

200831026A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、
治療法の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡上 武

平成21(2009)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、
治療法の開発に関する研究…………… 1
岡上 武

II. 分担研究報告

1. NASHの鉄過剰蓄積におけるトランスフェリン受容体1の役割に関する研究…………… 7
高後 裕
2. NASH およびC型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性…………… 9
河田 純男
3. C型肝炎とNAFLDの脂質分析…………… 11
小池 和彦
4. サイトカイン・アディポサイトカインからのNAFLD病態解明
と治療への応用、糖尿病患者の肝障害調査…………… 15
植木 浩二郎
5. NASH由来肝癌の臨床病理学的・分子生物学的解析…………… 17
有井 滋樹
6. 脂肪性肝炎モデル動物を用いたNASH発症進展メカニズムの解析
—脂肪性肝炎自然発症KK-A^yマウスにおける肝再生不全の検討……………19
渡辺 純夫
7. 高度線維化NASHのコホートStudy…………… 24
橋本 悦子
8. NASH/NAFLDの肝臓における
脂質代謝・鉄代謝関連遺伝子の発現解析…………… 26
安居 幸一郎
9. 非アルコール性脂肪性肝疾患におけるアポトーシスの分子機構と
病態形成における意義の解明…………… 29
竹原 徹郎

10. 閉経期におけるインスリン抵抗性発現機構の解明.....	31
	西原 利治
11. プロテオミクスを用いた非アルコール性脂肪性肝疾患の バイオマーカー探索と病態解明.....	34
	宇都 浩文
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	37
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷.....	49

I. 総括研究報告

非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究

研究代表者 岡上 武 大阪府済生会吹田病院院長
京都府立医科大学特任教授

研究要旨；糖尿病患者 3,071 例の data base を作成した。HCV 抗体、HBc 抗体を測定しえた 2,213 名の糖尿病患者(平均年齢男性 65 歳、女性 68 歳)の HCV 抗体陽性率は男性 5.1%、女性 3.9% HBc 抗体高値陽性例は男性 15.5%、女性 15.0%であった。血清 ALT 31IU/L 以上（肝障害例と定義）を示す例は男性 31.4%、女性 19.3%で糖尿病患者は高率に肝障害を合併していた。血清 ALT 31IU/L 以上 and/or 血小板数 15 万未満の糖尿病患者 92 例に肝生検を施行したが、92 例中単純性脂肪肝 25 例 NASH が 67 例であった。糖尿病合併・非合併 NAFLD 例に 309 例に肝生検を施行し、294 例に SNPs 用採血を終了し、whole genome を用いて SNPs 解析中である。肝生検所見では NASH 症例の約 25%、単純性脂肪肝症例の約 10%で肝組織に鉄過剰蓄積が見られた。

研究分担者
高後 裕 旭川医科大学
消化器血液腫瘍制御学教授
河田純男 山形大学消化器病態制御学教授
小池和彦 東京大学感染症内科学教授
植木浩二郎 東京大学糖尿病代謝内科学
准教授
有井滋樹 東京医科歯科大学肝胆膵・総合
外科学教授
渡辺純夫 順天堂大学消化器内科学教授
橋本悦子 東京女子医科大学
消化器内科学教授
安居幸一郎 京都府立医科大学
消化器内科学講師
竹原徹郎 大阪大学消化器内科学准教授
西原利治 高知大学消化器病態学准教授
宇都浩文 鹿児島大学消化器疾患・生活習
慣病学講師
研究協力者
篁 俊成 金沢大学恆常性制御学准教授
田中延善 福井県済生会病院副院長
松田文彦 京都大学疾患ゲノム疫学解析学
教授

中村直登 京都府立医科大学
内分泌代謝内科学教授
角田圭雄 市立奈良病院消化器センター
朴 孝憲 大阪府済生会吹田病院
糖尿病内科
川中美幸 川崎医科大学付属川崎病院
肝臓センター
中塔辰明 岡山済生会総合病院
糖尿病センター

A. 研究目的

- 1)糖尿病患者の肝障害の頻度・実態を明らかにし、肝障害に占める NAFLD(単純性脂肪肝、NASH)の頻度や臨床病理学的特徴を明らかにする。
- 2)単純性脂肪肝と NASH の biomarker の探索と血液生化学的所見から、両者の鑑別法を作成する。
- 3)単純性脂肪肝と NASH の SNPs 解析を行い両者の遺伝的背景の差を明らかにする。
- 4)NASH からの発癌機序の解明、NAFLD の長期予後の解明を行う。
- 5)動物実験モデルと臨床例を用いて、単純性脂肪肝と NASH の病態解明と単純性脂肪肝から NASH への進展機序を明らかにする。

6) NASH の治療法を確立する。

B. 研究方法

- 1) 糖尿病患者 5,000 例 (平成 20 年度に 3,071 例入力済み) の data base を作成する。
- 2) proteomics による検討から NASH に特徴的な biomarker を探索し、肝生検で診断した単純性脂肪肝 250 例以上と NASH 250 例以上の血液生化学的検査を用い、両者の鑑別診断法を確立する。
- 3) 単純性脂肪肝、NASH 各 500 例を対象に、whole genome で SNPs 解析を行う。
- 4) NASH からの発癌例の手術材料を用いて array-CGH, cDNA microarray による病態と発癌関連を検討する。
- 5) 臨床例、動物モデルを用いて、脂質代謝、インスリン抵抗性、炎症細胞浸潤、肝細胞アポトーシス、鉄代謝、NASH の肝再生不全、発癌機序などを検討する。

(倫理面への配慮)

研究計画全般において「ヘルシンキ宣言」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する指針」を遵守する。

インフォームドコンセント取得に使用する患者用説明文書や承諾書の文言に関しては、研究計画と同様に当該施設の倫理委員会に申請し、許可されたものを使用する。

個人情報保護のためサンプルの匿名化を行い、サンプルとデータの管理を厳重に行う。

C. 研究結果

<全体研究>

糖尿病患者 3,071 例の data base を作成した。HCV 抗体、HBc 抗体測定しえた糖尿病患者 2,213 名 (平均年齢: 男性 65 歳、女性 68 歳) の解析では、HCV 抗体陽性率は男性 5.1%、女性 3.9%、HBc 抗体高値陽性例は男性 15.5%、女性 15.0%であった。血清 ALT 31IU/L 以上 (肝障害例と定義) を示す例は男性 31.4%、女性 19.3% で高率に肝障害を有していた。血清 ALT 31IU/L 以上 and/or 血小板数 15 万未満の糖尿病患者 92 例に肝生検を施行したが、92 例中 25 例は単純性脂肪肝で 67 例が NASH であった。糖尿病合併・非合併 NAFLD 309 例に肝生検を施行したが、単純性脂肪肝と NASH の比率は糖尿病合併の有無にかかわらず有意差はなかった。なお、309 例中 294 例に SNPs 用採血を終了し、whole genome を用いて SNPs 解析中である。

<個別研究>

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における鉄過剰蓄積のメカニズムは不明である。トランスフェリン受容体 1 (TfR1) はトランスフェリン鉄を細胞内に取り込みに機能する鉄関連分子で、正常肝細胞では発現がわずかであるが、C 型肝炎、アルコール性肝障害では亢進している。今回、非アルコール性脂肪性肝炎症例の生検肝組織とマウス脂肪肝モデルを用いて、NAFLD の肝細胞における TfR1 の発現が亢進していることが明らかになった (高後 裕)。

NASH および C 型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性の原因として、ミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化の障害が挙げられる。これら患者において *in vivo* で脂肪酸 β 酸化の障害について検討し、NASH および C 型肝炎のインスリン抵抗性の要因として脂肪酸 β 酸化の障害が関与している事が明らかになった (河田純男)。

トランスジェニックマウスモデルを用いて、C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白が肝脂肪化のちに肝発癌を引き起こすが、このマウスモデルおよび C 型肝炎患者の肝臓に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、*cis*-ヴァクセン酸などの一価不飽和脂肪酸が増加しており、C 型肝炎の病態との関連性が示唆されてきている。C 型肝炎と NASH・NAFLD の類似性と相違を明らかにすることで NASH・NAFLD の病態を検討する目的で、HCV コア遺伝子トランスジェニックマウス (HCV マウス) と NAFLD モデルである ob/ob マウス (NAFLD マウス) を用い、肝脂肪化、脂質組成、脂質関連酵素発現の検討を行なった。NAFLD マウスでは著明な中性脂肪の蓄積を認め、またオレイン酸やパルミトオレイン酸などの ω -9 系の不飽和脂肪酸の相対的な増加も認められ、この点では HCV マウスに類似していた。しかし、多価不飽和脂肪酸の増加や一部脂肪関連酵素の発現は NAFLD マウスと HCV マウスでは異なる挙動を示し、病態の相違を反映していることが示唆された (小池和彦)。

肥満における炎症の端緒は、脂肪細胞ないし肝臓から産生されるケモカイン MCP-1 によって、脂肪組織や肝臓へのマクロファージが浸潤することと考えられる。ケモカインによる走化性に重要な役割を果たす class 1B PI3 kinase (PI3K γ) のノックアウトマウスを解析することによって、肝臓における脂肪沈着や炎症がどのように変化するかを検討することによる NAFLD の病態解明を試みた (植木浩二郎)。

NASH からの発癌機構の一端を明らかにし、新しい診断・治療の開発へつなげることを目的に、糖尿病などの生活習慣病の発癌への関与を

網羅的遺伝子解析により検討し、NBNC 肝癌患者は生活習慣病因子併存率が高く NASH 肝癌患者はさらにその傾向が強く、非癌肝組織の酸化ストレスマーカーも旺盛に観察された(有井滋樹)。

NASH では肝再生不全が見られるが、メタボリックシンドロームモデル動物である KK-Ay マウスに部分肝切除を行い、肝再生機転の異常について検討した。KK-Ay マウスに 70% 肝切除を行うと 48 時間以内に約半数の個体が死亡し、コントロールの C57Bl/6 マウスに比し有意な生存率の低下を認めた。KK-Ay マウスでは肝切除 48 時間後の時点で肝細胞核への BrdU 摂取が殆ど認められず、cyclin D1 発現誘導もほぼ完全に抑制されており、極度の肝再生不全状態にあると考えられた。KK-Ay マウスでは、高レプチン血症および低アディポネクチン血症が存在し、肝切除後の肝組織中 TNF- α mRNA 誘導および STAT-3 リン酸化が著明に亢進し、これらのアディポカイン発現バランスの異常に伴うシグナル伝達の変調が再生不全のメカニズムに深く寄与していると考えられた(渡辺純夫)。

NASH 高度線維化例のコホート study として、NASH 肝硬変の予後・発癌率・死因を C 型肝硬変と比較したが、NASH 肝硬変の予後は C 型肝硬変と有意差はなく、5 年生存率、NASH 75.2%、C 型 73.8% であった。発癌率は、NASH 11.3%/5 年、C 型 30%/5 年で症例数の関係から有意差はないが、C 型肝硬変のほうが高率であった。NASH 肝硬変の生命予後に影響を与える予後不良因子は HCC であり、予後良好な因子としては Child Pugh 分類(Grade A)であった。また、死因の 80% が肝不全、肝癌の肝関連死であった(橋本悦子)。

肝の脂肪化と鉄蓄積が酸化ストレスを惹起し、NASH/NAFLD の病態進展に関与する。その病態を明らかにするために、NASH/NAFLD 患者の肝臓における脂質代謝・鉄代謝関連遺伝子の発現を解析した。肝生検組織における脂質代謝関連 9 遺伝子と鉄代謝関連 3 遺伝子の mRNA 量を real-time RT-PCR 法で定量した。肝の脂肪化の程度は FL と NASH で同程度であった。解析したすべての脂質代謝関連遺伝子の発現は FL に比べて NASH で低下していた。肝臓の鉄蓄積は FL に比べて NASH で高度であった。transferrin receptor 1 の発現は FL に比べて NASH で高く、hepcidin の発現は FL に比べて NASH で低かった。FL に比べて NASH では脂質代謝関連遺伝子の発現レベルが全体に低下すること、また鉄蓄積に対して代償的に変化するべき transferrin receptor 1 と hepcidin の発現

応答が障害されている可能性が示唆された(安居幸一郎)。

NASH の病態形成への肝細胞アポトーシス

分子メカニズムを明らかにすることは、肝細胞アポトーシスを標的とした NASH の治療戦略を構築する上で重要である。NAFLD の患者試料を用いて、肝細胞アポトーシスの臨床的意義を検討し、またミトコンドリア経路のアポトーシスを欠損するマウスモデルの作成を行った。NAFLD 患者では血清 caspase-3/7 活性が正常者に比し上昇しており、また肝臓において TUNEL 陽性細胞の増加が認められた。単純性脂肪肝と NASH の両群間では肝細胞アポトーシスの程度に有意な差は認めなかった。肝細胞において Bak/Bax を欠損するコンディショナル KO マウスを作成した。このマウスでは Bcl-xL 欠損によるアポトーシスが消失したことから、ミトコンドリア経路のアポトーシスが完全に阻害されることが示された(竹原徹郎)。

NASH の遺伝的素因を明らかにすることにより、疾患の発症機構に迫り、新たな治療法の開発を目指すために、遺伝的肥満に関連する遺伝子変異とゴルジ装置の機能を制御する機能性遺伝子多型の関与について検討した。後者の遺伝子多型が NASH 発症の危険因子となっていることが明らかになった(西原利治)。

肝細胞の酸化ストレスマーカーの探索を行い、同定した酸化ストレスマーカーの臨床的意義を、NASH を含む非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) で検討した。初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素を添加することで誘導されるタンパク質をクリンプロットおよび MALDI TOF/MS システムを用いて分子量約 3000 以下の領域を検討し、有意差のあるタンパク質ピークを 73 個検出した。そのうち 4 つのタンパク質を同定し、一つは MnSOD であることを明らかになった。また、血清 MnSOD 濃度を ELISA で測定すると、その濃度は健常者と単純性脂肪肝に比較し、NASH では高値を示した。さらに、血清 MnSOD 濃度は NASH の stage の進行に伴い、上昇する傾向であることが明らかになった。血清 MnSOD は NAFLD における NASH の診断や NASH の肝病態進展の予測に有用であることが示唆された(宇都浩文)。

D. 考察

糖尿病患者における HCV 抗体陽性は非糖尿病患者と比較して有意差はなかったが、HBc 抗体高値陽性例の比率は高く、NASH からの肝発癌例の一部に肝炎ウイルス感染が関与している可能性が考えられる。しかし、糖尿病患者では、男性で 31%、女性で 19% に肝障害がみられるも

の、その殆どが非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)で、NAFLDのうち、単純性脂肪肝が30%近くを占め、NASHが70%前後と推定されるが、最終的な結論は平成21年度の集計を待つ必要がある。

単純性脂肪肝とNASHの生化学的診断法に関しては現在進行中であり、平成21年度には鑑別法が提示できると思われる。

単純性脂肪肝とNASHのSNPs解析は現在進行中で、平成22年度中にそれぞれ500例の検体を集め、最終的な解析結果を出す予定である。個別研究に関しては、脂質代謝、鉄代謝、炎症細胞浸潤、肝細胞アポトーシス、遺伝的素因、発癌機序などにつき、実験的、臨床的研究が進められており、この3年間で多くの成果が挙がるものと期待している。

E. 結論

1) 糖尿病患者では男性で約3割、女性で2割に肝障害がみられ、その多くはNASHと思われる。

2) 糖尿病患者の中にB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス持続感染者が存在し、HBV感染の頻度は非糖尿病患者よりも高頻度と考えられる。

その他、血液生化学的診断法や遺伝的素因に関しては現在検討中で、病態解明に関する研究も進行中である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

岡上 武、島 俊英、水野雅之、松本美加、榎村敦詩。C型肝炎、脂肪性肝疾患に関する消化器内科医、一般内科医の意識調査。日消誌 105:1737-1748, 2008

Okanoue T, Itoh Y, Minami M, Hashimoto H, Yasui K, Yotsuyanagi H, Takehara T, Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, Izumi N, Sata M, Onji M, Yamada G, Okita K, Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet count. *Hepatol Res* 38: 27-36, 2008

Inagaki Y, Yasui K, Endo M, Nakajima T,

Zen K, Tsuji K, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arie S, Okanoue T. CREB3L4, INTS3, and SNAPAP are targets for the 1q21 amplification frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 180: 30-36, 2008

Fujii H, Takagaki N, Yoh T, Morita A, Ohkawara T, Yamaguchi K, Minami M, Sawa Y, Okanoue T, Ohkawara Y, Itoh Y. Non-prescription supplement-induced hepatitis with hyperferritinemia and mutation (H63D) in the HFE gene. *Hepatol Res* 38: 319-323, 2008

Mitsuyoshi H, Itoh Y, Sumida Y, Minami M, Yasui K, Nakashima T, Okanoue T. Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 38:348-353, 2008

Umemura A, Itoh Y, Itoh Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue T, Fujita J. Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47: 493-502, 2008

Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arie S, Inazawa J, Okanoue T. Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 38: 886-895, 2008

Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakamura Y, Taniwaki M, Arie S, Okanoue T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulation mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 109-120, 2008

Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh

Y. Tanaka S, Taniwaki M, Arai S, Okanoue T, Yoshikawa T. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer lett* 275: 27-34, 2009

Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* (in press)

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金肝炎等緊急克服研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

NASH の鉄過剰蓄積におけるトランスフェリン受容体 1 の役割に関する研究

研究分担者 高後 裕

旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学分野教授

研究要旨:非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の病態のひとつに鉄過剰蓄積による酸化ストレスの関与があるが、そのメカニズムは不明である。トランスフェリン受容体1(TfR1)はトランスフェリン鉄を細胞内に取り込みに機能する鉄関連分子である。正常肝細胞では発現がわずかであるが、C型肝炎、アルコール性肝障害では亢進している。今回、我々は非アルコール性脂肪性肝炎症例の生検肝組織とマウス脂肪肝モデルを用いて、NAFLDの肝細胞におけるTfR1の発現が亢進していることを示した。

A. 研究目的

鉄は生体にとって必須の金属栄養素であるが、過剰状態になると肝障害などの臓器障害を引き起こす。C型肝炎、アルコール性肝障害と同様に非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)においても肝内鉄過剰蓄積が認められ、肝細胞内の過剰な不安定自由鉄が酸化ストレスを増強し、炎症、線維化ひいては肝発癌に関与していることが指摘されている。

しかし、NASHにおける鉄過剰症の病態メカニズムは不明である。今回、我々はトランスフェリン鉄の細胞内取り込みに機能するトランスフェリン受容体1(TfR1)の肝臓における発現を非アルコール性脂肪肝(NAFLD)症例の生検肝組織とマウス脂肪肝モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

対象:1999年～2007年の間に組織学的に診断されたNAFLD症例のうち、肝細胞癌(HCC)合併NASH(HCC-NASH)の4例とHCCを合併していないNASH(nHCC-NAFLD)の23例について検討した。

病理組織学的検討:背景肝組織の鉄染色、TfR1、4-hydroxy 2-nonenal (HNE)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の発現を免疫組織化学染色法にて検討した。

マウス脂肪肝モデル:C57BL/6マウスをコントロール食と高脂肪食で飼育し、2、4、8、16週目に義殺し、肝組織におけるTfR1の発現を

real-time PCR法と免疫蛍光染色法で検討した。

倫理面への配慮として、個人を特定可能な名前、ID番号、カルテ番号とは無関係に設定した「患者匿名化ID」を運用し、個人情報漏洩防止を行った。

C. 研究結果

臨床背景:HCC-NASHの平均年齢は68.5歳で、nHCC-NASHよりも有意に高齢であった($p=0.02$)。Body Mass Indexは平均33.1、Homa-IRは平均9.9で高値であった。血清鉄関連マーカーのフェリチン、トランスフェリン飽和度に差を認めなかった。

病理組織学的検討:両群でNASスコアに差を認めなかったが、stagingはHCC-NASHで平均4、nHCC-NASHで2となり、発癌例は全例が線維化進展した肝硬変症例であった。

免疫組織学的検討:HCC-NASHは全例で肝内鉄過剰蓄積、TfR1の発現亢進、HNEの発現亢進を認めた。また、2例で8-OHdGの発現を認めた。

マウス脂肪肝モデル:高脂肪食負荷マウスの肝臓では全ての週においてTfR1 mRNAの発現はコントロール食群より亢進していた($p<0.05$)。これは負荷開始後の2週間の微小脂肪滴しか存在しない早期の段階でも認められた。

D. 考察

NAFLDの病態形成において生活習慣に起因

する肥満、インスリン抵抗性、酸化ストレスがどのように関与して NASH が成立し、肝硬変や肝癌に進展するのか、その頻度や予後は明らかでない。NASH においても、C 型肝炎、アルコール性肝障害と同様に鉄過剰蓄積が酸化ストレスの原因となっていることが指摘されている。肝内過剰鉄蓄積に伴い、細胞内不安定鉄プールが増加し、Fenton 反応や Haber-Weiss 反応を介して radical を産生し、肝細胞障害をもたらす。

トランスフェリン(Tf)は血液中で 2 分子の Fe³⁺を結合し、全身に鉄を運搬する。TfR1 は高い affinity でこの Tf と結合し、Tf 鉄を細胞内に取り込む。TfR1 は正常肝細胞では発現がわずかであるが、C 型肝炎、アルコール性肝障害で発現が亢進している。本研究において、NASH においても肝発癌を合併した症例では TfR1 の発現亢進を認めた。また、マウスモデルより肝脂肪化の早期から TfR1 の発現亢進が誘導されている可能性が指摘された。

E. 結論

● HCC を合併し、F4 に進展した NASH において、肝内に鉄過剰蓄積を認めており、NASH 病態進展に鉄過剰蓄積が関与していることが示唆された。

● マウス脂肪肝モデルにおいて、脂肪負荷の早期から TfR1 の発現が亢進しており、肝脂肪化の初期段階からトランスフェリン鉄の取り込みが促進していた。

● NAFLD の鉄過剰蓄積の病態に TfR1 の発現亢進が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. *World J Gastroenterol*. 13(35):4699-706. Review. 2007.

● Ohhira M, Motomura W, Fukuda M, Yoshizaki T, Takahashi N, Tanno S, Wakamiya N, Kohgo Y, Kumei S, Okumura T. Lipopolysaccharide induces adipose differentiation-related protein expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J Gastroenterol*. 42(12):969-78. 2007.

● 生田克哉, 鳥本悦宏, 高後裕; 鉄代謝と病態. *日本臨牀* 2008 Mar; 66(3):469-74

● Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y, Kato J. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Mar;23 Suppl 1:S78-81.

● Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol*. 2008 Jul;88(1):7-15.

2. 学会発表

● 大竹孝明, 鈴木康秋, 高後裕. NASH の鉄過剰蓄積におけるトランスフェリン受容体 1 の役割—臨床免疫組織化学およびマウスモデルでの検討—. シンポジウム: 第 94 回日本消化器病学会総会. 平成 20 年 5 月 8 日, 福岡

● 大竹孝明, 阿部真美, 三好茂樹, 鈴木康秋, 大平賀子, 高後裕. 当施設 NAFLD 症例の臨床病理学的検討. 一般演題: 第 44 回日本肝臓学会総会. 平成 20 年 6 月 6 日, 松山

● 大平賀子, 本村亘, 高橋伸彦, 丹野誠志, 阿部真美, 三好茂樹, 鈴木康秋, 大竹孝明, 高後裕, 奥村利勝. LPS はマウス肝に一過性の脂肪沈着と adipose differentiation-related protein 発現を亢進させる一般演題: 第 44 回日本肝臓学会総会. 平成 20 年 6 月 6 日, 松山

● Ikuta, K., Torimoto, Y., Hosoki, T., Jimbo, J., Shindo, M., Sato, K., Ohtake, T., Sasaki, K., Kohgo, Y. : Changes of the Expressions of the Genes Involved in Iron Metabolism by the Iron Chelation Therapy in the Iron Overloaded Mouse Model. Session Type: Poster Session: 50th ASH Annual Meeting & Exposition, December 6-9, 2008. San Francisco, California, USA

NASH およびC型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性

研究分担者 河田 純男 山形大学 消化器病態制御学教授

研究要旨：NASH およびC型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性の原因として、ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の障害が挙げられる。これら患者において *in vivo* で脂肪酸β酸化の障害について検討することを目的とした。NASH およびC型肝炎のインスリン抵抗性の要因として脂肪酸β酸化の障害が示された。

A. 研究目的

NASH およびC型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性の原因として、ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の障害が挙げられる。これら患者において *in vivo* で脂肪酸β酸化の障害について検討することを目的とした。

B. 研究方法

NASH 6例およびC型慢性肝炎18例における脂肪酸β酸化能を検討するために絶食試験を行い、ケトン体産生を検討した。18時間絶食とし、ベッド上で安静を保ち、飲水は可とした。対照として健常者6名に同様の絶食試験を行った。

C. 研究結果

NASH 患者におけるケトン体産生を検討したが、12時間から15時間における増加率は健常対照者に比較すると明らかに低下しており、NASH 患者では肝ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化能の低下が示唆された。しかし、個人差が大きく、NASH はミトコンドリア機能において多様性があると考えられた。

C型慢性肝炎におけるケトン体産生を検討したが有意に低下していた。またC型肝炎患者の中でHOMA-IRが2.5未満の群と2.5以上の群についてケトン体産生量を比較すると、HOMA-IRの大きい群、すなわちインスリン抵抗性が大きい群でケトン体産生が低下してい

た。またC型肝炎ウイルスのコア抗原が10,000以上の群では10,000未満の群に比較してケトン体産生は低下していた。

D. 考察

NASH においてほとんどケトン体が産生されない症例があるが、一方では健常者と同程度にケトン体を産生した症例があり、NASH ではミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化には多様性があると考えられる。C型肝炎ではウイルス量がβ酸化に障害にかかわっていることが明らかになった。また肥満や内臓脂肪蓄積の関与も示唆された。

E. NASH およびC型肝炎のインスリン抵抗性の要因として脂肪酸β酸化の障害が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Konta T, Emi M, Toriyama S, Ariumi H, Ishii M, Takasaki S, Ikeda A, Ichikawa K, Shibata Y, Takabatake N, Takeishi Y, Kato t, Kawata S, Kubota I: Association of CC chemokine ligand 5 genotype with urinary albumin excretion in the non-diabetic Japanese general population: the Takahata study. *J Hum Genet* 2008; 53: 267-274
2. Wada M, Daimon M, Emi M, Iijima H, Sato

- H, Koyano S, Tajima K, Kawanami T, Kurita K, Hunt SC, Hopkins PN, Kubota I, Kawata S, Kato T: Genetic association between aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) variation and hi-density cholesterol (HDL-C) among non-drinkers in two large population samples in Japan. *J Atheroscler Throm* 2008; 15: 179-184
3. Daimon M, Sato H, Sasaki S, Toriyama S, Emi M, Muramatsu M, Hunt SC, Hopkins PN, Kawasaki S, Wada K, Jimbu Y, Kameda W, Susa S, Oizumi T, Fukao A, Kubota I, Kawata S, Kato T: Salt consumption-dependent association of the GNB3 gene polymorphism with type 2 DM. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 576-580
4. Koyano S, Emi M, Saito T, Makino N, Toriyama S, Ishii M, Kubota I, Kato T, Kawata S: Common null variant, Arg192Stop, in a G-protein coupled receptor, olfactory receptor 1B1 decreased serum cholinesterase activity. 2008; *Hepatol Res* 38: 696-703
5. Iijima H, Emi M, Wada M, Daimon M, Toriyama S, Koyano S, Sato H, Hopkins PN, Kubota I, Kawata S, Kato T: Association of an intronic haplotype of the LIPC gene with hyperalphalipoproteinemia in two populations. *J Hum Genet* 2008; 53: 192-200
6. Daimon M, Sato H, Oizumi T, Toriyama S, Saito T, Karasawa S, Jimbu y, Kameda W, Susa S, Yamaguchi H, Emi M, Muramatsu M, Kubota I, Kawata S, Kato: Association of the PIK3C2G gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 466-471
7. Kawasaki r, Tielsch JM, Wang TY, Mitchell P, Tano Y, Tominaga M, Oizumi T, Daimon M, Kato T, Kawata S, Kayama T, Yamashita H: The metabolic syndrome and retinal microvascular signs in a Japanese population: the Funagata Study. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 161-166
2. 学会発表
 佐藤佳香子、齊藤貴史、三沢慶子、河田純男。
 C型慢性肝炎患者における脂肪酸β酸化障害
 — 絶食試験を用いた検討 — 第44回日本肝臓学会総会抄録集 A127、2008
- G. 知的財産の出願・登録状況
 該当なし

C型肝炎とNAFLDの脂質分析

研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部医学系研究科 感染症内科教授

研究要旨：肝脂肪化をきたすNAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) は肥満や糖尿病、高脂血症に合併し、本質的に良性の病態と考えられてきており、重症慢性肝障害、ことに肝細胞癌（肝癌）へと至る病態であるとの認識はなかった。最近になり、アルコール非摂取でありながらアルコール性肝炎のごとき肝組織像を呈する「非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）」の存在と、その肝発癌との関連性が示唆されるに至り、肝脂肪化と慢性肝疾患、肝発癌の関連性が注目されている。私たちは、これまでにトランスジェニックマウスモデルを用いて、C型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白が肝脂肪化ののちに肝発癌を引き起こすことを示してきた。このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝臓に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、*cis*-ヴァクセン酸などの一価不飽和脂肪酸が増加しており、C型肝炎の病態との関連性が示唆されてきている。C型肝炎とNASH・NAFLDの類似性と相違を明らかにすることでNASH・NAFLDの病態を検討する目的で、HCVコア遺伝子トランスジェニックマウス（HCVマウス）とNAFLDモデルであるob/obマウス（NAFLDマウス）を用いて、肝脂肪化、脂質組成、脂質関連酵素発現の検討を行なった。NAFLDマウスでは著明な中性脂肪の蓄積を認め、またオレイン酸やパルミトオレイン酸などの ω -9系の不飽和脂肪酸の相対的な増加も認められ、この点ではHCVマウスに類似していた。しかしながら、多価不飽和脂肪酸の増加や一部脂肪関連酵素の発現はNAFLDマウスとHCVマウスでは異なった挙動を示し、病態の相違を反映していることが示唆された。

A. 研究目的

肝脂肪化(steatosis)が注目されている。これまで、肝脂肪化をきたすNAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) は肥満や糖尿病、高脂血症に合併し、本質的に良性の病態と考えられてきた。アルコール多飲や薬剤に関連した肝脂肪化には、必ずしも良性とは言い切れない場合もあるが、それでも重症慢性肝障害、ことに肝細胞癌（肝癌）へと至る病態であるとの認識はなかったといえる。最近になり、アルコール非摂取でありながらアルコール性肝炎のごとき肝組織像を呈する「非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）」の存在と、その肝発癌との関連性が示唆されるに至り、肝脂肪化と慢性肝疾患、肝発癌の関連性は注目を浴びるよ

うになった。

一方、1989年にC型肝炎ウイルス(HCV)が発見され、C型慢性肝炎の診断法が確立されて、さらに病理組織所見が詳細に検討されると興味深いことが判明してくる。C型肝炎の肝組織像には特徴があり、リンパ瀝胞の形成、胆管障害、肝脂肪化の3つであることが明らかとなった。すなわち、B型慢性肝炎や自己免疫性肝炎に比して、C型慢性肝炎では有意に肝脂肪化の頻度及び程度が高いのである。このことによって、肝脂肪化の病態における意義に対する関心が高くなっている。

さらに、HCVのコア遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（以下、コアTg）で肝脂

肪化を経た後、肝癌が発生することが 1998 年に示され、また、コア遺伝子を導入した培養細胞においても脂肪の蓄積が誘発されると、肝脂肪化と肝発癌の関連性の問題に、さらに注目が集まった。本研究では、C型肝炎と NAFLD、NASH を比較検討し、肝病態における肝脂肪化の意義を検討する。

B. 方法

HCV コア蛋白を恒常的に発現する肝脂肪化モデルマウス (HCV 遺伝子 (コア、NS5A) トランスジェニックマウス) と NAFLD モデルである ob/ob マウスとを対比させながら、体重、肝蓄積脂肪量、蓄積脂肪組成、脂肪酸比率、脂肪蓄積機序、等に関して検討を行なった。ともに C57/BL6 をバックグラウンドとする。

脂肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。脂質代謝関連遺伝子発現に関してはリアルタイム PCR 法にて定量を行なった。

C. 結果

- 1) 7 週齢においてコア Tg と対照 C57/BL6 には体重差は無かったが (約 22g)、ob/ob マウスでは約 43g とほぼ倍であった。
- 2) 肝/体重比は対照の 0.053 に対して、コア Tg で 0.071、ob/ob マウスで 0.079 と有意に肝肥大を示した。
- 3) 肝臓中の中性脂肪 (トリグリセリド) はコア Tg で対照の 20 倍、ob/ob マウスで 30 倍と有意な蓄積を示した。
- 4) オレイン酸はコア Tg、ob/ob マウスともに有意な増加を示したが ob/ob マウスの方が高度であった。5,8,11-eicosatrienoic acid (20:3(n-9)) は有意な増加がありコア Tg、ob/ob マウスで同等であった。
- 5) オレイン酸/ステアリン酸比はコア Tg、ob/ob マウスともに有意な増加を示したが ob/ob マウスの方が高度であった。パルミトとオレイン酸/パルミチン酸比は有意な増加がありコア Tg、ob/ob マウスで同等であった。
- 6) ω 9 系統のアラキドン酸、 γ リノレン酸は ob/ob マウスでは減少を示した。オメガ 3 系統の EPA、DHA も ob/ob マウスでは減少を示した。
- 7) 脂質代謝関連酵素、転写因子 mRNA レベルは、SREBP (sterol regulatory element binding protein)-1c、FAS (fatty acid synthase)、SCD (stearoyl Co-A desaturase)、Elovl-6 ともに

コア Tg、ob/ob マウスともに有意な増加を示した。SREBP-1c レベルはコア Tg、ob/ob マウスで同等であったが、他の 3 つの酵素 mRNA レベルは ob/ob マウスの方で高度であった。

D. 考察

肝脂肪化、インスリン抵抗性など、C型肝炎と NASH にはいくつかの共通点がある。C型肝炎と NASH を比較してみると、C型肝炎と NASH には沢山の共通点があるが、また、相違点もある。そこに両者の病態の類似点と違いが存在していると考えられる。

肝脂肪化は NASH の定義のひとつであるが、C型肝炎においても本質的な特徴のひとつである。血中脂質に関しては、両者ともに異常があるが、その表現型は反対ともいえる。すなわち、C型肝炎では低アポリポ蛋白血症を示す例が多く、血清コレステロール値は一般に低値である。これに対して、NASH では一般に高脂血症を呈する例が多い。C型肝炎ではインスリン抵抗性が出現しやすい。NASH においてもインスリン抵抗性の存在はほぼ必発であり、それをベースとして NASH が発症するといわれている。

今回の検討では、肝脂肪化、インスリン抵抗性、2型糖尿病を呈するが HCC は発生しない ob/ob マウスにおいてもオレイン酸の増加は著明であった。一方、PUFA (poly unsaturated fatty acid) については、ob/ob マウスで著減していた。今後、脂質代謝遺伝子等について更なる検討を加えて、シリアスな肝病変へと至る経路を明らかにしていく必要がある。

TNF- α を中心としたサイトカインは、C型肝炎において増加していることがヒトにおいても実験モデルにおいても示されている。NASH においても血清 TNF- α は高値例が多く、また TNF- α の遺伝子多型性 (SNP) が NASH の発症と関連しているというデータもある。インスリン抵抗性とサイトカイン反応性が NASH 発症を規定しているとの説もある。

NASH では酸化ストレスの発生が肝障害の発症に重要とされており、C型肝炎においてもコア蛋白の存在のみで酸化ストレスが発生し、そこへ炎症が加わることで酸化ストレスの更なる増加が起こると考えられる。また、酸化ストレス発生の原因として、両者ともミトコンドリア機能異常が想定されている点も共通点である。

今後、これらの、あるいは他のマウスモデルを用いて、酸化ストレス、抗酸化系、TNF- α 等に詳細に検討を進めて行く必要がある。

E. 結論

肝脂肪化、インスリン抵抗性など、C型肝炎とNASHにはいくつかの共通点がある。C型肝炎とNASHを比較してみると、C型肝炎とNASHには沢山の共通点があるが、また、相違点もある。そこに両者の病態の類似点と違いが存在していると考えられる。

今回の検討では、肝脂肪化、インスリン抵抗性、2型糖尿病を呈するがHCCは発生しないob/obマウスにおいてもオレイン酸の増加は著明であった。一方、PUFA (poly unsaturated fatty acid)については、ob/obマウスで著減していた。今後、脂質代謝遺伝子等について更なる検討を加えて、C型肝炎、NASH、NAFLDと3者で異なる肝病態、ことにシリアスな肝病変へと至る経路に関して明らかにしていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, Koike K, Nagai R. Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 2) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2008 Dec 8. [Epub ahead of print]
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]
- 4) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 5) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2008 Nov 27. [Epub ahead of print]
- 6) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
- 7) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
- 8) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.
- 9) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258.
- 10) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S87-91.
- 11) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.

12) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.

2. 学会発表

- 1) Koike K: Steatosis, liver injury and hepatocarcinogenesis in HCV infection. *Hepatic Inflammation and Immunity* 2008, Galveston, 2008.
- 2) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. p210, 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, 2008.
- 3) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.
- 4) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. #1071, 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

サイトカイン・アディポサイトカインからの NAFLD 病態解明と
治療への応用、糖尿病患者の肝障害調査

研究分担者 植木 浩二郎 東京大学大学院医学系研究科 糖尿病代謝内科准教授

研究要旨; ①NASH, NAFLD においては、肥満・インスリン抵抗性を基盤とした肝臓への脂肪沈着を 1st hit として、炎症性サイトカイン・酸化ストレス・鉄代謝異常などの 2nd hit による肝細胞の傷害が病態を進行させていくと考えられている。我々は、動物モデルを用いて肝臓での脂肪沈着と炎症の相互作用の分子メカニズムを解明することを目指している。肥満における炎症の端緒は、脂肪細胞ないし肝臓から産生されるケモカイン MCP-1 によって、脂肪組織や肝臓へのマクロファージの浸潤することであるとされる。我々は、ケモカインによる走化性に重要な役割を果たす Class 1B PI3 kinase (PI3K γ) のノックアウトマウスを解析することによって、肝臓における脂肪沈着や炎症がどのように変化するかを検討することによる NAFLD の病態解明を試みた。②また、糖尿病患者における肝障害の実態把握のためのデータベース構築の準備を開始した。

A. 研究目的

①肥満における炎症反応の端緒として、MCP-1 によるマクロファージの脂肪組織への浸潤が重要であるが、これを阻害したときに肝臓への脂肪沈着や炎症がどのように変化するかを解析することによって、NAFLD の病態成立のメカニズムを明らかにする。②2 型糖尿病患者における肝機能障害の実態をデータベース化によって明らかにする。

B. 研究方法

①好中球などの遊走能が阻害されていることが知られている PI3K γ ノックアウトマウス (KO) マウスを通常食 (ND) 下飼育する群と、高脂肪食 (HD) で飼育し肥満を誘導する群に分けて観察した。この際、同系統の野生型 B6 マウス (WT マウス) をコントロールとし、同様に ND および HD にて飼育する群を作成し、インスリン負荷試験 (ITT)、ブドウ糖負荷試験 (GTT)、脂肪組織及び肝臓におけるマクロファージの浸潤の検討、脂肪組織及び肝臓における炎症性サイトカインの発現、肝臓における中性脂肪含量、肝臓における脂肪酸合成・酸化・脂肪酸輸送に関する遺伝子の発現などを観察し、各々の群で比較した。

②東京大学医学部附属病院における主に入院患者を対象にした肝機能・肝炎ウイルス抗体などのデータベース構築。

(倫理面への配慮)

①で行う動物実験に関しては、東京大学医学部医学部組み換え DNA 実験安全委員会において承認されている。②本データベース構築にあたって、被験者に新たな身体的苦痛などを与える恐れはなく、経済的負担も生じない。データは匿名化された上で解析されるため、個人情報保護される。

C. 研究結果

①ND 飼育下では、WT マウスと体重・血糖値・インスリン値などに差を認めないが、HD 飼育下では PI3K γ KO マウスは WT マウスに比して、血糖値・インスリン値ともに有意に低く、ITT でもインスリン感受性亢進を認めた。脂肪組織におけるマクロファージ数は、HD 飼育によって週齢を追うごとに増加するが、PI3K γ KO マウスではその増加の度合いが著明に低下していた。また、WT マウスでは内臓脂肪における炎症性アディポカインの発現や血中レベルも HD 飼育によって週齢を追うごとに増加するが、

PI3K γ KO マウスでは消化が抑制されていた。同様に、WT マウスでは HD 飼育によって肝臓におけるマクロファージマーカーの発現も著しく増加するが、PI3K γ KO マウスの肝臓では、その増加が有意に抑制されており、炎症性サイトカインの発現も WT マウスに比して有意に低下していた。また、HD 飼育下では PI3K γ KO マウスの肝中性脂肪含量も WT マウスに比して有意に低下しており、脂肪酸合成酵素の発現は変わらなかったが、CPT-1 などの脂肪酸酸化に関与する酵素の発現が増加しており、また脂肪酸の輸送に関連する分子の発現が低下していた。②データベース構築のための研究計画が、東京大学医学部倫理委員会申請中である。

D. 考察

PI3K γ ノックアウトマウスでは、HD 飼育下で WT マウスに認められる脂肪組織や肝臓へのマクロファージマーカーの増加が抑制されており、それに伴って炎症性サイトカインの発現増加も抑制されている。驚くべきことに PI3K γ ノックアウトマウスでは肝臓での脂肪沈着も著明に抑制されており、それは主に脂肪酸酸化の亢進と脂肪酸取り込みの障害によるものと考えられた。これらの実験結果から、NAFLD, NASH において 1st hit, 2nd hit と考えられていた脂肪沈着と炎症反応の間に相互作用が存在することが示唆された。生活習慣の改善やインスリン抵抗性の解除等に加えて、マクロファージ浸潤を端緒とする炎症抑制も、1st hit, 2nd hit を共に抑制できる NAFLD, NASH の治療法として考慮すべきと考えられた。

E. 結論

肝臓におけるマクロファージあるいはマクロファージ様細胞による脂肪沈着制御のメカニズムを明らかにした。NAFLD, NASH における 1st hit, 2nd hit は相互に影響していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

メタボリックシンドロームの分子メカニズム—インスリン抵抗性の視点から—
植木浩二郎、栗澤元晴、窪田直人、山内敏正、門脇孝

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし