

東海大学大学院平成26年度博士論文

一過性脳虚血モデルラットに対する
リラグルチドの神経保護効果の検討

指導 松前光紀教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

佐藤颯一郎

総括

近年、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の神経保護効果が報告されており、基礎研究においてパーキンソン病やアルツハイマー病に代表される中枢神経系疾患に対する治療効果が示されている。本研究では、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドが一過性脳虚血モデルラットに対して治療効果を有するかどうかを検討した。

7 週齢の雄性 Wistar rat に対し、右頸動脈分岐部よりナイロン糸を挿入することで右中大脳動脈を 90 分間閉塞し、再灌流から 1 時間後にリラグルチドまたは生理食塩水の腹腔内投与を行った。再灌流 1 時間後と 24 時間後に行動学的評価として modified Bederson' s test を行い、直後に屠殺し組織学的評価を行った。組織学的には、2,3,5 トリフェニルテトラゾリウムクロライド (2,3,5-Triphenyl tetrazolium Chloride: TTC) 染色にて脳梗塞体積の評価を行った。組織学的評価とは別の群を用い、虚血ペナンプラ領域の脳組織における血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) の測定を ELISA 法にて行った。また、屠殺直前の血液を用いて活性酸素代謝物を測定することにより酸化ストレスを評価した。

行動学的評価としての modified Bederson' s score と TTC 染色を用いた脳梗塞体積の評価において、リラグルチド治療群では、対照群と比較して有意な改善が認められた。酸化ストレス評価では対照群と比較して、リラグルチド治療群で有意に活性酸素代謝物の低下を認めた。また、リラグルチド治療群では対照群と比較して虚血ペナンプラ領域大脳皮質における有意な VEGF の増加が認められたが、虚血ペナンプラ領域の線条体では認められなかった。本研究で、一過性脳虚血モデルラットに対するリラグルチドの神経保護効果を示し、抗酸化作用と

VEGF の増加が関与していることが明らかになった。

研究の背景

ある種の腸管抽出物質により、糖尿病患者の尿糖が減少することは、古くから知られていた。糖を経口で摂取すると、糖を静脈内投与された時に比べ、インスリンの作用が強く発揮されることは、従来門脈血糖の変動と相関すると考えられていた。ところが食後小腸に存在している細胞の一部が刺激されて、消化管ホルモンが分泌され、このホルモンの一部が膵臓の β 細胞を刺激してインスリンの分泌を促進することが発見され、これらのホルモンを総称してインクレチンと呼ぶようになった。このインクレチンの発見は、1929年に La Barre らが腸管粘膜抽出物中の血糖透過性物質の分離に成功し、「Intestine seCRETion Insulin」から INCRETIN（インクレチン）と名付けたことに始まる。[1] 血糖低下作用を有するインクレチンの1つとして、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)があげられる。GLP-1はブドウ糖を含む栄養素が腸管を刺激することにより血中に分泌されるが、分解酵素Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV)によって速やかに分解されて腎臓から排泄される。糖尿病治療薬として GLP-1 活性を発揮するために、経口薬である DPP-IV阻害薬と、GLP-1 に構造が類似した注射薬である GLP-1 受容体作動薬が開発された。GLP-1 受容体作動薬はグルコース依存的インスリン分泌刺激作用、グルカゴン抑制作用、食欲抑制作用、胃内容排泄遅延作用の他、基礎研究では膵 β 細胞の新生やアポトーシス抑制作用が注目されている。[2] その他に、GLP-1 の作用として心筋細胞のアポトーシス抑制による心筋保護・心機能改善作用、肺血管拡張・肺サーファクタント分泌促進作用、骨代謝促進作用、ナトリウム排泄増加・尿量増加作用・免疫細胞に作用して慢性炎症を抑制する作用・脂質代謝異常の改善・血圧コントロールなども明らかになって

いる。これらインクレチンが有する糖代謝改善以外の作用は、現在インクレチンの膵外作用として、糖尿病の合併症を抑制する可能性を求め研究が推進されている。今回は、このインクレチンが有する膵外作用に注目し、特に虚血性脳血管障害のリスクファクターの一つである糖代謝異常の改善と脳虚血の進展抑制を同時に満たす薬効の評価を検証する事を目的として、まずは脳虚血モデル動物を用いた研究を行った。

インクレチンには、GIP と GLP-1 の 2 種類があり、GIP は小腸上部から、GLP-1 は小腸下部から多く分泌される。両者ともにインスリン分泌促進作用があり優れた糖代謝異常改善効果を有するが、GLP-1 の方がグルカゴン分泌抑制作用、体重抑制作用に優れるため、GLP-1 受容体作動薬（リラグルチド、エキセナチド、リキシセナチド、アルビグルチド、デュラグルチド）として創薬が盛んである。（Appendix figure）また GLP-1 受容体作動薬はいずれも皮下注射薬として開発されている。インクレチンを分解してしまう酵素が DPP-4 であり、この DPP-4 の作用を阻害する薬物が DPP-4 阻害薬で、薬剤としては経口薬（シタグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチン、リナグリプチン、テネリグリプチン、アナグリプチン、サキサグリプチン、トレラグリプチン）として盛んに創薬されている。今回は、脳虚血急性期から亜急性期の病態改善を目的としたため、インクレチンのうち注射薬として開発された GLP-1 受容体作動薬を実験に用いた。GLP-1 受容体作動薬は、GLP-1 のアミノ酸配列に変更を施すなどして改良を加え、GLP-1 が DPP-4 によって分解されにくく、その作用は DPP-4 阻害薬に比べ強力であり、臨床では 1 日 1 回または 2 回の投与で用いられている。GLP-1 受容体作動薬は現在 2 種類が入手可能である。そのうちリラグルチドは、ヒト

GLP-1 の 34 位のリジンをアルギニンに置換して、26 位のリジンを脂肪酸の一つであるパルミチン酸でアシル化し、アルブミンとの結合力を強くして作用時間を延長し、1 日 1 回投与により GLP-1 と同様の薬理作用を示す物質である。[2] リラグルチドは別の GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチド（1 日 2 回投与 *2013 年 5 月にエキセナチドは 1 週間 1 回投与製剤が本邦でも発売されている）に対して血糖コントロールにおける認容性で優位性が示されている。[3] 一方、エキセナチドの神経保護効果は様々な基礎研究により既に報告されており、今回新規性とその薬理学的特徴からリラグルチドをターゲットとして選択した。[4]

日本における糖尿病患者数は 900 万人に及び、脳卒中は死亡原因の第四位となっている。糖尿病は脳梗塞のリスク因子としても重要であり、糖尿病患者は 2-4 倍の脳梗塞発症リスクがあると報告されている。[5] また非糖尿病患者においても、脳梗塞後のストレス高血糖が予後を悪化させることが報告されている。[6] 脳梗塞のストレスに端を発し、視床下部-下垂体-副腎皮質系が活性化され副腎皮質ホルモンが増加し、交感神経が活性化され、インスリン抵抗性・グリコーゲン分解・糖新生などが亢進することにより、結果として血糖値が上昇する。[7] 高血糖状態では、凝固系が亢進し線溶系が抑制されることで閉塞血管再開通率も低下し、血管内皮機能が障害され、酸化ストレスや炎症反応が増大して再灌流障害を増悪させる。これらを含めた複数のメカニズムにより、高血糖が脳梗塞の予後を悪化させる。[8] 一方、ストレス高血糖の抑制を目標として、ICU 入院中の急性期患者に対して厳格な血糖管理（81-108 mg/dl）を行ったところ、低血糖発作による予後の悪化が明らかになっている。以上をまとめると、脳梗塞発症後の急性

期治療において、ストレス高血糖も低血糖発作も予後を悪化させるものであり、低血糖リスクを抑えた適切な血糖管理により、予後の改善が期待される。GLP-1 受容体作動薬は、比較的低血糖リスクが低く、脳梗塞に対する神経保護効果を検討することは有意義であると考えた。本研究で我々は、一過性脳虚血モデルラットを用いて、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドの神経保護効果を検討した。また過去に報告されている GLP-1 受容体作動薬の血管内皮障害改善作用や抗酸化ストレス作用に着目して、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の測定及び、酸化ストレスの評価を行うこととした。

研究方法

使用動物

本研究では、雄性の成体 Wistar rat (7 週齢、200～250 g、日本クレア、合計 49 匹) を用いた。本研究において、動物の飼育・取り扱いは岡山大学の「動物愛護及び管理に関する規約」に則って行われた。ラット 3 匹はクモ膜下出血のため、またラット 2 匹はモデル作成失敗のため本研究から除外した。ラットは、自由に動くことができ、好きな時に水分や食餌を摂取することが可能なケージ内で単独飼育され、12 時間の明暗周期で、温度や湿度などを一定に調節した。

研究デザイン

ラットは無作為に 2 群に分け、対照群 22 匹、治療群 22 匹とした。全てのラットに対して、90 分間右中大脳動脈を閉塞し、再灌流 1 時間後、行動学的評価を行った後、対照群に生理食塩水 1ml、治療群にリラ

グルチド 700 μ g/kg 1ml を腹腔内投与した。糖尿病モデルラットに対するリラグルチド投与の報告[9]からリラグルチドの投与量と投与時期を決定した。再灌流 24 時間後に再度、行動学試験を行い、屠殺して速やかに脳組織を採取し、組織学的評価と VEGF 測定を行った (Figure 1)。

一過性中大脳動脈閉塞モデル

一過性中大脳動脈閉塞 (transient Middle cerebral artery occlusion : tMCAO) は、これまで我々も含めた多くの研究室で施行されている、内頸動脈内縫合糸挿入法にて施行した。[10, 11] 以下、同法を概説する。1%フローセン、69%笑気、30%酸素を用いた全身麻酔下に、仰臥位で右頸部皮膚を切開し、右総頸動脈に到達した。右内頸動脈分岐部を小切開し、同部から右中大脳動脈分岐部遠位まで、シリコン (Xantopren L blue & ACTIVATOR Universal Liquid; Heraeus Kulzer GmbH & Co KG, Hanau, Germany) でコーティングされた 4-0 ナイロン糸を挿入し、右中大脳動脈の血流遮断を行った。血流遮断中は吸入麻酔を中断し、麻酔覚醒後、ラットはケージ内で自由に動ける状態とした。90 分間の血流遮断後、再度全身麻酔下に、ナイロン糸を抜去し右中大脳動脈の血流を再開させた。

脳皮質血流評価

MCAO 時のナイロン糸挿入前後と、再灌流時のナイロン糸抜去前後で、血流遮断する右中大脳動脈の灌流領域である右側頭葉皮質血流を、レーザードップラー血流計 ALF21 (アドバンス社製) にて測定した。右側頭骨を穿頭し、ステンレス製のプローブを脳表に当て測定を行った。

行動学的評価

脳虚血による神経学的異常所見について、行動学的に評価するため、再灌流 1 時間後リラグルチド投与前、および再灌流 24 時間後に modified Bederson' s test を施行した（各群 N=7）。概説すると、障害の無いものを 0 点、テーブル上で尾を持ち、20-30 cm の高さに持ち上げて左前肢が屈曲し右前肢が伸展したら 1 点、加えてテーブル上で側方から押されたときに抵抗の減少が見られれば 2 点、加えてその場で回転するものを 3 点として、最大 3 点を最重症とした。[12, 13]

血糖値測定

術前（各群 N=4）及び再灌流後 3 時間（各群 N=3）、8 時間後（各群 N=7）に尾静脈採血により血糖値を測定した。測定にはワンタッチウルトラビュー（ジョンソンエンドジョンソン社製）を使用した。

脳梗塞体積測定

2, 3, 5 トリフェニルテトラゾリウムクロライド（2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium Chloride: TTC）染色を施行するため、再灌流 24 時間後に、ペントバルビタール（100 mg/kg）の腹腔内投与による深麻酔下、ラットを屠殺し、PBS で灌流してから速やかに脳組織を摘出した（各群 N=7）[10]。脳組織から 2mm 毎の厚さで冠状断切片を作成した。各切片は PBS で溶解した 0.2% TTC 溶液に 37℃で 30 分間反応させた後、4%パラホルムアルデヒド溶液で反応を停止させた。TTC 染色ではミトコンドリア活性が保たれた正常な領域は暗赤色に染まり、梗塞部分は元の白色調に保たれて、梗塞領域の評価が可能となる。各切片をカラスキ

ャナーで読み込み、解析ソフト ImageJ を用いて梗塞領域の体積を計算した。

活性酸素代謝産物測定

再灌流 24 時間後に尾先端の切断により採血を行い、活性酸素代謝産物の測定を行った（各群 N=7）。測定にはフリーラジカル解析装置 FREE carpe diem (Wismarll Company Ltd.) の d-ROMs (derivatives of reactive oxygen metabolites) テストを使用した。d-ROMs テストは体内の活性酸素、フリーラジカル量を反映する血中ヒドロペルオキシド量を測定するもので、測定値は U. CARR という単位で算出され、1 U. CARR は H_2O_2 の 0.08 mg/dL の酸化ストレスに相当する。[14]

VEGF 測定

VEGF 測定のため、再灌流 24 時間後に対照群と治療群両群で、ペントバルビタール (100 mg/kg) 腹腔内投与による深麻酔下に断頭後、速やかに両側の大脳皮質、線条体から新鮮な脳組織を採取した（各群 N=8）。脳組織の採取は本研究における tMCAO の損傷程度にばらつきがなかったことから、右側では対照群における虚血ペナンプラ領域を中心として、大脳皮質、線条体ともに部位を決定し、左側では左右対称になるようにした。脳組織の採取は厚さ 2mm の冠状断切片 (bregma レベル) に対し、直径 2mm の生検用パンチ (Kai corporation) を用いて行った。

(Figure 2) 脳組織は採取後速やかに超音波破碎機器 T-PER によって破碎した後、4°C、10,000 G で 10 分間の遠心分離を施行して上清を採取した。上清から、組織 VEGF 量をラット VEGF ELISA 測定キット (IBL) を使用して測定した。

統計学的分析

データは平均±標準誤差で提示した。VEGF 濃度以外は Mann-Whitney の U 検定を使用して統計学的に評価された。VEGF 濃度の評価には repeated-measures ANOVA と one-way ANOVA ならびに post hoc Scheffe' s test を用いた。統計学的有意差は $p < 0.05$ に設定した。

結果

リラグルチド治療群における行動学的改善

リラグルチド治療群では再灌流 24 時間後に行動学的改善が認められた (Figure 3)。再灌流 1 時間後の modified Bederson' s score ではリラグルチド治療群 (1.9 ± 0.14) と対照群 (1.9 ± 0.14) 間で有意差を認めなかった。再灌流 24 時間後では、リラグルチド治療群では (1.1 ± 0.14) であり、対照群 (1.7 ± 0.18) と比較して有意に低値であり、($P < 0.05$) リラグルチド治療群において行動学的な改善を認めた。

皮質局所脳血流の変化

MCAO 時に、右中大脳動脈の血流遮断を行うと、右側頭葉皮質脳血流は術前と比較してリラグルチド治療群 ($50 \pm 8.6 \%$)、対照群 ($53 \pm 7.1 \%$) とともに有意な低下を認めた (Figure 4)。再灌流時の皮質脳血流はリラグルチド治療群 ($79 \pm 11 \%$)、対照群 ($70 \pm 11 \%$) の両群とも有意に血流再開前より上昇した。($P < 0.05$) 一方、リラグルチド治療

群と対照群を比較したところ、MCAO 前、血流遮断時および再灌流時のいずれのタイミングにおいても有意差を認めなかった。

リラグルチド投与の効果と血糖値

術前、再灌流 3 時間後、8 時間後の血糖値は、リラグルチド治療群でそれぞれ、 151 ± 14 mg/dL、 110 ± 12 mg/dL、 98 ± 5 mg/dL であった。対照群の血糖値は 136 ± 11 mg/dL、 108 ± 6 mg/dL、 109 ± 7 mg/dL であった。リラグルチド投与 8 時間後の血糖値については、リラグルチド治療群と対照群を比較したところ、ややリラグルチド治療群で血糖値が低下する傾向を示したものの、有意差は得られなかった。

($P=0.26$, Figure 5)

リラグルチド治療群における梗塞体積の減少

リラグルチド治療群では対照群に比べて、TTC 染色で脳梗塞体積の減少が認められた (Figure 6)。脳梗塞体積はリラグルチド治療群 (259.4 ± 21.1 mm³) で、対照群 (314.4 ± 13.6 mm³) と比較して、有意な減少が認められた。

リラグルチド治療群における活性酸素代謝物の減少

再灌流 24 時間後の末梢血を用いた d-ROMs テストで、リラグルチド治療群 (494 ± 12 U.CARR.) は、対照群 (526 ± 6 U.CARR.) と比較して有意な低値を認めた ($P < 0.05$, Figure 7)。

リラグルチド投与によるペナンプラ領域大脳皮質における VEGF の増加

大脳皮質における VEGF 濃度はリラグルチド治療群では障害側、健側においてそれぞれ (18 ± 2.1 pg/mL、 12 ± 0.49 pg/mL) であった。対照群ではそれぞれ (10 ± 1.7 pg/mL、 9.8 ± 0.54 pg/mL) であり、リラグルチド治療群は、対照群と比較して有意な増加を認めた ($P < 0.05$, Figure 8)。一方、線条体における VEGF 濃度はリラグルチド治療群では障害側、健側においてそれぞれ (11 ± 0.88 pg/mL、 13 ± 0.48 pg/mL) であった。対照群ではそれぞれ (10 ± 1.1 pg/mL、 14 ± 1.1 pg/mL) であり、2 群間で有意差は得られなかった。

考察

本研究では GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドを単回投与することにより、一過性脳虚血モデルラットにおける行動学的改善ならびに脳梗塞体積の減少が認められており、リラグルチドの神経保護効果が明らかになった。酸化ストレスの抑制と VEGF の増加がリラグルチドの神経保護効果に影響を与えていると推察される。

GLP-1 受容体作動薬と中枢神経系疾患

GLP-1 受容体作動薬の治療効果は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などを含めた中枢神経系疾患モデルにおいて報告されている。[15-19] これらの報告では主として、別の GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチドが用いられ、ある *in vitro* の研究では酸素、ブドウ糖が不足した環境下で、少なくとも PKA (protein kinase A) 経路を介した反応により神経が保護されていることを明らかにした。[20] PKA 経路は、糖や脂質の代謝に深く関与するが、神経保護にも関与していることが知られている。

リラグルチドは GLP-1 受容体作動薬としてアルツハイマー病に関連したいくつかの研究で用いられている。リラグルチドはアルツハイマー病モデルマウスにおいて、海馬でのシナプス喪失を減少させることにより、記憶障害を軽減した。[21] 同グループは、アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究で、リラグルチドの投与が長期増強 (long-term potentiation: LTP) を促進し、LTP の低下を抑制することを明らかにしている。[22] LTP とは、神経細胞を同時刺激することにより、2 つの神経細胞間の信号伝達が持続的に増強される現象を意味し、記憶の形成において、極めて重要な役割を果たしている。また現在、アルツハイマー病患者に対してリラグルチドを投与することにより、 β -アミロイド沈着を減少させるか、中枢神経系でのブドウ糖取り込みを増加させるか、また、認知機能・脳血流にどのような影響を与えるか、等の点を検討するために、無作為臨床試験が実施されている。[23] 一方、最近の研究では、脳内出血モデル動物に対してリラグルチドを投与することにより、抗炎症作用と脳浮腫の抑制作用を介して、治療効果が示された。[24] 我々が渉猟し得た範囲では、本研究が脳虚血モデルラットに対するリラグルチドの神経保護効果を検討

した最初の報告である。リラグルチドによる神経保護効果のメカニズムは完全には判明していない。しかし、抗酸化ストレス作用、抗アポトーシス作用、神経栄養作用等がリラグルチドの治療効果に関与していると考えられている。

GLP-1 及び GLP-1 受容体作動薬の抗酸化作用

我々の研究ではd-ROMsテストにおいて、リラグルチド治療群で対照群と比較して、活性酸素代謝物の有意な減少を認めた。中枢神経系におけるリラグルチドの抗酸化作用を直接示した研究はこれまでに報告されていない。中枢神経系を離れるならば、膵島細胞におけるGLP-1とエキセナチドの抗酸化作用の報告を挙げることができる。[25, 26] GLP-1を投与することで、少なくともPKAシグナル経路を経て、グルコースにより誘導される、膵島細胞における誘導型NO合成酵素の発現を抑制した。[26] 別の研究で、マウスにおける膵島細胞移植後にエキセナチドは、抗酸化作用、抗アポトーシス作用を介した治療効果を発揮している。[25] また、エキセナチドは活性酸素を放出する内皮型NO合成酵素のup-regulation を正常化することにより、内皮細胞における抗酸化作用が示されている。これらの研究は、エキセナチドによる治療効果において、抗酸化作用が重要な役割を果たしていることを示している。[21] ドパミン神経細胞に対する神経毒である1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) によるパーキンソン病モデルマウスにおいて、エキセナチドは神経保護効果を示している。MPTPの神経毒としての作用には、酸化ストレスが深く関与しており、エキセナチドの治療効果が抗酸化作用に関連付けられることが示唆される。[19]

抗酸化作用以外のGLP-1・GLP-1受容体作動薬の神経保護効果の機序

虚血脳組織では、虚血ペナンプラ領域において、新生神経前駆細胞の遊走を伴った神経新生が増強される。神経新生の増強は中枢神経系の再生医療を考える上で、有望な治療戦略になりうる。[27] 前述したように、リラグルチドはアルツハイマー病の研究にも用いられている。これまでの研究において、エキセナチドと同様にリラグルチドの投与により、神経新生増強効果が示されており、高脂肪食マウスやアルツハイマー病モデルマウスの海馬歯状核などにおいて、神経前駆細胞の増殖が認められている。[21, 28] その他の研究でも、リラグルチド投与により、アルツハイマー病モデルマウス海馬におけるDCx (doublecortin) 陽性の神経前駆細胞とNeuN陽性の神経細胞の増加が示されている。[29] 新規に開発されたGLP-1受容体作動薬のリキシセナチドは、げっ歯類アルツハイマー病モデルでリラグルチドと同様に血液脳関門を通過して、最終的に脳内で神経新生効果を示すが、リラグルチドよりも強力な神経新生効果を示した。[30]

近年の報告でGLP-1は、内皮前駆細胞におけるVEGFの自己分泌・傍分泌による増加を介して、内皮前駆細胞の増殖と分化を促進することが明らかにされている。[31] 今回の研究では、リラグルチドによって増加したVEGFならびに、評価されていないが他の栄養因子や成長因子等が治療効果を発揮した可能性も考えられる。対照群と比較して、リラグルチド治療群において、障害側および健側の大脳皮質でVEGFが増加していたが、線条体では有意な増加は認められなかった。VEGFはいくつもの中枢神経系疾患において神経保護、血管新生、神経新生、抗炎症作用等により、治療効果を示すことが明らかになっている。[32,

33] 中枢神経系疾患に対しては、様々な細胞から分泌される神経栄養・成長因子が、神経保護・再生効果の重要な鍵であることが知られている。リラグルチドの潜在的な治療効果をさらに明らかにするためにも、他の神経栄養因子の発現に関する、更なる研究が不可欠である。

[34]

今後の展望

今回、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドについて、ラット一過性脳虚血モデルに対して、抗酸化ストレス作用、大脳皮質における VEGF の増加を確認した。[35] GLP-1 受容体作動薬の神経保護効果に関しては、他の研究において、神経栄養因子の増加も認められており、リラグルチドを用いて、今後他の神経栄養・成長因子の発現を評価する必要がある。

今回の実験におけるリラグルチドの1回投与量は、ラットとヒトの体重比を考慮すると、市販のリラグルチド製剤ビクトーザの通常投与量を大きく上回っている。神経保護効果を得るための、ラットに対する投与時期・投与量が定まったとしても、non-human primate であるマーモセット等を用いた前臨床研究が必須であると考ええる。

GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドを、脳卒中急性期に臨床応用することを考える場合、現在の脳卒中に対する標準治療に対してリラグルチドを追加することで、低血糖の発生リスクを抑えつつ、急性期の血糖コントロールが可能になる。ただ、本研究で明らかにされた抗酸化ストレス作用や VEGF の増加による神経保護効果が、実際臨床で脳卒中患者にどの程度治療効果を有するかは、臨床試験によって初めて明らかになるものである。

さらに脳梗塞の大きなリスクファクターである糖代謝異常群には、今後 DPP-4 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬が積極的に用いられると予想される。これらの患者群で、脳梗塞の発生が抑制されるか、または脳梗塞発症後の虚血範囲が抑制されるか、あるいは神経脱落症状が軽微な程度に抑えられるか、長期的な臨床研究の推進が待たれるところである。

結論

本研究では一過性脳虚血モデルラットに対するリラグルチドの治療効果が明らかになった。抗酸化作用や大脳皮質における VEGF の増加などが関与していると考えられる。血糖のコントロールも含めて、脳卒中急性期患者に対する有用な治療戦略の一つになりえるが、さらなるメカニズム解明を目的とする基礎研究、前臨床研究が必要である。

謝辞

本研究の実施にあたり、研究機関である岡山大学大学院脳神経外科学教室の伊達 勲教授には公私にわたり、多大なご支援をいただき、深謝いたします。研究室である移植・ステレオグループにて研究指導から学会発表、論文作成まで御指導・御鞭撻を賜りました安原隆雄先生、亀田雅博先生にも深く感謝申し上げます。また、研究活動を支援していただきました同グループの諸先生、医局員の皆さま、岡山大学同門の諸先生方、医局秘書の皆様に厚く御礼申し上げます。

またこの度、研究のため、岡山大学への長期にわたる出向をお許しいただきました東海大学大学院医学研究科の指導スタッフの先生方にも深謝いたします。事務手続き・連絡などでお世話になりました伊勢原教学課、教育計画部のスタッフの皆様にも感謝を申し上げます。また、東海大学での実験でご支援をいただきました神経内科 滝澤俊也教授、教育研究支援センター動物部門のスタッフの皆様にも感謝申し上げます。

そして岡山大学での研究、派遣に向けてご尽力をいただき、また岡山大学に出向後も、研究及び学位論文作成まで厚く御指導を賜りました東海大学医学部脳神経外科 松前光紀教授には、最大限の感謝を申し上げます。また、以前に岡山大学で研究をされていた先輩である馬場胤典先生には、今回の派遣に先駆けて東海大学で実験手技をご指導いただき、その後岡山に出向後も引き続きご指導くださりました。あらためて深く感謝を申し上げます。そして東海大学医学部脳神経外科の医局員の先生方、医局秘書の方々にも深く感謝を申し上げます。また、公私にわたり、東海大学入学以前から今回の出向に至るまで、大変な

ご支援を賜りました岡山大学大学院医歯薬総合研究科長 谷本光音先生にも深く感謝申し上げます。

図の説明

Figure 1

研究デザイン

全てのラットに対して、90 分間右中大脳動脈を閉塞し、再灌流 1 時間後、行動学的評価を行った後、対照群に生理食塩水 1ml、治療群にリラグチド 700 μ g/kg 1ml を腹腔内投与した。再灌流 24 時間後に再度、行動学的評価を行い、屠殺して速やかに脳組織を採取し、組織学的評価と VEGF 測定を行った。

Figure 2

VEGF 測定に向けての脳実質のパンチアウト

両側の皮質、線条体から新鮮な脳組織を採取した（各群 N=8）。脳組織の採取は本研究における tMCAO の損傷程度にばらつきがなかったことから、右側では対照群における虚血ペナンプラ領域を中心として、大脳皮質、線条体ともに部位を決定し、左側では左右対称になるようにした。脳組織の採取は厚さ 2mm の冠状断切片（bregma レベル）に対し、直径 2mm の生検用パンチを用いて行った。

Figure 3

行動学的評価の改善

再灌流 1 時間後の modified Bederson' s score ではリラグルチド治療群 (1.9 ± 0.14) と対照群 (1.9 ± 0.14) 間で有意差を認めなかった。再灌流 24 時間後では、リラグルチド治療群では (1.1 ± 0.14) であり、対照群 (1.7 ± 0.18) と比較して有意に低値であり、(* $P < 0.05$) リラグルチド治療群において行動学的な改善を認めている。

Figure 4

血流遮断時及び再灌流時の脳血流変化

右中大脳動脈の血流遮断を行うと、右側頭葉皮質脳血流は MCAO 前 (Pre) と比較してリラグルチド治療群 ($50 \pm 8.6 \%$)、対照群 ($53 \pm 7.1 \%$) とともに有意な低下を認めた (MCAO, * $P < 0.05$)。再灌流時の皮質脳血流はリラグルチド治療群 ($79 \pm 11 \%$)、対照群 ($70 \pm 11 \%$) の両群とも有意に血流再開前より上昇した。(Reperfusion, * $P < 0.05$) 一方、リラグルチド投与群と対照群を比較したところ、MCAO 前、血流遮断時および再灌流時のいずれのタイミングにおいても有意差を認めなかった。

Figure 5

リラグルチド単回投与の血糖に与える影響

術前、再灌流 3 時間後、8 時間後の血糖値は、リラグルチド治療群でそれぞれ、 $151 \pm 14 \text{ mg/dL}$ 、 $110 \pm 12 \text{ mg/dL}$ 、 $98 \pm 5 \text{ mg/dL}$ であっ

た。対照群の血糖値は 136 ± 11 mg/dL、 108 ± 6 mg/dL、 109 ± 7 mg/dL で あった。再灌流 8 時間後の血糖については、リラグルチド治療群と対照群を比較したところ、ややリラグルチド治療群で血糖が低下する傾向を示したものの、有意差は得られなかった。 ($P=0.26$)

Figure 6

リラグルチド治療群ラットにおける脳梗塞体積の減少

対照群の TTC 染色写真(A)とリラグルチド治療群の TTC 染色写真(B)ではリラグルチド治療群の脳梗塞部分が明らかに減少している。グラフは脳梗塞体積の有意な差異を示している (C) ($*p<0.05$)。

Figure 7

リラグルチド治療群における活性酸素代謝物の減少

再灌流 24 時間後の末梢血を用いた d-ROMs テストでは、リラグルチド治療群 (494 ± 12 U. CARR.)は対照群 (526 ± 6 U. CARR.)と比較して有意な低値を認めた。 ($*P<0.05$)

Figure 8

リラグルチド治療群における大脳皮質における VEGF の増加

上段：グラフはリラグルチド治療群での大脳皮質における VEGF の有意な増加を示す。（* $P < 0.05$ ）

下段：グラフはリラグルチド治療群と対照群における線条体での VEGF 濃度に有意差が無かったことを示す。

表記の Infarct は梗塞（障害）側、Intact は健側を示す。

Appendix figure

GLP-1 作用を示すシエーマ

Figure 1

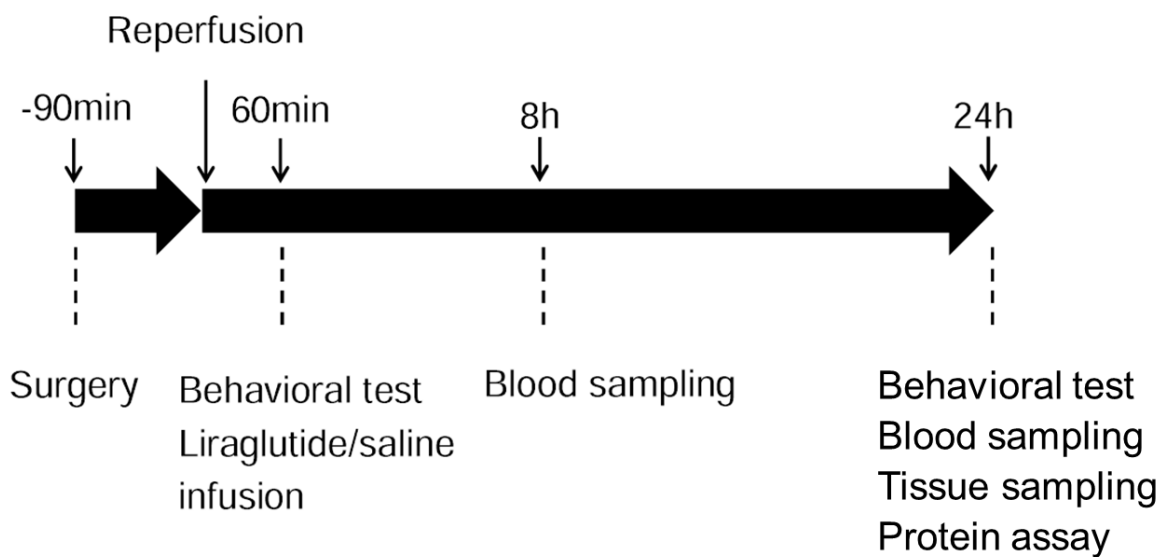
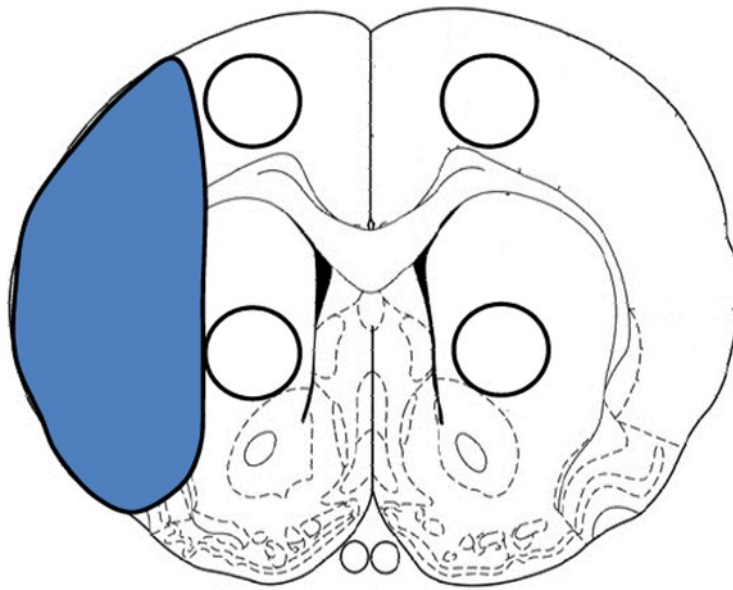


Figure 2

Punch out for VEGF ELISA



Infarct

Non infarct

Figure 3

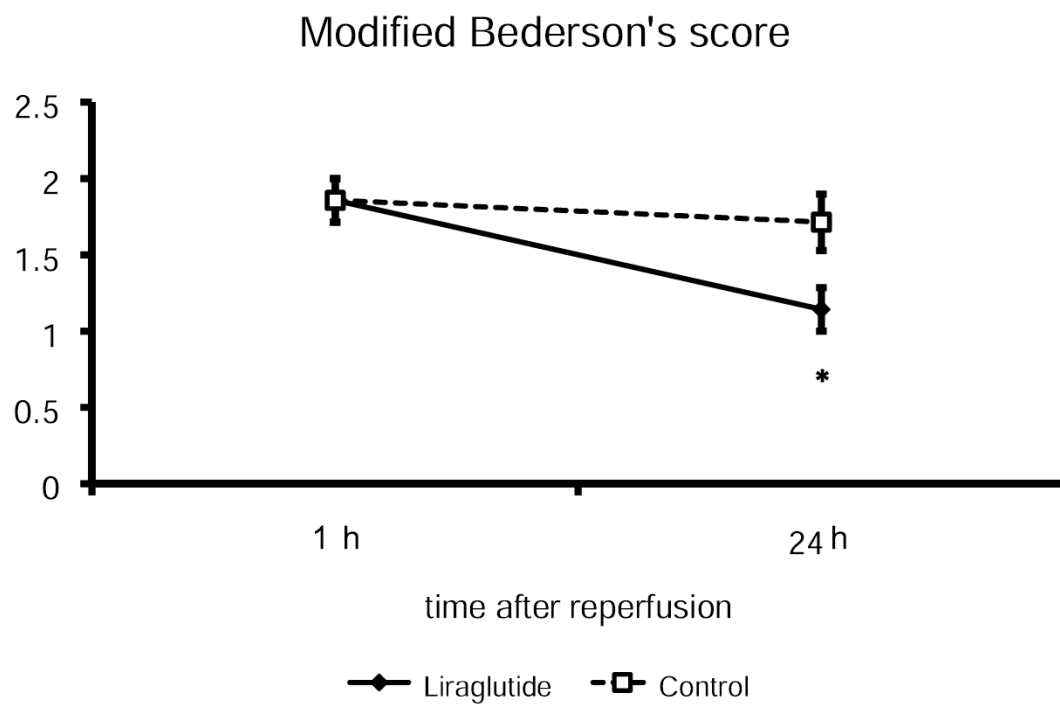


Figure 4

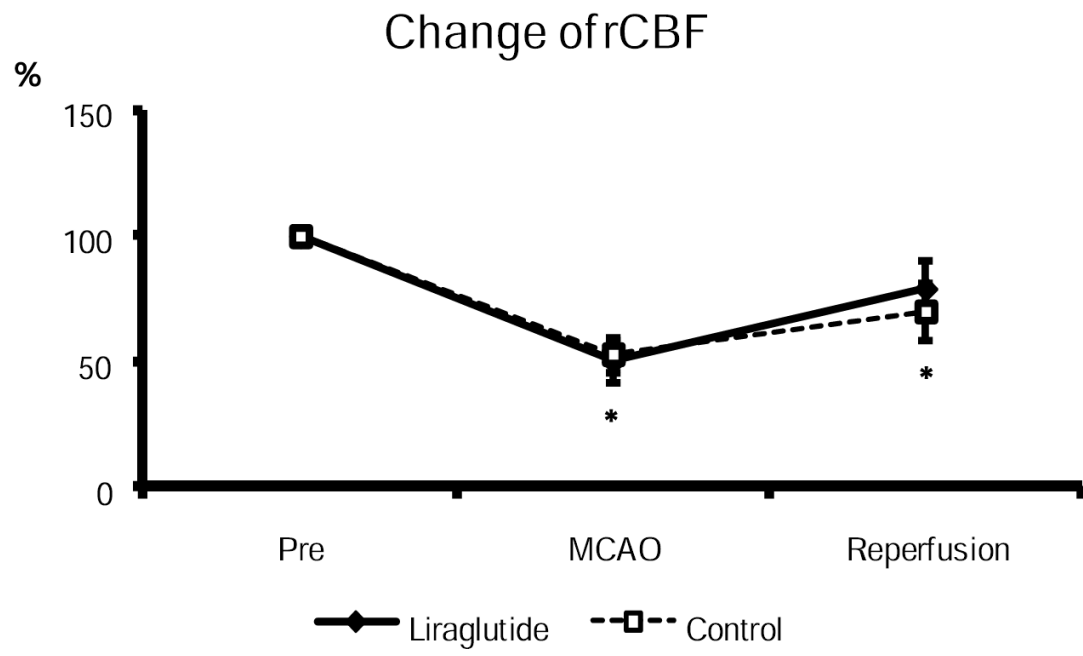


Figure 5

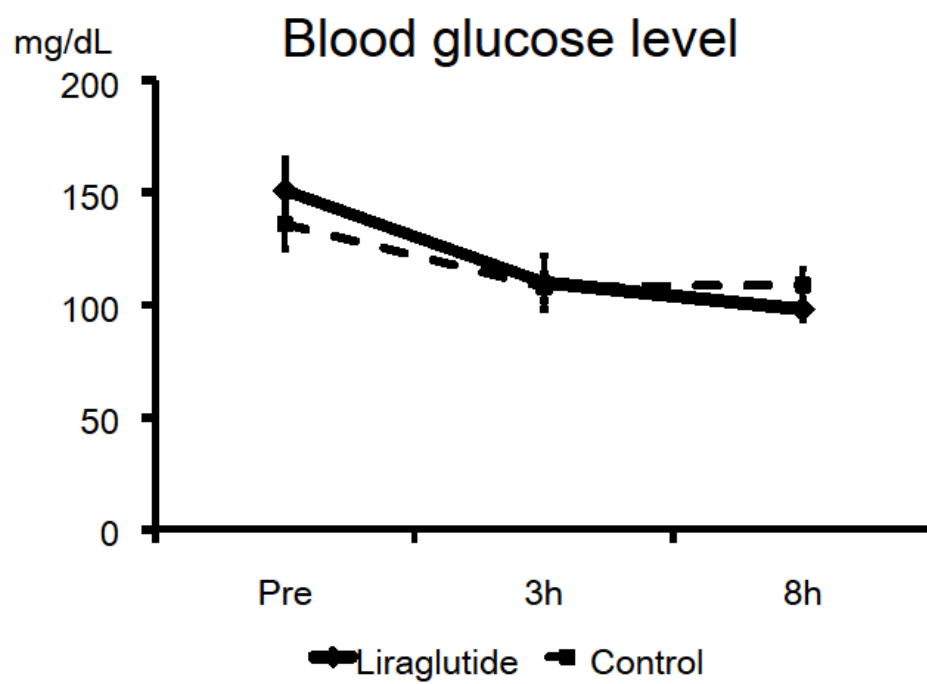


Figure 6

Infarct volumes

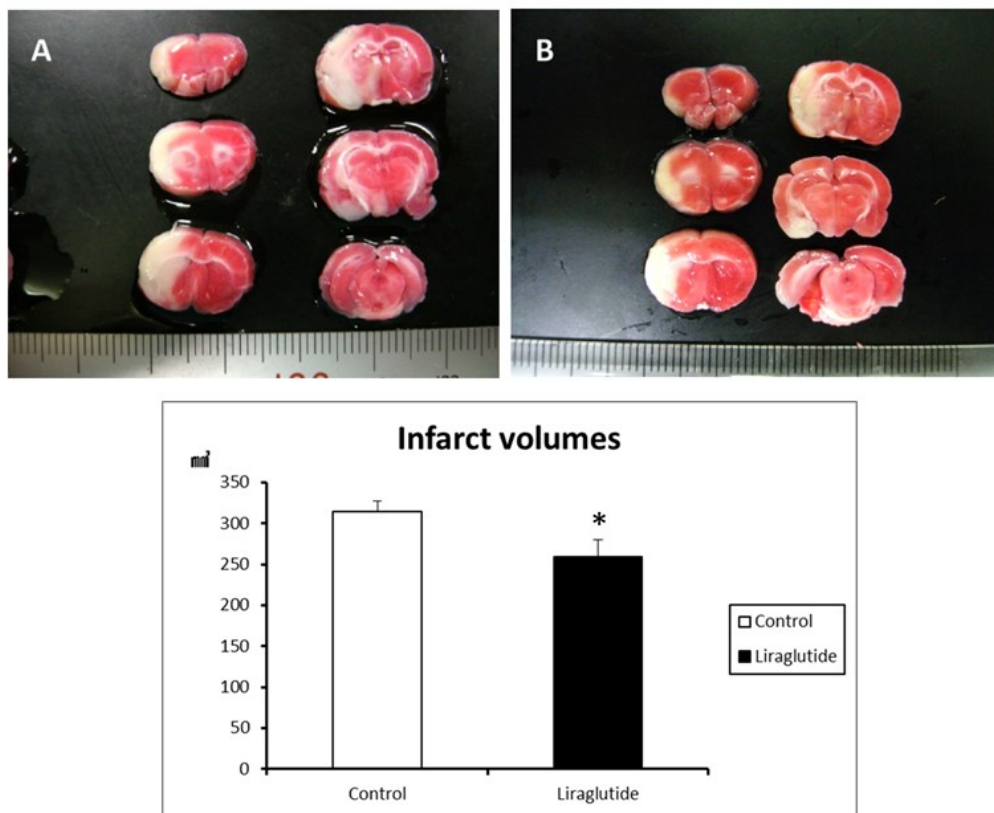


Figure 7

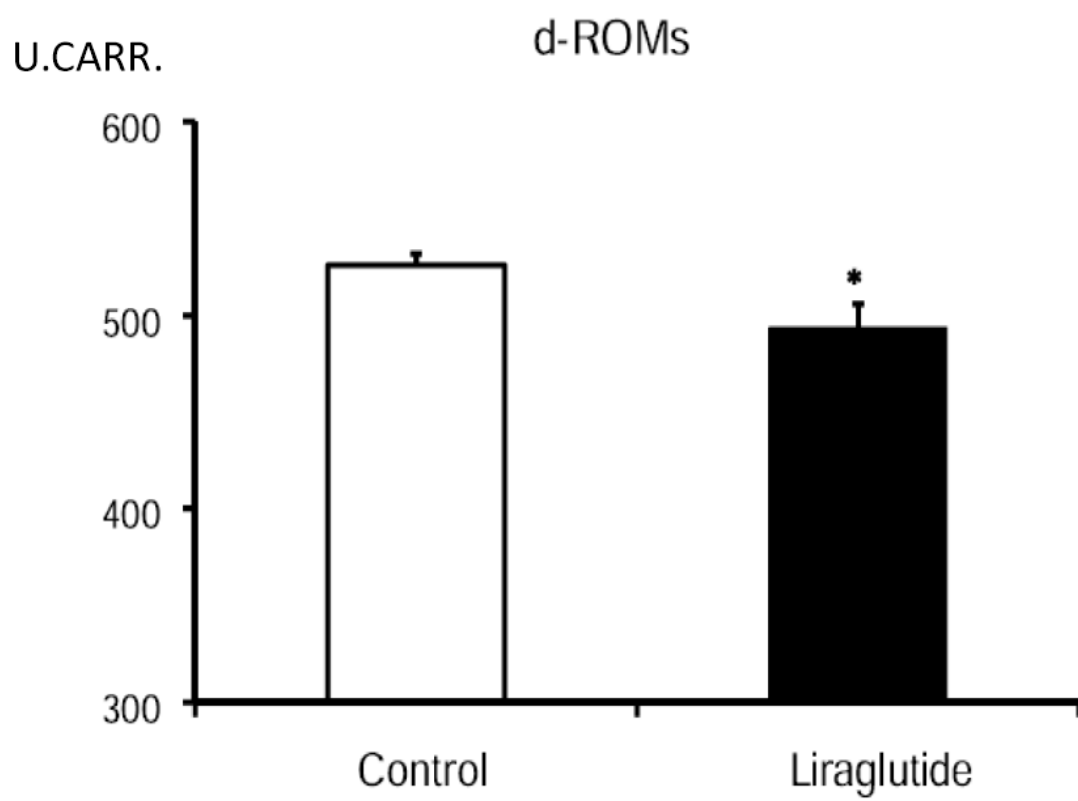
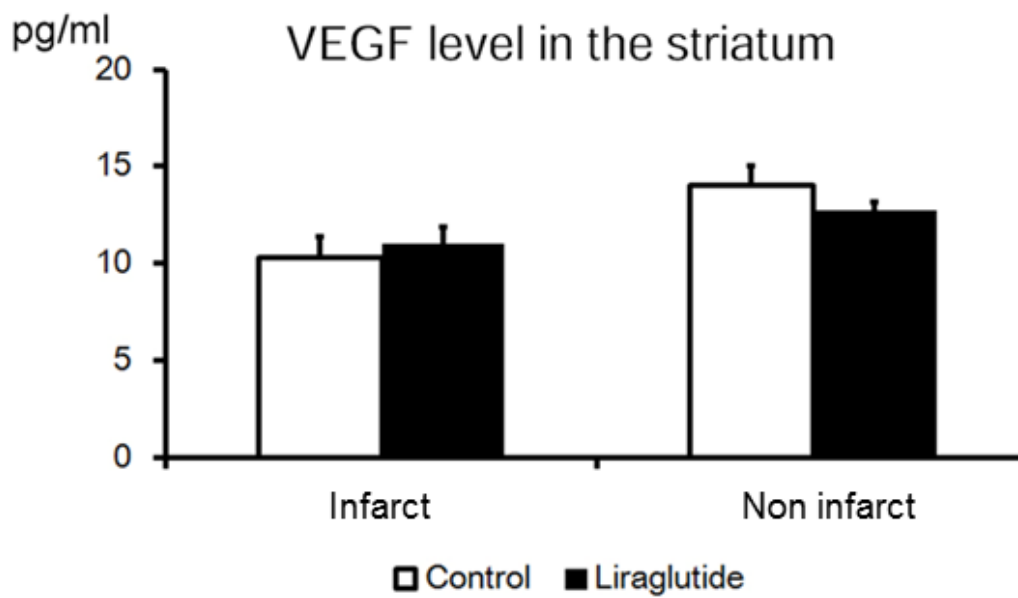
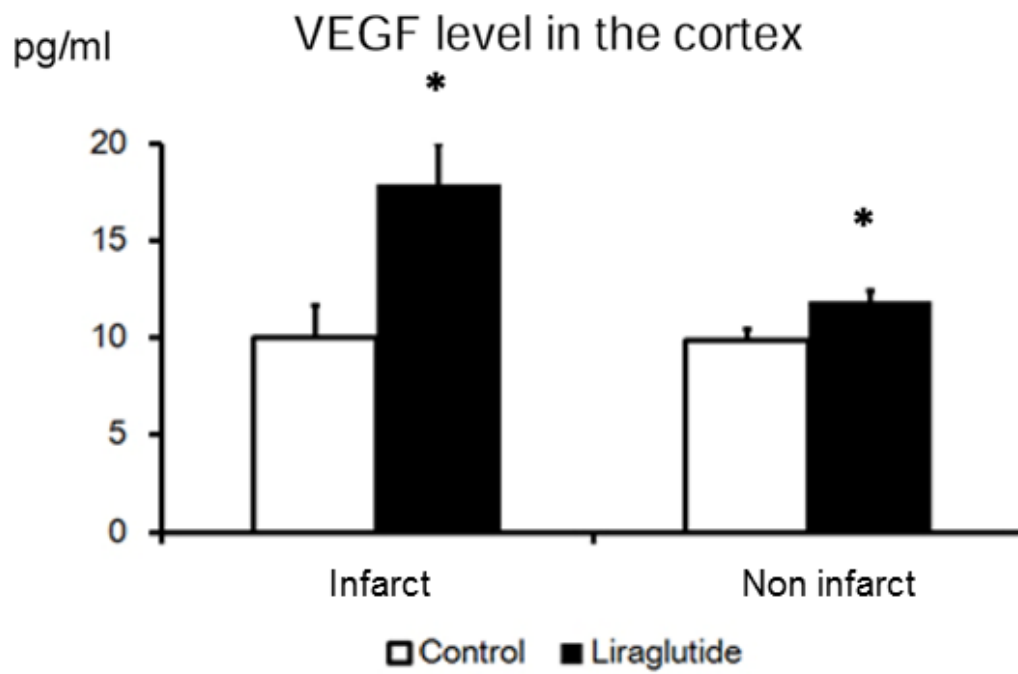
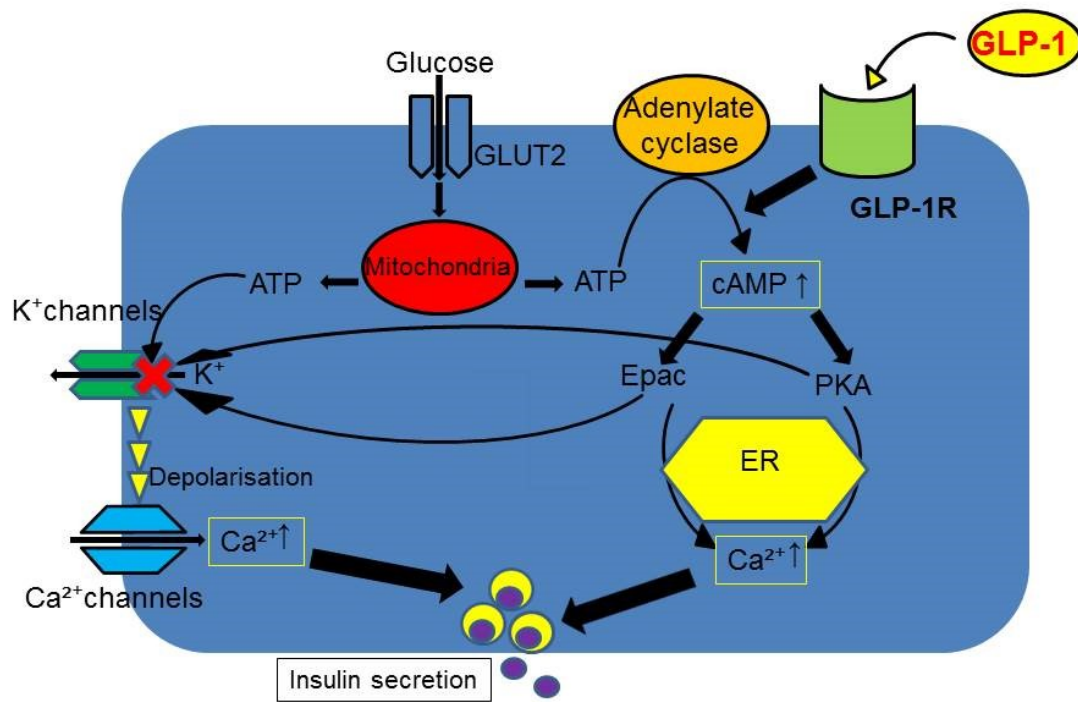


Figure 8



Appendix figure



参考文献

1. La Barre. Sur les possibilities d' un traitement du diabete par l' incretine. Bull Acad R Med Belg. **1932**, 12, 620-634.
2. Nauck, M.A.; Meier, J.J. Glucagon-like peptide 1 and its derivatives in the treatment of diabetes. Regul. Pept. **2005**, 128, 135-148.
3. Buse, J.B.; Rosenstock, J.; Sesti, G.; Schmidt, W.E.; Montanya, E.; Brett, J.H.; Zychma, M.; Blonde, L.; LEAD-6 Study Group. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: A 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). Lancet **2009**, 374, 39-47.
4. Holscher, C. Potential role of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in neuroprotection. CNS Drugs **2012**, 26, 871-882.
5. Cui R, Iso H, Yamagishi K, Saito I, Kokubo Y, Inoue M, Tsugane S. Diabetes mellitus and risk of stroke and its subtypes among Japanese: the Japan public health center study. Stroke. **2011** 42, 2611-4.
6. Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC. Stress hyperglycaemia. Lancet. **2009**, 373(9677):1798-807.
7. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. Lancet Neurol. **2012**, 11:261-71.
8. NICE-SUGAR Study Investigators, Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, Bellomo R, Cook D, Dodek P, Henderson

WR, Hébert PC, Heritier S, Heyland DK, McArthur C, McDonald E, Mitchell I, Myburgh JA, Norton R, Potter J, Robinson BG, Ronco JJ. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med.* **2009**, 360(13):1283-97.

9. Guo, N.; Sun, J.; Chen, H.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Cai, D. Liraglutide prevents diabetes progression in prediabetic OLETF rats. *Endocr. J.* **2013**, 60, 15-28.

10. Baba, T.; Kameda, M.; Yasuhara, T.; Morimoto, T.; Kondo, A.; Shingo, T.; Tajiri, N.; Wang, F.; Miyoshi, Y.; Borlongan, C.V.; et al. Electrical stimulation of the cerebral cortex exerts antiapoptotic, angiogenic, and anti-inflammatory effects in ischemic stroke rats through phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Stroke* **2009**, 40, e598-e605.

11. Kameda, M.; Shingo, T.; Takahashi, K.; Muraoka, K.; Kurozumi, K.; Yasuhara, T.; Maruo, T.; Tsuboi, T.; Uozumi, T.; Matsui T.; et al. Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 26, 1462-1478.

12. Bederson, J.B.; Pitts, L.H.; Tsuji, M.; Nishimura, M.C.; Davis, R.L.; Bartkowski, H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* **1986**, 17, 472-476.

13. Liu, H.S.; Shen, H.; Harvey, B.K.; Castillo, P.; Lu, H.; Yang, Y.; Wang, Y. Post-treatment with amphetamine enhances

reinnervation of the ipsilateral side cortex in stroke rats.

NeuroImage **2011**, 56, 280-289.

14. Morishita, Y. ; Hanawa, S. ; Chinda, J. ; Iimura, O. ; Tsunematsu, S. ; Kusano, E. Effects of

aliskiren on blood pressure and the predictive biomarkers for cardiovascular disease in hemodialysis-dependent chronic kidney disease patients with hypertension. Hypertens. Res. **2011**, 34, 308-313.

15. Darsalia, V. ; Mansouri, S. ; Ortsater, H. ; Olverling, A. ; Nozadze, N. ; Kappe, C. ; Iverfeldt, K. ; Tracy, L.M. ; Grankvist, N. ; Sjöholm, A. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reduces ischaemic brain damage following stroke in Type 2 diabetic rats. Clin. Sci. **2012**, 122, 473-483.

16. Li, Y. ; Chigurupati, S. ; Holloway, H.W. ; Mughal, M. ; Tweedie, D. ; Bruestle, D.A. ; Mattson, M.P. ; Wang, Y. ; Harvey, B.K. ; Ray, B. ; et al. Exendin-4 ameliorates motor neuron degeneration in cellular and animal models of amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One **2012**, 7, e32008.

17. Lee, C.H. ; Yan, B. ; Yoo, K.Y. ; Choi, J.H. ; Kwon, S.H. ; Her, S. ; Sohn, Y. ; Hwang, I.K. ; Cho, J.H. ; Kim, Y.M. ; et al. Ischemia-induced changes in glucagon-like peptide-1 receptor and neuroprotective effect of its agonist, exendin-4, in experimental transient cerebral ischemia. J. Neurosci. Res. **2011**, 89, 1103-1113.

18. Teramoto, S. ; Miyamoto, N. ; Yatomi, K. ; Tanaka, Y. ; Oishi, H. ; Arai, H. ; Hattori, N. ; Urabe, T. Exendin-4, a glucagon-like

peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2011**, 31, 1696-1705.

19. Li, Y.; Perry, T.; Kindy, M.S.; Harvey, B.K.; Tweedie, D.; Holloway, H.W.; Powers, K.; Shen, H.; Egan, J.M.; Sambamurti, K.; et al. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 1285-1290.

20. Wang, M.D.; Huang, Y.; Zhang, G.P.; Mao, L.; Xia, Y.P.; Mei, Y.W.; Hu, B. Exendin-4 improved rat cortical neuron survival under oxygen/glucose deprivation through PKA pathway. *Neuroscience* **2012**, 226, 388-396.

21. McClean, P.L.; Parthasarathy, V.; Faivre, E.; Holscher, C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2011**, 31, 6587-6594.

22. McClean, P.L.; Gault, V.A.; Harriott, P.; Holscher, C. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: A link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, 630, 158-162.

23. Egefjord, L.; Gejl, M.; Moller, A.; Braendgaard, H.; Gottrup, H.; Antropova, O.; Moller, N.; Poulsen, H.E.; Gjedde, A.; Brock, B.; et al. Effects of liraglutide on neurodegeneration, blood flow and cognition in Alzheimer's disease—Protocol for a controlled, randomized double-blinded trial. *Dan. Med. J.* **2012**, 59, A4519.

24. Hou, J. ; Manaenko, A. ; Hakon, J. ; Hansen-Schwartz, J. ; Tang, J. ; Zhang, J.H. Liraglutide, a long-acting GLP-1 mimetic, and its metabolite attenuate inflammation after intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, 32, 2201-2210.
25. Padmasekar, M. ; Lingwal, N. ; Samikannu, B. ; Chen, C. ; Sauer, H. ; Linn, T. Exendin-4 protects hypoxic islets from oxidative stress and improves islet transplantation outcome. *Endocrinology* **2013**, 154, 1424-1433.
26. Jimenez-Feltstrom, J. ; Lundquist, I. ; Salehi, A. Glucose stimulates the expression and activities of nitric oxide synthases in incubated rat islets: An effect counteracted by GLP-1 through the cyclic AMP/PKA pathway. *Cell Tissue Res.* **2005**, 319, 221-230.
27. Morimoto, T. ; Yasuhara, T. ; Kameda, M. ; Baba, T. ; Kuramoto, S. ; Kondo, A. ; Takahashi, K. ; Tajiri, N. ; Wang, F. ; Meng, J. ; et al. Striatal stimulation nurtures endogenous neurogenesis and angiogenesis in chronic-phase ischemic stroke rats. *Cell Transplant.* **2010**, 20, 1049-1064.
28. Hamilton, A. ; Patterson, S. ; Porter, D. ; Gault, V.A. ; Holscher, C. Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. *J. Neurosci. Res.* **2011**, 89, 481-489.
29. Parthsarathy, V. ; Holscher, C. Chronic treatment with the GLP1 analogue liraglutide increases cell proliferation and differentiation into neurons in an AD mouse model. *PLoS One* **2013**,

8, e58784.

30. Hunter, K.; Holscher, C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci.* **2012**, *13*, doi:10.1186/1471-2202-13-33.

31. Xie, X.J.; Mo, Z.H.; M.; Chen, K.; He, H.H.; Xie, Y.H. Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation. *Med. Sci. Monit.* **2011**, *17*, BR35-BR41.

32. Yasuhara, T.; Date, I. Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: Toward clinical application. *Cell Transplant.* **2007**, *16*, 125-132.

33. Yasuhara, T.; Shingo, T.; Date, I. The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. *Rev. Neurosci.* **2004**, *15*, 293-307.

34. Borlongan, C.V.; Kaneko, Y.; Maki, M.; Yu, S.J.; Ali, M.; Allickson, J.G.; Sanberg, C.D.; Kuzmin-Nichols, N.; Sanberg, P.R. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev.* **2010**, *19*, 439-452.

35. Sato K, Kameda M, Yasuhara T, Agari T, Baba T, Wang F, Shinko A, Wakamori T, Toyoshima A, Takeuchi H, Sasaki T, Sasada S, Kondo A, Borlongan CV, Matsumae M, Date I. Neuroprotective effects of liraglutide for stroke model of rats. *Int J Mol Sci.* **2013** *14*(11):21513-24.