

平成 21 年 4 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790627

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝の病理学的自然歴を規定する臨床像と肝発現遺伝子プロファイル

研究課題名（英文）The clinical pictures and gene expression profiles in the liver associated with natural course of liver histology in NAFLD

研究代表者

濱口 えりか（HAMAGUCHI ERIKA）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10436818

研究成果の概要：

NAFLD患者179人の臨床マーカーと肝病理像に関する横断的検討では、年齢・性・BMIで補正した重回帰分析の結果よりIRI、HOMA-R、トランスアミナーゼは各病理像（脂肪化、線維化、肝細胞変性、活動性）を、ヒアルロン酸は線維化と肝細胞変性を、高感度CRPは活動性を予知することが明らかとなった。連続肝生検NAFLD患者39人を平均 3.0 ± 2.1 年間観察したところ、肝線維化は11人（28%）が悪化、12人（31%）が改善、16人（41%）が不変であった。年齢、性、BMIで補正した重回帰分析では、 HbA_{1c} 低下量のみが肝線維化進展の予測因子であった。以上より、血糖コントロールの改善が、NAFLD患者の肝病理改善を予知することが解明された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,500,000	510,000	3,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：インスリン抵抗性、血糖、NAFLD、肝生検、肝線維化

1. 研究開始当初の背景

米国では、成人の4人に1人が「非アルコール性脂肪肝（NAFLD）」に罹患し、その20-30%は肝線維化が進行し、肝硬変や肝臓の発生母地ともなりうる事が最近、認識されてきた。近年日本でも、食生活の欧米化や肥満の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝（NAFLD）の罹患率が増加している。NAFLDは、肝実質への脂肪滴の沈着を中心とする単純性脂肪肝（FL）から、高度の炎症・線維化を伴う非ア

ルコール性脂肪肝炎（NASH）にいたるまで、広い疾患スペクトラムを有し、その病態と成因に肥満・脂質代謝異常・インスリン抵抗性といった代謝面での異常が深く関与していることが明らかになりつつある。しかしNAFLDの自然歴とNASHへの進展に寄与する因子は不明である。

研究者の教室では研究開始前までに

1. NAFLD 患者の肝病理像の中でも、肝臓の脂肪化は、炎症・線維化にも増して、独立したインスリン抵抗性およびメタボリックシンドロームの予測因子であることを明らかにした[第 11 回日本消化器関連学会週間・肝臓病学ワークショップ, 2003 年, 大阪; 第 77 会日本内分泌学会学術総会シンポジウム, 2004 年, 京都]。

2. 連続肝生検により、NAFLD 合併 2 型糖尿病患者の肝組織所見を経時的に追跡し、その自然歴と病理像の変化を解析したところ、NAFLD 合併 2 型糖尿病患者では、血糖コントロールの改善に伴い、肝の脂肪化のみならず線維化をもが改善しうることがわかった[第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会 2006 年]。

3. さらに、NAFLD 患者 179 名の肝病理像と関連する臨床データを多変量解析した結果、肝脂肪化は、肝線維化や肝細胞変性にもまして、インスリン抵抗性マーカーである BMI、空腹時インスリン、HOMA-R と強く関連することを見出した[J Gastroenterol 42:312-317, 2007]。

3. 研究者の教室では肝臓 cDNA ライブラリーの SAGE および DNA チップ解析をもとに世界最大規模である 60 万を超える肝発現遺伝子データベースを構築してきた。この遺伝子情報をもとに肝発現遺伝子解析に適した cDNA マイクロアレイを独自に作製して、2 型糖尿病・肥満患者の肝に発現する遺伝子を包括的に解析してきた[Diabetologia

47:638-647, 2004; Diabetologia

50:268-277, 2007]。

5. その結果、脂肪肝を有する 2 型糖尿病患者の肝臓では糖・脂質代謝、タンパク代謝が大きく変動すること[Diabetologia 2004]、ミトコンドリアの酸化リン酸化に関連した遺伝子群が協調的に発現亢進し、このプロファイルは肝糖新生に関わる遺伝子発現と関連することがわかった[Diabetologia 2007]。

6. NAFLD の病態を実験的に検証する目的で、インスリン抵抗性を伴い、肝細胞変性を有する NASH モデル動物の作成に世界で初めて成功し、このモデルを使って、インスリン抵抗性が肝臓の脂肪化のみならず、炎症・線維化をも促進すること、インスリン抵抗性を改善することでそれらの NASH 肝病理が改善しうることが示した[Gastroenterology 132:282-293, 2007]。

これらの知見は、肝の脂肪化とインスリン抵抗性が、お互いに成因として NAFLD 患者の病

態と肝病理を促進する可能性を示唆する。

NAFLD 患者の予後不良群の同定、および進展因子に対する臨床的介入が NASH 進展と代謝異常を阻止する治療法開発に結びつくことが期待されるため、NAFLD 患者の連続肝生検による肝病理像の変化とそれに寄与する臨床像と NASH 進展因子を明らかにする本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) インスリン抵抗性がいかなる機序で肝臓の脂肪化・炎症・線維化を引き起こすか

(2) NAFLD のいかなる肝病理がインスリン抵抗性を引き起こすのか

の 2 点を、NAFLD 患者の経時的観察により明らかにし、NAFLD の治療標的を探索することを目指した。

3. 研究の方法

(1) NAFLD 患者の臨床像と代謝関連マーカーを経時的に追跡観察するとともに、連続肝生検により、肝病理像の自然歴を観察する。

(2) 肝病理の自然歴と関連する NAFLD 患者の臨床像と代謝関連マーカーを抽出する。

(3) NAFLD 患者の臨床像と肝病理を規定する肝発現遺伝子プロファイルと代謝パスウェイを抽出する。

(4) 上記で同定した径路を標的とした治療・介入が NAFLD 患者の病態と肝病理の自然歴を改善しうるのが前向きに検討する。

<平成 19 年度>

NAFLD 患者の臨床像・インスリン抵抗性

の評価：これまで蓄積してきた NAFLD 患者 179 名の、身長、体重、腹囲、血圧を測定する。また、糖負荷試験および正常血糖下高インスリンクランプ試験により、インスリン抵抗性を評価する。

生化学・分子マーカーの測定：臨床マーカーとして、1) 脂質代謝マーカー

(T-Chol, TG, HDL-C, FFA) 2) 糖代謝マーカー(空腹時血糖値, HbA1c, 空腹時インスリン値) 3) 脂肪細胞関連生理活性物質

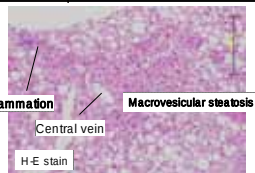
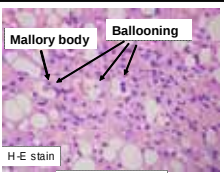
(TNF- γ , レプチン, アディポネクチン, PAI-1) 4) 肝機能検査・肝線維化マーカー

(AST, ALT, γ -GTP, ヒアルロン酸, 型コラーゲン 7s, P-III-P) 5) メタボリックシンドロームの活動性の指標となる、

炎症性マーカー(高感度 CRP) 7) 肝内鉄蓄積マーカー(フェリチン) 8) 血算(白血球, 赤血球, 血小板数)を患者末梢血液にて測定し、データベースを作成、肝

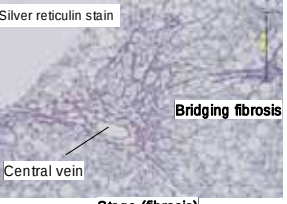
組織像との関連を単変量解析、ついで多変量解析・重回帰分析にて検討する。
連続肝生検サンプルの病理像・免疫組織化学的評価：独立した病理医により肝組織学的に NAFLD と診断された患者の肝病理像を、下図表のごとく Brunt 分類に従い、脂肪化、線維化、肝細胞変性（肝細胞の風船化、マロリー体）の程度を各々スコア化する。活性化した星細胞の指標である α -smooth muscle actin、また浸潤する単球・マクロファージを免疫化学染色法により可視化し炎症の程度を評価する。

Brunt分類			
Grading(活動性)			
Grade score	Steatosis score	Ballooning score	Inflammation score
1	1(<小葉内33%)~2(33-66%)	1 時々あり	1 小葉内・門脈端に認めないが、軽度あり
2	2~3	2 あり(zone3)	2 軽度~中等度
3	3(>66%)	3 高度(zone3)	3 高度

Staging(病期)

Stage score (fibrosis)
1 perivenular / pericellular fibrosis (Zone 3)
2 + periportal fibrosis
3 + bridging fibrosis
4 cirrhosis



NAFLD 患者の肝臓における包括的発現遺伝子解析：正常肝、単純性脂肪肝、NASH を有する患者、および連続肝生検し得た症例の肝生検組織サンプルを用いて3万遺伝子を搭載したDNAチップによる包括的な発現遺伝子解析を行う。これによって糖・脂質・蛋白・エネルギー代謝にかかわる遺伝子発現を明らかにする。これまでの解析から対象肝臓においては糖新生、解糖、脂肪酸合成、TCA サイクル、 β 酸化、酸化的リン酸化、プロテアゾーム系が有意に変動していることが予想

され、これらの組み合わせによって肝内代謝の状態を明らかにする。また、病理像の変化と関連する発現遺伝子プロファイルと代謝パスウェイを抽出する。

<平成 20 年度>

NAFLD 患者の肝病理変化に寄与する進展因子の同定：平成 19 年度に解析した臨床・病理・分子情報相互の関連を解析する。まず、NAFLD 患者の肝病理像（脂肪化、線維化、肝細胞変性）に寄与する臨床像、臨床生化学マーカーを同定し、それらの経時的变化、ならびに肝病理像の変化との相関を検討し、NASH 進展因子を明らかにする。

NAFLD 患者の肝病理進展因子と関連する肝発現遺伝子プロファイル：肝病理、および上記検討で同定した生化学・分子マーカーの変化と関連する肝発現遺伝子プロファイルを抽出する。この際、個々の発現遺伝子に着目するのみならず、代謝パスウェイに属する遺伝子群の協調的発現変動、およびパスウェイ間相互の代償関係をも考慮に入れて解析を進める。代謝パスウェイの抽出には、BRB ArrayTools、GenMAPP、Gene Set Enrichment Analysis、各解析ソフトウェアを用いる。次に、キーとなる候補パスウェイに属する遺伝子発現量を標準化・平均化した mean centroid 値と、組織分子マーカー・血清マーカーとの相関関係を解析することで、候補パスウェイの意義をさらに検証する。

4. 研究成果

平成19年度は

1. NAFLD患者の臨床マーカー、肝病理像スコアのデータベース作成

平成18年度までに蓄積してきたNAFLD患者179名の糖負荷試験および正常血糖下高インスリンクランプ試験によるインスリン抵抗性の評価、ならびに臨床マーカー；1) 脂質代謝マーカー 2) 糖代謝マーカー 3) 脂肪細胞関連生理活性物質 4) 肝機能検査・肝線維化マーカー 5) メタボリックシンドロームの活動性の指標となる、炎症性マーカー 6) 肝内鉄蓄積マーカー 8) 血算 を患者末梢血液にて測定し、肝組織学的にNAFLDと診断された患者の肝病理像を、Brunt分類に従って脂肪化、線維化、肝細胞変性（肝細胞の風船化、マロリー体）活動性の程度を各々スコア化し、臨床データベースを作成した。

2. NAFLD患者の肝細胞変性に寄与する臨床

マーカーの抽出

肝組織中等度線維化を有する（線維化マーカー2、脂肪化マーカー2以上）NAFLD患者において肝細胞変性を有する群では、レブチン、AST上昇を認め、これらマーカーが初期のNASH患者の予知マーカーとなりうる可能性がある。

3. 連続肝生検NAFLD患者の肝病理像、臨床像の自然観察

平成19年度までに観察しえた連続肝生検NAFLD患者28名の臨床データベースを作成した。肝病理像の線維化については28名中10名（35.7%、うち3名はNASH）は不変であった。10名（35.7%）では組織像が悪化し、うち3名が単純性脂肪肝（FL）からNASHに悪化した。8名（25.8%）は組織像が改善し、うち5名がNASHからFLに改善した。NASHからFLへの改善を認めたNAFLD合併肥満2型糖尿病患者において、血糖コントロールの改善が肝脂肪化、線維化を改善しうる事が明らかとなった。

平成20年度は

1. NAFLD患者の肝病理像に寄与する臨床像、臨床マーカーの抽出

NAFLD患者179人の臨床データベースをもとに、これら臨床マーカーとBrunt分類による肝病理像（脂肪化、線維化、肝細胞変性、活動性）スコアとの関連を横断的に回帰分析で検討した。年齢・性・BMIで補正した重回帰分析では、いずれの肝病理像もインスリン抵抗性マーカー（IRI、HOMA-R）、AST、ALTと関連し、線維化と肝細胞変性はヒアルロン酸と関連した。また、炎症のみが高感度CRPと関連した。したがって、インスリン抵抗性とトランスアミナーゼは各病理像の予知因子となり、ヒアルロン酸は線維化と肝細胞変性を、高感度CRPは活動性を予知することが明らかとなった。

2. NAFLD患者の肝病理変化に寄与する進展因子の同定

NAFLD患者179人のうち、平成20年度までに連続肝生検を行った39人の最も客観的な肝障害、予後の指標となる線維化スコアの変化で不変、改善、悪化の3群にわけ、群間で臨床データの変化を比較した。平均観察期間 3.0 ± 2.1 年間で肝線維化は11人（28%、FL：NASH 10：1）が悪化、12人（31%、FL：NASH 3：9）が改善、16人（41%、FL：NASH 9：7）が不変であった。単変量解析では、線維化改善群で初回肝生検時のASTおよびHbA_{1c}低下量（HbA_{1c}）が有意に高値を示した一方、BMIやインスリン抵抗性マーカーは線維化進展と関連しなかった。多変量解析により年齢、性、BMIで補正すると、HbA_{1c}のみが肝線維化進展の予測因子であった。以上より、血糖コントロールの改善は、BMI、インスリン抵抗性にも増して、NAFLD患者の肝病理改善を予知することが明らかとなった。したがって、厳格な血糖コントロール介入によりNAFLDの

肝線維化が阻止されうる可能性が示唆された。

3万遺伝子を搭載したDNAチップによる包括的な発現遺伝子解析の予備的検討では、肥満2型糖尿病治療前後で連続肝生検をし得た症例の肝の脂肪化・線維化が顕著な時期での遺伝子発現は、供給される糖をグリコーゲン合成や、ペントースリン酸回路へ向かわせる系で亢進し、脂肪酸代謝の系は低下していた。遺伝子発現が肝の脂肪蓄積に伴い発現変動している可能性がある。

したがって、今後は正常者、NAFLD患者（FL、NASH）および連続肝生検NAFLD患者（前後検体）の肝生検組織サンプルを用いて、糖・脂質・蛋白・エネルギー代謝にかかわる遺伝子発現を明らかにし、これらの組み合わせによって肝内代謝の状態を明らかにしたい。また、各々の肝病理像（脂肪化、線維化、肝細胞変性、活動性）、および上記検討で同定した肝線維化の予知マーカーであるHbA_{1c}と関連する肝発現遺伝子プロファイルをも抽出したい。さらに、チアゾリジン誘導体[Gastroenterology, 2007]、ビッグアナイド薬[第49回日本糖尿病学会年次学術集会, 2006年, 東京]、AT1受容体拮抗薬[第49回日本糖尿病学会年次学術集会, 2006年]、線維化抑制薬[特許出願予定]をNAFLD患者に用いて、新規に同定した肝発現遺伝子、代謝経路に対する介入を目指したい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Erika Hamaguchi（他 11 名、1 番目）、The histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients: tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis, Diabetes Care, in revision, 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

石倉和秀, 田治孔明, 竹下有美枝, 土山奈央美, 濱口えりか,（その他9名, 5番目）, 副腎不全、Cushing 徴候、BigIGF2 誘発性低血糖を来した副腎癌剖検例, 第19回臨床内分泌代謝 Up date, 2009.3.14, 東京

島 孝佑, 毛利研祐, 石倉和秀, 竹下有美枝, 土山奈央美, 御簾博文, 濱口えりか（その他1名, 7番目）, 内蔵型肥満症を伴うMODY5 疑診例, 第78回日本糖尿病学会中部地方会, 2008.10.25, 福井

石倉和秀，御簾博文，篁俊成，長田直人，
清水暁子，栗田征一郎，竹下有美枝，濱口え
りか（その他 2 名，8 番目），新規肝臓由来分
泌タンパク Hapatokine β 血中濃度は 2 型糖
尿病患者において HbA1c と相関する，第 51
回日本糖尿病学会総会，2008.5.23，東京

6．研究組織

(1)研究代表者

濱口 えりか（HAMAGUCHI ERIKA）
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：10436818

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし