

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08460

研究課題名(和文)新規肝癌動物モデルとヒトNASH肝癌臨床検体を用いたNASH発癌機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of liver carcinogenesis in NASH from using new animal models and human materials

研究代表者

石毛 和紀(Ishige, Kazunori)

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：20597918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：p62およびNrf2遺伝子二重欠失(DKO)マウスは、高脂肪食摂取で重症NASHと肝癌を発症する新規モデルマウスである。DKOマウスをベースに、肝細胞のみp62を発現する組織細胞特異的p62レスキューマウスはNASHの炎症線維化を抑制し、肝癌の発症を低下させた。ヒトNASH肝癌臨床標本についてNRF2とKEAP1の免疫染色を行い、患者情報との相関解析を行った。非癌部のNRF2の染色強度と核への局在は、肝炎症、線維化と関連したが、癌部のNRF2発現強度と局在は、病理学的悪性度や大きさと相関しなかった。p62およびNrf2はNASH進展と肝癌発症に対して防御的に機能すると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、単純性脂肪肝から発生し、肝硬変、肝癌へ進行する致死性疾患であるが、その発症進展機序は完全には解明されていない。本研究は、ヒトNASHおよび肝癌に類似する新規モデルの解析により、NASH肝発癌のメカニズムにp62やNrf2が関与する可能性を示唆し、今後の肝癌発症機序の解明に寄与すると考えられる。また、基礎と臨床の両面から、肝細胞のp62とNrf2がNASHと肝癌に対して防御的な役割を果たすことを見出したことにより、これらの分子が新しいNASHの治療標的となり得る可能性を示した点で、将来的なNASH治療開発のための研究として意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：p62 and Nrf2 double knock-out (DKO) mice exhibit NASH fed by normal chow, moreover, these mice develop liver cancers fed by a high fat feeding. To elucidate the mechanism of liver carcinogenesis, tissue specific conditional p62 rescue mice were analyzed. The p62 gene rescue of hepatocytes suppressed the development of NASH and reduced the prevalence of liver cancer from 39% to 14%. To explore the role of NRF2 and KEAP1 in human NASH and liver cancer, clinical liver specimens collected by surgery were analyzed by NRF2 and KEAP1 immunohistochemistry. The intensity and nuclear translocation of NRF2 associated with hepatic inflammation and fibrosis in non-tumor (cirrhosis) area, however, did not associate with differentiation and size of liver cancers. While, the intensity of KEAP1 did not have relationship with the intensity and nuclear translocation of NRF2. p62 and Nrf2 in hepatocytes was considered to play a protective role against the development of steatohepatitis and liver cancer.

研究分野：消化器内科, 肝臓病学

キーワード：NASH 肝癌 p62 Nrf2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

本邦の約 2000 万人は非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD）と称される脂肪肝を伴う慢性進行性の肝障害に罹患し、NAFLD の 10-20% は肝硬変、肝癌へ進行する致死性疾患である Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) が含まれる。このため、NAFLD/NASH に対しては積極的な医療介入を要するが、単純性脂肪肝を基盤に炎症、線維化を来す NASH への進展機序は十分に明らかになっておらず、進行および肝癌発生を阻止する内服治療も存在しない。

NASH の発症進展メカニズムを探索するためには良質な動物疾患モデルが必要不可欠であるが、従来の NASH 病態動物は、肥満を伴わない、若年時から急激に病変が進展するなど、ヒトの病態とは乖離していた。筑波大学の正田、岡田らが作製した“*p62* および *Nrf2* 遺伝子二重欠失 (double knockout; DKO) マウス (特許第 6020791 号)”は、過食による肥満と単純性脂肪肝から NASH および肝癌を自然発症するヒト病態に類似する新しい NASH モデルである。この DKO マウスは通常食摂餌で 30 週齢以降の壮年期に NASH を全例に自然発症し、50 週齢以降の高齢期の 12% に高分化型肝癌を合併する。DKO マウスは、①過食肥満、②腸内細菌叢異常による LPS 産生増加、③腸管バリア機能異常、④肥満による内臓脂肪の炎症性サイトカイン産生増加、⑤肝 Kupffer 細胞の感受性異常亢進、などの複合的な要因により NASH を発症する (Akiyama K, et al. *Exp Anim*, 2018)。

更に、この DKO マウスは 60% 高脂肪食 (HFD) を 26 週間 (6-32 週齢) 摂餌させることにより、全例に強い肝線維化伴う重症 NASH を発症し、更に 33% に肝癌を発生する新規肝癌モデルである。近年の次世代シーケンサーによる肝癌ゲノム解析では、*p53-Rb*, *WNT-β catenin*, *PI3K-mTOR* の各 pathway に加え *Keap1-Nrf2* pathway の遺伝子変異頻度が高いことが報告され、*Nrf2* の機能障害の肝発症への関与が示唆される (Totoki Y, et al. *Nature genetics*, 2014)。一方、*p62* が制御に関与する選択的 autophagy (自食作用) が肝癌の進行と予後に影響することも報告され (Umehura A, et al. *Cancer Cell*, 2016)、*p62* および *Nrf2* が NASH の進行および肝癌発症に関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

(1) DKO マウスをベースに、*Nrf2* および *p62* の組織細胞特異的レスキューマウスを作製し、これらのマウスの肝病態の変化と肝発症の頻度を比較解析し、臓器連関の視点から肝発症の抑止における細胞組織別の *Nrf2* および *p62* の役割を明らかにする。

(2) 外科手術によって収集された NASH 肝癌臨床標本を用いて、*Keap1-Nrf2* 経路と *p62*, autophagy 関連因子の免疫組織学的解析を行い、染色強度、染色パターンと、組織学的特徴・悪性度、更に患者情報 (病歴、血液検査結果) との関係性を解析し、臨床的な視点から NASH 肝癌における *Nrf2* および *p62* の役割を解明する。

3. 研究の方法

<動物実験>

マウスは筑波大学生命科学動物資源センターにて、室温 23°C、12 時間ごとの明暗サイクル、水は自由摂取下で飼育し、すべての解析には雄性マウスを使用した。

(1) 6 週齢の *p62* および *Nrf2* 遺伝子欠失 (DKO) マウスに、通常食 (normal chow; NC 群) または、60% 高脂肪食 (オリエンタル酵母より購入。high fat diet; HF 群) を摂餌させ、HFD 摂餌 26 週後のマウスより、血液、肝臓などを採取した。

(2) 肝組織の病理学的評価：肝組織について HE 染色および sirius red 染色を行い、脂肪性肝炎の脂肪化、炎症、線維化を steatosis activity fibrosis (SAF) score によって評価した。

(3) 血液生化学的検討：AST, ALT, triglyceride (TG), LDL-cholesterol (Cho), HDL-Cho, non-esterified fatty acid (NEFA) を測定した。測定はオリエンタル酵母へ委託した。

(4) DKO マウスをベースとした、マクロファージ、脂肪細胞、または肝細胞特異的 *p62* レスキューマウスの作製：*p62* 遺伝子のイントロンに、*LoxP* 配列で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナル配列を挿入したノックインマウス (*p62^{KI/KI}*) を作製し、このマウスとの交配により、*p62^{KI/KI}/Nrf2^{-/-}* マウスを得た。このマウスは、全身で *p62* および *Nrf2* 遺伝子が二重欠失しており、NASH を自然発症する。

次に、全身の *p62*, *Nrf2* 遺伝子二重欠損下において、組織特異的に *p62* を発現させる (レスキューする) ために、*p62^{KI/KI}/Nrf2^{-/-}* マウスと組織特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウスを交配した。本研究では、マクロファージ、脂肪細胞、肝細胞の特異的 *p62* レスキューマウスを作製するために、それぞれ *Lysozyme2-Cre*, *Adipoq-Cre*, *Albumin-Cre* マウスを用いた (最終遺伝子型は、*p62^{KI/KI:Lysozyme2-cre+/+}/Nrf2^{-/-}*; *Macro-res* マウス、*p62^{KI/KI:Adipoq-cre+/+}/Nrf2^{-/-}*; *Adip-res* マウス、または、*p62^{KI/KI:Alb-cre+/+}/Nrf2^{-/-}*; *Hep-res* マウス)。

(5) これらのレスキューマウスに対しても、(1)と同様に高脂肪食を摂餌させ、肝組織の NASH 病勢評価、肝腫瘍形成評価を行い、比較解析した。

<ヒト臨床標本の免疫組織学的解析による臨床研究>

この臨床研究は、東京女子医科大学と筑波大学附属病院の多施設共同臨床研究である (筑波大学附属病院臨床研究倫理審査：臨床研究番号 H30-123, 東京女子医科大学臨床研究倫理審査：承認番号：4932)。

2010年から2018年に東京女子医科大学外科で外科手術(肝切除術)により収集された、NASH患者50症例の肝癌および非癌部を含む肝組織病理標本を筑波大学医学医療系へ運搬し、免疫組織学的解析を行った。NASH肝癌の特徴を捉えるため、慢性C型肝炎から発生した肝癌49症例、大腸癌肝転移48症例についても比較解析を行った(計147症例)。免疫組織学的解析は、大腸癌肝転移の非癌部を正常コントロールとして、HE染色、Masson trichrome染色、NRF2免疫染色(NRF2抗体: Abcam ab31163)を行い、癌部および非癌部の染色強度、染色局在などを解析した。これらの結果と、既に得られている患者情報(病歴、血液検査結果、予後情報など)との関係性を統計的に解析した。

4. 研究成果

(1) DKO マウスは HFD 摂餌により重症の NASH と肝癌を発症する:

DKO は NC で肥満を呈すが、HFD 摂餌により更に高度の肥満を呈した(図 1A)。HFD 群を腫瘍発生群(腫瘍群: tumor (+)) と発生しなかった群(非腫瘍群 (-)) に分けて解析したが、肥満の程度は差を認めなかった。また、解剖時の体組成は、HFD 摂餌群では内臓脂肪が有意に軽く、萎縮していた。一方、肝は NC 群よりも有意に腫大していた。しかし、腫瘍群と非腫瘍群の間では、差は認められなかった(図 1B)。

肝病理では、通常食でも DKO マウスは NASH を発症したが、HFD 摂餌により重症の脂肪性肝炎を発症した。特に、HFD 群では線維化が高度であり、肝硬変像を呈していた(図 2 下段, Sirius red 染色)。また、HFD 摂餌群の 39% に腫瘍形成を認めた。腫瘍は、肝臓から突出するような大型のものが多くを占めた(図 2 右下)。病理では、腫瘍内に脂肪滴を含む、大型の核を持つ腫瘍細胞を認め、高分化型肝臓癌と考えられた(図 2 右上)。SAF score でも、NC 群と比較して HFD 摂餌群で、脂肪化、炎症、線維化とも有意に高値であったが、腫瘍群と非腫瘍群の間で差は認められなかった(図 3)。

(2) HFD 摂餌 DKO マウスは強い肝障害を来す:

血液生化学検査では、HFD 摂餌 DKO マウスは AST, ALT が高値であり、高度の肝障害を呈した。また、LDL-Cho も HFD 摂餌群で有意に高値であったが、TG, HDL-Cho については有意な差は認められなかった。一方、HFD 摂餌群では NEFA が軽度低下していた。腫瘍群と非腫瘍群の間で有意な差は認められなかった(図 4)。

(3) 組織細胞特異的 p62 レスキューマウスの作製:

DKO マウスをベースとして、マクロファージ、脂肪細胞、または肝細胞のみに p62 を発現する、組織細胞特異的 p62 遺伝子レスキューマウスを作製した。マクロファージ(肝 Kupffer 細胞)、脂肪細胞、肝細胞の p62 の発現(レスキュー)を immunoblot にて確認した(図 5)。これらのタンパク発現は、野生型(WT) マウスと同程度であった。また、脂肪細胞特異的 p62 レスキューマウスでは、WAT, BAT 双方で p62 のタンパク発現が認められた(図 5)。

(4) 組織細胞特異的 p62 レスキューは、体重および体組成に影響を与えない:

DKO マウス, Macro-res, Adip-res マウス, Hep-res マウスに NC および HFD を摂餌させ、体重変化を経時的に観察した(図 6)。NC と比較して HFD で高度の肥満を呈したが、レスキュー群でも DKO 群と比較して体重に差は認められなかった。体組成については、NC 摂餌および HFD 摂餌において各遺伝子型で、内臓脂肪重量および肝重量に大きな差は認められなかった。

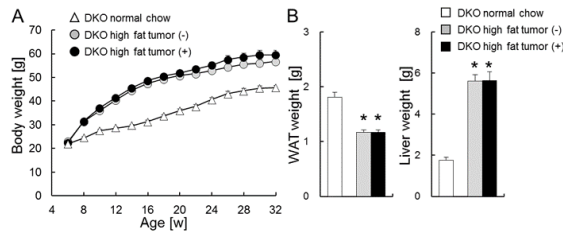


図 1 p62 および Nrf2 double knockout (DKO) マウスは肥満を来し、60% 高脂肪食により増悪する。高脂肪食により内臓脂肪は萎縮し、肝は腫大する。* $P < 0.05$, vs. normal chow

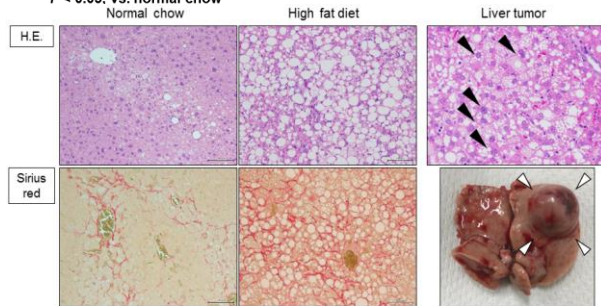


図 2 DKO マウスは、高脂肪食摂餌により高度の肝細胞障害を呈し、線維化を来す。約 40% に肝臓癌を発生する。腫瘍は、脂肪を伴

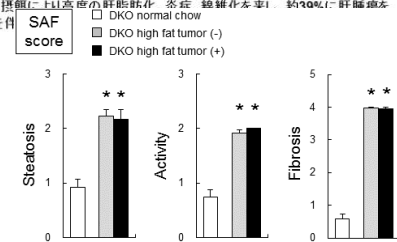


図 3 DKO マウスは病理学的に重症 NASH を発症する。しかし、腫瘍群と非腫瘍群を差はしない。

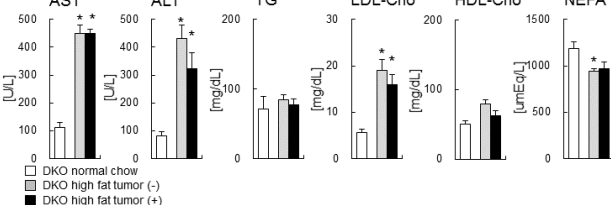


図 4 DKO マウスは肝障害を来し、高脂肪食摂餌で増悪する。しかし、腫瘍群と非腫瘍群で差は乏しい。* $P < 0.05$, vs. normal chow

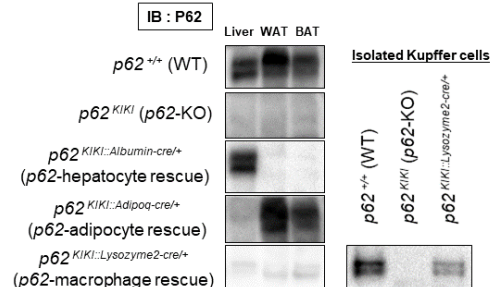


図 5 組織細胞

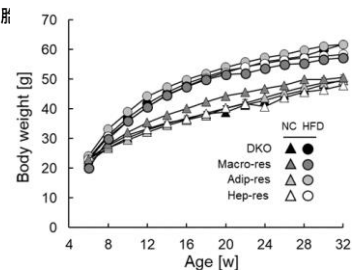


図 6 各遺伝子系はいずれも肥満を来したが、遺伝子型による差は認められなかった。

(5) 肝細胞特異的 p62 レスキューは、NASH 進展と肝癌発生を抑制する：

HFD26 週間摂餌時の病理組織を比較した。Macro-res マウスおよび Adip-res マウスは、DKO マウスと同様の重症 NASH を発症し、SAF score でも有意な差は認められなかった (図 7, 8)。一方、肝細胞の p62 レスキュー (Hep-res) では、SAF score による解析で、肝脂肪化、炎症

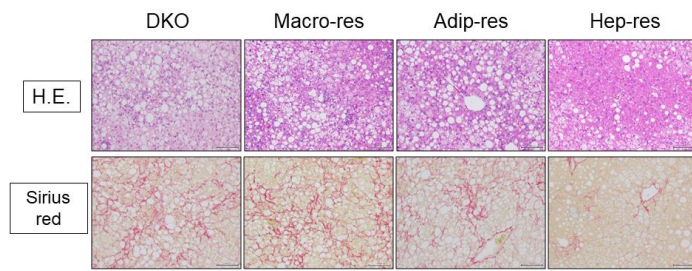


図 7 肝細胞のp62レスキューは、DKOマウスのNASH進行を抑制する。

(activity), 線維化が有意に低値であり、肝細胞の p62 発現が NASH 進展を抑制した (図 7, 8)。肝癌の発生率は、Macro-res マウス、Adip-res マウスと DKO マウスで 39%程度と同等であったが、肝細胞の p62 レスキューは肝癌の発生を 33%から 14%に低下させた。

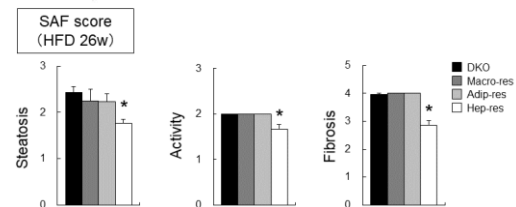


図 8 肝細胞特異的p62レスキューは、NASH進展を抑制する。
* P < 0.05, vs. DKO.

(6) ヒト肝癌臨床標本を用いた臨床研究 - NASH, 慢性 C 型肝炎, 大腸癌肝転移の基本情報：

疾患ごとの症例背景情報を table1 に示す。NASH 肝癌患者 (NASH 群) では、生活習慣病である高血圧、糖尿病、脂質異常症 (DL) の合併率が、高率であった。

血液生化学検査では、NASH 群で慢性 C 型肝炎肝癌患者 (CHc 群) よりも血小板数が高値であったが、大腸癌肝転移患者 (CC 群) と有意な差ではなかった。一方、PT%は、NASH 群で CC 群よりも有意に低下していた。ALT は NASH 群で CC 群よりも高値であったが、AST, GGT, ALP については差を認めなかった。一方、Fib-4 index は、CHc 群で有意に高値であったが、ICG15 分値に差を認めなかった。これらの結果から、NASH 群、CHc 群では肝障害、肝予備能の低下が認められ、肝予備能は CHc 群でより低下しているものと考えられた。

	NASH肝癌 (group1) (n=50)	C型肝炎肝癌 (group2) (n=49)	大腸癌肝転移 (group3) (n=48)	P - value	
				1 vs. 2	1 vs. 3
Age (years)	70.5 ± 10.0	69.5 ± 7.7	64.5 ± 13.0	0.876	0.014
Sex, males/females (n)	40/10	39/10	32/16	0.221	
BMI	25.0 ± 4.4	21.9 ± 2.6	22.4 ± 3.7	<0.001	0.001
Life style-related diseases					
Hypertention (%)	44.0	33.0	23.0	<0.001	
Diabetes mellitus (%)	45.7	30.9	23.5	0.002	
Dislipidemia (%)	49.2	18.6	32.2	0.001	
Hepatic abnormalities					
PLT, U/L	17.8 ± 5.2	13.7 ± 5.2	19.9 ± 4.3	<0.001	0.096
PT, %	86.1 ± 13.0	82.5 ± 15.7	95.8 ± 6.6	0.325	<0.001
AST, U/L	43.6 ± 30.1	46.4 ± 38.1	30.1 ± 13.5	0.877	0.061
ALT, U/L	58.2 ± 91.2	44.5 ± 48.4	26.4 ± 17.6	0.506	0.029
ALP, U/L	310.8 ± 148.2	300.2 ± 111.8	323.0 ± 163.4	0.927	0.907
γ-GT, U/L	95.0 ± 80.5	62.8 ± 62.0	95.5 ± 115.8	0.169	1.000
Fib-4 index	4.6 ± 3.1	8.1 ± 7.5	2.5 ± 1.6	0.001	0.079
ICG15, %	12.4 ± 8.5	14.7 ± 7.7	10.6 ± 10.6	0.251	0.448
Glucose and lipid profiles					
FPG, mg/dl	135.6 ± 57.1	131.1 ± 64.8	108.3 ± 23.3	0.918	0.033
HbA1c, %	6.6 ± 1.0	6.2 ± 1.1	6.0 ± 1.0	0.105	0.020
HDL-C, mg/dl	50.1 ± 13.8	53.1 ± 15.7	60.9 ± 14.7	0.672	0.004
LDL-C, mg/dl	101.9 ± 26.5	96.3 ± 26.2	124.2 ± 38.5	0.729	0.005
TG, mg/dl	139.1 ± 80.8	102.1 ± 47.0	131.3 ± 65.4	0.034	0.852
Tumor marker					
AFP, mg/dl	1769.4 ± 8579.8	1783.6 ± 8433.7	4.1 ± 1.3	1.000	0.857
PIVKA II, mg/dl	4824.8 ± 14882.8	3732.5 ± 11795.4	22.4 ± 9.6	0.909	0.634
CEA, mg/dl	2.7 ± 1.5	3.7 ± 3.2	57.7 ± 150.9	0.999	0.101
CA19-9, mg/dl	19.0 ± 11.8	33.2 ± 29.7	105.1 ± 275.8	0.971	0.216

血液生化学検査では、NASH 群で慢性 C 型肝炎肝癌患者 (CHc 群) よりも血小板数が高値であったが、大腸癌肝転移患者 (CC 群) と有意な差ではなかった。一方、PT%は、NASH 群で CC 群よりも有意に低下していた。ALT は NASH 群で CC 群よりも高値であったが、AST, GGT, ALP については差を認めなかった。一方、Fib-4 index は、CHc 群で有意に高値であったが、ICG15 分値に差を認めなかった。これらの結果から、NASH 群、CHc 群では肝障害、肝予備能の低下が認められ、肝予備能は CHc 群でより低下しているものと考えられた。

(7) NRF2 免疫組織学的解析：

NRF2 抗体を用いて免疫染色を行い、その発現と局在と、臨床情報の相関性を解析した。NRF2 の発現は主に細胞質に認められ、症例ごとに異なっていた。また、癌部と非癌部の染色性についても、癌部の方が強い症例、非癌部の方が強い症例が混在し、一定の傾向を示さなかった (図 9)。

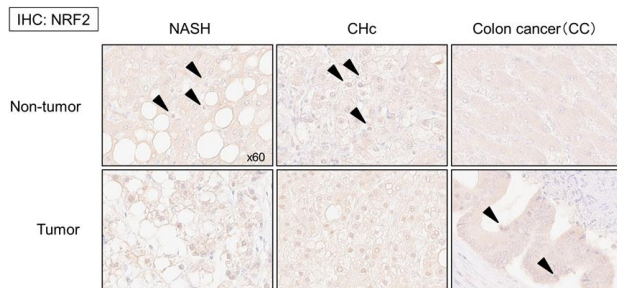


図 9 NRF2 の染色パターンは、症例ごとに異なる。

NRF2 の染色強度に着目して、非癌部、癌部とも low, medium, high の 3 群に層別化して解析した。また、非癌部の NRF2 の染色局在に着目して、細胞質のみに染

	NASH (group1) (n=50)	CHc (group2) (n=49)	CC (group3) (n=48)	P - value	
				1 vs. 2	1 vs. 3
Non-tumor area					
NRF2 intensity (low / medium / high)	15 / 32 / 3	17 / 30 / 2	5 / 33 / 10	0.006	
NRF2 localization (cellular / + nuclear)	7 / 43	1 / 48	26 / 22	<0.001	
Tumor area					
NRF2 intensity (low / medium / high)	26 / 22 / 2	23 / 24 / 2	14 / 26 / 8	0.039	
NRF2 localization (cellular / + nuclear)	0 / 50	0 / 49	0 / 48	ND	
Dense NRF2 staining in nuclear (low / medium / high)	27 / 13 / 10	35 / 7 / 7		0.187	

色される群 (cytoplasm 群) と核にも染色が認められる群 (+nuclear 群) の 2 群に層別化して解析した。癌部ではほぼ全例で NRF2 の核局在が認められたため、NRF2 の核への濃染が認められる割合によって、low (33%未満), medium (33-65%), high (66%以上) の 3 群に分類して層別解析を行った。

(8-i) 非癌部の解析：

CC 群非癌部には、NRF2 の染色が強い例が有意に多く含まれていたが、NASH と CHc 群の

間で差は認められなかった。また、NASH 群と CHc 群では CC 群と比較して、核に局在が認められる症例が有意に多かった (table 2 上段)。

Table 3 NRF2免疫染色解析-発現強度3分位での比較

	Low	Medium	High	P - value	
	(n = 37)	(n = 95)	(n = 15)	Low vs. Medium	Low vs. High
Steatosis activity fibrosis (SAF) score					
Steatosis	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.376	0.617
Activity (periobular inflammation)	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.278	0.033
Activity (ballooning)	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.017	< 0.001
Fibrosis	2.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.3 ± 0.5	0.107	0.004

非癌部の染色強度別 3 分位による比較では、NRF2 発現 low 群で高血圧の合併率が高かったが、その他の生活習慣病や、肝障害、生活習慣病に関わる血液生化学検査などの有意な関連は認められなかった。一方、病理学的 SAF score とは関連を認め、NRF2 の発現が低い症例では、病理学的な肝炎症 (activity) および肝線維化が有意に高度であった (table 3)。

非癌部の染色局在別 2 分位 (Cytoplasm 群, +Nuclear 群) による比較では、NRF2 の核への局在が認められる +Nuclear 群では、血小板、プロトロンビン時間、GGT が低値であり、FIB-4 index が高値であった。これらの結果から、+Nuclear 群ではより線維化が進行し、肝予備能が低下していると考えられた。同様に、病理学的 SAF score も、+Nuclear 群では、肝炎症 (activity) と肝線維化が有意に高度であった。

(8-ii) 癌部の解析:

癌部の NRF2 免疫染色の発現強度に着目した解析では、NRF2 の発現が強度の症例が CC 群で有意に多かったが、大腸癌と肝細胞癌の直接比較は困難と考えられた。NASH と CHc の間では、有意な差は認められなかった (table 2 下段)。既述のように、癌部では NRF2 の核への局在が全例に認められ、また、核濃染の程度は NASH と CHc 群の間で有意な差を認めなかった (table 2 下段)。

Table 4 NRF2免疫染色解析-癌病種との関係

NRF2の発現強度3分位	Low	Medium	High	P - value	
	(n = 49)	(n = 46)	(n = 4)	Low vs. Medium	Low vs. High
Characteristics of HCCs					
Maximum size, cm	43.4 ± 3.8	42.1 ± 3.7	32.5 ± 2.5	0.964	0.690
Number of HCC	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.282	0.992
Differentiation (well/moderately/poorly)	12/36/1	10/35/1	0/4/0		0.838
T factor (T1/T2/T3/T4)	2/28/16/3	2/21/18/5	0/2/2/0		0.893
Stage (I/II/III/IV)	2/33/11/3	2/24/15/5	0/2/2/0		0.715
Tumor marker					
AFP, ng/mL	1944.1 ± 1310.1	1732.0 ± 1198.3	232.8 ± 211.2	0.992	0.922
PIVKA-II, ng/mL	2644.1 ± 1216.5	6380.4 ± 2570.9	268.5 ± 161.2	0.365	0.938
NRF2の核濃染3分位					
	Low	Medium	High	P - value	
	(n = 62)	(n = 20)	(n = 17)	Low vs. Medium	Low vs. High
Characteristics of HCCs					
Maximum size, cm	40.5 ± 3.3	42.7 ± 5.3	45.9 ± 7.0	0.945	0.726
Number of HCC	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.1	0.979	0.264
Differentiation (well/moderately/poorly)	2/45/15	0/16/4	0/14/3		0.784
T factor (T1/T2/T3/T4)	2/27/28/5	1/12/4/3	1/12/4/0		0.194
Stage (I/II/III/IV)	2/33/22/5	1/12/4/3	1/14/2/0		0.237
Tumor marker					
AFP, ng/mL	2018.4 ± 1123.3	2511.8 ± 2396.6	17.4 ± 3.9	0.973	0.683
PIVKA-II, ng/mL	4978.4 ± 1824.5	4269.0 ± 3508.2	1876.3 ± 800.6	0.977	0.688

癌部の染色強度別 3 分位による比較では、肝癌の大きさ、数、病理学的悪性度、T 因子、病期および腫瘍マーカーなど癌の病態に関連する因子について、いずれも NRF2 の発現強度と関連を認めなかった (table 4 上段)。また、NRF2 の核濃染に着目した 3 分位の比較においても、肝癌の病態因子と有意な関連は認められなかった (table 4 下段)。

尚、予後については、術後年数が短い例もあり、現在予後調査を継続している。

<考察>

(1) 基礎研究の結果から、①DKO マウスは、HFD 摂餌により重症 NASH に加え、高率に肝癌を発症する、②肝細胞特異的 p62 遺伝子レスキューは、NASH 進展および肝癌発症を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、マクロファージではなく、脂肪細胞ではなく、特に肝細胞の p62 発現が NASH に対して防御的に機能し、肝硬変への進行を抑制することにより肝癌発生を低減させていると推測された。

(2) 臨床研究の結果から、①非癌部の肝炎症・線維化の進行した症例では、NRF2 の発現強度が低下している、②非癌部の肝炎症・線維化の進行した症例では、NRF2 の核への局在が認められる、③NRF2 の発現強度、発現局在は、肝癌の病態因子とは有意な相関がない、ことが明らかとなった。これまで、ヒト肝臓、肝硬変における NRF2 の挙動は報告がなく、本研究の意義は大きいと考えられる。

ただし、この臨床研究では、肝癌症例に対しては原則、肝切除手術適応基準 (ミラノ基準: 肝癌単発 5cm まで、3 個 3cm まで、脈管侵襲なし) に適応した症例に手術を行っているため選択バイアスが存在し、肝癌病態についての解析の自由度が低下している可能性が高い。

以上の結果から、肝の p62、NRF2 とともに NASH において防御的な役割を演じていることが明らかとなった。p62 および Nrf2 の賦活化は、NASH 進展防御や肝癌抑止のための新規標的として有望であると考えられた。

今後の展望として、①マウス肝臓の癌シグナル遺伝子の発現変化を比較解析 (全遺伝子検索を計画) することにより、p62 の肝発癌における役割を解析する、②組織細胞特異的 Nrf2 遺伝子レスキューマウスの作製を進め、Nrf2 の NASH 進展と肝癌における役割解明を目指す、③ヒト肝癌臨床標本について、NRF2 以外にも、KEAP1 などの免疫組織学的解析を追加し、KEAP1-NRF2 システムを介した NASH 進展と肝癌発生のメカニズムを明らかにすることを目標とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watahiki T, Okada K, Warabi E, Nagaoka T, Suzuki H, Ishige K, Yanagawa T, Takahashi S, Mizokami Y, Tokushige K, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 69
2. 論文標題 Gender difference in development of steatohepatitis in p62/Sqstm1 and Nrf2 double-knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 395-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.20-0028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Shosei, Okumura Toshiyuki, Oshiro Yoshiko, Fukumitsu Nobuyoshi, Fukuda Kuniaki, Ishige Kazunori, Hasegawa Naoyuki, Numajiri Haruko, Murofushi Keiko, Ohnishi Kayoko, Mizumoto Masashi, Nonaka Tetsuo, Ishikawa Hitoshi, Sakurai Hideyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical outcomes of previously untreated patients with unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma following proton beam therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13014-019-1451-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda K, Mori K, Hasegawa N, Nasu K, Ishige K, Okamoto Y, Shiigai M, Abei M, Minami M, Hyodo I.	4. 巻 37
2. 論文標題 Safety margin of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a prospective study using magnetic resonance imaging with superparamagnetic iron oxide.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Raiol.	6. 最初と最後の頁 555-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11604-019-00843-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada Kosuke, Watahiki Takahisa, Horie Kaoru, Takayama Takako, Aida Yuka, To Keii, Shida Takashi, Ishige Kazunori, Nishiyama Hiroyuki, Shoda Junichi, Suzuki Hideo	4. 巻 100
2. 論文標題 The prevalence and clinical implications of pancreatic fat accumulation identified during a medical check-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e27487 ~ e27487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mukherjee Pradipta, Miyazawa Arata, Fukuda Shinichi, Yamashita Toshiharu, Lukmanto Donny, Okada Kosuke, El-Sadek Ibrahim Abd, Zhu Lida, Makita Shuichi, Oshika Tetsuro, Yasuno Yoshiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Label-free functional and structural imaging of liver microvascular complex in mice by Jones matrix optical coherence tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20054 ~ 20054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98909-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabe Yoshito, Kim Taeho, Oh Sechang, Shida Takashi, Oshida Natsumi, Hasegawa Naoyuki, Okada Kosuke, Someya Noriko, Mizokami Yuji, Shoda Junichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Relationships of Dietary Habits and Physical Activity Status with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Featuring Advanced Fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 8918 ~ 8918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18178918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Ikuru, Komine Shoichi, Okada Kosuke, Wada Shota, Warabi Eiji, Uchida Fumihiko, Oh Sechang, Suzuki Hideo, Mizokami Yuji, Shoda Junichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non alcoholic steatohepatitis by long term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14859 ~ e14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shida Takashi, Oshida Natsumi, Suzuki Hideo, Okada Kosuke, Watahiki Takahisa, Oh Sechang, Kim Taeho, Isobe Tomonori, Okamoto Yoshikazu, Ariizumi Shun ichi, Yamamoto Masakazu, Shoda Junichi	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical and anthropometric characteristics of non obese non alcoholic fatty liver disease subjects in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshida Natsumi, Shida Takashi, Oh Sechang, Kim Taeho, Isobe Tomonori, Okamoto Yoshikazu, Kamimaki Takashi, Okada Kosuke, Suzuki Hideo, Ariizumi Shun-ichi, Yamamoto Masakazu, Shoda Junichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Urinary Levels of Titin-N Fragment, a Skeletal Muscle Damage Marker, are Increased in Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19498 ~ 19498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56121-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 脂肪酸代謝制御因子p62はマウス脂肪性肝炎を防御する - 組織細胞特異的p62遺伝子レスキューマウスの解析より
3. 学会等名 JDDW2020 (神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はp62:Nrf2遺伝子二重欠失マウス脂肪性肝炎における線維化を抑制する
3. 学会等名 JDDW2020 (神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 p62は肝臓-脂肪組織の連関による脂肪酸代謝の制御を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会 (大阪)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 石毛和紀, 藤 栄治, 正田純一
2. 発表標題 脂肪酸代謝に着目したマウス脂肪性肝炎におけるp62の役割
3. 学会等名 第105回消化器病学会総会, 金沢
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田浩介, 石毛和紀, 正田純一
2. 発表標題 Lipophagy制御因子p62は, 中性脂肪-脂肪酸代謝を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会, 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okada K, Watahiki T, Shoda J
2. 発表標題 p62/SQSTM1 in hepatocytes plays a protective role against the development of steatohepatitis in mice
3. 学会等名 JDDW2021 (Kobe) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陶 経緯, 綿引隆久, 岡田浩介, 石毛和紀, 鈴木英雄, 有泉俊一, 山本雅一, 正田純一
2. 発表標題 NASH進行とNASH肝癌におけるautophagy調節因子p62の役割
3. 学会等名 JDDW2021 (神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はNASHモデルの肝線維化および肝癌を抑制する
3. 学会等名 JDDW2021 (神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山敬子, 岡田浩介, 鈴木英雄
2. 発表標題 たこいぼ状隆起の関連因子についての検証
3. 学会等名 JDDW2021 (神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) は脂肪性肝炎モデルにおける肝線維化と発癌を抑制する
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会 (札幌)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 p62およびNrf2遺伝子二重欠失マウスは, 腸内細菌叢の変化に関連したlipopolysaccharide増加により脂肪性肝炎を自然発症する
3. 学会等名 第107回消化器病学会総会 (東京)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はp62:Nrf2遺伝子二重欠失マウス脂肪性肝炎における線維化を抑制する
3. 学会等名 第107回消化器病学会総会 (東京)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦征, 石井亜紀子, 綿引隆久, 岡田浩介, 和田聖大, 正田純一
2. 発表標題 継続的走運動は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を改善する
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岡田 浩介 (Okada Kosuke) (80757526)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究 分担者	正田 純一 (Shoda Junichi) (90241827)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------