

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. Kohgo Y (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ー非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) 測定よりー. 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、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へ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

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
非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究
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に関する研究

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およびC型肝炎患者について検討した。その結果、NASHおよびC型肝炎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症例およびC型肝炎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例およびC型肝炎18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

平成20-21年度: C型肝炎におけるケトン体産生を検討したが有意に低下し、インスリン抵抗性がより強い症例でケトン体産生低下が著しかった。

平成22年度: 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。

D. 考察

NASHおよびC型肝炎患者において肝ミトコンドリアの脂肪酸β酸化能の障害はイ

ンスリン抵抗性と関連していることが示唆された。

E. 結論

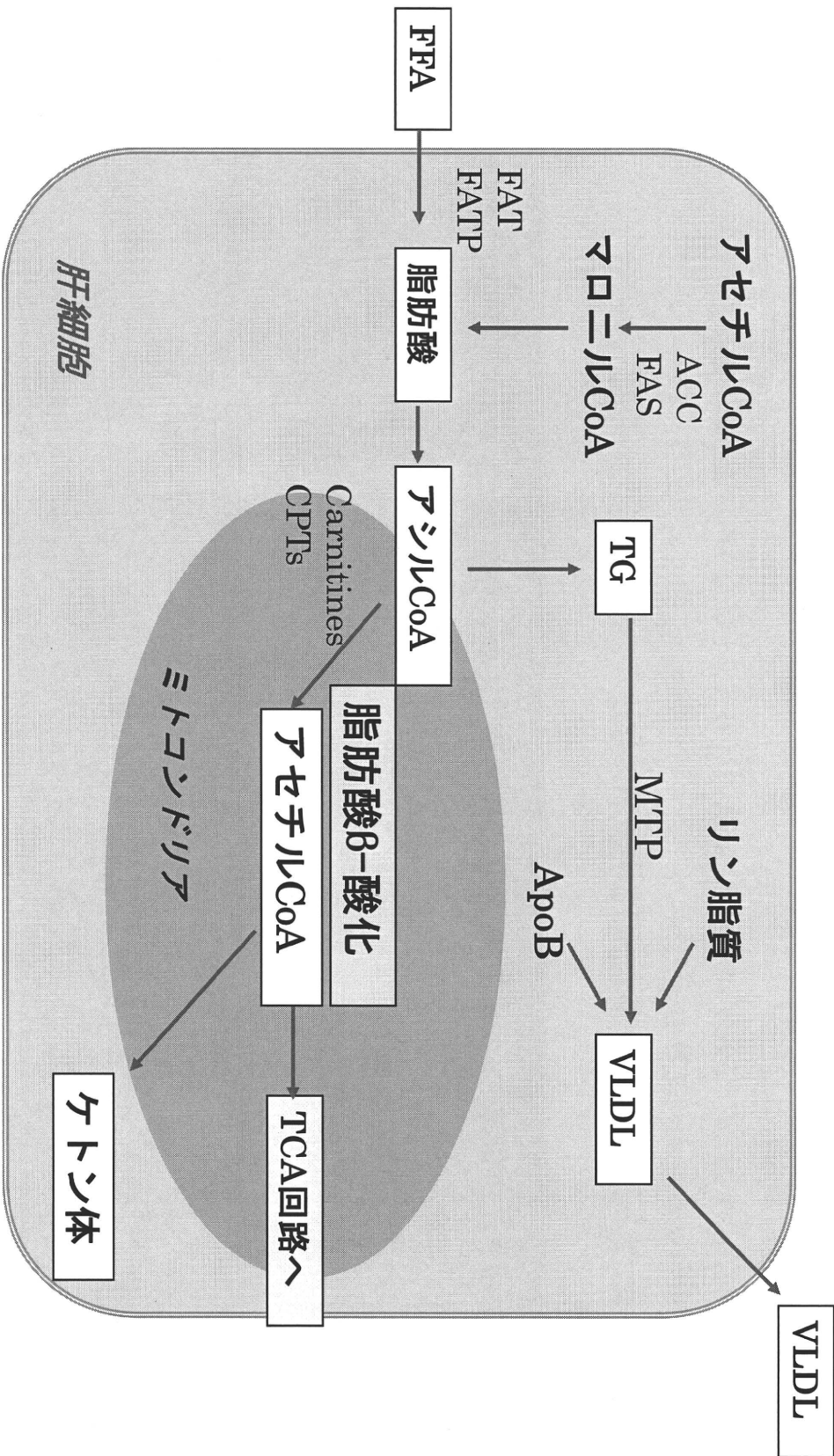
NASHおよびC型肝炎症例では肝ミトコンドリア障害が存在する。

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* 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.
4. Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Ito JI, Saito t, Kawata S.

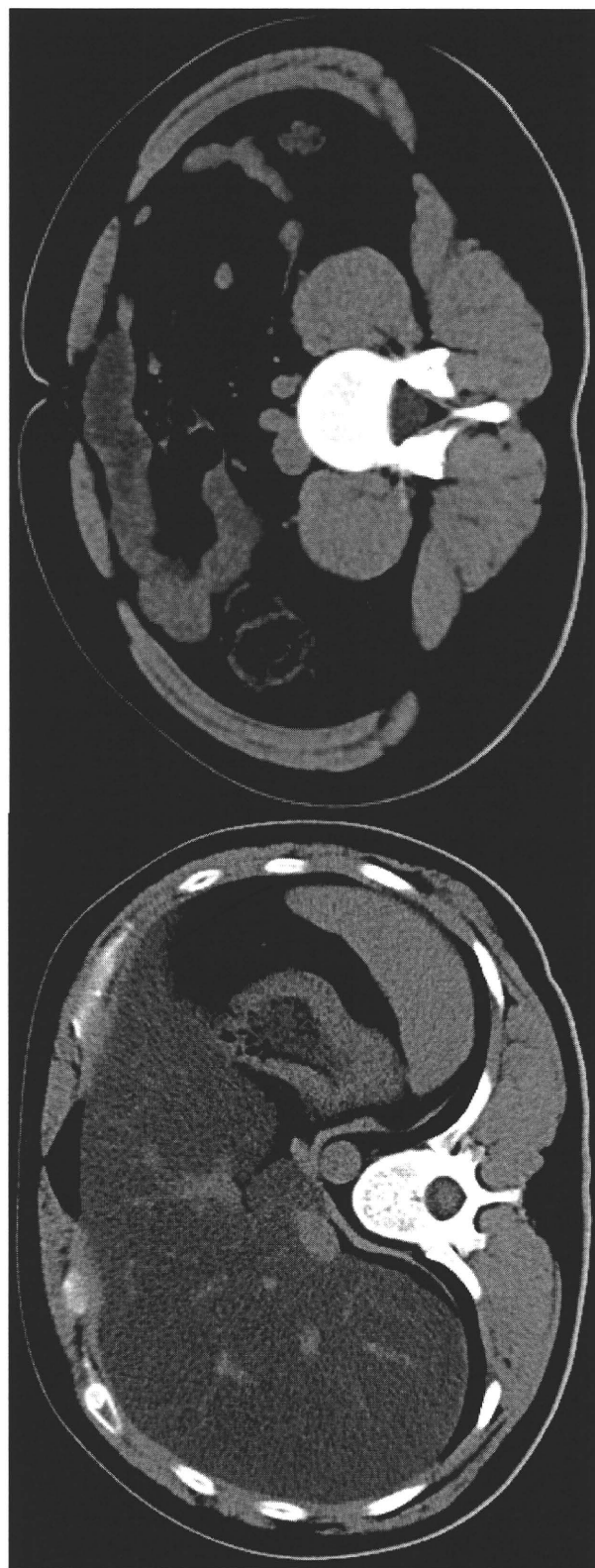
- Down-regulated of hepatic stearyl-CoA desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese fa/fa Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 44: 583-591, 2009.
5. Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S. Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. *Metabolism* 58: 1067-1075, 2009.
 6. Togashi H, Hashimoto C, Yokozawa J, Suzuki A, Sugahara K, Saito T, Yamaguchi I, Badawi H, Kainuma N, Aoyama M, Ohya H, Akatsuka T, Mizokami M, Kawata S. What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit? *J Hepatol* 49: 17-24, 2008.

肝細胞における脂肪酸代謝

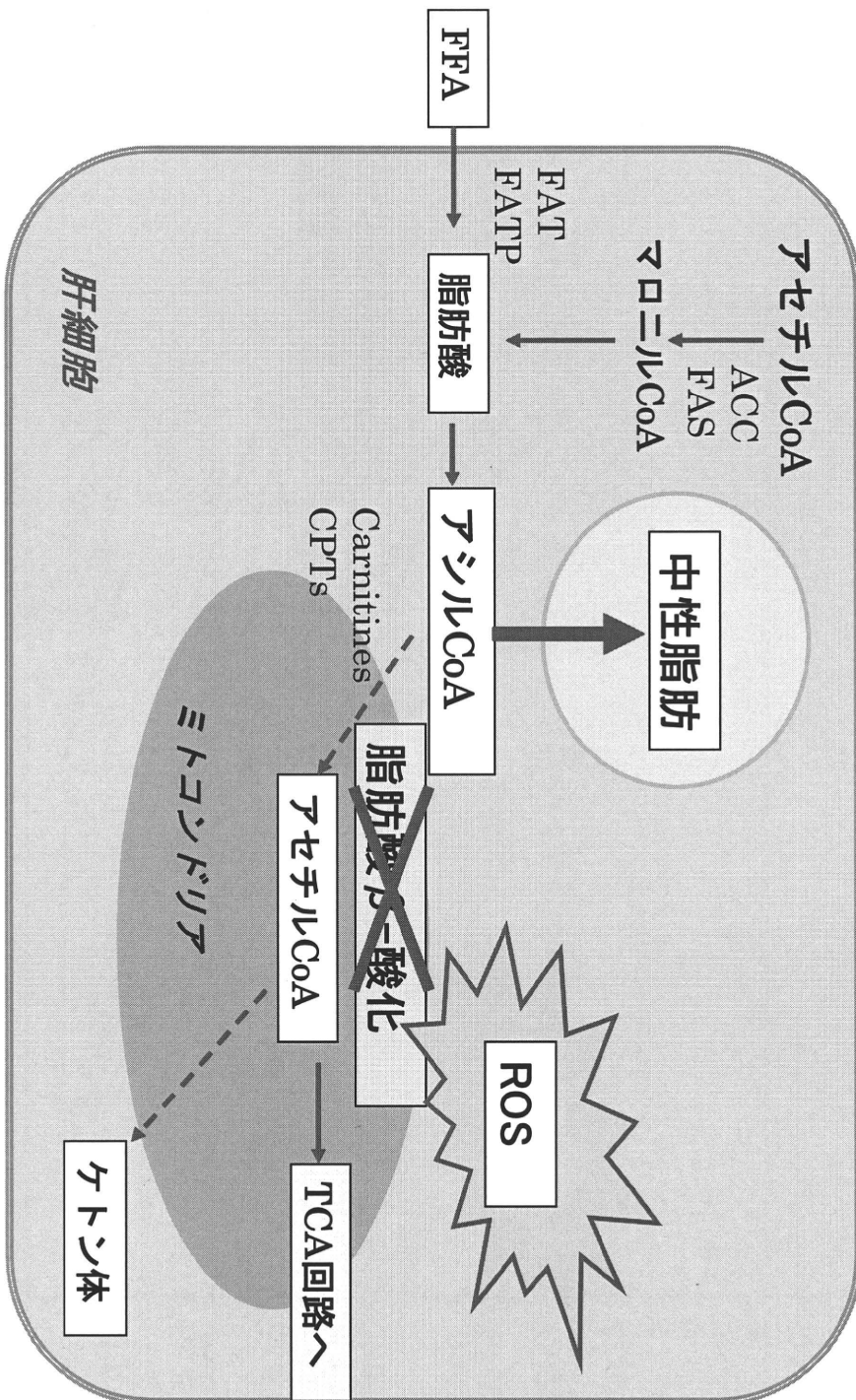


ケトン体の増加の不良なNASH症例の特徴

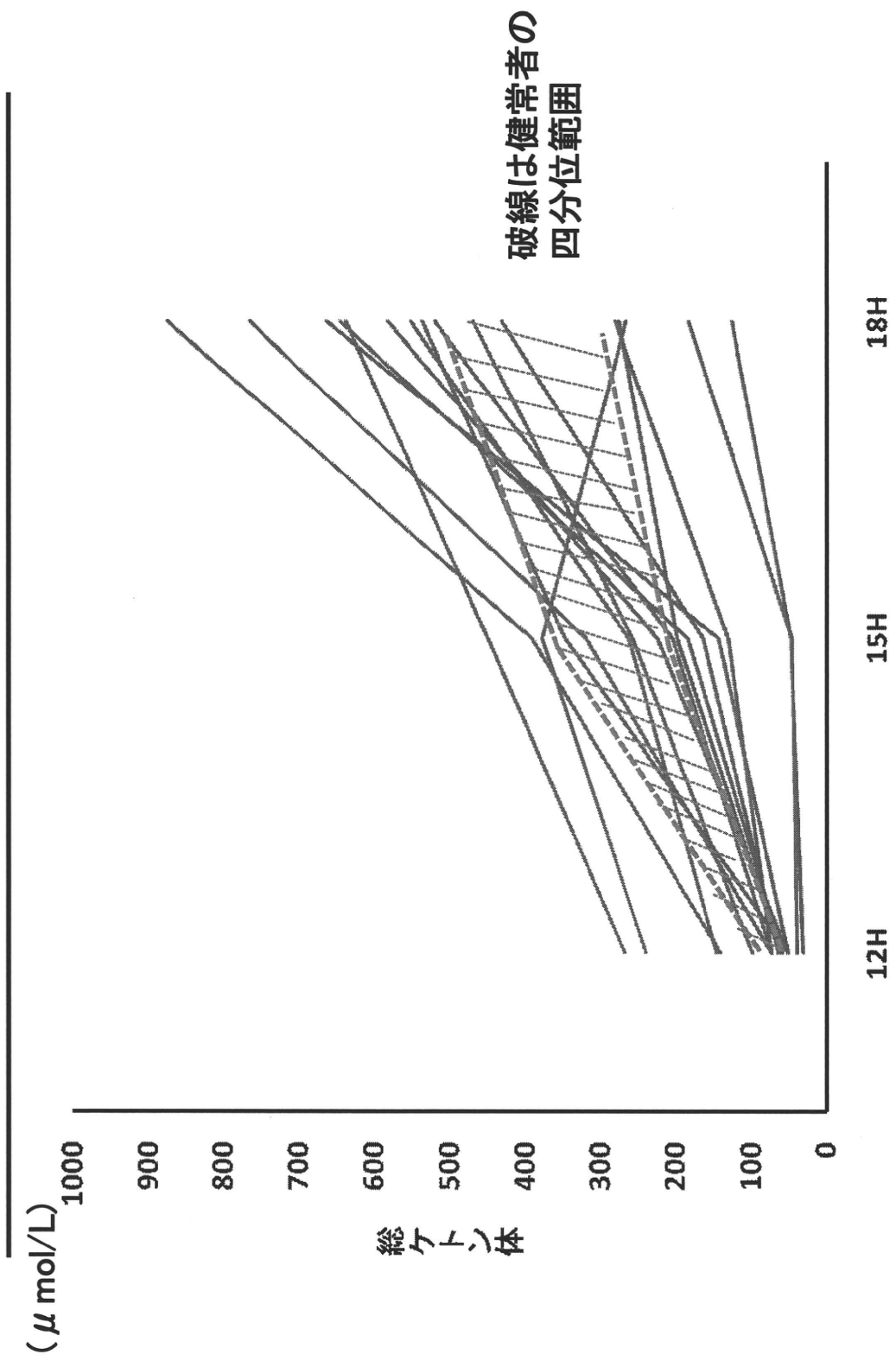
症例1: 30歳 男性、身長 180cm、体重 81kg、BMI 25、
内臓脂肪面積 210.16cm²
insulin 30.7 μ IU/mL, HOMA-IR 8.1, TG 349 mg/dl ,
adiponectin 2.9 μ g/ml
総ケトン体 31 - 47 - 125 μ mol/L



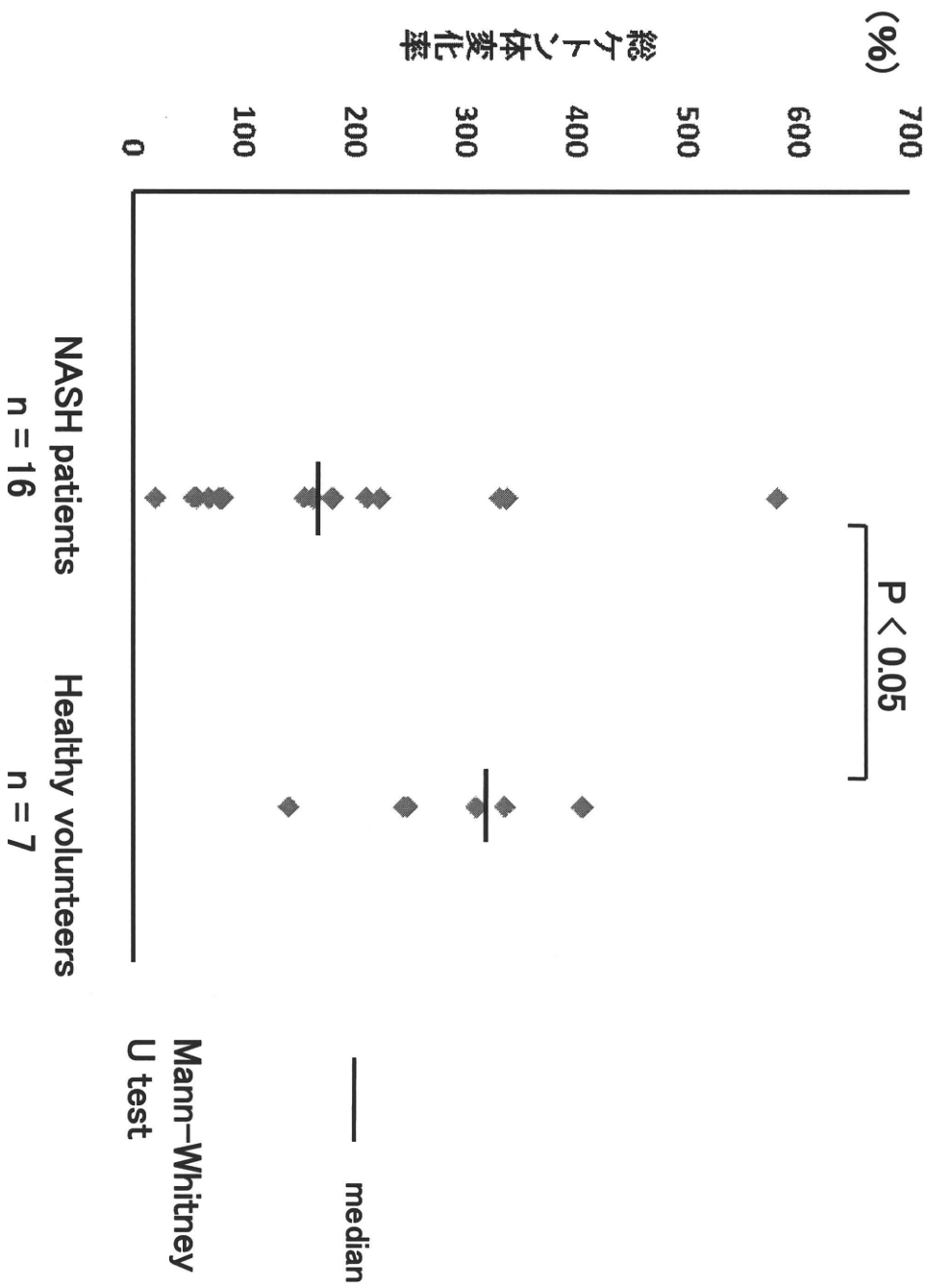
NASH患者におけるミトコンドリアβ酸化障害



NASH患者におけるケトン体産生



NASH患者における12時間から15時間の総ケトン体変化率



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）
非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究
分担研究報告書

NAFLD 脂質分析と非B非C肝障害症例における肝発癌危険因子の解析

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：肝脂肪化をきたす NAFLD は本質的に良性の病態と考えられてきており、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がなかった。最近になり、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、肝発癌の関連性が注目されている。

先ず、HCV トランスジェニックマウスと ob/ob マウスを用いて、肝脂肪化、脂質組成、脂質関連酵素発現の検討を行なった。ob/ob マウスでは著明な中性脂肪の蓄積を認め、またオレイン酸やパルミトオレイン酸などの ω -9系の不飽和脂肪酸の相対的な増加も認められ、多価不飽和脂肪酸の増加や一部脂肪関連酵素の発現は ob/ob マウスと HCV マウスでは異なった挙動を示し、病態の相違を反映していることが示唆された。

一方、NASH 関連肝癌の実態解明は十分ではない。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。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が存在した。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。さらに、慢性非B非C肝障害患者の中で肝発癌に至った症例について詳細に臨床的特徴を調べた。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、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。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肝脂肪が消失していく可能性が示唆された。

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、C型肝炎とNAFLD、NASHを比較検討し、肝病態における肝脂肪化の意義を検討する。ついで、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。さらに、慢性非B非C肝障害の中で発癌に至った症例について詳細に臨床的特徴を調べた。

B. 方法

平成20年度

HCVコア蛋白を恒常的に発現する肝脂肪化モデルマウス (HCV遺伝子 (コア、NS5A) トランスジェニックマウス) とNAFLDモデルであるob/obマウスとを対比させながら、体重、肝蓄積脂肪量、蓄積脂肪組成、脂肪酸比率、脂肪蓄積機序、等に関して検討を行なった。ともにC57/BL6をバックグラウンドとする。

脂肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。脂質代謝関連遺伝子発現に関してはリアルタイムPCR法にて定量を行なった。

平成21年度

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。

平成22年度

1991年1月から2006年12月までに東京大学医学部付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

平成20年度

1) 7週齢においてコアTgと対照C57/BL6

には体重差は無かったが (約 22g)、ob/ob マウスでは約 43g とほぼ倍であった。

2) 肝/体重比は対照の 0.053 に対して、コア Tg で 0.071、ob/ob マウスで 0.079 と有意に肝肥大を示した。

3) 肝臓中の中性脂肪 (トリグリセライド) はコア Tg で対照の 20 倍、ob/ob マウスで 30 倍と有意な蓄積を示した。

4) オレイン酸はコア Tg、ob/ob マウスともに有意な増加を示したが ob/ob マウスの方が高度であった。5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20:3(n-9)) は有意な増加がありコア Tg、ob/ob マウスで同等であった。

5) オレイン酸/ステアリン酸比はコア Tg、ob/ob マウスともに有意な増加を示したが ob/ob マウスの方が高度であった。パルミとオレイン酸/パルミチン酸比は有意な増加がありコア Tg、ob/ob マウスで同等であった。

6) ω 9 系統のアラキドン酸、 γ リノレン酸は ob/ob マウスでは減少を示した。オメガ 3 系統の EPA、DHA も ob/ob マウスでは減少を示した。

7) 脂質代謝関連酵素、転写因子 mRNA レベルは、SREBP(sterol regulatory element binding protein)-1c、FAS (fatty acid synthase)、SCD (stearoyl Co-A desaturase)、Elovl-6 とともにコア Tg、ob/ob マウスともに有意な増加を示した。SREBP-1c レベルはコア Tg、ob/ob マウスで同等であったが、他の 3 つの酵素 mRNA レベルは ob/ob マウスの方で高度であった。

平成 21 年度

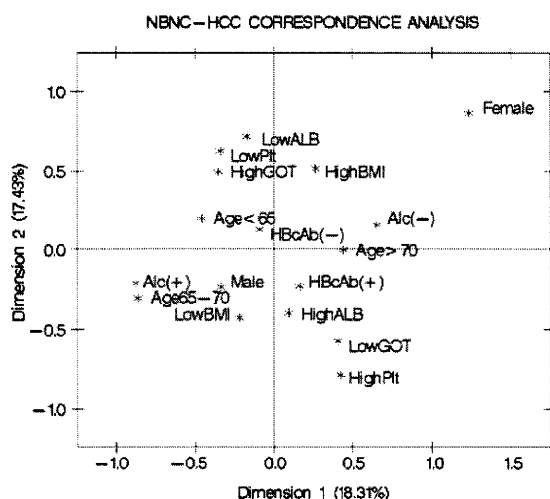
非 B 非 C 型肝癌患者 211 名の臨床背景を表 1 に示す。

(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。

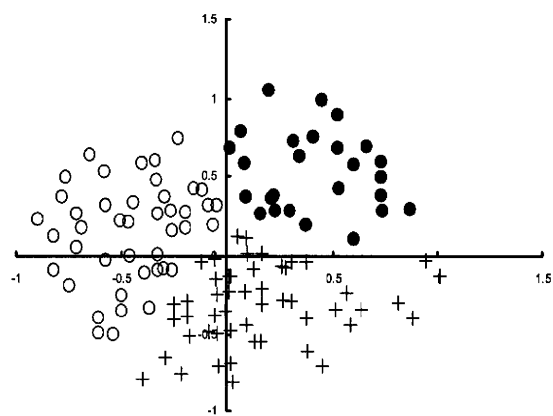
次に、対応分析で得られた各症例の座標をもとに非B非C型肝炎症例のクラスタ化を行った。症例はA (74/211、35.1%)、B (41/211、19.4%)、C (96/211、45.5%) の3クラスタに分離された。元の散布図をクラスタ別に塗り分けると図2のようになり、A (○) は左上、B (●) は右上、C (+) は右下を中心分布した。



(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)があった。BMIはB>A>Cの順であった。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)

平成22年度

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3に示す。

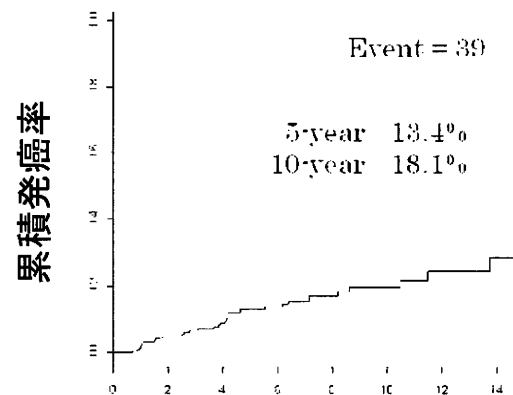
(表 3)

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 ²)-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 ⁴ /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3)。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 3)

(表 4)

	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 ²)	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 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	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

($\times 10^4/\mu\text{L}$)	1.93)	
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5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。

	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 ²)	2.65 (1.32-5.30)	0.006
飲酒量 > 50 (g/日)	2.42 (1.12-5.23)	0.025
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	0.79 (0.32-	0.60

(表5)

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- $\times 10^4/\mu\text{L}$ *		
13.5 (9.7-15.3)	10.8 (10.1-12.2)	0.11

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6)。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6)

	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

肝脂肪化、インスリン抵抗性など、C型肝炎とNASHにはいくつかの共通点がある。C型肝炎とNASHを比較してみると、C型肝炎とNASHには沢山の共通点があるが、また、相違点もある。そこに両者の病態の類似点

と違いが存在していると考えられる。本検討では、肝脂肪化、インスリン抵抗性、2型糖尿病を呈するがHCCは発生しないob/obマウスにおいてもオレイン酸の増加は著明であった。一方、PUFAについては、ob/obマウスで著減していた。今後、脂質代謝遺伝子等について更なる検討を加えて、シリアスな肝病変へと至る経路を明らかにしていく必要がある。

NASHでは酸化ストレスの発生が肝障害の発症に重要とされており、C型肝炎においてもコア蛋白の存在のみで酸化ストレスが発生し、そこへ炎症が加わることで酸化ストレスの更なる増加が起こると考えられる。また、酸化ストレス発生の原因として、両者ともミトコンドリア機能異常が想定されている点も共通点である。

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。

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

肝脂肪化、インスリン抵抗性、2 型糖尿病を呈するが HCC は発生しない ob/ob マウスにおいてもオレイン酸の増加は著明であった。一方、PUFA (poly unsaturated fatty acid) については、ob/ob マウスで著減していた。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。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可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

平成 20 年度

1. 論文発表

- 1) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
- 2) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor α in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
- 3) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with

Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.

- 4) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon α -2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258.
- 5) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S87-91.
- 6) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
- 7) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.
2. 学会発表
 - 1) Koike K: Steatosis, liver injury and hepatocarcinogenesis in HCV infection. *Hepatic Inflammation and Immunity* 2008, Galveston, 2008.
 - 2) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. p210, 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio,

2008.

- 3) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.
- 4) 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. #1071, 59TH Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.
- core protein: Analysis using mouse model and cultured cells. Am J Pathol 2009;175:1515-1524.
- 3) 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 2009;50:378-386.
- 4) 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 coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. Hepatol Res 2009;39:657-663.
- 5) 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 2009;32:141-149.
- 6) 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 2009;49:1203-1217.
- 7) 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

平成 21 年度

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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