

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	川村 智恵
審査委員	主査 渡部 祐司 副査 茂木 正樹 副査 青戸 守 副査 北澤 理子 副査 倉田 聖

論文名 ヒトモチリン受容体トランスジェニックマウスを用いてのモチリン受容体アゴニストとグレリンの作用発現に関する研究

学位論文要旨

背景と目的：消化管運動は神経性因子と液性因子により制御されている。モチリンとグレリンは消化管運動促進系ホルモンであり、モチリン受容体(MLNR)、グレリン受容体(GHSR)の作動性物質は糖尿病性胃麻痺などの消化管運動機能低下例の治療などに期待されているが、両者の関連に関しては不明である。ヒトではモチリン系とグレリン系が存在するが、げっ歯類にはモチリン系が存在せず、両ホルモン系の研究は困難であった。申請者らはこれまで *in vitro* でモチリン系とグレリン系の相互作用を明らかにしてきた(J Biol Chem 2001,2002,2006, J Pharmacol Exp Ther 2005, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008, Regul Pept 2011, 2012, 2013)。また、*in vivo* ではヒト消化管における MLNR、GHSR の発現様式を明らかにし(J Gastroenterol 2006)、動物モデルとして human motilin receptor transgenic(Tg)マウスを作製した(Regul Pept 2012)。本研究ではこの Tg マウスを用いて、モチライドが及ぼす消化管運動への影響と、グレリンとの相互連関を明らかにすることを目的とした。

材料と方法：1.10 週齢の human MLNRTg マウスと、対象として C57BL/6J マウスを使用した。Tg マウスは Human MLNR の cDNA を挿入したプラスミドを受精卵に前核注入し作成した。仔マウスの尾より PCR で MLNR-DNA が導入されていることを確認した。

2.RT-PCR にて Human MLNR, GHSR, グレリンの mRNA を定量した。内在性コントロールとして

GAPDH を用いた。

3. Erythromycin とグレリンの投与経路は脳室内投与（中枢投与）と腹腔内投与（末梢投与）とした。その他の薬剤 (Mosapride, Loperamide, Atropine) は腹腔内投与を行った。

4. 脳室内投与は bregma より 0.5mm 後方、1mm 側方の 3mm の深さに針を注入し、2 μ l/2min で行った。

5. 胃排出能の測定は phenol red を用いて行った。Phenol red 溶液を経口投与 20 分後における胃内に残存した phenol red の吸光度と 0 分後の吸光度との比より算出した。各リガンド投与はゾンデ挿口の 30 分前とした。

6. 血漿アシルグレリンは ELISA kit を用いて測定した。

7. 組織学的評価の検体は、Erythromycin 脳室内投与 1 時間における時点で取得した。

8. この動物実験は、愛媛大学大学院医学系研究科等遺伝子組換え実験安全委員会および愛媛大学動物実験委員会によって承認されている（承認番号：05T180-16）。

結果と考察：

1. RT-PCR において MLNR mRNA は消化管を中心として、全身に発現していた。GHSR mRNA は殆どが脳に発現していたが消化管では低発現であった。グレリンの mRNA は胃にて高発現であった。

2. Erythromycin とグレリンには末梢投与、中枢投与ともに胃排出促進効果を認めた。Erythromycin においては、中枢投与の際に Atropine にてその効果が消失することから、遠心性ニューロンは迷走神経を介することが同定され、また末梢投与の際には atropine にてその効果が消失しないことから、消化管平滑筋に存在する MLNR への直接作用が示唆された。

3. Mosapride での胃排出効果に対する Erythromycin の上乘せ効果を確認した。

4. Loperamide による gastroparesis に対する Erythromycin の改善効果を確認した。

5. Erythromycin を中枢投与した際に、血漿アシルグレリンが抑制されること、胃組織におけるグレリンの免疫染色にてグレリン陽性細胞が減少していることが各員され、モチリンとグレリン系は相補的な関係にあることが示唆された。

結論：開発したヒトモチリン受容体 Tg マウスはヒトの消化管機能評価可能な動物モデルとして有用であり、同モデルを用いてモチライドが胃排出を改善するメカニズムを証明し、グレリンとの相補的な関係が示唆された。本研究の成果は新たな消化管運動機能改善剤の開発、モチリンおよびグレリンを介した消化管運動機能を改善させる治療への臨床応用に繋がることが期待される。

本学位論文の審査会は令和元年8月16日に開催された。英語での発表後、次のような質疑応答がなされた。1)齧歯類にモチリン系の存在しない理由と、発現させた時の影響、2) Tg マウス作成時に強く胃に発現する理由、3)モチリンとグレリンの相補的調節のメカニズム、4)モチリンとグレリン産生および放出のメカニズム、5)本実験における投与量の設定、6)モチライドとして EM を使用した理由、7)gastric emptying のヒトでの評価法、8)グレリン分泌細胞のマウスでの胃内分布の評価、8)調節メカニズムにおける求心性、遠心性神経調節について、9)臨床応用への疾患モデル（糖尿病、肥満など）による検討への展望、などの多くの質問がなされ、申請者はこれらに的確に回答した。

申請者は、本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識および能力があることを審査員全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。