

授与番号	甲第 1945 号
------	-----------

## 論文内容の要旨

Effects of laparoscopic sleeve gastrectomy on nonalcoholic fatty liver disease and TGF- $\beta$  signaling pathway

(非アルコール性脂肪性肝疾患と TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に対する腹腔鏡下スリーブ状胃切除術の効果)

(熊谷秀基, 佐々木章, 梅邑晃, 柿坂啓介, 岩谷岳, 西塚哲)

(Endocrine Journal 71 巻, 2 号 令和 6 年 2 月掲載予定)

### I. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) は不規則な食事や運動不足を背景に発症し, 非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) を介して肝硬変へ進展し, 肝細胞癌の発癌母地となる. 腹腔鏡下スリーブ状胃切除術 (laparoscopic sleeve gastrectomy, LSG) をはじめとした減量・代謝改善手術は, NAFLD を劇的に改善させることが知られている. NAFLD の確定診断においては, 未だに肝生検が必要であり, 非侵襲的なスコアリングシステムは複数の項目を組み合わせたものであり, 正診率も高いとは言えない. したがって, NAFLD の病勢を反映するサロゲートマーカーなどの診断, モニタリング手法の確立が重要な課題である.

TGF- $\beta$  シグナル伝達経路は, 肝線維化をはじめとした NAFLD の病勢に関与することが, 動物実験で報告されているが, ヒトで検証した報告は少ない. プロテオーム解析は, 網羅的にタンパクを解析する技術で, 新しいバイオマーカーの発見などを目的に行われる.

本研究の目的は, LSG 前後で採取した血清を用いてプロテオーム解析により, 抽出されたタンパクについて酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) や免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) の手法を用いて検証実験を行い, NAFLD との関連を検討することとした.

### II. 研究対象ならび方法

対象は, 2020 年 1 月から 2022 年 4 月までに岩手医科大学附属病院で LSG を施行した 36 名である. すべての患者において, 身長, 体重などの身体的データ, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), 肝容積などの臨床的データを収集し, 比較した. また, すべての患者に対して LSG 時に肝生検を施行し, NASH と診断された患者に対しては術後 6 か月時に超音波ガイド下肝生検を施行した. 病理組織診断は, 2 名以上の病理専門医によって行い, NAFLD の病勢を評価する NAFLD activity score (NAS), 肝線維化を評価する pericellular fibrosis score (PFS) についても同様に診断した.

プロテオーム解析は, 6 名を対象に LSG 前と LSG 後 6 か月時点で採取した血清を用いて

行い、手術前後で変動したタンパクを抽出した。その後、他の 30 名を対象として、プロテオーム解析で抽出されたタンパクについて、ELISA による検証を行った。また、LSG 時の術中肝生検で得られた残余検体を用いて IHC を行い、肝組織におけるタンパクの発現を評価した。

統計学的解析は、連続変数に対しては、正規性の有無により対応のある t 検定または Wilcoxon の符号順位検定、順序変数に対しては、Wilcoxon の符号順位検定を行った。血清タンパクと NAFLD 関連項目との相関を評価するために、Spearman の相関係数を用いた。加えて、NAS、PFS のグレード別の平均値比較に対しては、one way ANOVA および Tukey の事後検定を行った。肝線維化を予測する因子について、線形回帰モデルを用いた単変量、多変量解析により検討した。

### III. 研究結果

1. LSG 後 6 か月時の超過体重減少率、総体重減少率はそれぞれ 48.7%, 23.7%であり、良好な減量効果が得られた。
2. LSG 後、AST, ALT, NAS をはじめとした多くの NAFLD 関連項目が劇的に改善した。術後 6 か月時点での病理組織学的な NASH 改善率は 14/29 (48.3%)であった。
3. プロテオーム解析により、1,912 種類の血清タンパクが同定された。P 値が 0.100 未満のタンパクに着目すると、asporin (ASP) や thrombospondin-1 (THBS1) をはじめとした TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関与する多くのタンパクが術前後で変動した。
4. プロテオーム解析の結果および過去の文献を参考に ASP, EMILIN-1, platelet factor 4, serglycin, THBS1 の 5 つのタンパクに着目して解析を行った。ELISA による検証では、LSG 後に ASP, THBS1 が有意に減少した。また、術後 6 か月時において、ASP と PFS との関連を認めた。単変量解析では、AST, ASP, THBS1 が PFS と関連しており、多変量解析では、ASP が独立した肝線維化の予測因子であった (回帰係数: 0.703, 95% 信頼区間 [CI]: 0.114-1.291, P=0.022)。Receiver operating characteristic 解析では、ASP の曲線下面積は 0.868 (95% CI : 0.714-1.000, カットオフ値 : 1.079 ng/mL, 感度 : 78.9%, 特異度 : 100%) で他の NAFLD 関連項目より優れていた。
5. IHC では、NASH 患者において、5 つのタンパクすべてが肝組織で発現していた。NAFLD 患者では、他のタンパクと比較して ASP が強く発現する傾向を認めた。

### IV. 結 語

プロテオーム解析および ELISA により、LSG 前後で TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関連するタンパクが劇的に変動していた。また、IHC で TGF- $\beta$  関連タンパクが肝で発現していることも確認できた。加えて、本研究では ASP が NAFLD における肝の線維化を予測するマーカーとして既存のマーカーよりも有用である可能性を示した。ASP は、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に対してのフィードバックおよび細胞外マトリックスへの直接的な関与などの作用が報告されており、上記機序により NAFLD における肝線維化に関連している可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 特任教授 岡田 健太 (内科学講座: 糖尿病・代謝・内分泌内科分野)

副査 特任准教授 柿坂 啓介 (内科学講座: 肝臓内科分野)

副査 特任准教授 長谷川 豊 (内科学講座: 糖尿病・代謝・内分泌内科分野)

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の確定診断は未だ肝生検が必須であるが、侵襲的かつ煩雑性より、より簡便なバイオマーカーの開発が望まれてきた。本研究本論文は、NAFLD を劇的に改善する腹腔鏡下スリーブ状胃切除術による治療に着目して、その治療前後に採取した血清を用いたプロテオーム解析や病理組織を用いて免疫組織化学法を行い、NAFLD との関連を検証した。プロテオーム解析の結果、TGF- $\beta$  シグナル伝達関連するに 5 つのたんぱくに着目し、多変量解析より Asporin が独立した肝線維化の予測因子として同定した。加えて、手術症例の免疫染色の結果でも NAFLD における Asporin の発現が高いことを確認した。このことは NAFLD における肝線維化に Asporin が関与している可能性が示唆している。

本論文は、NAFLD の早期発見や病態モニタリングに役立つ有益な知見を示した研究といえる。学位に値する論文である。

## 試験・試問の結果の要旨

腹腔鏡下スリーブ状胃切除術における NAFLD 改善に関するメカニズム、特に TGF- $\beta$  シグナル伝達関連するたんぱくの Asporin に関して、また患者背景や基礎疾患に関する治療法のバイアス (影響)、他の TGF- $\beta$  シグナル伝達関連するたんぱくに関して等について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作の研究不正は無いことを確認した。

## 参考文献

- 1) Effects of laparoscopic sleeve gastrectomy on nonalcoholic fatty liver disease and TGF- $\beta$  signaling pathway (非アルコール性脂肪性肝疾患と TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に対する腹腔鏡下スリーブ胃切除術の効果) (熊谷秀基 他 5 名と共著) Endocrine Journal, (2023) doi: 10.1507. Online ahead of print.
- 2) Extensively Invasive Gallbladder Cancer from Intracholecystic Papillary Neoplasm Treated with Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy and Extended Cholecystectomy: A Case Report and Literature Review (熊谷秀基 他 7 名と共著) Case Report Surgery, (2023):5825045.