

氏 名	ZHAO ZHENG
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 号 番 号	博理工甲第 674 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 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	Study on the Regulatory Mechanism of Rat Gastric Ghrelin Gene Expression in a Fasting State (絶食ラットにおける胃グレリンの発現調節機構に関する研究)
論 文 審 査 委 員	委員長 教 授 坂井 貴文 委 員 教 授 井上 金治 委 員 准 教 授 小林 哲也 委 員 准 教 授 足立 明人 委 員 教 授 西垣 功一

論文の内容の要旨

Ghrelin, a 28-amino acid peptide isolated as an endogenous ligand for the G protein-coupled growth hormone (GH) secretagogue receptor, is predominantly produced in the stomach. Although the physiological effects of ghrelin have been revealed by numerous studies, the regulation of gastric ghrelin expression in various physiological states remains obscure. It is generally accepted that the most important physiological state for the regulation of stomach ghrelin is feeding. Results of many studies have shown that levels of both ghrelin expression and secretion are increased by fasting and decreased after refeeding; however, little is known about the regulatory mechanism underlying the elevation of ghrelin expression level in a fasting state. In the present study, possible contributions of various regulatory factors of ghrelin inside and outside the stomach to the elevation of ghrelin expression level in a fasting state were investigated.

It has been reported that estrogen regulates ghrelin expression and that somatostatin knockout mice showed an increased expression level of stomach ghrelin, whereas leptin has paradoxical effects on ghrelin expression in vivo. Recently, several studies have shown that estrogen, somatostatin and leptin are produced in the stomach, but the direct effects of these gastric hormones on ghrelin expression and contributions of these hormones to the elevation of ghrelin expression level in a fasting state remain to be elucidated. On the other hand, as an important regulatory factor of ghrelin outside the stomach, insulin has been shown to inhibit ghrelin secretion in an euglycemic state. However, little is known about the direct role of insulin in regulation of ghrelin expression. In this study, the direct effects of estrogen, somatostatin, leptin and insulin on ghrelin mRNA expression were examined by using isolated ghrelin-rich stomach cells and stomach tissue. In vitro studies revealed that estrogen stimulated ghrelin expression in a dose-dependent manner and that treatment with formestane, an aromatase (estrogen synthetase) inhibitor, decreased ghrelin expression level. Leptin inhibited both basal and estrogen-stimulated ghrelin expression, whereas somatostatin had an insignificant effect and no effect of insulin on ghrelin expression was observed.

Then the mRNA expression levels of gastric ghrelin, aromatase, leptin and somatostatin in fasted male and female rats were examined, and concentrations of stomach leptin and portal vein 17 β -estradiol in fasted male rats was also examined. After 48 hrs of fasting, although gastric ghrelin mRNA level was significantly increased, both gastric leptin mRNA level and leptin content were decreased. Further refeeding of fasted rats resulted in a decrease in ghrelin expression level and an increase in leptin expression level. On the other hand, expression levels of gastric aromatase and somatostatin mRNA and 17 β -estradiol concentration in the portal vein did not change after fasting. Moreover, both aromatase-mRNA expressing cells and leptin cells were found to be located close to ghrelin cells in the gastric mucosa. RT-PCR analysis clearly showed that long and short forms of the leptin receptor are expressed in the rat stomach, and no inhibitory effect of leptin on ghrelin expression was observed in leptin receptor-defective Zucker Fatty (fa/fa) rats.

The results strongly suggest that estrogen and leptin produced in the stomach directly regulate ghrelin expression in the rat stomach and support the hypothesis that under a basal condition the expression of stomach ghrelin is maintained by the control of a balance possibly involving gastric estrogen, somatostatin and leptin and some factors outside the stomach, whereas decreased gastric leptin level under a fasting condition attenuates the negative regulation of this balance and finally results in elevated ghrelin expression. The findings of the present study provide new evidence on how ghrelin expression is regulated in a fasting state and may have implications in the control of high ghrelin levels in some negative energy balance states, which may directly contribute to increased food intake and adiposity.

論文の審査結果の要旨

当学位論文は平成 20 年 2 月 7 日 15 時より理学部 3 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、審査結果の要約を示す。

グレリンは成長ホルモン分泌促進因子 (GHS) 受容体の内因性リガンドとして、胃から単離された 28 アミノ酸残基のペプチドであり、近年、末梢から分泌される摂食促進作用を持つ物質として注目を集めている。グレリンは摂食行動やエネルギー恒常性に重要な働きをすることが報告されており、グレリンの発現と分泌はどちらもエネルギーバランスの変化に影響を受ける。グレリン発現は絶食により増加し、摂食の再開とともに減少することが知られているが、その調節機構については不明な点が多く残されている。本研究は、インスリンや胃から産生されるエストロゲン、レプチン、ソマトスタチンなど、胃の内外でグレリン調節に関わるさまざまな因子と絶食条件下でのグレリン発現レベルの上昇との関係を明らかにするために *in vitro* 実験、*in vivo* 実験の両面から検討を行っている。本論文によって、詳細に論じられている主要な課題と成果は以下の通りである。

初めに、申請者は、所属する研究室で確立した方法を用いてラット胃粘膜から高密度な単離グレリン細胞を取得し、これら単離細胞と 1 mm³ 程度に細切した胃細切組織片をそれぞれ用いて、胃グレリン mRNA 発現に対するエストロゲン、レプチン、ソマトスタチン、インスリンの直接的な効果を検討している。その結果、エストロゲンが濃度依存的に単離細胞のグレリン発現を増加させること、アロマターゼ阻害剤であるフォルメスタンを用いて胃組織を処理すると、グレリン発現レベルが減少することを明らかにした。加えて、申請者は、胃組織細切片に対するレプチン投与は基礎グレリン発現を抑えるが、単離培養細胞のグレリン発現に影響を与えないことを見出し、さらに、レプチンはエストロゲン刺激後に上昇した単離細胞におけるグレリン発現を有意に減少させることを示した。また、RT-PCR 解析より、正常ラットの胃においてレプチン受容体の long form 及び short form が発現し、レプチン受容体を欠損した Zucker-Fatty ラットではグレリン発現に対するレプチンの抑制的な効果は全く観察されないことを明らかにした。これらの知見に加えて、申請者は二重染色法により、アロマターゼ mRNA 発現細胞とレプチン細胞が胃粘膜のグレリン細胞に近接して存在することを確認している。以上の結果は、ラット胃におけるグレリンの基礎発現は近傍からのエストロゲン刺激により維持され、レプチン刺激により抑制的に制御されることを意味する。この他に、胃外からの重要な調節因子としてインスリンがあり、*in vivo* でのグレリン分泌を抑制することが知られているが、申請者による *in vitro* 実験では、グレリン mRNA 発現に対するインスリンの効果は観察されなかった。この結果はグレリン発現調節において、インスリンが直接的ではなく神経等を介する間接的な作用を持つことを示唆する。

次に、申請者は絶食条件下でのグレリン発現上昇に対する胃で産生されるエストロゲン、レプチン、ソマトスタチンの関与について検討するために、48 時間絶食条件下の雌雄ラットにおける胃由来グレリン、アロマターゼ、レプチン、ソマトスタチン mRNA 発現レベルの変化と胃レプチン濃度及び門脈血中 17 β -estradiol 濃度を測定した。その結果、48 時間の絶食後、胃で産生されるグレリン mRNA レベルは有意に上昇したのに対し、レプチン mRNA 発現及び産生されたレプチンは有意に減少していた。さらに 48 時間絶食後の再摂食ではグレリン発現レベルは速やかに減少するのに対して、レプチン発現レベルは逆に増加することを明らかにしている。併せて、絶食後の胃由来アロマターゼ、ソマトスタチン mRNA 及び門脈血中 17 β -estradiol 濃度は変化しないことを確認している。*in vitro* 実験から明らかになったグレリン発現に対するエストロゲン、レプチンの直接的な効果に加え、絶食条件下に胃で産生されるグレリンとレプチンレベルの間に見られる逆相関関係は、胃エストロゲン、レプチンのバランスによって胃グレリン発現が調節される

ことを強く示唆しており、絶食で胃グレリン発現が上昇するのは、減少したレプチンレベルが負の制御を減弱させた結果と説明できる。これらの結果は、絶食時にグレリンレベルが上昇する機構を解明するための基礎的且つ重要な知見と言える。

以上のことから、本論文で得られた新たな成果は、(1)エストロゲンとレプチンは胃で産生され、胃におけるグレリン産生を直接的に制御すること、(2)絶食条件下で上昇した胃グレリン発現レベルは主に抑制作用を持つ胃レプチンの減少によること、としてあげられる。これらの発見は負のエネルギーバランス時に起こる高いグレリン発現調節の理解に重要であり、絶食条件下での胃グレリン発現調節機構の解明に関する新しい知見として高い意義を有すると言える。また、趙崢氏は本論文の内容の一部をすでにレフェリー制のある外国専門誌に2編（英文）発表した。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断した。