

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号: 17102

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2009~2011

課題番号: 21590850

研究課題名(和文) 全く新しいタイプの糖尿病治療薬 GLP-1 による脂肪肝・肝炎への治療応用の検討

研究課題名(英文) Analysis of therapeutic effects of GLP-1, novel anti-diabetic medication, on non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis.

研究代表者

加藤 正樹(KATO MASAKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 60444808

研究成果の概要(和文): ヒト脂肪肝における GLP-1R、DPP-4 の発現を定量化して正常肝と比較した。脂肪肝では GLP-1R、DPP-4 の発現が有意に上昇していた。肝細胞株 HepG2 に脂肪酸を添加すると、GLP-1R の発現は増大した。ラットに高脂肪食を与えて GLP-1 を投与したところ、体重増大抑制と脂肪肝の改善が認められた。このとき、脂肪や筋組織における脂肪酸酸化酵素の著明な発現増大が認められ、GLP-1 による新たな膵外作用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The mRNA expression levels of GLP-1R and DPP-4 were quantified in the livers with NAFLD patients and compared with normal subjects. The expression levels of both genes were significantly elevated in NAFLD liver. Fatty acids induced the expression of GLP-1R in HepG2 cells. Treatment with GLP-1 in rats fed high fat diet showed suppression of body weight gain and improvement of hepatic steatosis. Markedly elevated expression of fatty acids oxidation enzymes in adipose and muscle tissues were observed in these rats, suggesting new extrapancreatic actions of GLP-1 in these tissues.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード: 脂肪肝、脂肪性肝炎、GLP-1、糖尿病、インクレチン

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因第一位である心血管系疾患の主な原因は、肥満・糖尿病・高脂血症を含むメタボリックシンドロームであり、これに対する根本的治療が最重要課題である。

想定されている進展形式としては、肥満による脂肪細胞の巨大化に伴うアディポサイトカイン分泌の異常や脂肪酸分泌の増大により、組織のインスリン感受性が低下しイン

スリン抵抗性となる。糖取り込みが低下するために血糖は上昇し、インスリン分泌はさらに増大する。インスリンによる中性脂肪分解抑制効果が低下した脂肪組織からは、大量の遊離脂肪酸が放出され、肝に取り込まれる。高インスリン血症は肝の脂質合成を促進して脂肪肝となり、貯留した脂質は大量の VLDL として血中に放出され脂肪組織に脂質を供給する。さらに、インスリンによる糖新生抑

制効果が低下するために2型糖尿病が発症し、動脈硬化や循環障害にいたる。メタボリックシンドロームでは脂肪や筋、肝など多臓器にまたがって障害のリンクが次々に広がっていくため、いずれかのステップでこのリンクを断ち切ることがその進展阻止に必要である。

GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) は GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) と同様に腸管より分泌され、膵β細胞からのインスリン分泌を促進するインクレチン作用を有する物質である。GLP-1 はインスリン分泌促進作用以外にもグルカゴン分泌抑制、消化管運動抑制、食欲抑制などの生理的効果を持つため、優れた2型糖尿病治療薬として用いられつつある。GLP-1 受容体アゴニストである Exendin-4 を肥満・糖尿病動物である ob/ob マウスに投与すると、脂肪肝が完全に改善された (Hepatology 2006;43:173-181)。この報告では GLP-1 投与によって体重増大抑制、耐糖能異常の改善を認めており、GLP-1 による摂食量低下と血糖コントロール作用により脂肪肝が改善された可能性がある。同時に、単離された初代培養肝細胞では GLP-1 により cAMP 増大と脂質酸化の増強が見られたとされた。しかし、これまで GLP-1 が肝細胞に直接作用して代謝調整を行っているという確実な根拠はない。

2. 研究の目的

本研究では、GLP-1 シグナル系が脂肪肝の発症・増悪のメカニズムに関与しているかを解明する。さらに、GLP-1 による脂肪肝改善作用が、摂食量の低減と血糖制御効果によるものか、また肝細胞の代謝を直接制御する効果があるのか検討する。これらを解明するために、以下の3点を中心に検討を行う。

(1) ヒト脂肪肝での GLP-1 シグナル系の評価

肝生検標本より GLP-1 受容体 (GLP-1R) の mRNA 発現を定量化し、健常者と比較する。GLP-1R の発現レベルが、血清コレステロールや血糖などの代謝状態の指標と関連しているのか解析する。さらに、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を様々な栄養状態で培養し、GLP-1R の発現の変化を観察する。同様に、GLP-1 を分解する生理活性があるため、GLP-1 の負の制御因子として知られている DPP-4 の mRNA 発現に関しても解析を行う。

(2) 肝細胞に対する GLP-1 の直接効果の解析

GLP-1 受容体のアゴニスト Exendin-4 を HepG2 細胞に添加して培養し、脂質の合成や分解、VLDL としての放出等に関与する遺伝子

の発現レベルを定量化し、肝細胞への直接作用を検討する。

(3) GLP-1 による全身代謝への影響の検討
インスリン放出促進による血糖制御作用以外の効果を評価するために、糖尿病を有さない動物に高脂肪食を与えて脂肪肝モデルを作成し、その上で GLP-1 を投与する。3か月間ほど GLP-1 投与を継続し、体重や摂食量の変化を評価する。肝のみならず脂肪組織、筋組織より mRNA を抽出し、脂質の合成、取り込みや酸化に関与する遺伝子群を定量化して対照群と比較する。

3. 研究の方法

全てのヒト標本の使用に関しては、本研究に関して十分なインフォームドコンセントを得た上で解析を行った。動物実験に関しては当院動物実験倫理委員会の承認を得た上で研究を行った。

(1) ヒト脂肪肝での GLP-1 シグナル系の評価

2004年から2006年に九州大病院で肝生検を行った脂肪肝症例22例と、正常肝症例10例の標本から TRIzol reagent を用いて RNA を抽出し、GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems) によって cDNA を合成する。これを基質として LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green1 (Roche) のシステムを用いて GLP-1R 及び DPP-4 に対する定量的 Real-time PCR (RT-PCR) を行った。各症例の血液生化学データに関しては、肝障害の指標として aspartate amino transferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) を用い、代謝障害の指標として血清総コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖値を用いた。

HepG2 細胞株は 10% fetal bovine serum を添加した DMEM 培地で培養した。栄養条件による影響を解析するために、低グルコース (100mg/dl)、高グルコース (400mg/dl)、低インスリン (0.001ng/ml)、高インスリン (1ng/ml)、オレイン酸 (1mM)、パルミチン酸 (1mM) を添加し、24時間培養後に RNA を回収し、GLP-1R および DPP-4 の mRNA 発現を RT-PCR で定量化した。

(2) 肝細胞に対する GLP-1 の直接作用の解析

HepG2 細胞株を上記条件で培養し、GLP-1 受容体アゴニスト Exendin-4 を最終濃度 100nM となるように培養液に添加した。24時間培養後に RNA を回収し、代謝制御遺伝子群の発現を解析した。脂肪酸合成系として acetyl-CoA carboxylase (ACC) 1、fatty acid synthase (FAS)、stearoyl-CoA

desaturase (SCD)、これらを活性化する転写因子として sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 1c、carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) を選択し、糖新生系として glucose-6-phosphatase (G6Pase)、糖取り込み系として glucose transporter (GLUT) 2、liver type glucokinase (L-GK) を選択し解析した。

(3) GLP-1 による全身代謝への影響の検討

4週齢の Wistar rat を以下の3群に分けた。コントロール群：通常食を摂取、高脂肪食群：high fat diet (HFD) を摂取、GLP-1 群：HFD を摂取。1か月後に、GLP-1 群には GLP-1 受容体アゴニストとして exenatide 10 μ g/kg/日の腹腔内投与を開始した。各群の食事内容は変更せず、exenatide を3か月間投与して体重、摂食量を評価した。肝組織で脂肪肝のレベルを評価した。肝、脂肪及び筋組織より RNA を抽出し、脂質代謝を制御する遺伝子群の発現を RT-PCR で定量化した。脂肪酸合成系として、FAS、ACCl、SREBP1c、脂肪酸酸化系として long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD)、hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADHA)、acyl-CoA oxidase (ACOX)、carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1、中性脂肪取り込み系として lipoprotein lipase (LPL)、hormone sensitive lipase (HSL)、VLDL 放出系として apolipoprotein B (apoB) を測定した。さらに、脂肪酸代謝増大に伴って発生する活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) 除去系として catalase、superoxide dismutase (SOD) および脱共役蛋白質 uncoupling protein: UCP2、3 を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト脂肪肝での GLP-1 シグナル系の評価

正常肝の GLP-1R の発現量を 1.0 とすると、脂肪肝での発現量 (相対値) は 4.43 ± 6.78 と有意に増大していた。脂肪肝症例を GLP-1R の発現量の多寡で2群に分類した。血清 AST (U/L)、 γ GTP (U/L)、総コレステロール (mg/dl)、中性脂肪 (mg/dl)、空腹時血糖 (mg/dl) を評価すると、GLP-1R 低値群 (0.24 ± 0.24) では 87.1、109、214、168、123、GLP-1R 高値群 (9.21 ± 7.47) では 32.6、43.9、168、115、108 と、GLP-1R 高値群の肝障害は軽度である傾向があった。インスリン抵抗性の指標である homeostasis model assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR) で脂肪肝群を分類したところ、GLP-1R 発現量は HOMA-IR 2.5 未満群 (n=10) で 0.99 ± 1.22 に対して、2.5 以上の群 (n=12) では 6.87 ± 8.59 と増大していた。

同様にヒト脂肪肝標本における DPP-4 の発現を評価した。正常例での発現を 1.0 とすると、脂肪肝では 16.2 ± 11.3 と有意に増大していた ($p < 0.001$)。DPP-4 の肝での発現量と血中インスリン濃度との相関を評価すると、有意な負の相関が得られた ($r = -0.683$, $p = 0.0137$)。同様に、HOMA-IR との相関を評価すると、DPP-4 とは負の相関が見られた ($r = -0.5882$, $p = 0.053$)。血清コレステロール値とは正の相関 ($r = 0.597$, $p = 0.0147$) を示したが、中性脂肪濃度とは相関しなかった。

様々な栄養条件下での HepG2 細胞における GLP-1R の発現の検討を行った。低グルコースで培養した場合の GLP-1R の発現を 1 とすると、高グルコースでは 1.49 ± 0.45 と増大し、高インスリン条件では 0.76 ± 0.14 と低下した。オレイン酸 (1mM) 添加時には 1.02 ± 0.53 、パルミチン酸添加時には 3.22 ± 1.14 と飽和脂肪酸添加により GLP-1R の発現は増大した。DPP-4 の発現に関しては、高グルコースの培養下では 1.87 ± 0.32 ($p < 0.05$) と増大していた。しかし、高インスリン条件 (20ng/ml) では影響されなかった。オレイン酸添加時には 0.52 ± 0.16 、パルミチン酸添加時には 0.63 ± 0.27 と DPP-4 の発現は低下する傾向が認められた。

脂肪肝では正常肝と比較して GLP-1R および DPP-4 は共に高発現しており、脂肪肝の発症・進展に GLP-1 シグナル系が関与していることが示唆された。脂肪肝症例では GLP-1R の発現はインスリン抵抗性と正に相関、DPP-4 の発現は負に相関しており、インスリン抵抗性が肝における GLP-1 シグナル系に深く関与していることが示された。

(2) 肝細胞に対する GLP-1 の直接作用の解析

Exendin-4 非添加群を 1.0 として相対評価すると、Exendin-4 添加群における各遺伝子の発現は、脂肪酸合成系: ACC1: 0.97 ± 0.19 、FAS: 0.92 ± 0.11 、SCD: 0.99 ± 0.26 、SREBP1c: 1.15 ± 0.30 、ChREBP: 0.99 ± 0.27 、糖新生系: G6Pase: 0.99 ± 0.20 、糖取り込み系: L-GK: 5.08 ± 5.7 、GLUT2: 0.81 ± 0.11 であった。糖取り込み系の L-GK が Exendin-4 添加にて増大している以外にはほぼ両群に有意差はなく、GLP-1 シグナル系は一部を除いて肝細胞の脂質・糖代謝に直接影響していない可能性が高いことが示唆された。

(3) GLP-1 による全身代謝への影響の検討

Wistar rat に高脂肪食を与え、exenatide を投与して全身の代謝状態を評価した。3か月後の各群の体重は、コントロール群 521 g、HFD 群 584 g、GLP-1 群 368 g と GLP-1 群は有意に低下していた。一日摂食量はコントロール群 26.8 g、HFD 群 19.7 g、GLP-1 群 13.7

gであったが、体重 100 gあたりの摂食量は HFD 群 3.4 g、GLP-1 群 3.7 g で差を認めなかったことから、GLP-1 投与群ではいずれかの組織で過剰栄養を消費していることが示唆された。HFD 群の肝組織は顕著な脂肪肝であったが、GLP-1 群はコントロール群と同様脂肪肝を認めなかった。各組織の代謝状態を代表的遺伝子の発現で評価した。コントロール群における mRNA 発現量を 1.0 とした。肝での脂肪酸合成系では、FAS:HFD 群 2.5±2.6 : GLP-1 群 2.4±2.8、ACC 1 : 1.25±0.59 : 1.2±0.51、SREBP1c : 2.2±1.2 : 1.5±0.85、脂肪酸取り込み系では LPL : 0.85±0.37 : 0.75±0.25、HSL : 1.34±0.52 : 1.25±0.32、VLDL としての放出系は ApoB : 1.0±0.34 : 0.87±0.22、酸化系では LCAD : 1.2±0.42 : 0.94±0.22、HADHA : 0.82±0.23 : 0.70±0.239、ACOX : 0.73±0.31 : 0.71±0.37、CPT1 : 0.92±0.45 : 0.76±0.42 であった。これらの結果からは、高脂肪食で脂肪酸合成は活性化しているものの GLP-1 による変化は見られず、また脂質の取り込みや放出、酸化に関しても GLP-1 は肝に対して有意な影響を与えていない可能性が示された。筋における代謝を評価すると、脂肪酸合成系として FAS : 1.45±0.62 : 0.85±0.21、SCD : 0.99±0.55 : 0.75±0.93、SREBP1c : 1.25±0.51 : 1.21±0.63、脂質取り込み系として LPL : 3.2±2.19 : 5.47±4.47、HSL : 1.35±0.64 : 1.87±0.87、ATGL : 1.9±0.55 : 2.52±1.04、酸化系として CPT1 : 1.25±0.32 : 1.46±0.62、LCAD : 2.10±0.66 : 1.95±0.77、HADHA : 1.85±0.85 : 1.95±1.05 であった。この結果から、筋では高脂肪食にて中性脂肪の分解と脂質の酸化が亢進しているが、GLP-1 投与はとくに中性脂肪の分解を促進して、効率よくエネルギーに転換していることが示された。脂肪組織における代謝を評価すると、脂質取り込み系として HSL : 0.95±0.44 : 1.45±0.33、LPL : 1.12±0.27 : 1.35±0.37、ATGL : 0.85±0.29 : 1.86±0.45 と GLP-1 投与により中性脂肪の分解は亢進していた。脂質酸化系として CPT1 : 1.04±0.27 : 1.95±0.95、LCAD : 1.21±0.15 : 2.43±0.75、HADHA : 1.35±0.22 : 2.32±0.63、ACOX : 1.45±0.32 : 2.4±0.75 であり、GLP-1 投与によって脂肪組織におけるミトコンドリアやペルオキシソームでの脂質の酸化が亢進している状態が示された。さらに、catalase : 1.12±0.29 : 2.36±0.66、SOD : 1.01±0.21 : 1.45±0.25 と GLP-1 投与により ROS 除去システムも活性化していた。これらの結果より、GLP-1 による脂肪肝改善メカニズムは肝での脂質合成抑制や酸化促進作用ではなく、筋や脂肪組織における脂質の消費・燃焼作用による可能性が高いこと、また脂質の酸化に伴って生じる ROS を消去する生理的防御機構を活性化することが示唆された。

(4) 研究成果のまとめ

本研究の結果から、脂肪肝では GLP-1R や DPP-4 を介した GLP-1 シグナル系が活性化していることが示された。GLP-1 投与は肝内の脂質代謝には大きな影響を与えなかったが、筋や脂肪組織での脂質の燃焼を促進していることが示唆された。筋や脂肪組織に対する GLP-1 の効果はこれまでに知られておらず、本研究により新たな GLP-1 の膵外作用の可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Miyazaki M, Kato M, Tanaka M, Kohjima M, Nakamura K, Enjoji M, Nakamuta M, Kotoh K, Takayanagi R. Increased hepatic expression of dipeptidyl peptidase-4 in non-alcoholic fatty liver disease and its association with insulin resistance and glucose metabolism. Mol Med Report [査読あり] 5:729-733, 2012.
DOI 10.3892/mmr.2011.707

Higuchi N, Kato M, Tanaka M, Miyazaki M, Takao S, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M, Nakamuta M, Takayanagi R. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP, and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. Experimental and Therapeutic Medicine [査読あり] 2:1077-81, 2011.
DOI 10.3892/etm.2011.328

[学会発表] (計 2 件)

田中紘介、加藤正樹 GLP-1 投与による NAFLD 肝改善メカニズムの解明 第 48 回日本肝臓学会総会 平成 24 年 6 月 8 日 金沢 (予定)

宮崎将之、樋口野日斗、加藤正樹、古藤和浩、高柳涼一 NAFLD 症例における DPP-4 発現の評価 第 38 回日本肝臓学会東部会 平成 22 年 12 月 2 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

九州大学病態制御内科肝臓研究室
http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed3/general_3.html#ken

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 正樹 (KATO MASAKI)
九州大学病院・大学病院・助教
研究者番号：60444808

(2) 研究分担者

古藤 和浩 (KOTOH KAZUHIRO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：80289579

(3) 連携研究者

()

研究者番号：