

201320011A

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

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの 病態解明及び治療法の開発等に関する研究

(H24-肝炎-一般-006)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **小池和彦**

東京大学医学部消化器内科学 教授

平成26(2014)年3月

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

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び
治療法の開発等に関する研究

(H24 ー肝炎ー一般ー 006)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小池 和彦
東京大学医学部消化器内科 教授

平成 26 (2014) 年 3 月

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

「C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究」班

平成25年度 班の構成

- 小池 和彦 東京大学医学部消化器内科学・教授
- 岡上 武 大阪府済生会吹田病院・院長
- 西原 利治 高知大学教育研究部医療学系医学部門臨床医学系消化器内科・教授
- 橋本 悦子 東京女子医科大学消化器内科・教授
- 田中 真二 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授
- 植木浩二郎 東京大学医学部糖尿病・代謝内科・准教授
- 芥田 憲夫 虎の門病院肝臓センター・医長
- 川口 巧 久留米大学医学部消化器疾患情報講座・講師
- 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野・教授
- 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授
- 森屋 恭爾 東京大学医学部感染制御学・教授
- 建石 良介 東京大学医学部消化器内科学・特任講師

目 次

I. 総括研究報告

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び
治療法の開発等に関する研究

小池 和彦 1

II. 分担研究報告

1. C型肝炎の病態・進展に及ぼす PNPLA3 遺伝子多型 26

岡上 武

2. 肝発癌における PPAR- α の役割に関する研究 32

西原 利治

3. 非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝細胞癌に関する
病理組織学的検討 36

橋本 悦子

4. HCV および NASH による代謝パスウェイ異常と
肝細胞癌の関連解析研究 42

田中 真二

5. インスリン抵抗性と NASH 病態の分子機構の解明に関する研究 46

植木浩二郎

6. C型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響 49

芥田 憲夫

7. 非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルにおける消化管ホルモンと
肝脂肪酸組成に関する研究 53

川口 巧

8. アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に關与する.....	60
松浦 善治	
9. C 型肝炎ウイルス感染培養系による C 型肝炎關連肝がんと 代謝因子に關する研究	63
勝二 郁夫	
10. 胆汁酸による代謝變化に關する研究	67
森屋 恭爾	
11. 我が国における非 B 非 C 肝癌の背景因子の検討 (共同研究).....	70
建石 良介	
III. 研究成果に關連した刊行物 (總説抜粋)	73

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

総括研究報告書

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び 治療法の開発等に関する研究

研究代表者 小池 和彦

東京大学消化器内科学 教授

研究要旨

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、現在でもなお年間 3 万 4 千人が肝癌で死亡している。C 型、B 型肝炎に関連した肝癌が多くを占めるが、最近では、C 型、B 型肝炎ともに陰性である『非 B 非 C 型肝癌』の増加傾向が見られ、対策確立が急務である。非 B 非 C 型肝癌の中では、アルコール性肝硬変 (ASH) 合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 合併肝癌の増加が著しい。また、糖尿病患者では肝癌が多いが、高リスク患者は不明である。アルコール摂取量からは ASH と NASH のどちらにも属さない非 B 非 C 型肝癌の存在と増加も大きな問題である (非 ASH 非 NASH 非 B 非 C 型肝癌)。また、C 型肝炎関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子であることが示されてきている。そこで、C 型肝炎、NASH、非 ASH 非 NASH の非 B 非 C 型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌 (Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御を試みた。具体的には、1) C 型肝炎肝発癌における代謝因子の重要性の解明と肝発癌抑制法の確立、2) NASH の実態解明、病態解析と肝発癌抑制法の確立、3) NASH、ASH の診断基準を満たさない非 ASH 非 NASH 非 B 非 C 型肝癌の実態解明、病態解析、高リスク群の設定、4) 糖尿病患者に発生する肝癌の病態解明と高リスク群の設定、を中心として臨床と基礎の両面からの検討を開始した。班全体研究として、日本における非 B 非 C 型肝癌の実態調査を行なった。固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない 2,166 例を対象に 16 の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行い、非 B 非 C 型肝癌は 5 つのカテゴリーに分別できた。近年の増加はカテゴリー 1 (高齢中等度飲酒男性)、5 (非飲酒メタボリック男性) によるものであった。すなわち、従来考えられてきた「高度飲酒」群や「NASH」とは異なったカテゴリーの、より一般的といえる「軽度肥満、軽度〜中等度飲酒」の男性が肝癌のリスクに曝されていることが初めて明らかとなった。

研究分担者 (所属施設名・職名)

岡上 武 (大阪府済生会吹田病院・院長)	学総合研究科・准教授)
西原利治 (高知大学教育研究部医療学系医学部門臨床医学系消化器内科・教授)	植木浩二郎 (東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科・准教授)
橋本悦子 (東京女子医科大学消化器内科・教授)	芥田憲夫 (虎の門病院肝臓センター・医長)
田中真二 (東京医科歯科大学 大学院医歯	川口 巧 (久留米大学医学部消化器疾患情報講座・講師)

松浦善治（大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野・教授）

勝二郁夫（神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授）

森屋恭爾（東京大学医学部感染制御学・教授）

建石良介（東京大学医学部消化器内科・特任講師）

A.研究目的

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、なお年間3万4千人が死亡する。C型、B型肝炎に関連した癌が多くを占めるが、両者陰性の「非B非C型肝炎」の増加傾向があり対策確立が急務である。非B非C型肝炎の中では、アルコール性肝硬変(ASH)合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）合併肝癌の増加が著しい(Yasui, 2011)。糖尿病では肝癌が多いが高リスク患者は不明である。飲酒量ではASHとNASHのどちらにも属さない非B非C型肝炎の増加も問題である（非ASH非NASH非B非C型肝炎）。一方、C型関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子である(Koike K, 2010)。そこで、C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝炎疾患に関連する肝癌を、代謝関連肝癌(Metabolism-associated liver cancer, MALC)として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御を試みる。具体

的には、1) C型肝炎における代謝因子解明と発癌抑制法確立、2) NASHの実態解明、病態解析と発癌抑制法確立、3) 非ASH非NASH非B非C型肝炎の実態解明、病態解析、高リスク群の設定、4) 糖尿病に発生する肝癌の病態解明と高リスク群設定、を臨床と基礎の両面から検討を行なう。

研究代表者小池は、H23年度まで『肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究』班でウイルス肝炎における代謝性変化の発生機序と肝発癌に対する影響を検討した。その結果、C型肝炎では、インスリン抵抗性や肝脂肪化が慢性肝炎進行を促進することを明らかにした。一方、小池が分担研究者であった『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』班（H20～H22年度、研究代表者岡上武）では、日本にNASHが多く存在し、肝癌の原因であることを明らかにした。これらの先駆的な研究班の成果を受けて、本研究班においてはC型肝炎肝発癌における代謝要因の解析、NASHの病態解析、非ASH非NASH非B非C型肝炎の解析を行ない、これらの肝癌発生の抑制を図る。

B.方法

1) 対象は済生会吹田病院と京都府立医科大学消化器内科で肝生検を施行したC型肝炎414例で、TaqMan PCRでPNPLA3のrs738409のSNPを解析し、403例(97.3%)でrs738409の遺伝子型(SNP)を解析しえた。解析対象の内訳は肝機能持続正常HCV carrier (PNALT) 36例、慢性肝炎273例、肝硬変27例、肝癌67例

である。肝細胞への脂肪蓄積の程度は1%以下、1~10%, 11~33%, 34%以上の4群に分け、線維化の程度は F0 (線維化なし), F1 (線維化軽度), F2 (線維化中等度), F3 (小葉改築傾向あり), F4 (肝硬変) に分類した。(岡上 武)

- 2) 蓄積した脂肪酸は転写因子である PPAR- α の内因性 ligand であることから、PPAR- α の慢性的活性化をもたらす、肝細胞は常時高濃度のフリーラジカルに曝されることになる。実際、PPAR- α の ligand を長期間投与すると、マウスのみならずヒトでも肝細胞の癌化が促進 (promotion) されることが知られている。そこで、今回、我々は PPAR- α の慢性的活性化が脂肪肝に伴う肝障害、ことに NASH の発症に重要な働きをし、肝線維化の進行、さらには肝発癌の促進に繋がるのではないかと想定し、ヒト遺伝性 NASH のモデル動物 (4 型メラノコルチン受容体遺伝子 KO マウス:MC4RKO) と MC4R/PPAR- α double KO マウスを用いて、我々の仮説を検証したので報告する。雄性 MC4RKO と MC4R/PPAR- α double KO マウス各群 10 匹を高脂肪食で 12 ヶ月間飼育し、肝臓への炎症性細胞浸潤や線維化、肝発癌の有無を比較検討した。(西原利治)
- 3) 1990 年から 2013 年までに当科で経験した NAFLD 677 (男 58%) 例中、HCC を合併し癌部および非癌部肝組織を採取した NAFLD-HCC 34 例 (肝切除 30 例、RFA 時針生検 2 例、剖検 2 例) NAFLD-HCC と同時期に経験し年齢・性別・組織採取方法をマッチさせた

HCV-HCC34 例を臨床病理学的に比較検討した。HCC の主腫瘍径・肉眼分類・分化度は 34 例で、組織型は肝切除例 30 例で評価した。SH-HCC に関しては、癌部の steatosis, Ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis いずれも中等度以上の所見を 3 項目以上認めるものと定義し、各所見の出現率を検討した。免疫組織学的検討は肝切除した 30 例で、早期 HCC 関連マーカー (HSP70, Glypican3, CD34)、肝前駆細胞マーカー (CK7,CK19)、癌幹細胞自己増殖促進因子 Nanog、細胞分化・増殖抑制因子 (リン酸化・非リン酸化 LKB1)、酸化 DNA 傷害マーカー 8-OHdG に関して、癌部での染色性を評価した。統計は、数値は Mann-Whitney U 検定、比率はカイ 2 乗検定で解析し、P 値 0.05 未満を有意差ありとした。(橋本悦子)

- 4) 肝癌切除検体の癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析から、肥満度や糖尿病歴などの代謝関連臨床因子のクラスタ解析を行い、さらに遺伝子機能 (gene ontology) 解析を行って代謝関連肝癌に特異的な遺伝子パスウェイを同定し、代謝関連肝癌の発癌及び再発リスクに対する臨床病理学的、分子生物学的意義を検証する。2000 年から 2012 年までに当科で初回肝切除を施行した肝癌 555 例を対象として、背景肝疾患別に代謝関連因子などの臨床病理学因子の検討を行った。また当教室にて保有する 153 例の肝癌切除検体の癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析結果を、肥満度や糖尿病歴などの代謝関連臨床因子でクラスタ解析を

行い、発現と相関のある遺伝子を抽出する。続いて遺伝子機能(gene ontology)解析を行って遺伝子パスウェイ異常を同定し、代謝関連肝癌特異的な臨床病理学的因子との相関を解明する。(田中真二)

5) ①常法により Sdf2l1 flox マウスを樹立した。これにアデノウイルスによって Cre リコンビナーゼを発現させることによって、肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスを作成した。LacZ アデノウイルスを投与したマウスをコントロールとして、肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスの糖代謝・肝臓での ER ストレス・脂肪蓄積などを検討した。②消化器内科入院中の患者において、OGTT、肝生検を施行し、生検サンプルにおいて ER ストレス関連遺伝子の発現を解析した。(植木浩二郎)

6) (検討1) IFN 関連療法施行後に SVR に至った 2,660 例を対象として代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討した。代謝要因からは総コレステロール・HDL コレステロール・LDL コレステロール・中性脂肪・Body mass index、宿主要因からは IL28B 遺伝子多型、ウイルス要因からは HCV-1b Core アミノ酸置換を含む 15 個の因子を検討項目として多変量解析を施行した。(検討2) HCV-1b Core aa70 Mutant 定量系(Q-Invader assay 法, BML) (Invader 法)を用いて抗ウイルス効果、肝発癌への影響を検討した。抗ウイルス効果に関しては HCV-1b・高ウイルス量の前治療無効 72 例を対象に、Telaprevir/PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果を評価した。更に、肝発癌に関し

ては RNA 持続陽性の連続 44 例を対象に、発癌前後の aa70 Mutant 頻度の経時変化を評価した。(芥田憲夫)

7) 本研究の目的は、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 が NASH マウスモデルの肝障害と肝組織中の脂肪酸組成におよぼす影響を検討することである。

実験動物:NASH は 6 週齢の糖尿病モデルマウス (db/db mouse) をメチオニン・コリン欠乏食で飼育することにより誘導した。

プロトコール:NASH モデルマウスに対し、exendin-4 (n = 4) (20 µg/kg; AnaSpec Inc. Fremont, CA) もしくは生食 (n = 4) を腹腔内に 8 週間連日投与した。14 週目で屠殺し、摘出した肝臓をホルマリン固定もしくは、液体窒素にて凍結した。ホルマリン固定した肝臓は、hematoxylin-eosin 染色および Sudan IV 染色により、それぞれ nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score と肝組織中の中性脂肪含量を評価した。

脂肪酸分画:凍結肝組織より chloroform-methanol を用いて総脂肪酸を抽出し、ガスクロマトグラフィーにより 24 の脂肪酸を測定した。脂肪酸分類:脂肪酸分画の結果より脂肪酸を分類した。

(川口 巧)

8) 人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を導入した細胞をクローニングし、ApoB あるいは ApoE のノックアウト Huh7 細胞株を樹立した。また、ApoB と ApoE のダブルノックアウト (DKO) 細胞株も樹立した。それらの細胞に対する HCV の感染性を

qRT-PCR および Focus forming assay によって検討した。レンチウイルスベクターによって、種々のアポリポ蛋白質を発現させ、HCV の粒子産生に及ぼす影響を検討した。アポリポ蛋白質の 2 次構造は CLC Genomics Workbench により予測した。ApoC1 あるいは ApoE の欠損変異体を発現する DKO 細胞株を作製し、HCV の感染性粒子産生における両親媒性の α ヘリックスの意義を検討した。HCV 粒子を超速心法で精製し、アポリポ蛋白質とウイルス粒子の結合を検討した。(松浦善治)

- 9) HCV 感染による JNK 経路と Itch 活性および脂肪滴結合蛋白の解析:HCV J6/JFH1 をヒト肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞に感染させ 1-7 日まで細胞を回収した。ウエスタンブロット法にて JNK, c-Jun, p-c-Jun (Ser63), Itch, p-Itch (pT222), adipophilin, TIP47 の各抗体で発現レベルを比較した。2) HCV 感染による脂肪滴形成の変化:HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染させ、脂肪滴を BODIPY で染色した。陰性対照の mock 細胞と脂肪滴形成の違いを解析した。3) HCV 感染による Spartin のプロセッシング:HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染させ、Spartin の泳動度の変化をウエスタンブロット法で解析した。4) Spartin 内の NS3/4A プロテアーゼ切断モチーフの検索:Spartin のアミノ酸配列内に NS3/4A プロテアーゼ切断モチーフが存在するか、既知のモチーフと比較検討を行った。(勝二郁夫)

- 10) 3ヶ月齢 C57/bl6 オスに対し通常食及び高カロリー食、また高カロリー食に

(UDCA0.05%)、および DPP-4 阻害薬 (0.0015%) 配合食を 3ヶ月間投与 6ヶ月齢時に sacrifice し体重、肝臓/体重比、血清脂質、AST/ALT 血糖 インスリン 肝臓 膵臓脂肪細胞 膵臓について mRNA 発現変化を含め検討した。(森屋恭爾)

- 11) 班共同研究:近年増加傾向にある非 B 非 C 肝癌の背景には生活習慣病の影響が大きいと考えられているが、その詳細はこれまで明らかになっていない。また、飲酒や肥満を含む多数のリスク因子が関与する非 B 非 C 肝癌はウイルス性肝癌に比べて多様性が高いとも考えられる。本研究は、大規模コホートを用いて非 B 非 C 肝癌の背景因子からカテゴリー化を行うことを目的とした。

全国 55 の第 3 次医療機関において 1991 年~2010 年までに診断された非 B 非 C 型肝細胞癌 5633 症例を収集した。そのうち、PBC や自己免疫性肝炎などの固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない 2166 例を対象に 16 の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行った。使用したデータは、以下のとおり:年齢、性別、飲酒量、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常症、脂肪肝の有無、身長体重比 (BMI)、アルブミン値、総ビリルビン値、AST、ALT、GGT、ALP、プロトロンビン活性、血小板数。それぞれのデータは、正規化した上で解析に用いた。

(倫理面の配慮) 本研究は、東京大学大学院医学系研究科倫理委員会で審査され、承認された(承認番号 3710)。患者登録に際して氏名・生年月日等の個人情報

録されず、個々のデータは、本研究独自の登録番号を割り当てた上で管理された。本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。(建石良介)

C.結果

- 1) 済生会吹田病院と京都府立医科大学の症例の比較と各病型間における PNPLA3 の rs738409 の遺伝子型(CC, CG, GG)の分布に有意な差はなかった(表 2)。rs738409 の遺伝子型 CC, CG, GG の 3 群間で血液生化学所見、肝組織所見で有意差を検討したが、血液生化学所見には有意差は無く、脂肪肝の有無(1%未満 vs 1%以上)と肝線維化の程度(F0,F1,F2 vs F3,F4)に有意な差を認めた(表 3)。慢性肝炎のみを対象として同様の検討を行ったが、結果は全症例を対象とした解析結果とほぼ同様であった(表 4)。すなわち、rs738409 がリスクアレル G を有する CG,GG の症例では脂肪蓄積が起きやすく、肝線維化も進展しやすいことを示す結果が得られた。(岡上 武)
- 2) MC4R はレプチンの下流にあってインスリンの分泌抑制に加えて、食欲抑制を担う。従って、MC4RKO と MC4R/PPAR- α double KO マウスは高インスリン血

症とともに過食を生じ、高度肥満を呈する。MC4RKO マウスでは脂肪肝の進展と共に、炎症性細胞浸潤に加えて肝線維化が生じ、やがて全例で肝細胞癌の合併が観察された。他方、MC4R/PPAR- α double KO マウスでは MC4RKO マウスと同様に高度の脂肪肝を生じるものの、炎症性細胞浸潤や肝線維化は観察されず、肝発癌を生じることもなかった。(西原利治)

- 3) 1. 臨床背景：(BMI、肥満(BMI \geq 25)・II 型糖尿病(DM)・脂質異常症(DL)の合併率はいずれも NAFLD-HCC で高かった。高血圧(HTN)では両群に差が無かった。2. HCC の主腫瘍径・肉眼所見・分化度・組織型：主腫瘍径は、中央値 40mm に対し 20mm と、NAFLD-HCC で HCV-HCC より高値であった。分化度は両群とも中分化が約 70%と最多であった。高分化型のうち、内部に中分化結節を含む nodule in nodule 型を呈した症例が 7 例含まれ、HCV-HCC の 3 例に対し高率であった。組織型は、両群とも索状型が最も多く約 70%程度であった。3. SH-HCC の頻度、癌部の steatohepatic features 各特徴所見の出現頻度：SH-HCC の頻度は 50%に対し 20%と NAFLD-HCC で高率であった。各特徴的所見の出現頻度も、steatosis, ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis の全項目で NAFLD-HCC で有意に高い出現率を呈した。4. 免疫組織染色：早期 HCC 関連マーカーと肝前駆細胞関連マーカーに関しては、NAFLD-HCC と HCV-HCC 両群間に差は無かった。癌幹細胞・細胞

分化増殖関連因子に関しては、癌部での陽性率で NAFLD-HCC と HCV-HCC 群間に差を認めたのは Nanog のみで、NAFLD-HCC で陽性率が高く、結節内の全癌細胞の 50%以上が陽性となった 6 例はいずれも NAFLD-HCC で、全例が SH-HCC であった。(橋本悦子)

- 4) 症例は B 型肝炎 101 例、C 型肝炎 286 例、重複感染 4 例、NBNC164 例であった。NBNC 肝癌は C 型肝炎に比べて有意に男性に多く、B 型肝炎に比べて高齢発症であり、背景肝は肝硬変が少なかった。腫瘍因子では有意に AFP が低く、vp2 以上の割合も少なかったが、腫瘍径は B 型肝炎と同程度に大きかった。NBNC 肝癌の予後は、B 型肝炎・C 型肝炎に比べて無再発生存期間、全生存期間とも有意に良好であった($p < 0.005$)。また B 型肝炎、C 型肝炎、NBNC 肝癌の代謝関連因子の割合は、肥満(BMI30 以上)は 1%、2.3%、8.3%、糖尿病合併は 13.3%、17.2%、49.4%、高血圧合併は 20%、45.5%、61%、高脂血症合併は 11.4%、17.2%、25.6%、アルコール多飲(70g/day 以上)は 30.5%、33.8%、49.4%とすべて NBNC 肝癌で多かった。遺伝子機能解析では、NBNC 肝癌の癌部において糖尿病と高血圧に正相関する群では 84 遺伝子で発現異常を認め、細胞周期関連遺伝子群に有意な発現異常を認めた($p = 0.002$)。非癌部において糖尿病と肥満に正相関する群では 90 遺伝子で発現異常を認め、細胞接着関連遺伝子群に有意な発現異常を認めた($p < 0.001$)。これらの遺伝子群は C 型肝炎における解析では有意差を認めず、

NBNC 肝癌で特徴的な遺伝子発現異常と考えられた。また年齢及び脂質代謝異常症と逆相関し、肥満度と正相関する群では、非癌部 10 遺伝子に有意な発現異常を認め、エンドサイトーシス関連遺伝子群に異常が認められた。さらに、そのうちいくつかの遺伝子では、遺伝子発現と術後無再発生存期間とに有意な相関が認められた。(田中真二)

- 5) ①肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスは、耐糖能障害を呈しており、肝臓の脂肪蓄積も増加していた。また、ノックアウトマウスの初代幹細胞では、ツニカマイシン刺激による ER ストレス反応が亢進・遷延していることが分かった。②ヒト生検サンプルを用いて、XBP-1, BIP, CHOP, Sdf2l1 など ER ストレスの終息シグナルの発現を測定した。これらの発現が低下しているほど、耐糖能の低下や NASH の進展が認められた。(植木浩二郎)
- 6) (検討 1) SVR 後肝発癌に寄与する要因を多変量解析(Cox proportional hazard model)で検討すると、年齢(50 歳以上)、性別(男性)、肝線維化(F2 以上)、HCV subgroup(HCV-1b Core aa70 Mutant)が独立要因として抽出された($P < 0.01$)。脂質要因では、総コレステロール(190 mg/dl 未満)、HDL コレステロール(50 mg/dl 未満)、中性脂肪(150mg/dl 以上)が単変量解析では肝発癌に影響していたが($P < 0.05$)、何れも多変量解析では独立要因として抽出されず。(検討 2) 前治療無効例の Telaprevir 併用療法における抗ウイルス効果の検討では、Invader 法で

aa70 Mutant 頻度が 1.0%未満の症例の SVR 率は 67%(16/24 例)、前治療無効かつ IL28B nonTT で Mutant 1.0%未満の症例の SVR 率も 67%(4/6 例)と何れも高い SVR 率が得られた。前治療 Partial responder で Mutant 1.0%未満の症例の SVR 率が 100%(2/2 例)であるのに対して、前治療 Null responder で Mutant 99.0%以上の症例の SVR 率は 20%(2/10 例)と低い SVR 率であった。この様に、前治療無効例に対する Telaprevir 併用療法では aa70 Mutant 頻度が低い症例で治療感受性を示すことが確認された。肝発癌の検討で aa70 Mutant 頻度の経過は、経過持続的に低頻度を推移(持続 Low)、持続的に高頻度を推移(持続 High)、中頻度を推移(変動)、低頻度から高頻度に移行(Low-High)、高頻度から低頻度に移行(High-Low)の 5 グループに分けられることが確認された。全症例で各経時的な aa70 Mutant 頻度の中央値(10 例以上の data が存在するポイントのみ)を評価すると、肝発癌の 15 年前の Mutant 頻度 6%、10 年前 58%、5 年前 67%、肝発癌時 74%と経時的に増加することが確認された。この様に、肝発癌前後で、aa70 Mutant は様々な変動パターンを呈したが、全体で評価すると肝発癌前より既に Mutant の頻度は増加傾向を示した。(芥田憲夫)

- 7) ① Exendin-4 による体重と肝の肉眼所見の変化：コントロール群の体重は徐々に増加し、14 週齢で約 50 g となった。一方、Exendin-4 群は 7 週齢より体重はほぼ増加せず、14 週齢で約 40 g とコン

トロール群と比較し有意に低値であった。Exendin-4 群の肝臓は、コントロール群の肝臓と比較して、褐色調であった。

Exendin-4 による肝組織所見、肝組織中の中性脂肪含量、および NAFLD activity score の変化：両群ともに著明な肝線維化は認めなかったが、Exendin-4 群における肝小葉内の炎症、肝細胞内の脂肪蓄積や肝細胞風船様変化は、コントロール群と比較して抑制されていた。Exendin-4 群における NAFLD activity score はコントロール群と比較して有意に低値であった。

③ Exendin-4 が肝組織中飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の飽和脂肪酸値はコントロール群と比較し有意な変化は認めなかった。また、アテローム性飽和脂肪酸値、血栓形成性飽和脂肪酸値、中鎖飽和脂肪酸値、および長鎖飽和脂肪酸濃度値も両群間において有意差は認めなかった。

肝組織中の長鎖飽和脂肪酸の分画を検討したところ、パルミチン酸値、ステアリン酸値、ベヘン酸値、およびリグノセリン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるアラキジン酸値とリグノセリン酸値はコントロール群と比較して、有意に高値であった。

④ Exendin-4 が肝組織中不飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の一価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較して有意な変化は認めなかった。

一方、Exendin-4 群の肝組織中多価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較して有意に高値であった。また、Exendin-4 群の肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸値および n-3/n-6 系多価不飽和脂肪酸比もコントロール群と比較して有意に高値であった。

肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸の分画を検討したところ、アラキドン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるリノール酸値、 γ リノレン酸値、およびジホモ- γ リノレン酸値は、コントロール群と比較して有意に高値であった。一方、Exendin-4 群における肝組織中の Δ^5 デサチュラーゼ index はコントロール群と比較して有意に低値であった。(川口巧)

8) これまでの本研究班の研究で、HCV の完全な増殖を許容する新規細胞株、JHH4 と FU97 細胞を同定した。また、ApoE の欠損細胞を樹立することによって、HCV の粒子産生には、ApoE の機能を ApoB が代償することが明らかとなった。ApoE と ApoB 遺伝子の両方を欠損させた DKO 細胞株では粒子産生能が顕著に抑制されていたことから、ApoB と ApoE が相補的に HCV の粒子産生に関与していることが示唆された。一方、cDNA マイクロアレイによる解析で、ヒト肝組織では全ての肝臓特異的なアポリポ蛋白質が高く発現しているのに対し、Huh7 細胞では ApoB と ApoE の発現は高いものの、ApoA や ApoC の発現が低かった。そこで、DKO 細胞に、

ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoE および ApoH を発現させ、粒子産生能を検討した。興味深いことに、ApoE だけでなく、ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、および ApoC3 の発現によっても感染性粒子の産生が認められた。次に、DKO 細胞に発現することで、HCV の感染性粒子産生を回復できるアポリポ蛋白質の共通性を 2 次構造で予測したところ、これらのアポリポ蛋白質には共通して両親媒性 α ヘリックスを複数有することが明らかになった。さらに、ApoC1 と ApoE から、単一の α ヘリックスだけを DKO 細胞に発現させるだけで、HCV の粒子産生が回復することから、アポリポ蛋白質の両親媒性の α ヘリックスが HCV の感染性粒子産生に関与していることが示唆された。さらに、HCV 粒子を超遠心で濃縮すると、アポリポ蛋白質も濃縮されることから、HCV 粒子にアポリポ蛋白質が結合していることが示唆された。(松浦善治)

9) 1.HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が T222 でリン酸化され、活性化された。また、Itch の活性化に伴い Adipophilin の蛋白質量が減少したが、TIP47 の量は変化しなかった。2. HCV 感染に伴い、BODPY で染色される脂肪滴の大きさが mock 細胞と比較して増大傾向にあった。3. HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染にさせ、経時的に観察したところ、Spartin の全長のバンドが減少し、2 本のバンドに分かれ、低分子量のバンドの比が増加した。4.

Spartin 内に NS3/4A プロテアーゼの切断モチーフと類似のアミノ酸配列が存在した。(勝二郁夫)

10) 体重、肝臓内中性脂肪量、血中インスリン量は、高脂肪食群で薬剤投与の有無に関係なく増加を認めるとともに薬剤間の有意差認めなかった。一方、肝臓内総コレステロール量は高脂肪食で増加を認め、DPP4-inhibitor では有意な変化認めなかったが、UDCA 投与群では低下を認めた。一方、血糖値は高脂肪食投与で上昇傾向認めるが、有意差は認めなかった。高脂肪食で発現増加した FAS SREBP1 などの肝臓内脂質代謝関連酵素は、2 種類の薬剤投与によっても有意な低下は認めないが、UDCA のみが SCDmRNA を有意に低下させた。一方、TGR5mRNA は DPP-4inhibitor 群で増加を認めた。また、膵臓においては GLP1-RmRNA が UDCA によって発現増加を認めた。脂肪組織においては、DPP-4inhibitor が、高脂肪食によって増加した TNFalpha mRNA を減少させた。(森屋恭爾)

11) 階層クラスタリングによって、対象者は、以下の 5 つの群に大別できた：C1 高齢男性、中等度飲酒、肝機能正常、C2 高齢男性、肥満、中等度飲酒、肝硬変、C3 比較的若年男性、大量飲酒、肝機能不良、C4 肥満男性、非飲酒、生活習慣病、C5 高齢女性、肥満、非飲酒、肝硬変。年代別の各グループの割りあいを検討したところ、C1 と C5 の増加が近年の非 B 非 C 肝癌の増加に寄与している可能性が示唆された。(建石良介：

班共同研究)

D. 考察

我々は以前肝生検で非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) と診断した 529 例を Matteoni 分類に従い組織分類し、GWAS を行い、PNPLA3 の rs738409 の遺伝多型が NASH 発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが (PLoS One 7(6): e38322, 2012)、今回 NASH と病態が類似する C 型肝炎でも類似する結果が得られた。すなわち C 型肝炎においては脂肪蓄積と線維化進展に PNPLA3 の遺伝子多型が関与していることが明らかになった。PNPLA3 は中性脂肪の代謝に関与しているがその役割は十分に明らかにされておらず、今後さらなる検討が必要であるが、今回の結果は C 型肝炎の予後、特に PNALT 症例の予後の検討に重要な意味を持つ可能性がある。

MC4R 遺伝子に異常を有する症例は幼児期より高度肥満を呈する。日本人では劣性遺伝形式を取ることが知られている。他方、フランス人では優性遺伝形式を示し、高度肥満者の 1% に MC4R 遺伝子異常を認める。MC4R 遺伝子変異を持つこれらの症例は遺伝性 NASH を発症し、しばしば肝硬変で死亡することが知られている。従って、この遺伝性疾患を研究すれば非遺伝性 NASH で観察される代謝異常に近い病態を知ることができるのではないかと考えられる。

MC4RKO マウスでも高度肥満に伴う脂肪肝を背景に典型的な NASH の発症が観察されたことから予想に違わずヒト NASH の病態を反映する優れた NASH モデルと考えられた。

MC4RKO マウスでは炎症細胞浸潤と著明な肝線維化の進展、肝細胞癌の合併が全例で観察され、MC4R/PPAR- α double KO マウスでは炎症細胞浸潤は軽微で、肝線維化や肝細胞癌の合併を認めなかったとの成績がヒトに外挿可能であれば、NASH 治療に新たな breakthrough をもたらす可能性がある。

NAFLD-HCC は、HCV-HCC と比較し肥満・生活習慣病合併率が高く、主腫瘍径が大きく、SH-HCC の頻度が高く、癌部の Nanog 陽性率が高く、癌部 Nanog 強陽性例は全例 NAFLD-HCC の SH-HCC 例であった。

NAFLD の年齢・性の分布には特徴があり、50 程度を境に若年層では男性例が多く、高齢層では女性例が多い。当科における NAFLD 全体の症例分布は 50 歳以下では男性が多く、50 歳以上では女性が多いが、年齢中央値男女とも約 71 歳の NAFLD-HCC は男性が 65% を占めた。この原因として、NAFLD における HCC 合併の危険因子とされる肥満・DM の合併率が男性で高いこと、男性で女性より高頻度に合併する喫煙・少量飲酒の影響などの関与が推測されているが、未だ明らかではない。

NAFLD-HCC では高分化型 HCC が多いという複数の報告があるが、当科の検討では HCV-HCC と差が無かった。

しかし、HCV-HCC に比し主腫瘍径が大きいにもかかわらず分化度が同等ということは、主腫瘍径のわりに高分化型が多いといえる。また、高分化型の中に中分化型の成分を含む症例は NAFLD-HCC に高頻度であったという事実も考慮を要する。

癌部 steatohepatic features に関しては、前述のように 2010 年に初報告の論文において、対象疾患が HCV-HCC であり、その後複数の論文で、基盤となる肝疾患は様々であるが、癌部の steatohepatic features は非癌部の脂肪沈着の有無と関連し、基盤となる疾患の中で最も重要なのは NAFLD と報告された。当科の検討でも、NAFLD-HCC は HCV-HCC に比較し SH-HCC の頻度が高く、また癌部 steatohepatic features の各特徴的所見の出現頻度も高率であった。SH-HCC の生物学的特徴や NAFLD 自体あるいは HCC 病態との関連については今まで全く報告が無く、発癌メカニズムとの関連を含め、今後の重要な検討課題と考えられる。

今回検討した免疫染色の染色性の評価で、NAFLD-HCC と HCV-HCC で差異を認めしたのは、Nanog のみであった。Nanog は癌幹細胞の自己増殖促進分子であり、その染色性の両群における差異が、非癌部の線維化の程度を含め発癌メカニズムや発癌危険因子の差異に繋がる可能性がある。今後、非癌部での発現との関連や動物モデルでの検証など更なる検討を要する。

今回の検討では、当院における今回検討した期間の肝切除施行数は HCV-HCC が NAFLD-HCC の約 20 倍程度と非常に差が大きく、統計解析とその解釈に困難があることが最大の問題点と考える。今後、多施設共同研究などを通し更なる症例集積を目指す。検討項目としては、今回の報告で検討しえなかった HCC 関連マーカー (Bmi-1, glutamine-synthetase, adenylyate cyclase-associated protein2 など)、慢性炎

症関連分子(Cox2 など)、マロリー体関連分子 (抗ユビキチン抗体, p62, CK18 など)、幹細胞関連分子 (Oct4, Sox9, GLP-1, CK18/8 など)、細胞分化・再生関連分子 (hepassocin など)、細胞周期・アポトーシス・DNA 修復関連分子 (Fox-O など) などについて、主としての免疫組織学的手法により解析していく。また、最近 NAFLD に関連する腫瘍性病変で前癌病変としての意味合いから注目される肝細胞腺腫や過形成性結節などについても検討を加えていきたい。

非ウイルス性肝癌は代謝関連因子との関連が強く、それら代謝関連肝癌は、ウイルス性肝癌とは別の特異的な遺伝子機能異常を内包している。その発癌及び悪性化メカニズムの解明が、代謝関連肝癌に対する新たな分子マーカーや分子標的の開発に寄与すると考えられる。

前年までの検討から、摂食により肝臓での ER ストレスが惹起され、Sdf2l1 等のシグナルの誘導によりそれが適切に終息すること、肥満ではその誘導が低下し、持続的な ER ストレスとそれによるインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積が生じることを提唱した。今回の検討で、ER ストレス終息シグナルと考えられる Sdf2l1 を肝臓特的にノックアウトすると、確かに ER ストレスの遷延と耐糖能障害・肝脂肪蓄積の増大が起きていることが明らかとなった。ヒト生検サンプルの検討でも、ER ストレスシグナルの発現が低下しているほど、ER ストレスが遷延し、耐糖能障害・NASH の進展が生じていると考えられた。

トランスジェニック・マウスによる動物

実験では HCV core 蛋白による肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌への影響が報告されてきた。当施設の検討は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。今回の検討では、ウイルス排除前の Core アミノ酸置換の状態が SVR 後肝発癌にまで影響することが確認された。これはイニシエーターとしての HCV が排除された状態にあっても、Core aa70 Mutant の症例ではウイルス排除前の段階で既に肝発癌の素地が出来上がっている可能性を示唆する所見と思われる。

本研究により、GLP-1 受容体刺激剤である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、exendin-4 による脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が NASH 改善の一機序である可能性が示唆された。

本研究において、exendin-4 は NASH モデルマウスの体重増加と NAFLD activity score の上昇を抑制した。これまでに、GLP-1 受容体の発現は NASH モデルマウスや NASH 患者において抑制されていることが報告されている。また、GLP-1 受容体作動薬投与により、高脂肪食飼育ラットや ApoE ノックアウトマウスの肝障害が抑制されることも報告されている。このように、本研究における exendin-4 の体重減少効果と NASH 改善効果は既報の結果と類似していた。

GLP-1 受容体作動薬による NASH 改善効果の機序として、インスリン感受性の亢進、peroxisome proliferator-activated receptor α の活性亢進、および β 酸化の亢

進が報告されている。しかしながら、GLP-1受容体作動薬が脂肪酸組成におよぼす影響について未だ不明である。

長鎖飽和脂肪酸は炎症促進性の脂肪酸であり、NASHの発症に促進的に作用することが報告されている。しかしながら、本研究において Exendin-4 群の肝組織中長鎖飽和脂肪酸値は上昇していた。本研究における長鎖飽和脂肪酸と肝障害の関連が既報と一致しない理由は明らかではないが、長鎖飽和脂肪酸のなかでもアラキジン酸は apoB の分泌を促進して、リグノセリン酸はセラミド代謝を調節して肝細胞への脂肪蓄積を抑制することが報告されている。本研究において、長鎖飽和脂肪酸値の増加に寄与する脂肪酸分画はアラキジン酸とリグノセリン酸であることから、enendin-4 は長鎖飽和脂肪酸の組成を変化させることで、NASH に対する抑制作用を発揮している可能性が示唆された。

Exendin-4 群では、肝内の n-6 系多価不飽和脂肪酸、特にリノール酸値、 γ リノレン酸値、およびジホモ- γ -リノレン酸値が高値であった。これらの脂肪酸は炎症促進性エイコサノイドの前駆体であり、NASH の発症に関与することが報告されている。本研究における n-6 系多価不飽和脂肪酸の変化は既報と一致しないが、脂肪酸代謝経路の律速酵素である Δ^5 デサチュラーゼの変化がその一因と考えられる。 Δ^5 デサチュラーゼはジホモ- γ -リノレン酸より炎症促進性エイコサノイドの産生を促進する酵素で、NASH 患者においてその活性は亢進していることが報告されている。また、 Δ^5 デサチュラーゼ活性阻害剤 (CP-24879) により、

炎症が抑制され、肝細胞内脂肪含量が低下することが報告されている。本研究結果と、これら既報の研究結果は、enxendin-4 が肝組織中 Δ^5 デサチュラーゼの活性を阻害し、炎症促進性エイコサノイドの産生を抑制することで NASH を軽減している可能性が示唆される。

アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスが HCV の感染性粒子産生に関与していることが明らかとなった。両親媒性の α ヘリックスとウイルス粒子の結合を特異的に阻害するような薬剤やペプチドは新規抗 HCV 剤の創薬標的と考えられる。

UDCA は肝腫瘍マーカーである SCD mRNA の抑制ならびに膵臓において GLP1-RmRNA 発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signal 増強をもたらす可能性が示唆された。一方 DPP4inhibitor は TGR5mRNA 増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と異なるなら部位で補完的作用をもたらす可能性が示された。

近年、肥満人口の増加とともに非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝細胞癌発癌への関与が注目されているが、成人日本人男性では、20g/日以下の飲酒者はむしろ少数派であり、飲酒と肥満のリスクを併せ持つ集団(C2)の同定が必要である。また、中等度飲酒と加齢以外に特段の危険因子を擁しない集団(C1)が同定されたため、今後これらの集団に隠れた危険因子が存在しないか精査する必要があると思われる。

E. 自己評価

1) 達成度について：当初設定した目標について、ほぼ各項目について1年目の目標

通りに研究が遂行されたと考える。

- 2) 研究成果の学術・国際・社会的意義について:全国的な非 B 非 C 型肝炎の増加の中、代謝関連肝癌として捉えて研究、診断、治療を行なうというコンセプトのもつ社会的な意義は大きいと考えられる。
- 3) 今後の展望について:代謝関連肝癌(MALC)に関して、臨床データ、基礎実験を通じて、発癌機序の解明、抗リスク群の設定等、早期発見、早期治療に向けた取り組みの成果が期待される。

F. 結論

非 B 非 C 型肝炎の階層化クラスタリング解析によって、従来言われている NASH やアルコール性肝硬変以外に肝機能正常高齢男性や肥満と飲酒のリスクを併せ持つ集団など新たな背景集団を抽出することができた。C 型肝炎、NASH、非 NASH 非 NASH の非 B 非 C 型肝炎疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌 (Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御が可能になると考えられた。このような認識をもって患者の管理・治療に当ることにより、患者の予後、QOL を大幅に改善することが期待される。

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表のみ

- 1) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2014 Jan 13. doi: 10.1002/ijc.28720. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24420733.
- 2) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
- 3) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol* 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24258409.
- 4) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. *Hepatol Res* 2013 Nov 14. doi:10.1111/hepr.12275. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24224477.