

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07930

研究課題名(和文)臓器連関の視点からの組織細胞特異的レスキューマウスを用いたNASH肝発癌機構解明

研究課題名(英文)The mechanism of liver carcinogenesis in NASH from the view point of organ crosstalk using tissue specific conditional rescue mice

研究代表者

岡田 浩介 (OKADA, Kosuke)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：80757526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、高脂肪食摂餌で重症脂肪性肝炎と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ところ、肝細胞のp62レスキューは脂肪性肝炎の炎症線維化を抑制し、肝癌の発症を14%に低下させた。NASH肝癌臨床標本についてp62の免疫染色を行い、患者情報と比較解析を行った。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T因子と関連しなかった。

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、肝癌へ進行する致死的疾患にも関わらず、その発症機序は未解明であり、確立された薬物治療も存在しない。本研究は、DKOマウスに高脂肪食を摂餌させるという簡便な方法でヒト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、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意義が大きい。

研究成果の概要(英文)： We generated p62 and Nrf2 double knockout (DKO) mice and demonstrated that these mice developed to NASH. And, we found that DKO mice developed severe fibrosis and liver cancer induced by high fat diet. To elucidate the mechanism of liver carcinogenesis in organ crosstalk, we generated tissue specific conditional p62 rescue mice. The rescue of hepatocytes p62 suppressed the development of NASH and reduced the prevalence of liver cancer from 39% to 14%. To evaluate the role of p62 in human NASH and liver cancer, clinical specimens collected by surgery were analyzed by p62 immunohistochemistry. The intensity and localization of p62 associated with hepatic inflammation and fibrosis in non-tumor area, however, did not associate with differentiation and size of liver cancers. p62 in hepatocytes played 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：肝臓病学

キーワード：NASH 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

(1) 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性疾患である Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) が含まれ、積極的な医療介入が必要である。

(2) 単純性脂肪肝を基礎に炎症、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。肝細胞への脂肪沈着、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” が提唱され支持されている (Tilg H, et al. *Hepatology*, 2010)。

(3) 我々が作製した “p62 および *Nrf2* 遺伝子二重欠失 (double knockout; DKO) マウス” (特許第 6020791 号) は通常食の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 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 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、② *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、③ 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、④ *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)。

(4) DKO マウスに 60% 高脂肪食 (HFD) を 26 週間摂餌させると、全例に強い肝線維化伴う重症 NASH を発症し、更に約 40% に肝癌が認められる。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- $\beta$  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* の機能障害の肝癌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) が肝癌の進行に影響することも報告され (Umemura 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、脂肪細胞、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、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癌促進状態において肝病態の変化と肝発癌の頻度を比較解析し、臓器連関の視点から肝発癌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、p62 の免疫組織学的解析を行い、染色強度や局在と、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), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-Cho), high density lipoprotein (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 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<sup>KI/KI</sup>/*Adipoq-cre*<sup>+/+</sup>/*Nrf2*<sup>-/-</sup>; *Adip-res* マウス、または、p62<sup>KI/KI</sup>/*Alb-cre*<sup>+/+</sup>/*Nrf2*<sup>-/-</sup>; *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 (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) との関係性を統計学的に解析した.

#### 4. 研究成果

(1) DKO マウスは 60%HFD 摂餌により重症の脂肪性肝炎と肝癌を発症する:

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.

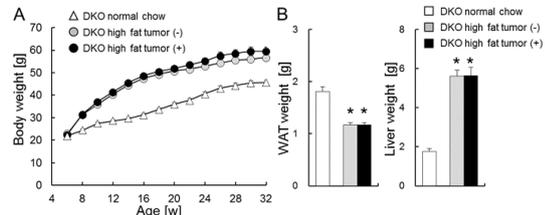


図 1 p62およびNrf2 double knockout(DKO)マウスは肥満を来し, 60%高脂肪食により増悪する. 高脂肪食により内臓脂肪は萎縮し, 肝は腫大する. \* P < 0.05, vs. normal chow

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 マウスは脂肪性肝炎を発症したが, 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. 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). 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).

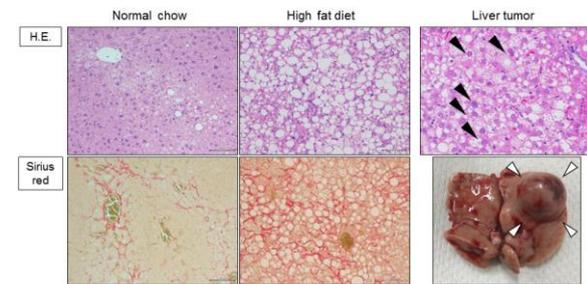


図 2 DKOマウスは, 高脂肪食摂餌により高度の肝脂肪化, 炎症, 線維化を来し, 約39%に肝腫瘍を発生する. 腫瘍は, 脂肪を伴いNC比の大きな異型細胞を伴う高分化肝癌の像を示す.

(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).

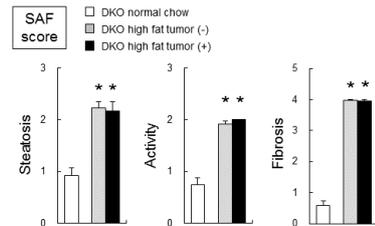


図 3 DKOマウスは病理学的に重症NASHを発症する. しかし, 腫瘍群と非腫瘍群で差はない. \* P < 0.05, vs. normal chow

(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).

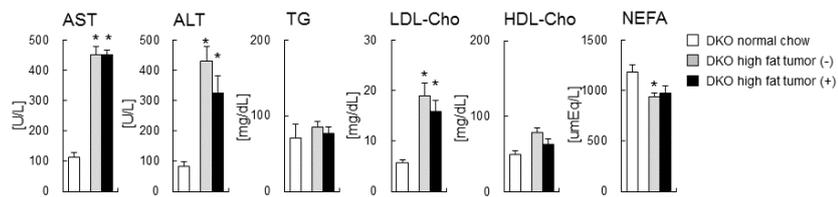


図 4 DKOマウスは肝障害を来し, 高脂肪食摂餌で増悪する. しかし, 腫瘍群と非腫瘍群で差は乏しい. \* P < 0.05, vs. normal chow

(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:

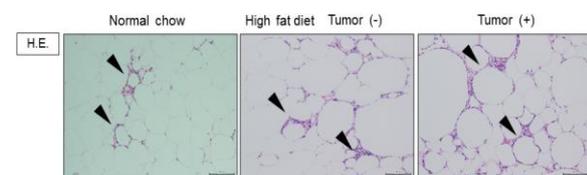


図 5 DKOマウスは, 内臓脂肪にcrown like structure (CLS)を伴い, 高脂肪食により増悪する.

DKO マウスをベースとして、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。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。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 6)。

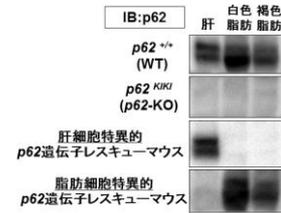


図 6 組織細胞特異的 *p62* 遺伝子レスキューマウスの作製

(5) 脂肪細胞、または肝細胞特異的 *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)。

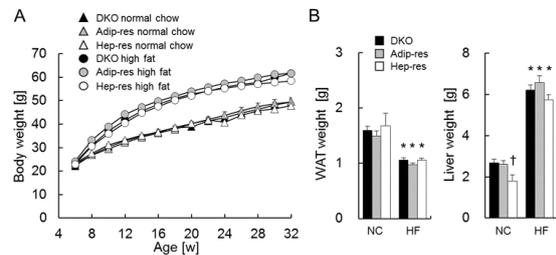


図 7 DKOマウスの脂肪細胞特異的*p62*レスキューおよび肝細胞特異的*p62*レスキューは、体重に影響を与えず、肥満を呈す。高脂肪食により内臓脂肪は萎縮し、肝は腫大する。  
\*  $P < 0.05$ , vs. normal chow, †  $P < 0.05$ , vs. DKO.

(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  $2.4 \pm 0.1$  vs Hep-res  $1.7 \pm 0.1$ )、炎症 (DKO  $2.0 \pm 0.0$  vs Hep-res  $1.4 \pm 0.2$ )、線維化 (DKO  $4.0 \pm 0.1$  vs Hep-res  $2.8 \pm 0.2$ ) 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% 程度と同等であつ

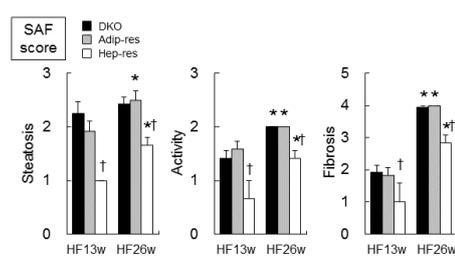


図 9 肝細胞特異的*p62*レスキューは、NASH進展を抑制する。  
\*  $P < 0.05$ , vs. normal chow, †  $P < 0.05$ , vs. DKO.

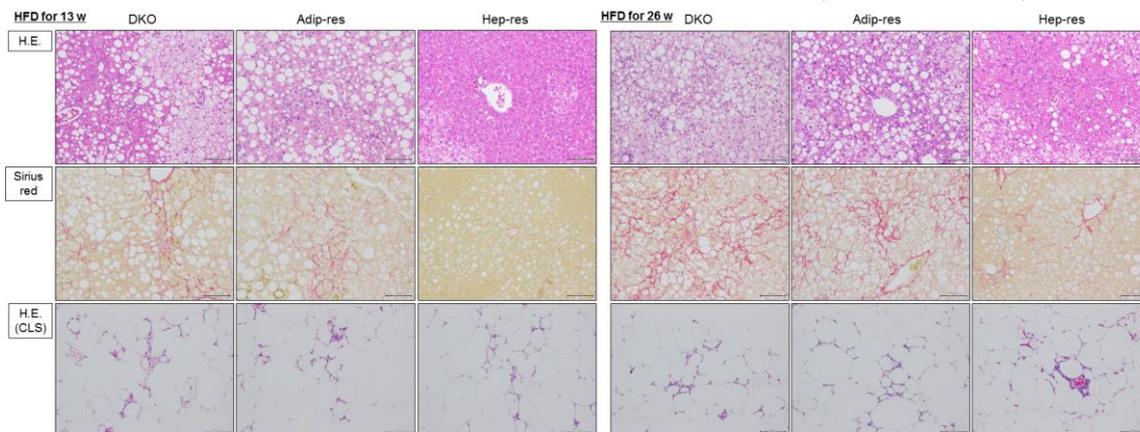


図 8 肝細胞特異的*p62*レスキューは、NASHの進行を抑制する。

たが、肝細胞の *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：

疾患ごとの症例背景情報を table 1 に示す。NASH 肝癌患者 (NASH 群) では、生活習慣病

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	
										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
<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	
PT, %	86.1 ± 13.0			82.5 ± 15.7			95.8 ± 6.6			< 0.001	
AST, U/L	43.6 ± 30.1			46.4 ± 38.1			30.1 ± 13.5			0.877	
ALT, U/L	58.2 ± 91.2			44.5 ± 48.4			26.4 ± 17.6			0.506	
ALP, U/L	310.8 ± 148.2			300.2 ± 111.8			323.0 ± 163.4			0.927	
γ-GT, U/L	95.0 ± 80.5			62.8 ± 62.0			95.5 ± 115.8			0.169	
Fib-4 index	4.6 ± 3.1			8.1 ± 7.5			2.5 ± 1.6			0.001	
ICG15, %	12.4 ± 8.5			14.7 ± 7.7			10.6 ± 10.6			0.251	
<b>Glucose and lipid profiles</b>											
FPG, mg/dl	135.6 ± 57.1			131.1 ± 64.8			108.3 ± 23.3			0.918	
HbA1c, %	6.6 ± 1.0			6.2 ± 1.1			6.0 ± 1.0			0.105	
HDL-C, mg/dl	50.1 ± 13.8			53.1 ± 15.7			60.9 ± 14.7			0.672	
LDL-C, mg/dl	101.9 ± 26.5			96.3 ± 26.2			124.2 ± 38.5			0.729	
TG, mg/dl	139.1 ± 80.8			102.1 ± 47.0			131.3 ± 65.4			0.034	
<b>Tumor marker</b>											
AFP, mg/dl	1769.4 ± 8579.8			1783.6 ± 8433.7			4.1 ± 1.3			1.000	
PIVKA II, mg/dl	4824.8 ± 14882.8			3732.5 ± 11795.4			22.4 ± 9.6			0.909	
CEA, mg/dl	2.7 ± 1.5			3.7 ± 3.2			57.7 ± 150.9			0.999	
CA19-9, mg/dl	19.0 ± 11.8			33.2 ± 29.7			105.1 ± 275.8			0.971	

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、CH(c)群では肝障害、肝予備能の低下が認められ、肝予備能は CH(c)群でより低下しているものと考えられた。

腫瘍マーカーは、各群で有意な差は認められなかった。

#### (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異なっていたが、総じて非癌部よりも癌部に強い染色が認められた (図 10)。p62 の染色性に応じて、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 (図 11)。

#### (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 12A)。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 13A)。

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 12C)、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 13B)。

#### (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 (強度 3 例、中等度 22 例、弱または無し 23 例、図 12B)。

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 群が多かった (cytoplasm 群 31 例、nuclear 群 18 例)。一方、肝細胞癌全体 (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 II) 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 因子についても、有意な相関は認められなかった。尚、予後については、術後年数が浅い例もあり予後調査が終了しておらず、今後解析を継続する予定である。

<考察>

以上の基礎研究から、①DKO マウスは、HFD 摂餌により重症 NASH と高率に肝癌を発症する、②腫瘍群と非腫瘍群では、病理学的な NASH 病勢や血液生化学による肝障害、内臓脂肪組織の CLS 形成に有意な差を認めない、③肝細胞特異的 p62 遺伝子レスキューは、NASH 病勢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、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。

また、臨床研究から、①p62 は、非癌部と比較して肝癌部で強く発現する、②非癌部の p62 の発現強度は、血小板数および肝脂肪化と正の相関を示す、③非癌部での p62 の染色局在は、肝炎症および肝線維化と有意な関連が認められる、④癌部での p62 の発現強度と局在は、癌の病理学的な悪性度や T 因子、腫瘍マーカーなどと関連は認められない、ことが明らかとなった。

以上の結果から、肝細胞の p62 が NASH の進展と肝癌発症に対して防御的に機能していると考えられた。p62 の賦活化は、NASH 防御の新規標的として有望であると考えられた。

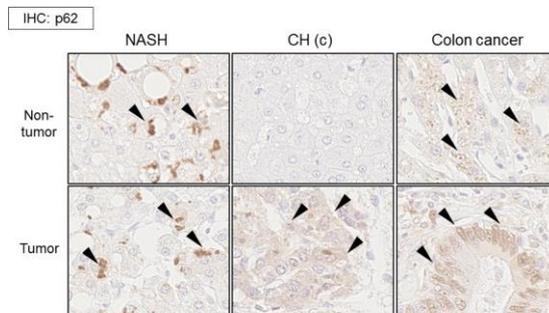


図 10 ヒト臨床標本の p62 免疫染色 (original magnification x60) p62 は癌部で強い発現が認められる。

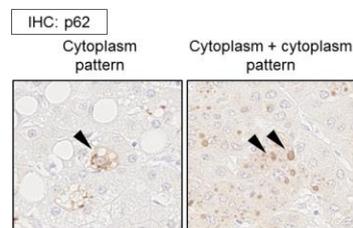


図 11 p62 の発現局在は、症例によって異なる。

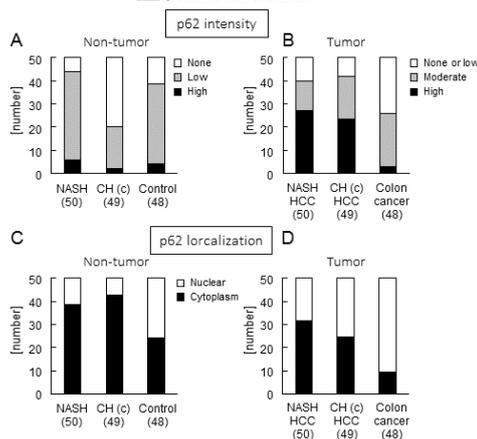


図 12 疾患群別の p62 の発現強度と局在の比較

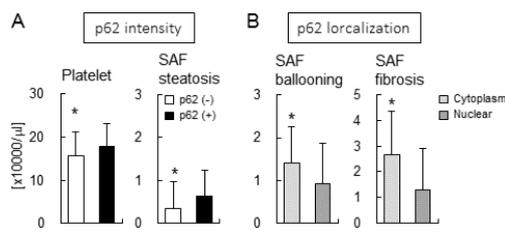


図 13 p62 の発現強度と局在は、血小板数、SAF と関連する。  
\* P < 0.05, between two groups.

一方、肝細胞癌全体 (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 II) 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 因子についても、有意な相関は認められなかった。尚、予後については、術後年数が浅い例もあり予後調査が終了しておらず、今後解析を継続する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shida Takashi, Oshida Natsumi, Oh Sechang, Okada Kosuke, Shoda Junichi	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 <p>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</p>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy	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 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
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 WATAHIKI Takahisa, OKADA Kosuke, WARABI Eiji, NAGAOKA Tsugumi, SUZUKI Hideo, ISHIGE Kazunori, YANAGAWA Toru, TAKAHASHI Satoru, MIZOKAMI Yuji, TOKUSHIGE Katsutoshi, ARIIZUMI Shun-ichi, YAMAMOTO Masakazu, SHODA Junichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Gender difference in development of steatohepatitis in <i>p62/Sqstm1 and Nrf2</i> double-knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	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 Takayama Takako, Suzuki Hideo, Okada Kosuke, Yamada Takeshi, Maruo Kazushi, Saito Yoko, Mizokami Yuji	4. 巻 15
2. 論文標題 Prediction of true Helicobacter pylori-uninfected status using a combination of age, serum antibody and pepsinogen: Logistic regression analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0240040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0240040	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 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 Luong Nho Cong, Abiko Yumi, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Warabi Eiji, Suzuki Midori, Noguchi Takuya, Matsuzawa Atsushi, Kumagai Yoshito	4. 巻 45
2. 論文標題 Redox cycling of 9,10-phenanthrenequinone activates epidermal growth factor receptor signaling through <i>S</i> -oxidation of protein tyrosine phosphatase 1B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 349 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.349	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 Oh Sechang, Oshida Natsumi, Someya Noriko, Maruyama Tsuyoshi, Isobe Tomonori, Okamoto Yoshikazu, Kim Taeho, Kim Bokun, Shoda Junichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Whole body vibration for patients with nonalcoholic fatty liver disease: a 6 month prospective study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14062 ~ e14062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14062	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 Yamashita-Kashima Yoriko, Yoshimura Yasushi, Fujimura Takaaki, Shu Sei, Yanagisawa Mieko, Yorozu Keigo, Furugaki Koh, Higuchi Ryota, Shoda Junichi, Harada Naoki	4. 巻 83
2. 論文標題 Molecular targeting of HER2-overexpressing biliary tract cancer cells with trastuzumab emtansine, an antibody?cytotoxic drug conjugate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 659 ~ 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-019-03768-8	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 Yoshida Toshio, Terabe Takehito, Nagai Hiroki, Uchida Fumihiko, Hasegawa Shogo, Nagao Toru, Miyabe Satoru, Ishibashi Kanno Naomi, Yamagata Kenji, Warabi Eiji, Gosho Masahiko, Yanagawa Toru, Bukawa Hiroki	4. 巻 5
2. 論文標題 Association between p62 expression and clinicopathological characteristics in oral leukoplakia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research	6. 最初と最後の頁 389 ~ 397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.193	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 Yamada Mami, Iwata Masahiro, Warabi Eiji, Oishi Hisashi, Lira Vitor A., Okutsu Mitsuharu	4. 巻 33
2. 論文標題 p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8022 ~ 8032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900133R	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 Ishii Tetsuro, Warabi Eiji, Mann Giovanni E.	4. 巻 133
2. 論文標題 Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 169 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.002	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 Ishii Tetsuro, Warabi Eiji	4. 巻 8
2. 論文標題 Mechanism of Rapid Nuclear Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Activation via Membrane-Associated Estrogen Receptors: Roles of NADPH Oxidase 1, Neutral Sphingomyelinase 2 and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 69 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox8030069	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 Akiyama Kentaro, Warabi Eiji, Okada Kosuke, Yanagawa Toru, Ishii Tetsuro, Kose Katsumi, Tokushige Katsutoshi, Ishige Kazunori, Mizokami Yuji, Yamagata Kenji, Onizawa Kojiro, Ariizumi Shun-ichi, Yamamoto Masakazu, Shoda Junichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Deletion of both <i>p62</i> and <i>Nrf2</i> spontaneously results in the 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 ~ 218
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumitomo Akiko, Yukitake Hiroshi, Hirai Kazuko, Horike Kouta, Ueta Keisho, Chung Youjin, Warabi Eiji, Yanagawa Toru, Kitaoka Shiho, Furuyashiki Tomoyuki, Narumiya Shuh, Hirano Tomoo, Niwa Minae, Sibille Etienne, Hikida Takatoshi, Sakurai Takeshi, Ishizuka Koko, Sawa Akira, Tomoda Toshifumi	4. 巻 27
2. 論文標題 ULK2 controls cortical excitatory/inhibitory balance via autophagic regulation of p62 and GABAA receptor trafficking in pyramidal neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3165 ~ 3176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy219	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 Omori Shoei, Uchida Fumihiko, Oh Sechang, So Rina, Tsujimoto Takehiko, Yanagawa Toru, Sakai Satoshi, Shoda Junichi, Tanaka Kiyoji, Bukawa Hiroki	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Exercise habituation is effective for improvement of periodontal disease status: a prospective intervention study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Therapeutics and Clinical Risk Management	6. 最初と最後の頁 565 ~ 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/TCRM.S153397	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21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0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, 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 岡田浩介, 押田夏海, 正田純一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における骨格筋の異常と肝病態との関連性
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 高山敬子, 岡田浩介, 鈴木英雄, 溝上裕士
2. 発表標題 人間ドックにおけるピロリ菌血清抗体検査と便中抗原検査併用の有用性についての検証
3. 学会等名 第58回日本消化器がん検診学会総会, 岡山.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木英雄, 岡田浩介, 奈良坂俊明, 溝上裕士, 齋藤洋子, 谷中昭典
2. 発表標題 当院人間ドックにおけるヘリコバクター・ピロリ感染診断と除菌療法
3. 学会等名 第25回日本ヘリコバクター学会学術集会, 名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 聖大, 小峰 昇一, 岡田 浩介, 吳 世昶, 蕨 栄治, 大森 肇, 正田 純一
2. 発表標題 継続的走運動は高脂肪食摂餌p62遺伝子欠失マウスにおける脂肪性肝炎を改善する
3. 学会等名 JDDW 2019, 神戸
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志田隆史, 岡田浩介, 鈴木英雄, 正田純一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の非肥満症例における臨床病態の検討
3. 学会等名 JDDW 2019, 神戸
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小峰昇一, 岡田浩介, 蕨 栄治, 正田純一
2. 発表標題 過食肥満マウスにおける継続的走運動はKupffer細胞の異物貪食能の増大と形質変化を誘導する
3. 学会等名 第42回肝臓学会東部会, 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 押田夏海, 小峰昇一, 岡田浩介, 鈴木英雄, 正田純一
2. 発表標題 慢性肝疾患における筋損傷マーカーTitin N-fragmentの尿中測定とその臨床的意義
3. 学会等名 第42回肝臓学会東部会, 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田浩介, 志田隆史, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋減少と内臓脂肪増加の体組成異常は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を悪化進展させる
3. 学会等名 第54回肝臓学会総会, 大阪
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田浩介, 志田隆史, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋減少と内臓脂肪増加による体組成異常は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を悪化させる
3. 学会等名 第104回消化器病学会総会, 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦征, 石井垂紀子, 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
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 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 押田夏美, 岡田浩介, 鈴木英雄, 正田純一
2. 発表標題 NAFLDにおける筋損傷マーカーTitin-N fragmentの尿中測定とその臨床的意義.
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, 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106回消化器病学会総会, 広島
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志田隆史, 岡田浩介, 鈴木英雄, 正田純一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の非肥満症例における臨床病態の検討.
3. 学会等名 JDDW2019, 神戸
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田聖大, 小峰昇一, 岡田浩介, 呉世昶, 蕨栄治, 大森肇, 正田純一
2. 発表標題 継続的走運動は高脂肪食摂餌p62遺伝子欠失マウスにおける脂肪性肝炎を改善する.
3. 学会等名 JDDW2019, 神戸
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木英雄, 岡田浩介, 奈良坂俊明, 溝上裕士, 齋藤洋子, 谷中昭典
2. 発表標題 当院人間ドックにおけるヘリコバクター・ピロリ感染診断と除菌療法.
3. 学会等名 第25回日本ヘリコバクター学会学術集会, 名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山敬子, 岡田浩介, 鈴木英雄, 溝上裕士
2. 発表標題 人間ドックにおけるピロリ菌血清抗体検査と便中抗原検査併用の有用性についての検証.
3. 学会等名 第58回日本消化器がん検診学会総会, 岡山
4. 発表年 2019年

## 〔図書〕 計2件

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 480
3. 書名 消化器診療マニュアル：胆石の形成機序	

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 352
3. 書名 膵・胆道疾患診療の最前線：胆石の形成機序	

## 〔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	石毛 和紀  (ISHIGE Kazunori)  (20597918)	筑波大学・医学医療系・客員研究員   (12102)	
研究分担者	藤 栄治  (WARABI Eiji)  (70396612)	筑波大学・医学医療系・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
---------	---------