

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06350

研究課題名(和文)ニワトリの抱卵期における自発的低エネルギー状態への適応戦略の解明

研究課題名(英文) Analysis of the adaptation for the spontaneous low-energy state in chickens during incubation behavior

研究代表者

大久保 武 (Ohkubo, Takeshi)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70233070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニワトリの生理的低エネルギー状態(抱卵)への適応とCRP及びレプチンとの関連性について解析を行った。その結果、CRPが摂取エネルギーを反映するマーカーであることを明らかにし、CRP発現の様子から抱卵中の肝臓の代謝が特異的に変化している可能性を見出した。その一方で、鳥類では哺乳類とは異なり、CRPとレプチンとの相互作用によりエネルギー代謝を制御する可能性は低いと考えられた。さらにCRPとレプチンのmRNA発現は神経回路構築が起こる発生後期から視床下部で増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ニワトリが抱卵中の自律的なエネルギー摂取の抑制とそれに対する適応に炎症性マーカーの一つであるC反応性タンパク質(CRP)が関与する可能性を見出したもので、ニワトリの生殖とエネルギー摂取との関連を明らかにするうえで、学術的な意義は高い。さらに本研究では、発生後期のニワトリ胚視床下部でCRPとレプチンがともに増加することを今回初めて明らかにした。発生後期の視床下部における両因子の役割は明らかでなく、脳の機能発達と両因子の関係解明に向けた研究の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the relationship between CRP and leptin was analyzed to clarify the adaptation of chickens to the physiological low-energy state (incubation behavior). As a result, it was found that CRP is a marker reflecting energy intake and that the liver metabolism may be altered specifically during incubation behavior based on the result of CRP mRNA expression. On the other hand, unlike mammals, the interaction between CRP and leptin is not associated to regulate energy metabolism in birds. Furthermore, it was revealed that mRNA expression of CRP and leptin increases from late development in the hypothalamus chick embryos when neural circuit construction occurs.

研究分野：動物生理学

キーワード：CRP レプチン エネルギー代謝 ニワトリ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抱卵中のニワトリでは、摂食低下による体重減少と卵巣機能の低下が生じるため、抱卵は生産上排除すべき形質と考えられている。我々は、ニワトリの抱卵制御の分子機構の解明による生産性のさらなる向上を目指し、抱卵鶏の視床下部で特異的に発現が変動する遺伝子について網羅的な解析を行い、ヒトでは炎症の指標として知られる C-reactive protein (CRP) の mRNA 発現が抱卵中に増加することを見出した。哺乳類では血中 CRP の増加は糖尿病と関連するとされ、レプチン投与による肥満マウス (*ob/ob*) の体重抑制効果はレプチンと CRP の同時投与で軽減し [1]、CRP はレプチン及びレプチン受容体と結合してその作用を阻害する [2]。

一方、抱卵中のニワトリでは、血中プロラクチン (PRL) 濃度が高値を示し [3]、産卵鶏に PRL を脳室内投与すると摂食が低下する [4]。ヒトでは高 PRL 血症の患者の血中 CRP 濃度の上昇が認められている [5]。しかし、これまでの研究のほとんどは血中 CRP とレプチンなどのホルモンとの関連性について言及したものであり、脳内で発現する CRP の生理的意義についてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、抱卵中のニワトリが自発的に摂食を抑制して低エネルギー状態へ適応することに着目し、脳内 CRP とレプチン情報伝達の関連性について解析し、中枢性 CRP が摂食及びエネルギー代謝制御に関与するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

エネルギー摂取量と CRP 発現の関連性の解析：

産卵、抱卵、抱卵と同水準の飼料を給与した制限給餌の 3 種類の異なる生理状態のウコッケイから視床下部及び肝臓を採取して全 RNA を調整した。得られた全 RNA を鋳型に RT-qPCR を行い、視床下部の CRP mRNA の発現及び各種摂食制御因子の mRNA 発現を解析し、抱卵と人為的なエネルギー制限 (制限給餌) が視床下部の CRP 発現に対する影響と摂食関連因子との関係について検討した。

肝臓から調整した全 RNA を用いて、CRP 及びレプチン受容体 mRNA 発現を RT-qPCR により解析し、低エネルギー適応と末梢性の CRP の関係について検討した。

肝臓の CRP 発現に対するレプチンの影響：

ニワトリ肝がん細胞 (LMH) を 0、10、100 mg/mL のレプチンで 24 時間刺激した後、細胞を回収し、全 RNA を調整した。得られた全 RNA を鋳型に RT-qPCR を行い、レプチンが CRP mRNA およびレプチン受容体 mRNA の発現に直接影響するかを検討した。

白色レグホーンのヒナにレプチンを 0、25 及び 250 mg/kg 体重の濃度で腹腔内投与し、24 時間後に肝臓を採取し、全 RNA を調整した。調整した全 RNA を鋳型に RT-qPCR を行い、ニワトリ生体においてレプチンが肝臓の CRP mRNA およびレプチン受容体 mRNA の発現を変化させるかについて解析した。

レプチン情報伝達に対する CRP の影響：

ニワトリ CRP 発現ベクター及びニワトリレプチン発現ベクターを構築し、ニワトリレプチン受容体発現細胞 (LEPR 細胞) に同時導入した。遺伝子導入の 24 時間後に細胞を回収して全細胞抽出液を調整した。そしてウェスタンブロットにより全 STAT3 及びリン酸化 STAT3 の検出を行った。

ニワトリ CRP 発現ベクター及びニワトリレプチン発現ベクターをそれぞれ CHO 細胞に導入し、遺伝子導入の 24 時間後に培養上清を回収した。回収した培養上清で、LEPR 細胞を 0 分、30 分及び 60 分間刺激し、その後細胞を回収し全細胞抽出液を調整した。上述と同様に、ウェスタンブロットにより全 STAT3 及びリン酸化 STAT3 を検出した。

以上により、レプチン情報伝達の活性化に対する CRP の影響を検討した。

CRP 発現に対する絶食の影響：

白色レグホーンのヒナを 6 時間または 24 時間絶食させた後、視床下部を採取し、全 RNA を調整した。調整した全 RNA を鋳型に RT-qPCR を行い、CRP mRNA 及びレプチン mRNA の発現を解析した。

胚発生に伴う視床下部 CRP 及びレプチン発現の変動：

孵卵 16 日目から孵化後 3 日まで経時的に視床下部を採材し、全 RNA を調整した。調整した全 RNA を鋳型に RT-qPCR を行い、胚発生に伴う CRP 及びレプチン発現の推移を解析した。

4. 研究成果

エネルギー摂取量と CRP 発現の関連性の解析

トランスクリプトーム解析では、視床下部における CRP mRNA 発現は産卵群と抱卵群との間で有意な差が認められていたが、今回の結果では個体間で発現量の差が著しく、CRP 発現の有意な変動は確認できなかった。しかしながら、肝臓における CRP mRNA 発現は、抱卵時と同水準の飼料を与えた制限給群では、産卵群と抱卵群に比べて有意に増加する事を新たに見出した。このことは肝臓では、自発的な摂食抑制（抱卵）と人為的な摂食抑制（制限給餌）で CRP の応答性が異なることを示しており、肝臓の代謝が生理的な低エネルギーへの適応する機構を有している可能性が示された。

肝臓では制限給餌により CRP とレプチン受容体の mRNA 発現が増加することを認めたため、肝臓における CRP mRNA 発現に対するレプチンの影響についてニワトリ由来肝がん細胞株（LMH）を用いて解析した。その結果、肝臓の CRP mRNA 発現は先行研究と同様に高濃度（100 ng/mL）のレプチン処理により低下する傾向が示されたが（図 1A）、この時レプチン受容体発現には変化が認められなかった。

一方、腹腔内への高濃度（250ug/kg 体重）のレプチン投与によりレプチン受容体発現は増加する傾向を認めたが、その変化は有意ではなかった。また、CRP mRNA 発現はレプチン投与による変化は認められなかった（図 1B）。

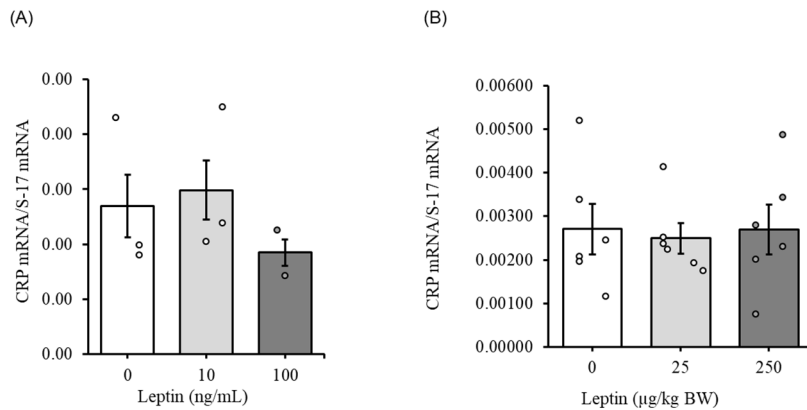


図 1 肝臓 CRP mRNA 発現に対するレプチンの影響
(A): LMH 細胞、(B): ニワトリヒナ肝臓

レプチン情報伝達に対する CRP の影響

ニワトリ CRP 発現ベクターとニワトリレプチン発現ベクターを LEPR 細胞に同時導入し、同細胞における STAT3 のリン酸化を経時的に解析した。この時リン酸化 STAT3 は検出されたが CRP とレプチンとの相互作用の結果として期待される STAT3 のリン酸化の低下は認められなかった（図 2A）。さらに、レプチンと CRP をそれぞれ発現させた CHO 細胞の培養上清で LEPR 細胞を刺激したところ、レプチン発現培養上清の添加は STAT3 のリン酸化が経時的に増加させた。CRP 発現細胞の培養上清を添加しても STAT3 のリン酸化は認められなかった。またレプチン発現培養上清と CRP 発現培養上清を同時に LEPR 細胞に添加した場合、STAT3 のリン酸化は認められたが、リン酸化の程度はレプチン培養上清のみで刺激した場合と同程度であり、CRP によるレプチン情報伝達への影響は認められなかった（図 2B）。

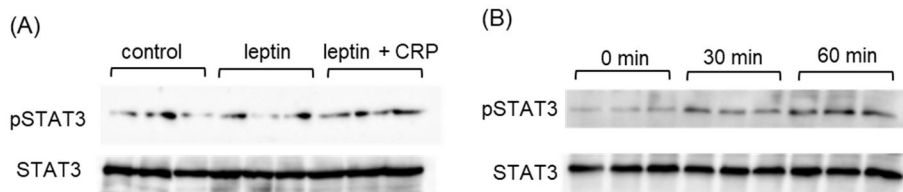


図 2 STAT3 のリン酸化に対するレプチン及び CRP の影響
(A) レプチン及び CRP 発現ベクターを導入した LEPR 細胞
(B) レプチン及び CRP 発現細胞培養上清で処理した LEPR 細胞後

CRP 発現に対する絶食の影響：

卵用系統である白色レグホーンの子を 6 時間絶食させた場合には視床下部の CRP mRNA 発現に変化は認められなかったが、24 時間の絶食では CRP 発現が有意に減少した（図 3）。この結果は、ロードアイランドレッドの一系統で行われた先行研究の結果と一致していた [6]。視床下部の CRP 発現は低エネルギーに対して応答する分子であることが強く示唆された。この結果は先行研究の抱卵鶏と産卵鶏の視床下部を用いたトランスクリプトーム解析の結果とは類似したが、用いた抱卵、制限給餌及び産卵の 3 ステージのウコッケイ視床下部での CRP 発現の変動と

は異なっており、結果の再現性については課題が残った。したがって低エネルギーに対して視床下部のCRPが応答するかについてはさらなる検討が必要である。

一方、視床下部のレプチン発現は6時間及び24時間の絶食により変化は認められず、レプチン発現とCRP発現との関連性は見いだせなかった。

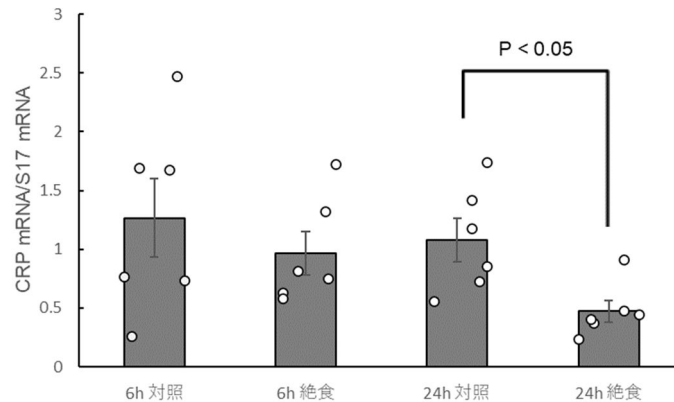


図3 視床下部CRP mRNA発現に対する6時間または24時間絶食の影響

胚発生に伴う視床下部CRP及びレプチン発現の変動：

また哺乳類では、胎児期の摂食回路の形成にレプチンが関与する。そこで、発生後期の白色レグホーン視床下部におけるCRPとレプチン発現について経時的に解析した。視床下部のレプチン発現は孵卵16日から孵化まで経時的に増加し、孵化後3日目まで高い発現が維持された。一方CRP発現はレプチンと同様に孵卵16日から孵化まで経時的に増加する傾向を示したのちに、餌付け開始後にはその発現が低下することを認めた。

以上、本研究ではニワトリの生理的低エネルギー状態（抱卵）への適応とCRP及びレプチンとの関連性について解析を行ったが、哺乳類で認められているCRPとレプチンとの相互作用は認められなかったが、CRPは哺乳類と同様にニワトリでも摂取エネルギー状態を反映するマーカーである可能性が示された。哺乳類では、絶食などの低エネルギー状態で血中レプチンの低下が認められている。しかしながら鳥類では血中レプチン濃度が哺乳類と比較して低く、局所的に作用するホルモンであると指摘されている [7]。そのため鳥類ではレプチンとCRPとの相互作用によるエネルギー代謝が哺乳類と異なる可能性があることを見出した。一方、肝臓でのCRP発現は、摂取エネルギー水準は同等であるにもかかわらず、抱卵と制限給餌では異なっており、肝臓の代謝が抱卵に適応するために特異的に変化している可能性を見出した。抱卵中のニワトリでは血中プロラクチン濃度が高濃度で維持されているが [3]、プロラクチンが脂質代謝に影響を与えることがニワトリで示されている [8]。一方、鳥類では、プロラクチンとCRPとの関連について検討した。これまでに認められないが、健康的肥満のヒトでは血中プロラクチン濃度及び高感度CRPはそれぞれ高値及び低値を示す [9]。ニワトリの抱卵も病的な状況ではないと考えられることから、今後プロラクチンとCRPとの関係性を明らかにできれば、抱卵中の代謝変動の適応機構が明らかにできる可能性があると考えられた。

さらに、発生後期のニワトリ視床下部では、レプチンとCRPのmRNA発現はともに孵化にかけて増加し、摂食開始後には低下する発現パターンを示した。発生後期は脳内回路の形成に重要であり [10]、様々な神経ペプチドの発現が孵化に向けて増加する [11]。本研究において、視床下部のCRP mRNA発現が絶食に応答して変化することを認めているため、CRPがニワトリの摂食に応答する神経回路の構築に関与する可能性があると考えられた。

参考文献

- [1] Chen et al., Nat Med., 12: 425-432. 2006.
- [2] Sudhakar et al., Front Immunol. 9:1167. 2018.
- [3] Sharp et al., J Endocrinol. 80: 51-57. 1979.
- [4] Denbow, Poult Sci. 65: 1197-1200. 1986.
- [5] Perić et al., Endocr Res. 41: 200-206. 2016.
- [6] Sintubin et al., Neuropeptides. 48: 213-220. 2014.
- [7] Seroussi et al., Endocrinology. 157:737-751. 2016.
- [8] Sotowska-Brochocka et al., Exp Clin Endocrinol. 88: 316-324. 1986.
- [9] Liu et al., Endocr Connect. 10: 484-491. 2021.
- [10] De Groef et al., Mol. Cell. Endocrinol., 293: 17-24, 2008
- [11] Ellestad et al, Gen Comp Endocrinol. 171: 82-93. 2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Greene E. S., Zampiga M., Sirri F., Ohkubo T., Dridi S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Orexin system is expressed in avian liver and regulates hepatic lipogenesis via ERK1/2 activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76329-2	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

1. 著者名 Takeda Misa, Ohkubo Takeshi	4. 巻 90
2. 論文標題 Identification of hypothalamic genes in associating with food intake during incubation behavior in domestic chicken	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1293 ~ 1302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ahmadi Sadequillah, Takeda Misa, Ohkubo Takeshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Determination of Polymorphisms in Pituitary Genes of the Native Afghani Naked Neck Chicken	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 253 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0180087	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有馬 明莉、曳地結衣、神作宜男、大久保武
2. 発表標題 ニワトリ後期胚の発生におけるNPW及びNPBWR2発現変動と生理機能変化の可能性
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神作宜男、大久保武、河上真一
2. 発表標題 ニワトリ発生胚下垂体に対するVIPアンタゴニストのPRL分泌抑制作用
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ahmadi Sadequillah、Ohkubo Takeshi
2. 発表標題 Leptin stimulates ovarian insulin-like growth factor-1 mRNA expression and promotes primordial follicle development in juvenile chicks
3. 学会等名 日本家禽学会2022年度春季大会
4. 発表年 2022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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関