

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09327

研究課題名(和文) グルカゴン様ペプチド1作動薬を用いた内在性保護機構活性化による脊髄保護

研究課題名(英文) Spinal cord protection using glucagon-like peptide-1 receptor agonists

研究代表者

松本 美志也 (Matsumoto, Mishiya)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60243664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：対麻痺は胸腹部大動脈手術の重篤な合併症の一つであり、周術期の脊髄虚血が原因と考えられているが、いまだに有効な脊髄保護法がない。今回われわれは糖尿病治療薬として臨床使用されている Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 作動薬の Exendin-4 と Liraglutide について家兔一過性脊髄虚血を用いて、その脊髄保護効果を検討した。その結果、高用量(臨床使用量の数倍) Liraglutide に脊髄保護効果があることが判明した。Liraglutide 投与により塩基性線維芽細胞増殖因子遺伝子やグルタミン酸トランスポーター遺伝子の発現が増加しており保護効果との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床使用されている薬物で脊髄保護効果が認められたことの意義は大きい。虚血前投与による保護効果ではあるが、胸腹部大動脈手術での脊髄保護を想定しているため虚血前投与は可能であり、投与タイミングに関しては臨床応用に問題となることはない。ただし、保護効果がみられた Liraglutide の投与量は臨床使用量の数倍であり、臨床応用に関しては何らかの対策が必要である。われわれは Liraglutide と作用機序の近いインスリンを併用することによりこの問題を解決できるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Paraplegia is a devastating complication of thoracoabdominal aortic surgery and is thought to occur due to spinal cord ischemia during aortic clamping or inadequate spinal cord perfusion postoperatively. However, no protective strategy has been established. We investigated whether glucagon-like peptide 1 receptor agonists, namely exendin-4 and liraglutide, could protect against ischemic spinal cord injury. The results showed that a high dose of liraglutide had protective effects on spinal cord ischemia and that liraglutide increased the gene expression of basic fibroblast growth factor and glutamate transporter.

研究分野：麻酔

キーワード：脊髄虚血 脊髄保護 Glucagon-like peptide-1 Exendin-4 Liraglutide 家兔

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

対麻痺は胸腹部大動脈手術の重篤な合併症の一つであり、大動脈遮断中の脊髄虚血または術後の不十分な脊髄灌流のために起こると考えられている。いまだに有効な脊髄保護法がなく、臨床応用可能な脊髄保護法の確立が求められている。従来、脊髄保護の研究に関しては、脊髄障害の機序を解明し、その障害メカニズムを阻止することで脊髄を保護する方法が試みられてきた。しかし、障害機序は複雑であり十分な成果が得られていない。一方、ischemic preconditioning(IPC)による中枢神経保護作用が発見されて以来、虚血性障害を自ら回避する内在性の保護機構に注目が集まっている。

われわれの家兎一過性脊髄虚血モデルを用いた IPC の研究においても、delayed IPC (IPC と侵襲的虚血の間隔が数日間)¹⁾と early IPC (IPC と侵襲的虚血の間隔が 1 時間以内)²⁾の両方で脊髄保護効果を認めている。特に大動脈遮断による early IPC の脊髄保護作用は強力で、その機序に Akt2 の活性化(リン酸化)が関与している可能性が高いことをわれわれは見出した²⁾。したがって、何らかの方法で Akt2 を虚血侵襲の前に活性化しておくことができれば強力な保護作用が期待できる可能性がある。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 作動薬は糖尿病治療薬として数種類が臨床使用されており、血液脳関門を通過する薬剤ではマウスの局所脳虚血モデルで脳保護作用が報告されている。GLP-1 作動薬は phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) →phosphoinositide-dependent kinase (PDK) →Akt→細胞生存の機序で脳保護作用があると考えられており、この経路を脊髄虚血負荷前に活性化しておくことができれば、脊髄を保護できる可能性があると考えたとわれわれは考えた。また、上記の保護機序において、Akt に関してはアイソフォームレベルでの検討は行われていないが、Akt2 は糖代謝に関与していることがわかっており、GLP-1 作動薬により Akt2 が活性化される可能性は十分考えられる。

以上の知見をもとに、胸腹部大動脈瘤手術時の脊髄障害を軽減する臨床応用可能な方法を開発するという観点から、すでに臨床使用され安全性が確認されている GLP-1 作動薬が Akt2 を活性化させ、脊髄虚血侵襲から脊髄を保護することができるか検討することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では家兎一過性脊髄虚血モデルを用いて、現在臨床使用されている GLP-1 作動薬の中で、オオトカゲの唾液腺から分離されたペプチドを基にした Exendin-4 とヒト GLP-1 を基にした GLP-1 アナログの Liraglutide に脊髄保護効果があるか検討することを第 1 の目的とした。そして、outcome study で効果が見られれば、その薬剤によりどのようなタンパク質が活性化されるのか遺伝子発現のレベルから検討することを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

家兎(2 ~ 3 kg)を用い、イソフルランで麻酔を導入し、耳静脈より輸液ラインを確保した。気管挿管を行い、以後イソフルラン + フェンタニル麻酔下で人工呼吸を行った。耳動脈と右側大腿動脈で大動脈遮断部の中枢側と末梢側の動脈圧をモニターした。脊髄虚血は、経後腹膜的腹部大動脈一時遮断(15 分間)により作成した。具体的には、経後腹膜のアプローチにより左腎動脈直下の腹部大動脈にテーピングを行った。体温は食道温と傍脊椎筋温をモニターし、傍脊椎筋

温を 38.0°C に保つように加温マットと加温ランプでコントロールした。虚血再灌流後、創を閉じて、全身麻酔から覚醒させた。

家兎は毎日 7 日間神経学的所見をモニターした。後肢運動機能は 5 段階評価とした(4: 正常、3: 跳躍できるが正常ではない、2: 後肢はよく動くが跳躍できない、1: 後肢がわずかに動く、0: 後肢の完全麻痺)。最終的な神経学的所見を確認後、再び全身麻酔を行い、大量のチオペンタールによる安楽死後、10 %リン酸緩衝ホルマリンを用いて脊髄灌流固定を行った。第 5 腰椎レベルの脊髄で厚さ 8 μm の切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。群分けを知らない者(若松)によって光学顕微鏡を用いて腰部腹側脊髄(中心管を通る線の腹側)の正常神経細胞数を各家兎 2 つの標本で計測し平均した。Nissl 小体の消失、細胞質の好酸性の増強、神経細胞核の均質な濃縮を虚血性障害の指標とした。

(2) Exendin-4 の脊髄保護効果

家兎を 4 群(各 $n=6$)に分けた。全身麻酔導入後、大動脈遮断 60 分前にそれぞれ E-4 (生理食塩水に溶解) 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、生理食塩水(対照群)を静脈投与した。左腎動脈直下の大動脈を露出し 15 分間遮断した。Exendin-4 投与前、投与後 30 分、60 分、90 分に血糖値を測定した。再灌流後 7 日間後肢運動機能を 5 段階で評価した。その後、HE 染色により腰部脊髄(L5)腹側の正常神経細胞数を計測した。

(3) Liraglutide の脊髄保護効果

家兎を 4 群(各 $n=6$)に分けた。全身麻酔導入後、大動脈遮断 90 分前にそれぞれ Liraglutide を 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、生理食塩水(対照群)を皮下注した。左腎動脈直下の大動脈を露出し 15 分間遮断した。L 投与後 30 分、60 分、90 分、120 分に血糖を測定した。再灌流後 7 日間後肢運動機能を 5 段階で評価した。その後、HE 染色により腰部脊髄(L5)腹側の正常神経細胞数を計測した。

(4) Exendin-4 と Liraglutide による脊髄での遺伝子発現

家兎を 3 群(各群 $n=4$)に分けた。イソフルランとフェンタニルによる全身麻酔下の家兎に、エクセナチド 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注(E 群)、リラグルチド 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下注(L 群)、生理食塩水を静注し(C 群)、E 群と C 群では投与後 60 分に、L 群では投与後 90 分に腰部脊髄を取り出した。Total RNA を抽出後に RNA 純度測定を行い、次世代シーケンス解析に用いた。total RNA 100ng から mRNA の抽出と断片化を行い、バーコードおよびアダプターを付加しライブラリーを作製した。濃度とライブラリー長を確認後に Illumina NextSeq で全 mRNA のシーケンスを行った。データ解析は Genomics Workbench ソフトを用いてトリミング後にウサギのリファレンス配列(*Oryctolagus cuniculus* 102)にマッピングさせ、発現値を正規化した。各遺伝子の TPM (transcripts per million) 値に 1 を加え \log_2 に変換し、データ解析を行った。

(5) 統計分析

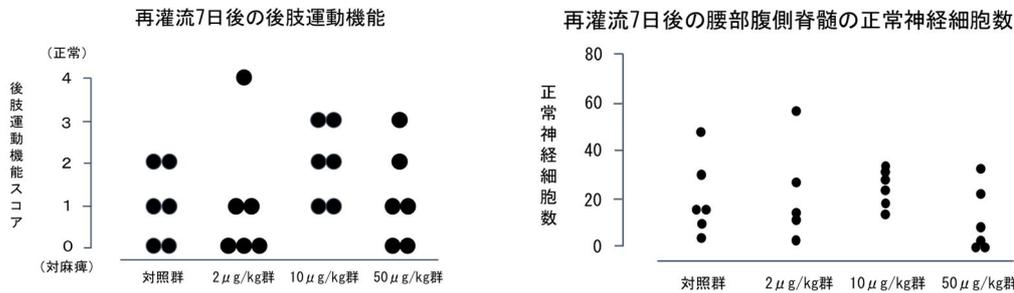
血糖値と遺伝子発現データは一元配置分散分析に続いて Dunnett's multiple comparisons test で、後肢運動機能データおよび脊髄腹側の正常神経細胞数は Kruskal-Wallis 検定と Mann-Whitney U test を用いて統計分析を行った。 $P < 0.05$ を有意とみなした。

4. 研究成果

(1) Exendin-4 の脊髄保護効果

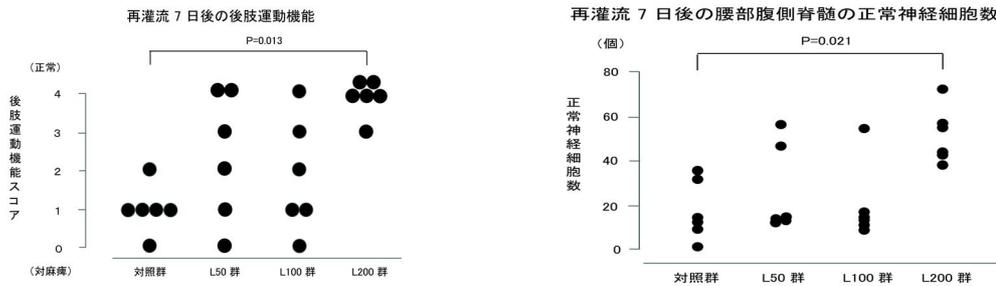
再灌流 7 日後の後肢運動機能と正常神経細胞数に群間差はなかった(下図)。また、血糖値の変

化にも群間差はなく、E-4 の高用量投与によっても低血糖を起こすことはなかった。



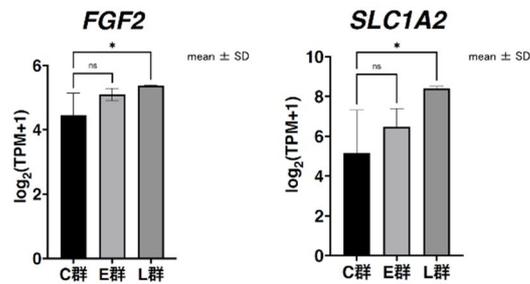
(2) Liraglutide の脊髄保護効果

200 μg/kg 投与により脊髄保護効果が認められた。虚血直前の血糖値は 200 μg/kg 群でやや低い傾向にあったが、低血糖は起こさず 4 群間で有意差はなかった。



(3) Exendin-4 と Liraglutide による脊髄での遺伝子発現

主成分分析では成分 2 でコントロールと薬剤処理が分離し、成分 3 でエクセナチドとリラグルチドが分離した。50%以上有意に上昇した遺伝子は E 群で 65 個検出され、L 群では 311 個検出された。塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) 遺伝子やグルタミン酸トランスポーター (SLC1A2) 遺伝子が C 群と比較し L 群で有意に上昇していた。



(4) 考察

GLP-1 作動薬である Exendin-4 と Liraglutide で脊髄保護効果を検討したが、Exendin-4 では保護効果が見られず、Liraglutide の高用量のみで保護効果が見られた。FGF2 や SLC1A2 には神経細胞保護効果があることが報告されており、リラグルチドの脊髄保護作用に関連がある可能性がある。

Exendin-4 はオオトカゲの唾液腺から分離されたペプチドを基に作られた薬剤であり、ヒト GLP-1 アナログの Liraglutide と比較するとヒト GLP-1 との相同性が低い。この違いが脊髄保護効果の違いとなった可能性がある。遺伝子発現を見ても Exendin-4 と Liraglutide には差があり、outcome study の差が生じたことは不自然ではないと考えられる。ただ、研究の仮説であった Akt2 の遺伝子の発現に関しては有意な変化をとらえることができなかった。今後、タンパクレベルの解析を行う必要がある。

(5) 今後の展望

臨床使用されている薬物で脊髄保護効果が認められたことの意義は大きい。虚血前投与による保護効果ではあるが、胸腹部大動脈瘤手術の脊髄保護を想定しているため虚血前投与は可能であり、投与タイミングに関しては臨床応用に問題となることはない。ただし、保護効果が見られた Liraglutide の投与量は臨床使用量の数倍であり、臨床応用に関しては何らかの対策が必要

である。われわれは Liraglutide と作用機序の近いインスリンを併用することによりこの問題を解決できるのではないかと考えている。今後、Liraglutide とインスリンの併用療法により脊髄保護効果が確認できるかさらに研究を進めていく予定である。

<引用文献>

1. Matsumoto M, Ohtake K, Wakamatsu H, et al. The time course of acquisition of ischemic tolerance and induction of heat shock protein 70 after a brief period of ischemia in the spinal cord in rabbits. *Anesth Analg* 2001;92:418-23.
2. Fukui T, Ishida K, Matsumoto M, et al. Comparison of the protective effects of direct ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning in a rabbit model of transient spinal cord ischemia. *J Anesth* 2018;32:3-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下敦生、若松弘也、松本美志也
2. 発表標題 Glucagon-like peptide-1受容体作動薬による脊髄保護効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下敦生、若松弘也、松本美志也
2. 発表標題 Glucagon-like peptide-1受容体作動薬Liraglutideによる脊髄保護効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下敦生、若松弘也、松本美志也
2. 発表標題 グルカゴン様ペプチド1受容体作動薬による脊髄保護と遺伝子発現
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022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	山下 敦生 (Yamashita Atsuo) (50379971)	山口大学・医学部附属病院・准教授 (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水上 洋一 (Mizukami Yoichi) (80274158)	山口大学・大学研究推進機構・教授 (15501)	
研究分担者	若松 弘也 (Wakamatsu Hiroya) (80379966)	山口大学・医学部附属病院・准教授 (15501)	

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