

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592118

研究課題名(和文) 脳虚血においてGLP-1がアポトーシスを抑制し神経再生を促進する分子機構の解明

研究課題名(英文) The neuronal protective and regenerative effects of glucagon-like peptide 1 agonist against transient forebrain ischemia

研究代表者

金丸 和也 (KANEMARU, Kazuya)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：80402080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血後アポトーシスの機序解明とその抑制は新規脳梗塞治療の開発に必須である。Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)アゴニストであるexendrin-4投与により、一過性全脳虚血後の海馬CA1領域でのアポトーシス細胞数は減少する傾向を示し、exendrin-4投与により神経保護効果が得られる可能性が示唆された。さらに、exendrin-4投与群では、非投与群に比べて、海馬subventricular zoneでのKi67陽性細胞数が増加し、exendrin-4が神経新生を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the mechanisms of neuronal apoptosis and its prevention is crucial for the development of a new therapeutic strategy for stroke. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) agonist; exendrin-4 showed a tendency to decrease the amount of apoptosis cells in the CA1 region of the rat hippocampus after transient forebrain ischemia. In addition, the number of Ki67 positive cells tends to increase in the group injected exendrin-4. Thus, these results suggest that exendrin-4 has neuroprotective effect and regulates neuronal regeneration under physiological and ischemic conditions.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳虚血 神経保護 神経再生 アポトーシス GLP-1 exendrin-4

## 1. 研究開始当初の背景

脳主幹動脈閉塞による局所脳虚血巣中心部は早期にネクローシスに陥る。しかし、その周辺部位や、短時間で血流が再開された場合には、急激な細胞死は免れるものの、アポトーシスを主とした細胞障害により神経細胞は徐々に死に陥る。そのため、比較的タイムウインドウの広いアポトーシスによる神経細胞死の抑制が、脳梗塞治療戦略上の主たる目標とされている。

脳虚血後のアポトーシスの抑制的な調節因子として Bcl2 と BclXI および促進的な因子として Bax や Bad などが細胞内に不活型として存在していることが判明している。さらにこれら上流の細胞情報伝達経路として、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系の c-Jun N terminal kinase (JNK) と、細胞生存シグナルの中心的役割をなす phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt の2つの相反する経路が存在する。このようにアポトーシスの機序解明が進んでいる一方で、未だこのアポトーシスを抑制する有用な脳梗塞の臨床薬は開発されていない。

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は小腸の L 細胞により作り出されるペプチドホルモンで、膵臓の  $\beta$  細胞で GLP-1 受容体に作用し血糖値を下げる働きがあり、GLP-1 受容体アゴニストである exendrin-4 は本邦でも2型糖尿病に対し臨床使用が開始されている。GLP-1 は血糖降下作用に加えて膵臓  $\beta$  細胞のアポトーシス抑制作用および再生(増殖)作用があることが示されており、近年はその分子機構についての研究が盛んに行われている。その結果、GLP-1 は培養膵臓  $\beta$  細胞において種々のアポトーシス誘発刺激に対して細胞保護的に働くことが報告され、アポトーシス抑制には、PI3K/AKT アポトーシス抑制経路、MAPK アポトーシス抑制経路さらに PKC などの活性化により下流の caspase と Bcl2 ファミリーの活性を調節していることが示されてきた。

また GLP-1 受容体アゴニスト投与により膵臓 precursor cell の新生が促進され、 $\beta$  細胞への分化も促進されていることが示された。一方、GLP-1 受容体は神経細胞にも発現していることが判明し、さらに exendrin-4

に培養神経細胞の保護作用および増殖作用があることが示されている。Exendrin-4 は脳血液関門を通過し、パーキンソン病動物モデルにおいてドーパミン作動性神経細胞のアポトーシスを抑制し、線条体での細胞外ドーパミン濃度を回復させることが報告されており、脳虚血においてはラット一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて exendrin-4 の脳梗塞縮小効果が示されている。しかし、これらの機序については解明されておらず、脳虚血治療の標的となりうるアポトーシスによる神経細胞死および神経再生における GLP-1 の役割については、現在まで解明されていない。

## 2. 研究の目的

以上を踏まえ、(1) GLP-1 受容体アゴニストが全脳虚血後のアポトーシスに対して神経保護的に働く、(2) GLP-1 受容体アゴニストは脳虚血後神経新生において新生神経細胞増殖を促すと仮説を立てた。これらを検証すべく、脳虚血における GLP-1 受容体アゴニストのアポトーシスの抑制とその機序、さらに GLP-1 受容体アゴニストの神経再生とその機序について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 一過性全脳虚血モデルの作成

生後 9-12 週齢 (300-350g) の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて両側頸動脈遮断と低血圧を併用した Smith モデルを用いた。吸入麻酔下にて、微小血管クリップを用いて、両側総頸動脈を遮断し、心房へカニューレーションしたチューブにより速やかに脱血し、平均血圧 30mmHg を5分間維持し、一過性全脳虚血モデルを作成した。

### (2) 薬剤の投与

GLP-1 レセプターアゴニスト (Exendrin-4) は 10 $\mu$ g/kg を虚血7日前から

1日2回朝夕に腹腔内投与した。また虚血負荷後も断頭日まで1日2回朝夕の腹腔内投与を継続した。コントロール群では生理食塩水を同様に腹腔内投与した。

#### (3) 断頭と脳切片の作成

虚血後、3、5、7日目にラットを4% paraformaldehyde を用いて灌流固定し、断頭した。30 $\mu$ m 厚の脳薄切切片を、ピブラームを用いて作成した。

#### (4) 虚血性神経細胞傷害の検討

作成した薄切切片に対し、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL)染色を行い、アポトーシス細胞の断片化DNAを検出し、対比染色としてhematoxylin染色を行った。

#### (5) 新生神経細胞の同定

新生細胞は薄切脳切片に対するKi-67およびDCX, NeuN, GFAP, NG2免疫染色により標識した。

#### (6) アポトーシス関連蛋白のwestern blot解析

虚血後、3、5、7日に両側海馬を摘出し、タンパク質サンプルを抽出した。30 $\mu$ gのサンプルを10% NuPAGE Bis-Tris gelを用いて電気泳動し、polyvinylidene difluoride膜へ転写した。膜はブロッキング後に一次抗体および二次抗体と反応させ、結合抗体をchemiluminescence法で発光させた。発光バンドはFuji LAS 4000 Lumino Image Analyzer (Fuji Film社)で検出した。

#### (7) 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。二群間の検定にはStudent's t-testを使用した。P<0.05をもって統計学的有意差ありと判断

した。

## 4. 研究成果

### (1) 虚血性神経細胞傷害の検討

我々の過去の検討により、ラット一過性全脳虚血モデルではアポトーシスは虚血後5日目にピークとなるため、今回の検討では、虚血3、5、7日後に断頭を行った。また、exendrin-4投与の効果をも十分に得るため、虚血負荷の7日前から腹腔内投与を開始し、虚血後も断頭日まで投与を継続した。exendrin-4投与群では、非投与群と比較して、投与3日目から有意に体重増加量が減少し、虚血負荷時点では平均体重が投与群で343.3 $\pm$ 12.5gとなり、非投与群では360.8 $\pm$ 12.0gであった。その他の生理化学的結果には異常は認めず、過去の報告と同様であった。

TUNEL染色では、exendrin-4投与群では海馬CA1領域でのアポトーシス細胞数が減少する傾向を認め、exendrin-4投与により神経保護効果が得られる可能性が示唆された。

### (2) 新生神経細胞の同定

神経新生を評価するために、脳切片に対するKi67を用いた免疫染色を行った。Exendrin-4投与群では、非投与群に比べて、海馬subventricular zoneでのKi67陽性細胞数が虚血前から増加し、神経新生をexendrin-4が修飾する可能性が示唆された。虚血負荷後7日目の時点では、Exendrin-4投与群でKi67陽性細胞数は虚血前の254%まで増加した。一方で、NestinやDCX, NeuN, GFAP, NG2などの細胞分化マーカーでは、個体間での差が強く、二群間での有意な傾向を認めず、exendrin-4が神経細胞分化にどのような関与をしているか明らかにすることはできなかった。そのため、さらに実験個体数を増加させるか、in vitroの異なるモデルを用いた検討が今後は必要であると考えられる。

(3) アポトーシス関連蛋白の Western blotting

神経細胞傷害が減少した機序を解明するために、我々はアポトーシスの中核となる Bcl2 ファミリータンパクのリン酸化やその上流の細胞内情報伝達経路である PI3K/Akt 系および MAPK-JNK 系におけるタンパクの活性化、チトクロム C、Smac/Diablo, HrtA2/Omi の定量的評価を Western blotting を用いて行った。しかし、この検討では exendrin-4 投与と非投与群間で有意差が得られず、その抑制機序の解明には至らなかった。そのため、今回検討し得た経路以外の関与の存在も示唆され、その解明は今後の重要な課題である。

今回の我々の研究により、exendrin-4 投与により、一過性全脳虚血後の海馬 CA1 領域でのアポトーシス細胞数が減少する傾向を示し、exendrin-4 投与により神経保護効果が得られる可能性が示唆された。また、exendrin-4 投与群では、非投与群に比べて、海馬 subventricular zone での Ki67 陽性細胞数が増加し、神経新生を exendrin-4 が促進する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金丸 和也 (KANEMARU Kazuya)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：80402080

##### (2) 研究分担者

堀越 徹 (HORIKOSHI Tohru)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：50209300

##### (3) 連携研究者

なし