

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460999

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎の肝病態におけるインクレチン作用機序の解明

研究課題名(英文)The investigation of contribution of incretin to the pathogenesis of NASH

研究代表者

岡本 宣人 (Okamoto, Nobuto)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：10346710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態におけるインクレチンの肝臓への直接作用機序について検討した。肝細胞表面にはわずかながらGLP-1受容体(GLP-1R)が発現していた。さらに、GLP-1Rを肝細胞に過剰発現させる実験系を用いることにより、インクレチンの肝細胞への直接作用による糖代謝およびNASH発症病態への関与が明らかとなった。さらに、インスリンシグナルにおけるIRS-1, 2とのクロストークを介することで肝臓における糖代謝に重要な役割を果たしていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The direct mechanisms of contribution of incretin to hepatocytes on the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) was investigated. We found GLP-1 receptor (GLP-1R) expressed on the hepatocytes. It was clarified that incretin contributed glucose metabolisms and pathogenesis of NASH by overexpression of GLP-1R on hepatocytes. In addition, it was clarified that this system had close talk with insulin signal, IRS-1, -2, and had important roles for the glucose metabolisms in liver.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝臓学 非アルコール性脂肪肝炎 インクレチン GLP-1 receptor

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) とその進行型の病態である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、肥満、糖尿病、インスリン抵抗性などを背景病態としており、治療においてもこれらの改善が重要である。近年、数々のインクレチン関連薬が登場し、糖尿病治療においてその有用性が徐々に明らかになっており、NAFLD、NASH に対する治療薬としても期待されている。NASH への治療効果として、血糖上昇時のみインスリン分泌刺激を行うことにより、インスリン抵抗性および分泌遷延化を抑制するとともに、糖毒性を改善することにより NASH の病態を改善しているとされている。インクレチンは膵臓への直接作用のみならず、膵外作用が存在することも知られており、その主なものとしては、中枢神経系への働きにより食欲を抑制することで、体重減少および耐糖能異常を改善する効果などである。さらに、消化管への直接作用も知られており、食物の胃からの排泄を抑制することで食欲の抑制効果を発揮するとされている。その一方、肝臓への直接作用も想定されてきたものの、肝細胞表面におけるインクレチン受容体の存在はこれまで明らかになっておらず、直接作用の有無を含め詳細なメカニズム解明がなされていなかった。

## 2. 研究の目的

インクレチンによる肝臓への直接作用を介した NASH の病態改善における作用メカニズムを基礎的、臨床的に明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) インクレチン投与により NASH の改善は認められるのか。NASH モデル動物における検討

インクレチンのうち GLP-1 アナログである exendin-4 を、2 種類の NASH モデルマウスである GTG+HF マウスおよび ob/ob マウスに対し、皮下埋め込み型注入ポンプにより持続的に exendin-4 を安定的に投与した。exendin-4 投与により肝臓内における糖質・脂質代謝がどのように変化するのか、また、それに関連する因子の発現、活性化にどのように影響を与えているかを解析した。

### (2) インクレチン投与による血糖上昇およびインスリン分泌のパターンの変化の検討

NASH に特徴的な食後超早期の血糖上昇や強いインスリン抵抗性の存在などの耐糖能異常が、インクレチンとくに GLP-1 アナログにより改善できるかどうかを検討した。検討の方法としては、2 種類の NASH モデルマウスに対し、皮下埋め込み型注入ポンプにて exendin-4 を 2 週間持続投与したのちに、グ

ルコーストレランステスト (GTT) およびインスリントレランステスト (ITT) を行い、それぞれの血糖値とインスリン分泌の変動を解析し、野生型マウスとの比較検討にて GLP-1 が肝臓に及ぼす影響について解析を行った。

### (3) インクレチンによる肝細胞への直接作用は NASH の病態改善に関与しているか

GLP-1 による肝臓への直接作用についての詳細な検討を行う目的で、GLP-1R 発現ベクターを肝臓特異的に過剰発現させる手法を用いて、GLP-1 の肝細胞に及ぼす直接的な影響について解析を行った。albumin promoter, AFPenhancer を有する pLIVE-SEAP vector に対し GLP-1R 遺伝子を挿入し (pLIVE-GLP-1R vector)、C57BL/6 マウスの尾静脈から投与することにより、GLP-1R は 24 時間以内には高発現状態となり、7~10 日目までにピークに達し、その後 8 ヶ月間は安定して高発現が続く。GLP-1R 遺伝子の transient な投与による過剰発現にて NASH の病態が改善するかどうかについて検討を行った。

### (4) インクレチンによる肝細胞内シグナル伝達機構の検討

GLP-1R 発現ベクター投与を NASH モデルマウスおよび通常マウスに施行することによる GLP-1R の肝細胞での過剰発現システムを用いて、肝細胞内シグナル伝達、特にインスリンシグナルとのクロストークについて解析を行った。

## 4. 研究成果

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態におけるインクレチンの肝臓への直接作用機序について検討したところ、肝細胞表面にはわずかではあるが、マウスのみならず人間の肝細胞においても GLP-1 受容体 (GLP-1R) が発現していることが明らかとなった。さらに、その作用を増強するために発現ベクターを用いて GLP-1R を肝細胞特異的に過剰発現させ、脂肪肝および糖代謝への影響を検討したところ、体重の減少は認めないものの、肝臓でのインスリン抵抗性改善により肝脂肪化の改善効果があることが明らかとなった。さらに、糖負荷によるインスリン分泌亢進だけでなく、肝臓への糖の取り込み量の増加など、肝臓への直接作用に基づき血糖を調整する作用を有していることも明らかとなった。

GLP-1 の作用機序として、膵臓や全身のみならず、肝細胞上の GLP-1R を介した肝臓への直接を通じた作用で肝の脂肪化、糖代謝を改善する作用があることが明らかとなった。さらに、インスリンシグナルにおける IRS-1, 2 とのクロストークを介することで肝臓における糖代謝に重要な役割を果たしていることも明らかとなった。

## 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 60 件)

- ① Ochi T, Munekage K, Ono M, Higuchi T, Tsuda M, Hayashi Y, Okamoto N, Toda K, Sakamoto S, Oben JA, Saibara T : Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through X-box binding protein 1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. *Hepatol Res* 46:584-92. 2016. 査読有  
DOI: 10.1111/hepr.12587.
- ② Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Taguri M, Hyogo H, Sumida Y, Ono M, Eguchi Y, Inoue T, Yamanaka T, Wada K, Saito S, Nakajima A: Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography . *Gastroenterology* 150 : 626-37. 2016. 査読有  
DOI: 10.1053/j.gastro.2015.11.048.
- ③ Kamada Y, Ono M, Hyogo H, Fujii H, Sumida Y, Mori K, Tanaka S, Yamada M, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Yamamoto A, Takamatsu S, Yoshida Y, Itoh Y, Kawada N, Chayama K, Saibara T, Takehara T, Miyoshi E : A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis using two glyco-biomarkers . *Hepatology* 62 : 1433-43. 2015. 査読有  
DOI: 10.1002/hep.28002.
- ④ 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* 49 : 1065-73 . 2014. 査読有  
DOI: 10.1007/s00535-013-0852-8.
- ⑤ Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K : Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon-alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol*

Res. 44 : 410-9. 2014. 査読有

DOI: 10.1111/hepr.12139.

- ⑥ 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* 8: e76161. 2013. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0076161
- ⑦ Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O : Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. *J Clin Invest* 123:834-43. 2013. 査読有  
DOI: 10.1172/JCI65188.

[学会発表] (計 56 件)

- ① 宗景玄祐, 小野正文, 西原利治 : 高インスリン血症は糖尿病未発症 NAFLD 患者の肝線維化進展に重要な因子である. 第41回日本肝臓学会西部会. パネルディスカッション「NAFLD の病態と治療」, 2015.12.3-4. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ② Kamada Y, Ono M, Hyogo H, Fujii H, Sumida Y, Mori K, Tanaka S, Yamada M, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Yamamoto A, Takamatsu S, Yoshida Y, Itoh Y, Kawada N, Chayama K, Saibara T, Takehara T, Miyoshi E : A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) using two glyco-biomarkers . *AASLD The Liver Meeting* . 2015.11.13-17. Sanfrancisco (USA)
- ③ Kogiso T, Hashimoto E, Hyogo H, Nakajima T, Ono M, Kawaguchi T, Honda K, Eguchi Y, Nozaki Y, Kawanaka M, Imajo K, Sumida Y, Kamada Y, Fujii H, Suzuki Y, Tokushige K : Risk factors for hepatocellular carcinoma recurrence in patients with nonalcoholic and alcoholic fatty liver disease : A Japanese multicenter survey. *AASLD The Liver Meeting* . 2015.11.13-17. Sanfrancisco (USA)
- ④ 越智経浩, 小野正文, 西原利治 : C 型慢性肝炎患者と NAFLD 患者の血糖日中変動

- に影響を及ぼす要因についての比較検討. 第 101 回日本消化器病学会総会. パネルディスカッション「生活習慣病・メタボリックシンドロームと消化器疾患: 病態と治療」. 2015. 4. 23-24. 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ⑤ 小野正文, 増田弘誠, 宗景玄祐, 越智経浩, 廣瀬享, 西原利治, 福本光孝, 西岡明人, 小川恭弘: NAFLD 患者における肝脂肪化に対する肝脂肪酸β酸化能の影響-男女の比較解析結果より-. 第 10 回消化器病における性差医学・医療研究会. 2014. 7. 26. TKP ガーデンシティ品川 (東京)
- ⑥ 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, 2014. 6. 13-17. San Francisco (USA)
- ⑦ 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, 2014. 5. 29-30. ホテルニューオータニ (東京)
- ⑧ 小野正文, 川口巧, 西原利治: CGMS からみた NAFLD と C 型慢性肝炎の耐糖能異常の特徴と比較検討. 第 100 回日本消化器病学会総会. ワークショップ「NAFLD/NASH における新知見と治療法の進歩」, 2014. 4. 23-26. 東京国際フォーラム (東京)
- ⑨ Eguchi Y, Kitajima Y, Takahashi H, Ono M, Okada M, Hyogo H, Sumida Y, Araki N, Ono N, Eguchi T, Iwakiri R, Anzai K, JSG-NAFLD: Insulin secretory function and HbA1c are related to liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. EASL (49th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver). 2014. 4. 9-13. London (UK)
- ⑩ 越智経浩, 宗景玄祐, 小野正文: 耐糖能異常からみた NAFLD の組織学的, 生化学的特徴についての検討. 第 40 回日本肝臓学会西部会. ワークショップ「NAFLD/NASH の病態と治療」, 2013. 12. 6-12. 7. 長良川国際会議場・岐阜都ホテル (岐阜県・岐阜市)
- ⑪ Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Kanemasa K, Yoneda M, Imajyo 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. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013, 2013. 11. 1-5. Washington (USA)
- ⑫ Imajyo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Kirikoshi H, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y, Ono M, Saito S, Wada K, Nakajima A: Small dense low-density lipoprotein as a useful biomarker for predicting arteriosclerotic diseases in nonalcoholic steatohepatitis. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013, 2013. 11. 1-5. Washington (USA)
- ⑬ 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. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013, 2013. 11. 1-5. Washington (USA)
- ⑭ 小野正文, 羽柴基, 石川洋一, 永田友梨, 吉岡玲子, 越智経浩, 宗景玄祐, 小笠原光成, 廣瀬享, 高橋昌也, 岩崎信二, 西原利治: 24 時間血糖測定から見た C 型慢性肝炎患者と NAFLD 患者の耐糖能異常の相違についての検討. 第 55 回日本消化器病学会大会. 2013. 10. 9-12 グランドプリンス高輪他 (東京)
- ⑮ 小野正文, 宗景玄祐, 越智経浩, 小笠原光成, 廣瀬享, 高橋昌也, 岩崎信二, 西原利治: NAFLD における肝脂肪化, 線維化に及ぼす耐糖能異常についての男女別検討. 第 9 回消化器病における性差医学・医療研究会. 2013. 8. 3. 大阪大学中之島センター (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 宣人 (OKAMOTO, Nobuto)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・講師  
研究者番号：10346710

(2) 研究分担者

西原 利治 (SAIBARA, Toshiji)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・教授  
研究者番号：60145125

小野 正文 (ONO, Masafumi)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・准教授  
研究者番号：70304681