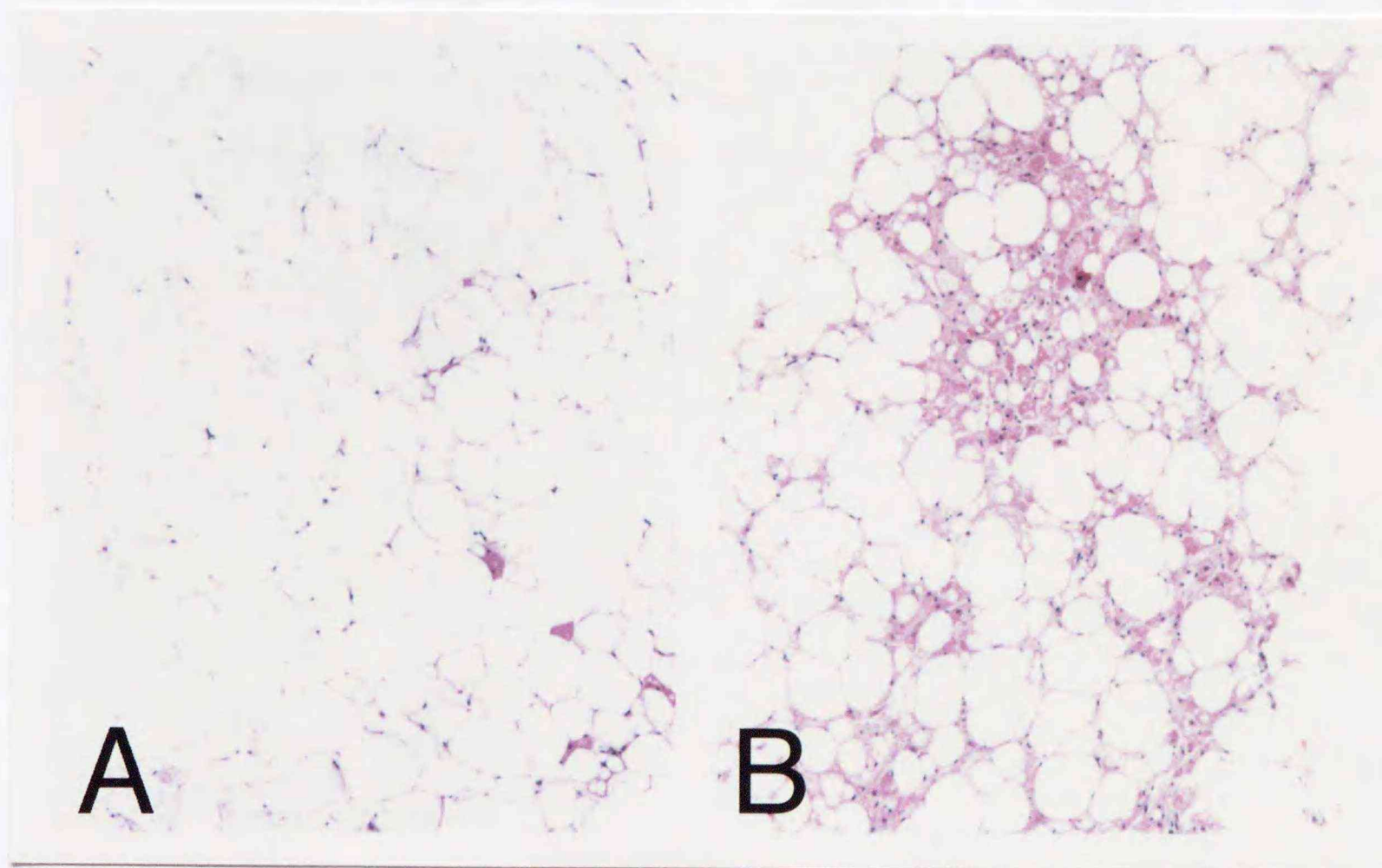


図 2-4. CL316,243を長期投与したイヌの腎周囲脂肪組織

腎周囲脂肪の光学顕微鏡組織像。Aはプラシーボを投与したイヌ，BはCL316,243（0.1 mg/kg）を7週間投与したイヌの脂肪組織である。ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色，x 100。

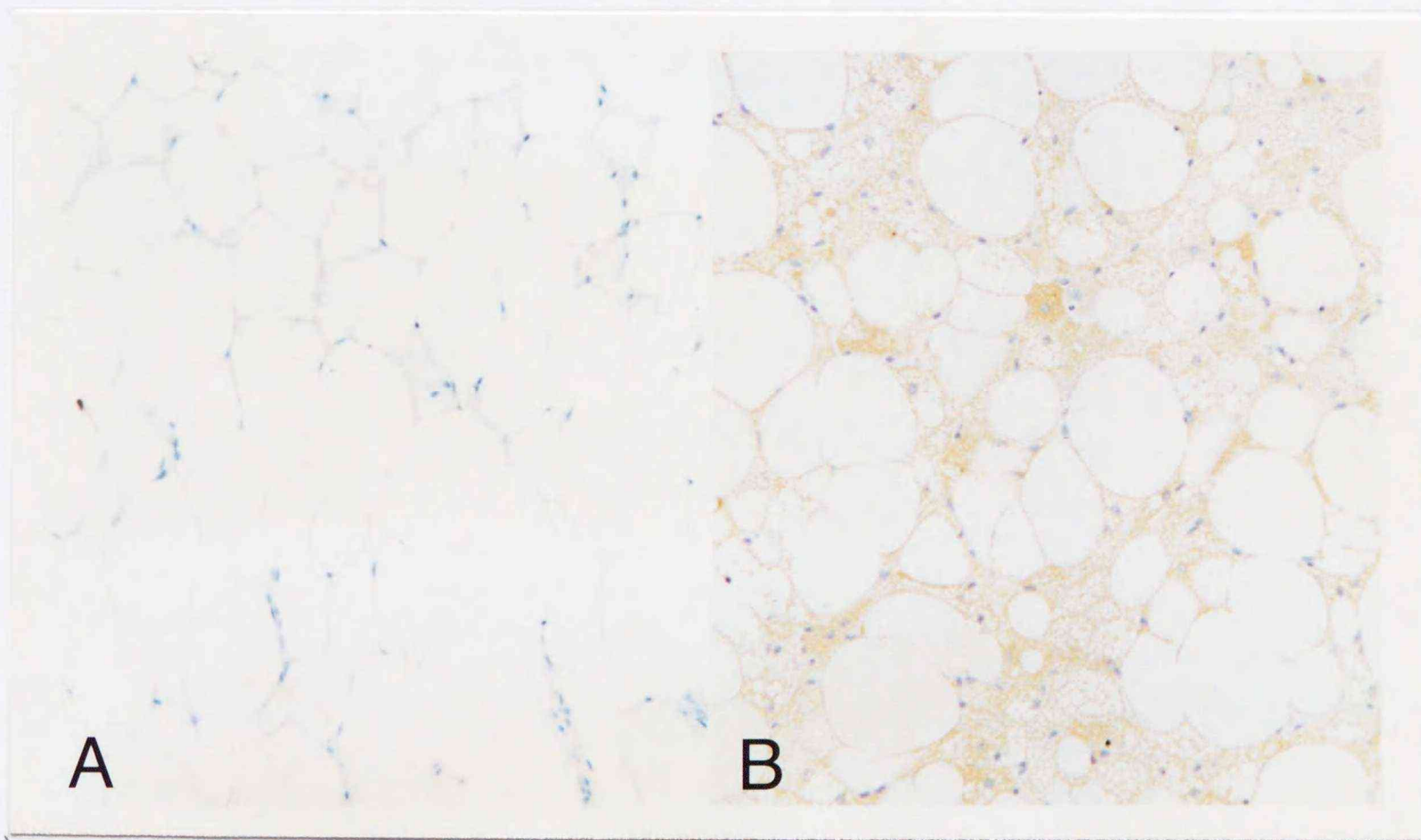


図 2-5. CL316, 243の長期投与によるWATでのUCP発現

抗ラットUCP抗血清により，WATで免疫染色を行った。Aはプラシーボを投与したイヌ，BはCL316, 243を投与したイヌからそれぞれ採取した腎周囲脂肪組織である。対比染色；ヘマトキシリン染色，x 200。

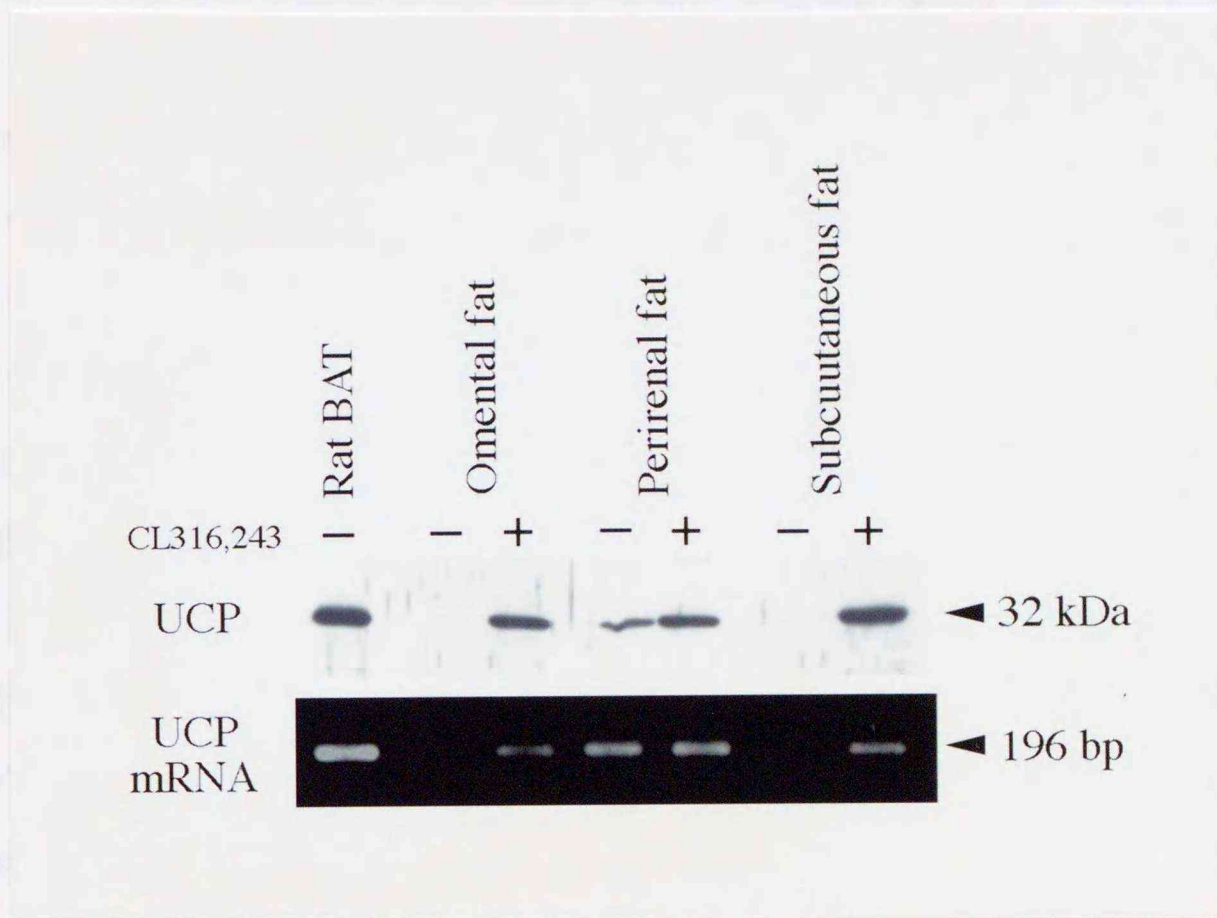


図 2-6. ウエスタンブロット法およびRT-PCR法によるイヌ脂肪組織でのUCPの検出

上段：CL316,243 (+) あるいはプラシーボ (-) を投与したイヌ脂肪組織の粗ホモジネート（タンパク量で1レーン当たり20 μ g）を用いて、抗ラットUCP抗体によるウエスタンブロットを行った。下段：CL316,243 (+) あるいはプラシーボ (-) を投与したイヌ脂肪組織から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCRを行った。
ウエスタンブロット，RT-PCRともに，ラットの肩甲間BATを陽性対照として使用した。

【 考 察 】

イヌに対する β_3 作動薬の長期投与効果を調べるために、CL316,243を0.1mg/kgの用量で1日1回、給餌時に経口投与した。この用量は、第1章で明らかになった脂肪動員効果と循環器系への作用とを勘案して決定したものである。また、第1章でインスリン分泌作用も見出されたので、低血糖に陥る危険性を回避するために、薬物投与は給餌と同時に行った。このような投与を数週間続けると、プラシーボ投与に比べて、体重および胸囲、胴囲が減少する傾向が認められた。体重などの体格の変化のみでは、抗肥満効果の有無を即断できないことは言うまでもない。特に今回は、体格の差がCL316,243投与群とプラシーボ投与群で常に有意となった訳ではない。しかし、肥満の定義が『体脂肪の過剰蓄積』であるように、体重よりもむしろ体脂肪の増減が効果判定の重要な指標である。イヌで体脂肪を経日的に判定する適当な方法が無いために、今回は剖検時の所見しか得られなかったが、CL316,243を投与したイヌでは脂肪組織が明らかに小さくて、組織学的にも脂肪細胞内の中性脂肪の減少が認められた。これらの結果を総合すると、CL316,243の長期投与は体脂肪を減少させ、肥満を軽減する効果があったと結論できよう。Champignyら [16] は同様の結果を別の β_3 作動薬であるICI D7114で報告しているが、彼らはより多くの用量 (0.1-10.0mg/kg) を1日2回投与していた。第1章で述べたように、静脈内投与でみられた脂肪動員作用は、CL316,243の方がICI D7114よりもはるかに強いので、長期投与の場合でも低用量で十分な効果がみられたものと思われる。

第1章で述べたように、静脈内投与を行った場合には脂肪動員作用以外に心拍増加作用も見られた。そのために、長期にわたり投与した場合には循環器系をはじめとする副作用が懸念された。しかし今回の投薬期間中の血液生化学的な検査および一般臨床所見からは特記すべき影響は見られなかった。さらに、剖検所見においても脂肪組織以外では特に異常は認められなかった。このように、CL316,243の長期投与により、重大な副作用なしに体脂肪が減少することが明らかになった。 β_3 作動薬の長期投与によって、体脂肪が選択的に減少することは、すでにげっ歯類で確立された事実であり、今回の結果もこれとよく一致している [2, 27]。

この β_3 作動薬による体重減少のメカニズムとしては、摂食量の減少、エネルギー消費の増加、あるいはその両者が考えられる。実際に、CL316,243を投与したイヌの平均摂食量は、有意ではないがプラシーボ投与群に比べて約8%減少していた。この摂食量の減少が体脂肪の減少効果にどの程度寄与しているのかは、現在のところ不明であるが、げっ歯

類では $\beta 3$ 作動薬投与によって摂食量がほとんど変化せずに体脂肪が減少することが知られている [70]。この場合には、 $\beta 3$ 作動薬によるWATからの脂肪動員とBATでの熱産生が寄与していることは以下の事実から疑いない。例えば人為的にBATを少なくしたり [44]、 $\beta 3$ -ARを欠損させたトランスジェニックマウスでは [63]、同じ摂食量の対照マウスよりも体脂肪量が増加しやすく、逆に、UCPを過剰発現させたマウスでは肥満が軽減する [35]。また、 $\beta 3$ 作動薬の刺激が長期的に続く場合には、BATの増生とUCPの発現増加による熱産生能力の増大が起こる。Nagaseら [53] は遺伝性の肥満・糖尿病モデルであるYellowKKマウスにCL316,243を長期間投与することで褐色脂肪が増生し、UCPの発現が増加し、肥満と高血糖が改善されることを報告している。今回、げっ歯類と同様にイヌにおいても $\beta 3$ 作動薬によるBATの活性化が起こることが明らかとなった。すなわち、プラシーボ処置のイヌでは腎周囲の脂肪組織にしか見られなかったUCPが、長期的にCL316,243を投与することで腎周囲のみならず大網や皮下（肩甲間）などの広範な脂肪組織に発現することが確認された。組織学的にもこれらの脂肪組織は、多くの多房性の脂肪滴を含み、褐色脂肪細胞のマーカーであるUCPを発現していた（図2-5）。これらの事実は、げっ歯類と異なり成長するに従ってBATがほとんど萎縮消失してしまうイヌにおいても、持続的に $\beta 3$ -ARを刺激すればUCP 遺伝子の発現が活性化されて、褐色脂肪細胞が出現し得ることを示している。このようなBAT増生が、動物まるごとの熱産生を亢進させ、エネルギー消費の増加による体脂肪の減少へと向かわせるのであろう。

最近になって、UCPの新しいファミリーとしてUCP-2 [20, 23] およびUCP-3 [10, 66] が発見された。UCPがBATにのみ存在するのに対して、UCP-2は肺や脾臓などの全身の広汎な組織に、またUCP-3は骨格筋に多く発現している。これらの、UCPファミリーの生理的な役割はまだ解明されていないが、やはりエネルギー出納調節に寄与している可能性が高い。肥満との関連や $\beta 3$ 作動薬への応答について興味を持たれるが、現在のところ、イヌでは全く報告がなく、今後の研究が期待される。

【 小 括 】

急性投与実験の結果に基づき、ビーグル犬に対するCL316,243の長期投与の効果を検討した。CL316,243 (0.1mg/kg) を5-7週間にわたり1日1回経口投与すると、プラシーボ投与群に比べて体重および胸囲、胴囲が減少した。この間の摂食量もやや低下したが、有意な差ではなかった。また、血液生化学的パラメーターや一般臨床所見においても、特記すべき変化は見られなかった。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。投薬群の脂肪組織は縮小しており、組織学的には細胞内の中性脂肪が減少し、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発すると結論した。従って、 β_3 作動薬は、特に重大な副作用をおこすことなく肥満の予防・治療に効果があることが示された。

第3章 イヌ $\beta 3$ -AR cDNAの塩基配列の解析とmRNAの組織分布

【 序 文 】

$\beta 3$ 作動薬の作用や選択性に大きな動物種差があることは、先述の通りである。本研究で用いた作動薬も、げっ歯類では $\beta 3$ -ARに極めて高い選択性を示し、*in vivo* で用いても脂肪分解以外の反応はほとんど認められない。しかし、イヌに投与すると脂肪動員効果と同時に心拍数の増加に象徴されるような循環器系への作用が出現した。今回、長期投与を行った際に、重大な副作用をもたらすことはなかったとはいえ、イヌの抗肥満薬として $\beta 3$ 作動薬を実用化する上では、今後詳細な検討が必要である。イヌにおいて $\beta 3$ 作動薬が循環器系へ影響する原因として以下の可能性が考えられる。第1は、イヌの $\beta 3$ -ARの構造が他の動物種とは異なり $\beta 1$ -ARに似ている、あるいは全く異なる新たなタイプの β -ARであるという可能性である。既にクローニングされた動物種間で $\beta 3$ -ARの塩基配列およびアミノ酸配列を比較すると、相同性が非常に高く、他の $\beta 1$ -、 $\beta 2$ -ARとは約50%程度の相同性しか示さない [19, 24, 52]。また、ヒトでは薬理学的な実験から心臓や骨格筋に $\beta 3$ -ARとは異なる非定型的 β -AR の存在も推定されており [31]、イヌの $\beta 3$ -ARが他の動物種の $\beta 3$ -ARとどの程度異なっているのかが注目される。別の可能性としては、組織分布の違いが挙げられる。げっ歯類では、WATとBATにしか、 $\beta 3$ -ARが発現していないために [24, 52, 54]、副作用が少ないと考えるならば、イヌでは、脂肪組織以外にも他の臓器、特に循環器系の組織に $\beta 3$ -ARが発現している可能性が考えられる。

そこで本章ではイヌ $\beta 3$ -ARの構造と組織分布を調べるために、以下のような実験を行った。まずイヌ $\beta 3$ -ARのアミノ酸配列を、既に報告されている他の動物種の $\beta 3$ -AR、あるいは $\beta 1$ -AR、 $\beta 2$ -ARと比較検討する目的で、ビーグル犬のWATから $\beta 3$ -AR cDNAをRT-PCR法を利用したRACE法によりクローニングし、その塩基配列を一部決定した。この配列より推定されるアミノ酸配列を既報のヒトやげっ歯類の $\beta 3$ -ARと比較した。さらに、脂肪組織以外での $\beta 3$ -ARの発現の有無についてRT-PCR法を用いて検討した。

【 材料および方法 】

核酸実験の基本的な操作は Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd. edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) [60] に基づいて実施した。

1. イヌ β 3-AR cDNAのクローニングと塩基配列の決定

1) 脂肪組織からのRNA抽出およびpoly(A) RNAの精製

生後3日齢の雄のビーグル犬を過剰量のペントバルビタールナトリウム(ネンブタール)により安楽死させ、肩甲間脂肪組織を採材した。採取した組織は直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで -80°C で保存した。まず、組織からのtotal RNAの抽出を、第2章に記載した方法で行った。次に、このtotal RNAより、oligo(dT)₂₀を結合させた磁性ビーズ (BioMag Oligo (dT)₂₀; PerSeptive Biosystems, 東京) を使ってpoly(A) RNAを精製し、その濃度を260nmの吸光度により測定した。

2) Rapid amplification of cDNA ends (RACE法) によるイヌ β 3-ARのクローニング

イヌ β 3-AR cDNA のクローニングは Marathon cDNA amplification kit (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) を利用して RACE 法により実施した。

(1) イヌ脂肪組織cDNAライブラリーの作成

1 μg のpoly(A) RNA, 1pmolのcDNA合成用プライマー(5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)₃₀ (A, G, C) (A, G, C, T)-3') , 1mM dNTP, 100units MMLV逆転写酵素を含む10 μl の反応液 (6mM MgCl₂, 75mM KCl, 50mM Tris-HCl [pH8.3]) 中で, 42°C , 1時間逆転写反応を行い, first strand cDNAを合成した。このfirst strand cDNAに0.05units RNaseH, 1.2units DNA polymerase I, 0.24units DNA ligaseを加え, 最終液量80 μl の反応液 (100mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 5mM MgCl₂, 0.15mM β -NAD, 4 μg BSA, 20mM Tris-HCl [pH7.5]) 中で 16°C , 90分間反応させ, second strand cDNAを合成した。さらに, 10unitsのT4 DNA polymerase を加えることで末端を平滑化させた。1unitsのT4 DNA ligaseを用いて, このcDNAにMarathon cDNA adaptor (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3' : 3'側の8塩基のみ2本鎖) を付加させ, アダプター結合cDNAライブラリーを作成した。

(2) PCR法によるイヌ β 3-AR cDNA断片の作製

既に報告されているマウス β 3-ARの塩基配列 [54] をもとに, PCR用のプライマー (上

流側：5'-ATGGCTCCGTGGCCTCAC-3' (MB3FWD2)，下流側：5'-CCCAACGGCCAGTGGCCAGTCAGTCG-3' (MB3REV2) を設計した。PCRは前記cDNAと2.5units Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, USA)，1.5mM MgCl₂，200 μ M dNTPと0.5 μ Mのプライマーを含む最終容量50 μ l の1x PCR緩衝液 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3]) 中で，94℃で30秒間の熱変性，60℃で30秒間のプライマーのアニーリング，72℃で1分間の伸長反応を30回行った。なお，PCRはGene Amp 2400 (Perkin-Elmer) により実施した。得られたPCR産物はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動し確認した。得られたPCR産物をアガロースゲルから回収，精製し，プラスミドベクターに組み込んだ。このサブクローニングには，Marchukの方法 [47] に従い，pBlueScriptSK+をEcoRVで切断し，切断末端にdTTPを1塩基だけ付加したT-オーバーハングを持つベクターを作成し，これにT/Aクローニングを行った。この組換えたプラスミドで大腸菌 (XL-1Blue; Stratagene) の形質転換を行った。

(3) 3'-RACE法によるイヌ β 3-AR cDNAの3'-cDNA末端のクローニング

上記の方法で得られたイヌ β 3-AR cDNA断片の塩基配列から，イヌ β 3-ARに特異的なプライマー (B3ARU: 5'-GCTGGCCACCGTGGGAGGCAACCTGCT-3') を設計した。5 μ l のアダプター結合cDNAを用いて，10pmolのアダプター配列を有するプライマー (AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3')，10pmolのB3ARUプライマー，1 μ gのTaq Start Antibody (CLONTECH)と1 μ l のKlen Taq DNA polymerase (CLONTECH) を含む最終容量50 μ l の反応液 (0.1mM β -mercaptoethanol, 75 μ g/ml BSA, 2 μ M EDTA, 1% Glycerol, 1mM KCl, 15mM CH₃COOK, 3.5mM Mg(CH₃COO)₂, 40mM Tricine-KOH, 0.8mM Tricine-HCl [pH7.5]) 中でPCRを行った。PCRはGene Amp 2400 (Perkin-Elmer) により，95℃，5秒間と68℃，4分間の反応を30回行った。増幅したPCR産物はエチジウムブロマイドを含む1%のアガロースゲルで電気泳動を行い，1.5-3.0kbp付近のバンドを回収，精製しプラスミドベクターに組み込んだ。このサブクローニングには前記の(2)と同様にT-オーバーハングを持つpBluescriptSK+ベクターを作成し，これにT/Aクローニングを行った。この組換えたプラスミドで大腸菌 (XL-1Blue) の形質転換を行った。

(4) 5'-RACE法によるイヌ β 3-AR cDNAの5'-cDNA末端のクローニング

5 μ l のアダプター結合cDNA，10pmolのアダプター配列を有するプライマー (AP1)，10pmolのMB3REV2プライマー，1 μ gのTaq Start Antibody (CLONTECH) および1 μ l のKlen Taq DNA polymerase (CLONTECH) を含む最終容量50 μ lの反応液 (0.1mM β -mercaptoethanol, 75 μ g/ml BSA, 2 μ M EDTA, 1% Glycerol, 1mM KCl, 15mM CH₃COOK,

3.5mM Mg(CH₃COO)₂, 40mM Tricine-KOH, 0.8mM Tricine-HCl [pH7.5]) 中でPCRを行った。PCRはGene Amp 2400 (Perkin-Elmer) により, 94℃, 5秒間の熱変性, 60℃, 30秒間のプライマーのアニーリング, および68℃, 4分間の伸長反応を30回行った。増幅したPCR産物はエチジウムブロマイドを含む1%のアガロースゲルで電気泳動を行い, バンドを回収, 精製しプラスミドベクターに組み込んだ。以下, サブクローニングとクローンの選択方法は上記の3'-RACE 法の場合と同様に行った。

3) 塩基配列の決定

塩基配列の決定は, ジデオキシ法により, Taq DNA polymeraseを用いた反応系 (Dye terminator cycle sequencing kit) で行い, 蛍光式自動シーケンサー (Model 373A) で解析した。

2. RT-PCRによるイヌ β 3-AR mRNAの組織分布の検討

イヌ β 3-AR mRNAの組織分布の検索には, ビーグル犬 (雄, 11ヶ月齢) を使用した。まず, イヌを過剰量のネンブタールで安楽死させ, 臓器を採取し, ただちに液体窒素にて凍結した。組織よりTRIzol試薬 (GibcoBRL) を用いてtotal RNAを抽出し, 濃度を260nmの吸光度により測定した。1 μ gのtotal RNAを用いて, 100pmolのoligo(dT)₁₅を逆転写用プライマーとして用い, 200unitsのMMLV逆転写酵素 (Gibco BRL), 0.5mM dNTP, 10units リボヌクレアーゼ阻害剤 (和光純薬) を含む最終容量 20 μ l の1x first strand緩衝液 (Gibco BRL) 中で37℃, 1時間の逆転写反応を行った。PCRは, 前述の2)-(1)と同様に行った。得られたPCR産物はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動し確認した。また, 内在性の脂肪細胞を検出するために脂肪組織に特異的に発現している *ob* 遺伝子のmRNA (*ob* mRNA) を指標として使用した。既報の塩基配列 [50, 71] よりプライマー (上流側: 5'-TTCCTGTGGCTTTGGCCCTAT-3' および下流側: 5'-GCCACCACCTCTGTGGAGTA-3') を設計し, RT-PCRは β 3-ARの場合と同じ条件で実施した。

【 結 果 】

1. イヌ β 3-AR cDNAのクローニングと部分塩基配列の決定

既に報告されているマウス β 3-AR cDNAの塩基配列から設計したプライマーでのRT-PCRでは、317bpのPCR断片が得られた。このcDNA断片をサブクローニングして、塩基配列を決定したところ、既に報告されているヒト [19, 43] , マウス [54] , ラット [24] の β 3-AR cDNAの該当領域と79.5~86.4%の高い相同性を示した。また、この塩基配列より推定されるアミノ酸配列も、これらの種間と高い相同性 (81.7~82.9%) を示した。従って、このcDNA断片はイヌ β 3-ARの一部である可能性が高いので、このcDNA断片の配列内で、イヌに特異的なPCRプライマーを新たに設計した (B3ARU)。このプライマーとアダプタープライマーで3'-RACEを行い、3'-cDNA末端のクローニングを行った。現在までに確定した塩基配列は650bpに相当する部分配列である (図3-1)。既報の他の動物種の β 3-AR cDNAは2kbp程度であるので、今回は予想されるイヌ β 3-AR cDNAの全長の約1/3の配列に該当する。5'側の解析が十分ではないが、図3-1に示したように開始コドン (ATG) を推定した。このATG付近の配列は (GCG GGG ATG G) となっており、コザック規則 (CC (A/G) CC AUG (G)) [36] には厳密にはあてはまらないが、ATGの3塩基上流がプリン塩基であること、ならびに既に報告のあるウシ β 3-AR cDNAの開始コドン付近と同じ配列 (GCG GGG ATG G) であることから [56] , この部分のATGが開始コドンであると思われる。

この開始コドンから推定した206個のアミノ酸配列は、推定される全アミノ酸配列 (約400) の半分にすぎないが、他の動物種の対応するアミノ酸配列と非常に相同性が高かった (図3-2, 表3-1)。また、塩基配列、アミノ酸配列ともに β 3-ARとは相同性が高いが、 β 1や β 2-ARとは塩基配列で約57-68%と約57-60%、アミノ酸配列ではそれぞれ約49-58%、約49-50%と相同性は低い [1, 13, 21, 29, 34, 46] 。

このイヌ β 3-ARは、他の β -ARと同様な、いくつかの保存されたアミノ酸配列を有していた。つまり、N-末端側にN-グリコシド結合型糖鎖付加部位が2カ所推定され、疎水性の膜貫通領域が確認できる。しかし、このcDNAは部分配列しか含んでいないため、膜貫通領域は1から5番目の途中までしか認識できなかった。

以上のことから、今回得られたcDNAはイヌ β 3-AR cDNAの一部であると判断した。

2. RT-PCRによるイヌ $\beta 3$ -AR mRNAの組織分布の検討

まずイヌ $\beta 3$ -AR mRNAの組織分布を調べるために、ビーグル成犬の種々の臓器よりtotal RNAを抽出し、317bpのイヌ $\beta 3$ -AR cDNA断片をプローブとしてノーザンブロットを行ったが $\beta 3$ -AR mRNAを検出することはできなかった（結果は図示せず）。

そこで、より感度の高いRT-PCR法により $\beta 3$ -AR mRNAの組織分布を調べた。図3-3上段にみられるように、全ての脂肪組織（大網、腸間膜、後腹膜と腎周囲の脂肪組織）で予想される317bpの位置にバンドがみられた。しかし、脂肪組織以外にも脾臓で脂肪組織と同程度に、肝臓、肺、腎臓、骨格筋、膵臓および副腎でもごく弱いながらもバンドが検出された。さらに、脂肪組織以外の臓器では、240bp付近にもバンドが認められた。これらのバンドは、逆転写反応を行わなかった試料を用いてPCRを行っても検出されなかったことから、ゲノムに由来するものではない（結果は図示せず）。さらに、脂肪組織から得られた317bpのcDNAをプローブにして、PCR産物に対するサザンブロットを行ったところ、240bp付近のバンドとはほとんど結合しなかった（結果は図示せず）ことから $\beta 3$ -AR mRNA由来のバンドでもない結論した。

また、脂肪細胞に特異的といわれる *ob*遺伝子 mRNAの発現を同時に調べたところ、*ob* mRNAの増幅産物は413bpの位置に見られ、脂肪組織に強く見られた。脂肪組織以外には骨格筋と膵臓、副腎にも弱い発現が見られたが、それ以外の肝臓、肺、腎臓には見られなかった。

-32

CCTTCCCTTCCCGCCCCACTCGCGCCGCGGGG

1 ATGGCTCCGTGGCCTCACGGGAACGGCTCTGTGGCCTCGTGGCCGGCTGCCCCACCCCG
MetAlaProTrpProHisGlyAsnGlySerValAlaSerTrpProAlaAlaProThrPro
61 ACGCCCGATGCCGCCAACACGAGTGGGCTGCCAGGGGCGCCCTGGGCGGTGGCCTTGGCG
ThrProAspAlaAlaAsnThrSerGlyLeuProGlyAlaProTrpAlaValAlaLeuAla
121 GGGGCGCTGTTGGCGCTGGAGGTGCTGGCCACCGTGGGAGGCAACCTGCTGGTCATCGTG
GlyAlaLeuLeuAlaLeuGluValLeuAlaThrValGlyGlyAsnLeuLeuValIleVal
181 GCCATCGCTCGGACGCCAAGACTGCAGACCATGACCAACGTGTTCGTGACGTCGCTGGCC
AlaIleAlaArgThrProArgLeuGlnThrMetThrAsnValPheValThrSerLeuAla
241 ACCGCGGACCTGGTGGTGGGGCTCCTGGTAGTGCCGCCGGGGGCCACCTTGGCGCTGACG
ThrAlaAspLeuValValGlyLeuLeuValValProProGlyAlaThrLeuAlaLeuThr
301 GGCCGCTGGCCTCTGGGCGCCACCGGTTGCGAGCTGTGGACCTCAGTGGACGTGCTGTGT
GlyArgTrpProLeuGlyAlaThrGlyCysGluLeuTrpThrSerValAspValLeuCys
361 GTGACAGCCAGCATCGAAACCCTGTGCGCCCTGGCGGTGGACCGCTACCTGGCCGTGACC
ValThrAlaSerIleGluThrLeuCysAlaLeuAlaValAspArgTyrLeuAlaValThr
421 AACCCGCTGCGGTACGGCGCCCTGGTCACCAAACGGCGCGCCCGGGCGGCAGTGGTCCTG
AsnProLeuArgTyrGlyAlaLeuValThrLysArgArgAlaArgAlaAlaValValLeu
481 GTGTGGGTCGTGTCCGCCGCGGTGTCGTTGCGCCCCATCATGAGCAAGTGGTGGCGCGTG
ValTrpValValSerAlaAlaValSerPheAlaProIleMetSerLysTrpTrpArgVal
541 GGAGCCGACGCCGAGGCGCAGCGCTGCCACTCCAACCCGCACTGCTGCGCCTTCGCCTCC
GlyAlaAspAlaGluAlaGlnArgCysHisSerAsnProHisCysCysAlaPheAlaSer
601 AACATACCCTACGCGCTG
AsnIleProTyrAlaLeu

図 3-1. イヌ β 3-ARcDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列（部分配列）

推定上の開始コドン（ATG）は網掛けのboxで示してあり、塩基配列の番号はこの開始コドンからの番号で示してある。N-グリコシド型の糖鎖付加部位はboxで示してある。この配列は部分配列であり、他の動物種のcDNAと比較して全長cDNAの約1/3（アミノ酸の翻訳領域で約1/2）と推定される。

表3-1. イヌ β_3 -ARの他の動物種との比較

		Dog β_3 -AR	
		Nucleic acid	Amino acid
Human	β_1 -AR	55.8%	49.0%
	β_2 -AR	57.8%	49.5%
	β_3 -AR	84.3%	87.9%
Mouse	β_1 -AR	67.8%	57.1%
	β_2 -AR	60.1%	48.5%
	β_3 -AR	89.3%	87.4%
Rat	β_1 -AR	57.4%	57.7%
	β_2 -AR	57.4%	48.5%
	β_3 -AR	89.9%	87.9%
Bovine	β_3 -AR	91.1%	89.8%
Guinea pig	β_3 -AR	87.0%	89.8%

イヌ β_3 -ARの塩基配列, アミノ酸配列を他の動物種の β -ARと比較した。塩基配列は開始コドン (ATG) 以降で比較を行った。

ヒト, マウス, ラット, ウシ, モルモットの β_1 -, β_2 -, β_3 -ARの配列は文献より引用した [1, 3, 4, 13, 19, 21, 24, 29, 34, 46, 54, 56]。

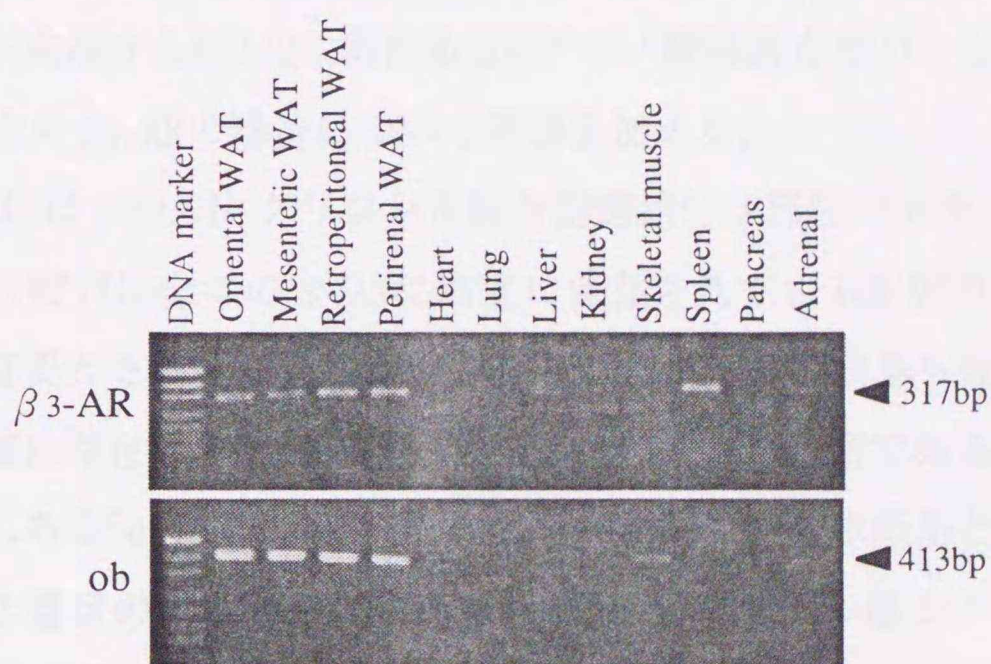


図 3-3. RT-PCRによる β_3 -AR mRNAの組織分布

イヌの各組織での β_3 -AR mRNAの発現をRT-PCRで検出した。

DNA marker; pUC19 DNA/MspI (Fermentas), Omental WAT; 大網, Mesenteric WAT; 腸間膜, Retroperitoneal WAT; 後腹膜, Perirenal WAT; 腎周囲の各脂肪組織, Heart; 心臓, Lung; 肺, Liver; 肝臓, Kidney; 腎臓, Skeletal muscle; 骨格筋, Spleen; 脾臓, Adrenal; 副腎

上段: β_3 -AR mRNA, 下段: ob mRNAをそれぞれ検出している。

【 考 察 】

β_3 -ARをコードしている遺伝子はいくつかの動物種で決定され、機能解析が行われている。現在までに、ゲノムDNAではヒト [19] , マウス [54] , ラット [24] で、cDNAではラット [24, , 52] , ヒト [43] , ウシ [56] およびモルモット [3, 4] で塩基配列が報告されている。いずれの動物種でも β_3 -ARは、他の β -ARと同様にN末端領域が細胞外にC末端領域が細胞質内に位置し、約20個のアミノ酸からなる α ヘリックス構造の疎水性部分が7回膜を貫通しているモデルが推定されている。 β_3 -ARのアミノ酸配列を動物種間で比較すると約80%の高い相同性が認められるが、同一の動物種で β_1 , β_2 と比較すると50%前後の相同性しか示さない [19, 24, 52] 。

今回はまず、マウスの β_3 -ARの塩基配列をもとに設計したプライマーを用いてイヌ脂肪組織のRNAでRT-PCRを行ったが、得られた317bpのcDNA断片はマウス β_3 -ARの対応する領域と86.4%と非常に高い相同性を示した。さらに、この領域内に新たにプライマーを設計し、RACE法を用いて全長cDNAのクローニングを試みた。現在のところ、塩基配列が決定できたのは650bpであり、これは他の動物種の β_3 -ARから推定される全長cDNAの約1/3に過ぎないが、翻訳領域ではN-末端から約1/2にあたる206アミノ酸残基をカバーしている。この部分に限って、以下にイヌ β_3 -ARの構造について考察を加える。

まず、N末端領域には2つのN-グリコシル結合型糖鎖付加部位のモチーフ (N-X-S) が存在しているが、この配列は全ての β -ARに高度に保存されている配列である [62] 。また、リガンドの結合に重要とされるいくつかの保存されたアミノ酸残基も確認できる。即ち、3番目の膜貫通領域に存在するAsp117は、アミン類の結合に必須であるとされている。4番目の膜貫通領域にあるSer169は、ethanolamineの側鎖である水酸基と水素結合をする部位である。また、2番目の膜貫通領域にあるAsp83は、アデニル酸シクラーゼ系で促進的に働くGsタンパク質の活性化に必要であるとされている [62] 。

ヒト、ウシの β_3 -ARでは、マウス、ラットと異なり第1膜貫通領域内の48-50番目にVal-Leu-Alaの3アミノ酸残基が挿入されている。今回イヌの β_3 -ARでも同様の挿入が存在することが明らかとなった。現在のところ、この3アミノ酸残基の有無がどのような役割を果たしているかは不明である。

イヌ β_3 -ARの64番目のアミノ酸はArgであるが、これはマウス、ラット、ウシと同一である。一方、ヒトではTrpであり、モルモットではCysとなっているが、この両種はいずれ

も β_3 作動薬に対する反応性が低いことが知られている。この64番目のアミノ酸と β_3 作動薬への反応性との関係は今のところ不明であるが、ヒトで大変興味深い事実が知られている。即ち、ヒトではこの64番目のアミノ酸はTrpであるが、これがArgに置き換わるミスセンス変異があることが報告された [67]。この変異は肥満と糖尿病を高率に発症するピマ・インディアンで見つかっており、肥満との関連が示唆されている。しかし このアミノ酸残基はヒト (Trp) とモルモット (Cys) 以外では、どの動物種もArgである。今回調べたイヌも、この64番目のアミノ酸はげっ歯類と同じArgであった。なぜ、ヒトではArgに変異すると肥満傾向を生じるのかについての明確な回答はまだない。

in vivo での β_3 作動薬の効果に関する動物種差の原因としては、 β_3 -ARの構造以外にも組織分布の違いが考えられる。げっ歯類では、 β_3 -ARは脂肪細胞にのみ存在するとされている [24, 52, 54]。イヌの脂肪組織についても4カ所 (大網, 腸間膜, 後腹膜, 腎周囲) を採取して、RT-PCR法で β_3 -AR mRNAの分布を調べたが、いずれにおいても β_3 -AR mRNAのシグナルが検出された。しかし脂肪組織以外にも脾臓では脂肪組織と同程度に、肺、肝臓、腎臓、骨格筋、膵臓および副腎でも極めて弱いながら β_3 -AR mRNA 由来と思われるシグナルが検出された。この弱いシグナルは、採取組織中に脂肪細胞が混入したためとも考えられるが、脂肪細胞でのみ発現している *ob* 遺伝子のmRNA (*ob* mRNA) [50, 71] を指標にして、その発現の有無を調べた結果では骨格筋、膵臓と副腎以外では検出されなかったもので、この可能性は低い。いずれにせよ、量的に少ないとはいえイヌの β_3 -AR mRNAは、脂肪組織以外にも広範に発現している可能性が示唆された。ヒトでは脂肪組織以外に、胆嚢や消化管にも発現が見られるが [5, 37]、今回のように肝臓、脾臓、骨格筋などのように広範囲に発現している動物種の報告はない。これが、循環器系や膵内分泌への β_3 作動薬の効果 (第1章) と、どう関係するのかは今のところ不明であるが、薬理的には心臓や骨格筋に、 β_3 -ARとも異なる非定型的な β -AR (β_4 -AR?) の存在が提唱されており [31]、今後の詳細な検討が必要である。

【 小 括 】

$\beta 3$ -ARの動物種差のメカニズムを解明するために、ビーグル犬の脂肪組織よりRNAを抽出し、RT-PCR法を利用したRACE法にてイヌ $\beta 3$ -ARのcDNAをクローニングし、塩基配列の一部を決定した。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 $\beta 3$ -ARの塩基配列と約85%の高い相同性を示すが、 $\beta 1$ や $\beta 2$ -ARの塩基配列とは50%前後の相同性しかなかった。イヌ $\beta 3$ -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 $\beta 3$ -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つのアミノ酸残基が挿入が認められた。また、ヒトで肥満に関連しているといわれる64番目のアミノ酸は、イヌではげっ歯類と同じArgであった。現時点では、これらの差が生理的にどのような役割を果たしているかは不明である。

さらに、RT-PCR法を用いて $\beta 3$ -AR mRNAの組織分布を調べた結果では、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。イヌでは量的には少ないにしろ、脂肪組織以外にも広範に $\beta 3$ -ARが発現していた。

総 括

ヒトと同様に、小動物臨床領域、特にイヌにおいて、肥満は最も重要な栄養性疾患として認識されている。現在のところ、イヌの肥満治療は、ほとんどが食餌療法と運動療法によって行われている。しかし、WATでの脂肪分解を促進し、BATでの熱産生を促進するような β_3 -ARの作動薬が開発され、新しい肥満の治療法として注目されている。そこで、本研究では、 β_3 作動薬をイヌの肥満治療に応用することを目的として、イヌでの β_3 作動薬の薬理学的効果の検討およびイヌ β_3 -ARの1次構造の解析を行い、以下の知見を得た。

(1) イヌにおける β_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 β_3 作動薬であるCL316,243とICI D7114を静脈内に投与し、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。 β_3 作動薬は投与開始直後から急速な血中FFAの増加を示した。その効果は非選択的な β 作動薬であるイソプロテレノールに比べて、より持続的であり、数時間にわたり持続した。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。 β_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 β_3 -ARに対する直接作用であると考えられた。このように、 β_3 作動薬はイヌにおいても *in vivo* で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) 急性投与実験の結果より、脂肪動員効果の最も高かったCL316,243を用いて、ビーグル犬に長期投与を行い実際の抗肥満効果と副作用について検討を行った。CL316,243 (0.1mg/kg) を5-7週間にわたり1日1回経口投与すると、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中性脂肪が減少し、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、特に重大な副作用をおこすことなく肥満の予防・治療に効果があることが示された。

(3) β 3-ARの動物種差のメカニズムを解明するために、ビーグル犬の脂肪組織よりRNAを抽出し、RT-PCR法を利用したRACE法にてイヌ β 3-ARのcDNAをクローニングし、塩基配列の一部を決定した。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。また、ヒトで肥満に関連しているといわれる64番目のアミノ酸は、イヌではげっ歯類と同じArgであった。現時点では、これらの差が生理的にどのような役割を果たしているかは不明である。

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。しかし、イヌでは脂肪組織以外での β 3-ARの発現がみられたことから、循環器系への副作用との関係もあわせて今後さらに詳細な検討を加える必要がある。

謝 辞

本論文の作成にあたり、終始有益な御助言ならびに御指導をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生化学教室、斉藤昌之教授に心より感謝いたします。また、ビーグル犬への投与実験にあたり、数多くの御助言ならびに御協力をいただきました酪農学園大学獣医学部獣医内科学第二教室の内田英二助教授、新山雅美教授に深く感謝いたします。本研究の全般にわたり貴重な御助言をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科生化学教室の木村和弘助教授、田村多喜子博士、岩手大学農学部生理学教室の首藤文栄教授ならびに森松正美助教授、京都府立医科大学第一内科の吉田俊秀講師に深く感謝いたします。UCP抗血清を供与していただきました京都大学大学院農学研究科の河田照雄助教授に深謝いたします。

本論文を御校閲いただきました北海道大学大学院獣医学研究科薬理学教室の中里幸和教授、同臨床分子生物学教室の橋本晃教授、ならびに同生化学教室の木村和弘助教授に深謝いたします。

最後に、本研究に貴い命を捧げてくれました実験動物達の冥福を心から祈ります。

引用文献

1. Allen, J.M., Baetge, E.E., Abrass, I.B., and Palmiter, R.D. (1988) : Isoproterenol response following transfection of the mouse β 2-adrenergic receptor gene into Y1 cells. *EMBO J.*, **7**, 133-138.
2. Arch, J. R. S., Ainsworth, A.T., Cawthorne, M.A., Piercy, V., Sennitt, M.V., Thody, V.E., Wilson, C., and Wilson, S. (1984) : Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309**, 163-165.
3. Atgié, C., Tavernier, G., D'Allaire, F., Bengtsson, T., Marti, L., Carpené, C., Lafontan, M., Bukowiecki, L.J., and Langin, D. (1996) : β 3-adrenoceptor in guinea pig brown and white adipocytes: low expression and lack of function. *Am. J. Physiol.*, **271**, R1729-R1738.
4. Atgié, C., Tavernier, G., D'Allaire, F., Bengtsson, T., Marti, L., Carpené, C., Lafontan, M., Bukowiecki, L.J., and Langin, D. (1996) : Gene bank accession U51098.
5. Berkowitz, D.E., Nardone, N.A., Smiley, R.M., Price, D.T., Kreutter, D.K. (1995) : Distribution of β 3-adrenoceptor mRNA in human tissues. *Eur. J. Pharmacol.*, **289**, 223-228.
6. Berlan, M., Galitzky, J., Bousquet-Melou, A., Lafontan, M., and Montastruc, J.L. (1994) : Beta-3 adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1444-1451.
7. Blin, N., Camoin, L., Maigret, B., and Strosberg, A.D. (1993) : Structural and conformational features determining selective signal transduction in the β 3-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 1094-1104.
8. Blin, N., Nahmias, C., Drumare, M.F., and Strosberg, A.D. (1994) : Mediation of most atypical effects by species homologues of the β 3-adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 911-919.
9. Bloom, J. D., Dutia, M. D., Johnson, B. D., Wissner, A., Burns, M. G., Largis, E. E., Dolan, J. A., and Claus, T. H. (1992) : Disodium(R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL316,243). A potent β -adrenergic agonist virtually specific for β 3 receptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent. *J. Med. Chem.*, **35**, 3081-3084.
10. Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997) : Uncoupling protein-3 : a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, **408**, 39-42.
11. Bouillaud, F., Raimbault, S., and Ricquier, D. (1988) : The gene for rat uncoupling protein: complete sequence, structure of primary transcript and evolutionary relationship

between exons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 783-792.

12. Bousquet-Mélou, A., Galitzky, J., Carpené, C., Lafontan, M., and Berlan, M. (1994) : β -adrenergic control of lipolysis in primate white fat cell: a comparative study with nonprimate mammals. *Am. J. Physiol.*, **267**, R115-123.
13. Buckland, P.R., Hill, R.M., Tidmarsh, S.F., and McGuffin, P.M. (1990) : Primary structure of the rat beta-2 adrenergic receptor gene. *Nucl. Acid. Res.*, **18**, 682.
14. Carpené, C., Castan, I., Collon, P., Galitzky, J., Moratinos, J., and Lafontan, M. (1994) : Adrenergic lipolysis in guinea pig is not a β 3-adrenergic response: comparison with human adipocytes. *Am. J. Physiol.*, **266**, R905-R913.
15. Carpené, C., Galitzky, J., Collon, P., Esclapez, F., Dauzats, M., and Lafontan, M. (1993) : Desensitization of beta-1 and beta-2 but not beta-3 adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **265**, 237-347.
16. Champigny, O., Ricquier, D., Blondel, O., Mayers, R. M., Briscoe, M.G., and Holloway, B.R. (1991) : β 3-adrenergic receptor stimulation restores message and expression of brown-fat mitochondrial uncoupling protein in adult dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10774-10777.
17. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
18. Edney, A.T.B. and Smith, P.M. (1986) : Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet.Rec.*, **118**, 391-396.
19. Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., and Strosberg, A. D. (1989) : Molecular characterization of the human β 3-adrenergic receptor. *Science*, **245**, 1118-1121.
20. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., and Warden, C.H. (1997) : Uncoupling protein-2 : a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genet.*, **15**, 269-272.
21. Frielle, T., Collins, S., Daniel, K.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Kobilka, B.K. (1987) : Cloning of the cDNA for the human β 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7920-7924.
22. Galitzky, J., Reverte, M., Portillo, M., Carpené, C., Lafontan, M., and Berlan, M. (1993) : Coexistence of β 1-, β 2-, and β 3-adrenoceptors on dog fat cells and their differential activation by catecholamines. *Am. J. Physiol.*, **264**, E403-E412.
23. Gimeno, R.E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A.W., Gimeno, C.J., Iris, F., Ellis, S.J., Woolf, E.A., and Tartaglia, L.A. (1997) : Cloning and characterization of an

uncoupling protein homologue.: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*, **46**, 900-906.

24. Granneman, J.G., Lahners, K.N., and Chaudhry, A. (1991) : Molecular cloning and expression of the rat β 3-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, **40**, 895-899.
25. Granneman, J.G., Lahners, K.N., and Chaudhry, A. (1993) : Characterization of the human β 3-adrenergic receptor gene. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 264-270.
26. Himms-Hagen, J. (1986) : Brown adipose tissue and cold-acclimation. In : *Brown Adipose Tissue* (Trayhurn, P. and Nicholls, D.G. eds.) pp.214-268, Edward Arnold, London.
27. Himms-Hagen, J., Cui, J., Danforth, J.E., Taatjes, D.J., Lang, S.S., Waters, B.L., and Claus, T.H. (1994) : Effect of CL-316,243, a thermogenic β 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am. J. Physiol.*, **266**, R1371-R1382.
28. Holloway, B. R., Howe, R., Rao, B. S., Stribling, D., Mayers, R. M., Briscoe, M.G., and Jackson, J. M. (1991) : ICI D7114 a novel selective β -adrenoceptor agonist selectively stimulates brown fat and increases whole-body oxygen consumption. *Br. J. Pharmacol.*, **104**, 97-104.
29. Jasper, J.R., Link, R.E., Chruscinski, A.J., Kobilka, B.K., and Bernstein, D. (1993) : Primary structure of the mouse β 1-adrenergic receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1178**, 307-309.
30. Joshua, J.O. (1970) : The obese dog and some clinical repercussions. *J. Small Anim. Pract.*, **11**, 601-606.
31. Kaumann, A.J. (1997) : Four β -adrenergic subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 70-76.
32. Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1991) : The uncoupling protein UCP : a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int. J. Biochem.*, **23**, 791-801.
33. Klingenberg, M. (1990) : Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 108-112.
34. Kobilka, B.K., Dixon, R.A.F., Frielle, T., Dohlman, H.G., Bolanowski, M.A., Sigal, I.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987) : cDNA for the human β 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 46-50.
35. Kopecky, J., Clarke, G., Enerbäck, S., Spiegelman, B., and Kozak, L.P. (1995) : Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2914-2923.
36. Kozak, M. (1986) : Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that

modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**, 283-292.

37. Krief, S., Lönnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A. D., Ricquier, D., and Emorine, L. J. (1993) : Tissue distribution of β 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.*, **91**, 344-349.
38. Krook, L., Larsson, S., and Rooney, J.R. (1960) : The interrelationship of diabetes mellitus, obesity, and pyometra in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 120-124.
39. Laemmli, U.K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
40. Lafontan, M., and Berlan, M. (1993) : Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid. Res.*, **34**, 1057-1091.
41. Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P., and Brown, T.G. (1967) : Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, **214**, 597-598.
42. Langin, D., Portillo, M.P., Saulnier-Blache, J.S., and Lafontan, M. (1991) : Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.*, **199**, 291-301.
43. Lelias, J.M., Kaghad, M., Rodriguez, M., Chalon, P., Bonnin, J., Dupre, I., Delpech, B., Bensaid, M., LeFur, G., Ferrara, P., and Caput, D. (1993) : Molecular cloning of a human β 3-adrenergic receptor cDNA. *FEBS Lett.*, **324**, 127-130.
44. Lowell, B.B., S-Suslic, V., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., and Flier, J.S. (1993) : Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, **366**, 740-742.
45. Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
46. Machida, C.A., Bunzow, J., Serles, R.P., VanTol, H., Tester, B., Neve, K.A., Teal, P., Nipper, V., and Civelli, O. (1990) : Molecular cloning and expression of the rat β 1-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **265**, 12960-12965.
47. Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., and Collins, F.S. (1991) : Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl. Acid. Res.*, **119**, 1154
48. Markwell, P. J., van Erk, W., Parkin, G. D., Sloth, C. J., and Shantz-Christienson, T. (1990) : Obesity in the dog *J. Small Anim. Pract.*, **31**, 533-537.
49. Mason, E. (1970) : Obesity in pet dogs. *Vet.Rec.*, **86**, 612-616.
50. Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., Jingami, H., Kawada, T., and Nakao, K. (1995): Human obese gene expression: adipocyte-specific expression and regional differences in the

adipose tissue. *Diabetes*, **44**, 855-858.

51. Méjean, A., Guillaume, J.L., Strosberg, A.D. (1995) : Carazolol: a potent, selective β 3-adrenoceptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **291**, 359-366.
52. Muzzin, P., Revelli, J.P., Kuhne, F., Gocayne, J. D., McCombie, W. R., Venter, J. C., Giacobino, J.P., and Fraser, C.M. (1991) : An adipose tissue-specific β -adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24053-24058.
53. Nagase, I., Yoshida, T., Kumamoto, K., Umekawa, T., Sakane, N., Nikami, H., Kawada, T., and Saito, M. (1996) : Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic β 3-adrenergic agonist. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2898-2904.
54. Nahmias, C., Blin, N., Elalouf, J. M., Mattei, M. G., Strosberg, A. D., and Emorine, L. J. (1991) : Molecular characterization of the mouse β 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J.*, **10**, 3721-3727.
55. Newberne, P.M. (1966) : Overnutrition on resistance of dogs to distemper virus. *Fed. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol.*, **25**, 1701-1710.
56. Piétri-Rouxel, F., Lenzen, G., Kapoor, A., Drumare, M.F., Archimbault, P., Strosberg, A.D., and Manning, B.S.J. (1995) : Molecular cloning and pharmacological characterization of the bovine β 3-adrenergic receptor. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 350-358.
57. Rocchini, A.P., Moorehead, C.P., DeRemer, S., and Bondie, D. (1989) : Pathogenesis of weight-related changes in blood pressure in dogs. *Hypertension*, **13**, 922-928.
58. Rothwell, N. J., and Stock, M. J. (1979) : A role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, **281**, 31-35.
59. Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1986) : Brown adipose tissue and diet-induced thermogenesis. In : *Brown Adipose Tissue* (Trayhurn, P. and Nicholls, D.G. eds.) pp.269-298, Edward Arnold, London.
60. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
61. Shen, Y.T., Zhang, H., and Vatner, S.F. (1994) : Peripheral vascular effects of beta-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 466-473.
62. Strosberg, A.D., and Pietri-Rouxel, F. (1996) : Function and regulation of the β 3-adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **17**, 373-381.
63. Susulic, V.S., Frederich, R.C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B.B., Harper, M.E., Himms-Hagen, J., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1995) : Targeted disruption of the β 3-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29483-29492.

64. Tan, S., and Curtis-Prior, P.B. (1983) : Characterization of the beta-adrenoceptor of the adipose cell of the rat. *Int. J. Obesity*, **7**, 409-414.
65. Tate, K.M., Briend-Sutren, M.M., Emorine, L.J., Delavier-Klutchko, C., Marullo, S., and Strosberg, A.D. (1991) : Expression of three human β -adrenergic receptor subtypes in transfected chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **196**, 357-361.
66. Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1997) : UCP-3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 79-82.
67. Walston, J. (1995) : Time of onset of NIDDM and genetic variation in the β 3-adrenergic receptor gene. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 343-347.
68. Yoshida, T., Hiraoka, N., and Kondo, M. (1991) : Effects of a β 3-adrenoceptor agonist, BRL 26830A, on insulin and glucagon release in mice. *Endocrinol. Japon.*, **38**, 641-646.
69. Yoshida, T., Sakane, N., Wakabayashi, Y., Umekawa, T., and Kondo, M. (1994) : Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL316,243, a highly specific β 3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. *Life Sci.*, **54**, 491-498.
70. Yoshida, T., Sakane, N., Wakabayashi, Y., Umekawa, T., and Kondo, M. (1994) : Anti-obesity effect of CL 316,243, a highly specific β 3-adrenoceptor agonist, in mice with monosodium-L-glutamate-induced obesity. *Eur. J. Endocrinol.*, **131**, 97-102.
71. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994) : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425-432.

ANTI-OBESITY EFFECTS OF SELECTIVE AGONISTS TO THE β 3-ADRENERGIC RECEPTOR IN DOGS

Noriyasu Sasaki

Laboratory of Biochemistry,

Department of Biomedical Sciences,

Graduate School of Veterinary Medicine,

Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Obesity is the most common nutritional disorder in small animal practices, as in humans. Current treatment of obesity in dogs mostly relies on reducing energy intake by low calorie diet or fasting and increasing energy expenditure by exercise. It is known that in rodents and humans that the β 3-adrenergic receptor (β 3-AR) is present primarily in adipocytes and plays a significant role in the adrenergic stimulation of lipolysis and heat production. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of β 3-adrenergic agonists for the treatment and prevention of obesity in the dog without any side effects.

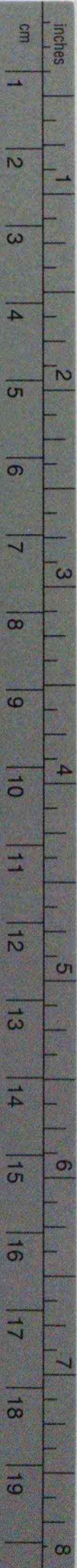
1) The acute lipomobilizing effects of β 3-AR-selective agonists were examined in the dog in vivo. When a selective β 3-AR agonist, CL316,243, was infused intravenously into dogs, the plasma level of free fatty acid increased in 30 min and persisted at higher levels for several hours. ICI D7114, another β 3-AR agonist, also showed a similar lipomobilizing effect, but with two order of lower potency. β 3-AR agonist infusion also increased the plasma insulin level, and heart rate. Thus, the lipomobilization effect of the β 3-AR agonist may be due to a direct action on the β 3-AR in adipocytes. These results suggested that functional β 3-AR is present in adipose tissues of the dog and that it is effective for in vivo lipomobilization.

2) The chronic anti-obesity effects of CL316,243 were examined, because CL316,243 was more effective than ICI D711 when given acutely at the same dose. When a selective β 3-adrenergic agonist, CL316,243 (0.1mg/kg), was given orally to adult beagles every day for 5-7 weeks, body weight and girth were decreased compared with control placebo-treated dogs. The mean food intake of drug-treated dogs was reduced as compared to the placebo treated dogs, although the change was not statistically significant. There was no significant difference in blood

biochemistry data before the experiment and at the end of the first or second phase of the experiment. In postmortem examinations, no apparent difference in gross appearance of individual organs, except fat pads, was found between the two groups. The fat pads of various sites of drug-treated dogs were small and the adipose tissue composed of multilocular cells containing smaller amounts of triglyceride. Immunohistochemical examination of this adipose tissue showed a remarkable increase in brown adipocytes expressing a thermogenic protein, uncoupling protein (UCP). The increased expression of UCP and its mRNA in drug-treated dogs was also confirmed by Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses. It was concluded that treatment with a β 3-AR agonist stimulates UCP expression, which may lead to an increase in energy expenditure, and thereby is useful for the treatment and prevention of obesity in the dog.

3) To clarify the molecular structure of dog β 3-AR, its cDNA was cloned by RT-PCR method and the nucleotide and deduced amino acid sequences were determined. A β 3-AR cDNA fragment (650bp) was obtained by amplifying RT-PCR of RNA extracted from dog white adipose tissue. The nucleotide sequence of the fragment was 81.9- 91.1% homologous to the corresponding region of β 3-AR cDNA of other species so far reported. The deduced amino acid sequence (206 amino acid residues) was also highly homologous (87.4- 89.8%) to other species, which it showed low sequence homologies (about 50%) compared to the β 1- and β 2-ARs. Thus, it is likely that the cDNA fragment obtained in this study was the dog β 3-AR. The N-linked glycosylation sites and hydrophobic transmembrane regions were highly conserved in the dog β 3-AR, but three amino acid residues (N-X-S) were inserted as compared to the rodent β 3-AR. The tissue distribution of dog β 3-AR mRNA was studied using RT-PCR. Abundant expression of β 3-AR mRNA was found in subcutaneous and visceral adipose tissues. Unlike in rodents, a weak but apparent expression of β 3-AR mRNA was found in lung, liver, kidney and spleen. Thus, the tissue distribution of β 3-AR in the dog is a little different from these in rodents, and this may explain why the β 3-AR agonists induce tachycardia as well as lipomobilization in the dogs.

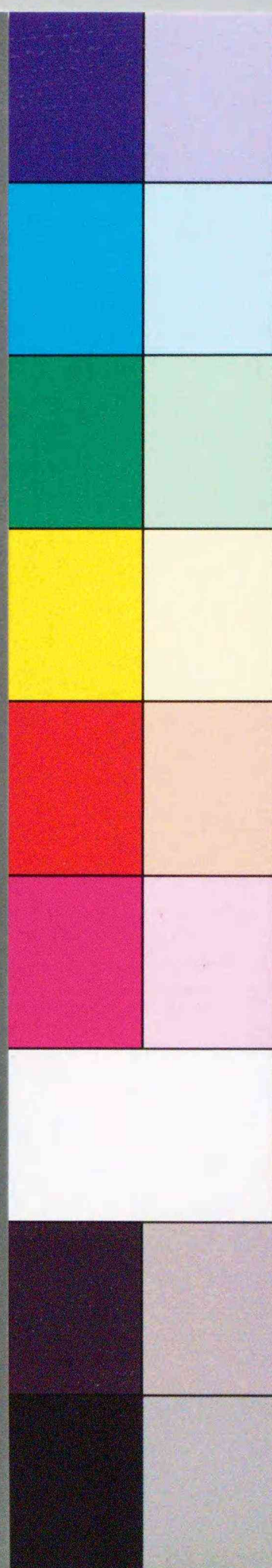




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

