

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461018

研究課題名(和文) NASHの発症進展に関わる生活習慣病態と凝固線溶系を標的とした新規治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of new treatment targeting lifestyle diseases and coagulation fibrinolytic system related to the development of NASH

研究代表者

野口 隆一 (Noguchi, Ryuichi)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：30423908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラットNASHモデルにおいて、ARB製剤、DPP-IV阻害剤は活性化肝星細胞やTGF- β 1の発現を抑制することで肝線維化を抑制し、両薬剤の併用は単独投与に比しさらに有意な抑制効果を認めた。糖尿病治療薬であるSGLT-2阻害剤はインスリン抵抗性改善効果を介して間接的に肝線維化を抑制した。PAI-1阻害剤は、肝線維化を抑制し、in vitroで活性化肝星細胞の細胞増殖やTGF- β 1 mRNA、 α 1 collagen mRNAの発現抑制を認め、活性化肝星細胞への直接作用により肝線維化を阻害することが明らかとなった。臨床研究にてDPP-IV阻害剤の2型糖尿病を有する脂肪性肝疾患治療効果の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the rat NASH model, ARB and DPP-IV inhibitor inhibited liver fibrosis along with suppression of activated hepatic stellate cells (Ac-HSCs) and TGF- β 1 expression, and treatment with both drugs further suppressed significantly as compared with either single agent. SGLT-2 inhibitor, which is a drug for treating diabetes mellitus, indirectly suppressed liver fibrosis through the insulin resistance-improving effect. PAI-1 inhibitor markedly inhibited the development of liver fibrosis along with suppression of Ac-HSC. Our in vitro data showed that PAI-1 inhibitor directly suppressed proliferation of Ac-HSCs, expression of TGF- β 1 mRNA and α 1 collagen mRNA. Furthermore, clinical studies suggested the possibility of DPP-IV inhibitor for treating fatty liver disease with type 2 diabetes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：NASH 生活習慣病 ARB DPP-IV阻害剤 SGLT-2阻害剤 PAI-1阻害剤

1. 研究開始当初の背景

NASH(nonalcoholic steatohepatitis;非アルコール性脂肪肝炎)の病態進展に酸化ストレス、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームの関与があげられており、インスリン抵抗性改善薬としてピオグリタゾン、メトホルミンといった糖尿病治療に用いられている薬剤や、酸化ストレスを緩和するビタミンEなど病態を考慮した治療薬の選択がなされているが、実際の臨床においては単独薬剤での治療効果は十分でなく、NASHにおける新規薬物治療が期待されている。

一方、生活習慣病と凝固線溶系異常との関連において、なかでも線溶阻害因子である plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)は、肝細胞のみならず脂肪細胞で産生・分泌されるアディポサイトカインの一つであることが明らかとなっている。脂肪細胞における PAI-1 の発現はインスリンや TNF- α 、TGF- β などのサイトカインによって著明に促進され、酸化ストレス、インスリン抵抗性の増強やメタボリックシンドロームとの関連が示唆され、生活習慣病や NASH の病態進展において PAI-1 の役割が注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、臨床応用を目指し基礎的研究にて種々の生活習慣病治療薬を用いた NASH 治療の可能性を検討し、生活習慣病治療薬によるカクテル療法などの新たな治療法を確立する。また、これまで明らかにされていない NASH の発症進展に関わる生活習慣病態と凝固線溶系のクロストークをターゲットとして基礎的・臨床的に解析を加える。特に線溶阻害因子である PAI-1 に注目し、新規経口 PAI-1 阻害剤を用いた NASH における新規治療の開発とともに、PAI-1 を含めた NASH 診断・治療のバイオマーカーの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 基礎的検討：インスリン抵抗性を呈する OLETF ラットにブタ血清を腹腔内投与し作成した実験的ラット NASH モデルとコリン欠乏アミノ酸食を投与し肝脂肪化と線維化を誘発する実験的ラット NASH モデルを用いて、降圧剤である ARB(Angiotensin type 1 receptor blocker)製剤、糖尿病治療薬である DPP(dipeptidyl peptidase)-IV 阻害剤、SGLT(sodium-glucose cotransporter)-2 阻害剤を用いて、肝線維化に与える影響や線維化における主要な因子である TGF- β 、 α 1 collagen mRNA の発現について検討した。また同様に、新規経口 PAI-1 阻害剤(TM5275)を用いて、検討を行った。*In vitro*では、肝線維化に重要な働きをする活性化肝星細胞を中心に検討した。

(2) 臨床的検討：脂肪肝を有する糖尿病患者を対象とした多施設共同研究(UMIN 00008068)を行い、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)進展過程に及ぼす DPP-IV 阻害剤の効果について NASH 診断に有用とされている IRI、フェリチン、IV 型コラーゲン 7S を用いる modified NAFIC score (m-NAFIC)を中心に検討した。

4. 研究成果

(1) 基礎的検討：ARB 製剤、DPP-IV 阻害剤各薬剤単独投与が肝線維化に重要な働きをする活性化肝星細胞や、線維化における主要な因子である TGF- β 発現を抑制し、肝線維化を抑制した。また、両薬剤の併用は単独投与に比しさらに有意な抑制効果を認めた。SGLT-2 阻害剤は、活性化肝星細胞に対する直接的作用は認めずインスリン抵抗性改善効果を介して間接的な肝線維化を抑制することが明らかとなった。新規経口 PAI-1 阻害剤は活性化肝星細胞の抑制を伴い、ラット NASH モデルの肝線維化を抑制した(図1)。

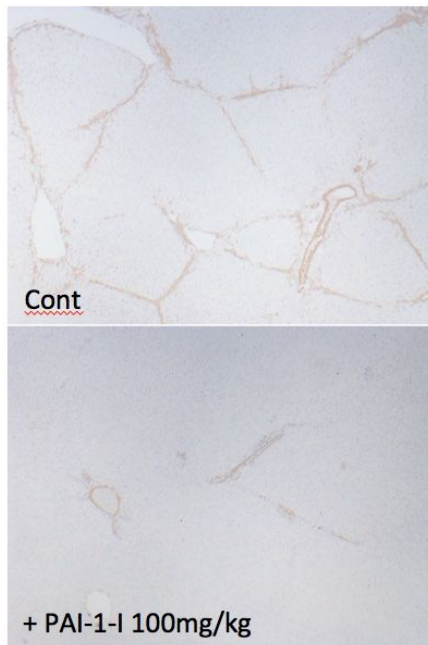


図1 OLETF ラット+ブタ血清モデルにおける PAI-1 阻害剤の肝線維化・活性化肝星細胞の抑制効果 (SMA 免疫染色)

In vitro において、活性化肝星細胞に TGF- β 添加すると PAI-1 mRNA の発現を促進し、その効果は PAI-1 阻害剤で抑制された(図 2)。PAI-1 阻害剤は活性化肝星細胞の細胞増殖を抑制 (WST assay) し、TGF- β mRNA や α 1 collagen mRNA の発現抑制を認めた。また、TGF- β や recombinant PAI-1 は用量依存性に活性化肝星細胞増殖を促進し、PAI-1 阻害剤はそれを抑制した (図 3)。

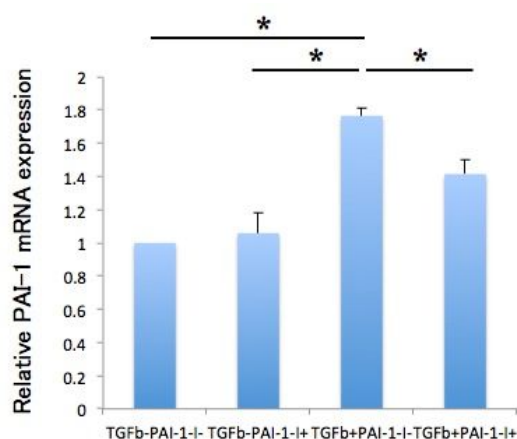


図2 活性化肝星細胞における TGF- β 刺激による PAI-1 mRNA 発現と PAI-1 阻害剤による抑制効果 (* p<0.05)

PAI-1 はパラクライン及びオートクラインの双方で活性化肝星細胞に作用することで肝線維化を促進し、PAI-1 阻害剤は活性化肝星細胞への直接作用により肝線維化進展を阻害することが示唆された。

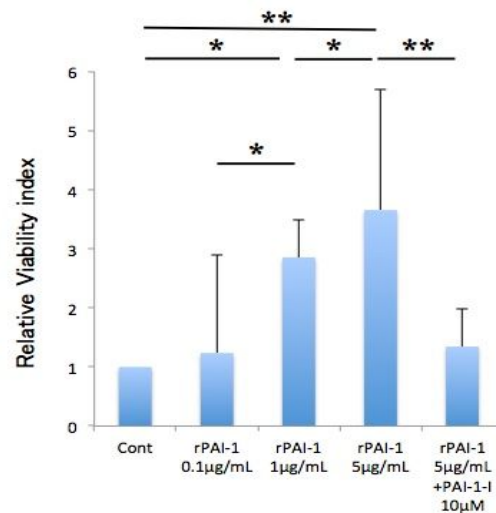


図3 活性化肝星細胞における recombinant PAI-1 の細胞増殖促進作用と PAI-1 阻害剤による抑制効果 (*p<0.05、**p<0.01)

(2) 臨床的検討：多施設共同研究の結果、DPP-IV 阻害剤は糖尿病合併 NAFLD 患者において m-NAFLC を有意に改善した。投与前の IRI、フェリチンが高く、HbA1c 値が比較的低い 2 型糖尿病患者ほど NAFLD に対する DPP-IV 阻害剤の臨床的効果が期待できる可能性が示唆された (Biomed Rep. 2016 Feb;4(2):183-187.)。

(3) 成果のまとめ

本研究において、すでに臨床で使用されている生活習慣病治療薬を用いた NASH の治療効果を基礎的・臨床的に検討し論文報告した。また、新たにアディポサイトカインとしても注目されはじめた線溶阻害因子である PAI-1 が NASH の発症・進展過程において、TGF- β を介して活性化肝星細胞に作用し肝線維化を促進すること、さらに PAI-1 阻害剤

が NASH 進展を抑制する可能性が示唆された (論文投稿中)

新規経口 PAI-1 阻害剤は、新たな抗血栓薬として臨床応用に向けて開発中であり、本薬剤を用いて腎臓や肺など他臓器においても線維化過程における PAI-1 阻害効果が解明されつつあり (Nature Reviews. Nephrology. 2011, Am J Respir Cell Mol Bio. 2012)、今後 PAI-1 をターゲットとした新たな肝疾患治療法の確立につながることを期待される。

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 5 件)

Combined treatment with dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (sitagliptin) and angiotensin-II type 1 receptor blocker (losartan) suppresses progression in a non-diabetic rat model of steatohepatitis. Okura Y, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Takeda K, Kaji K, Noguchi R, Nishimura N, Seki K, Kawaratani H, Takaya H, Sato S, Sawada Y, Shimozato N, Furukawa M, Nakanishi K, Saikawa S, Kubo T, Asada K, Yoshiji H. Hepatol Res. 2016 Dec 28. [Epub ahead of print]

DNA methylation of angiotensin II receptor gene in nonalcoholic steatohepatitis-related liver fibrosis. Asada K, Aihara Y, Takaya H, Noguchi R, Namisaki T, Moriya K, Uejima M, Kitade M, Mashitani T, Takeda K, Kawaratani H, Okura Y, Kaji K, Douhara A, Sawada Y, Nishimura N, Seki K, Mitoro A, Yamao J, Yoshiji H. World J Hepatol. 2016 Oct 8;8(28):1194-1199.

Ipragliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, ameliorates the development of liver fibrosis in diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Nishimura N, Kitade M, Noguchi R, Namisaki T, Moriya K, Takeda K, Okura Y, Aihara Y, Douhara A, Kawaratani H, Asada K, Yoshiji H. J Gastroenterol. 2016 Dec;51(12):1141-1149.

Efficacy of alogliptin in preventing non-alcoholic fatty liver disease progression in patients with type 2 diabetes. Mashitani T, Noguchi R, Okura Y, Namisaki T, Mitoro A, Ishii H, Nakatani T, Kikuchi E, Moriyasu H, Matsumoto M, Sato S, An T, Morita H, Aizawa S, Tokuoka Y, Ishikawa M, Matsumura Y, Ohira H, Kogure A, Noguchi K, Yoshiji H. Biomed Rep. 2016 Feb;4(2):183-187.

Beneficial effects of combined ursodeoxycholic acid and angiotensin-II type 1 receptor blocker on hepatic fibrogenesis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Namisaki T, Noguchi R, Moriya K, Kitade M, Aihara Y, Douhara A, Nishimura N, Takeda K, Okura Y, Kawaratani H, Takaya H, Seki K, Yoshiji H. J Gastroenterol. 2016 Feb;51(2):162-72.

[学会発表] (計 6 件)

西村典久、北出光輝、野口隆一、吉治仁志、他. SGLT2 阻害薬は糖尿病発症ラット肝線維化モデルにおいて耐糖能異常改善を介した肝線維化抑制効果を有する. 日本門脈圧亢進症学会、2016 年 9 月 9 日～10 日、兵庫

野口隆一、浪崎正、守屋圭、北出光輝、

西村典久、吉治仁志、他. ウイルス性肝炎における肝線維化診断バイオマーカーの確立. 日本肝臓学会大会、2016 年 11 月 3 日～6 日、兵庫

大倉康志、浪崎正、野口隆一、守屋圭、北出光輝、西村典久、吉治仁志、他. DPP4 阻害薬及びアンギオテンシン II 受容体拮抗薬併用による肝病態進展抑制効果. 第 102 回日本消化器病学会総会、2016 年 4 月 22 日～23 日、東京

西村典久、北出光輝、野口隆一、吉治仁志、他. 糖尿病発症ラットにおける非環式レチノイドとアンギオテンシン II 受容体拮抗薬の併用による肝発癌抑制効果. 第 24 回日本がん転移学会学術集会、2015 年 7 月 23 日～24 日、大阪

野口隆一、西村典久、吉治仁志、他. アンギオテンシン II・アルドステロンを標的とする肝癌治療：血管新生の観点から. 第 24 回日本がん転移学会学術集会、2015 年 7 月 23 日～24 日、大阪

増谷剛、野口隆一、吉治仁志、他. 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)合併 2 型糖尿病患者に対する DPP- 阻害薬による肝線維化抑制の試み. 第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究会、2015 年 5 月 23 日、山口

〔図書〕(計 1 件)

野口隆一、吉治仁志. 肝硬変研究と診療の進歩、Annual Review 消化器 2016:114-120,2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~3int/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 隆一 (NOGUCHI RYUICHI)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究

員

研究者番号：30423908

(2)研究分担者

吉治 仁志 (YPSHIJI HITOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40336855

(3)連携研究者

松本 雅則 (MATSUMOTO MASANORI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60316081

浪崎 正 (NAMISAKI TADASHI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20526850

守屋 圭 (MORIYA KEI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40526852

北出 光輝 (KITADE MITSUTERU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40526795

増谷 剛 (MASHITANI TSUYOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20401929

(4)研究協力者

西村 典久 (NISHIMURA NORIHISA)