

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591759

研究課題名(和文) 糖尿病モデル動物における脳機能および循環器機能のイメージング

研究課題名(英文) Imaging study on receptor binding, cerebral blood flow and metabolism in diabetes mouse brain

研究代表者

細井 理恵 (Hosoi, Rie)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30291446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1型および2型糖尿病モデル動物脳におけるグリア代謝および糖代謝、乳酸代謝のイメージングに関する検討を主に行った。14C-酢酸の取込みは1型および2型糖尿病モデルマウス脳において著明な増加を示した。18F-FDG(もしくは14C-DG)の取込みは1分値、30分値のどちらも低下を示したが、30分値の方がより鋭敏に反応し、ヘキソキナーゼによるリン酸化過程が影響を受けやすいことが明らかとなった。2型糖尿病モデルマウスでは乳酸代謝が増加しており、エネルギー基質が移行している可能性も示された。またムスカリン性アセチルコリン受容体のインビボ結合の一部に低下を認めたが、詳細は今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Glial energy metabolism in both type 1 and type 2 diabetic model mouse brain was measured with 14C-acetate. 14C-acetate uptake was significantly increased in diabetic model mouse brain. 18F-FDG, a glucose analog, uptake at 1 minute and 30 minutes after 18F-FDG injection was decreased. 18F-FDG uptake (30 minutes) was more sensitive, and it shows that phosphorylation process by hexokinase is more sensitive than transport process by glucose transporters. In type 2 diabetic model brain, 14C-lactate uptake was significantly increased. It is suggested the possibility that energy substrates shifted to alternative one, such as monocarboxylates in diabetic model mouse brain. In vivo muscarinic acetylcholine receptor binding using 3H-QNB was partly decreased. However, future study is required about receptor binding in diabetic model animal brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 脳循環代謝 FDG 酢酸 乳酸 受容体結合

1. 研究開始当初の背景

世界の成人人口の約 5% が糖尿病を抱えているといわれており、日本を含め東南アジア圏の患者数は今後著しく増加すると推定されている。糖尿病患者においては末梢組織におけるエネルギー代謝・機能の異常のみではなく、中枢神経系の疾患に対するリスクが増加しているとされる。

糖尿病とアルツハイマー病患者との関連について、Ott らがロツテルダムにおいて 6000 人以上を対象とし調査し、その結果を *Neurology* 誌 (1999) に報告している。その中で糖尿病患者が認知症や学習障害を生じるリスクは健常人の約 2 倍であるとされている。また糖尿病患者は冠動脈疾患や脳卒中などの脳・心血管イベントの発症率が高い。しかし糖尿病における脳機能の変化は複合的な要因で生じることが多く、臨床研究のみでは解明は困難である。

本研究においてはげっ歯類を用いたモデル動物を使用し、核医学的手法を用いて基礎的知見の集積を行うこととした。

これまでの我々の研究において、脳のエネルギー代謝もグリア細胞に特異的に取込まれる ^{14}C -酢酸を用いて、神経・グリアの弁別測定などを実施している。この過程で一過性脳虚血-再還流直後に ^{14}C -酢酸の取込みが一過性に低下し、グリア細胞のみの特異的な反応を検出することに成功している。また試験管内での検討では同じ反応を示す標識化合物が生体においては標識化合物の特性により特にその動的パラメータの反応が異なることを報告している。本研究においても複数の標識化合物をその性質に応じて用いることにより、脳機能を細分化・コンパートメント化し、さらに動的な情報に関する検討を行った。

2. 研究の目的

糖尿病モデル動物を用いてその機能障害を検出し、生体脳においてのみ得ることのできる情報を画像化することを目的としている。画像化には感度、基質選択性に優れている核医学的手法を用いる。また核医学的手法は CT などの形態学的手法と比較し、早い段階での変化を捉えることが可能であり、異常の早期検出のための情報を得ることを目的としている。

また本研究ではグリア細胞に焦点をあて、グリア細胞の制御と糖尿病における認知機能障害との関連を探ることも目的としている。

3. 研究の方法

1 型糖尿病モデルマウスは雄性 ICR マウスに streptozotocin (STZ) を 3 日間の間隔で 2 回腹腔内投与し作成した。対照群には同容量の生理食塩水を投与したマウスを用いた。

2 型糖尿病モデルマウスは雄性 BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db} マウス (dbdb マウス) を購入し用いた。対照群には雄性 BKS.Cg-m +/+Lepr^{db} マウス (db+マウス) を購入し用いた。

生体における代謝を測定するために、標識化合物として糖代謝の指標である ^{14}C -デオキシグルコース (DG) もしくは ^{18}F -フルオロデオキシグルコース (FDG)、グリア代謝の指標である ^{14}C -酢酸、神経細胞の代謝の指標と考えられている ^{14}C -乳酸を用いた。また局所脳血流の指標には ^{14}C -IMP および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ヘキサメチルプロピレンアミノキシム (HMPAO) を用いた。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO は血流の指標とされて臨床でも用いられているが、グリア細胞の影響も検討されている血流トレーサーである。また神経受容体結合の検討にはムスカリン性アセチルコリン受容体結合には ^3H -QNB、 ^3H -NMPB、ベンゾジアゼピン受容体結合には ^3H -フルマゼニールなどを用いた。

組織への取込みは組織摘出法およびオートラジオグラフィ法を用いて放射能濃度の測定を行った。必要に応じて短半減期核種と長半減期核種を組み合わせたダブルトレーサー法による検討を行った。病態モデルにより有意な体重差を認めため放射能濃度は DAR を用いて比較した。

また糖尿病モデル動物においてグリア細胞のエネルギー代謝が変化していることが明らかになったので、その機序を解明するために正常動物を用いてグリア細胞の代謝異常を起こした際の ^{14}C -酢酸の取込みについての検討も併せて実施した。

4. 研究成果

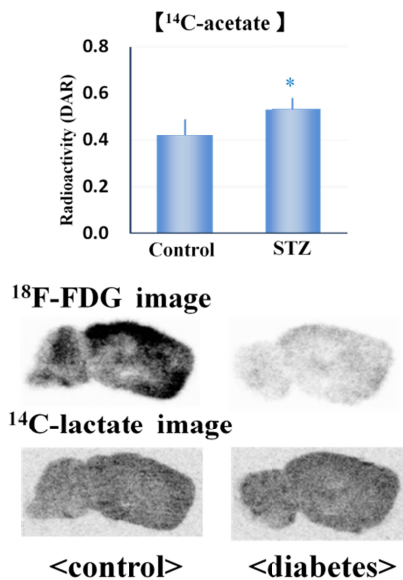
(1) 1 型糖尿病モデルマウスにおける脳循環代謝の変容

1 型糖尿病モデルマウス脳において、 ^{14}C -酢酸の取込みは病態の進行に伴う血糖値の増加と並行して増加し、早期に代謝異常が生じていることが明らかになった。 ^{14}C -DG (もしくは ^{18}F -FDG) の取込みは 1 分値、30 分値共に低下し、 ^{14}C -乳酸の取込みは有意な変化は認めなかった。糖代謝の低下は神経活動の低下を反映している可能性を示唆している。またエネルギー基質が糖からモノカルボン酸などに移行している可能性も示された。

さらに $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO および ^{14}C -IMP の取込みをダブルトレーサー法で測定したところ、それぞれ 25%、20% の取込みの低下を認めた。

また STZ により糖尿病を発症させた後、インスリンを投与することにより血糖値を抑制させたマウスの ^{14}C -酢酸の取込みはコントロール群と同程度の値を示し、取込み増加は抑制された。一方で ^{14}C -DG の取込み (1 分値) はインスリンによりコントロール群と同程度まで回復したのに対し、 ^{14}C -DG の取込み (30 分値) は STZ 群と同程度の低値を示した。これは脳の糖代謝はグルコーストランスポー

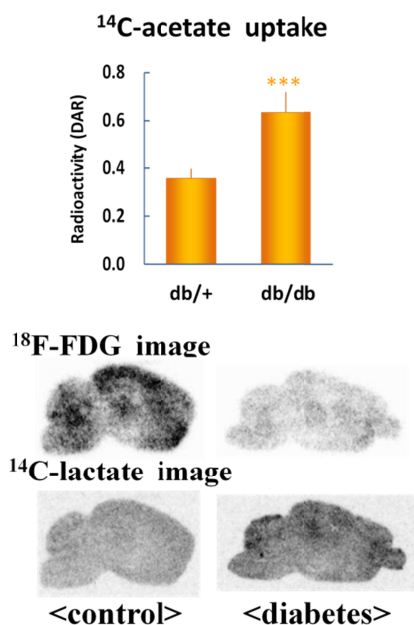
ターよりもヘキソキナーゼの方がより病態の影響を受けやすく、回復も困難であることを示している。



< 図 1 > 1 型糖尿病モデルマウス脳における¹⁴C-酢酸、¹⁸F-FDG、¹⁴C-乳酸の取込み

(2) 2 型糖尿病モデルマウスにおける脳循環代謝の変容

2 型糖尿病モデルマウス脳において、¹⁴C-酢酸の取込みは 1 型糖尿病モデルマウスと同様に増加を示した。一方で、¹⁴C-DG (もしくは¹⁸F-FDG)の取込みは 1 分値は有意な変化を示さず、30 分値は著明な低下を認めた。¹⁴C-乳酸の取込みは 50%以上の増加を認めた。本検討においては¹⁴C-DGの取込み(1分値)は有意な変化を示さなかったが、病態が進んだ状態では有意な低下を示した。これよりヘキソキナーゼの方がより早期に影響を受ける



< 図 2 > 2 型糖尿病モデルマウス脳における¹⁴C-酢酸、¹⁸F-FDG、¹⁴C-乳酸の取込み

ことが明らかとなった。また 2 型糖尿病モデルマウス脳ではエネルギー基質の変遷が生じていることが明らかとなった。

(3) 糖尿病モデルマウスにおける神経化学受容体結合の変容

1 型糖尿病モデルマウスの脳切片を用いてドーパミン D1 受容体 (³H-SCH 23390)、ドーパミン D2 受容体 (³H-raclopride)、TSPQ (³H-PK 11195)、ベンゾジアゼピン受容体 (³H-FMZ)、グルタミン酸受容体 (³H-MK 801)、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (³H-QNB) のインビトロ結合実験を行った。線条体における³H-SCH 23390、³H-raclopride の結合は 15% の増加を認めたが有意ではなかった。³H-PK 11195 については 15% の低下を認めたが有意ではなかった。³H-FMZ、³H-MK 801、³H-QNB のインビトロ受容体結合には変化を認めなかった。

³H-QNB についてインビボ受容体結合の検討を行ったところ、ARG 法では前頭皮質、線条体、海馬、大脳皮質などで有意な取込みの低下を認めたが、組織摘出法を用いて動態解析を行ったところ、線条体(1分および30分値)、大脳皮質(1分値)において結合の有意な低下を認めたがその他の領域、時間ではコントロール群と同程度の値を示した。ARG 法と組織摘出法との結果の乖離については今後の検討課題である。

(4) 脳におけるグルタミン酸-グルタミンサイクルとグリア細胞の代謝に関する検討

グルタミン合成酵素は脳ではグリア細胞のみに存在し、脳におけるグルタミン酸-グルタミンサイクルのキーエンザイムである。薬物によりグルタミン合成酵素を阻害した時の¹⁴C-酢酸、¹⁴C-DG、¹⁴C-IMPの取込みを検討した。グルタミン合成酵素阻害により¹⁴C-酢酸の取込みは影響を受けず、前頭皮質、体性感覚皮質、線条体、視床、小脳などの多くの領域で糖代謝の低下、前頭皮質、体性感覚皮質、線条体、扁桃体、海馬で脳血流の低下を認めた。これよりグルタミン酸-グルタミンサイクルの異常では¹⁴C-酢酸の取込みは影響を大きく受けず、糖尿病モデル動物における¹⁴C-酢酸の取込み増加はTCAサイクルの状態を反映している可能性が示唆された。

(5) 糖尿病モデルマウスの心筋における機能評価

1 型糖尿病モデルマウスの心筋における¹⁴C-DGの取込みは脳と同様に1分値、30分値共に著明に低下し、インスリンによる血糖値抑制によりどちらもコントロールレベルまで回復することが明らかとなった。ヘキソキナーゼの制御は脳と心筋では異なり、脳の方がより回復が困難であることを示している。

(6) 糖尿病モデルマウスへの¹⁴C-酢酸の取込みに対する麻酔の影響

小動物用 PET での測定を想定し、麻酔下でコントロール群と 1 型糖尿病モデルマウス群への ^{14}C -酢酸の取込みを比較した。その結果、イソフルレン麻酔下では 1 型糖尿病モデルマウス脳への取込みはコントロール群より低値を示した。これまでの検討で我々は麻酔により ^{14}C -酢酸の取込みが増加することを報告しており、コントロール群は麻酔の影響により通常の 2 倍程度まで ^{14}C -酢酸取込みが増加したのに対し、糖尿病モデル群では麻酔下と覚醒下での取込みに差を認めなかったことから今回の結果となった。 ^{14}C -酢酸の糖尿病モデルマウス脳での取込み増加と麻酔による取込み増加の機序については今後の重要な課題である。さらにモデル動物脳への ^{11}C -酢酸の取込みを小動物用 PET で測定するには新たな測定法の開発が必要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 6 件)

細井理恵、柳本和彦、峠田晃伸、福地一樹、1 型および 2 型糖尿病モデルマウスにおける脳および心筋の ^{14}C -乳酸取込みに関する検討、第 135 年会日本薬学会、20150327、神戸

財家俊幸、城野孝宏、柳本和彦、福地一樹、細井理恵、Li-Pilocarpine てんかんモデルラットにおける $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO および ^{14}C -IMP の取り込みについて (幼若動物と成熟動物の比較) 第 13 回放射線医薬品・画像診断薬研究会、20131214、京都

城野孝宏、財家俊幸、柳本和彦、福地一樹、細井理恵、グリア細胞における TCA サイクル抑制時の標識酢酸および標識 DG 取込みについて、第 13 回放射線医薬品・画像診断薬研究会、20131214、京都

細井理恵、柳本和彦、井上修、1 型糖尿病モデルマウスにおける脳循環代謝の変化とインスリン処置の影響、第 53 回日本核医学会総会、20131109、福岡

細井理恵、吉田真麻、張つばみ、柳本和彦、井上修、2 型糖尿病モデルマウスにおける脳および心筋のエネルギー代謝に関する検討、第 133 年会日本薬学会、20130330、横浜

細井理恵、吉田真麻、柳本和彦、井上修、グルタミン合成酵素阻害によるけいれん発作時のマウス脳の ^{14}C -酢酸の取り込みについて、第 52 回日本核医学会総会、20121012、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細井 理恵 (HOSOI, Rie)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30291446