

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20931

研究課題名（和文）非侵襲的中枢神経系GLP-1受容体定量法の開発とその発現量変化の病的意義の解明

研究課題名（英文）Noninvasive evaluation of GLP-1 receptor in central nervous system

研究代表者

村上 隆亮（Murakami, Takaaki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50904017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウスに<sup>111</sup>In-Ex4プローブを尾静注し頭部を含めSPECT/CTを撮像した。視床下部・下垂体相当領域に限定的な有意集積像を認め、膵臓と同時に描出可能であった。他の頭蓋内領域には有意集積を確認できなかった。また、この有意集積はEx(9-39)前投与にて消失した。次に、プローブ投与後に下垂体、視床下部、大脳、膵臓を摘出し、カウンターでRI集積値を測定した。下垂体に安定した集積を認めたが、視床下部・大脳では認めなかった。また、下垂体でのGLP1R mRNA発現量とRI集積値は有意な相関を示した。<sup>111</sup>In-Ex4 SPECT画像上観察可能な集積の責任領域は下垂体であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経領域での<sup>111</sup>In-Ex4プローブ集積像は膵臓と同時に描出できたことから、GLP-1R標的膵・中枢神経同時イメージングが可能であった。また、画像上の解剖学的位置情報や、Biodistribution studyの結果から、同有意集積領域は下垂体へのプローブ集積シグナルであることが明らかになった。また、SPECT画像上の同領域のRI集積値とGLP-1R mRNA発現量は有意な相関関係を示すことから、<sup>111</sup>In-Ex4 SPECT/CTにより、膵細胞量同様、下垂体のGLP-1R発現に関する量的情報を非侵襲的に得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mice were injected intravenously with <sup>111</sup>In-Ex4 probe in the tail and SPECT/CT imaging was performed including the head. Limited significant accumulation was observed in the hypothalamus/pituitary region, which could be visualized at the same time as the pancreas. No significant accumulation was observed in other intracranial regions. The significant accumulation disappeared after pre-treatment with Ex(9-39). Next, the pituitary gland, hypothalamus, cerebrum, and pancreas were collected after administration of the probe, and RI accumulation values were measured with a counter. Stable accumulation was observed in the pituitary gland, but not in the hypothalamus or cerebrum. The GLP1-R mRNA expression level in the pituitary gland was significantly correlated with the RI accumulation level, indicating that the pituitary gland was responsible for the accumulation observed on <sup>111</sup>In-Ex4 SPECT images.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 GLP-1受容体 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

食欲や摂食行動の制御は肥満・糖尿病予防・治療の大きな柱である食事療法の成否に直結し、膵細胞量保護に繋がることから、その客観的な評価法の確立は重要な研究課題である。しかし、食欲や摂食行動を含む食事療法の成否を客観的に評価する系・バイオマーカーは未だない。視床下部等における GLP-1R の発現は食欲や摂食行動に深く関係し、GLP-1R 作動薬の摂食抑制効果の一部は視床下部など中枢性作用を介し、中枢神経系 GLP-1R 発現は高脂肪食や食欲によって変化することから、食欲や摂食行動を反映するバイオマーカーとなり得る可能性が示唆されている。しかし、これまで中枢神経系 GLP-1R 研究の多くは神経核での発現の有無を対象とした神経生理学的な視点で行われてきた。一方、中枢神経系 GLP-1R 発現を量として評価する方法は主に切除標本を用いた RNA やタンパク量測定による侵襲を伴う手法に限られ、縦断的評価は困難であり、非侵襲的な中枢神経系 GLP-1R 発現量の評価法確立が必要となる。本法の構築は中枢神経系 GLP-1R 発現量を標的とする新規肥満・糖尿病予防・治療法の開発の推進に貢献すると考えられる。申請者は、これまで GLP-1R に特異的に結合するプローブを開発し、核医学的手法を用いることで非侵襲的な生体内膵細胞量評価を可能にした(図、文献 2-4)。更に、本プローブが膵臓のみならず、中枢神経系 GLP-1R も描出可能であることを確認している(図)が、中枢神経系では発現領域・量が限られるため、標的領域設定・画像定量法を別途に創出・確立する必要がある。中枢神経系 GLP-1R 発現量と膵細胞量を同時かつ縦断的に評価することで、中枢神経系 GLP-1R 発現量と肥満・糖尿病発症・進展過程の相互関係を明らかにし、各種治療の食欲・摂食行動への効果を独立して評価するだけでなく、食欲・摂食行動制御を加味した膵細胞量保護戦略を可能にすることを旨とする。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発したプローブを用いた非侵襲的評価技術により、生体の膵細胞量だけでなく、同時に中枢神経系の GLP-1R 発現量への影響を可視化・定量化し、肥満や糖尿病における両者の時相的関係性を解明することを目的とする。これまで視床下部など中枢神経系 GLP-1R について、発現量自体の生理学・病的意義に関する理解は不十分であり、発現量の縦断的検討や膵細胞量など肥満・糖尿病の発症や進展過程との関係に着目した研究はほとんど行われていない。独自のイメージング技術基盤を活用しこれを解明しようとする本研究は極めて独創的である。GLP-1R を標的にした膵・中枢神経系同時イメージング法が確立できれば、食欲や摂食行動を客観的に評価し得るバイオマーカーの確立、食事療法・膵細胞量双方を標的とした肥満・糖尿病の新たな予防・治療戦略の構築につながる可能性がある。

申請者は、膵細胞特異的な標的として GLP-1 受容体に着目し、京都大学薬学研究科と共同で、2 型糖尿病治療薬として実用化されていた GLP-1 受容体アゴニストである Exendin-4 を母体骨格とした SPECT 及び PET 用プローブを開発し、非侵襲的膵細胞イメージング及び膵細胞量評価を可能にした。一方で、申請者は、糖尿病、内分泌代謝科専門医として肥満・糖尿病の診療・臨床研究に従事しており、食欲や摂食行動の制御は肥満・糖尿病予防・治療の大きな柱である食事療法の成否に直結し、肥満や耐糖能の増悪を通じて膵細胞量に多大な影響をもたらすと考えられるにも関わらず、膵細胞量同様に、客観的な可視化・定量化評価法が確立されておらず、実際の対策に苦慮している患者・医療従事者が多い現状を目の当たりにしてきた。近年、種々の GLP-1 受容体作動薬が中枢神経作用を介した食欲抑制・減量効果を有することが報告されており、中枢神経系における GLP-1 受容体発現量評価が食欲や摂食行動を反映し食事療法における新規バイオマーカー・評価系となり得ると考えられ、本研究を着想するに至った。また、臨床医として多くの糖尿病患者の治療に携わり臨床研究を行う中で、インスリン分泌障害が糖尿病の病態の根幹である一方、既存の糖尿病治療薬の多くはその有効性が残存する膵細胞機能に依存しており、患者を長期に治療するためには膵細胞量を早期から保護する必要があると痛感している。本研究により、中枢神経系シグナルと膵細胞量を同時に評価することで、多面的な作用をもつ膵細胞量保護戦略を構築できる可能性があり、医学的意義も極めて大きい。

## 3. 研究の方法

### < 中枢神経系 GLP-1R 発現量の非侵襲的評価法の確立 >

#### ・ 中枢神経系の GLP-1 受容体発現量とプローブシグナルの関係性の解析

中枢神経系でのプローブの薬物動態を明らかにするため、非糖尿病マウス及び糖尿病モデルマウスを用い、視床下部など各中枢神経領域における GLP-1R mRNA 発現量と、プローブ投与時の相当領域での放射能との量的関係性を評価する。プローブシグナル値が中枢神経系 GLP-1R 発現

量を反映していることを明確化する。

・ 膵・中枢神経系同時イメージング画像の撮像プロトコルの最適化

中枢神経におけるプローブシグナルが描出可能かを確認し、中枢神経系と膵臓を同時に撮像する際に最適な撮像条件を検討する。C57BL/6 マウスを用い、SPECT を用い、画像上の膵シグナルが膵細胞量を、中枢神経領域のシグナルが中枢神経系 GLP-1R 発現量を最も反映し得る条件を選定することで、最適化する。

#### 4 . 研究成果

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスに  $^{111}\text{In-Ex4}$  プローブ ( $90\ \mu\text{Ci}$ ) を尾静注し頭部を含めた SPECT/CT を撮像した。さらに、9 週齢の C57BL/6J 雄マウスへ Ex(9-39)  $200\ \mu\text{g}$  を前投与した後に、同様に  $90\ \mu\text{Ci}$  の  $^{111}\text{In-Ex4}$  プローブを尾静注し SPECT/CT 撮像を行った。次に、頭蓋内での集積領域を特定するため、9 週齢の C57BL/6J 雄マウスに  $^{111}\text{In-Ex4}$  プローブを尾静注し、プローブ投与  $0\cdot 0.5\cdot 1\cdot 2\cdot 4$  時間後に、下垂体、視床下部、大脳、膵臓を摘出し カウンターで RI 集積値を測定した (Biodistribution study)。また、9-88 週齢の C57BL/6J 雄マウスに、 $^{111}\text{In-Ex4}$  プローブを尾静注し、SPECT 画像上の有意集積領域の RI 集積値と摘出した下垂体組織の GLP-1R mRNA 発現量を評価した。

頭部  $^{111}\text{In-Ex4}$  SPECT/CT 画像解析において、鞍上部またはその周辺に、有意集積を認めた。頭蓋内に他に有意集積を認めなかった。また、同集積像は膵臓と同時に描出可能であった。さらに、Ex(9-39) 前投与下では認められなかった。

Biodistribution study では、膵臓に次いで、下垂体において、高集積をプローブ投与 4 時間にわたって認めた一方で、視床下部や大脳では有意な集積を認めなかった。また、 $^{111}\text{In-Ex4}$  SPECT/CT 画像上の有意集積領域の RI 集積値と、qPCR で評価した摘出した下垂体組織の GLP-1R mRNA 発現量は、有意な正の相関関係を示した ( $n=9$ ,  $r^2=0.745$ )。

$^{111}\text{In-Ex4}$  プローブを用いた SPECT/CT 画像解析において認められた有意集積は、Ex(9-39) 前投与で消失することから、GLP-1R へのプローブ集積を反映していると考えられた。同集積像は膵臓と同時に描出できたことから、GLP-1R 標的膵・中枢神経同時イメージングが可能であった。また、画像上の解剖学的位置情報や、Biodistribution study の結果から、同有意集積領域は下垂体へのプローブ集積シグナルであることが明らかになった。また、SPECT 画像上の同領域の RI 集積値と GLP-1R mRNA 発現量は有意な相関関係を示すことから、 $^{111}\text{In-Ex4}$  SPECT/CT により、膵細胞量同様、下垂体の GLP-1R 発現に関する量的情報を非侵襲的に得られる可能性がある。しかし、下垂体における GLP-1R 発現の詳細な解析・生理学的意義や、発現量変化と病態との関連性は明らかになっておらず、今後の研究課題である。Ex4 の脳室内・末梢投与により ACTH やコルチゾールの分泌が促進されるとの報告もあり、下垂体での GLP-1R 発現が下垂体前葉機能を介し肥満等の病態に寄与している可能性がある。今後、GLP-1R と下垂体前葉機能の分子・生理学的関連解析とともに、 $^{111}\text{In-Ex4}$  プローブによる下垂体 SPECT を用いた縦断的評価により、下垂体における GLP-1R 発現の生理学的意義や、発現量変化と病態との関連性を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kiyobayashi Sakura, Murakami Takaaki, Harada Norio, Fujimoto Hiroyuki, Murata Yuki, Fujita Naotaka, Hamamatsu Keita, Ikeguchi-Ogura Eri, Hatoko Tomonobu, Lu Xuejing, Yamane Shunsuke, Inagaki Nobuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Noninvasive Evaluation of GIP Effects on $\beta$ -Cell Mass Under High-Fat Diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.921125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fauzi Muhammad, Murakami Takaaki, Fujimoto Hiroyuki, Botagarova Ainur, Sakaki Kentaro, Kiyobayashi Sakura, Ogura Masahito, Inagaki Nobuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Preservation effect of imeglimin on pancreatic $\beta$ -cell mass: Noninvasive evaluation using $^{111}\text{In}$ -exendin-4 SPECT/CT imaging and the perspective of mitochondrial involvements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.1010825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Botagarova Ainur, Murakami Takaaki, Fujimoto Hiroyuki, Fauzi Muhammad, Kiyobayashi Sakura, Otani Daisuke, Fujimoto Nanae, Inagaki Nobuya	4. 巻 37
2. 論文標題 Noninvasive quantitative evaluation of viable islet grafts using $^{111}\text{In}$ exendin 4 SPECT / CT	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202201787RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------