

原著

高脂肪食給与により肥満させた犬の白血球中のインスリン感受性に関連する遺伝子発現量の変化

酒井美帆¹・森 伸子¹・山本一郎¹・川角 浩²・新井敏郎^{1*}

¹ 日本獣医生命科学大学 獣医生理化学教室,

² 日本獣医生命科学大学 動物医療センター特殊検査室

(受付 2011 年 1 月 20 日 / 受理 2011 年 2 月 20 日)

要約

肥満は慢性的炎症と捉えることができ、アディポネクチンの低下がインスリン抵抗性の要因であることが明らかとなっている。肥満した犬でも TNF α の上昇やアディポネクチンの低下が起こるが、インスリン感受性に関連する遺伝子にどのような影響を及ぼすかは明らかにされていない。犬 6 頭を高脂肪食給与により肥満させ、血中アディポネクチンおよびインスリン、炎症性サイトカイン濃度、白血球中のインスリン感受性に関連する遺伝子としてインスリン受容体基質 (IRS) とアディポネクチンレセプター (AdipoR) の mRNA 発現量の変化について調べた。その結果、アディポネクチンの変化よりも先に血中インスリンや白血球中の IRS の mRNA 発現量の方が大きく変動し、同時に炎症性サイトカインの発現量の増加が認められた。本実験により、肥満した犬でも人と同様に慢性炎症に伴いインスリン抵抗性が誘発されている事が示唆され、肥満に伴う炎症性変化が 2 型糖尿病などの発症につながる可能性も示唆された。

(予防動物医学 3 (1), 11-19, 2011)

キーワード：アディポネクチン, 犬, インスリン抵抗性, 炎症性サイトカイン, 肥満

略語：	ALP	alkaline phosphatase	G6PDH	glucose-6-phosphate dehydrogenase
	ALT	alanine aminotransferase	IL	interleukin
	AST	aspartate aminotransferase	IRS	insulin receptor substrate
	BUN	blood urea nitrogen	TNF	tumor necrosis factor
	FFA	free fatty acid		

近年、犬においても肥満が増加しており、アメリカでは飼育犬の約 33% に肥満が認められるという報告がある [1]。人では、肥満が糖尿病や癌など様々な病気のリスクファクターになることが分かっているが [2]、犬も同様であると思われる [3]。肥満はイ

ンスリン抵抗性を引き起こし、さらに 2 型糖尿病の発症原因となる。インスリン抵抗性を引き起こす原因として、アディポネクチンの減少と炎症性サイトカインの増加が挙げられる。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるサイトカイン (アディポサイトカイ

*連絡先 E-mail : tarai@nvl.u.ac.jp

〒180-8602 東京都武蔵野市境南町 1-7-1 TEL : 0422-31-4151 (内線 276) FAX : 0422-31-7841

ン)である。アディポネクチンには、インスリン感受性の亢進、癌抑制遺伝子の活性化など様々な作用があるが、肥満すると脂肪細胞が大型化しアディポネクチンの分泌が減り、血中のアディポネクチン濃度が低下するため、インスリン抵抗性を引き起こすと考えられている [4, 5]。犬でも人と同様に、肥満すると血中アディポネクチン濃度が低下することが明らかにされている [6]。また、アディポネクチンのレセプターとして2つの型、AdipoR1とAdipoR2が存在し、これらはAMPキナーゼ (AMPK) やPPAR- α を活性化することで末梢組織における脂肪酸の β -酸化やグルコースの取り込みを増加させる [7]。肥満時には、筋肉と肝臓でこのレセプターの発現量が増えることが分かっている [8]。

一方、肥満は一種の炎症であると言われているように、肥満時には、白血球が活性化され脂肪細胞にマクロファージなどが集積し [9]、脂肪細胞からも炎症性サイトカインが分泌され [10, 11]、これら炎症性サイトカインの作用によりインスリン抵抗性が増悪することも明らかとなっている [12, 13]。肥満した犬で、炎症性サイトカイン、インスリン抵抗性、アディポネクチンがどの様に変化するのかを調べるため、我々は犬に高脂肪食を給与して実験的に肥満させ、血液中のインスリン、アディポネクチン、炎症性サイトカイン濃度および白血球におけるインスリン感受性に関連する遺伝子発現量の変化を測定した。

材料と方法

1. 動物

日本獣医生命科学大学富士アニマルファーム (山梨県河口湖町) で飼育されているビーグル (雌) 6頭を試験に用いた。すべての動物は、健康であると診断された。市販のヘルスラボ犬用体脂肪計 (花王株式会社, 東京) で体脂肪率を測定し、体脂肪率25%未満を対照群 (3頭, 8歳), 体脂肪率25%以上を肥満群 (3頭, 3~5歳) とした。両群とも高脂肪食 (オリエンタル酵母株式会社, 東京に依頼して作成) を1ヵ月間、午前6時と午後2時の2回に分けて給餌し、1日の摂取エネルギー量が休息時エネルギー要求量 (RER) の3倍になるように調整した。RER (kcal)

は (体重 Kg)^{0.75} × 70 で求めた。高脂肪食の構成成分は表1に示した。

2. 血液サンプリング

血液サンプルは、朝の給餌前 (非飽食時) に頸静脈から5ml採血し、血液生化学検査用としてEDTA管に2.5ml、遺伝子発現量測定用としてパクスジーンRNA採血管 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 福島) に2.5ml集血した。血漿は4℃での遠心操作により分離し、その後-20℃で保存した。また、遺伝子発現量測定用のサンプルは-20℃で保存した。

3. 測定方法

血液生化学検査は12項目で、代謝産物として、トリグリセリド (TG), グルコース, 総コレステロール (T-cho), 遊離脂肪酸 (FFA), 総蛋白質, 尿素窒素 (BUN), クレアチニンを測定した。ホルモンは、インスリン, アディポネクチンを測定し、酵素はLDH, ALT, ASTを測定した。血液代謝産物および酵素はオリンパス AU680 auto analyzer (オリンパス株式会社 東京), FFAはNEFA-C test Wako (和光純薬, 東京), アディポネクチンはDog Adiponectin ELISA kit (CircuLex, 長野), インスリンはLbis Dog Insulin kit (シバヤギ株式会社, 渋川) により測定した。

インスリン感受性に関連する遺伝子として、白血球内のIRS-1, IRS-2, AdipoR1, AdipoR2, グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH), PI3キナーゼ (PI3K), IL-8, IL-6, TNF α , AMPK α , AMPK β , AMPK γ のmRNA発現量の変化を調べた。遺伝子発現量測定用の血液サンプルは、RNA抽出を行った後、cDNA合成キット (キアゲン, 東京) を使用してcDNA合成し、リアルタイムPCRにより遺伝

表1 餌の組成

組成	(%)
水分	8.4
灰分	6.9
粗脂肪	24.3
粗蛋白	22.9
粗繊維質	1.86

411.7 kcal/100g

牛脂は全体の20%を占め、粗脂肪の主な構成成分となっている

子発現量を測定した。リアルタイム PCR は Perfect Real Time SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用い, マニュアルに従って行った。リアルタイム PCR に使用したプライマーは表 2 に示すとおりである。遺伝子発現量は, トータル RNA 1 ng 中のコピー数として表した。

4. 統計解析

測定した結果は, 平均値±95%信頼区間で示した。統計学的有意性の判定は, 対応しない群の比較の場合は Unpaired t-test で, 対応する群の比較の場合は Paired t-test で行った。すべての検定は, Graph Pad Prism Version 4.0 (Graph Pad Software) を用い, P

< 0.05 を有意とした。

結果

犬では, 通常, 適正体重時の体脂肪率は 25% 以下とされている [14]。本実験ではその値をもとに, 高脂肪食の給与開始前に供試犬 6 頭を対照群 (体脂肪率 25% 以下) と肥満群 (体脂肪率 25% 以上) に分けた。しかし, 高脂肪食給与前において, 両群間で BCS や腹囲に差はみられなかった (表 3)。高脂肪食を 1 ヶ月間にわたり給与した結果, 両群とも高脂肪食給与前よりも体重は顕著に増加し, 体脂肪率も増えた。

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー配列

プローブ	PCR 産物の 大きさ (bp)	プライマー タイプ	プライマー配列	GenBank Acc.No.
IRS-1	81	Forward	acctgcgttcaaggaggtctg	XM_543274
		Reverse	cggtagatgccaatcaggttc	
IRS-2	177	Forward	tggcaggtgaacctgaagc	XM_542667
		Reverse	gaagaagaagctgtccgagtgg	
AdipoR1	247	Forward	cttctactgtccccacagc	XM_843263
		Reverse	catcacagccatgaggaaga	
AdipoR2	146	Forward	tccacaacctgtctcatct	XM_848936
		Reverse	tgattccactcagaccaagg	
G6PDH	140	Forward	gctacttogatgaatttgggatc	XM_538209
		Reverse	cactttaacaccttgaccttctcg	
PI3K	132	Forward	gcattaaaccagacctcattcagc	AB436616
		Reverse	gcgagtattggtcttcagtgttctc	
IL-8	233	Forward	tacaggtgaaaggcccagac	AF047047
		Reverse	caggttcagcacaagacca	
IL-6	166	Forward	ggagggaaaagatggatgct	U12234
		Reverse	caggatcttgggtactcatgtgc	
TNF- α	123	Forward	gcctcttctcctcctcctc	DQ923808
		Reverse	gggcaagagggtgattagt	
AMPK α	110	Forward	cctcaagcttttcaggatc	XM_536491
		Reverse	aatcaaatagctcctcctcctgaga	
AMPK β	122	Forward	ccaagatcctgatggacag	XM_543421
		Reverse	ggggctttatcattcacttcc	
AMPK γ	71	Forward	aagactcagagagtgggtttacat	XM_532769
		Reverse	actcgtgggaacgatgtca	

表3 高脂肪食給与前と給与後における変化

	体脂肪率25%以下(25%>)				体脂肪率25%以上(25%≤)			
	給与前		給与後		給与前		給与後	
体重 (kg)	13.8 ± 0.3	16.4 ± 0.1*	14.6 ± 0.7	17.8 ± 0.7**				
BCS	3.3 ± 0.4	4.0 ± 0.0	3.7 ± 0.4	3.8 ± 0.5				
体脂肪率 (%)	23.0 ± 0.0	32.0 ± 1.0*	29.0 ± 3.0	33.0 ± 4.0*				
腹囲 (cm)	50.7 ± 0.6	60.8 ± 1.2*	48.4 ± 2.2	58.2 ± 2.4**				

BCS はボディコンディションスコアを示す。

データは平均値± 95%信頼区間で示した。

* : それぞれのグループにおける高脂肪食給与前と給与後で有意差あり (p<0.05)。

統計処理は Paired t-test で行った。

** : 体脂肪率 25%未満だったグループの高脂肪食給与前と比較して有意差あり (p<0.05)。

統計処理は Unpaired t-test で行った。

肥満する前と後の血液生化学的変化として、肥満群においてインスリン濃度に有意な上昇がみられたが、グルコース濃度には特に変化がみられなかった (表3)。また、アディポネクチン濃度は両群とも肥満に伴いやや低下していたものの、有意差はなかった。代謝産物については、肥満群ではBUNおよびクレアチニンの低下が有意にみられたが、対照群ではクレアチニンのみが有意に低下していた。炎症性サイトカインであるTNF α の血中濃度は、検出限界以下の個体もあったが、全6頭の平均値は肥満後にやや上昇していた (P<0.05, データ表示なし)。

次に白血球中の遺伝子発現量の変化について調べた。肥満した後では、IRS-2の発現量は両群とも有意に上昇していたが、AdipoR1, R2の発現量は有意な差は認められなかった (図1)。IRS-1の発現量はIRS-2に比べて極めて低く、同一検体を測定しても値にばらつきが生じていた。G6PDHの発現量は両群とも顕著に増加していたが、AMPKは対照群のみで肥満に伴い有意に上昇していた。また、炎症性サイトカインでは両群ともTNF α やIL-8の発現量の増加がみられた。しかし、IL-6の発現量は非常に低く、検出限界以下の検体も存在していた (データ表示なし)。

考 察

犬および猫の肥満では、高脂血症がしばしば認めら

れる [15] が、本実験では高脂肪食を1ヵ月間給与した後に、T-choとTGに目立った変化は認められなかった (表4)。血液中の代謝産物として、BUNとクレアチニンの低下が見られた (P<0.05)。肥満マウスでは尿素回路の酵素活性が低下するという報告がある [16] ことから、BUNの低下は、高脂肪食による肥満で尿素産生が低下したためと考えられる。しかし、肝臓の障害を示唆する血中AST, ALT, ALP活性は大きく変動していなかったことから、肝障害に至る程の重度の肥満ではなかったと推測される。また、クレアチニンは筋肉へのエネルギー供給源であるクレアチンリン酸の代謝産物であることから、運動量や年齢などによる影響を受ける。それぞれの群内で年齢差は小さいため、年齢よりも肥満による運動量の減少がクレアチニンの変動に関わっていた可能性が示唆される。

肥満は脂肪細胞が慢性的に炎症を起こしている状態と考えられ、インスリン抵抗性を引き起こす要因になると言われている [17]。一方で、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンの血中濃度の低下がインスリン抵抗性を誘発することも明らかになっている [18, 19]。しかし、これまで犬の肥満時にアディポネクチンの低下、インスリン抵抗性、炎症性変化がどのような関わりを持って変化するのか明らかにされていなかった。本実験で、高脂肪食給与前と後で、血中ア

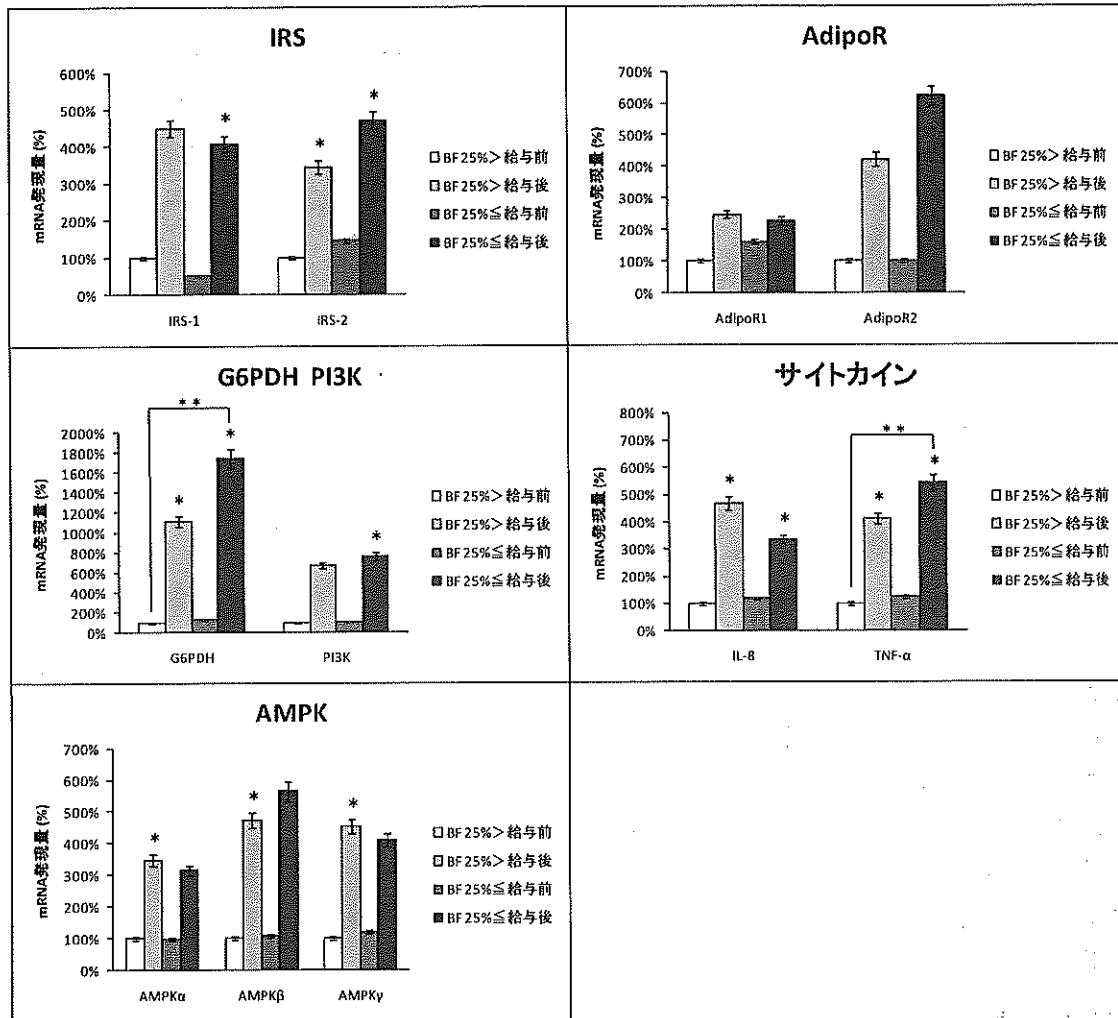


図1 高脂肪食給与後の白血球内 mRNA 発現量の変化

mRNA 発現量はトータル RNA 1 ng あたりのコピー数で求め、体脂肪率 25% 未満だったグループの高脂肪食給与前を 100% とし、パーセンテージで示した。データは平均値 ± 95% 信頼区間で示してある。統計処理はトータル RNA 1 ng あたりのコピー数を使用して行った。

* : それぞれのグループにおける高脂肪食給与前と給与後で有意差あり ($p < 0.05$)。統計処理は Paired *t*-test で行った。

** : 体脂肪率 25% 未満だったグループの高脂肪食給与前と比較して有意差あり ($p < 0.05$)。統計処理は Unpaired *t*-test で行った。

ディボネクチンおよびインスリン濃度、また、白血球の炎症性サイトカインなどの遺伝子発現量を調べた結果、高脂肪食給与後の肥満群において、血中インスリン濃度の上昇と血中アディポネクチン濃度の低下では、血中インスリンの上昇に有意差が現われていた (表 4)。また、白血球のインスリン受容体基質 IRS-1、IRS-2 とアディポネクチンレセプター AdipoR1、AdipoR2 の mRNA 発現量についても、IRS-1 および IRS-2 でのみ有意に発現量が増加していた (図 1)。

白血球の働きが活発な状態では、白血球のグルコース輸送体 (GLUT) の発現量が増加し [20]、TNF α や IL-1 などは末梢組織のインスリン抵抗性を高めることが分かっている [12]。この 2 つの変化により、グルコースは再分配され、白血球により多くのグルコースが取り込まれるようになる。本実験において、高脂肪食給与後は、グルコース代謝を亢進させる酵素である G6PDH や AMPK の mRNA 発現量が増加していたことから、白血球におけるエネルギー代謝が活性化し

表4 高脂肪食給与前と給与後における血液生化学的変動

項目		体脂肪率 25%>		体脂肪率 25%≤	
		給与前	給与後	給与前	給与後
Glucose	(mg/dL)	93 ± 3.0	103 ± 3.5	100 ± 2.0	104 ± 6.0
Triglyceride	(mg/dL)	50 ± 3.0	55 ± 10	43 ± 1.0	75 ± 18
Total cholesterol	(mg/dL)	201 ± 22	205 ± 15	172 ± 13	210 ± 11
BUN	(mg/dl)	16 ± 0.0	10 ± 2.0	19 ± 2.0	10 ± 0.0**
Creatinine	(mg/dL)	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0*	0.7 ± 0.0**	0.6 ± 0.0*
Total protein	(g/dL)	6.0 ± 0.2	6.3 ± 0.4	6.6 ± 0.2	7.0 ± 0.2**
AST	(U/L)	33 ± 1.0	41 ± 5.0	33 ± 3.0	39 ± 5.0
ALT	(U/L)	120 ± 40	159 ± 46	48 ± 9.0	48 ± 7.0
ALP	(U/L)	35 ± 13	61 ± 15	10 ± 5.0	9.0 ± 5.0
FFA	(mEq/L)	0.6 ± 0.02	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.07	0.7 ± 0.3
Adiponectin	(μg/mL)	16 ± 6.2	13 ± 5.8	18 ± 7.0	14 ± 4.9
Insulin	(ng/mL)	1.2 ± 0.3	2.1 ± 0.7	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3*

データは平均値± 95%信頼区間で示した。

* :それぞれのグループにおける高脂肪食給与前と給与後で有意差あり (p<0.05)。

統計処理は Paired t-test で行った。

** :体脂肪率 25%未満だったグループの高脂肪食給与前と比較して有意差あり(p<0.05)。

統計処理は Unpaired t-test で行った。

ていると考えられ、サイトカインである IL-8 および TNF α の遺伝子発現量の増加が見られたことから、炎症反応に伴い白血球が活性化した状態であるといえる。その炎症反応に対応するために IRS の発現量を増やし、白血球へのグルコース取り込みを増やしていたと考えられる。今回、GLUT の遺伝子発現量は測定していないが、IRS の発現量に伴い PI3K の発現量も増加していたことから、おそらく GLUT の発現量も増加していたと予想される。今後、肥満した犬において実際に白血球の GLUT 発現量が増えるのか検討する必要がある。

肥大した脂肪細胞は、CD8 陽性の T 細胞を増殖させることが分かっている [9]。脂肪細胞に集まった CD8 陽性 T 細胞はマクロファージを集積させ、脂肪細胞に炎症を起こす。この白血球の集積により、脂肪細胞からも炎症性サイトカインである TNF α やケモカインである MCP-1 が分泌され、また遊離脂肪酸などが分泌されて、さらに炎症を悪化させることが分かっている [10]。肥満マウスを用いた Haiya らの実験で、血中インスリンの増加よりも先に炎症性サイト

カインやケモカインの発現量の増加がみられることが報告されており [17]、また、犬の脂肪細胞は炎症性サイトカインによく反応し、TNF α に長時間暴露されるとアディポネクチンの遺伝子発現量が低下すること [11] や TNF α がインスリン抵抗性を上昇させる可能性があること [21] が報告されている。本実験の結果では、高脂肪食給与後に血中アディポネクチンの低下よりも先に血中インスリンの上昇に有意差が生じ、また、インスリン抵抗性と同時に白血球内の炎症性サイトカインの発現量増加が顕著にみられた。白血球の活性化が組織におけるインスリン抵抗性を亢進させ、さらに脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌低下を引き起こしつつある状態であったと考えられる。しかし、血中 TNF α 濃度に関しては、検出限界以下の犬もいたことから、さらに検体数を増やし、再検討する必要がある。肥満させた犬が、本実験と同じ様な血液動態で血中 TNF α の上昇に有意差があらわれれば、犬においても脂肪の過剰蓄積から起こる慢性的な軽度の炎症が肥満に起因する病気の発症につながることを示唆される。

脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインには、アディポネクチンの他にレプチンもある。人では脂肪の増加に伴い血中レプチン濃度が上昇することが分かっており [22]、犬においても同様の変化がみられる [23]。その作用もアディポネクチンとは逆にインスリン抵抗性を高めることが分かっている [24]。インスリン抵抗性が生じる原因として、TNF α などのサイトカイン以外にもレプチンが関わっているため、今後、肥満時におけるレプチンの変動についても検討する必要がある。

謝 辞

本実験を行うにあたりご協力いただいた日本獣医生命科学大学動物栄養学教室 木村信熙教授、獣医内科学教室 水谷 尚講師および動物管理を担当して下さった日本獣医生命科学大学富士アニマルファームの職員に深謝する。

引用文献

1. Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Klausner, D.S., 2006. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *International Journal of Applied research in Veterinary Medicine* 4: 177-186
2. Kopelman, P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404 (6778): 635-643
3. German, A.J., Ryan, V.H., German, A.C., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2010. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *Veterinary Journal* 185 (1): 4-9
4. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B., Kadowaki, T., 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8 (11): 1288-1295
5. Kelesidis, I., Kelesidis, T., Mantzoros, C.S., 2006. Adiponectin and cancer: a systematic review. *British Journal of Cancer* 94 (9): 1221-1225
6. Ishioka, K., Omachi, A., Sagawa, M., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., Saito, M., 2006. Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. *Research in Veterinary Science* 80 (2): 127-132
7. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terachi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., Kadowaki, T., 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769
8. Bullen, J.W., Jr., Bluher, S., Kelesidis, T., Mantzoros, C.S., 2007. Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292 (4): E1079-1086
9. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, ., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., Nagai, R., 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 15 (8): 914-920
10. Suganami, T., Nishida, J., Ogawa, Y., 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (10): 2062-2068
11. Ryan, V.H., German, A.J., Wood, I.S., Hunter, L., Morris, P., Trayhurn, P., 2010. Adipokine expression and secretion by canine adipocytes: stimulation of inflammatory adipokine production by LPS and TNF α . *European Journal of Applied Physiology* 102 (3): 603-616
12. Ling, P.R., Bistrrian, B.R., Mendez, B., Istfan, N.W., 1994. Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat: relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake. *Metabolism* 43 (3): 279-284
13. Tilg, H., Moschen, AR., 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Molecular Medicine* 14 (3-4): 222-231
14. Burkholder, W.J., Toll, P.W., 2001. 第13章 肥満. 本好茂一 監修, 小動物臨床栄養学 第4版, 学窓社 (東京), pp. 459-492

15. Johnson, M.C., 2005. Hyperlipidemia disorders in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 18: 1053-1060
16. Barber, T., Vina, J.R., Vina, J., Cabo, J., 1985. Decreased urea synthesis in cafeteria-diet-induced obesity in the rat. *Biochemical Journal* 230: 675-681
17. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1821-1830
18. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20: 1595-1599
19. Yang, W.S., Lee, W.J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C.L., Tai, T.Y., Chuang, L.M., 2002. Plasma adiponectin levels in overweight and obese Asians. *Obesity Research* 10 (11): 1104-1110
20. Maratou, E., Dimitriadis, G., Kollias, A., Boutati, E., Lambadiari, Y., Mitrou, P., Raptis, S.A., 2007. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *European Journal of Clinical Investigation* 37 (4): 282-290
21. German, A.J., Hervera, M., Hunter, L., Holden, S.L., Morris, P.J., Biourge, V., Trayhurn, P., 2009. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domestic Animal Endocrinology* 37 (4): 214-226
22. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P.A., Friedman, J.M., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1 (11): 1155-1161
23. Ishioka, K., Hosoya, K., Kitagawa, H., Shibata, H., Honjyoh, T., Kimura, K., Saito, M., 2007. Plasma leptin concentration in dogs: Effects of body condition score, age, gender and breeds. *Research in Veterinary Science* 82: 11-15
24. Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401 (6748): 73-76

Changes in mRNA Expression of Factors Related to Insulin Sensitivity in Peripheral Leukocytes from Obese Dogs Fed on High-fat Diet

Miho Sakai¹, Nobuko Mori¹, Ichiro Yamamoto¹,
Koh Kawasumi² and Toshiro Arai^{1*}

¹Laboratory Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine,

²Special Reference Laboratory, Animal Medical Center,

Nippon Veterinary and Life Science University

(Received January 20, 2011/Accepted February 20, 2011)

Abstract

Obesity is associated with a state of chronic and low-grade inflammation. Inflammation is considered to have a pivotal role in the development of metabolic diseases and decreased adiponectin induces a state of insulin resistance. In obese dog, as in human, plasma TNF- α concentrations increase and plasma adiponectin levels decrease. However, the relationship between these hemodynamic alternations and the expression levels of insulin sensitive candidate genes in white blood cell are unclear. To investigate the relationship, we measured the adiponectin levels, the insulin levels, the inflammatory cytokine levels in plasma and the expression levels of insulin sensitive candidate genes such as insulin receptor substrate (IRS) and adiponectin receptor (AdipoR) in white blood cell from six dogs fed a high fat diet. In the results, there were significantly difference in the plasma insulin levels and the expression levels of IRS before adiponectin levels were decreased significantly. Moreover, weight gain led to significant increase in the expression levels of inflammatory cytokine. These results indicate that the chronic inflammation induces insulin resistance in obese dog, as in human. This inflammatory change in obese dog may cause the onset of metabolic diseases such as type 2 diabetes.

(*Jpn. J. Prophy. Vet. Med.* 3 (1), 11-19, 2011)

Key words: adiponectin, dog, insulin resistance, inflammatory cytokine, obesity

Abbreviations:

ALP	alkaline phosphatase	G6PDH	glucose-6-phosphate dehydrogenase
ALT	alanine aminotransferase	IL	interleukin
AST	aspartate aminotransferase	IRS	insulin receptor substrate
BUN	blood urea nitrogen	TNF	tumor necrosis factor
FFA	free fatty acid		

* Correspondence to: E-mail : tarai@nvl.u.ac.jp