

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

研究分担者 橋本 悦子 東京女子医科大学消化器内科 教授

研究要旨；わが国において急増している非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とする肝細胞癌 (NAFLD-HCC) の病理学的特徴を明らかにすることを目的とした。癌部・非癌部の組織を得た NAFLD-HCC34 例において、臨床背景、主腫瘍径、分化度・組織型、癌部の早期肝細胞癌マーカー、肝前駆細胞マーカー、癌幹細胞関連因子、細胞分化・増殖制御因子の発現に関して、年齢・性をマッチさせた C 型肝炎ウイルス関連の HCV-HCC34 例と比較検討した。HCV-HCC と比較し NAFLD-HCC は主腫瘍径が大きく、癌部での脂肪性肝炎様所見を高率に認め、癌幹細胞関連分子 Nanog を強く発現していた。

A. 研究目的

飽食の時代を迎えた我が国では、肥満・糖尿病などの生活習慣病に基づくメタボリックの急増に伴い、生活習慣病の肝病変である非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) が増加しており、日本人一般成人の約 20% が NAFLD を合併していると考えられる。このような現況を受け肝細胞癌 (HCC) の原因疾患として NAFLD が注目されている。NAFLD を基盤とする HCC (NAFLD-HCC) は、絶対数・HCC 全例中に占める割合ともに増加していることが複数の報告から明らかであり、今後さらなる増加が予想される。しかし、NAFLD-HCC の疫学的実態や肝発癌メカニズムなどは必ずしも明らかにされておらず、HCC 発生高リスク群の囲い込みが成されていないのが現状である。

最近、HCC に関連する新たな病理学

的知見として、Salomao らにより、癌部に steatohepatic features (steatosis, Ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis) を認める steatohepatic HCC (SH-HCC) が発表された。SH-HCC の初報は C 型肝炎ウイルス関連 HCC (HCV-HCC) 例であるが、その後の検討では、SH-HCC の基盤となる病変として最も重要なのは NAFLD とされている。しかし NAFLD-HCC と SH-HCC の関連や SH-HCC の生物学的特徴などは明らかでない。

SH-HCC との関連を含め、NAFLD-HCC の病理学的特徴を明らかにすることは、NAFLD における発癌メカニズム解明の一助となる。発癌メカニズムの解明により、多数の NAFLD 患者の中から HCC 発生高リスク群の設定や臨床現場での効果的な症例囲い込みと能率的外来フォローアップ体制の確立が可能となる。結果

として、HCCの早期発見と治療、さらには発癌抑止によるHCC発生率低減が可能となり、NAFLD患者の予後改善と国民医療費全体の削減が期待される。そこで、今回SH-HCCを含めNAFLD-HCCの病理学的・生物学的特徴を明らかにすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

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・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分子 Nanog、細胞分化・増殖抑制因子 (リン酸化・非リン酸化 LKB1)、酸化的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。

(倫理面への配慮)

本研究は医療情報と病理組織標本を用いた後ろ向き研究である。研究内容は東京女子医科大学倫理委員会の承認を受け同大学ホームページに掲載されており、これをもって研究参加患者へのインフォームドコンセントとした。本研究ではヒトゲノム・遺伝子情報は取り扱わない。全データは症例番号のみで管理され個人を特定する情報は収集していない。解析用データファイルはアクセスにパスワードを設け、管理責任者 (東京女子医科大学消化器内科 谷合麻紀子) を決め管理した。

C. 研究結果

1. 臨床背景 (表1)

BMI、肥満 (BMI ≥ 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)では両群に差がなかった。

2. HCCの主腫瘍径・肉眼所見・分化度・組織型 (表2)

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 (表3)

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 (表 4)

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。

D. 考察

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 steatohepatitic 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 steatohepatitic 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 steatohepatitic 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, adenylate 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 (抗コビキチン抗体, 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 (Foxo 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。

E. 結論

NAFLD-HCC は HCV-HCC と比較し、SH-HCC と癌部 Nanog 強発現例を高率に認めた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28 Suppl 4:64-70

- 2) Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K. Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28 Suppl 4:88-92

2. 学会発表

- 1) Kogiso M, Hashimoto E, Kodama K, Tobar M, Matsushita N, Torii N, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K. Clinicopathological features of HCC derived from steatohepatitis. Hepatology アメリカ肝臓学会年次総会 Washington DC. 2013

- 2) Taniai M, Kodama K, Kogiso T, Torii N, Tokushige K, Hashimoto E. Comparison of Histopathological Features of Hepatocellular Carcinoma Rising from Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Those of Hepatocellular Carcinoma Rising from Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. ヨーロッパ肝臓学会年次総会 アムステルダム 2013

- 3) 小木曾 智美, 谷合 麻紀子, 橋本悦子. 非アルコール性脂肪性肝炎を基盤とした肝細胞癌の病理組織学的検討. 日本消化器病関連学会週間 東京 2013

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

表1 NAFLD-HCCとHCV-HCC 臨床背景

	NAFLD-HCC n=34	HCV-HCC n=34	p値
BMI	26.5 (22.4-35.6) kg/m ²	22.5 (20.7-30.3) kg/m ²	0.02
肥満合併	56%	29%	0.02
糖尿病合併	62%	44%	0.03
脂質異常症合併	53%	26%	0.02
高血圧合併	65%	56%	ns

比率以外は中央値(range)で表示

表2 NAFLD-HCCとHCV-HCC 肉眼・組織所見

	NAFLD-HCC n=34	HCV-HCC n=34	p値	
発癌時主腫瘍径	40(10-150)mm	20(8-45)mm	0.03	
発癌時単発	79%	74%	ns	
肉眼所見	単結節型	65%	59%	ns
	単結節周囲増殖型	20%	26%	ns
	多結節融合型	12%	15%	ns
分化度*	高分化	38%	20%	ns
	中分化	68%	71%	ns
	低分化	9%	13%	ns
組織型**	索状	68%	73%	ns
	偽腺管	17%	17%	ns
	充実	3%	5%	ns

*結節内の主たる分化度 **NAFLD-HCC30例、HCV-HCC30例で評価

表3 NAFLD-HCCとHCV-HCC steatohepatic HCC所見

	NAFLD-HCC n=34	HCV-HCC n=34	p値
Steatohepatic HCC	50 %	24 %	0.01
Steatosis なし	50 %	81 %	0.005
軽度	14 %	9 %	ns
中等度	33 %	9 %	0.001
高度	3 %	0 %	ns
Mallory体あり	59 %	15 %	0.002
癌細胞ballooningあり	56 %	9 %	<0.001
pericellular fibrosis なし	47 %	76 %	0.01
軽度	24 %	12 %	ns
中等度	29 %	12 %	ns

表4 NAFLD-HCCとHCV-HCC 免疫染色陽性率

	NAFLD-HCC n=30	HCV-HCC n=30	p値
Hep-1	100 %	97 %	ns
HSP-70	60 %	57 %	ns
Glypican-3	77 %	73 %	ns
CD34	63 %	70 %	ns
CK7	3 %	7 %	ns
CK19	13 %	17 %	ns
Nanog	50 %	17 %	0.02
リン酸化LKB-1	86 %	83 %	ns
非リン酸化LKB-1	100 %	100 %	ns
8-OHdG	73 %	77 %	ns

分担研究報告書

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

研究分担者 田中 真二 東京医科歯科大学肝胆膵外科 准教授

研究要旨：生活習慣病などに伴う、C型肝炎及び非ウイルス性肝癌の肝切除検体を用いた網羅的遺伝子発現解析から遺伝子機能(gene ontology)解析を行い、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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

(倫理面の配慮)

【ヒトゲノム・遺伝子解析研究】：「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則に従って、倫理審査委員会の審査を経る手続きを行う。

C. 研究結果

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型肝癌に比べて有意に男性に多く、B型肝癌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型肝癌と同程度に大きかった。NBNC肝癌の予後は、B型肝癌・C型肝癌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型肝癌、C型肝癌、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 型肝癌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。

D. 考察

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。

E. 結論

臨床検体の網羅的遺伝子発現解析の結果、代謝関連肝癌に特異的な遺伝子発現異常を認め、予後との相関が示唆された。

F. 健康危険情報 特記なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Sato K, Tanaka S, Mitsunori Y, Mogushi K, Yasen M, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Aarii S. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma; clinical and biological significance. *Hepatology*, 2013;57(4):1436-1447
- 2) Muramatsu S, Tanaka S, Mogushi K, Adikrisna R, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Aarii S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication. *Hepatology*, 2013;58(1):218-228.
- 3) Furuta M, Kozaki KI, Tanimoto K, Tanaka S, Aarii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J. The Tumor-suppressive mir-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(3):e60155.
- 4) Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Aarii S. Age-related clinicopathological and molecular features of patients received curative hepatectomy for hepatocellular

carcinoma. American Journal of Surgery, in press

- 5) Kudo A, Tanaka S, Ban D, Matsumura S, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Arii S, Tanabe M. Alcohol consumption and recurrence of non-B or non-C hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a propensity score analysis. Journal of Gastroenterology, in press
- 6) Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Arii S. EpCAM-Targeted therapy for human hepatocellular carcinoma. Annals of Surgical Oncology, in press
- 7) Kudo A, Mogushi K, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Arii S. Mitochondrial metabolism in the Noncancerous Liver Determine the Occurrence of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study. Journal of Gastroenterology, in press

2.学会発表

- 1) 田中真二、茂櫛薫、藍原有弘、村松俊輔、Rama Adikrisna、三浦智也、中尾圭介、松永浩子、勝田絵里子、松村聡、伴大輔、入江工、落合高德、工藤篤、中村典明、田中博、有井滋樹. 肝細胞癌の再発様式に基づく新規分子標的治療の開発. 第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013 (パネルディスカッション)
- 2) 松村聡、田中真二、茂櫛薫、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、田中博、有井滋樹. 遺伝子機能解析を用いた非ウイルス性肝癌発生メカニズムの解明. 第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013
- 3) 田中真二、Rama Adikrisna、村松俊輔、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、有井滋樹. 癌幹細胞のリアルタイムイメージングに基づいた標的治療の開発. 第25回日本肝胆膵外科学会学術集会、宇都宮、2013 (ミニシンポジウム)
- 4) 工藤篤、田中真二、伴大輔、松村聡、中村典明、入江工、落合高德、有井滋樹. 肝切除後多中心性再発のバイオマーカー：背景肝のSLC22A7発現低下. 第49回日本肝癌研究会、東京、2013 (ワークショップ)
- 5) 田中真二、松村聡、茂櫛薫、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、田中博、有井滋樹. 切除症例における非B非C肝細胞癌の臨床病理学的特徴と遺伝子発現解析. 第49回日本肝癌研究会、東京、2013 (パネルディスカッション 追加発言)
- 6) 小川康介、田中真二、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明. EpCAMを標的とした新規肝癌治療と幹細胞性に対する特異的効果. 第68回日本消化器外科学会総会、宮崎、2013 (ワークショップ)
- 7) Tanaka S, Adikrisna R, Mogushi K, Matsumura S, Aihara A, Ochiai T, Tanaka H, Yamaoka S, Arii S. English Oral Sessions E11-2: Characteristics of cancer stem cell (2).

- Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma and tumor-host interaction. 第72回日本癌学会総会、横浜、2013
- 8) 田中真二、小川康介、有井滋樹. 腫瘍形態に基づく肝細胞癌の遺伝子解析と特異的分子標的による治療戦略. 第11回日本消化器外科学会大会、第21回日本消化器関連学会週間、東京、2013 (シンポジウム)
- 9) 田中真二、伊藤浩光、有井滋樹. 可視化癌幹細胞に基づいた分子生物学的特徴の解明と治療開発への展開. 第11回日本消化器外科学会大会、第21回日本消化器関連学会週間、東京、2013 (ワークショップ)
- 10) 松村聡、田中真二、有井滋樹. NASH及びメタボリックシンドローム関連肝癌を含む非ウイルス性肝癌切除症例の解析. 第17回日本肝臓学会大会、第21回日本消化器関連学会週間、東京、2013 (シンポジウム)
- 11) 田中真二、藍原有弘、松永浩子、茂籟薫、中尾圭介、三浦智也、松村聡、伴大輔、入江工、落合高德、工藤篤、中村典明、田中博、田邊稔、有井滋樹. 臨床検体に基づく肝細胞癌再発機序の解明と新規分子標的治療への応用展開. 第51回日本癌治療学会学術集会、京都、2013 (臓器別シンポジウム)
- 12) Tanaka S, Muramatsu S, Adikrisna R, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Tanabe M, Arii S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma; tumor-host Interaction and clinical impact. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver diseases, Washington DC, USA, 2013
- 13) 田中真二、勝田絵里子、藍原有弘、松永浩子、中尾圭介、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、有井滋樹、田邊稔. 肝癌の再発治療の解析と再発パターンに基づく新規治療法の開発. 第75回日本臨床外科学会総会、名古屋、2013 (パネルディスカッション)

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

特記なし

2.実用新案登録

特記なし

3.その他

特記なし

分担研究報告書

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

研究分担者 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

研究要旨：肥満・インスリン抵抗性によって引き起こされる NAFLD/NASH の病態形成において、ER ストレスが関与することを見いだした。ER ストレスは、食事によっても惹起されるが、シャペロン分子の誘導によって適切に終息する。本研究では、正常状態で摂食により誘導される機能未知分子 Sdf211 がコシャペロン分子であること、肥満動物モデルでは肝臓での Sdf211 の発現が低下しており、その補充によって血糖値や脂肪肝が改善することを見いだした。また、肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスでは、耐糖能異常と肝脂肪蓄積増加が認められた。さらに、ヒト肝生検サンプルを用いた解析では、Sdf211 など ER ストレス終息シグナル分子の発現が低下しているほど、NASH 病変が進行することが明らかとなった。

A. 研究目的

肥満等のインスリン抵抗性状態においては、インスリン抵抗性・過栄養による脂肪沈着という 1st hit と肝臓における慢性炎症や ER ストレスなどの細胞ストレスという 2nd hit があってはじめて NASH の病態が確立するといわれているが、その相互作用の分子メカニズムを明らかにすることによって、治療への応用の可能性を探究する。また、この関連を実際に肝機能障害患者の生検サンプルを用いて検証する。

B. 研究方法

①常法により Sdf211 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 Sdf211 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 Sdf211 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。

(倫理面の配慮)

①、②で行う動物実験に関しては、東京大学医学部組み換え DNA 実験安全委員会において承認されている。③のヒトにおける検証については、医学部倫理委員会の承認されており、データは匿名化された上で解析されるため、個人情報情報は保護される。

C. 研究結果

①肝臓特異的 Sdf211 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, Sdf211 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。

D. 考察

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、Sdf211 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 Sdf211 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。

E. 結論

Sdf211 をはじめとする肝臓での ER ストレス終息シグナルは、肝臓の糖脂質代謝を正常に維持するために必須であり、その障害はインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積などを進行させて、NASH 病態を進展させる。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013;503:493-499
- 2) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lynge J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013;Oct 15 (Epub ahead of print)
- 3) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S and Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503:493-499, 2013
- 4) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lynge J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK and Kadowaki T. Body Composition is Main

Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013 無し
3.その他
無し

- 5) Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism* 2013;62:939-951

2.学会発表

- 1) 植木浩二郎 肥満症治療の課題と展望
第 63 回日本体質医学会総会 2013 年
久留米 (シンポジウム)
- 2) 植木浩二郎 肥満症とがん 第 34 回日本肥満学会 2013 年 東京 (教育講演)
- 3) Kohjiro Ueki Potential effects of treatment for diabetes on the cancer risk 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 横浜 (シンポジウム)
- 4) 植木浩二郎 PI3K とインスリン作用
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会
2013 年 熊本 (特別シンポジウム)

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

無し

2.実用新案登録

CC型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響

研究分担者 芥田 憲夫 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 肝臓内科 医長

研究要旨：C型肝炎 SVR 後発癌における代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討した。肝発癌に寄与する独立要因は、多変量解析で年齢・性別・肝線維化以外にウイルス要因 (HCV-1b Core aa70 Mutant) が抽出された。代謝要因も単変量解析では肝発癌率に影響していた。更に、Core aa70 Mutant 定量系 (Q-Invader assay 法) を用いて抗ウイルス効果、肝発癌への影響を検討した。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。また、肝発癌の検討で、肝発癌前より aa70 Mutant 頻度は増加傾向を示し、*IL28B* 遺伝子多型の影響を受けながら Mutant の頻度が経時的に変化する可能性も示唆された。今後は、非発癌例の経過とも比較していく必要がある。

A. 研究目的

C型肝炎病態進行には代謝要因が関与している。我々は、新規の肝発癌抑制療法の手掛りを見出すことを目的としてC型肝炎肝発癌症例における代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討してきた。本年度は、ウイルス排除後の SVR 後肝発癌に影響する要因を検討した。更に、HCV-1b Core aa70 Mutant 定量系を用いて最新治療における抗ウイルス効果、肝発癌へのウイルス要因の影響を検討した。

B. 研究方法

(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。

(倫理面の配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患

者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

（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(150 mg/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。

更に*IL28B*別に各経時的なaa70 Mutant頻度の中央値(5例以上のdataが存在するポイントのみ)を評価すると、TT群(21例)では肝発癌の5年前に7%が肝発癌時13%と6%の増加に留まったのに対して、nonTT群(7例)では肝発癌の5年前に47%が肝発癌時93%と46%も増加していた。この様に、宿主要因の影響も受けながらMutantの頻度が経時的に変化する可能性が示された。

D. 考察

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、この様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。

プロテアーゼ阻害剤併用療法で治癒しない症例からは NS3 領域の薬剤耐性ウイルスの出現が懸念される。Core aa70 Mutant 定量系を用いることで前治療無効例に対する第一世代プロテアーゼ阻害剤の Telaprevir 併用療法における治療効果予測の精度を更に改善出来る可能性を示唆された。今後は、第二世代の Simeprevir 併用療法でもその有用性を検討していく必要がある。

今回の肝発癌例のみの検討では、肝発癌の 10 年前より既に aa70 Mutant 頻度が増加傾向を示し、*IL28B* の様な宿主要因の影響も受けながら Mutant 頻度が経時的に変化する可能性も示唆された。今後は、その他の肝発癌危険因子である、年齢・性別・肝組織の影響も加味しながら総合的に Mutant 頻度の経時的な推移を評価していく必要がある。更に、今回の検討はあくまで肝発癌例のみの検討であるため、今後は非発癌例における Mutant 頻度の経時変化の経過とも比較していく必要がある。

E. 結論

(検討 1) ウイルス要因は年齢・性別・肝線維化から独立して SVR 後肝発癌に影響していた。

(検討 2) 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。肝発癌例では、発癌前より aa70 Mutant 頻度が既に増加傾向を示し、宿主要因の影響も受けながら Mutant の頻度が経時的に変化する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol* 2013;85:1028-1036.
- 2) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Clin Microbiol* 2013;51:2862-2868.
- 3) Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to

- interferon plus ribavirin combination therapy.
Intervirology 2013;56:13-21.
- 4) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. Hepatology 2013;57:964-973.
- 5) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Utility of telaprevir-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. J Clin Microbiol 2014;52:193-200.

2. 学会発表

- 1) Akuta N, Suzuki F, Hara T, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment prediction of sustained virological response and telaprevir-resistant variants by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1 patients treated with triple therapy. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington, DC. 2013.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし

分担研究報告書

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

研究分担者 川口 巧 久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 講師

研究要旨：消化管ホルモンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、糖・脂質代謝に関与することが報告されているが、GLP-1 の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) におよぼす影響は未だ不明である。本研究の目的は、GLP-1 が NASH マウスモデルにおよぼす影響を検討することである。NASH モデルマウスに対し、GLP-1 受容体作動薬 exendin-4 (n = 4) もしくは生食 (n = 4) を 8 週間連日投与し、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score、肝組織中の脂肪酸組成、および Δ^5 デサチュラーゼ index を評価した。Exendin-4 投与群はコントロール群と比較し、有意な体重増加の抑制と NAFLD activity score の低下を認めた。Exendin-4 投与群の肝組織中の長鎖脂肪酸値および n-6 系不飽和脂肪酸値は、コントロール群と比較して有意に高値であった (23240 ± 955 vs. 31710 ± 8436 $\mu\text{g/g}\cdot\text{liver}$, $P < 0.05$; 16166 ± 943 vs. 23937 ± 7845 $\mu\text{g/g}\cdot\text{liver}$, $P < 0.05$)。一方、Exendin-4 投与群の肝組織中 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 (31.1 ± 12.4 vs. 10.5 ± 3.1 , $P < 0.05$)。本研究により、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、肝臓における脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が exendin-4 による NASH 改善の一機序である可能性が示唆された。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) は欧米諸国だけでなく、本邦においても急速に増加している肝疾患である。他方、消化管は、門脈を介して肝臓と臓器相関を形成しており、様々な肝疾患の発症に関わる。

消化管は、栄養素の消化・吸収を司るとともに、消化管ホルモンにより全身の代謝調節に関与する。なかでも、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、糖・脂質代謝に深

く関わる消化管ホルモンである。GLP-1 受容体は膵 β 細胞や心筋細胞だけでなく、肝細胞にも同定されており、これまでに GLP-1 は、protein kinase C 活性化や peroxisome proliferator-activated receptor α の活性化を介して肝癌細胞内の中性脂肪含量を減少することが報告されている。

中性脂肪を構成する多価不飽和脂肪酸の一部は、律速酵素であるデサチュラーゼにより代謝され、炎症反応を制御するエイコサノイドの前駆体となる。n-3 系多価不飽

和脂肪酸はロイコトリエン B5 を含む炎症抑制性エイコサノイドの前駆体である。一方、n-6 系多価不飽和脂肪酸は、プロスタグランジン E2 を含む炎症促進性エイコサノイドの前駆体である。このように脂肪酸組成は炎症と密接に関係するが、NASH における GLP-1 と脂肪酸組成の関連未だ不明である。

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。

B. 研究方法

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下記 24 の脂肪酸を測定し

た。ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ リノレン酸、リノレン酸、アラキジン酸、イコセン酸、イコサジエン酸、5,8,11-エイコサトリエン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘニン酸、エルカ酸、ドコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、リグノセリン酸、ドコサヘキサエン酸、ネルボン酸

脂肪酸分類

脂肪酸分画の結果より、下記に従い脂肪酸を分類した。

アテローム性飽和脂肪酸：ラウリン酸、ミリスチン酸、およびパルミチン酸の総和

血栓形成性飽和脂肪酸：ミリスチン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸の総和

中鎖飽和脂肪酸：ラウリン酸、ミリスチン酸、およびパルミチン酸の総和

長鎖飽和脂肪酸：ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘニン酸、およびリグノセリン酸の総和

n-3 系多価不飽和脂肪酸：リノレン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸の総和

n-6 系多価不飽和脂肪酸：リノール酸、 γ リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ γ リノレン酸、アラキドン酸、およびドコサテトラエン酸の総和

Δ^5 デサチュラーゼ index：アラキドン酸/ γ リノレン酸

データは実数もしくは平均±SDにて記載した。体重の経時的変化は、two-factor repeated measures ANOVAにて検定した。2群間の比較は Wilcoxon rank sum test を用いて検定した。P 値が 0.05 以下の場合を統計学的に有意と判断した。

(倫理面の配慮)

本研究は、本学倫理委員会および動物倫理委員会の承認を得て開始した。本研究では、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および日本学術会議策定の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき実験を遂行した。屠殺は「動物の殺処分方法に関する指針」準拠して、可能な限り処分動物に苦痛を与えない方法を用いた。

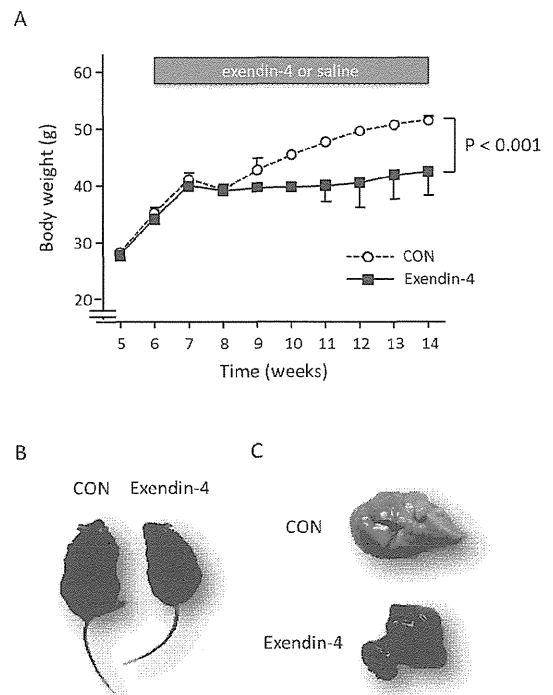
C. 研究結果

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 (図 1A, $P < 0.001$, 図 1B)

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 (図 1C)。

図1



② 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 (図 2A)。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 (図 2B)。

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 (表 1)。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