

# 学位論文内容要旨

氏名： 安藤 航

## 【題目】

非アルコール性脂肪性肝炎における肝線維化バイオマーカーの臨床的検討

(Clinical Study of Liver Fibrosis Biomarkers in Patients with Histologically Proven Nonalcoholic Steatohepatitis)

## 【目的】

慢性肝炎は肝細胞の炎症を主体する病態でありC型肝炎ウイルス(HCV: hepatitis C virus)や非アルコール性肝疾患(NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease)などが主な原因である。長期にわたる持続的な肝臓の炎症は、肝細胞がコラーゲン線維に置き換わる肝線維化を引き起こし、やがて肝硬変や肝がんの発生を上昇させることが知られている。NAFLDは脂肪肝を伴う肝炎の一種であり、本邦での有病率は健康診断を受ける成人のおよそ30%と報告されている。非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)はNAFLDの重症型であり、高率に糖尿病を合併している。現在、NASHに対して確立された治療方法はないため、食事運動療法や血糖降下薬の投与をはじめとした糖尿病等の合併症の治療が優先される。なかでも経口血糖降下薬であるピオグリタゾン(PPAR $\gamma$  agonist)は脂肪細胞分化の促進、脂肪細胞やマクロファージからのアディポカインの分泌調節を介してインスリン抵抗性、脂質代謝異常、炎症機転を改善する作用を持つ。また、NASH治療においてピオグリタゾンはALTを改善させることが報告されている。NASHでは高度な肝臓の炎症や肝線維化がみられ、進展することで肝硬変や肝がんのリスクが高まるため、早期の発見が重要である。肝線維化が起こる機序は、肝炎ウイルス感染や脂肪の蓄積によって肝臓に炎症が発生し、その炎症が肝星細胞を活性化させることで細胞周囲の線維化を促進する。また、線維化の促進には種々の酵素や炎症性サイトカインが関わっているとされている。脂肪細胞から分泌されるサイトカインはアディポカインと呼ばれる。食欲の低下作用を持つleptinは、肥満やNAFLD患者において高い血中濃度となり、レプチン抵抗状態を誘発させることで、過食や肥満を増強させる。ghrelinは食欲を増進させる作用を持ち、肥満患者ではその血中濃度は低下する。脂肪の蓄積による炎症では、単球走化性因子(MCP-1)の濃度は高まり、Kupffer細胞の活性化を介して肝炎と肝線維化を促進させる作用を持つ。一方で、炎症による細胞障害は再生のために幹細胞が動員される。その再生に寄与する因子として、幹細胞因子(SCF-1)や幹細胞増殖因子(SCGF- $\beta$ )、間質細胞由来因子(SDF-1 $\alpha$ )が報告されている。肝線維化の改善には細胞外マトリクス分解酵素であるMatrix metalloproteinases (MMPs)が関与し、肝臓ではその分子種のうちのMMP-1、MMP-2、及びMMP-9が関与する。Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)はMMPsの活性化を抑制する作用を持ち、コラーゲンの産生と分解のバランスが保たれている。これらのサイトカインやMMPs、TIMPsが、早期NASHにおける線維化形成に、重要な役割を担っていると推察された。そのため、本研究では、NASHの病態に関与する物質の血中濃度を測定することで、NASHの早期発見や治療評価に可能か否かを明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

2013年4月1日から2016年12月31日に北里大学メディカルセンターおよび国際医療福祉大学病院(栃木県那須塩原市)を受診し、肝生検でNASHと診断された患者33人を対象とした(男性24人、女性9人;平均年齢 $50.6 \pm 12.3$ 歳)。除外基準はNASH以外の他の肝炎を合併している患者、およびアルコール性肝障害を除外するために飲酒量が男性で20 g/day、女性で10 g/day以上の患者とした。比較対照群は国際医療福祉大学病院の健康管理センターにおいて健康診断を受けた健康人ボランティア14人とした。本研究は研究施設ごとに倫理委員会の承認を得たのち、被験者本人に文書で説明し同意を得て実施した。NASHの肝線維化の評価は肝生検組織像からBruntの分類に従ってステージ1から4に分類した。線維化ステージ1(F1:14人)~2(F2:10人)の患者を早期群(24人)、ステージ3(F3)~4(F4)を進行期群(9人)と定義した。被験者の血液よりleptin、ghrelin、MCP-1、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、SCF-1、SCGF- $\beta$ 、SDF-1 $\alpha$ 、MMP-1、MMP-2、MMP-9、TIMP-1、及びTIMP-2の濃度を測定し、それぞれの血清中濃度は肝線維化ステージおよび治療経過ごとに解析した。測定は、ビーズ標識抗体を用いた免疫学的測定装置(Bio-Plex<sup>®</sup> 200, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA)を用いた。

## 【結果・考察】

肝線維化の早期群における平均血清MMP-1濃度( $1.71 \pm 1.63$  ng/mL)は、進行期群( $0.75 \pm 0.32$  ng/mL)と健常対照群( $0.96 \pm 0.55$  ng/mL)より高い傾向を示したが有意な差は見られなかった。早期群のMMP-1濃度をF1およびF2群に分けて解析したところ、F1群において有意に高値であった。MMP-1はヒトのNASH肝臓組織において、肝幹/前駆細胞が関与するキャピラリゼーションの先端で発現し、早期のNASH病態で増加することが明らかにされていることから、MMP-1は早期のNASH病態を反映すると考えられた。進行期群におけるMMP-2の血清中濃度( $52.0 \pm 19.2$  ng/mL)は対照群( $30.7 \pm 10.8$  ng/mL)より有意に高かった(図1)。血清MMP-2濃度と線維化ステージ段階は相関する傾向がみられた( $r = 0.286$ ,  $p = 0.051$ )ことから、MMP-2は線維化ステージの進行によって高くなることが示唆された。MMP-1は早期において高い値を示しており、肝線維化の初期段階で特徴的な変化を示している可能性が示唆された。また、進行期群におけるTIMP-1の血清中濃度は健常対照群および早期群よりも高い値を示しており、TIMP-1は線維化ステージの進行によって高くなることが示唆された。MMP-1

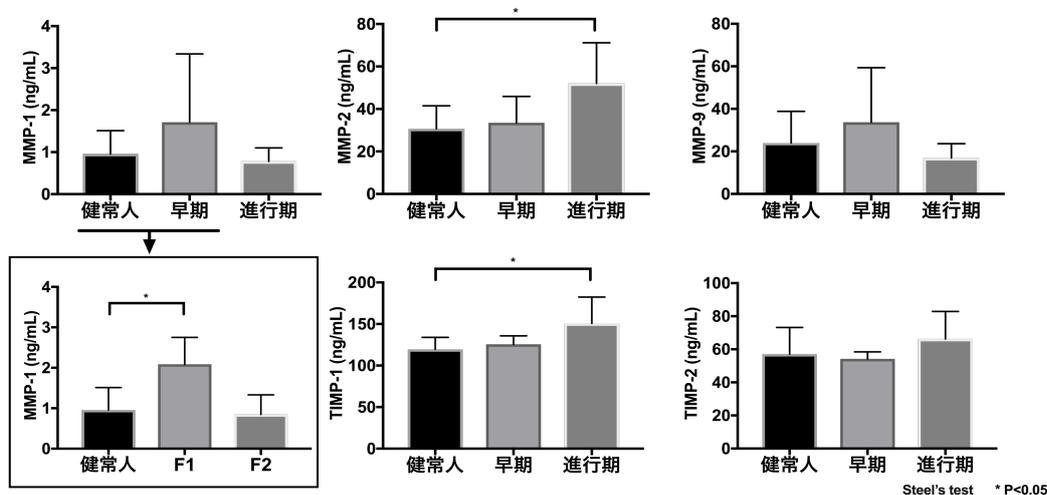


図1. 肝線維化ステージごとの血清MMPsおよびTIMPs濃度

サイトカインについては、血清中 SDF-1  $\alpha$ 、MCP-1、leptin 濃度は健常対照群より早期群と進行期群において有意に高値を示した(図 2)。血清中 G-CSF 濃度は早期において、血清中 SCGF- $\beta$  濃度は進行期群でそれぞれ健常対照群より高値を示した。血清中 ghrelin および SCF-1 濃度は早期群および進行期群と健常対照群には有意な差は認められなかった。血清中 SDF-1  $\alpha$  濃度は線維化ステージとの相関がみられた( $r = 0.638, p < 0.001$ )。SDF-1  $\alpha$  は肝線維化ステージの進行に伴って血清中濃度が上昇すると考えられた。血清中 MCP-1、leptin、G-CSF 濃度は NAFLD の病態と関連して上昇する報告があり、本研究の対象患者においても同様の傾向を示したと考えられた。一方、ghrelin も NAFLD やメタボリックシンドロームの合併において血中濃度が上昇するとされているが、本研究では有意な差はみられなかった。ghrelin は食事摂取に影響するホルモンであり、採血時の状態や日内変動も影響していると考えられた。

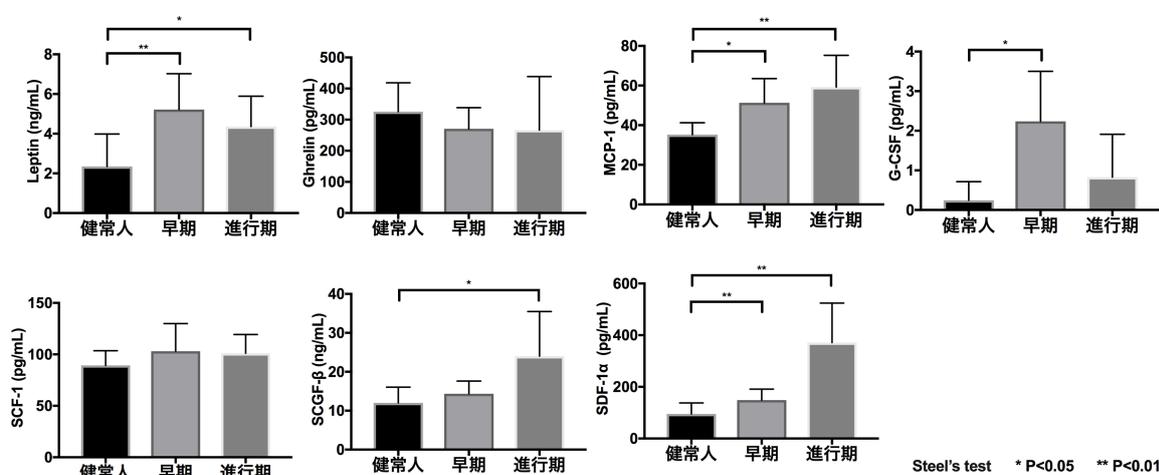


図 2. 肝線維化ステージごとの血清中サイトカイン濃度

33 人の NASH 患者のうち MMPs、TIMPs およびサイトカインの血清中濃度を肝生検の直前、21、35、70 週後に測定できた 15 人を対象とし、観察期間中に ALT が 30 IU/L 未満に改善した群 (ALT 改善群 8 人) と、ALT が改善しなかった群 (ALT 非改善群 7 人) に分け検討した。臨床経過における ALT 値および MMPs、TIMPs の血清濃度を解析したところ、ALT 改善群の ALT 値は 70 週間で 30 IU/L 未満まで低下し、ALT 低下に沿って MMP-1 濃度も低下した。一方で ALT 非改善群の MMP-1 濃度は臨床経過においてほとんど変化しなかった。MMP-2、MMP-9 および TIMP-1、TIMP-2 は ALT 改善群および ALT 非改善群において変化しなかった。また、ピオグリタゾン投与が新たに開始され、2 カ月間継続して服用していた F1 群 6 人、F2 群 9 人を対象とし、MMPs、TIMPs の血清中濃度を測定したところ、F1 群の MMP-1 濃度は、ピオグリタゾン治療後に減少する傾向が見られたが、F2 群では MMP-1 の変化はわずかであった(図 3)。また、ALT は F1 群および F2 群においてピオグリタゾン投与後に低下する傾向がみられた。一方、MMP-2 および TIMP-1、TIMP-2 では変化が見られなかった。ALT の改善が見られた群で MMP-1 濃度が低下したことから、炎症の改善が MMP-1 濃度に影響を与えたと考えられた。

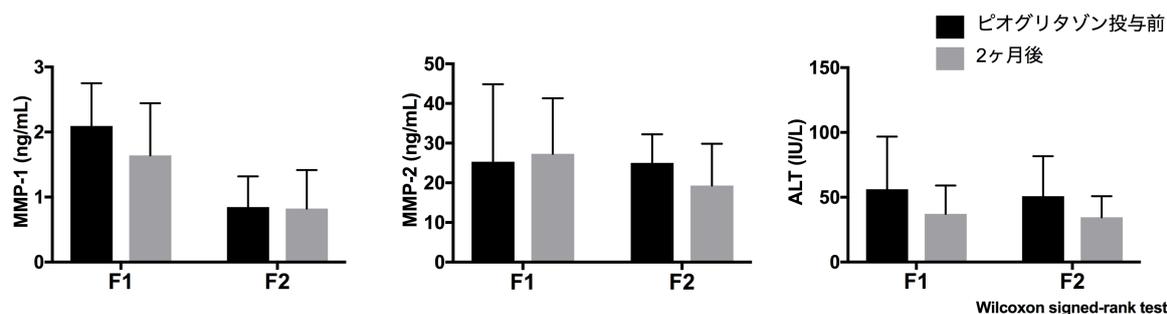


図3. ピオグリタゾン使用前と使用2ヶ月後の MMP-1、MMP-2 および ALT

現在、C型肝炎は高いウイルス陰性化効果を持つ直接ウイルス阻害薬(DAA)が登場し、治療が容易になった。しかしながら、C型肝炎ウイルス(HCV)が消失したとしても、肝線維化の進展や発がんリスクは残されているため、DAA治療後も定期的に継続した肝線維化の観察は必要である。肝線維化の観察方法には肝生検、超音波、血中線維化マーカーを用いて間接的に判定する方法が行われている。なかでも血中線維化マーカーは、採血のみによって肝線維化の程度を判定することが可能であり侵襲性はとても低い。現在、臨床では肝線維化マーカーとしてヒアルロン酸、IV型コラーゲン、*Wisteria floribunda*陽性 Mac-2 結合タンパクなどが用いられているが、近年 Autotaxin (ATX) が新規線維化マーカーとして登場した。ATX はリゾホスファチジルコリンをリゾホスファチジン酸へ変化させる酵素であり、全身の組織から分泌される一方で肝類洞内皮細胞に特異的に取り込まれ代謝されたため、肝線維化が進行し、細胞の脱落により血中の ATX 濃度が上昇することで肝線維化ステージと比例した肝線維化マーカーとして用いることが可能である。我々はこの ATX に着目し、C型肝炎患者の DAA 治療前後における血中濃度の変化を解析し、C型肝炎治療による肝線維化改善の評価についても現在検討を進めている。一方で NASH は根本的な治療法が確立されておらず、糖尿病や肥満を合併している場合はその治療が優先される。そのため、NASH は次の肝硬変や肝がん対策のターゲットとなる。ATX が NASH 患者において肝線維化マーカーとして利用できるかは解析中である。本研究は NASH の早期発見や薬物治療の評価に寄与すると考えられ、今後、NASH における MMP-1 が関与する病態のより詳細な解明や治療に用いられる薬剤との関係について検討し、ATX や SDF-1 $\alpha$  などの肝線維化マーカーを併用した個別化医療を目指して臨床へ応用していきたい。

### 【総括】

高い血清中 Leptin 及び MCP-1 濃度を示した早期段階の NASH では、血清中 MMP-1 濃度は高値を示した。また、食事運動療法及び薬物治療は炎症及び肝星細胞の沈静化によって血清中 MMP-1 濃度を低下させることが示唆されたことから、MMP-1 が早期 NASH の発見や治療評価のバイオマーカーとなると考えられた。NASH の病態解明や早期診断、治療マーカーへの応用が期待された。

以上