

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461000

研究課題名(和文)肝移植後再発を手がかりとした非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease from recurrent disease after liver transplantation

研究代表者

上田 佳秀 (Ueda, Yoshihide)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：90378662

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)：1. 肝移植後NAFLD再発の危険因子解析：原因不明の肝硬変に対する肝移植症例28例において、肝移植後5年での脂肪肝発症率は69%、NASH発症率は41%と高率であった。有意な危険因子は同定されなかった。

2. 膵切除後のNAFLD発症の現状と危険因子解析：膵切除例423例において、膵切除後3ヶ月以内の高度の脂肪肝発症例は43例(10.2%)であった。危険因子は、原疾患が膵癌、膵全摘出または膵頭十二指腸切除後の2点であった。

3. NAFLD肝癌組織におけるゲノム異常の解析：NAFLDに発生した肝癌の遺伝子異常の解析の結果、TERTプロモーター変異ならびに8p欠失が特徴的な遺伝子変化であった。

研究成果の概要(英文)：1. Recurrence of NAFLD after liver transplantation: Rate of occurrence of fatty liver and NASH after liver transplantation for cryptogenic cirrhosis were 69% and 41%, respectively. No significant risk factor for the occurrence was identified.

2. NAFLD after pancreatectomy: High degree of fatty liver occurred in 43 of 423 patients (10.2%) after pancreatectomy. Risk factors for the fatty liver were pancreatic cancer, and total pancreatectomy or pancreatoduodenectomy.

3. Genetic analysis of hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD: TERT promoter mutations and 8p loss were identified as characteristic genetic change in hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD.

研究分野：肝臓学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 脂肪肝 脂肪肝炎 肝移植 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、肝移植後の原疾患再発に注目し、発症原因や進行メカニズムが不明であった様々な肝疾患の病態解明を行ってきた。具体的には、原発性硬化性胆管炎、B型肝炎、C型肝炎の肝移植後再発の有無ならびに再発予測因子の解析を行い、それらの知見を一般の肝疾患診療に還元している。今回は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の肝移植後の再発を手がかりに、NAFLD の病態を解明することを目的とする。

NAFLD は単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に分類される。NAFLD、中でも特に NASH の発症メカニズムは未だ十分に明らかとなっていない。これまで、肥満、糖尿病、脂質異常症などとの関連、脂肪細胞からのホルモン、腸内細菌、エンドトキシン、鉄代謝異常、遺伝子多型などの影響が明らかにされている。しかしながら、NASH を発症するのはこれらの危険因子を持つ症例の一部であり、発症メカニズムの本質は未だ不明である。

NASH または原因不明の肝硬変に対する肝移植に対する肝移植後には、高率に NAFLD や NASH が再発することが明らかになってきている。この事実は、NAFLD が全身疾患であり、肝臓外の因子が NAFLD 発症に関与していることを示している。この再発の危険因子を解析することにより、NAFLD 発症のメカニズムが明らかにできる可能性がある。

加えて、膵頭十二指腸切除術後に高度の脂肪肝ならびに NASH を発症することが報告されている。実際に、多数の膵切除を行っている当院においても、その一部の症例で高度脂肪肝を発症している。このメカニズムについても明らかにされていないが、膵島細胞から分泌されるホルモンや膵酵素による食物代謝などが NAFLD 発症に関与している可能性が示唆される。

これらの成績は、NAFLD の病因が肝臓外にも存在している可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の肝移植後の再発を手がかりに、NAFLD の病態を解明することを目的とする。

具体的には以下の3点を明らかにする。

(1) 肝移植後の NAFLD 再発の危険因子の同

定

(2) 膵切除後の NAFLD 発症の現状と危険因子の同定

(3) NAFLD から発症した肝癌の特徴

3. 研究の方法

(1) 肝移植後の NAFLD 再発の危険因子の同定：

当施設において2011年12月までに行われた肝移植症例のうち、18歳以上の原因不明の肝硬変に対する肝移植症例28例について、移植後の脂肪肝やNASHの発症について解析を行った。さらに、脂肪肝やNASHの発症に関与する因子として、レシピエントならびにドナーの肥満、糖尿病、高脂血症などの有無、これらに対する治療法と効果、術後の栄養状態、移植後合併症の有無、免疫抑制剤の種類などとの関連について解析した。加えて、高度脂肪肝症例、肝線維化進行例、NASH再発後改善例についての臨床的特徴の解析を行い、これらに関与する因子の同定を試みた。

(2) 膵切除後の NAFLD 発症の現状と危険因子の同定：

2006年から2013年に当院で行われた膵切除例423例におけるNAFLD発症の現状と危険因子の解析を行った。膵頭十二指腸切除術に限らず、膵体尾部切除術や膵全摘出術後のNAFLD発症の現状も解析すること、さらには術後の膵酵素補充やインスリン投与の有無などの臨床的特徴の詳細な解析を加えることによって、NAFLD発症に関与する因子の特定を行った。

(3) NAFLD から発症した肝癌の特徴：

2010年から2014年に当院で肝切除を行った247症例から「エタノール摂取量20g以下」「背景肝の組織学的脂肪変性5%以上」「生活習慣病(高血圧/糖尿病/高脂血症)合併あり」という3つの基準を元に選別したNAFLD肝癌10症例の肝切除例の肝組織にて、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス、特定の遺伝子のターゲットシーケンス、ならびに染色体コピー数解析を施行した。

4. 研究成果

(1) 肝移植後の NAFLD 再発の危険因子の同定：

当施設において2011年12月までに行われた肝移植症例のうち、18歳以上の原因不明の肝硬変に対する肝移植症例28例について、移植後の脂肪肝やNASHの発症ならびにこれらに關与する因子についての解析を行った。年齢の中央値は50歳(18-64歳)であり、男性が13例であった。肝細胞癌合併を5例に認めた。移植前の糖尿病、高脂血症、高血圧の合併は5例(18%)、2例(7%)、4例(14%)であった。肝移植時の摘出間の病理組織学的解析の結果、脂肪肝は14例(50%)に認めたが、いずれも軽度の脂肪化であり、NASHと診断できる症例はなかった。肝移植後の生存率は1年71%、3年62%、5年62%、10年62%であり、他の原因による肝移植症例よりも低い傾向にあった。死亡原因としては感染症が最多であった。肝移植後の脂肪肝発症率は、1年43%、3年58%、5年69%、10年69%であり、C型肝炎やB型肝炎にて移植した症例の脂肪肝発症率よりも有意に高かった。さらに、肝移植後NASH発症率は1年23%、3年41%、5年41%、10年50%と高率であった。肝移植後NAFLD再発の危険因子について、レシピエントならびにドナーの肥満、糖尿病、高脂血症などの有無、これらに対する治療法と効果、術後の栄養状態、移植後合併症の有無、免疫抑制剤の種類など、多方面から解析を行ったが、有意な因子は同定されなかった。これらの結果から、原因不明の肝硬変症例の多くがNASHであること、NASHは肝移植後の再発すること、が示唆された。

(2) 膵切除後のNAFLD発症の現状と危険因子の同定:

当院で行われた膵切除例423例におけるNAFLD発症の現状と危険因子の解析を行った。膵悪性腫瘍による手術例が228例であり、良性病変に対する手術例が195例であった。術式は、膵全摘術34例、膵頭十二指腸切除231例、膵尾部切除135例であった。膵切除後3ヶ月以内の高度の脂肪肝発症例は43例(10.2%)であった。高度脂肪肝発症の危険因子を解析した結果、原疾患が膵癌であること、ならびに術式が膵全摘出または膵頭十二指腸切除であることの2点が同定された。

(3) NAFLDから発症した肝癌の特徴:

当施設にて臨床的及び病理組織学的に厳格な基準に基づいてNAFLD肝癌を選別し、遺伝子異常の統合的解析を行うことによってNAFLD肝癌の遺伝子異常の特徴を検証した。2010年から2014年に当院で肝切除を行った

247症例から「エタノール摂取量20g以下」「背景肝の組織学的脂肪変性5%以上」「生活習慣病(高血圧/糖尿病/高脂血症)合併あり」という3つの基準を元にNAFLD肝癌を選別したところ、10症例が該当した。これは、“burned-out NASH”症例などを除外した、厳密な意味でのNAFLD肝癌が、肝癌全体の中で占める割合が4.0%であることを意味している。続いて、この10症例から得られた11検体(1症例は2個の独立した肝癌を解析)のNAFLD肝癌サンプルを対象として、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス、特定の遺伝子のターゲットシーケンス、ならびにcytoscan(Affymetrix社)を用いた染色体コピー数解析を施行した。まず、NAFLD肝癌における遺伝子異常の全体像を把握するために全エクソンシーケンス解析を行ったところ、11検体で合計1142個の体細胞変異が確認された。遺伝子変異が起こる頻度は1Mbあたり1.86変異程度であり、一般的な肝癌(1Mbあたり約2.8変異)よりも少ない傾向にあった。また、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)データベースを用いた解析により、これらの変異遺伝子が代謝経路、PI3K-Aktシグナル経路など生体内の重要なシグナル伝達経路に關与していることが確認された。続いて、検出された全遺伝子変異を対象として遺伝子変異パターンの解析を行ったところ、T>C/A>GおよびC>T/G>Aパターンが主体であり、過去に報告されているウイルス性肝癌の遺伝子変異パターンと類似していた。

NAFLD肝癌に寄与する変異遺伝子をより詳細に検討するため、既知の肝癌関連14遺伝子(CTNNB1, TP53, ARID1Aなど)に、前述の全エクソンシーケンスにおいて2例以上で共通して変異を認めた12遺伝子を加えた合計26遺伝子を対象とし、ターゲットシーケンス解析を行った。その結果、NAFLD肝癌では11検体中9例でTERTプロモーター変異が認められたほか、CTNNB1, TP53などの既知の肝癌関連遺伝子の変異が同定された。特に、TERTプロモーター変異は、過去の報告ではHCV肝癌全体の64%、HBV肝癌全体の37%の症例で認められたのに対して、今回の検討ではNAFLD肝癌の82%の症例で同定されたことから、NAFLD肝癌ではウイルス性肝癌と比べてTERTプロモーター変異がより高頻度に起こっている可能性が示唆された。また、ターゲットシーケンス解析では、これまで肝癌ドライバー遺伝子として認識されていなかったFGA, SYNE1などの遺伝子においても複数

検体で変異が生じていることが明らかになった。

次に、NAFLD 肝癌 11 検体を対象とした網羅的な染色体コピー数解析を行った。その結果、NAFLD 肝癌では染色体 1q(=1 番染色体長腕)、8q領域の増幅と染色体 1p(=1 番染色体短腕)、4q、6q、8p、13q、16p、17p、18q 領域の欠失が多いことが明らかになった。特に今回の NAFLD 肝癌の検討では、8p 欠失がすべての検体で認められており、NAFLD 肝癌のきわめて特異的な遺伝子変化像であると考えられた。すなわち、NAFLD 肝癌における遺伝子異常としては TERT プロモーター変異と 8 番染色体短腕欠失が主な特徴であることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kim SK, Ueda Y, Hatano E, Kakiuchi N, Takeda H, Goto T, Shimizu T, Yoshida K, Ikura Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Uemoto S, Chiba T, Ogawa S, Marusawa H. *TERT* promoter mutations and chromosome 8p loss are characteristic of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2016; 139(11): 2512-2518.
DOI:10.1002/ijc.30379

金秀基、上田佳秀、丸澤宏之. ここまでわかった NAFLD 肝癌の遺伝子異常. 肝胆膵 Vol.74 No.2 257-262, 2017

上田佳秀. 肝移植後の原疾患の再発 長期予後改善を目指して . 消化器・肝臓内科 1(5): 569-574, 2017

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 佳秀 (UEDA, Yoshihide)
京都大学 医学研究科・特定講師
研究者番号： 9 0 3 7 8 6 6 2

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし