

学位論文題名

Metformin prevents liver tumorigenesis induced by high-fat diet in C57Bl/6 Mice

（メトホルミンは高脂肪食下での肝腫瘍形成を抑制する）

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

近年、世界的な規模で肥満および糖尿病有病者数は増加の一途を辿っている。肥満や糖尿病は、心血管疾患の発生を増加させるだけでなく、種々の癌のリスクを高めることも明らかにされている。そのなかで、肝臓癌は、世界的に癌死の原因として第3位を占める癌であり、初期症状を呈することがなく、早期診断が困難とされており、発症予防を含めた治療の確立が求められている。近年肥満や糖尿病患者数の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）・非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）有病率の急速な増加を認め、特にNASHは高率に肝硬変、肝癌に進展する病態として注目されている。しかし、肥満やNASH、肝癌との病態メカニズムを含めた直接的な関連は明らかではない。我々はこれまでに、C57BL/6Jマウスに高脂肪食を長期間（60週）負荷することで、NASHの発症及び肉眼的肝結節性病変を呈するモデルマウスを樹立し、高脂肪食誘導性の肝腫瘍形成の機序として、まず肝における脂肪蓄積が生じ、それにより惹起される炎症が重要である可能性を示した。一方、近年ビグアナイド薬であるメトホルミンは、基礎研究のみならず臨床研究においても抗腫瘍効果が示され、抗糖尿病治療薬としての役割だけでなく、抗癌薬としても期待されている。メトホルミンの抗腫瘍効果の機序として、主要な標的分子であるAMP activated protein kinase (AMPK) を介し、細胞の成長、増殖や生存を促進する mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルを抑制する機序が示唆されている。しかし、AMPK非依存的な機序なども示唆されており、一定の見解は得られていない。今回、長期高脂肪食負荷肝腫瘍モデルマウスを用いて、メトホルミンが高脂肪食下での肝腫瘍形成に及ぼす影響について検討した。

【方法と結果】

1. 長期高脂肪食負荷 NASH、肝腫瘍モデルマウスにおいて、メトホルミンが、肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討

8週齢の雄性C57BL/6Jマウスを普通食群、高脂肪食群、高脂肪食+メトホルミン群（以下メトホルミン群）に分け、60週間飼育した。普通食群と比較し、高脂肪食群では高度肥満を呈し、インスリン抵抗性が認められた。一方メトホルミン群では、高脂肪食群と比較し、インスリン抵抗性の改善を認めたが、体重低下は認めず、肝内中性脂肪含量は同等であった。病理学的解析では、メトホルミン投与による肝の脂肪化の改善は認めなかつたが、炎症、纖維化の抑制を認めた。肉眼的肝結節性病変は普通食群で0%、高脂肪食群で70%、メトホルミン群で25%に認め、メトホルミン投与により、有意に腫瘍発症を抑制した。また、肝タンパク発現変化の解析では、メトホルミン群でAMPKリン酸化の亢進は認めたものの、mTOR、S6Kリン酸化の抑制は認めなかつた。

2. 高脂肪食負荷 NAFLD モデルマウスにおけるメトホルミンの追加投与が、肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討

8週齢より30週間高脂肪食を負荷し、NAFLDを呈する雄性C57BL/6Jマウスを、更に高脂肪食を30週間負荷する群（高脂肪食継続群）と、更に高脂肪食+メトホルミンを30週

間負荷する群(メトホルミン追加群)に分け飼育した。メトホルミン追加群は、高脂肪食継続群と比較し、体重低下は認めず、インスリン抵抗性の改善、肝内中性脂肪含量の低下は認めなかった。肉眼的肝結節性病変は高脂肪食継続群で 75%、メトホルミン追加群で 82%と、NAFLD を呈するマウスにおいて、メトホルミン投与による腫瘍発症の抑制は認めなかった。

3. 短期高脂肪食負荷マウスにおいて、メトホルミンが肝脂肪蓄積、脂肪細胞機能に及ぼす影響についての検討

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを普通食群、高脂肪食群、高脂肪食+メトホルミン(メトホルミン群)群に分け、8 週間飼育した。普通食群と比較し、高脂肪食群では肥満を呈し、脂インスリン抵抗性を認め、肝の脂肪化、肝内中性脂肪含量の増加を認めた。一方メトホルミン群では、高脂肪食群と比較し、体重は有意に低値で経過し、インスリン抵抗性は改善傾向、血中遊離脂肪酸は低下傾向、肝の脂肪化は認めず、肝内中性脂肪含量の低下を認めた。肝遺伝子発現変化の解析では、高脂肪食群とメトホルミン群で、脂肪酸合成や脂肪酸β酸化に関連する遺伝子の発現に有意な変化は認めなかった。一方、精巣上体脂肪組織においては、普通食群と比較し、高脂肪食群では、脂肪重量・体重比の増加、脂肪細胞サイズの増加、F4/80 染色で *crown-like structure* を認め、遺伝子発現解析では、F4/80、CD11c、TNF α 、MCP-1 の有意な発現増加を認めた。一方、メトホルミン群では、高脂肪食群と比較し、脂肪重量・体重比、脂肪細胞サイズの有意な低下、F4/80、CD11c 発現の有意な低下、TNF α 、MCP-1 発現は低下傾向を認めた。

4. 長期高脂肪食負荷 NASH、肝腫瘍モデルマウスにおいて、低用量メトホルミンが、肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを、高脂肪食群、高脂肪食+メトホルミン 50mg/kg (メトホルミン 50mg/kg 群) 群、高脂肪食+メトホルミン (150mg/kg) (メトホルミン 150mg/kg 群) 群の 3 群に分け、60 週間飼育した。体重は 3 群間に有意差なく経過した。高脂肪食群と比較し、メトホルミン 50mg/kg 群ではインスリン抵抗性の改善は認めなかつたが、メトホルミン 150mg/kg 群では改善傾向を示した。肝重量は、高脂肪食群と比較し、メトホルミン 50mg/kg 群では有意差を認めなかつたが、メトホルミン 150mg/kg 群では有意に低値であった。血清 ALT 値、肝臓内中性脂肪含量は、3 群間に有意差は認めなかつたが、高脂肪食継続群と比較し、メトホルミン 150mg/kg 群で低値傾向を示した。肉眼的肝結節性病変は、高脂肪食群で、75%に認めたのに対し、メトホルミン 50mg/kg 群で 58%、メトホルミン 150mg/kg 群で 25%と、メトホルミン投与により腫瘍抑制傾向を認めた。

【考察】

メトホルミンは、NASH の自然発症過程を抑制することで、高脂肪食下での肝腫瘍形成を抑制していることが示唆された。一方で、メトホルミンは、既に NAFLD を呈するマウスでは、腫瘍形成を抑制せず、またメトホルミンが早期の高脂肪食下における肝臓の脂肪蓄積を抑制する機序として、脂肪細胞の炎症性変化を抑制することが関与していることが示唆された。これらの事実から、既に脂肪細胞機能不全が進行した NAFLD の病態下では、メトホルミンの抗腫瘍効果が発揮できない可能性が考えられた。以上から、高脂肪食下での肝腫瘍形成におけるメトホルミンの抗腫瘍効果は、NAFLD 発症前の早期に、脂肪細胞の炎症性変化を抑制し、脂肪細胞機能不全の進展を遅らせることで、肝臓における脂肪蓄積の抑制、その後の NASH への進展および肝腫瘍発症を抑制する可能性が考えられた。

【結語】

メトホルミンは、高脂肪食下での肝腫瘍形成を抑制した。本研究におけるメトホルミンの抗腫瘍効果の機序として、NAFLD 発症前の早期に、脂肪細胞の炎症性変化を抑制し、脂肪細胞機能不全の進展を遅らせることで、肝臓における脂肪蓄積の抑制、その後の NASH への進展および肝腫瘍発症を抑制する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　山　下　啓　子
副　查　准教授　濱　田　淳　一
副　查　教　授　渥　美　達　也
副　查　教　授　坂　本　直　哉

学位論文題名

Metformin prevents liver tumorigenesis induced by high-fat diet in C57Bl/6 Mice

(メトホルミンは高脂肪食下での肝腫瘍形成を抑制する)

近年、肥満や糖尿病患者数の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 有病率の急速な増加を認め、特に NASH は高率に肝硬変、肝癌に進展する病態として注目されている。しかし肥満や NASH、肝癌との病態メカニズムを含めた直接的な関連は明らかではない。論文提出者である田島らは、以前、C57BL/6J マウスに高脂肪食を長期間 (60 週) 負荷することで NASH の発症と肉眼的肝結節性病変を呈するモデルマウスを樹立し、高脂肪食誘導性の肝腫瘍形成の機序として肝に脂肪蓄積が生じ、それにより惹起される炎症が重要である可能性を報告した。一方、糖尿病治療薬 (ビグアナイド薬) であるメトホルミンは抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、メトホルミンの抗腫瘍効果の機序として、主要な標的分子である AMP activated protein kinase (AMPK) を介して細胞の成長、増殖や生存を促進する mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルを抑制する機序が示唆されている。しかし、AMPK 非依存的な機序も示唆されており一定の見解は得られていない。今回、田島は、長期高脂肪食負荷肝腫瘍モデルマウスを用いてメトホルミンが高脂肪食下での肝腫瘍形成に及ぼす影響を検討した。

検討方法は 1. 長期高脂肪食負荷 NASH、肝腫瘍モデルマウスにおけるメトホルミンが肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討、2. 高脂肪食負荷 NAFLD モデルマウスにおけるメトホルミンの追加投与が肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討、3. 短期高脂肪食負荷マウスにおけるメトホルミンが肝脂肪蓄積、脂肪細胞機能に及ぼす影響についての検討、と 3 種類の設定で行った。

1. 長期高脂肪食負荷 NASH、肝腫瘍モデルマウスにおけるメトホルミンが肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討では 8 週齢の雄性 C57BL6/J マウスを普通食群、高脂肪食群、高脂肪食+メトホルミン群に分け 60 週間飼育した。肉眼的肝結節性病変 (dysplastic nodule および adenoma) は普通食群 0%、高脂肪食群 70%、高脂肪食+メトホルミン群 25% であり、メトホルミン投与により肝結節性病変の発症が有意に抑制された。メトホルミン投与

により肝の脂肪化の改善は認めなかつたが、炎症、線維化の抑制を認め、AMPK のリン酸化の亢進が認められたが、mTOR、S6K のリン酸化の抑制は認めなかつた。

低用量のメトホルミンを用いた場合の肉眼的肝結節性病変は高脂肪食群 75%、メトホルミン 50 mg/kg 群 58%、メトホルミン 150 mg/kg 群 25% であり、メトホルミン投与により肝結節性病変の発症が抑制される傾向を認めた。

2. 高脂肪食負荷 NAFLD モデルマウスにおけるメトホルミンの追加投与が肝腫瘍形成に及ぼす影響についての検討では 8 週齢より 30 週間高脂肪食を負荷し、NAFLD を呈する雄性 C57BL6/J マウスを、更に高脂肪食を 30 週間負荷する群、更に高脂肪食 + メトホルミンを 30 週間負荷する群に分け飼育した。メトホルミン投与による肝結節性病変の発症抑制は認めなかつた。

3. 短期高脂肪食負荷マウスにおけるメトホルミンが肝脂肪蓄積、脂肪細胞機能に及ぼす影響についての検討では 8 週間の飼育で行い、メトホルミンを投与群では高脂肪食負荷に伴う肝の脂肪化、肝内中性脂肪含量の増加を認めなかつた。精巣上体脂肪組織において脂肪重量・体重比、脂肪細胞サイズの有意な低下を認め、F4/80、CD11c 発現の有意な低下を認めた。

以上より、メトホルミンは既に NAFLD を呈するマウスでは腫瘍形成を抑制しなかつたが、NASH の自然発症過程を抑制することで高脂肪食下での肝腫瘍形成を抑制することが示唆された。メトホルミンが早期の高脂肪食下における肝臓の脂肪蓄積を抑制する機序として、脂肪細胞の炎症性変化の抑制が関与していることが示唆された。高脂肪食下での肝腫瘍形成におけるメトホルミンの抗腫瘍効果は、NAFLD 発症前の早期に脂肪細胞の炎症性変化を抑制して脂肪細胞機能不全を遅らせることで、肝臓における脂肪蓄積の抑制、その後の NASH への進展と肝腫瘍発症を抑制する可能性が考えられた。

本研究の意義、実験方法とその解釈について十分な審査を行い、今後の課題としてメトホルミンの抗腫瘍効果のメカニズムの解明が必要であること、糖尿病治療におけるメトホルミンの重要性などについて確認した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。