

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06354

研究課題名(和文) Toll様受容体リガンドを利用したニワトリヒナにおける感染時の摂食抑制機構の解明

研究課題名(英文) Studies of infection-associated anorexia in chicks using ligands for toll-like receptors

研究代表者

橘 哲也 (Tachibana, Tetsuya)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：80346832

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、ニワトリが病原性微生物に感染した際の食欲不振機構を解明することを目的として、TLRリガンドの作用を調べた。まず、サイモサン、レンキモドおよびフラジェリンがニワトリヒナの摂食を抑制することを見出した。これらの作用機序を解明するため、肥満細胞およびNOの機能について調べたところ、肥満細胞の脱顆粒やNOの過剰産生がヒナの摂食を抑制することを見出した。ただし、NOがTLRリガンドによる摂食抑制に関与していないことを明らかにした。最後に、TLRリガンドによって変動する脳内生理活性物質の遺伝子発現の変化を網羅的に探索し、間脳における甲状腺ホルモンの作用が亢進している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染時の食欲低下は家禽生産に負の影響を及ぼすものであるが、その機構については不明であった。本研究ではTLRリガンドが食欲不振を引き起こすことを明らかにしたことから、自然免疫の活性化が食欲低下に関わっていることを見出した。また、肥満細胞およびNOの作用についても明らかにした。さらに、自然免疫の活性化に伴って脳内の甲状腺ホルモンの作用が亢進する可能性を見出した。以上のように、ニワトリヒナの自然免疫に新しい情報を与えたとともに、免疫系と中枢神経系の関係性の解明の糸口を見出すことができた。これらの結果を基に、自然免疫系の調節が感染時のニワトリヒナの生産性の維持に貢献する可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the effect of ligands for toll-like receptors in order to clarify the anorexigenic mechanism induced by infection in chicks. First, it was found that zymosan, resiquimod and flagellin induce anorexia in chicks. Second, mast cell and nitric oxide (NO) are related to the decrease in food intake in chicks, although NO did not mediate the anorexia induced by TLR ligand. Finally, thyroid hormone was found to be a candidate to mediate the effect of TLR ligand in the brain of chicks.

研究分野：畜産学

キーワード：ニワトリヒナ 摂食行動 toll様受容体 家畜行動学 家畜栄養学

1. 研究開始当初の背景

ニワトリが効率的に成長・生産するためには、適切な量の飼料を摂取し、さらにそれを利用することが不可欠である。しかし、ニワトリの摂食行動は体内外の様々な因子による影響を受ける。例えば、ニワトリが病原性微生物に感染すると、食欲不振や嗜眠、体温の変化、消化管機能の低下が生じ、生産性が低下する。しかし、ニワトリの感染時に見られる食欲不振のメカニズムについては不明な点が多い。

感染時の食欲不振のメカニズムとして、体内に侵入した微生物の増殖による臓器の機能不全、微生物が産生する毒素による影響、微生物によって引き起こされる免疫反応、の三点が考えられる。免疫反応に関わる物質として、インターロイキンなどの炎症性物質が挙げられる。すなわち、微生物の感染によって炎症性物質の合成・分泌が増加し、それらが動物の摂食調節機構に影響を与えるという、「感染時の摂食調節ネットワーク」があると考えられている。

この「感染時の摂食調節ネットワーク」で重要な役割を果たすと考えられているのが微生物特有の成分を受容するパターン認識受容体である。パターン認識受容体の例として toll 様受容体 (TLR) があり、哺乳類の研究により TLR のリガンドが摂食を抑制することが報告されている。実際に、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) は TLR ファミリーの 1 つである TLR4 に結合することで、哺乳類やニワトリにおいて様々な免疫反応を引き起こすのみならず、食欲不振や消化管機能の低下などの生理的变化を引き起こす。ただし、TLR には様々なサブタイプが存在しており、細菌由来のフラジェリンや真菌成分であるザイモサンをリガンドとして受容することができるものもある。しかし、TLR に結合する病原性微生物の成分のうち、LPS 以外のものがニワトリの摂食行動やその他の生理反応に与える影響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

本研究では、TLR に結合する様々なリガンドを利用して、ニワトリが病原性微生物に感染した際の食欲不振のメカニズムを解明することを目的とした。そのために、様々な TLR リガンドがニワトリヒナの摂食行動に影響を与えるかを調べ、TLR リガンドによる摂食抑制モデルの確立を行い、そのモデルを利用して、感染時の食欲不振に関わる生理活性物質の探索を行うことで、感染時の食欲低下のメカニズムの解明を行った。

3. 研究の方法

研究には 5~9 日齢の卵用種オスヒナを用いた。また、本研究では、細菌由来の LPS (TLR4 リガンド)、細菌由来のフラジェリン (TLR5 リガンド)、真菌由来のザイモサン (TLR2 リガンド)、ウイルス性の poly I:C (TLR3 リガンド) および抗ウイルス剤であるレシキモド (TLR7 リガンド) を用いた。

1) ニワトリヒナにおける TLR リガンドによる摂食抑制モデルの構築

TLR リガンドによるヒナの摂食抑制モデルの確立を目標として、ザイモサン、レシキモドおよびフラジェリンが摂食を抑制するかを調べた。各 TLR リガンドをヒナに腹腔内投与し、その後の摂食量を測定した。

また、感染時の一般的な反応として行動量の低下、体温の変化、飼料の消化管通過の低下および血中コルチコステロン濃度の上昇といった行動および生理反応の変化が見られるため、上記の TLR リガンド投与後の反応を調査した。ヒナに各 TLR リガンドを腹腔内投与し、その後の行動量を自発運動量測定装置で測定した。同様に、ヒナに TLR リガンドを投与して直腸温の変化を調べた。飼料の消化管通過については、15 時間絶食したヒナに各 TLR リガンドを腹腔内投与し、その直後に経口投与飼料をそのう内に注入した。その 2 時間後にそのう内容物を採取して、飼料のそのう通過率を測定した。血中コルチコステロン濃度については、ヒナに各 TLR リガンドを腹腔内投与し、その 6 時間後に採血を実施して血漿を得た。血漿中コルチコステロン濃度を酵素免疫測定法で測定した。

2) TLR リガンドによる食欲低下のメカニズムの解明

(1) 一酸化窒素 (NO) の関与

まず、NO ドナーであるニトロプルシドナトリウム (SNP) をヒナに腹腔内投与し、体内で NO を過剰に産生させた場合の摂食量、直腸温および飼料のそのう通過について調べた。

次いで、ヒナに LPS、フラジェリン、ザイモサン、poly I:C またはレシキモドを腹腔内投与し、その 6 時間後に採血して血漿を得た。血漿を除タンパク質し、還元酵素で処理した後に、Griess 法にて NO の代謝産物 (NOx) 濃度を測定した。

さらにヒナに LPS、ザイモサン、poly I:C またはレシキモドを腹腔内投与し、その 3 時間後に間脳、肝臓、膵臓、心臓、腎臓および肺を採取し液体窒素で急速凍結した。これらの臓器が

ら全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成して、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、神経型 NOS (nNOS) および内皮型 NOS (eNOS) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて調べた。

最後に TLR リガンドと iNOS の関係性を明らかにするため、ヒナにザイモサン、poly I:C またはレシキモドと iNOS 阻害剤である S-メチルイソチオ尿素硫酸 (SMT) を同時投与し、その後の血漿中 NOx 濃度を測定した。また、poly I: またはレシキモドと SMT を同時投与した後の摂食量の測定および血漿中コルチコステロン濃度の測定を行った。

(2) TLR リガンドによって発現が変動する脳内生理活性物質の遺伝子の網羅的探索

ヒナに LPS を腹腔内投与し、その 3 時間後に間脳を採取して液体窒素で急速凍結させた。全 RNA を抽出した後に RNAseq 解析に供した。

その結果、甲状腺ホルモンの合成酵素 (DIO2) およびその受容体の遺伝子発現量が増加したことが明らかになったため、これらの遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法にて確認した。さらに、活性型甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン (T3) を脳室内投与した後の摂食量と直腸温の変化を調べた。

4. 研究成果

1) ニワトリヒナにおける TLR リガンドによる摂食抑制モデルの構築

ザイモサン、レシキモドおよびフラジェリンのいずれを腹腔内投与した場合でも、ヒナの摂食量が有意に低下した (図 1)。このことから、TLR2、TLR7 および TLR5 のいずれを活性化させた場合でもヒナの食欲が低下することが明らかとなった。

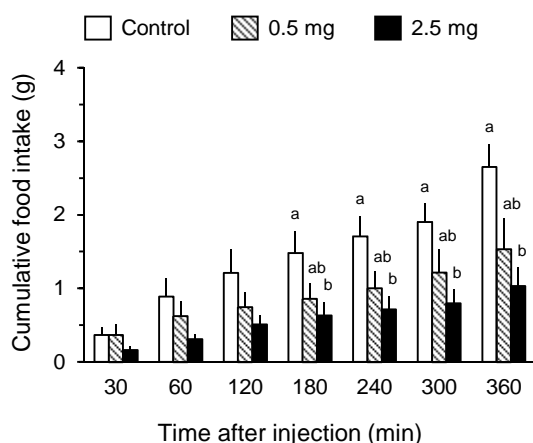


図1 ザイモサンの腹腔内投与による摂食量の変化
値は平均値 ± 標準誤差を示す (各群7-10羽)。各時間において異符号間に有意差あり (P<0.05)。

また、ザイモサン、レシキモドおよびフラジェリンを腹腔内投与すると自発運動量が有意に低下したことから、これらの TLR リガンドはヒナの行動を抑えることで食欲を低下させている可能性が示唆された。直腸温については、ザイモサンとフラジェリンを腹腔内投与した場合には上昇し、レシキモドでは低下した。また、ザイモサン、レシキモドおよびフラジェリンの腹腔内投与により飼料のそのう通過率が低下すること、および血漿中コルチコステロン濃度が増加することが明らかとなった。以上のことから、TLR2、TLR7 および TLR5 の活性化は感染時に見られる一般的な行動的および生理的反応の変化に関わっていることが明らかとなった。

以上のことから、TLR4 (LPS) および TLR3 (poly I:C) に加え、TLR2、TLR7 および TLR5 の活性化によるヒナの摂食抑制モデルの確立に成功したと判断した。

2) TLR リガンドによる食欲低下のメカニズムの解明

(1) NO の関与

NO ドナーである SNP をヒナに腹腔内投与したところ、摂食量が低下し、直腸温が低下し、さらに飼料のそのう通過率が低下した。これらの反応は TLR リガンドによる反応と類似していたため、TLR リガンドの作用に NO が関与している可能性が示唆された。

ヒナに LPS、フラジェリン、ザイモサン、poly I:C またはレシキモドを腹腔内投与し、その 6 時間後に採血して血漿中 NOx 濃度を測定したところ、いずれの TLR リガンドも NOx 濃度が有意に増加した。このことから、これらの TLR リガンドは NO の産生を促すことが明らかとなった。なお、LPS またはザイモサンを投与した 24 時間後の血漿中 NOx 濃度は対照区と同等の値であったことから、TLR リガンドによる NO 産生は一過性であることが明らかとなった。

次に、どの臓器において NO が産生されているかを明らかにするため、肝臓、脾臓、心臓、腎臓および肺において NOS の遺伝子発現量を調べた。その結果、LPS では肝臓、脾臓、腎臓および肺で、ザイモサンでは肝臓、脾臓および肺で、poly I:C では肝臓、脾臓、腎臓および肺で、レシキモドでは肝臓、腎臓および肺で iNOS の遺伝子発現量が増加した (図 2)。これに対し、

eNOS および nNOS 遺伝子発現量は一部の臓器を除いて変化がない、または有意に減少した。

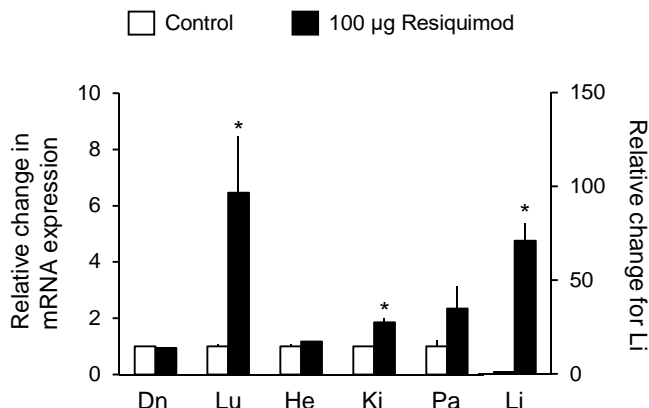


図2 レシキモドの腹腔内投与によるiNOS遺伝子発現量の変化値は平均値 ± 標準誤差を示す(各群8羽)。*Controlと比べて有意差あり(P<0.05)。Dn: 間脳、Lu: 肺、He: 心臓、Ki: 腎臓、Pa: 膵臓、Li: 肝臓。

さらに、ザイモサン、poly I:C またはレシキモドと iNOS 阻害剤である SMT を同時投与した後の血漿中 NOx 濃度を調べたところ、いずれも SMT によって NOx 濃度の増加が見られなくなった(図3)。以上の結果から、TLR リガンドによる NO の産生は、iNOS の発現を促すことで行われることが明らかとなった。

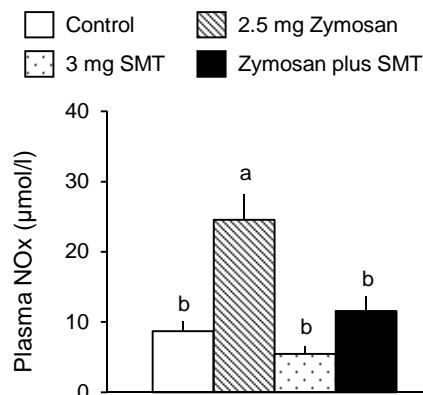


図3 ザイモサンとSMTの投与による血漿中NOx濃度の変化値は平均値 ± 標準誤差を示す(各群8-10羽)。異符号間に有意差あり(P<0.05)。

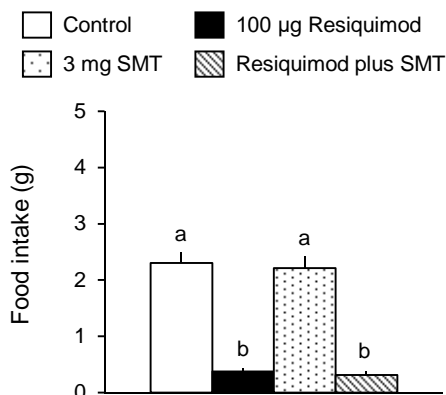


図4 レシキモドとSMTの投与による摂食量の変化値は平均値 ± 標準誤差を示す(各群8-10羽)。異符号間に有意差あり(P<0.05)。

そこで、poly I:C またはレシキモドと SMT を同時投与した後の摂食量の変化を調べたところ、

いずれのTLRリガンドによって摂食量の低下が見られたが、これに対してSMTは何の影響も示さなかった(図4)。したがって、poly I:Cおよびレシキモドによる摂食量の低下にはiNOS由来のNOが関与していないことが明らかとなった。

(2) TLRリガンドによって発現が変動する脳内生理活性物質の遺伝子の網羅的探索

LPSを腹腔内投与されたヒナの間脳を対象としてRNAseq解析を実施した結果、対照区で740万、LPS区で694万のリード数が得られ、17108種の遺伝子を検出することができた。これをニワトリゲノムデータにマッピングしたところ、9153個の遺伝子を特定することができた。この遺伝子のうち、349個の遺伝子がLPSによって発現が有意に変化しており、そのうち260遺伝子が増加し、89遺伝子が減少したことが明らかとなった。GO解析の結果、LPSに対する反応やサイトカインに対する反応、炎症反応などの9つの機能がLPSの影響を受けるものであることが明らかになった。さらに、Pathway解析の結果、アルギニン生成やグリセロ脂質代謝など6つの代謝経路が変化したことが明らかとなった。

LPSによって発現量が変化した遺伝子のうち、生理活性物質に関するものを探索したところ、NOや甲状腺ホルモンなど6つの生理活性物質を特定することができた。NOについては(1)の研究でTLRリガンドによる食欲不振に関与していない可能性が示唆されたため、今後は甲状腺ホルモンに着目して研究を進めることにした。

まず、LPSによる間脳の甲状腺ホルモン合成酵素(DI02)および甲状腺ホルモン受容体の遺伝子発現量の変化を確認するためリアルタイムPCRを実施したところ、両者はRNAseq解析と同様に有意に増加した。以上のことから、LPSは間脳におけるT3の合成を促す可能性が示唆された。なお、甲状腺における甲状腺ホルモンの合成もLPSによって変化する可能性が考えられたため、LPS投与後の甲状腺における甲状腺ホルモン合成酵素(甲状腺ペルオキシダーゼ、TPO)の遺伝子発現量も調べたが、TPOおよびDI02もLPSによる有意な変化が見られなかった。したがって、LPSは体全体の甲状腺ホルモンの合成に影響を与えるのではなく、間脳においてのみ影響を与える可能性が示唆された。また、末梢臓器における甲状腺ホルモンの受容体の遺伝子発現量についても調査したが、甲状腺ホルモン受容体は肝臓で低下し、心臓、肺および脾臓で有意に増加した。一方、甲状腺ホルモン受容体の遺伝子発現量は肝臓、腎臓および脾臓で有意に低下した。以上のことから、LPSによって間脳のみならず末梢臓器においても甲状腺ホルモンの作用が変化していると考えられた。

最後に、T3を脳室内投与した後の摂食量の変化を調べたところ、T3によって有意に増加することが明らかとなった。一方で、T3の脳室内投与は直腸温に影響を与えなかった。摂食抑制作用を有するLPSを脳室内投与したところ、摂食を促進するT3の合成酵素の遺伝子発現量が増加したことから、間脳のT3はLPSによる摂食抑制作用を緩和させるために合成が増加した可能性がある。感染時の間脳内T3の正確な作用については今後の研究が必要である。

3) 総括

本研究により、様々なTLRリガンドによる摂食抑制モデルをヒナで確立することができた。それらの摂食抑制作用に関わる生理活性物質および摂食調節ネットワークに関わる生理活性物質として、NOと甲状腺ホルモンに着目した。NOおよび甲状腺ホルモンのいずれもヒナの摂食行動に影響を与えることが見出したが、これらがTLRリガンドの摂食抑制作用に関与していることを明らかにすることはできなかった。以上のことから、TLRはヒナの摂食調節に関与していることを明らかにしたが、そのメカニズムについては今後の研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 120.Tachibana T, Nakatani A, Islam Khan MSI, Makino R, Cline MA.	4. 巻 72
2. 論文標題 Behavioral and physiological responses to intraperitoneal injection of zymosan in chicks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 106471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.domaniend.2020.106471.	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 該当する
1. 著者名 123.Tachibana T, Takahashi M, Takeda K, Ogino M, Khan MSI, Makino R, Cline MA.	4. 巻 62
2. 論文標題 Effect of zymosan on feed passage in the digestive tract in chicks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Poultry Science	6. 最初と最後の頁 414-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00071668.2020.1863336.	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 該当する
1. 著者名 Tachibana T, Takeda K, Khan MSI, Makino R, Cline MA.	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of toll-like receptor-7 agonists on feeding behaviour, voluntary activity, cloacal temperature and crop emptying in chicks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Poultry Science	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00071668.2020.1720907.	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 該当する
1. 著者名 Tachibana T, Hirai M, Tomita A, Ishimaru Y, Khan MSI, Makino R, Cline MA.	4. 巻 211
2. 論文標題 Physiological responses to central and peripheral injections of compound 48/80 and histamine in chicks.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiology and Behavior	6. 最初と最後の頁 112681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2019.112681.	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 該当する

1. 著者名 Tachibana T, Khan MSI, Makino R, Cline MA	4. 巻 237
2. 論文標題 Behavioral and physiological responses to peripheral injection of flagellin in chicks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiology and Behavior	6. 最初と最後の頁 113433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2021.113433.	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 該当する

1. 著者名 Takahashi M, Khan MSI, Makino R, Cline MA, Tachibana T	4. 巻 261
2. 論文標題 Role of nitric oxide on zymosan-induced inhibition of crop emptying in chicks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology - Part A	6. 最初と最後の頁 111057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2021.111057.	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋哲也・牧野良輔・モハメド シャキル イスラム カーン
2. 発表標題 フラジェリン22の腹腔内投与がニワトリヒナの行動および生理反応に与える影響
3. 学会等名 第70回関西畜産学会京都大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋真紀・牧野良輔・橋哲也
2. 発表標題 ザイモサンによる飼料の消化管通過抑制における一酸化窒素の役割
3. 学会等名 第70回関西畜産学会京都大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中谷愛・橋哲也・牧野良輔
2. 発表標題 真菌成分であるザイモサンがニワトリヒナの行動、血中成分および脾臓のサイトカイン遺伝子発現量に与える影響
3. 学会等名 第70回関西畜産学会京都大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋哲也・牧野良輔・モハメド シャキル イスラム カーン
2. 発表標題 フラジェリンの腹腔内投与がニワトリヒナの行動および生理反応に与える影響
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 高橋真紀・牧野良輔・橋哲也
2. 発表標題 真菌由来成分であるザイモサンがニワトリヒナにおける飼料の消化管通過に与える影響
3. 学会等名 第69回関西畜産学会鳥取大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋哲也・中谷愛・牧野良輔・モハメド シャキル イスラム カーン
2. 発表標題 ザイモサンの末梢投与がニワトリヒナの摂食行動および生理反応に与える影響
3. 学会等名 日本家禽学会2020年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋哲也・山田大輝・高橋真紀・牧野良輔・モハメド シャキル イスラム カーン
2. 発表標題 一酸化窒素供与体の脳室内投与がニワトリヒナの行動および生理反応に与える影響
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋真紀・牧野良輔・モハメド シャキル イスラム カーン・橋哲也
2. 発表標題 過剰な一酸化窒素はニワトリヒナの摂食行動および飼料のそのう通過に影響を与える
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大輝・高橋真紀・牧野良輔・橋哲也
2. 発表標題 リポポリサッカライドに対する反応に関わる脳内生理活性物質の次世代シーケンサーによる網羅的探索
3. 学会等名 第71回関西畜産学会神戸大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋哲也・山田大輝・高橋真紀・牧野良輔・モハメド シャキル イスラム カーン
2. 発表標題 細菌感染の影響を受けるニワトリヒナ脳内生理活性物質の探索
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋哲也・高橋真紀・牧野良輔・シャキル カーン
2. 発表標題 レシキモドは誘導型一酸化窒素合成酵素の 発現を誘導して一酸化窒素の産生を促す
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
---------	---------