

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08298

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎、新規診断マーカー・治療標的としての糖鎖修飾解析

研究課題名(英文)Glycan Modification Analysis as a Novel Diagnostic Marker and Therapeutic Target for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

研究代表者

小川 浩司(Ogawa, Koji)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20735188

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)：NASHの診断・病態把握には肝生検以外の方法が存在せず、非侵襲的な診断法の開発が急務である。1肝生検により診断されたNAFL症例・NASH症例の血清を独自に開発した網羅的な複合糖質糖鎖解析(総合グライコムクス)を行い、肝逸脱酵素と関連のなく肝における炎症を鋭敏に反映する新規の血清糖鎖マーカーAAT-A3Fを見出した。この血清AAT-A3F値は、肝逸脱酵素値と相関せず・肝細胞内の炎症性サイトカイン発現・肝組織炎症と相関し病早期のNASHをも診断可能なマーカーである事を明らかにした。この新規NASH診断、病態反映マーカーであるAAT-A3FがNASH進展の早期病変を検出可能である事を確認した。

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疾患は、肥満人口の増加に伴い世界的な公衆衛生上の問題となる。NAFLDは、非アルコール性脂肪肝(N AFL)と非アルコール性脂肪性肝(NASH)に分類されNAFLDの一部は、NASH、肝硬変、肝細胞癌へと進展する予後不良な病態をたどるため、早期に高リスク症例の囲い込みが必須である。この血清AAT-A3F値と既存の、診断マーカー統合し解析する事により、非侵襲的なNASH診断への開発の萌芽となりうる。

研究成果の概要(英文)：The development of non-invasive diagnostic methods is urgently needed for the diagnosis and understanding of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), as liver biopsy remains the only available diagnostic method. In this study, we performed comprehensive glycomic analysis (integrated glycomics) of serum samples from patients diagnosed with NAFL (non-alcoholic fatty liver) and NASH using a unique approach that goes beyond liver enzyme analysis. As a result, we discovered a novel serum glycan marker, AAT-A3F, which reflects liver inflammation sensitively without being correlated with liver enzyme levels. We further demonstrated that the serum AAT-A3F level correlates with the expression of inflammatory cytokines in liver cells and liver tissue inflammation, enabling the diagnosis of early-stage NASH. Our findings confirm that AAT-A3F, as a novel diagnostic and pathophysiological marker for NASH, can detect early-stage pathological changes associated with NASH progression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：NASH 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、脂肪性肝疾患のうちアルコール性を除外した疾患の総称である。世界的な、肥満人口の増加に伴い NAFLD の有病率は上昇し、世界的な公衆衛生上の大きな問題の 1 つとなりつつある。NAFLD の有病率は、世界的には 25% (Younossi. Hepatology 2016) と報告され、本邦では Eguchi らは検診受診者の約 30% が NAFLD と診断されたと報告されている (Eguchi. J Gastroenterol 2012)。NAFLD は、非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver; NAFL) と非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) に分類されるが、その過半数は予後良好な NAFL にとどまることが想定されている。一方で、NASH は肝臓に脂肪が蓄積することに加えて炎症性細胞の浸潤を合併し、炎症を引き起こす疾患群として知られ、肝硬変、肝細胞癌へと進展する予後不良な病態である。従って、早期の疾患の囲い込みが必須となる。しかしながら NASH の確定診断には肝生検以外の方法が現時点存在しない。肝生検は侵襲を伴うとともに、サンプリングエラーや評価者間の差異等が存在し、肝生検に代わる非侵襲診断法の開発が強く求められ国内外で、多くの研究が行われている。特に、線維化を伴わない初期の NASH と NAFL を鋭敏に診断するマーカー、肝炎症像を鋭敏に反するマーカーは十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

- 新規 NASH 診断、病態反映マーカーを生検にて診断された NASH 例の保存血清とを用いて行う我々は、独自に開発した糖鎖解析手法 (Kobayashi, Ogawa et al., J Proteome Res. 2019) を用いて行う
- そのマーカーの発現機序、臨床因子との相関を検討する
- NASH 動物モデル、臨床検体を用いて非侵襲的な NASH 診断手法を確立する

3. 研究の方法

○生検にて、NASH と診断された、線維化ステージの異なる症例の血清を用いて独自に開発した糖鎖解析手法 (Kobayashi, Ogawa et al., J Proteome Res. 2019) を用いて行う。更に肝組織が得られた症例においては RNA シークエンスを行い同マーカー発現と関連する因子の解析を行う。

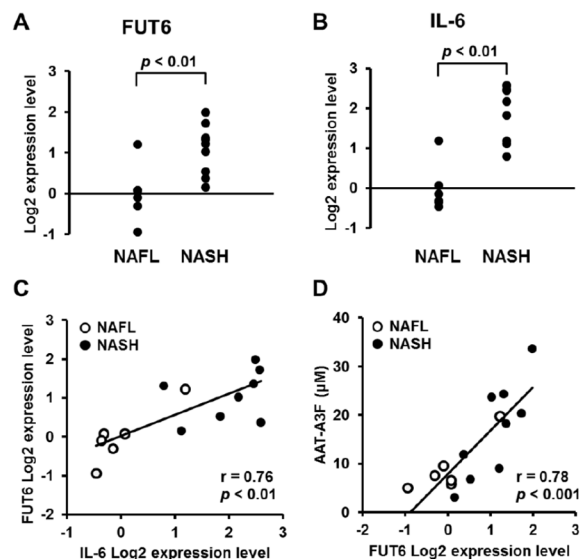
○NASH 動物モデル、臨床検体を用いて血清 solubleCD14 が非侵襲的な NASH 診断のバイオマーカーとなりうるかの検討を行う

○脂肪肝疾患との関連遺伝子、糖鎖修飾酵素関連遺伝子、アルコール代謝関連遺伝子、肥満関連遺伝子多型と同定されたマーカーとの統合解析を行い、NASH 非侵襲診断法の確立を目指す

4. 研究成果

○脂肪性肝疾患の診断マーカーについては、国内外で多くの検討が行われ、CK18 fragment, M2BPGi などのマーカーが報告されている。しかしながら、高い精度で病初期の NASH と NAFL を鑑別可能なマーカー、特に肝の炎症に特化したマーカー同定は十分には行われていない。我々は、独自に開発した糖鎖解析手法 (Kobayashi, Ogawa et al., J Proteome Res. 2019) を

用いて NASH 病初期の診断を可能とし、肝臓内の炎症を鋭敏に反映する新規糖鎖マーカーを同定した。すなわち、matteoni 分類 1-2 の NAFL 患者と matteoni 分類 3-4 の NASH 患者血清中の 1 アンチトリプシン(AAT)結合フコシル化糖鎖 A3F(AAT-A3F)濃度は、基質蛋白は変化を認めないにもかかわらず NASH 患者において、NAFL 患者と比較して有意に上昇し、特に、matteoni 分類 1-2 の症例と線維化の進展していない matteoni 分類 3 の症例に



においても差を認めた。更に、血清 AAT-A3F 値は肝炎症と非常に強い相関をみとめ、AST/ALT は有意な相関なく肝炎症を反映可能なマーカーであり特独自性の高いマーカーと考えられた。申請者らは、予備的な検討にて NASH 症例においては、NAFLD と比較して肝臓における炎症性サイトカインである IL-6 が高値とともに糖転移酵素 FUT6 が高値となる事を明らかにした。(図 2 A, B)。この IL-6 と FUT6 発現は正の相関をしめし、更に肝内 FUT6 と血清 AAT-A3F は正の相関を示す事を明らかにした。すなわち、AAT-A3F 上昇は肝炎症により発現上昇が起こった FUT6 により誘導されている可能性がある。

○更に、動物実験、生検にて診断された NASH, NAFLD において血清 solubleCD14 は、NASH と NAFL を鋭敏に区別可能な新規マーカー候補である事を明らかにした(Nakamura, Okagawa et al., Hep Res 2022)。すなわち、高脂肪食においては、腸管の tight junction が弛緩し LPS など肝の炎症を惹起する因子が血流に入りやすくなる leaky gut となり、肝の炎症が惹起される病態、実際の肝の線維化を簡易に診断可能となるマーカーであることを明らかにした。

○これらバイオマーカーを検討した症例における遺伝学的背景の検討(SNP)を同時に行い新規バイオマーカーとの遺伝的素因、さらに後述の生活習慣との関連について検討を行った。すなわち、肝生検に脂肪肝疾患と診断され、更にバイオマーカー研究に用いられた症例を含む症例において脂肪肝疾患との関連遺伝子、糖鎖修飾酵素関連遺伝子、アルコール代謝関連遺伝子、肥満関連遺伝子多型の検討を進めた。過去に報告のある PNPL3 SNP などは診断時の肝線維化進展と相関を認めた。更に生活習慣については詳細なアンケート調査により、体重、アルコールの経時的変化、積算アルコール摂取量なども検討を行った。それにより、NAFLD と診断されている症例においても、アルコール代謝遺伝子 ADH1B, ALDH2 SNP にて飲酒積算量が相関している事が明らかになった。すなわち遺伝子多型により生活習慣が規定されうる事が示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Ohira Masafumi, Yokoo Hideki, Ogawa Koji, Fukai Moto, Kamiyama Toshiya, Sakamoto Naoya, Taketomi Akinobu	4. 巻 42
2. 論文標題 Serum fatty acid-binding protein 5 is a significant factor in hepatocellular carcinoma progression independent of tissue expression level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 794 ~ 803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab025	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 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Yamada Ren, Tokuchi Yoshimasa, Kubo Akinori, Kitagataya Takashi, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Ohara Masatsugu, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 11
2. 論文標題 Baseline elevated serum angiopoietin-2 predicts long-term non-regression of liver fibrosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88632-7	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 Kubo Akinori, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohnishi Shunsuke, Sakamoto Naoya	4. 巻 13
2. 論文標題 Characteristics and Lenvatinib Treatment Response of Unresectable Hepatocellular Carcinoma with Iso-High Intensity in the Hepatobiliary Phase of EOB-MRI	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3633 ~ 3633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13143633	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 Tokuchi Yoshimasa, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Kitagataya Takashi, Kubo Akinori, Yoshida Sonoe, Fu Qingjie, Yang Zijian, Hosoda Shunichi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Possible correlation between increased serum free carnitine levels and increased skeletal muscle mass following HCV eradication by direct acting antivirals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96203-z	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 Tokuchi Y, Suda G, Kimura M, Maehara O, Kitagataya T, Ohara M, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Changes in the estimated renal function after hepatitis C virus eradication with direct-acting antiviral agents: Impact of changes in skeletal muscle mass	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Viral Hepat.	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) 10.1111/jvh.13484.	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 Masato Nakai, Goki Suda, Akinori Kubo, Yoshimasa Tokuchi, Takashi Kitagataya, Ren Yamada, Taku Shigesawa, Kazuharu Suzuki, Akihisa Nakamura, Naoki Kawagishi, Masatsugu Ohara, Machiko Umemura, Takuya Sho, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Naoya Sakamoto	4. 巻 55
2. 論文標題 Durable response without recurrence to Tolvaptan improves long-term survival.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 1150-1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01721-8.	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 Suda G, Ogawa K, Kimura M, Maehara O, Kitagataya T, Ohara M, Tokuchi Y, Kubo A, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Sakamoto N	4. 巻 50
2. 論文標題 Time-dependent changes in the seroprevalence of COVID-19 in asymptomatic liver disease outpatients in an area in Japan undergoing a second wave of COVID-19.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 1196-1200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13551	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 Ohara M, Suda G, Kimura M, Maehara O, Shimazaki T, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kobayashi T, Uebayashi M, Takagi R, Yokota I, Shimamura T, Sakamoto N.	4. 巻 50
2. 論文標題 Analysis of the optimal psoas muscle mass index cut-off values, as measured by computed tomography, for the diagnosis of loss of skeletal muscle mass in Japanese people	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 715-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13499	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 Kitagataya T, Suda G, Nagashima K, Katsurada T, Yamamoto K, Kimura M, Maehara O, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Umemura M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Ohnishi S, Komatsu Y, Hata H, Takeuchi S, Abe T, Sakakibara-Konishi J, Teshima T, Homma A, Sakamoto N.	4. 巻 35
2. 論文標題 Prevalence, clinical course, and predictive factors of immune checkpoint inhibitor monotherapy-associated hepatitis in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1782-1788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15041.	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0件

〔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	坂本 直哉 (Sakamoto Naoya) (10334418)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	須田 剛生 (Suda Goki) (20447460)	北海道大学・大学病院・特任助教 (10101)	

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
---------	---------