

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590663

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎の予測因子としての脂質代謝酵素測定意義の樹立

研究課題名(英文)Clinical significance of measuring lipolytic enzyme for predicting non-alcoholic steato hepatitis

研究代表者

小林 淳二(KOBAYASHI, Junji)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60302577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝性リパーゼ(HL)が非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の診断に有力なマーカーとなるか検討した。対象はアルゼンチン人の非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を疑われた42名。

Steatosis gradeを3段階に分類し各群のHL活性を測定。HL活性は各群で差がなし。一方、肝生検された日本人31名でも検討した結果、HL活性はNASH(-)群、NASH(+ )群でそれぞれ差がなし。HL活性で評価することの限界性が示唆され、抗ヒトモノクローナル抗体を用いたHL蛋白量のELISA系を確立した。HL蛋白量はHL活性より肝酵素ALTとの相関性に優れ、NASH検出に優れる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether hepatic lipase in post-heparin plasma could be a useful marker for diagnosing non-alcoholic steato hepatitis (NASH).Forty-two Argentines and thirty-one Japanese patients were involved in this study.

In Argentines, steatosis grade were classified into 3 grades and there were no significant differences in HL activities among the three groups. In Japanese patients, there was no difference in HL activities between subjects with and without NASH. These findings suggest that there is a limitation of applying HL activity as a method of reflecting HL. Alternatively we established a new enzyme-linked immunosorbent assay system for human HL protein mass. The correlation coefficients between alanine aminotransferase (ALT) and HL activity was 0.185( $p<0.05$ ) whereas those between ALT and HL mass was (0.285  $p<0.01$ ). This suggest that HL mass is superior to HL activity for detecting NASH.

研究分野：臨床検査学

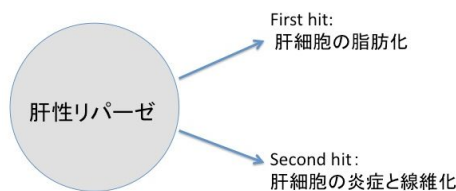
キーワード：肝性リパーゼ 非アルコール性脂肪肝炎

### 1. 研究開始当初の背景

肝性リパーゼ(HL)は、肝細胞で合成され、肝臓の血管内皮細胞に存在する脂質代謝の key enzyme である。その機能は、カイロミクロンレムナント、中間型リポ蛋白(IDL)やHDL<sub>2</sub>中のトリグリセリド(TG)の加水分解を主に担う。その活性が増加した病態ではHDLが低下、低下した病態ではHDLが増加する。代謝制御の側面からみると、HLはインスリン抵抗性、肥満、内臓脂肪蓄積、2型糖尿病、メタボリックシンドロームで高値を呈することが示されてきた。一方、脂肪肝の発症にHLが関与する可能性が国内外の研究者によって提唱されてきた(J Atheroscler Thromb 1995)。こうした中、HL欠損マウスに高脂肪食を負荷しても、wild typeと対照的に、肝臓での脂肪沈着を全く認めないことが海外の研究者により示された(Endocrinology, 2010)。この事実は、従来注目されてきたHL活性高値と脂肪肝発症の相関は単なる因果関係を示すのではなく、HLが脂肪肝発症の原因の一つであることを示す。

飲酒歴がなく画像上脂肪肝をみとめる場合を非アルコール性脂肪肝(NAFLD)と総称し、その10%が肝生検で非アルコール性脂肪肝炎(NASH)と診断され、更に5~10年でその10~25%は肝硬変に進行する。NASHの診断は肝生検が唯一の方法である。その成因としてtwo hits theoryが想定されている。First hitとして、インスリン抵抗性によって肝臓内に脂肪が蓄積して脂肪肝が発症し、次にSecond hitが加わり炎症および線維化が起こる。Second hitとしては、アディポサイトカイン、酸化ストレスなどが想定されるが、これに関連して、我々は、HL活性が高い場合、糖尿病や動脈硬化の発症を抑えるアディポネクチンが低下することを報告した(Horm Metab Res 2005)。

すなわちHLはtwo hits theoryのいずれとも深く関係すると考えられた(図)。



### 2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)はその一部が肝硬変に進行し生命予後不良の疾患である。現状では、肝生検が唯一の診断法である。その成因は、second hit説が広く受け入れられている。脂質代謝のkey enzymeである肝性リパーゼ(HL)はそのうち、first hit、second hitの両者とも密接に関わる。本研究では、ROC解析を行い、肝生検で診断したNASH有無を診断するために最適なHL活性のカットオフ値を定めることを目的とする。

### 3. 研究の方法

肥満症又はメタボリックシンドロームの定義に該当する症例を対象として、年間30症例を目標として実施。NASHの確定診断は肝生検を必要とするため1泊2日の入院体制とし、入院2日目の早朝空腹時に代謝マーカー(血清脂質、血糖、リポ蛋白リパーゼ蛋白量、インスリン、高分子アディポネクチン、レプチン、80HdGなど)測定のための採血、HHL活性測定のためのヘパリン静注後血漿の採取のための採血を行った。また、肝臓CTやエコーなどの画像検査は原則入院中に施行とするが、不可能な場合は出来る限り、肝生検施行1週間以内に外来で施行することとした。HL活性はヘパリン静注後(ヘパリン30U/kg静注10分後)のヘパリン血漿を試料として測定する。その測定方法は以前に申請者らが開発した発色法を用いて測定した。

### 4. 研究成果

HL活性と脂肪肝患者の肝生検の線維化程度との関係を検討した。対象はa)アルゼンチン人の非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を疑われた42名。対象症例は男性/女性=14名/28名、(年齢 $50.1 \pm 10.3$ 歳, BMI $34.3 \pm 6.4$ kg/m<sup>2</sup>, 総コレステロール $209 \pm 40$  mg/dl, トリグリセリド $182 \pm 80$  mg/dl, HDL-コレステロール $42 \pm 8.2$  mg/dl, 血糖値 $115 \pm 37$  mg/dl)。このうち、男性については症例数が少なく女性のみの解析結果を示す。肝生検を施行しSteatosis gradeを1. mild(n=5); 2. moderate(n=10); 3. severe(n=10)の3段階に分類、ヘパリン静注後血漿(PHP)中HTGL活性との関係を調べた。各群における代謝指標の平均値±標準偏差と一元配置分析の結果は、それぞれ、年齢 $54.8 \pm 10.6$ 歳,  $52.8 \pm 5.1$ 歳,  $43.8 \pm 11.1$ 歳(P=0.037); BMI $32.1 \pm 3.8$ kg/m<sup>2</sup>,  $37.5 \pm 9.5$  kg/m<sup>2</sup>,  $35.2 \pm 5.7$ kg/m<sup>2</sup> (ns); 腹囲 $104 \pm 12$  cm,  $109 \pm 12$ cm,  $106 \pm 8.7$ cm (ns); AST $42 \pm 33$  IU/L,  $35 \pm 22$  IU/L,  $41 \pm 16$  IU/L (ns); ALT $48 \pm 24$  IU/L,  $48 \pm 37$  IU/L,  $58 \pm 46$  IU/L (ns); HL活性 $124 \pm 38$ U,  $165 \pm 58$ U,  $163 \pm 41$ U(ns)であった。この結果からSteatosis gradeによるHL活性は有意な差がないことが示された。そこで、Bruntらの提唱したNAFLD Activity ScoreとHTGL活性との相関を検討した。その結果 $r=0.22$ ,  $p=0.35$  (n=17)と有意相関はみられなかった。

ついで我が国の31名の肝生検を施行した脂肪肝患者を対象として、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の存在とヘパリン静注後肝性リパーゼ(HL)活性との相関性を検討した。NASHの判定は、Matteoniの分類に従い、type 3と4をNASH(+)と、type 1と2をNASH(-)し(Gastroenterology, 1999)。HL活性測定は我々が以前報告した方法(J Lipid Res. 2008)で測定した。対象症例の臨床プロフィールは、年齢 $56 \pm 15$ y、男性35%、BMI $29 \pm 8.0$ kg/m<sup>2</sup>、AST $62 \pm 35$  IU/L、ALT $94 \pm 60$  IU/L、

GTP  $106 \pm 107$  IU/L。その結果、HL 活性は NASH(-)群、NASH(+)群でそれぞれ  $187 \pm 87$  IU/L、 $163 \pm 51$  IU/L ( $p=0.35$ )と差がなかった。また、HL 活性は肝臓の線維化を示す指標であるヒアルロン酸とは相関なく ( $r=-0.23$   $p=0.36$ ,  $n=18$ )、4型コラーゲン7Sとは負の相関傾向を示した ( $r=-0.36$ ,  $p=0.06$ ,  $n=0.06$ )。一方、ヒアルロン酸値は、NASH(+)群、NASH(-)群でそれぞれ、 $72 \pm 51$  ng/ml、 $26 \pm 19$  ng/ml ( $p=0.053$ )、typeIVコラーゲン7SはNASH(+)群、NASH(-)群でそれぞれ  $5.5 \pm 1.6$  ng/ml、 $4.2 \pm 0.5$  ng/ml ( $p=0.065$ )であり、NASH群で明らかに高値傾向を示した。当初の目的であるNASHを診断するためのマーカーとしてのHL活性測定の有用性を、肝生検にてNASH有無を判定できた国内外の脂肪肝症例を対象に検討することが出来た。しかしHL活性はAST、ALT、ヒアルロン酸、typeIVコラーゲン7s、肝生検で得られた脂肪肝重症度やNASHの有無との相関を示さなかった。

その後、HLの発現、分泌をより正確に反映すると考えられるHL蛋白量測定系を確立しその量と肝酵素の動向との関係を検討し、HL活性をマーカーとして用いる場合より優れる可能性を調べた。方法として、ヒトHLはCHO細胞にHTGLを発現させ培養液から精製したHL蛋白を用いてマウスを免疫し、得られた2種類の抗ヒトHLモノクローナル抗体を用いて蛋白量測定系を確立した (Clin Chim Acta 2013)。HL測定検体は、米国人ボランティア144名にヘパリン (50IU/kg) 静注後15分後に採血して得られた血漿を用いた。その結果、HL蛋白量はHL活性と良好な相関を有した ( $r=0.847$   $p<0.01$ )。一般に脂肪肝やNASHで増加がみられるALTとの相関を調べたところ、HL活性、HL蛋白量はそれぞれ  $r=0.185$   $p<0.05$ ;  $r=0.285$   $p<0.01$  とHTGL蛋白量の方が相関性において優れていた。一方ASTとの相関はそれぞれ  $r=0.028$  ns;  $r=-0.014$  ns。GTPとの相関はそれぞれ  $r=0.174$   $p<0.05$ ;  $r=0.203$   $p<0.05$ であった。これらの成績から、抗ヒトHLモノクローナル抗体を用いたヘパリン静注後血漿中のHL蛋白量のELISA測定系を確立した。脂肪肝やNASHとの動態を反映できる代謝マーカーである可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Osono Y, Nakajima K, Hata Y, Hypertriglyceridemia and fatty liver: clinical diagnosis of fatty liver and lipoprotein profiles in hypertriglyceridemic patients with fatty liver. J Atheroscler Thromb 2 Suppl 1 1995, pp.47-52

Chiu HK, Qian K, Ogimoto K, Morton GJ, Wisse BE, Agrawal N, McDonald TO, Schwartz MW, Dichek HL, Mice lacking hepatic lipase are lean and protected against

diet-induced obesity and hepatic steatosis, Endocrinology, Vol.151, No.3, 2010, pp.993-1001. doi: 10.1210/en.2009-1100

Kobayashi J, Kusunoki M, Murase Y (1 番目), Relationship of lipoprotein lipase and hepatic triacylglycerol lipase activity to serum adiponectin levels in Japanese hyperlipidemic men, Horm Metab Res, Vol.37, No.8, 2005, pp.505-509.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ, Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity, Vol.116, No.6, 1999, pp. 1413-1419

Miyashita K, Kobayashi J, Imamura S, Kinoshita N, Stanhope KL, Havel PJ, Nakajima K, Machida T, Sumino H, Nara M, Murakami M, A new enzyme-linked immunosorbent assay system for human hepatic triglyceride lipase. Clin Chim Acta, 査読有, Vol. 424, No.9, 2013, pp.201-206. doi: 10.1016/j.cca.2013.06.016

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Kakuda H, Kobayashi J, Kakuda M, Yamakawa J, Takekoshi N. The effect of anagliptin treatment on glucose metabolism and lipid metabolism, and oxidative stress in fasting and postprandial states using a test meal in Japanese men with type 2 diabetes. Endocrine, 査読有, Vol. 48, No.3, 2015, pp.1005-1009. doi: 10.1007/s12020-014-0376-x.

Shirakawa T, Nakajima K, Shimomura Y, Kobayashi J, Stanhope K, Havel P, Machida T, Sumino H, Murakami M, Comparison of the effect of post-heparin and pre-heparin lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase on remnant lipoprotein metabolism. Clinica Chimica Acta, 査読有, Vol.440, No.2, 2015, pp.193-200 doi: 10.1016/j.cca.2014.07.020.

Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M, Autosomal Recessive Hypercholesterolemia: A Mild Phenotype of Familial Hypercholesterolemia: Insight from the Kinetic Study using Stable Isotope and Animal Studies. J Atheroscler Thromb, 査読有, Vol.22, No.1,

2015, pp.1-9 doi: 10.5551/jat.27227.

Tada H, Kawashiri MA, Okada H, Teramoto R, Konno T, Yoshimuta T, Sakata K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M, Hayashi K, Assessment of Coronary Atherosclerosis in Patients With Familial Hypercholesterolemia by Coronary Computed Tomography Angiography. Am J Cardiol, 査読有, Vol.115, No.6, 2015, pp.724-729 doi:10.1016/j.amjcard.2014.12.034.

Shirakawa T, Nakajima K, Yatsuzuka SI, Shimomura Y, Kobayashi J, Machida T, Sumino H, Murakami M, The role of circulating lipoprotein lipase and adiponectin on the particle size of remnant lipoproteins in patients with diabetes mellitus and metabolic syndrome. Clinica Chimica Acta, 査読有, Vol.440, No.2, 2015, pp.123-132 doi: 10.1016/j.cca.2014.10.029.

Nohara A, Kobayashi J, Kawashiri MA, Tada H, Inazu A, Jiang M, Mabuchi H, Bujo H, Clinical significance of measuring soluble LR11, a circulating marker of atherosclerosis and HbA1c in familial hypercholesterolemia. Clinical Biochemistry, 査読有, Vol.47, No.13-14, 2014, pp.1326-1328 doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.05.003.

Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri MA, Inoue T, Mori M, Tada H, Nakanishi C, Yagi K, Yamagishi M, Ueda K, Takegoshi T, Miyamoto S, Inazu A, Koizumi J; The Hokuriku FH Study Group. Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. Atherosclerosis, 査読有, Vol. 236, No.1, 2014, pp.54-61. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.005.

Kakuda H, Kobayashi J, Nakato M, Takekoshi N, Short-Term Effect of Pitavastatin Treatment on Glucose and Lipid Metabolism and Oxidative Stress in Fasting and Postprandial State Using a Test Meal in Japanese Men Cholesterol, 査読有, Vol. 2013, 2013, 314170 doi: 10.1155/2013/314170

Miyashita K, Kobayashi J, Imamura S, Kinoshita N, Stanhope KL, Havel PJ, Nakajima K, Machida T, Sumino H, Nara M,

Murakami M, A new enzyme-linked immunosorbent assay system for human hepatic triglyceride lipase. Clin Chim Acta, 査読有, Vol. 424, No.9, 2013, pp.201-206. doi: 10.1016/j.cca.2013.06.016

[学会発表](計14件)

Kobayashi J, A new enzyme-linked immunosorbent assay system for human hepatic triglyceride lipase, The 2nd World Congress of Clinical Lipidology, 2014年12月5日~7日,(Intercontinental ウィーン、オーストリア)

小林 淳二, 新たなヒト肝性リパーゼ (HTGL) 蛋白量測定法の確立, 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 2014年11月25日(火)(福岡国際会議場 福岡県 福岡市)

小林 淳二, 腹部肥満は代謝異常による慢性腎臓病の発症を助長する 第46回日本動脈硬化学会総会学術集会, 2014年7月10日(木)~11日(金) 京王プラザホテル(東京都 新宿区)

中嶋 克行, 宮下 かずや, 小林 淳二, 血中に存在するリポ蛋白リパーゼの80%以上がレムナントに結合して存在する, 第46回日本動脈硬化学会総会学術集会, 2014年7月10日(木)~11日(金) 京王プラザホテル(東京都 新宿区)

角田 弘一, 小林 淳二, 2型糖尿病における選択的DPP-4阻害薬アナグリプチンの食後代謝に及ぼす影響, 第46回日本動脈硬化学会総会学術集会 2014年7月10日(木)~11日(金) 京王プラザホテル(東京都 新宿区)

Sakurai M, Kobayashi J, Abdominal obesity, metabolic syndrome, and the risk of chronic kidney disease in Japanese males and females 2014年6月13日(金)~17日(火). 第74回米国糖尿病学会議(ADA) モスコンセンター(サンフランシスコ 米国)

角田 弘一, 小林 淳二, テストミール負荷後の糖・脂質代謝異常に対するDPP4阻害薬アナグリプチンの効果の検討, 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月23日(金)(大阪国際会議場, 大阪府 大阪市)

小林 淳二, 代謝異常集積と慢性腎臓病の関連に及ぼす腹部肥満の影響, 第8回日本病院総合診療医学会学術集会, 2014年2月22日,(大阪大学中之島センター大阪府 大阪)

市)

削除：平成 24 年 2 月 1 日

櫻井 勝、小林 淳二、代謝異常集積と慢性腎臓病の関連に及ぼす腹部肥満の影響、第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 12 日(土)、東京国際フォーラム、(東京国際フォーラム 東京都 千代田区)

宮下 かずや、小林 淳二、新たなヒト肝性リパーゼ蛋白量測定法の確立、第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 11 日(金)、(東京国際フォーラム 東京都 千代田区)

小林 淳二、食後高脂血症と動脈硬化、第 45 回日本動脈硬化学会総会、2013 年 7 月 18 日(木)、(京王プラザホテル 東京都 新宿区)

小林 淳二、メタボリックシンドローム頻度の推移、第 55 回日本老年医学会、2013 年 6 月 6 日(木)(大阪国際会議場 大阪府 大阪市)

小林 淳二、メタボリックシンドローム該当者の頻度の推移、第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 12 日(金)(京都グランヴィア 京都府 京都市)

小林 淳二、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) における、肝線維化マーカーとアディポネクチン、リポ蛋白代謝酵素との関係について、第 23 回日本臨床化学会東海北陸支部総会、第 31 回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会、2012 年 8 月 4 日(土)(富山国際会議場 富山県 富山市)

〔図書〕(計 2 件)

小林 淳二、株式会社エルアイシー、HL、LMF1、疾患モデルの作製と利用 脂質異常と関連疾患、2015、478 (440 - 449)

小林 淳二、南山堂  
アポリポ蛋白  
南山堂医学大辞典 第 20 版  
、2015、3102 (45 - 46)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 淳二 (KOBAYASHI, Junji)  
研究者番号：60302577  
金沢医科大学・医学部・教授

### (2) 研究分担者

岡田 俊英 (OKADA, Toshihide)  
研究者番号：20251944  
金沢大学・医学系・特任教授