



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	非アルコール性脂肪性肝疾患における肝マクロファージ炎症および線維化進行バイオマーカーの探索
Author(s)	坂本, 譲
Description	配架番号 : 2529
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14064号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14064
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80087
Type	doctoral thesis
File Information	Yuzuru_Sakamoto.pdf



学 位 論 文

非アルコール性脂肪性肝疾患における肝マク
ロファージ炎症および線維化進行バイオマー
カーの探索

(Study on biomarker of liver macrophage
activation and advanced fibrosis in
patients with non-alcoholic fatty liver
disease)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

坂 本 譲

学 位 論 文

非アルコール性脂肪性肝疾患における肝マク
ロファージ炎症および線維化進行バイオマ
ーカーの探索

(Study on biomarker of liver macrophage
activation and advanced fibrosis in
patients with non-alcoholic fatty liver
disease)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

坂 本 譲

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語集	5 頁
緒言	7 頁
方法	12 頁
結果	18 頁
考察	38 頁
総括および結論	41 頁
謝辞	42 頁
利益相反	43 頁
引用文献	44 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

1. Sakamoto Y, Yoshio S, Doi H, Kawai H, Shimagaki T, Mori T, Matsuda M, Aoki Y, Osawa Y, Yoshida Y, Arai T, Itokawa N, Ito T, Seko Y, Yamaguchi K, Itoh Y, Mise Y, Saiura A, Taketomi A, Kanto T.
Serum soluble Siglec-7 concentration as an indicator of liver macrophage activation and advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease
Hepatol Res. 2019 Dec 5. doi: 10.1111/hepr.13464. [Epub ahead of print]

本研究は以下の学会に発表した。

1. 坂本 譲、由雄 祥代、考藤 達哉
NAFLDにおける可溶性 Siglec-7 はマクロファージ関連バイオマーカーである
第 55 回日本肝臓学会総会, 2019.5.30-31, 東京
2. Sakamoto Y, Yoshio S, Kawai H, Shimagaki T, Mori T, Matsuda M, Doi H, Aoki Y, Yoshida Y, Arai T, Itokawa N, Osawa Y, Taketomi A, Kanto T
Soluble Siglec-7 as a macrophage activation marker in patients with non-alcoholic fatty liver disease
APASL Single Topic Conference 2019, 2019.4.18-20, Tokyo
3. Sakamoto Y, Yoshio S, Kawai H, Mori T, Aoki Y, Yoshida Y, Arai T, Itokawa N, Osawa Y, Taketomi A, Kanto T
Siglec-7 as an indicator of dysregulated NK cells and macrophage inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver disease
AASLD The LIVER MEETING 2019, 2019.11.8-12, Boston

要旨

【背景と目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)は慢性肝疾患の 15-30%を占め、肝関連合併症および死亡の原因疾患として世界的に増加傾向にある。非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)は NAFLD の進行した病態とされ、病態進行とともに肝線維化をきたし、NASH 関連肝硬変および肝癌へと進行する。NAFLD 患者においては、肝線維化の病理学的 Stage が長期の死亡率や肝関連イベントに最も影響を及ぼす因子とされる。肝線維化 Staging のゴールドスタンダードは肝生検であるが、侵襲性、サンプルの不確実性など、臨床的な欠点をいくつか有しており、非侵襲的な肝線維化マーカーが望まれる。近年、NAFLD の病態において重要な役割をもつマクロファージに関連するマーカーが NAFLD 患者の肝線維化の診断に有用であるとされてきた。

Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Siglec)は、自然免疫細胞に主に発現する膜表面タンパクである。Siglec はリガンドであるシアル酸と結合することで免疫機能を調整する。Siglec-7 は、小腸や肝臓における NK 細胞などに多く発現し、HBV/HCV 慢性肝炎患者においては、NK 細胞の機能的指標となり、加えて血清中に存在する soluble form (sSiglec-7)が肝障害や肝線維化と相関するとされる。しかしながら、血清 sSiglec-7 の産生機序について明らかに示した報告はなく、免疫細胞の膜表面に発現する Siglec-7 をウィルスが shedding することによると考察されているに留まる。

本研究は、NAFLD 患者において血清中の sSiglec-7 の意義と肝線維化診断に対する有用性を検証することを目的とした。さらに、sSiglec-7 産生の機序に関しては、種々の免疫細胞へ炎症性サイトカインを添加する実験系を用いて検討した。

【対象と方法】

本研究は、臨床診断上 NAFLD と診断された(肝生検によって病理組織学的線維化診断がなされた 59 症例を含む) NAFLD 患者 93 症例と、B 型慢性肝炎患者 33 症例、C 型慢性肝炎患者 39 症例、および健康成人 19 症例を対象とした。肝線維化 Stage 診断は Brunt 基準を用いた。また、切除肝組織検体を用いた免疫細胞の解析を目的とし、NAFLD 関連肝細胞癌患者に対して治療的肝切除が施行された 3 症例より非癌部肝組織検体を採取した。対象

に対して、血清中の sSiglec-7、soluble CD163 (sCD163)、YKL-40 を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits を用いて測定した。肝硬度エコーを施行した症例については、virtual touch tissue quantification (VTTQ)、transient elastography (TE)を測定した。非侵襲的線維化スコアである FIB-4 index、AAR、APRI、GPR、肝予備能スコアである ALBI については、既報論文の計算式よりそれぞれ算出した。これら諸因子の肝線維化進行に対する診断能を統計学的に検討した。肝浸潤リンパ球はコラゲナーゼ処理にて抽出し、免疫細胞の解析には Flowcytometry を用いた。ヒト単球由来マクロファージの樹立ならびに刺激培養を行い、培養上清中の sSiglec-7 を ELISA で測定した。

【結果】

NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は上昇し、ALT 正常の NAFLD 患者においても同様に上昇した。また、生活改善によって体重が減少し肝障害が改善された前後においては、血清 sSiglec-7 は低下した。NAFLD 患者において、血清 sSiglec-7 は PT 値および血小板値と逆相関するが AST/ALT 値とは相関せず、非侵襲的線維化マーカーやマクロファージ関連肝線維化関連マーカーと正相関した。また、線維化進行 (F stage 3, 4)、NAFLD activity score 高値、肝内炎症高度、肝細胞バスターン高度の症例において上昇し、高度線維化診断に対する特異度 (96.3) が高く、独立した寄与因子として抽出された。NAFLD 患者の線維化進行診断に対する決定木解析では、sSiglec-7、Age、YKL-40 の順で寄与因子となった。肝内マクロファージにおける Siglec-7 発現の検討では、CCR2⁺マクロファージには Siglec-7 が高発現する一方で、Tim-4⁺マクロファージでは部分的な発現に留まった。また、in vitro での炎症性サイトカイン添加培養実験においては、ヒト単球由来マクロファージのみが sSiglec-7 を産生し、NK 細胞や単球は産生しなかった。

【考察】

今回の検討において、血清 sSiglec-7 が NAFLD 患者において上昇し、肝線維化進行診断に対して独立した寄与因子となった。この知見は、NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 が、sCD163 や YKL-40 と同様にマクロファージ関連肝線維化バイオマーカーに成り得ることを示唆する。また、NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 は、肝内炎症や線維化などに関連する一方で、肝逸脱酵素とは相関を認めなかった。このことは、sSiglec-7 が肝逸脱酵素よりも鋭敏に、緩徐な肝内炎症を反映する可能性を示唆する。決定木解析では、sSiglec-7 が非常に高い特異度をもって肝線維化進行の診断

に対する第一寄与因子となった。このことより、血清 sSiglec-7 が臨床における肝線維化進行に対する有用なマーカーと成り得る。

肝内マクロファージの検討では、CCR2⁺マクロファージには Siglec-7 が高発現する一方で、Tim-4⁺のレジデントマクロファージには発現が低いことを示した。加えて NAFLD 患者では、腸管透過性の亢進や、小腸内での細菌異常増殖を含めた腸管内細菌叢変化などから、血中の LPS、TNF- α 、IL-1 β も上昇している。ヒト単球由来マクロファージからの sSiglec-7 産生が、LPS や TNF- α 、IL-1 β の刺激によって増加するという我々の知見は、NAFLD 患者における肝内マクロファージの上昇と、そこに発現する Siglec-7、さらには血清 sSiglec-7 との間にある潜在的な関連を示唆している。

NAFLD 患者において、血清中の sSiglec-7 は上昇し、そのほとんどが活性化したマクロファージから産生され、さらには肝線維化進行症例の診断における独立した寄与因子であることを示した。これらの知見から、FIB-4 index などの他の肝線維化マーカーとの併用も含め、NAFLD 患者における肝線維化進行の高リスク症例を同定する方法として、血清 sSiglec-7 の有用性を検証するさらなる研究が非常に有意義となる。

【結論】

NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は上昇し、肝線維化、肝内炎症、肝細胞バルーニングが進行した症例で高値を認めた。また、肝線維化進行症例に対する独立した寄与因子であり、高い特異度を有し肝線維化進行の診断における有用なバイオマーカーである。肝内の炎症性 CCR2⁺マクロファージへの炎症性サイトカインの作用が、NAFLD 患者血清中の sSiglec-7 上昇の機序と成り得る。

略語集

ALT, alanine aminotransferase
AST, aspartate aminotransferase
APRI, aspartate aminotransferase (AST) to platelet ratio index
CCR2, C-C chemokine receptor 2
DMEM, Dulbecco' s modified Eagle' s medium
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay
FBS; fetal bovine serum
FIB-4, fibrosis-4
F stage, fibrosis stage
GPR, gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio
GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HBV, hepatitis B virus
HCV, hepatitis C virus
HIV, human immunodeficiency virus
IL-1 β , interleukin-1 beta
LPS, lipopolysaccharide
MACS, magnetic-activated cell sorting
M-CSF, macrophage colony-stimulating factor
MDM, monocyte-derived macrophage
MRE, Magnetic resonance elastography
MRI, magnetic resonance imaging
M2BPGi, Mac-2 binding protein glycosylation isomer
NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease
NASH, non-alcoholic steatohepatitis
NFS, NAFLD fibrosis score
NK, natural killer
ROC, receiver operating characteristic
sCD163, soluble CD163
Siglec, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
sSiglec, soluble Siglec
TE, transient elastography
TGF- β , transforming growth factor-beta
Tim-4, T-cell immunoglobulin mucin receptor 4

TNF- α , tumor necrosis factor-alpha

VTTQ, virtual touch tissue quantification

緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)は慢性肝疾患の 15-30%を占め、肝関連合併症および死亡の原因疾患として世界的に増加傾向にある(Farrell et al., 2006; Wong et al., 2013)。その罹患患者頻度は、欧米諸国、アジア諸国、いずれにおいても人口の 10-30%と報告されており、日本における罹患患者数は 1000 万人以上と報告される(Eguchi et al., 2012)。NAFLD は、組織診断あるいは画像診断で脂肪肝を認め、ウィルス性、アルコール性、薬剤性肝障害、自己免疫性肝炎など他の肝疾患を除外した病態である。エタノール換算で、男性 30g/日、女性 20g/日以上 of 飲酒量でアルコール性肝障害を発症しうることから、NAFLD の飲酒量はそれ未満となる。22 カ国、延べ 8,515,431 人を対象とした大規模 study では、NAFLD 患者の 51.3%に肥満、22.5%に 2 型糖尿病、69.2%に脂質異常症、39.3%に高血圧症を合併したとされ(Younossi et al., 2016)、これらの疾患が NAFLD の発症に深く関連していることが報告されている(Pagano et al., 2002; Huang et al., 2013; Yki-Jarvinen, 2014)。このように、NAFLD はメタボリックシンドロームの肝病変として捉えられている。生活習慣病による過栄養や内臓脂肪の蓄積から過剰な遊離脂肪酸が産生され肝組織で中性脂肪として蓄積された結果、肝細胞への脂肪沈着が生じ脂肪肝が形成される。NAFLD は組織学的に大滴性の肝脂肪変性を基盤として発症する。近年は、食事因子や環境因子、インスリン抵抗性、炎症性サイトカインや脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン、また遺伝的素因などの様々な因子が複合的に肝臓へ作用することが NAFLD の病態形成に関与しているとされている(Tilg et al., 2010)。

非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)は、肝細胞における脂肪変性、炎症、そして線維化を特徴とした NAFLD の進行した病態とされる。NAFLD は NASH へと病態が進行することで、ウィルス性肝疾患と同様に進行性に肝線維化をきたし、NASH 関連肝硬変および肝癌へと進行することが報告されている(Bugianesi et al., 2002; Tilg et al., 2010; Watanabe et al., 2015)。NAFLD の 40.8%が NASH へ移行するとされ、年率 1,000 人中 0.44 人の確率で NASH 関連肝細胞癌を発症し、NASH を背景とした肝疾患関連死亡率および全死亡率は年率 1,000 人中 15.4 人および 25.4 人とされる(Younossi et al., 2016)。

NAFLD/NASH の病態形成においては様々な機序が関わりとされてきたが、本疾患の自然経過については未だ不明な点が多い。3 年あるいは 6.6 年の間隔をあけ、同一患者より肝生検を施行し肝線維化を比較した study では、30-40%の症例で軽度な線維化から進行した線維化へと自然経過における線維化悪化を認めたとしている (Wong et al., 2010; McPherson et al., 2015)。軽度な線維化や 2 型糖尿病の併存が、このような線維化の進行を予見するものかもしれない。

NAFLD 患者においては、肝線維化の病理学的 Stage が長期の死亡率や肝関連イベントに最も影響を及ぼす因子として報告されている (Angulo, et al., 2002)。肝線維化 Staging のゴールドスタンダードは依然として肝生検であるが、侵襲性、サンプルの不確実性、また定期的な follow up に対して繰り返し施行することが難しいといった臨床的な欠点をいくつか有しており、非侵襲的な肝線維化マーカーが望まれる (Cadranel et al., 2000; Fujii et al., 2009; Sumida et al., 2014 Abe et al., 2015)。NAFLD 患者における肝線維化評価法として様々な指標が研究されてきており、血清学的には、血小板値、Hyaluronic acid、Type IV collagen 7s、Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi)、線維化スコアリングでは、fibrosis-4 (FIB-4) index、NAFLD fibrosis score (NFS)、aspartate aminotransferase (AST) to platelet ratio index (APRI), gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio (GPR), そして画像診断としては、エコーや magnetic resonance imaging (MRI)を用いた virtual touch tissue quantification (VTTQ)、transient elastography (TE)、magnetic resonance elastography (MRE)がある。最近では、FIB-4 index や NFS に TE を加えるといった、従来の非侵襲的線維化マーカーに他の指標を加えることによって、より肝線維化の診断能を上昇させることが検討されている (Yoneda et al., 2018)。NAFLD 診断アルゴリズムとして、簡便でコスト面からも有用とされているのは FIB-4 index であり、低値例(1.3 未満、ただし高齢者では 2.0 未満)は経過観察、中間値から高値例は肝臓専門医へ紹介し、上記肝線維化マーカーや画像診断を行い、症例に応じて肝生検を考慮する。高度線維化が疑われれば、食道静脈瘤や肝細胞癌のサーベイランスを行う。また近年、マクロファージ関連マーカーである soluble CD163 (sCD163)、YKL-40、IL-34 も NAFLD 患者の肝線維化の診断に有用であると報告されている (Kumagai et al., 2016; Kazankov et al., 2016; Shoji et al., 2016)。マクロ

ファージは NAFLD の病態において非常に重要な役割をもっており (Kazankov et al., 2019)、NAFLD 患者の肝内 CD68⁺マクロファージの増加量は肝線維化の重症度と正相関する (Park et al., 2007; Kazankov et al., 2016)。また、門脈領域のマクロファージの増加が NAFLD の病態において最も初期に現れる変化であり、肝内炎症や線維化よりも先に生ずるとされる肝脂肪化の段階で起こることから、門脈領域に浸潤する炎症性の応答で NAFLD 患者の病勢を予測することが出来ると報告されている (Gadd et al., 2014)。

NAFLD/NASH の治療として肝脂肪化の改善が挙げられる。肝脂肪化の改善には体重の 3~5%程度の減少でも達成可能とされるが、肝線維化を改善させるには 10%以上の体重減少が必要となる。減量達成困難症例については薬物療法や減量手術を要するが、適応に関しては AASLD (米国肝臓病学会)のガイダンスにて肝生検で診断された肝線維化を伴う NASH とされている (Chalasani, 2018)。薬物療法では、糖尿病合併例に対してピオグリタゾン、糖尿病非合併例に対してビタミン E が挙げられる。しかしながら、これらの薬剤に肝疾患死亡率の改善や発癌抑制のエビデンスはなく、副作用に対する懸念も存在する。また、脂質異常症合併例に対して期待される ω 3 脂肪酸製剤やエゼチミブに関しても、現在のところ NASH に推奨できるエビデンスはない。他に、ケノデオキシコール酸誘導体であるオベチコール酸 (obeticholic acid: OCA)、ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) α/δ 活性化剤である

Elafibranor、Apoptosis signaling kinase 1 (ASK1)阻害剤である Selonsertib、C-C ケモカイン受容体 2 型および 5 型 (CCL2/CCL5)の拮抗剤である Cencriviroc (CVC)が第Ⅲ相試験、その他多くの薬剤が第Ⅱ相試験で進行中であり、今後これらの有用性が期待される。

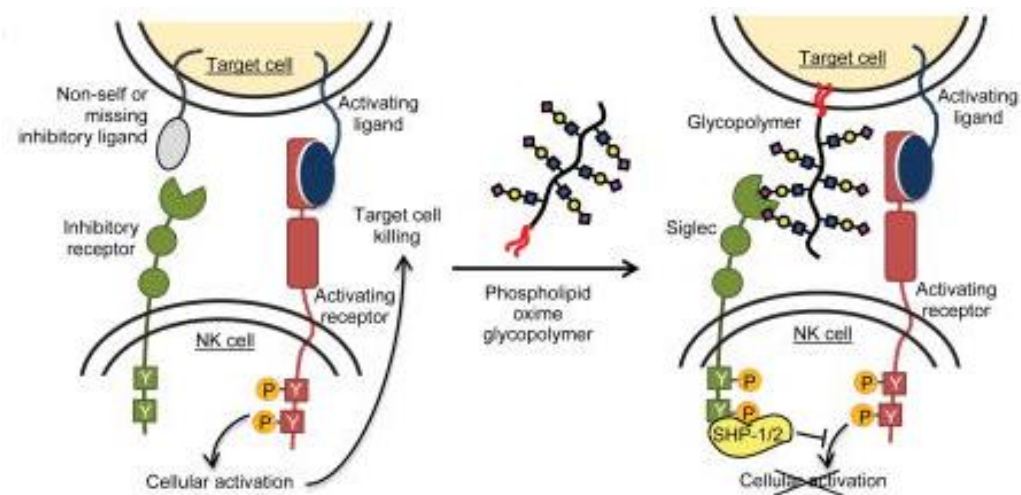
Siglec とは sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin の略であり、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチンの一群を示し、これらはマクロファージや natural killer (NK)細胞といった自然免疫細胞に主に発現する膜表面タンパクである (Crocker et al., 1998)。Siglec は受容体としての作用を有し、リガンドであるシアル酸と結合することで、Siglec を発現する免疫細胞へ抑制性あるいは活性化シグナルを伝達し免疫機能を調整する (Crocker et al., 1998; Ravetch et al., 2000; Varki et al., 2006; Crocker et al., 2007; Varki, 2007; von Gunten et al., 2008; Crocker et al., 2012; Hudak et al., 2014)。

(図 1) ヒトおよびマウスにおける Siglec 発現

	Siglecs common to mammals				CD33-related Siglecs									
Human														
Structure														
Common name	Sialoadhesin	CD22	MAG	Siglec-15	CD33	Siglec-5	Siglec-6	Siglec-7	Siglec-8	Siglec-9	Siglec-10	Siglec-11	Siglec-14	
Alternative name	Siglec-1, CD169	Siglec-2	Siglec-4	—	Siglec-3	CD170	CD327	CD328	—	CD329	—	—	—	
Expression	Mac	B	OligoD, Schw	ND	MyP, Mo	N, Mo, (B)	Troph (B)	NK (Mo)	Eo (Ba)	Mo, N, cDC (NK)	B (Mo, Eo)	Mac	ND	
Mouse														
Structure														
Common name	Sialoadhesin	CD22	MAG	Siglec-15	CD33	Siglec-E	Siglec-F	Siglec-G	Siglec-H					
Alternative name	Siglec-1, CD169	Siglec-2	Siglec-4	—	Siglec-3	—	—	—	—					
Expression	Mac	B	OligoD, Schw	ND	N	N, Mo, cDC	Eo	B	pDC (Mac)					

Crocker PR et al. Nat Rev Immunol. 2007.

(図 2) Siglec の構造と機能



Siglec-7 は 1990 年代頃より報告が散見され、小腸や肝臓における NK 細胞、単球、一部の T 細胞に多く発現する膜貫通型受容体タンパクとされる (Nicoll et al., 1999; Mitsuki et al., 2010; Miyazaki et al., 2012; Varchetta et al., 2012; Varchetta et al., 2016)。51kDa の抑制型受容体であり活性化を受けた免疫細胞に対して抑制的に作用する (Falco et al., 1999; Yamaji et al., 2002; Varki, 2011)。このメカニズムは、宿主の免疫応答を低下させるためにいくつかの疾患および腫瘍によって利用されている。例えば、悪性黒色腫は Siglec-7 の ligand を多く発現することで NK 細胞の機能低下をもたらすとされる (Jandus et al., 2014)。また、免疫細胞の機能的なマーカーとしての報告もあり、HBV/HCV 慢性肝炎患者や HIV 感染患者においては、末梢血の Siglec-7 陽性 NK 細胞は頻度が低下し (Varchetta et al., 2013; Varchetta et al., 2016)、Siglec-7 陽性の方が陰性に比べ NK 細胞の細胞傷害活性およびサイトカイン産生能が高いとされる (Varchetta et al., 2016)。加えて、血清中に存在する Siglec-7 の soluble form (sSiglec-7) についても様々な疾患で報告されており、HBV/HCV 肝炎患者における肝障害や肝線維化との相関 (Varchetta et al., 2016)、非代償期肝硬変・急性腎障害の死亡率の予測、などがある (Allegretti et al., 2016)。しかしながら、様々な疾患患者の血清中で上昇する sSiglec-7 の産生機序について明らかに示した報告はなく、免疫細胞の膜表面に発現する Siglec-7 をウィルスが shedding することによると考察されているに留まる (Varchetta et al., 2016)。よって、肝臓領域、特に非ウィルス性疾患である NAFLD 患者における Siglec-7 や sSiglec-7 の意義も含め、血清中の sSiglec-7 がいかに変化するか、またどのように産生されるかについても、未だ明らかではない。

本研究は、NAFLD 患者において血清中の sSiglec-7 の変化が存在するのか、だとすればそれは肝線維化を診断する有用なバイオマーカーになり得るのかを検証することを目的とした。さらには、他のマクロファージ活性化マーカーと比較して、血清 sSiglec-7 が NAFLD 患者における肝線維化進行症例や高リスク症例を診断し得る有用なマーカーであるかを確かめ、sSiglec-7 産生の機序に関しては、*vitro* にて種々の免疫細胞へ炎症性サイトカインを添加する実験系を用いて検討した。

方法

1. 対象

本研究は、国立研究開発法人国立国際医療研究センターおよび関連施設において、臨床診断上 NAFLD と診断された（肝生検によって病理組織学的線維化診断がなされた 59 症例を含む）NAFLD 患者 93 症例と、B 型慢性肝炎患者 33 症例、C 型慢性肝炎患者 39 症例、および健康成人 19 症例を対象とした。NAFLD の診断は、画像診断における肝の脂肪沈着、あるいは病理学的に肝細胞の 5%以上の脂肪滴を有する所見を認め、エタノール摂取量が男性では 30g/日未満、女性では 20g/日未満かつウイルス性肝疾患、薬剤性肝障害、自己免疫性肝疾患などの他の肝疾患を否定された症例とした。また、服薬や生活指導といった治療介入の有無を確認するために、生活改善および減量目的とした摂取カロリー制限の有無、併存する高血圧症、2 型糖尿病、脂質異常症に対する内服治療の有無を、全対象症例について診療記録より調査した。肝線維化 Stage 診断は Brunt 基準を用い (Brunt et al., 1999)、病理組織診断は各施設の専門病理診断医によってなされた。参加施設は、国立国際医療研究センター国府台病院、日本医科大学千葉北総病院、名古屋大学病院、京都府立医科大学附属病院である。

また、切除肝組織検体を用いた免疫細胞の解析を目的とし、がん研有明病院にて NAFLD 関連肝細胞癌患者に対して治療的肝切除が施行された 3 症例より非癌部肝組織検体を採取した。

なお、本研究は、国立国際医療研究センターを主体とした他施設共同研究であり、同倫理委員会により承認された課題名「非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者における肝発癌・線維化の機序の解明」(臨床研究番号：2355)に基づき行われた。また、各施設の倫理委員会の承認を得て行われ、研究参加に際しては書面による同意が得られた症例を対象とした。

2. 血清液性因子測定、線維化・肝予備能スコアの測定および算出法

各施設にて、施行した採血を回収し遠心分離にて血清を分離後凍結保存とし、国立国際医療研究センターに輸送した後、後方視的解析を行った。同センターにて、血清中の sSiglec-7、sCD163、YKL-40 を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Quidel, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

肝硬度エコーを施行した症例については、virtual touch tissue quantification (VTTQ)、transient elastography (TE) を測定した。

非侵襲的線維化スコアである FIB-4 index、AAR、APRI、GPR、肝予備能スコアである ALBI については、既報論文の計算式よりそれぞれ算出した (Wai et al., 2003; Sterling et al., 2006; McPherson et al., 2010; Johnson et al., 2015; Lemoine et al., 2016)。下記に、FIB-4 index、AAR、APRI、GPR、ALBI の計算式を記載する。

〈各スコアの計算式〉

・ FIB-4 index = (年齢 [歳] × AST 値 [IU/L]) / (血小板数 [10^9 /L] × ALT 値 [IU/L]^{1/2})

・ AAR = AST 値 (IU/L) / ALT 値 (IU/L)

・ APRI = (AST 値 [IU/L] / 正常上限の AST 値 [IU/L] × 100) / 血小板数 (10^9 /L)

・ GPR = (γ GTP 値 [IU/L] / 正常上限の γ GTP 値 [IU/L] × 100) / 血小板数 (10^9 /L)

・ ALBI = ($\log_{10}$ 総ビリルビン値 [mg/dL] × 17.1 × 0.66) + (血清アルブミン値 [g/dL] × 10 × -0.085)

※本検討では、正常上限の AST 値を 40 IU/L、 γ GTP 値を 48 IU/L とした。

3. 肝浸潤リンパ球の抽出方法

がん研有明病院において、NAFLD 関連肝細胞癌患者 3 症例に対して施行された治療的肝切除の際に採取した非癌部肝組織を用いた。標本採取後すぐに冷蔵保存し国立国際医療研究センターへ輸送後、以下の手順で肝浸潤リンパ球を抽出した。肝浸潤リンパ球の抽出方法は、既報論文を参考に施行した (Morsy et al., 2005)。

〈肝組織から浸潤リンパ球抽出までの手順〉

- i. 摘出した肝組織を 10cm dish 上で、肝切片 1mm 四方より小さく刻む。
- ii. DNase I (50 μ g/L) と collagenase IV (500mg/L) を添加した溶液に浸し、CO₂ インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 下、40rpm で、30-60 分間酵素反応させる。
- iii. 適宜肝組織を濾しながら、40 μ L セルストレイナーを通す。
- iv. 得られた抽出液を回収し、リンパ球分離液 Ficoll-Paque (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて肝浸潤リンパ球を抽出する。

4. Flowcytometry を用いた解析方法

肝組織検体より抽出した肝浸潤リンパ球、および末梢血単核球細胞 (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) を、Live/Dead Aqua Cell Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて死細胞染色を行い、その後蛍光標識された以下の抗体を用いて染色した。データは LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 上で FACSDiva software を用いて抽出し、FlowJo で解析を行った。

表 5. Flowcytometry 抗体一覧

Target	Fluorescence	Clone	Staining	Company
CD45	FITC	2D1	Surface	BioLegend
CD3	PerCP	SK7	Surface	BioLegend
CD14	PerCP	HCD14	Surface	BioLegend
CD56	BV421	NCAM16.2	Surface	BD
Siglec-7	APC	6-434	Surface	BioLegend
CCR2	BV421	K036C2	Surface	BioLegend
CD68	PE	Y1/82A	Intracellular	eBioscience
Tim-4	PE/Cy7	9F4	Intracellular	BioLegend

Siglec-7, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7; CCR2, C-C chemokine receptor 2; Tim-4, T-cell immunoglobulin mucin receptor 4.

5. ヒト単球由来マクロファージの樹立ならびに刺激培養
- 健康成人から末梢血を採取し、リンパ球分離溶液 Ficoll-Paque (Nacalai Tesque) を用いて末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離した。MACS CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を用いて PBMC から CD14⁺単球を分離後、10%非働化ウシ胎児血清 (FBS; fetal bovine serum, GE Healthcare, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) に、20ng/mL の granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、あるいは 50ng/mL の macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; R&D Systems) を添加し、CO₂ インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 下で 7 日間培養した。前者を GM-CSF ヒト単球由来マクロファージ (MDMs, monocyte-derived macrophages)、後者を M-CSF MDMs とした。それぞれの MDMs を 10⁶ 個/mL/well で 24 well プレートに撒き、100ng/mL の lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、20ng/mL の TGF- β (R&D systems)、10ng/mL の tumor necrosis factor- α (TNF- α ; R&D Systems)、100ng/mL の IL-1 β (Peprotech) をそれぞれ添加有り無しで 2 日間刺激培養し、培養上清中の sSiglec-7 を ELISA で測定した。

6. 統計解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U-test と paired Student' s t-test、他群間の比較には Kruskal-Wallis test followed by Dunn' s multiple comparison test を使用した。相関の検討では、Spearman 順位相関係数を用いた。F stage 3 以上の Advanced Fibrosis に対する各因子の診断能の検討では、Receiver operating characteristic (ROC) curve 解析を用いた。単変量、多変量解析にはロジスティック回帰分析と決定木解析を行った。統計解析ソフトは、Prism software version 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA)、JMP Pro version 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、P 値は 0.05 未満を有意とした。

結果

本研究における対象症例の臨床データを表 1～4 に示す。

表 1. NAFLD 93 症例の臨床データ

	NAFLD (n=93)		
Age (years)	64.0	±	12.6
Gender (male/female)	42	/	51
AST (IU/L)	43.0	±	26.0
ALT (IU/L)	47.0	±	34.8
T-bil (mg/dL)	0.8	±	0.5
Alb (g/dL)	4.3	±	0.5
Plt (x10 ⁴ /μL)	17.8	±	6.6
PT (%)	97.2	±	17.1
Hb (g/dL)	13.8	±	1.5
TP (g/dL)	7.3	±	0.6
γGTP (IU/L)	49.0	±	80.9
ALP (IU/L)	244.0	±	85.3
HbA1c (%)	6.1	±	0.9
FIB-4	2.3	±	2.1
AAR	0.9	±	0.4
APRI	0.6	±	0.5
GPR	0.6	±	1.1
ALBI	-2.7	±	0.5

NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-bil, total bilirubin; Alb, serum albumin; Plt, platelet counts; PT, prothrombin time; Hb, hemoglobin; TP, total protein; γGTP, gamma-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; HbA1c, hemoglobin A1c; FIB-4, fibrosis-4 index; AAR, AST to ALT ratio; APRI, AST to platelet ratio index; GPR, γGTP to platelet ratio; ALBI, albumin bilirubin grade.

表 2. 肝生検を施行した NAFLD 59 症例の臨床データ

	NAFLD performed liver biopsy (n=59)					p-value
	F0	F1	F2	F3	F4	
	(n=4)	(n=10)	(n=13)	(n=24)	(n=8)	
Age (years)	53.0 ± 5.8	57.0 ± 3.7	57.0 ± 3.2	64.0 ± 2.4	64.0 ± 4.1	NS
AST (IU/L)	45.5 ± 15.0	49.6 ± 9.5	48.7 ± 8.3	55.8 ± 6.1	59.8 ± 10.6	NS
ALT (IU/L)	62.8 ± 15.5	54.0 ± 9.8	52.4 ± 8.6	64.0 ± 6.3	57.9 ± 11.0	NS
T-bil (mg/dL)	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	NS
Alb (g/dL)	4.5 ± 0.2	3.9 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.2	NS
Plt (x10 ⁴ /μL)	23.7 ± 2.9	21.0 ± 1.8	20.0 ± 1.6	16.7 ± 1.2	11.2 ± 2.0	p=0.0029
Hb (g/dL)	15.1 ± 0.8	14.4 ± 0.5	13.7 ± 0.4	14.6 ± 0.3	13.4 ± 0.6	NS
γGTP (IU/L)	81.8 ± 32.2	56.0 ± 20.3	79.0 ± 17.9	70.0 ± 13.1	103.5 ± 22.8	NS
FIB-4	1.9 ± 0.9	2.2 ± 0.6	2.3 ± 0.5	3.2 ± 0.4	4.4 ± 0.6	p=0.045
AAR	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	NS
APRI	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	p=0.013
GPR	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3	p=0.026
ALBI	-2.7 ± 0.2	-2.4 ± 0.1	-2.7 ± 0.1	-2.7 ± 0.1	-2.5 ± 0.2	NS

P values were determined by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test. F, fibrosis stage; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-bil, total bilirubin; Alb, serum albumin; Plt, platelet counts; Hb, hemoglobin; γGTP, gamma-glutamyl transpeptidase; FIB-4, fibrosis-4 index; AAR, AST to ALT ratio; APRI, AST to platelet ratio index; GPR, γGTP to platelet ratio; ALBI, albumin bilirubin grade.

表 3. B 型慢性肝炎 33 症例、C 型慢性肝 39 症例の臨床データ

	HBV infection			HCV infection		
	(n=33)			(n=39)		
Age (years)	61.5	±	14.9	71.0	±	11.6
Gender (male/female)	18	/	15	15	/	24
AST (IU/L)	28.5	±	38.3	36.5	±	39.1
ALT (IU/L)	23.5	±	52.8	30.5	±	41.0
T-bil (mg/dL)	0.9	±	0.3	0.7	±	0.8
Alb (g/dL)	4.3	±	0.4	4.1	±	0.5
Plt (x10 ⁴ /μL)	17.1	±	5.7	13.5	±	7.1
PT (%)	92.4	±	14.5	93.1	±	20.2
Hb (g/dL)	13.7	±	1.7	12.6	±	1.6
TP (g/dL)	7.3	±	0.6	7.5	±	0.5
γGTP (IU/L)	19.5	±	46.1	21.5	±	32.1
ALP (IU/L)	215.0	±	107.1	272.5	±	241.2
HbA1c (%)	6.0	±	1.2	5.7	±	1.0
FIB-4	2.0	±	1.5	3.8	±	4.4
AAR	1.1	±	0.4	1.3	±	0.6
APRI	0.5	±	0.8	0.7	±	1.1
GPR	0.3	±	0.7	0.5	±	0.8
ALBI	-2.7	±	0.4	-2.5	±	0.6

HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-bil, total bilirubin; Alb, serum albumin; Plt, platelet counts; PT, prothrombin time; Hb, hemoglobin; TP, total protein; γGTP, gamma-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; HbA1c, hemoglobin A1c; FIB-4, fibrosis-4 index; AAR, AST to ALT ratio; APRI, AST to platelet ratio index; GPR, γGTP to platelet ratio; ALBI, albumin bilirubin grade

表 4. NAFLD 93 症例における生活改善と投薬治療の有無

Treatments	NAFLD (n=93)		
	no	/	yes
Lifestyle intervention	15	/	78
Antihypertensive agents	52	/	41
Antidiabetic agents	58	/	35
Antihyperlipidemic agents	64	/	29
Plural agents	61	/	32

Lifestyle intervention denotes the habitual physical exercise or restriction of food/energy intake for aiming at losing weight, which was confirmed by medical records. Antihypertensive agents include calcium channel blocker, angiotensin II receptor blocker, and angiotensin converting enzyme inhibitor. Antidiabetic agents include dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, α -glucosidase inhibitor, biguanide, sulfonylurea, thiazolidine derivatives, and sodium glucose cotransporter 2 inhibitor. Antihyperlipidemic agent is an HMG-CoA reductase inhibitor. Plural agents mean the patients received plural agents including antihypertensive, antidiabetic, and antihyperlipidemic agents.

1. NAFLD 患者、HBV/HCV 慢性肝炎患者において、血清 sSiglec-7 は上昇する

NAFLD 93 症例、HBV 慢性肝炎患者 33 症例、HCV 慢性肝炎患者 39 症例と健康成人 19 症例の血清 sSiglec-7 を測定した。

血清中の sSiglec-7 は、HBV/HCV 慢性患者と同様に NAFLD 患者においても、健康成人と比較して有意に高値を示した(図 1)。

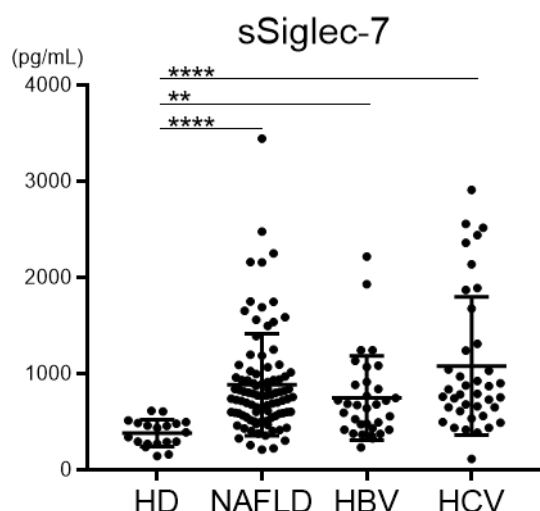


図 1 NAFLD、HBV/HCV 慢性肝炎患者における血清 sSiglec-7

HD, healthy donor; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus. Mean $\pm$ SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ by the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

2. ALT 正常の NAFLD 患者においても、血清 sSiglec-7 は上昇する

ALT 値 30IU/L 以下を正常 ALT として、正常 ALT の NAFLD 患者(N-ALT)と ALT の上昇を認める NAFLD 患者(E-ALT)に分け、血清 sSiglec-7 を測定した。

ALT 値 30IU/L 以下の ALT 正常の NAFLD 患者においても、血清 sSiglec-7 は健康成人と比較して有意に高値を示した(図 2-1)。

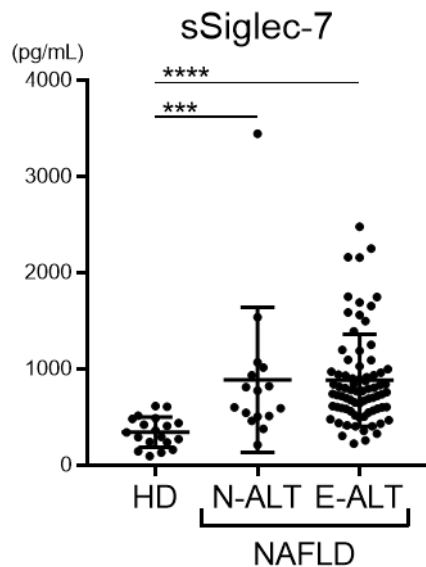


図 2-1 ALT 正常/上昇 NAFLD 患者における血清 sSiglec-7

HD, healthy donor; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; N-ALT, normal ALT NAFLD patients; E-ALT, elevated ALT NAFLD patients. Mean $\pm$ SD. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ by the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

性別によって ALT の正常値が異なるとも報告されていることから (Bugianesi et al., 2016)、男性 (ALT 30IU/L 以下)、女性 (ALT 19IU/L 以下) で性別ごとに分けて検討した。性別ごとに ALT の正常値を設定し検討しても、血清 sSiglec-7 は健康成人と比較して有意に高値を示した (図 2-2)。

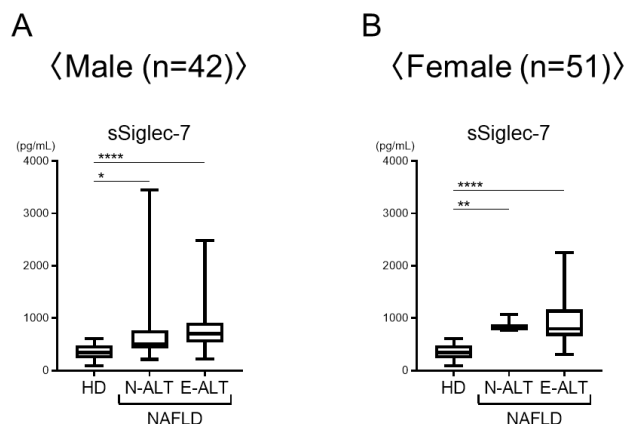


図 2-2 性別ごとに分けた ALT 正常/上昇 NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 (A: 男性, B: 女性)

HD, healthy donor; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; N-ALT, normal ALT NAFLD patients;

E-ALT, elevated ALT NAFLD patients. Mean $\pm$ SD. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test.

3. NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 は、生活改善や併存疾患に対する投薬の有無では変化しない
- 生活改善や併存疾患に対する投薬(降圧薬、抗糖尿病薬、抗高脂血症薬)の有無で、NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 を比較した。
- 降圧薬内服治療群において内服していない群と比較し血清 sSiglec-7 が有意に高い結果であったが、その他は明らかな有意差は認めなかった(図 3)。

Differences of serum sSiglec-7 levels by lifestyle intervention or medications

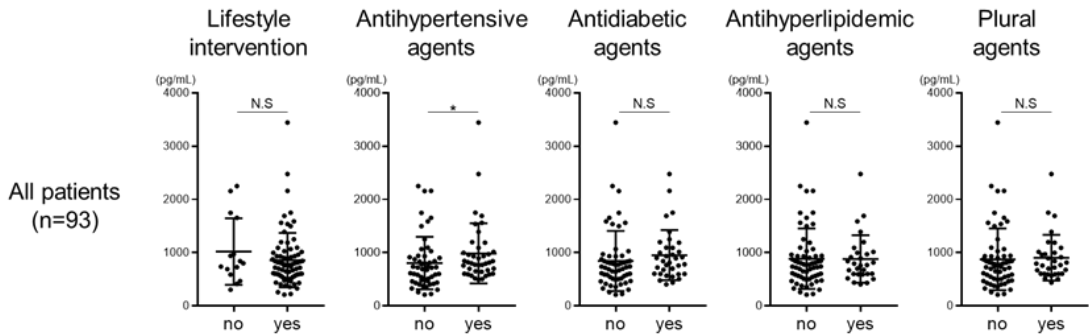


図 3 生活改善や併存疾患に対する投薬の有無での、NAFLD 患者における血清 sSiglec-7

Mean $\pm$ SD. * $p<0.05$ by the Mann–Whitney U-test. N.S., not significant.

4. 生活改善によって体重が減少し肝障害が改善された前後においては、血清 sSiglec-7 は低下する
- 生活改善によって 7%以上体重が減少し、肝障害の改善を認めた NAFLD 患者 2 症例において、生活改善前と改善後での血清 sSiglec-7 を比較検討した。
- 7%以上の体重減少および肝障害の改善に伴って、生活改善前後での血清 sSiglec-7 は 2 例ともに低下を認めた(表 6)。

表 6. 生活改善により体重減少と肝障害の改善を認めた NAFLD 患者 2 症例

	Case 1		Case 2	
	before	after	before	after
Age (years)	64	68	82	85
Gender	Female		Male	

BW (kg)	69	61	78	67
BMI (kg/m ²)	27.6	24.6	27.0	23.2
AST (IU/L)	71	17	43	24
ALT (IU/L)	91	11	54	25
VTTQ	2.46	1.22	1.36	0.84
TE (kPa)	6.8	4.5	6.5	4.1
Soluble Siglec-7 (pg/mL)	795.02	564.30	844.84	710.56
Lifestyle intervention	no	yes	no	yes
Antihypertensive agents	no	no	yes	yes
Antidiabetic agents	no	no	no	no
Antihyperlipidemic agents	no	no	yes	yes

BW, body weight; BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; VTTQ, virtual touch tissue quantification; TE, transient elastography. Lifestyle intervention denotes the habitual physical exercise or restriction of food/energy intake for aiming at losing weight, which was confirmed by medical records. Antihypertensive agents include calcium channel blocker, angiotensin II receptor blocker, and angiotensin converting enzyme inhibitor. Antidiabetic agents include dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, α -glucosidase inhibitor, biguanide, sulfonylurea, thiazolidine derivatives, and sodium glucose cotransporter 2 inhibitor. Antihyperlipidemic agent is an HMG-CoA reductase inhibitor. Plural agents mean the patients received plural agents including antihypertensive, antidiabetic, and antihyperlipidemic agents.

5. NAFLD 患者において、血清 sSiglec-7 は PT 値および血小板値と逆相関するが、AST/ALT 値とは相関しない
NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 と臨床データとの関連性を検討した。
NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は、肝障害が進むに従って低下する PT 値や血小板値と逆相関を示した。一方、肝細胞傷害を反映する AST/ALT 値とは明らかな相関は認めなかった (図 4)。

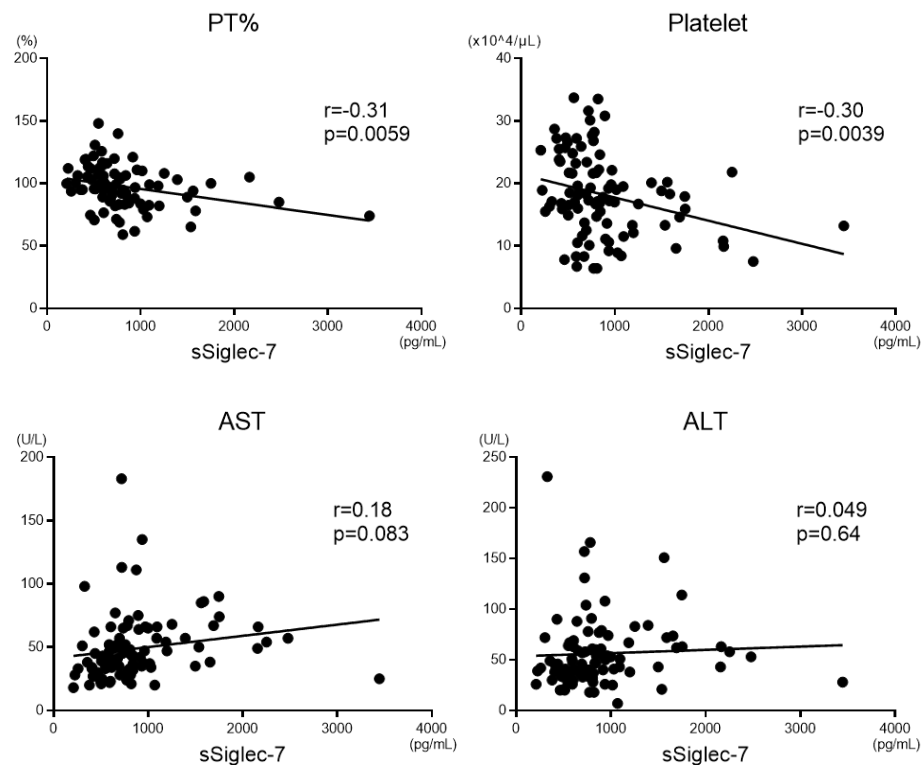


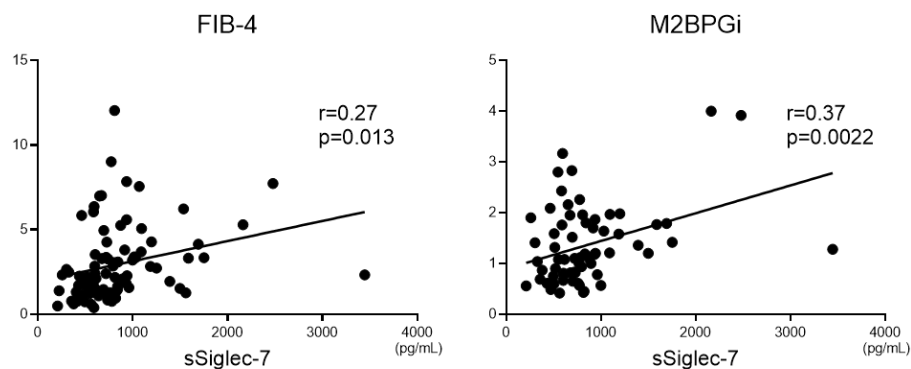
図 4 NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 と臨床データとの相関

Correlations as assessed by Spearman's rank correlation coefficient.

6. NAFLD 患者において、血清 sSiglec-7 は非侵襲的線維化マーカーと正相関する

NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 と非侵襲的肝線維化スコア (FIB-4, M2BPGi, APRI, GPR)、およびエコーを用いた肝硬度測定値 (TE, VTTQ) との関連性を検討した。

NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は、FIB-4、M2BPGi、APRI、GPR、TE、VTTQ といった非侵襲的肝線維化マーカーと正相関した (図 5)。



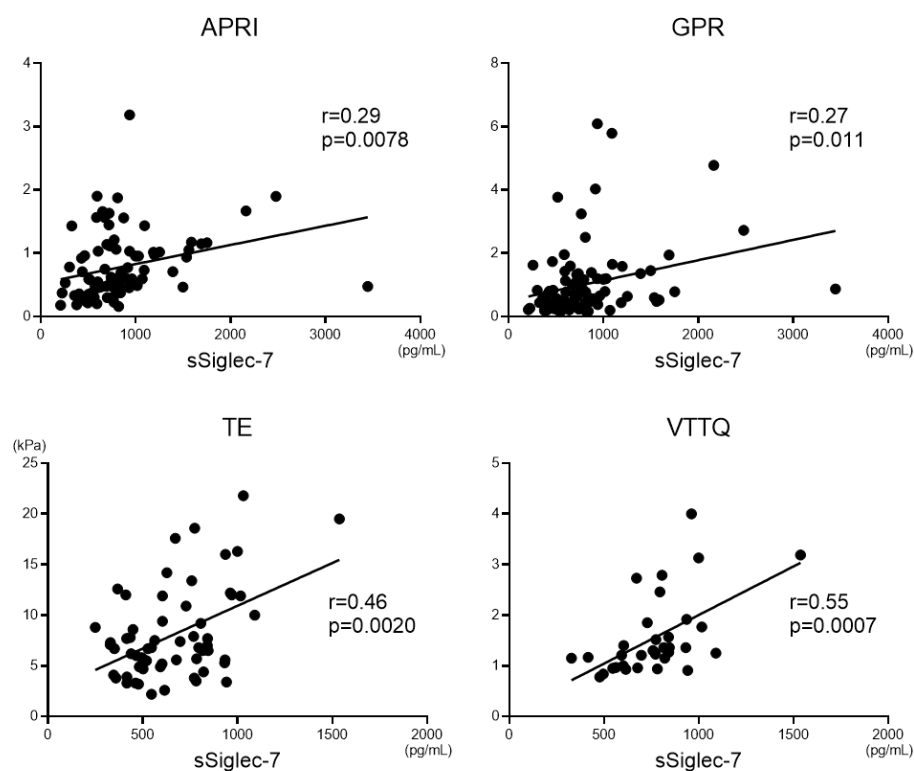


図 5 NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 と非侵襲的肝線維化マーカーとの相関

FIB-4 (fibrosis-4 index, $n=93$), M2BPGi (Mac-2 binding protein glycosylation isomer, $n=69$), APRI (aspartate aminotransferase to platelet ratio index, $n=93$), GPR (gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio, $n=93$), TE (transient elastography, $n=61$), and VTTQ (virtual touch tissue quantification, $n=34$).

7. NAFLD 患者において、血清 sSiglec-7 はマクロファージ関連肝線維化関連マーカーと正相関する

NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 とマクロファージ関連肝線維化関連マーカー (sCD163, YKL-40) との関連性を検討した。

NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は、sCD163、YKL-40 と強い正相関を認めた (図 6)。

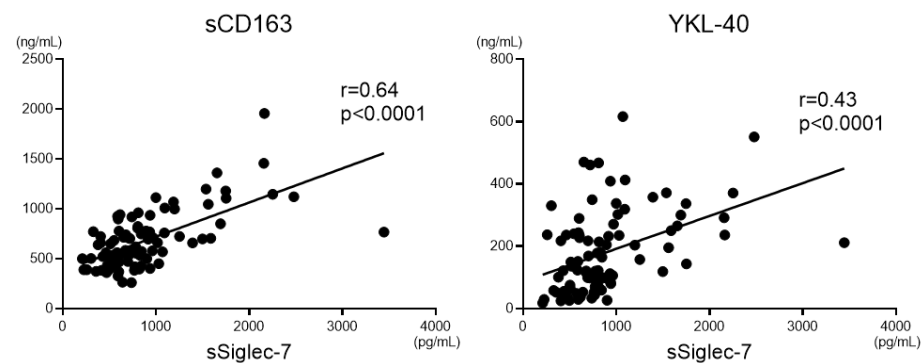
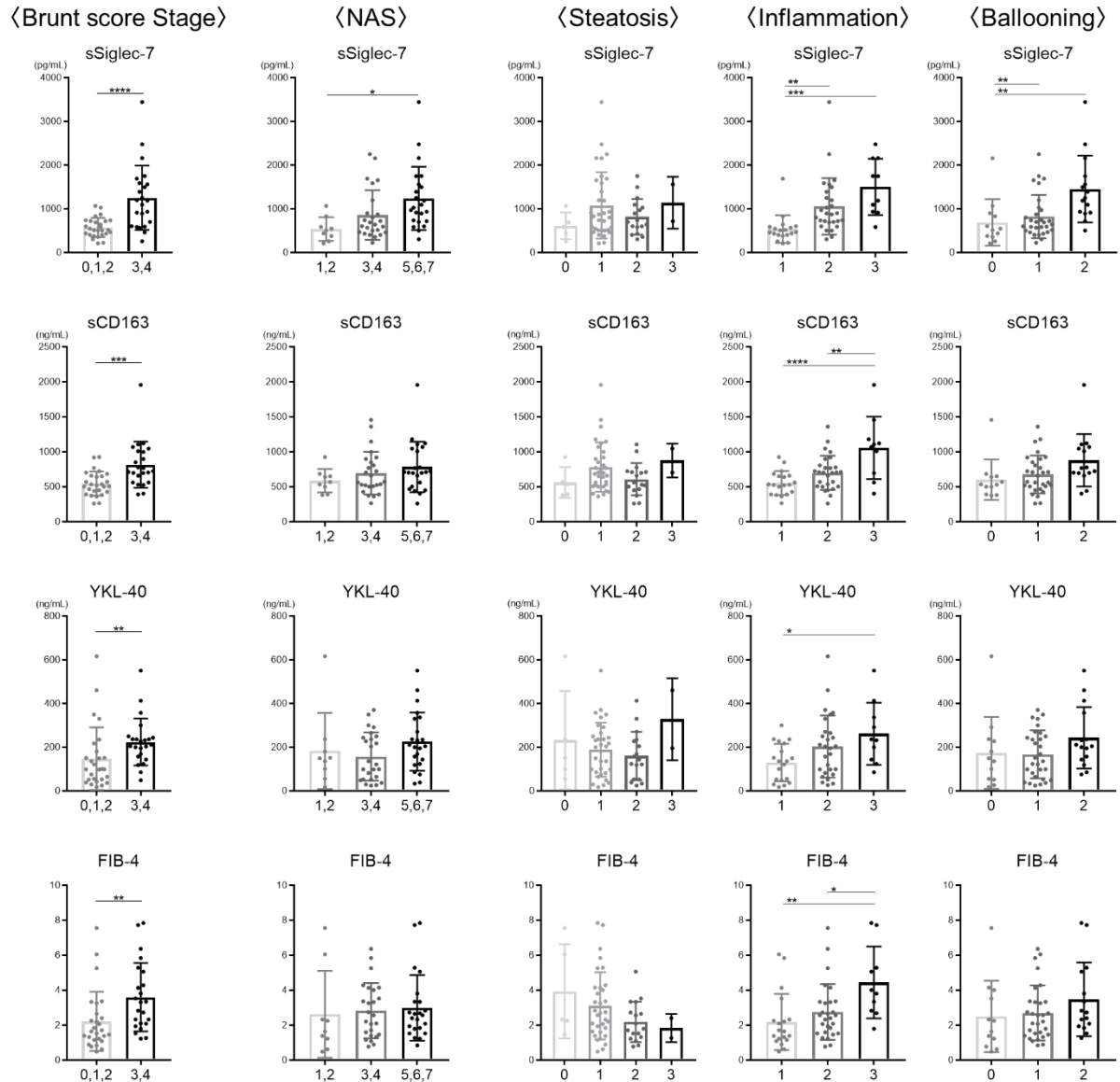


図 6 NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 とマクロファージ関連肝線維化関連マーカーとの相関

8. 線維化進行 (Advanced fibrosis: F stage 3, 4)、NAS 高値、肝内炎症高度、肝細胞バルーニング高度の NAFLD 症例において、血清 sSiglec-7 は上昇する

NAFLD 患者における血清 sSiglec-7、sCD163、YKL-40、FIB-4 を、肝線維化、NAS (NAFLD activity score)、肝脂肪変性 (steatosis)、肝内炎症 (inflammation)、肝細胞バルーニング (ballooning) の違いによる変化を検討した。

NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 は、F stage 3 および 4 の Advanced fibrosis 症例、NAS 5 以上の症例、肝内炎症が高度の症例、肝細胞バルーニングが高度の症例において、線維化がないあるいは軽度な症例、NAS 4 以下の症例、肝内炎症がない症例、肝細胞バルーニングを認めない症例と比較して、有意に上昇した。他の肝線維化関連マーカーである FIB-4、sCD163、YKL-40 についても、線維化進行症例や肝内炎症高度の症例では上昇を認めたが、sSiglec-7 と比較するとその変化は小さかった (図 7)。



Fibrosis stage (Brunt's criteria), NAFLD activity score (NAS), and steatosis, inflammation, and ballooning. Mean $\pm$ SD. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ by the Mann–Whitney U-test or the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

図7 肝線維化、NAS、肝脂肪変性(steatosis)、肝内炎症(inflammation)、肝細胞バルーンング(ballooning)による血清 sSiglec-7、sCD163、YKL-40、FIB-4 の違い

9. NAFLD 患者において、血清 sSiglec-7 は F stage 3, 4 の高度線維化診断における特異度が高く、独立した寄与因子である
NAFLD 患者の F stage 3, 4 の高度線維化診断における寄与因子を、単変量および多変量解析にて探索した。

F stage 3, 4 の高度線維化寄与因子を探索した。単変量解析の結果、臨床因子としては Age、および血小板値が線維化寄与因子として抽出された。また、sSiglec-7 の他に、sCD163、YKL-40、FIB-4 が線維化寄与因子として抽出された。多変量解析の結果では、sSiglec-7 のみが独立した線維化寄与因子として抽出された (表 7)。

表 7. F stage 3, 4 の高度線維化診断における単変量・多変量解析

	Advanced Fibrosis (F Stage 3, 4)					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	p value	OR	95% CI	p value
Sex (Female: 0, Male: 1)	0.834	0.297-2.350	0.736			
Age (years)	1.062	1.012-1.124	0.023			
AST (IU/L)	1.011	0.992-1.033	0.290			
ALT (IU/L)	1.009	0.992-1.029	0.320			
T-bil (mg/dL)	1.074	0.393-3.059	0.881			
Alb (g/dL)	1.429	0.437-5.267	0.556			
Plt ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0.857	0.767-0.942	0.003			
Hb (g/dL)	1.036	0.746-1.447	0.829			
γ GTP (IU/L)	1.002	0.994-1.011	0.650			
sSiglec-7 (pg/mL)	1.004	1.002-1.007	0.0007	0.996	0.994-0.999	0.002
sCD163 (ng/mL)	1.005	1.002-1.009	0.001	0.998	0.994-1.002	0.392
YKL-40 (ng/mL)	1.007	1.002-1.013	0.010	1.000	0.994-1.007	0.945
FIB-4	1.545	1.078-2.216	0.018	0.858	0.574-1.282	0.448

OR, odds ratio; CI, confidence interval; sSiglec-7, soluble Siglec-7; sCD163, soluble CD163; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-bil, total bilirubin; Alb, serum albumin; Plt, platelet counts; Hb, hemoglobin; TP, total protein; γ GTP, gamma-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; HbA1c, hemoglobin A1c; FIB-4, fibrosis-4 index.

NAFLD 患者の F stage 3, 4 の高度線維化診断に関し単変量解析で抽出された因子における ROC 曲線を作成し、感度・特異度を比較した。

ROC 解析の結果から、NAFLD 患者の F stage 3, 4 高度線維化診断に対し、sSiglec-7、sCD163、YKL-40、FIB-4 の AUC は、0.85、0.79、0.78、0.76 であり、sSiglec-7 が最も優れていることが明らかとなった。特に sSiglec-7 は線維化進行症例に対する特異度が著明に高い結果が得られた (Specificity: 96.3)。これらの結果より、血清 sSiglec-7 は、NAFLD 患者における肝線維化進行症例に対する良好な肝線維化バイオマーカーと成り得ることが示唆された (表 8、図 8)。

表 8. ROC 解析による F stage 3, 4 の高度線維化診断能の評価

	sSiglec-7	sCD163	YKL-40	FIB-4
AUC	0.85	0.79	0.78	0.76
Cutoff value	894	696	157.5	2.33
Sensitivity (%)	71.9	68.8	78.1	75.0
Specificity (%)	96.3	81.5	77.8	74.1
PPV (%)	95.8	81.5	80.6	77.4
NPV (%)	74.3	68.8	75.0	71.4
Predictive accuracy (%)	83.1	74.6	78.0	74.6

Optimal cut-off values were defined as those yielding the lowest value for $(1 - \text{sensitivity})^2 + (1 - \text{specificity})^2$, which correspond to values with sensitivity and specificity closest to the (0, 1) point on the receiver operating characteristic curve. AUC, area under the curve; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; sSiglec-7, soluble Siglec-7; sCD163, soluble CD163; FIB-4, fibrosis-4 index.

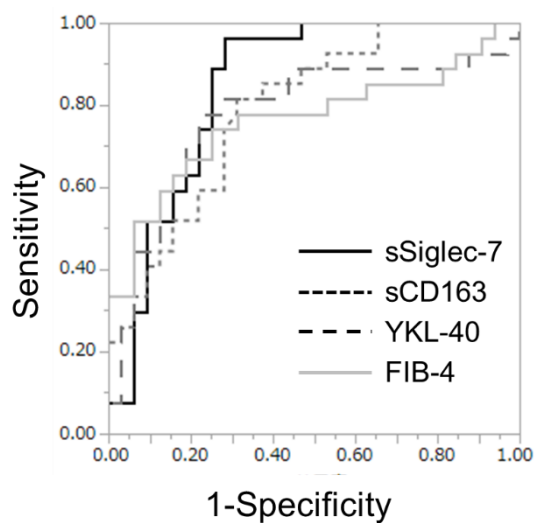


図 8 NAFLD 患者における液性因子と非侵襲的肝線維化スコア値の高度線維化診断能の比較

NAFLD 患者の F stage 3, 4 の高度線維化診断に影響を及ぼす因子の順位を明らかにするために、単変量解析で抽出された因子を用いて決定木解析を施行した。

NAFLD 患者の F stage 3, 4 高度線維化診断における単変量解析で抽出された、Age、血小板値、sSiglec-7、sCD163、YKL-40、FIB-4 の 6 因子で決定木解析を行ったところ、最も上位に挙げた因子が sSiglec-7 であった。カットオフ値を 894pg/mL とし、sSiglec-7 がカットオフ値以上の患者の 95.4%が F stage 3, 4 の Advanced fibrosis であった。続いて Age がカットオフ値 58 歳で挙がり、sSiglec-7 が 894pg/mL 未満のうち年齢が 58 歳未満の患者は全て F stage 0-2 の線維化進行を認めない症例となった。3 番目にはカットオフ 228ng/mL で YKL-40 が続いた(図 9)。

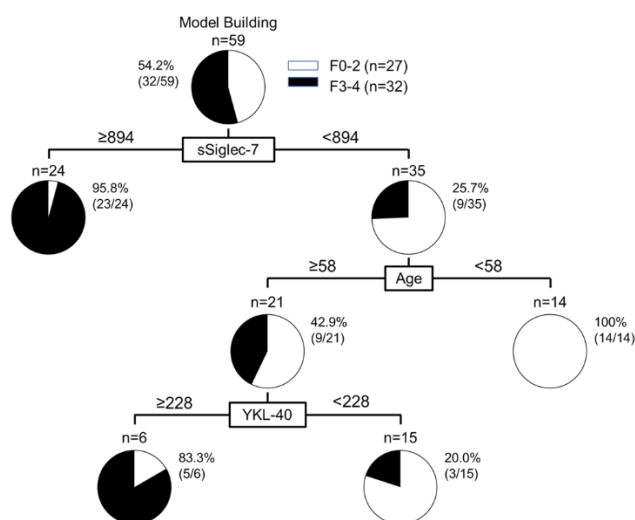


図 9 NAFLD 患者の F stage 3, 4 の高度線維化診断における決定木解析

10. NAFLD 患者において、肝内マクロファージに Siglec-7 が発現する NAFLD 関連肝細胞癌患者 3 症例から得られた非癌部肝浸潤リンパ球を用いて、肝内マクロファージに発現する Siglec-7 を Flowcytometry で解析した。
- 肝内マクロファージにおいても phenotype が異なっており、CCR2⁺マクロファージは活性化した炎症性マクロファージとされ、一方で Tim-4⁺マクロファージは常在マクロファージであり非炎症性といった特徴をもつ (Thornley et al., 2014)。これらの結果から、NAFLD 患者の肝内マクロファージにおいては、特に活性化した炎症性マクロファージに Siglec-7 が高発現しており、これらの細胞から sSiglec-7 が供給される傍証が示唆された (図 10)。

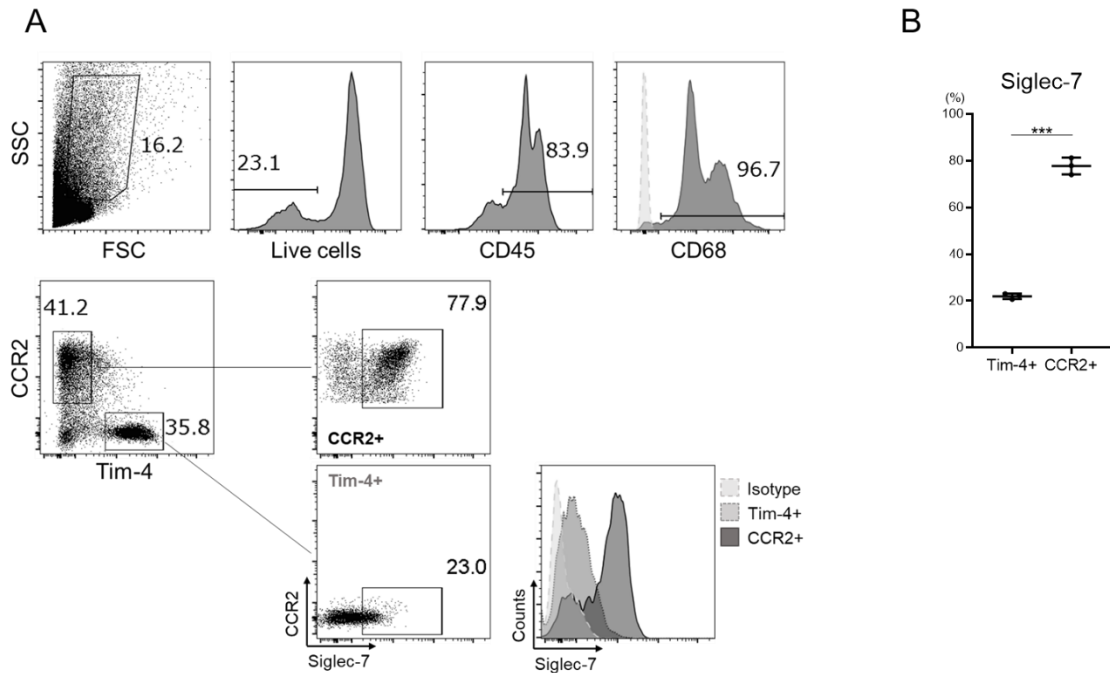


図 10 NAFLD 患者の肝内マクロファージにおける Siglec-7 の発現

Mean $\pm$ SD. *** $p < 0.001$ by paired t-test.

A: 代表的な gating strategy を示した。Live cells、CD45⁺、CD68⁺を全マクロファージ細胞と定義し、CCR2⁺マクロファージと Tim-4⁺マクロファージに gating した。

B: CCR2⁺マクロファージには Siglec-7 が高発現する一方で、Tim-4⁺マクロファージでは部分的な発現に留まった。

11. ヒト単球由来マクロファージは sSiglec-7 を産生し、炎症性サイトカインによる刺激で産生は増大する

ヒト単球由来マクロファージ (MDM, monocyte-derived macrophage) に、LPS、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β を添加し培養後、上清中の sSiglec-7 を測定した。

GM-CSF MDMs、M-CSF MDMs いずれにおいても、2 日間の培養にて上清中の sSiglec-7 は上昇した。また、LPS や TNF- α 、IL-1 β といった NAFLD 患者の血清中で上昇している炎症性サイトカイン (Tomita et al., 2006; Harte et al., 2010; Thornley et al., 2014; Wree et al., 2014) を添加して培養したところ、上清中の sSiglec-7 は著増した。一方で、肝線維化促進因子である TGF- β の添加では、明らかな変化は認められなかった (図 11)。

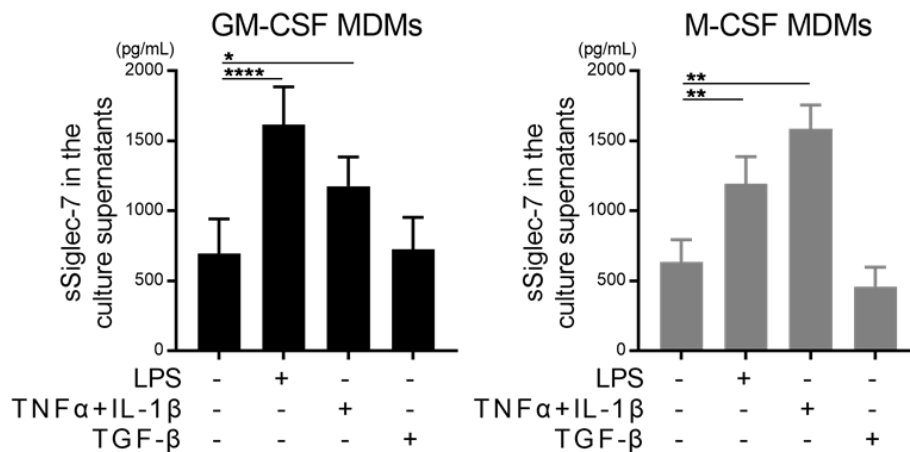


図 11 ヒト単球由来マクロファージ刺激培養における sSiglec-7 産生
Mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ by the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

ヒト単球由来マクロファージへ $\text{TNF-}\alpha$ と $\text{IL-1}\beta$ を添加培養した系における、細胞表面 Siglec-7 の発現と培養上清中の sSiglec-7 を測定した。MDM へ $\text{TNF-}\alpha$ と $\text{IL-1}\beta$ を添加し 2 日間培養した系において、MDM の細胞表面 Siglec-7 の発現と上清中の sSiglec-7 はともに上昇し、それらは強い正の相関を認めた(図 12)。

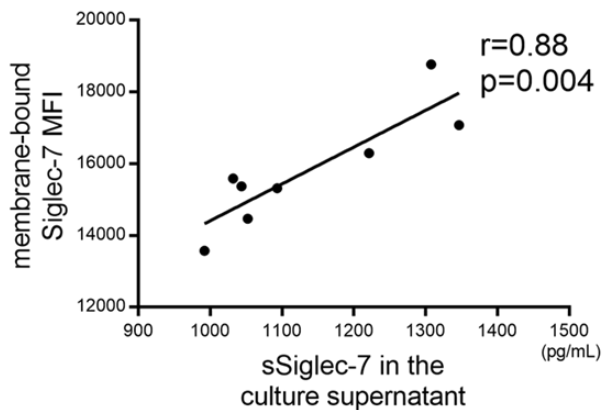
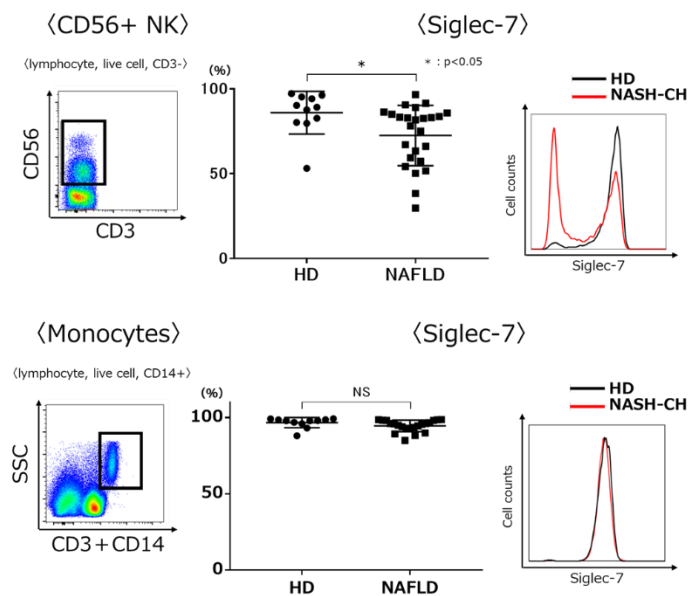


図 12 ヒト単球由来マクロファージへの $\text{TNF-}\alpha$ と $\text{IL-1}\beta$ の添加培養における細胞表面 Siglec-7 と上清中 sSiglec-7 との相関

12. NAFLD 患者において、NK 細胞の Siglec-7 発現は低下する
健康成人と NAFLD 患者の PBMC を用いて、NK 細胞と単球に発現する Siglec-7 の発現を比較した。

NAFLD 患者においては健康成人と比較し、NK 細胞の Siglec-7 発現の低下を認めた。単球に発現する Siglec-7 は違いを認めなかった(図 13)。



HD, healthy donor; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease. Mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ by the Mann-Whitney U-test.

図 13 健康成人と NAFLD 患者における、NK 細胞および単球の Siglec-7 発現の比較

13. NK 細胞や単球は sSiglec-7 を産生しない

NK 細胞や単球に、LPS、TNF- α 、IL-1 β を添加し培養後、上清中の sSiglec-7 を測定した。

NK 細胞、単球いずれにおいても、2 日間の培養にて上清中の sSiglec-7 は上昇を認めなかった。また、LPS、TNF- α 、IL-1 β を添加して培養しても同様の結果であった(図 14)。

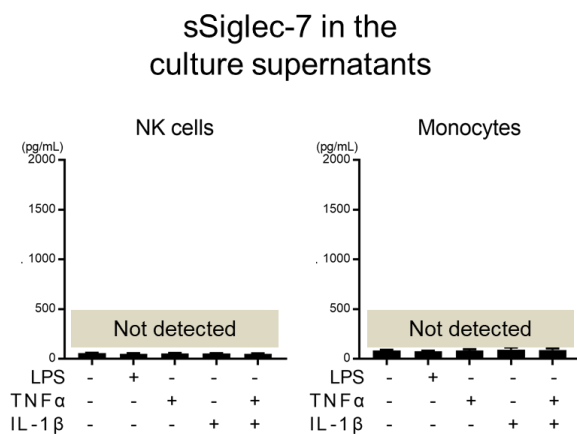


図 13 NK 細胞、単球刺激培養における sSiglec-7 産生

これらの結果から、NAFLD 患者の血清中においては TNF- α や IL-1 β といった炎症性サイトカインが上昇しており、これらのサイトカインによって肝内の炎症性マクロファージの細胞表面の Siglec-7 が上昇し、血清中へ産生されている可能性が示唆された。

考察

今回私は、血清 sSiglec-7 が NAFLD 患者において上昇し、肝線維化進行症例に対して独立した寄与因子であることを報告した。この知見は、ウイルス性肝炎患者のみならず NAFLD 患者において sSiglec-7 が、sCD163 や YKL-40 と同様、マクロファージ関連肝線維化バイオマーカーに成り得ることを示唆する。また、NAFLD 患者における sSiglec-7 は、肝内炎症と肝細胞のバルーニング、そして肝線維化と関連する一方で、AST や ALT といった肝逸脱酵素とは相関を認めなかった(図 4、7)。特に、ALT が正常な NAFLD 患者においても血清 sSiglec-7 が上昇するということは興味深く(図 2)、sSiglec-7 が肝逸脱酵素よりも鋭敏に、緩徐な肝内炎症を反映する可能性を示唆する。すなわち、採血上肝の炎症を認めない F stage 0, 1 症例においてさえ実際は微小な肝線維化が進行していると考えれば、血清 sSiglec-7 の上昇が、将来進行性の肝線維化を来す高リスク群をマクロファージの炎症として反映しているのかもしれない。また、生活改善により 7%以上の減量に成功した 2 例において、減量や肝逸脱酵素の正常化に伴い血清 sSiglec-7 は低下した(表 6)。今後縦断的大規模な検討を要するが、これら 2 例の知見は、血清 sSiglec-7 が NAFLD 患者における肝臓の炎症や線維化を反映する新規バイオマーカーと成り得る可能性を示している。

FIB-4 index は NAFLD 患者の肝線維化進行症例を同定するのに有用な指標として広く認識されている(Sumida et al., 2012; Angulo et al., 2013)。Yoneda らは、上記疾患群において線維化の同定およびモニタリングに対する臨床的アルゴリズムを提唱しており、非侵襲的方法を用いて低リスク、中リスク、高リスク群に患者を振り分ける。すなわち、FIB-4 index が 2.67 より高値の患者は肝線維化の進行が疑われるため、肝生検が推奨される(Yoneda et al., 2018)。我々の検討によると、実際の肝生検にて肝線維化進行症例(F stage 3, 4)と診断された症例のうち FIB-4 index が 2.67 より高値な症例は 32 例中 19 例と 59.4%に過ぎず、この指標では 40.6%の症例が実際に進行性の肝線維化を有するにも関わらず線維化の可能性が低いと判断される。一方で、FIB-4 index も含めた我々の決定木解析では、sSiglec-7 が非常に高い特異度をもって肝線維化進行の診断に対する第一寄与因子となった。しかしながら、本検討にはいくつかの limitation が存在する。第一に、血清 sSiglec-7 が NAFLD 患者の肝線維化進行症例の診断に対して最も優れたマーカーと結論づけるにはやや肝生検症例が少ないことが挙げられる。第二に、血清 sSiglec-7 の肝線維化進行

症例の診断に対する感度が 71.9%であり、これは他の肝線維化マーカーと比較すると、はじめに行う肝線維化スクリーニングマーカーとしては有用性が劣る。血清 sSiglec-7 が、臨床における肝線維化進行に対する有用なマーカーとして確立されるのには、より大規模な追加検討が必要である。マクロファージには、その分化の過程において、Siglec-1, -3, -8, -9, -11, -15, -16 といった様々な Siglec が発現すると報告されてきた (Freeman et al., 1995; Angata et al., 2007; Cao et al., 2008; Schwarz et al., 2017)。しかしながら、これらの Siglec 発現プロファイルは、肝疾患領域においては詳細に知られていない。NAFLD 患者から採取された肝組織サンプルは、CCR2 陽性炎症性マクロファージが著明に増加し、これは NASH の重症度や肝線維化 stage とパラレルに動くと考えられる (Morinaga et al., 2015)。我々の検討では、肝内の CCR2 陽性マクロファージには Siglec-7 が高発現する一方で、Tim-4 陽性のレジデントマクロファージには発現が低いことを示した。

また、患者血清中の sSiglec-7 上昇の機序として Varchetta らは、HIV 感染患者において血清 sSiglec-7 値とウィルス量が正相関することから、ウィルスによって活性化した NK 細胞から sSiglec-7 が shedding されるという仮説を提唱した (Varchetta et al., 2013)。彼らは HBV/HCV 肝炎患者においても検討しており、NK 細胞の Siglec-7 発現低下と血清 sSiglec-7 の上昇から、ウィルス性肝炎患者においてもウィルスによる shedding を soluble form の産生機序と報告している (Varchetta et al., 2016)。我々の検討では、NAFLD 患者においても NK 細胞の Siglec-7 の発現は低下するが、血清中の sSiglec-7 値とは明らかな相関関係は認めなかった (図 12, 13)。ゆえに、HIV 感染患者あるいは HBV/HCV 肝炎患者といったウィルス感染患者と NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 値上昇の機序は異なると考えられる。Soluble Siglec-7 の機能については、HIV-1 と結合し CD4 陽性 T 細胞やヒト単球由来マクロファージの HIV 感染感受性を増強することが知られているが (Varchetta et al., 2013)、NAFLD や HBV/HCV 肝炎を含めた慢性肝疾患の病態における sSiglec-7 の機能は不明のままであり、今後さらに検討する必要がある。

NAFLD 患者の肝内におけるマクロファージは、疾患初期の段階においてさえ、健康成人と比較し著明に増加している (Park et al., 2007; Gadd et al., 2014)。また NAFLD 患者では、腸管透過性の亢進や、小腸内での細菌異常増殖を含めた腸管内細菌叢変化などから、血中の LPS、TNF- α 、IL-1 β も上昇している (Tomita et al., 2006; Harte et al., 2010;

Thornley et al., 2014; Wree et al., 2014)。ヒト単球由来マクロファージからの sSiglec-7 産生が、LPS や TNF- α 、IL-1 β の刺激によって増加するという我々の知見は、NAFLD 患者における肝内マクロファージの上昇と血清 sSiglec-7 との間にある潜在的な関連を示唆している。さらに興味深いことに、TNF- α と IL-1 β による刺激培養では、ヒト単球由来マクロファージの表面に発現する Siglec-7 と培養上清中の sSiglec-7 が強い正相関を認めた。LPS 刺激培養においては、培養上清中の sSiglec-7 は著明に上昇するも、細胞表面の Siglec-7 発現とは明らかな相関は認めず、先の既報と同様の結果であった (Lock e al., 2004)。これらの結果より、NAFLD 患者においては、血中の LPS、TNF- α 、IL-1 β が増加し、体循環によってこれらのサイトカインが肝内マクロファージを活性化することで、結果として Siglec-7 の発現と sSiglec-7 の産生が増加することを示唆している。今回我々は、NAFLD 患者において、血清中の sSiglec-7 は上昇し、そのほとんどが活性化したマクロファージから産生され、さらには肝線維化進行症例の診断における独立した寄与因子であることを示した。これらの知見から、FIB-4 index や NFS といった他の肝線維化マーカーとの併用も含め、NAFLD 患者における肝線維化進行の高リスク症例を同定する方法として、血清 sSiglec-7 の有用性を検証するさらなる研究が非常に有意義となる。

総括および結論

1. NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は上昇し、肝線維化、肝内炎症、肝細胞バラーニングが進行した症例で高値を認める。
2. 血清 sSiglec-7 は、NAFLD 患者の肝線維化進行症例に対する独立した寄与因子であり、高い特異度を有し肝線維化進行症例の診断において有用なバイオマーカーである。
3. NAFLD 患者の肝内リンパ球において、炎症性 CCR2 陽性マクロファージに Siglec-7 は高発現する。
4. ヒト単球由来マクロファージから sSiglec-7 は高産生され、炎症性サイトカインである LPS、TNF- α 、IL-1 β 刺激によって産生量は増加する。

今後は、他の非侵襲的肝線維化マーカーより優れた有用性を示すための縦断的大規模なコホート研究、NAFLD およびウイルス性肝疾患における発癌との関連性、多臓器疾患における血清 sSiglec-7 の有用性を検討し明らかにする必要がある。さらには、肝線維化進行症例の診断ツールに留まらず、sSiglec-7 自体の機能的作用の有無、ならびに抗線維化治療としての新たな治療標的の可能性についても検討すべきと考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究のご指導を賜りました国立国際医療研究センター 考藤達哉肝炎・免疫研究センター長、由雄祥代肝疾患先端治療研究室長、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武冨紹信教授に深く謝意を表します。また、貴重な検体、臨床資料、ご助言、技術のご指導を賜りました関連施設の先生方、北海道大学消化器外科学教室 I の先生方、ならびに肝炎・免疫研究センター 肝疾患研究部の皆様に、厚くお礼申し上げます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED, grant number LP19fk0210041) と、国立国際医療研究センター (grant number 29-shi-1005, 29-shi-1007) より、研究助成を得たものである。

利益相反

考藤達哉は、Gilead Sciences and Merck, Sharp, & Dohme より、講演料を得ていることを開示する。

他の著者は、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abe, M., Miyake, T., Kuno, A., Imai, Y., Sawai, Y., Hino, K., Hara, Y., Hige, S., Sakamoto, M., Yamada, G., et al. (2015). Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology* 50, 776-784.
- Allegretti A. S., Ortiz G., Kalim S., Wibecan J., Zhang D., Shan H. Y., Xu D., Chung R. T., Karumanchi S. A. and Thadhani R. I. (2016). Siglec-7 as a Novel Biomarker to Predict Mortality in Decompensated Cirrhosis and Acute Kidney Injury. *Dig Dis Sci.* 61, 3609-3620.
- Angata T., Tabuchi Y., Nakamura K. and Nakamura M. (2007). Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* 17, 838-846.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 346, 1221-1231.
- Angulo P., Bugianesi E., Bjornsson E. S., Charatcharoenwitthaya P., Mills P. R., Barrera F., Haflidadottir S., Day C. P. and George J. (2013). Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 145, 782-789.
- Brunt E. M., Janney C. G., Di Bisceglie A. M., Neuschwander-Tetri B. A. and Bacon B. R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 94, 2467-2474.
- Bugianesi, E., Leone, N., Vanni, E., Marchesini, G., Brunello, F., Carucci, P., Musso, A., De Paolis, P., Capussotti, L., Salizzoni, M. and Rizzetto, M. (2002). Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 123, 134-140.
- Bugianesi E., Rosso C. and Cortez-Pinto H. (2016). How to diagnose NAFLD in 2016. *J Hepatol.* 65, 643-644.
- Cadranel, J. F., Rufat, P. and Degos, F. (2000). Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of

the Liver (AFEF). *Hepatology* 32, 477-481.

Cao H., Lakner U., de Bono B., Traherne J. A., Trowsdale J. and Barrow A. D. (2008). SIGLEC16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and non-functional alleles in humans. *Eur J Immunol.* 38, 2303-2315.

Chalasani N. (2018). Reply. *Hepatology* 67, 2478-2479.

Crocker P. R., Clark E. A., Filbin M., Gordon S., Jones Y., Kehrl J. H., Kelm S., Le Douarin N., Powell L., Roder J., et al. (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8, v-10.

Crocker P. R., Paulson J.C., Varki A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 7, 255-266.

Crocker P. R., McMillan S. J., Richards H. E. (2012). CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci.* 1253, 102-111.

Eguchi, Y., Hyogo, H., Ono, M., Mizuta, T., Ono, N., Fujimoto, K., Chayama, K. and Saibara, T. (2012). Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *Journal of gastroenterology* 47, 586-595.

Falco M., Biassoni R., Bottino C., Vitale M., Sivori S., Augugliaro R., Moretta L., Moretta A. (1999). Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells. *J Exp Med.* 190, 793-802.

Farrell, G. C. and Larter, C. Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99-S112.

Freeman S. D., Kelm S., Barber E. K. and Crocker P. R. (1995). Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* 85, 2005-2012.

Fujii, H., Enomoto, M., Fukushima, W., Tamori, A., Sakaguchi, H. and Kawada, N. (2009). Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. *Gut* 58, 1566-1567; author reply 1567.

Gadd V. L., Skoien R., Powell E. E., Fagan K. J., Winterford C.,

Horsfall L., Irvine K. and Clouston A.D. (2014). The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59, 1393-1405.

Harte A. L., da Silva N. F., Creely S. J., McGee K. C., Billyard T., Youssef-Elabd E. M., Tripathi G., Ashour E., Abdalla M. S., Sharada H. M., et al. (2010). Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm.* 30, 7:15.

Huang, R. C., Beilin, L. J., Ayonrinde, O., Mori, T. A., Olynyk, J. K., Burrows, S., Hands, B. and Adams, L. A. (2013). Importance of cardiometabolic risk factors in the association between nonalcoholic fatty liver disease and arterial stiffness in adolescents. *Hepatology* 58, 1306-1314.

Hudak J. E., Canham S. M., Bertozzi C. R. (2014). Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat Chem Biol.* 10, 69-75.

Jandus C., Boligan K. F., Chijioke O., Liu H., Dahlhaus M., Démoulin T., Schneider C., Wehrli M., Hunger R. E., Baerlocher G. M., et al. (2014). Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *J Clin Invest.* 124, 1810-1820.

Johnson P. J., Berhane S., Kagebayashi C., Satomura S., Teng M., Reeves H. L., O'Beirne J., Fox R., Skowronska A., Palmer D., et al. (2015). Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol.* 33, 550-558.

Kazankov K., Barrera F., Møller H. J., Rosso C., Bugianesi E., David E., Younes R., Esmaili S., Eslam M., McLeod D., et al. (2016). The macrophage activation marker sCD163 is associated with morphological disease stages in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 36, 1549-1557.

Kazankov K., Jørgensen S. M. D., Thomsen K. L., Møller H. J., Vilstrup H., George J., Schuppan D., Grønbaek H. (2019). The role of macrophage in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16, 145-159.

Kumagai E., Mano Y., Yoshio S., Shoji H., Sugiyama M., Korenaga M.,

Ishida T., Arai T., Itokawa N., Atsukawa M., et al. (2016). Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* *6*:35282.

Lemoine M., Shimakawa Y., Nayagam S., Khalil M., Suso P., Lloyd J., Goldin R., Njai H. F., Ndow G., Taal M., et al. (2016). The gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio (GPR) predicts significant liver fibrosis and cirrhosis in patients with chronic HBV infection in West Africa. *Gut* *65*, 1369-1376.

Lock K., Zhang J., Lu J., Lee S. H. and Crocker P. R. (2004). Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* *209*, 199-207.

McPherson S., Stewart S. F., Henderson E., Burt A. D. and Day C. P. (2010). Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* *59*, 1265-1269.

McPherson S., Hardy T., Henderson E., Burt A. D., Day C. P. and Anstee Q. M. (2015). Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol.* *62*, 1148-1155.

Mitsuki M., Nara K., Yamaji T., Enomoto A., Kanno M., Yamaguchi Y., Yamada A., Waguri S. and Hashimoto Y. (2010). Siglec-7 mediates nonapoptotic cell death independently of its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in monocytic cell line U937. *Glycobiology* *20*, 395-402.

Miyazaki K., Sakuma K., Kawamura Y. I., Izawa M., Ohmori K., Mitsuki M., Yamaji T., Hashimoto Y., Suzuki A., Saito Y., et al. (2012). Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. *J Immunol.* *188*, 4690-4700.

Morinaga H., Mayoral R., Heinrichsdorff J., Osborn O., Franck N., Hah N., Walenta E., Bandyopadhyay G., Pessentheiner A. R., Chi T. J., et al. (2015). Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes* *64*, 1120-1130.

Morsy M. A., Norman P. J., Mitry R., Rela M., Heaton N. D. and

Vaughan R. W. (2005). Isolation, purification and flow cytometric analysis of human intrahepatic lymphocytes using an improved technique. *Lab Invest.* 85, 285-296.

Nicoll G., Ni J., Liu D., Klenerman P., Munday J., Dubock S., Mattei M. G. and Crocker P. R. (1999). Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. *J Biol Chem.* 274, 34089-34095.

Pagano, G., Pacini, G., Musso, G., Gambino, R., Mecca, F., Depetris, N., Cassader, M., David, E., Cavallo-Perin, P. and Rizzetto, M. (2002). Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35, 367-372.

Park J.W., Jeong G., Kim S. J., Kim M. K., Park S. M. (2007). Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 22, 491-497.

Ravetch J. V., Lanier L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84-89.

Schwarz F., Landig C. S., Siddiqui S., Secundino I., Olson J., Varki N., Nizet V. and Varki A. (2017). Paired Siglec receptors generate opposite inflammatory responses to a human-specific pathogen. *EMBO J.* 36, 751-760.

Shoji H., Yoshio S., Mano Y., Kumagai E., Sugiyama M., Korenaga M., Arai T., Itokawa N., Atsukawa M., Aikata H., et al. (2016). Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 6:28814.

Sterling R.K., Lissen E., Clumeck N., Sola R., Correa M. C., Montaner J., Sulkowski M., Torriani F. J., Dieterich D. T., Thomas D. L., et al. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 43, 1317-1325.

Sumida Y., Yoneda M., Hyogo H., Itoh Y., Ono M., Fujii H., Eguchi Y., Suzuki Y., Aoki N., Kanemasa K., et al. (2012). Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease

population. *BMC Gastroenterol.* *5*, 12:2.

Sumida, Y., Nakajima, A. and Itoh, Y. (2014). Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* *20*, 475-485.

Thornley T. B., Fang Z., Balasubramanian S., Larocca R. A., Gong W., Gupta S., Csizmadia E., Degauque N., Kim B. S., Koulmanda M., et al. (2014). Fragile TIM-4-expressing tissue resident macrophages are migratory and immunoregulatory. *J Clin Invest.* *124*, 3443-3454.

Tilg, H. and Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* *52*, 1836-1846.

Tomita K., Tamiya G., Ando S., Ohsumi K., Chiyo T., Mizutani A., Kitamura N., Toda K., Kaneko T., Horie Y., et al. (2006). Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* *55*, 415-424.

Varchetta S., Brunetta E., Roberto A., Mikulak J., Hudspeth K. L., Mondelli M. U. and Mavilio D. (2012). Engagement of Siglec-7 receptor induces a proinflammatory response selectively in monocytes. *PLoS One* *7*, e45821.

Varchetta S., Lusso P., Hudspeth K., Mikulak J., Mele D., Paolucci S., Cimbri R., Malnati M., Riva A., Maserati R., et al. (2013). Sialic acid-binding Ig-like lectin-7 interacts with HIV-1 gp120 and facilitates infection of CD4pos T cells and macrophages. *Retrovirology* *10*, 154.

Varchetta S., Mele D., Lombardi A., Oliviero B., Mantovani S., Tinelli C., Spreafico M., Prati D., Ludovisi S., Ferraioli G., et al. (2016). Lack of Siglec-7 expression identifies a dysfunctional natural killer cell subset associated with liver inflammation and fibrosis in chronic HCV infection. *Gut* *65*, 1998-2006.

Varki A., Angata T. (2006). Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* *16*, 1R-27R.

Varki A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* *446*, 1023-1029.

Varki A. (2011). Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology* 21, 1121-1124.

Wai C. T., Greenson J. K., Fontana R. J., Kalbfleisch J. D., Marrero J. A., Conjeevaram H. S. and Lok A. S. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38, 518-526.

Watanabe, S., Hashimoto, E., Ikejima, K., Uto, H., Ono, M., Sumida, Y., Seike, M., Takei, Y., Takehara, T., Tokushige, K., et al. (2015). Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 45, 363-377.

Wong V. W., Wong G. L., Choi P. C., Chan A. W., Li M. K., Chan H.Y., Chim A. M., Yu J., Sung J. J. and Chan H.L. (2010). Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 59, 969-974.

Wong, V. W. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease in Asia: a story of growth. *J Gastroenterol Hepatol.* 28, 18-23.

Wree A., McGeough M. D., Peña C. A., Schlattjan M., Li H., Inzaugarat M. E., Messer K., Canbay A., Hoffman H. M. and Feldstein A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med.* 92, 1069-1082.

Yamaji T., Teranishi T., Alphey M. S., Crocker P. R. and Hashimoto Y. (2002). A small region of the natural killer cell receptor, Siglec-7, is responsible for its preferred binding to alpha 2,8-disialyl and branched alpha 2,6-sialyl residues. A comparison with Siglec-9. *J Biol Chem.* 277, 6324-6332.

Yki-Jarvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 901-910.

Yoneda M., Imajo K., Takahashi H., Ogawa Y., Eguchi Y., Sumida Y., Yoneda M., Kawanaka M., Saito S., Tokushige K., et al. (2018). Clinical strategy of diagnosing and following patients with nonalcoholic fatty liver disease based on invasive and noninvasive methods. *J Gastroenterol.* 53, 181-196.

Younossi Z. M., Koenig A.B., Abdelatif D., Fazel Y., Henry L. and Wymer M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73-84.

von Gunten S., Bochner B.S. (2008). Basic and clinical immunology of Siglecs. *Ann N Y Acad Sci.* 1143, 61-82.