

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07988

研究課題名(和文) インスリン感受性の低下における成長ホルモン作用メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of growth hormone action in the reduction of insulin sensitivity

研究代表者

塚田 光 (Tsukada, Akira)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：20343212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2つのGHR異常ニワトリをGSP系統に戻し交配することによりコンジェニック系統を作出した(15世代の戻し交配)。この2系統は肝臓IGF-1mRNA合成に関わるGHR細胞内情報伝達が異なる事がわかっている。GTT, ITTを行った結果、インスリン感受性はSTAT5のみのリン酸化疎外系統の方が強い事がわかった。すなわち、GHR細胞内ドメインには様々な情報伝達物質の結合が予想され、それらが複雑に働く。肝臓でのGHに依存的遺伝子を網羅的に解析した。GST、PLG、GLG-1、cEST159o8、DDX5、FGB、2AB56、CALM2、C1S、CYP3A37、COMTなど興味深い遺伝子が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

伴性型矮性鶏の原因がGH受容体(GHR)であり、その2つの対立遺伝子を同定した。しかし、その作用メカニズムは明らかでない。GHRの細胞内情報伝達経路、全身性に発現するGHRの末梢作用などである。この2系統を用いることでGH-GHR作用、末梢組織での多様な作用、分子メカニズムが明らかにできる。特に肝臓を中心とした糖代謝のメカニズムを明らかにすることにより、GHの成長作用を明確に提示できる。さらに近年健康ブームにより、糖などの栄養素代謝機構へのGH作用が見直されてきている、GHR欠損鶏の生理的基礎情報を収集することでその分子メカニズムを解明し畜産業、医療に貢献する。

研究成果の概要(英文)：A congenic line was created by backcrossing two GHR abnormal chickens to a GSP line (15th generation backcross). It is known that these two lines differ in GHR intracellular signal transduction involved in liver IGF-1 mRNA synthesis. As a result of GTT and ITT, it was found that the insulin sensitivity was stronger in the phosphorylated alienation line of STAT5 only. That is, various signaling substances are expected to bind to the intracellular domain of GHR, and they act in a complicated manner. GH-dependent genes in the liver were comprehensively analyzed. Interesting genes such as GST, PLG, GLG-1, cEST159o8, DDX5, FGB, 2AB56, CALM2, C1S, CYP3A37, and COMT were found.

研究分野：家畜生理

キーワード：成長ホルモン 成長ホルモン受容体 JAK2 STAT5 ニワトリ ITT GTT

## 1. 研究開始当初の背景

GH は個体の正常な発育を促すホルモンとして古くから知られており、その作用も多岐にわたることが示唆されている。また、ニワトリを含む家禽や畜産動物の増体率の向上は産業形質/経済形質そのものである。しかしながら、その作用メカニズム、各標的組織での分子応答や機能発現機構についてはほとんど明らかになっていない。ニワトリは古くから矮性品種が多く報告されている(Burnside et al. 1992 GCE, Hunag et al. 1993 ME, Hull et al. 1993 JE, Agarwal et al. 1994 JOE, Goddard et al. 1996 JME, Tanaka et al. 1996 Endocrinology, Tahara et al. 2009 JPS)が、その研究は原因遺伝子が GHR であることを示すのみにとどまっている。申請者は国内に保存されている矮性鶏を調査し、2つの異なる GHR 突然変異品種を同定した(Thara et al. 2009 JPS;正常 GHR と、膜結合しない GHR、細胞内領域に異常がある GHR)。同定した品種は GHR 正常鶏に比べ体が小さく(体重は約 50%)、足が短いことが特徴である。採食量も GHR 正常鶏の半分であり(栄養効率は同等)、より少ない餌で食卵等の効率の良い生産も期待される(Thara et al. 2009 JPS)。また、その生理的基礎データを得ており、血糖値や各種血中脂質成分に違いが見られた。これらの結果は個体成長を考える上で GH が細胞の増殖・分化を直接刺激するだけでなく、必要な栄養素を摂取・利用するメカニズムにも関与していることを示唆するものである。一方、GH のエネルギー代謝への関与は臨床的には古くから示唆されている。GH 過剰分泌患者(末端肥大症)においてインスリン感受性が低下し糖尿病を誘発する。同定したニワトリをもちいたインスリン負荷試験により GHR 異常鶏においてインスリン感受性が上昇することを確認している。

## 2. 研究の目的

GHR は多くの組織に発現する受容体であり GH の標的器官はほぼ全身であることが知られているがその分子メカニズムはほとんど解明されていない。本申請は、肝臓・脂肪組織・筋肉・膵臓を中心とした糖代謝経路における GH の作用メカニズムを明らかとすることとした。申請者らは現在までに、ニワトリ GHR 異常系統を用い、肝臓における成長ホルモンの分子応答メカニズムをインスリン様成長因子-I(IGF-I)結合タンパク質 4(IGFBP4)において部分的に明らかにしている、さらに、肝臓における GH 依存的な遺伝子をいくつか同定している。

この中には糖の代謝経路に關与する遺伝子も含まれており、これらを解析することにより、GH の糖代謝制御への関わりをより明らかにできる。また近年、アディポサイトカイン発見とともに脂肪組織が巨大な内分泌器官として位置づけられ、個体におけるインスリン抵抗性やエネルギー代謝メカニズムが見直されてきている。本申請課題は家禽の鶏肉生産や飼料効率に貢献するばかりでなくヒトの疾患モデル動物の開発にもつながる。

個体の正常な発育には細胞の増殖・分化が正常に行われる必要がある。成長に関する内分泌学的研究(各成長ステージでのホルモンの分泌動態に関わる研究)はよく知られているが、栄養素の需要と同化作用の関係を内分泌学的観点から考察した情報は少ない。本申請では、特に古くから知られている、GH とインスリン(Ins)に着目し、成長ホルモンの細胞の増殖・分化に関わる作用と栄養素(特に糖代謝に関わる)同化作用を解明する。また近年 Ins-Ins 受容体-Irs 作用の感受性に関する研究が多くなされている。それらの中には GH 依存的発現が示唆されているものも少なくない。また、細胞内情報伝達経路にも多くの共通点がみられる。GH と Ins は糖代謝系では相反する作用を持つことも知られている。栄養素の同化という観点からこの二つのホルモンの関わりを明らかにしたい。GHR 欠損モデル動物は成長ホルモンの感受性がなく血中 Ins 濃度が極端に低い、個体成長に関わる同化作用が低下しているという点から二つのホルモンの関わりを知るのに最適なモデル動物である。さらに GHR 欠損鶏を用い糖代謝のメカニズム(血糖の調節、糖の貯蔵、エネルギー産生、糖新生)を肝臓、筋組織、脂肪組織、膵臓、下垂体の相互作用といった組織のクロストークに注目して解明していく。肝臓で矮性鶏特有の発現遺伝子を探索(マイクロアレー)し、GH 依存的糖代謝関連遺伝子を選別しその機能を明らかにする。

GH の成長作用をより明確にすることは鶏肉生産に直結する重要課題である。このことを理解するためには栄養素の摂取、その同化作用を深く理解する必要がある。本研究では現在までに同定した2つのタイプの GHR 異常系統を用い、GHR 正常鶏との比較を通しそのメカニズムを考察できる。さらに、GH と Ins 作用に焦点を絞りその作用における分子メカニズムを解明する。このことは他の畜産動物やヒトの疾患・健康維持に関わる実験動物としても有用である。現在までの報告でヒトの GH 過剰症(巨人症・末端肥大症)では糖尿病を誘発することがわかっている。産業動物・実験動物であるニワトリを用いることでこの現象を確認できる。またその分子メカニズムをより詳細に検討できる。

今回用いる GHR 欠損鶏は孵化直後の体重は GHR 正常鶏と同じであるが GH 分泌・効果が現れ始めるにつれその体重が有意に低くなる。このことは GH が摂食行動(栄養素の供給)に関わると示唆するが、個体・臓器・細胞が要求する栄養素量を摂食中枢にフィードバックしているとも考えられる。この GHR 欠損鶏を用いることにより、GH の個体成長、栄養素の同化、エネルギー代の解明のブレークスルーになる。

現在、世界各国でニワトリ品種の維持が困難になってきている。このことについて世界の著名な研究者らが nature 誌にて警鐘を鳴らしている。日本は有数の家禽品種保有国であり、これら

の特殊系統を維持管理することは遺伝子資源の保存の観点からも重要である。また、それらのユニークな形質をより深く理解することがこれらの品種・系統の存在意義を高めることになる。

### 3. 研究の方法

2つのGHR異常ニワトリをGSP系統に戻し交配することによりコンジェニック系統を作出した(15世代の戻し交配)。この2系統は肝臓IGF-1 mRNA合成に関わるGHR細胞内情報伝達が異なる事がわかっている。すなわち、JAK2-STAT5のリン酸化疎外系統とSTAT5のみのリン酸化疎外である。作成した2系統のコンジェニック系統を用いてGTT, ITTを行う。また組織重量を比較すると共に、糖の貯蔵器官におけるグリコゲンを測定する。膵臓、脂肪組織等の組織切片を作成し、その特徴を把握、形態学的観点から考察する(GHR異常鶏と正常鶏の比較) 3)肝臓・筋組織・脂肪組織・膵臓におけるGH依存的候補遺伝子をマイクロアレー法により探索する。候補遺伝子の作用を推測し、細胞の増殖・分化、糖の代謝系に関わる遺伝子を抽出する。以上によりGHによる糖の代謝メカニズムを網羅的に解明する。

### 4. 研究成果

2つのGHR異常ニワトリをGSP系統に戻し交配することにより作出したコンジェニック系統を用いた。この2系統は肝臓においてJAK2-STAT5のリン酸化疎外系統とSTAT5のみのリン酸化疎外でありIGF-1 mRNA合成が全く見られない。組織重量の比較、グリコゲン量、組織切片の比較GTTなど様々な検討を行なったが、両矮性系統には大きな差は見られなかった。ITTのみにその作用に違いが見られた。インスリン感受性は肝臓においてJAK2-STAT5のリン酸化疎外系統よりもSTAT5のみのリン酸化疎外系統の方が強い事がわかった。すなわち、GHR細胞内ドメインには様々な情報伝達物質の結合が予想され、それらが複雑に働くことで様々な生理作用の調整を行なっていると考えられる。

肝臓重量は両GHR変異ニワトリで減少するものの体重比ではGHR正常ニワトリとの差は見られない。しかしながら生体内でのGH依存的なIGF-1産生の主役であり、糖の貯蔵器官として重要な組織であることから肝臓でのGHに依存的に合成されるmRNAの同定が必要である。網羅的にその発現が変化する候補mRNAをいくつか同定した。同定した遺伝子にはGST、PLG、GLG-1、cEST159o8、DDX5、FGB、2AB56、CALM2、C1S、CYP3A37、COMT mRNAなど興味深い遺伝子が見られた。今後インスリン抵抗性へ関与について詳細を検討する必要がある。両コンジェニック系統で差が見られる遺伝子としてSSP2とSerpina1が候補に上がった。これらの遺伝子の働きを解明することはインスリン抵抗性に関わるGH作用を解明する一助になるとともにGHの多様な作用の解明に資するものである。候補遺伝子のさらなる解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuyama H, Khan MSI, Tsukada A, Tachibana T	4. 巻 198
2. 論文標題 Heat exposure alters the mRNA expression of growth- and stress-related genes in chicks、	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Livestock Science	6. 最初と最後の頁 97-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.livsci.2017.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚田光・香取尚久・小酒井貴晴
2. 発表標題 伴性型矮性ニワトリの血糖調節と血中脂質の調査
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚田光
2. 発表標題 成長ホルモン受容体異常ニワトリをもちいたグルコース・インスリン負荷試験
3. 学会等名 2017年度日本家禽学会秋季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----