

公益財団法人 お酒の科学財団
2021 年度 最終報告書

代表研究者	氏 名	今 一義	
	所属機関 役職	順天堂大学医学部消化器内科学 先任准教授 (助成開始時：順天堂大学医学部消化器内科学 准教授)	
研究領域 臨床・内科学領域			
研究課題名 アルコール関連肝疾患における脂質代謝変化と脂質メディエーターによる病態形成機序			
助成期間		2021 年 4 月～2023 年 3 月	
共同研究者			
	氏 名	所属機関および役職	担当分野
	横溝 岳彦	順天堂大学生化学第一講座 教授	脂質メディエーターの産生 酵素と受容体
	李 賢哲	順天堂大学生化学第一講座 助教	リポドミクス解析
	山科 俊平	順天堂大学消化器内科 先任准教授	慢性肝疾患、肝硬変
	北村 庸雄	順天堂大学浦安病院 先任准教授	慢性肝疾患、肝再生
	大久保 裕直	順天堂大学練馬病院 先任准教授	慢性肝疾患、肝がん
	鈴木 聡子	東部地域病院 副院長	慢性肝炎
	金野 明	東京臨海病院 消化器内科 医長	肝疾患全般

研究実績の概要

具体的内容：

アルコール関連肝疾患（ALD）と非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は大滴性脂肪沈着をはじめとした病理像が酷似した慢性肝疾患である。両疾患とも一部の症例は肝硬変、肝がんへ進展し、かつ両疾患とも罹患数が世界的に増加傾向で、臨床的重要性が年々増している。過剰な脂肪酸による細胞障害“脂肪毒性”が病態に関与するという点は両疾患の共通項だが、脂質の動態は両疾患で大きく異なると考えられる。脂質の細胞膜の構成成分や脂質メディエーターとして機能することが知られているが、脂質組成の変化による ALD /NASH の病態への関与はまだ十分に解明されていない。また、近年、遺伝子多型など遺伝子的要素による脂質代謝活性の変化が ALD /NASH の病態にどのように関与するのかについても、不明な点が多く残されている。

本研究では申請者らのこれまでの実績を活かし、ALD/NASH 患者の臨床検体を用いて最新のリピドミクス解析を行い、両疾患の脂質代謝、脂質組成および脂質メディエーターの共通点・相違点を詳細に解明し、遺伝的要素による影響を解明することを目的とした研究を行った。

○ 遺伝的影響の解析

脂肪性肝疾患（ALD および NASH）患者 36 症例を含む計 79 症例の肝生検組織および血清、血球成分を集積した。脂肪性肝疾患の病態に対する遺伝的影響を解明するため、血球成分から DNA を抽出し、TaqMan SNP genotyping 法で既知の 1 塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）、PNPLA3 rs738409、FADS1 rs174556、FADS2 rs174583 を解析した。その結果、ALD・NASH・原発性胆汁性胆管炎患者を除外した対照群 26 名では GG アレル保有者は 8%であったのに対して脂肪性肝疾患患者のうち 44%が PNPLA3 の GG マイナーアレルを有していて有意に高頻度であり、既報の通り PNPLA3 の GG アレルが脂肪性肝疾患のリスク因子であることが確かめられた。さらに、動脈硬化関連因子のリスクアレルとして報告されている FADS1 および FADS2 の SNP について解析したところ、対照群における TT マイナーアレル保有率は FADS1 15%および FADS2 19%であったのに対して脂肪性肝疾患患者では FADS1 18%および FADS2 38%と有意差を認めなかった。しかしながら脂肪性肝疾患患者の中で Stage 0-2 の線維化非進行群と Stage 3 以上の線維化進行群で比較したところ、FADS2 の TT アレルは線維化進行群で 64%と非進行群 20%に対して有意に高頻度であった。さらに PNPLA3 GG アレル、FADS1 TT アレル、FADS2 TT アレル、ALD/NAFLD、年齢、性別を因子として多変量解析を行ったところ、FADS2 の TT アレルが線維化進行群の独立した危険因子として抽出された。

○ リピドミクス解析

本報告の作成時点で、計 36 症例（ALD 5 例、NASH 16 例、原発性胆汁性胆管炎 5 例、その他 10 例）の肝組織および空腹時血清のリピドミクス解析が完了している。液

体クロマトグラフィー+質量分析器 (Waters, Xevo TQ-S micro) によるターゲット解析を行った。

主成分分析では特に肝組織において脂質プロファイルが ALD 群と NASH 群間で明確に異なった。肝組織の解析では、トリアシルグリセロール (TAG; 16:0, 16:1, 18:0, 18:1) およびジアシルグリセロール (DAG; 16:0, 18:0, 18:1) が NASH 群において ALD 群より有意に高値であった。同様に、NASH 群ではセラミド、 α ヒドロキシセラミド (ahCer; d18:1/h18:0, d18:1/h24:0)、リゾホスファチジルグリセロール (Lyso PG; 18:2, 18:1, 22:6)、ホスファチジレイノシトール (PI; 18:0/20:3n-9) およびリゾホスファチジレイノシトール (Lyso PI; 18:0)、ホスファチジルエタノールアミン (PE; 18:2, 18:0) が有意に高値であった。一方、ALD 群の肝組織ではリゾホスファチジン酸 (Lyso PA; 18:1, 22:6)、リゾホスファチジルエタノールアミン (Lyso PE; n-2 18:2, sn-2 18:1, sn-2 20:4, sn-2 22:6, sn-2 22:5n-3)、リゾホスファチジルセリン (Lyso PS; 18:1) が有意に高値であった。そのうち、TAG、DAG、セラミドおよび ahCer は血清でも NASH 群で有意に高値であり、血清 Lyso PS は ALD 群で有意に高値であった。総括して、NASH の肝組織では TAG および DAG, セラミドが顕著に増加する一方で、リゾリン脂質の構成は病態毎に明確な特徴が認められた。

学術的意義：

SNP 解析では従来報告されてきた PNPLA3 の SNP が ALD および NASH といった脂肪性肝疾患の高リスク因子であることが確かめられただけでなく、動脈硬化関連疾患の高リスク因子として報告されている FADS2 rs174583 の TT マイナーアレルが肝線維化進展の高リスク因子でもあることが示された。ALD および NASH の病態進展が冠動脈疾患の発症リスクに関与することが近年のトピックスであり、本研究結果は SNP 変異によるリスク上昇が両疾患を繋ぐ鍵であることを示唆したものである。また、血漿および肝組織を用いたリポドミクス解析ではリゾリン脂質の多くが ALD 群より NASH 群で高値であったが Lyso PS は ALD で高値であることが示され、病態形成における脂肪毒性の機序は両疾患で異なることが示された。特に ALD で有意に高値であった Lyso PS は ALD の病態におけるメディエーターとして機能している可能性があり、学術的な意義の大きなものである。

社会的重要性：

ALD および NASH の病態進行高リスク群の抽出、囲い込みは現在の脂肪性肝疾患診療において極めて重要なテーマである。本研究で示された FADS2 の SNP は脂肪性肝疾患の予後規定因子である線維化進展の高リスク群の抽出に有効であるだけでなく、脂肪性肝疾患と動脈硬化関連疾患リスクとの共通項となりうる因子である可能性がある。また、血清 Lyso PS の測定が脂肪性肝疾患における ALD の鑑別リポドミクス解析が ALD および NASH の病態解明および診断に有用である可能性が示す、社会的意義の大きな結果である。

本文

1. 研究開始当初の背景

アルコール関連肝疾患（ALD）と非アルコール性脂肪肝炎（NASH）はいずれも大滴性脂肪化、肝細胞障害および肝細胞周囲線維化像といった極めて酷似した病理像を呈する。ALD と NASH 患者の一部は肝硬変に進行し、一部は肝発癌に至る。ALD と NASH の病態進展には遺伝的背景が大きく関与しており、NASH の進行リスク因子として全ゲノム関連解析（genome-wide association studies: GWAS）で明らかにされた PNPLA3 rs738409 の G アレル変異は¹、ALD の増悪因子でもあると報告されている²。ALD と NASH の病態形成・進展には、その他にも複数の遺伝的背景が関与していると想定される。

少量飲酒が動脈硬化に与える影響については議論のあるところだが、過剰な飲酒歴を背景とする ALD 患者では心血管疾患を発症するリスクが高いことが明らかにされており、特に初期の ALD 患者では顕著に心血管疾患のリスクが上昇すると報告されている。また、NASH 患者も肝病態の進行に伴い心血管イベントのリスクが上昇するとされており³、本邦における診療ガイドラインでも NASH 患者を対象とした心血管疾患のスクリーニング検査が推奨されている。しかし、これら脂肪肝関連疾患と心血管イベントのリスク増大の鍵となる因子は明らかになっていない。近年、脂肪酸不飽和化酵素（fatty acid desaturase）のマイナーアレルが心血管イベントのリスクアレルであることが報告されている⁴。

ALD、NASH の病態形成機序にはまだ不明な点が残されているが、過剰な脂質による細胞障害—脂肪毒性—が病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている。ALD ではエタノールにより、NASH では過剰な糖質供給のため、SREBP1-c の発現が亢進し、de novo 脂肪酸合成が亢進する。また、小胞体ストレスなどの細胞ストレスも脂肪酸合成の促進に働く。さらに ALD ではエタノールの作用により脂肪酸 β 酸化が抑制される^{5,6}。その一方で NASH では脂肪酸分解の活性は亢進しているが不十分であり、最終的には脂肪蓄積の結果となる^{7,8}。ALD と NAFLD の肝内脂質蓄積の機序は共通点もあるが、多くの点で異なっており、両疾患において脂質組成に違いがあることが想定される。近年、脂質はエネルギー源としての機能や細胞膜の構成成分であるだけでなく、リン脂質を中心とした生理活性を持つ資質が脂質メディエーターとして体内のホメオスタシスの維持に寄与していることが明らかになってきた^{9,10}。

報告者はこれまでに ALD および NASH の病態形成における脂肪毒性の関与について動物実験を中心とした解析を行ってきており、生化学第一講座の横溝岳彦教授の研究グループと共同で、脂肪肝炎動物モデルのリピドミクス解析によって加齢マウスで脂肪酸不飽和化酵素 FADS の発現が低下、リン脂質中の多価不飽和脂肪酸の比率が減少し、脂肪肝炎の増悪を来すことを示し報告した¹¹。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では肝生検で確定診断を受けた ALD および NASH 患者を対象として、遺伝的素因、特に動脈硬化関連疾患と関係する SNP の肝病態への影響を明らかにし、患者の血清、肝組織を用いたリポドミクス解析を行い、脂質メディエーターを中心に脂質組成が肝病態に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝的素因に関する研究：

脂肪性肝疾患（ALD および NASH）患者 36 症例を含む計 79 症例の肝生検組織および血清、血球成分を集積した。脂肪性肝疾患の病態に対する遺伝的影響を解明するため、血球成分から DNA を抽出し、TaqMan SNP genotyping 法で既知の 1 塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）、PNPLA3 rs738409、FADS1 rs174556、FADS2 rs174583 を解析した。

リポドミクス解析：

本報告書の作成段階ではまだ追加検体分の解析中であり、今回提出するデータは 2021 年 5 月～2022 年 4 月の間に肝生検を施行した患者 36 症例（ALD 5 例，NASH 16 例，原発性胆汁性胆管炎 5 例，その他 10 例）を対象とし、肝組織および空腹時採血の血清を用いて、液体クロマトグラフィー+質量分析器（Waters, Xevo TQ-S micro）によるターゲット解析を行ったものである。

4. 研究成果

遺伝的影響の解析：

ALD・NASH・原発性胆汁性胆管炎患者を除外した対照群 26 名では GG アレル保有者は 8%であったのに対し、脂肪性肝疾患患者のうち 44%が PNPLA3 の GG マイナーアレルを有していて有意に高頻度であった。このことから、既報の通り PNPLA3 の GG アレルが脂肪性肝疾患のリスク因子であることが確かめられた。さらに、動脈硬化関連因子のリスクアレルとして報告されている FADS1 および FADS2 の SNP について解析したところ、対照群における TT マイナーアレル保有率は FADS1 15%および FADS2 19%であったのに対して脂肪性肝疾患患者では FADS1 18%および FADS2 38%と有意差を認めなかった。脂肪性肝疾患の病態進展への影響を明らかにするため、脂肪性肝疾患患者の中で Stage 0-2 の線維化非進行群と Stage 3 および 4 の線維化進行群で比較したところ、FADS2 の TT アレルは線維化進行群で 64%と非進行群 20%に対して有意に高頻度であった。さらに PNPLA3 GG アレル、FADS1 TT アレル、FADS2 TT アレル、ALD/NAFLD、年齢、性別を因子として多変量解析を行ったところ、FADS2 の TT アレルが線維化進行群の独立した危険因子として抽出された（Table 1）。

Variables	Coefficient	p Value
<i>PNPLA3</i> rs738409 GG allele	0.0697	0.710
<i>FADS1</i> rs174556 TT allele	-0.390	0.133
<i>FADS2</i> rs174583 TT allele	0.577	0.011
ALD or NASH	0.0818	0.673
Age	0.0127	0.101
Male or Female	-0.279	0.113

Table 1. 重回帰分析による肝線維化進行の因子の解明

主成分分析では血清、肝組織共に脂質プロファイルが ALD 群と NASH 群間で異なり、特に肝組織において相違が顕著であった (Figure 1)。

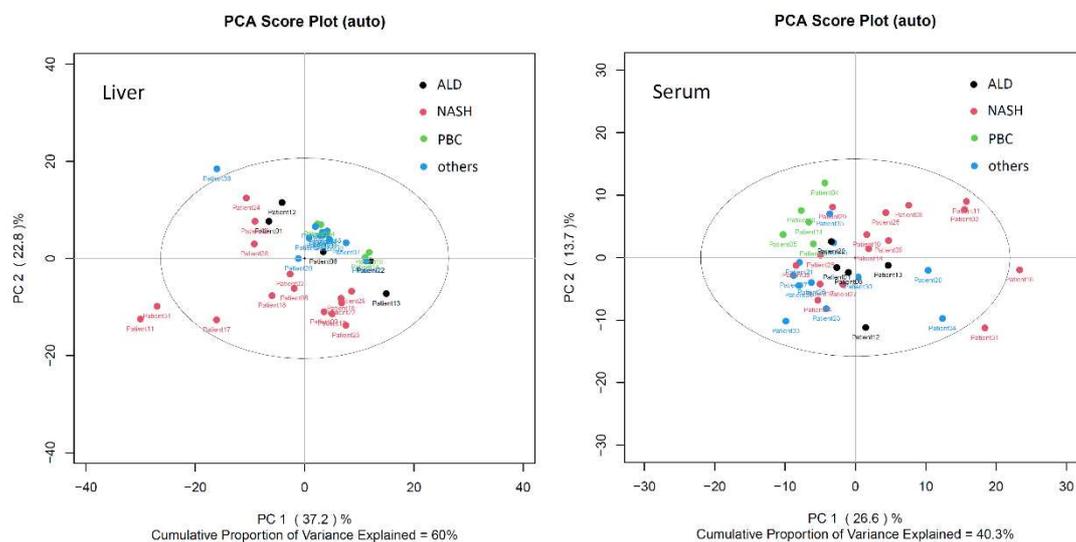


Figure 1. 主成分分析 (左: 肝組織、右: 血清)

肝組織における中性脂肪の解析では NASH 群において全体的に高値であったが、中でもトリアシルグリセロール (TAG; 16:0、16:1、18:0、18:1) およびジアシルグリセロール (DAG; 16:0、18:0、18:1) が NASH 群において ALD 群より有意に高値であった (Figure 2)。

スフィンゴ脂質の解析でも、NASH 群でセラミド、 α ヒドロキシセラミド (ahCer; d18:1/h18:0、d18:1/h24:0) が有意に高値であった (Figure 3)。同様に、グリセロリン脂質の解析では、ホスファチジルイノシトール (PI; 18:0/20:3n-9)、ホスファチジルエタノールアミン (PE; 18:2、18:0) が NASH 群で有意に高値であった (Figure 4)。

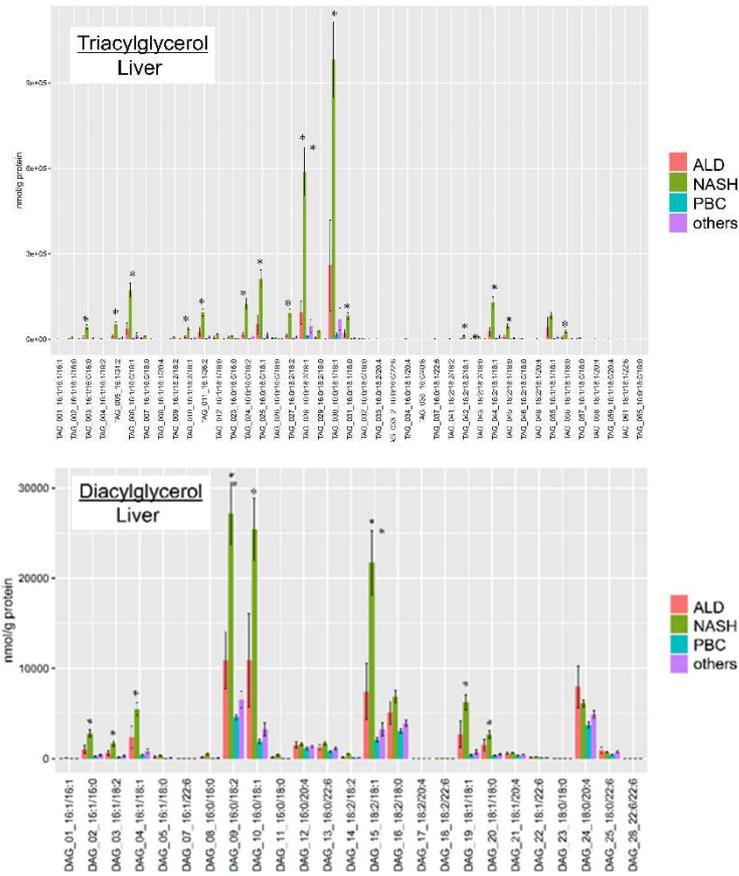


Figure 2. 中性脂肪の組成： 上段・triacylglycerol (TAG)、下段・diacylglycerol (DAG)

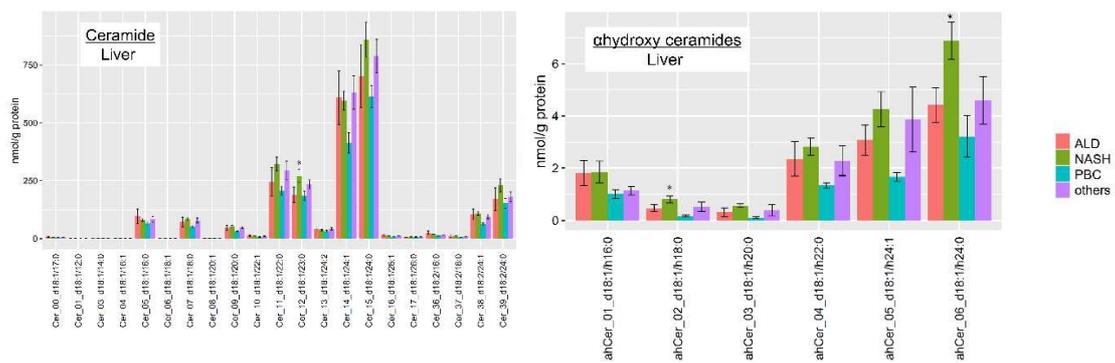


Figure 3. スフィンゴ脂質の組成： 左・Ceramide (Cer)、右・ahydroxy ceramide (ahCer)

*; p < 0.05 vs. ALD

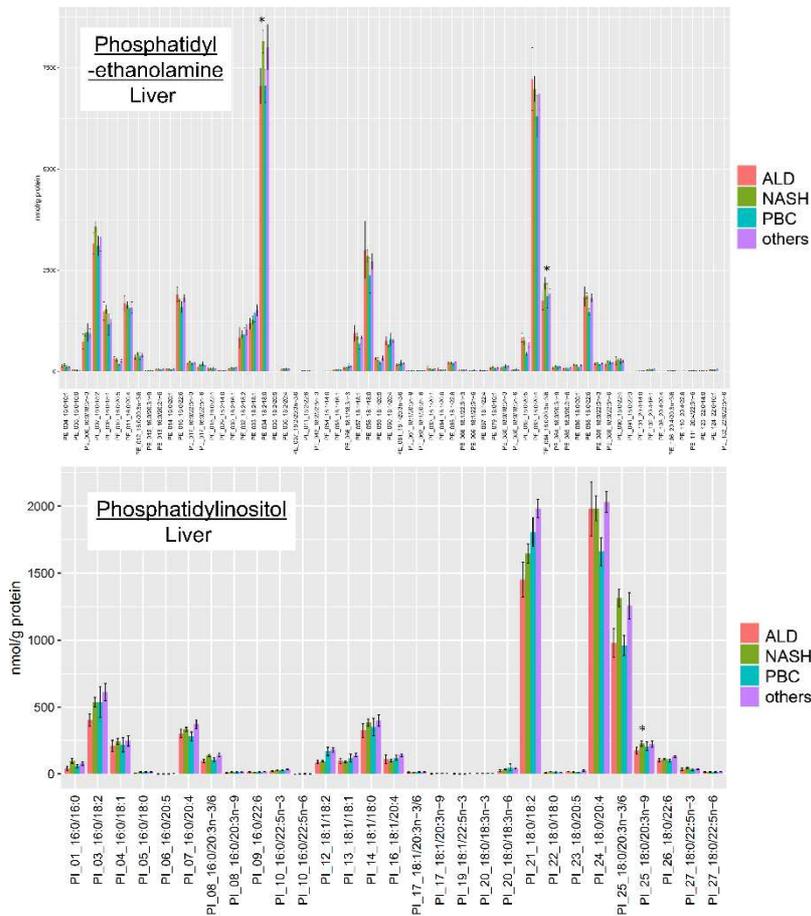


Figure 4. グリセリン脂質の組成： 上段・phosphatidylethanolamine (PE)、下段・phosphatidylinositol (PI)

*; $p < 0.05$ vs. ALD

一方、リゾリン脂質の解析において、リゾホスファチジルイノシトール (Lyso PI; 18:0) およびリゾホスファチジルグリセロール (Lyso PG; 18:2, 18:1, 22:6) が NASH 群で有意に高値であったが、リゾホスファチジン酸 (Lyso PA; 18:1, 22:6) およびリゾホスファチジルセリン (Lyso PS; 18:1)、リゾホスファチジルエタノールアミン (Lyso PE; n-2 18:2, sn-2 18:1, sn-2 20:4, sn-2 22:6, sn-2 22:5n-3) は ALD 群で有意に高値であった (Figure 5)。

そのうち、TAG、DAG、セラミドおよび ahCer は血清でも NASH 群で有意に高値であり、血清 Lyso PS は ALD 群で有意に高値であった。総括して、NASH の肝組織では TAG および DAG, セラミドが顕著に増加する一方で、リゾリン脂質の構成は病態毎に明確な特徴が認められ、特に Lyso PA と Lyso PE は ALD 群の肝組織に多く発現しており、Lyso PS は血清中に特に多く認められ、肝組織中でも 18:1 は有意に高値であった。

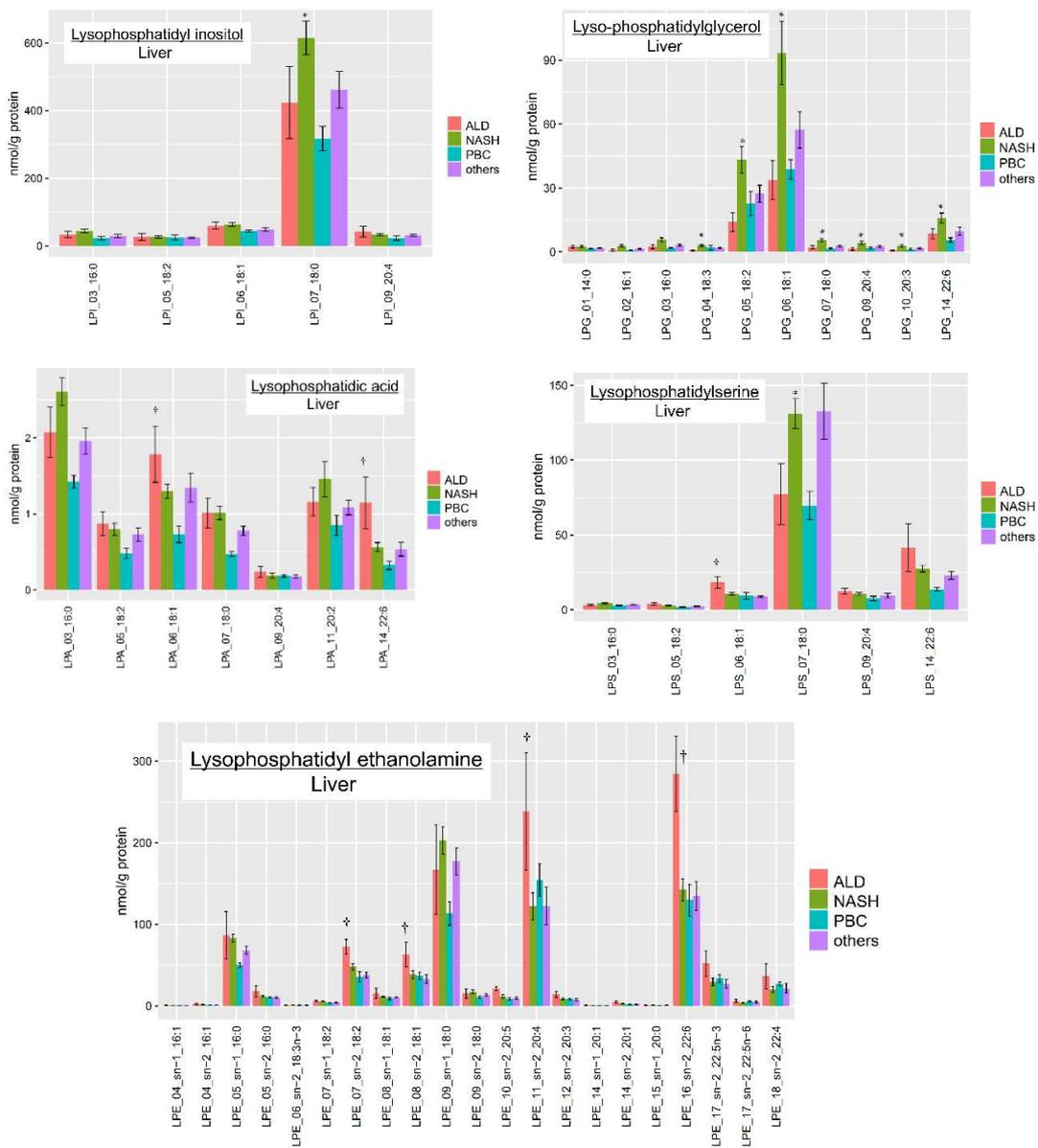
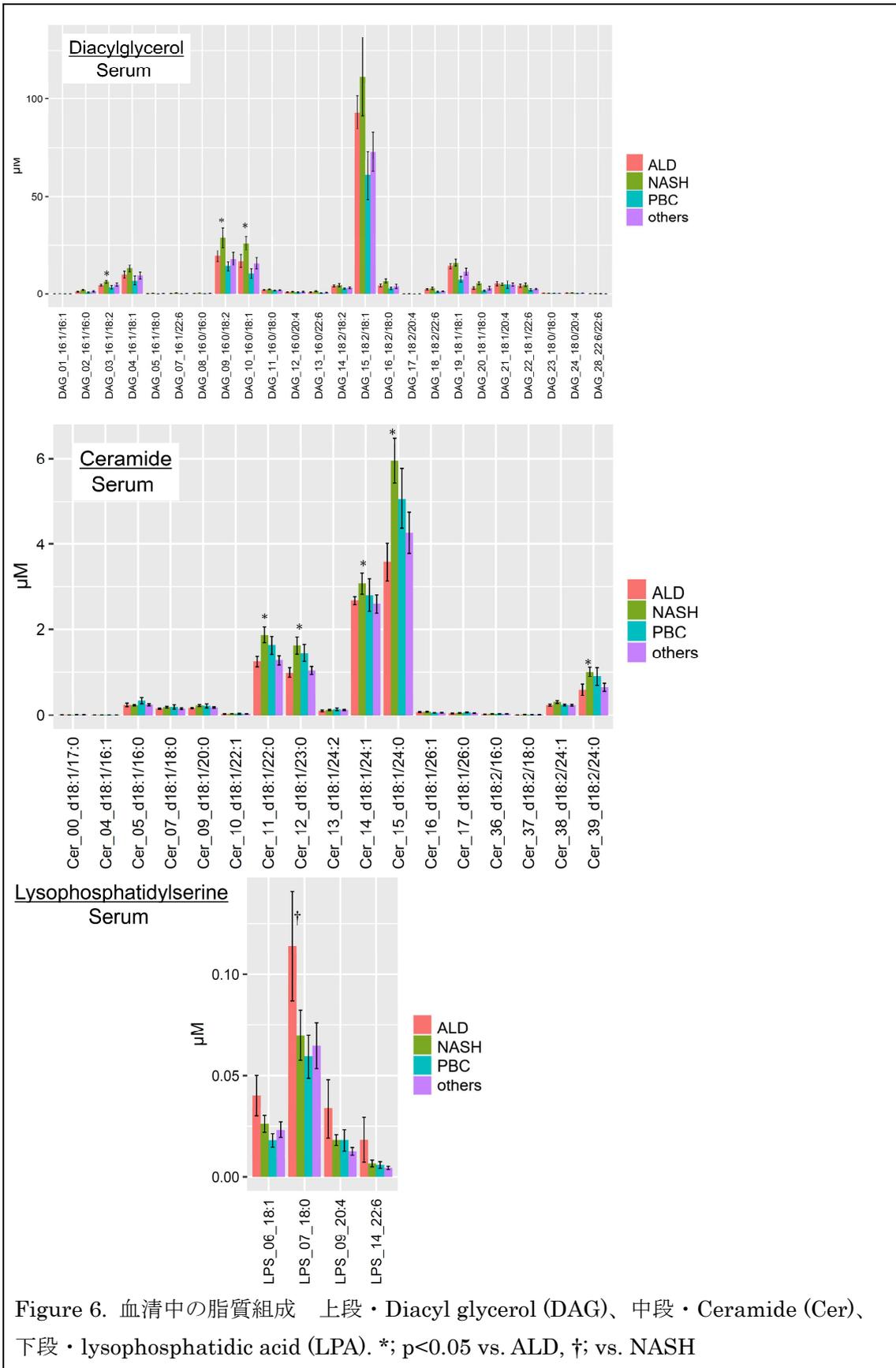


Figure 5. リゾリン脂質の組成 左上段・lysophosphatidyl inositol (LysoPI)、右上段・lysophosphatidylglycerol (LysoPG)、左中段・lysophosphatidic acid (LysoPA)、右中段・lysophosphatidylserine (LysoPS)、下段・lysophosphatidyl ethanolamine (LysoPE)

*; $p < 0.05$ vs. ALD, †; vs. NASH



5. 結果に対する考察・結論

SNP解析では従来報告されてきた PNPLA3 の SNP が ALD および NASH といった脂肪性肝疾患の高リスク因子であることが確かめられただけでなく、動脈硬化関連疾患の高リスク因子として報告されている FADS2 rs174583 の TT マイナーアレルが肝線維化進展の高リスク因子でもあることが示された。ALD および NASH の病態進展が冠動脈疾患の発症リスクに関与することが近年のトピックスであり、本研究結果は SNP 変異によるリスク上昇が両疾患を繋ぐ鍵であることを示唆したものである。

血漿および肝組織を用いたリポドミクス解析では脂質の多くが ALD 群より NASH 群で高値であったが Lyso PA、Lyso PS、Lyso PE は ALD の肝組織で高値であることが示され、Lyso PS 18:0 は特に血清中で顕著に高値であり、病態形成における脂肪毒性の機序が ALD、NASH の両疾患で異なることが示された。リゾリン脂質はアシル基を 1 本有するリン脂質で、細胞膜を構成するリン脂質より産生される。リゾリン脂質の構造は細胞膜の脂質二重層に入りやすく、高い生理活性作用を持ち、脂質メディエーターとして機能する。ALD の病態において Lyso PA、Lyso PE は肝組織中で、Lyso PS は大循環においてメディエーターとして機能している可能性が考えられた。Lyso PS の前駆体である PS はむしろ NASH 群で高値であり、ALD で Lyso PS が増加している機序については今後の検討が必要である。

セラミドをはじめとしたスフィンゴ脂質は NASH 群において血清、肝組織中のいずれも有意に高値であった。スフィンゴ脂質はインスリン抵抗性、脂質異常症、細胞障害の誘因になるため⁹、NASH の背景であるインスリン抵抗性を基盤としたメタボリック症候群と肝細胞障害に重要な役割を果たしていること、血清中のセラミド測定が肝組織中のセラミドの動態を反映している可能性が示された。

6. 今後の展望

本研究の結果から、遺伝的素因として SNP のリスクアレルに脂肪性肝疾患の病態進展と心血管イベントリスクの共通項があることが示された。今後、より大規模の症例集積によって確認していく必要があるが、複数の SNP を評価することで ALD および NASH 患者の併存疾患のリスク評価、予後予測が期待できる。

ALD の病態において血清中 Lyso PS 18:0 は病態のバイオマーカーとなり得る。さらに、Lyso PS 18:0 に対するアプローチが ALD の病態に併発する全身疾患の予後改善に寄与することが期待できる。肝組織中の Lyso PA および Lyso PE は ALD の肝組織中の病態解析に有用である可能性があり、さらに ALD の肝病態に対する治療ターゲットになり得る。今後は本研究で得られたデータに基づいて ALD の病態におけるリゾリン脂質の役割に関する基礎的知見を集めて行き、臨床応用へと繋げてゆく方針である。

引用文献

1. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One* 2012;7:e38322.
2. Yoo T, Lee KW, Yi NJ, et al. Impact of PNPLA3 (rs738409-G) polymorphism on post-transplant outcomes after liver transplantation for alcohol-related liver disease. *Clin. Transplant.* 2020;34:e14011.
3. Targher G, Byrne CD, Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications. *Gut* 2020;69:1691-1705.
4. Khodarahmi M, Javidzade P, Farhangi MA, et al. Interplay between fatty acid desaturase2 (FADS2) rs174583 genetic variant and dietary antioxidant capacity: cardio-metabolic risk factors in obese individuals. *BMC Endocr. Disord.* 2022;22:167.
5. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:17756-72.
6. Kitagawa R, Kon K, Uchiyama A, et al. Rifaximin prevents ethanol-induced liver injury in obese KK-A(y) mice through modulation of small intestinal microbiota signature. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2019;317:G707-G715.
7. Lu Q, Tian X, Wu H, et al. Metabolic Changes of Hepatocytes in NAFLD. *Front. Physiol.* 2021;12:710420.
8. Kon K, Ikejima K, Morinaga M, et al. L-carnitine prevents metabolic steatohepatitis in obese diabetic KK-A(y) mice. *Hepatol. Res.* 2017;47:E44-E54.
9. Chaurasia B, Summers SA. Ceramides in Metabolism: Key Lipotoxic Players. *Annu. Rev. Physiol.* 2021;83:303-330.
10. Koh EH, Yoon JE, Ko MS, et al. Sphingomyelin synthase 1 mediates hepatocyte pyroptosis to trigger non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2021;70:1954-1964.
11. Ishizuka K, Kon K, Lee-Okada HC, et al. Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through alteration in hepatic lipid metabolism in mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2020.

特記事項

<論文発表>

1. Morinaga M, Kon K, Uchiyama A, et al. Carbohydrate-deficient transferrin is a sensitive marker of alcohol consumption in fatty liver disease. Hepatol Int. 16(2):348-358,2022.

<学会発表>

1. 今一義, 石塚敬, 池嶋健一. 脂肪肝炎形成の分子機構とジェントロジー. 合同シンポジウム1 (日本肝臓学会)「脂質異常症と脂肪肝のクロストーク」. 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 福岡県久留米市. 2022年7月23日
2. 今一義, 内山明, 池嶋健一. アルコール関連肝疾患の病態進展における血中亜鉛濃度の変化. ワークショップ2. 第44回日本肝臓学会東部会. 宮城県仙台市. 2022年11月25日

<図書発表> なし

<産業財産権> なし