

令和元年5月27日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01406

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪肝炎の診断と発癌リスク分析に向けた脂肪酸音響マッピングの創成

研究課題名(英文) Identification of nonalcoholic steatohepatitis and risk assessment of cancer development by using acoustic investigation

研究代表者

丸山 紀史 (MARUYAMA, Hitoshi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：90375642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、超音波音響特性に基づいた非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の診断と発癌リスク分析を可能とする新たな肝組織脂肪酸マッピングを創成することを目的とした。マウスならびに臨床例における検討で、NASH群では単純性脂肪肝群に比べて組織インピーダンス値が有意に低値であり、肝組織における脂肪酸組成と脂肪酸自体の音響特性を反映したものであった。また発癌については、高分化癌発癌例は非発癌例に比べて、非腫瘍部における組織インピーダンス値が低い傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の成果は、実臨床における脂肪関連肝疾患の診断と発癌リスク患者の囲い込みに極めて有用である。すなわち、単純性脂肪肝とNASHの鑑別において不要な肝組織生検検査を回避することが可能となり、発癌高危険群に対しては相応の診療を提供することができる。今後の急増が予想されるNASHに対して、脂肪酸マッピングを基盤とした超音波という非侵襲的な手法を応用することで、健診・検診の質や患者診療体制を飛躍的に向上させる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver disease is increasing worldwide, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) may be one of the most important treatment-resistant liver diseases. This project demonstrated the acoustic properties of NASH by comparing those of simple steatosis and control in the animal model and human subjects. The assessment using 80/250MHz transducer identified higher acoustic impedance in simple steatosis, and lower acoustic impedance in NASH as characteristic features. Also, lower impedance in the non-tumor liver tissue may feature a risk of cancer development in NASH. These acoustic properties were based on the intrahepatic composition of fatty acid which showed characteristic property in itself. These data may enhance the quality of noninvasive diagnosis of NASH and the risk stratification of cancer development.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝臓 超音波 脂肪酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームが増加の傾向を示し、一表現型としての脂肪肝が注目されている。脂肪肝の一部は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)と呼ばれ、肝硬変へと進展し肝癌の発症リスクも有する。脂肪肝と NASH の有病率については、最近の米国の研究で脂肪肝 46%、NASH12.2%以上、さらに糖尿病患者では脂肪肝 74%、NASH22.2%と報告されている[Gastroenterology 2011]。これは、従来から推定されている有病率よりはるかに高いもので、国際的かつ速やかな対応の必要性を強く示唆する。とくに NASH は肝線維化程度が軽い病期でも発癌が多いとされ、早期の段階での効率のよい診断が必要である。肝炎ウイルス対策が飛躍的に向上し食生活の欧米化が進む中、今後は NASH が主要な肝臓病として社会的に重要視される時代が確実に到来し、本疾患への対策を講じておくことは重要な課題である。

現在、NASH の診断は肝生検による侵襲的な組織診断が唯一の方法である。しかし侵襲性の低減を目指す昨今の医療事情を考慮すると、組織診断(肝生検)に依存した診断プロセスは可能な限り省略されるべきである。また最近、線維化程度に着目した NASH の画像診断の研究(肝弾性度測定、MRI など)が積極的に行われているが、これらの手法は病期の進行した患者を対象としており、早期診断を目指した戦略には合致しない。本疾患の頻度が高く増加傾向にあることから、非侵襲的な早期診断システムを構築し、多数例に対して広く施行可能な方法として社会に導入することが急務の課題といえる。

申請者は、脂肪関連肝疾患に対して低侵襲的な超音波画像診断を開発・導入するため、高周波超音波顕微鏡システムを利用して肝組織中の脂肪酸組成を音響学的に識別するという新たな試みを行ってきた。そして、オレイン酸のインピーダンスが他の脂肪酸(パルミチン酸、パルミトオレイン酸、リノール酸、リノレン酸)に比べて有意に低いという特異な音響学的特性を世界で初めて明らかにした[科研費 H25-27;丸山・他, 第 51 回日本肝臓学会総会; 山口・他, 第 88 回日本超音波医学会]。

しかしこれまでの研究は、5 種の脂肪酸のみを対象とした成果であり、臨床例における研究成果の報告もない。NASH 肝における脂肪酸組成は脂肪肝や正常肝と異なること[Hepatology2007; J Hepatol2008]、また不飽和脂肪酸と発癌との関連が示唆されていること[Gastroenterology2008; Hepatology2009]を考慮すると、音響特性による包括的な肝組織脂肪酸マッピングを構築することで、NASH 診断とその発癌リスク分析が可能になると推測される。

2. 研究の目的

本課題は、超音波音響特性に基づいた NASH の診断と発癌リスク分析を可能とする新たな肝組織脂肪酸マッピングを創成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪酸における音響学的特性の検討

in vitro での検討: 多種の脂肪酸(C4~C21、37 種を対象として選定)について、各種濃度(100-500uM)における音響学的特性(インピーダンス、 $\ln p$ 、 $\times 106\text{kg/m}^2/\text{s}$; 音速、m/s)を超音波顕微鏡システム(現有装置)によって計測した。

in vivo での検討: 培養細胞(Huh7)に対して各種脂肪酸処理を行い、音響学的特性を計測した。脂肪酸処理については、従来の検討結果を参考に 100-500uM の濃度で 9h の incubation time を標準条件とした[Lipids Health Dis 2014]。なお音響計測については、AMS-50SI 改(本多電子、計測範囲: 2.4mm x 2.4 mm, Point 300*300, Average 8, Tange 200mV, 印加電圧 21.5V(80MHz), 40.0V(250MHz))を使用して音響特性を検討した。なお、計測に際してはリファレンスとしての溶媒の特性を考慮した上で測定を行った。

脂肪酸の音響特性と分子構造の比較検討: 各脂肪酸の分子構造(炭素数、二重結合の数や位置、光学異性などの立体構造)の視点から、異なる音響特性に関わる分子生物学的因子を検討した。

(2) 脂肪関連肝疾患モデルマウスでの検討

STAM マウス(ステリック再生医科学研究所)を利用した。コントロールを含む各週齢のマウスを使用し、安楽死後に肝組織を採取して検討を行った。

肝組織像の検討: 脂肪化や線維化の程度、発癌の有無や程度について、肉眼的および標本作成後に鏡視下で検討した。

肝組織における音響特性の検討: 肝組織に対して、臓器摘出直後の非固定条件と固定後薄切標本の二通りの条件で検討した。各種音響特性を超音波顕微鏡にて分析した。

肝組織における各種脂肪酸の含有量解析: 各種脂肪酸の総量(遊離・エステル, $\mu\text{g/g}$)を、ガスクロマトグラフィー法(GC profiles, GC-2010 Plus)によって計測した。

[この脂肪酸分析については東レに委託する予定であったが、同業務の中止に伴い、SHIMAZU に委託した]。そして肝疾患別、非発癌モデルと発癌モデルとの差、また癌の進行度別で、非腫瘍部肝組織における脂肪酸の種類や含有差を検討した。

(3) 臨床検体における肝組織脂肪酸組成・音響学特性と肝組織所見ならびに発癌との関連の検討

対象については、当初は、超音波映像下での穿刺針による経皮的肝生検検体を利用する予定

であった。しかし、同検体での計測では、形状や容量の点から安定した計測には不適合であったため、当院外科との連携により手術検体を利用して検討することとなった。計 90 例の手術検体を収集し、その中で、患者背景や癌の進展度などを考慮して、30 検体を選択した。検体組織を、以下の 3 通りの方法で処理・保存して検討を行った。HE・アザン染色標本(4 μ)で組織所見を評価、未染標本(10 μ)で音響特性を計測、液体窒素保存(脂肪酸分析：東レ委託)。そして、脂肪酸種・含量と肝組織所見、脂肪酸種・含量と肝癌所見(分化度・進展度)、脂肪酸種・含量と超音波顕微鏡からみた各種音響所見との関連を検討した。

4. 研究成果

(1)脂肪酸単独と脂肪酸処理細胞における音響学的特性

脂肪酸のインピーダンス($\times 106\text{kg/m}^2/\text{s}$)は、中心周波数 80MHz 振動子での計測条件下で、炭素数と二重結合数に依存していることが示された。すなわち炭素数が少ないほどインピーダンスが高く、同じ炭素数の場合は、二重結合数が少ないほどインピーダンスが高値であった。しかし cis 型の場合は逆に、二重結合数が少ないほどインピーダンスが低値であった。このように炭素数ならびに二重結合の存在は、超音波の伝搬に深く関与していることが推測された。

(2)マウスモデル

病理所見

脂肪肝・NASH・担癌のモデルマウスにおける肝組織は、臨床例での単純性脂肪肝や種々の段階のNASH、肝腫瘍に相当するものであり、使用したモデルマウスにおける肝組織所見の妥当性が確認された。

音響特性の検討

インピーダンスの検討では、コントロール(n=5)は 1.72 であったのに対し脂肪肝(n=6)は 1.74 と高値であった($p=0.05$)。一方、NASH(n=4)では 1.70 と低値であった($p=0.04$)。肝組織の脂肪酸濃度を検討すると、NASH では脂肪肝に比べてパルミトオレイン酸が高い傾向を示し、オレイン酸($p<0.05$)とアラキドン酸($p<0.005$)は有意に高値であった。一方、ドコサヘキサエン酸はNASH で低い傾向を示した。脂肪酸単独でのインピーダンスは、オレイン酸、パルミトオレイン酸とアラキドン酸はコントロールに比べて有意に低く、ドコサヘキサエン酸では有意に高かった。

(3)臨床例での検討

病理所見

肝組織における線維化、脂肪化を検討し、単純性脂肪肝やNASHの診断を行った。また、肝腫瘍例においては、肝細胞癌例における分化度の判定や転移性肝癌における組織像の確認を行った。

音響特性の検討

臨床例での検討：脂肪酸組成は、NASH 群では単純性脂肪肝群に比べて C18:0 と C22:6n3 が高値で C18:1n9c は低値であった。また C20:4n6 は、肝線維化の進展に伴って漸増した。NASH 群において脂肪化の程度別で比較すると、脂肪化高度例では C20:4n6、C20:5n3、C22:6n3 が低下し、C18:1n9c が上昇していた。

NASH 群では単純性脂肪肝群に比べて組織インピーダンス値が有意に低値であった(1.76 ± 0.007 vs. 1.84 ± 0.02 , $p=0.011$)。なお、C18:0、C20:4n6、C20:5n3、C22:6n3 単体でのインピーダンスは基準より有意に低値であり、NASH 肝組織における音響特性(低 Inp)の要因であることが示唆された。

一方、音速(m/s)は単純性脂肪肝/NASH 群(1573.2 ± 22.4)ではコントロール群(1634.3 ± 47.3)に比べて有意に低値で($p<0.01$)、線維化進行例において低下傾向を呈した。

発癌については、非発癌例の方が高分化癌発癌例に比べて、非腫瘍部における組織インピーダンス値が高い傾向にあった(1.79 ± 0.03 vs. 1.75 ± 0.003 , $p=0.26$)。しかし、中分化癌例(1.76-1.86, 1.81 ± 0.04)を加味すると、非腫瘍部組織の音響特性には一定の傾向が見られず、分化の段階には多彩な背景因子の影響があるものと推測された。

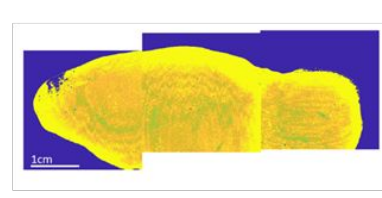
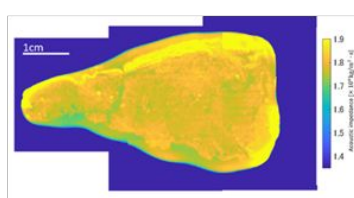
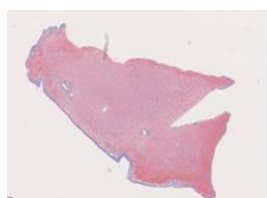
以上より、脂肪酸の音響特性と組成が、脂肪肝での高インピーダンス所見とNASHでの低インピーダンス所見を説明しうるものと考えられた。そして、低インピーダンスかつ低音速パターンがNASHを強く示唆する音響所見で、肝組織における脂肪酸組成を背景にしたものと考えられた。

コントロール例の画像

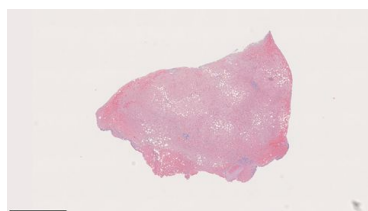
臨床例

80MHz での画像

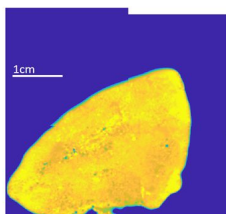
250MHz での画像



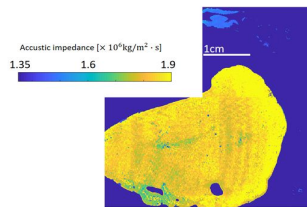
単純性脂肪肝例の画像 臨床例



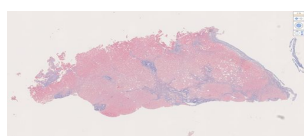
80MHz での画像



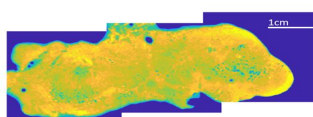
250MHz での画像



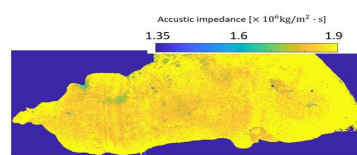
NASH(F4)例の画像 臨床例



80MHz での画像



250MHz での画像



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Maruyama H, Kato N. Advances in ultrasound diagnosis in chronic liver diseases. Clin Mol Hepatol. [Epub ahead of print]. 査読有 DOI: 10.3350/cmh.2018.1013.

Tamura K, Yoshida K, Maruyama H, Hachiya H, Yamaguchi M. Proposal of compound amplitude envelope statistical analysis model considering low scatterer concentration. Jpn J Appl Phys 2018; 57: 07LD19. 査読有 DOI.org/10.7567/JJAP.57.07LD19

Ito K, Deng ZH, Yoshida K, Maruyama H, Mamou J, Yamaguchi T. Microscopic Acoustic Properties Analysis of Excised Rat Livers using Ultra-high Frequency Ultrasound. Medical imaging technolog 2017;35:51-62. 査読有 DOI: https://doi.org/10.11409/mit.35.51

Ito K, Yoshida K, Maruyama H, Mamou J, Yamaguchi T. Acoustic impedance analysis with high-frequency ultrasound for identification of fatty acid species in the liver. Ultrasound Med Biol. 2017;43(3):700-711. 査読有 DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.11.011

〔学会発表〕(計 7 件)

伊藤一陽, 本田瑤季, 吉田憲司, 丸山紀史, 山口 匡. 脂肪酸の音響特性解析による肝臓内の組織構造評価. 日本超音波医学会第 91 回学術集会. 2018 年 6 月 8 日、神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)

伊藤一陽, 田村和輝, 丸山紀史, 吉田憲司, 山口 匡. 500MHz 超音波を用いた軟組織の音響特性評価. 日本超音波医学会第 90 回学術集会. 2017 年 5 月 26 日、栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)

徳永 菜, 伊藤一陽, 丸山紀史, 吉田憲司, 山口 匡. 肝臓内の脂肪酸種特定に向けた音響物性解析. 日本超音波医学会第 90 回学術集会. 2017 年 5 月 26 日、栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)

Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Yasui S, Maruyama H, Kato N. Inhibition of microRNA-b/c improved liver inflammation and liver fibrosis in NASH model mice. Annual meeting: American Association for the Study of Liver Diseases 2017, Washington DC (USA)

Ito K, Yoshida K, Mamou J, Maruyama H, Yamaguchi T. Speed of Sound Evaluation of Organelles of NASH Livers in rats with 250-MHz Ultrasound. 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium 2017/9/6, Washington DC (USA)

Ito K, Yoshida K, Maruyama H, Mamou J, Yamaguchi T. Fatty-acid species identification by quantitative high-frequency acoustic impedance measurements. 172nd Meeting of the Acoustical Society of America. 2016/11/30, Honolulu, Hawaii (USA)

Yoshida K, Deng Z, Ito K, Mamou J, Maruyama H, Hachiya H, Yamaguchi T. Speed of sound, attenuation, and acoustic impedance of hepatic lobule in diseased rat liver observed by scanning acoustic microscopy with 250 MHz. 172nd Meeting of the Acoustical Society of America. 2016/11/30, Honolulu, Hawaii (USA)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山口 匡

ローマ字氏名：YAMAGUCHI, Tadashi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：フロンティア医工学センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 40334172

研究分担者氏名：清野宗一郎

ローマ字氏名：KIYONO, Soichiro

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：医員

研究者番号(8桁): 00773326

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。