

論文内容の要旨

論文提出者氏名 置塩 伸也

論文題目

PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat

論文内容の要旨

Metformin は糖尿病治療薬として広く使われる一方、肝機能障害では慎重投与、重度の肝障害では投与が推奨されておらず、2 型糖尿病を伴う進行した非アルコール性脂肪肝炎（NASH）への十分な投与量維持が困難である。今回我々は高脂肪含有コリン欠乏アミノ酸置換（HF-CDAA）食誘導性 NASH モデルマウスに Metformin の効果を引き出すため高脂血症薬 peroxisome proliferator-activated receptor α （PPAR α ）agonist を併用し有効性を検討した。

8 週齢の C57BL/6J マウスを①普通食投与群（普通食群）、②HF-CDAA（脂質カロリー比 45%）食投与群（コントロール群）、③HF-CDAA 食 + Metformin 投与群（Met 単独群）、④：HF-CDAA 食 + GW7647（PPAR α agonist）投与群（GW 単独群）、⑤：HF-CDAA 食 + Metformin + GW7647 群（併用群）の 5 群に分け、16 週間投与後に末梢血、肝臓を採取し血液生化学検査と肝臓検体から肝脂肪化、肝障害、線維化を評価した。肝での HE 染色、シロウスレッド染色、トリグリセリド（TG）定量、ハイドロキシプロリン定量、NAD/NADH の検討に加え肝内線維化、炎症性メディエーター、ER ストレス、糖・脂質代謝関連遺伝子発現を real-time PCR 法やウエスタンブロット法で解析した。

②コントロール群と①普通食群の比較にて、②では肝体重比、内臓脂肪体重比の有意な上昇、血中コレステロール、TG 値の有意な低下、AST、ALT 値の有意な上昇を認めた。②では HE 染色で主に中心静脈周囲の肝細胞に脂肪滴の沈着を認め、肝内 TG 含有量の有意な上昇、肝小葉内炎症スコアの有意な上昇を認め、肝内コラーゲン遺伝子の有意な上昇、シロウスレッド染色陽性領域の有意な上昇を認め、炎症、線維化の強い進行 NASH が誘導された。

③-⑤薬剤投与群と②コントロール群の比較にて、④、⑤では肝体重比の有意な低下、HE 染色にて脂肪沈着の改善、肝内 TG 含有量の有意な低下、肝内の脂肪酸酸化関連遺伝子 PPAR α 、ACOX、CPT2 遺伝子の有意な上昇を認め、ペルオキシソーム、ミトコンドリアでの脂肪酸 β 酸化の亢進により脂肪肝が改善したと考えた。また⑤では血中 ALT 値の有意な低下、HE 染色にて小葉内の炎症グレードが改善傾向、肝内 TNF α 、MCP-1、IL-6 遺伝子の有意な発現低下、ウエスタンブロットにおいて NF- κ B、Erk、JNK リン酸化が低下していた。肝線維化に関して、肝内コラーゲン、TIMP-1 遺伝子の有意な発現低下、肝細胞周囲のシロウスレッド染色陽性領域やハイドロキシプロリン含有量が有意に低下し、肝線維化の著明な改善を認めた。

同じく③-⑤薬剤投与群と②コントロール群の比較にて、ER ストレスに関して③、④、⑤では肝内 CHOP 遺伝子の有意な低下を認め、⑤では肝内 BiP 遺伝子の有意な低下、ウエスタンブロットにおいて eIF2 α リン酸化、CHOP タンパク発現の低下を認め、ウエスタンブロットにおいて AMPK リン酸化タンパク発現亢進、IRS-1 Ser636 のリン酸化タンパク発現低下を認め、また NAD/NADH 比、NAD 量の有意な上昇を認め、ミトコンドリア機能の改善が示唆された。

以上より、NASH モデルマウスにて PPAR α agonist 単独群、Metformin+PPAR α agonist 併用群でペルオキシソーム、ミトコンドリアでの脂肪酸 β 酸化の亢進を伴う肝脂肪化の減少、併用群で炎症、線維化改善を認めた。また併用群で ER ストレスの減少、AMPK の活性化、ミトコンドリア機能の回復を認めた。一般に Metformin は電子伝達系の呼吸鎖の複合体 I 阻害による AMP/ATP 比の増加に伴い AMPK を活性化し、SIRT1 等の経路を介した抗炎症作用、CHOP 等を介した ER ストレス抑制作用をきたすが、AMPK 自体が TNF α 等の炎症シグナルで直接抑制されることが報告されている。我々は PPAR α の peroxisome proliferator response element（PPRE）依存性の脂肪酸 β 酸化亢進作用に加え、PPRE 依存性、非依存性の急性期炎症応答遺伝子発現抑制作用に注目した。Metformin 単独では TNF α や MAP キナーゼの活性化により AMPK の活性が抑制され効果が限定的だったが、PPAR α agonist との併用では PPRE 非依存性の抗炎症作用により Metformin による AMPK の活性化を引き出したと考えた。また、PPAR α agonist によりペルオキシソームの脂肪酸酸化が活性化され、ミトコンドリア機能の負担を減らし、相加的に肝臓での炎症、ER ストレス、線維化改善に寄与したと考えた。