

pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2009;284:3513-3520.

- 8) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2009;204:619-623.
- 9) Koike K. Steatosis, Liver injury and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 10) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2009;23:480-487.

2. 学会発表

- 1) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H. The HNRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. p177, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009.
- 2) K. Moriya, H. Miyoshi, S. Shinzawa, H. Fujie, Y. Shintani, T. Tsutsumi, K. Koike: Branched chain amino acids ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance in hepatitis C mouse model, p125, 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, 2009
- 3) Ohki T, Akahane M, Yamashiki N, Goto E, Enooku K, Sata T, Masuzaki R, Kondo Y, Tateishi R, Inoo S, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Ortomo K, Koike K, Omata M. A prospective randomized study to elucidate the efficacy of computed tomography with hepatic arteriography and arterial portography (CTA/P) as a pre-treatment examination among patients with small hepatocellular carcinoma: a preliminary report. #926, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 4) Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Goto E, Enooku K, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Ortomo K, Koike K, Omata M. Proposal of surveillance program for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C using comprehensive scoring system and stratum specific likelihood ratio. #1756, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 5) Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inue Y, Nishkawa T, Watanabe N, Ikeda H, Koike K, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of alpha-taxilin may reflect malignant potential of hepatocellular carcinoma. #1776, 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2009.
- 6) K Koike. Animal models in HCC research. 3rd International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA Joint Scientific Session, Kobe, 2009.
- 7) K Koike. HIV and HCV co-infection in

Japan. US-Japan Joint AIDS-Hepatitis Meeting, Portland, USA, 2009.

- 8) 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.

平成22年度

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.
- 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
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

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

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

①肥満状態においては、過栄養による脂肪沈着という 1st hit と肝臓におけるマクロファージなどの浸潤による慢性炎症反応や持続的な小胞体ストレスなどの 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、その実態は明らかではない。本研究では、これらの炎症反応やストレス応答と肝脂肪沈着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

を探究した。②2型糖尿病患者における肝機能障害の実態をデータベース化によって明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

①肥満があっても炎症が生じないマウスモデルの解析によって、マクロファージの浸潤とそれによる炎症反応が肝脂肪沈着に与える影響を解析した。②摂食と小胞体ストレスとの関連を野生型マウスを通常食で飼育する

ことで検討し、さらに高脂肪食負荷マウスや *db/db* マウスなどでの変化とインスリン抵抗性や肝脂肪沈着との関連を検討した。③また、抗糖尿病作用・抗肝脂肪沈着作用のあるアディポネクチンの肝臓におけるインスリン感受性亢進メカニズムを解析した。④東京大学医学部附属病院の糖尿病・代謝内科における入院患者を対象にして、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。

平成 20 年度

①マクロファージや他の免疫担当細胞の遊走能が阻害されている PI3K γ ノックアウトマウス(PI3K γ KO)マウスを通常食(ND)下飼育する群と、高脂肪食(HD)で飼育し肥満を誘導する群に分けて観察した。この際、同系統の野生型 B6 マウス(WT マウス)をコントロールとし、同様に ND および HD にて飼育する群を作成し、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、肝臓における中性脂肪含量、肝臓における脂肪酸合成・酸化・脂肪酸輸送に関与する遺伝子の発現などを観察し、各々の群で比較した。

平成 21 年度

① *ob/ob* マウスにおいて PI3K γ を欠損させた (*ob/ob*:PI3K γ □□)マウスを作成し、*ob/ob* マウスをコントロールとし、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、肝臓における中性脂肪含量、肝臓における脂肪酸合成・酸化・脂肪酸輸送に関与する遺伝子の発現などを観察し、各々の群で比較した。また、*ob/ob* マウスに PI3K γ KO マウスの骨髄を移植し、全身欠損と同じ表現形を示すのかを検討した。②絶食状態および摂食 6 時間後の野生型マウスの肝臓の網羅的発現解析を行った。野生型マウスおよび肥満モデルマウスを用いて、摂食による小胞体ストレスの変化を検討した。④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。

平成 22 年度

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。

C. 研究結果

平成 20 年度

PI3K γ KO マウスは、野生型マウスに比して HD 飼育下で良好な血糖値を示し、インスリン感受性が亢進していた。また、PI3K γ KO マウスでは脂肪組織のマクロファージ浸潤が有意に抑制されており、それにとまって炎症性アディポカインの発現も有意に低下していた。また、肝臓でのマクロファージマーカーの発現が低下しており、肝臓の PPAR γ の発現低下に伴い肝中性脂肪含量も著明に低下していた。

平成 21 年度

①*ob/ob*:PI3K γ マウスでは、*ob/ob* マウスに比して、血糖値が良好でインスリン感受性・耐糖能共に著明に改善していた。また、脂肪組織のマクロファージ浸潤が有意に抑制されており、それにとまって炎症性アディポカインの発現も有意に低下していた。また、肝臓での、脂肪含量も低下傾向に

あった。このような表現形は、*ob/ob* マウスに PI3K γ マウスの骨髄を移植するだけで再現された。②摂食状態で大きく増加している遺伝子に、小胞体ストレス関連遺伝子が多く認められた。その中で最も大きく変化している分子として、新規の小胞体ストレス因子 Sdf2l1 を見いだした。Sdf2l1 は、Bip の共役シャペロンとして、小胞体ストレスの軽減に貢献するものと考えられた。④525 名の糖尿病患者の臨床情報を収集し、データベースを構築した。

平成 22 年度

①PI3K 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。② Sdf2l1 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

1. PI3K γ の阻害により、インスリン抵抗性と NAFLD を抑制できる。
2. 過食による持続的小胞体ストレスが、インスリン抵抗性と肝脂肪沈着を促進する。
3. 一過性の生理的 IL-6 の誘導は、インスリン感受性を改善する。

F. 研究発表

平成 20 年度

1. 論文発表

- 1) Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K and Kadowaki T. Dynamic Functional Relay between Insulin Receptor Substrate 1 and 2 in Hepatic Insulin Signaling during Fasting and Feeding. *Cell Metab* 8:49-64, 2008
- 2) Yano W, Kubota N, Itoh S, Kubota T, Awazawa M, Moroi M, Sugi K, Takamoto I, Ogata H, Tokuyama K, Noda T, Terauchi Y, Ueki K and Kadowaki T. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J* 55:515-522, 2008

2. 学会発表

- 1) 植木浩二郎、栗澤元晴、窪田直人、山内敏正、門脇孝。メタボリックシンドロームの分子メカニズムーインスリン抵抗性の視点からー。第 45 回日本臨床分子医学会 (July 24 2008)

平成 21 年度

1. 論文発表

- 1) Awazawa M, Ueki K, Inabe K,

- Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, Bardeesy N, Ohnishi S, Nagai R and Kadowaki T. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 382:51-56, 2009
- 2) Hashimoto H, Arai T, Mori A, Kawai K, Hikishima K, Ohnishi Y, Eto T, Ito M, Hioki K, Suzuki R, Ohsugi M, Saito M, Ueyama Y, Okano H, Yamauchi T, Kubota N, Ueki K, Tobe K, Tamaoki N, Kadowaki T and Kosaka K. Reconsideration of insulin signals induced by improved laboratory animal diets, Japanese and American diets, in IRS-2 deficient mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117:577-586, 2009
- 3) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T and Nagai R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914-920, 2009
- 4) Takazawa T, Yamauchi T, Tsuchida A, Takata M, Hada Y, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Ueki K and Kadowaki T. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone increases expression of very low density lipoprotein receptor gene in adipocytes. *J Biol Chem* 284:30049-30057, 2009
- 5) Watanabe T, Kubota N, Ohsugi M, Kubota T, Takamoto I, Iwabu M, Awazawa M, Katsuyama H, Hasegawa C, Tokuyama K, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Noda T, Nagai R, Terauchi Y, Tobe K, Ueki K and Kadowaki T. Rimonabant Ameliorates Insulin Resistance via both Adiponectin-dependent and Adiponectin-independent Pathways. *J Biol Chem* 284:1803-1812, 2009
- 6) Park SW, Zhou Y, Lee J, Lu A, Sun C, Chung J, Ueki K and Ozcan U. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nat Med* 16:429-437, 2010
- 7) Winnay JN, Boucher J, Mori MA, Ueki K and Kahn CR. A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response. *Nat*

Med 16:438-445, 2010

2. 学会発表

- 1) 植木浩二郎、小林直樹、門脇孝。
肥満糖尿病におけるClass 1B PI3
キナーゼの役割。シンポジウム
12：脂肪細胞の炎症と肥満発症
第82回日本内分泌学会学術総会
(April 23 2009)
- 2) 植木浩二郎、小林直樹、門脇孝。
Class 1B PI3キナーゼ制御による
肥満糖尿病治療の可能性の検討。
シンポジウム2:インスリン抵抗性
と炎症～アディポサイエンスの臨
床応用の視点から～ 第52回日本
糖尿病学会年次学術集会 (May
22 2009)
- 3) 植木浩二郎。 Class 1B PI3キナー
ゼ制御による肥満糖尿病治療の可
能性の検討。シンポジウム5:肥満
脂肪組織の新しい病態と臨床応用
第30回日本肥満学会 (October 9
2009)
- 4) 植木浩二郎。Class 1B PI3キナーゼ
制御による肥満糖尿病治療の可能
性の検討。シンポジウム:イノシ
トールリン脂質研究の新展開 第
82回日本生化学会大会 (October
21 2009)

平成22年度

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

第31回日本肥満学会 (October 1 2010)

G. 知的所有権の取得状況
今回の研究内容については特になし。

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

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

NBNC および NASH 由来肝癌の発癌機構の解析

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。手術で得られた切除標本の臨床病理学的、分子生物学的知見と当該患者の臨床情報を総合的に解析した。その結果、NBNC 由来肝癌患者は生活習慣病関連因子の保有率が高いこと、ことに NASH 由来患者にその傾向が高いことが示された。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。

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、その発癌機構一端を明らかにすることを目的とする。

B.研究方法

[平成 20 年度]

HBV, HCV, NBNC, NASH 由来肝癌患者の臨床病理学的解析をとくに生活習慣病関連因子、酸化ストレスとの関わりについて検討した。

[平成 21 年度-22 年度]

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影

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。

C.研究結果

[平成 20 年度]

2000 年-2009 年に切除した肝癌患者 291 名の臨床的解析を行った。HBV, HCV, NBNC 由来肝癌患者は各々、48 名 (16.5%)、162 名 (55.7%)、79 名 (27.1%) であった。病理学的に NASH と診断された患者は 5 名 (約 7%) であった。年齢は NASH 患者が最も高齢であった。最も特徴的なことは糖尿病、高血圧、高脂血症の併存率が HBV, HCV, NBNC, NASH の順に高くなることであった。8 OH d G に

よる免疫染色では NASH 肝癌の非癌部肝組織がもっとも染色性が高い傾向があった。

[平成 21 年度-22 年度]

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

HBV 由来肝癌より HCV 由来肝癌、そして HCV 由来肝癌より NBNC 由来肝癌がいわゆる生活習慣病の併存率の高い傾向のあることが示された。さらに NASH 由来肝癌患者は症例数が少ないものの、生活習慣病の併存率は最高であった。また、NASH 由来肝癌ではその非癌部肝組織が他に比べて強く酸化ストレスを受けている可能性が示唆された。このような知見は非ウイルス性肝癌の発生、進展に生活習慣病の関与や酸化ストレスの影響があることを示唆するものである。そしてこの発癌に関与する分子機構に dbpA 遺伝子がかかわっており、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。

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。

F. 研究発表

平成 20 年度 (2008)

1. 論文発表

- 1) Takamatsu S, Noguchi N, kudo A, Nakamura N, Kawamura T, Teramoto K, Igari T, Arii S. Influence of risk factors for metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease on the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2008;55:609-614.

2. 学会発表

- 1) Saito M, Iijima H, Yoshikawa S, Aizawa N, Nishiguchi S, Kudo A, Arii S. The mechanism of decrease in ultrasound contrast enhancement during kupffer phase in NASH patients-study using NASH rat model. AASLD 2008: The 59th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases, San Francisco, America, 2008.10.31-11.4
- 2) 吉川昌平, 飯島尋子, 斉藤正紀, 西口修平, 中西憲司, 工藤 篤, 有井滋樹, 市之瀬志津子, 和氣健二郎. NASH ラットモデル (MCDD ラット) におけるクッパー細胞の貪食能の検討. 第 22 回肝類洞壁細胞研究会, 2008.11.29

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 野口典男, 吉武健一郎, アディクスナ
ラマ, 工藤 篤, 黒川敏昭, 中村典明,
田中真二, 有井滋樹. 非 B 非 C 型肝細胞
癌における生活習慣病, 非アルコール
性脂肪性肝炎との関連性と切除成
績への影響. 第 109 回日本外科学会定
期学術集会, 福岡, 2009.4.2.
- 2) 伊藤浩次, 平沼 進, 田中真二, 有井
滋樹. 非 B 非 C 型肝細胞癌切除症例の
検討. 第 95 回日本消化器病学会総会,
札幌, 2009.5.9.
- 3) 野口典男, 田中真二, 有井滋樹. 非 B
非 C 肝癌切除例における, 生活習慣
病, NASH との関連性と切除成績の
検討. 第 45 回日本肝臓学会総会, 神戸,
2009.6.4.
- 4) 吉川昌平, 飯島尋子, 石井昭生, 坂井
良行, 会澤信弘, 山本晃久, 岩田恵典,
榎本平之, 田中弘教, 今西宏安, 下村
莊治, 中村秀次, 西口修平, 工藤 篤,
有井滋樹, 和氣健二郎. NASH ラット
モデル (MCDD ラット) におけるク
ッパー細胞の貪食能の検討. 第 45 回日
本肝臓学会総会, 神戸, 2009.6.4.
- 5) アディクリスナ ラマ, 野口典男, 吉
武健一郎, 光法雄介, 村形綾乃, 松村
聡, 藍原有弘, 入江 工, 工藤 篤,
中村典明, 田中真二, 有井滋樹. 切除
症例から見た非 B 非 C、NASH 由来
肝癌と生活習慣病との関連. 第 45 回日
本肝臓研究会, 福岡, 2009.7.4.

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.
Hepato 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)

G. 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。

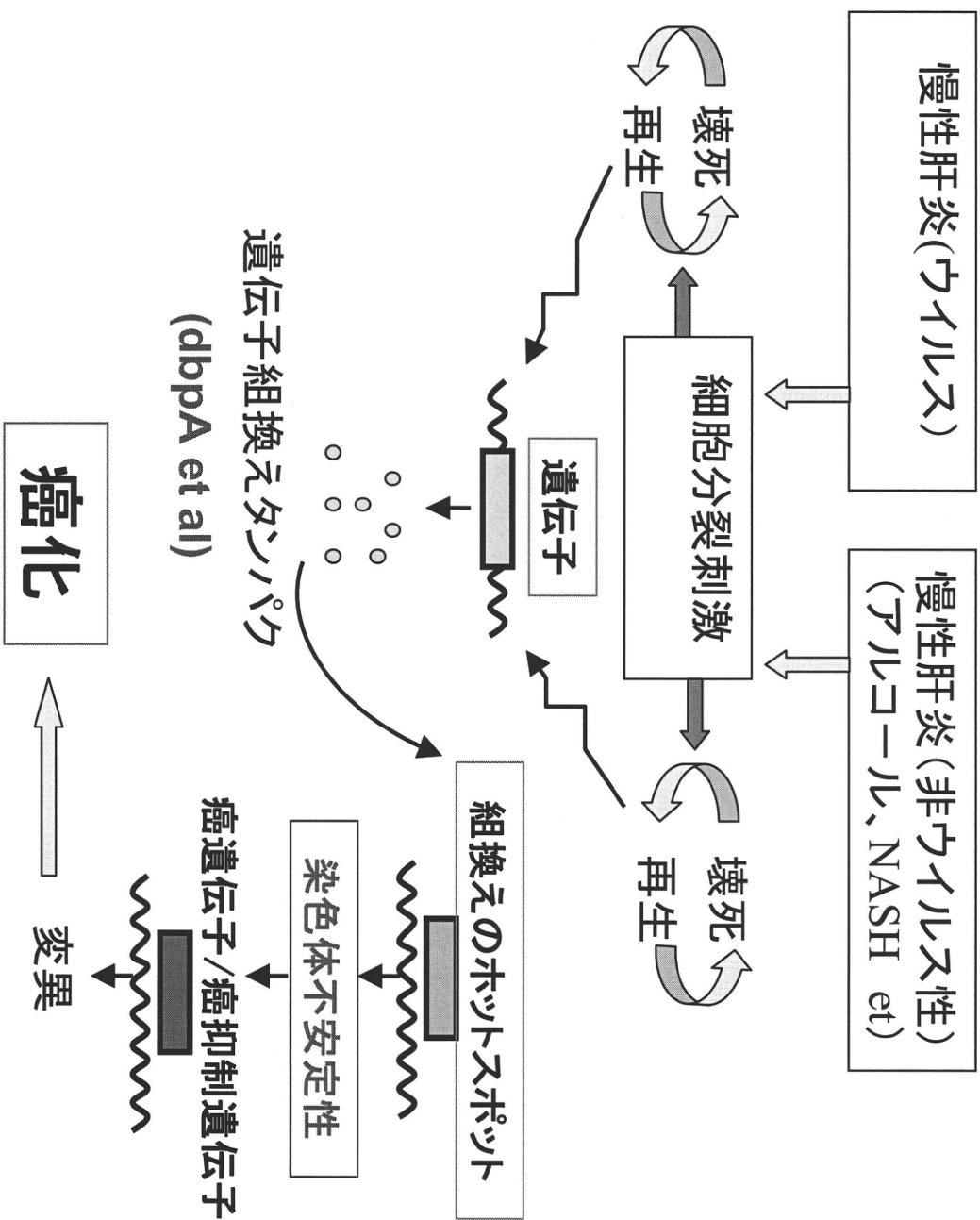
平成 22 年度 (2010)

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,

研究仮説：高癌化状態におけるdbpA過剰発現が染色体不安定性を引き起こす

仮説

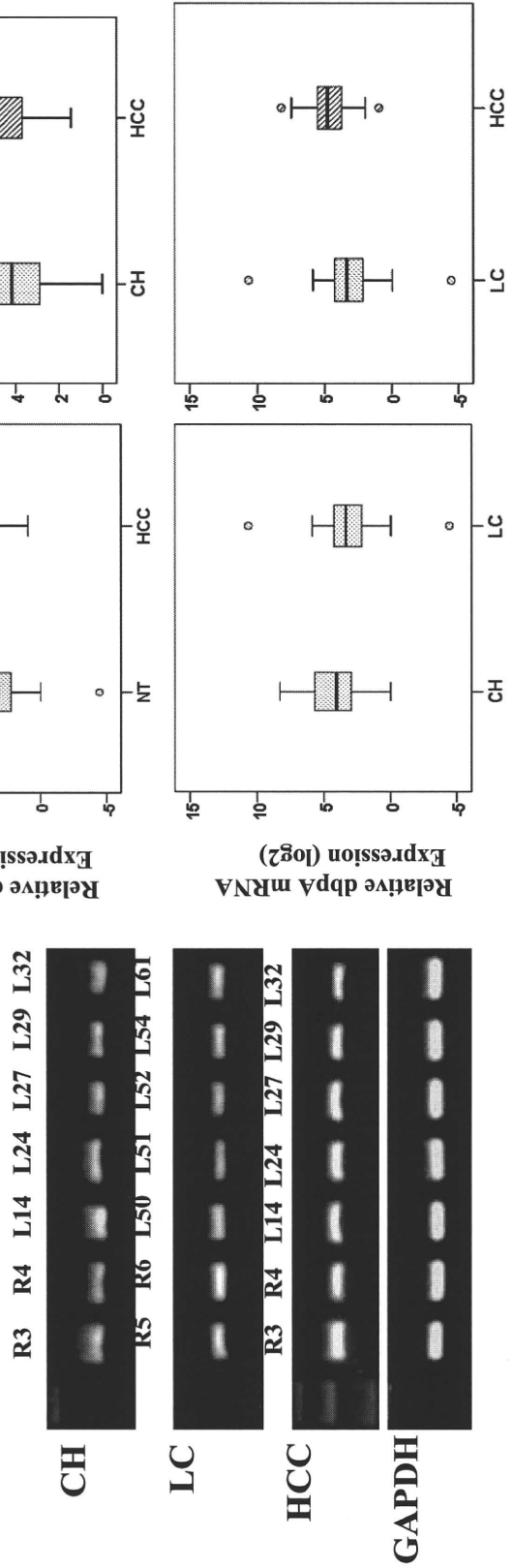


**dbpA mRNAが肝細胞癌においては高発現をしめす
Transcriptional Profile of dbpA Gene in Hepatocellular
Carcinoma and Non Cancerous Adjacent Liver Specimens**

Number of Cases	Significance	mRNA of dbpA Mean±SD (Non Cancer)	mRNA of dbpA Mean±SD (Cancer)	Relative expression Mean±SD	FC	P value
61 vs. 61**	NT vs. HCC	3.62±2.61	5.09±2.09	1.47±2.63	2.77	<0.001
35 vs. 35**	CH vs. HCC	4.18±2.52	5.56±2.19	1.38±2.68	2.60	0.012
22 vs. 22**	LC vs. HCC	3.36±2.72	4.79±1.66	1.43±2.49	2.69	0.013

*:Mann-Whitney U test

**Result of Wilcoxon signed rank test



dbpA mRNAが非癌部及び癌組織ではNASH由来症例においては高発現を示唆した

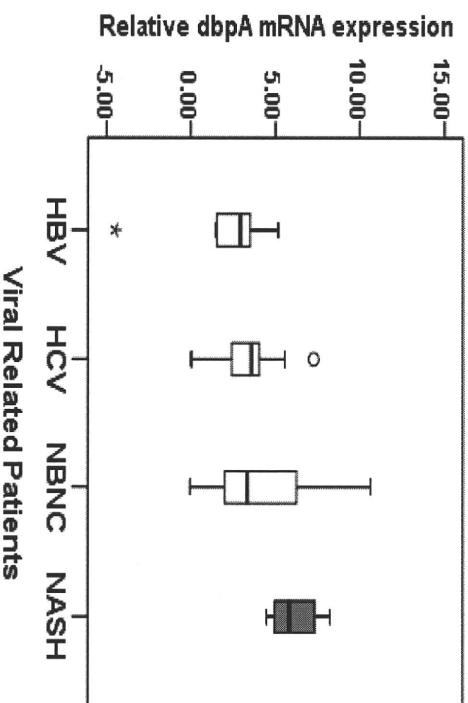
Transcriptional Profile of dbpA Gene in Hepatocellular Carcinoma and Adjacent Non-Cancerous Specimens According to With and Without Viral infection and Nonalcoholic Steatohepatitis Status

Viral status	Number of patients	mRNA of dbpA (NT)		P value	mRNA of dbpA (HCC)		P value
		Mean±SD			Mean±SD		
HBV	7	2.94±3.11		0.043**	4.12±1.15	0.043**	
HCV	20	3.60±1.56			4.79±1.85		
NBNC	29	3.35±2.88			5.59±2.22		
NASH	5	5.86±1.60		6.33±2.06			
NASH	5	5.86±1.60	0.151	6.33±2.06	0.206		
NBNC	29	3.35±2.88		5.59±2.22			
NASH	5	5.86±1.60	0.012*	6.33±2.06	0.012*		
HBV	7	2.94±3.11		4.12±1.15	0.042*		
NASH	5	5.86±1.60	0.003*	6.33±2.06			
HCV	20	3.60±1.56		4.79±1.85	0.097		
HBV	7	2.94±3.11	0.293	4.12±1.15			
HCV	20	3.60±1.56		4.79±1.85	0.037*		
HBV	7	2.94±3.11	0.053	4.12±1.15			
Virus(+)	27	3.36±2.11		4.46±1.75			
Virus(-)	34	4.73±2.80		5.62±2.22			

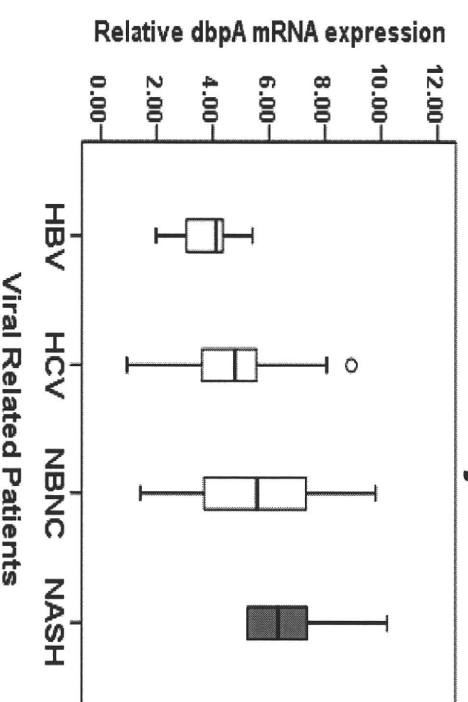
* Mann-Whitney U test (two-tail)

** Result of Kruskal Wallis H-test

Non Cancerous Subject



Cancer Subject



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

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

分担研究者 渡辺 純夫 順天堂大学医学部・消化器内科・教授
共同研究者 池嶋 健一 順天堂大学医学部 消化器内科学

研究要旨：非アルコール性脂肪性肝炎（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注目されている。本研究で私たちは、メタボリックシンドロームモデル動物である KK-A^y マウスで部分肝切除後の肝再生不全がみられることおよび、肝 NKT 細胞の減少と機能低下が認められることを見出した。さらに、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）マウスでは、チオアセタミド（TAA）肝線維化が著明に抑制されることを明らかにした。以上の結果より、脂肪性肝炎の発症および肝線維化の進展過程では、NKT 細胞を主軸とした自然免疫系細胞が、肝内サイトカイン発現調節などを介して病態形成に極めて重要な役割を演じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

本邦においても近年メタボリックシンドロームの概念が急速に普及し、それに伴う肝病態としての非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の重要性が広く認識されるようになってきている。私たちはこれまでメタボリックシンドロームのモデル動物である KK-A^y マウスを用いて非アルコール性の脂肪性肝炎の病態解析を行ってきた。その過程で、同マウスではアルコール負荷およびメチオニン・コリン欠乏（MCD）食負荷による脂肪性肝炎の進展がより顕著であることおよび、その背景に低アディポネクチン血症を主体としたアディポカインの発

現バランスの異常が認められることを報告してきた。そこで本研究ではメタボリックシンドロームに伴う脂肪性肝障害の増悪メカニズムをより明らかにする目的で、1. KK-A^y マウスに 70%部分肝切除した際の肝再生機転の変化についての解析および、2. KK-A^y マウスの肝内リンパ球分画の量的および機能的発現に関する検討を行った。本研究の過程で、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が判明したが、肝の炎症・線維化のプロセスにおける NKT 細胞の機能的役割については不明の点も多い。そこで最

終年度には、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追加検討を行った。

B. 研究方法

平成 20 年度

8 週齢の雄性 KK-A^y マウス (日本クレア) とコントロール (C57Bl/6) マウスに対し、エーテル麻酔下に Higgins & Anderson の定法に従って 70% 肝切除を施術した。術後 48 時間にわたり生存率を観察すると共に、経時的に屠殺して血清および肝組織サンプルを採取した。一部の動物は屠殺の 2 時間前に BrdU を腹腔内投与し、肝組織への BrdU 摂取を検討した。採取した肝組織の一部はホルマリン固定し、パラフィン包埋切片を作成して、BrdU および PCNA を免疫染色により評価した。また、血清アディポカイン濃度を ELISA 法で、肝組織中の各種サイトカインおよび増殖因子 mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で、cyclin D1 発現および STAT3 リン酸化を Western blot 法でそれぞれ検討した。

平成 21 年度

生後 7 週齢の雄性 KK-A^y マウスおよび C57Bl/6 マウス (日本クレアから購入) を 1 週間順化後、実験に供した。各系統のマウスをそれぞれ 2 群に分け、高脂肪食 (HFD32; 日本クレア社製) ないしコントロール食 (CE-2) を 4 週

間自由摂取させた。各々のマウスに α -galactosylceramide (GalCer, 100 μ g/kg BW) を腹腔内投与し、経時的に血清および肝組織を採取した。肝組織像は H-E 染色標本で検討し、肝組織中の顆粒球およびマクロファージの局在はエステラーゼ染色キット (Sigma Diagnostics 社製) を用いて評価した。

肝組織内リンパ球は 30% Percoll 液を用いた比重遠心法で単離した。単離したリンパ球に抗 CD3 ϵ モノクローナル抗体 (145-2C111) と抗 NK1.1 抗体 (PK136) モノクローナル抗体 (PharMingen 社製) を加え、FACS Calibur (Becton Dickinson 社製) にて NKT 細胞分画 (抗 CD3 ϵ 抗体、抗 NK1.1 抗体二重陽性分画) を測定した。

また、肝組織中の NKT 細胞由来サイトカイン mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で検討した。

平成 22 年度

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 (初期 1 週間は 0.1mg/g BW、2 週以降は 0.2mg/g BW, 和光純薬工業) を単回もしくは 9 週間に渡り週 3 回腹腔内投与した。肝組織像は HE 染色、エステラーゼ染色および Sirius Red 染色を行い評価した。また、肝組織中の α SMA 発現を免疫染色および Western blot 法で解析し、各種サイトカインおよびマトリックス関連分子の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で検討した。

C. 研究結果

平成 20 年度

メタボリックシンドロームモデル KK-A^y マウスにおける肝再生機転の異常に関する解析

メタボリックシンドロームモデル動物である KK-A^y マウスを用いて、部分肝切除後の肝再生機転の異常について検討した。KK-A^y マウスに 70% 肝切除を行うと 48 時間後の時点で肝細胞核への BrdU 摂取が殆ど認められず、cyclin D1 発現誘導もほぼ完全に抑制されており、極度の肝再生不全状態にあることが明らかになった。KK-A^y マウスでは、高レプチン血症および低アディポネクチン血症が存在すると共に、肝切除後の肝組織中 TNF- α mRNA 誘導および STAT-3 リン酸化が著明に亢進しており、これらのアディポカイン発現バランスの異常に伴うシグナル伝達の変調が再生不全のメカニズムに深く寄与していると考えられた。また、メタボリックシンドロームに伴う脂肪性肝炎の病態形成には肝再生不全が重要な役割を演じている可能性が示唆された。

平成 21 年度

メタボリックシンドロームモデル KK-A^y マウスにおける肝内 NKT 細胞分画の異常に関する解析

8 週齢の KK-A^y マウスは肝内 NKT 細胞分画が C57Bl/6 マウスの約 1/3 に低下しており、 α -galactosylceramide (GalCer, 100 μ g/kg) を腹腔内投与

した際の IL-4・IFN- γ mRNA 誘導も著明に抑制された。KK-A^y に高脂肪食を 4 週間摂食させた際には顕著な脂肪性肝炎を呈すると共に、NKT 細胞は 8.3% に低下し、GalCer による IL-4 と IFN- γ の誘導も一層減弱した。KK-A^y にピオグリタゾン (25mg/kg) を経胃管的に 5 日間投与すると NKT 細胞分画は有意に上昇し、GalCer による IL-4・IFN- γ mRNA 誘導も有意に増加した。高脂肪食負荷後の KK-A^y にピオグリタゾンを投与すると脂肪性肝炎は著明に改善し、肝 NKT 細胞の低下も有意に改善した。以上の検討より、肝内 NKT 細胞の減少と機能変化が脂肪性肝炎の進展に寄与しており、ピオグリタゾンは肝内自然免疫系の機能調節を介して脂肪性肝炎の病態改善効果を発揮する可能性が示唆された。

平成 22 年度

肝 NKT 細胞が脂肪性肝炎発症感受性および肝線維化進展に及ぼす影響に関する検討

肝 NKT 細胞が脂肪性肝炎の発症および線維化進展に及ぼす影響をより詳細に明らかにする目的で、NKT 細胞が全身性に枯渇している CD1d ノックアウト (KO) マウスを用いて、高脂肪食負荷時の脂肪性肝炎発症感受性およびチオアセタミド (TAA) 誘発肝線維化について検証した。CD1d-KO マウスは 4 週間の高脂肪食負荷で WT マウスと比較し脂肪肝および炎症性細胞浸潤がより高度に生