

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03197

研究課題名(和文) 脂肪酸代謝の異常と肝癌リスクの増大 新しいNASHモデルによる生体防御機構の解明

研究課題名(英文) The abnormal metabolism of fatty acid increases a risk of liver cancer - the study for protective mechanism against NASH using new animal models

研究代表者

有泉 俊一 (Ariizumi, Shyunichi)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40277158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000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、39%に肝癌を発症した。DKOマウスをベースに、脂肪細胞または肝細胞にのみp62を発現する組織細胞特異的p62レスキューマウスを作製した。肝細胞のp62レスキューはNASHの炎症線維化を抑制し、肝癌の発症を14%に低下させた。ヒトNASH肝癌臨床標本についてp62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p62染色強度と局在は、肝炎症、線維化と関連したが、癌部のp62発現強度と局在は、病理学的悪性度や大きさと関連しなかった。p62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、肝癌へ進行する致命的疾患にも関わらず、その発症機序は未解明であり、NASH進行および肝癌発生を阻止するための薬物治療も確立していない。本研究は、DKOマウスに高脂肪食を摂取させるという方法でヒトNASHおよび肝癌に類似する新規モデルを作製したことにより、NASH肝発癌のメカニズム解明に寄与出来る。基礎と臨床の両面から、肝細胞のp62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、p62が新しいNASHの治療標的と成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 severe NASH and liver cancers by a high fat feeding. To elucidate the mechanism of liver carcinogenesis associated with organ cross talks, tissue specific conditional p62 rescue mice were generated and 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 p62 in human NASH and liver cancer, clinical liver specimens collected by surgery were analyzed by p62 immunohistochemistry. The intensity and localization of p62 associated with hepatic inflammation and fibrosis in non-tumor (cirrhosis) area, however, did not associate with differentiation and size of liver cancers.

p62 in hepatocytes was considered to play a protective role against the development of steatohepatitis and liver cancer. Activation of p62 could be a promising target for the prevention and treatment of NASH and liver cancer.

研究分野：消化器外科学

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 1000 万人は非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic 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ている。NAFLD の 10-20% は肝硬変、肝癌へ進行する致死的疾患である Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) が含まれるため、積極的な医療介入を要する。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いない。全身の脂肪酸代謝異常による肝細胞への脂肪沈着と小胞体ストレス、脂肪毒性に加え、腸内細菌叢異常、内臓脂肪からの炎症シグナル、酸化ストレスなど肝のみならず全身の多様な因子が関与する “Multiple parallel hits hypothesis” が提唱・支持されている (Tilg H, et al. *Hepatology*, 2010)。

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、*p62* 欠失による過食肥満が腸内細菌叢異常を誘導し腸管内の LPS 産生を増加させる、*Nrf2* 欠失による腸管バリア機能異常が血中への LPS 流入を増加させる、肥満による内臓脂肪の炎症が炎症性サイトカイン産生を増加させる、*Nrf2* 欠失により肝 Kupffer 細胞の LPS への感受性が異常亢進し肝炎症応答シグナルを活性化することにより NASH を発症する (Akiyama K, et al. *Exp Anim*, 2018)。

更に、DKO マウスは 60% 高脂肪食 (HFD) を 26 週間 (6-32 週齢) 摂餌により、全例に強い肝線維化伴う重症 NASH を発症し、更に約 40% に肝癌を発生する肝癌モデルである。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 (Umamura 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、肝細胞、Kupffer 細胞 (肝臓マクロファージ)、腸管上皮細胞、脂肪細胞の *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、これらの各レスキューマウスと全身欠失マウスを通常状態、高脂肪食投与による肝発症促進状態において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、体重を経時的に測定した。32 週齢 (HFD 摂餌 26 週後) のマウスより、血液、肝臓、白色 (内臓) 脂肪組織 (white adipose tissue: WAT)、褐色脂肪組織 (brown adipose tissue: BAT) 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) 内臓脂肪組織の病理学的評価: 内臓脂肪組織について HE 染色を行い、内臓脂肪の炎症によって形成される crown like structure (CLS) の数と程度を評価した。

(5) DKO マウスをベースとした、脂肪細胞特異的 *p62*、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<sup>KI/KI</sup>*) を作製し、このマウスとの交配により、*p62<sup>KI/KI</sup>/Nrf2<sup>-/-</sup>* 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<sup>KI/KI</sup>/Nrf2<sup>-/-</sup>* 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。これにより生まれる仔は、*Cre* が発現する組織でのみ *LoxP* で挟まれた転写終結シグナルと *polyA* 付加シグナルが除去されるため、*p62* の発現が組織特異的にレスキューされる。本

研究では、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 Adipoq-Cre と Albumin-Cre マウスを用いた（最終遺伝子型は、 $p62^{KI/KI:Adipoq-cre+}/Nrf2^{-/-}$ ；Adip-res マウス、または、 $p62^{KI/KI:Alb-cre+}/Nrf2^{-/-}$ ；Hep-res マウス）。

(6) 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、(2) 肝組織の NASH 病勢評価、(3) 内臓脂肪病理評価を行い、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>

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。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、p62 免疫染色に加え、ubiquitin 結合部位を持つ p62 が autophagy と ubiquitin proteasome 系の双方のタンパク分解系に關与する点に着目して、multi-ubiquitin 免疫染色を行い、癌部および非癌部の染色強度、染色パターンなどを解析した。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 60% 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 (-)）に分けたところ、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）。

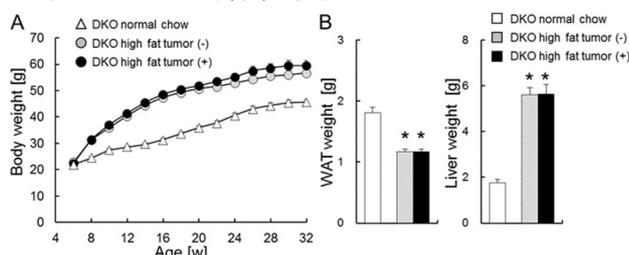


図 1 p62 および Nrf2 double knockout (DKO) マウスは肥満を来し、60% 高脂肪食により増悪する。高脂肪食により内臓脂肪は萎縮し、肝は腫大する。  
\*  $P < 0.05$ , vs. normal chow

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、細胞間に網目状に線維の伸び出しが認められ、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）。

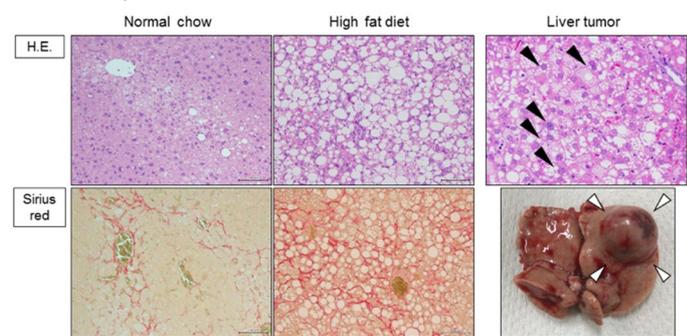


図 2 DKO マウスは、高脂肪食摂餌により高度の肝脂肪化、炎症、線維化を来し、約 39% に肝腫瘍を発生する。腫瘍は、脂肪を伴い NC 比の大きな異型細胞を伴う高分化肝癌の像を示す。

(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）。

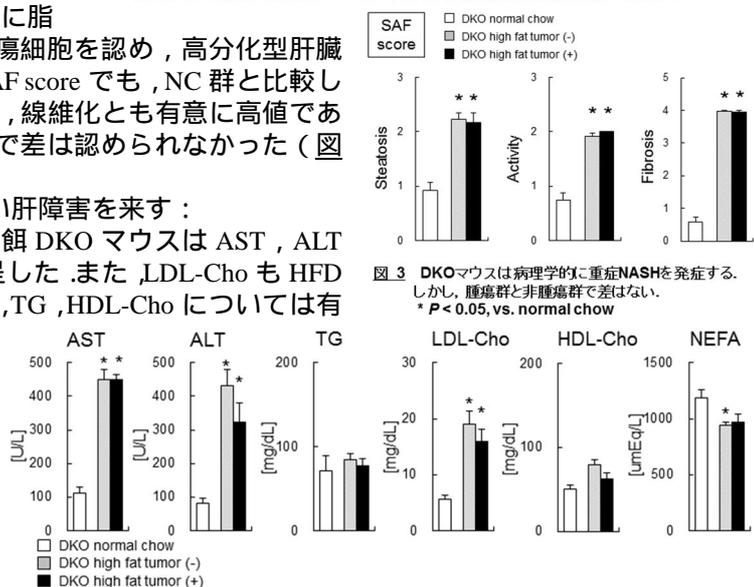


図 3 DKO マウスは病理学的に重症 NASH を発症する。しかし、腫瘍群と非腫瘍群で差はない。  
\*  $P < 0.05$ , vs. normal chow

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

(3) HFD 摂餌 DKO マウスは、高度の crown like structure (CLS) 形成を認める：

DKO マウスでは、NC 摂餌によっても内臓(白色)脂肪に crown like structure (CLS) の形成を認め、HFD 摂餌は CLS 形成を増悪させた。しかし、腫瘍群と非腫瘍群の間で CLS の形成の程度や数に有意な差は認められなかった(図5)。

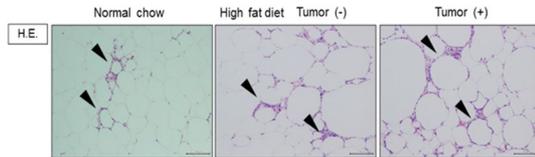


図5 DKOマウスは、内臓脂肪にCLSを認め、高脂肪食により増悪する。

(4) 脂肪細胞特異的 p62 (Adip-res マウス)、または肝細胞特異的 p62 レスキュー (Hep-res) マウスの作製：

DKO マウスをベースとして、脂肪細胞、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。脂肪細胞と肝細胞の p62 の発現(レスキュー)を immunoblot にて確認した(図6)。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。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6)。

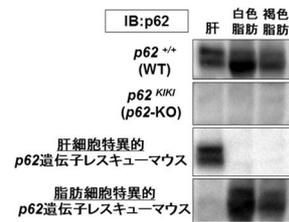


図6 組織細胞特異的 p62 遺伝子レスキューマウスの作製

(5) 脂肪細胞、肝細胞特異的 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、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7A) 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 Hep-res 群で、肝腫大が抑制されていたが、HFD 摂餌群では差は認められなかった(図7B)。

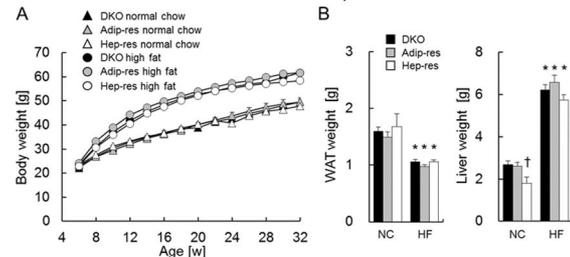


図7 DKOマウスの脂肪細胞特異的p62レスキューおよび肝細胞特異的p62レスキューは、体重に影響を与えず、肥満を呈す。高脂肪食により内臓脂肪は萎縮し、肝は腫大する。\* P < 0.05, vs. normal chow, † P < 0.05, vs. DKO.

(6) 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：

HFD13 週間摂餌時および HFD26 週間摂餌時の病理組織を比較した。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8, 9)。一方、肝細胞の p62 レスキュー (Hep-res) は、NASH の肝脂肪化 (DKO 2.4 ± 0.1 vs Hep-res 1.7 ± 0.1)、炎症 (DKO 2.0 ± 0.0 vs Hep-res 1.4 ± 0.2)、線維化 (DKO 4.0 ± 0.1 vs Hep-res 2.8 ± 0.2) と NASH 進展を抑制した(図8, 9) 肝癌の発生率は 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

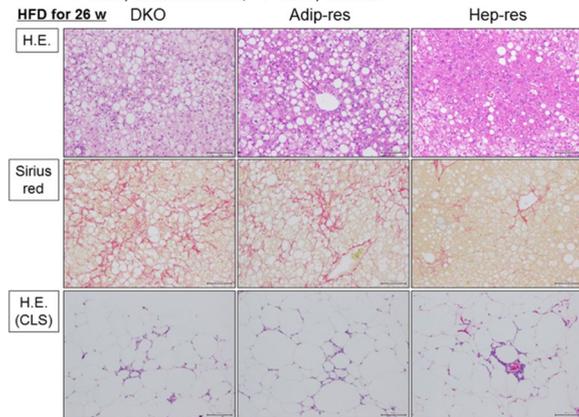


図8 肝細胞特異的p62レスキューは、NASHの進行を抑制する。

の p62 レスキューは肝癌の発生を 14% に低下させた。内臓脂肪の CLS については、DKO マウス、Adip-res マウス、Hep-res マウスの間で大きな違いを認めなかった。

(7) 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。

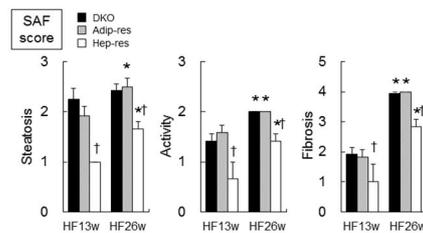


図9 肝細胞特異的p62レスキューは、NASH進展を抑制する。\* P < 0.05, vs. normal chow, † P < 0.05, vs. DKO.

血液生化学検査では、NASH 群で慢性 C 型肝炎肝癌患者 (CH(c)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、CH(c)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、CH(c)群では肝障害、肝予備能の低下が認

Table 1 対象症例の各疾患群別の基本情報	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
Age (years)	70.5 ± 10.0	69.5 ± 7.7	64.5 ± 13.0	1 vs. 2 1 vs. 3
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
<b>Life style-related diseases</b>				
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
<b>Hepatic abnormalities</b>				
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
<b>Glucose and lipid profiles</b>				
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
<b>Tumor marker</b>				
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

められ、肝予備能は CH(c)群でより低下していると考えられた。

(8) p62 免疫組織学的解析：

p62 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。p62 の発現は症例ごとに大きく異なっていたが、総じて非癌部よりも癌部に強い染色性が認められた(図 10)。p62 の染色性に依りて、非癌部は染色無し群と有り群の 2 群に、癌部は染色無しまたは弱群、中等度群、強度群の 3 群に層別化し相関解析を行った。また、p62 の局在を、細胞質に染色される症例 (cytoplasm 群) と、細胞質+核もしくは核のみに染色される症例 (nuclear 群) の 2 群に層別化して相関解析を行った。

(9-i) 非癌部の解析：

CH(c)群には非癌部における p62 の染色がない例 (p62(-)) が有意に多く含まれており (29/49 例)、一方、NASH 群には、p62 の発現がある例 (p62(+)) が有意に多く含まれていた (44/50 例、図 11A)。SAF score との関係性については、p62(+) 群では有意に血小板数が多く、SAF score のうち steatosis が有意に低下していた (図 12A)。

p62 の染色局在に着目した解析では、核に染色性のある nuclear 群は、有意に CC 群非癌部 (正常肝) を多く含んでいたが (19/48 例、図 11C)、NASH 群と CH(c)群の間には差が認められなかった。SAF score では、cytoplasm 群で ballooning および fibrosis が有意に高値であった (図 12B)。

(9-ii) 癌部の解析：

癌部の p62 免疫染色の発現強度に着目した解析では、p62 の発現が強度の症例が NASH HCC 群において有意に多かった (強度 27 例、中等度 13 例、弱または無し 10 例)。一方、p62 の発現が弱または無い症例が CC 群で有意に多かった (図 11B)。

また、p62 の局在について、主に細胞質に染色が見られる群 (cytoplasm 群) と核単独もしくは核と細胞質に染色が見られる群 (nuclear 群) に層別化すると、NASH 肝癌群では有意に cytoplasm 群が多く (cytoplasm 群 31 例、nuclear 群 18 例)、CC 群では有意に nuclear 群が多かった (cytoplasm 群 9 例、nuclear 群 39 例、図 11D)。

一方、肝細胞癌 (NASH 群、CH(c)群) に着目した場合、p62 の局在は、肝細胞癌の分化度、T factor、腫瘍マーカー (AFP、PIVKA<sub>4</sub>) など悪性度に関与する因子とは有意な相関は認められなかった。更に、T 因子について、T1+T2 群、T3+T4 群として 2 層に層別化し、p62 の染色強度と染色局在について解析したが、有意な相関は認められなかった。

(9) Multi-ubiquitin 免疫組織学的解析：

Multi-ubiquitin の染色性は、非癌部と癌部で大きな違いは認めなかった。また、染色強度については、染色性があっても中～強度の標本は少なく、殆どが弱い発現であったため、非癌部、癌部とも染色無し群と有り群の 2 群に層別化し相関解析を行った。染色局在については、非癌部では染色は全て細胞質に見られ、核の染色は認められなかった。

(9-i) 非癌部の解析：

Multi-ubiquitin の染色有群と無群に含まれる疾患の割合を解析したところ、CH(c)群では染色の無い例が多く (37/49 例)、CC 群 (正常肝) では染色の有る例が多かった (35/48 例、図 13A)。血液生化学検査との相関解析では、multi-ubiquitin の染色が無い群で、有意に血小板、PT%、HDL-Cho が低下していた (図 13B)。SAF score との比較では、染色の無い群では有意に lobular inflammation および ballooning が増加していた (図 13C)。

(9-ii) 癌部の解析：

癌部組織の multi-ubiquitin の染色の有群と無群に層別化し、患者情報、血液生化学、癌病理組織悪性度などと相関を解析したが、有意な差を持つ項目は認められなかった。また、p62 の発現部位との類似性に着目したが、p62 と multi-ubiquitin の局在は多くの症例で異なっており、一定の傾向を示さなかった。

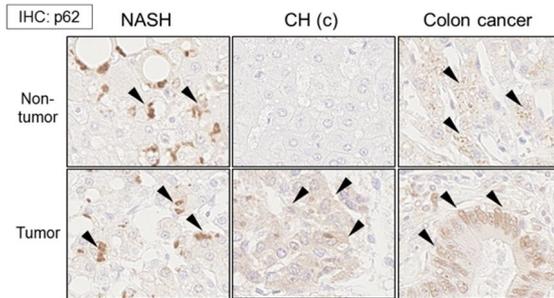


図 10 ヒト臨床標本のp62免疫染色 (original magnification x60)

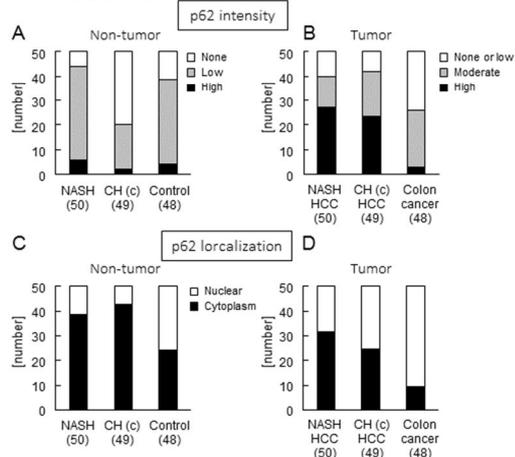


図 11 疾患群別のp62の発現強度と局在の比較

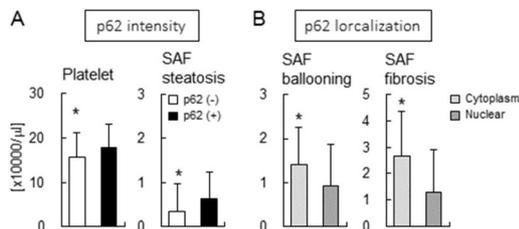


図 12 p62 の発現強度と局在は、血小板数、SAFと関連する。  
\* P < 0.05, between two groups.

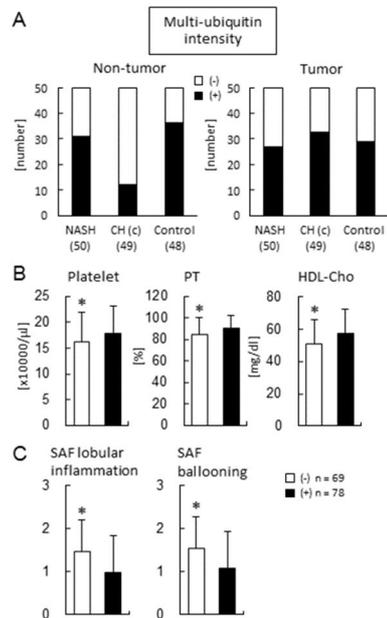


図 13 Multi-ubiquitinの発現強度の相関解析。  
\* P < 0.05, between two groups.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shida T, Oshida N, Oh S, Okada K, Shoda J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Progressive reduction in skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is associated with a worsening of the hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Metab Syndr Obes	6. 最初と最後の頁 495-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/DMSO.S185705	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 Oshida N, Shida T, Oh S, Kim T, Isobe T, Okamoto Y, Kamimaki T, Okada K, Suzuki H, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Urinary levels of Titin-N fragment, a skeletal muscle damage maker, are increased in subjects with Nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 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 -
1. 著者名 Ariizumi S, Ban D, Abe Y, Kumamoto T, Koizumi S, Tanabe M, Shinoda M, Endo I, Otsubo T, Yamamoto M	4. 巻 39
2. 論文標題 High-signal-intensity MR Image in the Hepatobiliary Phase Predicts Long-term Survival in Patients With Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4219-4225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.13583	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 Liang J, Ariizumi S, Nakano M, Yamamoto M	4. 巻 39
2. 論文標題 Diabetes Mellitus and/or Nonalcoholic Steatohepatitis-related Hepatocellular Carcinoma Showed Favorable Surgical Outcomes After Hepatectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5639-5643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.13760	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 Saito S, Kodama K, Kogiso T, Yamanashi Y, Taniai M, Ariizumi S, Yamamoto M, Tokushige K	4. 巻 59
2. 論文標題 A case of atypical sarcoidosis diagnosed by massive splenomegaly.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 641-648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3646-19	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 Nanashima A, Ariizumi S, Yamamoto M	4. 巻 50
2. 論文標題 Right anatomical hepatectomy: pioneers, evolution, and the future.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 97-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01809-6	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 Kim DS, Kim BW, Hatano E, Hwang S, Hasegawa K, Kudo A, Ariizumi S, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Surgical Outcomes of Hepatocellular Carcinoma With Bile Duct Tumor Thrombus: A Korea-Japan Multicenter Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA	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 Ariizumi SI, Nanashima A, Yamamoto M	4. 巻 25
2. 論文標題 Anterior approach in right hepatectomy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 351-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.567	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 Furuta M, Tanaka H, Shiraishi Y, Unida T, Imamura M, Fujimoto A, Fujita M, Sasaki-Oku A, Maejima K, Nakano K, Kawakami Y, Arihiro K, Aikata H, Ueno M, Hayami S, Ariizumi SI, et al.	4. 巻 18
2. 論文標題 Characterization of HBV integration patterns and timing in liver cancer and HBV-infected livers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25075-25088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25308	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 Wardell CP, Fujita M, Yamada T, Simbolo M, Fassan M, Ariizumi SI, et al.	4. 巻 68
2. 論文標題 Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hepatol	6. 最初と最後の頁 959-969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2018.01.009	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 Nanashima A, Ariizumi S, Yamamoto M	4. 巻 25
2. 論文標題 East meets West: East and West pioneers of "anatomical right hepatectomy" - period of dawn to establishment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JHPBS	6. 最初と最後の頁 214-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.531	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 T, Oshida N, Oh S, Okada K, Shoda J	4. 巻 12
2. 論文標題 Progressive reduction in skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is associated with a worsening of the hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Metab Syndr Obes	6. 最初と最後の頁 495-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/DMSO.S185705	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 Akiyama K, Warabi E, Okada K, Yanagawa T, Tokushige K, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 67
2. 論文標題 Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 201-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0112	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 T, Akiyama K, Oh S, Sawai A, Isobe T, Okamoto Y, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K, Onizawa K, Tanaka H, Iijima H, Shoda J	4. 巻 53
2. 論文標題 Skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is an important determinant affecting pathophysiology of NAFLD.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 535-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-017-1377-3	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

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
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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雅一
2. 発表標題 日本腹部救急医学会の現状と問題点（理事長講演）.
3. 学会等名 第55回日本腹部救急医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雅一, 有泉俊一
2. 発表標題 小型肝細胞癌に対する系統的肝区域・亜区域切除術の変遷と手術成績（パネルディスカッション18 系統的肝切除をめぐる諸問題 術式の選択と長期予後の観点から）
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotera Y, Yamamoto M, Omori A, Ariizumi S
2. 発表標題 Experience of laparoscopic partial liver resection for potato liver-improvement of efficacy to insert first port- (Oral Session 9)
3. 学会等名 The 2nd World Congress of the International Laparoscopic Liver Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ariizumi S, Kotera Y, Omori A, Nemoto S, Katagiri S, Egawa H, Yamamoto M
2. 発表標題 New Forceps for Glissonean pedicle approach in laparoscopic hepatectomy (ePoster1 Surgical Techniques).
3. 学会等名 The 2nd World Congress of the International Laparoscopic Liver Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小寺由人, 江川裕人, 大森亜紀子, 山下信吾, 加藤孝章, 根本 慧, 有泉俊一, 山本雅一
2. 発表標題 腫瘍性病変合併患者に対する肝移植手術の検討 ( 主題関連演題22【肝】肝移植ハイリスク患者への挑戦 ) .
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有泉俊一, 片桐 聡, 山本雅一
2. 発表標題 肝細胞癌に対する系統的肝切除後の合併症は生存率に影響している ( ワークショップ24 消化器がん術後合併症と予後との関係 ) .
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有泉俊一, 小寺由人, 山下信吾, 大森亜紀子, 加藤孝章, 根本慧, 樋口亮太, 谷澤武久, 植村修一郎, 出雲 渉, 青山翔太, 片桐 聡, 江川裕人, 山本雅一
2. 発表標題 肝細胞癌や生体肝移植ドナーに対するAnterior Approachによる右肝切除は安全である
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有泉俊一, 伴 大輔, 阿部雄太, 熊本宜文, 小泉 哲, 田邊 稔, 板野 理, 遠藤 格, 大坪毅人, 山本雅一
2. 発表標題 臨床に対応した肝癌亜分類の推奨 EOB-MRI 肝細胞相で高信号な肝細胞癌は肝細胞癌の一亜型である
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有泉俊一,小寺由人,山下信吾,大森亜紀子,加藤孝章,根本 慧,片桐 聡,江川裕人,山本雅一
2. 発表標題 CCR15とvirtual hepatectomyは肝癌に対する安全な解剖学的切除の術式選択に必要である
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有泉俊一,小寺由人,山下信吾,大森亜紀子,加藤孝章,根本 慧,片桐 聡,江川裕人,山本雅一
2. 発表標題 Safe anatomical hepatectomy with Glissonian pedicle transection method for HCC
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有泉俊一,小寺由人,山下信吾,大森亜紀子,加藤孝章,根本 慧,樋口亮太,谷澤武久,植村修一郎,出雲 渉,片桐 聡,江川裕人,山本雅一
2. 発表標題 肉眼分類による肝切除と術後補助療法は肝内胆管癌のベストプラクティス
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 有泉俊一,山本雅一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 秀潤社	5. 総ページ数 350
3. 書名 ビジュアルサージカル 消化器外科手術 肝臓・脾臓.標準手技をイラストと動画で学ぶ.	

1. 著者名 正田純一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 455
3. 書名 胆石の形成機序 消化器疾患診断・治療指針	

1. 著者名 正田純一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 355
3. 書名 胆石の形成機序 膵・胆道疾患診療の最前線	

1. 著者名 正田純一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ライフメディコム	5. 総ページ数 105
3. 書名 カレントセラピー（NAFLD/NASHの運動療法）	

1. 著者名 正田純一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学図書出版	5. 総ページ数 586
3. 書名 胆と膵（性差による臨床像の差違 胆石症）	

1. 著者名 正田純一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学図書出版	5. 総ページ数 264
3. 書名 胆と膵（コレステロール胆石とウルソデオキシコール酸）	

〔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	徳重 克年  (Tokushige Katsutoshi)  (60188729)	東京女子医科大学・医学部・教授   (32653)	
研究分担者	山本 雅一  (Yamamoto Masakazu)  (60220498)	東京女子医科大学・医学部・教授   (32653)	
研究分担者	蕨 栄治  (Wasabi Eiji)  (70396612)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究分担者	岡田 浩介  (Okada Kosuke)  (80757526)	筑波大学・附属病院・病院講師   (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
---------	---------