

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09417

研究課題名(和文) 脊髄損傷2次障害に対するGLP-1受容体作動薬の有効性の検討

研究課題名(英文) Administration of the GLP-1 receptor agonist enhances the ER stress response and improves functional recovery in the secondary injury process after spinal cord injury

研究代表者

渡辺 雅彦 (Watanabe, Masahiko)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40220925

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)：外傷性脊髄損傷における障害は二次障害により拡大するが、中枢神経では小胞体ストレスが重要である。GLP-1受容体作動薬は小胞体ストレス応答能の増強によるアポトーシス抑制効果が報告されており検討をおこなった。投与により損傷脊髄内でのGRP78の発現は亢進し、CHOPは抑制された。組織学的にも損傷範囲の軽減がみられ、高い有効性がみられた。また、抗炎症/組織修復に關与するM2マクロファージが有意に増加し、一方炎症/組織傷害に關連するM1では発現が減少する傾向がみられた。血液脳脊髄関門に対しても保護的な作用が確認でき、今後の臨床応用に希望がもてる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脊髄損傷における障害は二次障害により拡大するが、その主体をなすのがアポトーシスであり、中枢神経では小胞体ストレスが重要な経路である。二次障害は損傷の拡大に加えて、再生のために誘導・増殖されたオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存分化も障害し、再髄鞘形成を阻害する。すなわち損傷脊髄内でのグリア細胞のアポトーシス抑制が可能であれば、二次障害による損傷範囲拡大の軽減、再髄鞘形成による脊髄損傷後の麻痺の軽減へとつながる可能性がある。小胞体ストレス応答能増強効果が報告されているGLP-1受容体作動薬の効果を検討し良好な結果を得た。今後の臨床応用を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis is a key factor in the secondary injury process after spinal cord injury that aggravates the damage to the injured spinal cord, and endoplasmic reticulum stress is one of the main apoptosis pathways in the central nervous system. GLP-1 receptor agonist, which enhances the ER stress response, decreased the area of lesion and improved the function after spinal cord injury. GLP-1 receptor agonist also brought about the positive effect in M1/M2 rate of macrophage and the blood spinal cord barrier, showing great potential for the treatment of SCI.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊髄損傷 脊髄損傷2次障害 小胞体ストレス応答 アポトーシス GLP-1受容体作動薬

## 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。脊髄損傷遺残麻痺の軽減に向けて基礎的研究の進歩は目覚ましいが、損傷時の脊髄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も多い。外傷性脊髄損傷において、一旦死滅した脊髄細胞を再び取り戻すには、損傷した部分への細胞移植が最も効果的と考えられる。しかし、細胞移植療法に関しては多くの基礎的実験結果は報告されているものの、臨床応用には未だ多くの課題が残されている。

外傷性脊髄損傷における障害は、外力による物理的破壊のみならず、これに引き続いて生じる二次障害で形成されることが知られている。実験的脊髄損傷モデルでは、直接的外力（一次障害）によって生じる脊髄組織の挫滅による物理的細胞破壊や出血性壊死とそれに引き続いて生じる生化学的、病理学的変化（二次障害）により損傷が拡大する現象が認められている (Watanabe et al., J Neurotrauma 1998)。二次障害の主体をなすのがアポトーシスである。さらにアポトーシスは再生のために誘導・増殖された細胞も障害する。われわれがこれまで行ってきた外傷性脊髄損傷における脱髄とオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化・誘導の検討では、脱髄部周囲でオリゴデンドロサイト前駆細胞は一時的に増殖するが、その後再髄鞘形成が得られない。(Watanabe et al., J Neurosci Res 2002, Watanabe et al., Glia 2004, Suyama et al., J Neurotrauma 2007) この要因の一つとして、増殖したオリゴデンドロサイト前駆細胞(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）の意味においても大変重要となる。

中枢神経系におけるアポトーシスの経路として小胞体内におけるタンパク修飾異常が挙げられている。外傷のストレスにより小胞体内でのタンパク修飾異常が起こり、異常タンパクが集積しアポトーシスへ至る。この異常タンパクに対する自己防御機能として unfolded protein response(UPR)がある。UPRは小胞体シャペロン GRP78 が主体となるが、小胞体シャペロンの異常がアルツハイマー病や、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、グルタミン酸やツニカマイシンによるストレス下にグリア細胞の培養を行い、GRP78の発現増強を確認した。その結果は、ストレスが軽度のうちはGRP78により異常タンパクが分解されるが、ストレスが過度になるとその処理能力を超えてアポトーシスに至るというLarnerらの報告と矛盾しない結果であった。また、遺伝子導入によりGRP78を強発現することによりアポトーシスを抑制することも報告した。(Suyama et al., Neuroscience Letters, 2011, PloS one, 2014) in vivoにおいても、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、オリゴデンドロサイト前駆細胞で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., Spinal Cord, 2014) また小胞体ストレス応答能を増強するとされるFDAで認可された利尿剤アミロライドの効果を報告した。アミロライドは培養オリゴデンドロサイト前駆細胞の小胞体ストレス応答能を高め、またin vivoでもGRP78の発現を高め、オリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスを軽減した。(Kuroiwa et al., Eur J Neurosci, 2014) アミロライド投与で生存したオリゴデンドロサイトが、再髄鞘形成や後肢感覚機能障害の軽減にも影響していることを長期的観察にて証明し報告した。(Imai et al., Clinical Medicine, 2018)しかしながらアミロライドは日本では認可されておらず、また血行動態の安定しない脊髄損傷急性期に降圧効果のある薬剤を投与することは危険である。近年、糖尿病薬とし

て普及している GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチドは、インスリン分泌能に加え、アポトーシス抑制作用が報告されており、その要因として小胞体ストレス応答能の増強がある。また GLP-1 受容体作動薬は虚血性心疾患、慢性腎障害、脳梗塞等の各種疾患の動物モデルで酸化ストレスの軽減、細胞傷害性 M1 マクロファージから細胞保護作用を有する M2 マクロファージへの転化、オートファジーの促進等が報告されている。われわれはラット脊髄損傷モデルを用いて、損傷脊髄における GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチドの有効性と ER ストレスへの影響を調査した。

## 2. 研究の目的

- (1) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬の有効性と ER ストレスへの影響の検討
- (2) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬のマクロファージ極性への作用の検討
- (3) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬の血液脳脊髄関門への作用の検討
- (4) GLP-1 受容体作動薬投与方法の検討

## 3. 研究の方法

- (1) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬の有効性と ER ストレスへの影響の検討

10 週齢雌 SD ラットで IH-Impactor を用いて 200kdyn 胸髄圧挫損傷モデルを作成し、脊髄損傷のみのコントロール群、損傷直後と 7 日後にエキセナチド 10 µg を皮下注射したエキセナチド群、そして椎弓切除のみの Sham 群を比較検討した。脊髄損傷前後と隔日での血糖値を測定し、後肢機能評価を BBB スコアで行った。損傷後 3, 7, 14 日に脊髄を摘出し、Western blot, 免疫染色で小胞体ストレス関連蛋白の発現を比較し、OPC の細胞数を調査した。

- (2) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬のマクロファージ極性への作用の検討

10 週齢雌 SD ラットで IH impactor を用いて胸髄圧挫損傷モデルを作成し、損傷直後に Exenatide 10 µg を皮下注射したエキセナチド群、脊髄損傷直後に PBS 1ml を皮下注射したコントロール群とし、両群ともに損傷後 7 日に 2 回目の Exenatide/PBS の皮下注射を行った。損傷後 1, 3, 7, 14 日に脊髄を摘出し、M (Iba1)・M1 phenotype(iNOS)・M2 phenotype(Arginase1)を用いた二重染色を行った。RT-PCR で iNOS, CD16, CD86 を M1 型マーカー、Arginase1, CD163, CD206 を M2 型マーカー、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-1 など)や抗炎症性サイトカイン(IL-4, IL-10 など)も評価した。

- (3) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬の血液脳脊髄関門への作用の検討

10 週齢雌 SD ラットで IH impactor を用いて胸髄圧挫損傷モデルを作成し、損傷直後に Exenatide 10 µg を皮下注射したエキセナチド群、脊髄損傷直後に PBS 1ml を皮下注射したコントロール群とした。損傷後 1 日、2 日に頸静脈から 2%エバンスブルー(2ml/kg)を投与し、損傷脊髄中心頭尾側 5mm に析出した色素量を分光光度法(620nm)で測定した。また損傷後 0.5、1、2 日に western blot を用いて Tight Junction(TJ)タンパクの Claudin5、Occludin、Zo1 の評価を行った。

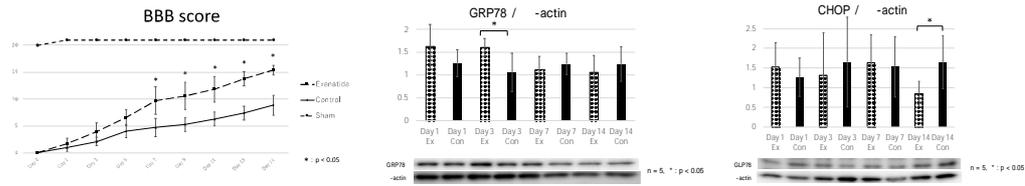
- (4) GLP-1 受容体作動薬投与方法の検討

損傷直後と損傷後 7 日のエキセナチド投与で改善効果が確認されたのを受け、連日投与の効果も検証した。

## 4. 研究成果

(1) 脊髄損傷に対する GLP-1 受動体作動薬の有効性と ER ストレスへの影響の検討

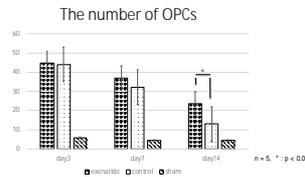
エキセナチド投与群は損傷後 7 日以降、コントロール群と比較し有意に BBB スコアの改善を認めた ( $p < 0.01$ )。低血糖は発生せず、3 群間で血糖値に有意差はなかった。Western blot では損傷後 3 日で GRP78 発現量が有意に増加し、14 日で CHOP 発現量が有意に減少し、免疫染色で同様の結果が得られた ( $p < 0.01$ )。OPC 細胞数は 14 日においてエキセナチド投与群で有意に高かった。病理学的検討では、損傷後 14 日の HE 染色で、エキセナチド群で有意に空洞面積が減少しており、組織学的に保護されていた。LFB 染色でも髄鞘が有意に保護されていた。



運動機能

GRP78 の高発現

CHOP の発現低下

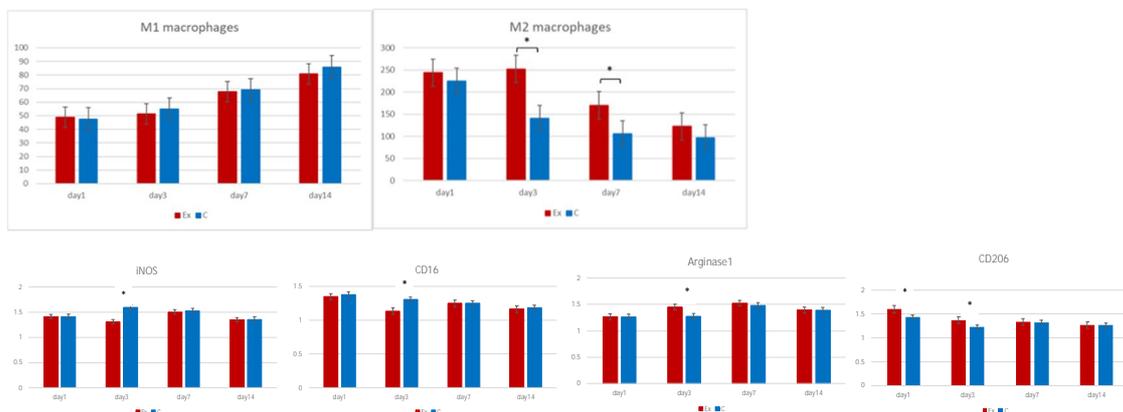


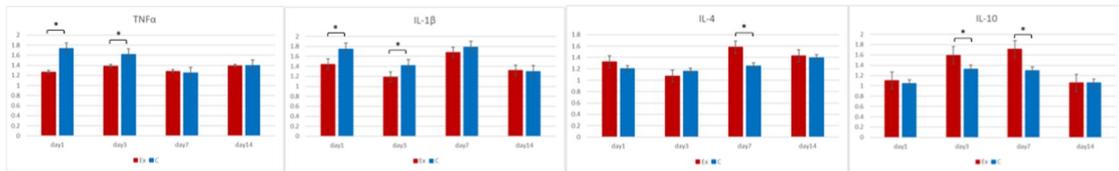
オリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシス抑制効果



(2) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬のマクローファージ極性への作用の検討

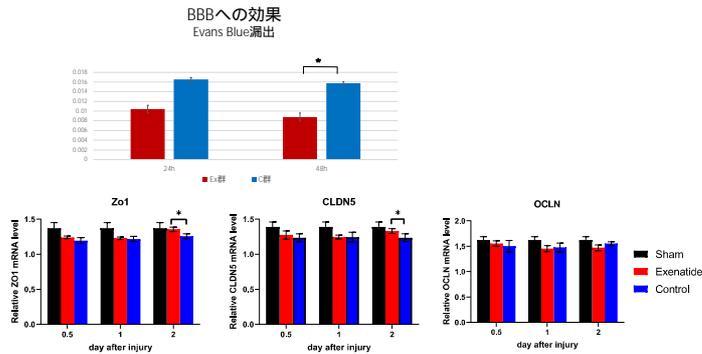
抗炎症/組織修復に関与する M2 マクローファージが有意に増加し、一方炎症/組織傷害に関連する M1 では発現が減少する傾向がみられ、M1 の指標となる iNOS と CD16 は損傷後 3 日に有意に低値を、M2 の指標となる Arginase1, CD163 は損傷後 3 日に、CD206 損傷後 1 日目から有意に高値を示した。サイトカインについては炎症性サイトカインが減少し、抗炎症性サイトカインが高発現していた。





### (3) 脊髄損傷に対する GLP-1 受容体作動薬の血液脳脊髄関門への作用の検討

損傷後 48h でエバンスブルー漏出がエキセナチド投与で有意に低下し、保護効果を実証された。また、Tight Junction に関わるタンパクを定量したところ、損傷後 48 時間でエキセナチド群において RT-PCR および Western Blot で Zo-1 および CLDN5 の発現が有意に高かった。



### (4) GLP-1 受容体作動薬投与方法の検討

エキセナチドを連日投与しても低血糖は認めず、体重の減少もなかった。2 回投与と同様に小胞体ストレス応答の増強を認め、2 回投与より顕著な抗炎症マクロファージ分極を確認したが、BBB による下肢運動機能の改善は同程度であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 野口俊洋、加藤裕幸、渡辺雅彦	4. 巻 34
2. 論文標題 脊髄損傷におけるGLP-1受容体作動薬の作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本脊髄障害医学会誌	6. 最初と最後の頁 122 - 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤裕幸、渡辺雅彦、岡田慶子、服部伸昭、野口俊洋
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
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katoh H, Okada K, Hattori N, Watanabe M
2. 発表標題 Glp-1 Receptor Agonist Exenatide Reduces Endoplasmic Reticulum Stress And Improves Function In A Rat Spinal Cord Injury Model
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2023 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田慶子、加藤裕幸、服部伸昭、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脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第37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 岡田慶子、加藤裕幸、服部伸昭、渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷ラットにおけるGLP-2受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第41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 岡田慶子、加藤裕幸、服部伸昭、渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷ラットにおけるGLP-3受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脊髄関門への作用の検討
3. 学会等名 第57回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺雅彦、加藤裕幸、野村慧、野口俊洋、岡田慶子
2. 発表標題 小胞体ストレス応答能増強による損傷脊髄2次障害の軽減 - オリゴデンドロサイト前駆細胞による再髄鞘化を目指して -
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会 シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村慧、渡辺雅彦、加藤裕幸、野口俊洋、岡田慶子
2. 発表標題 脊髄損傷におけるGLP-1受容体作動薬による小胞体ストレス応答能増強の効果
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 加藤裕幸、野村慧、野口俊洋、岡田慶子、渡辺雅彦
2. 発表標題 頸髄症除圧に伴う再灌流障害の軽減 - マウス頸髄症モデルにおける遠隔虚血プレコンディショニングの効果
3. 学会等名 第50回 日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田慶子、加藤裕幸、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

1. 発表者名 岡田慶子、加藤裕幸、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GGLP-1受容体作動薬のマクロファージ極性と血液脊髄関門保護効果と機能予後の改善について
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 2020年

1. 発表者名 野口俊洋、加藤裕幸、野村慧、渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷におけるGLP-1受容体作動薬の作用
3. 学会等名 第55回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口俊洋、加藤裕幸、野村慧、渡辺雅彦
2. 発表標題 脊髄損傷におけるGLP-1受容体作動薬の作用
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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	加藤 裕幸  (KatoH Hiroyuki)  (40348678)	東海大学・医学部・准教授   (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
---------	---------