



成長過程でのラットの胃におけるガストリン受容体 遺伝子発現の変化

王, 賀瑶

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1611

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001611>

※ 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。



氏名・（本籍）	王 賀 瑶（中華人民共和国）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1074号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成9年3月31日
学位論文題目	成長過程でのラットの胃におけるガストリン受容体遺伝子発現の変化

審査委員	主査 教授 前 田 盛
	教授 岡 田 昌 義 教授 千 原 和 夫

論文内容の要旨

（序文）

ガストリンは前庭部に存在するG細胞より合成分泌され、胃酸分泌を刺激するだけではなく、消化管の細胞の増殖を促進している可能性がある。実際、我々は、最近ガストリン受容体（cDNA）をクローニングし、さらにガストリン受容体をトランスフェクトし発現させた細胞では、その増殖がガストリンによって促進されることを明らかにしてきた。成体ではガストリン受容体は胃粘膜のECL細胞と壁細胞に発現していることが明らかとなっているが、これらの受容体は胃酸分泌の調整にのみ関与しているのか、細胞増殖にも関与しているのかは明らかになっていない。

哺乳動物の出生直後には血漿ガストリン濃度は一時的に著増することが報告されている。したがってこの時期にガストリンはガストリン受容体を有する消化管の細胞に重要な役割を果たす可能性があると考えられる。しかし、周産期の胃内においてガストリン受容体を発現している細胞がどの細胞であるかは明らかとなっていない。そこで、本研究では、ガストリン受容体、プロトンポンプ、ヒスチジン・デカルボキシラーゼ（HDC）の遺伝子発現を調べ、胎生期においてガストリン受容体を発現する細胞を明らかにすることを試みた。

（実験方法）

Sprague-Dawley系妊娠ラットを麻酔したうえで子宮切開し、20日目の胎児の脳、胃と脾臓を摘出した。出生直後、4時間後、1日後、3日後、7日後、50日後のラットより麻酔下にて脳、胃と脾臓を摘出した。摘出された各臓器を分離したうえで液体窒素にて凍結し、RNA抽出まで-80℃に保存した。各グループに含まれるラット数（n）は6匹である。

分離された組織をguanidine thiocyanate（GTC）にてホモジネート後、cesium chloride超遠心にて、RNA抽出をおこなった。そのRNAを1.0%ホルムアルデヒド含有アガロースゲルを用いて電気泳動した後、ニトロセルロース膜にトランスファーし、UVクロスリンカーによってフィルターに固定した。ノーザン・ブロット法に用いたプローベはガストリン受容体cDNAの0.2Kbのフラグメン

ト、豚H⁺-K⁺-ATPase cDNAの0.4Kbフラグメント、そしてマウスHDCcDNAの0.4Kbフラグメントである。ガストリンc/DNAの0.4kbフラグメントは我々の研究室でRT-PCR法を用いて作製した。これらのcDNAを用いてrandom primer labeling kitによって³²P-Labeled cDNA probeを合成した後、nitrocellulose membraneを42°Cで24時間ハイブリダイズした。その後、0.1%×SSC/0.1%SDSにて50°Cで20分間洗浄した。シグナル強度はbiomaging analyzer systemを用いて計測した。

ガストリンがラット胃に発現するガストリン受容体の遺伝子発現にどのような影響を与えるか検討するため、生後3日目のラットには2.4μgのアモガストリンを皮下注射した。ガストリン投与6時間後と9時間後に、麻酔下で脳と胃を摘出し、RNAを抽出した。ノーザン・ブロット法を用いて、ガストリン受容体、H⁺-K⁺-ATPase、HDCの遺伝子発現を検討した。

(結果)

胃において、ガストリン遺伝子発現は胎生期と出生直後においてはほとんど認められなかったが、生後7日目より発現が明らかとなった。この結果は、发育過程におけるG-cellの成熟の時間的な変化に関する報告と一致していた。一方、膵臓においては、ガストリンの遺伝子発現は胎生期と周産期にしか認められなかった。特に出生直後の血中ガストリン濃度のピークと一致する時期に膵臓におけるガストリンの遺伝子発現が最も強かった。ECL細胞のマーカーであるHDCの遺伝子の胃内での発現はガストリンと一致しており、生後7週間以降で明らかな発現が認められるようになった。これらの2つの胃内分泌細胞の遺伝子発現とは異なってH⁺-K⁺-ATPaseは胎生20日においてすでにそのmRNAが認められた。興味深いことに、H⁺-K⁺-ATPaseのmRNAの発現は2峰性の変化を呈した、出生直後にその発現は著しく増強したが、生後3日目に一時的に減少し、生後7週目に再び増強した。また、ガストリン受容体の遺伝子発現もプロトンポンプと同様に2峰性の経過を示した。

一方、脳におけるガストリン受容体遺伝子の発現は胃と違い、胎生20日目には発現が認められ、その後徐々に増強していった。脳においては2峰性の変化は認められなかった。

生後3日目のラットにガストリンを皮下投与すると、胃におけるガストリン受容体遺伝子の発現は著しく増強したが、脳においては変化が認められなかった。H⁺-K⁺-ATPase遺伝子の発現も同様に増強したが、HDCmRNAの変化は、認められなかった。組織学的検討では、生後3日目ラット胃体粘膜には壁細胞を同定することは可能であった。一方、グリメリウス染色では生後3日目のラットの胃にはグリメリウス陽性の胃内分泌細胞は同定できなかった。またガストリンを皮下投与しても、組織学的な変化は認められなかった。

(考察)

ガストリンは、胃酸分泌を刺激するだけではなく、その受容体を介して上皮細胞の増殖を促進させることが知られている。周産期には、血漿ガストリン濃度は高値を示すと報告されているが、特に出生直後には、ガストリン濃度は一時的に胎生期の数倍にも達する。従ってガストリンは、特に周産期胃粘膜細胞の増殖に関与している可能性が考えられる。

我々は、ラットを用いて胎生期においても胃と脳でガストリン受容体が強く発現していることを明らかにした。又、出生直後、血漿ガストリン濃度がピークに達したときにガストリン受容体mRNAが一時的に上昇することも明らかにした。

胃内には2種類のガストリン受容体を有する細胞が存在することが知られている。実際、我々は、胃において壁細胞とECL細胞だけにガストリン受容体mRNAが存在し、ガストリン受容体が特異的

に発現することを証明している。壁細胞は $H^+-K^+-ATPase$ 発現する唯一の細胞で、ECL細胞はHDCを産生する胃でただ1つの細胞である。したがって、 $H^+-K^+-ATPase$ とHDCは壁細胞とECL細胞のマーカーとして使いうると思えられる。我々のノーザン・ブロット解析では、胎生期と周産期においては、HDCのmRNA発現は認められず、また、組織学的にも生後3日目の胃粘膜には内分泌細胞は同定できなかった。すなわち、胎生期、周産期においてはECL細胞は未だ十分に成熟していないものと考えられた。一方、 $H^+-K^+-ATPase$ 遺伝子の発現は胎生期にすでに明らかとなり、出生直後に著しく増強した。実際、胎生期にすでに胃酸分泌が認められるという報告があり、我々の成績でも、一致するものと思えられる。プロトンポンプ遺伝子の発現はガストリン受容体発現と同様に出生後一時的に低下し、その後の経時的な発現パターンは同一であり、胎生期、周産期においては、ガストリン受容体は主に、壁細胞に発現しているものと考えられた。

興味深いことは、周産期の $H^+-K^+-ATPase$ とガストリン受容体遺伝子の発現が2峰性変化であることである。出生直後に、血漿ガストリン濃度が著明に増加することが数多く報告されているが、我々の研究でも出生直後のラットの脾臓に強いガストリン遺伝子の発現が認められており、この時期のガストリン分泌は脾臓に由来するものと考えられた。この血漿ガストリンの増加はガストリン受容体を有する壁細胞の増加あるいは活動性に影響を及ぼすいくつかの遺伝子の発現を増強させる可能性がある。実際、我々の研究では、生後3日目のラットにガストリンを投与した6時間後に、ガストリン受容体と $H^+-K^+-ATPase$ 遺伝子の発現が強くなっており、ガストリンは壁細胞を刺激し、ガストリン受容体と $H^+-K^+-ATPase$ 遺伝子の発現を増強させたことが考えられた。

胃のガストリン受容体遺伝子の発現は、出生後一時的に減弱するが、出生7週目には再び著増した。HDC遺伝子発現とグリメリウス染色陽性の内分泌細胞は出生50日ラットに大量に認められており、この時期のガストリン受容体遺伝子発現は壁細胞だけではなく、ECL細胞にも存在すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

消化管研究は内視鏡等の診断学に力点が置かれていたが、種々の疾患の理解には更に詳細な機能の研究が重要である。ガストリンは前庭部に存在するG細胞より合成分泌され、胃酸分泌を刺激するだけでなく、消化管の細胞の増殖を促進している可能性がある。成体ではガストリン受容体は胃粘膜のECL細胞と壁細胞に発現していることが明らかとなっているが、これらの受容体は胃酸分泌の調節にのみ関与しているのか、細胞増殖にも関与しているのかは明らかになっていない。

一方、哺乳動物の出生直後には血漿ガストリン濃度は一時的に著増することが報告されているが、周産期の胃内においてガストリン受容体を発現している細胞がどの細胞であるかは明らかとなっていない。そこで、本研究者は、ガストリン受容体、プロトンポンプ、ヒスチジン・デカルボキシラーゼ(HDC)の遺伝子発現を調べ、胎生期においてガストリン受容体を発現する細胞を明らかにすることを試みた。

(実験方法)

Sprague-Dawley系妊娠ラットを麻酔したうえで子宮切開し、20日目の胎児の脳、胃と脾臓を摘出した。出生直後、4時間後、1日後、3日後、7日後、50日後のラットより麻酔下にて脳、胃と脾臓を摘出した。摘出された各臓器を分離したうえで液体窒素にて凍結し、RNA抽出まで $-80^{\circ}C$ に保存した。

分離された組織をguanidine thiocyanate (GTC) にてホモジネート後, cesium chloride超遠心にて, RNA抽出をおこなった。そのRNAを1.0%ホルムアルデヒド含有アガロースゲルを用いて電気泳動した後, ニトロセルロース膜にトランスファーし, UVクロスリンカーによってフィルターに固定した。ノーザン・ブロット法はガストリン受容体cDNA, 豚 $H^+-K^+-ATPase$ cDNAとマウスHDC遺伝子のcDNAのそれぞれの一部をプローブとして行った。シグナル強度はbiomaging analyzer systemを用いて計測した。

ガストリンがラット胃に発現するガストリン受容体の遺伝子発現にどのような影響を与えるか検討するため, 生後3日目のラットに $2.4\mu g$ のアモガストリンを皮下注射した。ガストリン投与6時間後と9時間後に, 麻酔下で脳と胃を摘出し, RNAを抽出した。ノーザン・ブロット法を用いて, ガストリン受容体, $H^+-K^+-ATPase$, HDCの遺伝子発現を検討した。

(結果)

胃において, ガストリン遺伝子発現は胎生期と出生直後においてはほとんど認められなかったが, 生後7日目より発現が明らかとなった。一方, 膵臓においては, ガストリンの遺伝子発現は胎生期と周産期にしか認められなかった。特に出生直後の血中ガストリン濃度のピークと一致する時期に膵臓におけるガストリンの遺伝子発現が最も強かった。ECL細胞のマーカーであるHDCの遺伝子の胃内での発現はガストリンと一致しており, 生後7週令以降で明らかな発現が認められるようになった。これらの2つの胃内分泌細胞の遺伝子発現とは異なって $H^+-K^+-ATPase$ は胎生20日においてすでにそのmRNAが認められた。興味深いことに, $H^+-K^+-ATPase$ のmRNAの発現は2峰性を示した。また, ガストリン受容体の遺伝子発現もプロトンポンプと同様に2峰性の経過を示した。

一方, 脳におけるガストリン受容体遺伝子の発現は胃と違い, 胎生20日目には発現が認められ, その後徐々に増強していった。脳においては2峰性の変化は認められなかった。

生後3日目のラットにガストリンを皮下投与すると, 胃におけるガストリン受容体遺伝子の発現は著しく増強したが, 脳においては変化が認められなかった。 $H^+-K^+-ATPase$ 遺伝子の発現も同様に増強したが, HDC mRNAの変化は, 認められなかった。組織学的検討では, 生後3日目ラット胃体粘膜には壁細胞を同定することは可能であった。一方, グリメリウス染色では生後3日目のラットの胃にはグリメリウス陽性の胃内分泌細胞は同定できなかった。またガストリンを皮下投与しても, 組織学的な変化は認められなかった。

(考察)

ガストリンは, 胃酸分泌を刺激するだけではなく, その受容体を介して上皮細胞の増殖を促進させることが知られている。周産期には, 血漿ガストリン濃度は高値を示すと報告されているが, 特に出生直後には, ガストリン濃度は一時的に胎生期の数倍にも達する。従ってガストリンは, 特に周産期胃粘膜細胞の増殖に関与している可能性が考えられる。

本研究者は, ラットを用いて胎生期においても胃と脳でガストリン受容体が強く発現していることを明らかにした。又, 出生直後, 血漿ガストリン濃度がピークに達したときにガストリン受容体mRNAが一時的に上昇することも明らかにした。

胃内には2種類のガストリン受容体を有する細胞が存在することが知られている。本研究者のグループは, 胃において壁細胞とECL細胞だけにガストリン受容体mRNAが存在し, ガストリン受容体が特異的に発現することを証明している。壁細胞は $H^+-K^+-ATPase$ 発現する唯一の細胞で, ECL細胞はHDCを産生する胃でただ1つの細胞である。したがって, $H^+-K^+-ATPase$ とHDCは壁細胞とECL細胞のマーカーとして使いうると思われる。今回のノーザン・ブロット解析では, 胎生期と周産

期においては、HDCのmRNA発現は認められず、また、組織学的にも生後3日目の胃粘膜には内分泌細胞は同定できなかった。すなわち、胎生期、周産期においてはECL細胞は未だ十分に成熟していないものと考えられた。一方、 $H^+-K^+-ATPase$ 遺伝子の発現は胎生期にすでに明らかとなり、出生直後に著しく増強した。プロトンポンプ遺伝子の発現はガストリン受容体発現と同様に出生後一時的に低下し、その後の経時的な発現パターンは同一であり、胎生期、周産期においては、ガストリン受容体は主に、壁細胞に発現しているものと考えられた。

興味深いことは、周産期の $H^+-K^+-ATPase$ とガストリン受容体遺伝子の発現が2峰性変化であることである。出生直後の血漿ガストリンの増加はガストリン受容体を有する壁細胞の増加あるいは活動性に影響を及ぼすいくつかの遺伝子の発現を増強させる可能性がある。胃のガストリン受容体遺伝子の発現は、出生後一時的に減弱するが、出生7週目には再び著増した。HDC遺伝子発現とグリメリウス染色陽性の内分泌細胞は出生50日ラットに大量に認められており、この時期のガストリン受容体遺伝子発現は壁細胞だけではなく、ECL細胞にも存在すると考えられる。

以上、本研究は、成長過程での消化管機能について、ラットのガストリンに関連する遺伝子発現を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったガストリン受容体発現機序について重要な知見を得たものとした価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。