

表2. 3群の比較 (血液データ)

1) 全体

	アルコール	NAFLD関連	原因不明
Alb (g/dL)	3.7	3.8	3.5
T-Bil (mg/dL)	1.1	1.2	1.1
AST (IU/L)	60.9	54.9	51.9
ALT (IU/L)	42.9	50.7	37.8
γ-GTP (IU/L)	323	195	159
血小板数 (x10 ⁴ /mL)	12.7	13.4	17.3
プロトロンビン時間 (%)	83.2	83.0	86.4
肝硬変合併率 (%)	71%	64%	46%

厚生労働省科学研究費（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と慢性腎臓病

研究分担者： 安居幸一郎 京都府立医科大学・消化器内科・准教授

研究要旨：慢性腎臓病（chronic kidney disease: CKD）は末期腎臓病（透析）の危険因子であるのみならず、心血管疾患の独立した危険因子としても重要な疾患である。非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease）と CKD は共通した病態を基盤とする。すなわち両者とも糖尿病、肥満、高血圧、高脂血症などの生活習慣病を高率に合併し、メタボリック症候群と関連があり、インスリン抵抗性や酸化ストレスを発症メカニズムとする。しかし、NAFLD と CKD の関連についてはこれまでほとんど不明であった。本研究では、肝生検で病理学的に確定診断した日本人 NAFLD 患者における CKD の合併頻度と危険因子を調査した。CKD の診断基準はタンパク尿陽性または $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ が 3 カ月以上持続することとした。NAFLD 患者 174 名中 92 名（53%）が NAFLD の進行型である非アルコール性脂肪肝炎（NASH: non-alcoholic steatohepatitis）で、残りの 82 名（47%）が non-NASH NAFLD であった。NAFLD 患者 174 名中 24 名（14%）が CKD を合併していた。CKD の合併は、non-NASH NAFLD 患者では 82 名中 5 名（6%）であったのに比べて、NASH 患者では 92 名中 19 名（21%）と有意に NASH で高率であった。NAFLD 患者における CKD の合併には body mass index (BMI) 高値、高血圧、NASH が有意に関連していた。本研究は NASH 患者において CKD 合併の頻度が高いことをはじめてあきらかにした。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease）の多くは糖尿病、肥満、高脂血症など生活習慣病を背景に発症する。換言すると、NAFLD は生活習慣病、あるいはメタボリック症候群の肝臓での表現型といえる。実際、NAFLD は心血管疾患の危険因子である。

慢性腎臓病（chronic kidney disease: CKD）は末期腎臓病（透析）の危険因子であるのみならず、心血管疾患の独立した危険因子としても重要な疾患である。CKD も高血圧、糖尿病を背景に発症することが多い。また、NAFLD と CKD は共に、酸化ストレスやインスリン抵抗性を発症メカニズムとする。（図 1）

このように、NAFLD と CKD は共通した病態を基盤とすると想定されるが、両者の関連を調べた研究は少ない。最近、海外から①2 型糖尿病患者において NAFLD は CKD の独立した危険因子である (Targher et al. Am Soc Nephrology 2008; Targher et al. Diabetologia 2008)、②健康男性において NAFLD は CKD の独立した危険因子である (Chang et al. Metabolism 2008)、と報告された。しかし、それらの研究では肝生検が施行されておらず、NAFLD のうち、NASH

(non-alcoholic steatohepatitis) なのか単純性脂肪肝 (simple steatosis) なのか不明である。また、日本人についてのデータはない。

そこで本研究では、日本人の NAFLD 患者で肝生検を施行し、NASH または単純性脂肪肝の確定診断がついた症例を対象に、CKD の合併頻度を調べ、さらに CKD を合併する危険因子を解析した。

B. 研究方法

京都府立医科大学付属病院と市立奈良病院で肝生検を施行した NAFLD 患者 174 名を対象とした。年齢の中央値 (範囲) は 54 歳 (18-78)、男性 102 名 (59%)。BMI の中央値 (範囲) は 26.2 (18.6-43.4)。肥満 (BMI \geq 25) を 61%、糖尿病を 31%、高脂血症を 48%、高血圧を 34%に合併した。

なお、本研究は疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、臨床研究に関する

倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) を遵守して遂行した。また、本研究は京都府立医科大学と市立奈良病院の倫理委員会で承認されている。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

対象とした NAFLD 患者 174 名のうち、肝生検病理診断で 92 名 (53%) が NASH、残りの 82 名 (47%) が non-NASH NAFLD (単純性脂肪肝) であった。NASH 患者は non-NASH NAFLD 患者に比べて高齢で、女性が多く、BMI が高値で、高血圧の合併が多かった。(表 1)

CKD の診断基準は日本腎臓学会の診断基準に従って、タンパク尿陽性、または eGFR < 60 mL/min/1.73 m² が 3 カ月以上持続すること、とした。

全 NAFLD 患者における eGFR の中央値 (範囲) は 82.3 (46.5-161.8) で、タンパク尿を 10%に認めた。

NAFLD 患者 174 名中 24 名 (14%) に CKD を合併した。CKD の病期は、病期 1 (eGFR \geq 90) が 7 名、病期 2 (eGFR = 60-89) が 9 名、病期 3 (eGFR = 30-59) が 8 名で、病期 4 (eGFR = 15-29) および病期 5 (eGFR < 15) は 0 名であった。(表 1)

CKD の合併は、non-NASH NAFLD 患者では 82 名中 5 名 (6%) であったのに比べて、NASH 患者では 92 名中

19名(21%)と有意にNASHで高率であった。(表1)

NAFLD患者においてCKD合併と有意に関連する危険因子は、単変量解析では、NASH($P=0.007$)、BMI高値($P=0.003$)、高血圧($P=0.001$)であった(表2)。多変量解析では高血圧が独立した危険因子であった(表3)。

D. 考察

今回はじめて、肝生検で病理学的に確定診断し得た日本人NAFLD患者におけるCKD合併の実態が明らかになった。CKDは、non-NASH NAFLD患者よりもNAFLD患者でより多く認められた。

CKDは末期腎臓病(透析)のみならず心血管疾患の危険因子であり、CKDの危険因子を明らかにすることは重要である。一般的にCKDの危険因子として高血圧、糖尿病、高齢などが知られている。今回、NAFLD患者における危険因子としてNASH、BMI高値、高血圧を同定した。

NASHがCKDを高率に合併する機序は不明である。本研究は横断研究であるため、NASHとCKD発症の因果関係については考察できない。可能性として、NASHがインスリン抵抗性を増悪させる、また炎症性サイトカインや酸化ストレスを惹起することでCKDの発症を促進することは想定される。

今後、①前向き研究で、NASH・NAFLD患者におけるCKD発症の頻度と危険因子を明らかにする、②

NASHがCKD発症を促進する分子機序を解明する必要がある。また逆に、③CKD患者におけるNASH・NAFLDについてもこれまでほとんど不明であり、現在、研究を進めている。

E. 結論

肝生検で病理学的に確定診断した日本人NAFLD患者におけるCKDについて研究した。NASHでは21%と高率にCKDを合併した。CKD合併の危険因子がNASH、BMI高値、高血圧であることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T, and The Japan NASH Study Group, The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. Clin Gastroenterol Hepatol, in press.
2. Yasui K, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y,

- Kanemasa K, Matsubara H, Okanou T, Yoshikawa T. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism*, in press (PMID: 20817213).
3. Sumida Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Yoshida N, Yasui K, Itoh Y, Okanou T, Yoshikawa T. Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and glucose tolerance in non-cirrhotic patients without overt diabetes. *J Gastroenterol Hepatol*, in press (PMID: 21054524).
 4. 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, Okanou 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*, in press (PMID: 20842510).
 5. Itoh Y, Nishimura T, Hashimoto H, Yamaguchi K, Niimi T, Yokomizo C, Fujii H, Minami M, Yasui K, Mitsuyoshi H, Okanou T, Takehara T, Hiasa Y, Onji M, Yoshikawa T. Simple formula to predict response to peginterferon alpha2b and ribavirin combination therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients with high viral loads. *Hepatol Res* 41:126-132, 2011.
 6. Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanou T. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 46:101-107, 2011.
 7. Sumida Y, Yonei Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Hibino S, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Itoh Y, Naito Y, Yoshikawa T, Okanou T. Lower circulating levels of dehydroepiandrosterone, independent of insulin resistance, is an important determinant of severity of non-alcoholic steatohepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res* 40:901-910, 2010.

8. Gen Y, Yasui K, Zen Y, Zen K, Dohi O, Endo M, Tsuji K, Wakabayashi N, Itoh Y, Naito Y, Taniwaki M, Nakanuma Y, Okanoue T, Yoshikawa T. SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 202:82-93, 2010.
9. Park H, Hasegawa G, Shima T, Fukui M, Nakamura N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Kitawaki J, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. The fatty acid composition of plasma cholesteryl esters and estimated desaturase activities in patients with nonalcoholic fatty liver disease and the effect of long-term ezetimibe therapy on these levels. *Clin Chim Acta* 411:1735-1740, 2010.
10. Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, Sakamoto M, Ohkawara T, Sawa Y, Nishida K, Nishimura T, Yamaguchi K, Yasui K, Minami M, Okanoue T, Ohkawara Y, Yoshikawa T. Relapse of hepatitis C in a pegylated-interferon-alpha-2b plus ribavirin-treated sustained virological responder. *Hepatol Res* 40:654-660, 2010.
11. Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 198:118-125, 2010.
12. Takada H, Wakabayashi N, Dohi O, Yasui K, Sakakura C, Mitsufuji S, Taniwaki M, Yoshikawa T. Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) is frequently silenced by aberrant promoter hypermethylation in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 197:16-24, 2010.
13. Dohi O, Takada H, Wakabayashi N, Yasui K, Sakakura C, Mitsufuji S, Naito Y, Taniwaki M, Yoshikawa T. Epigenetic silencing of RELN in gastric cancer. *Int J Oncol* 36:85-92, 2010.
14. Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y,

Yoshikawa T, Fukui M,
Hasegawa G, Nakamura N, Ohta
M, Obayashi H, Okanoue T.
Hepatic senescence marker
protein-30 is involved in the
progression of nonalcoholic fatty
liver disease. J Gastroenterol
45:426-434, 2010.

15. Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H,
Tsuji K, Endo M, Nakajima T,
Minami M, Itoh Y, Zen Y,
Nakanuma Y, Yoshikawa T,
Okanoue T. Steatosis and
hepatic expression of genes
regulating lipid metabolism in
Japanese patients infected with
hepatitis C virus. J
Gastroenterol 45:95-104, 2010.

2. 学会発表

1. Yasui K, Sumida Y, Mori Y,
Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y,
Kanemasa K, Matsubara H,
Okanoue T, Yoshikawa T.
Nonalcoholic Steatohepatitis
And Increased Risk Of Chronic
Kidney Disease. 61th Annual
Meeting of the American
Association for the Study of
Liver Disease. 2010 Oct 30;
Boston, USA.
2. Mitsuyoshi H, Yasui K, Endo M,
Tsuji K, Minami M, Itoh Y,
Yoshikawa T, Okanoue T. Limited

Synthesis of Hepcidin Against
Iron Overload In Nonalcoholic
Fatty Liver Disease. 61th
Annual Meeting of the American
Association for the Study of
Liver Disease. 2010 Oct 30;
Boston, USA.

3. 安居幸一郎、角田圭雄、吉川敏一。
NAFLD/NAFLD：における慢性腎臓病
（CKD）（シンポジウム：
NAFLD/NAFLD の最近の知見）。第
14回日本肝臓学会大会。2010年10
月14日。横浜。

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

表1. Patient characteristics

Characteristic	Total (n = 174)	NASH (n = 92)	non-NASH (n = 82)	P
Age (y)	54 (18-78)	62 (24-78)	49 (18-78)	<0.001
Sex				0.009
Male	102 (59%)	45 (49%)	57 (70%)	
Female	72 (41%)	47 (51%)	25 (30%)	
BMI (kg/m ²)	26.2 (18.6-43.4)	26.5 (19.1-39.4)	25.2 (18.6-43.4)	0.02
Obesity	106 (61%)	61 (66%)	45 (55%)	0.16
Diabetes	53 (31%)	33 (36%)	20 (24%)	0.14
Dyslipidemia	84 (48%)	44 (48%)	40 (49%)	1.00
Hypertension	59 (34%)	39 (42%)	20 (24%)	0.02
Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	21.8 (4.6-37.3)	18.9 (4.6-35.1)	24.2 (12.3-37.3)	<0.001
AST (IU/L)	49 (10-447)	61 (10-447)	39 (16-151)	<0.001
ALT (IU/L)	77 (12-358)	79 (16-316)	75 (12-358)	0.14
γ -GTP (IU/L)	73 (19-1681)	76 (19-1681)	69 (19-568)	0.59
Albumin (g/dL)	4.6 (2.9-5.5)	4.5 (2.9-5.2)	4.8 (4.0-5.5)	<0.001
Fasting glucose (mg/dL)	102 (65-452)	103 (65-452)	99 (76-333)	0.17
Total cholesterol (mg/dL)	202 (52-344)	192 (52-288)	217 (99-344)	0.003
HDL cholesterol (mg/dL)	47 (25-79)	46 (25-79)	49 (35-77)	0.12
Triglyceride (mg/dL)	136 (35-1454)	131 (42-1454)	139 (35-410)	0.56
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	82.3 (46.5-161.8)	82.1 (46.5-161.8)	82.7 (53.8-137.9)	0.18
Proteinuria	17 (10%)	12 (13%)	5 (6%)	0.14
CKD	24 (14%)	19 (21%)	5 (6%)	0.007
Stage				0.07
1	7 (4%)	6 (7%)	1 (1%)	
2	9 (5%)	5 (5%)	4 (5%)	
3	8 (5%)	8 (9%)	0 (0%)	
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

表2. Univariate analysis of factors associated with CKD in NAFLD patients

Factor	No CKD (<i>n</i> = 150)	CKD (<i>n</i> = 24)	<i>P</i>
Age (y)	55 (18-78)	54 (31-78)	0.19
Male	89 (59%)	13 (54%)	0.66
BMI (kg/m ²)	25.6 (18.6-43.4)	28.3 (21.1-35.1)	0.003
Diabetes	42 (28%)	11 (46%)	0.10
Dyslipidemia	72 (48%)	12 (50%)	1.00
Hypertension	43 (29%)	16 (67%)	0.001
AST (IU/L)	50 (10-210)	45 (21-447)	0.82
ALT (IU/L)	78 (12-358)	65 (18-254)	0.45
γ-GTP (IU/L)	77 (19-568)	72 (29-1681)	0.87
NASH	73 (49%)	19 (79%)	0.007

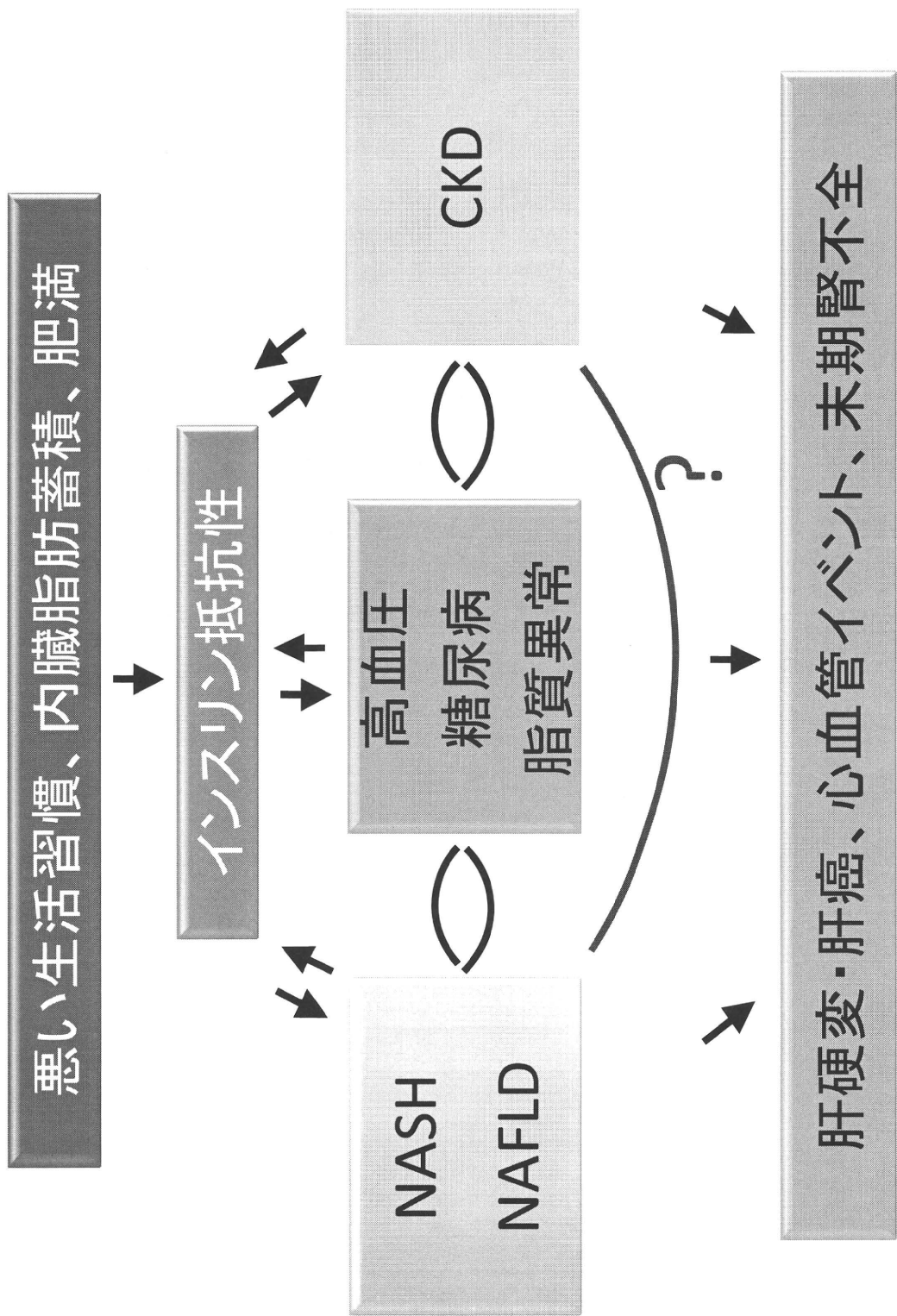
Values are median (range) or numbers (%). Where no other unit is specified, values refer to numbers of patients.

表3. Multivariate analysis of factors independently associated with CKD in NAFLD patients

Factor	Odds ratio	95% confidence interval	<i>P</i>
BMI (kg/m ²)	1.09	0.98 - 1.21	0.11
Hypertension	3.90	1.42 - 10.71	0.008
NASH	2.46	0.82 - 7.42	0.11

Data are from a total of 174 patients.

図1. 生活習慣病、NASH/NAFLDとCKD



厚生労働省科学研究費（肝炎等克服緊急対策研究事業）
H22 年度分担研究報告書

NASH 進展における p53 の意義

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 をはじめ慢性肝疾患で肝細胞の p53 発現が亢進しているという報告があるが、肝病態の進展における p53 の意義については明らかにされていない。遺伝子改変マウスを用いて肝細胞の p53 発現の肝病態におよぼす意義を明らかにすることを目的に研究を行う。肝細胞特異的な Mdm2 欠損マウスを作成したところ、マウスは正常に出生し発育したが、肝臓では p53 の下流遺伝子である p21、Noxa の発現が亢進し、肝線維化が進展した。Mdm2 欠損マウスでは軽度の ALT 上昇があり、肝細胞アポトーシスの増強を認めたが、部分肝切除後の肝再生は正常に保たれていた。肝臓の実質細胞の p53 の活性化は臓器の線維化に直結する分子イベントであることが明らかとなった。

共同研究者

小玉尚宏林 大阪大学消化器内科学

らかにされていない。本研究では p53 発現の肝病態に与える影響を動物モデルを用いて明らかにする。

A. 研究目的

p53 はゲノムの守護神と呼ばれ、遺伝子に障害が生じた際に、細胞周期の停止、DNA 修復、細胞死を誘導する分子である。多くのがんで欠失や変異が認められ、代表的ながん抑制遺伝子であると考えられている。一方、近年 p53 が心不全や代謝異常に関与することが報告されており、非腫瘍性病変における p53 の意義に注目が集まっている。慢性肝疾患においては、ウイルス性肝炎や原発性胆汁うっ滞性肝硬変をはじめ非アルコール性脂肪肝炎において p53 の実質細胞での発現亢進が報告されているが、その意義については明

B. 研究方法

アルブミン遺伝子プロモーター制御化に Cre を発現するマウスと Mdm2 遺伝子に loxP 配列を挿入したマウスの交配により肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウスを作成した。肝臓における遺伝子発現を real-time PCR、WB にて評価、肝組織を HE 染色、シリウスレッド染色、TUNEL 染色にて評価した。

C. 研究成果

肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウスはメンデルの法則に従って正常に出生した。6 週齢のマウスを犠死させ評価し

たところ、同腹対照マウスに比し、肝臓での p53 の mRNA 発現は変化がなかったが、p53 蛋白の発現は増加していた。また、p53 の転写標的である p21、Noxa の mRNA 発現は有意に亢進していた。肝臓では門脈、肝静脈周囲を中心に線維化が亢進し、コラゲン遺伝子の発現も有意に亢進していた。血清 ALT 値は軽度の上昇を認め、TUNEL 陽性肝細胞数が増加していた。BrdU 染色では肝再生に両群間に差を認めなかった。

今回作成した肝細胞特異的 Mdm2 欠損マウスでは内在性の p53 の活性化が認められ、軽度の肝障害の誘導とともに、早期から肝線維化の進展を認めた。

D. 考察と結論

肝細胞における p53 の活性化は肝臓の線維化を誘導した。p53 の活性化は DNA 障害に対して防御的な効果がある一方で、臓器の線維化を促進することが明らかとなった。

E. 研究発表

論文発表

Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Wei Li, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology 138: 2487-2498, 2010.**

Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio

K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Hayashi N. Lack of invariant natural killer cells elicits liver inflammation and predisposes to liver fibrosis in mice fed with high-fat-diet. **J Gastroenterol 45: 1247-1254, 2010**

学会発表

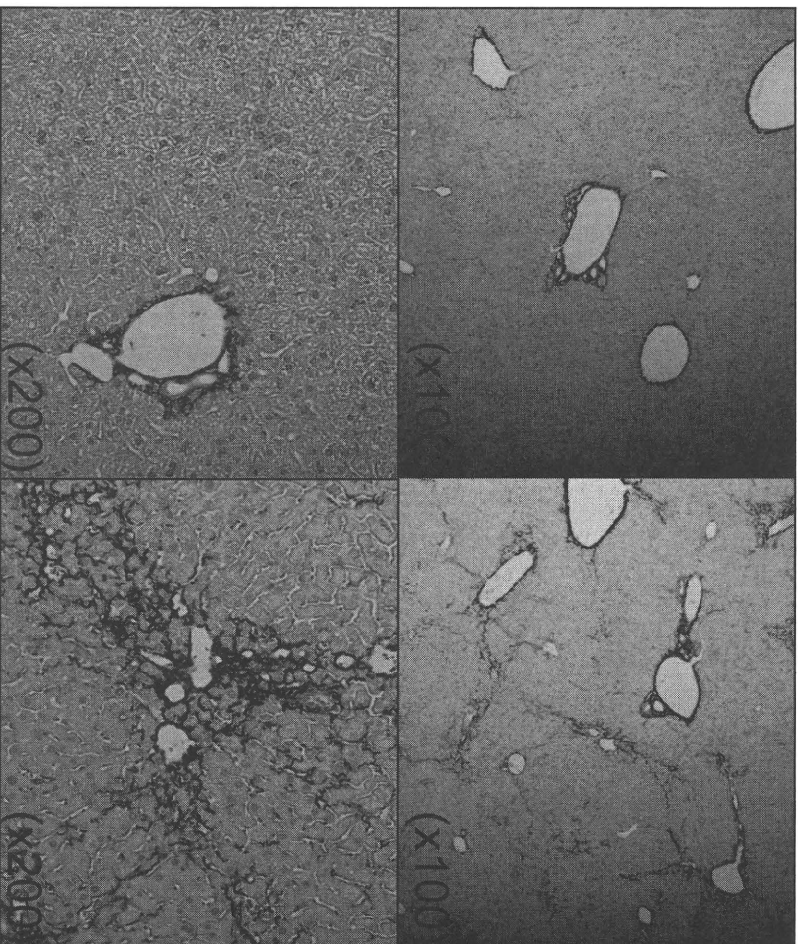
なし

F. 知的所有権の取得状況

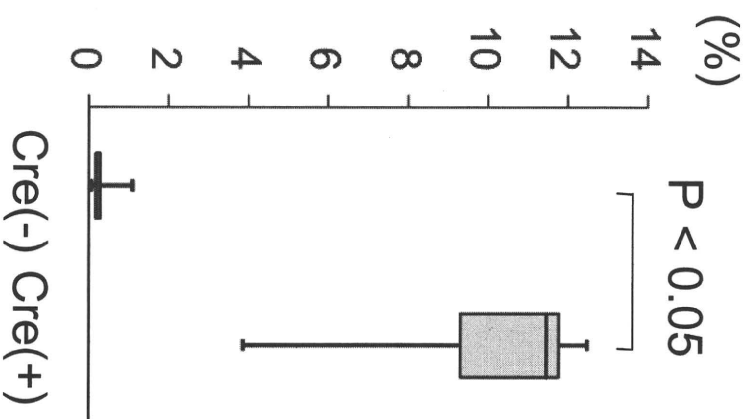
1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

肝細胞特異的Mdm2欠損マウスは 肝線維化が自然発生する

Sirius red

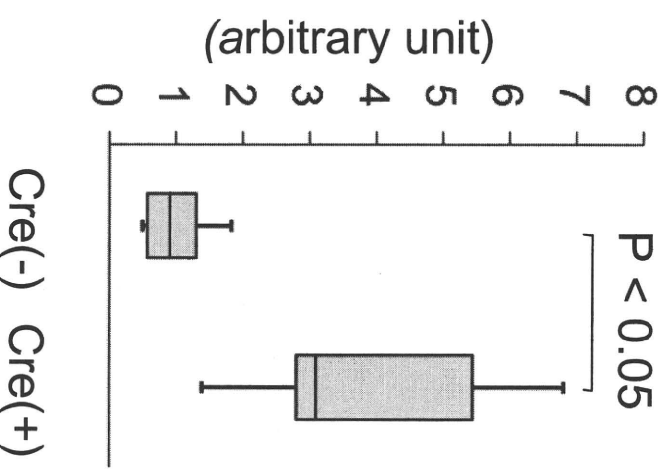


Sirius red
positive area



qRT-PCR

col1a1



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の遺伝的背景と動物モデルの開発

研究分担者 西原 利治 高知大学医学部・消化器内科・教授

研究要旨 NASHはNAFLDの中でも最も活動性の高い肝病変を有する慢性進行性肝疾患で、高率に肝硬変から肝細胞を発症する。近年の肥満人口の急増に伴い既に肝細胞癌の3～5%を占めるようになった。本症の診断には従来、肝生検が必須であったが、本研究ではNASHを非観血的に診断するために必要な臨床検査項目を明確にし、多変量解析により高い確率でNASH症例を絞り込むことを可能にした。また、ヒトNASHに酷似する病態を遺伝子改変技術を用いることなく、マウスに惹起することに成功し、NASHの発症における肝臓浸潤単球・マクロファージの役割を明らかにすることができた。その成果を元に、現在、治療法の開発を進めている。

A. 研究目的

近年、肥満人口の増加により本邦成人の4人に1人が慢性進行性の肝疾患に罹患することとなった。中でも最も重要視されているのが、ウイルス性肝疾患であり、成人の3%、肝硬変の7割、肝細胞癌の8割を占めている。また、エタノールの消費量は頭打ちとなったが、依然、アルコール性肝障害は成人の7%を占め重要な生活習慣病である。では、成人の15%が罹患する非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）はいつからどのようにして日本人の中に侵入し、根を張り、肝硬変や肝細胞癌の原因疾患として認知されることになったのであろうか。今回の研究においては、肥満がどのようにしてNAFLDという慢性進行性肝疾患を惹起するのか、インスリン感受性と脂肪酸合成という観点から病態の解明を行うと共に、肝細胞における低下した脂肪酸酸化を再活性化することにより肝病変の改善を試みたので報告する。

B. 研究方法

毎年の検診受診者を対象に肝障害を検出するために重要なASTとALTが高値を示す症例について、飲酒歴を聴取した後、肝炎ウイルスの持続感染や既知の代謝性肝疾患の有無を検索した。さらに、肝臓の線維化マーカーやアルブミン、血小板数といった慢性肝疾患の進展度を示す指標について検索し、

肝生検によりNASH/NAFLDの確定診断を行った。血液生化学検査などを用いた多変量解析により肝病変の進展度を示すマーカーを作成した。また、このような病態に対して適切な治療法を確立するために、遺伝子改変を行わずに成人のNAFLD/NASHに極めて類似する病態を示すマウスモデルを作成し、動物愛護の精神に基づいた実験法を用いてNAFLD/NASHの発症に肝臓における単球・マクロファージが果たす役割について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の前半部分はヒトを対象とした研究であるので倫理委員会の承諾を得た文書を元に、肝病変の進展度を明らかにすることが治療法の選択に重要であることを文書を見せながら説明し、病態の把握に必要な検査および治療を行うことについて文書により同意を取得した。

C. 研究結果

多変量解析により非観血的にNAFLD/NASHの進展度を評価する方法を確立すると共に（J Gastroenterology, 2010）、成人のNAFLD/NASHに極めて類似する病態を示すマウスモデルを作成した（Liver International, in press）。また、NASHの肝臓では単球・マクロファージ系の異常が存在し、肝の線維化進展に重要な役割を

果たす可能性を報告した(Gut 2010)。

D. 考察

NAFLD/NASHは肥満を誘因とする生活習慣病、あるいはメタボリックシンドロームの肝臓における表現型である。その発症にはすでに報告したように遺伝的背景の関与が強く示唆されており、肥満に伴うインスリン感受性の低下、耐糖能異常、脂質異常などの多因子の重積が重要であると考えられている。今回の検討はその根拠をより確固としたものにすると共に、今後の治療法の探索に向けて重要なツールをもたらすものであった。

E. 結論

NAFLD/NASHの有病率は、肥満人口の急速な増加に伴って、今後、倍増すると考えられている。幸い今回の研究により、治療法の探索に有用なモデル動物を得ることができ、非観血的NASH診断に向けたスクリーニング法と相まって、NAFLD/NASH治療薬の開発に弾みが付くものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben JA. Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. Gut 2010, 59:258-266.
2. Yoshioka S, Hamada A, Jobu K, Yokota J, Onogawa M, Kyotani S, Miyamura M, Saibara T, Onishi S, Nishioka Y. Effects of Eriobotrya Japonica seed extract on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. J Pharmacy and Pharmacology 2010, 62: 241-246.
3. Toda K, Hayashi Y, Saibara T. Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor type 1 exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis in aromatase knockout mice. Biochim Biophys Acta 2010, 1801: 655-664
4. Hidaka M, Iwasaki S, Matsui T, Kawakita T, Inoue Y, Sakai T, Harada N, Takemoto S, Nagakura S, Kiyokawa T, Takahashi M,

Saibara T, Onishi S Kawano F. Efficacy of bezafibrate for chronic GVHD of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation 2010, 45: 912-918.

5. 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 Sep 15.

2. 学会発表

1. Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Ochi T, Munkage K, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Iwasaki S, Saibara T. Gold-thioglucose with high fat diet provides comprehensive mice models of NASH. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Poster Vienna Austria 2010 Apr 14-18
2. Therapeutic strategy of primary and secondary NASH. The 96th Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. Symposium {NASH-Current Insights in Pathogenesis and Clinical Aspects}Niigata Japan 2010.4.22-4.24
3. 西原利治：肥満と脂肪肝，第31回日本肥満学会 教育講演，前橋，2010
4. 小野正文、岡本宣人、西原利治：遺伝子ハプロタイプから見たNASHの治療標的としてのangiotensinogen 第52回日本消化器病学会 シンポジウム7 NAFLD/NASHの最近の知見 2010/10/14 横浜

非アルコール性脂肪性肝疾患における生活習慣の病的意義に関する研究

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:生活習慣病は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の重要な原因であり、喫煙は生活習慣病の危険因子である。しかし、生活習慣病や喫煙と NAFLD の病態との関連は十分明らかになっていない。本年度は昨年度の解析を変更し、対象を 1998 年と 2008 年に人間ドックを受診し、B 型・C 型肝炎の感染がなく、1 日アルコール摂取量がエタノール換算で 20g 以下の 2029 名とした。1998 年に 1560 名が NAFLD ではなく、そのうち 266 名が 2008 年に新規に NAFLD と診断された。新規 NAFLD に寄与する因子を多変量解析すると、喫煙は NAFLD 発症の独立した危険因子であり、喫煙指数が増加すると NAFLD の発症リスクが高くなった。また、喫煙者が禁煙した場合には、禁煙後の体重増加も NAFLD 発症に関与する可能性が示唆された。一方、原因の異なる脂肪肝動物モデルを用いて、脂肪肝と肝癌の前癌病変の相違を比較検討した。今回用いた動物モデルでは、脂肪肝の程度が軽い高フルクトース食による脂肪肝の方が、脂肪肝の程度が高度の高脂肪食による脂肪肝より、肝の前癌病変と考えられる GST-P 陽性肝細胞は増加していた。すなわち、脂肪肝の程度よりは脂肪肝の原因の方が、肝発症に関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

肥満、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) といった非アルコール性かつ非ウイルス性の慢性肝疾患症例が増加してきている。NAFLD/NASH やその基本病態である高度肥満や糖尿病は肝細胞癌の重要なリスクファクターと考えられ、今後、生活習慣病を背景とした肝細胞癌症例の増加も危惧されている。しかし、NAFLD/NASH の危険因子や脂肪肝の原因の違いにより肝細胞癌発生が異なるかは十分明らかになっていない。

本研究では、人間ドック受診者において NAFLD における重要な危険因子を検討した。また、原因の異なる脂肪肝動物モデルを用いて、脂質代謝異常と糖代謝異常により誘導される脂肪肝における肝発症の相違を比較検討した。

B. 研究方法

1) 人間ドック受診者を対象とした検討

1998 年と 2008 年の人間ドック受診者を対象とした。HBs 抗原陽性、HCV 抗体陽性、ウイルスマーカー未検査者

は対象から除外した。また、質問紙調査から飲酒の有無、一日飲酒量、一か月における飲酒頻度から、日本酒換算で算出し、アルコール摂取量 21g/日以上の人間ドック受診者も対象から除外した。腹部超音波検査で脂肪肝と診断された者を FL (+) 群、脂肪肝を認めなかった者を FL (-) 群とした。

2) 動物モデルを用いた検討

SD ラットに 2 種類の食餌 [H-Fat、高フルクトース食 (H-Fruct)] を 8 週間投与しながら、DEN を 50 μ g/L の濃度で飲水中に溶解し投与した。屠殺後、血清・肝組織を採取した。GST-P 染色による肝腫瘍の評価は、Wang らの方法 (Int J Cancer 124: 540-546, 2009) に準じ、肝は左葉・右葉・中葉に分けて切片を作成し、1 つの切片でランダムに 15 視野を観察し、肝組織中の GST-P 陽性肝細胞数をカウントした。

倫理面の配慮

- a. 個人の人権の擁護：参加者のデータは、連結不可能匿名化を行い、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。
- b. 個人情報の管理：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。
- c. 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

1) ①HBs 抗原陽性者 76 例、HCV 抗体陽性者 90 例、HBV 抗原陽性かつ HCV 抗体陽性者 2 例、ウイルスマーカー未検査者 439 例は対象から除外した。また、アルコール摂取量 21g/日以上 の 729 例も対象から除外し、最終的に、2029 例を解析した。

②1998 年に non-NAFLD 群であった 1560 例のうち、2008 年に NAFLD と診断された症例は 266 例 (男性 164 例、女性 102 例) であり、non-NAFLD から NAFLD への移行頻度 (新規 NAFLD 発症頻度) は 17.1% (男性 21.2%、女性 12.9%) であった。

③NAFLD の発症に関与する因子を明らかにするために、ロジスティック回帰分析を用い、多変量解析の結果、年齢、男性、肥満、脂質異常症、喫煙が NAFLD の発症に関連していた。

④喫煙の程度と NAFLD 発症の関連について検討するために、喫煙指数 (BI) を 0 (非喫煙)、1~399、400 \leq の 3 つに区分し、多変量解析を行った。結果として、非喫煙者の AOR を 1 とした場合、BI が 1~399 の AOR, 1.773 (95% CI 1.021-3.078)、BI が 400 以上の AOR 2.086 (95% CI 1.407-3.039) であり、喫煙指数が増加するに従い、NAFLD の発症のリスクが増加した。

⑤禁煙と NAFLD 発症の関連について、1998 年以前の禁煙群、1998 年以降の新規喫煙開始群を除き、1998 年から 2008 年にかけての非喫煙持続群もしくは喫煙持続群、1988 年以降の新規禁煙群の 3 群を対象に検討した。年齢、性別、肥満、高血圧、脂質異常症、糖代謝異常、飲酒歴を補正して NAFLD 発症との関連について検討した結果、新規

禁煙群では AOR 2.733 (95% CI, 1.713-4.360)、喫煙持続群では AOR 1.474 (95% CI, 0.899-2.415) であった。また、1998～2008 年間の BMI の増加を加えて補正したところ、新規禁煙群は、喫煙持続群と比べ、オッズ比の低下が顕著で、禁煙による BMI 増加の関連が示唆された (2.908 から 1.943 vs. 2.289 から 1.905)。

2) ①飼育期間中の食餌摂取量は各群共に 30g/day/匹となるように調節したため、体重推移は各群間で差はなく、8 週間後の空腹時血糖は高フルクトース食群がコントロール食群と高脂肪食群に比べて高値で、肝重量と ALT 値は高フルクトース食群と高脂肪食群がコントロール食群より高値であった。また、脂肪肝の程度は高脂肪食群の方が高フルクトース食群よりも高度であった。②GST-P 染色による肝腫瘍の評価では、肝組織の GST-P 陽性細胞のあるスライド切片数、および GST-P 陽性切片中の GST-P 陽性細胞数は、高フルクトース食群が最も多く、次に高脂肪食群で多く、コントロール食群では GST-P 陽性細胞はごく少数であった。

D. 考察

本年度は、10 年間の 2 つの時点のいずれも人間ドックを受診した 2029 例を対象として、NAFLD の発生に寄与する因子を解析した。10 年間で NAFLD の発症は 17.1%であり年齢、男性、肥満、脂質異常症に加えて、喫煙が NAFLD 発症の危険因子であった。また、喫煙指数が増加するに従い、NAFLD 発症のリスクが増加した。生活習慣病は NAFLD の発症に関連することは、すでに報告され

ているが、本研究では喫煙は NAFLD の発症において独立した危険因子であることを示した。また、喫煙持続、1998 年以降の禁煙、非喫煙持続のみの限られた対象者での検討では、禁煙後の BMI の増加により NAFLD が発症する可能性も示した。

慢性肝疾患患者においては、喫煙と肝障害との関連が報告され、喫煙は C 型慢性肝炎や B 型慢性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、アルコール性肝疾患といった肝疾患の進行を促進する。しかし、NAFLD については喫煙との関連は十分明らかになっていない。1 年間の追跡調査では、喫煙の開始は NAFLD における ALT の上昇に関連すると報告されているが、喫煙と NAFLD の発症との関連については十分明らかになっていない。また、喫煙は NAFLD と関連しないとの報告もあるが、横断研究であり、解析対象数も十分とは言えない。本研究では、喫煙が NAFLD の発症に寄与する独立した危険因子であることを長期間の観察から初めて明らかにした。また、喫煙者における NAFLD 発症の原因の一つとして、禁煙後の BMI 増加も関与する可能性を示し、肥満などの生活習慣病の改善も念頭に置きながら禁煙指導を進めることが、NAFLD の予防や改善には重要であると考えられた。

Yan Wang らは、体重当たり 30mg/kg の DEN を SD ラットの腹腔内に投与後に、総カロリーの 71%が脂肪由来である高脂肪食 (HFD) を 6 週間投与し、肝内の GST-P 陽性肝細胞数を、総カロリーの 35%が脂肪由来であるコントロール食群の肝組織と比較している。この報告では、2 群ともに GST-P 陽性肝細胞が出現しているが、コントロール食群で

は GST-P 陽性肝細胞の集簇 (巢 ; Foci) はなく、HFD 群のみに GST-P 陽性肝細胞巢が認められている。GST-P 陽性肝細胞は前癌病変と考えられることから、高脂肪食が肝細胞癌の発症を促進させる可能性がある。我々の検討でも、高脂肪食モデルでは GST-P 陽性肝細胞の出現がコントロール食よりも多かった。しかし、フルクトース食モデルではその頻度がさらに高くなっていた。今までの疫学研究からは、NASH からの肝発癌に脂質異常が関連するかどうかは十分明らかではなく、脂質異常よりは糖代謝異常が NASH からの肝発癌に関連する可能性が高いと考えられる。また、われわれの検討から、脂肪肝の程度よりは脂肪肝の原因の方が、肝発癌に関連する可能性が示唆された。

E. 結論

NAFLD の発症には、肥満などの生活習慣病に加え、喫煙が独立した危険因子であると考えられた。また、合併する生活習慣病の違いにより NAFLD における肝発癌は異なる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hamabe A, Uto H, Imamura Y, Kusano K, Mawatari S, Kumagai K, Kure T, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. *J Gastroenterology* 2011 [in press]
- (2) Hiramane Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M,

Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and the risk of fatty liver in Japanese men. *J Gastroenterol.* 2011 [in press]

- (3) Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. *Proteome Sci* 8: 70, 2010
- (4) Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 45: 459-467, 2010
- (5) Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol Res* 40: 438-445, 2010
- (6) Takami Y, Uto H, Takeshita M, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 40: 337-45,

2010.

2. 学会発表

- (1) Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Arima S, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Liver regeneration after partial hepatectomy was more impaired in liver steatosis induced by dietary fructose than by Dietary fat. The 9th JSH Single Topic Conference "NASH 2010". 2010 Nov 18; Tokyo, Japan
- (2) Hiramane Y, Imamura Y, Uto H, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and risk of fatty liver in Japanese men. 61th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010 Nov 2; Boston, USA
- (3) Kumamoto R, Uto H, Tanoue S, Arima S, Kure T, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Dietary fructose rather than dietary fat affects liver tumor incidence by diethylnitrosamine administration in rats. 61th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010 Nov 1; Boston, USA
- (4) Hamabe A, Uto, Imamura Y, Mawatari S, Oda K, Saisyoji A, Hashiguchi M, Kure T, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Impact of cigarette smoking on the onset of nonalcoholic fatty liver disease: A 10-year longitudinal study. 61th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010 Oct 30; Boston, USA
- (5) 宇都浩文、今村也寸志、坪内博仁：喫煙は非アルコール性脂肪性肝疾患の発症に関与する。第14回日本肝臓学会大会。2010年10月14日；横浜
- (6) 隈元 亮、宇都浩文、田ノ上史郎、熊谷公太郎、岩下祐司、佐々木文郷、玉井 努、森内昭博、寄山敏男、桶谷真、井戸章雄、坪内博仁。第14回日本肝臓学会大会。2010年10月13日；横浜
- (7) 玉井 努、宇都浩文、最勝時晶子、橋口正史、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、森内昭博、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁。非B非C型肝細胞癌の臨床的特徴について。第14回日本肝臓学会大会。2010年10月13日；横浜
- (8) 馬渡誠一、宇都浩文、稲田由紀子、岩満章浩、重信秀峰、最勝寺晶子、橋口正史、呉 建、熊谷公太郎、玉井 努、森内昭博、桶谷 真、井戸章雄、坪内博仁。組織学的に診断した非アルコール性脂肪性肝疾患の背景因子の検討。第95回日本消化器病学会九州支部例会。2010年6月19日；小倉
- (9) 高見陽一郎、宇都浩文、玉井 努、最勝寺晶子、橋口正史、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、森内昭博、桶谷 真、井戸章雄、佐藤悠子、中島知明、岡上武、坪内博仁。血清 MnSOD は非アルコール性脂肪肝炎と HCV 関連慢性肝疾患