

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09238

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の二次障害を軽減するGLP-1受容体作動薬の治療効果メカニズム

研究課題名(英文) Examining the mechanisms through which GLP-1 receptor agonists ameliorate the secondary injury process of spinal cord injury

研究代表者

加藤 裕幸 (Kato, Hiroyuki)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：40348678

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)：脊髄損傷後にGLP-1受容体作動薬エキセナチドを投与することにより、小胞体ストレス応答が増強されてオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスが抑制され、運動機能の改善がもたらされることを確認した。その機序として、炎症/組織傷害に関連するM1から抗炎症/組織修復に関与するM2マクロファージへと極性転換があり、TNF、IL-1等の炎症性サイトカインの減少、IL-4、IL-10の抗炎症性サイトカインの上昇を確認した。更にエキセナチド投与により、血管内皮細胞間のtight junctionの構成要素タンパクが維持され、脊髄損傷で発生する血液脳脊髄関門の破綻が抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷の研究はiPS細胞やES細胞による損傷組織の再生に傾いているが、造腫瘍性などの問題や胎児由来のES細胞においては倫理的な問題も指摘されている。特に高齢者の脊髄損傷が近年増加傾向にあり、幹細胞移植よりは脊髄損傷後の二次障害を少しでも緩和する治療が必要と思われる。脊髄損傷後のGLP-1受容体作動薬投与が脊髄損傷後の高血糖の抑制、脊髄空洞の縮小、脱髄の抑制、マクロファージの極性転換、血液脳脊髄関門破綻の抑制、そして有意に高い機能障害の改善をもたらす効果を確認した。GLP-1受容体作動薬エキセナチドは既に糖尿病治療薬として臨床応用されているため、早期の臨床応用に向けて更に研究を重ねていく。

研究成果の概要(英文)：Administration of the GLP-1 receptor agonist exenatide enhanced the endoplasmic reticulum stress response, which lead to decreased apoptosis of the oligodendrocyte precursor cells and improved hindlimb motor function. Looking in to the mechanisms of this improvement, we found that exenatide changed the polarization of infiltrating macrophages from a pro-inflammatory M1 to an anti-inflammatory M2 profile, leading to a decrease in inflammatory cytokines TNF and IL-1 and an increase in anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10. Furthermore, through RT-PCR we found that exenatide administration brought about an increase in the expression of major tight junction proteins of the vascular endothelial cells such as Zo-1 and claudin-5, suggesting that exenatide administration protected against disruption of the blood-spinal cord barrier, leading to functional improvement.

研究分野：脊椎脊髄外傷

キーワード：脊髄損傷 小胞体ストレス GLP-1受容体作動薬 エキセナチド マクロファージ 血液脊髄関門 オリゴデンドロサイト前駆細胞

## 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。外傷性脊髄損傷において、直接的外力によって生じる脊髄組織の挫滅や出血性壊死(一次障害)に引き続き、生化学的、病理学的変化により損傷が拡大する現象(二次障害)が認められている。二次障害の主体をなすのがアポトーシスであり、再生のために誘導・増殖された細胞も傷害する。脊髄損傷後、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)は一時的に増殖するが、その後の再髄鞘形成が得られない。この要因の一つとして、増殖した OPC のアポトーシスが考えられる。これらアポトーシスを抑制することは、二次障害による損傷の拡大を軽減することのみならず再生(再髄鞘形成)の意味において大変重要となる。

近年、アポトーシスの新たな経路として、小胞体ストレスが着目されている。ストレスを受けた小胞体は正常なタンパクを生成できずに異常タンパクを生成し、この異常タンパクの蓄積が proapoptotic factor である CHOP を介して遅発性細胞死を引き起こす。この異常タンパクに対する自己防御機能として、小胞体シャペロン GRP78 が同定されており、その異常がアルツハイマー、パーキンソン病に大きく関与していることが報告されている。われわれは、ストレス下に培養したグリア細胞の実験系で、軽度ストレスでは GRP78 により異常タンパクが分解されるが、過度なストレスが処理能力を超えると CHOP によるアポトーシスへいたることを確認した。また、遺伝子導入により GRP78 を強制発現することによりアポトーシスが抑制されることを報告した(Suyama et al., Neuroscience Letters, 2011)。in vivo でも損傷により脊髄細胞内に GRP78 が強発現し、その発現程度は細胞種により異なり、OPC は他の細胞種に比して有意に発現が低いことを証明した(Matsuyama et al., J Spinal Cord 2014)。この結果から、OPC の小胞体ストレスに対する脆弱性が再髄鞘化阻害に関与していると考えている。

利尿剤/降圧剤として臨床で用いられているアミロライドには小胞体ストレス応答能を高める効果が報告されていたことから、ラット脊髄損傷モデルで損傷後 14 日間アミロライドを投与して検討した。アミロライド投与群では Western Blot で有意に GRP78 の発現が高く、また CHOP の発現は有意に低かった。また TUNEL 染色で確認したアポトーシスの脊髄内の拡がりには有意に抑制され、運動機能にも有意な効果がみられた(Kuroiwa et al., Eur J Neurosci 2014)。更に、アミロライド投与による再髄鞘化を確認するため、脊髄損傷後 3 日間 BrdU を投与して増殖細胞を標識しつつアミロライドを投与したところ、対照群に比してアミロライドで有意に多い OPC、そして OPC から分化したオリゴデンドロサイトが確認された。Western Blot でミエリンの構成蛋白である Myelin basic protein (MBP)を定量したところ、アミロライド群で有意に MBP 発現が高く、また電子顕微鏡で髄鞘の厚さを計測したところ、対照群と比べてアミロライド群で有意に髄鞘は厚く、アポトーシスを免れた OPC から分化したオリゴデンドロサイトが再髄鞘化に関わることが判明した (Imai et al., J Clin Med 2018)。

このように小胞体ストレス応答能を増強することによって脊髄損傷の麻痺が軽減できることが示され、臨床応用の可能性が検討されたが、脊髄損傷患者にアミロライドを投与する前に超えなければならないハードルがあった。アミロライドは米国 FDA に承認されている薬剤ではあるが、本邦での承認は得られていない。また、アミロライドは降圧剤として利用される利尿剤であるが、脊髄損傷の急性期には循環動態が不安定で多くの場合は低血圧を呈する。このようにアミロライドの使用は困難と考えられたため、小胞体ストレスを軽減する他の薬剤を検討し、有望な候補として挙げたのがグルカゴン用ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬である。

GLP-1 は高血糖によって小腸 L 細胞から分泌されるホルモンであり、高血糖時に血糖降下作用を発揮する。しかし血糖が正常あるいは低い時には血糖降下作用がないため、GLP-1 受容体作動薬は比較的安全な薬剤として 2010 年から本邦で 2 型糖尿病の治療薬として承認を得て、現在 5 種類の薬剤が臨床で使われている。高血糖は脊髄損傷の機能悪化因子であることが報告されており、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、臓器以外の多くの組織に確認されており、その効果に関する研究が盛んに行われている。GLP-1 受容体作動薬は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。ラット脊髄損傷モデルで GLP-1 受容体作動薬が小胞体ストレスを軽減し、OPC アポトーシスを抑制して再髄鞘化と機能回復をもたらすことを証明することは、臨床応用への大きな布石となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脊髄損傷後の GLP-1 受容体作動薬エキセナチド投与が、小胞体ストレス、浸潤性マクロファージの極性、血液脊髄関門の破綻にどのような影響を及ぼすのかを調査することである。

## 3. 研究の方法

動物モデルの作成：10 週齢雌 SD ラットを使用する。Infinite Horizon spinal cord injury device (IH impactor: Precision Systems & Instrumentation [PSI], Lexington, KY)を用いて 200Kdyne の損傷強度で第 10 胸椎硬膜上に脊髄圧挫損傷を作成した。損傷ラットを GLP-1 受容体作動薬 weekly 群, daily 群, control 群の 3 群に分け, weekly 群は損傷 24 時間後と 8 日後に weekly GLP-1 受容体作動薬を腹腔内投与し, daily 群と対照群はそれぞれ daily GLP-1 受容体作動薬, 溶媒(PBS)を 24 時間毎, 損傷後 14 日目まで腹腔内投与を行った。GLP-1 受容体作動薬による低血糖の有無を検証するため, 血糖値を測定した。

後肢機能評価：損傷前及び損傷翌日より隔日で the Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale (BBB scale)による後肢機能を評価した。

Western Blot：損傷後 3 日, 7 日, 14 日, 28 日に検討を行う。麻酔下に損傷脊髄を摘出し, GRP78, CHOP, internal control として  $\beta$ -actin の抗体を用いて Western blot を行い, 蛋白レベルで小胞体ストレス関連タンパクの発現を評価した。

RT-PCR：損傷後 3 日, 7 日, 14 日, 28 日に麻酔下に損傷脊髄を摘出し, internal control として  $\beta$ -actin の primer を用いて RT-PCR を行い, 遺伝子レベルでの発現を評価した。浸潤性マクロファージの極性を確認するため, 炎症性の M1 マクロファージの指標として iNOS, CD16, CD86, 細胞保護の M2 マクロファージの指標として Arginase1, CD163, CD206 を調査した。また血液脊髄関門の機密性に関わる tight junction protein として, Occludin, Zo1, Claudin5 を調査した。

組織学的検討：損傷 7 日, 14 日, 28 日に灌流固定を行い, 損傷脊髄を摘出する。損傷部から頭尾側へ 7mm ずつの後索部での脊髄横断切片を作成し, 小胞体ストレス関連タンパクとして抗 GRP78 抗体, 抗 CHOP 抗体, 各種細胞マーカーとして抗 NeuN 抗体 (ニューロン), 抗 GFAP 抗体 (アストロサイト), 抗 NG2 抗体 (OPC) による二重免疫染色を行った。また浸潤性マクロファージの極性を確認するため, M1 マクロファージとして Iba1/iNOS 二重陽性細胞, M2 マクロファージとして Iba1/Arginase1 二重陽性細胞を定量化した。

血液脳脊髄関門の評価：血液脳脊髄関門の気密性を評価するため, 損傷後 24h, 48h に頸静脈からエバンスブルーを投与し, 脊髄に析出した色素量を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 後肢運動機能評価

両群で損傷直後および翌日は BBB スコアが 0 であったが, その後時間の経過とともに改善した。7 日目以降からエキセナチド群が対照群と比較して有意に高い BBB スコアを示した ( $p < 0.05$ ) (図 1)。

### (2) 血糖値

損傷直後にエキセナチド群と対照群で約 200 mg/dL まで増加後, すぐに正常レベルに戻った。2 群間に有意差は認めず, エクセナチド群においても低血糖は認めなかった。

### (3) Western blot

ER ストレス応答能の指標である GRP78 の発現量は, エクセナチド群において損傷後 3 日目で有意に上昇し ( $p < 0.05$ ), アポトーシスの指標 CHOP の発現量は, エクセナチド群で 1 日目から 7 日目のピークまで増加し, その後減少したのに対して, 対照群では CHOP 発現は高レベルで維持され, 14 日目でエキセナチド群と比較して対照群の CHOP 発現が有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (図 2)。

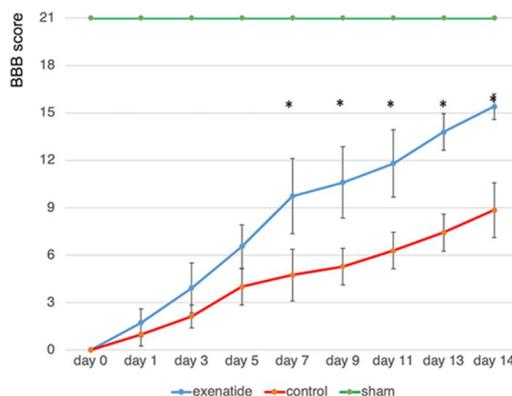


図 1

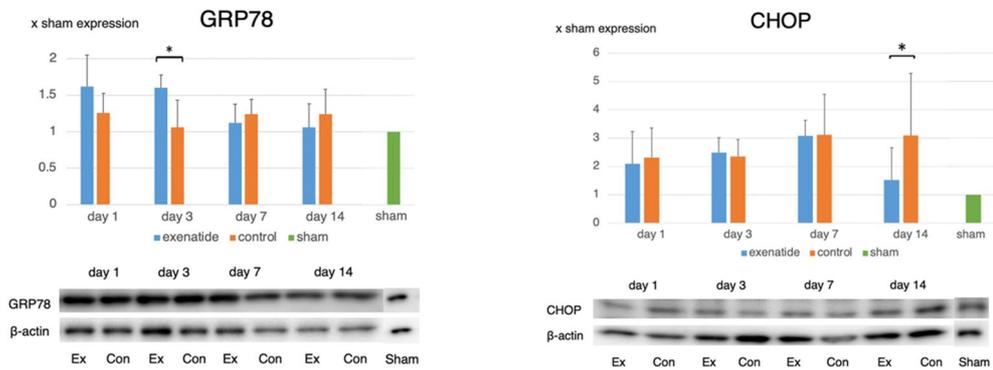


図 2

(4) RT-PCR

iNOS 陽性 M1 マクロファージはエキセナチド群で損傷後 3 日で有意に低く ( $p < 0.05$ ), Arginase1 陽性 M2 マクロファージはエキセナチド群で損傷後 3 日目に有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (図 3).

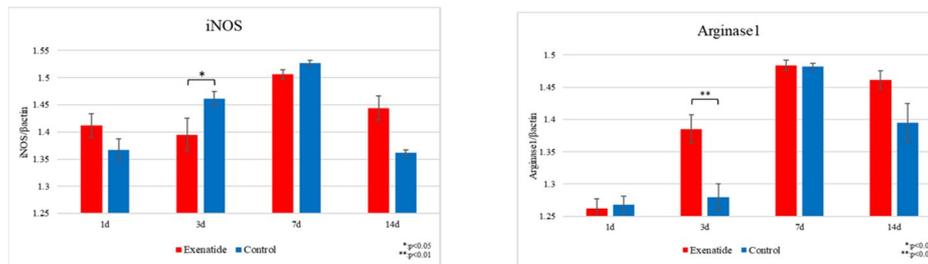


図 3

エキセナチド投与により炎症性サイトカインは減少し ( $p < 0.05$ ) (図 4), 抗炎症性サイトカインは亢進した ( $p < 0.05$ ) (図 5).

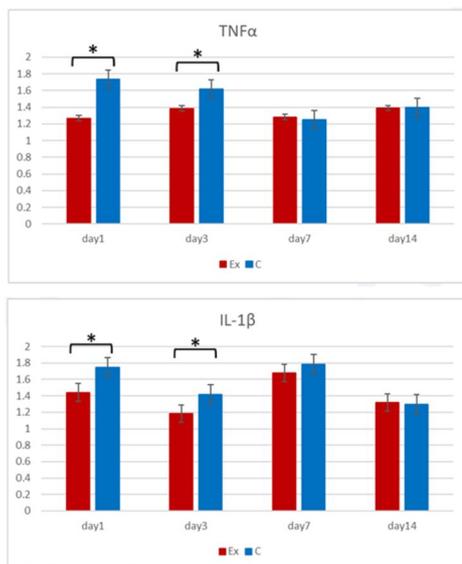


図 4

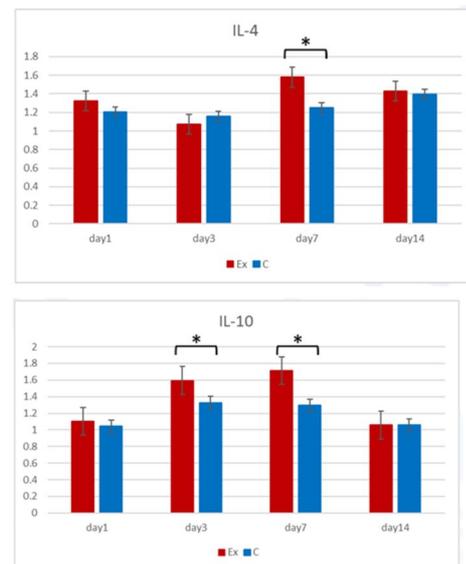


図 5

血液脳脊髄関門に関わる tight junction に関しては, 損傷後 2 日目で claudin5 や Zo1 がエキセナチド群において有意に減少が抑制されていた ( $p < 0.05$ ) (図 6).

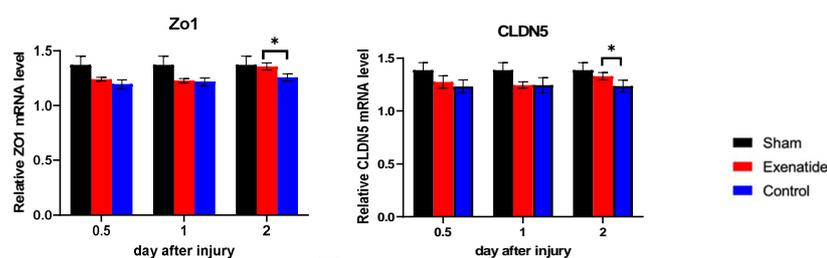


図 6

(5) 組織学的評価

後索における各種細胞における GRP78 陽性率はエクセナチド群の方が高い傾向があり，対照群と比較して OPC とアストロサイトにおける GRP78 陽性細胞率はエクセナチド群で有意に高かった( $p < 0.01$ ) (図 7) . CHOP の陽性率は 3 日目から 7 日目まで両群で同様に増加したが，14 日目の OPC およびアストロサイトでエクセナチド群の CHOP 陽性率が対照群と比較して有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (図 8) .

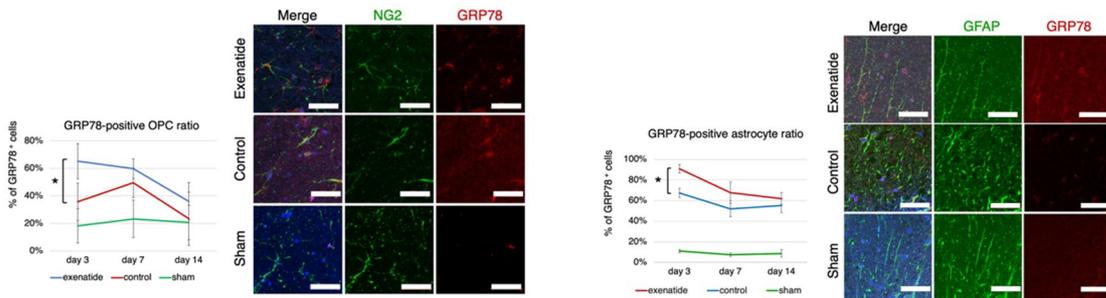


図 7

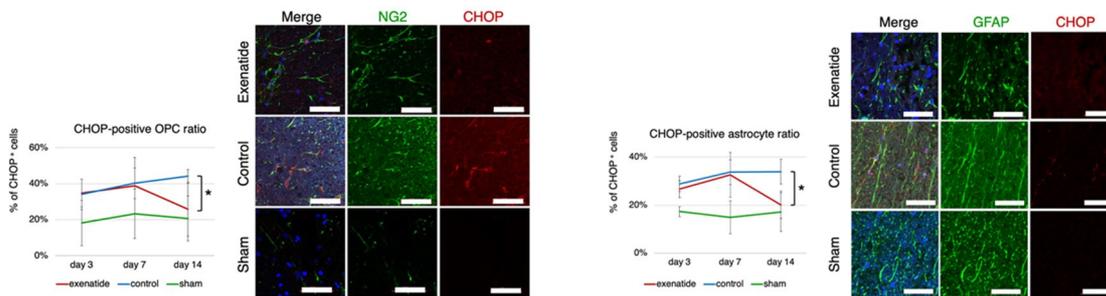


図 8

(6) 血液脳脊髄関門の評価

エバンスブルーの漏出はエキセナチド群において損傷後 48h で有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (図 9) .

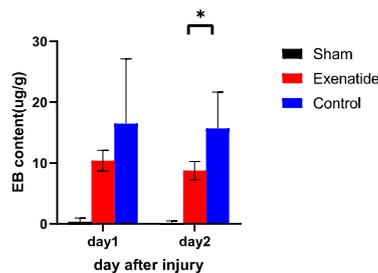


図 9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nomura Satoshi, Katoh Hiroyuki, Yanagisawa Sho, Noguchi Toshihiro, Okada Keiko, Watanabe Masahiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Administration of the GLP-1 receptor agonist exenatide in rats improves functional recovery after spinal cord injury by reducing endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IBRO Neuroscience Reports	6. 最初と最後の頁 225 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibneur.2023.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi Toshihiro, Katoh Hiroyuki, Nomura Satoshi, Okada Keiko, Watanabe Masahiko	4. 巻 18
2. 論文標題 The GLP-1 receptor agonist exenatide improves recovery from spinal cord injury by inducing macrophage polarization toward the M2 phenotype	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2024.1342944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口慶子 加藤裕幸 野口俊洋 野村慧 渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷ラットにおけるGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脳脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第36回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口慶子 加藤裕幸 野口俊洋 渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷ラットにおけるGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脳脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第39回 日本運動器・移植再生医学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 裕幸, 野村 慧, 野口 俊洋, 岡田 慶子, 服部 伸昭, 渡辺 雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷における小胞体ストレスの関与とその制御
3. 学会等名 第57回 日本脊髄障害医学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口慶子 加藤裕幸 野口俊洋 野村慧 渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷ラットにおけるGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脳脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口慶子 加藤裕幸 野口俊洋 野村慧 渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷ラットにおけるGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脳脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第40回日本運動器移植再生医学研究会
4. 発表年 2021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
---------	---------