

氏名	中村 憲
(ふりがな)	(なかむら けん)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成29年6月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	A long-lasting dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, teneligliptin, as a preventive drug for the development of hepatic steatosis in high-fructose diet-fed ob/ob mice (高フルクトース飼料を摂取させた ob/ob マウスにおいてジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害薬であるテネリグリプチンは肝脂肪変性への進展予防薬として有効である)
論文審査委員	(主) 教授 今 川 彰 久 教授 朝 日 通 雄 教授 林 道 廣

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

非アルコール性脂肪肝(以下 NAFLD ; Non-alcoholic fatty liver disease)は、2型糖尿病、肥満、高血圧症、高脂血症などのいわゆるメタボリック・シンドロームの要素を持つ患者に多く発症するとされている。NAFLD の組織学的変化は幅広く、単純性の脂肪変性から炎症性細胞浸潤を伴う脂肪性肝炎、線維化を伴う脂肪性肝炎、肝癌の発症母体となる肝硬変にまで及ぶとされる。加えて、疫学的には西欧諸国では、人口の 15-39%に NAFLD がいるとされて、わが国でも増加する可能性がある疾患と考えられる。

近年、日本人の糖尿病患者において、肝硬変および肝細胞癌をあわせて肝疾患とした場合、従来の糖尿病の代表的な合併症とされている虚血性心疾患を上回ることが報告された。しかし、現在、NAFLD への治療薬（特効薬）は開発されておらず、NAFLD に対しての治療戦略の研究は極めて重要であると考えられる。

本研究では 2 型糖尿病及び肥満を発症する ob/ob マウスに、高フルクトース飼料を摂取させることで NAFLD を発現させ、その発現過程におけるジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害薬(以下 DPP-4 阻害剤)であるテネリグリプチンの NAFLD への有効性を検討することを目的とした。

《材料および方法》

動物は、レプチンをコード化した肥満遺伝子の突然変異である ob/ob マウス 5 週齢、雄性のマウスを使用し、飼料は脂肪（21%）、タンパク質（69%）、フルクトース（60%）からなる複合糖質食(以下 HCD ; High carbohydrate diet)を使用し、マウスに摂取させ 2 型糖尿病と NAFLD を誘発させた。

HCD のみを 8 週間摂取させる群（以下 Control Group1:n=8）、HCD に 0.018%のテネリグリプチンを添加した飼料を 8 週間摂取させる群（以下 Teneligliptin Group1:n=8）を予防群として作製した。次に、HCD のみを 12 週間摂取させる群(以下 Control Group2:n=8)、最初の 4 週間 HCD だけを摂取させ、その後の 8 週間 HCD に 0.018%のテネリグリプチンを添加した飼料を摂取させる群（以下 Teneligliptin Group 2:n=8）を治療群として作製した。

《結果》

体重変化は予防群および治療群と各群のマウス間で有意差を認めなかった。

肝障害は血漿中の AST、ALT を、脂肪変性は肝臓中の TG、FFA 濃度を評価として用いた。

Control Group1 と比較し Teneligliptin Group1 では AST、ALT、肝臓中の TG、FFA 濃度の有意な低下を認めた。一方、Control Group2 と比較し、Teneligliptin Group 2 では

ASTに有意差は認めず、ALTは上昇を認めた。肝臓中のTG、FFA濃度に有意な差を認めなかった。

血漿中の血糖値、グリコアルブミン、インスリンの評価では Control Group1 と比較し Teneligliptin Group1 で低下を認めたが、Control Group2 と Teneligliptin Group 2 の比較では有意な差を認めなかった。NAFLD に関して効果を有すると報告されている血中GLP-1濃度は、Teneligliptin を摂取させたマウスで上昇を認めた。さらに DPP-4 活性は、Teneligliptin を摂取させたマウスで、活性の抑制が認められた。

以上から、Teneligliptin の投与によって体重変化は差を認めず、GLP-1濃度は上昇、DPP-4 活性系では低下を認めた。

次に HE 染色と Oil-red 染色で肝臓の組織学的検討を行ったところ、Control Group1 と比較し Teneligliptin Group1 では両染色で脂肪滴の減少を認めた。しかし Control Group2 と Teneligliptin Group 2 では差を認めなかった。

NAFLD 発現に関与している炎症性サイトカインである TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 の肝臓での発現は、Control Group1 と比較し Teneligliptin Group1 で有意な低下を認めた。しかし、Control Group2 と Teneligliptin Group 2 の比較では TNF- α 、IL-6 で有意な上昇を認め、IFN- γ は差を認めなかった。

β -酸化関連遺伝子は Teneligliptin Group1 で CPT1A、ACC1 の低下と ACL の上昇を認め、脂肪酸酸化の影響があることが示唆された。

FFA 産生に関連する遺伝子の MCAD、LCAD、ECAH、HACDH、bKACTB の検討では、各群のマウス間で有意な差を認めなかった。

インスリン抵抗性に関連する IRS1、IRS2、PI3K、PEPCK、G6Pase などの検討では、Control Group1 と比較し、Teneligliptin Group1 で、PI3K、IRS-1、IRS-2、AMPK で有意差を認め、Control Group2 と Teneligliptin Group 2 の比較では IRS-1 と IRS-2、PEPCK、G6Pase で有意差を認めた。

組織学的には Teneligliptin Group1 で脂肪変性の抑制を認め、生化学的にも Teneligliptin Group1 で肝障害や肝臓中の TG、FFA 濃度、血漿中の血糖値およびインスリン値で Control

Group1 との有意差を認めた。加えて、炎症性サイトカインにおいてもまた脂質合成関連遺伝発現に関しても同様の結果を認め、組織学的な結果を裏付けるものと考えた。

《結論》

今回、予防群と治療群との結果の差は、治療群は先に NAFLD の発現を含めた内臓脂肪過剰な状態であり、この過剰な脂肪組織からのアディポサイトカインの分泌の影響が関与していたのではないかと推察される。このため DPP-4 阻害薬の投与時期の検討が重要であると考え。また今回の結果から DPP-4 阻害薬は、その効能としては、糖尿病の初期段階からの投薬であれば、炎症性サイトカインや脂質合成関連遺伝子への発現低下、脂肪変性の抑制、インスリン抵抗性の改善をもたらし、NAFLD に対しては予防薬としての副次的な効果を有する可能性があることが示唆された。一方、脂肪変性がある程度ある状態では、治療薬としての効果に乏しいことも示唆された。

本研究の結果は、DPP-4 阻害薬が糖尿病の初期段階での投薬が推奨されていることを後押しする結果であると考え。

論文審査結果の要旨

非アルコール性脂肪肝 (以下 NAFLD ; Non-alcoholic fatty liver disease) は、2 型糖尿病、肥満、高血圧症、高脂血症などのいわゆるメタボリック・シンドロームの要素を持つ患者に多く発症するとされている。2 型糖尿病、肥満が増加している現在、NAFLD 患者の増加も予測される。しかし NAFLD への特効薬はなく、治療戦略の研究が極めて重要と考えられる。本研究では、2 型糖尿病および肥満を発症する ob/ob マウスを用いて NAFLD を発現させ、ジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害薬 (以下 DPP-4 阻害薬) であるテネリグリプチンの NAFLD への有効性を検討することを目的とした。

ob/ob マウスに脂肪、タンパク質、フルクトースを混ぜた飼料 (HCD; High carbohydrate diet) と HCD にテネリグリプチンを混ぜた飼料をマウスへ摂取させる時期および飼料の種類で予防実験群 (Control Group1、Teneligliptin Group1) および治療実験群 (Control Group2、Teneligliptin Group2) に分け、それぞれを比較しテネリグリプチンの有効性について検討した。

肝障害、脂肪変性、血糖値、グリコアルブミン、インスリンに関して生化学的項目を用いて評価を行ったところ、Teneligliptin Group1 で差が認められた。組織学的には Teneligliptin Group1 で脂肪変性の程度に差が認められた。また、Teneligliptin の投与によって体重変化は差を認めず、GLP-1 濃度は上昇、DPP-4 活性系では低下を認めた。

次に、肝臓での炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6)、脂質合成関連遺伝子 (SREBP-1c、FAS、ChREBP、PPAR α)、脂肪化関連酵素 (ACL、ACC、CPT1A)、インスリン抵抗性関連シグナル (IRS1、IRS2、PI3K、AMPK) などの NAFLD と関連する因子の発現を検討した結果、Teneligliptin Group1 で有意差が認められた。

以上の結果から、糖尿病初期から DPP-4 阻害薬を投薬することで NAFLD 進行への抑制は可能で予防薬として有効であることが示唆されたが、一方である程度に脂肪変性が進行した状況での DPP-4 阻害薬の投薬では治療薬としての効果が乏しい可能性も示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Medicine 39(4): 969-983, 2017