

分担研究報告書

本邦における NASH 肝硬変の頻度と  
肝発癌における PPAR- $\alpha$  の役割に関する研究

研究分担者 西原 利治 高知大学 教授

研究要旨：近年の肥満人口の増加に伴って非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 罹患者数の増加が危惧される。本研究では検診受診者の 2~3%が NASH 肝硬変の予備群と評価されることを明らかにし、集団検診での肝硬変予備群発見に向けた行政的介入の必要性を提起した。次に、遺伝性 NASH のモデル動物を用いてヒトと同様にまず肝線維化が伸展し、肝発癌が生じることを明らかにした。また、肝の線維化は中心静脈から約 200  $\mu$ m 近傍に最初に生じ、肝小葉の中心と辺縁の双方向に線維の伸展が生じることを示した。PPAR- $\alpha$  の欠損 MC4R 欠損マウスを創出し、NASH 肝癌の誘発には脂肪肝による慢性的な PPAR- $\alpha$  の活性化が重要であることを明らかにした。

A. 研究目的

近年の肥満人口の増加を背景に生活習慣病罹患者数は増加の一途を辿り、脂肪肝の有病率は3割を超え、非アルコール性脂肪性肝疾患罹患者が検診受診者の3割に達している。この増加は肝硬変や肝細胞癌をきたす背景となる非アルコール性脂肪肝炎症例の増加をきたしていると推定される。そこで、本研究では NASH 肝癌の予防を目的として NASH 肝硬変を疑って精査が必要である症例を検診受診者から検出する方法を創出し、その頻度を全国の多施設共同研究により明らかにする。ついで、遺伝性 NASH のモデル動物である MC4R 欠損マウスを用いてヒトと同様に線維化の伸展した肝臓を背景に肝発癌が生じることを証明し、肝硬変への最初のステップである肝の線維化の進展過程を明らかにする。さらに、脂

肪肝による PPAR- $\alpha$  の慢性的な活性化が NASH 肝発癌を誘発するとの仮説を検証する。

B. 研究方法

NASH肝硬変を疑って精査が必要である症例を検診受診者から検出する方法を創出するために、腹部超音波検査、血液検査、身体計測値等の完備した8352症例を対象に全国の多施設共同研究を行い、その頻度を推計する。

遺伝性NASHのモデル動物である雄性MC4R欠損マウスを用いてヒトと同様に線維化の伸展した肝臓を背景に肝発癌が生じるか検討する。また、肝硬変への最初のステップである肝の線維化の進展過程を明らかにする。さらに、脂肪肝による PPAR- $\alpha$  の慢性的な活性化が NASH 肝発癌を誘発するとの仮

説を検証する。

(倫理面の配慮)

本検討は高知大学医学部倫理委員会の指導と承認のもとに、実験動物の苦痛が最少となるように配慮して行われた。

### C. 研究結果

本研究では2009年度検診受診者における非アルコール性脂肪性肝疾患の有病率が男性で41.0%、女性で17.7%であり、肥満と高LDL-C血症が重要な誘因であることを明らかにした。NASH肝硬変の予備群と評価された検診受診者は2~3%であり、簡便性からBAAT indexやFIB-4による肝硬変予備群の検出と二次検診受診勧奨の必要性が確認された。

次に、遺伝性NASHのモデル動物であるMC4R欠損マウスではヒトと同様に肝線維化が伸展し、肝発癌が生じることを明らかにした。また、肝の線維化は中心静脈から200 $\mu$ m近傍に最初に生じ、肝小葉の中心と辺縁の双方向に肝細胞周囲性に線維の伸展を認めることを明らかにした。

さらに、PPAR- $\alpha$ の欠損MC4R欠損マウスを創出し、NASH肝発癌の頻度が低下することを示し、脂肪肝による慢性的なPPAR- $\alpha$ の活性化がNASH肝癌の誘発に重要であることを証明した。

### D. 考察

人間ドック学会による検診結果の年次報告で成人の3人に1人が肝機能異常を呈するとの報告がなされて久しい。非肥満者における慢性肝疾患の有病率は2%であるのに比して、肥満者では20%であることから、

肝障害は生活習慣病の鋭敏な指標とされて受診勧奨にも利用されている。

今回の我々の検討では、単に非アルコール性脂肪性肝疾患が増加していることを確認できたのみならず、肝硬変の予備群が検診受診者の2~3%、200万人に達していることが示された。従って、成人検診にBAAT indexやFIB-4を導入して、この危険群を抽出し、二次検診を勧奨する制度の確立が行政的には重要と考えられた。

また、マウスとヒトに共通する遺伝性NASHモデルでの研究により、中心静脈を鞘状に包み込むように血管内皮から肝細胞数個分離した部位の星細胞の活性化がまず選択的に生じ、細かな線維化巣の形成が小葉中心と小葉辺縁の2方向に向けて伸展することが明らかになった。この様式は肝炎ウイルス感染症における肝臓の線維化伸展様式と明らかに異なる未知の線維化機序であり、同じく中心静脈領域から線維化が伸展するとされるアルコール性肝障害の線維化過程との異同を明らかにする必要がある。

この成績がヒトに外挿可能であれば、pericellular fibrosisを標的とする治療法の開発はNASH治療の新たな戦略に繋がるのではないかと考えられた。

### E. 結論

NASH肝硬変の予備群が検診受診者の2~3%、200万人に達していることが明らかとなった。ウイルス性肝炎と異なりNASHでは診断に有用なマーカーが欠如しているため、検診受診者からNASH肝硬変の高危険群を検出するためには、二次検診を勧奨できる安価で実施可能な方略の整備が行政

的には重要と考えられた。

ヒトと共通する遺伝性 NASH モデルである MC4RKO マウスを用いた NASH の治療法に関する研究の推進が求められる。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, Saibara T, Oben JA. Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. **J Gastroenterol** 2014;49:1065-1073
- 2) Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD. The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol** 2014;49:1163-1174
- 3) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Aikata H, Tanaka S, Kanemasa K, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Type 2 diabetes mellitus is associated with the

fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. **J Gastroenterol** 2014; 49:1477-1484.

- 4) Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Nagata Y, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Nozaki-Fujimura Y, Noguchi S, Okamoto N, Chayama K, Suganuma N, Saibara T. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease. **PLoS One** 2013;8:e76161.
- 5) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels. **J Gastroenterol** 2013;48:1051-1060
- 6) Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, Yasui K, Saibara T, Hashimoto E, Kawanaka M, Watanabe S, Kawata S, Imai Y, Kokubo M, Shima T, Park H, Tanaka H, Tajima K, Yamada R, Matsuda F, Okanoue T, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver

- disease in Japanese. **PLoS One** 2012;7:e38322.
- 7) Yasui K, Hashimoto E, Tokushige K, Koike K, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Uto H, Takami S, Kawanaka M, Komorizono Y, Okanoue T; Japan NASH Study Group. Clinical and pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma. **Hepatol Res** 2012;42:767-773.
- 8) Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T; JSG-NAFLD. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. **J Gastroenterol** 2012;47:586-595.
- 9) Masuda K, Ono M, Fukumoto M, Hirose A, Munekage K, Ochi T, Okamoto N, Akagi N, Ogawa Y, Saibara T. Usefulness of Technetium-99 m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatol Res** 2012;42:273-279.
- 10) Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Aoki N, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Yoshikawa T, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. **BMC Gastroenterol** 2012;12:2.
- 1) Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Saibara T. PRDX1 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion by modulating P38 MAPK activity. UEG Week 2014, Vienna, Austria, 2014
- 2) Ohmi S, Ono M, Nishi Y, Hirano S, Tsugita S, Takata H, Yoshimura K, Mori S, Terada Y, Saibara T, Fujimoto S. Correlation between glucose intolerance and histological severity in non-alcoholic fatty liver disease. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions 2014, San Francisco, US, 2014
- 3) Ohmi S, Ono M, Nishi Y, Hirano S, Tsugita S, Takata H, Yoshimura K, Mori S, Terada Y, Saibara T, Fujimoto S. Correlation between glucose intolerance and histological severity in non-alcoholic fatty liver disease. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions 2014, San Francisco, US, 2014.6.13-17
- 4) Ono M, Eguchi Y, Hyogo H, Takahashi H, Ochi T, Munekage K, Hirose A, Takahashi M, Okamoto N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T : Alcohol intake is less important as predictive factors for development of fatty liver disease compared to obesity, impairment of glucose metabolism and dyslipidemia. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Poster Sessions, Boston, 2012 Nov.
- 5) Saibara T. NAFLD An epidemiological perspective from the Asia Pacific region. JSGE-APAGE Joint Conference 3<sup>rd</sup> Asian

## 2. 学会発表

- Pacific Topic Conference Tokyo Japan Nov 3 2012
- 6) Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Kanemasa K, Yoneda M, Imajo K, Nakajima A, Hyogo H, Chayama K, Ono M, Saibara T, Fujii H, Eguchi Y, Itoh Y. The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. American Association for the Study of Liver Disease 2013, Washington DC, USA
- 7) Ochi T, Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Munekage K, Okamoto N, Iwasaki S, Chayama K, Eguchi Y, Saibara T. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. American Association for the Study of Liver Disease 2013, Washington DC, US 2013.11.1-5
- 8) 小野正文、越智経浩、西原利治：75gOGTTおよびCGMSから見たNAFLDの耐糖能異常の特徴について 第50回日本肝臓学会総会パネルディスカッション「DMとNAFLD・NASHの病態を考える」、東京、2014
- 9) 西原利治：基調講演・司会 NASH肝発癌 第50回日本肝臓学会ワークショップ3 NASH肝発癌の基礎と臨床：診断基準も含めて、京都、2014. 6. 5
- 10) 小野正文、川口巧、西原利治：CGMSから見たNAFLDとC型慢性肝炎の耐糖能異常の特徴と比較検討 日本消化器病学会ワークショップ12：NAFLD/NASHにおける新
- 知見と治療法の進歩、東京、2014. 4. 24
- 11) 小野正文、羽柴基、西原利治：NASH肝線維化に影響を及ぼす耐糖能異常の病態解析、第99回日本消化器病学会総会 シンポジウム3 「NAFLD/NASHの病態解明と治療への展開」 東京 2013/3/21-23
- 12) 小野正文、宇都浩文、西原利治：NASH/NAFLD診療ガイドライン～疫学に関するミニレビュー～. 第98回日本消化器病学会総会. パネルディスカッション, 東京, 2012.
- 13) 安居幸一郎、橋本悦子、徳重克年、小森園康二、小池和彦、有井滋樹、今井康陽、西原利治、岡上武：肝細胞癌を発症したNASH患者の臨床病理学的特徴 第48回日本肝臓学会総会 ワークショップ8：NASH/NAFLDから進展する肝硬変・肝癌の現状と対応、金沢、2012, 6. 7
- 14) 西原利治：ALDとNAFLDのクロストーク 日本肝臓学会・日本消化器病学会ワークショップ12：日常診療のジレンマ NASHかASHか、神戸、2012. 10. 11
- 15) 西原利治：肥満症と脂肪肝 非アルコール性脂肪肝炎の診断と治療. 第33回日本肥満学会. 教育講演, 京都, 2012.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

分担研究報告書

インスリン抵抗性と NASH 病態の分子機構の解明に関する研究

研究分担者 植木 浩二郎 東京大学 分子糖尿病科学講座 特任教授

研究要旨：NASH の形成には、脂肪蓄積による first hit と炎症や細胞ストレスによる second hit が必要とされているが、実際には両者が相互に影響しあっており、そのメカニズムを解明することが、NASH・肝癌の画期的治療法の開発につながると考えられる。本研究で、我々は肝臓において摂食によって誘導される ER ストレスの制御破綻が、肥満・インスリン抵抗性によって引き起こされる NAFLD/NASH の病態形成に重要であることを見いだした。正常状態で摂食により誘導される機能未知分子 Sdf211 がコシャペロン分子であり、摂食によって誘導される ER ストレスを終息させるのに必須の因子であることを見いだした。実際、肥満動物モデルでは肝臓での Sdf211 の発現が低下しており、その補充によって ER ストレスが軽減され血糖値や脂肪肝が改善する。また、肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスでは、耐糖能異常と肝脂肪蓄積増加が認められた。さらに、ヒト肝生検サンプルを用いた解析では、Sdf211 など ER ストレス終息シグナル分子の発現が低下しているほど、NASH 病変が進行することが示唆された。糖尿病合併 NASH において、癌発症抑制にどのような糖尿病治療が最適であるかを動物モデルを用いて検証し、肝臓での適切なインスリン作用や血糖コントロールが NASH・肝癌の進展抑制に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

肥満等のインスリン抵抗性状態においては、インスリン抵抗性・過栄養による脂肪沈着という 1st hit と肝臓における慢性炎症や ER ストレスなどの細胞ストレスという 2nd hit が密接に影響し合って NASH の病態が確立すると言う仮説のもとに、その相互作用の分子メカニズムを明らかにすることによって、治療への応用の可能性を探究する。また、この関連を実際に肝機能障害患者の生検サンプルを用いて検証する。ま

た、糖尿病合併 NASH において、病期の進展や肝癌への進行を抑制する最適な糖尿病治療法を明らかにする。

B. 研究方法

①摂食・絶食によりどのような細胞ストレスが肝臓に加わるのか肥満の状態ではそれがどのように変化するかをマウスモデルで検証した。②①において摂食で誘導され ER ストレスを制御する因子として同定した Sdf211 について、その機能と生理的役

割について、肥満マウスでの過剰発現や肝臓特異的ノックアウトやノックダウンにより検討した。③消化器内科入院中の患者において、OGTT、肝生検を施行し、生検サンプルにおいてERストレス関連遺伝子の発現を解析した。④糖尿病NASHモデルマウスとしてSTAMマウスを用い、インスリン、フロリジン、ストレプトゾトシン投与にてNASH、肝癌の進展を解析した。

(倫理面の配慮)

①、②、④で行う動物実験に関しては、東京大学医学部組み換えDNA実験安全委員会において承認されている。③のヒトにおける検証については、医学部倫理委員会の承認されており、データは匿名化された上で解析されるため、個人情報保護される。

#### C. 研究結果

①野生型マウスでは、摂食によりERストレスが生じること、その際ERストレス関連分子(コシャペロン) Sdf211が誘導され、ERストレスを終息させることを見いだした。db/dbマウスでは、ERストレスが亢進してインスリン抵抗性や脂肪肝を生じているが、Sdf211をアデノウイルスで過剰発現させると、これらが改善した。②肝臓特異的Sdf211ノックアウトマウスは、耐糖能障害を呈しており、肝臓の脂肪蓄積も増加していた。また、ノックアウトマウスの初代幹細胞では、ツニカマイシン刺激によるERストレス反応が亢進・遷延していることが分かった。③糖尿病患者の肝臓では、XBP-1, BIP, CHOP, Sdf211などERストレスの終息シグナルの発現が低下しているほど、NASHの進展が認められた。④インス

リンやフロリジンの治療で、STAMマウスのNASH進展が抑制されることが判明した。

#### D. 考察

摂食によりERストレスが惹起されるが、インスリン作用が正常であればSdf211等の発現誘導などによって終息する。しかしながら肥満・インスリン抵抗性状態ではこれらの終息シグナルが誘導されずERストレスが持続し、インスリン抵抗性や脂肪肝が増強されるという悪循環を形成する。このようなERストレスの終息シグナルの低下とインスリン抵抗性・NASHの関連はヒト検体の解析からも示唆された。糖尿病NASHモデルマウスについては、血糖値の改善がNASHの進展を抑制していることが示唆され、肝癌進展の抑制には肝臓での適正なインスリン作用の改善も必要である可能性も示された。

#### E. 結論

Sdf211をはじめとする肝臓でのERストレス終息シグナルは、肝臓の糖脂質代謝を正常に維持するために必須であり、適正なインスリンシグナルがその誘導には必要である。その誘導障害はインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積などを進行させる悪循環を引き起こし、NASH病態を進展させる。糖尿病NASHにおいては、肝臓でのインスリン作用を適正に改善し血糖コントロールを良好に保つことでNASHの病気進展や肝癌の発症を抑制できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto S, Kubota N, Sato H, Sasaki M, Takamoto I, Kubota T, Nakaya K, Noda M, Ueki K, Kadowaki T: Insulin Receptor Substrate-2 (Irs2) in Endothelial Cells Plays a Crucial Role in Insulin Secretion. *Diabetes* 2014 Oct 2. pii: DB\_140432. [Epub ahead of print]
- 2) Moller JB, Dalla Man C, Overgaard RV, Ingwersen SH, Tornøe CW, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Ueki K, Lynge J, Vasconcelos NM, Pedersen BK, Kadowaki T, Cobelli C: Ethnic differences in insulin sensitivity, beta-cell function, and hepatic extraction between Japanese and Caucasians: a minimal model analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4273-4280.
- 3) Awazawa M, Futami T, Sakada M, Kaneko K, Ohsugi M, Nakaya K, Terai A, Suzuki R, Koike M, Uchiyama Y, Kadowaki T, Ueki K: Deregulation of Pancreas-Specific Oxidoreductin ERO1beta in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Mol Cell Biol* 2014;34:1290-1299
- 4) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lynge J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T: Body composition is the main determinant for the difference in type 2 diabetes pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2014;37:796-804
- 5) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013;503:493-499
- 6) Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism* 2013;62:939-951
- 7) Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T: Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2013;48:515-525
- 8) Nio Y, Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Funata M, Yamaguchi M, Ueki K, Kadowaki T: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) deficiency enhances alternatively activated M2 macrophages and ameliorates insulin resistance and fatty liver in lipotrophic diabetic A-ZIP transgenic mice. *Diabetologia* 2012;55:3350-3358



## 2. 学会発表

- 1) 植木浩二郎 糖尿病の薬物療法と発癌リスク 第49回糖尿病学の進歩 2015年 岡山 (シンポジウム)
- 2) 植木浩二郎 高血糖・インスリン作用がNASH 肝癌発症に及ぼす影響 第35回日本肥満学会学術集会 2014年 宮崎 (シンポジウム)
- 3) 植木浩二郎 糖尿病とNASH・肝癌 第29回日本糖尿病合併症学会 2014年 東京 (シンポジウム)
- 4) 添田光太郎、戸田郷太郎、笹子敬洋、門脇孝、植木浩二郎 NASH 合併糖尿病における適切なインスリン補充は肝発癌を抑制しうる 第1回肝臓と代謝研究会 2014年 東京 (シンポジウム)
- 5) 植木浩二郎 肥満症治療の課題と展望 第63回日本体質医学会総会 2013年 久留米 (シンポジウム)
- 6) 植木浩二郎 肥満症とがん 第34回日本肥満学会 2013年 東京 (教育講演)
- 7) Kohjiro Ueki Potential effects of treatment for diabetes on the cancer risk 第72回日本癌学会学術総会 2013年 横浜 (シンポジウム)
- 8) 植木浩二郎 PI3K とインスリン作用 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年 熊本 (特別シンポジウム)
- 9) 植木浩二郎 Possible Mechanisms Linking Treatment for Diabetes and Cancer Risk 第71回日本癌学会学術総会 札幌 (シンポジウム)
- 10) 植木浩二郎 2型糖尿病 up-date一成因と病態 第85回日本内分泌学会学術総

会 2012年 名古屋 (教育講演)

- 11) Kohjiro Ueki Role of hepatic ER stress in the development of insulin resistance The 2012 Shanghai Symposium on Obesity and Diabetes Shanghai 2012 (シンポジウム)

## H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

分担研究報告書

C型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響

研究分担者 芥田 憲夫 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 肝臓内科 医長

研究要旨：C型肝炎の肝発癌には2型糖尿病と Core aa70 置換が関与することが確認された。特に、2型糖尿病では HbA1c 低値群で肝発癌率が抑制された。脂質代謝は *IL28B* 遺伝子多型や Core aa70 置換と関連し、糖代謝は Core aa70 置換と関連していた。肝発癌例のみの検討では、肝発癌の10年前より aa70 Mutant 定量値が増加傾向を示し、その変化量には代謝要因の関与が示唆された。更に、SVR 後肝発癌例でも代謝・ウイルス要因が肝発癌期間に影響する可能性が示唆された。C型肝炎は代謝・宿主・ウイルス要因が相互に関連しながら肝病態進行に影響している。ウイルス排除のみならず糖脂質代謝を標的とした薬剤の追加で更なる肝発癌抑制効果の改善が期待される。

A. 研究目的

C型肝炎では代謝・宿主・ウイルス要因が相互に関連しながら肝癌を含む肝病態の進行に影響している。我々は、HCV genotype 1bのCore領域の70番目のアミノ酸置換(HCV-1b Core aa70 Mutant)が肝発癌に影響することを報告してきた。本研究では、新規の肝発癌抑制療法の手掛りを見出すことを目的として、C型肝炎の肝発癌に及ぼす代謝・宿主・ウイルス要因の影響とそれら背景因子の関連性について検討した。

B. 研究方法

【検討1: C型肝炎の肝発癌に影響する代謝・宿主・ウイルス要因】

インターフェロン(IFN)関連療法を施行されたC型肝炎慢性肝疾患4,302例と、IFN無治療

で経過観察されたC型肝炎慢性肝疾患1,181例を対象として代謝・宿主・ウイルス要因から見た肝発癌率を検討した。更に、IFN関連療法施行後にSustained virological response(SVR; IFN治療終了後24週経過時点のHCV RNA陰性状態)に至った2,660例を対象として代謝・宿主・ウイルス要因から見たSVR後の肝発癌率を検討した。

【検討2: HCVと代謝・宿主要因との関係】

HCV-1bの2,220例を対象として代謝要因と*IL28B* rs8099917遺伝子多型・Core aa70置換との関連解析を施行した。更に、aa70 Mutant定量(Q-Invader assay法)が測定可能であった151例を対象として、代謝・宿主要因とaa70 Mutant定量値との関係を検討した。

【検討3: C型肝炎の肝発癌例におけるウイルス要因の経時変化】

HCV RNA持続陽性の状態から肝発癌した連続43例と、SVR後に肝発癌した連続17例を対象として、肝発癌例におけるaa70 Mutant定量値の経時変化を検討した。

#### 【倫理面の配慮】

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

### C. 研究結果

#### 【検討1: C型肝炎の肝発癌に影響する代謝・宿主・ウイルス要因】

IFN関連療法を施行されたC型慢性肝疾患症例を対象として肝発癌に寄与する要因を多変量解析(Cox proportional hazard model)で検討すると、代謝要因からはType2 DM(有り)( $P<0.001$ )が独立要因として抽出された。Type2 DMを有する症例の検討で、経過観察中の平均HbA1c(NSPG)低値群(7.0%未満)では高値群(7.0%以上)と比較して累積肝発癌率が低率であった( $P=0.015$ ; Log rank test)。IFN無治療で経過観察されたC型慢性肝疾患症例を対象として肝発癌に寄与する要因を多変量解析(Cox proportional hazard model)で検討すると、ウイルス要因からはHCV subgroup(HCV-1b Core aa70 Mutant>HCV-1b Core aa70 Wild>HCV-2a/2b)( $P<0.001$ )が独立

要因として抽出された。更に、SVR後の肝発癌に寄与する要因を多変量解析(Cox proportional hazard model)で検討すると、年齢(50歳以上)、性別(男性)、肝線維化(F2以上)、HCV subgroup(HCV-1b Core aa70 Mutant)が独立要因として抽出された( $P<0.01$ )。脂質要因では、総コレステロール(190 mg/dl未満)、HDLコレステロール(50 mg/dl未満)、中性脂肪(150 mg/dl以上)が単変量解析では肝発癌に影響していたが( $P<0.05$ )、何れも多変量解析では独立要因として抽出されず。

#### 【検討2: HCVと代謝・宿主要因との関係】

HCV-1b症例を対象とした代謝要因と*IL28B* rs8099917遺伝子多型との関連解析で、*IL28B* TT症例ではnon-TT症例と比較して肝細胞脂肪化低頻度( $P=0.009$ )、LDLコレステロール高値( $P<0.001$ )を単変量解析で示した(Mann-Whitney U test)。代謝要因とCore aa70置換との関連解析で、Core aa70 Mutant症例ではWild症例と比較して中性脂肪高値( $P=0.015$ )、LDLコレステロール低値( $P=0.006$ )、肝細胞脂肪化高頻度( $P=0.001$ )、空腹時血糖高値( $P=0.050$ )を示す傾向が単変量解析で確認された(Mann-Whitney U test)。更に、aa70 Mutant定量値が増加している症例では*IL28B* non TTの頻度が高く、肝線維化進行例(Fibrotic score for hepatitis C; Stage 4)の頻度も高く( $P<0.001$ ; Chi-squared test)、AFP高値を示す傾向が確認された( $P=0.003$ ; Kruskal Wallis test)。

#### 【検討3: C型肝炎肝発癌例におけるウイ

## ルス要因の経時変化】

HCV RNA 持続陽性の状態からの肝発癌例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、発癌 10 年前 30%、発癌 5 年前 65%、発癌 1 年前 80%。肝発癌例の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示した。初診時背景因子の中で、総コレステロール高値 ( $P=0.059$ )、LDL コレステロール高値 ( $P=0.007$ )、HDL コレステロール低値 ( $P=0.012$ )、BMI 高値 ( $P=0.035$ ) の症例では aa70 Mutant 変化量が大きい傾向が確認された (Chi-squared test)。特に、初診時 BMI は aa70 Mutant 変化量と正の相関を示す傾向が確認された ( $r=0.539$ ,  $P=0.001$ ; Spearman rank correlation test)。更に、SVR 後に肝発癌した症例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、SVR5 年前 45%、SVR 直前 95%。SVR 後肝発癌例の aa70 Mutant 定量値も経時的に増加傾向を示し、SVR 前で最終治療時の HDL コレステロール値は aa70 Mutant 定量値と負の相関を示す傾向が確認された ( $r=-0.824$ ,  $P<0.001$ ; Spearman rank correlation test)。SVR 後の肝発癌までの期間に影響する要因を検討すると、空腹時血糖が高い症例 ( $P=0.004$ )、aa70 Mutant 定量が多い症例 ( $P=0.045$ ) で肝発癌までの期間が短い傾向にあった (Mann-Whitney U test)。

## D. 考察

トランスジェニック・マウスによる動物実験では HCV core 蛋白による肝細胞脂肪化・IR といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌を含む肝病態進行への

影響が報告されてきた。当施設の検討は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。特に、糖脂質代謝・肝発癌に寄与する要因としてウイルス要因の Core アミノ酸置換が抽出されたことは HCV の肝病態への直接的な関与を示唆する重要な成績であるといえる。

C 型肝炎の肝発癌には Type2 DM と Core aa70 Mutant が関与することが確認された。特に、Type2 DM 症例では経過観察中の平均 HbA1c 低値群で肝発癌率が抑制された。更に、脂質代謝は *IL28B* 遺伝子多型や Core aa70 置換と関連し、糖代謝は Core aa70 置換と関連していた。代謝・宿主・ウイルス要因の関連を解析することが肝発癌メカニズムの解明や新規抗癌剤/抗 HCV 療法の開発に繋がることが期待される。更に、今回の成績はウイルス排除のみならず糖脂質代謝を標的とした薬剤を追加することで更なる肝発癌抑制効果の改善を期待することが出来ることを示唆している。

今回の肝発癌例のみの検討では、肝発癌の10年前より既にaa70 Mutant定量値が増加傾向を示し、その変化量には代謝要因の関与が示唆された。更に、SVR後の肝発癌例でもウイルス排除前のaa70 Mutant定量値は経時的に増加傾向を示し、代謝・ウイルス要因が肝発癌期間に影響する可能性が示唆された。このような、ウイルス排除前のCoreアミノ酸置換の状態がSVR後の肝発癌にまで影響するという成績は、イニシエーターとしてのHCVが排除される前段階で既にaa70 Mutantの症例では肝発癌の素地が出来上がっている可能性を示唆する所見と思わ

れる。即ち、Coreアミノ酸置換は肝発癌の Surrogate markerとしての役割を担っている可能性があるといえる。今後は、aa70 Mutant定量値の推移に影響している代謝要因も加味しながら総合的に代謝・宿主・ウイルス要因と肝発癌との関係性を評価していく必要がある。更に、今回の検討はあくまで肝発癌例のみの検討であるため、今後は更に症例数を増やして、非発癌例におけるaa70 Mutant定量値の経時変化の経過とも比較していく必要がある。

#### E. 結論

C型肝炎において、代謝・宿主・ウイルス要因は相互に関連しながら肝発癌を含む肝病態進行に影響している。これはウイルス排除後の肝発癌においても同様であった。ウイルス排除のみならず糖脂質代謝を標的とした薬剤の追加で更なる肝発癌抑制効果の改善が期待される。

Core aa70 Mutantは肝発癌のSurrogate markerとして有用な可能性がある。肝発癌例のaa70 Mutant定量は経時的に増加傾向を示し、定量法は肝癌危険群の早期指摘に有用な可能性がある。Coreアミノ酸置換と代謝・宿主要因の関係を解析することが肝病態進行メカニズムの解明に繋がる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T,

Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Utility of telaprevir-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. J Clin Microbiol 2014;52:193-200.

2) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Evolution of simeprevir-resistant variants over time by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1b. J Med Virol 2014;86:1314-22.

3) Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy. Intervirology 2013;56:13-21.

4) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. J Med Virol 2013;85:1028-1036.

5) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Prediction of treatment efficacy and

telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Clin Microbiol* 2013;51:2862-2868.

- 6) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;57:964-973.
- 7) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy and anticarcinogenic activity of ribavirin combination therapy for hepatitis C virus-related compensated cirrhosis. *Intervirology* 2013;56:37-45.
- 8) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Complicated relationships of amino acid substitution in hepatitis C virus core region and IL28B genotype influencing hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012;56:2134-2141.
- 9) Takeyasu M, Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Long-term interferon monotherapy reduces the risk of HCV-associated hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2012;84:1199-1207.
- 10) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y,

Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Association of IL28B genotype and viral response of hepatitis C virus genotype 2 to interferon plus ribavirin combination therapy. *J Med Virol* 2012;84:1593-1599.

## 2.学会発表

- 1) Akuta N, Suzuki F, Sorin Y, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Clinical utility of NS3/4A protease inhibitor-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA. 2014.
- 2) Akuta N, Suzuki F, Hara T, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment prediction of sustained virological response and telaprevir-resistant variants by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1 patients treated with triple therapy. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington, DC. 2013.

## H.知的所有権の出願・取得状況

### 1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

分担研究報告書

消化管ホルモンが肝代謝と肝発がんに及ぼす影響

研究分担者 川口 巧 久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 講師

研究要旨：消化管は多彩なホルモンを分泌する内分泌臓器であり、代謝性肝疾患の発症に関わる。なかでも、グレリンや glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、糖・脂質代謝調節に関与する。本研究の目的は、①慢性肝疾患患者における活性型グレリンの変化に関与する因子、②GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 が non-alcoholic steatohepatitis (NASH) マウスモデルの肝障害におよぼす影響、③dipeptidyl deptidase-4 (DPP-4) 阻害剤が NASH 関連肝がんマウスモデルの肝腫瘍に及ぼす影響を検討することである。結果① 活性型グレリン値低下に関与する独立危険因子として肝硬変、血清アルブミン値、HCV 感染が同定された。結果② Exendin-4 群により肝小葉内の炎症、肝細胞内の脂肪蓄積や肝細胞風船様変化は抑制され、NAFLD activity score は有意に低下した。結果③ Sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルの肝腫瘍数と肝腫瘍容積を低下した。本研究結果より、消化管ホルモンは代謝性肝疾患の病態に関与するだけでなく、GLP-1 シグナリングの活性化が代謝関連肝がんの新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝臓は門脈を介して消化管と臓器相関を形成している。消化管は、栄養素の消化・吸収を司るとともに、消化管ホルモンを分泌する内分泌臓器であり、代謝性肝疾患の発症に深く関わる。

グレリンは胃のX/A-like細胞より分泌される消化管ホルモンである。グレリンは食欲を調節するだけでなく、基礎的研究により糖代謝、脂質代謝、肝線維化および細胞増殖に関与することが報告されている。グレリンは不活性型で分泌され、ghrelin O-acyltransferaseと prohormone convertase 1/3により活性化される。活性型グレリンのみが

生理活性を発揮しうるが、C型慢性肝疾患患者における活性型グレリンの変化や代謝異常との関連は未だ不明である。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、糖・脂質代謝に深く関わる消化管ホルモンである。GLP-1受容体は膵β細胞だけでなく、肝細胞にも同定されており、これまでにGLP-1は、protein kinase C活性化や peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の活性化を介して肝細胞内の中性脂肪含量を減少することが報告されている。GLP-1のN端のアミノ酸を変化させたGLP-1誘導体 exendin-4はGLP-1受容体親和性が高く、non-alcoholic steatohepatitis (NASH) の病態

を改善しようと考えられるがその効果は未だ明らかではない。

GLP-1の作用はセリンプロテアーゼである dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) により不活化されるため、GLP-1の半減期は約2分と短い。DPP4阻害剤は、DPP4によるGLP-1の不活化を抑制して血糖値を低下させる薬剤である。また、DPP4はperoxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ の不活化や sterol regulatory element binding protein-1cの活性化を介した脂肪蓄積作用を有する。さらに、動物実験では、DPP4による酸化ストレスを介して大腸がんの発症に関与することが報告されている。このように、DPP4阻害剤はNASH関連肝がんに対しても抑制的に作用すると推察されるが、未だその効果は不明である。

本研究の目的は、①慢性肝疾患患者における活性型グレリンの変化に関与する因子、②GLP-1受容体作動薬である exendin-4 が NASH マウスモデルの肝障害におよぼす影響、③DPP4阻害剤が NASH 肝がんマウスモデルの肝がんにおよぼす影響を検討することである。

## B. 研究方法

### 検討①

#### 対象

外来通院中の C 型慢性肝疾患患者 (HCV) 96 名、B 型慢性肝疾患患者 (HBV) 20 名、非アルコール性脂肪性肝障害患者 (NAFLD) 49 名、および健常人 (CON) 16 名を対象とした。

#### 血液生化学検査

早朝空腹時に採血し、肝機能および糖、脂質、蛋白代謝を血清学的に評価した。

#### 血漿活性型グレリンの測定

早朝空腹時に採血し、Active Ghrelin ELISA Kit (セティーカンパニー、東京) を用いて、血漿活性型グレリン値を測定した。

#### 統計解析

データは実数もしくは平均 $\pm$ SD にて記載した。多群間の比較は analysis of variance (ANOVA) にて解析した。血漿活性型グレリン値に関与する独立因子はステップワイズ法で変数を選択後、多変量解析にて検討した。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

### 検討②

#### 実験動物

NASH は 6 週齢の糖尿病モデルマウス (db/db mouse) をメチオニン・コリン欠乏食で飼育することにより誘導した。

#### プロトコール

NASH モデルマウスに対し、exendin-4 (n = 4; 20  $\mu$ g/kg) もしくは生食 (n = 4) を腹腔内に 8 週間連日投与した。14 週目で屠殺し、摘出した肝臓をホルマリン固定もしくは、液体窒素にて凍結した。ホルマリン固定した肝臓は、hematoxylin-eosin 染色および Sudan IV 染色により、それぞれ NAFLD activity score と肝組織中の中性脂肪含量を評価した。



## 統計解析

データは実数もしくは平均  $\pm$  SD にて記載した。体重の経時的変化は、two-factor repeated measures ANOVA にて検定した。2 群間の比較は Wilcoxon rank sum test を用いて検定した。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

## 検討③

### 実験動物

NASH 関連肝がんモデルである STAM®マウス（株式会社 ステリック再生医科学研究所；東京）を用いた。

### プロトコール

8 週齢の STAM®マウスに対し、sitagliptin 30mg/kg (n = 8) もしくは蒸留水 (n = 8) をゾンデにより 1 日 1 回、10 週間連日投与した。

16 週齢時に全個体についてネンブタールにて麻酔を施行したのち、肝臓を撮影した。その後、イオパミロン（Bayer Health Care AG）を尾静脈より投与し、再び肝臓を撮影した。造影後期相のみにて低吸収域として描出される結節を肝腫瘍と定義し、肝腫瘍の個数と腫瘍の容積を評価した。

## 統計

平均値の差の検定は Student-t test 法を用いて検討した。P 値が 0.05 未満である場合に統計学的に有意差があると判断した。

### （倫理面の配慮）

本研究の研究内容はヘルシンキ宣言に準

じており、久留米大学倫理委員会にて承認を受けている。患者を対象とした研究では、参加者より書面により同意を得ている。また、通常の日常診療における医療従事者が行うべき守秘義務に加え、個人が識別できる情報は、暗号化し、プライバシーの保護に留意した。本研究により得られたデータは本試験の目的以外には利用していない。

動物実験では、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき実験を遂行した。屠殺は「動物の殺処分方法に関する指針」準拠して、可能な限り処分動物に苦痛を与えない方法を用いた。

## C. 研究結果

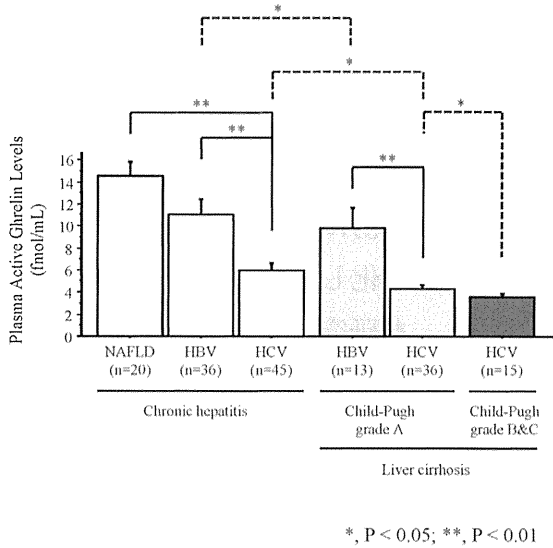
### 検討①

#### 肝疾患の病期進展と活性型グレリンの関連

HBV 群および HCV 群の両群において、活性型グレリン値は、肝疾患の病期進展とともに有意に低下した（図 1 点線）。

慢性肝疾患における層別解析では、HCV 群の活性型グレリン値は NAFLD 群もしくは HBV 群と比較し有意に低値であった（図 1 実線）。また、肝硬変 Child-Pugh grade A における層別解析においても、HCV 群の活性型グレリン値は HBV 群と比較して有意に低値であった（図 1 実線）。

#### 図 1. 肝疾患の病期進展・成因と活性型グレリンの関連



### 活性型グレリン値低下に關与する独立危険因子

多変量解析にて、活性型グレリン値低下に關与する独立危険因子を檢討したところ、肝硬変、血清アルブミン値、HCV感染が独立危険因子として同定された（表1）。

表1. 活性型グレリン値低下に關与する独立危険因子

Variable	OR	95% CI	P value
肝硬変	-1.82	-0.37 to -4.33	0.0359
血清アルブミン値	2.39	1.32 to 7.95	0.0251
HCV感染	-3.05	-0.93 to -19.51	0.0192

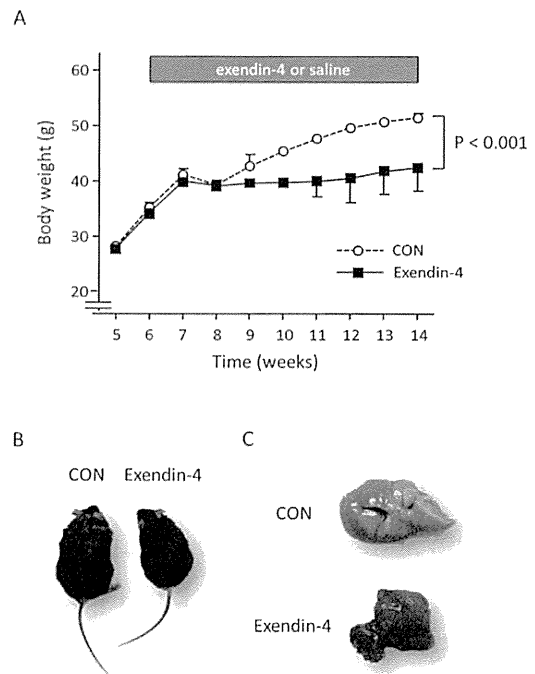
### 検討②

#### Exendin-4 による NASH モデルマウス体重と肝の肉眼所見の変化

コントロール群の体重は徐々に増加し、14 週齡で約 50 g となった。一方、Exendin-4 群は 7 週齡より体重はほぼ増加せず、14 週齡で約 40 g とコントロール群と比較し有意に低値であった（図 2A, P <

0.001, 図 2B)。Exendin-4 群の肝臓は、コントロール群の肝臓と比較して、褐色調であった（図 1C）。

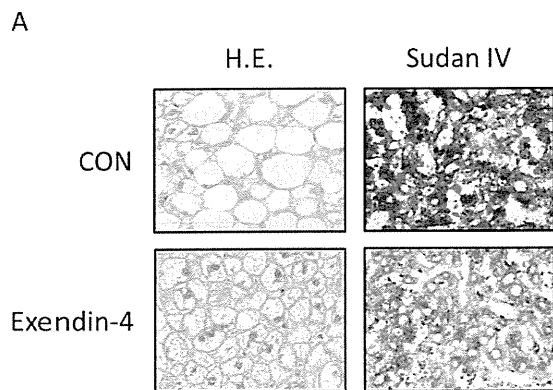
図 2. Exendin-4 による NASH モデルマウス体重と肝の肉眼所見の変化



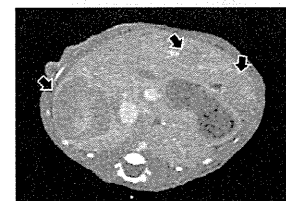
#### Exendin-4 による肝組織所見、肝組織中の中性脂肪含量、および NAFLD activity score の変化

Exendin-4 群およびコントロール群ともに著明な肝線維化は認めなかったが、Exendin-4 群における肝小葉内の炎症、肝細胞内の脂肪蓄積や肝細胞風船様変化は、コントロール群と比較して抑制されていた（図 3A）。Exendin-4 群における NAFLD activity score はコントロール群と比較して有意に低値であった（図 3B）。

図 3. Exendin-4 による NASH モデルマウス体重と肝の肉眼所見の変化



Vehicle



Sitagliptin

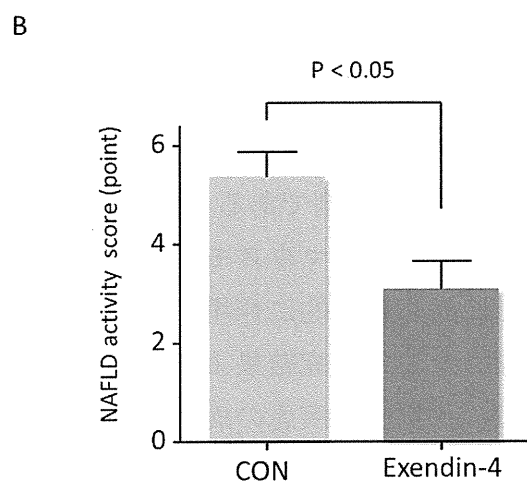
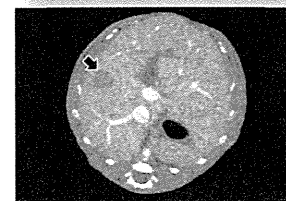


表 2. 肝腫瘍発生個体、肝腫瘍数、肝腫瘍容積

	Vehicle	Sitagliptin	P
Incidence of tumor	100% (8/8)	87.5% (7/8)	N.S.
Number of tumor	4.5 ± 1.7/liver	1.8 ± 1.2/liver	0.0057
Volume of tumor	37.5 ± 72.5 mm <sup>3</sup> /liver	11.2 ± 20.8 mm <sup>3</sup> /liver	0.0338

### 検討③

Sitagliptin による NASH 関連肝がんモデルマウスの肝腫瘍に及ぼす影響

Vehicle 群と Sitagliptin 群の間で、肝腫瘍が発生したマウス個体数に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の腫瘍数と腫瘍容積は Vehicle 群と比較して有意に低値であった (図 4・表 2)。

図 4. Sitagliptin による NASH 関連肝がんモデルマウスの肝腫瘍に及ぼす影響: CT 画像 (矢印: 肝腫瘍)

### D. 考察

本研究により、下記の 3 点が明らかとなった。①C 型慢性肝疾患患者において血漿活性型グレリン値は低下しており、肝硬変、血清アルブミン低値と HCV 感染がその危険因子であった。② Exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制した。③ Sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝発がんの腫瘍数と腫瘍容積作用を低下させた。これらの研究結果から消化管ホルモンは代謝性肝疾患の病態に関わるだけでなく、代謝関連肝がんの新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。

C 型慢性肝疾患患者の活性型グレリン値

は、他の慢性肝疾患患者と比較して有意に低値であった。また、HCV 感染は活性型グレリン値低下の独立危険因子であった。これらの研究結果より、HCV 自体が活性型グレリンに影響をおよぼしている可能性が示唆される。その機序は未だ明らかではないが、C 型慢性肝疾患患者では血清レプチン濃度が上昇していることが報告されている。レプチンはグレリン分泌に対し抑制的に作用することから、HCV はレプチンを介して活性型グレリン濃度に変化をおよぼしている可能性がある。

本研究において、exendin-4 は NASH モデルマウスの体重増加と NAFLD activity score の上昇を抑制した。GLP-1 受容体作動薬による NASH 改善効果の機序として、インスリン感受性の亢進、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の活性亢進、および  $\beta$  酸化の亢進が報告されている。また、我々は、exendin-4 は肝組織中  $\Delta^5$  デサチュラーゼの活性を阻害し、炎症促進性エイコサノイドの産生を抑制することで NASH を軽減することを明らかにした。このように、GLP-1 シグナリングの活性化は、NASH の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

本研究において、sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルの肝がんに対し抑制的に作用した。Sitagliptin は DPP4 を阻害し、活性型 GLP-1 濃度は上昇させることでインスリン抵抗性を改善していると考えられる。インスリンは細胞増殖作用を有するホルモンであり、インスリン抵抗性は肝発がんのリスクファクターである。以上

より、DPP4 阻害剤はインスリン抵抗性を是正することで肝発がんに抑制的に作用すると考えられる。また、DPP4 は血管新生の開始と維持に必要な分子であり、DPP4 阻害剤は血管新生の抑制を介して肝腫瘍に対して抑制的に作用することも推察される。

## E. 結論

本研究により、①HCV 感染が血漿活性型グレリン値低下の危険因子であること、②GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制すること、③DPP4 阻害剤である sitagliptin は NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝発がんに対し抑制的に作用することが明らかになった。本研究結果より、消化管ホルモンは、代謝性肝疾患の病態に関与するだけでなく、GLP-1 シグナリングの制御が代謝関連肝がんの新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) [Kawaguchi T](#), Ito M, Taniguchi E, Sata M. Exendin $\square$ 4, a glucagon $\square$ like peptide $\square$ 1 receptor agonist, modulates hepatic fatty acid composition and  $\Delta^5$  $\square$ desaturase index in a murine model of non $\square$ alcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Med.* 2014;34:782-787.

2) Yamada S, Kawaguchi A, [Kawaguchi T](#), Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S,