

主論文の要旨

**The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor
Tofogliflozin prevents the progression of nonalcoholic
steatohepatitis-associated liver tumors in a novel
murine model**

（新しい非アルコール性脂肪肝炎関連肝がんモデルの確立と
薬効評価系としての応用）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

（指導：石上 雅敏 准教授）

吉岡 直輝

【緒言】

肥満や糖尿病患者では、肝がんの発症や死亡のリスクは約2倍に上昇するとされている。非アルコール性脂肪肝炎(NASH)はメタボリックシンドロームの肝臓における合併症とされ、糖尿病や肥満患者の多くがNASHを合併する。NASHは、予後良好の単純性脂肪肝と異なり、炎症や線維化を伴って慢性に進行することで最終的に肝硬変や肝がんに至る。近年、糖尿病や肥満の増加に伴って、NASHを原因とする肝がんの増加が問題になっている。しかしながら、ヒトの病態を反映する疾患モデルに乏しいため、糖尿病や肥満が肝がんの発症や進展を促進するメカニズムは未解明の点が多く残されている。これまでに報告されている疾患モデルの問題点として、肝腫瘍の発症に長期間(～1年間)を要すること、必ずしもNASHを背景としていないことなどが挙げられ、研究の障壁となっていた。我々は既に、遺伝性肥満を呈するメラノコルチン4型受容体欠損(*Mc4r* KO)マウスに高脂肪食を負荷することで、肥満やインスリン抵抗性を背景に、脂肪肝、NASH、多発性肝腫瘍を経時的に発症することを報告してきた。このNASH関連肝がんモデルは、ヒト病態を良く反映するが、やはり肝腫瘍の発症に長期間(約1年)を要する点が課題であった。そこで本研究では、より短期間に肝腫瘍を発症し、薬効評価に有用な動物モデルの作出を試みた。

【方法・結果】

肥満は化学発がん剤誘発性肝がんの発症を促進することが報告されているため、2週齢の *Mc4r* KO マウスに様々な用量(0, 1, 25 mg/kg body weight)の肝化学発がん剤 Diethylnitrosamine (DEN)を腹腔内投与し、6週齢より高脂肪食を10週間負荷した。高用量のDENを投与した *Mc4r* KO マウスは、肥満やインスリン抵抗性に加えて、全例で多発性肝腫瘍を発症した。DEN投与後の高脂肪食負荷の期間を14週間に延ばすと、予想通り、発症する腫瘍の数とサイズが増加した。高用量のDENを投与しても、高脂肪食を負荷した野生型マウスや通常食で飼育した *Mc4r* KO マウスでは肝腫瘍は発症せず(Fig. 1a)、DENにより誘発される肝腫瘍は、*Mc4r* 欠損と高脂肪食の組み合わせにより促進されることが明らかになった。肝腫瘍を病理組織学的に評価すると、細胞密度が増加し周囲組織を圧排・浸潤する像がみられ、多くの腫瘍はヒトの *dysplastic nodule* に相当した(Fig. 1b)。一部の肝腫瘍は細胞異型、構造異型および間質浸潤を認め、ヒトの高分化型肝細胞がんに対応した(Fig. 1c)。腫瘍部におけるKi-67発現細胞は非腫瘍部に比べて高く、増殖能をもつ腫瘍であること確認した。また肝腫瘍は、造影CTの門脈相・平衡相で等～低吸収域、EOB-MRIの肝細胞相で低信号域として検出され、ヒトの *dysplastic nodule* や肝細胞がんと同様の所見を呈した(Fig. 1a)。肝臓の非腫瘍部では、NASHに特徴的とされる中心静脈優位の肝細胞 *ballooning* や *pericellular fibrosis* の所見を認めた。実際、NASHの評価に用いられるNAFLD activity scoreはいずれのマウスも5点を超過しており、NASHの病理組織像に一致していた。またDENは、*Mc4r* KO マウスに高脂肪食を負荷することで発症する肥満やインスリン抵抗性、NASH様肝病変の所見に影響を与えなかった。こうして、10～14週間という短期間で、

肥満やインスリン抵抗性に加えて NASH を背景とした肝腫瘍を確実に発症する、新しい NASH 関連肝がんモデルが確立された。

さらに本疾患モデルの肝がん発症や進展に対する薬効評価モデルとしての有用性を検証するために、抗糖尿病薬の SGLT2 阻害薬 Tofogliflozin の効果を検証した。DEN を投与した *Mc4r* KO マウスに、12 週間の高脂肪食負荷中に Tofogliflozin (5 mg/kg body weight/日) を同時に投与した。Tofogliflozin 投与により、体重増加や血糖上昇、NASH 発症が抑制されるとともに、肝腫瘍の形成、特にサイズの大きい肝腫瘍の形成が抑制された。Tofogliflozin が肝腫瘍の形成を抑制したメカニズムを明らかにするために腫瘍部の遺伝子発現を調べたが、Tofogliflozin 投与による明らかな変化はなかった。また腫瘍部において SGLT1 と SGLT2 の発現は認めなかった。非腫瘍部については、炎症・線維化関連の遺伝子発現は Tofogliflozin により低下し、糖脂質代謝関連の遺伝子発現については、Tofogliflozin により β 酸化は増加、脂肪合成は低下していた。さらに細胞老化に関連する p21 や senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子の遺伝子発現が Tofogliflozin により大きく低下していることを見出した。近年、細胞老化が NASH や肝がんの発症に関連することが数多く報告されているため、細胞老化の制御因子である p21 に注目し、免疫組織化学染色を行った。本疾患モデルにおいて p21 の発現は主に肝細胞でみられ、Tofogliflozin は肝細胞の細胞老化を抑制することが明らかになった。

【考察】

糖尿病や肥満が肝がんの発症や進展を促進する機序を明らかにするために、これまでに多くの動物モデルが報告されてきた。しかし、ヒトの病態を再現することは困難であり、多くのモデルでは非生理的な飼料を負荷したり、肝臓そのものに遺伝子操作を加えたりすることが必要であった。この点、MC4R は主に中枢神経系に限局して発現する。また、DEN を投与しても、高脂肪食を負荷した野生型マウスや通常食で飼育した *Mc4r* KO マウスは単純性脂肪肝を示すのみで、NASH や肝腫瘍を発症しないことは、NASH 患者は脂肪肝患者に比較して HCC 発症リスクが 10 倍も高いという疫学データと一致している。このように、本疾患モデルは全身の糖脂質代謝が NASH や肝がんの発症や進展に及ぼす影響を検討することができるユニークなモデルと考えられた。

近年、NASH や肝がんの発症に細胞老化の関連が指摘されている。実際、脂肪肝患者で肝細胞の細胞老化は HCC 発症と相関を示すことが報告されている。本疾患モデルで Tofogliflozin が肝腫瘍の形成を抑制したメカニズムの 1 つとして、Tofogliflozin 投与により、糖尿病や肥満により誘導される肝細胞の細胞老化や SASP 因子の発現上昇が抑制されたことが考えられた。

【結論】

本研究において、短期間で再現性よく NASH 関連肝がんを発症する新たな動物モデルを確立した。本疾患モデルを用いて Tofogliflozin が肝腫瘍の進展を抑制することを

示し、本疾患モデルの薬効評価モデルとしての有用性を確認した。