

(表3)

発癌時に脂肪肝が消失していた症例 n=10		
初診時	発癌時	P値
血小板- $\times 10^4/\mu\text{L}^*$		0.11
13.5 (9.7-15.3)	10.8 (10.1-12.2)	
アルブミン-g/dL*		0.007
4.2 (3.9-4.4)	3.6 (3.3-3.9)	
総ビリルビン-mg/dL*		0.89
0.5 (0.6-1.1)	0.9 (0.7-1.9)	
AST-IU/L*		0.34
59.5 (39.8-72)	69 (55.8-72.5)	
ALT-IU/L*		0.22
51 (36.3-77.8)	55 (42.8-73.3)	
GGT-IU/L*		0.58
73.5 (49-96.4)	54 (44.3-69.3)	
PT-%*		0.22
70.1 (67.5-81.1)	73.8 (65-77.0)	

初診時に脂肪肝を認めた178人に対して脂肪肝の有無を時間依存性共変量としてCox比例ハザードモデルを用い、多変量Cox回帰で有意であった項目(年齢、BMI、飲酒量、糖尿病)で補正を行った(表4)。肝脂肪の消失は発癌の危険因子として有意であった(HR:7.75, P=0.008)。

(表4)

	OR (95%CI)	P
脂肪肝 (時間依存性共変量)	7.75 (1.69-35.5)	0.008
年齢(歳)	1.12 (1.04-1.21)	0.004
BMI > 25 (kg/m ²)	1.73 (0.44-6.83)	0.44
飲酒量 > 50 (g/日)	1.29 (0.29-5.72)	0.74
糖尿病あり	5.08 (1.05-24.7)	0.043

D. 考察

慢性非B非C肝障害からの発癌危険因子を解析したところ、年齢、BMI25以上の肥満、糖尿病、50g/日以上アルコール摂取の他、超音波所見にて脂肪肝が無いことが危険因子の一つであった。既存の報告でも肥満・糖尿病はNAFLDからの肝発癌の危険因子とされている。

超音波所見にて脂肪肝が無いことが発癌の危険因子であるという結果が得られたため、我々は改めて発癌した症例のカルテを調べた。すると初診時にも発癌時にも脂肪肝が認められなかった症例でも多くの場合は(26症例中21症例)、過去に健診などで脂肪肝といわれた既往があった。また、初診時に脂肪肝があり、経過観察中に脂肪肝が消失し、その後に発癌した症例が全発癌症例の4分の1を占めていることが判明した。そこで、脂肪肝の有無、脂肪肝の消失に注目して解析を進めることにした。

初診時に脂肪肝があり脂肪肝が消失してから発癌した症例に注目して血液生化学検査値・超音波所見を追ったところ、脂肪肝の消失とともに血小板・血清アルブミンが減少することが観察された。これらの結果は脂肪肝の消失が慢性肝障害の進展・肝の線維化を反映している可能性を示唆している。脂肪肝の消失が慢性肝障害の進行を反映している可能性が考えられたため、あらためて脂肪肝の有無を時間依存性共変量としてCox比例ハザードモデルを用いて解析を行ったところ、やはり脂肪の消失が発癌の危険因子という結果になった。脂肪肝の消失に伴い発癌のリスクが上昇するという結果はNAFLDやNASHが線維化の進行過程で

steatosisを失い、そしてcryptogenic cirrhosisに至ると発癌しやすくなるということを表している可能性がある。

E. 結論

今回、慢性非B非C肝障害における肝発癌の危険因子を解析し、その過程で、脂肪肝の消失が発癌と関与している可能性が示唆された。慢性非B非C肝障害にて通院中の患者で体重減少が無いにもかかわらず超音波所見にて脂肪肝が消失した場合には、発癌の危険が高くなったと言えるのかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2010;40:135-44.
- 2) Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, Koike K. Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly. *J Gastroenterol* 2010;45:876-84.
- 3) Sakamoto A, Ishizaka Y, Toda EI, Nagai R, Koike K, Yamakado M, Ishizaka N. Impact of Changes in Obesity Parameters on Glucose Metabolism and Insulin Resistance Over a One-Year Period. *J Atheroscler Thromb* 2010.
- 4) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Koike K, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* 2010;37:1417-23.
- 5) 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;82:776-92.
- 6) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of Contrast Enhanced Ultrasonography with Sonazoid in Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010.
- 7) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology* 2010;78 Suppl 1:24-30.
- 8) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver

- disease. *Hepatol Res* 2010;40:69-82.
- 9) 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;91:1207-12.
- 10) 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;17:476-85.
- 11) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, 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* 2010;37:410-6.
- 12) 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;33:263-8.
- 13) Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H, Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Koike K, Yatomi Y. Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2010;411:765-70.
- 14) Hmwe SS, Aizaki 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* 2010;85:520-4.
2. 学会発表
- 1) Masuzaki, R. R. Tateishi, S. Shiina, H. Yoshida, H. Nakagawa, T. Arano, K. Uchino, K. Enooku, E. Goto, Y. Kondo, T. Goto, Y. Sugioka, H. Ikeda, M. Omata, K. Koike. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma recurrence by transient elastography after curative radiofrequency ablation. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Viena, Austria.
- 2) Uchino, K., R. Tateishi, S. Shiina, T. Arano, K. Enooku, E. Goto, R. Masuzaki, H. Nakagawa, Y. Kondo, T. Goto, M. Omata, H. Yoshida, K. Koike. Clinical features of advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2010. Vienna, Austria.
- 3) Arano T, Nakagawa H, Yoshida H, Tateishi, R., Uchino Y, Enooku K, T. Sato, R. Masuzaki, T. Ohki, E. Goto, Goto, R. Masuzaki, Y. Kondo, T. Goto, Shiina S, M. Omata, K. Koike. Association between serum adiponectin level and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. The 62th Annual Meeting of the

- American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
- 4) Kojima K, Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kato N, Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. miRNA-122, a liver-specific miRNA, is a key regulator for bridging the clinical phenomena between alpha-feto-protein expression and biologically malignant phenotype in HCC. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
 - 5) Tanoue Y, Tomiya T, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Shirataki H, Ikeda H, Koike K, Fujiwara K. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and protein production in rat hepatocytes through an mTOR signaling pathway. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
 - 6) Takahashi H, Okuse C, Yamada N, Takatsu Y, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Itoh F. Hepatitis B virus clearance in acute hepatitis is prolonged in genotype A HBV infection. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010. Boston, USA.
 - 7) Tsutsumi T, Goto K, Fujinaga H, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Suzuki T, Koike K. Association of the substitution of amino acid 75 in the hepatitis virus core region with IL-8 upregulation and hepatocarcinogenesis. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.
 - 8) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kawatari N, Goto T, Chang JH, Yoshida H, Omata M, Koike K, Kato N. Amino acid substitutions in genotype 1b HCV core protein and response to PEG-IFN/RBV treatment. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.
 - 9) Yuhashi K, Kodama T, Koike K, Kanamori H. Identification of hepatic mRNA 3'-untranslated regions that bind to HCV NS5B. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, 2010.
 - 10) 工藤洋太郎, 立石敬介, 田中康雄, 山本恵介, 金井文彦, 小俣政男, 小池和彦. 脂肪肝から肝発がんを呈する新たなモデルマウスの作成と解析. 第 47 回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.
 - 11) 大塚基之, 高田朱弥, 小島健太郎, 前田慎, 立石敬介, 池上恒雄, 平田善裕, 建石良介, 椎名秀一朗, 吉田晴彦, 小池和彦. microRNA machinery 構成因子 DDX20 の発現低下に伴う microRNA 機能の減弱によって惹起される肝発癌経路の同定. 第 47 回日本臨床分子医学会学術総会. 2010. 東京.
 - 12) 小池和彦. Virus associated ontogenesis Hepatocarcinogenesis and lipid metabolism in HCV infection. 第 68 回日本癌学会総会. 2009. 横浜.
- 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）
H22 年度分担研究報告書

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; NASH, 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。本研究では、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の解明を目指した。①マクロファージの遊走が障害されている PI3K γ 欠損マウスでは、肥満によるインスリン抵抗性や肝臓へのマクロファージの浸潤と肝脂肪沈着が起こらず、これまで考えられていたのとは異なり、慢性炎症と脂肪沈着には相互作用がある可能性が示唆された。②摂食によって生理的に肝臓において小胞体ストレスが惹起されることを見だし、肥満状態ではその制御が破綻して持続的な小胞体ストレスが惹起され、肝臓でのインスリン抵抗性・脂肪沈着に至る可能性があることを見いだした。③また、興味深いことに、空腹やアディポネクチン刺激では一過性の IL-6 の上昇が生じ、このような生理的一過性の炎症反応は、むしろ肝臓でのインスリン感受性の保持に貢献していることを見いだした。このように、生理的一過性の炎症・ストレス反応の制御が破綻し、持続化すると肥満による肝臓のインスリン抵抗性や脂肪沈着にいたると考えられる。④東大病院における糖尿病患者（575 名）の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

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。また、2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 *ob/ob* マウスに PI3K γ 阻害薬を投与し、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などを検討した。②新規に発見した小胞体ストレス制御因子 *Sdf2l1* を野生型マウスや *db/db* マウスに過剰発現あるいは、発現抑制することにより、全身および肝臓での糖脂質代謝を検討した。③肝臓においてインスリン感受性を高め、脂肪沈着を抑制するアディ

ポネクチンが、それらの作用の鍵分子であるインスリン受容体基質 (IRS-2) の発現を調節するメカニズムを、*db/db* マウスにアディポネクチンを投与し、また IL-6 欠損 (IL-6KO) マウスや肝臓特異的 STAT3 欠損 (LSTAT3KO) マウス、アディポネクチン受容体 *AdipoR1*, *AdipoR2* の各々欠損あるいは両者の欠損 (*AdipoR1KO*, *AdipoR2KO*, *DKO*) マウスを用いて検討した。④前年度に引き続き、東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科に入院した糖尿病患者について、糖尿病の病態・治療・肝機能・肝炎ウイルス抗体などの臨床情報を収集した。

(倫理面への配慮)

①～③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。④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

① PI3K γ 阻害薬 AS-605240 を *ob/ob* マウス

に投与すると、脂肪組織などへのマクロファージの浸潤が著明に抑制され、糖脂質代謝が改善した。②Sdf2l1 の発現を shRNA により野生型マウスの肝臓で抑制すると、小胞体ストレスが亢進し、糖代謝の悪化や脂肪蓄積が生じた。一方、*db/db* マウスの肝臓に Sdf2l1 を過剰発現すると、糖代謝や脂肪肝が改善した。③*db/db* マウスでは、肝臓での IRS-2 の発現が低下しており、これがインスリン抵抗性や脂肪沈着に結びついている。アディポネクチンを投与すると、IRS-2 の発現が上昇した。このアディポネクチンによる IRS-2 の増加は、野生型マウスでも認められたが、IL-6KO マウスや LSTAT3KO マウスでは認められなかった。また、*db/db* マウスや野生型マウスに IL-6 を投与しても同様に IRS-2 の発現上昇が起きた。この時、IL-6 は脂肪織のマクロファージから分泌されていた。このアディポネクチンの投与により肝臓での脂肪合成は抑制された。④前年度からさらに 50 名のデータを加え、計 575 名のデータベースを構築した。

D. 考察

脂肪組織や肝臓でのマクロファージなどの免疫担当細胞の持続的な増加とそれに伴う慢性炎症が、インスリン抵抗性と併に肝臓での脂肪沈着も促進すると考えられる。従って、これまでの 1st hit と 2nd hit という概念も再考すべきではないかと考えられる。一方、マクロファージの遊走を抑制する PI3K γ 阻害薬は、抗糖尿病・抗 NAFLD 薬として期待できる。また、過食による恒常的小胞体ストレスも NAFLD を促進するため、小胞体ストレスの抑制薬も治療に応用可能である。一方、生理的一時的な小胞体ストレスや炎症は、NAFLD を抑制する可能性もある。

E. 結論

肝臓におけるマクロファージあるいは他の免疫担当細胞による何らかの刺激を介して、肝臓の脂肪沈着と慢性炎症や慢性的小胞体ストレスが相互的に影響を及ぼしあっていることを明らかにした。このことから、NAFLD, NASH においても、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

- 1) Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K and Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab* 13:294-307, 2011
 - 2) Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M and Kadowaki T. Adiponectin Enhances Insulin Sensitivity by Increasing Hepatic IRS-2 Expression via Macrophage-derived IL-6 Dependent Pathway. *Cell Metab* in press
 - 3) Kobayashi N, Ueki K, Okazaki Y, Iwane A, Kubota N, Ohsugi M, Awazawa M, Kobayashi M, Sasako T, Kaneko K, Suzuki M, Nishikawa Y, Hara K, Yoshimura K, Koshima I, Goyama S, Murakami K, Sasaki J, Nagai R, Kurokawa M, Sasaki T and Kadowaki T. Blockade of Class IB Phosphoinositide-3 Kinase Ameliorates Obesity-induced Inflammation and Insulin Resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* in press
- ##### 2. 学会発表
- 1) Kohjiro Ueki Regulation of insulin

sensitivity through changes in
expression of adipokines by obesity
シンポジウム10 : Insulin resistance
and qualitative changes in adipocytes
第53回日本糖尿病学会年次学術集会
(May 28 2010)

- 2) 植木浩二郎。肝臓におけるインスリン
シグナルと小胞体ストレスシグナルの
クロストーク。シンポジウム2 : 細胞内
シグナル異常と肥満 第31回日本肥満
学会 (October 1 2010)

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

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

NBNC および NASH 由来肝癌の発癌機構の解析と
NASH 診断における造影超音波の有用性に関する基礎的研究

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した。肝癌切除標本を用いた分子生物学的解析から肝細胞癌の発生に関与する dbpA 遺伝子の発現が生活習慣病を有する患者および NASH 由来肝癌においては癌部、非癌部ともにその mRNA 発現が肝炎由来の場合よりも高いことが示され、その発現制御にメチル化が関与している可能性が示唆された。さらに、ラットの NASH モデルを用いて NASH の造影超音波診断の有用性に関する基礎的研究を行い、ラット NASH モデルではクッパー細胞のソナゾイド取り込みが低下し、これが造影超音波クッパー相における染色低下の要因であることを明らかにした。

A. 研究目的

NBNC 由来あるいは NASH を背景にもつ肝細胞癌の特質を解析し、その発癌機構の一端を明らかにすることを目的とする。さらに、NASH の造影超音波診断における有用性を検討した。

定量化した。

（倫理面への配慮）ヘルシンキ宣言を遵守し、個人情報保護の立場から本研究を行った。

B. 研究方法

1. Y-Box 蛋白である dbpA 遺伝子が肝細胞癌の発癌に関与するとの我々の知見を踏まえて、HBV, HCV、NBNC, NASH を背景に有する肝癌切除標本における dbpA 遺伝子発現動態を検討した。
2. ソナゾイド造影超音波イメージにおいて NASH ではクッパーイメージの染色が低下するとの臨床知見をラットモデルを用いた実験により検証した。すなわち、ラットにソナゾイドを静注しラット肝を生体顕微鏡下で観察し、クッパー細胞へのソナゾイド取り込みを

C. 研究概要

1. dbpAmRNA が肝細胞癌において高発現し、慢性肝炎、肝硬変では発現が低下した。非癌部肝組織では NASH 由来において高発現を示した。非ウイルス背景の癌組織ではウイルス由来肝癌よりも発現が高い傾向があった。生活習慣病関連因子の保有率が高い症例の癌組織、非癌部肝組織では dbpAmRNA の発現が高く、とくに糖尿病合併症例においては癌部の発現がもっとも有意に高値であった。以上の発現程度は同遺伝子プロモーター CpG 領域のメチル化/非メチル化状態と有意に相関した。
2. ラット NASH モデルではクッパー細

胞によるソナゾイドによる取り込みが減少することが明らかとなり、これがソナゾイド造影超音波クッパー相の染色低下の要因であることを示した。

D. 考察

NBNC、NASH、生活習慣病、糖尿病を背景に有する肝癌ではその発癌の分子機構に dbpA 遺伝子がより強くかかわっており、その発現はプロモーターの CpG 領域のメチル化により制御されていることを示唆する知見を得た。さらに、NASH 診断においてソナゾイド造影超音波検査の有用性を示唆する知見を得た。

E. 結論

非ウイルス性肝癌、NASH 由来肝癌の発生には生活習慣病、酸化ストレスの関与が示唆され、その分子機構の一端に dbpA 遺伝子が関与する可能性を示した。また、NASH 診断におけるソナゾイド造影超音波の有用性を示した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshikawa S, Iijima H, Saito M, Tanaka H, Imanishi H, Yoshimoto N, Yoshimoto T, Futatsugi-Yumikura S, Nakanishi K, Tsujimura T, Nishigami T, Kudo A, Arii S, Nishiguchi S. Crucial role of impaired Kupffer cell phagocytosis on the decreased Sonazoid-enhanced echogenicity in a liver of a nonalcoholic steatohepatitis rat model. *Hepatol Res*, 2010;40:823-831.

2. 学会発表

1. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平, 和氣健一郎, 市之瀬志津子, 工藤篤, 石井昭生, 高嶋智之, 坂井良之, 會澤信弘, 山本晃久, 池田直人, 岩田恵典, 榎本平之, 齊藤正紀, 今西宏安, 下村莊治, 有井滋樹. Kupffer 細胞の形態からみた NASH 発症の要因. 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010. 4. 22
2. Obulhasim Gulanbar, Mahumut Yasen, 梶野一徳, 阿部雅明, 田中真二, 水島 洋, 田中 博, 有井滋樹, 桶野興夫. 非ウイルス背景肝癌におかえる bdpA 遺伝子のゲノム, エピゲノム異常とその意義. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.5.27. (ポスター)

H. 知的財産の出願・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。
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）
H22年度分担研究報告書

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
脂肪性肝炎における自然免疫および組織損傷修復機転の異常に関する検討

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 順天堂大学医学部・消化器内科 准教授

研究要旨：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態進展には肝の自然免疫系が深く関与していることが示唆されており、最近私たちはメタボリックシンドロームモデル動物であるK^K-A^yマウスで肝NKT細胞の減少と機能低下が認められることを明らかにした。そこで今年度はNKT細胞の肝線維化における機能的役割について明らかにする目的で、NKT細胞の成熟分化に必須であるCD1d分子の欠損により肝NKT細胞が完全に枯渇しているCD1dノックアウト（KO）マウスを用いて、チオアセタミド（TAA）肝線維化におけるNKT細胞の関与について検討した。CD1d KOマウスではTAA肝障害および致死性が著明に抑制された。さらに、TAA投与9週後にはWTでは線維性架橋形成を伴う明瞭な肝線維化を認めたが、CD1d KOでは線維形成が明らかに軽度であり、肝組織中COL1A1 mRNAの誘導も約1/5に抑制された。これらの結果より、TAAによる肝組織障害およびそれに伴う線維化の進展にNKT細胞が重要な役割を演じていると考えられた。従って、NKT細胞が肝内サイトカイン発現の調節を介して脂肪性肝炎の病態進展にも寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、アルコール性肝障害と病理学的に類似するのみならず病態生理の観点からも共通したメカニズムが発症・進展に寄与していることが示唆されている。実際、アルコール性肝炎では腸内細菌由来エンドトキシンが門脈を介して肝マクロファージ（Kupffer細胞）を活性化し、TNF α などの炎症性サイトカインやラジカルなどを過剰産生して肝実質細胞障害を惹起する一方、TGF β の産生を介して線維化進展にも寄与することが証明されているが、NASHでも同様のメカニズムが炎症および線維化のプロセスに関与している可能性が示唆されている。従って、Kupffer

細胞活性化の過程でこれらの炎症惹起と組織損傷修復に関わる生理活性物質の発現バランスがどのように制御されているかを明らかにすることが重要であると考えられる。最近、肝内リンパ球の産生するIL-4、IL-13などのサイトカインがKupffer細胞の機能分化に関与していることが示唆され注目されている。肝内リンパ球には自然免疫系を司るNK細胞およびNKT細胞の分画が多く含まれており、これらの細胞群が種々のサイトカイン誘導を介してKupffer細胞の機能調節にも重要な役割を演じていると考えられるが、脂肪性肝炎の病態におけるNK細胞およびNKT細胞の関与については未だ不明の点が多い。私たちは最近、メタボリックシ

ンドロームモデル動物であるKK-A^yマウスにおいて脂肪性肝炎の進展に伴い肝NKT細胞分画が減少し、サイトカイン産生能も低下していることを見出した。しかし、肝の炎症・線維化におけるNKT細胞の機能的役割については不明の点も多い。そこで今回私たちは、NKT細胞の成熟分化に必須であるCD1d分子のノックアウト (KO) マウスを用いて、チオアセトアミド (TAA) 肝障害におけるNKT細胞の役割について検討した。

B. 研究方法

動物モデルの作成

7週齢雄性CD1d-KO (順天堂大学医学部免疫学教室より供与) 及びWTマウス (C57Bl/6; 日本クレア社) にTAA (和光純薬工業) を単回もしくは9週間投与した。TAAは生理食塩水に希釈し、初期1週間は0.1mg/g BW、2週以降は0.2mg/g BWを週3回腹腔内に投与した。急性投与ではTAA投与3, 6, 12, 24時間後に、慢性投与ではTAA投与5ないし9週時点で最終投与日から2日後に、エーテル麻酔下に下大静脈より脱血し、血清および肝組織サンプルを採取した。血清AST・ALT値は酵素法測定キット (カイノス社製) を用いて定量した。

病理組織学的検討

肝組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、HE染色、エステラーゼ染色およびSirius Red染色を行い、光学顕微鏡 (Leica DM 2000; Leica Microsystems社製) を用いて組織像を観察した。炎症細胞浸潤の評価にはエステラーゼ染色200倍観察で1標本あたり無作為に5視野を写真撮影し、1視野あたりの平均陽性細胞数を計測した。また、Sirius Red染色による線維化領域のモルフオメトリーはScion Imageソフトウェア (Scion Corp社製) を用いて行った。

免疫組織化学

パラフィン包埋切片を用い、10% ウマ血清でブロッキング後、抗Actinモノクローナル抗体 (ASM-1; American Research Products社製) を加えてインキュベートし、ビオチン化horse anti-mouse IgG (Vectastain Elite ABC Mouse IgG kit; Vector Laboratories社製) を用いてDABで発色した。

Western Blot法

凍結肝組織から蛋白を抽出し、SDS-PAGEで展開後PVDF膜に転写し、抗Actinモノクローナル抗体 (ASM-1; American Research Products社製) およびポリクローナルgoat anti-immunoglobulins/HRP (DAKO社製) とインキュベートした。膜を洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare社製) およびルミノイメージアナライザー (LAS-3000; FUJI Film社製) を使用して特異バンドを検出した。デンストメトリー解析にはMulti Gaugeソフトウェア (FUJI Film社製) を用いた。

Real-time PCR

凍結肝組織よりillustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE healthcare社製) を用いてtotal RNAを精製し、MMLV reverse transcriptase (SuperScript II; Invitrogen社製) およびoligo dTプライマー (Invitrogen社製) を用いてcDNAを作成した。Real-Time PCR にはIL-4、IL-6、TNF α 、IFN γ 、TGF β -1、 α 1(I)procollagen (COL1A1)、TIMP-1、GAPDHの各特異的プライマーとSYBR Premix Ex TaqTM (タカラバイオ社製) を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Life Technologies Foundation製) でthreshold cycle(Ct)値を測定した。

(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

CD1d-KOマウスでのTAA慢性投与時の致死率

TAA反復投与(0.1 mg/g BW, 週3回)1週間以内にWTマウスの50%が死亡したが、KOは同等の処置で全例が生存した。2週以降はTAA投与量を0.2 mg/g BWに増加したが、KOマウスは5週時点で90%以上が生存し、WTマウスと致死率に有意差を認めた(Log-Rank test; $p=0.001$)。

CD1d-KOマウスでのTAA慢性投与時の肝障害

TAA投与5週後にはWTマウスでは中心静脈周囲を主体とした壊死炎症所見を認めたが、CD1d-KOマウスでは同等のTAA投与でも壊死炎症が軽度であった。また、同時点での血清ALT値はWTマウスで 366 ± 46 IU/L、KOマウスで 106 ± 12 IU/Lと後者で有意に低値を示した ($p<0.05$)。

TAA投与後の肝組織への炎症細胞浸潤をより正確に評価するため、エステラーゼ染色を行い、視野中の好中球とマクロファージをそれぞれカウントした。WTマウスではTAA投与5週後には顆粒球およびマクロファージが1視野($\times 200$)当たり 11.0 ± 0.4 および 124.4 ± 10.0 個と有意に増加していたが、KOマウスではそれぞれ 3.1 ± 0.7 および 50.1 ± 3.9 個と有意に抑制されていた。

CD1d-KOマウスでのTAA慢性投与時の星細胞活性化

TAA投与5週後には、WTマウスでは肝組織中の α SMA陽性染色像が著明であるのに対し、CD1d-KOマウスでは軽微であった。また、肝組織中の α SMAをWestern blot法で定量的に評価したところ、KOマウスではWTの約1/4に減弱していた。一方、TAA投与5週後の肝組織でのTGF β mRNA発現誘導もKOマウスではWTマウスの約2/3に抑制されていた。

CD1d-KOマウスでのTAA慢性投与時の肝線維化

TAA投与9週後、WTマウスでは線維性架橋形成を伴う明瞭な肝線維化を認めたが、KOマウスでは線維形成が明らかに軽度であった。モルフォメトリ解析では、KOマウスの肝組織でのSirius Red陽性領域はWTマウスの約50%と有意に抑制されていた。また、肝組織中のCOL1A1及びTIMP-1 mRNA発現は、それぞれWTマウスの約30%と14%に抑制されていた。

CD1d-KOマウスでのTAA単回投与後のサイトカイン誘導

WTマウスではTAA単回投与12時間後をピークとして肝組織中IL-4およびIFN γ mRNAの上昇が認められた。CD1d-KOマウスでは、これらのNKT細胞が主として産生するサイトカインの発現誘導が著明に抑制されていた。また、TAA投与12時間ないし24時間後をピークとするTNF α およびIL-6 mRNAの発現亢進も、KOマウスでは有意に抑制された。

D. 考察

脂肪性肝炎の発症および進展には、自然免疫細胞の一つであるNKT細胞が寄与する可能性が示唆されている。これまで、レプチン欠損により著明な肥満および脂肪肝を呈するob/obマウスでは、肝NKT細胞が枯渇しており、NKT細胞が産生するサイトカインの異常が認められることが報告されている。ob/obマウスで見

られるこれらの現象にはレプチンが直接関与していることが示されているが、ヒトではレプチン欠損に伴う肥満やメタボリックシンドロームはまれであり、むしろレプチン抵抗性に伴う高レプチン血症が認められることの方が多いことなど、ヒトの病態とは異なる点も多い。そこで、私たちはヒトのメタボリックシンドロームに類似したアディポカイン発現異常を生じるKK-A^yマウスを用いて、脂肪性肝炎の病態解析を行ってきた。これまで、私たちはKK-A^yマウスにメチオニン・コリン欠乏食を負荷すると、より強い脂肪性肝炎を生じ、肝線維化も見られることや、本マウスでは脂肪性肝炎に伴って重度の肝再生不全が認められることなどを示してきた。最近、私たちはKK-A^yマウスの肝NKT細胞が脂肪性肝炎の進行に先だって減少し、NKT細胞由来サイトカインの産生能も低下していることを明らかにした。興味深いことに、KK-A^yマウスにチアゾリジン系誘導体であるピオグリタゾン投与することによって、低アディポネクチン血症が回復するとともに肝NKT細胞分画が増加し、NKT細胞由来サイトカイン産生も回復することが判明した。従って、脂肪性肝炎におけるNKT細胞枯渇は、必ずしもレプチン依存性に見られる現象ではなく高レプチン血症でも生じ得ることおよび、むしろ低アディポネクチン血症が関与している可能性が示唆された。

以上の検討から、NKT細胞が脂肪性肝炎の病態と密接な関連があることが示唆されたが、脂肪性肝炎の進展、特に肝線維化の進行におけるNKT細胞の役割についてはこれまで殆ど明らかにされていない。そこで、本研究ではNKT細胞の分化・成熟に必須である分子であるCD1dの欠損により全身性にNKT細胞が欠失しているCD1d-KOマウスを用いてTAA肝障害・線維化モデルを作成し、肝の炎症および線維化におけるNKT細胞の役割について検証した。TAA投与により生じる肝細胞障害、壊

死炎症所見がCD1d-KOマウスでは明らかに微弱であり、TAA継続投与時の致死率もKOマウスの方が有意に低いことから、CD1dおよびNKT細胞の反応がTAAによる肝毒性に深く寄与していることが明らかになった。実際、KOマウスではTAA単回投与後の肝組織でのNKT細胞由来サイトカイン(IL-4、IFN γ など)発現が極めて低いのみならず、TNF α やIL-6などの炎症性サイトカイン発現も抑制されており、このことはTAAにより誘発される肝内免疫細胞賦活化にCD1d分子およびNKT細胞が重要であることを示していると考えられる。CD1dは糖脂質抗原を提示し、NKT細胞の不可変性T細胞受容体(TCR)がこれを認識することにより活性化することから、TAA投与で肝細胞内の酸化ストレス増大により生じた変性脂質や、腸内細菌由来の糖脂質抗原などがこのシステムで認識されることが、TAA肝障害の増悪に関わっている可能性が示唆される。

一方、線維化の進展にもNKT細胞が関与している可能性が十分に想定される。NKT細胞が欠損したCD1d-KOマウスではTAAによる肝星細胞活性化および肝線維化が生じ難いことは、NKT細胞が線維化進展メカニズムに対しても促進に寄与している可能性を示唆している。NKT細胞が産生するIL-4やIL-13などのサイトカインは線維化反応に促進的に作用し得ることが知られている一方、NKT細胞が産生するIFN γ はむしろ線維化に対しては抑制的に作用することから、これらのサイトカイン産生のタイミングおよびバランスにより巧妙に調節されている可能性が高い。上述の通りCD1d-KOではTAAによる肝障害自体が抑制されていることから、本実験系で線維化進展が微弱であることは当然の帰結であり、NKT細胞の線維化メカニズムに対する直接作用に関してはさらなる検討を要すると考えられた。

E. 結論

以上の検討から、脂肪性肝炎における炎症および線維化の進展にもCD1d分子および肝NKT細胞が関与していることが示唆された。従って、NKT細胞を主軸とする肝自然免疫機構がNASHに対する新たな治療ターゲットになり得ると考えられた。

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. Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, Ikejima K, Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol* 45(2): 195-203, 2010. PMID: 19760134
2. Kon K, Ikejima K, Okumura K, Arai K, Aoyama T, Watanabe S. Diabetic KK-A^y mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G329-337, 2010. PMID: 20539006
3. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, Watanabe S. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol* 2010 Nov 5. [Epub ahead of print] PMID: 21145835
4. Wang X, Ikejima K, Kon K, Arai K, Aoyama T, Okumura K, Abe W, Sato N, Watanabe S. Ursolic acid ameliorates hepatic fibrosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010 Dec 16 [Epub ahead of print]. PMID: 21168456
5. 池嶋健一, 福原京子, 渡辺純夫. 臨時増刊 NASH/NAFLD のすべて 成因から栄養療法まで NASH/NAFLD と関

連疾患 Topics 線維化の成立機構と診断法. *臨床栄養* 116(6):665-670, 2010.

6. 池嶋健一, 宮地隆史, 渡辺純夫. 特集 NASH II. 基礎的メカニズムの解明 1. NASH モデル *The Lipid* 21(3): 38-45, 2010.
7. 今一義, 池嶋健一, 渡辺純夫. 特集 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) -病態の解明と診断・治療法の確立 NASH/NAFLD の治療法 インスリン抵抗性改善薬. *Current Therapy* 28 (12): 37-42, 2010.

2. 学会発表

1. Ikejima K, Yamagata H, Ishikawa S, Arai K, Aoyama T, Kon K, Takeda K, Watanabe S. CD1d-restricted natural killer T cells modulate susceptibility to dietary-induced steatohepatitis in mice. Poster Session, The 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. April 16, 2010, Vienna, Austria.
2. Saito H, Kon K, Ishikawa S, Hosoya S, Arai K, Takashima M, Yamashina S, Ikejima K, Watanabe S. High-carbohydrate diet containing trans-fatty acid induces severe steatohepatitis via the enhancement of endoplasmic reticulum stress in KK-A^y mice. Poster Session, The 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. April 16, 2010, Vienna, Austria.
3. Hosoya S, Ikejima K, Aoyama T, Ishikawa S, Yamagata H, Kon K, Takeda K, Watanabe S. Contribution of NK and NKT cells in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. Poster Session, The 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. April 17, 2010, Vienna, Austria.
4. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H,

- Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, Watanabe S. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to thioacetamide-induced hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. Parallel Session 11: Chronic liver injury and fibrosis, The 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. April 17, 2010, Vienna, Austria.
5. Ikejima K, Piao N, Yamagata H, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Ursolic acid ameliorates dietary steatohepatitis in obese diabetic KK-A^y mice. AASLD Poster Session, Digestive Disease Week (DDW), May 2, 2010, New Orleans, LA, USA.
 6. Igusa Y, Yamashina S, Izumi K, Fukada H, Mikirai A, Inami Y, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Loss of autophagy enhances acetaminophen-induced liver injury. AASLD Poster Session, Digestive Disease Week (DDW), May 2, 2010, New Orleans, LA, USA.
 7. Ikejima K, Ishikawa S, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, Watanabe S. Contribution of CD1d-restricted natural killer T cells to xenobiotics-induced hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. Session II. Steatohepatitis-II (Oral presentation), 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, August 29, 2010, Pasadena, CA, USA.
 8. Yamagata H, Ikejima K, Ishikawa S, Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, Watanabe S. Impaired hepatic innate responses involving NKT cells in obese diabetic KK-A^y mice. Poster Session I Steatohepatitis-NASH, 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, August 29-30, 2010, Pasadena, CA, USA.
 9. Ikejima K, Piao N, Kon K, Aoyama T, Yamashina S, Takei Y, Sato N, Watanabe S. Synthetic triglyceride containing an arachidonic acid branch (8A8) minimizes endotoxin-induced liver injury. Poster Session, 2010 International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) World Congress, September 13-16, 2010, Paris, France.
 10. Yamashina S, Inami Y, Ikejima K, Watanabe S. Hepatic steatosis suppresses autophagic proteolysis. Poster Session, 2010 International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) World Congress, September 13-16, 2010, Paris, France.
 11. Ikejima K, Yamagata H, Arai K, Ishikawa S, Hosoya S, Kon K, Yamashina S, Takeda K, Watanabe S. Depletion of natural killer T cells increases the susceptibility to dietary-induced steatohepatitis in mice. Poster Session, The Liver Meeting 2010 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), November 1, 2010, Boston, MA, USA.
 12. Kon K, Ikejima K, Saito H, Ishikawa S, Hosoya S, Arai K, Okumura K, Yamashina S, Watanabe S. Trans-fatty acid induces apoptosis of hepatocytes by enhancement of oxidative stress in steatotic liver of KK-A^y mice. Poster Session, The Liver Meeting 2010 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), November 1, 2010, Boston, MA, USA.
 13. Hosoya S, Ikejima K, Aoyama T, Ishikawa S, Yamagata H, Kon K, Yamashina S,

- Takeda K, Watanabe S. Hepatic NKT and NK cells regulate liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Poster Session, The Liver Meeting 2010 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), November 3, 2010, Boston, MA, USA.
14. Fukada H, Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Loss of autophagy enhances the sensitization of Kupffer cells to endotoxin. Poster Session, The Liver Meeting 2010 (Annual Meeting of American Association for Study of Liver Diseases), November 3, 2010, Boston, MA, USA.
 15. Ikejima K, Yamagata H, Hosoya S, Ishikawa S, Aoyama T, Kon K, Yamashina S, Suzuki S, Watanabe S. Innate immunity and NAFLD/NASH. Session 4: Immunity and cytokine responses in NASH. The 9th Japan Society of Hepatology (JSH) Single Topic Conference NASH-2010, November 18, 2010, Tokyo, Japan.
 16. 池嶋健一, 山形寿文, 渡辺純夫. 肝 NKT 細胞と CD1d 分子による脂肪性肝炎の発症制御メカニズムの解析. ワークショップ 3 : NASH/NAFLD 発症のメカニズム. 第 96 回日本消化器病学会総会, 2010 年 4 月 22 日, 新潟.
 17. 石川幸子, 池嶋健一, 山形寿文, 青山友則, 今一義, 渡辺純夫. チオアセタミド誘発性肝障害における CD1d 拘束性 NKT 細胞の役割. 一般演題 (口演), 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010 年 5 月 27 日, 山形.
 18. 池嶋健一, 山形寿文, 渡辺純夫. 脂肪性肝炎発症における肝 NKT 細胞と CD1d 分子の関与. パネルディスカッション : NASH/NAFLD の病因・病態と予後. 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010 年 5 月 28 日, 山形.
 19. 今一義, 池嶋健一, 細谷聡子, 斉藤紘昭, 石川幸子, 柳沼礼子, 山科俊平, 渡辺純夫. 脂肪性肝炎の病態形成におけるトランス脂肪酸の影響と酸化ストレスの役割. ワークショップ 7, 肝病態形成における酸化ストレスの意義. 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010 年 5 月 28 日, 新潟.
 20. 米合古麗阿不都雪克, 山科俊平, 深田浩大, 井草祐樹, 今一義, 池嶋健一, 渡辺純夫. ジエチルニトロソアミン投与後肝障害におけるオートファジーの関与について. 一般演題 (口演), 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010 年 5 月 28 日, 山形.
 21. 今一義, 池嶋健一, 渡辺純夫. 非 B 非 C 原発性肝癌の腫瘍マーカーと背景疾患からみた検討. ワークショップ 4 : 慢性肝疾患からの発癌 : 背景肝疾患 (病理, 画像, 遺伝子異常を含む) からみた検討, 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW 2010), 2010 年 10 月 13 日, 横浜.
 22. 井草祐樹, 山科俊平, 今一義, 池嶋健一, 渡辺純夫. アセトアミノフェン投与後肝障害におけるオートファジーの役割の検討. 一般演題 (ポスター). 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW 2010), 2010 年 10 月 13 日, 横浜.
 23. 稲見義宏, 山科俊平, 渡辺純夫. 肝細胞内脂肪滴によるオートファジー機能障害と酸化ストレス. シンポジウム 7 : NAFLD/NASH の最近の知見. 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW2010), 2010 年 10 月 14 日, 横浜.
 24. 池嶋健一, 石川幸子, 渡辺純夫. チオ

アセタミド肝障害の病態形成における
NKT 細胞の関与. ワークショップ 12:
肝疾患における免疫病態形成と新たな
治療戦略. 第 14 回日本肝臓学会大会
(JDDW2010), 2010 年 10 月 14 日, 横
浜.

25. 福原京子, 池嶋健一, 渡辺純夫. MRI に
よる fat fraction+T2 star を用いた肝脂肪
化および鉄含有量の定量的評価. 第 38
回日本肝臓学会東部会, 2010 年 12 月 3
日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

H22 年度分担研究報告書

NAFLD 関連肝細胞癌と非 B 非 C 型肝細胞癌の比較検討

研究分担者 橋本 悦子 東京女子医科大学消化器内科教授

研究要旨: NASH を基盤とした肝細胞癌の頻度・臨床病理学的特徴を明らかにするために、当院における非 B 非 C 型肝細胞癌の年次別頻度と成因別比較検討をおこなった。1995 年以降、非 B 非 C 型肝細胞癌の割合は、11.2% / 14.7% / 20.4% / 31% と明らかに増加し、NAFLD 関連肝細胞癌も 1.3% / 2.1% / 6.8% / 6.5% 増加した。非 B 非 C 型肝細胞癌のうち、アルコール性/ NAFLD 関連/ 原因不明の 3 群の比較では、アルコール性が有意に若年で、男性が特に有意であった。NAFLD 関連では、BMI が高く DM の合併率が高率であった。原因不明群では血小板数が高く、肝硬変合併率が低かった。また原因不明群のうち女性例では、46% に肥満を認め、burn-out NASH を含んでいる可能性が指摘された。

A. 研究目的

わが国において脂肪肝 NASH (非アルコール性脂肪肝) は急増している。一方、NASH に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・特徴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関する報告が集積されてきている。

我々は、一昨年 NASH 肝硬変の予後を検討し、5 年発癌率が 11.3% であること、NASH 肝硬変の予後規定因子として HCC の発癌が重要な因子であることを報告した。昨年度は、NASH を基盤とした肝細胞癌 (HCC) の特徴を明らかにするため、C 型肝炎を基盤とした HCC と比較検討した。今回は、非 B 非 C 型 HCC・NAFLD 関連 HCC の年次推移と、非 B 非 C 型 HCC の成因別比較検討をおこない、NASH-HCC の増加の有無と臨床病理学的特徴を解明することを目的とした。さらに、原因不明肝疾患を基盤とした HCC に burn-out NASH が潜在的に存在するのか検討した。

B. 研究方法

1995 年 4 月-2009 年 3 月までに、東京女子医大消化器内科に入院して、はじめて HCC と診断された 1034 例を対象とした。HBs 抗

原陰性、HCV 抗体陰性を非 B 非 C 型 HCC とした。

まず、年次別基礎肝疾患の原因別変化を調べ、非 B 非 C 型 HCC のうち

(1) 非飲酒者 (1 日 1 合以下) で、組織または画像で肝脂肪沈着が指摘されたものを NAFLD 関連、(2) 1 日 3 合以上 5 年以上の飲酒者をアルコール性、(3) 自己免疫性、うっ血性を除いた原因不明の 3 群にわけ、その年次別変化・病態を比較検討した。

(倫理面への配慮)

今回の研究は retrospective study であり、HCC 対して一般的な治療を施行し、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

1. HCV 感染を基礎肝疾患とした HCC の割合は、1995 年 4 月-2000 年 3 月 / 2000 年 4 月-2003 年 3 月 / 2003 年 4 月-2006 年 3 月 / 2006 年 4 月-2009 年 3 月 = 76% / 73.3% / 66.4% / 57% と年代進行とともに低下していた。HBV 感染を基礎肝疾患とした HCC の割合は、12.8% / 11.9% / 13.1% / 10% と変化はなかった。非 B 非 C 型 HCC の割合は、11.2% / 14.7% / 20.4% / 31% と明らかに増加していた。その内訳では、ア

アルコール性は 6.3% / 6.4% / 9.1% / 17.4% と割合は増加し、NAFLD 関連も 1.3% / 2.1% / 6.8% / 6.5% と増加した。

2. この間の合計症例 アルコール性 HCC 85 例 / NAFLD 関連 HCC 33 例 / 原因不明 HCC 39 例の 3 群を比較した。BMI、生活習慣病に関しては NAFLD 関連 HCC で BMI が高く、DM の合併率が高率であった (表 1, 表 2)。年齢・性差は、アルコール性 HCC が有意に若年で、男性が特に高率であった。原因不明 HCC では、血小板数が高く、肝硬変合併率が低かった。また、男・女別に分けて検討すると、原因不明 HCC の女性例で、BMI 平均値 26.8 と高値で、肥満 46%、糖尿病 36%、高血圧 36%、脂質異常症 18% であった。一方、男性原因不明 HCC では、BMI 平均値 23.2、肥満 33%、糖尿病 46%、高血圧 38%、脂質異常症 0% であった。

D. 考察

肝細胞推移の年次推移では、非 B 非 C 型 HCC の占める割合が年々増加し、最新のデータでは約 30% を占めた。そのうち訳では、アルコール性、NAFLD 関連ともに増加していた。非 B 非 C 型 HCC 3 群間の比較では、アルコール性 HCC は男性が多く、年齢が比較的若年であった。NAFLD 関連 HCC は、BMI 高値で糖尿病の合併率が高率であった。原因不明 HCC は、高齢で肝機能が保たれており、過去に何らかの軽度の肝疾患が存在したが進行せず、高齢にもなつて発癌した可能性が指摘された。従って、それぞれ臨床的な特徴が異なった。

糖尿病の合併に関しては、当院のデータでは、C 型肝炎を基盤にした肝細胞癌では糖尿病合併率 26%、B 型肝炎を基盤にした肝細胞癌では 13% であった。一方、非 B 非 C 型肝細胞癌では、アルコール性肝細胞癌 61%、NAFLD 関連肝細胞癌 78.8%、原因不明肝細胞癌 43% で糖尿病の合併率が有意に高率で、糖尿病の risk factor として意義が、非 B 非 C 型肝細胞癌ではさらに大きくなるものと推定された。

なお、原因不明の肝細胞癌の女性例では、BMI 高値、肥満・糖尿病の合併率が高率で

あることから、その一部に burn-out NASH が関与している可能性が指摘された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. Hashimoto E, Tokushige K. J Gastroenterol. 2011;46 Suppl 1:63-9

2. Prospective study of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis in comparison with hepatocellular carcinoma caused by chronic hepatitis C. Tokushige K, Hashimoto E, et al. J Gastroenterol. 2010 ;45:960-7

3. Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, et al. Lab Invest. 2010;90:577-88.

4. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan.

Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, et al. Hepatol Res. 2010 ;40:135-44.

2. 学会発表

1. 橋本悦子。肥満と肝 ; NAFLD と NASH。トピックセミナーインテグ。第 28 回日本医学会 2010 年 4 月

2. 橋本悦子。Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. International Forum 2. 第 96 回消化器病学会総会総会 2010 年 4 月

3. 徳重克年、橋本悦子、白鳥敬子。NASH 合併肝細胞癌と C 型肝炎合併肝細胞癌の比較。ワークショップ 3、第 96 回消化器病学会総会、2010 年 4 月

4. 谷合麻紀子、橋本悦子、白鳥敬子。性・年齢を考慮した非アルコール性脂肪性肝疾患の危険因子。パネルディスカッション 2、第 96 回消化器病学会総会、2010 年 4 月

H. 知的財産権の出癌・登録状況
なし

表1. 3群の比較 (生活習慣病)

1) 全体

	アルコール	NAFLD関連	原因不明
年齢	64.7 ± 10.1	69.0 ± 8.9	68.0 ± 10.9
性差(男性%)	95%	64%	73%
BMI	24.1 ± 3.6	26.4 ± 4.5	24.4 ± 3.6
肥満	31%	49%	40%
糖尿病	61%	78.8%	43%
脂質異常症	11%	15%	6%
高血圧	34%	39%	37%