

謝性因子に着目して解析することは、IFN治療難治例に対する新規の治療法を開発していく上で重要な鍵となるであろう。中でも、肝脂肪化を惹起する背景因子を詳細に検討することは、抗ウイルス剤の進歩のみでは解決できない問題に対する糸口となる可能性があり、今後の展開が非常に期待される。

## 文 献

- 1) Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al : Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347 : 975-982, 2002
- 2) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC et al : Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358 : 958-965, 2001
- 3) Ramesh S, Sanyal AJ : Hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 24 : 399-413, 2004
- 4) Lonardo A, Adinolfi LE, Loria P et al : Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology* 126 : 586-597, 2004
- 5) Hickman IJ, Powell EE, Prins JB et al : In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy. *J Hepatol* 39 : 1042-1048, 2003
- 6) Monto A, Alonzo J, Watson JJ et al : Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 36 : 729-736, 2002
- 7) Camma C, Bruno S, Di Marco V et al : Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 43 : 64-71, 2006
- 8) Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE et al : Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 45 : 80-87, 2007
- 9) Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K et al : Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 33 : 106-115, 2000
- 10) Patton HM, Patel K, Behling C et al : The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 40 : 484-490, 2004
- 11) Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y et al : Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 78 : 1527-1531, 1997
- 12) Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H et al : Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126 : 840-848, 2004
- 13) Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G et al : High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 38 : 639-644, 2003
- 14) Charlton MR, Pockros PJ, Harrison SA : Impact of obesity on treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* 43 : 1177-1186, 2006
- 15) Poynard T, Ratziu V, McHutchison J et al : Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 38 : 75-85, 2003
- 16) Sanyal AJ, Contos MJ, Sterling RK et al : Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. *Am J Gastroenterol* 98 : 2064-2071, 2003
- 17) Romero-Gomez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ et al : Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128 : 636-641, 2005
- 18) Harrison SA, Brunt EM, Qazi RA et al : Effect of significant histologic steatosis or steatohepatitis on response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3 : 604-609, 2005
- 19) Thomopoulos KC, Theocharis GJ, Tsamantas AC et al : Liver steatosis is an independent risk factor for treatment failure in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17 : 149-153, 2005
- 20) D'Souza R, Sabin CA, Foster GR : Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 100 : 1509-1515, 2005
- 21) Yaginuma R, Ikejima K, Okumura K et al : Hepatic steatosis is a predictor of poor response to interferon alpha-2b and ribavirin combination

- therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepato Res* 35 : 19-25, 2006
- 22) Jian Wu Y, Shu Chen L, Gui Qiang W : Effects of fatty liver and related factors on the efficacy of combination antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 26 : 166-172, 2006
- 23) Soresi M, Tripi S, Franco V et al : Impact of liver steatosis on the antiviral response in the hepatitis C virus-associated chronic hepatitis. *Liver Int* 26 : 1119-1125, 2006
- 24) Larrea E, Garcia N, Qian C et al : Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 23 : 210-217, 1996
- 25) Di Bona D, Cippitelli M, Fionda C et al : Oxidative stress inhibits IFN-alpha-induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway. *J Hepatol* 45 : 271-279, 2006
- 26) Overbeck K, Genne D, Golay A et al : Pioglitazone in chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon-alpha and ribavirin. *J Hepatol* 49 : 295-298, 2008
- 27) Belfort R, Harrison SA, Brown K et al : A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 355 : 2297-2307, 2006

\*

\*

\*

## 日本におけるC型肝炎治療のコンセンサス



渡辺 純夫

# 1. ペグインターフェロン・ リバビリン併用療法の治療成績

Watanabe Sumio  
渡辺 純夫Suzuki Satoko  
鈴木 聡子Ikejima Kenichi  
池嶋 健一\*

\*順天堂大学医学部消化器内科

## はじめに

2001年に米国および欧州においてペグインターフェロン(PEG-IFN)  $\alpha$ -2b+リバビリン併用療法がC型慢性肝炎(CHC)治療に承認されて以降、CHCに対する国際的標準的治療は、現在PEG-IFN+リバビリン併用療法である<sup>1,2)</sup>。通常の投与期間は、難治とされるgenotype 1/4には48週間、本併用療法で有効性の高いgenotype 2/3には24週間が推奨されている。PEG-IFN  $\alpha$ 製剤としては、その後PEG-IFN  $\alpha$ -2aが承認され、2製剤の優劣を検討する研究もいくつか報告<sup>3,4)</sup>されている。

日本においても2004年にPEG-IFN  $\alpha$ -2b+リバビリン併用療法が臨床使用されるようになり、既に9万例以上に本治療が実施されている。その後わが国でもPEG-IFN  $\alpha$ -2aの臨床使用が承認されたが、国内における本併用療法は、PEG-IFNの用法・用量はともに海外と共通であるが、リバビリンの用量が海外と異なっている(日本:600~1,000 mg/日,海外:800~1,400 mg/日)。その背景としては、日本のCHC症例は欧米に比べて高齢化が進み、また低体重例が多いことに起因している。これに関連して、わが国の実地臨床においてはPEG-IFNやリバビリンの投与量を減量するなど独自の検討も行われてきた。このような研究の中から、PEG-IFN+リバビリン併用療法における有効要因、無効要因、再燃要因が明らかになりつつあり、有効性を向上させる試みも報告されつつある。

本稿では、国際的に実施された大規模臨床研究によるevidenceレベルの高い研究結果とともに、われわれの研究を含めた日本における最新の情報を紹介する。

なお、PEG-IFN  $\alpha$ の2製剤間の比較や本療法を長期投与する試みは別稿で紹介されることから、本稿においては触れない。

## PEG-IFN $\alpha$ + リバビリン併用療法の 有効性に関連する宿主要因

Genotype 1b/高ウイルス量症例を対象とした国内臨床試験<sup>5)</sup>におけるsustained viral response (SVR)に対する寄与要因としては、IFN治療歴(未治療>無効)、性別(男>女)、肝生検staging(低>高)が確認されている。Genotypeが混在する海外におけるコア研究<sup>6,7)</sup>では、genotype(1以外>1)、体重(低>高)、投与前ウイルス量(低>高)、年齢および性(女>男)などが予後要因とされた。性の影響が日本と欧米で異なるのは、日本では高齢女性の占める頻度が高いためと推測されている。

最近の研究では、インスリン抵抗性やsteatosisといったメタボリックシンドロームの病態の関与が挙げられる<sup>8-10)</sup>。ライフスタイルの変化に伴い、肥満や2型糖尿病、高血圧などの生活習慣病が増加してきているが、われわれもCHCの進行やIFN抵抗性にこれら代謝危険因子が深く関与することを明らかにしてきた(図1)。生活習慣病の代表として高血圧に焦点を当てたわれわれの研究において、高血圧症例では、BMIが高くfibrosisも進展している症例が有意に高く、IFN抵抗性を示していると考えられた。また、おそらく高齢者が高血圧群に多いためか、服薬コンプライアンス不良となる症例が高血圧群で有意に多いことも明らかに

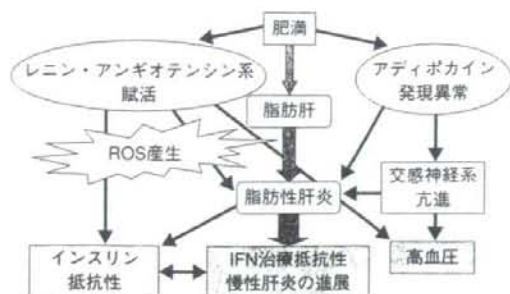


図1 生活習慣病とCHCの関連

なっている。C型肝炎ウイルス(HCV)が早期に陰性化すればSVRとなる確率が高いことが広く知られている<sup>11)</sup>が、steatosisがHCV陰性化を遅延させることも報告<sup>12)</sup>されている。われわれの研究でも図2に示したように、steatosisがなければ投与12週目のHCV陰性化(EVR)率が60%を超えるのに対して、steatosisありの症例におけるEVR率は40%以下であり、投与32週以降におけるHCV陰性化率に有意な差が認められた。アディポカインの1つであるレプチンは、steatosisばかりでなくfibrosisの進展にも関連している<sup>13)</sup>。さらに、HCV感染自体がインスリン抵抗性を惹起<sup>14)</sup>し、インスリン抵抗性とHCV量が相関すること<sup>15)</sup>も示されている。この結果の下に、インスリン抵抗性を低下させればPEG-IFN+リバビリン併用療法の有効性が向上する可能性がある。食事・運動療法、インスリン抵抗性改善薬を含む薬物療法が試みられているが、残念ながら未だCHC治療における有効性を示した報告はない<sup>16,17)</sup>。

日本発の情報としては、HCVのISDR変異、およびcore領域の変異が挙げられる。ISDRのmutantは有効要因であり<sup>18)</sup>、core領域のaa70、aa91置換は無効要因<sup>19)</sup>とされている。残念ながら、これらの要因は治療などの介入により改善不能な要因となっており、プロテアーゼ阻害薬などの新薬がこれらウイルス側の無効要因を凌駕できるかに期待がかかる。

## PEG-IFN $\alpha$ + リバビリン併用療法の有効性に関連する治療要因

国内開発治験<sup>2)</sup>では、PEG-IFN $\alpha$ -2bおよびリバビリンとも減量せずに投与が完了できた症例におけるSVR率は62.5%であったのに対し、PEG-IFNのみの減量例では52%、リバビリンのみの減量例では53.3%

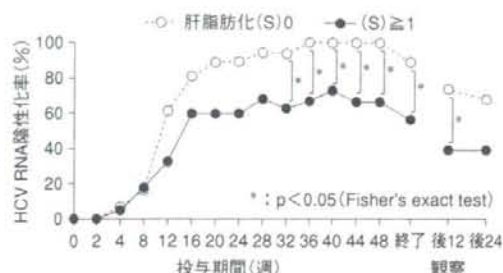


図2 Genotype 1b/高ウイルス量症例に対するPEG-IFN $\alpha$ -2b+リバビリン併用療法の肝脂肪化別経時的HCV RNA陰性化率(n=42)

と10%程度の低下にとどまるが、両剤を減量すると45.7%、投与中止となると19.2%にまで低下していた。このため、PEG-IFN $\alpha$ -2b、あるいはリバビリンの投与開始量を減量することにより投与中止を避ける試みがわが国で行われたが、HCV陰性化時期が遅延し、SVRの改善には至っていない。従来、リバビリンのCHC治療における主な役割は投与終了後の再燃防止と考えられていたが、ポリメラーゼ阻害薬やプロテアーゼ阻害薬を用いた研究において、リバビリンがなければ投与初期のHCV量の減少が1-log以上少なくなり<sup>20)</sup>、SVR率の低下にもつながってリバビリンの有効性が再認識されている。リバビリンを投与開始8週以内に減量するとHCVの陰性化時期が遅延することも確認されており<sup>21)</sup>、いかに十分量のリバビリンを投与できるかは、プロテアーゼ阻害薬が登場しても重要な問題として残されている。

PEG-IFNあるいはリバビリンの総投与量の重要性、特に推奨投与量に対する80%以上の投与量確保がSVRを得る上で重要であることは、本治療法の初期から報告<sup>22,23)</sup>されている。われわれの検討においても、両剤の服薬率が80%未満となるとSVR率は34%にまで低下していた(図3)。ここでの問題は、安全性上薬剤の減量を行わざるを得なかった症例に対する対策である。1つの対策は、PEG-IFN $\alpha$ -2bの場合、0.75  $\mu$ g/kgへの減量ではなく1.0  $\mu$ g/kgにとどめる試みである。今後確認する必要のあるもう1つの対策として、服薬率不良例に対するPEG-IFN+リバビリン投与期間の延長がSVR率の向上に寄与するかが挙げられる。

治療要因に挙げることは問題かもしれないが、早期HCV陰性化は高いSVR率に関連する。PEG-IFN $\alpha$ -2b+リバビリンの国内開発治験<sup>2)</sup>では、4週以内のHCV陰性化(RVR)例におけるSVR率は100%、12週以内陰

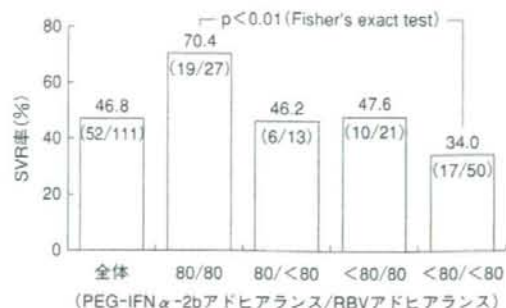


図3 Genotype 1b/高ウイルス量症例に対するPEG-IFN  $\alpha$ -2b+リバビリン併用療法の薬剤アドヒアランスとSVR率(n=111)

性化(EVR)例では71%、24週以内陰性化例においては36%と報告されている。通常、RVR率は10%程度、EVR率は60%程度とされている。本施設における経時的HCV陰性化率は図4のようで、RVR率、EVR率ともやや低いが、投与終了時点におけるHCV陰性化率は開発治験とはほぼ同レベルとなり、SVR率も全国平均レベルとなっていた。

### PEG-IFN+リバビリン併用療法無効例に対する再投与の試み

Genotype 1 の症例に対するPEG-IFN+リバビリン併用療法の有効性は50%程度である。したがって、本併用療法後には半数の症例ではHCVが排除されず、他の対策が必要となる。この対策として、PEG-IFN  $\alpha$ -2b+リバビリン併用療法でSVRとならなかった症例にPEG-IFN  $\alpha$ -2a+リバビリンを投与するREPEAT study<sup>21)</sup>と名づけられた研究が米国を中心に実施された。本試験ではPEG-IFN  $\alpha$ -2a 180  $\mu$ g/週を基本の投与量とし、初期12週は360  $\mu$ g/週に増量する群を設定し、さらにおのおのの投与方法で48週、あるいは72週投与する4群が設定された。このREPEAT studyの問題点として、前治療無効の基準が現在の規定(投与12週以内にHCV RNAが $2$ -log以上低下しない)とされておらず、late responderが含まれる可能性が挙げられる。その他、genotype 3/4の症例が9%含まれ、前治療再燃例の存在が排除されないこと、さらに前治療のリバビリン投与量は800 mgであり、REPEAT studyではリバビリン投与量の増量効果も存在することなども考慮する必要がある。このような不明な要因を多く含んだ集団におけるSVR率は、PEG-IFN  $\alpha$ -2aを増量しても48週投与

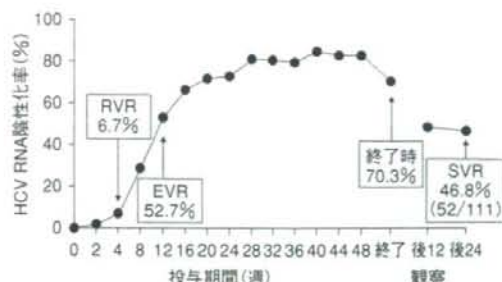


図4 Genotype 1b/高ウイルス量症例に対するPEG-IFN  $\alpha$ -2b+リバビリン併用療法の経時的HCV RNA陰性化率(n=111)

RVR: 4週以内陰性化例, EVR: 12週以内陰性化例, SVR: sustained viral response.

では7~9%、72週投与で14~16%という結果であり、IFN反応性に欠ける症例に単純にPEG-IFN  $\alpha$ +リバビリン併用療法を繰り返しても有効性は期待できないことが示されている。

上記のように、PEG-IFN+リバビリン併用療法ではHCV排除が困難な症例に対する他の対策として、肝癌進展防止を目指したPEG-IFN  $\alpha$ -2a単独、あるいはPEG-IFN  $\alpha$ -2b単独投与の研究結果が報告されている。前者はHALT-C<sup>22)</sup>と名づけられた研究で、原則PEG-IFN  $\alpha$ -2a+リバビリン併用療法無効例にPEG-IFN  $\alpha$ -2aが90  $\mu$ g/週、後者はPEG-IFN  $\alpha$ -2b(0.5  $\mu$ g/kg/週)とコルヒチンの比較試験として実施されたCOPILOT study<sup>23)</sup>である。観察期間が3.5年あるいは4年と短く、CHCからの進展予防効果を証明するには短い期間ということも影響してか、PEG-IFNの少量継続投与の有効性は示されなかった。ただ、両研究の限界として、規定の期間PEG-IFNの投与が継続されなかった症例が40%を超えており、今後自己注射ではない日本の成績が待たれる。

### Genotype 2 症例における短期投与の可能性

わが国におけるgenotype 2 症例に対するPEG-IFN  $\alpha$ -2b(1.5  $\mu$ g/kg/週)とリバビリン24週併用投与の有効性は87.9%(51/58)と極めて高率である<sup>27)</sup>。特に、服薬率が50%以上であれば高いSVR率が得られていることが注目される(表1)。海外においても、genotype 2-3症例におけるSVR率は70~80%程度とされ、genotype 1 に比べて高率である。このため海外では、安全

表1 累積服薬率別SVR率

		PEG-IFN/RBV群				IFN/RBV群			
		IFN製剤服薬率							
		≥95%	≥50%~ <95%	<50%	計	≥95%	≥50%~ <95%	<50%	計
RBV 服薬率	≥95%	26/29 (90%)	8/8 (100%)	—	34/37 (92%)	24/27 (89%)	8/11 (73%)	—	32/38 (84%)
	≥50%~<95%	4/5 (80%)	11/11 (100%)	2/3 (67%)	17/19 (89%)	4/5 (80%)	9/9 (100%)	—	13/14 (93%)
	<50%	—	1/1 (100%)	3/6 (50%)	4/7 (57%)	—	0/1 (0%)	2/8 (25%)	2/9 (33%)
	計	30/34 (88%)	20/20 (100%)	5/9 (56%)	55/63 (87%)	28/32 (88%)	17/21 (81%)	2/8 (25%)	47/61 (77%)

(文献27より引用)

性向上を目指して投与期間を12~16週に短縮する研究が盛んに行われている。Shiffmanら<sup>20)</sup>はgenotype 2/3症例を対象に16週投与と24週投与を比較し、16週投与の有効性は24週に及ばないが、4週以内の陰性例では16週投与も可能と発表している。Andriulliら<sup>21)</sup>はこれら研究のメタアナリシスの結果を報告している。その結果、genotype 2の症例においても投与期間は24週とすべきとされている。

## まとめ

PEG-IFN $\alpha$ とリバビリン併用療法に関して多くのevidenceが集積されてきている。今後の課題は、無効要因をいかに取り除くかを前向きに検証することである。

## 文献

- 1) NIH consensus statement on management of hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements 2002; 19: 1-46.
- 2) Strader DB, Wright T, Thomas DL, et al: Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. Hepatology 2004; 39: 1147-1171.
- 3) Ascione A, De Luca M, Tartaglione MT, et al: Peginterferon alpha-2a plus ribavirin versus peginterferon alpha-2b plus ribavirin in naive patients with chronic hepatitis C virus infection: results of a prospective randomised trial. J Hepatol 2008; 48(Suppl 2): S370.
- 4) Sulkowski M, Lawitz E, Shiffman ML, et al: Final results of the IDEAL (individualized dosing efficacy versus flat dosing to assess optimal pegylated interferon therapy) phase III b study. J Hepatol 2008; 48(Suppl 2): S370-S371.
- 5) 飯野四郎, 沖田 極, 小俣政男ほか: Genotype 1 かつ高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するPEG-インターフェロン $\alpha$ -2bとリバビリン48週併用療法の有効性—インターフェロン $\alpha$ -2bとリバビリン6か月併用療法とのretrospectiveな比較. 肝胆脾 2004; 49: 1099-1121.
- 6) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. Lancet 2001; 358: 958-965.
- 7) Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2002; 347: 975-982.
- 8) Durante-Mangoni E, Zampino R, Marrone A, et al: Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with serum imbalance of adiponectin/tumour necrosis factor- $\alpha$  in chronic hepatitis C patients. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24: 1349-1357.
- 9) Charlton MR, Pockros PJ, Harrison SA, et al: Impact of obesity on treatment of chronic hepatitis C. Hepatology 2006; 43: 1177-1186.
- 10) Leandro G, Mangia A, Hui J, et al: Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. Gastroenterology 2006; 130: 1636-1642.
- 11) 豊田成司, 狩野吉康, 赤池 淳ほか: コバスTaqMan HCV「オート」によるC型慢性肝炎抗ウイルス療法時のウイルス動態と効果予測. 肝臓 2008; 49: 297-306.
- 12) Westin J, Lagging M, Dhillion AP, et al: Impact of hepatic steatosis on viral kinetics and treatment outcome during antiviral treatment of chronic HCV infection. J Viral Hepat 2007; 14: 29-35.
- 13) Piche T, Vandenbos F, Abakar-Mahamat A, et al: The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. J Viral Hepat 2004; 11: 91-96.
- 14) Delgado-Borrego A, Liu YS, Jordan SH, et al: Prospec-

- tive study of liver transplant recipients with HCV infection : evidence for a causal relationship between HCV and insulin resistance. *Liver Transpl* 2008 ; 14 : 193-201.
- 15) Yoneda M, Saito S, Ikeda T, et al : Hepatitis C virus directly associates with insulin resistance independent of the visceral fat area in nonobese and nondiabetic patients. *J Viral Hepat* 2007 ; 14 : 600-607.
  - 16) Merat S, Jabbari H, Sharifi AH, et al : The effect of adding metformin to the treatment of hepatitis C : a preliminary report of a randomized controlled trial. *J Hepatol* 2008 ; 48(Suppl 2) : S304.
  - 17) Romero-Gomez M, Diago M, Andrade RJ, et al : Interim analysis from TRIC-1 : a study of metformin with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment naive genotype 1 chronic hepatitis C with insulin resistance. *J Hepatol* 2008 ; 48(Suppl 2) : S375.
  - 18) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81.
  - 19) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al : Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b : amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 2007 ; 46 : 403-410.
  - 20) Pockros PJ, Nelson D, Godofsky E, et al : Robust synergistic antiviral effect of R1626 in combination with peginterferon alfa-2a (40KD), with or without ribavirin—interim analysis results of phase 2a study. *Hepatology* 2007 ; 46(Suppl 1) : 311A.
  - 21) Karino Y, Akaike J, Toyota J, et al : Early reduction of ribavirin leads to retardation of viral clearance and affects SVR. *Hepatology* 2007 ; 46(Suppl 1) : 369A.
  - 22) McHutchison JG, Manns M, Patel K, et al : Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 1061-1069.
  - 23) Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, et al : Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 ; 38 : 645-652.
  - 24) Jensen DM, Freilich B, Andreone P, et al : Pegylated interferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin (RBV) in prior non-responders to pegylated interferon alfa-2b (12KD)/RBV : final efficacy and safety outcomes of the REPEAT study. *Hepatology* 2007 ; 46(Suppl 1) : 291A-292A.
  - 25) Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, et al : Incidence rates and risk factors associated with hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with advanced liver disease due to hepatitis C : results of the HALT-C trial. *J Hepatol* 2008 ; 48(Suppl 2) : S45.
  - 26) Afdhal NH, Levine R, Brown R Jr, et al : Colchicine versus peg-interferon alfa 2b long term therapy : results of the 4 year COPILOT trial. *J Hepatol* 2008 ; 48(Suppl 2) : S4.
  - 27) 熊田博光, 豊田成司, 後藤賢一郎ほか : Genotype 1 かつ低ウイルス量, あるいはgenotype 2 のC型肝炎に対するPEG-インターフェロン  $\alpha$ -2b とリバビリン 24週併用療法の有効性—インターフェロン  $\alpha$ -2b とリバビリン 24週間併用療法との比較—, *肝胆膵* 2006 ; 52 : 645-663.
  - 28) Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, et al : Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 124-134.
  - 29) Andriulli A, Mangia A, Iacobellis A, et al : Meta-analysis : the outcome of anti-viral therapy in HCV genotype 2 and genotype 3 infected patients with chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008 ; 28 : 397-404.

## 11. Sphingosine 1-phosphate (S1P) の 肝類洞内皮細胞に及ぼす影響

北村庸雄<sup>1,2)</sup> 鄭冬梅<sup>1)</sup> 池嶋健一<sup>1)</sup>  
榎本信行<sup>1)</sup> 山科俊平<sup>1)</sup> 今一義<sup>1)</sup>  
鈴木聡子<sup>1)</sup> 竹井謙之<sup>1,3)</sup> 佐藤信紘<sup>1)</sup>  
渡辺純夫<sup>1)</sup>

### The Effect of Sphingosine 1-phosphate (S1P) on Liver Sinusoidal Endothelial Cells

Tsuneo Kitamura<sup>1,2)</sup>, D-M Zheng<sup>1)</sup>, Kenichi Ikejima<sup>1)</sup>,  
Nobuyuki Enomoto<sup>1)</sup>, Shunhei Yamashina<sup>1)</sup>, Kazuyoshi Kon<sup>1)</sup>,  
Satoko Suzuki<sup>1)</sup>, Yoshiyuki Takei<sup>1,3)</sup>, Nobuhiro Sato<sup>1)</sup>  
and Sumio Watanabe<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Gastroenterology, Juntendo University Urayasu Hospital

<sup>3)</sup>Department of Gastroenterology, Mie University Graduate School of Medicine

#### はじめに

sphingolipid 代謝産物である sphingosine 1-phosphate (S1P) は、細胞外リガンドとして機能する生理活性物質であり、その多彩な機能が注目を集めているが<sup>1-3)</sup>、肝類洞内皮細胞における役割については不明な点が多い。S1P は血小板に多く含まれるため、アルコール性肝障害のとくに重症型では、肝類洞に集積・凝集した血小板から S1P が放出され、肝類洞内皮細胞機能を制御することで肝類洞リモデリングに寄与している可能性が推測される<sup>4,5)</sup>。そこで、S1P の肝類洞内皮細胞に及ぼす影響を検討するため、

*in vitro* および *in situ* において検討を行った。  
なお、本稿は口演抄録である。

#### I 方 法

初代培養肝類洞内皮細胞は Wistar 系雌性ラット肝をコラゲナーゼで灌流後 two-step Percoll gradient 法により分離した。細胞は EBM-2 培養液中にて 37 °C で培養し、培養 2 日目に実験に供した。DNA 合成能は BrdU labeling index により、アポトーシスの誘導は TUNEL 法により検討した。細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度および NO 産生は、膜透過型蛍光指示薬である fura-

<sup>1)</sup>順天堂大学医学部 消化器内科  
医学講座 消化器内科学分野

<sup>2)</sup>順天堂大学医学部附属浦安病院 消化器内科

<sup>3)</sup>三重大学大学院医学系研究科病態制御



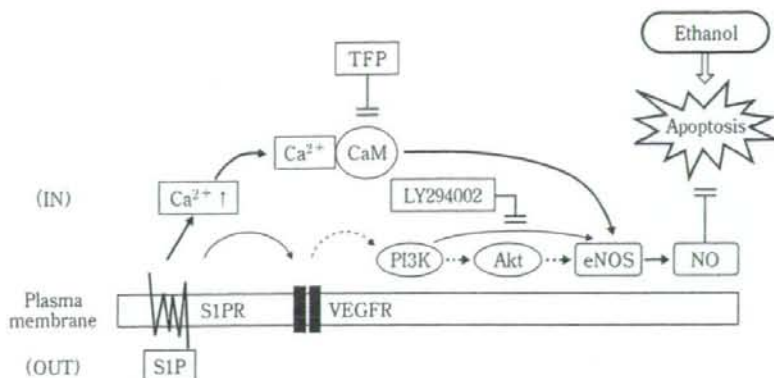


図1 肝類洞内皮細胞における Sphingosine-1-Phosphate の制御機構

2-AM および diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) で細胞をそれぞれ前処置後、画像解析装置により単一細胞レベルで解析した<sup>6-8)</sup>。一方、isolated perfused rat liver を用いた実験では、S1P およびエタノールで灌流後、電子顕微鏡組織像にて肝類洞内皮細胞傷害を検討した。

## II 結 果

*in vitro* の系では、エタノール非存在下において S1P 添加により細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は上昇し、DNA 合成能は増強された。また、S1P はエタノールにより誘導される DNA 合成低下とアポトーシスを有意に抑制したが、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の競合阻害剤である  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の同時添加によりこの作用は解除された。また、エタノール非存在下において S1P 刺激により細胞の eNOS 活性と NO 産生の亢進が観察されたが、L-NAME の同時添加により NO 産生の阻害が確認された。さらに S1P による eNOS の活性化は calmodulin (CaM) 阻害剤である trifluoperazine (TFP) によって抑制された。一方、isolated perfused rat liver を用いた実験では、S1P の前灌流によりエタノール誘導性肝類洞内皮細胞傷害は抑制されたが、L-NAME の同時添加によりこの作用は解除された。

## III 考 察・結 語

S1P は肝類洞内皮細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を惹

起し、また、S1P による eNOS の活性化は  $Ca^{2+}$  結合蛋白 (CaM) の阻害剤によって抑制されたことより、S1P による eNOS の活性化は  $Ca^{2+}$ -CaM complex を介したものと推測される。一方、今回の結果では eNOS の競合阻害剤である L-NAME が S1P の NO 産生能と抗アポトーシス作用を抑制することから、肝類洞内皮細胞における S1P の抗アポトーシス作用には eNOS の活性化を介した NO 産生が関与しているものと考えられた (図1)。

## 文 献

- 1) Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 1991; 114: 155-67.
- 2) Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serumdeprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem* 2001; 276: 10627-33.
- 3) Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000; 106: 951-61.
- 4) Yatomi Y, Ohmori T, Rile G, Kazama F, Okamoto H, Sano T, et al. Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* 2000; 96: 3431-8.
- 5) Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, et al. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phos-

- phate generation in blood. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 21197-206.
- 6) Kitamura T, Watanabe S, Ikejima K, Hirose M, Miyazaki A, Yumoto A, et al. Different features of  $Ca^{2+}$  oscillations in differentiated and undifferentiated hepatocyte doublets. *Hepatology* 1995 ; 21 : 1395-1404.
- 7) Enomoto N, Kitamura T, Hirose M, Ikejima K, Watanabe S, Sato N. Differential  $Ca^{2+}$  signaling in neonatal and adult rat hepatocyte doublets. *J Hepatol* 1998 ; 28 : 221-30.
- 8) Zheng D-M, Kitamura T, Ikejima K, Enomoto N, Yamashina S, Suzuki S, et al. Sphingosine 1-phosphate protects rat liver sinusoidal endothelial cells from ethanol-induced apoptosis : role of intracellular calcium and nitric oxide. *Hepatology* 2006. ; 44 : 1278-87.

\* \* \*

## 12. 酸化ストレスに伴う肝細胞障害における鉄イオンの細胞内動態と細胞死への影響

順天堂大学医学部 消化器内科

内山 明 池嶋 健一  
今 一義 渡辺 純夫

### Translocation of Iron from Lysosomes into Mitochondria is a Key Event during Oxidative Stress-induced Hepatocellular Injury

Akira Uchiyama, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon  
and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

#### KEY WORDS

Lysosomes, ROS, MPT, Iron

#### はじめに

近年、メタボリックシンドロームに伴う肝病変としての非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) が注目されており、肝脂肪化に伴う脂肪酸酸化やミトコンドリア機能異常などに起因する活性酸素種 (ROS) の増大がその病態に深く関与していると考えられている。さらに C 型慢性肝炎やアルコール性肝障害などの慢性肝疾患の病態進展にも酸化ストレスがきわめて重要な役割を演じていると考えられている<sup>1,2)</sup>。肝細胞では、鉄は細胞膜上のトランスフェリン受容体を介してエンドゾームからリソソーム内に取り込まれ、鉄を維持するためにリソソーム内が酸性に保たれていることが重要であると考えられている<sup>3)</sup>。リソソーム膜上の vacuolar proton-pump は、proton を ATP 依存性にリソソーム内に取り込むことによ

り、リソソーム内の酸性を維持している<sup>4)</sup>。これまで肝細胞内において、鉄過剰状態が酸化ストレスに伴う肝障害を増悪させる要因となることは報告されているが<sup>5-7)</sup>、肝細胞障害の過程における鉄イオンの細胞内動態、また細胞死への影響についてはほとんど知見がない。そこで今回われわれは、肝細胞障害において、酸化ストレスに対する感受性の亢進が病態増悪に関与している可能性を考え、酸化ストレス感受性の亢進における肝細胞内の局在変化と 2 価鉄の役割について、また種々の蛍光指示薬を使い細胞内小器官のイオン濃度や膜電位変化を共焦点レーザー顕微鏡を用い詳細に解析した。

なお、本稿は口演抄録である。

## I 実験材料および方法

## 1 初代培養肝細胞の作製

肝細胞における鉄イオンの細胞内動態また細胞死への影響を調べるために、collagenase 比重遠心法を用いて C3Heb/HeJ mouse・Sprague-Dawley rat から単離した初代培養肝細胞を用いた。単離した肝細胞は 10%FBS を添加した Waymouth's Medium で培養し実験に供した<sup>8)</sup>。

## 2 細胞質内の 2 価鉄イオン濃度測定

単離培養 6 時間後の肝細胞を calcein-AM (1  $\mu$ M, Molecular Probe/Invitrogen), (37°C, 20 min) で染色し、蛍光減弱を共焦点型レーザー顕微鏡を用いて可視化した。bafilomycin (BAF, vacuolar proton-pumping ATPase 阻害剤, 50nM) を投与後、calcein の蛍光減弱を測定し細胞質内の 2 価鉄イオンの濃度変化を評価した。

## 3 ミトコンドリア内の 2 価鉄イオン濃度測定 (cold-loading and warm-incubation 法)

単離培養 6 時間後のラット肝細胞を、calcein-AM で 4°C で 1 時間染色したのち、37°C で 12 時間培養しミトコンドリアのみ calcein 蛍光で染色し、その蛍光減弱を共焦点型レーザー顕微鏡を用いて可視化した。BAF (50 nM) を投与後、calcein の蛍光減弱を測定しミトコンドリア内の 2 価鉄イオンの濃度変化を評価した<sup>9)</sup>。

## 4 ミトコンドリア膜の透過性の変化 (MPT) の評価

肝細胞を tetramethylrhodamine methylester (TMRM, 100 nM) で染色し、共焦点型レーザー顕微鏡を用いて可視化した。

## 5 肝細胞ネクローシスと肝細胞内 ROS の産生の評価

単離培養 4 時間後の肝細胞の培養液中に 30  $\mu$ M の propidium iodide (PI, Sigma, St. Louis, MO) 添加し、蛍光増強をマイクロプレートリーダーで経時的に測定し、ネクローシスを評価した。また 5- (and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCF, MolecularProbe, Eugene, OR) にて染色し、蛍光増強を同様にマイクロプレートリーダーで経時的に測定し、ROS の産生を判定した<sup>10,11)</sup>。

## II 結果

共焦点型レーザー顕微鏡による観察では、BAF 投与により 2 時間後には細胞質内の calcein の減弱を認めた。またこの現象は、鉄キレート剤 (desferal) にて抑制された (図 1)。BAF 単剤また *t*-BuOOH 単剤 (20  $\mu$ M) では有意な変化はなかったが、BAF で前処置を行い *t*-BuOOH を投与したところ、2 時間後には 58% がネクローシスをきたした (図 2)。また、同様に共焦点型レーザー顕微鏡にてミトコンドリア内膜のポテンシャルを評価したところ、BAF 単剤群および *t*-BuOOH 単剤群では、MPT の発生はみられなかったが、BAF + *t*-BuOOH 併用群では、1 時間後には MPT の発生を認め細胞死に至った。ROS の産生増加を測定したところ、*t*-BuOOH 単剤群では、軽度の ROS の産生を認めたが、BAF + *t*-BuOOH 群では、ROS の産生が著明に亢進した (図 3)。

ミトコンドリア内の鉄イオン濃度変化を調べるために、cold-loading and warm-incubation 法を用いラット肝細胞のミトコンドリアを calcein で染色したところ、BAF 投与後、ミトコンドリア内の calcein は減弱を認めた。また Ru360 (ミトコンドリア膜上の calcium uniporter 拮抗剤) にて前処置を行うと、BAF によるミトコンドリア内の calcein の減弱は抑制された (図 4)。

## III 考察

以前より C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害および非アルコール性脂肪性肝炎といった慢性肝疾患の増悪因子として、鉄の重要性は示唆されている。遊離鉄は容易に電子の受け渡しを起し、Fenton 反応 ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \cdot + \text{OH}^-$ ) を介して、ヒドロキシラジカル ( $\text{OH} \cdot$ ) を産生する触媒として働く。ラジカルの産生はミトコンドリア膜の透過性の変化 (mitochondrial permeability transition : MPT) を惹起して、チトクローム c の遊離を介してアポトーシスを誘導すると考えているが<sup>12,12)</sup>、2 価鉄自体も MPT を引き起こす<sup>13)</sup>。

本研究において、われわれは種々の蛍光指示薬を用い、細胞内小器官のイオン濃度や膜電位変化について、共焦点レーザー顕微鏡による詳細な解析を行っ

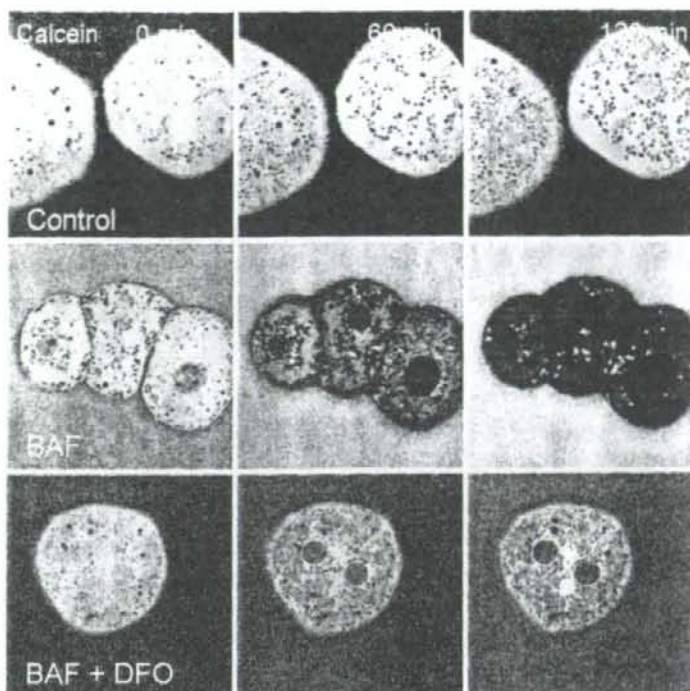


図 1 Bafilomycin による細胞質内 calcein の蛍光減弱および鉄キレート剤による抑制

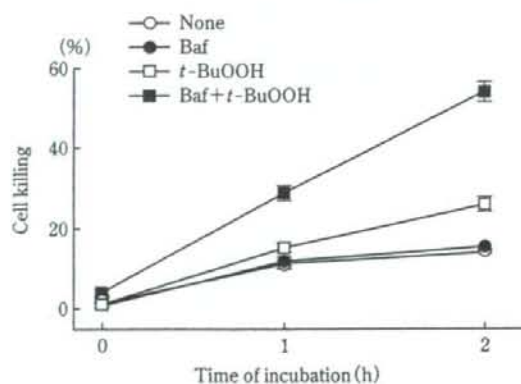


図 2 Bafilomycin と *t*-BuOOH 併用による肝細胞ネクローシスの誘導

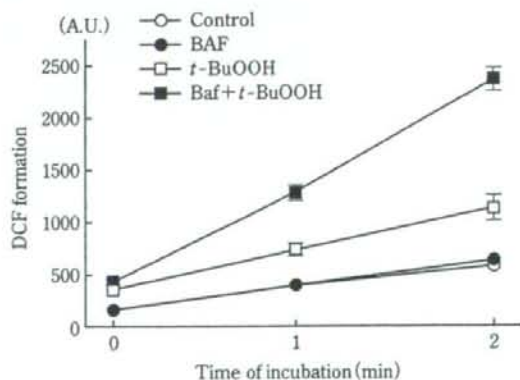


図 3 Bafilomycin と *t*-BuOOH 併用による ROS の産生

た。calcein 蛍光は 2 価の金属イオンにより減弱する特性を有しており<sup>14)</sup>、その特徴を用いて細胞質内の金属イオンの濃度変化を調べた。リソソーム膜上の proton-ATPase 阻害剤である BAF を投与したところ、細胞質内の calcein 蛍光は減弱 (図 1)、細胞質内の 2 価の金属イオン濃度の上昇が示唆された。さ

らに鉄キレート剤である desferal にてこの蛍光減弱は抑制された。つまり、BAF 投与によりリソソームのアルカリ化を生じ、2 価鉄イオンがリソソームより細胞質内に遊離したと考えられた。さらに、単離培養した肝細胞に *t*-BuOOH と BAF を用いて MPT、細胞死また ROS の産生について調べた。*t*-BuOOH は

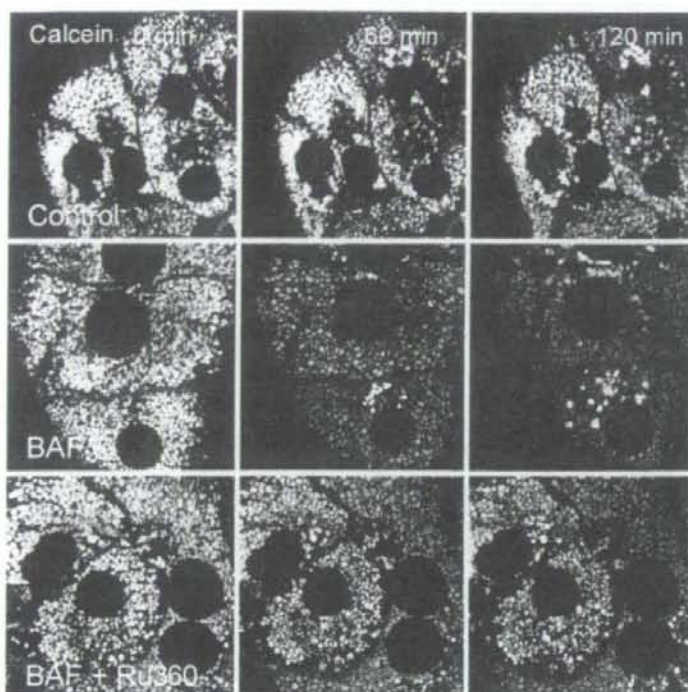


図 4 Bafilomycin によるミトコンドリア内の calcein の蛍光減弱と calcium uniporter 拮抗剤による抑制

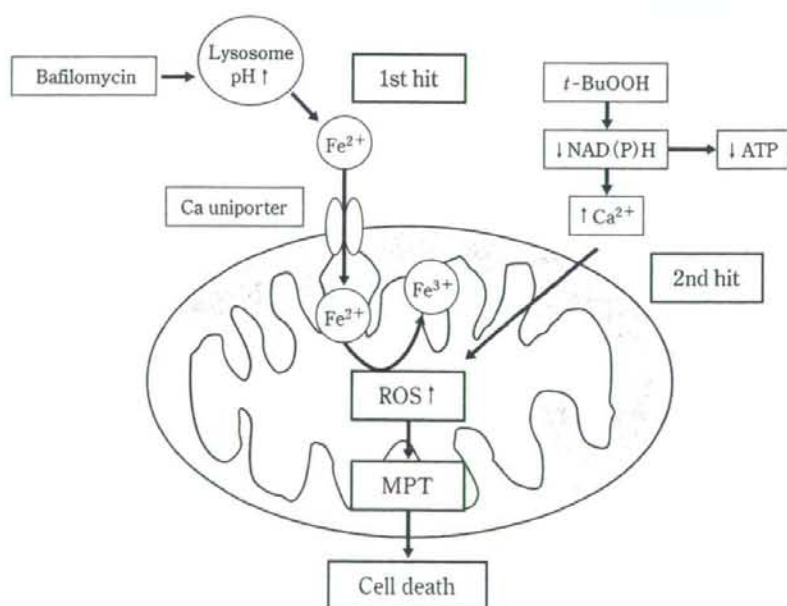


図 5 リソゾームからの 2 価鉄の遊離およびミトコンドリアへの流入と酸化ストレスによる細胞死誘導メカニズム

ミトコンドリア内の NADPH または glutathione の低下をもたらす、ミトコンドリア内の ROS の産生をひき起こす<sup>15)</sup>。

また *t*-BuOOH (>100  $\mu$ M) では、MPT を起こし細胞死に至ることが報告されている<sup>16)</sup>。そこで、リソソームより遊離した 2 価鉄イオンの役割を調べるために、低濃度の *t*-BuOOH (25  $\mu$ M) を用いて実験を行った。BAF 単剤ならびに *t*-BuOOH 単剤では有意な ROS の産生の亢進や細胞死は認められないが、BAF と併用することにより著明な ROS の感受性の亢進を認め細胞死をきたした (図 2, 3)。

2 価鉄イオンのミトコンドリアへの流入経路を調べるため、cold-loading warm-incubation 法によりミトコンドリアを calcein で染色し、鉄イオン濃度変化について評価した。BAF 投与によりミトコンドリア内の calcein 蛍光は減弱し (図 4)、ミトコンドリア内の 2 価鉄イオン濃度の上昇が示唆された。またこの現象はミトコンドリア膜上の calcium uniporter 拮抗剤である Ru360 で前処置することにより抑制され (図 5)、リソソームより細胞質内へ遊離された 2 価鉄イオンは、ミトコンドリア膜上の calcium uniporter を介した経路でミトコンドリア内に流入したと考えられた。肝細胞質内に 2 価鉄イオンが増加した状況下では酸化ストレス負荷に対する感受性が亢進し、MPT を生じ肝障害に至るメカニズムが示唆された。C 型慢性肝炎、NASH やアルコール性肝障害などの慢性肝疾患において、鉄の沈着また過剰鉄は、酸化ストレスを上昇させることにより病態を増悪させることが報告されている。本研究により、酸化ストレスによる肝障害において、リソソームより遊離された鉄は ROS の感受性の亢進をもたらす、病態増悪のメカニズムに関与している可能性が示された。

## 要 旨

【目的】酸化ストレスの増大は慢性肝炎の病態進展に深く関与しており、その一因として鉄過剰に伴う活性酸素種 (ROS) の産生が重要視されている。しかし肝細胞障害時における鉄の細胞内動態については不明の点が多い。そこでわれわれは、酸化ストレス誘導肝細胞障害における、肝細胞内の 2 価鉄の局在変化と役割について、種々の蛍光指示薬を用い細

胞内小器官のイオン濃度や膜電位変化を詳細に解析した。

【方法】マウスおよびラット初代培養肝細胞を用い、calcein, TMRM, propidium iodide (PI) で細胞染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2 価イオンの局在、ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) および細胞死の過程を観察した。また DCF 蛍光により ROS 産生を測定した。

【結果】液胞型  $H^+$ -ATPase 阻害剤 Bafilomycin (BAF; 50nM) 添加 2 時間後には細胞質の calcein 蛍光強度が 47.8% 減弱したが、desferal (DFO) および starch-desferal (sDFO) により細胞質とリソソームの鉄をそれぞれキレートすることにより calcein 蛍光強度減弱が抑制された。この現象よりリソソームから細胞質への  $Fe^{2+}$  流入を反映していることが判明した。BAF および *tert*-butylhydroxide (*t*-BuOOH; 25  $\mu$ M) おおのこの単独投与では MPT は認められなかったが、BAF/*t*-BuOOH 共添加では MPT 発生に続き細胞死が観察された。ROS 産生も BAF と *t*-BuOOH おおのこの単独添加で 46% および 65% であったが、共添加時には 212% と著明に増加した。肝細胞を低温下でミトコンドリアのみ calcein 染色して観察すると、ミトコンドリアの calcein 蛍光は BAF 添加により消失したが、この現象は DFO, sDFO および Ca-uniporter 阻害剤 Ru360 によりそれぞれ抑制された<sup>17)</sup>。

【結論】酸化ストレスによる肝障害において、リソソームより遊離された 2 価鉄は ROS の感受性の亢進をもたらす、病態増悪のメカニズムに関与している可能性が示された (本研究は、サウスカロライナ医科大学 John J. Lemasters 教授との共同研究である)。

## 文 献

- 1) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de GH. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol* 2004; 40 (4): 607-15.
- 2) Lemasters JJ. Rusty notions of cell injury. *J Hepatol* 2004; 40 (4): 696-8.
- 3) Ma Y, de GH, Liu Z, Hider RC, Petrat F. Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinone fluorescent probes. *Biochem J* 2006; 395 (1): 49-55.

- 4) Gagliardi S, Rees M, Farina C. Chemistry and structure activity relationships of baflomycin A1, a potent and selective inhibitor of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Curr Med Chem* 1999 ; 6 (12) : 1197-212.
- 5) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de GH. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol* 2004 ; 40 (4) : 607-15.
- 6) Kerkweg U, Jacob M, de GH, Mannherz HG, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells : contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 2003 ; 76 (3) : 501-8.
- 7) Rauen U, Kerkweg U, de GH. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes : a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 2007 ; 54 (1) : 77-86.
- 8) Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997 ; 273 (6 Pt 1) : C1783-92.
- 9) Lemasters JJ, Trollinger DR, Qian T, Cascio WE, Ohata H. Confocal imaging of Ca<sup>2+</sup>, pH, electrical potential, and membrane permeability in single living cells. *Methods Enzymol* 1999 ; 302 : 341-58.
- 10) Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 ; 290 (5) : H2024-34.
- 11) Nieminen AL, Gores GJ, Bond JM, Imberti R, Herman B, Lemasters JJ. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992 ; 115 (2) : 147-55.
- 12) Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004 ; 40 (5) : 1170-9.
- 13) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de GH. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol* 2004 ; 40 (4) : 607-15.
- 14) Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik IZ. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am J Physiol* 1995 ; 268 (6 Pt 1) : C1354-61.
- 15) Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 1995 ; 307 (Pt 1) : 99-106.
- 16) Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH : NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1997 ; 272 (4 Pt 1) : C1286-94.
- 17) Uchiyama A, Kim JS, Kon K, Jaeschke H, Ikejima K, Watanabe S, et al. Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology* 2008 ; 48 (5) : 1644-54.

\* \* \*



## 19. KK-A<sup>y</sup>マウスにおける肝再生不全

### —Pioglitazone による改善効果の検討—

順天堂大学医学部 消化器内科

青山友則 池嶋健一 今一義  
山形寿文 柳沼礼子 山科俊平  
渡辺純夫

#### Effect of Pioglitazone on Liver Regeneration Failure Following Partial Hepatectomy in Obese KK-A<sup>y</sup> Mice

Tomonori Aoyama, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon, Hisafumi Yamagata,  
Reiko Yaginuma, Shunhei Yamashina and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

#### はじめに

非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) はインスリン抵抗性やアディポサイトカイン発現異常に伴い脂肪肝から脂肪性肝炎、さらには肝硬変へと進行することが知られている<sup>1)</sup>が、その病態進展にはインスリン抵抗性を基盤とした酸化ストレスの増加に伴う細胞障害の増悪とともに、肝再生をはじめとした組織修復機転の破綻が考えられている。また、NASH の治療方法としてはさまざまな薬剤の有用性が報告されているものの<sup>2)</sup>、とくに組織修復をターゲットとした治療についてはいまだ確立されていない。このような脂肪肝と肝再生不全の関連を背景として、今回私たちは、ヒトのメタボリックシンドロームにきわめて類似した表現形を呈する KK-A<sup>y</sup>マウスに対し、肝切除を行い肝再

生について検討した。また、KK-A<sup>y</sup>マウスに対しインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体 pioglitazone を投与し肝再生への効果について調べた。

なお、本稿は口演抄録である。

#### I 方 法

雄性 KK-A<sup>y</sup>および C57Bl/6 マウスに Higgins and Anderson 法にて 70% 肝切除を行いその後の生存を観察した。肝細胞への BrdU 摂取を免疫染色で検討した。肝組織中の cyclin D1 発現および STAT-3 リン酸化を Western blot 法で検出した。血清 IL-6、アディポネクチンおよびレプチンは ELISA 法で測定した。肝組織中 TNF- $\alpha$  および socs-3 mRNA は real time RT-PCR 法で検出した。また、KK-A<sup>y</sup>マウスに対し pioglitazone (25 mg/kg) を 5 日間経口投与し、その

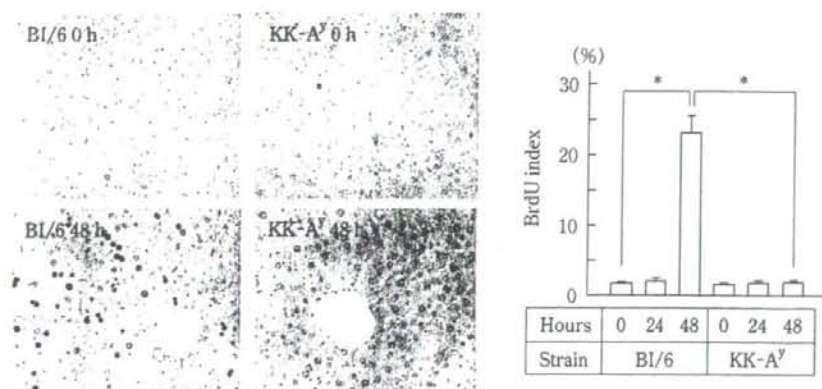


Fig. 1 肝切除後の肝細胞への BrdU 摂取

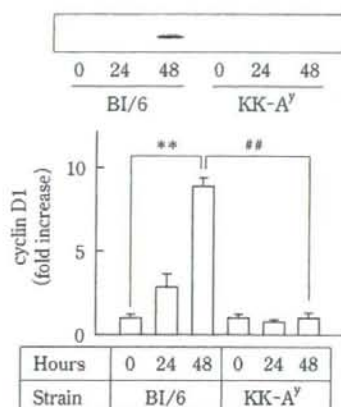


Fig. 2 肝切除後の cyclin D1 発現

後同様に肝再生を検討した。

## II 結 果

肝切除後 48 時間までにすべての BI/6 マウスは生存したが、KK-A<sup>y</sup> マウスは半数が死亡した。肝切除 48 時間後の肝細胞の BrdU 摂取率は BI/6 では 22% に上昇したが、KK-A<sup>y</sup> マウスでは 2% 以下に留まった ( $p < 0.05$ )。また、肝切除 48 時間後には BI/6 マウスでは cyclin D1 の発現レベルが約 9 倍に上昇したが、KK-A<sup>y</sup> マウスでは殆ど上昇しなかった (Fig. 1, 2)。

一方、pioglitazone を前投与した KK-A<sup>y</sup> マウス (KK-A<sup>y</sup>+pio マウス) は肝切除後 48 時間でもすべて生存しており、生存率の著明な改善を認めた。肝

細胞 BrdU 摂取率は KK-A<sup>y</sup>+pio マウスでは 8% と有意に改善した ( $p < 0.05$ )。肝組織中 cyclin D1 発現も肝切除後 24 時間で KK-A<sup>y</sup> マウスと比べ約 4 倍に上昇した ( $p < 0.05$ )。また、肝組織中 TNF- $\alpha$  mRNA は KK-A<sup>y</sup> マウスで肝切除後 1 時間に BI/6 マウスと比較し 8.9 倍と著明な上昇を認めたが、KK-A<sup>y</sup>+pio マウスでは 2.1 倍に留まった。血清 IL-6 は KK-A<sup>y</sup> マウスで BI/6 マウスと比較し肝切除後 24 時間をピークとした上昇を示したが、KK-A<sup>y</sup>+pio マウスではピークは 6 時間にシフトし、かつ上昇は BI/6 マウスと同等なレベルまで抑制された。さらに、KK-A<sup>y</sup> マウスでは肝切除後持続的な STAT-3 のリン酸化および socs-3 mRNA の発現増強を認めたが、pioglitazone 投与によりいずれも減弱し BI/6 マウスと同様なパターンを示した。血清アディポネクチンは KK-A<sup>y</sup> マウスで低アディポネクチン血症が認められたが、KK-A<sup>y</sup>+pio マウスでは BI/6 マウスと同等なレベルまで改善した。血清レプチンは KK-A<sup>y</sup> マウスで肝切除後 24 時間をピークとした著明な上昇を示したが、KK-A<sup>y</sup>+pio マウスではピークが 6 時間にシフトし、かつ上昇が抑制された。

## III 考 察

脂肪肝と肝再生不全については、肝切除後の術後肝不全の原因としてその関連が以前より指摘されていた。しかし、肝切除の多くは肝癌に対して行われておりかつその背景肝の主体はウイルス性肝炎やア

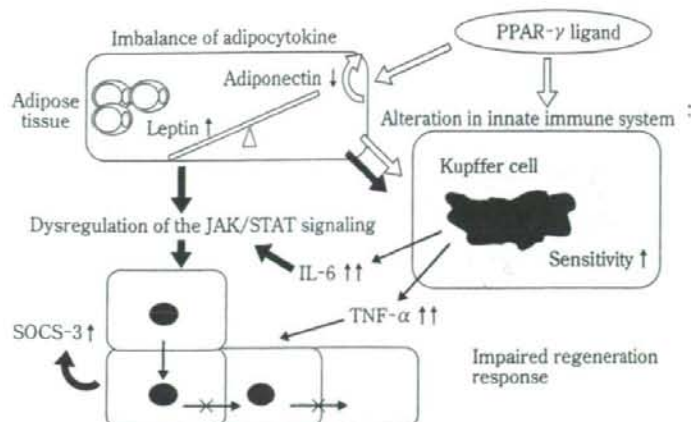


Fig. 3 Working hypothesis

アルコール性肝障害であることが大半であったため、脂肪肝そのものによる肝切除後の術後経過については系統的な解析が困難であった。一方、近年の移植技術の進歩とともに肝移植件数が増加したことから、90年代前半より欧米をはじめとして脂肪肝グラフトと術後肝不全の関係が指摘され始めた<sup>3)</sup>。本邦でも生体肝移植数の増加とともに脂肪肝と移植後肝不全の関連が問題視されている<sup>4)</sup>。脂肪肝グラフトの肝不全の原因として脂肪蓄積に起因する肝再生不全、虚血再灌流障害などが考えられている<sup>5)</sup>が明らかになっていない。他方、生活習慣の欧米化などに伴い肝臓病領域ではメタボリックシンドロームを背景とした脂肪肝や脂肪性肝炎が増加し、その病態解明および治療方法の確立が急務となっている。今回私たちはKK-A<sup>y</sup>マウスを用いて肝切除後の肝再生を検証したが、KK-A<sup>y</sup>マウスでは肝切除後48時間以内に半数が死亡する著明な肝再生不全を認めた。一方、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体 pioglitazone の前投与によりKK-A<sup>y</sup>マウスの肝再生不全は一部改善した。そのメカニズムとして、PPAR-γ ligand による直接的な Kupffer 細胞への作用およびアディポサイトカイン発現バランスの是正

が、再生機転に伴う TNF-α および IL-6, JAK/STAT 系の反応を正常化させたことにより、肝再生の改善に寄与したものと考えられた (Fig. 3)。チアゾリジン誘導体が NASH における組織修復機転の障害を改善することにより NASH の進展を抑制することが示唆された。

## 文 献

- 1) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 843-5.
- 2) Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol.* 2008; 43 (7): 509-18. Epub 2008 Jul.
- 3) Adam R, Reynes M, Johann M et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991; 23: 1538-40.
- 4) 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告, 移植 2006; 41: 599-608.
- 5) Clavien PA, Harvey PR, Strassberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: an overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53: 957-78.

\* \* \*

## 27. NAFLD 患者に対する低用量ピオグリタゾン 投与の有用性について

順天堂大学医学部 消化器内科

柳 沼 礼 子 池 嶋 健 一 福 原 京 子  
青 山 友 則 今 一 義 水 井 智 和  
山 科 俊 平 鈴 木 聡 子 渡 辺 純 夫

### Efficacy of Low Dose Pioglitazone in Japanese Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Reiko Yaginuma, Kenichi Ikejima, Kyoko Fukuhara,  
Tomonori Aoyama, Kazuyoshi Kon, Tomokazu Mizui,  
Shunhei Yamashina, Satoko Suzuki and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

#### はじめに

メタボリックシンドロームに伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) の病態基盤として、インスリン抵抗性が重要視されていることから、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体が薬物治療の選択肢として注目されている。実際、同系薬剤のピオグリタゾンはインスリン抵抗性改善作用のみならず、基礎的検討から Kupffer 細胞活性化抑制に伴う炎症抑制作用や肝星細胞活性化抑制による線維化進展抑制なども十分に期待される (図 1)<sup>1)</sup>。しかし、本邦の非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) 患者におけるピオグリタゾンの有用性および至適用量設定についての検証はまだまだ十分になされていない。そこで、今回私たちは、インスリン抵

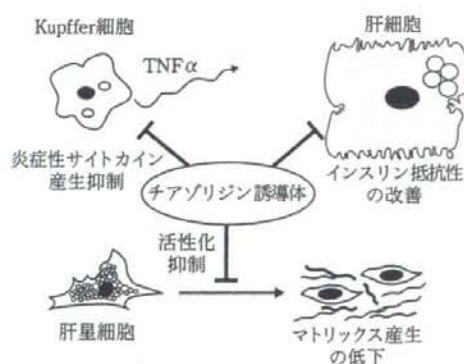


図 1 チアゾリジン誘導体 (ピオグリタゾン) の多角的作用機序

抗性を有する NAFLD 患者に対するピオグリタゾン投与の用量設定、およびその効果と安全性について検証した。なお、本稿は口演抄録である。