

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16206

研究課題名(和文) GLP-1の臓器保護効果の機序及び膵外受容体の生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Unraveling of the mechanism of the organ-protective effect of GLP-1 and the physiological role of extrapancreatic receptors

研究代表者

井上 智彰 (Inoue, Tomoaki)

九州大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：70815894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者等は本研究において、単球特異的GLP-1受容体欠損マウスの作出に成功した。単球特異的GLP-1受容体欠損マウスとコントロールマウスの間には、体重、血糖に変化は認めなかった。心エコーにて評価したところ、生後約18週齢で左心室拡張の低下する所見を認めた。単球特異的GLP-1受容体欠損マウスが心機能低下を引き起こす機序の一つとして、心筋での線維化の進行及び筋線維芽細胞の増加を認めた。以上の結果から、単球GLP-1受容体を介したシグナルが心臓の線維化を抑制することで、臓器保護効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大規模臨床研究においてGLP-1受容体作動薬が心血管イベントならびに腎イベント抑制作用を有することが示され、大きな注目を集めている。しかしながら、GLP-1受容体の分布と臓器保護効果には解離があり、その臓器保護効果のメカニズムは理解できていない。

本研究において、単球のGLP-1受容体を介したシグナルが臓器保護効果に関与している可能性が示唆された。膵臓以外の組織でのGLP-1シグナルの全貌を明らかにすることはGLP-1の生理作用・臓器保護のメカニズムの解明のみならず、糖尿病以外の疾患に対する治療応用という点においても極めて重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in producing monocyte-specific GLP-1 receptor-deficient mice in this study. No changes in body weight or blood glucose were observed between monocyte-specific GLP-1 receptor-deficient mice and control mice. Echocardiography revealed left ventricular dysfunction at about 18 weeks of age. As one of the mechanisms by which monocyte-specific GLP-1 receptor-deficient mice cause cardiac dysfunction, progression of fibrosis in the myocardium and an increase in myofibroblasts were observed. By the above results, it was suggested that the signal mediated by the monocyte GLP-1 receptor may exert an organ protective effect by suppressing the fibrosis of the heart.

研究分野：糖尿病合併症

キーワード：GLP-1

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の急速な欧米化により、肥満、糖尿病、高血圧症、脂質異常症などの生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿っている。特に 2 型糖尿病における心腎イベントを抑制する有効な治療戦略の確立は喫緊の課題である。2 型糖尿病患者を対象とした大規模臨床研究にて、新規糖尿病治療薬である GLP-1 受容体アナログ (GLP-1RA) が心血管イベントならびに腎イベント抑制作用を有することが報告された。しかしながら、心室心筋には GLP-1 受容体が存在しないなど、組織分布とそれに対応する臓器保護効果には解離があり、機序の詳細は明らかではなかった。申請者は自身のこれまでの研究背景に基づき、神経系や免疫系あるいは代謝調節を介した機序を推測していた。そこで本研究では申請者が最近独自に作成、樹立した GLP-1 受容体神経組織特異的欠損マウスおよび GLP-1 受容体単球特異的欠損マウスを用いて詳細な機序の検討を行い、GLP-1RA が持ち合わせる臓器保護効果のメカニズムの解明を目指した。

### 2. 研究の目的

新規糖尿病治療薬である GLP-1RA は、大規模臨床研究において心保護作用及び腎保護作用を有することが報告されているがその機序は不明な点も多い。申請者は上記 GLP-1 の心筋保護作用の研究において、中枢神経系 (central nervous system) GLP-1 受容体及び交感神経系を介した、末梢組織での AMPK の活性化により脂質代謝異常を改善させる機序を想定している (Inoue T, et al. *Atherosclerosis*, 2015)。一方で、GLP-1 受容体は単球系細胞に高発現しており、単球の活性化抑制を介して抗炎症作用を有することが報告されている。心筋への異所性脂肪により引き起こされる慢性炎症・線維化及び心筋の障害を、GLP-1 受容体作動薬が単球に作用することで保護効果を引き起こすことも推測される。GLP-1 受容体神経組織特異的欠損マウスおよび GLP-1 受容体単球特異的欠損マウスを作成して、詳細な機序の検討を行うことを目的とする。機序を解明することで、GLP-1 の有するエネルギー代謝、摂食や食欲、免疫調整作用、炎症制御因子としての作用などの臓器外の GLP-1 受容体を介する生理学的、病理病態学的役割の包括的な理解に繋がり、糖尿病などの生活習慣病を背景として発症する動脈硬化性疾患、癌、認知症などの様々な疾病への治療法・治療応用の発見が期待される。

### 3. 研究の方法

- (1) 神経組織特異的 GLP-1 受容体欠損マウスおよび単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスの作成。
- (2) 上記遺伝子改変動物の代謝パラメーター (血糖、インスリン、グルカゴン、脂肪酸など) 各臓器生理機能の評価と疾患負荷時の臓器保護効果の評価 (心機能 (心収縮能, 心拡張能, 心筋脂肪定量) 腎機能 (GFR, 尿中アルブミン排泄率) 心腎の組織学的変化) を行う。上記の指標を中心に比較解析することにより、神経系ならびに単球の GLP-1 受容体を介した生理作用と臓器保護作用のメカニズムを検討できるものと考えられる。これにより GLP-1 の循環ホルモンとしての機能、神経ペプチドとしての機能、単球を介した炎症制御因子としての機能を明確に区別化し、GLP-1 シグナルの各臓器の生理学的、病理病態学的役割の一端が明らかになることが期待される。

### 4. 研究成果

申請者は GLP-1 受容体 (以下、GLP-1R; *glp1r*) 遺伝子を Cre 発現トランスジェニックマウスとの交配にて組織特異的に欠損可能な遺伝子改変マウスを作成した。loxP 配列で *glp1r* 遺伝子のエクソン 4、5 を挟むターゲティングベクターを構築し、floxed マウスを作製した (GLP-1R flox/flox mice 図 1)。以上により全ての臓器における組織特異的な GLP-1 受容体の生理的・病態生理的意義と分子機構の解析が可能である。申請者はさらに、LysM (lysozyme M)-Cre マウスと交配することにより単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスの作成に成功した。RT-PCR を行い、単球特異的に GLP-1 受容体が欠損していることを確認した。(図 2)

神経組織特異的ノックアウトマウスは、全体の表現型をはじめ現在解析中であり、下記に単球系特異的 GLP-1 受容体ノックアウトマウス (GLP-1R<sup>f/f</sup> lysM-Cre) のこれまでの解析結果について述べる。

図 1

Targeting scheme of *Glp1r* gene

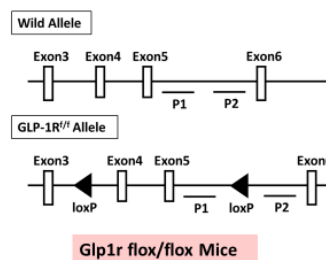
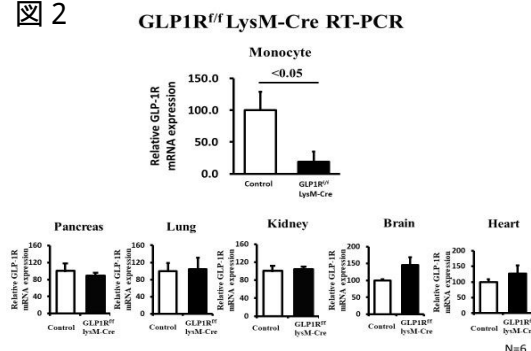


図 2



単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスとコントロールマウス間に、週齢ごとの体重と血糖の経過を観察したが変化は認めなかった。心機能を心エコーにて評価したところ、生後約 18 週齢で左心室拡張の低下する所見を認めた。

GLP1-Rf/f lysM-Cre マウスが心機能低下を引き起こす機序の一つとして、網羅的な遺伝子発現の解析や RT-PCR 法による解析により、コラーゲン I やコラーゲン III をはじめ線維化マーカーの発現上昇が認められた。さらに Picrosirius Red 染色において GLP1-Rf/f lysM-Cre マウスの心臓では線維化の進行を認めた(図 3)。

次に、コラーゲンを産生し線維化を進行させる筋線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA を免疫染色で評価したところ、GLP1-Rf/f lysM-Cre マウスの心臓で増加していた(図 4)。

以上より単球を介した GLP-1 の生理作用として、筋線維芽細胞への分化に関与し、繊維化を含む炎症を制御することで臓器保護効果を発揮することが考えられた。これらは臨床的にも認められている GLP-1 受容体作動薬の心筋保護作用のメカニズムの一つであることが示唆された。

図 3 Picrosirius Red 染色

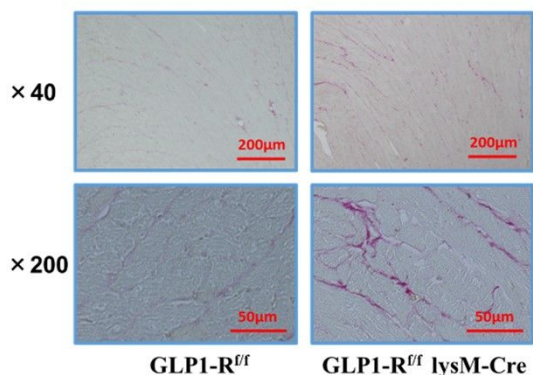
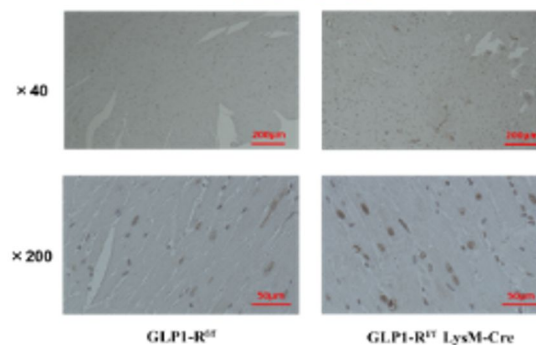


図 4  $\alpha$ -SMA免疫染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------