

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580387

研究課題名(和文)ニワトリ胚の下垂体 - 甲状腺系フィードバック機構の成立機序に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the development of feedback mechanisms of the pituitary-thyroid axis of the chick embryo

研究代表者

岩澤 淳 (IWASAWA, ATSUSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90242742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円、(間接経費) 1,350,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部 - 下垂体 - 甲状腺軸は高等動物の恒常性調節の重要なしくみのひとつである。本研究はニワトリ胚を研究対象として、この軸の構成要素が、ニワトリ胚の発生過程のどの段階で出現し、機能するのかを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、孵卵12日以前から、主に少量の血中甲状腺ホルモンと各臓器の脱ヨード酵素による、各臓器の発生過程での必要に応じた調節が存在しており、大量の血中甲状腺ホルモンが必要な孵化の際には、上位の下垂体からの甲状腺刺激ホルモンによる甲状腺ホルモンの分泌制御が大きな役割を果たしていることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The hypothalamus-pituitary-thyroid axis is one of the important homeostatic regulatory systems of higher vertebrates. This research was undertaken using chick embryos for the purpose of clarifying at what stages of their development the components of this axis emerge and start functioning. The results obtained suggested that in the peripheral organs from before day 12 of incubation regulation by small amounts of circulating thyroid hormones and peripheral deiodinases were functioning according to the demand of each developing organ, and that top-down regulation by thyrotropin released from the pituitary played an important role around hatching when large amounts of circulating thyroid hormones were necessary.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：代謝・内分泌制御 ニワトリ 甲状腺刺激ホルモン 甲状腺ホルモン

1. 研究開始当初の背景

ニワトリ胚は孵化時に肺呼吸(ピョピョと鳴き始めること)ならびに外界の温度に対応した体温調節を開始するが、この時期のニワトリ胚では血中甲状腺ホルモン濃度が著しく増加し、孵化後には再び減少することが知られている。血中の甲状腺ホルモン濃度が急上昇する例としては両生類の変態のような形態形成にかかわるものが有名だが、恒温動物ではあまり表立たずに体温調節のような恒常性の微調節を行っていると考えられている甲状腺ホルモンが、ニワトリにおいてこのように急激に変動することはあまり注目されていない。孵卵や観察もしやすいニワトリ胚は恒温動物における視床下部 - 下垂体 - 甲状腺軸のホルモン調節機構を研究する上で適した対象と考えられ、仕組みがよく似た同じ恒温動物である哺乳類との比較研究も期待できる。

視床下部 - 下垂体 - 甲状腺軸の調節機構は、胚発生の当初から完成した形で存在するとは考えにくい。たとえば先行研究によると、ニワトリ胚の甲状腺は発生(孵卵期間)の最初の1/3(ニワトリ胚の孵卵期間は21日)の時期から甲状腺ホルモンを生産しているが、下垂体でTSH(甲状腺刺激ホルモン)の生産が始まるのは、次の1/3の期間である。つまり、発生の初期の甲状腺は自律的にホルモンを分泌しているが、次第に上位のホルモンからの制御を受けるようになり、上位の器官へのフィードバック機構も確立して、孵化時の急激な甲状腺ホルモン濃度の上昇を準備することが予想される。しかし、ニワトリ胚を用いてこのことを明らかにする取り組みは、従来、十分にはなされてこなかった。

2. 研究の目的

視床下部 - 下垂体 - 甲状腺軸は高等動物の恒常性調節の重要なしくみのひとつである。本研究は重要な生産動物でもあるニワトリの胚を研究対象として、この軸の構成要素(甲状腺軸を構成する各組織)が、21日間にわたるニワトリ胚の発生過程のどの段階で出現するのか、これらの要素がいつの時点から機能(たとえばホルモン合成)し始めるのか、各要素間には時間的に意味ある前後関係があるのか(下垂体 甲状腺 末梢組織という命令系統はどの順に働き始めるのか)という詳細を明らかにすることで、個体発生の過程において、下位の器官を上位の器官が制御するような「リンク」が次第に成立していくのではないかという仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では視床下部 - 下垂体 - 甲状腺軸

の構成要素のうち下垂体と甲状腺に焦点を絞り、ホルモンの精製と高感度定量、リアルタイムPCR、免疫組織化学などを用いて、ニワトリ胚の発生段階を追って下垂体と甲状腺におけるホルモン、受容体、特異的タンパク質など、甲状腺軸が機能するために不可欠な因子の発現を検出・定量し、その発現順序を検討することとした。さらに、甲状腺ホルモンが実際に末梢組織で作用するにはプロホルモンであるチロキシンから活性型のトリヨードチロニンに変換されることが不可欠であるため、末梢組織に存在する変換酵素(脱ヨード酵素)の発生過程での変化についても重点的に検討を行うことにした。

(1) 甲状腺刺激ホルモン(TSH)遺伝子発現と、血中濃度の高感度測定法の確立

ニワトリ下垂体における、TSH遺伝子発現のリアルタイムPCRによる定量を行った。また、ニワトリ下垂体から抽出したTSHを標準品としたELISAによる測定系の確立を試みた。さらに、免疫組織化学的方法により、TSH産生細胞の観察を行った。

(2) 甲状腺に局在する特異的因子(TSH受容体、ナトリウム-ヨウ素共輸送体、チログロブリン、甲状腺ペルオキシダーゼ、甲状腺特異的転写因子TTF-1)のリアルタイムPCRによる定量および胚発生に伴う変動の解析を行った。

(3) ニワトリ胚の組織における脱ヨード酵素(D1, D2, D3)のリアルタイムPCRによる定量および胚発生に伴う変動の解析を行った。

(4) 甲状腺刺激ホルモンによる代謝制御の代表例として、ニワトリ胚の肝臓や骨格筋における糖代謝酵素のリアルタイムPCRによる定量および胚発生に伴う変動の解析を行った。

4. 研究成果

(1) TSH(甲状腺刺激ホルモン)遺伝子発現と、血中濃度の高感度測定法の確立

TSH遺伝子発現の定量

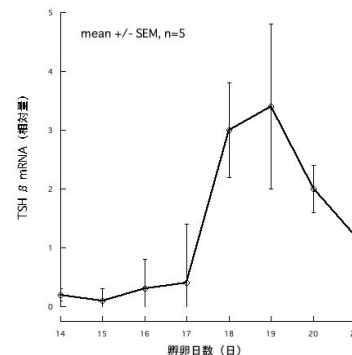


図1 ニワトリ胚下垂体におけるTSH mRNA発現量の孵卵日数に伴う変動

図1に示すように、ニワトリ胚下垂体にお

いて TSH mRNA は測定開始日より発現していたが、17 日目以降に急激に上昇し、19 日目でピークに達した。

血中 TSH 濃度の定量

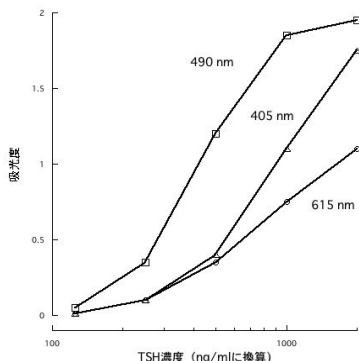


図2 ニワトリ血中 TSH 測定における検量線 (異なる基質間での感度比較)

図2に示すように、TSH に対して作成した抗体を様々な酵素等で標識し、非競合法による測定を行ったところ、良好な検量線を描くことができた。感度は一般的なラジオイムノアッセイ等と比べて低いが、成鶏に甲状腺ホルモン刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) を投与して血中 TSH 濃度を測定したところ、その濃度変化を検出することができた。

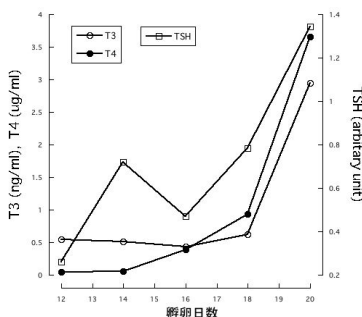


図3 ニワトリ胚における血中 TSH および甲状腺ホルモンの孵卵日数に伴う変動

図3に示すように、図2において確立した TSH 測定法および既存の甲状腺ホルモン (T3, T4) 測定法を用いて、ニワトリ胚におけるこれらのホルモン濃度を定量したところ、孵化に先立ってまず TSH 濃度が増加し、続いて T4、最後に T3 濃度が増加するという傾向が見られた。

下垂体 TSH 産生細胞の免疫組織化学による検出

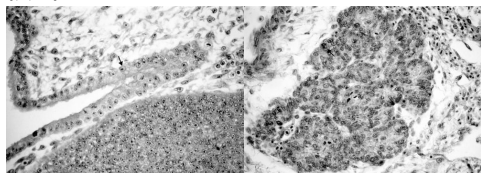


図4 孵卵3日目(左)と12日目(右)の

ニワトリ胚下垂体における TSH 陽性細胞

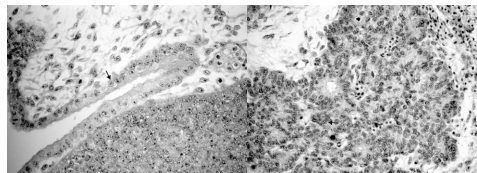


図5 孵卵3日目(左)と12日目(右)のニワトリ胚下垂体における TSH 陽性細胞

図4および5に示すように、ニワトリ胚の下垂体では、組織学的に甲状腺が確認できる孵卵3日目にはまだ TSH 陽性細胞は認められなかったが、TSH の血中濃度が上昇し始める孵卵12日目には明確に認めることができた。

(2) 甲状腺に局在する特異的因子 (TSH 受容体, ナトリウム - ヨウ素共輸送体, チログロブリン, 甲状腺ペルオキシダーゼ, 甲状腺特異的転写因子 TTF-1) のリアルタイム PCR による定量および胚発生に伴う変動の解析

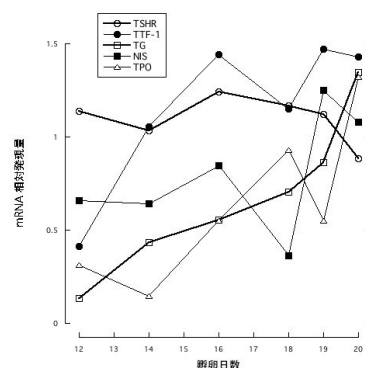


図6 TSH 受容体 (TSHR), ナトリウム - ヨウ素共輸送体 (NIS), チログロブリン (TG), 甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO), 甲状腺特異的転写因子 (TTF-1) mRNA 発現量の孵卵日数に伴う変動

図6に示すように、いずれの因子の mRNA も孵卵12日目には発現しており、TSHR を除く4因子は孵化に向かって次第に増加する傾向があったのに対して、TSHR は孵卵期間を通じて発現量がほぼ一定で推移する傾向があった。図3, 4および5からは、孵卵12日目には TSH が生産されていることがわかるが、遺伝子発現という点から見ると、この時期に甲状腺は TSH の刺激に応じて甲状腺ホルモンを生産できる状態にあることが示唆された。

(3) ニワトリ胚の組織における脱ヨード酵素 (D1, D2, D3) のリアルタイム PCR による定量および胚発生に伴う変動の解析

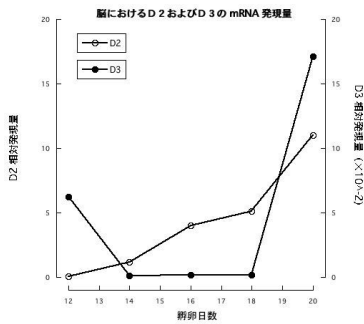


図7 ニワトリ胚の脳における脱ヨード酵素 (D2, D3) mRNA 発現量の孵卵日数に伴う変動

脳では脱ヨード酵素のうち, D1 は発現していなかった。図7に示すように, D3 の発現量は低かったが, 孵化前に急激に増加した。D2 は孵卵期間中を通じて次第に増加した。

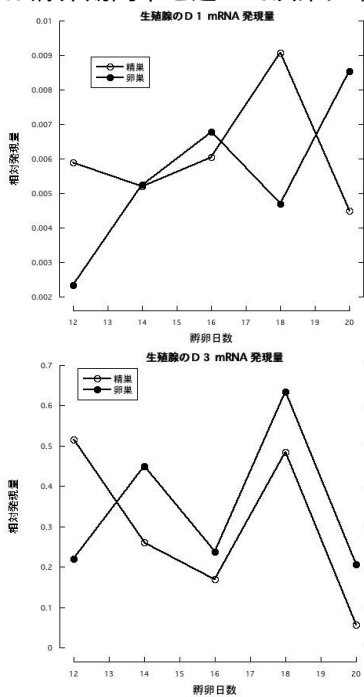


図8 ニワトリ胚の生殖腺における脱ヨード酵素 (D1, D3) mRNA 発現量の孵卵日数に伴う変動

精巣, 卵巣ともに脱ヨード酵素のうち D2 は発現していなかった。図8に示すように, D1 の発現量は精巣と卵巣でやや異なる推移を示した。D3 の発現量は, 精巣, 卵巣ともに孵卵 18 日目に上昇し, その後減少する点で共通していた。

(4) ニワトリ胚の末梢組織における糖代謝酵素のリアルタイム PCR による定量および胚発生に伴う変動

ヒトの甲状腺機能亢進症では糖新生が促進され, 高血糖になる場合があることが知られている。そこで, ニワトリ胚の肝臓および骨格筋における糖新生鍵酵素 (グルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase), フルクトース

ビスホスファターゼ (FBPase), ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK), ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)) mRNA 発現量の孵卵日数に伴う変動を調査したところ, それぞれの臓器に特徴的な変動が見られ, 特に孵化時期に向けて, 血糖値を高める方向に代謝が進む様子がうかがわれた。これは孵化に向けて甲状腺ホルモン濃度が高まることと矛盾しない結果であった。

(5) 考察と今後の展望

先行研究によって, 甲状腺は孵卵 3 日目頃から存在が確認されているが, 実際にホルモンを分泌するのは孵卵 9~10 日目頃と推定されている。甲状腺特異的因子は, 調査した孵卵 12 日目にはすでに発現していた。このことは, この時期にはすでに甲状腺が機能し, ホルモンを合成・分泌していることを示すものと考えられる。甲状腺特異的因子は, ほぼ一定で推移した TSHR を除けば孵化に向かって増加する傾向があり, 特に孵卵 20 日目で高かった。これは甲状腺ホルモンの血中濃度が最も高まる時期と合致する結果であった。この甲状腺ホルモンの血中濃度上昇に約 1 日先立って, 下垂体 mRNA の発現量の増加と血中 TSH の上昇が認められた。したがって, TSH はこの時期には甲状腺からの甲状腺ホルモン放出を促しているものと考えられる。

TSH や甲状腺ホルモンの血中濃度が大きく変動していない孵卵 12 日目~18 日目頃の間でも, 甲状腺ホルモンの標的臓器における脱ヨード酵素は, 臓器別に細かな変動を示していた。このことから, 血中甲状腺ホルモン濃度に関わらず, 各臓器において独自に脱ヨード酵素が働くことで, 甲状腺ホルモンは孵卵中の各時期で, 各臓器において必要な機能を発揮することができると思われる。各臓器における脱ヨード酵素の発現の変動を制御している因子についての解明は今後の課題として残された。

以上のことから, 孵卵 12 日目以前の発生過程の早い時期から, 下位の器官で, 主に一定量の甲状腺ホルモンと各臓器の脱ヨード酵素による, 各臓器の必要に応じた調節が存在しており, 孵化というような個体全体に関係する変化のために大量の甲状腺ホルモンが必要な際には, 上位の下垂体からの TSH による甲状腺ホルモンの分泌制御が大きな役割を果たしていると考えられた。その際, 甲状腺が TSH の刺激を受け取るために必要な TSHR は, TSH 濃度の大きな上昇よりも十分に前もって, 少なくとも孵卵 12 日目には甲状腺に発現しているのではないかと考えられた。従来, ニワトリ胚における視床下部 - 下垂体 - 甲状腺 - 末梢器官軸の機能の発現様式については部分的な報告が多かったが, 本

研究によって、孵卵期間（とくに後半の2 / 3）と結びつけて統合的に理解して捉えることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

柴田光浩, Too H.C., 岩澤 淳, Darras V.: 鶏胚の血中甲状腺ホルモンの変動と肝臓における脱ヨード酵素およびトランスサイレチンの意義. 東海畜産学会報 査読無 24, 15-15, 2013. <http://www.tokaichikusan.org/Journal.html>

Roy T.K., Iwasawa A., Shimizu Y., Kageyama K., Yoshizaki N.: Ontogenic profile of glucokinase and hexokinase mRNA expressions in embryonic chicken liver and muscle. J. Poultry Sci. 査読有 50, 270-274, 2013. <http://dx.doi.org/10.2141/jpsa.0120156>

Roy T.K., Iwasawa A., Shimizu Y., Kageyama K., Yoshizaki N.: Ontogenic profile of gluconeogenic key enzyme gene expressions in embryonic chicken liver and muscle. J. Poultry Sci. 査読有 50, 380-387, 2013. <http://dx.doi.org/10.2141/jpsa.0120183>

[学会発表] (計4件)

柴田光浩, Too H.C., 岩澤 淳, Darras V.: 鶏胚の血中甲状腺ホルモンの変動と肝臓における脱ヨード酵素およびトランスサイレチンの意義. 東海畜産学会平成25年度秋季大会 2013年12月6日 愛知県産業労働センターWINC あいち

柴田光浩, Too H.C., Darras V., 岩澤 淳: ニワトリ胚の発生過程における甲状腺ホルモンの脱ヨード酵素の働き. 日本動物学会第84回岡山大会 2013年9月28日 岡山大学津島キャンパス

柴田光浩, Too H.C., 岩澤 淳, Darras V.: ニワトリの発生過程における甲状腺ホルモンの脱ヨード酵素の働き. 日本家禽学会2013年度秋季大会 2013年9月8日 新潟大学五十嵐キャンパス

柴田光浩, Too H.C., 岩澤 淳: ニワトリ胚の発生過程における甲状腺ホルモンの脱ヨード酵素の働き. 日本動物学会中部支部大会 2012年11月17日~18日 松本市みやま荘

[産業財産権] 該当なし

[その他] 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩澤 淳 (IWASAWA Atsushi)
岐阜大学・応用生物科学部 教授
研究者番号: 90242742

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 研究連携者 該当なし

[図書] 該当なし