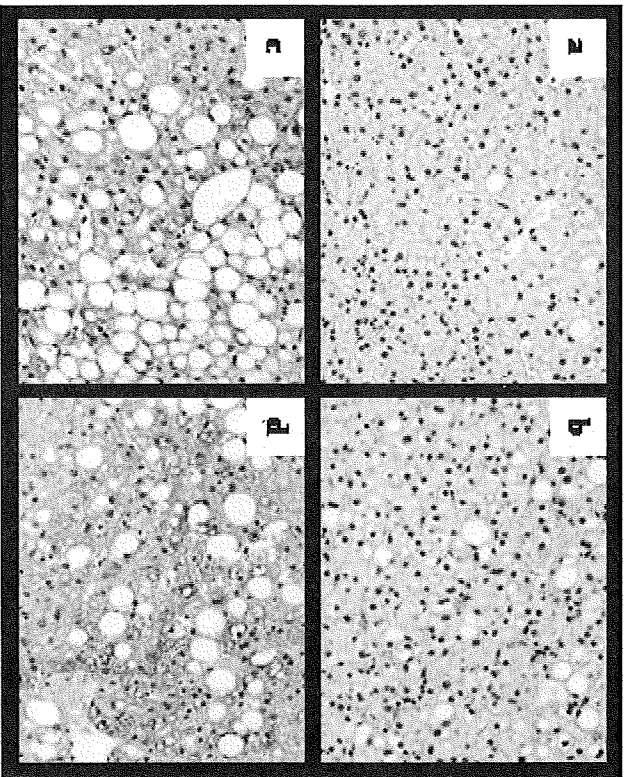
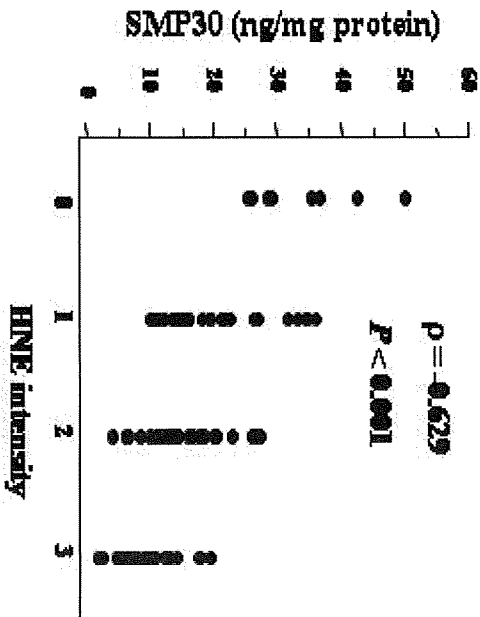
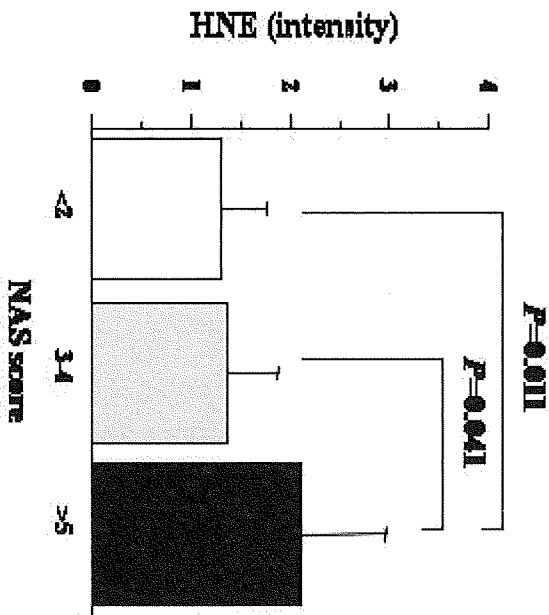


Immunostaining of 4-HNE in Liver Tissue

4-HNE intensity in Liver Tissue



(a) NAS ≤ 2
(b) NAS = 3-4
(c) NAS ≥ 5
(d) NAS ≥ 5



Spearman's Correlation Between
Hepatic SMP30 and 4-HNE

Ⅱ. 分担研究報告

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）

分担研究報告書

非アルコール性脂肪性肝疾患における鉄代謝異常に関する研究

分担研究：NAFLD 鉄代謝異常の実態調査—血清 NTBI 測定系の確立—

個別研究：NAFLD 病態におけるヘプシジン発現異常の実験的検討

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 教授

研究要旨：

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の 30%～60% に鉄の肝内過剰蓄積が認められ、鉄酸化ストレスが病態の進展に寄与していると考えられるが、NAFLD の鉄代謝異常の実態は明らかではなく、その分子メカニズムも不明である。本研究において我々は以下のことを行った。

（１）分担研究課題：NAFLD 鉄代謝異常の実態調査

現在、NAFLD の鉄過剰状態は血清フェリチンまたはトランスフェリン飽和度で評価している。血清非トランスフェリン結合鉄 (non-transferrin-bound iron: NTBI) は毒性の強い鉄であるが、その測定系が確立していないため鉄毒性の評価が不十分である。我々は本邦で測定が行われてこなかった血清 NTBI の定量システムを立ち上げ、パイロットスタディとして NAFLD 患者における血清 NTBI の測定を行った。

（２）個別研究課題：NAFLD 病態におけるヘプシジン発現異常の実験的検討

C 型肝炎、アルコール性肝障害の二次性鉄過剰症においては肝細胞からの鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現低下が起きていることが基礎研究で明らかにされつつあるが、NAFLD の鉄過剰症に関しては不明である。NAFLD マウスモデルを用いて NAFLD における鉄代謝異常の原因として脂肪肝組織におけるヘプシジンの発現低下を証明し、腸管からの食餌鉄吸収亢進が起きている可能性を示した。

A. 研究目的

（１）分担研究課題：NAFLD 鉄代謝異常の実態調査

鉄は生体にとって必須の金属栄養素であるが、過剰状態になると反応性に富む自由鉄が増え、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生することによって細胞毒性を呈する。主に内臓肥満を背景として肝細胞

に中性脂肪が蓄積する NAFLD では鉄も肝臓に沈着することが特徴である。現在、NAFLD の鉄過剰状態は血清フェリチンまたはトランスフェリン飽和度で評価され、その臨床的有用性が報告されている。しかし、実際に血清中の毒性の強い鉄は非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) である。本邦においては鉄過剰症における血清 NTBI の検討は

されておらず、欧米においても測定対象が遺伝性ヘモクロマトーシスや輸血依存性貧血のサラセミア等の高度鉄過剰症が対象になっている。NAFLDのような軽度から中等度の鉄過剰症に対する NTBI 検討の報告はない。本研究では NAFLD 患者における鉄毒性を安定的に測定するためのシステムを構築するとともに、NAFLD 鉄代謝異常の実態調査の一環として、新規に確立した測定系により、健常ボランティアと NAFLD 患者の血清 NTBI データを測定した。

(2) 個別研究課題：NAFLD 病態におけるヘプシジン発現変化の実験的検討

C 型肝炎、アルコール性肝障害の鉄過剰症においては肝細胞からの鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現低下が起きていることが基礎研究で証明されているが、NAFLD の鉄過剰症の病態は不明である。NAFLD における鉄代謝恒常性破綻の原因として脂質代謝と鉄代謝のクロストークが存在するという仮説をたて、過食肥満、高脂肪負荷マウスを用いて鉄代謝調節因子ヘプシジン発現の変化に関して検討した。

B. 研究方法

(1) 血清 NTBI 測定

【対象】

対象は旭川医科大学病院で診断された NAFLD 患者 37 名と健常ボランティアで血清 ALT 値が男性 30 IU/L 以下

(19 名)、女性 20 IU/L 以下(14 名)をコントロールとした。なお NAFLD 患者および健常ボランティアには説明同意書の文書を用いて説明し、患者の自由意思で同意された方をエントリーしている。

【血清 NTBI 測定法】

non-metal high performance liquid chromatography (HPLC) system を用いた。概要を以下に述べる。

- ① 血清にコバルト溶液を添加し、コバルトイオンで Apo-Tf をブロックする。
- ② NTA (Nitrilotriacetic acid) 溶液を添加し、Tf に結合していない不安定鉄(NTBI)を捕捉する。
- ③ NTBI を捕捉した NTA を限外濾過で、Tf、フェリチンなどから分離する。
- ④ 分離した NTBI を NTA からさらに高親和性鉄キレート剤 CP-22 に置換する。
- ⑤ Metal free HPLC system で測定し、標準試料から作成した標準曲線から鉄イオン濃度を算出する。

【研究施設、研究環境の状況】

NTBI に関しては当講座の基礎臨床研究棟に non-metal HPLC を用いた定量システムを導入した。これまで本システムで問題となった低濃度領域の定量性に関してその問題点を明白にし、改善することで検出感度の向上、安定した測定システムを構築することができてきた。これまで検出が難しかった健常人血清 NTBI 値を求めるこ

とが可能となっており、信頼性のあるデータを算出していける段階にあるといえる。

【生体試料の取り扱い】

末梢血は採血後1時間以内に血清分離を行い、適当量を分注し-30℃にて凍結保存した。

【倫理面への配慮】

対象患者および健常ボランティアには、当施設の主治医から直接説明同意書を用いて説明し、文書で同意を頂く。対象患者に関しては、日常の診療の一部として必ず施行している採血の際に合わせて本研究用の血液を採取させていただく形とし、本研究のためだけに採血での苦痛や不利益が生じることがないように配慮する。また、患者を特定できる個人情報を破棄して記号化し、個人情報が流出しないように十分配慮する。健常ボランティアに関しても末梢血血算や各種生化、NTBIを測定するが、患者群と同様に個人情報破棄した形をとり、個人情報の流出がないように配慮する。なお、日常診療上必要な検査項目以外の本研究で測定する検査項目に関しては、研究者が全て負担し、患者側に費用がかかることはない。臨床研究の倫理指針に基づき、当施設の倫理委員会の承認を得ることとし、平成21年4月に倫理委員会の認可を得た。

(2) NAFLD マウスモデルにおけるヘプシジン発現

【動物モデル】

NAFLD マウスモデルとして、①マウス用基本飼料で飼育した過食・肥満を表現型とするレプチン欠損マウス(ob/ob マウス, 10 週齢雄性)または②C57/BL6 マウス(12 週齢雄性)を高脂肪飼料(脂肪カロリー比: 82.0%)で16週間飼育した。ob/ob マウスおよび高脂肪飼料負荷マウスの負荷 2, 4, 8, 16 週目での肝組織及び血液を採取した。

【検討項目】

体重、肝重量、血液生化学検査、肝の組織学的所見、肝組織中鉄含量、肝組織におけるヘプシジン mRNA の発現および血清中の活性型 Hcp 濃度を測定した。

【実験方法】

肝組織中鉄含量を原子吸光スペクトロフォトメトリー法で、肝のヘプシジン mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で、血清中活性型 Hcp 濃度は liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) 法を用いて測定した。

【倫理面への配慮】

本実験は国立大学法人旭川医科大学動物実験委員会の承認を受け、旭川医科大学における動物実験等の実施に関する規定および取り扱い細則に基づき、動物愛護の精神に則って行われた。

C. 研究結果

(1) 血清 NTBI 測定

NAFLD 症例の血清 ALT (中央値) は男性 49 IU/L、女性 64 IU/L で、健常ボランティアの男性 18 IU/L、女性 11.5 IU/L に比べて有意に上昇していた ($p < 0.0001$)。鉄代謝に関連して貯蔵鉄のマーカーである血清フェリチン (中央値) は NAFLD 症例の男性 316.3 ng/mL、女性 90.3 ng/mL で、健常者の男性 136 ng/mL、女性 15.3 ng/mL に比べて有意に上昇していた ($p = 0.001$)。NAFLD 症例では軽度から中等度の高トランスアミナーゼ血症と軽度の鉄過剰症があることが確認された。

これらの対象に対して血清 NTBI を測定した。健常者が $0.20 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 、NAFLD 症例が $0.27 \pm 0.24 \mu\text{M}$ 、男性が健常者 $0.22 \pm 0.15 \mu\text{M}$ 、NAFLD 症例 $0.31 \pm 0.26 \mu\text{M}$ 、女性が健常者 $0.18 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 、NAFLD 症例 $0.22 \pm 0.22 \mu\text{M}$ であった。NAFLD 男性例では健常ボランティアの 75%パーセンタイル以上 ($0.31 \mu\text{M}$) を示す症例が 47% 存在し、NTBI が高い傾向があった。

(2) NAFLD マウスモデルにおけるヘプシジン発現

ob/ob マウス群は野生型群と比較して有意に体重が増加し ($p < 0.001$)、肝重量が増加していた ($p < 0.001$)。肝組織像ではびまん性に肝細胞に大滴性脂肪蓄積、風船様腫大が認められ、著明な脂肪肝の所見を呈し、脂肪滴質量を差し引いた補正肝組織鉄含量は有意に増加していた ($p < 0.05$)。肝組織の

ヘプシジン mRNA の発現は有意な減少を認めなかったが ($p = 0.10$)、蛋白レベルでは血清中活性型 Hcp 濃度が有意に低下していた ($p = 0.01$)。

高脂肪飼料負荷マウスでは、8 週目以降から体重が増加し、肝組織像では 8 週目から中心静脈周辺の Zone 3 の肝細胞内に小滴性脂肪滴が出現し、16 週目で大滴性の脂肪蓄積がみられた。肝のヘプシジン mRNA の発現は、肝細胞に脂肪滴が出現した 8 週目以降から低下しており ($p = 0.01$)、蛋白発現レベルでも 16 週目の血清中活性型ヘプシジン濃度は低下していた ($p < 0.05$)。

D. 考察

(1) 血清 NTBI 測定

C 型慢性肝炎、アルコール性肝障と同様に NAFLD においても二次性の肝内鉄沈着が高頻度に認められ、肝細胞障害、肝線維化、肝発癌に寄与する可能性が指摘されている。

一般に貯蔵鉄のマーカーで用いられている血清フェリチンは有用なマーカーではあるが、肝細胞障害の強い場合に Apo-ferritin が血中に逸脱するため、実際の貯蔵鉄量と解離することがある。鉄は血中ではトランスフェリンに結合し毒性を示さないようにされているが、鉄過剰状態に陥ると、血中にトランスフェリンに結合していない NTBI が出現する。よって NTBI 測定は臨床的に重要だが、国内で測定した報告はない。国外でも血清 NTBI 測定の検討はもっぱら遺伝性ヘモクロマトーシスや鎌状赤血球、サラセミ

アなどの輸血依存性の難治性貧血患者の長期大量輸血後の高度鉄過剰症に関して報告されている。それに対してNAFLDを含めた慢性肝疾患の鉄過剰は軽度から中等度のものであり、その測定は検査系の感度の問題から不可能であった。今回我々が構築した測定系はNAFLD患者だけでなく、健常者の血清NTBI濃度を測定することも可能であった。その結果、NAFLD症例の中には細胞毒性の高い血清NTBIが高値群が存在し、特に男性症例において高値症例が多く存在している可能性が示された。

(2) NAFLD マウスモデルにおけるヘプシジン発現

肝で産生される鉄代謝調節因子ヘプシジンは腸管細胞、マクロファージの細胞膜上のフォロポルチン1と結合し、その分解を促進している。アルコール負荷またはC型肝炎ウイルス蛋白がヘプシジンの発現を抑制して生体を鉄過剰にすることが示唆されている。一方、NAFLDにおいても鉄の過剰蓄積がしばしばみられ、フリーラジカルを産生し、肝細胞障害の一因となっているが、そのメカニズムは不明である。

今回、我々は過食・肥満マウスと高脂肪飼料負荷マウスのNAFLDモデルを用いて、ヘプシジンの発現動態を検討した。これらのモデルでは組織学的に脂肪沈着は認めたが、炎症細胞浸潤は認めないことからNAFLDのモデルとして妥当と考えられる。

高脂肪飼料負荷マウスでは8週目以降の脂肪肝が形成された時期にヘプシジンの発現低下を mRNA および蛋白レベルの両方で認め、結果的にフェロポルチン1の分解を調節して腸管からの食餌鉄吸収亢進、マクロファージからの鉄放出に作用する可能性が示唆された。ヘプシジンの発現変化の機序は今のところ不明であるが、8週目以降の変化であることから肝細胞への脂肪沈着という細胞内の脂質代謝を含めた代謝系の変化が関与している可能性が考えられる。

E. 結論

(1) 血清NTBI測定

NAFLD症例において血清NTBIが高い群、つまり、全身的に鉄細胞毒性の強い群が存在し、特に男性で多い傾向があった。NAFLDにおいて血清NTBIは鉄毒性の評価に有用な血清マーカーと考えられた。

(2) NAFLD マウスモデルにおけるヘプシジン発現

動物モデルにおいて、過食・脂肪負荷がヘプシジンの発現抑制を介して腸管からの鉄吸収やマクロファージからの鉄放出を誘導している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ikuta K, Yersin A, Ikai A, Aisen P, Kohgo Y ; Characterization of the interaction between diferric transferrin and transferrin receptor 2 by functional assays and atomic force microscopy. J Mol Biol, 2010 in press
- Hosoki T, Ikuta K, Shimonaka Y, Sasaki Y, Yasuno H, Sato K, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y ; Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms in hepatoma-derived cells detected using simultaneous LC-MS/MS. Proteomics - Clinical Applications-, 2009 Nov 16; 3(11):1256-1264
- Tsuchiya Y, Takahashi N, Yoshizaki T, Tanno S, Ohhira M, Motomura W, Tanno S, Takakusaki K, Kohgo Y, Okumura T ; A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2009 May 1;382(2):348-52.
- 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.
- 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.
- 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. 2007 Dec;42(12):969-78.
- 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. 2007 Sep 21;13(35):4699-706.
- Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, Motomura W, Kohgo Y, Okumura T ; A diacylglycerol kinase inhibitor, R59022, stimulates glucose transport through a MKK3/6-p38 signaling pathway in skeletal muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 17;360(1):244-50.
- Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, Inoue M, Miyoshi S, Suzuki Y, Fujimoto Y, Kohgo Y ; Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. Alcohol Clin Exp Res. 2007 Jan;31(1 Suppl):S2-8.
- 大竹孝明 ; アルコールと金属代謝

最新医学別冊 新しい診断と治療の
ABC 62 アルコール性肝障害 2009
年：50-59

- 生田克哉、佐々木勝則、鳥本悦宏、高後裕；生体内不安定鉄と鉄毒性と鉄キレート療法. 血液フロンティア 2009年2月号 19(2):31-39

2. 学会発表

1) 海外

- 2009 IBIS Meeting BioIron (2009.06.07-11, Portugal)
A novel simultaneous quantitative method for hepcidin isoforms using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Ikuta K, Shimonaka Y, Hosoki T, Sasaki Y, Yasuno H, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y (Poster)
- 2009 IBIS Meeting BioIron (2009.06.07-11, Portugal)
Metabolic steatosis and alcohol-loading regulate the expression of transferrin receptor 1 and hepcidin in mice liver. Ohtake T, Ikuta K, Sawada K, Abe M, Hosoki T, Miyoshi S, Suzuki Y, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y (poster)
- Asia Pacific Iron Academy Conference 2009 (2009.11.26-29, Chiang Mai)
Evaluation and monitoring of body iron. Yutaka Kohgo (Oral Presentation)

2) 国内

- 第45回日本肝臓学会総会 (2009.06.04-05, 神戸)

新規同時定量法による肝癌由来培養細胞株における鉄代謝調節ホルモン・ヘプシジン アイソフォーム発現パターンに関する検討. 細木卓明、生田克哉、佐藤一也、大竹孝明、佐々木勝則、鳥本悦宏、高後裕、佐々木雄亮、安野秀之、下中靖、斉藤敬司 (口頭発表)

- 第45回日本肝臓学会総会 (2009.06.04-05, 神戸)

肥満およびアルコール負荷によるマウスヘプシジンの発現変化に関する検討

大竹孝明、三好茂樹、澤田康司、阿部真美、鈴木康秋、生田克哉、高後裕 (ポスター発表)

- 第33回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (2009.09.12-13, 倉敷)
Non-metal HPLC を用いた高感度 NTBI 測定法の確立—健常人および鉄過剰症患者の NTBI 測定— 佐々木勝則、高後裕、大竹孝明、生田克哉、鳥本悦宏 (口頭発表)

- 第33回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (2009.09.12-13, 倉敷)
過栄養性脂肪肝は鉄代謝関連分子の発現異常をもたらす - 基礎的検討 - 三好茂樹、大竹孝明、本村亘、澤田康司、阿部真美、鈴木康秋、大平賀子、細木卓明、生田克哉、佐々木勝則、鳥本悦宏、高後裕

- 第71回日本血液学会学術集会 (2009.10.23-25, 京都)

A novel simultaneous

quantification of hepcidin isoforms by liquid chromatography-mass spectrometry. Katsuya Ikuta, Yasushi Shimonaka, Takaaki Hosoki, Yusuke Sasaki, Hideyuki Yasuno, Naoka Okamura, Motohiro Shindo, Takaaki Ohtake, Katsunori Sasaki, Yoshihiro Torimoto, Keiji Saito, Yutaka Kohgo (ポスター発表)

3. その他
該当なし

- 第 29 回アルコール医学生物学研究会学術集会 (2009. 11. 13-14、千葉)
NAFLD における非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) 測定意義に関する検討. 大竹孝明、生田克哉、佐々木勝則、澤田康司、阿部真美、三好茂樹、鈴木康秋、高後裕 (口頭発表)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

PCT 出願、国際出願番号 :
PCT/JP2009/004765、国際出願日 :
2009 年 9 月 18 日
発明人 : 高後裕、生田克哉、佐々木勝則、西田雄三、発明の名称 : 鉄キレート剤及びその製造方法、並びに鉄イオンの定量・補足方法、基礎出願番号 : 特願 2008-243095 号、基礎出願日 : 2008 年 9 月 22 日

2. 実用新案登録

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研究
分担研究報告書

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 消化器内科 教授

研究要旨： NAFLDにおける肝脂肪化にはインスリン抵抗性および血中アディポネクチン値低下がかかわっている。またC型肝炎における脂肪化にはHCV感染によるミトコンドリア脂肪酸 β -酸化低下がかかわっている。

A. 研究目的

肝脂肪蓄積の病態を解明するため、一般住民における肝脂肪蓄積の頻度、肝ミトコンドリア機能およびアディポサイトカインの役割を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 住民検診においてALTを上昇させる因子の解析を行う。

(2) 肥満・糖尿病ラットに高脂肪食を与え、肝トリグリセリド(TG)量および血中アディポネクチン値へのアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)の効果を検討する。

(3) 絶食試験を用いて、C型肝炎患者におけるin vivoでの脂肪酸 β -酸化能を検討する。

(倫理面への配慮)

山形大学倫理委員会の承認を受け、患者から書面での承諾を得た。

C. 研究結果

(1) 山形県高島町の住民検診を行い、ALTを上昇させる因子について検討したが、ALT上昇は肥満、インスリン抵抗性やアディ

ポネクチン低値などメタボリックシンドロームと関連することを明らかにした。

(2) Zucker糖尿・肥満モデルに高脂肪食を与え、高度の脂肪肝を作成し、アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)の効果を検討した。ARBは肝TG量を低下させ、血中アディポネクチン値を低下させた。またアンジオテンシンIIの肝における

新しい標的分子(SCD-1)を明らかにした。

(3) C型肝炎患者30例に絶食試験を行い、ケトン産生の低下を認めたことから、C型肝炎患者における肝ミトコンドリア傷害による脂肪酸 β -酸化の低下を明らかにした。この脂肪酸 β -酸化の低下にはウイルス感染と代謝要因がともにかかわっていることが示唆された。

D. 考察

一般住民においてALT上昇に対する飲酒の寄与は少なく、むしろ肥満、インスリン抵抗性の関与が示唆された。同時に、NAFLDでは血中アディポネクチン値が低下するが、ARBはこれを上昇させ、脂肪蓄積を軽

減させる効果があることが示唆された。
C型肝炎における脂肪化にはHCV感染
と血中アディポネクチン値の低下による
脂肪酸 β -酸化の低下がかかわっている可
能性がある。

E. 結論

肝脂肪化にはインスリン抵抗性および
血中アディポネクチン値低下がかかわっ
ている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasa
ki Y, Ito J-I, Saito T, Kawata S: Down-re
gulation of hepatic stearyl-CoA desatura
se 1 expression by angiotensin II recepto
r blocker in the obese fa/fa/Zucker rat:
possible role in amelioration of insulin
resistance and hepatic steatosis. J Gastro
enterol 44: 583-591, 2009

(2)Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H,
Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, S
aito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Da
imon M, Kato T, Kawata S: Impact of metab
olicsyndrome on elevated serum alanine am
inotransferase levels in the Japanese pop
ulation. Metabolism 58: 1067-1075, 2009

2. 学会発表 なし

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

日本における非B非C肝癌症例の統計学的解析

研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究協力者： 吉田晴彦 東京大学医学部（病）・講師

研究協力者： 建石良介 東京大学医学部（病）・助教

研究要旨：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ており、肝脂肪化と慢性肝疾患、肝発癌の関連性が注目を浴びている。しかし、NASH 関連肝癌の実態解明はまだ十分ではない。大規模なコホート研究が難しく、肝発癌時の NASH 診断が困難なこともあり、後ろ向き研究も妨げられている。今回、非B非C肝癌患者について、性、年齢、BMI、アルコール飲酒、臨床検査データをもとに対応分析とクラスタ分析を行い、教師無し分類を試みた。2,524 名の全肝癌患者のうち非B非C型肝癌は 211 名であった。非B非C型肝癌例は 3 つのクラスタに分類された。内 41 名が女性、高齢、非アルコール多飲、BMI 大、肝機能不良などで特徴付けられるクラスタに属した。これを NASH 関連肝癌と考えると、非B非C肝癌の 19.4%、全肝癌の約 2%を占めた。今後、更なる検討が必要であるが、NASH 関連肝癌の病態を考える上で興味深い結果と考えられる。

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。

NASH は重要な肝疾患として認識されているが、わが国における NASH の実態については、まだ不明な点が多い。NASH は組織学的に、炎症細胞浸潤や肝線維化の存在によって単純性脂肪肝と鑑別される。確定診断には肝生検を必要とするが、侵襲性のため確定診断された患者による大規模コホートを設定することが困難である。臨床的に最も重要なのは NASH からの肝癌や肝不全の発

生率、およびその危険因子の解明であろうが、これらを得るためには大規模な前向きコホート研究が必要であり、NASH 関連肝癌の実態は十分解明されたとはいいがたい。

わが国で毎年 3 万例以上生じている肝癌の多くは肝炎ウイルスによるものであり、8 割弱が HCV 感染、1 割強が HBV 感染に起因する。残りの約 1 割が HCV および HBV 陰性の肝癌であり、この中からアルコール多飲者や原発性胆汁性肝硬変などの基礎疾患をもつ症例を除外した集団が NASH 関連肝癌の候補ということになる。そのような患者は実際に稀ではなく、わが国における近年の非 B 非 C 肝癌患者の増加が NASH 関連肝癌によるものであることが疑われている。しかしながら、実際に肝癌と NASH との関連を証明するのは困難な場合が多い。NASH 関連肝癌も他の肝癌と同様に肝硬変を基盤として発生することが多いが、この時期には肝の脂肪化は減少しており、発癌時の背景肝からは NASH を組織学に確定診断できない。

本研究では、本施設を受診した肝癌患者の臨床的背景を総合的に解析することにより、NASH との関連が想定できるような患者群の存在と、そのような患者群が全肝癌患者に占める割合を検討してみた。

B. 方法

東京大学消化器内科を受診した初発肝癌患者 2,524 名の内、290 名 (11.5%) が HCV 抗体陰性かつ HBs 抗原陰性であった。なお、HCV 抗体陽性は 1,900 名 (75.3%)、HBs 抗原陽性は 259 名 (10.3%)、両者陽性は 42 名 (1.7%) であった。HCV 抗体陰性かつ HBs

抗原陰性の患者のなかで、原発性胆汁性肝硬変 (7 名)、自己免疫性肝炎 (4 名)、外国人 (3 名)、データ欠損例 (HBc 抗体欠損 53 名、飲酒歴ないし BMI 欠損 12 名) を除外した 211 名を今回の解析対象とした。なお、肝癌 (肝細胞癌) は造影 CT ないし MRI における早期相濃染と後期相低吸収によって診断し、必要な場合には超音波ガイド下腫瘍生検を行った。

HCV 抗体陰性かつ HBs 抗原陰性の肝癌患者についてカルテ調査により、性および肝癌診断時の年齢、身長、体重、飲酒量、血清 GOT 値、血小板数、アルブミン濃度および HBc 抗体の有無を調べた。

対応分析は質的データを扱うため、量的な臨床データについてはその分布に基づいて二分化 (または三分化) した。症例のクラスタ化は対応分析で得られた第 1 次元と第 2 次元の座標を用いて Ward 法によるクラスタ分析で行った。

C. 結果

非B非C型肝炎患者 211 名の臨床背景を表 1 に示す。

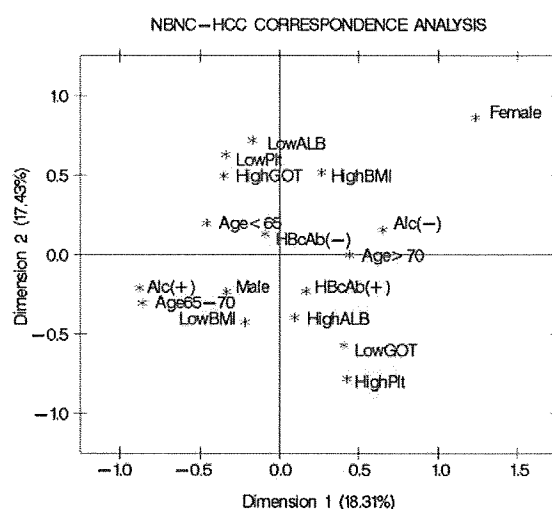
(表 1)

因子		対応分析採用、区分
男/女 (n/n)	166/45	○
年齢 (歳)	66.8±10.3	○ 65 未満 / 65 ~ 70/70 以上
身長 (cm)	160.5±8.8	
体重 (kg)	64.5±11.7	
BMI	25.0±3.9	○ 25 未満 / 以上
飲酒 (少/中/多*) : 男	52/26/89	○ 男 1 日 80g 未満 / 以上
: 女	44/1/0	女 1 日 50g 未満 / 以上
AST (IU/L)	48.0±28.4	○ 40 IU/L 未満 / 以上
ALT (IU/L)	37.8±26.1	
アルブミン (g/dL)	3.64±0.49	○ 3.5 g/dL 未満 / 以上
総ビリルビン (mg/dL)	1.09±0.76	
血小板数 (万/ μ L)	13.6±7.6	○ 13 未満 / 以上
HBc 抗体陽性 : 男	66/166 (39.8%)	
: 女	10/45 (22.2%)	

右の欄に○印をつけた 7 項目を説明変数として対応分析を行った。説明変数 (臨床因子) のプロット (図 1) をみると、例えば血小板数が多い場合 (図で HighPlt) は右下方向、少ない場合 (LowPlt) は左上方向にプロットされることが解る。一方、女性 (Female)、BMI 大 (HighBMI)、非アルコール多飲 (Alc(-)) は右上方向、男性 (Male)、BMI 小 (LowBMI)、アルコール多飲 (Alc(+)) は左下方向にプロットされる。実際には、各症例の位置は各臨床因子の値によって決まり、その症例で右下方向の因子と左上方

向の因子、右上方向の因子と左下方向の因子が拮抗していれば原点付近にプロットされる。

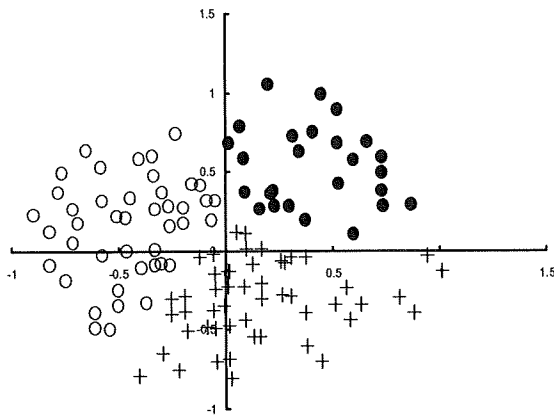
次に、対応分析で得られた各症例の座標をもとに非B非C型肝炎症例のクラスタ化を行った。症例は A (74/211、35.1%)、B (41/211、19.4%)、C (96/211、45.5%) の 3 クラスタに分離された。元の散布図をクラスタ別に塗り分けると図 2 のようになり、A (○) は左上、B (●) は右上、C (+) は右下を中心に分布した。



(図 1)

次に各クラスタにおける臨床的特性について検討した (表 2)。クラスタ A とクラスタ B は血小板が少ない、AST 値が高値である、アルブミン濃度が低いといった特性を共有していた。クラスタ C はこれらの特性について対照的であり、肝機能はクラスタ A と B で不良であり C では相対的に良好であることが解る。一方、クラスタ A とクラスタ B の相違点としては、性差 (A は全て男性、B は大部分が女性)、年齢 (A は比較的若年、B は高齢)、飲酒量 (多飲者は A に多く、B では少ない) があつた。BMI は B > A > C の順であつた。以上の特性につい

てはカイ二乗検定または ANOVA により $P < .0001$ でクラスタ間に有意差を認めた。なお、HBc 抗体陽性率はクラスタ B で高い傾向があったが有意ではなかった（クラスタ間の差はカイ二乗検定で $P=0.0704$ ）。



(図 2)

因子 \ クラスタ	A	B	C
症例数	74	41	96
男性 (%)	74 (100%)	8 (19.5%)	84 (87.5%)
年齢	61.7±8.4	71.3±7.7	68.8±11.1
BMI	25.2±4.3	27.5±4.0	23.8±2.9
飲酒 (少/中/多*)	8/7/59	38/3/0	49/17/30
AST (IU/L)	58.7±33.4	52.4±17.5	37.9±24.3
アルブミン (g/dL)	3.47±0.50	3.38±0.43	3.88±0.40
血小板数 (万/μL)	9.5±4.1	10.1±3.4	18.2±8.3
HBc 抗体陽性	24 (32.4%)	10 (24.4%)	42 (43.8%)

(表 2)

D. 考察

今回の解析結果から言えることは、非 B 非 C 肝癌患者をその臨床的特性によって、何ら前提をおかずに客観的にいくつかのグループに別けることができたということだけである。しかし、実際には各クラスタの

特性を検討することにより、病因をある程度推定することは可能である。クラスタ A は相対的若年の男性アルコール多飲者を中心とした患者群であり、肝機能も不良であることから、アルコール性肝硬変を基盤に生じた肝癌が主体となっていると考えることができる。ここで重要なのは、今回の解析においてはアルコール飲酒量によって非 B 非 C 肝癌患者を分類したのではなく、非 B 非 C 肝癌患者を種々の臨床因子によって総合的に分類した結果、アルコール飲酒量が重要な分類因子として寄与したということである。

クラスタ B ではアルコール多飲のない高齢女性が主体であり、BMI は高めで肝機能は不良であった。これらの特徴は文献的に NASH 関連肝癌の特徴とされているものにも一致している。本研究はこれらの症例が NASH 由来であるということを証明するものではない。しかし、我々が臨床的に NASH との関連を疑うような肝癌症例が、統計学的な教師無し分類においても確かに非 B 非 C 肝癌のなかの 1 グループを形成していることが確認された。

クラスタ B に属す症例を NASH 関連肝癌と考えた場合、これが非 B 非 C 肝癌に占める割合は 19.5% (41/211) である。また、当科を受診した肝癌患者全体に占める割合は、データ欠損例のため正確ではないが約 2. % である。この数字をもとに推定した場合、わが国における肝癌発生数を年 35000 人とすると、年間 700 人が NASH 関連肝癌を発症していることになる。全国の NASH 患者数を 100 万人と推定すると、年発癌率は 0.07% となる。ただし、これは若干過小評価にな

るかもしれない。

E. 結論

211 名の非 B 非 C 肝癌患者について対応分析およびクラスタ分析による教師無し分類を行い、NASH との関連が疑われる 41 症例からなるクラスタを得た。これは非 B 非 C 肝癌の 19.5%、全肝癌の約 2%に当り、NASH 関連肝癌が全肝癌に占める割合の一つの推定値と考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. J Med Virol 2010 in press.
- 2) Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Okamoto M, Ikeda H, Kobayashi M, Fukuda Y, Takahashi H, Nagase Y, Suzuki Y, Matsunaga K, Ishii T, Matsumoto N, Koike K, Suzuki M, and Itoh F. Effect of nucleoside analogue-interferon sequential therapy on patients with acute exacerbation of chronic hepatitis B. Hepatol Res 2010 in press.
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol

consumption and number of cigarettes smoked. J Atheroscler Thromb 2010 in press.

- 4) Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, Koike K, Kodama T. RNA dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. J Gen Virol 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 5) Hmwe SS, Aizakia H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]
- 6) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K, Nagai R. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. Hypertens Res 2010 Jan 8. [Epub ahead of print]
- 7) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Impact of changes in waist circumference and BMI over one-year period on serum lipid data in Japanese individuals. J Atheroscler Thromb 2009 Dec 22. [Epub ahead of print].
- 8) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. J Rheumatol 2009 Dec 23. [Epub ahead of

print].

- 9) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Impacts of changes in obesity parameters for the prediction of blood pressure change in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:421-427.
- 10) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M, PERFECT STUDY GROUP. Prolonged treatment with PEG-IFN a-2b and ribavirin can improve SVR in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2009 Sep 25. [Epub ahead of print].
- 11) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and pathogenesis of liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 2010 in press.
- 12) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* 2010 in press.
- 13) Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: Analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol* 175:1515-1524, 2009
- 14) 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. *Hepatology* 50:378-386,2009
- 15) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients coinfectd with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatol Res* 39:657-663, 2009
- 16) Ishizaka Y, Ishizaka N, Tani M, Toda A, Toda EI, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Association between changes in obesity parameters and incidence of chronic kidney disease in Japanese individuals. *Kidney Blood Press Res* 32:141-149,2009
- 17) Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Fujisawa J, Seki T, Koike K, Okazaki K. Hepatitis B virus X protein shifts hepatic Smad3-mediated signaling from tumor-suppression to oncogenesis in chronic hepatitis B. *Hepatology* 49:1203-1217,2009
- 18) 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* 284:3513-3520,2009
- 19) 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* 204:619-623,2009

20) Koike K. Steatosis, Liver injury and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol* 44supl:82-88,2009

21) 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* 23:480-487,2009

2. 学会発表

1) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H. The HNRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. p177, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009

2) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike: Branched chain amino acids ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance in hepatitis C mouse model, p125, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009

3) Ohki T, Akahane M, Yamashiki N, Goto E, Enooku K, Sata T, Masuzaki R, Kondo Y, Tateishi R, Inoo S, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Ortomo K, Koike K, Omata M. A prospective randomized study to elucidate the efficacy of computed tomography with hepatic arteriography and arterial portography (CTA/P) as a pre-treatment

examination among patients with small hepatocellular carcinoma: a preliminary report. #926, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009

4) Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Goto E, Enooku K, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Ortomo K, Koike K, Omata M. Proposal of surveillance program for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C using comprehensive scoring system and stratum specific likelihood ratio. #1756, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009

5) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inue Y, Nishikawa T, Watanabe N, Ikeda H, Koike K, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin may reflect malignant potential of hepatocellular carcinoma. #1776, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009

6) K Koike. Animal models in HCC research. 3rd International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA Joint Scientific Session, Kobe, 2009

7) K Koike. HIV and HCV co-infection in Japan. US-Japan Joint AIDS-Hepatitis Meeting, Portland, USA, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

インスリン抵抗性と肝脂肪沈着の相互作用を制御する分子メカニズムに関する研究

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・小胞体ストレス・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・ストレスとの相互作用の分子メカニズムを解明し、その治療への応用を目指している。肥満における炎症の端緒は、脂肪細胞および肝臓への免疫応答細胞の浸潤・活性化であると考えられている。我々は、細胞周期調節因子である WTAP-1 のヘテロ欠損マウスにおいて、高脂脂肪食負荷で内臓脂肪の沈着が減少し、インスリン感受性であることや肝臓への脂肪沈着が少ないことを見いだした。またその際、脂肪組織のみならず肝臓においてもマクロファージの浸潤が有意に減少していることを見いだした。また、野生型マウスの肝臓では高脂脂肪食負荷で PPAR γ の発現が上昇するのに対して、WTAP-1 のヘテロ欠損ではこのような変化は認められなかった。炎症により、肝臓では PPAR γ が誘導される可能性が示唆された。このような肥満における炎症反応の制御機構を検討し、CD8 陽性 T リンパ球がマクロファージの誘導に関与していることを見いだした。また、上記のマウスの解析結果から、肝臓へのマクロファージの浸潤と肝脂肪沈着に密接な関係があることを明らかにした。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を構築した。

A. 研究目的

①肥満状態においては、過栄養による脂肪沈着という 1st hit と肝臓におけるマクロファージなどの免疫担当細胞の浸潤による炎症反応という 2nd hit があってはじめて NAFLD/NASH の病態が確立するといわれているが、その相互作用のメカニズムを明らかにすることによって、治療への応用の可能性を探究する。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細胞周期を調節する因子と考えられている WTAP-1 (Wilms Tumor Associating Protein-1) のヘテロ欠損マウス(KO マウス) と野生型マウス(WT 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。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・脂肪酸輸送に関与する遺伝子の発現などを観察し、各々の群で比較した。また、肥満マウスでは脂肪組織へのマクロファージ誘導がインスリン抵抗性や脂

肪肝の形成に重要であることが示唆されているが、このマクロファージの誘導がどのようにして起きるのかを検討するために、肥満モデルマウスにおける脂肪組織における T リンパ球の浸潤を評価した。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