

学位論文題名

Leptin in ruminants: effects of endotoxin,
cytokines and parturition

（反芻家畜におけるレプチンの血中動態に関する研究：
細菌内毒素および炎症性サイトカインと妊娠・出産の影響）

学位論文内容の要旨

レプチンは脂肪細胞から血中に分泌される 16KDa の蛋白質で、全身の栄養状態を反映するシグナル分子として脳視床下部に作用し、摂食を抑制すると同時にエネルギー消費を亢進させる。このようなエネルギー代謝の調節作用に加えて、レプチンは、性腺機能や免疫機能に対しても様々な修飾効果を持つことが明らかになりつつある。

レプチンの合成分泌や血中濃度は様々な因子によって調節される。例えば、摂食、インスリン、脂肪細胞におけるグルコース利用亢進はレプチンの分泌を促進し、絶食は抑制する。また細菌内毒素(LPS)や炎症性サイトカイン、ストレスホルモンであるエピネフリンやグルココルチコイドもレプチン分泌に影響を与える。さらに最近、胎盤や乳腺でもレプチンが産生されることが見いだされ、妊娠期や分娩時の血中レプチン動態に関与すると云われている。

このようなレプチンに関する従来までの知見は、主にヒトや齧歯類で明らかにされたものであり、反芻家畜での血中レプチン動態やその調節機構については、レプチン血中濃度と体脂肪量の相関関係以外には、不明な点が多い。反芻家畜は摂食様式やエネルギー基質の種類などでヒトや齧歯類と大きく異なっており、レプチン動態についても他の種とは異なることが予想される。そこで本学位論文では、ウシとヒツジの血中レプチンについて、LPS と炎症性サイトカインの影響および性周期、妊娠、出産での動態を調べ、炎症時に見られる食欲の減退や周産期疾患との関連について考察した。

最初に反芻家畜におけるレプチンの構造と発現を確認するために、ウシレプチンの cDNA をクローニングし、RT-PCR 法によるレプチン mRNA の組織分布を調べた。ウシレプチン mRNA は脂肪組織と乳腺組織で発現が確認されたが、他の組織では発現がみられなかった。またクローニングした cDNA のヌク

レオチド配列とその発現組換え体の分析から、ウシレプチンは 16kDa のタンパクであることが確認された。さらに、ウシとヒツジのレプチンを検出することが可能な RIA キットを用いて、ウシにおける絶食の影響について調べたところ、齧歯類やヒトと同様に血中レプチン濃度が低下した。これらの結果から、ウシレプチンも他の動物種と同様の構造を持っており、栄養状態に応じて血中レベルが変化することが確認出来た。

次に、ウシおよびヒツジの静脈内に LPS を投与して、経時的にレプチンや関連する血中成分の濃度変化を調べた。LPS を投与すると顕著な食欲減退や発熱が見られたが、血中レプチン濃度は 24 時間にわたってほとんど変化しなかった。この時、コチゾルやグルコース、インスリンなどの血中濃度は他動物種で報告されているのと同様の顕著な変化を示した。また炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF- α)やインターフェロン γ をウシに投与した場合にも、ACTH とコチゾルの血中濃度が上昇し、グルコース、遊離脂肪酸、インスリンも著変し、急性相タンパク質である haptoglobin の血中濃度も増加したが、血中レプチン濃度は全く影響を受けなかった。これらの結果により、ヒトや齧歯類での知見と異なり、反芻動物では、インスリンや炎症性サイトカインはレプチン分泌に対する作用を持たないことが示唆された。同時に、反芻類においては LPS 炎症時に見られる食欲減退にレプチンの関与は少ないと結論した。

さらにウシの性周期あるいは妊娠と血中レプチン濃度の関係についても調べた。妊娠及び非妊娠牛から 50 日間にわたって採血し、血中レプチン濃度を調べたところ、非妊娠牛では若干の日間変動はあるものの、LH サージに代表されるような性周期と関連した変化は見られなかった。また、初期妊娠牛についても、個体間の差異があるものの一定の傾向は認められなかった。次に周産期における変化も調べたところ、出産直前に血中コチゾルとグルコース濃度の上昇が観察されたが、レプチン濃度はほとんど変動をしなかった。また各個体の平均レプチン濃度は出産回数や乳房炎・乳熱の発生とも関係しなかった。

以上の結果から、ウシやヒツジの血中レプチンは、ヒトや齧歯類とは異なり、反芻動物固有の機構で調節を受けており、LPS や炎症性サイトカインあるいは性周期、妊娠や出産に関わるホルモンには影響されないと結論した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 葉 原 芳 昭

副 査 助 教 授 大 橋 和 彦

副 査 助 教 授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

Leptin in ruminants: effects of endotoxin, cytokines and parturition

(反芻家畜におけるレプチンの血中動態に関する研究：
細菌内毒素および炎症性サイトカインと妊娠・出産の影響)

レプチンは脂肪細胞から血中に分泌される 16KDa の蛋白質で、全身の栄養状態を反映するシグナル分子として脳視床下部に作用し、摂食を抑制すると同時にエネルギー消費を亢進させる。レプチンの合成分泌や血中濃度は、体脂肪量、食餌、インスリン、細菌内毒素(LPS)、炎症性サイトカイン、グルココルチコイド、カテコラミンなど、多くの因子によって影響される。さらに胎盤や乳腺でもレプチンが産生されることが見いだされ、妊娠期や分娩時の血中レプチン動態に関与すると云われている。このようなレプチンに関する従来までの知見は、主にヒトや齧歯類で明らかにされたものであり、反芻家畜での血中レプチン動態やその調節機構については、レプチン血中濃度と体脂肪量の相関関係以外には、不明な点が多い。反芻家畜は摂食様式やエネルギー基質の種類などでヒトや齧歯類と大きく異なっており、レプチン動態についても他の種とは異なることが予想される。そこで本学位論文では、ウシとヒツジの血中レプチンについて、LPS と炎症性サイトカインの影響および性周期、妊娠、出産での動態を調べ、炎症時に見られる食欲の減退や周産期疾患との関連について考察した。

最初に反芻家畜におけるレプチンの構造と発現を確認するために、ウシレプチンの cDNA をクローニングし、RT-PCR 法によるレプチン mRNA の組織分布を調べた。ウシレプチン mRNA は脂肪組織と乳腺組織で発現が見られたが、他の組織では発現がみられなかった。またクローニングした cDNA のヌクレオチド配列とその発現組換え体の分析から、ウシレプチンは 16kDa の蛋白質であることが確認された。さらに、ウシとヒツジ

のレプチンを検出することが可能な radioimmunoassay 法を用いて、絶食の影響について調べたところ、齧歯類やヒトと同様に血中レプチン濃度が低下した。これらの結果から、ウシレプチンも他の動物種と同様の構造を持っており、栄養状態に応じて血中レベルが変化することが確認出来た。

次に、ウシおよびヒツジの静脈内に LPS を投与して、経時的にレプチンや関連する血中成分の濃度変化を調べた。LPS を投与すると顕著な食欲減退や発熱が見られたが、血中レプチン濃度は12時間にわたってほとんど変化しなかった。この時、コチゾルやグルコース、インスリンなどの血中濃度は他動物種で報告されているのと同様の顕著な変化を示した。また炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF- α)やインターフェロン γ をウシに投与した場合にも、ACTH とコチゾルの血中濃度が上昇し、グルコース、遊離脂肪酸、インスリンも著変したが、血中レプチン濃度は全く影響を受けなかった。これらの結果により、ヒトや齧歯類と異なり、反芻動物では、インスリンや炎症性サイトカインはレプチン分泌に対する作用を持たないことが示唆された。同時に、反芻類においてはLPS炎症時の食欲減退にレプチンの関与は少ないと結論した。

さらにウシの性周期あるいは妊娠と血中レプチン濃度の関係についても調べた。妊娠及び非妊娠牛から50日間にわたって採血し、血中レプチン濃度を測定したところ、非妊娠牛では若干の日間変動はあるものの、性周期と関連した変化は見られなかった。また、初期妊娠牛についても、個体間の差異があるものの一定の傾向は認められなかった。次に周産期における変化も調べたところ、出産直前に血中コチゾルとグルコース濃度の上昇が観察されたが、レプチン濃度はほとんど変動をしなかった。また各個体の平均レプチン濃度は出産回数や乳房炎・乳熱の発生とも関係しなかった。

以上の結果から、ウシやヒツジの血中レプチンは、ヒトや齧歯類とは異なり、反芻動物固有の機構で調節を受けており、LPS や炎症性サイトカインあるいは性周期、妊娠や出産に関わるホルモンには影響されないと結論した。これらの知見は、反芻動物の生理学の発展に寄与するものである。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者 Mohamed Mohamed Soliman 氏が博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有すると認めた。