

氏名（本籍）	小原 功輝	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1055 号	
学位授与日付	平成 30 年 1 月 17 日	
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Preventive effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic mice	
審査委員	（主査）教授	森田 浩之
	（副査）教授	武内 康雄 教授 湊口 信也

論文内容の要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD）は、肥満やメタボリック症候群と密接な関係があると考えられており、先進国を中心に高い有病率を示している。NAFLD の約 20% は、慢性的な肝障害や肝線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis : NASH）であり、肝硬変に至り肝細胞癌の発生母地となる。肥満人口の増加やウイルス性肝炎患者の減少を背景として、近年、NAFLD/NASH を基盤とする肝細胞癌が注目されている。

ナトリウム・グルコース共役輸送体（sodium glucose cotransporter : SGLT）2 阻害薬は、尿細管でのグルコース再吸収阻害により尿糖排泄を増加させる 2 型糖尿病治療薬である。SGLT2 阻害薬のひとつである tofogliflozin は、肥満・糖尿病モデル動物において耐糖能および脂質異常症を改善し、肝中性脂肪蓄積量を減少させることが報告されている。本研究では、肥満・糖尿病モデルマウスである C57BL/KsJ-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}（db/db）マウスを用いて、肥満に関連する肝発癌に対する tofogliflozin の抑制効果を、肝における慢性炎症および脂肪化に着目して検討した。また、肝癌細胞に対する tofogliflozin の直接的作用についても、ヒト肝癌細胞株を用いて解析を行った。

【対象と方法】

5 週齢の db/db マウスに diethylnitrosamine（DEN, 40ppm）を 2 週間飲水投与したのち、通常食給餌群（8 匹）、低用量 tofogliflozin（1mg/kg）混餌投与群（7 匹）、高用量 tofogliflozin（10 mg/kg）混餌投与群（7 匹）の 3 群に分け飼育し、21 週齢で解剖を行った。肝組織は HE 染色を行い、肝脂肪沈着、炎症細胞浸潤、肝細胞膨化の程度について、NAFLD の活動性を示す NAFLD Activity Score（NAS）により評価した。肝腫瘍の解析では、前癌病変である foci of cellular alteration（FCA）の発生率および数について比較検討した。また real-time RT-PCR 法を用いて、CCL2, F4/80, IL-1 β , IL-6, TNF- α の肝臓における mRNA 発現量を解析したほか、血清 ALT, グルコース, インスリン, 総コレステロール, 遊離脂肪酸, 中性脂肪を測定し比較検討した。さらに、ヒト肝癌細胞株における SGLT2 タンパクの発現をウェスタンブロッティングにより確認したのち、通常培養条件あるいは高濃度グルコース, インスリン抵抗性存在下における、ヒト肝癌細胞（Huh7 および JHH7 細胞）の増殖に対する tofogliflozin の影響について、MTS アッセイを用いて解析した。

【結果】

マウスの肝重量の増加は、対照群と比較して高用量 tofogliflozin 投与群で有意に抑制されていた（ $P < 0.05$ ）。肝腫瘍の解析では、低用量 tofogliflozin 投与群で FCA の発生数は低く、高用量

tofogliflozin 投与群では FCA の発生率、発生数ともに有意な低下が認められた ($P < 0.05$)。病理組織学的所見において、対照群では著明な肝脂肪沈着、炎症細胞浸潤、肝細胞膨化を呈していたが、高用量 tofogliflozin 投与群では肝脂肪沈着、肝細胞膨化は抑制され、NAS は高・低用量 tofogliflozin 投与群いずれも有意に低値であった ($P < 0.05$)。肝臓における mRNA 発現解析では、高用量 tofogliflozin 投与群において F4/80 の発現は有意に低下し ($P < 0.05$)、その他の炎症性サイトカインの発現も tofogliflozin 投与により低下する傾向が認められた。血糖と血清遊離脂肪酸は、tofogliflozin 投与群で有意に低下していた ($P < 0.05$)。血清インスリン値は、各群間で有意差を認めなかった。

ヒト肝癌細胞株における SGLT2 タンパクの発現は、HepG2, Huh7, JHH7 細胞で確認されたが、48 時間の tofogliflozin 処理 (0.1–50 μ M) では、Huh7 および JHH7 細胞の増殖に有意な差はみられず、また高濃度グルコース、インスリン抵抗性存在下でも tofogliflozin (10 μ M) は細胞増殖に影響を与えなかった。

【考察】

近年、NAFLD/NASH、さらには肥満や糖尿病を背景とした肝発癌が問題となっている。現在のところ NASH の治療法は確立されておらず、NAFLD/NASH の進展および同病態に関連する肝発癌に対する有効な予防・治療戦略の開発が求められている。本研究結果より、SGLT2 阻害薬 tofogliflozin は肝脂肪化および肝臓での慢性炎症を制御することで、NAFLD/NASH の進展と肥満に関連する肝発癌を抑制し得る可能性が明らかとなった。Tofogliflozin 投与による血清遊離脂肪酸の低下が肝脂肪化の進展を阻止し、脂肪肝炎の抑制につながった可能性が考えられた。

一方、SGLT2 タンパクを発現する肝癌細胞株に対する tofogliflozin の直接的な増殖抑制作用は確認されなかったため、同剤による肝腫瘍形成の抑制機序は NAFLD/NASH の改善、肝臓の脂肪化および炎症抑制を介したものである可能性が示唆された。今回の研究結果は、SGLT2 阻害薬が糖尿病の治療のみならず、肥満に伴う代謝異常を改善し、NAFLD/NASH に関連する肝発癌の抑制につながる有用な薬剤である可能性を示すものと考えられた。

【結論】

SGLT2 阻害薬 tofogliflozin は、NAFLD/NASH の進展（肝脂肪化および肝臓における慢性炎症）と肥満関連肝発癌を抑制した。糖尿病治療薬により肥満に関連した病態を改善することが、肝発癌高危険群である肥満や糖尿病患者の肝発癌予防に繋がる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 小原功輝は、肥満に関連する肝発癌に対する SGLT2 阻害薬 tofogliflozin の効果について肥満・糖尿病モデル動物およびヒト肝癌細胞株を用いて検討し、tofogliflozin が SGLT2 を介した直接作用ではなく、肝の脂肪化と慢性炎症を抑制することを介して肝発癌を抑制することを明らかにした。本研究の成果は、ヒトでも SGLT2 阻害薬が NAFLD/NASH を改善させるだけでなく肝発癌も抑制する可能性を示すものであり、肝臓病学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Koki Obara, Yohei Shirakami, Akinori Maruta, Takayasu Ideta, Tsuneyuki Miyazaki, Takahiro Kochi, Hiroyasu Sakai, Takuji Tanaka, Mitsuru Seishima, and Masahito Shimizu: Preventive effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic mice
Oncotarget 8, 58353–58363 (2017), doi: 10.18632/oncotarget.16874