

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2008～2009
 課題番号：20790506
 研究課題名（和文） 胃排出障害ラットモデルにおけるグレリン動態と GHS 受容体発現の検討
 研究課題名（英文） Enhanced ghrelin production and secretion and reduced expression of ghrelin receptor in rat stomach with delayed gastric emptying

研究代表者
 岩崎 栄典（IWASAKI EISUKE）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10366172

研究成果の概要(和文)： 機能性ディスペプシアの病態にグレリンが関与することを証明するため、胃排出障害ラットモデルをもちいて、グレリン動態、胃排出動態、グレリン受容体の発現、c-kit 陽性細胞やコリン作働性神経を検討した。胃排出障害群では空腹時のグレリン分泌が上昇する一方で、GHS 受容体の mRNA 発現が上昇することがわかった。GHS 受容体のプロモーターにメチル化の関与は証明できなかった。その一方で、本モデルにおいて、コリン作働性神経およびカハールの介在細胞のシグナル発現が活性化されたことから、グレリンが胃排出障害に対して代償的に胃運動を亢進させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Ghrelin is a gastrointestinal peptide that exerts distinct effects on the gastrointestinal motility through the vagus nerve and gastric excitatory neural plexus. We investigated the influence of gastric outlet obstruction caused by surgical manipulation on the dynamics of ghrelin, GHS receptor or the gastric neural network in rats. This study had provided the first evidence that production and secretion of gastric ghrelin was enhanced with down-regulation of GHS receptor in rats with gastric outlet obstruction. The elevation of plasma ghrelin levels in rats with gastric outlet obstruction may stimulate gastric motility through activation of cholinergic neurons and interstitial cells of Cajal. These findings suggest that deregulation of gastric emptying might stimulate the ghrelin dynamics and network of gastric cellular communications between nerves and smooth muscle cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：グレリン、胃排出、GHS 受容体、胃運動、肥満

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、摂食を刺激する消化管ペプチドであるグレリンと消化管疾患の関心に注目してきた。グレリンは 28 個のアミノ酸からなる新規生理活性ペプチドで (Nature 402:656, 1999) あり胃の A-like 細胞から分泌される。GH の分泌促進に加え、摂食調節や体重増加、胃酸分泌、胃運動の亢進作用を持つ (Nat. Rev. Neurosci. 2:551-60, 2001)。グレリンの生理的分泌刺激となるのは空腹や体重減少で、血漿値は空腹時に上昇し、摂食により低下することや、肥満者で低く、痩身者で高くなることが明らかとなっている (J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 240, 2002)。

研究代表者らの研究室では以前より臨床研究において各上部消化管疾患でのグレリン動態を報告してきた。機能性ディスぺプシア、特に運動不全型機能性ディスぺプシア(食後愁訴症候群)で空腹時血漿グレリン値が有意に高いことを報告した (Aliment. Pharmacol. Ther. 24(S4): 104-110, 2006)。胃運動不全に対する生体の代償機構でグレリン値が上昇すると考えられたが、より詳細な検討を動物実験でおこなうこととした。

ラット胃、十二指腸領域への様々な手術処置を施し、幽門部における食物の排出がグレリン動態に重要な影響を与えることがわかった。さらにグレリン受容体である GHS (Growth hormone secretagogue) 受容体の発現調節についても研究がすすめられており、グレリンによる胃運動調節に迷走神経求心路における受容体発現が関与していることが示唆されている。GHS 受容体プロモーター領域の塩基配列には CpG アイランドが存在し、エピジェネティックな修飾が行われている可能性が高い。

以上より、本研究では、胃排出障害モデルラットを用い、グレリン動態と GHS 受容体発現、胃神経叢、筋層における神経タンパク発現を詳細に検討することとした。機能性ディスぺプシア、グレリンの関与を基礎的に研究している報告はなく、本研究は基礎と臨床病態を連携する重要な研究であると考えた。

2. 研究の目的

胃排出障害モデルラットを用いてグレリン動態、およびグレリン受容体である GHS 受容体の発現調節による消化管運動制御機構を解明する。また、胃筋層、神経叢における各種神経タンパクの発現をグレリン拮抗薬を用いて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ラット胃排出障害モデルの確立

雄性 Sprague-Dawley ラット (200-250 g) を 24 時間禁食後に麻酔下に開腹し、幽門から近位十二指腸にネラトンカテーテルを巻き付けて狭窄を作製し胃内容の十二指腸への流入を機械的に障害させた。2 週間自由摂食として 24 時間禁食後にフェノールレッド法で胃排出能を定量的に検索した。

2) ラット胃排出障害モデルにおける検討

雄性 Sprague-Dawley ラット (200-250 g) を用い上記手術を施行し、対照群と胃排出障害群と摂食量、体重が同程度となるようにペアフィーディング法を用いた。2 週間後にそれぞれ 24 時間禁食後に深エーテル麻酔下に検体を採取した。

グレリン動態の検討

採血検体より血漿グレリン、血糖、血清インスリン、血清アディポネクチンを含めた測定をおこなった。グレリン動態を評価するために、血漿及び胃内グレリン量を RIA で、活性型及び総グレリンを定量した。胃組織よりプレプログレリン mRNA を測定し、胃粘膜内のグレリン陽性細胞の分布を、抗グレリン抗体を用いた免疫組織化学で検討した。

GHS 受容体の発現

胃粘膜における GHS 受容体の mRNA 発現の変化をリアルタイム RT-PCR 法で定量化した。また、GHS 受容体遺伝子プロモーターに CpG アイランドの存在があり、メチル化を Real-time MSP 法を用いて解析した。

胃神経叢、筋層の神経タンパク発現

コリン作動性神経の活性化を示唆する ChAT、およびカハールの介在細胞のシグナルである scf、c-kit の活性化を検討した。ラットをエーテル麻酔下に、胃を摘出し、RT-PCR 法を用いて胃組織における ChAT、c-kit、scf mRNA 発現量を測定した。さらに解剖 60 分前にグレリン拮抗薬である (D-Lys3) GHRP-6 を腹腔内投与し、生理食塩水を投与した群を対照群とした。胃筋層における ChAT、c-kit、scf mRNA 発現を測定した。

4. 研究成果

- (1) 胃排出障害群では対照群に比べて胃排出率は有意に低下した ($p < 0.05$)。生存率も高く、手術処置により空腹時胃排出が有意に低下しており、機械的な胃排出遅延を引き起こす有用なモデルであることが確認された。
- (2) 対照群、胃排出障害群ともに、摂食量

を一定としたため、両群間で体重差を認めなかった。胃排出障害群で、血漿総グレリン濃度、活性型グレリン濃度は増加し($p < 0.01$)。胃内総グレリン含有量、活性型グレリン含有量は減少した($p < 0.05$)。また、プレプログレリン mRNA 発現は上昇し、グレリン陽性細胞数の増加を認めた。グレリンの血中半減期は約 15~30 分と短く、空腹時には胃粘膜内 A-like 細胞に含有されているグレリンが血漿中に分泌され、胃内含有量が低下し血漿濃度が上昇する(Eur J Endocrinol 150: 447-455, 2004)。本検討では術後 2 週で、元来亢進している空腹時グレリン分泌が胃排出障害によりさらに亢進することが確認された。また、粘膜内の細胞数が増加し、mRNA 発現も上昇したことから、グレリンの産生も上昇したと考えられた。一方で GHS 受容体発現は有意に減少した。そこで GHS 受容体ゲノムのプロモーター領域の CpG アイランドに注目し、同部位のメチレーション特異的 PCR を施行したが、明らかなメチル化の変化は認めなかったため、メチル化とは異なる機序で GHS 受容体発現が低下し、グレリン感受性が低下していることが示唆された。これらの成果を 2008 年米国消化器病学会週間発表した。

(3) 胃排出障害群で scf, c-kit mRNA の発現は亢進したが、(D-Lys3) GHRP-6 の投与により、ともに対照群と同程度の発現まで低下した($p < 0.05$)。ChAT 発現は亢進したが、(D-Lys3) GHRP-6 投与では優位な低下が見られなかった。つまり、胃排出遅延によりグレリン産生は上昇し、胃内のグレリン貯蔵は欠乏し、血中への分泌が亢進した。胃排出障害の病態において、分泌が増加したグレリンがこれら筋間神経叢、カハールの介在細胞が活発になり、胃排出を亢進させる方向に feedback をかけている事が示唆された。これらの成果を 2009 年米国消化器病学会週間、第 95 回消化器病学会総会、第 17 回日本消化器病学会大会で発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Iwasaki E, Suzuki H, Sugino Y, Iida T, Nishizawa T, Masaoka T, Hosoda H, Kangawa K, Hibi T. Decreased levels of adiponectin in obese patients with gastroesophageal reflux evaluated by videoesophagography: possible relationship between gastroesophageal reflux and metabolic syndrome. J Gastroenterol Hepatol S2, 16-21, 2009. (査読あり)

岩崎栄典、鈴木秀和、正岡建洋、鈴木祥

子、高橋哲史、西澤俊宏、齋藤義正、菅井恵津子、細田洋司、寒川賢治、日比紀文. 胃排出遅延モデルにおけるグレリン動態、消化管運動 目に見えない消化器疾患を追う. 10, 24-26, 2008. (査読なし)

[学会発表](計 8 件)

Iwasaki E, Suzuki H et al. Enhanced ghrelin secretion and gastric neural network in rats with gastric outlet obstruction 2009 International symposium on ghrelin 2009 年 11 月 18 日 東京

岩崎栄典、鈴木秀和、日比紀文 胃排出能障害モデルでのグレリン動態 第 17 回日本消化器病学会大会 パネルディスカッション 3 2009 年 10 月 14 日 京都

岩崎栄典、鈴木秀和 他 胃排出遅延モデルにおけるグレリン動態とカハールの介在細胞 第 11 回日本神経消化器病学会 2009 年 9 月 25 日 仙台

Iwasaki E, Suzuki H et al. Enhanced Ghrelin Secretion and Gastric Excitatory Neural Network in Rats with Gastric Outlet Obstruction 米国消化器病学会週間 2009 Poster T1779 (Digestive Disease Week 2009) 2009 年 6 月 2 日 シカゴ

岩崎栄典、鈴木秀和、日比紀文 胃排出障害モデルにおけるグレリン動態と胃の神経-筋連関 第 95 回消化器病学会総会 シンポジウム 3 2009 年 5 月 8 日 札幌

岩崎栄典 胃排出障害モデルにおけるグレリン産生・分泌の亢進と c-kit 陽性細胞の変化 第 1 回 Japan Functional Dyspepsia Research Society 平成 20 年 11 月 8 日 京都

Iwasaki E, Suzuki H, Masaoka T, Nishizawa T, Takahashi T, Tsugawa H, Saito Y, Suzuki S, Hosoda H, Kangawa K, Hibi T. Enhanced ghrelin production and secretion and reduced expression of ghrelin receptor in rat stomach with delayed gastric emptying. 米国消化器病学会週間 (Digestive Disease Week 2009) 平成 20 年 5 月 18 日 サンディエゴ

岩崎栄典、鈴木秀和、日比紀文 食後愁訴症候群患者と胃排出障害モデルラットのグレリン動態、第 94 回日本消化器病学会 シンポジウム 4、平成 20 年 5 月 6 日 青森

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕なし

6．研究組織

(1)研究代表者

岩崎 栄典（IWASAKI EISUKE）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10366172

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし