

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790660

研究課題名（和文） IGF, IGFBP-1 を用いた NASH 診断方法の開発

研究課題名（英文） Development of noninvasive diagnosis by using IGF and IGFBP-1 for predicting nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

研究代表者

米田 正人 (YONEDA MASATO)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：10423831

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は食生活の欧米化により増加し、日本でも約 3%の国民が罹患していることが想定されているが、侵襲的な肝生検以外の診断法は確立していない。肝生検を施行し組織学的検討を行った脂肪肝患者の血清を検討し、肝臓内の脂肪化程度と IGF-1 低下、IGFBP-1 低下の相関が認められた。本研究の過程で NASH の発症においてインスリン過剰分泌状態が関与すること、NASH の高度線維化症例の診断には血小板数が有用であること、NASH 治療として糖尿病薬であるシタグリプチンが有用であることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is rising rapidly. In Japan, the estimated prevalence of NASH in general population is reported about 3%. Liver biopsy is recommended as the gold standard for the diagnosis and staging of fibrosis in patients with NASH. In this study, we investigated biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients. We found that (1) IGF-1 and IGFBP-1 correlated negatively to hepatic steatosis grade, (2) a high percentage of the impaired fasting glucose group developed of NASH, (3) the measurement of the platelet count, scoring systems (FIB4) were clinically useful for predicting severe fibrosis (stage 3-4) in NASH patients, and (4) sitagliptin may be a novel treatment for NASH.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎, 非アルコール性脂肪性肝疾患, NASH, NAFLD, IGF, IGFBP-1, 血小板, シタグリプチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis:以下NASH) は食生活の欧米化により増加している新興疾患である。NASH 研究の問題として疾病発症

のメカニズムが未解明であることが挙げられる。我々は以前 NASH 患者の肝組織のメッセンジャーRNA をマイクロアレイ解析により解析し、NASH 発症に関与する多くの候補遺伝子を発見した。その候補遺伝子の一つとして

インスリン成長因子結合蛋白-1 (insulin-like growth factor binding protein: IGFBP-1) を認めた。

(2) NASH は日本国民の 3% に存在し、NASH を含めた非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) は日本で 1000 万人以上が罹患していることが想定されている。NASH の確定診断には侵襲的な肝生検が唯一の方法とされているが、1000 万人の NAFLD 患者すべてに肝生検を行うことは不可能であり、そのため数多くの NASH 患者が診断されずに存在することが考えられている。そのため非侵襲的な診断方法の確立は急務となっている。

(3) NAFLD および NASH に対する薬物療法については未だ確立されたものは無い。インクレチンの分解を行うジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) の阻害薬が 2 型糖尿病の治療薬として近年開発され、動物実験で脂肪肝改善効果が報告されている。

2. 研究の目的

(1) IGFBP-1, IGF と脂肪肝および NASH 発症と関連する肝臓の脂肪化、炎症との関連を解析することにより IGFBP-1, IGF およびインスリン分泌が NASH 病態にどのように関与するのか検討する。

(2) IGFBP-1 や IGF の血液濃度測定、またインスリン濃度や糖尿病の存在、その他本研究から発展した項目が NASH 診断、進行度のバイオマーカーとして有用か検討する。

(3) 2 型糖尿病を合併する NAFLD 25 症例に対して DPP-4 阻害薬シタグリブチンの脂肪肝改善効果を前向きに検討した。

3. 研究の方法

(1) 横浜市立大学附属病院で肝生検を施行した NAFLD, NASH 患者 120 症例の保存血清を用い、ELISA 法を用いて IGFBP-1, IGF-1 の測定を行い、肝生検組織所見と検討した。また IGF-1 と我々が NASH と関連するバイオマーカーとして報告した高感度 CRP との関連を検討した。

(2) 横浜市立大学で肝生検を施行した 147 症例を正常血糖値 (normal glucose tolerance: NGT) 群, 耐糖能異常群 (impaired fasting glucose: IFG) 群, 糖尿病 (diabetes mellitus: DM) 群の 3 群に分類し、NASH 病態、有病率とインスリン抵抗性、インスリン分泌量について検討した。

(3) 研究協力施設 9 施設 (横浜市立大学, 市立奈良病院, 広島大学, 高知大学, 佐賀大学, 大阪市立大学, 京都府立大学, 旭川医科大学, 済生会吹田病院) で肝生検を施行した 1048 例のデータベースを用い NAFLD 患者の高度線維化と関連するバイオマーカーを検討した。多変量解析から独立した因子として抽出された血小板の臨床有用性を検討した。

(4) 2 型糖尿病を有する NAFLD 患者 25 名に対し、シタグリブチン (50mg/日) を投与し 4 カ月間の肝機能 (AST, ALTT, γ -GTP), 脂質代謝, 糖代謝 (空腹時血糖, HbA1c) を検討し

た。

4. 研究成果

(1) IGFBP-1, IGF と脂肪肝および NASH 病態の検討: 肝生検を施行した NAFLD 患者の中で肝臓の内の脂肪沈着量から脂肪肝軽度群 (Grade 1 (<33%) 以下: 67 症例), 脂肪肝高度群 (Grade 2 以上 (>33%): 53 症例) に分類したところ血中 IGF-1 濃度は脂肪肝軽度群では $211.8 \pm 96.2 \mu\text{g/l}$, 高度群では $132.4 \pm 2.4 \mu\text{g/l}$ と有意に脂肪肝高度群で血中 IGF-1 濃度は低値であった ($p=0.03$)。また血中 IGFBP-1 濃度は脂肪肝軽度群では $16.2 \pm 3.4 \text{ng/ml}$, 高度群では $12.4 \pm 2.5 \text{ng/ml}$ と有意に脂肪肝高度群で血中 IGFBP-1 濃度は低値であった ($p=0.04$)。そのため血中 IGF-1, および IGFBP-1 の低値は肝臓の脂肪沈着量と関連することが示唆された。また血清 IGF-1 濃度は血清 ALT ($r=-0.325$, $p=0.008$), 高感度 CRP ($r=-0.311$, $p=0.022$) と逆相関を示し、IGF-1 が脂肪肝形成のみならず、NASH 発症と関与する可能性が示唆された。

(2) 血中インスリン値と NASH 病態の関連: 横浜市立大学で肝生検を施行した 147 症例の NAFLD 群を NGT 群 88 症例, IFG 群 23 症例, DM 群 36 症例の 3 群に分類した。血糖値は NGT 群 $98.7 \pm 6.0 \text{mg/dl}$, IFG 群 $115.5 \pm 4.7 \text{mg/dl}$, DM 群 $151.2 \pm 43.6 \text{mg/dl}$, 血中インスリン値は NGT 群 $12.6 \pm 8.2 \text{mg/dl}$, IFG 群 $20.7 \pm 13.5 \text{mg/dl}$, DM 群 $11.6 \pm 5.1 \text{mg/dl}$ であった。NASH の有病率は NGT 群 21.6%, IFG 65.2%, DM 群 41.7% と IFG 群で有意に高値であり、肝生検組織評価での NAFLD activity score (NAS) を用いて検討をすると NGT 群 3.28 ± 1.44 , IFG 群 4.39 ± 1.60 , DM 群 3.92 ± 1.63 と IFG 群で有意に高値であった。更に空腹時血糖値は NAS, 肝臓の線維化と相関を認めなかったが、空腹時インスリンは NAS ($r=0.364$, $p<0.0001$), 線維化スコア ($r=0.1777$, $p=0.0313$) と有意に相関を認めた。すなわちインスリン抵抗性のない血糖正常群、インスリン分泌能の低下した糖尿病群と比較し、インスリン分泌能が維持され高インスリン状態が持続している IGF 状態が NASH 発症と関与していることが示唆された。この研究結果は Journal of Diabetes Investigation 誌に採択され印刷中である。

(3) NASH 線維化進行例を判定する血小板の有用性の検討: 全国 9 施設で肝生検を施行した 1048 例の NAFLD 患者を対象として肝硬変と進行した NASH の背景を検討した。肝線維化でのステージ 0 は 216 症例, ステージ 1 は 334 症例, ステージ 2 は 270 症例, ステージ 3 は 187 症例, ステージ 4 (肝硬変) は 41 症例であった。線維化軽度群 (ステージ 0-2), 線維化進行群 (ステージ 3-4) と分類すると単変量解析で年齢 49.8 ± 15.3 歳対 57.6 ± 12.6 歳 ($p<0.0001$), AST が $54.6 \pm 36.4 \text{U/l}$ 対 $73.4 \pm 47.6 \text{U/l}$ ($P<0.0001$), アルカリフォスファターゼが $253.2 \pm 91.3 \text{U/l}$ 対 $285.8 \pm 115.4 \text{U/l}$ ($p<0.0001$), γ -GTP が $85.2 \pm 93.0 \text{U/l}$ 対 $100.2 \pm 92.9 \text{U/l}$ ($p=0.0322$), 血清フェリチン値が 242.2 ± 238.2 対 $300.4 \pm 279.5 \text{ng/ml}$ ($p=0.0038$), 血糖値が 110.3 ± 36.2 対 $125.0 \pm 48.5 \text{mg/dl}$ ($p<0.0001$), インスリン値が $13.6 \pm 9.8 \mu\text{U/ml}$ 対 $20.1 \pm 22.9 \mu\text{U/ml}$ ($p<0.0001$), 4 型コラーゲン 7s が $4.39 \pm 3.73 \text{ng/ml}$ 対 $6.31 \pm 2.56 \text{ng/ml}$ と有意に線維化

進行群で高値であり，コリンエステラーゼが 388.0 ± 93.5 U/l 対 351.6 ± 107.5 U/l ($p < 0.0001$)，アルブミン値 4.45 ± 0.38 mg/dl 対 4.21 ± 0.55 mg/dl ($p < 0.0001$)，ヘモグロビン 14.5 ± 1.6 g/dl 対 14.1 ± 1.7 g/dl ($p < 0.0001$)，血小板数 $23.4 \pm 6.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ 対 $17.8 \pm 6.6 \times 10^4/\mu\text{l}$ ($p < 0.0001$) と有意に低値であった．単変量で有意差のあった項目で線維化進行症例を規定する因子をロジスティック回帰分析を行ったところ空腹時インスリン値，血小板数，4型コラーゲン7sが独立して寄与する因子として認められた．今回はその中で血小板数測定の有用性を検討した．肝生検での線維化ステージと血小板数はStage 0で 24.8 ± 6.8 万，Stage 1で 23.7 ± 6.1 万，Stage 2で 22.0 ± 5.8 万，Stage 3で 18.9 ± 6.4 ，Stage 4で 12.4 ± 4.4 であった．血小板を用いて線維化進展例 (Stage 3-4) を診断する診断能はカットオフ値 19.2 万で AUROC 0.774、感度 62.7%、特異度 76.3%、肝硬変 (Stage 4) を診断する診断能はカットオフ値 15.3 万で AUROC 0.918、感度 80.5%、特異度 88.8% であった．血小板数は特殊な装置や判別式を必要とせず、慢性肝疾患の線維化を予測する値として汎用されているが、本検討により NAFLD 患者での適切な肝生検の時期、また肝臓がんや食道静脈瘤のスクリーニングを必要とする線維化進展例の予測に有用である可能性が示された．この研究結果は *Journal of Gastroenterology* 誌で発表を行った (*J Gastroenterol.* 2011;46:1300-1306)．

(4) 2型糖尿病を有する NAFLD 患者治療におけるシタグリブチンの有用性：糖尿病合併 NAFLD 25 例の平均年齢は 67.2 歳、平均糖尿病罹患歴は 11 年であった．シタグリブチン (50mg/日) 4 カ月投与により HbA1c は $8.09 \pm 1.55\%$ から $7.07 \pm 1.02\%$ に改善した．また肝機能では AST は 38.6 ± 19.5 U/l から 24.4 ± 7.30 U/l、ALT は 48.7 ± 26.7 U/l から 32.5 ± 19.6 U/l、 γ -GTP は 51.9 ± 33.7 U/l から 34.4 ± 16.8 U/l と有意に改善していた．GLP-1 は Vitro の系において肝細胞の脂肪化を減少させることが報告されており、DPP-4 を阻害することは糖尿病の改善のみならず脂肪肝の改善にも有用に働くことが考えられるが本研究によりシタグリブチンの NAFLD 治療薬としての可能性が示唆された．本研究結果は *Hepatogastroenterology* 誌で発表を行った (*Hepatogastroenterol.* 2011;58:2103-5)．

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 12 件)

① Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Thrombocytopenia is more severe in patients with chronic hepatitis C than in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2012;47:606-7. 査読有
DOI:10.1007/s00535-012-0556-5

② Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohno I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima

A. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:16. 査読有
DOI: 10.1186/1471-230X-12-16

③ Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Aoki N, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Yoshikawa T, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol.* 2012 Jan 5;12:2. 査読有
DOI: 10.1186/1471-230X-12-2

④ Iwasaki T, Yoneda M, Inamori M, Shirakawa J, Higurashi T, Maeda S, Terauchi Y, Nakajima A. Sitagliptin as a novel treatment agent for non-alcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus. *Hepatogastroenterology.* 2011;58:2103-5. 査読有
DOI: 10.5754/hge11263.

⑤ Yoneda M, Imajo K, Kirikoshi H, Nakajima A. Acoustic radiation force-based shear stiffness and non-invasive panels of tests in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2012;56:740-1. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.021>

⑥ Fujita K, Imajo K, Shinohara Y, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Endo H, Takahashi H, Abe Y, Inamori M, Shimamura T, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Liver microsomal triglyceride transfer protein activator may be a possible therapeutic agent in non-alcoholic steatohepatitis. *J Pharmacol Sci.* 2011;115:270-3. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.10R14FM>

⑦ Yoneda M, Nakajima A, Wada K. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: preface. *J Pharmacol Sci.* 2011;115:259-62. 査読無
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.11R01FM>

⑧ Yoneda M, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Eguchi Y, Suzuki Y, Aoki N, Kanemasa K, Imajo K, Chayama K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Yoshikawa T, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Platelet count for predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J*

Gastroenterol. 2011;46:1300-6. 査読有
DOI: 10.1007/s00535-011-0436-4

⑨Yoneda M. Efficacy of pitavastatin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis patients with dyslipidemia. Hepatol Res. 2011;41:1025-6. 査読無
DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00882.x.

⑩Yoneda M, Fujita K, Imajo K, Mawatari H, Kirikoshi H, Saito S, Nakajima A. Induction of microsomal triglyceride transfer protein expression is a candidate mechanism by which ezetimibe therapy might exert beneficial effects in patients with nonalcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol. 2011;46:415-6. 査読無
DOI: 10.1007/s00535-010-0356-8

⑪Hotta K, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A. Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. BMC Med Genet. 2010;11:172. 査読有
DOI: 10.1186/1471-2350-11-172

⑫Yoneda M, Suzuki K, Kato S, Fujita K, Nozaki Y, Hosono K, Saito S, Nakajima A. Nonalcoholic fatty liver disease: US-based acoustic radiation force impulse elastography. Radiology. 2010;256:640-7. 査読有
DOI: 10.1148/radiol.10091662

[学会発表] (計 13 件)

①米田正人. NAFLD の肝線維化ステージと血小板数, 肝生検 1048 症例での多施設検討. 第 39 回日本肝臓学会西部会. 2011 年 12 月 9 日. 岡山コンベンションセンター (岡山).

②Masato Yoneda, Correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and infection with the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis. The Liver Meeting 2011. 2011 年 11 月 7 日. サンフランシスココンベンションセンター (サンフランシスコ).

③米田正人. NASH 病態に対するコレステロール吸収阻害薬エゼチミブの治療効果. JDDW2011. 2011 年 10 月 21 日. 福岡国際会議場 (福岡).

④米田正人. NAFLD の発症、進展に歯周病菌 p. gingivalis 感染が関与する. JDDW2011. 2011 年 10 月 20 日. 福岡国際会議場 (福岡).

⑤米田正人. 糖尿病を有する NAFLD 患者に対するジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) 阻害薬シタグリプチンの使用経験. 第 47 回日本肝臓病学会総会 2011 年 6 月 3 日. ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東

京).

⑥米田正人. Acoustic Radiation Force Impulse imaging (ARFI) とフィブrosキャンを用いた NAFLD 患者での肝脂肪化, 炎症, 線維化の比較検討. 第 52 回日本消化器病学会大会. 2010 年 10 月 14 日. パシフィコ横浜 (神奈川).

⑦米田正人. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の脂質に注目した治療戦略—エゼチミブの NASH 患者に対するパイロットスタディーを踏まえて—. 第 14 回日本肝臓学会大会. 2010 年 10 月 14 日. パシフィコ横浜 (神奈川).

⑧米田正人. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症・増悪に歯周病菌が関与することのヒトおよび動物モデルを用いた解析. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010 年 5 月 28 日. 山形国際ホテル (山形).

⑨藤田浩司, 米田正人. NASH における ER ストレス応答亢進機序の解析. 第 46 回日本肝臓学会総会. 2010 年 5 月 28 日. 山形国際ホテル (山形).

⑩米田正人. NASH 患者に対するエゼチミブの有用性—6 ヶ月投与による肝組織改善効果のパイロットスタディー—. 第 96 回日本消化器病学会総会. 2010 年 4 月 22 日. 新潟県民会館 (新潟).

⑪藤田浩司, 米田正人. JNK シグナルを介した NASH 発症メカニズムの解析. 第 96 回日本消化器病学会総会. 2010 年 4 月 22 日. 新潟県民会館 (新潟).

⑫野崎雄一, 米田正人. NAFLD と肝血流: eNOS は体内脂肪分布を制御する. 第 96 回日本消化器病学会総会. 2010 年 4 月 22 日. 新潟県民会館 (新潟).

⑬野崎雄一, 米田正人. 一酸化窒素 (NO) は NAFL 形成を促進させるが, NASH 進展を抑制する; NAFLD 病態における NO の多様な作用とその機序について. 第 96 回日本消化器病学会総会. 2010 年 4 月 22 日. 新潟県民会館 (新潟).

[図書] (計 8 件)

①米田正人, 今城健人, 中島淳. NASH 病態に対するコレステロール吸収阻害薬 エゼチミブの治療効果. 消化と吸収. 特定非営利活動法人 日本消化吸収学会. 34 巻. 212-215 ページ. 2012 年 3 月 31 日発行

②米田正人, 今城健人, 河島圭吾, 中島淳. NAFLD の画像診断. 診断と治療. 診断と治療社. 99 巻. 1523-1529 ページ. 2011 年 9 月 5 日発行

③中島淳, 今城健人, 藤田浩司, 米田正人. NAFLD/NASH の血清脂質異常. 診断と治療. 診断と治療社. 99 巻. 1531-1538 ページ. 2011 年 9 月 5 日発行

④角田圭雄, 米田正人, 兵庫秀幸. NASH 診断の現状と課題. Adiposcience. フジメディアカ

ル出版. 7巻. 54-56 ページ. 2010年9月30日発行

⑤今城健人, 米田正人, 中島淳, 留野涉, 前山史朗, 中島淳. 糖尿病 (性) 脂肪肝. 日本臨床. 日本臨床社. 別冊肝・胆道症候群 I. 210-214 ページ. 2010年9月20日発行

⑥米田正人, 結束貴臣, 今城健人, 藤田浩司, 中島淳. NASH の治療. The Lipid. メディカルレビュー社. 21巻. 2010-2017 ページ. 2010年7月10日発行

⑦米田正人, 鈴木香峰理, 野崎雄一, 桐越博之, 藤田浩司, 中島淳, 前山史朗. Acoustic Radiation Force Impulse imaging (ARFI) elastography を用いた NAFLD 線維化判定の検討. アルコールと医学生物学. 東洋書店. 29巻. 122-125 ページ. 2010年4月10日

⑧鈴木香峰理, 桐越博之, 米田正人, 馬渡弘典, 藤田浩司, 高橋宏和, 阿部泰伸, 稲森正彦, 島村健, 小林規俊, 窪田賢輔, 斉藤聡, 中島淳. 非アルコール性肝疾患 (NAFLD) における脾体積の検討. アルコールと医学生物学. 東洋書店. 29巻. 126-129 ページ. 2010年4月10日

[その他]

ホームページ等

http://www.fukuhp.yokohama-cu.ac.jp/patient/guidance_of_the_medical/depts/digest.html

報道関連情報

米田正人: 気をつけたい「脂肪肝炎」太ると肝がんリスク高く. 女性より男性に多く. 食生活見直し減量を. 日本経済新聞 (夕刊) 元氣ナビらいふプラス, 2011年2月4日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 正人 (YONEDA MASATO)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 10423831

(2) 研究分担者

特記事項なし

(3) 連携研究者

特記事項なし