

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

NASH由来肝癌の臨床病理学的・分子生物学的解析

研究分担者 有井 滋樹 東京医科歯科大学 肝胆膵・総合外科教授

研究要旨 本分担研究はNASH, およびNBNC由来肝癌を臨床的、病理学的、分子生物学的に解析することにより、その発癌機構の一端を明らかにするとともに、新しい診断・治療の開発へつなげることを目的とする。研究の展開法の一つとしては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する。現在、得られた知見としてはNBNC由来肝癌患者は生活習慣病因子併存率が高くNASH由来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。

A. 研究目的

NASH及びNBNC由来肝癌患者の臨床・病理・分子生物学的解析 生活習慣病の増加に伴いNASH患者の著増が推察される現状においてNASH由来肝癌が今後大きな問題となると考えられる。また非ウイルス性のいわゆるNBNC由来の肝癌も明らかに増加傾向にある。このような観点からNASH由来肝癌およびNBNC由来肝癌、及びその非癌部の臨床・病理学的特徴、さらには遺伝子学的な変化を明らかにする。とくにヘテロな集団であるNBNC由来肝癌症例の癌部、非癌部の遺伝子学的変異を生活習慣病の関与（たとえばⅡ型糖尿病、アルコール摂取）の程度から分析して、NBNC由来肝癌におけるNASH由来肝癌の位置付けを明らかにするとともに、NBNC及びNASHからの発癌機構の一端を解明する。

B. 研究方法

1. HBV、HCV、NBNC、NASHの各々を基盤とする肝癌患者の臨床、病理学的特徴の解析
2. 上記の各群において臨床切除標本を用いて癌部、非癌部の網羅的遺伝子発現の解析をAfirmatrix DNA microarrayにより行う。すでに多くの症例で完了している。
3. CGHmicroarrayによるゲノム1次構造異常（ゲノムコピー数異常）の解析を上記と同じ

標本にて行う。

4. 可能な限り epigenetic な変化としての異常メチル化の検索を行う。

（倫理面への配慮）

標本データの匿名化と孤立化により、プライバシーの完全な保護を図っている。「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」などを遵守し、遺伝子研究では科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守し、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年3月29日文科科学省、厚生労働省、経済産業省告示及び文科振第266号文科科学省研究振興局長通知）に定める細則に沿う。

C. 研究結果

2000-2008年に切除した肝癌患者291名の臨床的解析をおこなった。HBV、HCV、NBNC由来肝癌患者は各々、48名（16.5%）、162名（55.7%）、79名（27.1%）であった。病理学的にNASHと診断された患者は5名（約7%）であった。年齢はNASH患者が最も高齢であった。最も特徴的なことは糖尿病、高血圧、高脂血症の併存率がHBV、HCV、NASHの順に高くなることであった。また、まだ予備実験であるが、8-OHdGによる染色ではNASH肝癌の非癌部肝組織がもっとも染色性が高い結果を得た。

D. 考察

HBV由来肝癌よりHCV由来肝癌、そしてHCV由来肝癌よりNBNC由来肝癌がいわゆる生活習慣病の併存率の高い傾向のあることが示された。さらにNASH由来肝癌患者はまだ症例数が少ないものの、生活習慣病の併存率は最大であった。また、NASH肝癌ではその非癌部肝組織が他の肝癌組織や非癌部組織よりも強く酸化ストレスを受けている可能性が示唆された。このような知見は非ウイルス性肝癌の発生・進展に生活習慣病の関与や酸化ストレスの影響のあることを示唆するものである。最近、糖尿病と肝癌の発生の関連性を示す疫学的研究の報告が発表されている。しかし、その機序については不明である。本研究のGenetic, Epigeneticなアプローチにより、糖尿病をはじめとする生活習慣病と肝癌発生との関連の遺伝子学的解明に迫る事が期待される。さらにはNBNC由来肝癌とNASH由来肝癌の分子生物学的異同を明らかにできる可能性を秘めている。そして、これら成果が新しい診断治療開発へ発展することが期待される。

E. 結論

NBNC由来肝癌患者、とりわけNASH由来肝癌患者がウイルス性肝癌患者に比べて、生活習慣病、酸化ストレスとの関わりがより強い事が示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takamatsu S, Noguchi N, kudo A, Nakamura N, Kawamura T, Teramoto K, Igari T, Arii S. Influence of risk factors for metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease on the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2008;55:609-614.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む。) なし。

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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

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

研究分担者 渡辺純夫 順天堂大学医学部 消化器内科教授
研究協力者 池嶋健一 同准教授

研究要旨：本研究では、メタボリックシンドロームモデル動物である KK-A^y マウスを用いて、部分肝切除後の肝再生機転の異常について検討した。KK-A^y 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-A^y 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-A^y 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すると共に、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ており、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。また、メタボリックシンドロームに伴う脂肪性肝炎の病態形成には肝再生不全が重要な役割を演じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

本邦においても近年メタボリックシンドロームの概念が急速に普及し、それに伴う肝病態としての非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の重要性が広く認識されるようになってきている。私たちはこれまでメタボリックシンドロームのモデル動物である KK-A^y マウスを用いて非アルコール性の脂肪性肝炎の病態解析を行ってきた。その過程で、KK-A^y マウスではアルコール負荷およびメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食負荷による脂肪性肝炎の進展がより顕著であることおよび、その背景に低アディポネクチン血症を主体としたアディポカインの発現バランスの異常が認められることを報告してきた。そこで、メタボリックシンドロームに伴う脂肪性肝障害の増悪メカニズムをより明らかにする目的で、KK-A^y マウスに 70% 部分肝切除した際の肝再生機転の変化を中心に解析した。

B. 研究方法

70% 部分肝切除モデルの作成・免疫組織化学

8 週齢の雄性 KK-A^y マウス (日本クレア) とコントロール (C57Bl/6) マウスに対し、エーテル麻酔下に Higgins & Anderson の定法に従って 70% 肝切除を施術した。術後 48 時間にわたり生存率を観察すると共に、経時的に屠殺して血清および肝組織サンプルを採取した。一部の動物は屠殺の 2 時間前に BrdU を腹腔内投与し、肝組織への BrdU 摂取を検討した。採取した肝組織の一部はホルマリン固定し、パラフィン包埋切片を作成して、BrdU および PCNA を免疫染色により評価した。

血清アディポカイン値の測定

血清レプチン濃度およびアディポネクチン濃度は、ELISA 法キット (生化学工業および大塚製薬社製) を用いて測定した。

肝組織中 TNF- α mRNA 発現レベルの同定

肝組織より guanidium/CsTFA 比重遠心法により total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法で TNF- α mRNA 発現レベルを定量的に解析した。リアルタイム PCR 増幅には SYBR Premix Ex TaqTM (タカラバイオ社製) および ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE アプライドシステム社製) を用いた。

STAT-3 リン酸化の検出

肝組織中の STAT-3 リン酸化は抗リン酸化 STAT-3 抗体 (Cell Signaling 社製) を用いた Western blot 法により検出した。また、STAT-3 蛋白発現量についても抗 STAT-3 抗体 (Cell Signaling 社製) を用いて同様に検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験に関しては、事前に学内の実験動物委員会で動物実験計画の審査、承認を受けている。また、動物愛護の観点からも最大限の配慮をしつつ研究を遂行している。

C. 研究結果

70%肝切除後の生存率および肝再生機転の変化

C57Bl/6 マウスでは 70%肝切除後 48 時間では 100%生存したが、KK-Ay マウスでは同様の処置により 48 時間以内に半数が死亡した。また、肝切除 48 時間後の時点で肝細胞核への BrdU 取込みを免疫染色で検討すると、C57Bl/6 マウスでは約 22%に上昇するのに対し、KK-Ay マウスではほとんど取込みを認めなかった。PCNA 免疫染色でも同様に、KK-Ay マウスでは肝切除後の発現誘導がほぼ完全に抑制されていた。さらに、肝組織中の cyclin D1 蛋白発現を Western blot 法で検出した。Bl/6 マウスでは肝切除後 48 時間後に明らかな cyclin D1 発現誘導を認めたが、KK-Ay マウスでは肝切除後の発現誘導が殆ど検出不能なレベルに抑制されていた。以上の結果より、C57Bl/6 マウスと比較して KK-Ay マウスでは明らかに肝再生が抑制されていることが明らかになった。

70%肝切除後の血中アディポカイン値の変動

KK-Ay マウスでは既報の通り血中レプチン値が著明に高値、血中アディポネクチン値が低値を呈する。そこで、肝切除後の血中アディポカイン値の推移を検討した。肝切除後には血中レプチン値は C57Bl/6 マウスでは 6 時間をピー

クに術前値の約 10 倍に上昇した。KK-Ay マウスでは術直後に一過性に低下した後、24 時間をピークとして著明に上昇し、全経過中 Bl/6 の値を大幅に上回った。一方、血中アディポネクチン値はいずれの strain でも肝切除後には漸減傾向を示し、48 時間後には前値の 60%程度にまで低下したが、全経過を通じて KK-Ay マウスでは Bl/6 マウスと比較し著明に低値を示した。70%肝切除後の肝組織中 TNF- α mRNA 発現および STAT-3 リン酸化の変動

肝組織中の TNF- α mRNA は、Bl/6 マウスでは肝切除後 1 時間をピークに微増した後に低下したが、KK-Ay マウスでは肝切除 1 時間後に約 30 倍に上昇し、一旦漸減した後に 24 時間後再上昇を認めた。STAT-3 リン酸化は Bl/6 マウスでは肝切除 6 時間後をピークに一過性的上昇を認めたが、KK-Ay マウスではピークが 6 時間後にシフトし、高リン酸化状態が 24 時間後まで遷延して観察された。

D. 考察

脂肪肝で肝再生不全が見られることは従来良く知られており、アルコール性脂肪肝は肝移植後のグラフト不全を来す要因としても重要視されている。また、肥満や耐糖能異常を伴い著明な脂肪肝を呈する ob/ob マウス、db/db マウスや Zucker ラットなどの非アルコール性脂肪肝モデル動物においても肝再生機転の異常が観察されている。ob/ob マウスや Zucker ラットはレプチンおよびその受容体の遺伝子変異に伴うフェノタイプの異常であると考えられ、実際これらの動物における肝再生不全にはレプチン・レプチン受容体系のシグナル伝達の異常が関与していると考えられている。しかし、ヒトで一般的に見られるメタボリックシンドロームではこれらの動物のようなレプチンないしレプチン受容体遺伝子の変異は稀であり、むしろ肥満に伴う高レプチン血症並びにレプチン抵抗性と考えられる状態が多く観察される。実際、レプチンは肝線維化の進展に重要な役割を果たしているサイトカインの一つと位置付けられ、ob/ob マウスや Zucker ラットなどではヒトの脂肪性肝炎で見られるような肝線維化の進展が観察されない。従って、ヒトの NASH およびアルコール性肝障害に及ぼすメタボリックシンドロームの関与について検討するためには、よりヒトの病態に即した動物モデルでの解析が望ましいと考えられる。

近年私たちが検討に用いている KK-A^y マウスは、肥満・耐糖能異常を自然発症する KK マウスに肥満遺伝子 A^y を導入することにより、早期から高度な肥満・高血糖を発現する 2 型糖尿病モデルマウスであり、この動物はインスリン抵抗性に加えてレプチン抵抗性や低アディポネクチン血症など、ヒトのメタボリックシンドロームに極めて類似した病態を呈する。KK-A^y マウスは通常の餌で飼育しても軽度の脂肪性肝炎を自然発症するが、脂肪性肝炎を誘発する MCD 食などの食餌性負荷をかけることにより高度の脂肪性肝炎が惹起されることをこれまで私たちは明らかにしてきた。今回の検討では KK-A^y マウスに 70% 肝切除を行うことにより、メタボリックシンドロームの病態における肝再生機転の変化について詳細に解析を行った。興味深いことに、KK-A^y マウスでは重度の肝再生不全が認められ、その背景には低アディポネクチン血症に伴う TNF- α 発現亢進や、高レプチン血症に伴う JAK-STAT 系シグナル伝達の異常が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

NASH を含む慢性肝疾患の病態進展メカニズムには肝再生不全を含む組織損傷修復機転の異常が関与していると考えられることから、再生不全に対する治療的アプローチの確立が今後の重要な課題の一つとして掲げられる。

F. 健康被害情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J. Gastroenterol.* 2008;43:509-518.
2. Takeda K, Kojima Y, Ikejima K, Harada K, Yamashina S, Okumura K, Aoyama T, Frese S, Ikeda H, Haynes N, Cretney E, Yagita H, Sueyoshi N, Sato N, Nakanuma Y, Smyth M, Okumura K. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(31):10895-10900.
3. Uchiyama A, Kim JS, Kon K, Jaeschke H,

Ikejima K, Watanabe S, Lemasters JJ. Translocation of Iron from Lysosomes into Mitochondria is a Key Event During Oxidative Stress-Induced Hepatocellular Injury. *Hepatology* 2008;48(5):1644-54.

4. 池嶋健一, 柳沼礼子, 渡辺純夫. 特集 ウイルス性慢性肝炎: 診断と治療の進歩 トピックス IV. C 型慢性肝炎の抗ウイルス療法 2. C 型慢性肝炎の進展と治療抵抗性 2) 宿主側因子の関与. 日本内科学会雑誌 97(1): 69-74, 2008.
5. 池嶋健一, 青山友則, 渡辺純夫. 特集 肝疾患と糖代謝, 脂質代謝 VI. 糖代謝および脂質代謝異常と肝臓 4. 脂肪肝と肝切除. 肝胆膵 56(1): 119-125, 2008.
6. 内山明, 池嶋健一, 今一義, 渡辺純夫. 特集 II 鉄代謝と消化器疾患 酸化ストレスに伴う肝細胞障害における鉄イオンの細胞内動態と細胞死への影響. 消化器科 46(2): 229-233, 2008.
7. 池嶋健一, 渡辺純夫. 特集 肥満へのアプローチ 肥満症・メタボリックシンドロームの治療・管理 (合併症の診断と治療) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH). 治療 90(5): 1727-1732. 2008
8. 今一義, 池嶋健一, 渡辺純夫. 特集 NASH/NAFLD の臨床および研究の進歩 NASH/NAFLD の成因と病態. *Medical Science Digest* 36(7): 27-30, 2008.
9. 柳沼礼子, 池嶋健一, 渡辺純夫. 第 42 回日本成人病 (生活習慣病) 学会: 「教育講演」より 脂肪肝から肝癌へ—NASH の病態を考える. 成人病と生活習慣病 38(5): 539-545, 2008.
10. 高島基樹, 池嶋健一, 渡辺純夫. 連載 第 18 回 No.35 シグナル伝達を理解するために必要な知識 E カドヘリンによるシグナル伝達. *分子消化器病* 5(2): 68-71, 2008.
11. 柳沼礼子, 池嶋健一, 渡辺純夫. 特集 C 型肝炎のすべて 2009 合併症を有する患者の HCV 治療 肝脂肪化合併 HCV と Interferon 治療. 肝胆膵 57(5), 949-957, 2008.
12. 渡辺純夫, 鈴木聡子, 池嶋健一. 1. ベグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療成績. *Progress in Medicine* 28(11): 2625-2629, 2008.

13. 北村庸雄, 鄭冬梅, 池嶋健一, 榎本信行, 山科俊平, 今一義, 鈴木聡子, 竹井謙之, 佐藤信紘, 渡辺純夫. 特集 肝病態生理研究のあゆみ 11. Sphingosine 1-phosphate (S1P) の肝類洞内皮細胞に及ぼす影響. 薬理と治療 (JPT) 36 suppl: S155-S157, 2008.
 14. 内山明, 池嶋健一, 今一義, 渡辺純夫. 特集 肝病態生理研究のあゆみ 12. 酸化ストレスに伴う肝細胞障害における鉄イオンの細胞内動態と細胞死への影響. 薬理と治療 (JPT) 36 suppl: S159-S164, 2008.
 15. 青山友則, 池嶋健一, 今一義, 山形寿文, 柳沼礼子, 山科俊平, 渡辺純夫. 特集 肝病態生理研究のあゆみ 19. KK-A^y マウスにおける肝再生不全—Pioglitazone による改善効果の検討—. 薬理と治療 (JPT) 36 suppl: S197-S199, 2008.
 16. 柳沼礼子, 池嶋健一, 福原京子, 青山友則, 今一義, 水井智和, 山科俊平, 鈴木聡子, 渡辺純夫. 特集 肝病態生理研究のあゆみ 27. NAFLD 患者に対する低用量ピオグリタゾン投与の有用性について. 薬理と治療 (JPT) 36 suppl: S239-S241, 2008.
2. 学会発表
1. Ikejima K, Arai K, Kon K, Aoyama T, Okumura K, Yaginuma R, Yamashina S, Watanabe S. C-reactive protein attenuates experimental hepatic fibrosis through inhibition of hepatic stellate cells transactivation. Poster Session, The 43rd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. April 23-27, 2008, Milan, Italy.
 2. Kon K, Ikejima K, Aoyama T, Arai K, Yamashina S, Watanabe S. Acetaminophen induces severe liver injury caused by increased susceptibility to oxidative stress in obese KK-A^y mice. Poster Session, The 43rd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. April 23-27, 2008, Milan, Italy.
 3. Ikejima K, Takeda K, Kojima Y, Aoyama T, Okumura K, Yamashina S, Okumura K, Watanabe S. TRAIL Receptor DR5-mediated apoptosis signals induce sclerosing cholangiopathy in mice. AASLD Research Forum, Digestive Disease Week, May 18, 2008, San Diego, USA.
 4. Yamagata H, Ikejima K, Takeda K, Aoyama T, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Altered expression and function of hepatic NKT cells in obese and diabetic KK-A^y mice. Parallel Session, The Liver Meeting 2008 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), Nov. 2, 2008, San Francisco.
 5. Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, Yamagata H, Yamashina S, Watanabe S. Pioglitazone minimizes regeneration failure following partial hepatectomy in obese KK-A^y mice. Poster Session, The Liver Meeting 2008 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), Nov. 2, 2008, San Francisco.
 6. Kon K, Ikejima K, Aoyama T, Yamagata H, Arai K, Yamashina S, Watanabe S. Involvement of iron in trans-fatty acid-induced accumulation and oxidative stress in mouse hepatocytes. Poster Session, The Liver Meeting 2008 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), Nov. 2, 2008, San Francisco.
 7. 池嶋健一, 柳沼礼子, 渡辺純夫. NAFLD に対する低用量ピオグリタゾン投与の有用性. シンポジウム 8, 第 94 回日本消化器病学会総会, 2008 年 5 月 8 日, 福岡.
 8. 池嶋健一, 竹田和由, 渡辺純夫. 硬化性胆管病変形成における TRAIL 系免疫機構の役割: TRAIL および DR5 遺伝子欠損マウスを用いた検討. ワークショップ 10, 第 94 回日本消化器病学会総会, 2008 年 5 月 9 日, 福岡.
 9. 高島基樹, 池嶋健一, 塚田重城, 今一義, 金野朗, 山科俊平, 鈴木聡子, 渡辺純夫. 癌抑制蛋白 PTEN の肝星細胞活性化に対する抑制効果. ワークショップ 8, 第 44 回肝臓学会総会, 2008 年 6 月 6 日, 松山.
 10. 鈴木聡子, 池嶋健一, 高島基樹, 水井智和, 山形寿文, 青山友則, 内山明, 柳沼礼子, 今一義, 金野朗, 山科俊平, 松本俊治, 渡辺純夫. ジェノタイプ 1b 型高ウイルス量の C 型慢性肝炎における peg-interferon/ribavirin 併用療法の宿主側難治性要因: 肝脂肪化との関連について.

口演，第 44 回肝臓学会総会，2008 年 6 月 6 日，松山。

11. 青山友則，池嶋健一，今一義，山形寿文，柳沼礼子，山科俊平，渡辺純夫。メタボリック症候群における肝再生不全：pioglitazone による改善効果とそのメカニズムの検討。第 44 回肝臓学会総会，2008 年 6 月 6 日，松山。
12. 池嶋健一，今一義，青山友則，山形寿文，柳沼礼子，山科俊平，鈴木聡子，渡辺純夫。C reactive protein (CRP) の肝星細胞活性化抑制を介した抗肝線維化作用。口演，第 44 回肝臓学会総会，2008 年 6 月 6 日，松山。
13. 今一義，池嶋健一，青山友則，山形寿文，内山明，柳沼礼子，山科俊平，渡辺純夫。肝細胞の脂肪沈着とネクローシスに対するトランス脂肪酸の影響。ポスター，第 44 回肝臓学会総会，2008 年 6 月 6 日，松山。
14. 柳沼礼子，池嶋健一，福原京子，青山友則，今一義，水井智和，山科俊平，鈴木聡子，渡辺純夫。NAFLD 治療におけるピオグリタゾン投与用量の検討：低用量投与の有用性について。ポスター，第 44 回肝臓学会総会，2008 年 6 月 6 日，松山。
15. 青山友則，池嶋健一，渡辺純夫。KKA^yマウスの肝再生不全に対する pioglitazone の改善作用とそのメカニズム。ワークショップ 1，第 50 回日本消化器病学会大会 (JDDW2008)，2008 年 10 月 1 日，東京。
16. 今一義，池嶋健一，渡辺純夫。メタボリックシンドロームにおける肝内参加ストレス応答性更新とそのメカニズム。パネルディスカッション 2，日本肝臓学会東部会，2008 年 12 月 4 日，東京。
17. 池嶋健一，柳沼礼子，渡辺純夫。C 型慢性肝炎における肝脂肪化およびアディポカイン発現とペグインターフェロン・リバビリン併用療法奏効性。シンポジウム 2，日本肝臓学会東部会，2008 年 12 月 4 日，東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

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

高度線維化 NASH のコホート Study

分担研究者 橋本悦子 東京女子医科大学 消化器内科教授

研究要旨: NASH 高度線維化例のコホート study として、今回 NASH 肝硬変の予後・発癌率・死因を C 型肝硬変と比較した。結果、NASH 肝硬変の予後は C 型肝硬変とかわらず、5 年生存率、NASH 75.2%、C 型 73.8%であった。発癌率に関しては、NASH 11.3%/5 年、C 型 30%/5 年と有意差はないが、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因子としては、予後不良な因子としては 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、死因としては、80%が肝不全、肝癌の肝関連死であった。

A. 研究目的

日本において脂肪肝 NASH (非アルコール性脂肪肝炎) は急増している。一方、NASH は人種差があることが知られており、日本人独自の NASH の予後・発癌率・死因を明らかにすることは厚生労働行政の面からも、非常に重要である。また、近年、肥満や糖尿病と肝発癌との関係についての報告が集積されてきている。米国からは、90 万人を対象とした肥満と癌死に関する大規模な prospective study が施され、BMI 35kg/m² 以上の肥満例では、肝癌死の relative risk が、男性 4.52 倍、女性 1.68 倍に上昇することが報告された。また、我が国からも、Muto らは非代償性肝硬変 622 例の肝細胞癌 (HCC) 発癌リスクを検討し、男性、糖尿病、AFP 値 20ng/ml 以上、BMI の高い症例、血清アルブミン値が低いことが発癌危険因子であると報告し、肝硬変からの HCC 発癌に糖尿病や肥満が関与していることを明らかにした。また、糖尿病と発癌に関しては、厚生労働省「多目的コホート研究」JPHC から、糖尿病のある人はない人に比べての肝発癌リスクが、男性 2.24、女性 1.94 となることが報告された。以上のことより、NASH の発癌・予後をテーマとして、NASH 肝硬変を C 型肝硬変と比較し検討した。

B. 研究方法

NASH は、組織学に確認された NASH 肝硬変 (NASH-LC) 68 例を prospective に解析した。

対象としてインターフェロン治療をおこなわなかったか、無効であった C 型肝硬変 (HCV-LC) 69 例を比較した。検討項目は、①肝不全の合併症の頻度、②発癌率、③生存率、④死亡・生存に寄与する因子、⑤死因であり、cox hazard model、Kaplan-Mier 法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

今回の研究は prospective study であるが、NASH-LC は確立した治療法がなく、肝硬変に対する一般的な治療はおこなった上で解析したので倫理的には問題ないものと判断した。なお、解析結果に関して患者氏名の公表はなく、患者へ新たな負担も発生しない。

C. 研究結果

表に 1 に NASH-LC と HCV-LC の肝硬変診断時の両疾患の臨床所見を示す。肥満、糖尿病、高脂血症の頻度が NASH-LC で有意に高頻度であった。また、生化学データでは、トランスアミナーゼは HCV-LC が有意に高値で、一方、γGTP は NASH-HCC で有意に高値であった。また、プロトロンビン時間や血小板数などの肝機能は NASH で比較的保たれており、同じ肝硬変でも NASH と HCV では、その特徴が異なることが注目される。診断時の肝不全の合併 (表 2) に関しては、腹水、食道静脈瘤、肝性昏睡に関して、NASH-LC では、9%、44%、3%で、HCV-LC では 6%、42%、1%で、両群に有意差は認めなかった。また、5

年各合併症の出現頻度も両群で有意差は認めなかった。

肝発癌に関しては、肝硬変診断時 HCC を合併した症例は、NASH-LC では 14 例 (21%)、HCV-LC では 9 例 (13%) で、これらの症例を除いた症例で検討した 5 年発癌率は、NASH-LC では 11.3%、HCV-LC では 30.5% であった (図 1)。なお、HCV-LC において HCC 発癌は高率であるが統計学的には有意差は認めなかった。NASH における HCC 発癌に寄与する因子を Cox 回帰分析で検討したが有意な因子は算出できなかった。

NASH-LC と HCV-LC の 5 年生存率は 75.2% と 73.8% で、両群の死因は HCC が最も高率で、NASH-LC 47%、HCV-LC 68% で、肝不全がそれぞれ 32% と 25% と続く。NASH-LC での死亡 19 例中 15 例 (79%) が肝関連死であった。NASH-LC での肝以外の 4 例の死因では、心血管イベントは脳梗塞 1 例のみであった。NASH-LC の死亡に寄与する有意因子は HCC と Child-Turcotte-Pugh score と算出され、HCC が重要な予後決定因子であることが明らかとなった (表 3)。図 3 は NASH 診断時 HCC を認めた 14 例と、発癌のない 54 例の予後を比較検討したもので HCC の有無で生存率が大きく異なることがわかる。

D. 考察

我が国の NASH-LC の予後を調べたところ、肝不全兆候 (腹水、黄疸、消化管出血) の出現、生存率に関して、HCV-LC と比較しほぼ同様の結果であった。この結果は、Sanyal ら、Hui らの報告と同様で、日本人 NASH でも肝硬変になると予後は決してよくないことが明らかになった。彼らの結果とは、死因・HCC の発癌の点で異なった。この点は、今回の検討した日本人 NASH-LC が高齢であったため発癌が多く、そのことが死因にも影響を及ぼしているものと推定された。実際、NASH からの発癌例では、平均発癌年齢が 70.5 歳であり、HCV-LC からの発癌年齢 62 歳より高齢であった。また、死因に関しても、欧米では心血管イベントが多いのに対し、今回の検討では肝関連死が 80% と多かった。これは、発癌例が多いこと、日本人 NASH 肝硬変では欧米 NASH より動脈硬化性変化が弱いことが関与しているのではないかと推定された。いずれにしても、日本人 NASH 肝硬変では、C 型よりは発癌率はやや劣るが、発癌を念頭に置いた follow up が必要であることが明らかになった。また、HCC 発癌の危険因子を検討したが明らかな因子は同定されなかった。しかし、HCC 発癌危険因子の解析対象を NASH-LC に限らず NASH 全例 (382 例、うち HCC 34 例) で検討すると、

高齢であること、高度線維化、AST 低値と肝組織の活動性は低いことと算出された。この一見矛盾する AST 低値と肝組織活動性の有意因子として算出される理由は、NASH では進行した肝硬変に HCC が発癌するため、発癌時はすでに活動性が低下した burned-out NASH に近い状態であるためと考えられた。

E. 結論

NASH 肝硬変は C 型肝炎と比較して、その予後は同様に予後不良で、発癌に関しては C 型肝炎よりやや低率であったが有意差を認めなかった。NASH 肝硬変において、HCC の発癌がその予後に一番影響を及ぼす因子であり、そのことを念頭に置いた NASH 肝硬変に対する対応が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Familial aggregation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Tokushige K, Yatsuji S, Hashimoto E, et al. Intern Med. 2008;47:405-10.
2. Prevalence of esophagogastric varices in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Nakamura S, Konishi H, Kishino M, Yatsuji S, Tokushige K, Hashimoto E, et al. Hepatol Res. 2008 ;38:572-9.
3. Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease. Komatsu M, Yazaki M, Tanaka N, Sano K, Hashimoto E, et al. J Hepatol. 2008 ;49:810-20.
4. Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. Yatsuji S, Hashimoto E, Tobar M et al. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Epub ahead of print

2. 学会発表

1. 橋本悦子. ワークショップ “NASH を基盤とし細胞癌の特徴と予後” 12 回肝臓大会、2008 年。
2. Hashimoto E. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma, Basic epidemiology. 第 94 回日本消化器病学会総会、2008 年。

H. 知的財産権の出産・登録状況
なし

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

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

研究分担者： 安居幸一郎 京都府立医科大学 消化器内科学講師

研究要旨：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。計 74 名の NAFLD 患者（単純性脂肪肝(FL)33 名と NASH41 名）の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。

A. 研究目的

肝の脂肪化と鉄蓄積が酸化ストレスを惹起し、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、なかでも非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態進展に関与する。NASH/NAFLD における肝脂肪化と鉄沈着の病態およびその機序を明らかにするために、患者の肝臓における脂質代謝および鉄代謝関連遺伝子の発現を解析した。

B. 研究方法

単純性脂肪肝(FL)患者 33 名と NASH 患者 41 名からなる計 74 名の NAFLD 患者の肝生検組織から RNA を抽出し、以下の脂質代謝関連 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。すなわち、脂質代謝については、脂質の取り込み（FATP5）、脂質の合成（SREBP1c、FASN、ACACA）、脂質の分解（ β 酸化）（PPAR α 、CYP2E1、ACADM、ACOX）、脂質の輸送（MTP）に関与する遺伝子を解析した。鉄代謝に関連しては、鉄の肝細胞への取り込みに関与する transferrin

receptor 遺伝子（TfR1、TfR2）、および肝細胞から分泌されて十二指腸からの鉄の吸収を抑制する hepcidin 遺伝子を解析した。

なお、本研究における遺伝子発現解析は京都府立医科大学・倫理委員会で承認されている。研究全般において「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省；平成 13 年 3 月 29 日）を遵守した。インフォームド・コンセントに十分留意して患者の同意を文書で得て、個人情報保護のためサンプルの匿名化を行い、サンプルとデータを厳重に管理した。

C. 研究成果

①臨床データ

患者背景と血液生化学データを FL と NASH で比較した。FL に比べて NASH では、AST・ALT が高値、血小板が低値、Alb が低値、T-Chol と TG が低値、HOMA-IR が高値であった。酸化ストレスマーカーである thiredoxin の発現は NASH で高値であった。

②脂質代謝

肝脂肪化の程度はFLとNASHでほぼ同等であった。NASH症例の中で、線維化のstage F4すなわち肝硬変例では脂肪化の程度は低かった(burn out NASH)。

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。

③鉄代謝

肝での鉄の蓄積は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、逆にtransferrin receptor 2の発現はFLに比べてNASHで低かった。肝線維化のstageの進行に伴って、transferrin receptor 1の発現は上昇し、逆にtransferrin receptor 2の発現は低下する傾向にあった。

hepcidinの発現はFLに比べてNASHで低かった。肝線維化のstageの進行に伴ってhepcidinの発現は低下する傾向にあった。また、鉄の蓄積に対するhepcidinの応答をみる指標として、hepcidin mRNA/ferritinまたはhepcidin mRNA/hepatic iron scoreを計測した。それらの比はFLに比べてNASHで低かった。

D. 考察

従来の報告と同様、FLに比べてNASHでは酸化ストレスとインスリン抵抗性が亢進していた。

脂質代謝関連遺伝子の発現解析において、脂質代謝の各ステップ(取り込み、合成、分解、輸送)を制御する遺伝子の発現レベルがすべて、FLに比べてNASHで低下していた。FLに比べてNASHでは脂質代謝レベルが全般的に低下している可能性が示唆された。

肝臓に鉄が蓄積すると、それを代償するために、肝細胞はtransferrin receptor 1の発現を低下させて肝細胞への鉄の取り込みを抑制する、あるいはhepcidinの発現を亢進させて十二指腸からの鉄の吸収を抑制する、と考えられる。一方、肝臓での鉄の蓄積はFLに比べてNASHで高度であった。よって、FLに比べてNASHではtransferrin receptor 1の発現が低値、hepcidinの発現が高値と予想された。しかし、遺伝子発現解析の結果は逆であった。これらの結果から、NASHにおいては鉄蓄積に応答する機構が障害されている可能性が示唆された。

今回の研究では脂質代謝・鉄代謝関連遺伝子

の発現をmRNAレベルで解析した。遺伝子発現のmRNAレベルとタンパクレベルは必ずしも一致しない。よって、タンパク質の発現レベル、さらには酵素活性あるいは機能レベルを測定することが今後の課題である。

E. 結論

NASH/NAFLDにおける肝脂肪化と鉄蓄積の病態を解明するために、肝臓における脂質代謝および鉄代謝関連遺伝子の発現を解析した。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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 2008 in press.

Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Arai S, Okanoue T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48:109-20.

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.* 2009;275:27-34.

Miyagawa M, Minami M, Fujii K, Sendo R, Mori K, Shimizu D, Nakajima T, Yasui K, Itoh Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa

T. Molecular characterization of a variant virus that caused de novo hepatitis B without elevation of hepatitis B surface antigen after chemotherapy with rituximab. *J Med Virol.* 2008;80:2069-78.

Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Ariei S, Inazawa J, Okanoue T. Activation of B-Myb by E2F1 in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Res.* 2008; 38:886-95.

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.* 2008;38:348-53.

Inagaki Y, Yasui K, Endo M, Nakajima T, Zen K, Tsuji K, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Ariei S, Okanoue T. CREB3L4, INTS3 and SNAPAP are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;180:30-6.

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 counts. *Hepatol Res.* 2008 ;38:27-36.

2. 学会発表

Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Steatosis and intrahepatic expression levels of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients with chronic hepatitis C. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2009 Nov 2; San Francisco, USA.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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

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

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨：NASHにおける肝障害には肝細胞アポトーシスが関与することが報告されているが、肝細胞アポトーシスがNASHの病態形成にどのような意義を持っているかは明らかにされていない。このような問題を解明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。本年度は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。来年度はこのマウスを用いて食餌誘発性のNASHの発症におけるアポトーシスの意義を検討する予定である。

A. 研究目的

NASHは肝細胞死の持続と線維化の進行により、通常の脂肪肝と峻別される病態である。NASHにおける肝細胞障害にアポトーシスが関与していることが示されている(Feldstein et al., *Gastroenterology* 125:437,2003)。しかしながら、肝細胞アポトーシスがNASHの病態形成にどのような意義を持っているのかは明らかにされていない。我々はBcl-2ファミリー分子であるBcl-xLを肝細胞特異的にノックアウトすることにより、肝細胞アポトーシスを自然発症するモデルを作成し、肝臓におけるアポトーシスが肝線維化を誘導することを報告した(*Gastroenterology* 127: 1189-1197, 2004)。そのメカニズムの一つとして、マクロファージや肝細胞がアポトーシス細胞を貪食し、これに伴い多量のTGF β が産生されることを見出した。本研究課題では、NASHにおける肝細胞アポト

ーシスの臨床的意義をヒト試料を用いて明らかにし、動物モデルを用いてミトコンドリア経路のアポトーシスがNASH病態の進展にどのような意義を持つかを解明することを目的に研究を行う。

B. 研究方法

NAFLD患者の肝生検試料および保存血清を用いて、肝細胞アポトーシスをTUNEL染色、caspase-3/7活性で評価した。Floxed bak alleleとbak deletion alleleをもつマウスとAlbCreマウスを交配し、肝細胞特異的Bak/Bax KOマウスを作成した。ミトコンドリア経路のアポトーシスに対する阻害活性を検討するために、さらに肝細胞特異的Bcl-xL欠損マウスとの交配を行いtriple KOマウスを作成した。

C. 研究成果

NAFLD 症例におけるアポトーシスの関与を評価するために、血清中の caspase-3/7 活性を測定した。健常コントロール 690 RLU/50 μ l (624-755)、単純性脂肪肝 (N=16) 942 RLU/50 μ l (624-755)、NASH (N=18) 1052 RLU/50 μ l (598-1377)であり、NASH と健常者の間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。NASH におけるカスパーゼ依存的細胞死の関与が示唆されたが、NASH と単純性脂肪肝の二つの病態を鑑別するには至らなかった。さらに、パラフィン切片を用いて TUNEL 染色を行ったところ、単純性脂肪肝、NASH とともに肝細胞アポトーシスの亢進が認められた。

ミトコンドリア経路のアポトーシスの病態形成における意義を検討するために、肝細胞特異的 Bak/Bax 欠損マウスを作成した (*alb-cre (+) bak^{-/-} bax fl/fl*)。このマウスの表現型を検討するために、Bcl-xL 欠損により肝細胞特異的にアポトーシスをおこすマウス (*alb-cre (+) bcl-x fl/fl*) と交配を行った。肝細胞特異的 Bak/Bax 欠損マウスではミトコンドリア経路のアポトーシスが完全に阻害された (ALT 値: *alb-cre (+) bcl-x fl/fl bak^{-/-} bax +/+*, 229 ± 131 IU/L vs. *alb-cre (+) bcl-x fl/fl bak^{-/-} bax fl/fl*, 17 ± 3 IU/L)。

D. 考察と結論

臨床試料において、単純性脂肪肝、NASH とともに肝細胞アポトーシスが亢進していることを確認した。肝細胞アポトーシスの程度は単純性脂肪肝と NASH で同程度に認められ、両病態を鑑別するには至らなかった。単純性脂肪肝と NASH は完全に独立した疾患ではなく、一部の単純性脂肪肝は NASH に移行する可能性もあり、特にアポトーシスの亢進した単純性脂肪肝の予後については今後検討する必要があると考えられる。

Bak/Bax のノックアウトは一般に胎生致死であるが、今回肝細胞特異的な Bak/Bax KO マウスを作成し、ミトコンドリア経路のアポトーシスを完全に阻害するモデルを作成した。来年度は食餌誘発性のマウス NASH モデルを作成することにより、NASH の病態形成におけるアポトーシスの意義について検討する予定である。

E. 研究発表

論文発表

1. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 43: 811-822, 2008.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

閉経期におけるインスリン抵抗性発現機構の解明

研究分担者 西原利治 高知大学 消化器内科准教授

研究要旨: NASH は非アルコール性脂肪性肝疾患の中でも最も肝病変の進行が懸念される病態であるが、未だ治療法は確立されていない。そこで我々は発病に繋がる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、新たな治療法を開発したいと考えている。本年は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、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を明らかにした。

A. 研究目的

C型肝炎を中心としたウイルス性肝疾患に伴う肝硬変や肝細胞癌に対する関心は極めて高い。これに対して、非アルコール性脂肪性肝疾患は成人の 13%を占める肝疾患であり、しばしば非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に移行し、肝硬変や肝細胞癌の発生源となる。しかし、肝疾患としての脂肪肝の予後は極めて良好との従前よりの先入観があるためか、医療の現場における本症の重要性は十分に認識がなされているとは言いがたく、日常診療の現場では未だに脂肪肝を進行性の病変として捉える視点が欠けている。

肥満の増加と共に急増した NASH は、遺伝的素因に過食や運動不足といった環境要因が相乗して発症する生活習慣病であり、1998 年によく疾患概念が確立された。我々は俊約遺伝子である β -adrenergic receptor、抗ラジカル作用を持つ Mn-SOD、炎症惹起物質である IL-1 β 、肝臓から中性脂肪を搬出する主要経路を司る MTP などの分子の機能性遺伝子多型が日本人における NASH の危険因子となっていることをすでに明らかにし、コリンやメチオニンの消費が亢進していることも明かとした。

NASH ではしばしば高度の肥満が認められることから、本年度は日本人の肥満の危険因子とされる small heterodimer partner gene (SHP) の遺伝子変異が NASH 発症の危険因子となっている可能性についてまず検討した。これは、変異 SHP を持つ症例でしばしば肝障害が観察されるとの報告 (Nishigori et al. Proc Natl

Acad Sci USA 98: 575-580, 2001)があるためである。

脂肪肝の肝細胞では endoplasmic reticulum stress が惹起されている。しかし、形態学的には脂肪肝以外に、endoplasmic reticulum (ER) stress の存在を窺わせる所見を認めない。これは XBP1 をはじめとする代償機構が正常に機能しているためと考えられる。これに対して、NASH に罹患した肝臓の風船様肝細胞では細胞質にユビキチン化した蛋白の蓄積がしばしば観察され、このような代償機構が破綻していることが示唆される。分泌蛋白はゴルジ装置で糖や脂質により修飾を受けて分泌されるので、ゴルジ装置の機能異常は変性蛋白の肝細胞内蓄積を容易に惹起する。そこでゴルジ装置の機能性遺伝子多型が NASH における風船様肝細胞の出現と関連する可能性についても検討した。

B. 研究方法

組織学的に NASH の確診が得られた 93 症例を対象に SHP 遺伝子の 2つの exon と flanking regions の塩基配列について、遺伝子変異を検索した。ついで、新たに見つかった変異遺伝子蛋白を発現させ、HNF-1 \cdot 遺伝子の promoter を用いた luciferase reporter assays によりその機能評価を行った。

次いで、組織学的に NASH との確定診断が得られた 95 症例を対象として、Cog2 遺伝子および Cog6 遺伝子の機能性遺伝子多型と臨床所見および肝組織所見との関連について検討を行った。

(倫理面への配慮)ヒトの検体を用いて機能性遺伝子多型の検索を行うために、実験計画書と検体提供者に対する説明文書を作成し、高知大学倫理委員会に提出し承認を得た。これに基づいて、人権擁護上の配慮、不利益、危険性の排除等について説明を行い、インフォームドコンセントを文書で得た。

C. 研究結果

SHP 遺伝子の遺伝子多型についての検討では 15 種類の遺伝子変異が確認され、NASH でも Arg45Pro という新たな変異が発見された。15 個の変異の内、12 種類で SHP の機能低下が観察されたが、NASH で発見された Arg45Pro という新たな変異には機能異常が観察されず、SHP 遺伝子変異が NASH の発症の危険因子である可能性は低いと考えられた。

他方、Cog2 および Cog6 の機能性遺伝子多型に関する検討では、NASH で Cog 2 gene A2217G の遺伝子変異を有する頻度が有意に高く、この遺伝子多型を有する症例では強い ER stress 負荷がかかると、肝細胞へのユビキチン化蛋白の蓄積をきたし易い可能性が示唆された。

D. 考察

Mn-SOD や IL-1 β 、MTP などの分子の機能性遺伝子多型は頻度も高く、日本人における NASH の危険因子となっている。肥満は NASH の背景病変であることから、俊約遺伝子である β -adrenergic receptor の遺伝子多型も NASH の誘因となることが確認されている。しかし、今回、検討した SHP の遺伝子多型は健常者における頻度が 1%と、 β -adrenergic receptor の遺伝子多型に比べて低頻度であり、NASH 発症への寄与率の低いことが明らかとなった。

他方、ER stress 下ではゴルジ装置への負荷が掛かりやすく、ゴルジ装置に潜在的な機能低下をもたらすような機能性遺伝子多型が存在する場合には、NASH 発症の閾値が下がることが示唆された。

E. 結論

NASH は遺伝的素因に、肥満という環境要因が加わって発症する疾患であり、ゴルジ装置の脆弱性は NASH 発症の閾値を低下させることが明らかになった。

F. 研究発表

1. Hirose A, Ono M, Saibara I, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Oben JA, Onishi S.

Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). European Association for the Study of Liver Disease, Milan, 2008
2. Ono M, Kubota K, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara I, Ogawa Y, Onishi S, Oben JA. Super-paramagnetic iron oxide-MRI: A novel technique in experimental liver studies shows defective Kupffer cell phagocytic function in human non alcoholic fatty liver disease. European Association for the Study of Liver Disease, Milan, 2008
3. Tokumitsu K, Ogasawara K, Maki M, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Iwasaki S, Saibara I, Onishi S. Methionine-choline metabolism is involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. European Association for the Study of Liver Disease, Milan, 2008

4. Kuratani Y, Ichikawa H, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara I, Onishi S. Secondary extrahepatic portal obstruction resulted from thrombus in splenic vein aneurysm. 7th Japan Society of Hepatology Single Topic Conference, Fukuoka, 2008

5. 小野正文、西原利治、戸田勝巳: NASH モデル動物における発癌リスク, 第 12 回日本肝臓学会大会 ワークショップ 3; NASH 起因発癌のエビデンス, 東京, 2008

6. 西原利治: 非アルコール性脂肪肝炎の病態基調発言, 第 12 回日本病態栄養学会 シンポジウム IV; 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態栄養と栄養管理, 京都, 2009/01/10

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Yokoi N, Yamagata K, Shihara N, Iizuka K, Saibara I, Seino S, Takeda J. Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. Human Mutat 29:E271-E277. 2008

2. Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara I. Preserved tissue-structure of efferent ductules in aromatase deficient mice. J Endocrinol 199:137-146, 2008

3. Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee GH. Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. *Cell Tissue Res.* 334:219-226, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

厚生労働省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

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

研究分担者 宇都浩文

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座
消化器疾患・生活習慣病学講師

研究要旨：酸化ストレスを反映するマーカーは非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の診断・治療に有用であると考えられる。本研究では、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以下の領域を検査し、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した。また、血清MnSOD濃度をELISAで測定すると、その濃度は健康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を明らかにした。以上のことから、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。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis; NASH）の発症機序には肥満や糖尿病などに起因する単純性脂肪肝（first hit）に、酸化ストレスなど（second hit）が加わる two hit theory が提唱されている。NASHにおける酸化ストレスの誘因としては、フリーラジカルの発生、脂質過酸化、CYP2E1 の誘導、ミトコンドリア機能不全などが知られている。また、腸内細菌由来のエンドトキシンにより誘導される炎症性サイトカインや、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインなども酸化ストレスの原因と考えられる。従って、このような酸化ストレスを反映するマーカーは NASH の診断に有用であると考えられる。

本研究では、ヒト初代培養肝細胞を用いて酸化ストレスのマーカーを探索し、同定した酸化ストレスマーカー候補の臨床的意義を、NASH を含む非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の血清で検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

高密度の初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素（終濃度 200 μ M）あるいは PBS を添加し、24 時間培養後に 1% CHAPS 含有 50 mM リン酸緩衝液を用いて細胞質タンパク質を抽出した。

2) NBS ラベル化ペプチドの精製とペアピークの同定

抽出した細胞質タンパク質（PBS 処理群と過酸化水素処理群）を [12 C]-NBS と [13 C]-NBS でそれぞれ標識し、還元・アルキル化した後にトリプシン消化した。フェニルカラムで精製した NBS 標識ペプチドを試料として MALDI-TOF/MS 解析を行った。6 Da 差のペアピークの同定は MS/MS イオンサーチ法にて行った。また、同定したタンパク質の発現を Western blot 法で確認した。

3) 患者血清

NAFLD50例 (NASH35例、単純性脂肪肝[SS]15例)、健常者20例を対象に、ELISA法を用いて、血清MnSOD濃度を測定した。

倫理面の配慮

- 個人の人権の擁護：1) 研究内容について十分な説明を行い、研究への参加は任意であること、研究に参加しない場合でも、従来通り診療を受けることができることを示す。2) 参加者のデータは、厳重な秘密保持のもとに管理され、本研究のデータが参加者に不利益を及ぼすことはないと考えられる。
- 個人情報の管理：1) ID番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。2) 対象者由来の血液サンプルは個人が同定できる情報を消去して、番号を付与する。
- 対象者に理解を求め同意を得る方法：担当医より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。
- 研究等によって生じる個人への不利益：超音波検査や静脈穿刺は侵襲性のあるものではなく、被験者に不当な危険が生じることはない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究結果

- 酸化ストレスを負荷するために、初代培養ヒト肝細胞の培養上清中に過酸化水素を添加した。過酸化水素200 μ M、24時間の処理では、培養中の肝細胞に顕著な変化は見られなかった。
- MALDI-TOF/MS解析では1000から3000 m/zの範囲で73個の6 Da差のあるペアピークを検出した。またこれらのペアピークのうち、過酸化水素処理群で発現が増加するペアピークを44個見出した。
- 過酸化水素処理により発現上昇する44個のペアピークのうち、1705-1711 m/z、1783-1789 m/z、1902-1908 m/z、及び2790-2796 m/zの計4種のペアピークについてMS/MSイオンサーチ法で同定した。 ^{12}C -NBSと ^{13}C -NBSのピーク強度比で表される相対発現比はそれぞれ1.724、1.478、1.618、及び2.485で、上記4種のペアピークのうち、2790-2796 m/zはsuperoxide dismutase [Mn] mitochondrial precursor (以下、MnSOD)であっ

た。さらに、Western blot法により過酸化水素処理によるMnSODの発現増加を確認した。その他3種のペアピークは薬物代謝、アンモニア代謝あるいはエネルギー変換に関連したタンパク質であった。

- NASH患者の血清MnSOD濃度は単純性脂肪肝患者および健常者よりも有意に高値であった。また、血清MnSOD濃度はNASHのstageの進行に伴い上昇する傾向であった。

D. 考察

種々の疾患のバイオマーカー探索にプロテオーム解析が重要な手段となっており、タンパク質の発現量を精度よく比較するための手法も開発されてきている。今回用いたNBS標識法は新しいタンパク質標識法であるが、MALDI TOF/MSを用いた解析で再現性よく同じタンパク質を6 Daの差で検出でき、その有用性を確認した。

今回の検討では、肝細胞の酸化ストレスマーカーの探索を行い、73個のペアピークを検出し、さらに4種類のマーカー候補を同定した。MnSOD以外は他の手法での発現の確認が出来ていないが、同定した4つのタンパク質はいずれも肝での発現が高いことが知られており、今回用いた手法が高発現のタンパク質を感度よく同定できると考えられた。しかしこのような手法では、発現量が低いタンパク質発現を感度よく検出できない可能性もある。今後、タンパク質をさらに感度よく検出及び同定するために、NBS標識法に種々の手法を組み合わせた解析も検討する必要があると思われる。

MnSODはミトコンドリアに局在し、電子伝達系で近傍の酸素が電子を捕獲した際に生じるスーパーオキシドを捕獲する酵素である。MnSODは酸化ストレスにより誘導されることが知られており、酸化ストレスマーカーの一つとされている。しかし、肝疾患、特にNASH患者における血清中MnSOD濃度との関連を明らかにした報告はなく、新しい知見であると考えられた。

MnSODの他に2つのペアピークから同定されたタンパク質はいずれもミトコンドリア由来のタンパク質であることが知られており、酸化ストレスによるミトコンドリア障害の指標になる可能性がある。さらにMnSODを含む2つのピークから同定されたタンパク質は細胞内だけでなく、細胞外へ分泌され血中で検出できることも知られており、これらはバイオマーカーと

して非常に有用である可能性がある。実際本研究でも、血清 MnSOD 濃度の評価を行い、細胞内だけでなく、血清中に分泌された MnSOD 濃度は酸化ストレスを反映すると考えられた。今後は実験動物モデルあるいは臨床検体を用いて、疾患のバイオマーカーとしての有用性をさらに検証する必要がある。

E. 結論

今回同定した酸化ストレスマーカーの一つである血清MnSODはNASHの診断やNASHの肝病態進展と関連することが示唆された。また、プロテオーム解析による酸化ストレスマーカー探索はバイオマーカー探索に有用であるだけでなく、病態進展に関わる分子を同定でき、病態解明につながる可能性があると思われた。

F. 研究発表

・論文発表

1. Imamura Y, Uto H, Oketani M, Hiramane Y, Hosoyamada K, Sho Y, Hiwaki T, Baba Y, Tahara K, Kubozono O, Kusano K, Tsubouchi H : Association between changes in body composition and the increasing prevalence of fatty liver in Japanese men. *Hepatol Res* 38: 1083-1086, 2008.
2. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. 2009 (in press)
3. Takahama Y, Uto H, Kanmura S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata N, Hayashi K, Stuver S, Okayama A, Tsubouchi H : Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterol* 2008 43: 942-50.

・学会発表

1. 今村也寸志, 桶谷 真, 宇都浩文. 脂肪肝は内臓脂肪の指標になりえるか. 第94回日本消化器病学会総会. (2008年5月).
2. 佐藤悠子, 宇都浩文, 高見陽一郎, 森内昭博, 長谷川 将, 桶谷 真, 井戸章雄, 中

島知明, 岡上 武, 坪内博仁. 血清プロテオーム解析で同定したキニノーゲン断片は非アルコール性脂肪性肝疾患で増加する. 第44回日本肝臓学会総会. (2008年6月)

3. 高見陽一郎, 宇都浩文, 高濱由香, 玉井 努, 熊谷公太郎, 重信秀峰, 森内昭博, 長谷川将, 桶谷 真, 井戸章雄, 坪内博仁. [13C]-NBS 安定同位体標識法を用いた肝細胞酸化ストレスマーカーの探索. 第44回日本肝臓学会総会. (2008年6月)
4. 今村也寸志, 平峯靖也, 樋脇卓也, 馬場芳郎, 田原憲治, 窪菌 修, 草野 健, 桶谷真, 宇都浩文, 井戸章雄, 坪内博仁. 脂肪肝形成のメカニズムについて (健診データの解析から). 第91回日本消化器病学会九州支部例会. (2008年6月)
5. 宇都浩文. 肝臓病から身を守る～増え続ける脂肪肝をどう考える～第58回日本消化器病学会九州支部市民公開講座(2008年11月)
6. Uto H, Sato Y, Tanoue S, Ishida Y, Tamai T, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. A fragment of high molecular weight kininogen is upregulated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease (AASLD) (2008年11月)
7. Takami Y, Uto H, Takahama Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the [13C]-2-nitrobenzenesulfonyl stable isotope labeling method. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease (AASLD) (2008年11月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 発明者; 坪内博仁, 宇都浩文, 岡上武, 高見陽一郎. 発明の名称; 非アルコール性脂肪性肝炎を推定するための検出方法. 出願番号; 2008-323982, 出願日; 平成20年12月19日