

主論文の要旨

**Dipeptidyl peptidase-4 inhibition prevents
nonalcoholic steatohepatitis-associated liver fibrosis
and tumor development in mice
independently of its anti-diabetic effects**

Dipeptidyl peptidase-4 阻害薬は抗糖尿病効果とは独立して
非アルコール性脂肪肝炎に伴う肝線維化や肝腫瘍形成を抑制する

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 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

川久保 充裕

【背景】

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: nonalcoholic steatohepatitis) はメタボリックシンドロームにおける肝臓の表現型であり、肝硬変や肝細胞癌のリスクを増加させることが知られている。これまでに、いくつかの抗糖尿病薬に NASH に対する治療効果が報告されているが、その効果が糖尿病治療効果と独立した作用かどうか明らかではない。

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬は、インクレチンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) などの血中濃度を上げてインスリン分泌を促進する一方、心血管系や脂肪肝に対する効果が知られているが、その詳細は明らかではない。また、DPP-4 の発現は全身で広範に認められるものの、脂肪肝の肝臓で高発現することが臨床的に報告されている。従って、DPP-4 阻害剤の NASH に対する効果が、代謝改善に関連するかどうかを明らかにする必要がある。

NASH に対する予防および治療法の開発が遅れている理由として、適切な動物モデルが存在しなかったことが挙げられる。我々は、主に中枢神経系に発現するメラノコルチン 4 型受容体を欠損するマウス (MC4R-KO) に高脂肪高蔗糖食 (western diet: WD) を与えると、肥満やインスリン抵抗性を背景とし、脂肪肝、NASH、肝細胞癌を経時的に発症することを見出し、ヒト NASH と酷似する新しいマウス NASH モデルとして報告した。また、本モデルにおいて、脂肪滴を蓄え細胞死に陥った肝細胞を CD11c 陽性マクロファージが取り囲む像を発見し、hepatic crown-like structures (hCLS) と命名した。hCLS の数は肝線維化の程度と相関すること、さらに、ヒト NASH 症例やメチオニン・コリン欠乏食誘導性マウス NASH モデルでも認められることから、hCLS は NASH に特徴的な指標となる可能性がある。

本研究では、WD 投与 MC4R-KO マウスを用い、DPP-4 阻害薬の 1 種であるアナグリプチンが NASH および肝細胞癌形成に及ぼす影響を検討した。

【方法】

通常食 (standard diet: SD) 投与野生型マウス (WT-SD) 群、WD 投与 MC4R-KO マウス (KO-Veh) 群、0.3%アナグリプチン混餌 WD 投与 MC4R-KO マウス (KO-Ana) の 3 群を設け、各飼料を投与した。経時的に組織を採取し、遺伝子発現解析、組織学的解析等を行った。培養マクロファージ (RAW264) 細胞を用いて、アナグリプチンの NASH 抑制効果に関する分子機構を検討した。

【結果】

○アナグリプチンは NASH 病変を改善する

飼料投与期間 10 週、20 週で肝臓を評価したところ、WT-SD 群に比較して KO-Veh 群では脂肪肝と肝線維化が認められた。KO-Ana 群では KO-Veh 群と比較して、体重、脂肪組織重量、血糖値、血中中性脂肪値、血中コレステロール値に差は認められなかったが、肝重量が軽減した。20 週投与における組織学的評価 (NAFLD activity score: NAS) では、KO-Veh 群に比較して KO-Ana 群では、炎症スコア、風船様変性スコアが

改善し、NAS が有意に低下した (Table 1、Figure 1)。

○アナグリプチンは、肝臓の炎症と線維化を抑制する

遺伝子発現、hCLS 数により肝臓の炎症を検討したところ、WT-SD 群と比較して KO-Veh 群では炎症の増悪が認められたが、KO-Ana 群では KO-Veh 群に比較して炎症が減弱した (Figure 2)。

遺伝子発現、組織学的評価、ヒドロキシプロリン量により肝臓の線維化を検討したところ、WT-SD 群と比較して KO-Veh 群では線維化の増悪が認められたが、KO-Ana 群では KO-Veh 群に比較して線維化が減弱した (Figure 3)。

これまでに、風船用変性スコアがヒト NASH 症例における hCLS 数と相関を示すこと、本マウス NASH モデルにおいて肝細胞死が hCLS の形成、肝線維化の起点となることが報告されている。そこで、アナグリプチンの肝細胞死への影響を検討したが、KO-Veh 群と KO-Ana 群で細胞死に差は認められなかった (Figure 4)。

○アナグリプチンは脂肪組織の炎症と線維化を改善しない

これまでに、肥満による脂肪組織の炎症や線維化が、肝臓における異所性脂肪蓄積を誘発すること、DPP-4 阻害薬が肥満マウスにおける脂肪組織炎症を抑制することが報告されている。そこで、アナグリプチンの脂肪組織に対する影響を検討したところ、WT-SD 群と比較して KO-Veh 群で炎症関連遺伝子が発現上昇したが、KO-Veh 群と KO-Ana 群で差は認められなかった (Figure 5)。

○GLP-1 はマクロファージにおける炎症と線維化関連遺伝子の発現亢進を抑制する

KO-Ana 群では、脂肪肝が改善されないにも関わらず hCLS 形成が抑制されたこと、血清 GLP-1 活性が上昇したことから、GLP-1 がマクロファージの炎症、線維化作用に影響を及ぼすと想定した。既存の肝マクロファージマイクロアレイデータを用いて、WT/SD (SD 投与 WT マウス) 群、KO/WD (WD 投与 MC4R-KO マウス) 群の遺伝子発現を比較したところ、WT/SD 群と比較して KO/WD 群では、炎症および線維化関連遺伝子が有意に発現上昇した。また、GLP-1 受容体の発現は、WT/SD 群と比較して KO/WD 群で高値を示した。RAW264 細胞を lipopolysaccharide (LPS) で刺激すると、GLP-1 受容体の遺伝子発現が上昇し、NASH 肝におけるマクロファージと同傾向を示したため、RAW264 細胞を用いてアナグリプチンの NASH 抑制効果の作用機序を検討した。その結果、GLP-1 アナログである Exendin-4 は、LPS やパルミチン酸による炎症および線維化関連遺伝子の発現上昇を抑制したが、死細胞添加による炎症および線維化関連遺伝子の発現上昇には効果が認められなかった (Figure 6)。

○アナグリプチンは MC4R-KO マウスにおいて肝細胞癌の形成を抑制する

最後に、アナグリプチンの発癌に対する効果を検討したところ、KO-Veh 群と KO-Ana 群において、前癌病変と考えられる foci の数に差はなかったが、腫瘍の数が KO-

Ana 群で有意に減少し、サイズの縮小傾向が認められた。また、KO-Veh 群では、癌関連遺伝子として知られる AFP や G6PD、CD133 が非腫瘍部に比較して腫瘍部で高発現していたが、アナグリプチン投与により発現亢進が抑制された (Figure 7)。

【考察】

これまで、DPP-4 阻害薬が全身の糖代謝の改善と共に NASH を軽減するという報告はあったが、NASH に対する効果が直接的か間接的か区別は困難であった。本研究では、おそらく本マウス NASH モデルの著しいインスリン抵抗性により、アナグリプチンは糖代謝改善効果を示さなかった。従ってアナグリプチンは、糖脂質代謝と独立して、炎症や線維化、腫瘍の進展に対して抑制効果を有することが初めて明らかになった。また、アナグリプチン投与により hCLS 数が減少したため、作用点として肝細胞死とマクロファージ活性化に着目したところ、GLP-1 によるマクロファージの炎症抑制効果が認められ、アナグリプチン投与による血中 GLP-1 濃度の上昇が NASH 進展抑制に貢献する可能性が考えられた。

【結語】

アナグリプチンは、体重や糖脂質代謝とは独立して、NASH における肝線維化や肝腫瘍形成を抑制することが明らかになった。この作用メカニズムとして、GLP-1 を介する肝マクロファージの炎症抑制効果が考えられた。