

氏名	AMRITA DUDANI		
博士の専攻分野の名称	博士（学術）		
学位記号番号	博理工甲第 1066 号		
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 22 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Motilin- and ghrelin-induced gastric contractions in different parts of <i>Suncus stomach in vitro</i> （スンクスの胃各部位でのモチリン及びグレリンによる収縮調節機構）		
論文審査委員	委員長	教授	坂井 貴文
	委員	准教授	塚原 伸治
	委員	准教授	坂田 一郎
	委員	連携教授	堀口 敏宏

## 論文の内容の要旨

A previous study showed that the gastric migrating motor contraction (MMC) propagates downward in the alimentary tract. However, the initiation site of MMC remains unclear. Some *in vivo* and *in vitro* studies have shown that ghrelin and motilin in combination initiate and regulate gastric phase III MMC. These hormones induce a synergistic phasic response in the isolated stomachs in a dose-dependent manner. In addition, motilin-induced contractions are regulated by a ghrelin-mediated GABAergic pathway. Therefore, it was hypothesized that there could be a specific area in the stomach where the motilin binds with its receptor and initiates gastric phase III. The aims of this study were to: 1) determine the most sensitive and responsive site for motilin-induced contractions in the stomach of *Suncus murinus*, 2) examine the response of different parts of the stomach to the coadministration of motilin and ghrelin, and 3) elucidate the underlying mechanism of motilin-induced gastric contractions.

Stomachs of *S. murinus* were sectioned into four parts: fundus, proximal corpus (includes the cardia), distal corpus, and antrum. Using an *in vitro* organ bath system, motilin- and/or ghrelin-induced gastric contractile patterns under pretreatment with different agonists and antagonists were studied. Quantitative PCR (qPCR) was performed to measure the mRNA expression of the motilin receptor, GPR38. Distribution of ghrelin-immunopositive cells and mRNA expression of the GHSR in the different segments of the *S. murinus* stomach were examined using immunohistochemical analysis and reverse transcription PCR (RT-PCR), respectively.

The results of this *in vitro* study indicate that the proximal corpus and cardia are the important sites for motilin-induced contractions and show high mRNA expression of the motilin receptor GPR38. Treatment with  $10^{-9}$  M motilin stimulates contractions in all the stomach segments. However, treatment with low motilin concentration ( $10^{-10}$  M) stimulates contractions only in the proximal corpus, suggesting that the proximal corpus is the initial site of motilin-induced contractions and the MMC propagates from the proximal corpus to the distal region of the alimentary tract. The present study also showed that ghrelin-induced contractions in the presence of motilin varied in different stomach segments, and these contractions were mediated by the cholinergic neural pathway in the myenteric plexus. Treatment with  $10^{-10}$

Motilin induced contractions only in the fundus and proximal corpus. The mRNA expression of the ghrelin receptor GHSR was detected in all the stomach segments. Moreover, the density of ghrelin-immunopositive cells was found to be significantly higher in the fundus and proximal corpus than in the other stomach segments. These results suggest that the fundus and proximal corpus (constituting the proximal stomach) are most sensitive and responsive to motilin- and ghrelin-induced synergistic contractions. The present study showed that pretreatment with the GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline reversed ghrelin antagonist d-lys3-GHPR6 attenuated motilin-induced gastric contractions. Moreover, the GABA<sub>B</sub> antagonist phaclofen also reversed ghrelin antagonist d-lys3-GHRP6 inhibited gastric contractions but less effectively than the GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline.

Adenosine and dopamine are well-known neurotransmitters and neuromodulators of the central nervous system and enteric nervous system. Several studies have shown that adenosine and dopamine regulate the inhibition of GABAergic neurons. In addition to their numerous functions, adenosine and dopamine aid in modulating gastrointestinal motility. Involvement of adenosine and dopamine in motilin-induced contractions was determined using the different stomach segments and the entire stomach. The results clearly showed that adenosine and dopamine partially reversed ghrelin antagonist attenuated motilin-induced contractions. The roles of adenosine A<sub>2A</sub> receptor and dopamine D<sub>2</sub> receptor in regulating motilin-induced contractions were examined. Simultaneous pretreatment with the agonists of both these receptors almost completely recovered motilin-induced contractions in all the stomach segments, as well as in the whole stomach, suggesting that adenosine and dopamine played key roles in motilin-induced gastric contractions in *S. murinus* via the A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors, respectively.

It can be concluded that each gastric segment shows a different response to motilin and/or ghrelin. The fundus and proximal corpus, including the cardia, are most sensitive and responsive to motilin- and/or ghrelin-induced synergistic gastric contractions. This suggests that the proximal part of the stomach together with fundus is the initial contractile site for the onset of MMC. In addition, the results indicate that adenosine and dopamine play vital roles in regulating motilin- and ghrelin-induced gastric contractions via the A<sub>2A</sub> receptor and D<sub>2</sub> receptor, respectively.

## 論文の審査結果の要旨

AMRITA DUDANI 氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 29 年 2 月 6 日に理学部 11 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

消化管収縮運動は、摂取した食物を胃から小腸、大腸へと移送する重要な生理機能であり、栄養の吸収及び消化管内の良好な環境維持に重要とされている。消化管運動は空腹期と食後期で異なる収縮様式を示し、ホルモンなどの液性因子と自律神経及び腸管神経系の緻密な制御を受けている。空腹期にみられる伝播性消化管運動（migrating motor complex : MMC）は、胃で収縮が始まり遠位小腸へと伝わるのが知られているが、胃内における収縮活動の起点やホルモンに対する胃内の部位特異的な反応性については知見が乏しい。また、MMC の phase III 収縮は主に小腸から分泌されるモチリンにより制御されていると考えられているがその詳細な機構は明らかになっていない。本論文では、ヒトに近い消化管運動研究モデル動物である食虫目スンス（*Suncus murinus*）を用いて、モチリンとグレリンによる部位特異的胃収縮作用とその作用機構を検討している。本論文によって述べられている主要な研究成果は以下の通りである。

第一章では、空腹期伝播性消化管収縮運動の生理学的役割及びモチリンとグレリンの作用機序について、ヒト、イヌそしてスンスで得られている知見を詳細に記述している。また、各ホルモンとそれぞれの受容体構造と発現分布、消化管運動研究モデル実験動物としてのスンスの特徴とその有用性、本研究の目的と仮説について説明している。

第二章では、スンスの胃を胃底部、近位胃体部、遠位胃体部、前庭部の 4 部位に分け、*in vitro* オーガンバス実験系を用いて、各部位におけるモチリンとグレリンによる収縮作用とそのメカニズムについて記述している。申請者は、自発性収縮運動やアセチルコリンによる収縮力が胃各部位で異なることを明らかにした後、モチリンに対する収縮を検討し、近位胃体部では  $10^{-10}$ M のモチリンにより収縮が惹起されるのに対し、その他の部位では  $10^{-9}$ M で収縮が刺激されることを示している。次に、申請者はムスカリン性アセチルコリン受容体遮断薬のアトロピン及び電位依存性ナトリウムチャンネル阻害薬であるテトロドトキシン（TTX）を用いて、胃各部位でのモチリン誘導性収縮運動への効果を検討している。その結果、いずれの部位においてもアトロピンまたは TTX 処理によってモチリンによる収縮が完全に抑制されることを示し、胃各部位のモチリン誘導性収縮はコリン作動性神経を介した作用であることを明らかにしている。さらに、モチリン受容体（GPR38）遺伝子発現を定量 PCR 法により検討し、GPR38 mRNA は近位胃体部の筋層で高発現しており、モチリン反応性との相関が見られると報告している。また、グレリンによる胃各部位での収縮を検討した結果、いずれの部位においてもグレリン単独では収縮を刺激しないのに対し、低濃度モチリンを前処置すると近位胃体部では  $10^{-10}$ M、胃底部では  $10^{-9}$ M グレリンで収縮が刺激されることを明らかにしている。加えて、モチリンによる胃各部位への収縮刺激作用はグレリン受容体拮抗薬の前投与により有意に抑制されることから、胃の全ての部位で、モチリン誘導性収縮作用にはグレリンの存在が不可欠であるとしている。また、スンスの胃各部位におけるグレリン産生細胞の局在及びグレリン受容体（GHS-R）の発現をそれぞれ免疫組織化学的手法、RT-PCR 法により検討し、グレリン免疫陽性細胞数は胃底部、近位胃体部の順で多く観察されること、また GHS-R は胃の各部位でその発現が見られることを明らかにしている。

第三章では、モチリンとグレリンによる協調的収縮刺激作用機構を明らかにすることを目的に、腸管神経系の関与を中心に一連の研究を行っている。第二章で示されたように、胃各部位において、モチリン誘導性収縮

はグレリン受容体拮抗薬の前投与により抑制されるが、申請者はこの抑制がGABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬の前投与により解除され、用量依存性のモチリン誘導性収縮が回復することを示している。これらの結果は、モチリン誘導性収縮は腸管神経系内のGABA神経により抑制され、さらにGABA神経はグレリンにより抑制的に制御されていることを示唆している。さらに、申請者は胃各部位にアデノシンとドーパミンを前投与すると、グレリン受容体拮抗薬によるモチリン誘導性収縮の抑制が部分的に回復することを明らかにした。加えて、本作用に関わるアデノシンとドーパミン受容体サブタイプの検討を行い、アデノシンA<sub>2A</sub>受容体とドーパミンD<sub>2</sub>受容体の関与を証明している。以上の結果をもとに、申請者はモチリン誘導性胃収縮に関する一連の機構について論じている。

以上、本論文は、モチリンとグレリンを産生する小型実験動物であるスunksを用いて、これまで不明であったモチリンとグレリンとの協調作用による収縮機構を胃各部位について詳細に明らかにしており、消化管運動研究に大きく貢献するものである。なお、上記の内容は査読付き国際学術専門誌に発表されている。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士（学術）の学位を授与するに値するものと判断し、学位論文審査に合格とした。