

## 表9. NASH起因肝癌87例の背景

|                                       | Total (n = 87)   | Male (n = 54)    | Female (n = 33)  | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| Age (y)                               | 72 (69–75)       | 72 (69–75)       | 72 (68–75)       | 0.52                  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )              | 26.0 (23.8–28.3) | 26.0 (23.8–28.8) | 26.2 (23.9–27.7) | 0.54                  |
| Obesity                               | 54 (62%)         | 35 (65%)         | 19 (58%)         | 0.50                  |
| Diabetes                              | 51 (59%)         | 31 (57%)         | 20 (61%)         | 0.77                  |
| Dyslipidemia                          | 24 (28%)         | 13 (24%)         | 11 (33%)         | 0.35                  |
| Hypertension                          | 47 (54%)         | 22 (41%)         | 25 (76%)         | 0.001                 |
| Platelet count (×10 <sup>4</sup> /μL) | 13.9 (10.1–18.0) | 14.5 (11.7–18.0) | 10.9 (7.8–18.0)  | 0.05                  |
| AST (IU/L)                            | 47 (30–59)       | 46 (27–60)       | 47 (35–58)       | 0.45                  |
| ALT (IU/L)                            | 36 (26–55)       | 43 (26–69)       | 34 (26–42)       | 0.11                  |
| γ-GTP (IU/L)                          | 75 (40–115)      | 68 (36–177)      | 75 (40–115)      | 0.90                  |
| Fasting glucose (mg/dL)               | 114 (99–145)     | 112 (99–144)     | 120 (97–152)     | 0.59                  |
| HbA1C (%)                             | 6.1 (5.4–7.1)    | 5.9 (5.4–7.0)    | 6.3 (5.2–7.1)    | 0.78                  |
| Total cholesterol (mg/dL)             | 169 (147–202)    | 169 (147–202)    | 169 (147–202)    | 0.62                  |
| HDL cholesterol (mg/dL)               | 50 (41–60)       | 45 (41–58)       | 55 (50–73)       | 0.03                  |
| Triglyceride (mg/dL)                  | 100 (76–138)     | 118 (80–147)     | 96 (74–116)      | 0.06                  |
| Ferritin (ng/dL)                      | 197 (74–401)     | 273 (154–703)    | 98 (23–172)      | 0.005                 |
| Hyaluronic acid (ng/mL)               | 166 (67–241)     | 151 (69–244)     | 174 (61–332)     | 0.85                  |
| AFP (ng/mL)                           | 7.1 (5.0–18.0)   | 6.0 (4.0–14.7)   | 10.8 (5.9–18.0)  | 0.02                  |
| DCP (mAU/mL)                          | 66 (22–298)      | 48 (22–243)      | 81 (21–942)      | 0.42                  |

**表10. NASH起因肝癌87例の背景**

|                              | Total (n = 87) | Male (n = 54) | Female (n = 33) | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|------------------------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------------|
| HCC tumor size (cm)          | 3.0 (2.0–4.0)  | 3.1 (2.2–4.5) | 2.6 (1.9–4.0)   | 0.18                  |
| Numbers of HCC tumor         |                |               |                 | 0.78                  |
| 1                            | 65 (75%)       | 39 (72%)      | 26 (79%)        |                       |
| 2 or 3                       | 16 (18%)       | 11 (20%)      | 5 (15%)         |                       |
| ≥ 4                          | 6 (7%)         | 4 (8%)        | 2 (6%)          |                       |
| Background liver tissue      |                |               |                 | 0.64                  |
| Steatosis grade <sup>b</sup> |                |               |                 |                       |
| 0: <5%                       | 1 (1%)         | 1 (2%)        | 0 (0%)          |                       |
| 1: 5-33%                     | 60 (69%)       | 36 (67%)      | 24 (73%)        |                       |
| 2: 34-66%                    | 19 (22%)       | 11 (20%)      | 8 (24%)         |                       |
| 3: >66%                      | 7 (8%)         | 6 (11%)       | 1 (3%)          |                       |
| Necroinflammatory grade      |                |               |                 | 0.22                  |
| 1: mild                      | 31 (35%)       | 22 (41%)      | 9 (27%)         |                       |
| 2: moderate                  | 45 (52%)       | 26 (48%)      | 19 (58%)        |                       |
| 3: severe                    | 11 (13%)       | 6 (11%)       | 5 (15%)         |                       |
| Fibrosis stage               |                |               |                 | 0.003                 |
| 1                            | 10 (11%)       | 10 (18%)      | 0 (0%)          |                       |
| 2                            | 15 (17%)       | 10 (18%)      | 5 (13%)         |                       |
| 3                            | 18 (21%)       | 13 (25%)      | 5 (15%)         |                       |
| 4                            | 44 (51%)       | 21 (39%)      | 23 (70%)        |                       |

**表11. NAFIC scoreの分布**

NAFIC score  
(NASH, Ferritin, Insulin, type IV collagen 7S)

| Variables                           | Cutoff values  | Score values |
|-------------------------------------|----------------|--------------|
| 1. Ferritin (ng/mL)<br>Female/ Male | $\geq 200/300$ | 1 point      |
| 2. Insulin ( $\mu$ U/mL)            | $\geq 10$      | 1 point      |
| 3. Type IV collagen 7S (ng/mL)      | $\geq 5.0$     | 2 points     |

This score ranges from 0 to 4

表12. NAFIC scoreと他の鑑別法との有用性の比較

|                      | N   | AUROC for<br>NASH | AUROC for<br>Significant fibrosis<br>(stage 2 to 4) | AUROC for<br>Advanced fibrosis<br>(stage 3 to 4) |
|----------------------|-----|-------------------|---|--|
| NAFIC                | 619 | <b>0.791</b>      | 0.802   | 0.832  |
| HAIR                 | 609 | 0.631             | 0.593   | 0.566  |
| Palekar's score      | 563 | 0.733             | 0.799   | 0.835  |
| Gholam's score       | 619 | 0.777             | 0.786   | 0.729  |
| BAAT                 | 604 | 0.647             | 0.585   | 0.526  |
| BARĐ                 | 604 | 0.627             | 0.688   | 0.734  |
| NAFLD fibrosis score | 588 | 0.685             | 0.817   | 0.853  |
| N (Nippon) score     | 585 | 0.668             | 0.720   | 0.704  |
| FIB4-index           | 608 | 0.742             | <b>0.848</b>  | <b>0.871</b>                                     |

表 13. NAFILD 442例を用いたNAFIC scoreのvalidation study

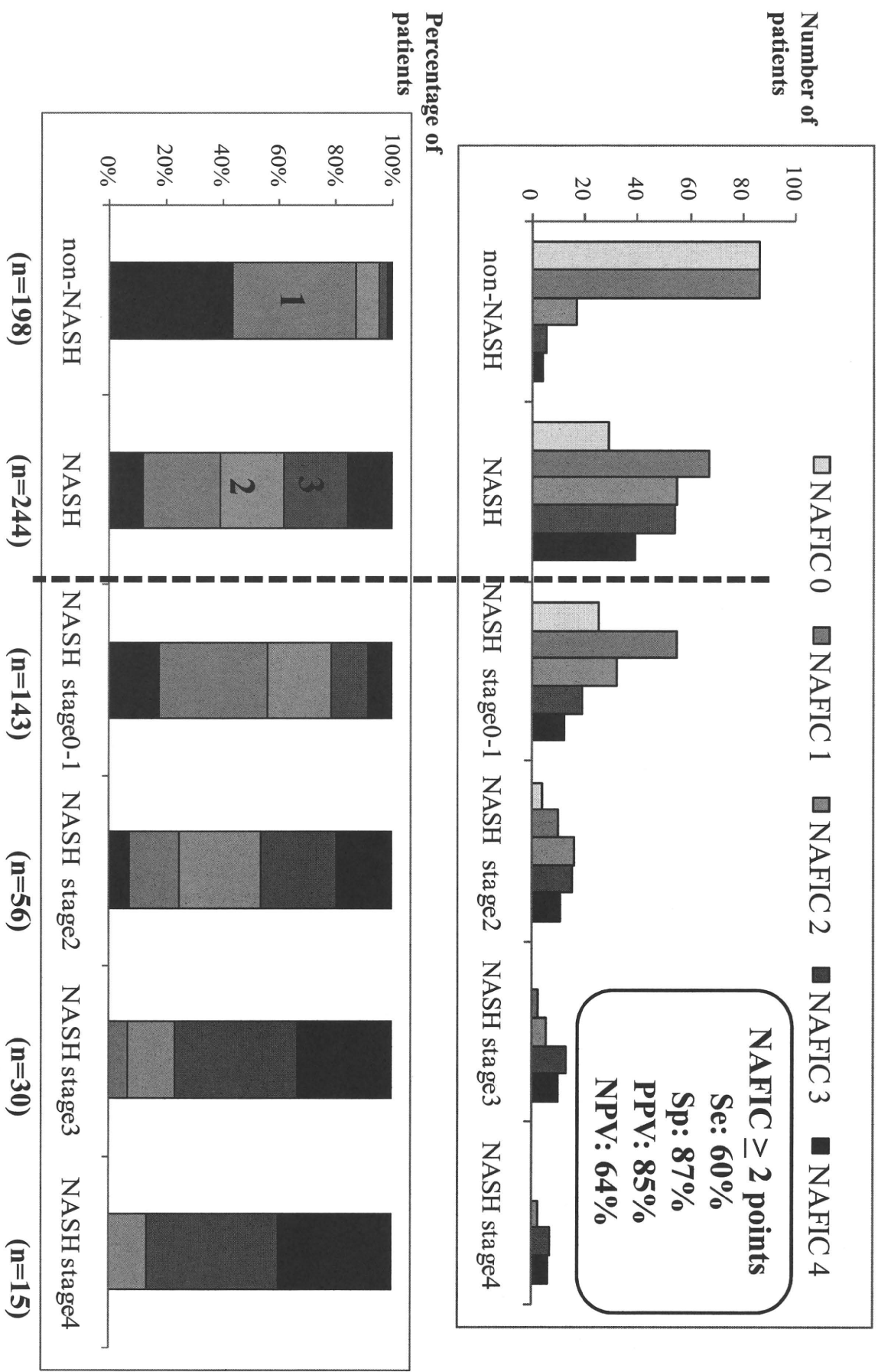


表14. GWASでの解析(Manhattan plot)  
(398例のNASHと2,766例のコントロールでの比較)

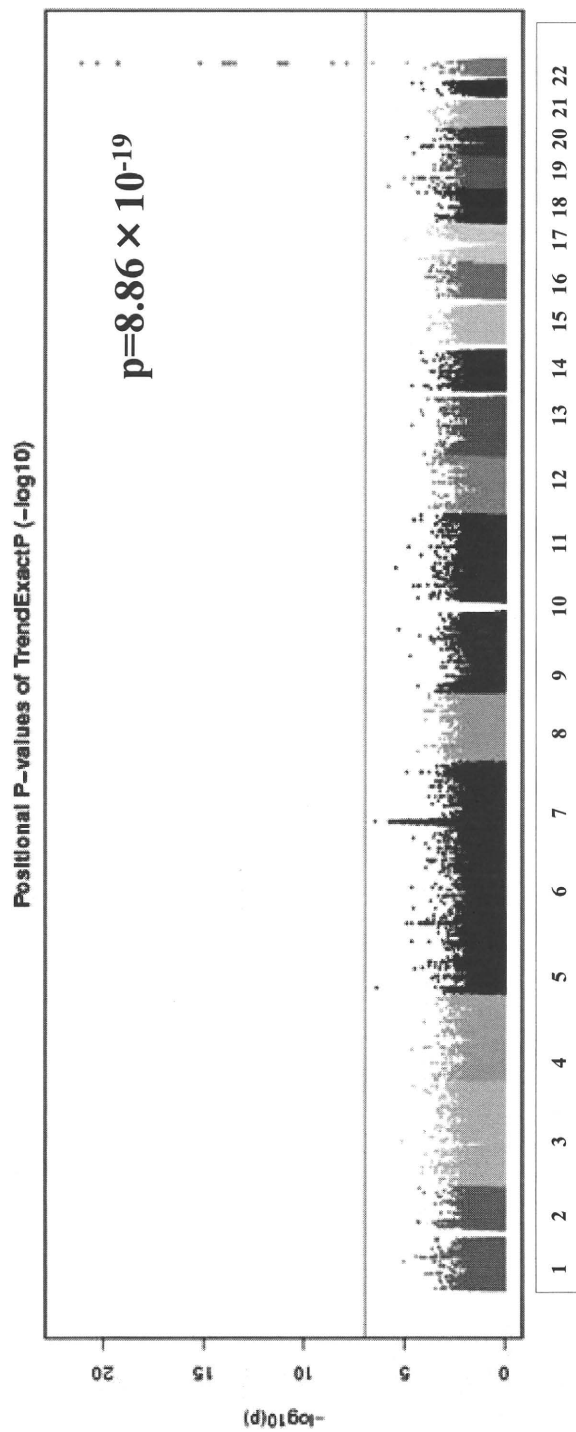
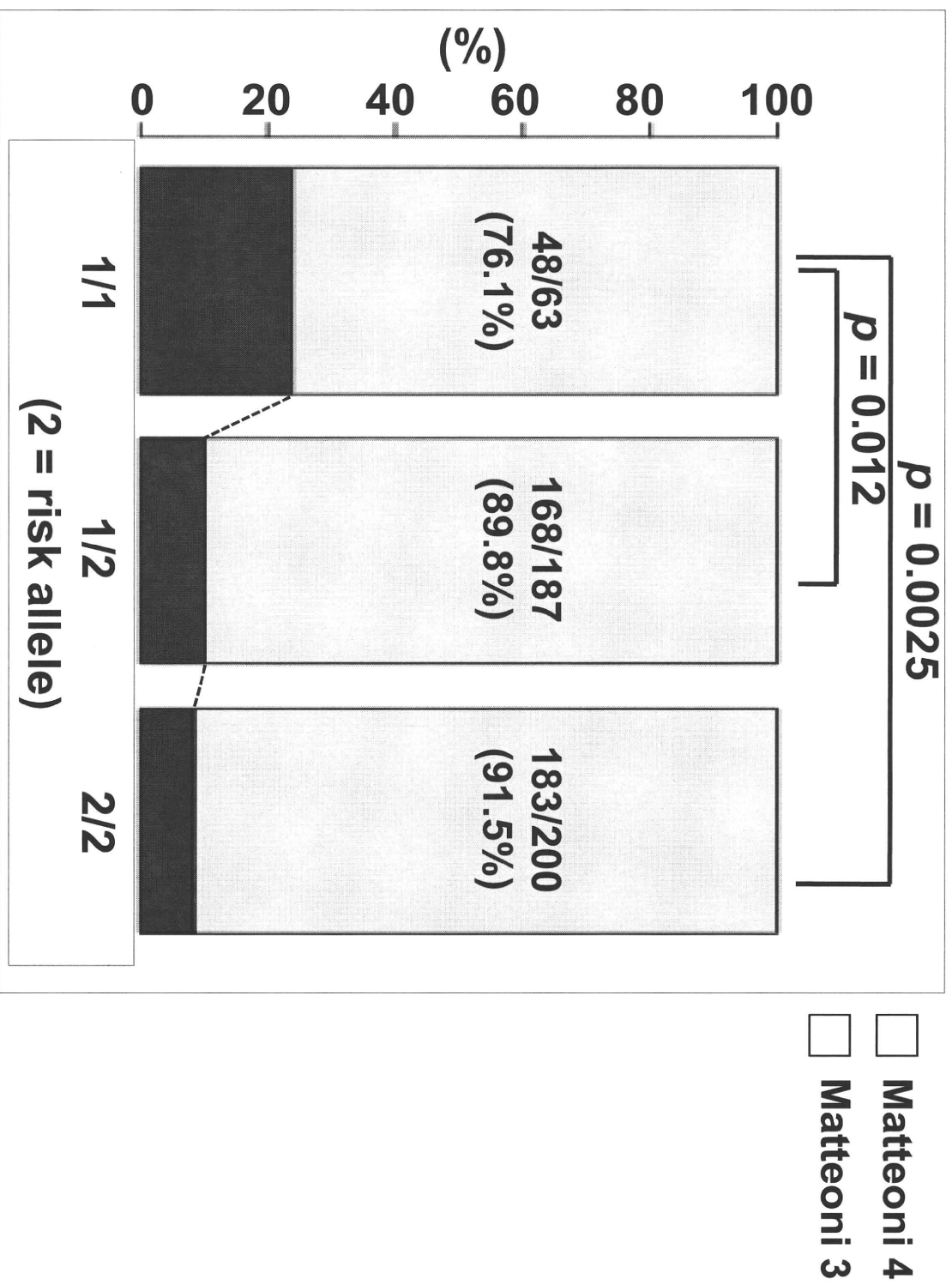


表15. NASHの病型別(Matteoni type 3, type 4)  
PNPLA3 genotypesの分布



## 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）  
H22 年度分担研究報告書

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、  
NAFLD病態におけるヘプシジン発現異常のメカニズム解析

研究分担者 高後 裕 旭川医科大学 教授

**研究要旨：**

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) において肝組織内の各種酸化ストレスの関与が病態の中心となっている。鉄代謝恒常性の破綻もその要因となっているが、そのメカニズムは不明な点が多い。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 Hepcidin 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/NASH に関しては未だ一定の見解ではない。我々はこれまでにマウスの高度脂肪肝において Hepcidin の発現が低下していることを報告してきた。今回はさらに Hepcidin 発現調節因子 Hemojuvelin (HJV) が cofactor となっている BMP-Smad シグナル系に関連して Bone morphogenetic protein (BMP) family の発現低下が起きていることは見出した。

**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。

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 Hepcidin 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/NASH の鉄過剰症の病態においては不明である。マウス NAFLD/NASH における鉄代謝恒常性破

綻のメカニズムとして鉄代謝調節因子 Hepcidin およびその調節因子 BMP の発現変化があ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検討した。

**B. 研究方法**

**【動物モデル】**

NAFLD マウスモデルとして雄性のレプチン欠損マウス (ob/ob マウス)、コントロール群として野生型 C57/BL6 マウスを用いた。マウス用基本飼料で飼育後 6 週齢時に肝、十二指腸、回腸組織及び心臓採決による血清を採取した。また、別の NAFLD モデルとして、C57/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週間飼育し作成した脂肪肝に対し、肝、小腸組織及び血液を採取した。

#### 【検討項目・実験方法】

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(原子吸光スペクトロフォトメトリー法)、肝組織におけるHepcidinのmRNAを定量的PCR法で、血清中活性型Hepcidin濃度をLiquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)法で測定した。肝または腸管の鉄トランスポーターであるDivalent metal transporter 1 (DMT1), Ferroportin 1 (FPN1)またはHepcidin発現調節因子であるBMP6 mRNAを定量的PCR法で、小腸組織におけるBMP6蛋白発現を免疫蛍光染色法で検討した。

#### 【統計学的解析】

各結果の統計学的解析はStudent t検定で行った。

#### 【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

レプチンが欠損し、遺伝的に過食・肥満のob/obマウス(0)は野生型マウ

ス(W)に比べて有意に体重が増加し(W:24.3g, 0:48.2g,  $p<0.001$ )、肝重量が増大していた(W:1020mg, 0:2990mg,  $p<0.001$ )。Hematoxylin-Eosin染色での肝組織像では肝小葉全体に肝細胞への大滴性脂肪蓄積、風船様腫大が認められ、著明な脂肪肝の所見を呈していたが、炎症性細胞浸潤、肝線維化は認めなかった。Prussian blue染色では肝組織に鉄沈着は認めないが、原子吸光スペクトロメトリー法による脂肪的の体積で補正した肝組織内鉄濃度は有意に上昇していた。(図1)

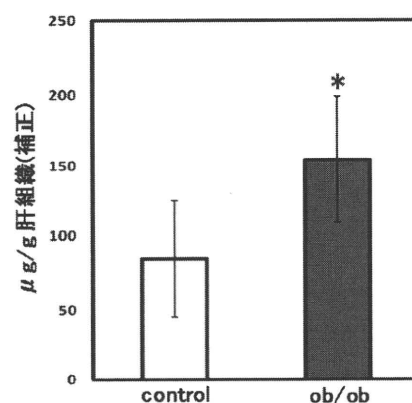


図1 : ob/obマウス脂肪肝の肝組織内鉄濃度  
\*: $p<0.05$

腸管からの鉄吸収動態を明らかにするために、腸管細胞におけるDMT1とFPN1のmRNAの発現について検討したが、ob/obマウス十二指腸におけるDMT1とFPN1のmRNAの発現は、野生型マウスに比べ、いずれも差を認めなかった。しかし、ob/obマウス肝臓におけるHepcidin mRNAは低下傾向にあり(W:1.60, 0:1.02,  $p=0.10$ )、血清活性型Hepcidin濃度はob/obマウスで有

意に低下していた (W:66.3, O:34.9,  $p=0.01$ )。 (図 2)

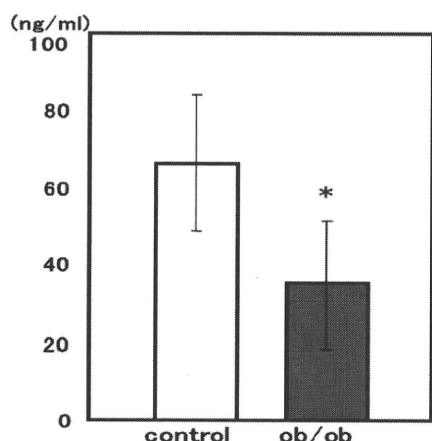


図 2 : ob/ob マウスの血清ヘプシジン濃度

\*: $p=0.01$

Hepcidin の発現調節系に関する検討として BMP6 の発現を検討した。ob/ob マウス肝組織における BMP6 mRNA の発現は低下し、十二指腸の BMP6 mRNA の発現も有意に低下していた。免疫蛍光染色では BMP6 の発現は陰窩部の腸管細胞に認められ、ob/ob マウスで発現が低下していた。(図 3)

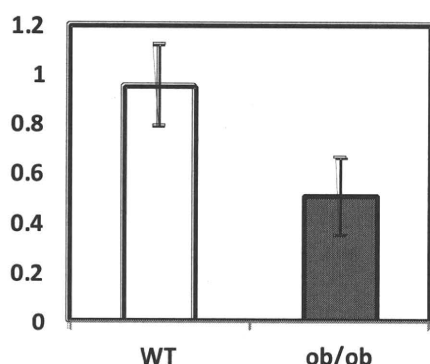


図 3 : ob/ob マウスの小腸 BMP6 発現

16 週間の高脂肪飼料負荷で誘導したマウス脂肪肝でも、小腸の BMP6

mRNA の発現は低下し、肝の Hepcidin mRNA の発現、血清中活性型 Hepcidin 濃度も低下していた ( $p<0.05$ )。

#### D. 考察

肝で産生される鉄代謝調節因子 Hepcidin は腸管細胞、マクロファージの細胞膜上の FPN1 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 Hepcidin 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、Hepcidin の発現動態を検討した。

ob/ob マウスおよび 16 週間の高脂肪飼料負荷で形成されたマウス脂肪肝では Hepcidin 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 FPN1 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。

Hepcidin の発現調節は鉄感知機構と炎症性サイトカインの大きく 2 つの経路より調節を受けている。鉄感知はトランスフェリン受容体 2 (TfR2) を介したシグナルが既知であるが、そのメカニズムの詳細は不明である。最近、腸管細胞の産生する BMP が肝細胞における BMP-Smad 系シグナルを介して

Hepcidin 発現を調節することが報告され、新たな鉄感知機構として注目されていた (S Arndt, Gastroenterology, 2010)。そこで今回の NAFLD モデルにおいて HJV が Cofactor である BMP-Smad シグナル系に対する BMP6 の発現に関して検討した。BMP6 は肝、小腸両臓器において発現しており、ob/ob マウス、高脂肪飼料誘導脂肪肝マウスの両モデルにおいて肝、小腸 BMP6 の発現は低下していた。特に小腸の BMP6 の発現レベルは肝臓より高いことから本モデルにおいても小腸の BMP6 発現変化が hepcidin 発現調節に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

動物モデルにおいて、過食・脂肪負荷が肝・小腸の BMP6 発現変化を介して hepcidin の発現抑制を起し、腸管からの鉄吸収、マクロファージからの鉄放出を誘導する方向に鉄代謝を変化させ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

- Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Yamaguchi K, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Imai S, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Yasui K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol.** 2010 (in press)
- 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.** 397: 375-84, 2010
- 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.
  - 大竹孝明, 生田克哉, 澤田康司, 阿部真美, 三好茂樹, 鈴木康秋, 高後裕, 佐々木勝則. 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. **アルコールと医学生物学** 29 巻 Page110-115 (2010. 04)
  - 大竹孝明, 鈴木康秋, 高後裕. 【NASH/NAFLD の Up to Date】 NASH/NAFLD の分子病態メカニズム 鉄関連分子動態と病態進展. **肝・胆・膵** (0389-4991) 60 巻 6 号 Page915-921 (2010. 06)
  - 大竹孝明, 鈴木康秋, 高後裕. 【NASH/NAFLD のすべて 成因から栄養療法まで】 NASH/NAFLD の診断・治療 診断法 血液・生化学的検査. **臨床栄養** (0485-1412) 116 巻 6 号 Page672-676 (2010. 05)
  - 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
- **Falk Workshop.** (2010.10.05-06, Freiburg, Germany) Alcohol-loading and obesity regulate the expression of transferrin receptor 1 and hepcidin in mice liver. Ohtake T, Ikuta K, Hasebe T, Nakajima S, Sawada K, Abe M, Hosoki T, Suzuki Y, Sasaki K, Torimoto Y, Kohgo Y.
  - **The 61<sup>st</sup> Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases.** (2010.10.29-11.02, Boston, USA) Disturbance of hepatic and intestinal Toll-like receptor signal pathway in high-fat diet induced NAFLD model mice. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Nakajima S, Abe M, Suzuki Y, Ohhira M, Kohgo Y.
  - **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

- **The 9th JSH Single Topic Conference “NASH 2010”.** (2010.11.17-18, Tokyo, Japan) Iron metabolism and NAFLD/NASH. Ohtake T, Kohgo Y.
- **第 46 回日本肝臓学会総会** (2010.05.27-28, 山形) パネルディスカッション. 非アルコール性脂肪性肝疾患における病態進展度予測のための非侵襲的肝線維化マーカーの検討. 大竹孝明、鈴木康秋、高後裕.
- **第 96 回日本消化器病学会総会** (2010.04.22-24, 新潟) ワークショップ. NAFLD における鉄毒性の検討—非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) 測定より—. 大竹孝明、生田克哉、高後裕.
- **第 34 回日本鉄バイオサイエンス学会** (2010.09.11-12, 東京) 一般口演. 非アルコール性脂肪肝における非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) の検討. 大竹孝明、生田克哉、長谷部拓夢、中嶋駿介、澤田康司、阿部真美、鈴木康秋、田中宏樹、佐々木勝則、鳥本悦宏、高後裕.
- **JDDW 2010 第 14 回日本肝臓学会大会** (2010.10.13-14, 横浜)、シンポジウム. NAFLD 患者における血清 NTBI 測定に関する検討. 大竹孝明、鈴木康秋、高後裕.
- **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、齊藤敬司 (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)

- 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

##### 3. その他

該当なし

NASH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・消化器内科学・教授

研究要旨

私どもが開発した絶食法によりケトン体産生量からin vivoにおけるミトコンドリア脂肪酸β酸化能をNASH患者について検討した。その結果、NASH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症例において肝ミトコンドリア障害が指摘されているが、in vivoにおける検討はほとんどなされていない。そこで私どもは新たに開発した絶食法によりケトン体産生量を測定して肝ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化能を検討した。

B. 研究方法

NASH16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。

（倫理面への配慮）山形大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

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。

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る。これはNASHにおける肝組織傷害の程度と関連する事が推測される。

E. 結論

NASH症例では肝ミトコンドリア障害が存在する。

F. 研究発表  
論文発表

1. Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult stem-like cells. *Hepatology Res* 40: 432-437, 2010
2. Sanjo M, Saito t, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 82: 1364-1370, 2010.
3. Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S. Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: The Takahata study- A cross-sectional study of a healthy Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3828-3835, 2010.



慢性非B非C肝障害症例の肝発癌危険因子

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：肝細胞癌の多くはB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)が原因となっているが、15-50%は肝炎ウイルスの関与もなく、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎といった特定の肝疾患の関与もない。しかし、このような原因が不明の肝細胞癌が発生した肝臓にも慢性肝炎とその結果としての肝線維化が認められる。慢性非B非C肝障害を背景とする肝細胞癌は漸増してきており、肝細胞癌の中で占める割合は高くなってきている。今回、慢性非B非C肝障害患者について経過をまとめ、その中でも発癌に至った症例について詳細に臨床的特徴を調べた。性、年齢、BMI、アルコール飲酒、臨床検査データをもとにCox比例ハザードモデルを用いて解析を行った。283名の慢性非B非C肝障害患者のうち経過観察中に発癌したものは39症例であった。年齢、BMI、糖尿病、アルコール飲酒が発癌の危険因子となったが、さらに脂肪肝が存在しないことも発癌の危険因子と判明した。個別の症例を見ると、発癌した39症例中10症例で初診時に脂肪肝が認められ、発癌時には脂肪肝を認めなかった。これらでは超音波所見上、肝の線維化の進展を示唆する所見も同時に出現した。慢性非B非C肝障害が進展し、肝障害の蓄積と肝の線維化が生じるにつれ脂肪肝が消失していく可能性が示唆された。今後、更なる検討が必要であるが、非B非C肝障害から発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

肝細胞癌の多くはB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)が原因となっているが、15-50%は肝炎ウイルスの関与もなく、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎といった特定の肝疾患の関与もない。しかし、このような原因が不明の肝細胞癌が発生した肝臓にも慢性肝炎とその結果としての肝線維化が認められる。慢性非B非C肝障害を背景とする肝細胞癌は漸増してきており、

肝細胞癌の中で占める割合は高くなってきている。従来より慢性非B非C肝障害の原因として最もよく知られているものはアルコール性肝障害である。しかしアルコール性肝障害では慢性非B非C肝障害の増加は説明できない。1980年頃より、濃厚な飲酒歴が無いにもかかわらず、アルコール性肝障害に類似した病理像を呈する慢性非B非C肝障害の存在が注目されてきた。このような肝障害は非アルコール性脂肪肝疾患NAFLD

(nonalcoholic fatty liver disease)と呼ぶ。NAFLDのリスクファクターとしては、2型糖尿病、肥満(BMI高値)、中心性肥満(内臓脂肪高値)、高脂血症、高齢などが報告されており、NAFLDはいわゆるメタボリックシンドロームの一つの側面ととらえられてきている。NAFLDのうち8-16%はNASHの状態を経て肝硬変まで進展すると考えられているが、その過程で、大滴性脂肪変性(steatosis)は消失してゆき、元のNAFLD・NASHの病理上の特徴が大きく失われる。しかしNAFLDの患者を追跡調査しcryptogenic cirrhosisに至ることを示したまとまった報告は数少ない。NAFLDからNASH・肝硬変に至るには数十年の経過が必要と考えられており、それだけの長い期間にわたる前向きな経過観察は容易ではないためである。

本研究では、慢性非B非C肝障害にて東京大学消化器内科を過去に受診した症例の経過をまとめ、その中でも発癌に至った症例について詳細に臨床的特徴を調べた。肝発癌の危険因子として(1)アルコール、(2)NAFLD・NASHの存在、そして(3)糖尿病・肥満といったメタボリックシンドロームの因子がそれぞれどのように関与しているのかを解析した。また、解析の過程で脂肪肝の消失が発癌のリスクを高めるという結果が得られたため、脂肪肝の消失が慢性非B非C肝障害の進展とどのように関連しているのかを検討した。

## B. 方法

1991年1月から2006年12月までに東京大学医学部附属病院消化器内科外来を初診し1年間以上経過観察した患者のうち、以下の基準を満たすものを解析対象とし、レトロ

スペクティブに解析を行った。(1)初診時から継続して6ヶ月間以上ASTもしくはALTが施設基準以上の持続高値を示す。(2)B型肝炎、C型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、原発性硬化性胆管炎、薬剤性肝障害、Budd-Chiari症候群、Wilson病、ヘモジデロシス、住血吸虫症のいずれでもない。(3)初診時の腹部超音波検査にて悪性肝腫瘍を指摘されていない。(4)肝移植後ではない。

初診時には身長と体重の測定、肝疾患の家族歴と既往歴の聴取、アルコール摂取量の聴取、腹部超音波検査、採血が行われた。以前に慢性HBV感染を指摘されたかどうかについても聴取された。初診時の採血ではHBs抗原、HBc抗体、HCV抗体、空腹時血糖、HbA1c、血清アルブミン、血清総ビリルビン、AST、ALT、GGT、ALP、白血球数、ヘモグロビン値、血小板数が測定された。初診以降は外来で3-6ヶ月に1回の採血、半年から1年に1回の腹部超音波検査にて経過観察が行われた。脂肪肝の有無は超音波検査で肝腎コントラストがあるかどうかで判断した。経過観察中に肝細胞癌と診断された症例に対しては、治療時の背景肝生検もしくは肝切除検体から背景肝の病理像が調べられた。患者が死亡した場合、肝細胞癌もしくは他の悪性腫瘍を発癌した場合、肝移植を受けた場合、その時点で観察打ち切りとした。

累積発癌率の計算では肝発癌をイベントとしてKaplan - Meier 法を用い、単変量および多変量でCox比例ハザードモデルを用いて解析した。脂肪肝の有無と患者背景の解析では各パラメーターにつきt検定を行いそれぞれの有意差を評価した。脂肪肝が消失してから発癌した症例については対応

のあるt検定を用いて脂肪肝消失前後での各パラメーターの有意差の有無を調べた。また脂肪肝の有無を時間依存性共変量としたCox比例ハザードモデルを用い解析を行った。

### C. 結果

解析対象となった慢性非B非C肝障害患者283名の臨床背景を表1に示す。

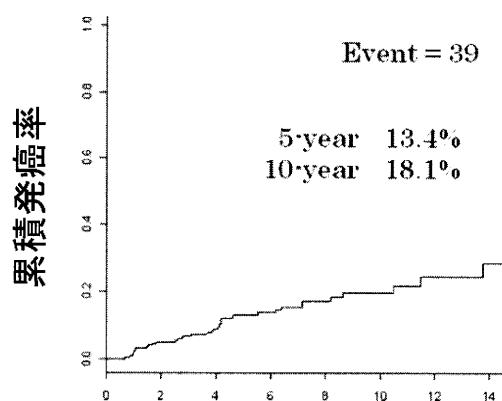
(表1)

| 症例数                              | n=283                  |
|----------------------------------|------------------------|
| 年齢-歳                             | 54.1 ± 13.7            |
| 性別-no. (%)                       |                        |
| 男性 / 女性                          | 191 (67.5) / 92 (32.5) |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )-no. (%) |                        |
| 18.5未満                           | 7 (2.5)                |
| 18.5 - 24.9                      | 145 (51.2)             |
| 25.0 - 29.9                      | 104 (36.7)             |
| 30以上                             | 27 (9.5)               |
| 糖尿病-no. (%)                      |                        |
| なし                               | 183 (64.6)             |
| 食事療法                             | 49 (17.3)              |
| 内服                               | 39 (13.8)              |
| インスリン                            | 12 (4.3)               |
| 飲酒量(g/日)-no. (%)                 |                        |
| 20未満                             | 163 (57.6)             |
| 20 - 49                          | 24 (8.5)               |
| 50 - 79                          | 53 (18.8)              |
| 80以上                             | 43 (15.2)              |
| 脂肪肝-no. (%)                      | 178 (62.9)             |
| HBc抗体陽性-no. (%)                  | 65 (23.0)              |
| 血小板-×10 <sup>4</sup> /μL*        | 21.0 (13.8-25.6)       |
| AST-IU/L*                        | 42 (29-66)             |

|           |                 |
|-----------|-----------------|
| ALT-IU/L* | 49 (29-84)      |
| AST/ALT比  | 0.97(0.61-1.20) |
| GGT-IU/L* | 93 (48-187)     |

\* 中央値(第1-第3四分位点)

平均観察期間5.7年(範囲1.0-16.9年)の間に39人に肝発癌を認めた。発癌をイベントとしてKaplan-Meier法を用い、累積発癌率を図示した(図1)。3、5、7、10年での累積発癌率は7.0%、13.4%、16.2%、19.1%であった。単変量・多変量Cox回帰の結果を表2にまとめた。多変量Cox回帰の結果、年齢(ハザード比[HR]:1.09/年, P<0.001)、BMI25以上の肥満(HR:2.65, P=0.006)、糖尿病(HR:2.91, P=0.005)、アルコール摂取量50g/日以上(HR:2.42, P=0.025)が発癌の危険因子であった。初診時の脂肪肝についてはオッズ比が1以下であり、初診時に脂肪肝があると発癌しにくく、逆に初診時に脂肪肝が存在しないと発癌しやすくなることが示唆された(HR:0.43, P=0.048)。性別はHR:1.81(男 vs. 女), P=0.22と有意に至らなかった。



(図1)

(表2)

|                                 | 単変量              |        |
|---------------------------------|------------------|--------|
|                                 | OR (95% CI)      | P      |
| 年齢 (歳)                          | 1.09 (1.05-1.13) | <0.001 |
| 女性                              | 0.46 (0.21-1.00) | 0.049  |
| BMI >25 (kg/m <sup>2</sup> )    | 2.27 (1.17-4.42) | 0.016  |
| 飲酒量 > 50 (g/日)                  | 2.30 (1.23-4.33) | 0.01   |
| 糖尿病あり                           | 4.55 (2.22-9.34) | <0.001 |
| 脂肪肝あり                           | 0.21 (0.11-0.42) | <0.001 |
| HBc抗体陽性                         | 1.55 (0.82-2.92) | 0.18   |
| 血小板 < 10 (×10 <sup>4</sup> /μL) | 3.04 (1.54-6.01) | 0.001  |
| アルブミン (g/dL)                    | 0.23 (0.13-0.40) | <0.001 |
| ALT > 36 (IU/L)                 | 0.55 (0.29-1.04) | 0.07   |
| GGT > 68 (IU/L)                 | 0.76 (0.40-1.43) | 0.39   |

|                              | 多変量              |        |
|------------------------------|------------------|--------|
|                              | OR (95% CI)      | P      |
| 年齢 (歳)                       | 1.09 (1.05-1.13) | <0.001 |
| 女性                           | 0.58 (0.25-1.37) | 0.22   |
| BMI >25 (kg/m <sup>2</sup> ) | 2.65 (1.32-5.30) | 0.006  |
| 飲酒量 > 50 (g/日)               | 2.42 (1.12-5.23) | 0.025  |

|                                 |                  |       |
|---------------------------------|------------------|-------|
| 日)                              | 5.23)            |       |
| 糖尿病あり                           | 2.91 (1.38-6.16) | 0.005 |
| 脂肪肝あり                           | 0.43 (0.19-0.99) | 0.048 |
| HBc抗体陽性                         | 1.37 (0.68-2.76) | 0.38  |
| 血小板 < 10 (×10 <sup>4</sup> /μL) | 0.79 (0.32-1.93) | 0.60  |
| アルブミン (g/dL)                    | 0.56 (0.28-1.13) | 0.11  |
| ALT > 36 (IU/L)                 | 0.74 (0.36-1.51) | 0.93  |
| GGT > 68 (IU/L)                 | 0.81 (0.40-1.66) | 0.87  |

初診時に脂肪肝を指摘され経過観察中に発癌した13例中、10例で発癌前に超音波検査にて脂肪肝が消失していた。脂肪肝が消失した10症例の血算生化学値の変化を表3にまとめた。これらの中で体重が発癌時に初診時と比較して5%以上減少していた症例は1例もなく、発癌時のCT・超音波にて腹水・胸水を認めなかった。血小板、血清アルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、GGT、PTについて対応のあるt検定を用いて初診時と発癌時を比較した。血清アルブミンでは有意差が認められ、発癌時には有意に低下していた。血小板についても有意には至らなかったが低下傾向が認められた。いずれの症例も初診時と発癌時の超音波検査所見を比較すると、肝辺縁の鈍化、肝表面の凹凸の出現、脾腫の出現など慢性肝障害による肝の線維化を反映する所見が観察された。