様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 ２４ 日現在

機関番号：１７７０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０９１００

研究課題名（和文）一般住民における非アルコール性脂肪肝の進展に関する分子疫学研究

研究課題名（英文）Molecular epidemiological study on the advancement of nonalcoholic fatty liver among general population.

研究代表者
指宿　りえ（IBUSUKI, RIE）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：９０７４７０１５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：一般集団における非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の進展に関わる環境・宿主要因を明らかにするために、横断的及び前向きに分子疫学研究を行った。対象者は、日本多施設共同コーホート研究に参加し腹部超音波検査を受けている研究協力者6,609名である。
近年、増加傾向にあるNAFLDの分布は、年齢と伴に上昇するものの50-60歳代にピークがあり、その後は低下していることが報告されている。本研究では、NAFLDは消失しても線維化は改善せず、加齢に伴う進行が上載せされる形で年齢と伴に肝線維化進展は持続していることが示唆され、NAFLD発生を防ぐことが肝繊維化予防のためにも重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年、増加傾向にある非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の健診受診者における頻度は、男性で30～40%, 女性は10～20%であり、NAFLDの性年齢別有病率は，日本の肥満人口を反映し、年齢と共に増加して、男性では40歳代、女性では60歳代をピークに低下する特徴がある。NAFLDの一部は脂肪性肝炎、肝硬変、肝癌と進展し、肝線維化が病態の上で重要な役割を有している。本研究における、一般住民に多く認められるNAFLDの経過と肝線維化に関する解明は、重症化例のスクリーニングや予防において重要であり、NAFLDの一次予防対策を講じるための新たに有用なエビデンスを提示した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the environmental and host factors involved in the advance of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)among general population, we conducted cross-sectional and prospective molecular epidemiological studies.
The subjects were 6,609 research collaborators who participated in the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) study and were undergoing abdominal ultrasound examination. In recent years, it has been reported that the distribution of NAFLD, which tends to increase, rises with age, but has a peak in the 50s to 60s and a decline thereafter. In this study, it was suggested that the disappearance of NAFLD does not improve fibrosis, and that the advancement of hepatic fibrosis continued with age, with age-related advancement being added. It has been shown that preventing the occurrence of NAFLD is also important for preventing hepatic fibrosis.

研究分野：分子栄養疫学

キーワード：NAFLD　脂肪肝　肝線維化

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

脂肪性肝疾患（FLD）は、肝細胞に中性脂肪が沈着し肝障害を引き起こす病態であり、脂肪滴を伴う肝細胞が30%以上のものが脂肪肝と定義されている。脂肪肝はアルコール性脂肪性肝疾患（ALD）と非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liverdisease ;NAFLD)に分類され、NAFLD は、さらに炎症を伴わない非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver : NAFL）と、慢性炎症から肝線維化、さらに肝硬変、肝癌に進展する非アルコール性脂肪肝炎(nonalcolic steatohepatitis: NASH）に分類される。日本にはNAFLDを有する患者が約1000万人、NASHが約200万存在すると報告されている。(Okanoue T, et al. J Gastroenterol Hepatol 2011)。NAFLD/NADH は、メタボリック症候群の肝臓での表現型とされ(Hamaguchi M et al,Ann InternMed 2005)、生活習慣病と深く関連しているため近年のライフスタイルの欧米化に伴い増加しつつあり、メタボリックシンドローム症候群と共通する予防対策が可能である。一方、NASH への進展にもメタボリックシンドロームと共通するアディポサイトカインやインスリン抵抗性、食事要因などの関与が指摘されている。この他にエンドトキシンや酸化ストレス、遺伝要因などの関与が考えられている。一方、遺伝要因に関しては、NASH を有する患者で、肥満に関与する倹約遺伝子である変異型β－adrenergic receptor（W64R）の WW 多型や炎症に関わる Interleukin-1beta-511 遺伝子の TT 多型を有する頻度が高かったことが報告されている(Nozaki Y, et al., alcohol ClinExp Res, 2004)。また、genome-wide association study (GWAS) 解析により、PNPLA3 の遺伝子多型がNAFLD/NASHの発症に関与していたことも報告されている。しかし、なぜNAFLDの一部のみがNASHに進展するかについては十分に解明されていない(Chwimmer JB, et al, Gastroentrology, 2009)。

２．研究の目的

本研究では、NAFLDの進展に関わる環境・宿主要因を明らかにするために、一般住民を対象に、横断的及び前向きに分子疫学研究を行う。

３．研究の方法

本研究は、文部科学省科学研究費によるコーホート・生体試料プラットフォームから支援を受け、提供された疫学情報と血液試料を用いた。対象者は、日本多施設共同コーホート研究（J - MICC Study）の研究協力者で、平成17～20 年度にあまみ島嶼地域、平成24 年度に鹿児島県本土地域でベースライン調査を実施した一般住民7,607 名の健診受診者のうち、ベースライン時の健診で腹部超音波検査を実施した35～69 歳の男女6,609 名である。ベースライン調査では喫煙・飲酒習慣、食生活、運動習慣、現既往歴、家族歴、ストレスなどの情報を質問票調査で収集し、更に血液採取（バフィー、血清、血漿)、脈波（CAVI）を用いた動脈硬化の測定を行った。更に、ベースライン後に腹部超音波検査を伴った健診を受けた対象者には別途、同意を得た上で健診結果と腹部超音波検査の結果の情報も健診機関から入手した。本研究は同研究科倫理委員会の承認を得て行った。

NAFLDは、腹部超音波検査で脂肪肝、HBs 抗原と HCV 抗体が陰性、飲酒歴無し・もしくは飲酒量が男性30g/日未満、女性20g/日未満（NAFLD/NASH 診療ガイドライン2014）と定義した。肝線維化の進展の程度は、NAFLD の定義に加えFIB4-index、TypeⅣコラーゲン7s（NAFLD/NASH 診療ガイドライン2014)、M2BPGi（Abe M, et al. J Gastroenterol.2012.）値を用いて評価し、定義した。

(1) NAFLD に関連する環境要因に関する横断的研究

ベースライン調査に参加した、男女 6,609 名を対象に、非アルコール性脂肪肝（NAFL） 有りを症例、NAFLD 無しを対照として、NAFL の進展度と動脈硬化要因との関連に関する症例・対照研究を行った。NAFL の肝線維化の進展の程度を評価するために、FIB-4 index 値を用いて症例を 3 グループ（低・中・高）に分類した。動脈硬化の指標として cardio-ankle vascular index （CAVI）値を用いて動脈硬化有りと無しの 2 グループに分類した。生活習慣病や生活習慣と NAFL の関連をロジスティック回帰モデルでオッズ比(OR)を見積もった。

(2) NAFLD に関連する宿主要因に関する横断的研究

ベースライン調査に参加した、男女 1,056 名(男 254 名、女 802 名)を対象に、エネルギー代謝に関わるβ2 アドレナリン受容体(BAR2)とβ3 アドレナリン受容体(BAR3) の遺伝子多型を用いて、NAFLD に対する肥満と宿主要因との相互作用を検討した。β2 アドレナリン受容体（BAR2）の C/G 多型(rs1042714)と、β2 アドレナリン受容体（BAR3）の C/T 多型(rs4994)について TaqMan PCR 法を用いて、遺伝子多型を解析した。genotype 群ごとの NAFLD に対する肥満、日常生活活動量、運動習慣量、1 日の摂取エネルギー量のオッズ比（OR)、及び相互作用をロジスティックモデルを用いて、性、年齢と関連因子で調整した上で見積もった。

(3) NAFLD の発生に関する前向き研究

ベースライン及び 5 年後の第二次調査に参加した、男女 1,711 名を対象にベースライン時と 5 年後の脂肪肝有無の変化について比較検討を行った。

(4) NAFLD の経時的変化に関する前向き研究

ベースライン調査に参加した男女 3,069 名のうち、8 年後まで経時的に追跡できた 831 名（男 296 名、女 535)を対象に、NAFL の発生・消失に伴う要因に関して解析を行った。経過中の脂肪肝発現と消失時には、腹部超音波検査での脂肪肝判定にバラツキが混在することから、ベースライン時、及び 8 年後を起点にそれぞれ 2 回連続して脂肪肝ありを NAFLD、2 回とも脂肪肝なしを対照とした。解析は重回帰分析を用い、年齢と関連要因で調整し男女別に行った。

(5) 一般住民女性における NAFLD の発生及び消失に伴う肝線維化の程度に関する前向き研究

対象者は、ベースライン調査に参加し、5 年後に第二次調査を受け、10 年間の腹部超音波検査結果が利用できた女性 228 名である。腹部超音波検査結果の経過には変動が認められるため、ベースライン時、及び 5 年後を起点にそれぞれ 2 回連続して脂肪肝ありを NAFLD、2 回とも脂肪肝なしを対照と定義し、ベースラインと 5 年後で、それぞれ NAFLD あり-ありを++群、なし-ありを－+群、あり-なしを+－群として解析した。肝線維化の評価は血清中の M2BPGi と TypeⅣコラーゲン 7s 値を用いた。解析は群間比較、及び経年変化は年齢で調整した ANOVA を用いた。

4．研究成果

(1) NAFLD に関連する環境要因に関する横断的研究

対象者における脂肪肝は 2,018 名（30.5%）であり、そのうちの 77.7%は NAFL で、男性 43%、女性 57%の割合であった。NAFLD 無し群に対して、男女ともに BMI と脂質異常症が

NAFL と有意に関連し、NAFLD の進展要因には、男女とも高年齢と高血圧あり、男性では多い日常生活活動量、女性では喫煙ありが関連している可能性が示唆された。FIB4 index を指標とした NAFL の進展度と、動脈硬化要因との関連は認められなかった。

(2) NAFLD に関連する宿主要因に関する横断的研究

NAFLD は、全体の 45.2%に認められ、NAFLD あり群の平均年齢は 56.2 歳、無し群は 54.5 歳であった。BAR2 の CC 群では、肥満有りの OR は、9.04 (6.58-12.42)、CG&GG 群で 6.74 (2.34-19.42)、BAR3 の TT 群では、8.40 (5.67-12.46)、TC&CC 群では、9.50 (5.90-15.32) であったが、いずれも相互作用は統計学的に有意ではなく、エネルギー摂取量、日常生活活動量、習慣的運動量に関しても相互作用は認められなかった。NAFLD に対する、肥満と BAR2 と BAR3 遺伝子多型との相互作用は認められなかった。

(3) NAFLD の発生に関する前向き研究

ベースライン調査時に、腹部超音波検査で脂肪肝と判定された対象者は 747 名(43.7%)、第二次調査では 696 名 (40.7%) であった。ベースライン時と 5 年後の脂肪肝の有無の変化は、脂肪肝無し持続が 791 名 (82.1%)、脂肪肝無しから有りに変化が 173 名 (18.0%)、脂肪肝有り持続が 523 名 (70.0%)、脂肪肝有りから無しに変化が 224 名 (30.0%) であった。脂肪肝無しから有りへの変化に比べ、脂肪肝有りから無しへの変化の割合が大きく、腹部超音波検査による脂肪肝の診断に大きなバラツキが存在している可能性が示唆された。以上の結果から、バラツキの影響をできるだけ排除して脂肪肝を定義するために、経時的な複数回の腹部超音波検査結果をもとに脂肪肝の評価を行う必要があることが考えられた。

(4) NAFLD の経時的変化に関する前向き研究

8 年間の NAFLD 発生は 23 例／463 例(5.7%)、消失例は 62 例／256 例(24.2%)であった。ベースライン時に NAFLD と正の関連があった要因は、男性で ALT、ALP、TG、BMI、女性では拡張期血圧、収縮期血圧、ALT、γ-GTP、TG、LDL、空腹時血糖(FBG)、BMI で、HDL-C は男女とも負の関連を認めた。男性の 8 年後の NAFLD 発生例では、8 年間の変化と関連する要因はなく、女性で ALT と γ-GTP、BMI の変化が正に関連していた。一方、8 年後の NAFLD 消失例と正の関連があったのは、男性で ALP と FBG の変化、女性でなし、負の関連は男性でなし、女性で LDL と FBG の変化であった。NAFLD はメタボリック症候群との関連要因を多く認め、女性の 8 年後の NAFLD の発生と消失にも認められた。

表 1. ベースライン時と 8 年後の NAFLD の経過

ベースライン時		8年後	N (%)
無し	→	無し	293 (55.6%)
有り	→	有り	149 (28.3%)
無し	→	有り	23 (4.3%)
有り	→	無し	62 (11.8%)

(5) 一般住民女性における NAFLD の発生及び消失に伴う肝線維化の程度に関する前向き研究

肝線維化マーカーである血清中 M2BPGi と TypeⅣコラーゲン 7s を用いて、脂肪肝の発生・持続・消失時における肝線維化の程度について、女性 228 名を対象に前向きに観察した。平均年齢は++群が 59.6 歳、－+群は 62.7 歳、+－群は 60.6 歳、対照群は 58.6 歳であった。ベースライン時の M2BPGi と TypeⅣコラーゲン 7s は、脂肪肝の発生・

表 2. ベースライン時と 5 年後の NAFLD の経過

ベースライン時→5年後	N (%)	Age
－ → －	150 (65.8%)	58.6±6.86
－ → ＋	6 (2.6%)	62.7±7.09
＋ → ＋	54 (23.7%)	59.6±6.32
＋ → －	18 (7.9%)	60.6±4.83

持続・消失群で対照群に比し高値を示した。5 年後の変化では、M2BPGi は持続群と発生群で対照群より有意に上昇し、消失群では持続群より変化量が小さいものの、値は対照群と同様に上昇した。一方、TypeIVコラーゲン７s では有意な変化が認められなかった。一般住民女性において、NAFLD があると肝線維化がより進むこと、線維化は脂肪肝消失後も改善せず、加齢に伴う進行が上載せされる形で継続することが示唆された。

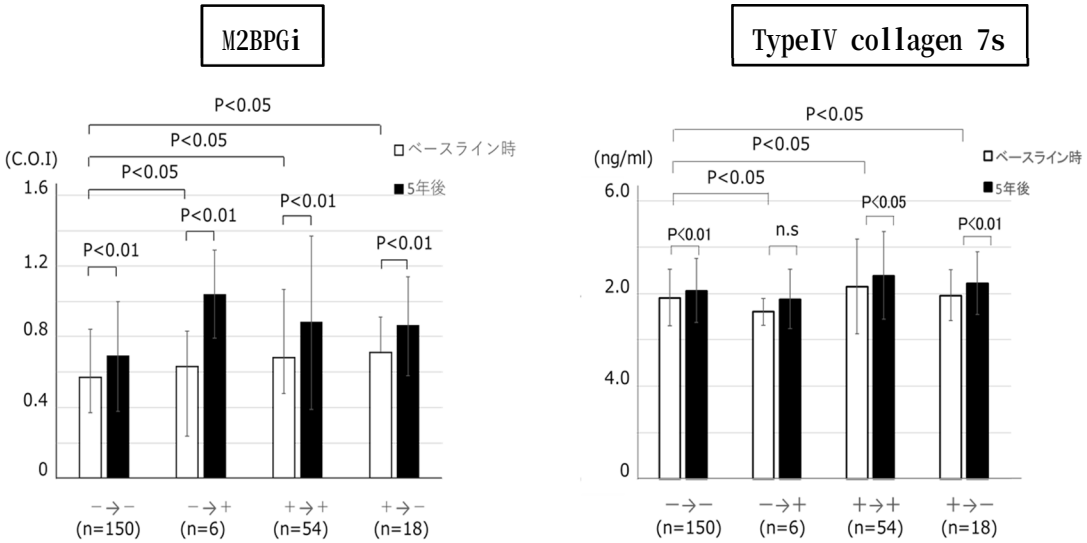

図１．NAFLD の変化群ごとの肝線維化マーカー値の比較

表 3．ベースライン時と 5 年後における肝線維化の変化量の比較

ベースライン時→5年後			M2BPGi			TypeIV collagen 7s	
			n	差	*p*	差	*p*
−	→	−	150	0.12±0.22	−	0.15±0.67	−
−	→	+	6	0.41±0.28	0.008	0.28±0.61	0.545
+	→	+	54	0.20±0.24	0.004	0.24±0.68	0.301
+	→	−	18	0.15±0.18	0.133	0.27±0.56	0.512

肥満やメタボリック症候群の増加に伴い増加している NAFLD の分布は、男性で 40 歳代、女性で 60 歳代をピークに増加から減少に転じることが報告されている。本研究の結果から、NAFLD は消失しても線維化は改善せず、加齢に伴う進行が上載せされる形で年齢と伴に肝線維化進展は持続していることが示唆され、NAFLD 発生を防ぐことが肝繊維化予防のためにも重要であることが示された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　0　件）

〔学会発表〕（計　5　件）

① 一般住民女性における非アルコール性脂肪肝と肝線維化に関する前向き研究．第 29 回日本疫学会学術総会（2019）、東京．

② 指宿 りえ、下敷領一平、西本大策、嶽崎俊郎．非アルコール性脂肪性肝疾患の経時的変化の男女差に関するコーホート研究．第 77 回日本公衆衛生学会総会（福島）、2018 年．

③ 指宿 りえ、Yora Nindida、下敷領一平、嶋谷 圭一、桑原 和代、中畑 典子、前之原 茂穂、嶽崎俊郎． 肥満及び糖代謝異常に対する間食習慣と宿主要因の相互作用に関する研究．第 28 回日本疫学会（2018）、福島．

④ 指宿 りえ、嶽崎俊郎．脂肪肝の進展と動脈硬化要因との関連についての横断的研究．第 75 回日本公衆衛生学会総会（大阪）、2016 年．

⑤ Ibusuki R, Shimatani K, Tara Sefanya Kairupan, Yora Nindita, Shimoshikiryo I, Maenohara S, Takezaki T. Risk of nonalcoholic steatohepatitis among Japanese general population. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, APOCP8th General Assembly（Brisbane）, 2016.

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕

ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：嶽崎　俊郎

ローマ字氏名：TAKEZAKI, toshiro

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8 桁）：50227013

研究分担者氏名：井戸　章雄

ローマ字氏名：IDO, akio

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8 桁）：30291545