

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15824

研究課題名(和文) NASHに対する胆汁酸受容体TGR5の活性化と既存薬剤を応用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) TGR5 activation modulates an inhibitory effect on liver fibrosis development mediated by anagliptin in NASH diabetic model

研究代表者

賀屋 大介 (Kaya, Daisuke)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：70812501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TGR5アゴニストとDPP4阻害薬を併用し、糖尿病条件下での肝線維化抑制効果を基礎的に検討した。2型糖尿病ラットであるOLETFにブタ血清を腹腔内投与し、糖尿病存在下での肝線維化モデルを作成した。同時にTGR5アゴニスト(TGR5)、DPP4阻害薬(DPP4)を単独、併用投与した群を作成した。対照群に比べ、各単独投与群ではインスリン抵抗性、感受性が改善し、肝組織では肝脂肪化の改善とともに、脂質過酸化マーカーも有意に低下していた。また両群において、肝線維化が抑制され、肝線維化マーカーのmRNAレベルが有意に低下していた。これらの改善効果は各単独投与群に比べ、併用群で顕著であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではOAとDPP4阻害薬(DPP4-I)を併用することにより、効果的に肝線維化抑制効果を示すことが証明できた。TGR5アゴニストの開発が進んでいる中で、本研究の結果を踏まえ、将来的にTGR5アゴニストのNASH肝硬変、肝癌予防効果が期待できる。さらにDPP4-Iは糖尿病治療薬として最も広く使用されている薬剤であり、肝硬変患者でも比較的安全に服用可能である。現在までTGR5アゴニストとDPP4-Iの相加相乗効果に関する報告はなく、臨床でも併用による効果増強が証明できれば、TGR5アゴニストの更なる有用性ととも、慢性肝疾患の多数を占めるNASH患者の予後改善につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study assessed the combined effect of TGR5 agonist and DPP-4 inhibitor on diabetes-based liver fibrosis development. Male diabetic rats received intraperitoneal injection of porcine serum (PS) to induce liver fibrosis, and they were orally administered the following agents: oleanolic acid (OA) as a TGR5 agonist, anagliptin (ANA) as a DPP-4 inhibitor, and a combination of both agents. Treatment with OA or ANA significantly improved glycemic status and attenuated intrahepatic steatosis and lipid peroxidation in diabetic rats. PS-induced liver fibrosis development was also drastically suppressed by treatment with either agent, and the combination of both reciprocally enhanced the antifibrotic effect. Fecal microbiome demonstrated that both agents inhibited the increase in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio, an indicator of dysbiosis related to metabolic syndromes. Furthermore, ANA directly inhibited in vitro HSC proliferative and profibrogenic activities.

研究分野：慢性肝疾患

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝線維化 糖尿病

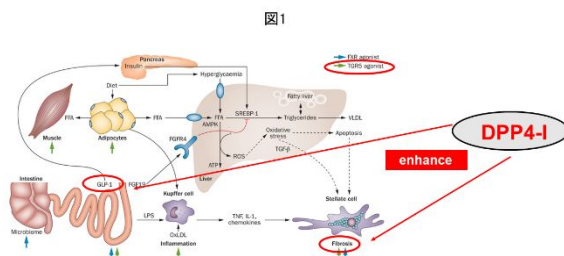
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では近年の肝炎ウイルス治療の進歩により B 型や C 型のウイルス性肝炎が減少するとともに、メタボリックシンドロームの増加により耐糖能異常、糖尿病を基盤とする非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の罹患率が上昇している。NAFLD は非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver: NAFL) から非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) として肝硬変・肝癌へと進行する広範な肝病態を包括する疾患概念として定義されている。多くのメタボリックシンドロームと同様に、NAFLD 発症には遺伝的な要素に加えて生活習慣に起因する酸化ストレス、アディポサイトカイン、インスリン抵抗性、エンドキシンなど環境因子が関連する。現在ではそれらの多因子が正常肝から NAFL へ、さらに NAFL から NASH へ進行する過程で平行して関与するという multiple parallel hit hypothesis が病態形成のメカニズムとして提唱されている。近年の臨床研究によって、NASH の予後を規定する最も重要な因子は肝線維化であることが明らかとなり、抗線維化治療に関する様々な研究が取り組まれている。しかしながら、多因子による病態形成を制御することは困難であり、現在まで肝線維化を対象とした治療は確立されておらず、NASH における有効な治療法の開発が急務とされている。Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) 阻害薬は、インクレチン関連製剤として現在最も広く用いられている糖尿病治療薬である。インクレチンは消化管から分泌され、膵細胞からのインスリン分泌を促進するホルモンの総称であり、その一つであるグルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1: GLP-1) は通常では体内で DPP4 により速やかに分解される。DPP4 阻害薬は DPP4 を阻害することで GLP-1 の生体内での作用を増強させ、効率的に血糖をコントロールする。さらに我々は、過去の基礎的検討で DPP4 阻害薬が肝星細胞へ直接作用して増殖抑制を介して線維化を抑制することを実験モデルで明らかにしており、NASH に代表される糖尿病を合併する肝線維化に対しては血糖降下作用も加わることでさらにその抗線維化効果が増強されることが期待されている。一方で、メタボリックシンドローム治療の新たな標的として、胆汁酸受容体である TGR5 が注目されている。TGR5 は G 蛋白質共役受容体の一種で、肝胆道系器官、消化器官、脂肪組織、筋組織をはじめ、骨髄、胎盤など広い範囲に分布している。生体内での分布が多岐に渡っていることから TGR5 の活性化による細胞内応答は、発現している組織内のシグナルカスケードの種類により異なり、作用発現も多様である。最近の研究で小腸や大腸の L 細胞では TGR5 の活性化により GLP-1 の分泌を促進しグルコースの制御にも関わっていることが明らかとなっている。またマクロファージでは TGR5 の活性化による cAMP 合成の上昇に伴い proinflammatory cytokine の分泌が抑制される。このような機能により TGR5 の活性化は肥満、2 型糖尿病、動脈硬化などの改善効果が期待され、そのアゴニストは新規糖尿病治療の候補に挙げられている。

2. 研究の目的

DPP4 阻害薬、TGR5 アゴニストともに多様な機序で NASH 進展を抑制する可能性が示唆されるものの、各薬剤単独での肝線維化抑制効果は乏しく十分な効果は得られないことが予測される。そこで本研究では相加効果を期待して、基礎的研究で糖尿病発症ラットに肝線維化を誘発させ、DPP4 阻害薬と TGR5 アゴニストの併用による抗線維化効果および作用機序を明らかにすることを目標とする (図1)。TGR5 アゴニストの開発が進んでいる中で、本研究の結果が証明されれば、将来的に TGR5 アゴニストの NASH 肝硬変、肝癌予防効果が期待できる。さらに DPP4-I は糖尿病治療薬として最も広く使用されている薬剤であり、肝硬変患者でも比較的安全に服用可能である。現在まで



TGR5 アゴニストと DPP4-I の相加効果に関する報告はなく、併用による効果増強が証明されれば、TGR5 アゴニストの更なる有用性ととも、将来的に慢性肝疾患の多数を占める NASH 患者の予後改善につながる事が期待できる。

3. 研究の方法

In vivo 実験

糖尿病自然発症ラットとして、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)を用いて、肝線維化を誘発するために、ブタ血清(1.0ml/kg/Bw)の反復腹腔内投与(1.0ml/kg/Bw)を行った。治療群として、TGR5 アゴニストであるオレアノール酸(Oleanolic acid: OA; 100mg/kg/日)、DPP4 阻害薬であるアナグリプチン(Anagliptin: ANA; 3mg/kg/日)をそれぞれ単独投与した群と両者を併用した群を作成した。8 週間後に犠死させ、各種検討を行った。

In vitro 実験

ヒト小腸 L 細胞株として、NCI-H716 を用いて OA による GLP-1 分泌への作用について検討した。小腸 L 細胞では TGR5 の活性化により cAMP 合成を介して GLP-1 が産生されるメカニズムが知られているため、まず OA(1-10 μM)を添加することによる cAMP の産生量を EIA キットを用いて測定した。また、両薬剤の肝線維化抑制効果において、肝星細胞への直接作用が関与しているかどうかをヒト肝星細胞株(LX-2)、ラット肝星細胞株(HSC-T6)を用いて in vitro で検討した。

4. 研究成果

(1) 体重と肝重量の変化

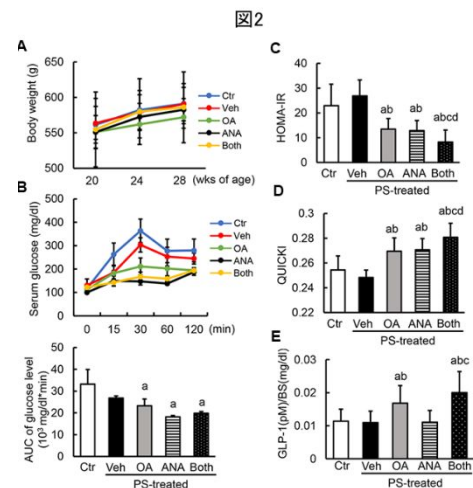
体重に関しては、ブタ血清投与および各種薬剤投与による変化は認めなかった(図 2A)。一方で、肝重量に関してはブタ血清投与により増加し、OA 投与、ANA 投与により有意に減少した。併用群では単独投与群に比べて差を認めなかった。

(2) 糖代謝の変化

実験終了時に行った経口ブドウ糖負荷試験(Oral glucose tolerance test: OGTT)では、OLETF ラットで認められる糖負荷後の血糖上昇は OA 投与、ANA 投与により有意に抑制されていた(図 2B)。またインスリン抵抗性への影響を Homeostasis model assessment as an index of insulin resistance (HOMA-IR)で評価したところ、OGTT と同様に OA 投与、ANA 投与により有意に改善を認めていた(図 2C)。インスリン感受性に関する量的インスリン感受性検査指数(Quantitative insulin sensitivity check index: QUICKI)においても、HOMA-IR と呼応するように OA 投与、ANA 投与による改善を認めた(図 2D)。このことにより、DPP4 阻害薬のみならず、TGR5 アゴニストも血糖降下作用を示すことが確認できた。実際に血中 GLP-1 濃度を測定したところ、OA 投与群では有意に上昇していた(図 2E)。

(3) 肝脂肪化と過酸化脂質への効果

肝臓への脂肪沈着を HE 染色を用いて検討したところ、OA 投与、ANA 投与により肝脂肪化は著明に改善を認めた。また両薬剤を併用することで、脂肪化の抑制効果は増強された(図 3A)。また、肝脂肪化に伴う酸化ストレス(脂質過酸化)への影響について肝組織中の 2-チオバルビツール酸反応性物質(2-thiobarbituric acid reactive substances: TBARS)を指標に測定したところ、肝脂肪化に対する影響に平行するように OA 投与群、ANA 投与群で低下していた(図 3B)。このことにより、OA、ANA はインス



リン抵抗性の抑制を介して、肝脂肪化、脂質過酸化を抑えることが示唆された。

(4) 肝線維化への効果

肝線維化への効果を Sirius-Red 染色を用いて検討したところ、OA、ANA 単独投与群で有意に線維化の進展が抑制されていた。さらに両薬剤併用群では各単独群に比べてより強い線維化の抑制が認められた。また、肝線維化において中心的な役割を果たす肝星細胞への影響について

-SMA 免疫染色を用いて検討したところ、肝線維化の抑制と平行するように -SMA の発現が抑制されていた(図 3C)。またこれらの抑制効果に関連して、線維化マ

ーカーである *Acta2*, *Col1a1*, *Fn1* の mRNA の肝組織中の発現レベルを real-time PCR 法で測定したところ、肝線維化への効果と同様の变化を示した (図 3D)。これらの結果から、OA、ANA は糖尿病条件下における肝線維化進展を有意に抑制することが示唆され、両薬剤の併用による相加効果が確認できた。

(5) OA 添加による小腸 L 細胞における GLP-1 分泌促進作用

小腸 L 細胞では TGR5 の活性化により cAMP 合成を介して GLP-1 が産生されるメカニズムが知られているため、まず OA(1-10 μM)を添加することによる cAMP の産生量を EIA キットを用いて測定した。その結果、OA 添加群では非添加群に比べて用量依存的に cAMP の産生が増加した(図 4A)。続けて、GLP-1 産生能への作用について ELISA キットを用いて同様に測定したところ、cAMP 産生への作用に呼応するように OA 添加により GLP-1 産生が増加していた (図 4B)。さらに GLP-1 関連遺伝子である *Gcg*, *Pc3* の mRNA 発現量も有意に増加していた (図 4C)。これらの結果から、OA 投与による OLETF ラットの血糖低下は GLP-1 分泌促進が関与している可能性が考えられた。

(6) OA、ANA 添加による肝星細胞への直接作用

まず細胞増殖への作用について WST-1 assay で検討したところ、DPP4 阻害薬である ANA 添加では濃度依存的に両細胞株の増殖が抑制された (図 5A)。一方で、OA 添加ではともに増殖に対する作用は認めなかった。また、線維化マーカーの発現に関しても ANA 添加では *Acta2*, *Col1a1*, *Tgfb1* の mRNA 発現レベルが低下していたが、OA では変化を認めなかった (図 5B)。このことから、ANA は血糖制御による肝脂肪化の抑制のみならず、肝星細胞への直接作用を介して OLETF ラットにおける肝線維化を抑制し得る可能性が示唆された。

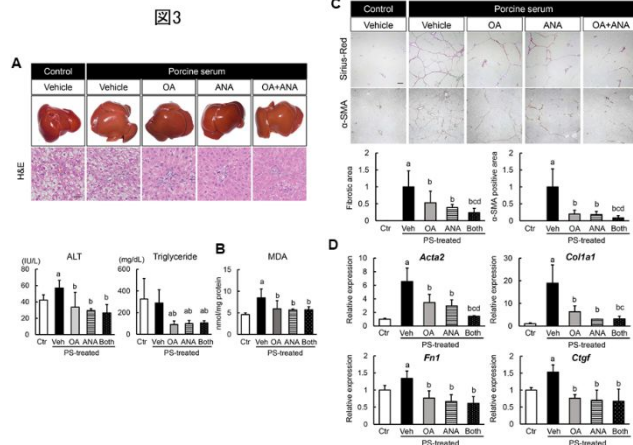


図4

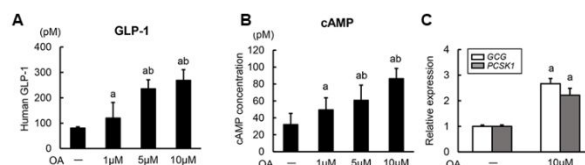
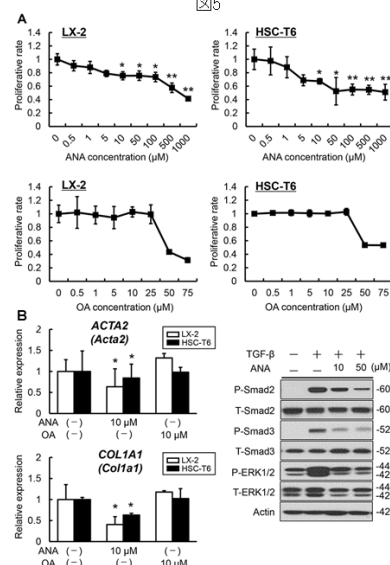


図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaya Daisuke, Kaji Kosuke, Tsuji Yuki, Yamashita Satoko, Kitagawa Koh, Ozutsumi Takahiro, Fujinaga Yukihisa, Takaya Hiroaki, Kawaratani Hideto, Moriya Kei, Namisaki Tadashi, Akahane Takemi, Yoshiji Hitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 TGR5 Activation Modulates an Inhibitory Effect on Liver Fibrosis Development Mediated by Anagliptin in Diabetic Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1153 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8101153	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP4阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第9回肥満と消化器疾患研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP4阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第6回肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR 5 アゴニストとDPP4阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR 5 アゴニストとDPP4阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP6阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第16回酸化ストレスと肝研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP6阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第4回臓器間ネットワーク研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP6阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP6阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第24回肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5 アゴニストとDPP4 阻害薬併用による糖尿病合併肝線維化治療の検討
3. 学会等名 第32回 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP4阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第9回肥満と消化器疾患研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 賀屋 大介
2. 発表標題 TGR5アゴニストとDPP4阻害薬の併用による糖尿病合併肝線維化モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第6回肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------