







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 588 号	氏名	安藤 久恵
審査委員会委員	主査氏名	松原悦朗	
	副査氏名	上村尚人	
	副査氏名	天田正之	
論文題目 Glucagon-like peptide-1 reduces pancreatic β -cell mass through hypothalamic neural pathways in high-fat diet-induced obese rats (GLP-1 は視床下部神経路を介して食餌誘導性肥満ラットの β 細胞容積を制御する)			
論文掲載雑誌名 Scientific Reports			
論文要旨 【緒言】肥満を伴う前糖尿病患者では正常血糖を保つため代償機構として膵島は肥大し、より多くのインスリンを分泌する。しかしこのような状態が続くと膵島は疲弊し、インスリン分泌低下さらには糖尿病発症が惹起される。Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、膵島に作用してインスリン分泌促進・グルカゴン分泌抑制するとともに、胃排泄遅延や膵島保護作用を有しており、肥満・糖尿病患者の治療に広く用いられている。GLP-1 の糖代謝に関する作用経路として、血行性と神経を介した経路の両者の存在が明らかになっている。一方、神経細胞の生存や維持に必要な脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) は、肥満動物において中枢に作用し摂食抑制や高血糖改善効果をもたらすことが知られている。今回我々は慢性的な GLP-1 末梢投与による膵島保護作用が中枢神経を介して発揮されるかについて検討した。 【研究対象および方法】8 週齢の雄 Sprague-Dawley ラットを用いて以下の実験を行った。【実験①】GLP-1 (7-36) の急性腹腔内投与が、肝臓由来求心性迷走神経を介して中枢神経を活性化させるか検討した。【実験②】GLP-1 の膵島保護作用が肝臓由来求心性迷走神経を介しているか検討するため、以下の群分けを行った。1) 普通食 (Standard) + Sham 群 + PBS 慢性腹腔内投与 (PBS) 群、2) 高脂肪食 (HFD) + Sham + PBS 群、3) HFD + Sham + GLP-1 慢性腹腔内投与 (GLP-1) 群、4) HFD + 迷走神経切断 (VgX) + PBS 群、5) HFD + VgX + GLP-1 群の 5 群とした。【実験③】GLP-1 の膵島保護作用が膵臓への遠心性交感神経を介しているか検討するため、以下の群分けを行った。1) Standard + Sham + PBS 投与群、2) HFD + Sham + PBS 群、3) HFD + Sham + GLP-1 群、4) HFD + 交感神経切断 (SpX) + PBS 群、5) HFD + SpX + GLP-1 群の 5 群とした。【実験④】GLP-1 アナログ製剤である Liraglutide による膵島保護作用も中枢神経を介しているか検討するため、以下の群分けを行った。1) HFD + Sham + PBS 群、2) HFD + Sham + Liraglutide 群、3) HFD + VgX + Liraglutide 群の 3 群とした。また作用機序に関して GLP-1 との違いがあるかについても検討した。迷走神経切断については手術的切断、交感神経については薬物 (6-OHDA) を用いた化学的切断を各々施行した。交感神経切断の確認は膵組織の VMAT2 抗体による染色で行った。中枢神経については <i>c-fos</i> の発現による神経細胞の活性化を評価、視床下部内の BDNF 含有量を測定した。膵臓については免疫染色による膵島のサイズやアポトーシスの検討するほか、ブドウ糖負荷試験を用いた糖代謝についても評価した。 【結果】【実験①】GLP-1 (5 nmol/kg) の急性腹腔内投与によって、視床下部内での <i>c-fos</i> 発現が有意に増加した。その効果は VgX によって消失した。【実験②および③】1) HFD 摂取による代償性膵島肥大が GLP-1 慢性投与により抑制されたが、その効果は VgX および SpX により消失した。2) GLP-1 投与による視床下部の <i>c-fos</i> 発現と BDNF 発現に正の相関が認められた。3) 実験③において、HFD 摂取による耐糖能障害が GLP-1 慢性投与によって改善したが、その効果は SpX によって消失した。【実験④】Liraglutide 慢性投与では、視床下部内の <i>c-fos</i> 発現の増加が VgX によって抑制された。一方、Liraglutide 慢性投与による代償性膵島肥大の抑制や耐糖能障害の改善作用は VgX によって部分的に減弱した。 【考察】今回、2 型糖尿病発症の前段階に似た肥満モデルを用いて検討した。GLP-1 の膵島保護作用には膵臓への遠心性交感神経の活性化、さらには膵 β 細胞に存在するアドレナリン受容体へ作用していることが推測される。一方、GLP-1 アナログ製剤は中枢神経のみならず、体循環を介して膵島保護作用を発揮することが推測された。本研究において、GLP-1 による一連の膵島における変化は、肝臓由来求心性迷走神経—視床下部—膵臓への遠心性交感神経という臓器間の神経ネットワークの存在が関与していることを新たに見出した。 【結語】GLP-1 の膵島保護作用には、肝臓—中枢神経—膵臓といった臓器連関が関与していることが示唆された。			
本研究はプレクリニカル糖尿病の発症病態への肝～中枢神経～膵の臓器連関を明らかにし、その制御による先制医療法確立に資する重要な基盤研究である。このため、審査委員の合議により本論文は学位論文に値すると判断した。			

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 ①・論	第588号	氏名	安藤久恵
審査委員会委員	主査氏名	松原悦朗	
	副査氏名	上村尚人	
	副査氏名	冬田 忍之	

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

1. 脳内のGLP-1受容体について説明せよ。
2. 今回触れていないβ細胞肥大へのアミリン関与につき、現時点での知見を説明せよ。
3. 膵臓以外、たとえば肝臓や脳などでのGLP-1 receptorの発現はどの程度なのか？また、中枢を介したGLP-1のシグナルを仮説として設定するにいたった臨床的あるいは基礎的な背景があるのか？
4. 肥満などによって代償性に増加や肥大したβ細胞が時間が経つとアポトーシスによって減少し糖尿病を発症するメカニズムは人間でも確立したメカニズムか。
5. 何故、コントロールにPBSを選択したのか？通常はスクランブルペプチドなどが必要と考えるが、研究計画作成の上でコントロール設定は適切か？
6. 使用したGLP-1とリラグルチドの相違を説明せよ。
7. 末梢投与での安定性・半減期などは、電気生理手法などを含め今回の実験系で確認しているのか？
8. BDNFとc-fosの発現は、同じ現象をとらえていると考えてよいのか？
9. 同様に、Ki-67とinsulin stainingは、同じものを評価していると考えているのか？(Ki-67は、insulinの産生を的確に反映するマーカーと言えるのか？)
10. リラグルチドを使った実験を実施した意味は？ GLP-1での実験と同じことを言っているだけでないのか？
11. モデルとしてSDラットに高脂肪食を投与する食事性の肥満モデルを用いているが、Zuckerのような遺伝性のものでない理由を説明せよ。またマウスではなくラットを使用した理由を説明せよ。
12. 論文でないスライドの統計処理の方法が十分に示されていないようだ。ほとんどの群間検定はOne way ANOVAと思うが違うか。また相関は何を使ったか。
13. 急性投与実験でのGLP-1作用発現がBDNF産生神経細胞である推測を詳しく説明せよ。
14. リラグルチドでの急性期投与実験をしていないのは何故か？
15. リラグルチドの慢性投与実験で交感神経切断を施行していないのは何故か？
16. BBBを介してのGLP-1の挙動、末梢投与後の脳内濃度、半減期、脳脊髄液中への出現などを検証していないのは何故か？
17. β細胞内でのGLP-1作用メカニズムを説明せよ。
18. 用量反応でみると2.5から5.0nmol/kgで急激に薬効がでていのはなぜか？
19. GLP-1の用量の設定根拠に関連して、暴露量ベースで換算したときに、臨床での薬効が発現する暴露量と、動物の5.0 nmol/kgで得られる暴露量は類似しているのか？
20. 急性実験において、BDNFがわずか数時間で上昇しているのは普通にあり得る現象なのか？
21. この実験での結論をふまえて、今後、臨床的にはどのような展開が望まれるのか？
22. 糖尿病患者に対するGLP-1の作用としてβ細胞の増殖がある。タイトルやDiscussionには慢性的なGLP-1やリラグルチドの投与により直接的にβ細胞の肥大や増殖が抑えられたとしているが、これは血糖コントロールが良くなった結果を見ている可能性はないのか。

これらの質問に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。