

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09084

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対するグルカゴン用ペプチド-1受容体作動薬の治療効果

研究課題名(英文) The therapeutic potential of GLP-1 receptor antagonists for the treatment of spinal cord injury

研究代表者

加藤 裕幸 (KATOH, Hiroyuki)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：40348678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後の二次障害における小胞体ストレスに着目し、糖尿病治療薬であるグルカゴン用ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬エキセナチドの脊髄損傷に対する治療効果とそのメカニズムを検証した。ラット圧挫損傷モデルを用いて脊髄損傷直後と7日後にエキセナチドを投与した治療群は血糖値の有害な低下を引き起こすことなく、PBSを投与した対照群に比べ、小胞体ストレス応答能の増強や細胞保護作用を有するM2マクロファージの増加などの作用を通じて、有意な下肢運動機能の改善をもたらすことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷後の再生医療では幹細胞移植が注目されているが、二次障害を軽減する薬物療法の確立はより多くの患者を救助する可能性が高いと考えられ、GLP-1受容体作動薬エキセナチド投与により脊髄損傷後の機能障害が軽減できることを確認した意義は大きい。エキセナチドは糖尿病治療薬として臨床応用されているため安全性に問題はなく、さらに糖尿病ではなくても低血糖などの副作用が発生しないことを確認した。今後その治療メカニズムをさらに解明する必要があるが、早期臨床応用に向けた確実な第一歩を踏み出した。

研究成果の概要(英文)：The effects of administering the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist exenatide after spinal cord injury (SCI) were examined in a rat contusion model. Compared to control animals that received PBS administration, the animals that received exenatide administration immediately after and 7 days after SCI had a significantly higher endoplasmic reticulum stress response levels along with a shift in the polarization of infiltrating macrophages leading to higher levels of anti-inflammatory M2 macrophages. The animals that received exenatide treatment did not suffer from hypoglycemia and showed significantly higher hindlimb motor function, demonstrating the therapeutic effects of exenatide for SCI.

研究分野：医学

キーワード：脊髄損傷 小胞体ストレス グルカゴン用ペプチド-1受容体作動薬 エキセナチド マクロファージ極性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 ( 共通 )

### 1 . 研究開始当初の背景

脊髄損傷患者数は、全世界で 250 万人とされ、多くの患者が障害を抱え不自由な生活と苦難を強いられている。脊髄損傷の麻痺の軽減に向けての基礎的研究の進歩は目覚ましいが、損傷時の脊髄細胞障害と再生阻害の詳細なメカニズムについては未だ解明されていない点が多い。複雑な病態を有する脊髄損傷に対して様々な手法を用いた再生医療の試みが行われているが、失われた軸索を再生させるより脊髄損傷で失われる軸索を最小限にとどめる方が容易である。われわれは外力による物理的細胞破壊に引き続いて生じる脊髄損傷後の二次障害における小胞体ストレスに着目し、小胞体ストレス応答能が相対的に低いオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)が小胞体ストレスを介したアポトーシスで失われることを確認した。また小胞体ストレス応答能を増強するアミロライド投与で OPC のアポトーシスが減少し、再髄鞘化と有意な機能回復が得られることを確認した。しかし循環動態が不安定な脊髄損傷急性期に降圧効果のあるアミロライド投与は臨床的に困難であり、それに代わる薬剤が望まれた。

### 2 . 研究の目的

グルカゴン用ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬エキセナチドは高血糖時に血糖降下作用を発揮するが、血糖が正常あるいは低い時には血糖降下作用はなく、本邦で 2 型糖尿病の治療薬として承認されている。高血糖は脊髄損傷の機能悪化因子であり、安全に高血糖を改善させることは脊髄損傷の治療上重要である。GLP-1 受容体は 脳や脊髄を含め、膵臓以外の多くの組織に確認されており、オートファジーを促進し、小胞体ストレスやミトコンドリアストレスを軽減して細胞死を抑制する。また GLP-1 受容体作動薬には神経保護作用があり、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症での改善効果が報告され、疼痛過敏性を軽減する作用も確認されている。更に炎症における活性化マクロファージを組織障害性のある M1 型から、免疫制御や組織修復作用のある M2 型に誘導し、炎症性サイトカインの放出を防ぐとの報告もある。このように小胞体ストレス軽減にとどまらない GLP-1 受容体作動薬の作用が脊髄損傷による神経障害を軽減する可能性が高いと考えられる。そこで本研究の目的は、脊髄損傷後に GLP-1 受容体作動薬が小胞体ストレスを軽減して炎症を改善し、OPC のアポトーシスを抑制して機能回復をもたらすことを証明することである。

### 3 . 研究の方法

- (1) 動物モデルの作成：Infinite Horizon spinal cord injury device (IH impactor)を用いて、10 週齢雌 SD ラットの第 10 胸椎高位に 200Kdyne の脊髄圧挫損傷を作成した。作成した脊髄圧挫損傷モデルに損傷直後と損傷後 7 日にエキセナチド(Exendin-4)10 µg を皮下投与する群を Exenatide 群とし、これに対して同スケジュールで PBS 1ml を皮下投与する群を Control 群とした。また椎弓切除のみの群を Sham 群として以下の各実験を行った。
- (2) 血糖値測定：GLP-1 受容体作動薬による低血糖の有無を検証するため、損傷直前、損傷直後、損傷後 3、6、12 時間後と、その後隔日で血糖値の測定を行った。
- (3) 後肢機運動能評価：運動機能を評価するために open-field locomotor test for rats である Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale (BBB score)を用いて損傷前、及び損傷翌日より 14 日目まで隔日で後肢機能評価を行った。
- (4) Western blot：損傷脊髄内の小胞体ストレスを定量し、エキセナチドの小胞体ストレス応答能を評価するために、GRP78 と CHOP の発現を western blot で評価した。GRP78 は小胞体内に蓄積した異常タンパクに対する自己防御機能(小胞体ストレス応答能)の主体となる小胞体シャペロンであり、小胞体ストレスを解消する。一方、CHOP は proapoptotic factor であり、小胞体ストレスが自己防御機能を上回ると細胞死を招く因子である。
- (5) RT-PCR：エキセナチド投与によるマクロファージ M1/M2 極性への影響を確認するために、損傷脊髄における M1/M2 のマーカー (M1：iNOS, CD16; M2：Arginase1, CD163, CD206) を RT-PCR で調査した。
- (6) 免疫染色：エキセナチドの効果を免疫組織化学的にも評価するため、損傷後 1、3、7、14 日に損傷脊髄を摘出して凍結切片を作成した。アストロサイトを抗 GFAP 抗体、OPC を抗 NG2 抗体で標識し、抗 GRP78 抗体と抗 CHOP 抗体での染色を通じて、後索におけるアストロサイトと OPC における GRP78 と CHOP の陽性率を定量した。またマクロファージ M1/M2 極性を評価するために、後索における Iba1+/iNOS+細胞(M1)、Iba1+/Arginase1+細胞(M2)を定量した。

### 4 . 研究成果

- (1) 血糖値：脊髄損傷直後は Exenatide 群も Control 群も血糖値は 200 mg/dl 前後まで上昇したが、その後は両群で徐々に低下し、100 mg/dl 前後に落ち着き、2 群間で有意差はなかった。
- (2) 後肢運動機能：BBB scale は両群とも損傷翌日は 0 点であり、その後経時的に改善傾向を示した。Exenatide 群は損傷後 7 日以降の全ての time point において、Control 群と比較し有意に高い BBB score の改善を認めた。しかも後肢機能の改善度は、過去に検証したア

ミロイドよりも高かった。

- (3) Western blot : 損傷後 3 日で Control 群と比較して Exenatide 群で有意に高い GRP78 の発現を認めた。損傷後 7 日, 14 日では両群の GRP78 発現に有意な差は認めなかったが, Exenatide 群において損傷後 1 日, 3 日では Control 群に対して GRP78 が高く, 損傷後 7 日, 14 日では低い結果になった。CHOP は, Exenatide 群においては損傷後 1 日から徐々に増加し, 損傷後 7 日をピークに損傷後 14 日では Control 群と比較して有意に低かった。Control 群は損傷後 14 日経過後も 7 日目と同様に高値であった。
- (4) RT-PCR : Control 群と比較して Exenatide 群の後索における iNOS, CD16 陽性細胞 (M1 マクロファージ) が損傷後 3 日で有意に低く, M2 マクロファージに関しては Arginase 1, CD163 陽性細胞が損傷後 3 日, CD206 陽性細胞が損傷後 1, 3 日で有意に高かった。
- (5) 免疫染色 : <小胞体ストレス> 後索組織全体での GRP78 発現率は, 全ての time point でエキセナチド群のほうが高い傾向にあり損傷後 3 日では OPC, アストロサイト共にエキセナチド群が Control 群に比べて有意に GRP78 の発現率の高かった。両群において OPC, アストロサイト共に CHOP 陽性細胞率は損傷後 7 日目までは徐々に増加傾向にあったが, エキセナチド投与群は損傷後 14 日で Control 群と比較して有意に CHOP 陽性細胞率が低かった。後索における全細胞中の NG2 陽性細胞率は両群において経時的に漸減傾向にあったが, 全ての time point でエキセナチド群で高い傾向にあった。
- <マクロファージ> iNOS 陽性細胞 (M1 マクロファージ) は損傷後 14 日まで 2 群間で有意差を認めなかったが, Arginase 1 陽性細胞 (M2 マクロファージ) は損傷後 3, 7 日で Control 群と比較して Exenatide 群で有意に高かった。

以上より, 脊髄損傷後の GLP-1 受容体作動薬エキセナチド投与は, 小胞体ストレス応答能の増強, 脊髄損傷後の血糖上昇の抑制, 細胞保護作用を有する M2 マクロファージの増加などの作用を通じて, 下肢運動機能の改善をもたらすことを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野口俊洋, 加藤裕幸, 山口慶子, 野村慧, 渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷に対するGLP-1受容体作動薬の作用 - マクロファージの極性に関する免疫組織学的検討 -
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiro Noguchi, Hiroyuki Katoh, Keiko Yamaguchi, Satoshi Nomura, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 The effects of GLP-1 receptor agonist administration for the treatment of spinal cord injury in a rat model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村慧, 加藤裕幸, 野口俊洋, 柳澤聖, 今井洸, 渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷に対するGLP-1受容体作動薬の作用 - 小胞体ストレス応答能の増強 -
3. 学会等名 第33回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Nomura, Hiroyuki Katoh, Sho Yanagisawa, Takeshi Imai, Masahiro Kuroiwa, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 GLP-1 receptor agonist enhances the ER stress response and improves functional recovery after spinal cord injury in a rat model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担 者	渡辺 雅彦  (WATANABE Masahiko)  (40220925)	東海大学・医学部・教授    (32644)	

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
---------	---------