

氏名・(本籍)	名 生 諭 史 (兵庫県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 第253号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位論文題目	The trophic effect of glicentin on the rat small intestinal mucosa in vivo and in vitro (グリセンチンのin vivoとin vitroにおけるラット小腸粘膜に対する増殖効果)

審査委員	主査 教授	服 部 隆 則
	副査 教授	小 玉 正 智
	副査 教授	馬 場 忠 雄

## 論文内容の要旨

### 【目的】

1971年にGleesonとBloomらが小腸粘膜の著しい肥厚と便秘を来したenteroglucagon産生腫瘍の症例を報告した。それ以降enteroglucagonは小腸粘膜に対して増殖作用を有すると考えられてきた。種々の実験モデルでenteroglucagonの増殖作用が検討されているが、その作用に否定的な報告もある。

enteroglucagonの前駆物質であるpreproglucagonから、消化管のL細胞でglucagon-like peptide 1(GLP-1)、GLP-2とglicentinが生成される。これまでglicentinの精製に問題があり、glicentin単独の作用の検討は困難であった。近年、遺伝子組み換え法によりラットglicentinの合成が可能になり、今回glicentinの小腸粘膜に対する増殖効果をin vivo、in vitroで検討した。

### 【方法】

- (1) 4週齢Wistar系雄ラットを経腸栄養剤(ED: エレンタール®)にて4週間飼育し、小腸粘膜萎縮モデルを作製した。control群(C群)には生食を、glicentin投与群(G群)にはglicentin 50  $\mu$ g/kgを12時間毎に2週間皮下注射した。小腸を摘出し、粘膜湿重量、蛋白量、DNA量、alkaline phosphatase(ALP)活性及び絨毛高と陰窩深を測定した。
- (2) 8週齢Wistar系雄ラットを24時間絶食後、C群には生食を、G群にはglicentin 100  $\mu$ g/kgを腹腔内注射し、3.5時間後に小腸を摘出し、粘膜内のornithine decarboxylase(ODC)活性を測定した。
- (3) ラット小腸粘膜上皮細胞株IEC-6細胞を24穴プレートに播種し、glicentinを0~1000ng/mlの各濃度で添加し、48時間後に<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みを測定した。同様にIEC-6細胞を12穴プレートに播種し、48時間後の細胞数を測定した。

### 【結果】

- (1) 空腸の粘膜湿重量(G;39.7 $\pm$ 1.64, C;35.0 $\pm$ 0.83mg/cm)、蛋白量(G;5.46 $\pm$ 0.19, C;4.95 $\pm$ 0.09mg/cm)、DNA量(G;240 $\pm$ 12.4, C;209 $\pm$ 3.18  $\mu$ g/cm)、ALP活性(G;6.46 $\pm$ 0.22, C;5.46 $\pm$ 0.32 $\times$ 10<sup>3</sup>IU/g protein)がG群で有意に高値であったが、回腸では差は認められなかった。絨毛高と陰窩深はG群が空腸で高い傾向が見られたが、有意差はなかった。
- (2) glicentin投与3.5時間後の空腸のODC活性は、477.69 $\pm$ 53.06CO<sub>2</sub>pmol/h/mg proteinと、C群の233.59 $\pm$ 46.88CO<sub>2</sub>pmol/h/mg proteinに比べ有意に高値であった。回腸では差は認められなかった。
- (3) IEC-6細胞に50ng/ml以上のglicentin添加では、<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みは有意に増加した。また、細胞数もglicentin 100ng/ml以上の濃度で有意に増加した。

## 【考 察】

ED投与による萎縮粘膜に対してglicentinは、空腸粘膜の湿重量、蛋白量、DNA量、ALP活性を約110ないし115%増加させた。活性型enteroglucagonの1つであるglucagon(1-21)の持続投与では回腸の絨毛高の増加のみ認められ、湿重量や蛋白、DNA濃度に変化はなかったとの報告(Watanabe et al., Biomed Res 1990) や、glucagon(1-21)が腸管上皮細胞の増殖を抑制したとの報告(Goodlad et al., Exp Physiol 1991) もある。しかし本研究にみられるように、glicentinは複数の粘膜パラメータが増加し、glucagon(1-21)よりも強い増殖作用を有していた。

Polyamine代謝は小腸粘膜の増殖に関与し、その律速酵素はODCである。glicentin投与で空腸粘膜ODC活性が増加したことより、glicentinの増殖作用はpolyamine代謝を介していることが示唆された。

glicentinの増殖効果は空腸にのみ認められた。このことはGleesonらが報告した上部小腸に著しい肥厚を来したenteroglucagon産生腫瘍の症例と一致する。in vitroの検討においてglicentinが小腸粘膜上皮細胞に直接作用していることが確認されたことより、receptor局在の違いによると推論された。

IEC-6細胞の<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みと細胞数は100ng/ml以上のglicentinにより増加した。この濃度は生理血清濃度の約10倍であり、IEC-6細胞に対する増殖効果に高濃度を要した機序として、glicentinのreceptorの数や親和性の減少、あるいはglicentinがparacrineに働いている可能性が考えられた。

## 【結 果】

glicentinは小腸粘膜に対して増殖効果を有し、小腸粘膜細胞に直接作用していることがin vivo、in vitroにおいて証明された。また、その増殖作用はpolyamine代謝を介していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Enteroglucagonは小腸粘膜に対してtrophic actionを有すると考えられている。本研究はenteroglucagonの活性部分とされているglicentinのtrophic actionを、ラット小腸粘膜を用いてin vivoとin vitroで検討したものである。著者は、ラットにelemental diet(Elental<sup>®</sup>)を4週間投与することで小腸萎縮モデルを作製し、その後にglicentinを1日2回2週間持続投与し、空腸粘膜の湿重量、蛋白量、DNA量、ALP活性などを無処理群と比較検討した。また、24時間絶食後のラットにglicentinを投与し、空腸粘膜のODC(ornithine decarboxylase)活性を測定した。さらに、小腸粘膜上皮細胞株IEC-6を用いてglicentinの細胞増殖促進効果を調べている。

その結果、

1. glicentin 50 μg/kg投与群では、対照群に比して、空腸粘膜の湿重量、蛋白量、DNA量、ALP活性が有意に増加した。また、glicentin 100 μg/kgを腹腔内に投与すると、3.5時間後に空腸粘膜のODC活性が有意に増加した。
2. IEC-6細胞に50ng/mlと100ng/mlの濃度のglicentinを添加培養すると、48時間後には、50ng/ml群で<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みが、100ng/ml群で細胞数が有意に増加した。

本研究は、glicentinがin vivoだけでなくin vitroにおいてもtrophic actionを示すこと、その増殖促進作用が、ODC活性の増加から、polyamine代謝を介していることなどを明らかにしたもので、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。