

令和元年6月12日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07983

研究課題名(和文) アディポカインによる家禽の下垂体機能制御に関する研究

研究課題名(英文) Study on the regulation of pituitary function in chicken by adipokine, leptin

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニワトリの下垂体ホルモン遺伝子の発現及び卵巣の機能発達に対するレプチンの作用を解析した。その結果、レプチンによる下垂体ホルモン mRNAの発現変動は日齢や系統などにより異なっており、これらの制御は下垂体への直接作用と、視床下部を介した間接制御が協調して行っている可能性を見出した。さらに、レプチンは時期特異的に視床下部-下垂体-性腺軸に作用して、幼若期の卵巣機能の発達に寄与する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類におけるレプチンの生理機能については未だ十分には明らかにされていないが、レプチンがニワトリ下垂体へ作用することにより、成長や生殖などの生理反応を制御する可能性を見出したことは、今後の家禽内分泌学の進展に寄与するものである。特に、レプチンが幼若期のニワトリ卵巣の機能発達に影響を与えることを示した成果は、成長期の栄養制御が、性成熟の早期化による産卵成績の改善に繋がる可能性を示すものであり、学術的な価値は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of leptin on the expression of pituitary hormone gene and the functional development of ovaries in chicken. The mRNA expression of pituitary hormones was differentially regulated by leptin on age, strain and so on. This leptin dependent mRNA expression was suggested to be coordinately regulated by direct action to pituitary gland and indirect action through hypothalamus. Furthermore, it was revealed that leptin acts on the hypothalamus-pituitary-gonad axis in an age specific manner to develop the ovarian function in juvenile chick.

研究分野：動物生理学

キーワード：レプチン ニワトリ 下垂体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

栄養摂取状況の変化は成長や生殖機能に影響を与えるが、その作用は視床下部 下垂体系による神経内分泌支配を受けている。その中でもアディポカインの1つであるレプチンは、哺乳類では飽食シグナルとして知られ、ヒトでは肥満の改善や生活習慣病の予防など、医療への応用が期待されている。また家畜・家禽では、レプチンによる生産性の改善等、実用面での応用が期待されている。

家禽において、性成熟は体脂肪量と関連することが明らかにされているが、レプチン投与は絶食により生じる産卵の停止を遅延させ、また幼若期の採卵鶏メスへのレプチン投与は初回排卵の早期化を促すことが報告されている。これらの結果は、レプチンが栄養摂取の状況に応答した情報として視床下部に伝えられ、それが下垂体を通じて性腺の機能を改変させた可能性を示唆している。またレプチンは、ニワトリの成長ホルモン (GH) 産生細胞の細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、GH の分泌に影響することが示されている。我々はこれまでに、ニワトリレプチン受容体の情報伝達の詳細を明らかにするとともに、鳥類のレプチン遺伝子の同定、鳥類の血中レプチン様活性の検出など、鳥類のレプチンシステムに関する数多くの研究成果を挙げてきた。その中で、レプチン受容体タンパク質の検出により、ニワトリ脳及び下垂体が哺乳類と同様にレプチンの標的器官であることも明らかにしている。また、株化細胞を用いた解析では、レプチンが転写因子 Pit-1 の存在下で、ニワトリ成長ホルモン遺伝子のプロモーターを活性化することから、レプチンが下垂体機能を直接制御する可能性を見出している。しかしながら、レプチンと下垂体ホルモンによる成長や生殖の協調的な制御に関する知見は乏しく、鳥類のレプチンの生理機能についても十分には明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ニワトリの下垂体ホルモン遺伝子の発現に対するレプチンの影響について解析し、レプチンの視床下部 下垂体系への作用機構を明らかにすることを目的とした。さらに、レプチンが視床下部 下垂体軸を介して生殖機能の制御に関与するかと明らかにするために、レプチン投与による卵巣の機能発達と視床下部 下垂体 性腺軸の制御について検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 初代下垂体細胞を用いた下垂体ホルモンの遺伝子発現に対するレプチンの影響評価

ブロイラーオスヒナ及び白色レグホーンメスヒナから抽出した下垂体から細胞を調整し、10% FBS を含む DMEM 培地で培養した。細胞は 0、10、100 ng/mL のレプチンで 6 時間処理し、その後細胞を回収し、全 RNA 及び細胞溶解液を調整した。抽出した全 RNA は逆転写 定量 PCR (RT-qPCR) に供し、成長ホルモン (GH) 及びプロラクチン (PRL) の mRNA 発現を解析した。細胞溶解液はウエスタンブロットに用い、レプチン処理によるリン酸化 STAT3 の検出を試みた。

#### (2) 器官培養下垂体を用いた下垂体ホルモンの遺伝子発現に対するレプチンの影響評価

10 日齢のブロイラーのオスヒナから抽出した下垂体を 10% FBS を含む M199 培地を用いて器官培養に供した。0、10、100 ng/mL のレプチンで下垂体を 6 時間処理したのち、全 RNA を抽出し、成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL)、LH $\beta$ 、FSH $\beta$ 、TSH $\beta$ 、POMC の各下垂体ホルモン遺伝子の mRNA 発現を逆転写 定量 PCR により検討した。さらに、レプチン刺激による、レプチン、レプチン受容体 (LEPR) の mRNA 発現も同様に解析した。

#### (3) 視床下部 下垂体 性腺軸に対するレプチンの影響評価

体重 1 kg 当たり 25  $\mu$ g または 250  $\mu$ g のレプチンを、卵巣の機能分化が生じる 7 日齢及び 28 日齢の白色レグホーンメスヒナの腹腔内に投与し、投与 24 時間後の視床下部における GnRH、GnIH および LEPR、下垂体の LH $\beta$  と FSH $\beta$ 、及び卵巣の FSH 受容体、CYP19A1 の各 mRNA 発現を RT-qPCR により解析した。また採材時に血液を回収し、血中エストラジオール濃度を測定した。

#### (4) レプチンの脳室内投与が視床下部及び下垂体の遺伝子発現に及ぼす効果の検証

レプチンが幼若期ニワトリにおける視床下部 下垂体 性腺軸の活性化に影響する可能性を認めことから、2.5  $\mu$ g または 5.0  $\mu$ g のレプチンを白色レグホーンメスヒナの脳室内に投与し、投与 24 時間後の視床下部の GnRH、GnIH、下垂体の LH $\beta$  と FSH $\beta$  及び糖タンパク質ホルモン  $\alpha$  サブユニット (GSU) の mRNA 発現を RT-qPCR により検討した。併せて、下垂体では GH、PRL、TSH $\beta$ 、POMC の mRNA 発現を解析し、(1) と (2) の結果と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 初代下垂体細胞を用いた下垂体ホルモンの遺伝子発現に対するレプチンの影響評価

1 日齢と 10 日齢のブロイラーオスヒナの下垂体細胞の PRL mRNA 発現はレプチンに応答した変化を示さなかった。一方、GH mRNA 発現は、1 日齢のブロイラーヒナでは、レプチン刺激により低下する傾向を確認できたが、10 日齢ではレプチン刺激による変化は認められなかつ

た。一方 PRL mRNA 発現は、レプチンに対する応答は 1 日齢の下垂体細胞では認められなかったが、10 日齢では 10 ng/mL の濃度のレプチン処理により PRL mRNA 発現が増加する傾向を見出した。白色レグホーンメスヒナでは、PRL mRNA 発現は、10 及び 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、GH mRNA 発現はレプチン処理による変化は認められなかった。

これらより、レプチンによるニワトリ下垂体ホルモンの mRNA 発現は、日齢や系統等により異なる制御を受けている可能性が示された。

### (2) 器官培養下垂体を用いた下垂体ホルモンの遺伝子発現に対するレプチンの影響評価

10 日齢のプロイラーオスヒナの下垂体における GH mRNA 発現はレプチン処理による変化は認められなかったが、PRL mRNA 発現は、10 ng/mL の濃度のレプチン処理により増加する傾向を示したが、100 ng/mL のレプチン処理では、その発現量は対照群 (0 ng/mL) と同程度であった (図 1)。これらの結果は初代下垂体細胞を用いた結果と同様であり、GH 遺伝子と PRL 遺伝子は類似の転写制御機構を有しているが、レプチンに対する応答は独立していることが示された。

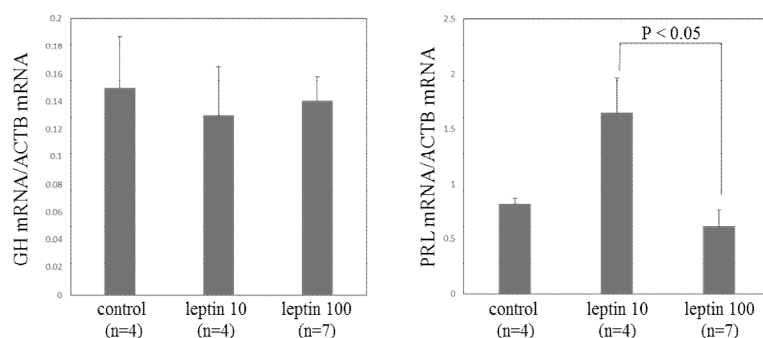


図1 培養ニワトリ下垂体のGH及びPRL mRNA発現に対するレプチンの効果

またレプチンは、FSHβ mRNA 発現を有意に減少させたが、LHβ の発現はレプチンにより変化しないことが確認された (図 2)。また POMC mRNA 発現は 10 ng/mL のレプチン処理で有意に増加したが、100 ng/mL の処理ではその効果が認められなかった。さらに TSHβ はレプチン濃度依存的に発現が増加する傾向を示した。

一方、下垂体のレプチン発現は 10 ng/mL のレプチン処理により減少する傾向を示し、LEPR 発現はレプチン濃度依存的に発現が増加する傾向が認められた。

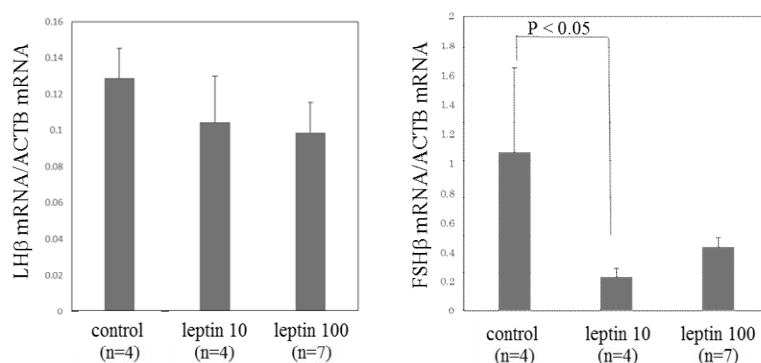


図2 培養ニワトリ下垂体のLHβ及びFSHβ mRNA発現に対するレプチンの効果

### (3) 視床下部 下垂体 性腺軸に対するレプチンの影響評価

視床下部の LEPR、GnRH、GnIH の mRNA 発現は、7 日齢及び 28 日齢のいずれにおいてもレプチン投与による有意な変化を示さなかった。7 日齢ヒナ下垂体では、25 µg/kg 体重のレプチン投与により LHβ mRNA 発現の有意な増加が認められたが、FSHβ mRNA の発現は 25 µg/kg 体重及び 250 µg/kg 体重のいずれのレプチン投与においても有意な変化は認められなかった。

7 日齢の卵巣における LEPR mRNA 発現は、25 及び 250 µg/kg 体重のレプチン投与により有意に増加した一方で、28 日齢の卵巣では、レプチンは濃度依存的に LEPR mRNA 発現を減少させた。また 7 日齢の卵巣の FSH 受容体と CYP19A1 の発現は 25 及び 250 µg/kg 体重のレプチン投与により有意に増加したが、28 日齢の卵巣では、25 µg/kg 体重のレプチン投与は FSH 受容体発現を増加させ、250 µg/kg 体重の投与では減少させた。またこのとき、CYP19A1 の発現はいずれの濃度のレプチン投与によっても変化しないことが示された。また血中エストラジオール濃度は、7 日齢ではレプチン投与により有意に上昇した。しかし、28 日齢では対照及び 25 µg/kg

体重のレプチン投与の間で差は認められなかったが、250 µg/kg 体重の投与では、対照に比べて血中エストロジオール濃度が有意に減少した。これらの結果より、レプチンは時期特異的に視床下部 下垂体 性腺軸に作用し、幼若期の卵巣機能の発達に影響を及ぼす可能性が示された。

またルシフェラーゼ活性を指標に、レプチンによる CYP19A1 遺伝子の転写制御の可能性を検討したが、レプチンによる転写誘導は確認できなかったことから、レプチンが直接 CYP19A1 の転写を調節する可能性は低いと考えられた。

#### (4) レプチンの脳室内投与が視床下部及び下垂体の遺伝子発現に及ぼす効果の検証

レプチンの脳室内投与により、視床下部の GnIH mRNA 発現は濃度依存的に変動する傾向を示したが、GnRH 及び LEPR の mRNA 発現には変化が認められなかった。下垂体の LHβ mRNA 発現は濃度依存的な減少を示したが、FSHβ mRNA 発現は変化が認められなかった。LHβ サブユニットと FSHβ サブユニットと対をなす糖タンパク質ホルモンαサブユニットの mRNA 発現はレプチン濃度依存的に増加した。本結果と(3)の結果を総合すると、レプチンは7日齢のニワトリメスヒナの卵巣に直接作用してその機能の発達を促す可能性が高いと判断され、視床下部 下垂体を介した制御は補助的である可能性が示唆された。

またゴナドトロピン以外の下垂体ホルモンに関しては、GH、PRL 及び、TSHβ の mRNA 発現は、レプチン投与による変化は認められなかったが、ACTH の前駆体である POMC mRNA 発現はレプチン濃度依存的な減少が認められた。この結果は、(1)と(2)の結果と一部異なっており、レプチンによる下垂体機能制御は、下垂体への直接作用と視床下部を介した間接作用による協調的な制御が行われている可能性があるとして示唆された。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計 3件)

Ahmadi S, Takeda M, Ohkubo T (2019) Determination of Polymorphisms in Pituitary Genes of the Native Afghani Naked Neck Chicken. *Journal of Poultry Science*, 査読有, in press. doi: 10.2141/jpsa.0180087

Piekarski A, Nagarajan G, Ishola P, Flees J, Greene ES, Kuenzel WJ, Ohkubo T, Maier H, Bottje WG, Cline MA, Dridi S (2018) AMP-Activated Protein Kinase Mediates the Effect of Leptin on Avian Autophagy in a Tissue-Specific Manner. *Frontiers in Physiology*, 査読有, 9:541. doi: 10.3389/fphys.2018.00541.

Shaikat AH, Namekawa S, Ahmadi S, Takeda M, Ohkubo T (2018) Gene expression profiling in embryonic chicken ovary during asymmetric development. *Animal Science Journal*, 査読有, 89: 688-694. doi: 10.1111/asj.12979.

#### [学会発表](計 6件)

Greene E, Flees J, Bottje W, Ohkubo T, Maier H, Cline M, Dridi S. Intracerebroventricular administration of leptin induces hepatic autophagy in chickens through AMPK pathway. *Poultry Science Association 107th Annual Meeting San Antonio, Texas, 2018.*

Flees J, Greene E, Kuenzel W, Bottje W, Ohkubo T, Maier H, Cline M, and Dridi S. Neuroendocrine regulation of avian hypothalamic autophagy by leptin. *Poultry Science Association 107th Annual Meeting San Antonio, Texas, 2018.*

武田未紗、大久保武. トランスサイレチン及びプロラクチン放出ペプチド mRNA 発現に対する短期絶食の影響. 日本家禽学会 2018 年度秋季大会.

Shaikat A, Namekawa S, Ahmadi S, T, Ohkubo T. Does leptin have a role in asymmetric development of ovary? 日本畜産学会第 122 回大会. 2017

Shaikat AH, 大久保武. レプチンはニワトリヒナの卵巣のレプチン受容体、FSH 受容体、アロマターゼ及びアポトーシスマーカーの発現を制御する. 日本家禽学会 2017 年度春季大会.

サデクラー アハマディ・大久保武. アフガニスタン在来の Naked Neck におけるプロラクチン及び Pit-1 遺伝子の遺伝子多型. 日本家禽学会 2017 年度春季大会. 2017

Namekawa S, Ohkubo T. Action of leptin for pituitary hormone gene expression in the chick. XXV World's Poultry Congress, Beijing, China. 2016.

#### [図書](計 1件)

Ohkubo T (2017) Neuroendocrine Control of Broodiness. In *Avian Reproduction* (Sasanami T ed.) pp. 151-171. Springer (Advances in Experimental Medicine and Biology, 1001:151-171.) doi: 10.1007/978-981-10-3975-1\_10.

### 6. 研究組織

#### (1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：滑川 晶子

ローマ字氏名：NAMEKAWA, Shoko

研究協力者氏名：シャイカット H アミル

ローマ字氏名：SHAIKAT, Amir H.