

特記なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Okajima C, Arii S, Tanaka S, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M. Prognostic role of Child-Pugh score 5 and 6 in hepatocellular carcinoma patients who underwent curative hepatic resection. *American Journal of Surgery*, 2015;209(1):199-205.
- 2) 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*, 2014;49(9): 1352-1361.
- 3) Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Arii S. Age-related clinicopathological and molecular features of patients received curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *American Journal of Surgery*, 2014;208(3):450-456.
- 4) 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*, 2014;21(4):1314-1322.
- 5) Matsunaga H, Tanaka S, Aihara A, Ogawa K, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Arii S,

Tanabe M. A novel therapeutic combination targeting sequentially Aurora B and Bcl-xL in hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, in press.

- 6) Tanaka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer. *Annals of Surgical Oncology*, in press.
- 7) Tanaka S. Cancer stem cells as therapeutic targets of hepato-biliary-pancreatic cancers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, in press.

2.学会発表

- 1) 田中真二、藍原有弘、田邊稔. 高度進行肝細胞癌に対するconversion治療の解析と術後高度進行再発に対する治療開発. 第100回日本消化器病学会総会、東京、2014 (パネルディスカッション)
- 2) 田中真二、松村聡、田邊稔. 肝切除症例における非ウイルス性DM関連肝癌の分子特異性の解明. 第50回日本肝臓学会総会、2014 (パネルディスカッション)
- 3) 田中真二. ゲノム・エピゲノム解析に基づく肝癌診療の将来展望 (コメンテーター). 第50回日本肝臓学会、宇都宮、2014 (パネルディスカッション)
- 4) Tanaka S. "Novel molecular targets and therapeutic combinations in hepatocellular carcinoma; rationale and significance" (invited lecture), 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium, Kyoto, 2014 (Early Morning Breakfast Workshop)
- 5) Tanaka S, Aihara A, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Arii S, Tanabe M. Molecular targeted therapy for

- major vascular invasiveness of hepatocellular carcinoma. 第26回日本肝胆膵外科学会、和歌山、2014 (シンポジウム)
- 6) 田中真二、藍原有弘、松村聡、伴大輔、入江工、落合高德、工藤篤、中村典明、有井滋樹、田邊稔. 肝癌臨床および代謝解析に基づく難治性機序解明と癌幹細胞性を標的とする前臨床試験. 第69回日本消化器外科学会総会、郡山、2014 (ワークショップ)
- 7) Tanaka S, Adikrisna R, Mogushi K, Matsunaga H, Matsumura S, Aihara A, Ochiai T, Tanaka H, Yamaoka S, Arii S. Visualized cancer stem cells for analysis of heterogenic expansion and microenvironments with tumor-host interaction. 第73回日本癌学会総会、横浜、2014 (シンポジウム)
- 8) 田中真二、中尾圭介、有井滋樹. 難治性肝癌を予測するバイオマーカーの探索と治療応用. 第12回日本消化器外科学会大会、第22回日本消化器関連学会週間、神戸、2014 (シンポジウム)
- 9) 田中真二、勝田絵里子、田邊稔. 高齢者肝癌切除症例の臨床病理と遺伝子発現パターン解析に基づいた応用展開. 第18回日本肝臓学会大会、第22回日本消化器関連学会週間、神戸、2014 (ワークショップ)
- 10) 田中真二、勝田絵里子、田邊稔. 膵神経内分泌腫瘍の癌幹細胞解析に基づいた新規分子標的治療の開発. 第56回日本消化器病学会大会、第22回日本消化器関連学会週間、神戸、2014 (ワークショップ)
- 11) Tanaka S, Ogawa K, Murakata A, Mogushi K, Matsumura S, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S, Tanabe M. Preclinical studies of EpCAM-targeted therapy for human hepatocellular carcinoma with specific inhibition of stem cell features. 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, USA, 2014
- 12) Tanaka S, Ogawa K, Matsumura S, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Arii S, Tanabe M. A preclinical study of EpCAM-targeted therapy for human hepatocellular carcinoma with stem cell features. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver diseases, Boston, USA, 2014
- 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

肝発癌における PPAR- α の役割に関する研究

研究分担者 西原 利治 高知大学 教授

研究要旨： 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、MC4RK0 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。MC4RK0 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た。従来、線維化は中心静脈の血管内皮下にある線維芽細胞の活性化を契機に始まると想定されてきた。今回の検討でも確かに、肝細胞の脂肪化の強い小葉中心部から最初の線維化は始まった。しかし、その部位は中心静脈の血管内皮直下ではなく、血管内皮から肝細胞数個分離れた部位の星細胞の活性化がまず選択的に生じ、中心静脈を鞘状に包み込むように細かな線維化巣の形成が伸展するものであった。従って、今後、この特定部位における星細胞の活性化機序を明らかにし、治療に応用する必要がある。

A. 研究目的

近年の肥満人口の増加を背景に生活習慣病罹患患者数は増加の一途を辿り、脂肪肝の有病率は3割を超えている。脂肪肝の誘因にはアルコール性の他にも、過栄養性、低栄養性、内分泌異常に伴うものなど多岐にわたる。中でも最も重要な誘因は過量飲酒と過食・運動不足に伴う肥満である。

アルコールの過剰摂取は脂肪肝以外にも進行性の肝障害を引き起こすことは周知の事実であるが、肥満と運動不足でも時に進行性の肝障害を生じ、アルコール性肝障害と見まがう肝臓の病理学的所見を呈することがある。このため、アルコール性肝障害に対して、肥満と運動不足を背景に発症する肝病変は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と呼ばれ、脂質異常症や高血圧、

糖尿病と言った生活習慣病の誘発と進展に重要な働きをすることが示されている。

これは、脂肪肝では肝細胞に過剰な中性脂肪が貯まるため、インスリンに対する感受性が低下し、高インスリン血症を伴い易いからである。高インスリン血症は肝細胞における脂肪酸の合成を促進し、腎では Na の再吸収を促進し、上記の合併症の基盤となる代謝異常を惹起する。さらに、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し、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、昨年度は 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ことを、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 : MC4RK0) と MC4R/PPAR- α double KO マウスとを比較対照することにより明らかにした。そこで、本年は、MC4RK0 の線維化進展過程における特徴的な病理変化を始めて明らかにしたので報告する。

B. 研究方法

雄性 MC4RK0 マウス 10 匹を高脂肪食で 4 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。

(倫理面の配慮)

本検討は高知大学医学部倫理委員会の指導と承認のもとに、実験動物の苦痛が最少となるように配慮して行われた。

C. 研究結果

MC4RK0 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。MC4RK0 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る。今回の検討でも、肝細胞の脂肪化の強い小葉中心部から最初の線維化は始まった。しかし、その部位は中心静脈の血管内皮直下ではなく、中心静脈を鞘状に包み込むように血管内皮から肝細胞数個分離れた部位の星細胞の活性化がまず選択的に生じ、細かな線維化巣の形成が小葉中心と小葉辺縁の 2 方向に向けて伸展することが明らかになった。この様式は肝炎ウイルス感染症にお

ける肝臓の線維化伸展様式と明らかに異なる未知の線維化機序であり、同じく中心静脈領域から線維化が伸展するとされるアルコール性肝障害の線維化過程との異同を明らかにする必要がある。

D. 考察

MC4R 遺伝子に異常が生じるとマウスでもヒトと同様に幼児期より高度肥満を呈する。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。

今回、中心静脈周囲性の肝細胞を取り囲む特徴的な pericellular fibrosis がどのように形成されるか、MC4RK0 マウスであきらかになったので、この成績がヒトに外挿可能であれば、pericellular fibrosis を標的とする治療法の開発は NASH 治療の新たな option に繋がるのではないかと考えられた。

E. 結論

遺伝性 NASH モデルである MC4RK0 マウスを用いて、pericellular fibrosis の最初期の病変を観察し、そこから小葉中心および小葉辺縁に向けて 2 方向性に線維化巣が進展する様子を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, Saibara T, Oben JA. Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol* 2014;49:1065-1073
- 2) Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2014;49:1163-1174
- 3) Kessoku T, Ogawa Y, Yoneda M, Imajo K, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Chayama K, Tanaka S, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Itoh Y, Nakajima A, Okanoue T; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:10108-10114.
- 4) Tanaka K, Hyogo H, Ono M, Takahashi H, Kitajima Y, Ono N, Eguchi T, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T, Anzai K, Eguchi Y, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). The upper limit of normal serum alanine aminotransferase levels in Japanese subjects. *Hepatol Res* 2014;44:1196-1207
- 5) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Aikata H, Tanaka S, Kanemasa K, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. *J Gastroenterol* 2014; 49:1477-1484.
- 6) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A, Nakamura M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H. Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 2014;44:1299-1307
- 7) 西原利治, 廣瀬享, 小笠原光成 : NASH の疾患概念最新醫學 2014;69(9) :1791-1794
- 8) 小野正文、西原利治 肝臓の糖代謝 糖尿病 2014;6:6-11

2. 学会発表

- 1) Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Saibara T. PRDX1 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion by modulating P38 MAPK activity. UEG Week 2014, Vienna, Austria, 2014

2) Ohmi S, Ono M, Nishi Y, Hirano S, Tsugita S, Takata H, Yoshimura K, Mori S, Terada Y, Saibara T, Fujimoto S. Correlation between glucose intolerance and histological severity in non-alcoholic fatty liver disease. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions 2014, San Francisco, US, 2014

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

3. その他

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 分子糖尿病科学講座 特任教授

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。本研究では、正常状態で摂食により誘導される Sdf2l1 がコシャペロン分子であり、摂食によって誘導される ER ストレスを終息させるのに必須の因子であることを見いだした。実際、肥満動物モデルでは肝臓での Sdf2l1 の発現が低下しており、その補充によって ER ストレスが軽減し血糖値や脂肪肝が改善する。また、肝臓特異的 Sdf2l1 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、Sdf2l1 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示唆された。糖尿病合併 NASH において、癌発症抑制にどのような糖尿病治療が最適であるかを動物モデルを用いて検証した。

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 が密接に影響し合って NASH の病態が確立すると言う仮説のもとに、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。また、糖尿病合併 NASH において、病期の進展や肝癌への進行を抑制する最適な糖尿病治療法を明らかにする。

B. 研究方法

①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。③糖尿病 NASH モデルマウスとして STAM マウスを用い、インスリン、フロリジン、ストレプトゾトシン投与にて NASH、肝癌の進展を解析した。

(倫理面の配慮)

①、③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。②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、個人情報保護される。

C. 研究結果

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。Sdf2l1 の ER ストレス終息作用は、BIP と協調して増大することが判明した。②糖尿病患者の肝臓では、XBP-1, BIP, CHOP, Sdf2l1 など ER ストレス終息シグナルの発現が低下しているほど、NASH の進展が認められた。③インスリンやフロリジンの治療で、STAM マウスの NASH 進展が抑制されることが判明した。

D. 考察

これまでの検討から、Sdf2l1 は、肝臓において BIP と協調して、ER ストレスを終息させると考えられる。その発現誘導は、肝臓でのインスリンシグナルが十分にあることが必要であり、Sdf2l1 の発現低下がインスリン作用を低下させるという悪循環を形成していることが、マウスおよびヒト検体の解析から示唆された。糖尿病 NASH モデルマウスについては、血糖値の改善が NASH の進展を抑制していることが示唆され、肝臓進展の抑制には肝臓での適正なインスリン作用の改善も必要である可能性も示唆された。

E. 結論

Sdf2l1 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、適正なインスリンシグナルがその誘導には必要である。その誘導障害はインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積などを進行させる悪循環を引き起

こし、NASH 病態を進展させる。糖尿病 NASH においては、肝臓でのインスリン作用を適正に改善し血糖コントロールを良好に保つことで NASH の病期進展や肝臓の発症を抑制できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto S, Kubota N, Sato H, Sasaki M, Takamoto I, Kubota T, Nakaya K, Noda M, Ueki K, Kadowaki T: Insulin Receptor Substrate-2 (Irs2) in Endothelial Cells Plays a Crucial Role in Insulin Secretion. *Diabetes* 2014 Oct 2. pii: DB_140432. [Epub ahead of print]
- 2) Moller JB, Dalla Man C, Overgaard RV, Ingwersen SH, Tornøe CW, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Ueki K, Lynge J, Vasconcelos NM, Pedersen BK, Kadowaki T, Cobelli C: Ethnic differences in insulin sensitivity, beta-cell function, and hepatic extraction between Japanese and Caucasians: a minimal model analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4273-4280.
- 3) Awazawa M, Futami T, Sakada M, Kaneko K, Ohsugi M, Nakaya K, Terai A, Suzuki R, Koike M, Uchiyama Y, Kadowaki T, Ueki K: Deregulation of Pancreas-Specific Oxidoreductin ERO1beta in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Mol Cell Biol* 2014;34:1290-1299

2. 学会発表

- 1) 植木浩二郎 糖尿病の薬物療法と発癌リスク 第49回糖尿病学の進歩 2015年 岡山 (シンポジウム)
- 2) 植木浩二郎 高血糖・インスリン作用がNASH肝癌発症に及ぼす影響 第35回日本肥満学会学術集会 2014年 宮崎 (シンポジウム)
- 3) 植木浩二郎 糖尿病とNASH・肝癌 第29回日本糖尿病合併症学会 2014年 東京 (シンポジウム)
- 4) 添田光太郎、戸田郷太郎、笹子敬洋、門脇孝、植木浩二郎 NASH合併糖尿病における適切なインスリン補充は肝発癌を抑制しうる 第1回肝臓と代謝研究会 2014年 東京 (シンポジウム)

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

3.その他

なし

C 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 型肝炎肝発癌における代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討した。HCV-1b Core aa70 Mutant 定量(Q-Invader assay 法)は *IL28B* 遺伝子多型や肝線維化進行度を含む宿主要因と関連しながら経時的に変化し、肝発癌指標の AFP 値とも相関していた。肝発癌例の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示し、aa70 Mutant 変化量には代謝要因の関与が示唆された。SVR 後発癌例でもウイルス排除前の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示し、代謝・ウイルス要因が肝発癌期間に影響する可能性も示唆された。aa70 Mutant 定量法で経時的に定量推移を評価することが肝癌危険群の早期指摘に有用な可能性がある。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。特に、HCV-1b Core aa70 Mutant が肝発癌に影響することを報告してきた。本年度は、宿主・代謝要因と aa70 Mutant 定量(Q-Invader assay 法)との関係、肝発癌における代謝・ウイルス要因の影響に関して、aa70 Mutant 定量系の成績も含めて検討した。

B. 研究方法

(検討 1) aa70 Mutant 定量測定可能であった 151 例を対象として、代謝・宿主要因と aa70 Mutant 定量の関係を検討した。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・空腹時血糖・Body mass index(BMI)、宿主要因からは *IL28B* 遺伝子多型・肝線維化マーカーの Fibrotic score for hepatitis C(FSC)を含む 15 個の因子を検討した。

(検討 2) HCV RNA 持続陽性の状態から肝発癌した連続 43 例と、Sustained virological response(SVR; 治療終了後 24 週経過時点の HCV RNA 陰性状態)後に肝発癌した連続 17 例を対象として、肝発癌例における aa70 Mutant 定量の経時変化を検討した。

(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・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）aa70 Mutant 定量値が増加している症例では *IL28B* rs8099917 non TT の頻度が高く、肝線維化進行例(FSC4)の頻度も高くなる傾向が確認され($P < 0.001$; Chi-squared test)、aa70 Mutant 定量は宿主要因と関連しながら経時的に変化する可能性が示唆された。更に、aa70 Mutant 定量値の増加に伴い AFP 値も増加する傾向が確認され($P = 0.003$; Kruskal Wallis test)、aa70 Mutant 定量は肝発癌の一指標として有用な可能性が示唆された。

（検討 2）HCV RNA 持続陽性の状態からの肝発癌例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、発癌 10 年前 30%、発癌 5 年前 65%、発癌 1 年前 80%。肝発癌例の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示した。この様に定量法で経時的に定量推移を評価することが肝癌危険群の早期指摘に有用な可能性がある。初診時背景因子の中で、総コレステロール高値($P = 0.059$)、LDL コレステロール高値($P = 0.007$)、HDL コレステロール低値($P = 0.012$)、BMI 高値($P = 0.035$)の症例では aa70 Mutant 変化量が大きい傾向が確認された(Chi-squared test)。特に、初診時 BMI は aa70 Mutant 変化量と正の相関を示す傾向が確認された($r = 0.539$, $P = 0.001$; Spearman rank correlation test)。この様に脂質要因が aa70 Mutant 変化量に影響する可能性が示唆された。

SVR 後に肝発癌した症例における aa70

Mutant 定量中央値の推移は、SVR5 年前 45%、SVR 直前 95%。SVR 後肝発癌例の aa70 Mutant 定量値も経時的に増加傾向を示した。SVR 前で最終治療時の HDL コレステロール値は aa70 Mutant 定量値と負の相関を示す傾向が確認された($r = -0.824$, $P < 0.001$; Spearman rank correlation test)。更に、肝発癌までの期間に影響する要因を検討すると、空腹時血糖が高い症例($P = 0.004$)、aa70 Mutant 定量が多い症例($P = 0.045$)で肝発癌までの期間が短い傾向にあった(Mann-Whitney U test)。この様に代謝要因とウイルス要因が SVR 後肝発癌例の発癌期間に影響する可能性が示唆された。

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。

今回の肝発癌例のみの検討では、肝発癌の 10 年前より既に aa70 Mutant 定量値が増加傾向を示し、その変化量には代謝要因の関与が示唆された。更に、SVR 後発癌例でもウイルス排除前の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示し、代謝・ウイルス要因が肝発癌期間に影響する可能性が示唆された。この様な、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という成績は、イニシエーターとしての HCV が排除される前段階で

既に **aa70 Mutant** の症例では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。即ち、Core アミノ酸置換は肝発癌の Surrogate marker としての役割を担っている可能性があるといえる。今後は、**aa70 Mutant** 定量値の推移に影響している代謝要因も加味しながら総合的にウイルス・代謝・宿主要因と肝発癌との関係性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、今後は更に症例数を増やして、非発癌例における **aa70 Mutant** 定量値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) **aa70 Mutant** 定量は宿主要因と関連しながら経時的に変化する可能性が示唆され、肝発癌の指標の AFP 値とも関連していた。

(検討 2) 肝発癌例の **aa70 Mutant** 定量は経時的に増加傾向を示し、定量法は肝癌危険群の早期指摘に有用な可能性がある。**aa70 Mutant** 変化量に代謝要因の関与が示唆された。更に、代謝要因とウイルス要因が SVR 後肝発癌例の発癌期間に影響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, 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, 2014.

2) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Evolution of simeprevir-resistant variants over time by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1b. *J Med Virol* 2014;86:1314-22.

3) Sezaki H, Suzuki F, Hosaka T, Akuta N, Fukushima T, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Effectiveness and safety of reduced-dose telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2014;44:163-171.

4) Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Impact of virus clearance for the development of hemorrhagic stroke in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2014;86:169-175.

5) Ikeda K, Kawamura Y, Kobayashi M, Fukushima T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Prevention of disease progression with anti-inflammatory therapy in patients with HCV-related cirrhosis: a Markov model. *Oncology* 2014;86:295-302.

2. 学会発表

1) Akuta N, Suzuki F, Sorin Y, Fukushima T,

Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Clinical utility of NS3/4A protease inhibitor-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. The 65th Annual Meeting of the

American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA. 2014.

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

非アルコール性脂肪性肝炎関連肝がんマウスモデルにおける DPP4阻害剤の肝がん抑制効果に関する研究

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：非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis; NASH）は、肝炎ウイルスとともに主要な肝がんの成因であり、高頻度に糖尿病を合併している。血糖値の調節には消化管ホルモン”glucagon-like peptide-1（GLP-1）”とその失活酵素である dipeptidyl deptidase-4（DPP-4）のバランスが重要である。本研究の目的は、DPP4阻害剤である sitagliptin が NASH 肝癌肝がんマウスモデル（STAM[®]マウス）の NASH および肝がんにおよぼす影響を検討することである。我々は、8週齢の STAM[®]マウスに対し、sitagliptin 30mg/kg（n=8）もしくは蒸留水（n=8）を10週間連日投与した。Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に肝重量に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の肝体重比は Vehicle 群と比較し有意に低値であった（ $P < 0.01$ ）。また、Sitagliptin 群の NAFLD activity score は、Vehicle 群と比較して有意に低値であった（ $P < 0.05$ ）。造影 CT 検査の結果、Vehicle 群と Sitagliptin 群の間で肝腫瘍が発生した個体数に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の腫瘍数と腫瘍容積は Vehicle 群と比較して有意に低値であった（ $P < 0.01, P < 0.05$ ）。本研究により、sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルの NASH を改善するだけでなく、肝発がんに対しても抑制的に作用することが明らかとなった。本研究の結果より、DPP4 の活性阻害は NASH 関連肝癌の新規治療戦略とな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、C型慢性肝疾患とともに、本邦における主要な肝がんの成因である。NASH から肝がんへの進展には様々な代謝異常が関与するが、なかでも糖尿病の合併は肝発がんに関与する。

血糖値の調節には食事摂取量に応じて分泌される消化管ホルモンが重要である。

Glucagon-like peptide-1（GLP-1）は回腸末端の L 細胞から分泌される消化管ホルモンであり、膵β細胞からのインスリン分泌促進、膵α細胞からのグルカゴン分泌抑制、胃の内容物排出速度の遅延などの効果を有する。このように、GLP-1 の血中濃度が上昇することで食後の血糖上昇は抑制されるが、その作用はセリンプロテアーゼである dipeptidyl deptidase-4（DPP-4）により不活化されるため、GLP-1 の半減期は約

2分と短い。

近年、消化管ホルモンをターゲットとした糖尿病治療薬が日常臨床で広く用いられている。DPP4阻害剤はDPP4によるGLP-1の不活化を抑制して血糖値を低下させる薬剤である。また、DPP4はperoxisome proliferator-activated receptor α の不活化やsterol regulatory element binding protein-1cの活性化を介した脂肪蓄積作用を有する。そのため、DPP4阻害剤は、脂肪蓄積に抑制的に作用することでNASHの改善効果が期待される。さらに、動物実験では、DPP4阻害剤による抗酸化ストレス作用を介した大腸がんの発症予防効果も報告されている。このように、DPP4阻害剤はNASH関連肝がんに対しても抑制的に作用すると考えられるが、いまだその効果は不明である。

本研究の目的は、DPP4阻害剤がNASH肝癌肝がんマウスモデルのNASHおよび肝がんにおよぼす影響を検討することである。

B. 研究方法

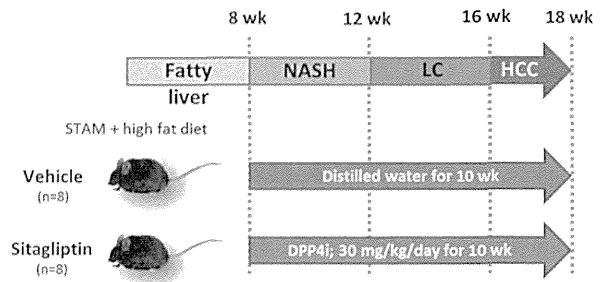
実験動物

NASH関連肝がんモデルであるSTAM[®]マウス（株式会社ステリック再生医科学研究所；東京）を用いた。

DPP4阻害剤（Sitagliptin）の投与方法と投与量

8週齢のSTAM[®]マウスに対し、sitagliptin 30mg/kg（n=8）もしくは蒸留水（n=8）をゾンデにより1日1回、10週間連日投与した（図1）。

図1. 実験計画



生存確認

全個体に対して実験期間中連日午前9時～11時の間に生存を確認した。

体重測定

全個体に対して実験期間中連日午前9時～11時の間に測定した。

摂餌量測定

各ゲージにマウス4匹を飼育した（各群2ゲージ）。全ゲージにおいて、餌の交換時（午前9時～11時；週3回）に摂餌量を測定した。

肝腫瘍評価：CT撮影

16週齢時に全個体についてネンブタールにて麻酔を施行したのち、肝臓を撮影した。その後、イオパミロン（Bayer Health Care AG）を尾静脈より投与し、再び肝臓を撮影した。造影後期相のみにて低吸収域として描出される結節を肝腫瘍と定義し、CT解析ソフト（Onis, DigitalCore. Co. Ltd.）を用いて肝腫瘍の個数と腫瘍の容積を評価した。

肝重量と肝外観

18 週齢時に全個体を心採血により屠殺し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は電子天秤（株式会社 島津製作所 AUW22D 型）を用いて肝重量を測定した。また、デジタルカメラを用いて肉眼的に肝外観の状態を評価した。

肝組織像

摘出した肝臓は、パラフィン包埋後、ミクロトームにて薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（H & E）にて染色した。

NAFLD Activity Score (NAS)

H & E 染色した肝組織の①脂肪化の程度 (steatosis)、②肝細胞風船様腫大 (hepatocellular ballooning)、③実質炎症 (lobular inflammation) のを評価し、既報 (Brunt EM et al. Am J Gastroenterol. 1999;94:2467-74) に従って NAS を評価した。

統計

平均値の差の検定は Student-t test 法を用いて検討した。生存率の検定は Kaplan-Meier 法を用い、log-rank test にて検討した。P 値が 0.05 未満である場合に統計学的に有意差があると判断した。

(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（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、改定

平成 23 年 8 月 30 日法律第 105 号）」、「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（平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号）」、「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（日本学術会議，平成 18 年 6 月 1 日）」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

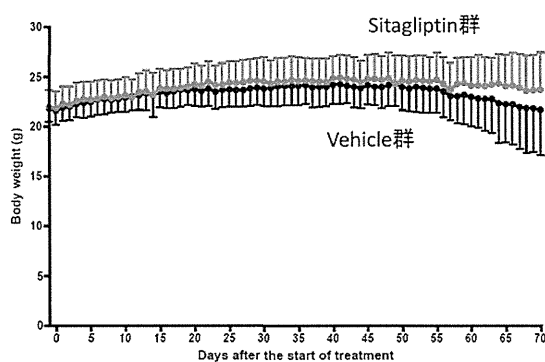
1) 生存率

Vehicle 群および Sitagliptin 群、いずれの群においても実験終了時まで死亡した個体は認めなかった。

2) 体重推移

観察期間中を通して、Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に体重の有意な差は認めなかった（図 2）。

図 2. 体重の変化

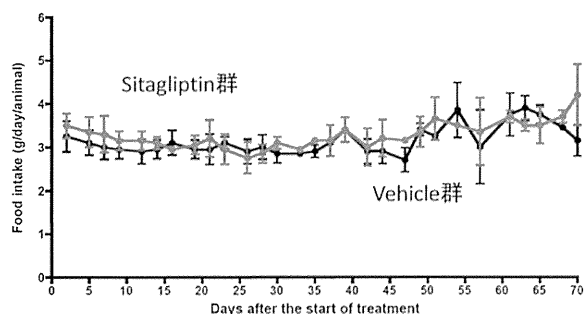


3) 摂餌量

観察期間中を通して、Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に摂餌量の有意な差は認め

めなかった (図 3)。

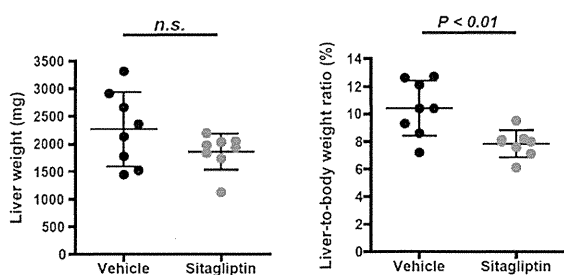
図 3. 摂餌量



4) 肝重量・肝体重比

Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に 18 週齢時の肝重量に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の肝体重比は Vehicle 群と比較し有意に低値であった ($P < 0.01$) (図 4)。

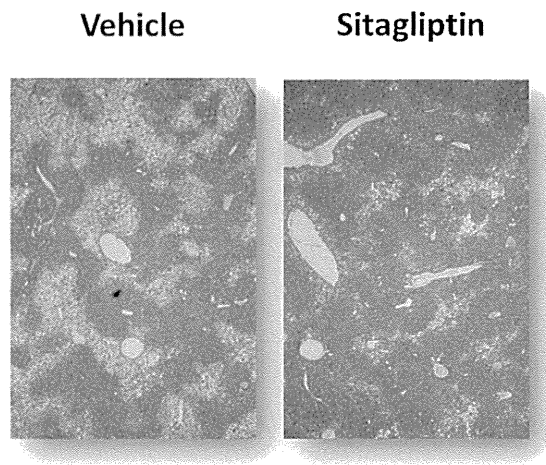
図 4. 肝重量・肝体重比の変化



5) 肝組織

18 週齢時、Vehicle 群の肝組織には中心静脈周囲の肝細胞に著名な脂肪滴の沈着が認められた。一方、Sitagliptin 群は、Vehicle 群と比較して肝細胞における脂肪滴の沈着が抑制されていた (図 5)。

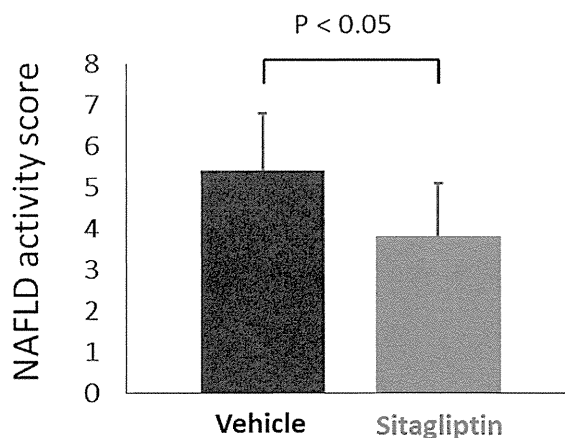
図 5. 肝組織



5) NAS

18 週齢時、Sitagliptin 群の NAS は、Vehicle 群と比較して有意に低値であった (図 6)。

図 6. NAFLD activity score

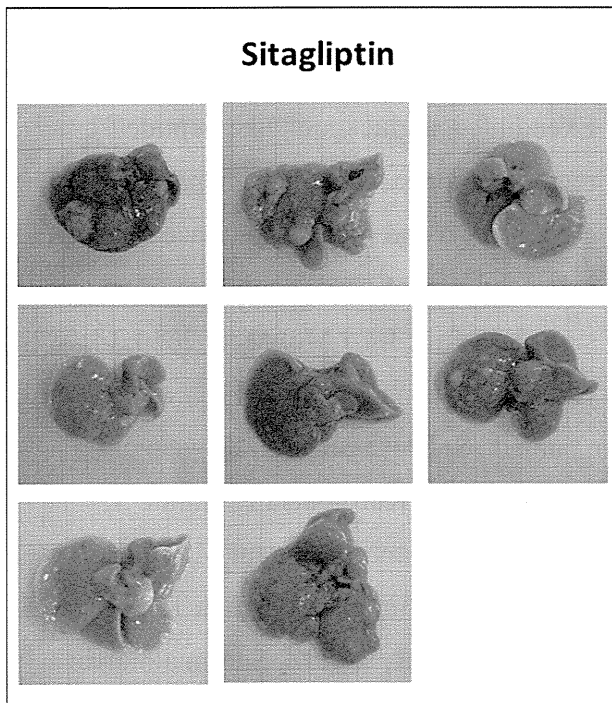
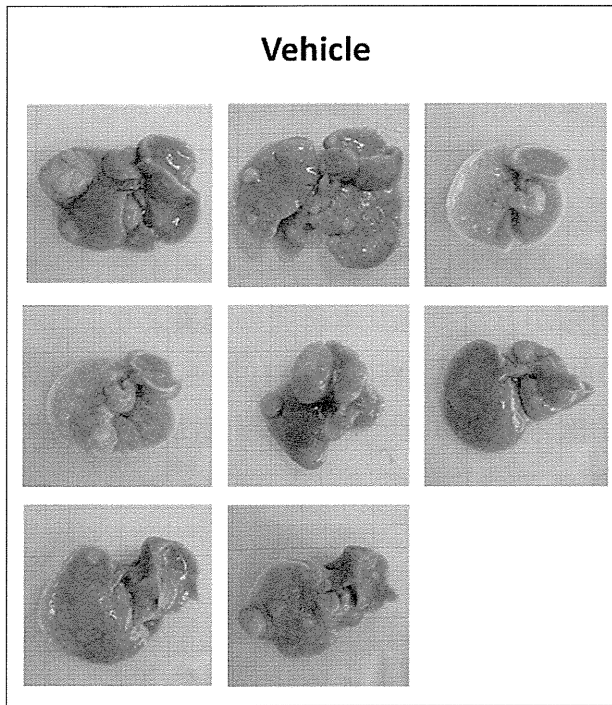


5) 肝腫瘍

①肉眼所見

Sitagliptin 群の肝腫瘍は Vehicle 群と比較して、腫瘍径が小さく、腫瘍数が少なかった (図 7)。

図 7. 肝肉眼所見



②造影 CT

Vehicle 群と Sitagliptin 群の間で、肝腫瘍が発生した個体数に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の腫瘍数と腫瘍容積は

Vehicle 群と比較して有意に低値であった (図 8・表 1)。

図 8. 造影 CT

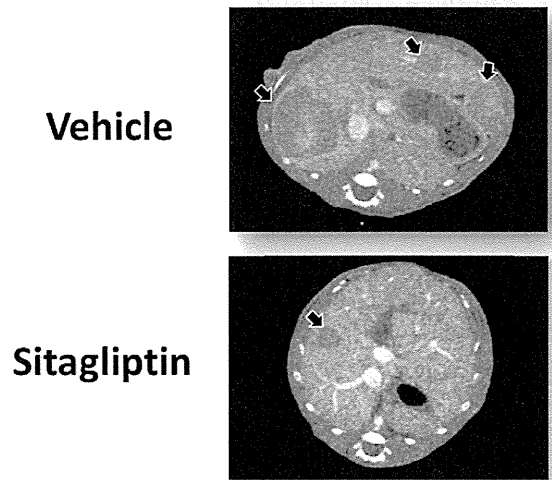


表 1. 肝腫瘍発生個体、肝腫瘍数、肝腫瘍容積

	Vehicle	Sitagliptin	P
Incidence of tumor	100% (8/8)	87.5% (7/8)	N.S.
Number of tumor	4.5 ± 1.7/liver	1.8 ± 1.2/liver	0.0057
Volume of tumor	37.5 ± 72.5 mm ³ /liver	11.2 ± 20.8 mm ³ /liver	0.0338

D. 考察

本研究により、DPP4 阻害剤である sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝細胞の脂肪沈着を抑制した。また、sitagliptin は、同モデルマウスの肝発がんに対し抑制的に作用することが明らかとなった。

DPP4 阻害剤である sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝細胞の脂肪沈着を抑制した。本研究では sitagliptin による脂肪肝抑制の機序は明ら

かではないが、DPP4 阻害剤の投与により本マウスモデルの活性型 GLP-1 濃度は上昇していると考えられる。これまでに、GLP-1 アナログ製剤は ob/ob マウスのインスリン抵抗性と脂肪肝を改善することが報告されている (Ding X et al. *Hepatology*. 2006;43:173-81.)。また、肝細胞には GLP-1 受容体が発現していることも報告されている (Gupta NA et al. *Hepatology*. 2010;51:1584-92.)。さらに、我々は、基礎的研究にて GLP-1 が肝細胞の脂肪分解に関わる AMP キナーゼを活性化しインスリン抵抗性を改善することを明らかにしてきた。以上の研究結果より、DPP4 阻害剤は GLP-1 の作用を増強し、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝細胞への脂肪沈着を抑制することが推察される。

Sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルの肝発がんに対し抑制的に作用した。sitagliptin による脂肪肝抑制の機序は明らかではないが、DPP4 阻害剤は前述のごとく活性型 GLP-1 濃度は上昇させ、インスリン抵抗性を改善していると考えられる。インスリンは細胞増殖作用を有するホルモンであり、インスリン抵抗性は肝発がんのリスクファクターである。以上より、DPP4 阻害剤はインスリン抵抗性を是正することで肝発がん抑制的に作用すると考えられる。また、Stecca らはヒト肝癌組織中の DPP4 の発現が亢進していることを報告している (*J Hepatol*. 1997;27:337-45)。DPP4 は血管新生の開始と維持に必要な分子であり、DPP4 阻害剤は血管新生の抑制を介して肝腫瘍に対して抑制的に作用する

ことが推察される。

E. 結論

本研究により、DPP4 阻害剤である sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルの NASH を改善するだけでなく、肝発がんに対しても抑制的に作用することが明らかとなった。本研究の結果より、DPP4 の活性阻害は NASH 関連肝癌の新規治療ストラテジーとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawaguchi T, Ito M, Taniguchi E, Sata M. Exendin⁴, a glucagon²-like peptide¹ receptor agonist, modulates hepatic fatty acid composition and Δ^5 -desaturase index in a murine model of non²-alcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Med*. 2014;34:782-787.
- 2) Yamada S, Kawaguchi A, Kawaguchi T, Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M. Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis. *Hepatol Res*. 2014;44:837-845.

2. 学会発表

- 1) 小野正文、川口巧、西原利治. CGMS から見た NAFLD と C 型慢性肝炎の耐糖能異常の特徴と比較検討、第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.
- 2) 住江修治、川口巧、佐田通夫. ピオグリタゾンの HCV 関連肝細胞癌再発抑制における有効性の検討、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.
- 3) 天野恵介、川口巧、桑原礼一郎、緒方啓、宮島一郎、有永照子、井出達也、鳥村拓司、佐田通夫. HB s 抗原陽性肝癌患者におけるウイルス・宿主・環境因子の変化：2000 年～2012 年の年次推移、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.
- 4) 谷口英太郎、川口巧、鳥村拓司. NAFLD 患者の肝線維化進展に関連する因子：生活習慣や体組成を含めた包括的検討、第 104 回日本消化器病学会九州支部例会、大分、2014.

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

3. その他

なし