

氏 名	桂 田 健 一
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 474 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	糖尿病治療薬 GLP-1 受容体アゴニストの中枢を介した心血管作用
論文審査委員	（委員長） 教授 百 村 伸 一 （委 員） 准教授 長 坂 昌一郎      講 師 藤 原      研

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

近年増加している 2 型糖尿病の主要な死亡原因は、心筋梗塞や脳梗塞などの心血管合併症である。わが国の 2 型糖尿病患者の寿命は非罹患者に比べて約 10 年も短く、生命予後改善には心血管合併症の予防が重要である。糖尿病治療薬としてインクレチン関連薬が 2009 年に登場し、幅広く使用されるようになった。インクレチンの代表である Glucagon-like peptide-1(GLP-1)にはインスリン分泌促進作用や膵 B 細胞保護作用以外に多彩な膵外作用が報告されている。特に心血管作用として、2 型糖尿病患者に対する臨床研究において GLP-1 受容体アゴニストの血圧低下作用が報告されたことから、心血管合併症予防効果にも大きな期待が寄せられている。心血管合併症において、自律神経調節の破綻とくに交感神経活性化は高血圧や虚血性心疾患、心不全の発症進展に密接に関わっており、交感神経活動を規定する中枢神経の役割は重要である。

GLP-1 には中枢神経作用があり、その摂食抑制作用は視床下部室傍核を介することが明らかにされている。GLP-1 受容体は脳内の心臓血管中枢を含む複数部位に発現している。そして、末梢 GLP-1、GLP-1 受容体アゴニストともに、血液脳関門を通過し脳内へ到達することが示されている。そのため GLP-1 の心血管作用は中枢神経を介した作用の寄与が大きいと推察される。

GLP-1 の心血管作用として、正常動物では末梢投与、中枢投与ともに急性の血圧上昇作用が知られており、中枢神経を介した機序が考えられている。一方、高血圧モデルでは末梢投与による慢性の降圧作用が報告されているが、中枢投与の作用は不明である。

そこで本研究は、高血圧モデルに対する GLP-1 中枢投与の効果とその作用機序を明らかにすることを目的とした。

### 2 研究方法

高血圧モデルとして高血圧自然発症ラット（SHR）および対照の Wistar-Kyoto（WKY）ラットを使用した。SHR、WKY ラットそれぞれに GLP-1 受容体アゴニストまたは Vehicle を脳室内投与した。GLP-1 受容体アゴニストの投与は、リラグルチド 200 pmol を脳室内（側脳室）に投与し、単回投与群と反復投与群に分けて行った。

単回投与群では、リラグルチド投与 2 時間後に Tail cuff 法により血圧・脈拍数を測定し急性効

果を観察した。反復投与群では、リラグルチドを1日1回2週間にわたって投与し、毎週 Tail cuff 法により血圧・脈拍数を測定し慢性効果を観察した。

中枢におけるリラグルチド作用機序の解析を、急性効果と慢性効果に分けて行った。急性効果の解析のため、リラグルチド脳室内単回投与後に抗 c-Fos 抗体を用いて視床下部および脳幹の免疫染色を行った。また視床下部に関しては GLP-1 の摂食抑制作用部位である室傍核の解析を行った。Wistar ラット室傍核からニューロンを単離し、fura-2 蛍光画像解析により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を測定し、GLP-1 の作用を解析した。その後、CRH およびバゾプレッシン、オキシトシン、ネスファチン抗体を用いた免疫染色により含有神経ペプチドを同定し、各神経ペプチドニューロンにおける GLP-1 の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加作用を解析した。

慢性効果の解析のため、リラグルチド反復投与2週間後に抗 c-Fos 抗体を用いて視床下部および脳幹の免疫染色を行った。またリラグルチド投与2週間目に蓄尿ケージを用いて採尿し、尿中カテコールアミン排泄量を HPLC 法により測定した。2週間のリラグルチド投与の終了後、下大静脈より採血し、レニン活性を RIA 法にて測定した。また腎臓を摘出し eNOS の mRNA 発現量を Real time PCR 法により測定した。

### 3 研究成果

SHR において、Vehicle 投与と比較してリラグルチド脳室内投与により、単回投与群では血圧・脈拍数はともに上昇した ( $\Delta\text{sBP}$   $11\pm1$  mmHg vs.  $3\pm2$  mmHg,  $p<0.05$ ,  $\Delta\text{PR}$   $45\pm5$  bpm vs.  $9\pm12$  bpm,  $p<0.05$ )。反復投与群では、2週間後に血圧上昇が抑制され、脈拍数は不変であった (sBP  $188\pm2$  mmHg vs.  $203\pm4$  mmHg,  $p<0.01$ , PR  $461\pm9$  bpm vs.  $471\pm5$  bpm,  $p=\text{ns}$ )。WKY ラットにおいては、リラグルチドの反復投与は血圧・脈拍数を変化させなかった。

SHR へのリラグルチド初回投与後に、視床下部室傍核、弓状核、および延髄孤束核の c-Fos 発現が亢進した。Wistar ラット室傍核から単離したニューロンの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  解析の結果、GLP-1 ( $10^{-14}$  ~  $10^{-8}$  M) は濃度依存性に室傍核ニューロンの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を惹起した。免疫染色の結果、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を示したニューロンの 50%が CRH、14%がバゾプレッシン、13%がオキシトシン、44%がネスファチン陽性であった。

SHR へのリラグルチド反復投与の2週間後に、室傍核、弓状核の c-Fos 発現は変化せず、孤束核の c-Fos 発現が亢進した。尿中ノルエピネフリン排泄量は有意に低下し、血漿レニン活性は変化しなかった。また腎皮質において eNOS の mRNA 発現量が有意に増加した。

### 4 考察

本研究は、高血圧モデル SHR において、リラグルチドの脳室内単回投与（急性効果）が血圧上昇作用を、反復投与（慢性効果）が血圧上昇抑制作用を発揮することを明らかにした。

SHR において、リラグルチドの単回投与後に室傍核、弓状核、孤束核で c-Fos 発現が亢進した。室傍核における標的を同定するため、Wistar ラットの単離室傍核ニューロンの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  解析を行ったところ、GLP-1 は室傍核ニューロンを直接活性化し、その主要標的は CRH およびネスファチンニューロンであった。CRH は ACTH-コルチコステロン分泌促進作用を有し、ネスファチンは交感神経活性化を介した一過性の血圧上昇作用が報告されている。リラグルチド脳室内投与による急性の血圧上昇作用に、室傍核 CRH、ネスファチンニューロン活性化が関与していることが示

唆される。

SHRにおいて、リラグルチドの反復投与2週間後に、孤束核でc-Fos発現が亢進し、尿中ノルエピネフリン排泄量が低下した。リラグルチド脳室内投与による慢性の血圧上昇抑制作用は、孤束核活性化を介した交感神経抑制による可能性が示された。この際、血漿レニン活性に変化はなく代償性の活性がみられなかったことから、腎交感神経も抑制されレニン活性が抑制されたままであった可能性が考えられる。

またリラグルチド反復投与後にみられた腎皮質eNOS発現の増加は、血管抵抗減少を介した血圧上昇抑制への寄与が考えられる。しかし、リラグルチドの中枢作用から末梢eNOS発現増加にいたる経路、機序を示唆するデータは得られなかった。孤束核活性化から交感神経抑制、末梢eNOS発現増加にいたるメカニズムについては、今後さらなる研究が必要である。

## 5 結論

本研究では、GLP-1受容体アゴニストの中枢作用が、高血圧モデルであるSHRに対して、急性の血圧上昇作用と慢性の血圧上昇抑制（高血圧改善）作用をもつことを示した。

急性作用は視床下部室傍核、弓状核の活性化を介すると考えられ、この活性化は慢性作用では消失していた。一方で反復投与後に観察されたGLP-1受容体アゴニストの慢性の高血圧改善作用は、臨床研究における報告に合致する。GLP-1受容体アゴニストは血液脳関門を通過するため、高血圧改善作用メカニズムの一部に中枢を介した機序が想定される。特に中枢を介した交感神経抑制作用が示されたことは、心血管合併症に結びつく交感神経活性化を予防し、高血圧改善のみならず糖尿病患者の生命予後を改善することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、GLP-1受容体アゴニストの中枢作用が、高血圧モデルであるSHRに対して、急性の血圧上昇作用と慢性の血圧上昇抑制（高血圧改善）作用をもつことが示された。その急性作用は視床下部室傍核、弓状核の活性化を介すると考えられ、この活性化は慢性作用では消失していた。一方で反復投与後に観察されたGLP-1受容体アゴニストの慢性の高血圧改善作用については、GLP-1受容体アゴニストは血液脳関門を通過するため、高血圧改善作用メカニズムの一部に中枢を介した機序が想定される。特に中枢を介した交感神経抑制作用が示されたことは、心血管合併症に結びつく交感神経活性化を予防し、高血圧改善のみならず糖尿病患者に対するベネフィットも期待できる。

本研究は精緻なデザインに基づいた実験によりGLP-1受容体アゴニストの中枢を介した心血管作用の機序解明に迫った内容で学位論文に値する質を有する研究であると考えられた。文言や図表のスタイルに関し、若干の修正が必要との指摘もあったため、それらの修正を加えた後、再度審査委員により内容の確認が行われ、全員一致で合格と判定された。

## 最終試験の結果の要旨

平成27年1月28日に委員長、百村伸一、委員、長坂昌一郎、委員、藤原 研の出席のもと最

終審査が行われた。桂田氏より学位論文内容に関するプレゼンテーションが約 30 分おこなわれた後、質疑応答に入った。審査委員からの質問に対して桂田氏より適切かつ真摯な回答が行われ、本人退場の後、審議を行い全員一致で最終試験に合格と判定された。

なお主な質疑応答内容は以下のとおりである。

質疑) まず、急性投与と慢性投与において脳内の c-Fos 発現亢進部位が異なっているのはどういう機序によると思われるか？

応答) 孤束核からは室傍核・弓状核への神経投射があり、リラグリチドが孤束核の活性化を介してこれらの部位のニューロンを慢性的には抑制することによる可能性がある。

質疑) 急性期慢性期の c-Fos 発現の亢進についてニューロンの同定はできているか？

応答) 今回は検討していないが、 $[Ca^{2+}]_i$  解析の結果から、おそらく室傍核では CRH ニューロンであろうと考えており、それを支持する c-Fos と CRH の二重免疫染色の報告もある。

質疑) 慢性投与で摂食も変化したか、もしそうであるならばそれが血圧に影響を与えた可能性は無いのか？

応答) 確かにリラグリチド投与群で摂食は 1 週目で有意に低下しており、2 週目で回復傾向にあるもののまだ有意に低下している。ただし体重には有意な変化がなく、摂食の変化が血圧に大きな変化を及ぼしたとは考えにくい。

質疑) 中枢に対する作用は交感神経を介することが本研究で明らかになったわけであるが末梢に対する作用として迷走神経を介した経路は考えられないか？

応答) 今回は評価していないが否定はできない。

質疑) SHR では血圧上昇を抑えているが対照ラットでは血圧を抑制していないのはなぜか？

応答) SHR では交感神経活性が亢進しており、そのような状態においてのみリラグリチドが交感神経を抑制し、交感神経活性が正常の場合には抑制していない可能性がある。

質疑) リラグリチドの臨床投与量で中枢への移行はどの程度と予想されるか？

応答) 検討は行っていないが、おそらく 1/100~1/1000 との予想に基づいて、それよりも高い濃度での実験を行った。

質疑) リラグリチドの慢性投与の血圧と心拍数に対する作用に解離がみられるのはなぜか？

応答) 心拍数は心臓の  $\beta$  受容体を介しているが、リラグリチドの作用機序は必ずしも  $\beta$  受容体を介するものがメインではない可能性がある。

質疑) リラグリチドの作用における CRH、ネスファチンをはじめとする各ニューロンの寄与度に差異はあると考えているか？

応答) 主要ターゲットは CRH であると考えているが、ネスファチンニューロンの寄与度については本研究では検討していない。