



# ニワトリの摂食調節におけるインスリン様成長因子-1の役割

藤田, 昇一

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2020-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7525号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007525>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



# 博 士 論 文

ニワトリの摂食調節におけるインスリン様成長因子-1 の役割

平成 31 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

藤田 昇一

## 目次

第一章 緒論 .....	1
第二章 ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制作用の検証と、栄養状態に応じた IGF-1 及びその結合タンパク質の発現変動の解明 .....	5
第一節 緒言 .....	5
第一項 動物及び飼料 .....	8
第二項 IGF-1 の中枢投与がニワトリの摂食に及ぼす影響 .....	8
第三項 ニワトリの脳における IGF-1 及びその受容体の mRNA 量の解析 .....	9
第四項 絶食及び再給餌がニワトリの肝臓及び脳における IGF-1 及び IGFBP mRNA 量に及ぼす影響 .....	10
第五項 IGF-1 の末梢投与がニワトリの摂食に及ぼす影響 .....	12
第六項 統計解析 .....	12
第三節 結果 .....	12
第四節 考察 .....	13
第五節 小活 .....	19
第三章 ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制機構の解明 .....	21
第一節 緒言 .....	21
第二節 材料及び方法 .....	23
第一項 動物及び飼料 .....	23
第二項 絶食及び再給餌がニワトリ視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響 .....	23
第三項 Akt シグナリング活性化ホルモンの中枢投与が視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響 .....	24
第四項 Akt シグナリング阻害剤の中枢投与が視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響 .....	25
第五項 IGF-1 の中枢投与がニワトリ視床下部摂食調節ペプチドの mRNA 量に及ぼす影響 .....	26
第六項 IGF-1 の中枢投与がニワトリ視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響 .....	27
第七項 異なる鶏種のニワトリヒナにおけるインスリン様成長因子-1 の摂食抑制効果の比較 .....	27
第八項 統計解析 .....	28
第三節 結果 .....	28
第四節 考察 .....	29
第五節 小活 .....	32
第四章 総括 .....	34

謝辞 .....	38
参考文献 .....	39
付表・付図.....	54

## 第一章 緒論

鶏肉生産用に育種改良されたニワトリであるブロイラーは、鶏卵生産用に改良された卵用鶏と比較して食欲旺盛で極めて成長が速い (Buzala and Janicki, 2016 ; Mahagna and Nir, 1996). しかしながら、近年、その旺盛な食欲に基づく過食による体脂肪の過剰蓄積が、脂肪肝を始めとする代謝異常や、非可食部である内臓脂肪の増加による飼料効率の低下を引き起こすことが問題となっている (Chelian, 2007 ; Richards and Proszkowiec-Weglarz, 2007 ; Julian, 2005). ここで、ヒトにおける体脂肪の過剰蓄積に対しては、食事制限によるエネルギー摂取の抑制と運動によるエネルギー消費の促進が有効であるとされているが、エネルギー消費の促進はブロイラーにおいては飼料効率の低下に繋がるため好ましくない。また、給与する飼料を制限することはブロイラーにとってはストレスであり、カニバリズムも誘導されることから望ましくない。それ故、ブロイラーの成長を阻害しない範囲で早めに満腹感を誘導することによって摂食量を減少させ、体脂肪の過剰蓄積を防ぐことが望ましい。しかしながら、ニワトリの食欲調節機構については、未だ不明な点が多い。

ヒトを始めとする哺乳類においては、肥満や生活習慣病の予防・治療法を開発するための一環として、食欲調節機構の解明が進められている。例えば、

哺乳類においては、生体における貯蔵脂肪量の情報を脳に伝達する肥満シグナルであるレプチン並びにインスリンと、消化管内容物の情報を脳に伝達する満腹シグナルであるコレシストキニン、グルカゴン様ペプチド (GLP), 並びにペプチド YY、空腹シグナルであるグレリンによって食欲が調節されるとされている (Woods, 2009 ; Sam ら, 2012 ; Steinert ら 2017). 一方、ニワトリの摂食調節機構については、幾つかの末梢のホルモンの生理学的役割が、哺乳類のそれとは異なることが示唆されている (Kuenzel, 1994 ; Honda ら, 2017 ; Bungo ら, 2011 ; Richards and Proszkowiec-Weglarz, 2007). 例えば、哺乳類においてはレプチンの主要な産生部位は脂肪組織であるが、ニワトリにおいては、レプチンは脳には高発現するものの、脂肪組織には発現しないことが報告されている (Seroussi ら, 2016). 更に、レプチンペプチド断片の脳室内投与はニワトリヒナの摂食に影響せず (Sims ら, 2017), 血中にレプチン様免疫活性も検出されない (Seroussi ら, 2016). また、ニワトリの腹部脂肪組織重量割合と血中インスリン濃度の間には有意な相関は認められないこと (Honda ら, 2015a), 及び哺乳類における空腹シグナルであるグレリンは、ニワトリにおいては摂食を抑制すること (Kaiya ら, 2007) が報告されている. そのため、ニワトリの食欲調節機構においては、肥満シグナルの生理的役割は重要ではない可能性がある. しかしながら、コレシストキニン (Savory ら, 1983 ; Covasa ら, 1994 ; Rodríguez-Sinovas ら, 1997 ; Tachibana ら, 2012), ペプチド YY (Aoki ら, 2017), 及び GLP-2 (Honda

ら, 2015c) の末梢投与による摂食抑制作用, 及び GLP-1 (Honda ら, 2015b) の中枢投与による摂食抑制効果が報告されていることから, ニワトリの食欲調節機構においては, これらの満腹シグナルが重要な役割を果たしている可能性がある.

インスリン様成長因子-1 (IGF-1) は肝臓から分泌されるプロインスリンと構造が類似したホルモンである (Zapf and Froesch, 1986). ニワトリにおいては, IGF-1 はグルコース輸送体により筋細胞へのグルコースの取り込みを促進するなど, インスリンと類似した作用を示すとされている (Duclos ら, 1993 ; Tesseraud ら, 2007 ; Tokushima ら, 2005 ; Yu ら, 2015). また, 鶏筋管細胞のタンパク質含量を増加させること (Nakashima ら, 2017), 筋芽細胞の分化を促進すること (Yu ら, 2015), 及び外因性の IGF-1 の投与により, ブロイラーの成長と飼料効率が改善されること (Tomas ら, 1998) が報告されており, IGF-1 は骨格筋形成と成長に極めて重要な役割を果たすことが示唆されている. 哺乳類においては, IGF-1 の脳室内投与は糖尿病ラットの摂食量を減少させること (Lu ら, 2001), 及び血中の IGF-1 が IGF-1 受容体を介して血液脳関門を通過すること (Reinhardt and Bondy, 1994 ; Armstrong ら, 2000) が報告されているが, ニワトリにおいては, IGF-1 の摂食調節への関与については全く調べられていない. しかしながら, 卵用鶏においては, 肝臓 IGF-1 の mRNA 量, 及び血中 IGF-1 濃度は摂食後, 比較的短時間で増加することが報告されている (Kita ら, 1996; 1998) ことから,

IGF-1 が食後の満腹シグナルとして働く可能性もあると判断される。

本研究では、ニワトリの食欲調節機構解明のための一環として、ニワトリの摂食調節における IGF-1 の役割について調べた。



## 第二章 ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制作用の検証と、栄養状態に応じた IGF-1 及びその結合タンパク質の発現変動の解明

### 第一節 緒言

IGF-1 は、末梢においては骨格筋の発達に (Duclos, 2005 ; Duclos ら, 1999), 中枢においては神経細胞の発生と分化に関与するとされている (Holzenberger and Lapointe, 2000). また, IGF-1 は脳において産生されるが, 血液脳関門を通過することも報告されている (Armstrong ら, 2000 ; Nishijima ら, 2010 ; Reinhardt and Bondy, 1994) ことから, 循環血液中の IGF-1 が脳において生理的役割を果たす可能性もある. ここで, 哺乳類においては, IGF-1 の脳室内投与が摂食に及ぼす影響については一致した見解が得られていない. 例えば, IGF-1 の脳室内投与はヒツジの摂食には影響せず (Foster ら, 1991) , ラットの摂食を促進する (Sato and Frohman, 1993) が, 糖尿病ラットの摂食を有意に抑制する (Lu ら, 2001) ことも報告されている. ニワトリにおいては, IGF-1 の受容体が脳に発現すること (Holzenberger and Lapointe, 2000), 及び血漿 IGF-1 濃度は食後に上昇することが報告されている (Kita ら, 1998) が, IGF-1 の投与が摂食に及ぼす影響は調べられていない. しかしながら, ニワトリにおいても, IGF-1 はインスリンと類似した効果を示すこと (Duclos ら, 1993 ; Tesseraud ら, 2007 ; Tokushima ら, 2005 ;

Yu ら, 2015), インスリンの中枢投与が摂食を抑制すること (Honda ら, 2007; Shiraishi ら, 2008), 及び, 一般に鳥類は, 哺乳類において IGF-1 の摂食抑制効果が認められている糖尿病ラットと同様に, 高血糖を示す動物として知られていること (Braun and Sweazea, 2008) から, ニワトリにおいて, IGF-1 が摂食抑制ホルモンとして働く可能性はあると判断される.

循環血液中においては, IGF 結合タンパク質 (IGFBP) が, IGF-1 のキャリアータンパク質として働く. また最近, IGF-1 の標的となる臓器・組織において発現する IGFBP が, その細胞における IGF の働きを制御する役割を果たすことも明らかにされている (Duan and Xu, 2005). ニワトリにおいては, 分子量が異なる 4 種の IGFBP が血中に存在し, そのうち 3 種類の IGFBP は 48 時間の絶食により増加すること (Beccavin ら, 1999), 及び血漿 IGFBP の IGF-1 への結合活性は, タンパク質制限 (Leili and Scanes, 1998), 絶食 (Leili ら, 1997), 及びデキサメサゾン (Leili and Scanes, 1998) によって影響されることが報告されている. また, その遺伝子発現については, 肝臓 IGFBP-2 mRNA は 2 日間の絶食で有意に増加し, その増加は 6 時間の再給餌によって回復すること, 脳 IGFBP-2 mRNA は, その逆の応答, 即ち, 2 日間の絶食で有意に減少し, その後の 6 時間の再給餌によってもその減少は回復しないこと (Kita ら, 2002) が報告されている. 更に最近, IGFBP-2 遺伝子 (Lei ら, 2005; Li ら, 2006; Leng ら, 2009), 及び IGFBP-3 遺伝子 (Ou ら, 2009) の多型は成長と枝肉形質と関連があることが示唆されている. こ

これらのことから、ニワトリにおける IGF-1 の生理的役割を明らかにするためには、IGF-1 及び IGFBP の主要な発現組織である肝臓、及び標的細胞における IGFBP の発現についても明らかにする必要があると判断される。

本章では、ニワトリにおける IGF-1 の摂食調節ホルモンとしての役割を明らかにするための一環として、ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制作用の検証と、栄養状態に応じた IGF-1 及びその結合タンパク質の発現変動を明らかにする。

## 第二節 材料及び方法

### 第一項 動物及び飼料

初生ヒナ（Ross 308）は石井養鶏農業協同組合（徳島）から購入した。ヒナには配合飼料（スターターK, CP 22.0%, ME 3,100 kcal/kg, フィードワン株式会社）を給与し, 試験当日まで自由摂食自由飲水条件下で飼育した。本研究は神戸大学動物実験委員会で審査・承認され, 学長に許可されたものである。実験は神戸大学動物実験実施規則に基づいて実施した。

### 第二項 IGF-1 の中枢投与がニワトリの摂食に及ぼす影響

24羽の8日齢のニワトリヒナを, 平均体重が等しくなるように1群6羽の4群に分けた。頭部固定装置 (Davis ら, 1979), 注射器 (イトーマイクロシリンジ, MS-N50, 株式会社伊藤製作所, 静岡) 及び注射針が 3 mm だけ脳内に挿入されるよう, 別の注射針 (TERUMO NEEDLE 19×11/2 1.10×38 mm, テルモ株式会社, 東京) の先をニッパーで切断して全長を 37 mm にしたものを注射針のストッパーとして用いた。自由摂食条件下のニワトリの側脳室内に 0.1% のエバンスブルーを含む生理的食塩水 (0.85% 塩化ナトリウム水溶液) に溶解した, 0, 30, 100, 或いは 300 pmol の IGF-1 を 10 µl 投与した。投与後, 飼料を自由に摂取させ, 30, 60, 及び 120 分後の飼料摂取量を測定した。その後, 断頭により安楽死させ, エバンスブルーによる側

脳室内の染色状態を確認することによって、側脳室内に正しく投与されている個体のデータのみを採用した。

### 第三項 ニワトリの脳における IGF-1 及びその受容体の mRNA 量の解析

4羽の7日齢のニワトリヒナを断頭により安楽死させ、速やかに脳を摘出した後、RNAlater®（シグナルドリッチジャパン合同会社、東京）に浸漬し、4℃で保存した。その後、脳を終脳、小脳、子葉、脳幹吻側部、脳幹中央部、及び脳幹尾部に分割して-80℃で保存した。総 RNA は Sepasol®-RNA I Super G（ナカライテスク株式会社、京都）を用いて抽出した。すなわち、50~100 mg のサンプルに対し 1.0 ml のセパゾールを加え、30 秒間ホモジナイズした。得られたホモジネートを 0.8 ml 採取し、室温で 5 分間静置後、200 µl のクロロホルムを加え、15 秒間激しく混和した。3 分間静置した後、遠心分離（12,000 g, 15 分間, 4 °C）した。最上層の 450 µl を別に採り、500 µl の 2-プロパノールを加えて転倒混和を 20 回行った。10 分間静置した後、遠心分離（18,000 g, 10 分間, 4 °C）した。上清を捨て、得られた沈殿に 1 ml の 75%エタノールを加え、軽く混和後、遠心分離（12,000 g, 5 分間, 4°C）した。上清を除去した後、沈殿を 5~10 分間乾燥させ、50 µl の DEPC 処理水に溶解した。RNA 濃度は、分光光度計（DU-640, ベックマン・コールター株式会社、東京）を用いて 260 nm の吸光度を測定し、算出した。cDNA 合成に供するまで、-80℃で保存した。また、RNA の分解の有無を 1%アガ

コース電気泳動で確認した。cDNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社, 大阪) を用いて, 総 RNA から調製し, リアルタイム解析に供するまで -30°C で保存した。PikoReal (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社, 東京), SYBR®Premix Ex Taq II (Tli RnaseH Plus) (タカラバイオ株式会社, 滋賀), 及び IGF-1 (GenBank accession number: NM\_001004384), IGF-1R (GenBank accession number: NM\_205032) に特異的なプライマー (IGF-1 sense, 5'-GCT GCC GGC CCA GAA -3'; IGF-1 antisense, 5'-ACG AAC TGA AGA GCA TCA ACC A -3'; IGF-1R sense, 5'-GGA GAA TTT CAT GGG TCT GAT TG-3'; IGF-1R antisense, 5'-CAT GGG AAT GGC GAA TCT TC-3') を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。すなわち, 2 µl の 20 倍希釈 cDNA あるいは  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , 及び  $10^7$  倍希釈した cDNA 標準液に, 8 µl の Reaction Mixture (2 µl の滅菌超純水, 5 µl の SYBR Premix Ex Taq II, 0.2 µl の 50×ROX reference dye, 0.4 µl の 5 pmol/µl のフォワードプライマー, 及び 0.4 µl の 5 pmol/µl のリバースプライマー) を加え, リアルタイム PCR を行った。mRNA 量はリボソーマルプロテイン S17 (RPS17) (GenBank accession number: NM\_204217) に特異的なプライマー (RPS17 sense, 5'-GCG GGT GAT CAT CGA GAA GT-3'; RPS17 antisense, 5'-GCG CTT GTT GGT GTG GAA GT-3') で補正した。

第四項 絶食及び再給餌がニワトリの肝臓及び脳における IGF-1 及び

## IGFBP mRNA 量に及ぼす影響

18羽の8日齢のブロイラーを平均体重が等しくなるように1群6羽の3群に分け、自由摂食条件下、自由摂食条件下から6時間絶食後、及び6時間絶食後から6時間再給餌後に、断頭により安楽死させ、速やかに肝臓及び脳を摘出した。肝臓は液体窒素により凍結後、-80°Cで保存し、脳はRNAlater® (シグナアルドリッチジャパン合同会社、東京)に浸漬し、4°Cで保存した後、本節第三項と同じ方法で分割し、-80°Cで保存した。第三項と同様の方法で、RNA抽出及、cDNA解析、及びリアルタイムPCRを行い、IGF-1 mRNA量を解析した。リアルタイムPCR用のプライマーには、IGFBP-1~5(GenBank accession numberは、それぞれ、NM\_001001294, NM\_205359, NM\_001101034, NM\_204353, 及びXM\_422069)の塩基配列に特異的なプライマー(IGFBP-1 sense, 5'-CCC AAC TGT AAC AAG AAT GGA TTT T-3'; IGFBP-1 antisense, 5'-CGG AAT CTC CAT CCA GTG AAG-3'; IGFBP-2 sense, 5'-AAT GGG CAG CGT GGA GAG T-3'; IGFBP-2 antisense, 5'-CTG GAT CAC CTT CCC ATG GA-3'; IGFBP-3 sense, 5'-ATC AGG CCA TCC CAA GCT T-3'; IGFBP-3 antisense, 5'-GAT GTG CTG TGG AGG CAA ATT-3'; IGFBP-4 sense, 5'-GAG CAC CCC AAC AAC AGC TT-3'; IGFBP-4 antisense, 5'-CCG TTG TTG ATG CGC TTT G-3'; IGFBP-5 sense, 5'-CAA GGC CGA ACG GGA AT-3'; IGFBP-5 antisense, 5'-TCC TCC GTC ATC TCC GAT GT-3'.)を用いた。

#### 第五項 IGF-1 の末梢投与がニワトリの摂食に及ぼす影響

18羽の8日齢のニワトリヒナを、平均体重が等しくなるように1群6羽の3群に分けた。自由摂食条件下のニワトリの翼下静脈内に生理的食塩水(0.85% 塩化ナトリウム水溶液)に溶解したIGF-1を、0, 3, 或いは12 nmol/kg体重投与した。投与容量は1 ml/kg体重とした。投与後、飼料を自由に摂取させ、30, 60, 及び120分後の飼料摂取量を測定した。

#### 第六項 統計解析

第二項及び第五項の実験により得られたデータはチューキークレーマー法により、第三項の実験により得られたデータはスチューデントのt検定により、第四項の実験により得られたデータは分散分析後、フィッシャーのPLSD法により、それぞれ解析した。

#### 第三節 結果

IGF-1の中枢投与は用量依存的にニワトリヒナの摂食を抑制した(Fig. 1)。また、IGF-1及びその受容体のmRNAは、脳の全ての部位で発現し、脳幹吻側部と小脳に比べて視葉において有意に高い値を示した(Fig. 2)。一方、IGF-1受容体mRNA量は脳幹吻側部、脳幹尾部、及び視葉に比べて終脳において有意に低い値を示した。しかしながら、6時間の絶食及び再給餌は、



脳の何れの部位においても IGF-1 mRNA 量に影響しなかった (Fig. 3). 一方で、肝臓の IGF-1 mRNA 量は 6 時間の絶食により有意に減少し、6 時間の再給餌によってその減少は回復した (Fig. 4). 更に、IGF-1 の末梢投与はニワトリヒナの摂食を抑制した (Fig. 5). これらの結果から、ニワトリにおいては、肝臓において摂食後に産生される IGF-1 が脳において摂食を抑制することが示唆された.

肝臓に発現する IGFBP-1~5 の mRNA のうち、IGFBP-1 及び-2 の mRNA 量は、6 時間の絶食により有意に増加し、6 時間の再給餌によってその増加は回復した (Table 1). 一方、脳においては、全ての部位で IGFBP-1~5 の mRNA が検出され、脳幹中央部の IGFBP-3 の mRNA 量は 6 時間の絶食により有意に減少し、6 時間の再給餌によっても、その減少は回復しないこと、視葉における IGFBP-5 の mRNA 量は 6 時間絶食後の 6 時間再給餌によって有意に減少することが明らかになった (Table 2). これらの結果から、ニワトリにおいては、肝臓における摂食に応じた IGFBP-1 及び 2 の産生は、IGF-1 のそれとは逆の変動を示すことが示唆された.

#### 第四節 考察

哺乳類においては、IGF-1 と同様の働きを示すホルモンであるインスリンは PI3K シグナリングを介して摂食を抑制すること (Muta ら, 2015 ;

Niswender ら, 2003) が報告されている. 一方, ニワトリ筋細胞において, IGF-1 は PI3K の下流のシグナルである Akt/FOXO1 シグナルを活性化すること (Nakashima et al., 2017) が報告されている. これらのことから, ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制機構に PI3K-Akt シグナリングが関与する可能性が示された. IGF-1 の摂食抑制効果は糖尿病ラットにおいては認められる (Lu ら, 2001) が, 糖尿病ではないマウス, ラット, 及びヒツジでは認められない (Hong ら, 2017 ; Foster ら, 1991 ; Sato and Frohman, 1993). 鳥類は, 他の脊椎動物に比べて血漿グルコース濃度が高いことが知られている (Braun and Sweazea, 2008). 哺乳類においては, 高血糖状態は IGF-1 に対する応答性を変化させ, リン酸化 Shc の増加と MAPK と PI3K シグナリングを促進することが報告されている (Radhakrishnan ら, 2010). それ故, ニワトリにおける IGF-1 による摂食抑制への Shc 及び MAPK の関与も調べる必要があるかもしれない.

6 週齢の卵用鶏においては, 食後に肝臓 IGF-1 mRNA と血中 IGF-1 濃度が増加することが報告されている (Kita ら, 1998) が, 本研究で用いたブロイラーは卵用鶏とは成長速度が大きく異なることが知られている. 実際, 血漿 IGF-1 濃度は鶏種によって異なるという複数の報告もある (Huybrechts ら, 1985 ; Lee ら, 1989 ; Pym ら, 1991) 他, 肝臓の IGF-I mRNA は発生中の鶏胚では検出されないが, 孵化後は 4 週齢まで増加する (Burnside and Cogburn, 1992) ことから, 鶏種のみならず, 日齢によって, 栄養状態に応じた肝臓 IGF-1

の産生が異なる可能性もある。本研究では、比較的短時間といえる 6 時間の絶食によって肝臓 IGF-1 mRNA 量が減少し、6 時間の再給餌によってその減少が回復することが明らかになった。これらの結果は、孵化後 1 週間程度の成長著しいブロイラーの摂食調節機構に肝臓 IGF-1 遺伝子の発現変動が深く関与している可能性を示す新しい知見といえる。

IGF-1 の静脈内投与は、ブロイラーの摂食を抑制し、再給餌は肝臓 IGF-1 mRNA 量を増加させた。ニワトリにおいては、血中 IGF-1 濃度は再給餌によって上昇する (Kita ら, 1998)。それ故、ニワトリにおいて、飼料に含まれる因子により血中 IGF-1 濃度上昇効果が異なるとすれば、血中 IGF-1 濃度上昇作用を有する因子を飼料に添加して与えることによって、ブロイラーの満腹感の誘導に基づく過食の抑制が可能になると判断される。今後、家禽産業においては、IGF-1 産生を促進する飼料素材・因子の検索が新たな課題となるかもしれない。

ニワトリにおいては、脳における IGF-1 の発現は、孵化後、速やかに下向き調節され、30 日齢においては検出限界以下になること (Holzenberger and Lapointe, 2000) が報告されている。一方、血漿 IGF-1 濃度は孵化後 21 日齢まで上昇すること (Lu ら, 2001)、孵化後、肝臓 IGF-I mRNA 量と血漿 IGF-1 濃度の変化は一致し、4 週齢でピークを迎えること (Burnside and Cogburn, 1992) が報告されている。本研究においても、飼料摂取に応じ、肝臓と脳における IGF-1 mRNA 量は異なる変動を示した。これらの知見から、ニワトリ

において、脳と肝臓における IGF-1 の生理学的役割は異なることが示唆された。

IGF-1 の神経細胞の発生と分化、及び神経の可変性と記憶への関与は、脊椎動物の進化の初期の過程において発生したことが示唆されている

(Holzenberger and Lapointe, 2000)。興味深いことに、本研究により、IGF-1 mRNA は、鳥類において特に発達している視葉において高発現することが明らかになった。鳥類において、網膜の神経節の多くは視蓋に投射し、視蓋は同側の外側線条体に神経線維を送る視床の左右のロット核に投射していることが知られている (Güntürkün, 2000)。それ故、ニワトリにおいては、視覚情報の視葉への神経伝達において、IGF-1 が重要な役割を果たす可能性があると判断された。

ヒツジにおいては、IGF-1 の脳室内投与は血清 IGF-1 濃度に影響しないことが報告されている (Foster ら, 1991)。それ故、本研究において確認された中枢投与による摂食抑制効果は、脳室内に投与した IGF-1 が末梢循環血液中に移行し、種々の臓器・組織に働いたうえで認められた効果ではなく、脳に直接的に働いた結果、認めら得れた効果であると判断される。また、IGF-1 は、ニワトリに末梢投与された後、血中において、遊離、分子量 45 kDa、或いは分子量 150 kDa の結合体として存在すること、及び投与した IGF-1 のほとんどは、投与 2 時間以内に消失することが報告されている (McMurtry ら, 1996)。本研究においても、外因性の IGF-1 による摂食抑制効果は、投

与 120 分後に消失した (Fig. 5). 今後, 末梢に投与された IGF-1 の血中濃度, その存在形態, 並びに脳への移行について確認する必要がある。

本研究ではニワトリではなくヒトの IGF-1 を用いたが, ヒト IGF-I はニワトリの研究に頻繁に用いられている (Luna-Acosta ら, 2015; Mohammadrezaei ら, 2014; Ritchey ら, 2012; Yu ら, 2015). ニワトリ IGF-1 を形成する 71 個のアミノ酸のうち, 8 個のアミノ酸がヒトのそれとは異なる (Ballard ら, 1990) が, 組換えニワトリ IGF-1 は, ラット L6 筋管細胞とニワトリ胚線維芽細胞を用いたタンパク質合成及び分解試験において, ヒト IGF-1 と同等の活性を示すこと (Upton ら, 1992), 7 週齢のニワトリにおいて, 放射性同位体でラベルされたニワトリ IGF-1 とヒト IGF-1 の投与後の消失の程度は類似していること (McMurtry ら, 1996) が報告されている。それ故, ニワトリ IGF-1 を中枢, 及び末梢に投与した場合も, 本研究と同様の結果が得られると判断される。

雄の痩せ型のニワトリにおいては, 48 時間の絶食は血漿中の 28 kDa の IGFBP と 34 kDa の IGFBP を有意に増加させることを示し, これらのタンパク質が哺乳類の IGFBP-1 及び 2 に相当するものであることが示唆されている (Beccavin ら, 1999). そして, ニワトリ肝細胞から分泌される 28 kDa の IGFBP (哺乳類の IGFBP-1 に相当) は外因性の IGF-1 による肝細胞へのアミノ酸の取込みを抑制することが報告されている (Duclos ら, 1998). 哺乳類においては, IGFBP-1 及び 2 は, 血中 IGF-1 の働きを抑制するとされている

(Allard and Duan, 2018.). これらのことから、絶食条件下における肝臓 IGFBP-1 及び 2 の遺伝子発現の上向き調節は、絶食条件下において減少する血中 IGF-1 の働きを更に抑制することに貢献している可能性がある。

卵用鶏においては、インスリンの静脈内投与が絶食で減少した肝臓 IGFBP-2 mRNA量を回復させる (Nagaoら, 2001). また、ブロイラーにおいては、血漿インスリン濃度は絶食時は低く、摂食時は高いことを示す多くの証拠がある (Saneyasuら, 2017 ; Christensenら, 2013 ; Bigotら, 2003 ; Krestel-Rickertら, 1986). それ故、本研究において認められた肝臓における絶食と再給餌によるIGFBP-2の発現変動もまた、血漿インスリン濃度の変動に基づくものかもしれない。

哺乳類においては、IGFBP-3及び5は細胞表面と細胞外基質に結合し、細胞におけるIGFの働きを制御する (Clemmons, 2001 ; Firth and Baxter, 2002). その他、IGFBP-3及び5はIGF非依存的生物学的活性も示すとされている

(Firth and Baxter, 2002). 脳におけるIGFBPの生理学的意義は哺乳類と鳥類においてほとんど明らかにされていないが、本研究によって、脳幹中央部におけるIGFBP-3のmRNA量は6時間の絶食により有意に減少したが、その後の6時間の再給餌によってその減少は回復しないこと、及び視葉におけるIGFBP-5のmRNA量は6時間絶食後の6時間の再給餌によって有意に減少することが確認された。これらの変動は、中枢神経系におけるIGFBP-3とIGFBP-5の何らかの生理的役割を示唆しているのかもしれない。

哺乳類においては、末梢の満腹シグナルは延髄に存在する迷走神経背側複合体（DVC）と、視床下部に存在する弓状核によって受信・統合されるとされている（Williams and Elmquist, 2012）。本研究において、脳幹吻側部と脳幹尾部にIGF-1受容体の発現が認められたが、ニワトリにおいては、これらの部位は、それぞれ視床下部と延髄を含むことが知られている（Kuenzel and Masson, 1988）。これまでに、ニワトリにおいては、IGF-1受容体アンタゴニストを用いた研究報告はないが、今後、種々のIGF-1受容体アンタゴニスト（JB-1, picropodophyllin等）の視床下部或いは延髄への投与が、摂食に及ぼす影響を明らかにすることによって、その生理的受容性を検証する必要があるろう。

## 第五節 小活

本章では、ニワトリにおける IGF-1 の摂食調節ホルモンとしての役割を明らかにするための一環として、ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制作用の検証と、栄養状態に応じた IGF-1 及びその結合タンパク質の発現変動を明らかにすることを試みた。

IGF-1 の中枢投与は用量依存的にニワトリヒナの摂食を抑制した。また、IGF-1 及びその受容体の mRNA は、脳の全ての部位で発現していた。IGF-1 の mRNA 量は、脳幹吻側部と小脳に比べて視床下部において有意に高い値を示

し、IGF-1 受容体 mRNA 量は脳幹吻側部，脳幹尾部，及び視葉に比べて終脳において有意に低い値を示した．しかしながら，6 時間の絶食及び再給餌は，脳の何れの部位においても IGF-1 mRNA 量に影響しなかった．一方，肝臓の IGF-1 mRNA 量は 6 時間の絶食により有意に減少し，6 時間の再給餌によってその減少は回復した．更に，IGF-1 の末梢投与はニワトリヒナの摂食を抑制した．これらの結果から，ニワトリにおいては，肝臓において摂食後に産生される IGF-1 が満腹シグナルとして働くことが示唆された．

肝臓に発現する IGFBP-1～5 の mRNA のうち，IGFBP-1 及び-2 の mRNA 量は，6 時間の絶食により有意に増加し，6 時間の再給餌によってその増加は回復した．一方，脳においても，全ての部位で IGFBP-1～5 の mRNA が検出された．また，脳幹中央部の IGFBP-3 の mRNA 量は 6 時間の絶食により有意に減少し，6 時間の再給餌によっても，その減少は回復しなかった．視葉における IGFBP-5 の mRNA 量は 6 時間絶食後の 6 時間再給餌によって有意に減少した．これらの結果から，ニワトリにおいては，肝臓において摂食後に抑制される IGFBP-1 及び 2 の産生が，IGF-1 の満腹シグナルとしての働きを更に高める可能性が示された．



### 第三章 ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制機構の解明

#### 第一節 緒言

第二章において、ニワトリにおいて、IGF-1 が食後の満腹シグナルとして働くことが示唆された。哺乳類においては、IGF-1 が食欲調節機構に及ぼす影響については全く調べられていないが、ラットの脳室内への IGF-1 の投与は視床下部の Akt をリン酸化することが報告されている (Cardona-Gomez ら, 2002)。ここで、視床下部の Akt シグナリングは哺乳類の摂食調節を含むエネルギー代謝において極めて重要な役割を果たすとされている (Belgardt ら, 2008 ; Cao ら, 2011 ; Cota ら, 2006 ; Kim ら, 2006 ; Kitamura ら, 2006 ; Muta ら, 2015)。例えば、摂食調節に関しては、Akt の下流のキナーゼである mTOR の阻害剤であるラパマイシンの脳室内投与は、インスリン、ロイシン、及びレプチン誘導性の摂食抑制と体重変化を阻止すること (Cota ら, 2006 ; Muta ら, 2015)、mTOR の下流の因子である S6K1 及び S6 タンパク質のリン酸化は、ラットの弓状核及び室傍核において再給餌により促進される (Cota ら, 2006) が視床下部基底部への活性型の S6K1 を発現するアデノウイルス投与は、摂食促進ペプチドである NPY 及び AgRP の発現を抑制する (Blout ら, 2008)。マウスの摂食量と体重は、視床下部における Akt の標的転写因子である FOXO1 の活性化により増加し、不活化により減少すること

(Kim ら, 2006), 及び *in vitro* と *in vivo* の研究において, FOXO1 は NPY と AgRP の転写を促進するが, 摂食抑制ペプチドの前駆体である POMC の転写を抑制すること (Kim ら, 2006 ; Kitamura ら, 2006) が報告されている. 更に, Akt の上流のキナーゼである PI3K の阻害剤の中樞投与は, インスリン誘導性の摂食抑制と体重減少を阻害することも報告されている

(Niswender ら, 2003). これらの知見は, 視床下部 PI3K/Akt/FOXO1 及び mTOR シグナリングが, 摂食を調節する神経ペプチドの転写制御に基づき摂食を調節することを強く示唆する. ニワトリにおいては, mTOR, S6K1, 及び S6 タンパク質は, Akt の下流の因子であること (Tesseraud ら, 2007), 及び IGF-1 は Akt シグナリングを介して筋芽細胞の分化を促進し, 鶏胚における骨格筋の成長を促進すること (Yu ら, 2015) が報告されているが, 脳におけるシグナル伝達に関する知見は極めて少ない. それ故, ニワトリの視床下部における IGF-1 の摂食抑制機構解明のためには, まず, Akt シグナリングの活性化に及ぼす影響を調べる必要があると判断される.

本章では, ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制機構を解明する目的で, まず, ニワトリ視床下部において Akt シグナリングが摂食調節における役割について検証し, 次に, IGF-1 の中樞投与が視床下部 Akt シグナリング, 及び摂食調節ペプチドの発現に及ぼす影響について調べた.

## 第二節 材料及び方法

### 第一項 動物及び飼料

ブロイラーの初生ヒナ (Ross 308) は石井養鶏農業協同組合 (徳島) から, 卵用鶏の初生ヒナ (Ross 308) は日本レイヤー株式会社 (岐阜) から, 購入した. ヒナには配合飼料 (スターターK, CP 22.0%, ME 3,100 kcal/kg, フィードワン株式会社) を給与し, 試験当日まで自由摂食自由飲水条件下で飼育した. 本研究は神戸大学動物実験委員会で審査・承認され, 学長に許可されたものである. 実験は神戸大学動物実験実施規則に基づいて実施した.

### 第二項 絶食及び再給餌がニワトリ視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響

12羽の7日齢のニワトリヒナを平均体重が等しくなるように1群6羽の2群に分け, 自由摂食条件下から24時間絶食後, 及び24時間絶食後から1時間再給餌後に, 断頭により安楽死させた. 頸動脈から採血後, 速やかに遠心分離 (3,000 g, 10 分間, 4 °C) により血漿を分離後, 市販のキット (レビス インスリン-ラット T, シバヤギ, 群馬) を用いてインスリン濃度を測定した. ニワトリ脳地図 (Kuenzel and Masson, 1988) に従い視床下部を摘出し, 速やかに液体窒素で凍結後, -80 °C で保存した. 冷凍保存された視床下部は, ライシスバッファー中で超音波処理によりホモジナイズされ, 遠心

分離（17,900 g, 15 分間, 4 °C）後, 得られた上清を-80 °C で保存した. タンパク質濃度はローリー法により測定した. 骨格筋のライゼートは, SDS-PAGE に供され, ホライズブロット（アトー株式会社, 東京）を用いてウエスタンブロットされた. タンパク質のバンドはケミルミワン Super（ナカライテスク株式会社, 京都）, 及び LumiCube（株式会社リポニクス, 東京）を用いて検出され, CS Analyzer（アトー株式会社, 東京）を用いて数値化された. 抗体は Cell Signaling Technology（Beverly, MA, USA）社の, Anti-Akt（#9272）, anti-phospho-Akt（pAkt）（Thr308）（#9275）, anti-pAkt（Ser473）（#9271）, anti-S6 ribosomal protein（S6）（#2217）, anti-phospho-S6 ribosomal protein（pS6）（Ser240/244）（#5364）, anti-FOXO1（#9454）, anti-phospho-FOXO1（pFOXO1）（Ser256）（#9461）, anti- $\beta$ -actin（#4967）, 及び horseradish peroxidase（HRP）-conjugated anti-rabbit IgG（#7074）を用いた.

### 第三項 Akt シグナリング活性化ホルモンの中樞投与が視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響

ラットにおいては, インスリンの脳室内投与は NPY の発現を抑制し, POMC の発現を促進する（Benoit ら, 2002 ; Qu ら, 2001）. 加えて, ラットへのインスリンの腹腔内投与は視床下部基底部のリン酸化 Akt の量を増加させる（Niswender ら, 2003）. 更に, インスリンは PI3K シグナリングを介

して摂食を抑制することが示されている (Muta ら, 2015; Niswender ら, 2003). ニワトリにおいても, 脳におけるインスリンの Akt シグナリングへの作用は調べられていないものの, インスリンの末梢投与は骨格筋と肝臓の Akt のリン酸化を促進し (Duchêne ら, 2008a; Duchêne ら, 2008b), 抗インスリン血清の投与はそのリン酸化を抑制する (Dupont ら, 2008) ことが報告されている. これらの知見は, ニワトリにおいても, インスリンが Akt シグナリングを介して摂食を抑制している可能性を示す. そこで, 16 羽の 9 日齢の卵用鶏ヒナを, 平均体重が等しくなるように 1 群 8 羽の 2 群に分け, 3 時間絶食した. その後, 10  $\mu$ l 0.1%のエバンスブルーを含む生理的食塩水 (0.85% 塩化ナトリウム水溶液) に溶解した, 0, 或いは 50 pmol のブタインスリン (MP Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) を第二章第二項で示した方法で側脳室内に投与した. 投与 1 時間後, 断頭により安楽死させ, エバンスブルーによる側脳室内の染色状態を確認することによって, 側脳室内に正しく投与されている個体の視床下部における Akt シグナリング関連タンパク質を前項に示した方法で解析した.

#### 第四項 Akt シグナリング阻害剤の中樞投与が視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響

24 羽の 8 日齢のニワトリヒナを, 平均体重が等しくなるように 1 群 8 羽の 3 群に分け, 3 時間絶食した. PI3K 阻害剤である LY294002, 及び mTOR

阻害剤であるラパマイシンは先行研究 (Sekiguchi ら, 2012) に従い, チメチルスルホキシドに溶解した後, 10  $\mu$ l の溶媒 (0.1% エバンスブルー, 5% ポリエチレングリコール, 及び 5% Tween-80 を含む 0.85% 塩化ナトリウム水溶液) に希釈し, 第二章第二項で示した方法で側脳室内に投与した. LY294002 の投与量は 4 nmol, ラパマイシンの投与量は 25 $\mu$ g とした. 投与 1 時間後, 飼料を自由に摂取させ, 30, 60, 及び 120 分後の飼料摂取量を測定した. その後, 断頭により安楽死させ, エバンスブルーによる側脳室内の染色状態を確認することによって, 側脳室内に正しく投与されている個体のデータのみを採用した.

#### 第五項 IGF-1 の中枢投与がニワトリ視床下部摂食調節ペプチドの mRNA 量に及ぼす影響

自由摂食条件下の 24 羽の 8 日齢のブロイラーを平均体重が等しくなるように 1 群 12 羽の 2 群に分け, 第二章第二項で示した方法で側脳室内に 0, 或いは 300 pmol のヒト IGF-1 を投与し, 60 分絶食後, 断頭により安楽死させ, エバンスブルーによる側脳室内の染色状態を確認することによって, 側脳室内に正しく投与されている個体の視床下部を摘出し, 第二章第二項に示した方法で NPY, AgRP, 及び POMC の mRNA 量を解析した. プライマーは NPY (GenBank accession number: NM\_205473), AgRP (GenBank accession number: AB029443), 及び POMC (GenBank accession number: NM\_001031098)

に特異的なプライマー (NPY sense, 5'-CTT GTC GCT GCT GAT CTG -3'; NPY antisense, 5'-GCC TCA GAG CCG AGT AGT-3'; AgRP sense, 5'-GCA GGA AGG TGA TGG TAA C-3'; AgRP antisense, 5'-GTC ACA GCA GGG GAT CTG-3'; POMC sense, 5'-AGA TGG AGA AGG GTT GGA A-3'; POMC antisense, 5'-CGT TGG GGT ACA CCT TGA-3') を用いた。

#### 第六項 IGF-1 の中枢投与がニワトリ視床下部 Akt シグナリングに及ぼす影響

自由摂食条件下の 24 羽の 8 日齢のニワトリヒナを，平均体重が等しくなるように 1 群 12 羽の 2 群に分け，第二章第二項で示した方法で側脳室内に 0 或いは 300 pmol のヒト IGF-1 を投与した。60 分絶食後，断頭により安楽死させ，エバンスブルーによる側脳室内の染色状態を確認することによって，側脳室内に正しく投与されている個体の視床下部を摘出し，本章第二項に示した方法で Akt シグナリング関連タンパク質を解析した。

#### 第七項 異なる鶏種のニワトリヒナにおけるインスリン様成長因子-1 の摂食抑制効果の比較

3 時間絶食した 7 日齢のブロイラー及び 8 日齢の卵用鶏のヒナ各 36 羽を平均体重が等しくなるように 1 群 12 羽の 3 群に分け，第二章第二項で示した方法で側脳室内に 0, 30, 或いは 300 pmol のヒト IGF-1 を投与し，摂食量

に及ぼす影響を調べた。

#### 第八項 統計解析

第四項の実験により得られたデータは分散分析後,, 第七項の実験により得られたデータはチューキークレーマー法により, その他のダネット法により, 第五項, 及び第六項の実験により得られたデータはスチューデントの  $t$  検定によりそれぞれ解析した。

#### 第三節 結果

24 時間絶食後の 1 時間の再給餌は, Akt, FOXO1, 及び S6 タンパク質のリン酸化を促進した (Fig. 6)。また, Akt シグナリングを誘導するホルモンとして知られるインスリンの中枢投与は, 視床下部の Akt, FOXO1, 及び S6 タンパク質のリン酸化を促進した (Fig. 7)。更に, Akt シグナリングの上流の正の制御因子である PI3K, 及び下流の正の制御因子である mTOR の阻害剤 (LY294002, 及びラパマイシン) の中枢投与は, ニワトリヒナの摂食を促進した (Fig. 8)。これらの結果から, 哺乳類と同様, ニワトリヒナにおいても, 視床下部 Akt シグナリングが食後の満腹感誘導による摂食抑制に関与していることが示唆された。

IGF-1 の中枢投与は POMC の mRNA 量を有意に増加させたが, NPY 及び



AgRP の mRNA 量には影響しなかった (Fig. 9). また, IGF-1 は Akt のリン酸化率を上昇させたが, FOXO1 及び S6 タンパク質のそれには影響しなかった (Fig. 10). これらの結果から, ブロイラーにおいては IGF-1 誘導性の Akt シグナリングは減弱していることが示唆された. そこで, IGF-1 の摂食抑制効果を卵用鶏とブロイラーのヒナで比較した. その結果, IGF-1 の中枢投与は両鶏種のヒナの摂食を抑制したが, その効果が現れるための閾値はブロイラーの方が高いことが明らかになった (Fig. 11). これらの結果から, ブロイラーにおける IGF-1 の摂食抑制機構には, 視床下部 Akt シグナリングと, それに基づく POMC の発現促進の関与が示唆されたが, 視床下部における IGF-1 に対する感受性は, 卵用鶏に比べてブロイラーにおいて減弱している可能性が示された.

#### 第四節 考察

Akt の活性化には, ニヶ所のリン酸化部位のリン酸化, 即ち, PI3K による Thr308 のリン酸化と mTORC2 による Ser473 のリン酸化が関与する. 例えば, Akt の生理的役割を果たすためには Thr308 の活性化で十分とされているが, Ser473 の活性化は Akt の活性を最大限 (約 10 倍) にまで高めるとされている (Dibble and Cantley, 2015). 本研究において, IGF-1 は視床下部 Akt の Thr308 と Ser473 の両方をリン酸化したが, 再給餌は Akt の Thr308 のリン酸

化は促進したものの、Ser473 のリン酸化には影響が見られなかった。この原因については不明であるが、24 時間絶食後の 1 時間の再給餌だけでは、Akt の十分な活性化は誘導されなかったのであろう。

ブロイラーにおいては、IGF-1 誘導性の摂食抑制が認められる投与量の閾値が卵用鶏に比べて高いことが明らかになった。ブロイラーは卵用鶏よりも良く食べ (Yuan ら, 2009 ; Saneyasu ら, 2011), 早く成長する (Zhao ら, 2004 ; Willson ら, 2018)。それ故、IGF-1 誘導性の摂食抑制効果における高い閾値は、ブロイラーの摂食量の増加、延いては高成長に関与しているのかもしれない。ここで、成長速度の速いブロイラーは、成長速度の遅い中国の在来種のニワトリに比べて血中 IGF-1 濃度が高いこと (Jia ら, 2018), 及び、同じブロイラーにおいても、成長の早い個体の方が血清 IGF-1 濃度は高いこと (Xiao ら, 2017) が報告されている。これらの知見は、末梢においては高い血漿 IGF-1 濃度が体重増加の原因になっている可能性を示す。それ故、IGF-1 の効果における高い閾値は、ブロイラー脳においてのみ認められるのかもしれない。

インスリンを中枢投与した場合、卵用鶏の摂食は抑制されるが、ブロイラーの摂食は抑制されないことが報告されている (Shiraishi ら, 2011b)。本研究においても、卵用鶏において摂食抑制効果を示す IGF-1 の投与量の閾値は、ブロイラーのそれに比べて低かった。卵用鶏ヒナへのインスリンの脳室内投与は視床下部の Akt, S6 タンパク質, 及び FOXO1 のリン酸化を促進したが、

ブロイラーヒナへの IGF-1 の投与は、視床下部の Akt のリン酸化を促進したものの、FOXO1 のリン酸化には影響しなかった。それ故、ブロイラーにおいては視床下部 Akt/FOXO シグナリング機構が十分に働かず、それによって食欲が亢進し、摂食量が増加している可能性もある。今後、その可能性について検証する必要がある。

本研究においては、IGF-1 はブロイラーの視床下部の FOXO1 のリン酸化には影響しなかったが、FOXO1 の総量を減少させる傾向を示した ( $P = 0.077$ , data not shown)。哺乳類の視床下部においては、リン酸化されていない FOXO1 は *NPY* と *AgRP* の遺伝子の転写を促進し、*POMC* のそれを抑制する (Kim ら, 2006)。それ故、本研究においては、IGF-1 の投与によって核内に存在するリン酸化されていない FOXO1 の量が減少し、*POMC* 遺伝子の発現抑制が解除された可能性もある。しかしながら、*NPY* と *AgRP* の mRNA 量が減少しなかった理由は説明できない。ラットにおいては、アデノウィルスによる視床下部内側基底部の S6K1 の活性化は、*POMC* の mRNA 量に影響することなく、*NPY* と *AgRP* の mRNA 量を減少させる (Blouet ら, 2008)。本研究において、S6 タンパク質のリン酸化は IGF-1 投与によって誘導されていないことから、S6K1 が活性化されていない可能性は極めて高いと判断される。S6K1 の上流の活性化因子である mTOR は Akt 非依存的に調節される (Sasaki and Kitamura, 2010 ; Haissaguerre ら, 2014)。これらのことから、何らかの機構によって mTOR の活性化が不十分となり、その結果、S6K1

の活性化が起こらず，NPY と AgRP の mRNA 量に変動しなかった可能性もある．今後の更なる検討が必要であろう．

## 第五節 小活

本章では，ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制機構を解明する目的で，まず，ニワトリ視床下部において Akt シグナリングが摂食調節における役割について検証し，次に，IGF-1 の中枢投与が視床下部 Akt シグナリング，及び摂食調節ペプチドの発現に及ぼす影響について調べた．

再給餌は，Akt，FOXO1，及び S6 タンパク質のリン酸化を促進した．また，Akt シグナリングを誘導するインスリンの中枢投与は，視床下部の Akt，FOXO1，及び S6 タンパク質のリン酸化を促進した．更に，Akt シグナリングの上流の正の制御因子である PI3K，及び下流の制御因子である mTOR の阻害剤（LY294002，及びラパマイシン）の中枢投与は，ニワトリヒナの摂食を促進した．これらの結果から，哺乳類と同様に，ニワトリヒナにおいても，視床下部 Akt シグナリングが食後の満腹感誘導による摂食抑制に関与していることが示唆された．

IGF-1 の中枢投与は POMC の mRNA 量を有意に増加させたが，NPY 及び AgRP の mRNA 量には影響しなかった．また，IGF-1 は Akt のリン酸化率を上昇させたが，卵用鶏におけるインスリンの効果とは異なり，FOXO1 及び

S6 タンパク質のそれには影響しなかった。これらの結果から、IGF-1 による摂食抑制には Akt の活性化と POMC の発現促進が関与していること、及び IGF-1 誘導性の Akt シグナリングはブロイラーでは減弱していることが示唆された。そこで、IGF-1 の摂食抑制効果を卵用鶏とブロイラーのヒナで比較した結果、IGF-1 の中枢投与は両鶏種のヒナの摂食を抑制したが、その効果が現れるための閾値はブロイラーにおいて高いことが明らかになった。これらの結果から、ブロイラーにおける IGF-1 の摂食抑制機構には、視床下部 Akt シグナリングと POMC の発現促進が関与していることが示唆されたが、視床下部における IGF-1 に対する感受性は、ブロイラーにおいては減弱している可能性が示された。

## 第四章 総括

鶏肉生産用に育種改良されたニワトリであるブロイラーは、鶏卵生産用に改良された卵用鶏と比較して食欲旺盛で極めて成長が速い。しかしながら、近年、その旺盛な食欲に基づく過食による体脂肪の過剰蓄積が、脂肪肝を始めとする代謝異常や、非可食部である内臓脂肪の増加による飼料効率の低下を引き起こすことが問題となっている。ここで、ヒトにおける体脂肪の過剰蓄積に対しては、食事制限によるエネルギー摂取の抑制と運動によるエネルギー消費の促進が有効であるとされているが、エネルギー消費の促進はブロイラーにおいては飼料効率の低下に繋がるため好ましくない。また、給与する飼料を制限することはブロイラーにとってはストレスであり、カニバリズムも誘導されることから望ましくない。それ故、ブロイラーの成長を阻害しない範囲で早めに満腹感を誘導することによって摂食量を減少させ、体脂肪の過剰蓄積を防ぐことが望ましい。しかしながら、ニワトリの食欲調節機構については、未だ不明な点が多い。

本研究では、ニワトリの食欲調節機構解明のための一環として、ニワトリの摂食調節に関与する可能性のある IGF-1 の役割について調べた。

第一章では、本研究の背景と目的を概説した。

第二章では、ニワトリにおける IGF-1 の摂食調節ホルモンとしての役割を明らかにするための一環として、ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制作用の検証

と、栄養状態に応じた IGF-1 及びその結合タンパク質の発現変動を明らかにすることを試みた。

IGF-1 の中枢投与は用量依存的にニワトリヒナの摂食を抑制した。また、IGF-1 及びその受容体の mRNA は、脳の全ての部位で発現していた。IGF-1 の mRNA 量は、脳幹吻側部と小脳に比べて視葉において有意に高い値を示し、IGF-1 受容体 mRNA 量は脳幹吻側部、脳幹尾部、及び視葉に比べて終脳において有意に低い値を示した。しかしながら、6 時間の絶食及び再給餌は、脳の何れの部位においても IGF-1 mRNA 量に影響しなかった。一方、肝臓の IGF-1 mRNA 量は 6 時間の絶食により有意に減少し、6 時間の再給餌によってその減少は回復した。更に、IGF-1 の末梢投与はニワトリヒナの摂食を抑制した。これらの結果から、ニワトリにおいては、肝臓において摂食後に産生される IGF-1 が満腹シグナルとして働くことが示唆された。

肝臓に発現する IGFBP-1~5 の mRNA のうち、IGFBP-1 及び-2 の mRNA 量は、6 時間の絶食により有意に増加し、6 時間の再給餌によってその増加は回復した。一方、脳においても、全ての部位で IGFBP-1~5 の mRNA が検出された。また、脳幹中央部の IGFBP-3 の mRNA 量は 6 時間の絶食により有意に減少し、6 時間の再給餌によっても、その減少は回復しなかった。視葉における IGFBP-5 の mRNA 量は 6 時間絶食後の 6 時間再給餌によって有意に減少した。これらの結果から、ニワトリにおいては、肝臓において摂食後に抑制される IGFBP-1 及び 2 の産生が、IGF-1 の満腹シグナルとしての働

きを更に高める可能性が示された。

第三章では、ニワトリにおける IGF-1 の摂食抑制機構を解明する目的で、まず、ニワトリ視床下部において Akt シグナリングが摂食調節における役割について検証し、次に、IGF-1 の中枢投与が視床下部 Akt シグナリング、及び摂食調節ペプチドの発現に及ぼす影響について調べた。

再給餌は、Akt, FOXO1, 及び S6 タンパク質のリン酸化を促進した。また、Akt シグナリングを誘導するインスリンの中枢投与は、視床下部の Akt, FOXO1, 及び S6 タンパク質のリン酸化を促進した。更に、Akt シグナリングの上流の正の制御因子である PI3K, 及び下流の制御因子である mTOR の阻害剤 (LY294002, 及びラパマイシン) の中枢投与は、ニワトリヒナの摂食を促進した。これらの結果から、哺乳類と同様に、ニワトリヒナにおいても、視床下部 Akt シグナリングが食後の満腹感誘導による摂食抑制に関与していることが示唆された。

IGF-1 の中枢投与は POMC の mRNA 量を有意に増加させたが、NPY 及び AgRP の mRNA 量には影響しなかった。また、IGF-1 は Akt のリン酸化率を上昇させたが、卵用鶏におけるインスリンの効果とは異なり、FOXO1 及び S6 タンパク質のそれには影響しなかった。これらの結果から、IGF-1 による摂食抑制には Akt の活性化と POMC の発現促進が関与していること、及び IGF-1 誘導性の Akt シグナリングはブロイラーでは減弱していることが示唆された。そこで、IGF-1 の摂食抑制効果を卵用鶏とブロイラーのヒナで比較



した結果、IGF-1の中枢投与は両鶏種のヒナの摂食を抑制したが、その効果が現れるための閾値はブロイラーにおいて高いことが明らかになった。これらの結果から、ブロイラーにおけるIGF-1の摂食抑制機構には、視床下部AktシグナリングとPOMCの発現促進が関与していることが示唆されたが、視床下部におけるIGF-1に対する感受性は、ブロイラーにおいては減弱している可能性が示された。

以上、本研究の結果から、IGF-1がニワトリにおいて満腹ホルモンとして働く可能性、その働きには肝臓IGFBP-1及び2も関与する可能性が示された。また、IGF-1の摂食抑制機構として、Aktシグナリングを介した視床下部POMCの発現促進が示唆された。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり，多大なご支援とご指導を賜りました，指導教官である上曾山博教授，ならびに本田和久准教授，實安隆興助教，資源生命科学科応用動物学講座動物遺伝育種学研究室の万年英之教授に厚く感謝を申し上げます。

また，本研究を遂行するにあたり，日夜実験に取り組み，データの作成において，多大なご協力を頂戴致しました，資源生命科学科応用動物学講座栄養代謝学研究室の皆様に，深く御礼申し上げます。

## 参考文献

Allard JB and Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Frontiers in Endocrinology*, 9:117, 2018.

Aoki K, Kondo M, Okuda M, Saneyasu T, Honda K, and Kamisoyama H. Identification, expression analysis, and functional characterization of peptide YY in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 242: 11-17, 2017.

Armstrong CS, Wuarin L and Ishii DN. Uptake of circulating insulin-like growth factor-I into the cerebrospinal fluid of normal and diabetic rats and normalization of IGF-II mRNA content in diabetic rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 59: 649-660, 2000.

Ballard FJ, Johnson RJ, Owens PC, Francis GL, Upton FM, McMurtry JP and Wallace JC. Chicken insulin-like growth factor-I: Amino acid sequence, radioimmunoassay, and plasma levels between strains and during growth. *General and Comparative Endocrinology*, 79: 459-468, 1990.

Beccavin C, Chevalier B, Simon J, and Duclos MJ. Circulating insulin-like growth factors (IGF-I and -II) and IGF binding proteins in divergently selected fat or lean chickens: effect of prolonged fasting. *Growth Hormone & IGF Research*, 9: 187-94, 1999.

Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ and Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *Journal of*

Neuroscience, 22: 9048-9052, 2002.

Bigot K, Taouis M, and Tesseraud S. Refeeding and insulin regulate S6K1 activity in chicken skeletal muscles. *The Journal of Nutrition*, 133: 369-373, 2003.

Blouet C, Ono H and Schwartz GJ. Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metabolism*, 8: 459-467, 2008.

Braun EJ and Sweazea KL. Glucose regulation in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151: 1-9, 2008.

Bungo T, Shiraishi J and Kawakami S. Hypothalamic melanocortin system on feeding regulation in birds: a review. *The Journal of Poultry Science*, 48: 1-1, 2011.

Burnside J and Cogburn LA. Developmental expression of hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in the chicken. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 89: 91-96, 1992.

Buzala M and Janicki B. Review: Effects of different growth rates in broiler breeder and layer hens on some productive traits. *Poult Science*, 95: 2151-2159, 2016.

Cao Y, Nakata M, Okamoto S, Takano E, Yada T, Minokoshi Y, Hirata Y, Nakajima K, Iskandar K, Hayashi Y, Ogawa W, Barsh GS, Hosoda H, Kangawa K, Itoh H, Noda T, Kasuga M and Nakae J. PDK1-Foxo1 in agouti-related peptide neurons regulates energy homeostasis by modulating food intake and energy expenditure. *PLoS One*, 6: e18324, 2011.

Cardona-Gomez GP, Mendez P and Garcia-Segura LM. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Molecular Brain Research*, 107: 80-88, 2002.

Chelian G. Metabolic and cardiovascular diseases in poultry: role of dietary lipids. *Poultry Science*, 86: 1012-1016, 2007.

Christensen K, McMurtry JP, Thaxton YV, Thaxton JP, Corzo A, McDaniel C, and Scanes CG. Metabolic and hormonal responses of growing modern meat-type chickens to fasting. *British Poultry Science*, 54: 199-205, 2013.

Clemmons DR. Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocrine Reviews* 22: 800-817, 2001.

Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC and Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 312: 927-930, 2006.

Covasa M and Forbes JM. Exogenous cholecystokinin octapeptide in broiler chickens: satiety, conditioned colour aversion, and vagal mediation. *Physiology & Behavior*, 56: 39-49, 1994.

Davis JL, Masuoka DT, Gerbrandt LK and Cherkin A. Autoradiographic distribution of L-proline in chicks after intracerebral injection. *Physiology & Behavior*, 22: 693-695, 1979.

Dibble CC and Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology*, 25: 545-555, 2015.

- Duan C and Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 44-52, 2005.
- Duchêne S, Audouin E, Berri C, Dupont J and Tesseraud S. Tissue-specific regulation of S6K1 by insulin in chickens divergently selected for growth. *General and Comparative Endocrinology*, 156: 190-198, 2008a.
- Duchêne S, Métayer S, Audouin E, Bigot K, Dupont J and Tesseraud S. Refeeding and insulin activate the Akt/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. *Domestic Animal Endocrinology*, 34: 1-13, 2008b.
- Duclos MJ, Beccavin C and Simon J. Genetic models for the study of insulin-like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. *Domestic Animal Endocrinology*, 17: 231-243, 1999.
- Duclos MJ, Chevalier B, Marchand-Brustel YL, Tanti JF, Goddard C and Simon J. Insulin-like growth factor-I-stimulated glucose transport in myotubes derived from chicken muscle satellite cells. *Journal of Endocrinology*, 137: 465-472, 1993.
- Duclos MJ, Chevalier B, Upton Z, and Simon J. Insulin-like growth factor-I effect on chicken hepatoma cells (LMH) is inhibited by endogenous IGF-binding proteins. *Growth Hormone & IGF Research*, 8: 97-103, 1998.
- Duclos MJ, Insulin-like growth factor-I (IGF-1) mRNA levels and chickens muscle growth. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56: 25-35, 2005.
- Dupont J, Tesseraud S, Derouet M, Collin A, Rideau N, Crochet S, Godet E, Cailleau-Audouin

- E, Métayer-Coustard S, Duclos MJ, Gespach C, Porter TE, Cogburn LA and Simon J. Insulin immune-neutralization in chicken: effects on insulin signaling and gene expression in liver and muscle. *Journal of Endocrinology*, 197: 531-542, 2008.
- Firth SM, and Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Reviews* 23: 824-854, 2002.
- Foster LA, Ames NK and Emery RS. Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. *Physiology & Behavior*, 50: 745-749, 1991.
- Güntürkün O. Sensory Physiology: Vision, in: Whittow G.C. (Eds.) , *Strukie's Avian Pysiology*. Academic Press, New York, pp. 1-19, 2000.
- Haissaguerre M, Saucisse N and Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 397: 67-77, 2014.
- Holzenberger M and Lapointe F. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II in the avian brain: relationship of in situ hybridization patterns with IGF type 1 receptor expression. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18: 69-82, 2000.
- Honda K, Kamisoyama H, Saneyasu T, Sugahara K and Hasegawa S. Central administration of insulin suppresses food intake in chicks. *Neuroscience Letters*, 423: 153-157, 2007.
- Honda K, Saneyasu T, Aoki K, Shimatani T, Yamaguchi T and Kamisoyama H. Correlation analysis of hypothalamic mRNA levels of appetite regulatory neuropeptides and several metabolic parameters in 28-day-old layer chickens. *Animal Science Journal*, 86:

517–522, 2015a

Honda K, Saneyasu T and Kamisoyama H. Gut hormones and regulation of food intake in birds.

The Journal of Poultry Science, 54: 103-110, 2017.

Honda K, Saneyasu T, Shimatani T, Aoki K, Yamaguchi T, Nakanishi K and Kamisoyama H.

Intracerebroventricular administration of chicken glucagon-like peptide-2 potently suppresses food intake in chicks. Animal Science Journal, 86: 312–318, 2015b.

Honda K, Shimatani T, Aoki K, Yamaguchi T, Kondo M, Saneyasu T and Kamisoyama H.

Glucagon-like peptide-2 functions as anorexigenic peptide not only in the central nervous system but also in the peripheral circulation in broiler chicks. The Journal of Poultry Science, 52: 183-187, 2015c.

Hong H, Cui ZZ, Zhu L, Fu SP, Rossi M, Cui YH and Zhu BM. Central IGF1 improves glucose

tolerance and insulin sensitivity in mice. Nutrition & Diabetes 7: 2, 2017.

Huybrechts LM, King DB, Lauterio TJ, Marsh J and Scanes CG. Plasma concentrations of

somatomedin-C in hypophysectomized, dwarf and intact growing domestic fowl as determined by heterologous radioimmunoassay. Journal of Endocrinology, 104: 233-239, 1985.

Jia J, Ahmed I, Liu L, Liu Y, Xu Z, Duan X, Li Q, Dou T, Gu D, Rong H, Wang K, Li Z, Talpur

MZ, Huang Y, Wang S, Yan S, Tong H, Zhao S, Zhao G, Te Pas MFW, Su Z and Ge C.

Selection for growth rate and body size have altered the expression profiles of somatotrophic axis genes in chickens. PLoS One 13: e0195378, 2018.



- Julian RJ. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry--a review. *The Veterinary Journal*, 169: 350-369, 2005.
- Kaiya H, Saito ES, Tachibana T, Furuse M and Kangawa K. Changes in ghrelin levels of plasma and proventriculus and ghrelin mRNA of proventriculus in fasted and refed layer chicks. *Domestic Animal Endocrinology*, 32: 247-259, 2007.
- Kim MS, Pak YK, Jang PG, Namkoong C, Choi YS, Won JC, Kim KS, Kim SW, Kim HS, Park JY, Kim YB and Lee KU. Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, 9: 901-906, 2006.
- Kita K, Hangsanet K, Shibata T, Conlon MA, Sasaki T, Saito N and Okumura J. Refeeding increases hepatic insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression and plasma IGF-I concentration in fasted chicks. *British Poultry Science*, 39: 679-682, 1998.
- Kita K, Nagao K, Taneda N, Inagaki Y, Hirano K, Shibata T, Yaman MA, Conlon MA, and Okumura J. Insulin-like growth factor binding protein-2 gene expression can be regulated by diet manipulation in several tissues of young chickens. *The Journal of Nutrition*, 132: 145-151, 2002.
- Kita K, Tomas FM, Owens PC, Knowles SE, Forbes BE, Upton Z, Hughes R and Ballard FJ. Influence of nutrition on hepatic IGF-I mRNA levels and plasma concentrations of IGF-I and IGF-II in meat-type chickens. *Journal of Endocrinology*, 149: 181-190, 1996.
- Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua Jr SC, Xu AW, Barsh GS, Rossetti L and Accili D. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake.

- Nature Medicine, 12: 534-540, 2006.
- Krestel-Rickert DH, Baile CA, and Buonomo FC. Changes in insulin, glucose and GH concentrations in fed chickens. *Physiol & Behavior* 37: 361-363, 1986.
- Kuenzel WJ and Masson MA. Stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 1988.
- Kuenzel WJ. Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals. *The Journal of Nutrition*, 124: 1355S-1370S, 1994.
- Lee PDK, Peacock A, Roessler MK, Hester J and Reeves JT. Insulin-like growth factor (IGF) -I and IGF-binding activity in normal and fast-growing chickens. *Life Science*, 45: 2465-2470, 1989.
- Lei MM, Nie QH, Peng X, Zhang DX, and Zhang XQ. Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits. *Poultry Science*, 84: 1191-1198, 2005.
- Leili S, Buonomo FC and Scanes CG. The effects of dietary restriction on insulin-like growth factor (IGF) -I and II, and IGF-binding proteins in chickens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216: 104-111, 1997.
- Leili S and Scanes CG. The effects of protein restriction on insulin-like growth factor-I and IGF-binding proteins in chickens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218: 322-328, 1998.
- Leng L, Wang S, Li Z, Wang Q, and Li H. A polymorphism in the 3'-flanking region of

insulin-like growth factor binding protein 2 gene associated with abdominal fat in chickens. *Poult Science*, 88: 938-942, 2009.

Li ZH, Li H, Zhang H, Wang SZ, Wang QG, and Wang YX. Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken. *Journal of Animal Science*, 84: 2902-2906, 2006.

Lu H, Martinez-Nieves B, Lapanowski K and Dunbar J. Intracerebroventricular insulin-like growth factor-1 decreases feeding in diabetic rats. *Endocrine* 14: 349-352, 2001.

Luna-Acosta JL, Alba-Betancourt C, Martínez-Moreno CG, Ramírez C, Carranza M, Luna M and Arámburo C. Direct antiapoptotic effects of growth hormone are mediated by PI3K/Akt pathway in the chicken bursa of Fabricius. *General and Comparative Endocrinology*, 224: 148-159, 2015.

Mahagna M and Nir I. Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-type chicks after hatching. *British Poultry Science*, 37: 359-371, 1996.

McMurtry JP, Francis GL, Upton Z, Walton PE, Rosselot G, Caperna TJ, and Brocht DM. Plasma clearance and tissue distribution of labelled chicken and human IGF-I and IGF-II in the chicken. *The Journal of Endocrinology*, 150: 149-160, 1996.

Mohammadrezaei M, Toghyani M, Gheisari A, Toghyani M and Eghbalsaied S. Synergistic effect of fadrozole and insulin-like growth factor-I on female-to-male sex reversal and

- body weight of broiler chicks. *PLoS One* 30: e103570, 2014.
- Muta K, Morgan DA and Rahmouni K. The role of hypothalamic mTORC1 signaling in insulin regulation of food intake, body weight, and sympathetic nerve activity in male mice. *Endocrinology*, 156: 1398-1407, 2015.
- Nagao K, Aman Yaman M, Murai A, Sasaki T, Saito N, Okumura J, and Kita K. Insulin administration suppresses an increase in insulin-like growth factor binding protein-2 gene expression stimulated by fasting in the chicken. *British Poultry Science*, 42: 501-504, 2001.
- Nakashima K, Ishida A, Shimamoto S, Ijiri D, Ohtsuka A. Effects of insulin-like growth factor-I on the expression of atrogen-1/MAFbx in chick myotube cultures, *The Journal of Poultry Science*, 54: 247-252, 2017.
- Nishijima T, Piriz J, Dufлот S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nuñez A and Torres-Aleman I. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*, 67: 834-846, 2010.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers Jr. MG, Seeley RJ and Schwartz MW. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes*, 52: 227-231, 2003.
- Ou JT, Tang SQ, Sun DX, and Zhang Y. Polymorphisms of three neuroendocrine-correlated

- genes associated with growth and reproductive traits in the chicken. *Poultry Science*, 88: 722-727, 2009.
- Pym RAE, Johnson RJ, Etse DB and Eason P. Inheritance of plasma insulin-like growth factor-I and growth rate, food intake, food efficiency and abdominal fatness in chickens. *British Poultry Science*, 32: 285-293, 1991.
- Qu SY, Yang YK, Li JY, Zeng Q and Gantz I. Agouti-related protein is a mediator of diabetic hyperphagia. *Regulatory Peptides*, 98: 69-75, 2001.
- Radhakrishnan Y, Busby Jr. WH, Shen X, Maile LA and Clemmons DR. Insulin-like growth factor-I-stimulated insulin receptor substrate-1 negatively regulates Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase substrate-1 function in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 15682-15695, 2010.
- Reinhardt RR and Bondy CA. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology*, 135: 1753-1761, 1994.
- Richards MP and Proszkowiec-Weglarz M. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poultry Science*, 86: 1478-1490, 2007.
- Ritchey ER, Zelinka CP, Tang J, Liu J and Fischer AJ. The combination of IGF1 and FGF2 and the induction of excessive ocular growth and extreme myopia. *Experimental Eye Research*, 99: 1-16, 2012.
- Rodríguez-Sinovas A, Fernández E, Manteca X, Fernández AG and Goñalons E. CCK is involved in both peripheral and central mechanisms controlling food intake in chickens.

American Journal of Physiology, 272: R334-R340, 1997.

Sam AH, Troke RC, Tan TM and Bewick GA. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*, 63: 46-56, 2012.

Saneyasu T, Honda K, Kamisoyama H, Ikura A, Nakayama Y and Hasegawa S, Neuropeptide Y effect on food intake in broiler and layer chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 159: 422-426, 2011.

Saneyasu T, Tsuchii N, Nakano Y, Kitashiro A, Tsuchihashi T, Shindo H, Honda K and Kamisoyama H. Effects of short-term fasting on the Akt-mediated pathway involved in protein metabolism in chicken skeletal muscle. *Domestic Animal Endocrinology*, 61: 54-61, 2017.

Sasaki T and Kitamura T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. *Endocrine Journal*, 57: 939-946, 2010.

Sato M and Frohman LA. Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology*, 133: 793-799, 1993.

Savory CJ and Gentle MJ. Effects of food deprivation, strain, diet and age on feeding responses of fowls to intravenous injections of cholecystokinin. *Appetite*, 4: 165-176, 1983.

Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, Yamaya S and Itoi E. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissues damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice.

Journal of Neurotrauma, 29: 946-956, 2012.

Seroussi E, Cinnamon Y, Yosefi S, Genin O, Smith JG, Rafati N, Bornelöv S, Andersson L and

Friedman-Einat M. Identification of the long-sought leptin in chicken and duck:

expression pattern of the highly GC-rich avian leptin fits an autocrine/paracrine rather

than endocrine function. *Endocrinology*, 157: 737-751, 2016.

Shiraishi J, Yanagita K, Fujita M and Bungo T. Central insulin suppresses feeding behavior via

melanocortins in chicks. *Domestic Animal Endocrinology*, 34: 223-228, 2008.

Shiraishi J, Yanagita K, Fukumori R, Sugino T, Fujita M, Kawakami S, McMurty JP and Bungo

T. Comparisons of insulin related parameters in commercial-type chicks: Evidence for

insulin resistance in broiler chicks. *Physiology & Behavior*, 103: 233-239, 2011b.

Sims W, Yi J, Cline MA and Gilbert ER. Central injection of a synthetic chicken partial leptin

peptide does not affect food intake in chicks. *Neuroscience Letters*, 656: 165-168, 2017.

Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C and Geary N. Ghrelin, CCK,

GLP-1, and PYY (3-36) : Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and

Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB. *Physiological Reviews*, 97: 411-463,

2017.

Tachibana T, Matsuda K, Kawamura M, Ueda H, Khan MS and Cline MA. Feeding-suppressive

mechanism of sulfated cholecystokinin (26-33) in chicks. *Comparative Biochemistry*

and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology, 161: 372-378, 2012.

Tesseraud S, Métayer S, Duchêne S, Bigot K, Grizard J and Dupont J. Regulation of protein

- metabolism by insulin: value of different approaches and animal models. *Domestic Animal Endocrinology*, 33: 123-142, 2007.
- Tokushima Y, Takahashi K, Sato K and Akiba Y. Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 141: 43-48, 2005.
- Tomas FM, Pym RA, McMurtry JP and Francis GL. Insulin-like growth factor (IGF) -I but not IGF-II promotes lean growth and feed efficiency in broiler chickens. *General and Comparative Endocrinology*, 110: 262-275, 1998.
- Upton FZ, Francis GL, Ross M, Wallace JC and Ballard FJ. Production and characterization of recombinant chicken insulin-like growth factor-I from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 9: 83-92, 1992.
- Williams KW and Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature Neuroscience*, 15: 1350-1355, 2012.
- Willson NL, Forder REA, Tearle R, Williams JL, Hughes RJ, Natrass GS and Hynd PI. Transcriptional analysis of liver from chickens with fast (meat bird) , moderate (F1 layer x meat bird cross) and low (layer bird) growth potential. *BMC Genomics*, 19:309, 2018.
- Woods SC. The control of food intake: behavioral versus molecular perspectives. *Cell Metabolism*, 9: 489-498, 2009.



Xiao Y, Wu C, Li K, Gui G, Zhang G and Yang H. Association of growth rate with hormone levels and myogenic gene expression profile in broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8: 43, 2017.

Yu M, Wang H, Xu Y, Yu D, Li D, Liu X and Du W. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Biology International*, 39: 910-922, 2015.

Yuan L, Ni Y, Barth S, Wang Y, Grossmann R and Zhao R. Layer and broiler chicks exhibit similar hypothalamic expression of orexigenic neuropeptides but distinct expression of genes related to energy homeostasis and obesity. *Brain Research*, 1273: 18-28, 2009.

Zapf J and Froesch ER. Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Research*, 24: 121-130, 1986.

Zhao R, Muehlbauer E, Decuypere E and Grossmann R. Effect of genotype-nutrition interaction on growth and somatotropic gene expression in the chicken. *General and Comparative Endocrinology*, 136: 2-11, 2004.

Table 1. Effects of fasting and refeeding on the mRNA levels of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) in the liver of chicks

	Feeding	Fasting	Refeeding
IGFBP-1	1.00 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.81 ± 1.91 <sup>b</sup>	1.07 ± 0.26 <sup>a</sup>
IGFBP-2	1.00 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.72 ± 0.78 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>a</sup>
IGFBP-3	1.00 ± 0.08	0.93 ± 0.07	0.80 ± 0.12
IGFBP-4	1.00 ± 0.20	0.64 ± 0.07	0.59 ± 0.05
IGFBP-5	1.00 ± 0.12	0.70 ± 0.06	0.95 ± 0.17

Values are means ± SEM of six chicks in each group. Groups with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

(The Journal of Poultry Science, 55, 269-273, 2018. doi: 10.2141/jpsa.0180005 より転載)

Table 2. Effects of fasting and refeeding on the mRNA levels of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) in the brain of chicks

	Feeding	Fasting	Refeeding
Telencephalone			
IGFBP-1	1.00 ± 0.09	1.15 ± 0.07	0.97 ± 0.09
IGFBP-2	1.00 ± 0.04	1.11 ± 0.10	0.95 ± 0.05
IGFBP-3	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06	0.95 ± 0.04
IGFBP-4	1.00 ± 0.06	0.90 ± 0.09	1.10 ± 0.07
IGFBP-5	1.00 ± 0.07	1.11 ± 0.13	0.99 ± 0.08
Optic lobes			
IGFBP-1	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.12	0.94 ± 0.11
IGFBP-2	1.00 ± 0.07	0.92 ± 0.09	0.89 ± 0.14
IGFBP-3	1.00 ± 0.06	0.86 ± 0.04	0.88 ± 0.07
IGFBP-4	1.00 ± 0.14	0.94 ± 0.11	0.91 ± 0.13
IGFBP-5	1.00 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>b</sup>
Cerebellum			
IGFBP-1	1.00 ± 0.13	1.22 ± 0.05	1.05 ± 0.21
IGFBP-2	1.00 ± 0.04	1.04 ± 0.12	1.08 ± 0.09
IGFBP-3	1.00 ± 0.12	0.97 ± 0.07	1.12 ± 0.10
IGFBP-4	1.00 ± 0.15	1.17 ± 0.13	1.23 ± 0.12
IGFBP-5	1.00 ± 0.11	1.26 ± 0.07	1.00 ± 0.14
Rostal part of the brainstem			
IGFBP-1	1.00 ± 0.06	1.05 ± 0.10	0.81 ± 0.07
IGFBP-2	1.00 ± 0.05	1.02 ± 0.04	1.24 ± 0.17
IGFBP-3	1.00 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.04
IGFBP-4	1.00 ± 0.13	1.18 ± 0.05	1.07 ± 0.10
IGFBP-5	1.00 ± 0.04	0.98 ± 0.07	1.01 ± 0.08
Middle part of the brainstem			
IGFBP-1	1.00 ± 0.08	1.02 ± 0.06	0.89 ± 0.10
IGFBP-2	1.00 ± 0.04	0.97 ± 0.05	0.89 ± 0.07
IGFBP-3	1.00 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.02 <sup>b</sup>
IGFBP-4	1.00 ± 0.11	0.87 ± 0.07	0.94 ± 0.07
IGFBP-5	1.00 ± 0.07	0.78 ± 0.05	0.80 ± 0.07
Caudal part of the brainstem			
IGFBP-1	1.00 ± 0.09	1.05 ± 0.03	0.84 ± 0.09
IGFBP-2	1.00 ± 0.07	1.10 ± 0.18	0.90 ± 0.07
IGFBP-3	1.00 ± 0.04	0.93 ± 0.03	0.87 ± 0.04
IGFBP-4	1.00 ± 0.11	1.13 ± 0.09	1.32 ± 0.16
IGFBP-5	1.00 ± 0.13	0.98 ± 0.07	0.94 ± 0.06

Values are means ± SEM of six chicks in each group. Groups with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

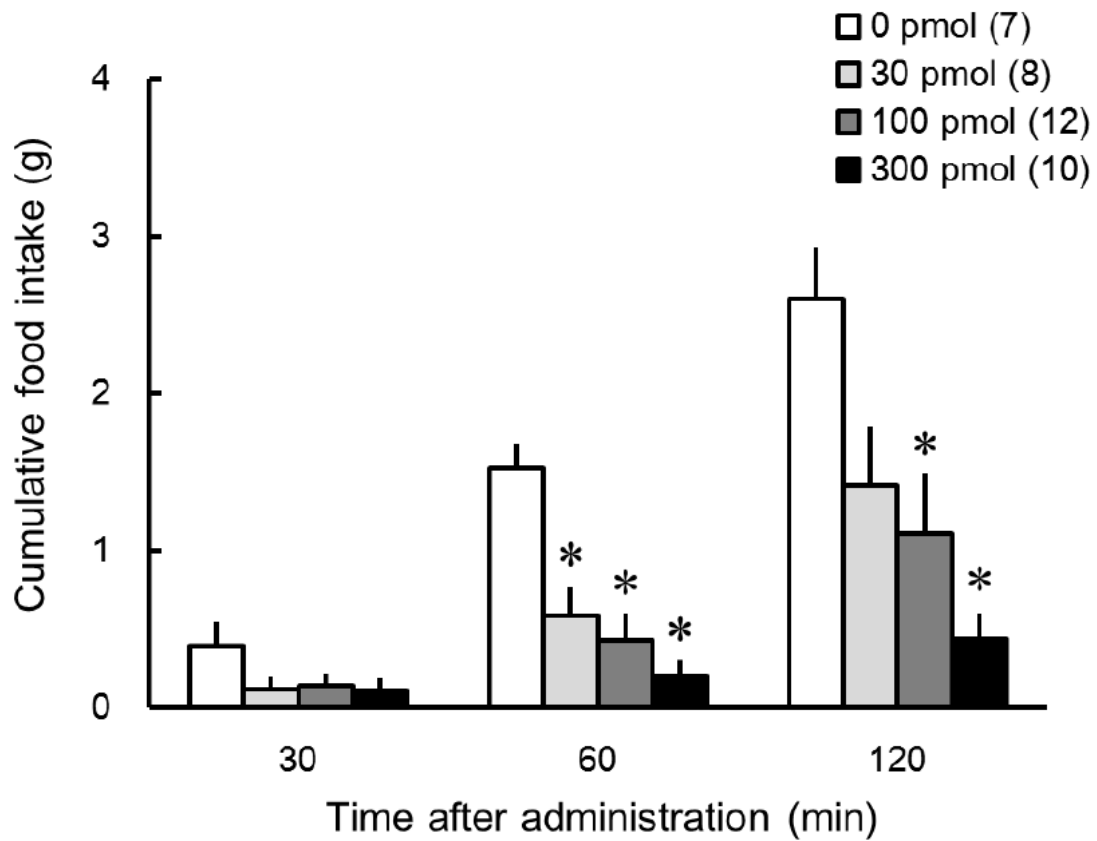


Fig. 1. Effects of central administration of insulin-like growth factor-1 on food intake in chicks. Data represent means  $\pm$  S.E.M. The number of chicks used is shown in parentheses. Groups with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

(Physiology & Behavior, 179, 308-312, 2017. doi:10.1016/j.physbeh.2017.07.001 より転載)

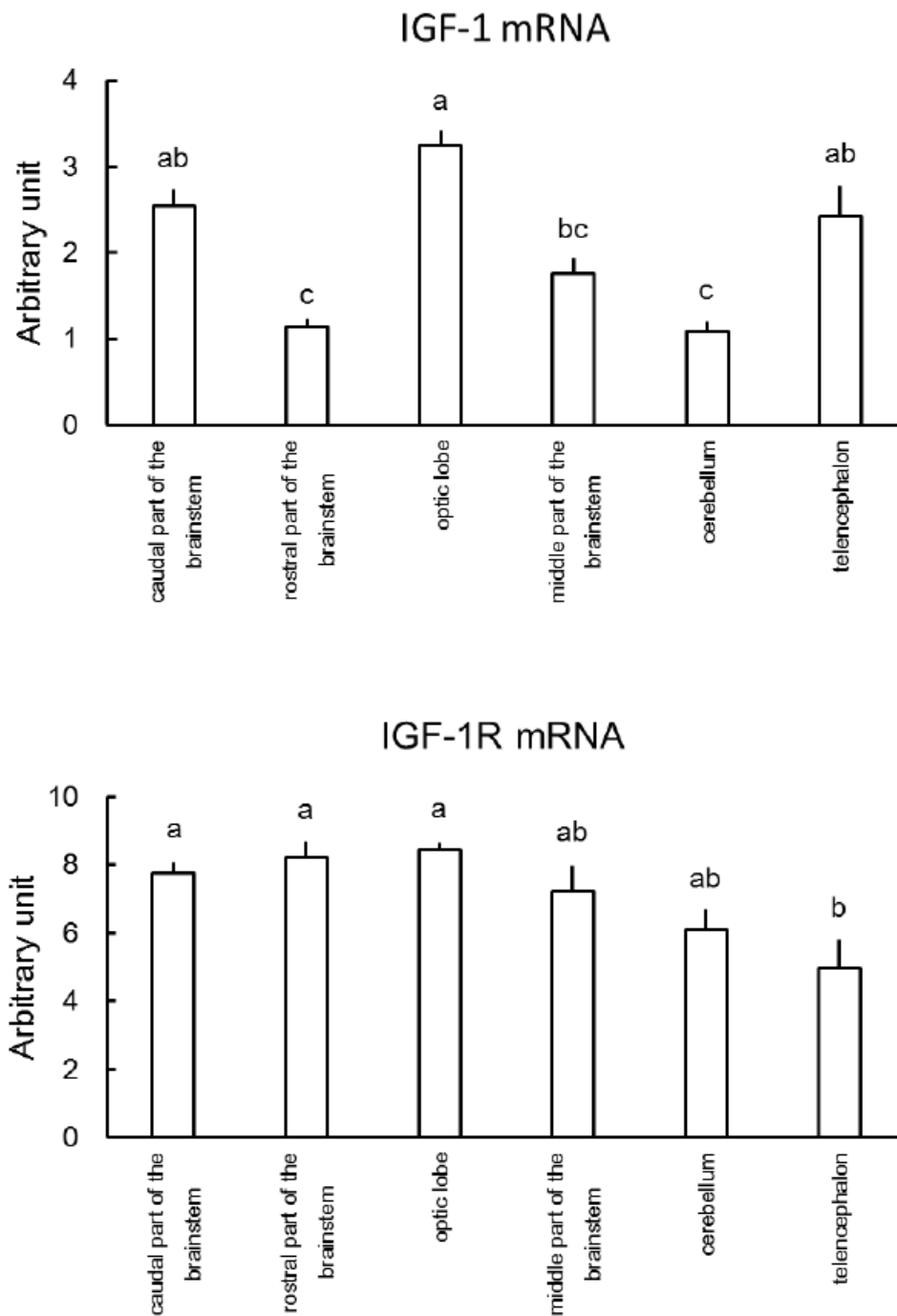


Fig. 2. Distribution of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its receptor (IGF-1R) mRNAs in the brain of chicks. Data represent means  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Groups with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

(Physiology & Behavior, 179, 308-312, 2017. doi:10.1016/j.physbeh.2017.07.001 より転載)

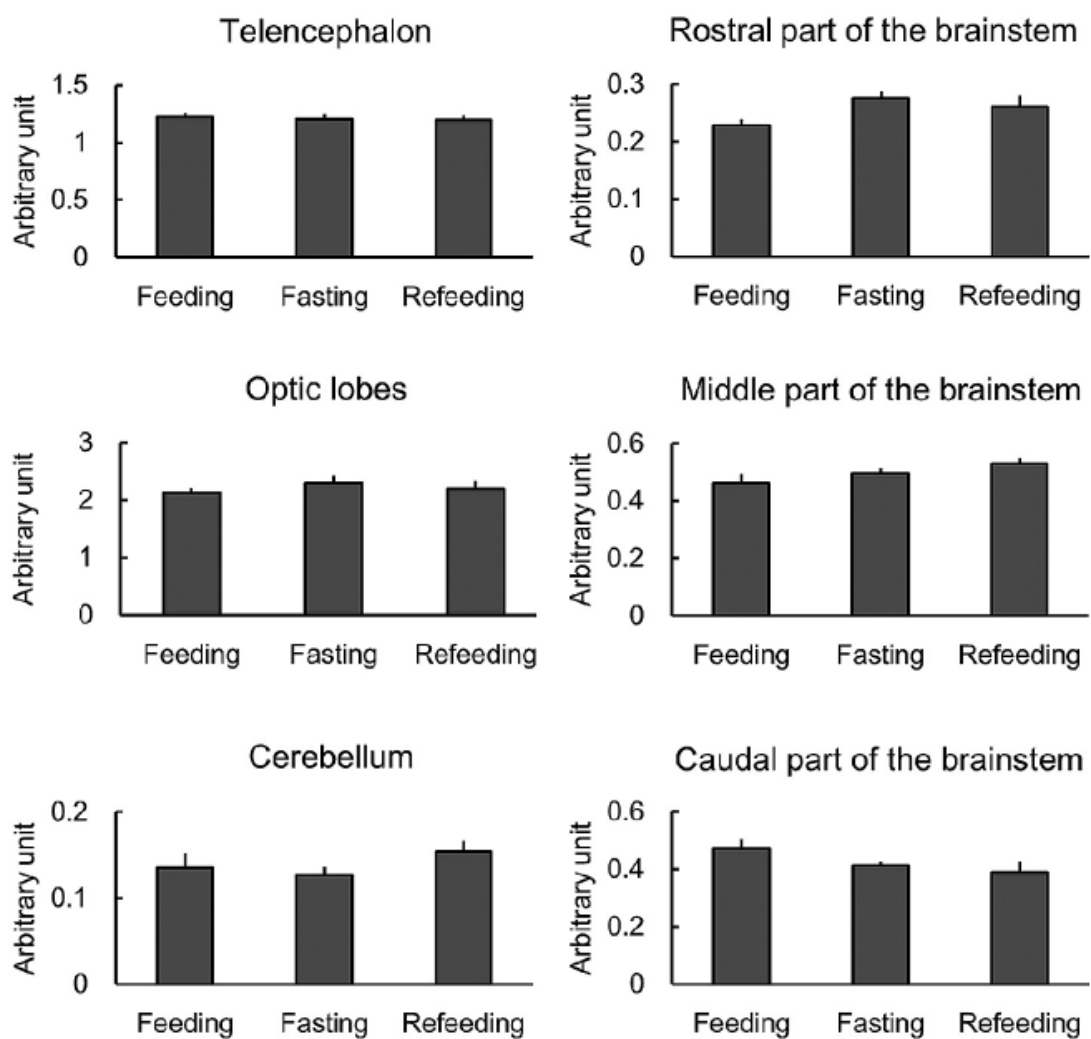


Fig. 3. Effects of fasting and refeeding on the mRNA levels of insulin-like growth factor-1 in the brain. Data are means  $\pm$  S.E.M. (n = 6).

(Physiology & Behavior, 179, 308-312, 2017. doi:10.1016/j.physbeh.2017.07.001 より転載)

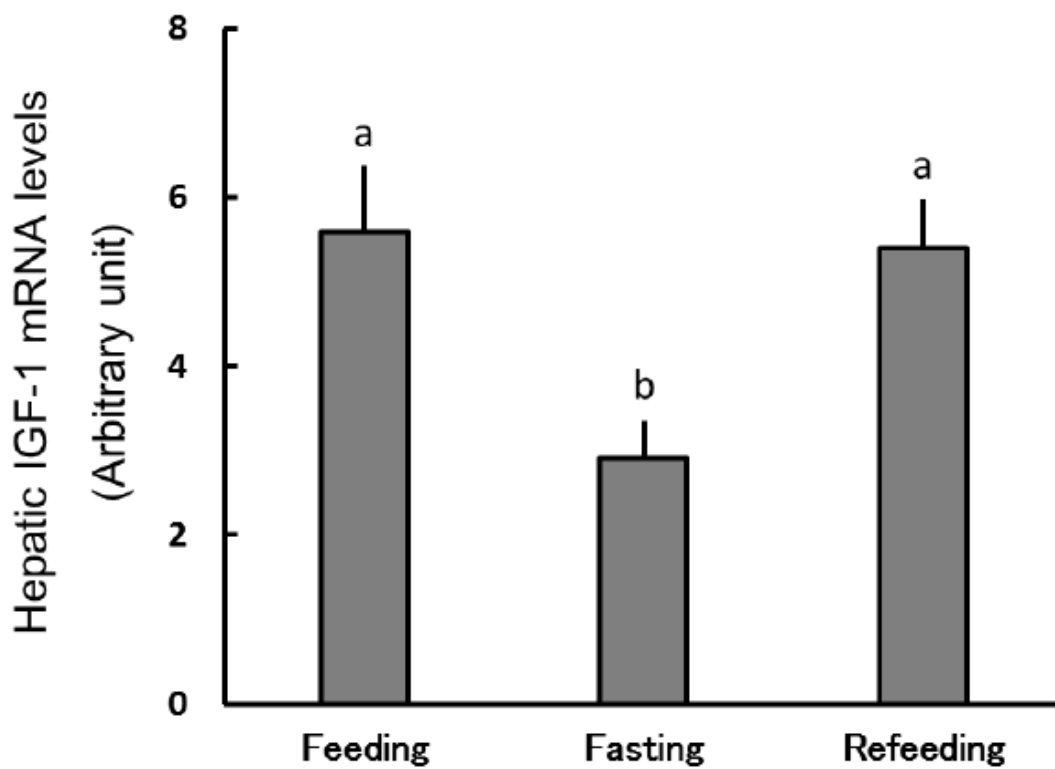


Fig. 4. Effects of fasting and refeeding on the hepatic insulin-like growth factor-1 mRNA levels in chicks. Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ). Groups with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

(Physiology & Behavior, 179, 308-312, 2017. doi:10.1016/j.physbeh.2017.07.001 より転載)

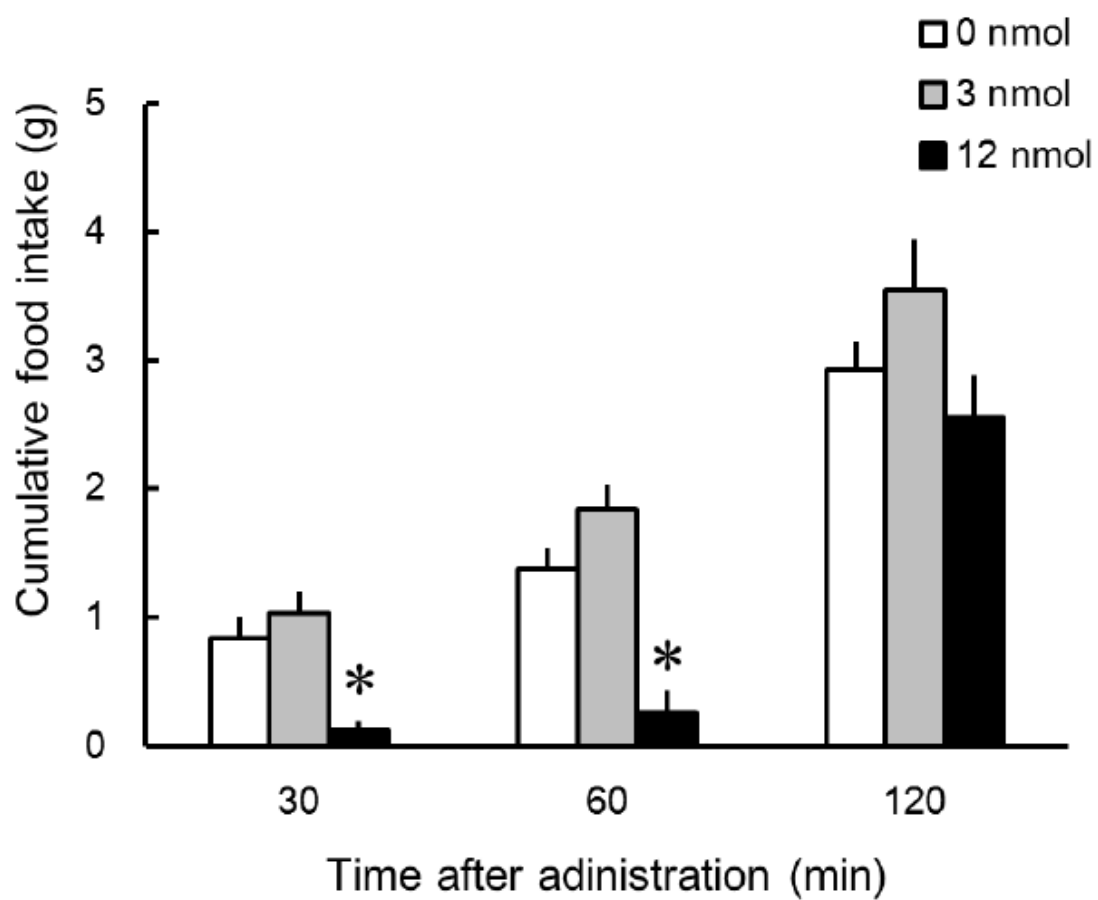


Fig. 5. Effects of peripheral administration of insulin-like growth factor-1 on food intake in chicks. Data represent means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ). Groups with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

(Physiology & Behavior, 179, 308-312, 2017. doi:10.1016/j.physbeh.2017.07.001 より転載)



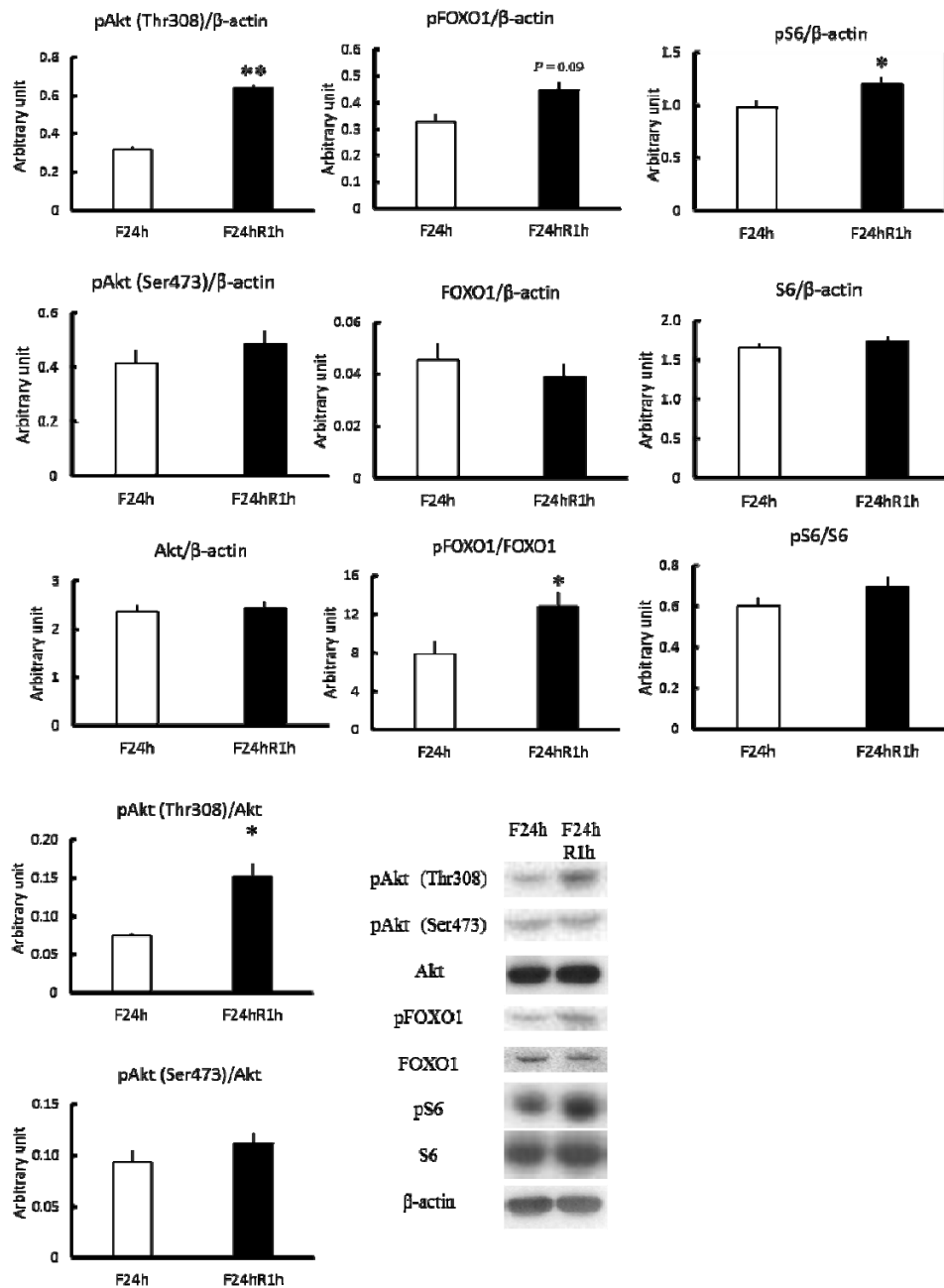


Figure 6. Effects of refeeding on the protein levels of insulin signaling-related factors in chicken hypothalamus. Data are expressed as mean ± SEM of six birds in each group. The Student's *t*-test was used to analyze the differences between groups. \*, \*\*Significance with respect to the fasting group (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ). F24h, 24 h-fasting group; F24hR1h, 1 h-refeeding after 24 h-fasting group.

(Neuroscience Letters, 670, 48-52, 2018. doi:10.1016/j.neulet.2018.01.032 より転載)

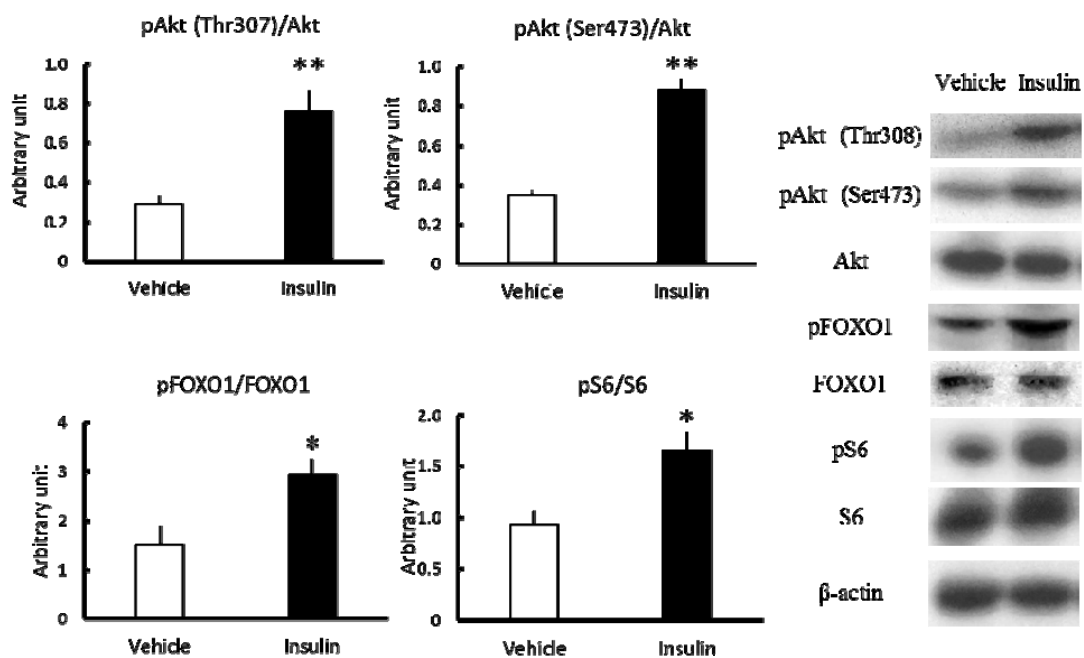


Figure 7. Effects of central insulin injection on the protein levels of insulin signaling-related factors in chicken hypothalamus. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of four birds in each group. The Student's *t*-test was used to analyze the differences between groups. \*, \*\*Significance with respect to the vehicle group (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

(Neuroscience Letters, 670, 48-52, 2018. doi:10.1016/j.neulet.2018.01.032 より転載)

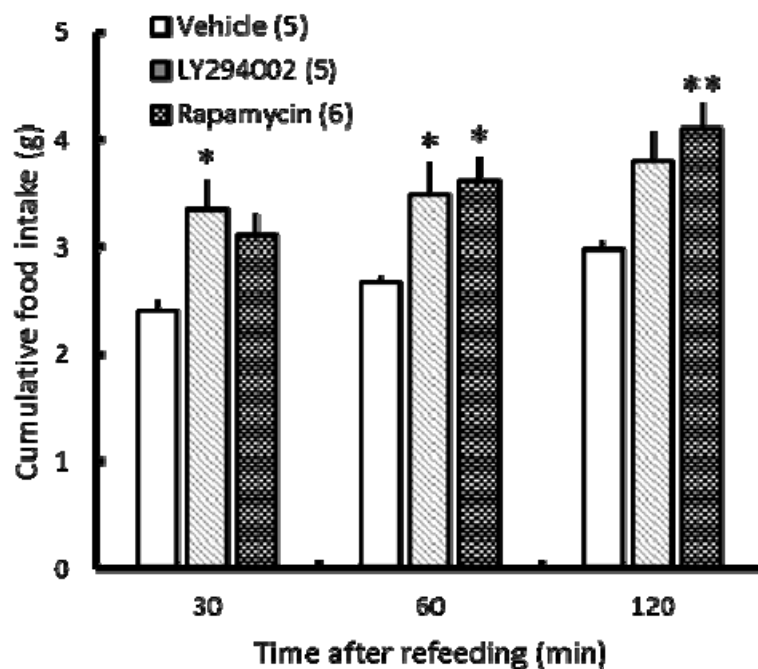


Figure 8. Effects of central injection of LY294002 or rapamycin on food intake in chicks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM in each group. The Dunnett's test was used to analyze the differences between groups. \*, \*\*Significance with respect to the vehicle group (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

(Neuroscience Letters, 670, 48-52, 2018. doi:10.1016/j.neulet.2018.01.032 より転載)

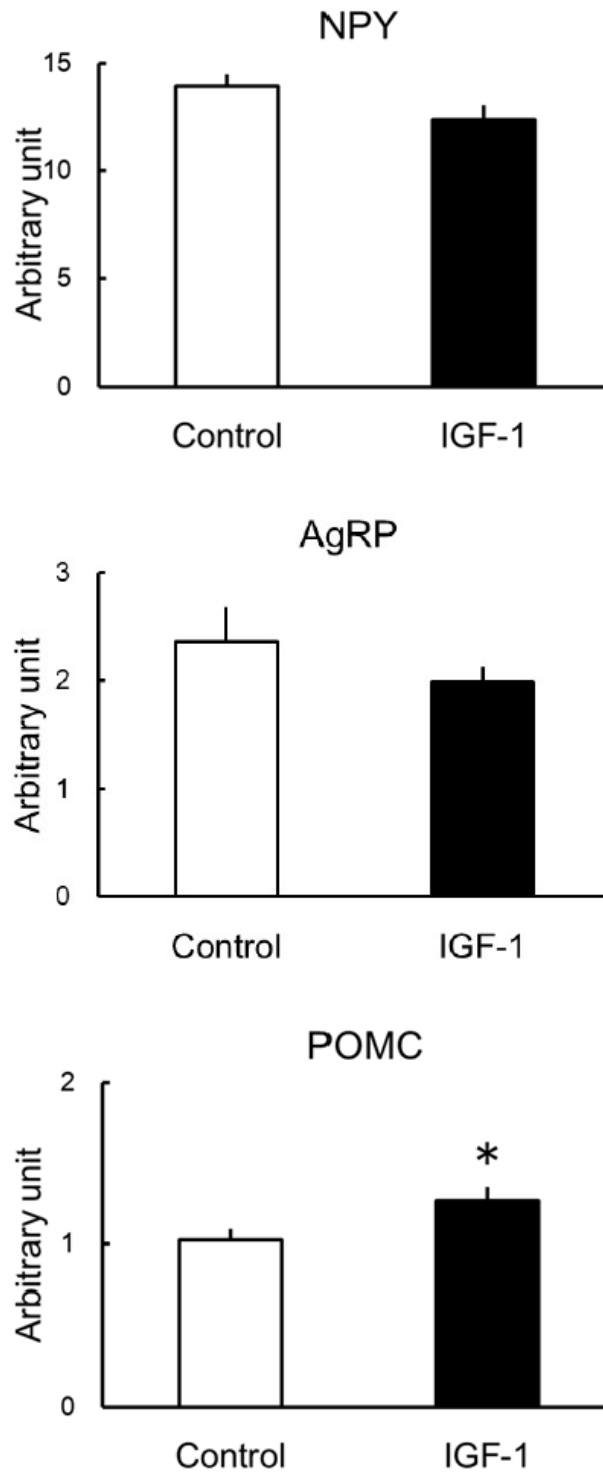


Fig. 9. Effects of central administration of insulin-like growth factor-1 on the mRNA levels of appetite regulation-related genes in chicken hypothalamus. Data represent means  $\pm$  S.E.M (n = 11). \*, Significant with respect to the control group ( $P < 0.05$ ).

(The Journal of Poultry Science, doi: 10.2141/jpsa.0180127 より転載)

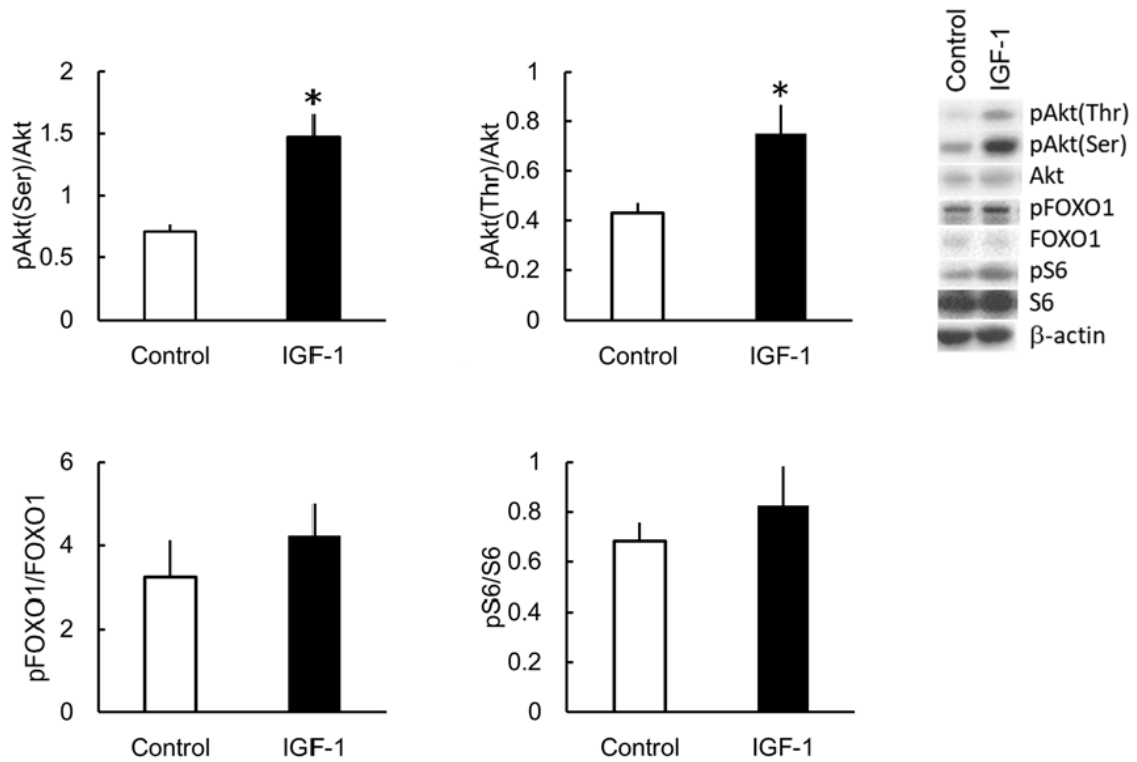


Fig. 10. Effects of central administration of insulin-like growth factor-1 on the Akt-mediated signaling molecules in chicken hypothalamus. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 8). \*, Significant with respect to the control group ( $P < 0.05$ ).

(The Journal of Poultry Science, doi: 10.2141/jpsa.0180127 より転載)

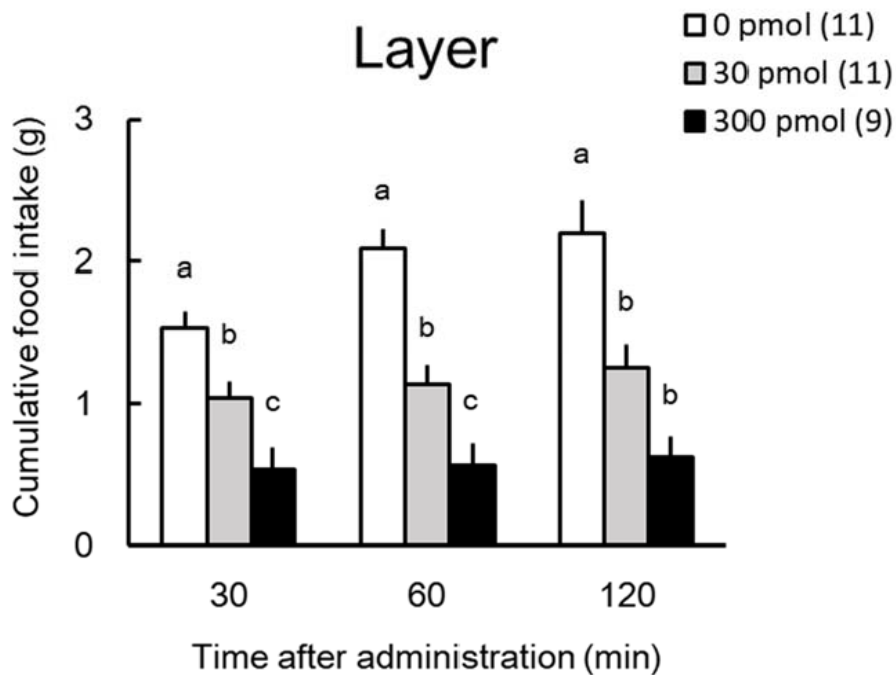
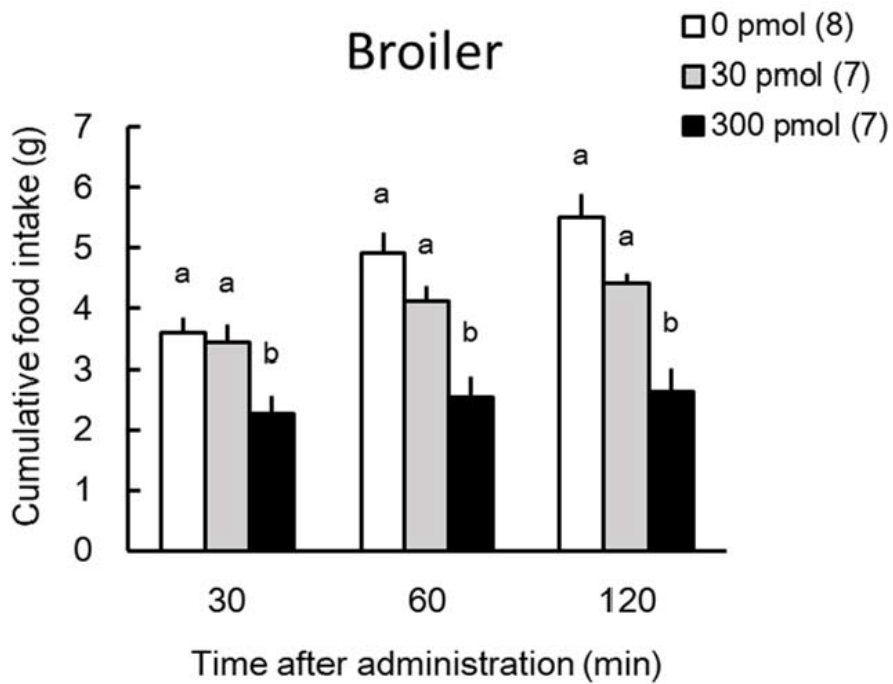


Fig. 11. Effects of central administration of insulin-like growth factor-1 on food intake in broiler (A) and layer (B) chicks. The number of chicks used is shown in parentheses. Groups with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

(The Journal of Poultry Science, doi: 10.2141/jpsa.0180127 より転載)