

表 4 NASH患者における除鉄療法の効果

患者 Number	年齢/性別	除鉄療法 期間/瀉血量	BMI (kg/m ²)		ALT (IU/L)		ヘモグロビン (g/dl)		血清鉄 (μg/dl)		フェリチン (ng/ml)		肝内鉄スコア		肝内8-OHdG (/10 ⁵ μm ²)	
			Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
1	47/M	9か月/2200ml	31.0	29.7	59	32	15.6	14.7	220	172	718	77	8	4	40.0	21.7
2	66/M	9か月/1000ml	26.2	25.9	171	110	14.5	14.2	188	155	431	382	6	8	32.0	39.0
3	67/M	12か月/1800ml	27.3	26.5	98	56	14.2	13.6	141	115	539	123	5	4	27.0	22.3
4	41/F	14か月/2400ml	29.0	27.8	136	97	14.5	13.2	170	122	481	53	5	2	25.3	12.3
5	59/F	13か月/1400ml	35.0	32.2	46	38	14.9	13.6	138	101	223	75	5	1	20.0	12.7
6	41/M	12か月/2800ml	25.1	25.3	122	89	15.3	13.9	92	72	374	68	4	4	19.0	5.7
7	59/F	10か月/800ml	23.5	22.2	133	72	12.2	11.5	202	154	847	272	7	5	17.6	6.7
8	54/F	8か月/1200ml	25.2	25.3	82	49	15.7	15.2	124	107	300	109	2	2	13.3	12.0
9	42/M	12か月/1800ml	28.1	28.3	94	42	16.4	14.7	120	77	537	39	5	2	12.3	5.0
10	39/M	9か月/2000ml	28.1	24.5	118	77	16.2	14.3	134	100	306	34	2	0	11.7	3.7
11	64/M	11か月/1200ml	30.4	30.1	37	49	15.0	14.2	96	94	339	46	4	2	10.0	10.7
Mean			28.1*	27.1*	99.6†	64.6†	15.0†	13.9†	148†	115†	463†	116†	4.8†	3.1†	20.7†	13.8†

* P=0.02, † P<0.01

“hits”? Gastroenterology 1998 ; 114 : 542.

- 4) Seki S, Kitada T, Yamada T, et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. J Hepatol 2002 ; 37 : 56.
- 5) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Hepatol 2003 ; 38 : 32.
- 6) Tesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Am J Gastroenterol 2005 ; 100 : 850.
- 7) Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP, et al. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxoG. Nature 1991 ; 349 : 431.
- 8) Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a biomarker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. Mutat Res 1997 ; 387 : 147.
- 9) Konishi M, Iwasa M, Yamauchi K, et al. Lactoferrin inhibits lipid peroxidation in patients with chronic hepatitis C. Hepatol Res 2006 ; 36 : 27.
- 10) Kaito M, Horiike S, Tanaka H, et al. Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of chronic hepatitis C patients without sustained virological response after completion of interferon therapy. J Gastroenterol 2006 ; 41 : 713.
- 11) Ishihara T, Iwasa M, Urawa N, et al. Elevation of 8-isoprostane in patients with hepatitis C virus infection undergoing hemodialysis. J Clin Virol 2006 ; 37 : 232.
- 12) Kaito M, Iwasa M, Kobayashi Y, et al. Iron reduction therapy by phlebotomy reduces lipid peroxidation and oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol 2006 ; 41 : 921.
- 13) Fujita N, Sugimoto R, Ma N, et al. Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis C and B. J Viral Hepat 2008 ; 5 : 498.
- 14) Tanaka H, Fujita N, Sugimoto R, et al. Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased

- risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Brit J Cancer* 2008 ; 98 : 580.
- 15) Horiike S, Kawanishi S, Kaito M, et al. Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005 ; 43 : 403.
- 16) Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, et al. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Rad Biol Med* 2007 ; 42 : 353.
- 17) Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 147.
- 18) Robertson G, Leclercq I, Farrel GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis : Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 ; 281 : G1135.
- 19) Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease : cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006 ; 131 : 934.
- 20) Fujita N, Sugimoto R, Takeo H, et al. Hepcidin expression in the liver : relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med* 2007 ; 13 : 97.
- 21) Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, et al. Sustained responders recover from impaired hepcidin secretion after peginterferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008 ; 49 : 702.
- 22) 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* 2004 ; 126 : 840.
- 23) Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease : implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005 ; 33 : 145.
- 24) Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, et al. Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 ; 22 : 1886.
- 25) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N, et al. Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* 1994 ; 89 : 986.
- 26) Yano M, Hayashi H, Yoshioka K, et al. A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C : a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol* 2004 ; 39 : 570.
- 27) Iwasa M, Iwata K, Kaito M, et al. Efficacy of long-term dietary restriction of total calories, fat, iron, and protein in patients with chronic hepatitis C. *Nutrition* 2004 ; 20 : 368.
- 28) Kato J, Kobune M, Nakamura T, et al. Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 8697.
- 29) Yamamoto M, Iwasa M, Iwata K, et al. Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 ; 22 : 498.

* * *

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者における 肝組織内 8-OHdG 量よりみた体内鉄過剰の意義

三重大学大学院病態制御医学講座消化器内科学

藤田 尚己 宮地 洋英 田中 秀明 竹尾 雅樹
小林 由直 岩佐 元雄 竹井 謙之

1. はじめに

「飽食の時代」と言われる今日の高エネルギー・高脂肪の欧米型食生活への変化に加え、自動車社会の発達や喫煙・飲酒などの生活習慣の変化によって、近年本邦においては肥満人口の急激な増加が大きな社会的問題となっている。そして肥満とそれに基づくメタボリックシンドローム患者の増加の問題は急速にその認識を深めている。

Ludwig が 80 年に「明らかな飲酒歴がないにも関わらず肝病理学上アルコール性肝障害に類似する組織像を呈する疾患」として非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) を提唱してから¹⁾既に四半世紀が経過したが、その肥満や糖尿病 (インスリン抵抗性) との深い関連性や先に述べたような社会背景を考えると、本邦において今後その患者数はますます増加することが危惧されている。

NASH 発症にはまず肝での脂肪沈着が起こり (first hit), これに何らかの second hit が加わることによって発症するといった two hit theory が現在のところ最も有力視されているが²⁾, second hit の解明はその病因論も含めてまだまだ研究途上である。一方、NASH においては高率に軽度

から中程度の鉄沈着をその肝臓内に認めることが以前より指摘されている^{3)~5)}。鉄は生体内においてその生命維持に必要不可欠な分子である一方、過剰に存在すると生体に害を及ぼす。細胞内で過剰に鉄が存在すると、まず貯蔵鉄の増加によって害を及ぼさないように隔離貯蔵されるが、同時に自由鉄も増加する。自由鉄のうち 2 価鉄は Fenton 反応によって最も有害な活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) であるヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) を発生させる (図 1)。このヒドロキシラジカルが核酸のグアニンの 8 位にアダクトすることにより 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が産生される (図 1)。そこで今回我々は NASH 患者における肝内 8-OHdG 量を測定し、各種臨床的パラメーターとの相関を検討することによって、NASH の病態における肝内酸化ストレスの関与やその発生機序の解明を試みた。また、NASH における除鉄療法の効果も合わせて検討した。

2. 対象と方法

2003 年 3 月より 2006 年 12 月の間に当科において肝機能異常の精査の為に入院し肝生検術が施行され NASH と診断された 38 例を対象とした

Iron Overload is Associated with Hepatic Oxidative DNA Damage in Nonalcoholic Steatohepatitis Patients.

Naoki Fujita M.D., Hirohide Miyachi M.D., Hideaki Tanaka M.D., Masaki Takeo M.D., Yoshinao Kobayashi M.D., Motoh Iwasa M.D. and Yoshiyuki Takei Prof. Department of Gastroenterology and Hepatology, Institute of Medical Sciences, Mie University Graduate School of Medicine, Mie, Japan.

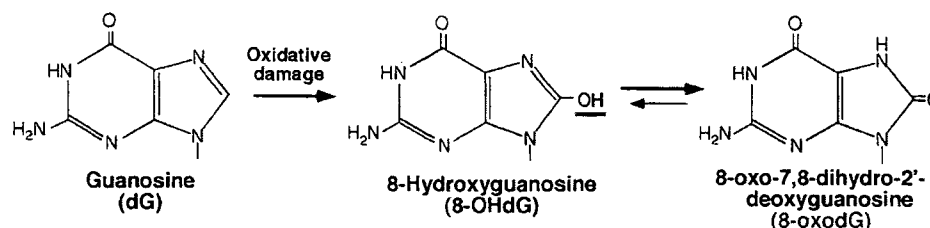
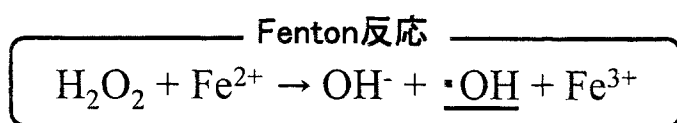


図1 鉄によるヒドロキシラジカルの産生および8-OHdGの産生経路.

過剰な自由2価鉄はFenton反応によって3価鉄に変換される. この際, 強力な活性酸素種であるヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)が発生する. このヒドロキシラジカルがグアニンの8位にアダクトすることで8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)が産生される.

表1 NASH患者と単純性脂肪肝患者

Characteristics	NASH (N = 38)	単純性脂肪肝 (N = 24)	P values
年齢 (yr)	59.0 (29-78)	51.0 (19-73)	NS
性別(男/女)	22/16	11/13	NS
BMI (kg/m ²)	25.6 (22.5-36.7)	24.7 (16.3-35.1)	NS
糖尿病 (N (%))	18 (47.4%)	8 (33.3%)	NS
高血圧症 (N (%))	14 (36.8%)	9 (37.5%)	NS
高脂血症 (N (%))	25 (65.8%)	15 (62.5%)	NS
血液データ			
ALT (IU/L)	63.0 (23-171)	59.0 (12-863)	NS
AST (IU/L)	58.0 (27-134)	37.0 (17-443)	0.0047
総コレステロール (mg/dL)	201 (151-358)	216 (155-276)	NS
中性脂肪 (mg/dL)	155 (63-443)	125 (73-261)	NS
空腹時血糖 (mg/dL)	102 (71-241)	99 (73-427)	NS
血清インスリン ($\mu\text{U/mL}$)	12.1 (2.4-34)	9.2 (1.0-18)	0.0083
HOMA-IR	3.48 (1.51-9.56)	2.21 (1.05-9.24)	0.0010
ヒアルロン酸 (ng/mL)	66.5 (5-365)	19.6 (6-258)	0.0004
血小板 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	18.0 (4.9-37.0)	23.0 (13.1-45.2)	0.0146
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	448 (274-633)	461 (367-558)	NS
ヘモグロビン (g/dL)	14.3 (8.3-18.9)	14.7 (11.5-18.9)	NS
血清鉄 ($\mu\text{g/dL}$)	126 (88-220)	93 (25-188)	0.0059
トランスフェリン飽和度 (%)	38.0 (22.3-87.6)	32.4 (9.4-43.8)	0.0152
血清フェリチン (ng/mL)	283 (69-847)	139 (18-640)	<0.0001
肝組織所見			
Inflammatory activity (1/2/3)	14/21/3	-	-
Fibrosis staging (1/2/3/4)	8/17/1/2	-	-
脂肪化 (%)	43 (15-86)	51 (28-90)	NS
肝内鉄スコア	3 (0-8)	0 (0-7)	<0.0001

HOMA-IR, Homeostasis of model assessment-insulin resistance.

Results are presented as numbers (percentages) for qualitative data and as medians (ranges) for quantitative data.

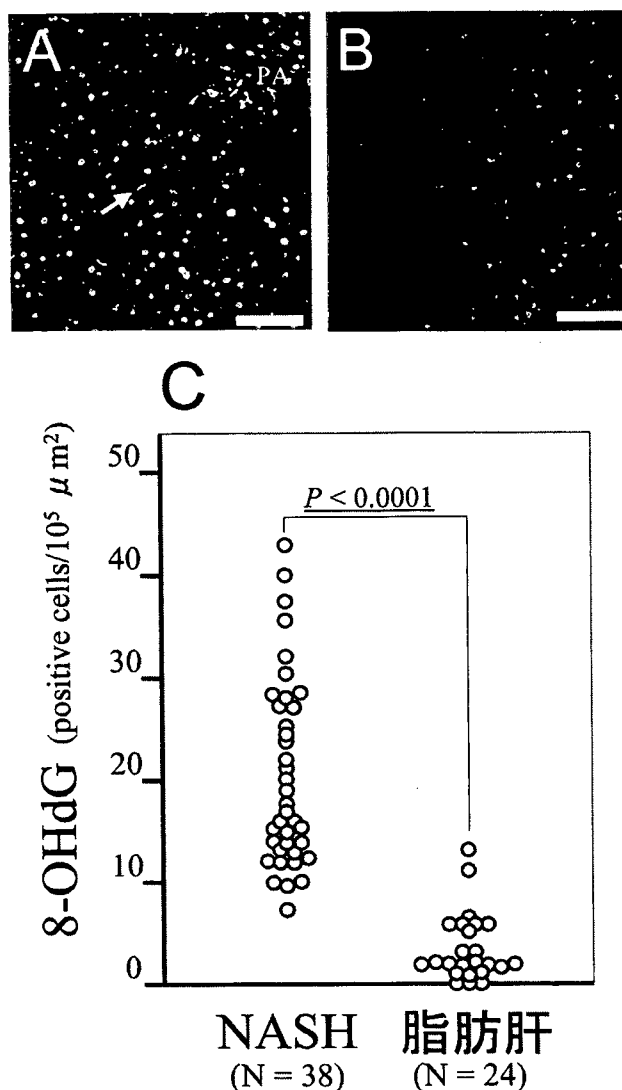


図2 NASH および単純性脂肪肝における免疫染色法による肝組織内 8-OHdG の同定。
マウス抗ヒト 8-OHdG モノクローナル抗体を一次抗体に、Alexa488 でラベルしたヤギ抗マウス IgG 抗体を二次抗体に用い免疫染色を施し、蛍光顕微鏡にて観察している。A: NASH では比較的多くの肝細胞や Kupffer 細胞 (白矢印) の核内に 8-OHdG 陽性所見を認める (PA = portal area)。B: 一方単純性脂肪肝では多くの症例でその染色性は弱い。Scale bar = 100 μm。C: 一定の視野あたりの 8-OHdG 陽性肝細胞数は NASH 群で単純性脂肪肝群に比し有意に高値であった。

(表 1)。なお、同時期に肝生検が行われるも肝炎の所見なく単純性脂肪肝とされた 24 例を比較対象とした。全例 HCV 抗体・HBs 抗原陰性、また飲酒量は 20 g/日以下であった。得られた肝組織に既報の如く⁶⁾ 抗 8-OHdG 抗体 (日本老化制御研

究所, 静岡) による蛍光免疫染色を施し, image analyzer にて陽性肝細胞数をカウントした。また, 肝組織内の鉄量を total iron score (TIS)⁷⁾ として半定量的に評価した。

3. 結 果

(1) NASH における肝内 8-OHdG 量の病態への関与

NASH 群と脂肪肝群の間では年齢・性別・体重・合併症の頻度に有意差を認めなかったが, NASH 群では有意に AST 値やヒアルロン酸・血小板数など, より肝病変の進展を示唆する血液検査所見であった (表 1)。また, 血中インスリン値や HOMA-IR (Homeostasis of model assessment-insulin resistance) によるインスリン抵抗性も, より NASH 群に強く, 更には各種血液鉄関連マーカーや肝内鉄量も NASH 群でより高値であった。つまり, NASH 群では, より鉄過剰状態にあると思われた。

図 2 に典型的な NASH と脂肪肝における肝内 8-OHdG 染色を示す。NASH 症例では比較的強く肝細胞核内に 8-OHdG 陽性シグナルを認めるのに対し, 脂肪肝症例においては, 比較的その染色性は弱く, 全例の比較で 8-OHdG 陽性肝細胞数に有意差を認めた (median = 17.5 vs. 2.0 positive cells/10⁵ μm²) (図 2 C)。そこで NASH 群において肝内 8-OHdG 量と各種臨床データとの相関をみてみると, 8-OHdG と血清鉄値や肝内鉄量とは有意な正の相関関係にあった (図 3 A, B)。更に 8-OHdG 量は血糖値や HOMA-IR, 肝内脂肪量とも正の相関関係にあった (図 3 C, D, E)。そして NASH 群ではインスリン抵抗性と肝内鉄量も正の相関関係にあった (図 3 F)。つまり, NASH においては肝脂肪化-インスリン抵抗性-鉄過剰が, 酸化ストレスの発生を介して, 各々が各々に作用しあい, より肝病変を進展させている可能性が想定される (図 4)。

(2) NASH における除鉄療法の効果

上記の肝脂肪化-インスリン抵抗性-鉄過剰の crosstalk による肝病態への関与は C 型慢性肝炎にみられるそれと同様である (図 4)^{10)~13)}。C 型慢性肝炎においては瀉血^{14),15)} や鉄制限食¹⁶⁾ と

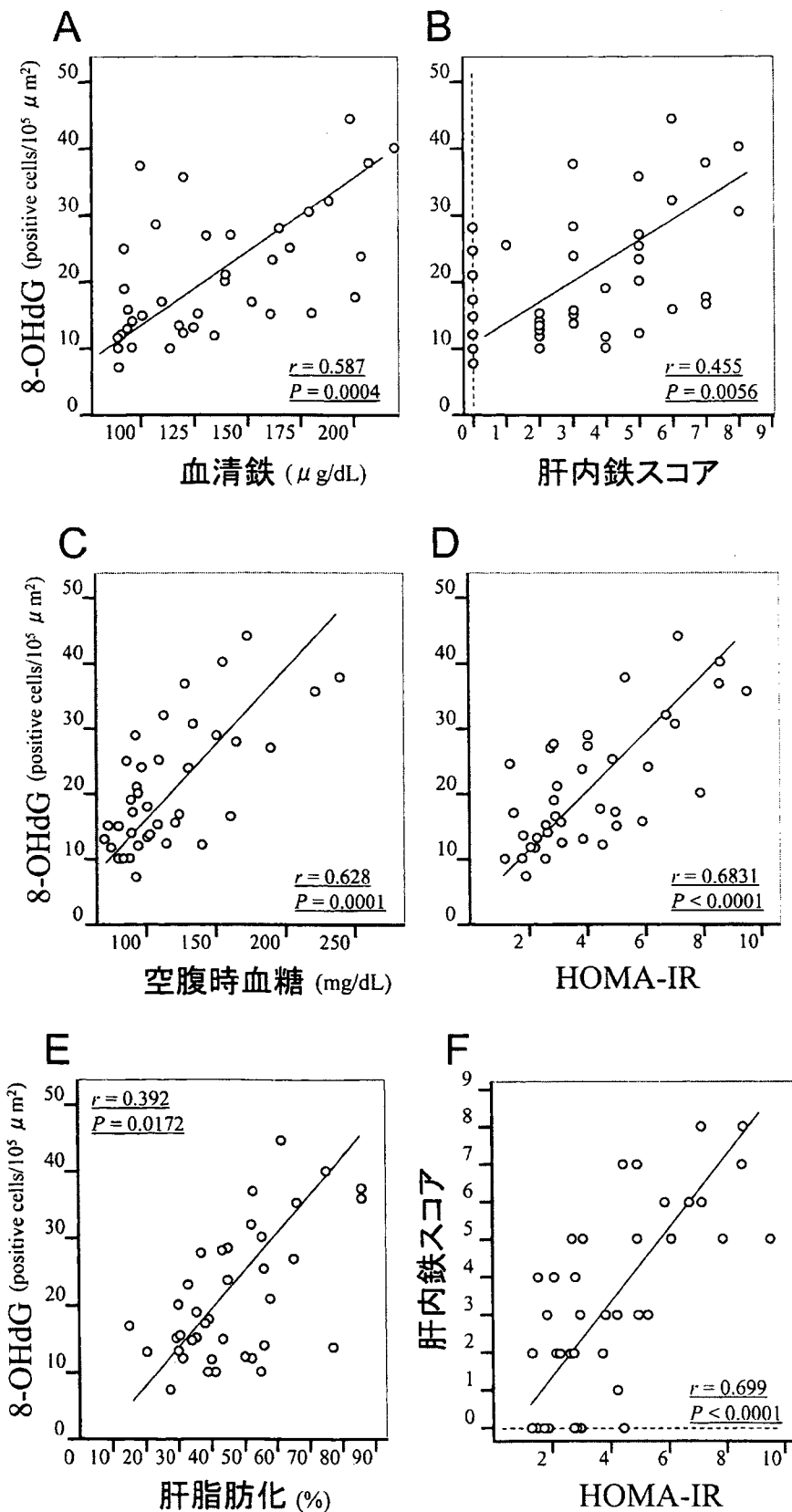


図3 NASHにおける肝内8-OHdG量と各種検査値との相関関係。
 NASH患者38例において免疫染色による肝内8-OHdG量は血清鉄(A), 肝内鉄量(B), 空腹時血糖(C), インスリン抵抗性(HOMA-IR)(D), 肝内脂肪化の程度(E)と正の相関関係にあった。更にNASHにおいてはインスリン抵抗性と肝内鉄量も有意な相関関係にあった(F)。

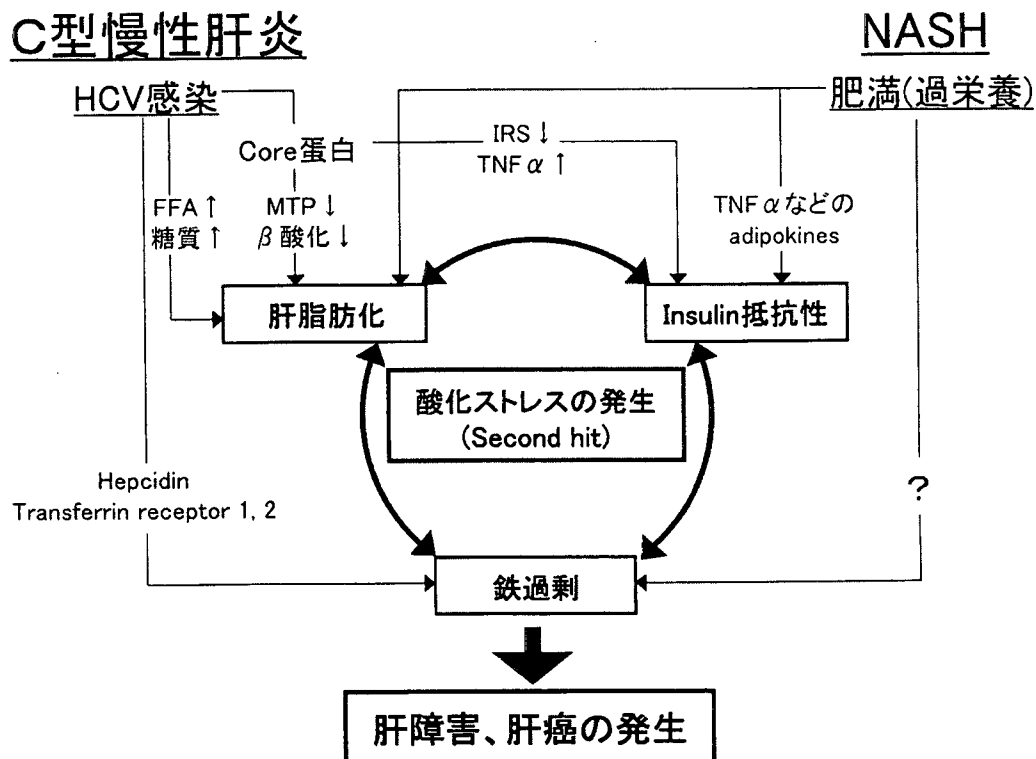


図4 C型慢性肝炎とNASHにおける肝内酸化ストレスの発生を介した肝病態進展のメカニズム。C型慢性肝炎においては過栄養による肝脂肪化の発生に加えて、core蛋白等による直接的な脂肪化やインスリン抵抗性の発生が指摘されている。更にC型肝炎においては様々な鉄調整関連分子の発現異常によって鉄過剰が発生することが解かっている^{8),9)}。そしてこれらが互いの増悪因子となる malignant cycle を形成しながら、酸化ストレスの発生を介して肝病態を進行させ、肝発癌に至る。NASHにおいても同様の病態形成機構が働いているものと想定されるが、鉄過剰発生のメカニズムは不明である。

いった除鉄療法によってALT値や肝組織所見が改善することが知られているが、更には肝内8-OHdG量が低下するといった報告もみられる^{12),17)}。そこで、上記のNASH群の中で、ダイエット療法の反応性に乏しい11例に対し、瀉血+鉄制限食の除鉄療法を施し、その前後にて肝内8-OHdG量を評価した。虚血性心疾患等のリスクを考慮し、全例70歳未満、血清フェリチン値高値、また明らかな心疾患のないものとした(表2)。方法は既報の如く¹⁸⁾フェリチン値50 ng/dLもしくはヘモグロビン値12 g/dLを目標に1回200 mLを1~2週ごとに瀉血した。その結果、約1年の経過にて血清ALTは1例を除いて低下し、その平均値は有意に低下した。また、肝内8-OHdG量も10例に低下を認め、やはりその平均は有意に低下した。なお、特に重篤な合併症等は認めなかった。

4. 考 案

本邦においては今後、急激なメタボリックシンドロームの増加が危惧されているが、NASHは肝におけるメタボリックシンドロームの表現型である。またNASH患者からの肝癌発生の問題も今後重要な臨床的課題とされている¹⁹⁾。8-OHdGはその立体構造の変化により本来の相手であるシトシンのみならずアデニンとも対合し、その結果G:C→A:T型のDNA変異が誘発されやすく、結果として癌遺伝子や癌抑制遺伝子に変異を生じさせやすくすると考えられる²⁰⁾。つまり、今回の我々の結果は、NASH症例に対する除鉄療法の肝病態ならびに肝癌発生の抑制効果の可能性を示唆している。現在NASHに対しては、食事や運動療法以外、有効な薬物療法は確立されておらず、より多くの症例において除鉄療法の有効性を確認

表 2 NASH 患者における除鉄療法の効果

患者 Number	年齢/性別	除鉄療法 期間/献血量	BMI (kg/m ²)		ALT (IU/L)		ヘモグロビン (g/dL)		血清鉄 (μg/dL)		フェリチン (ng/mL)		肝内鉄スコア		肝内8-OHdG (10 ⁵ μm ²)	
			Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
1	47/M	9ヶ月/2200mL	31.0	29.7	59	32	15.6	14.7	220	172	718	77	8	4	40.0	21.7
2	66/M	9ヶ月/1000mL	26.2	25.9	171	110	14.5	14.2	188	155	431	382	6	8	32.0	39.0
3	67/M	12ヶ月/1800mL	27.5	26.5	98	56	14.2	13.6	141	115	539	123	5	4	27.0	22.3
4	41/F	14ヶ月/2400mL	29.0	27.8	136	97	14.5	13.2	170	122	481	53	5	2	25.3	12.3
5	59/F	13ヶ月/1400mL	35.0	32.2	46	38	14.9	13.6	138	101	223	75	5	1	20.0	12.7
6	41/M	12ヶ月/2800mL	25.1	25.3	122	89	15.3	13.9	92	72	374	68	4	4	19.0	5.7
7	59/F	10ヶ月/800mL	23.5	22.2	133	72	12.2	11.5	202	154	847	272	7	5	17.6	6.7
8	54/F	8ヶ月/1200mL	25.2	25.3	82	49	15.7	15.2	124	107	300	109	2	2	13.3	12.0
9	42/M	12ヶ月/1800mL	28.1	28.3	94	42	16.4	14.7	120	77	537	39	5	2	12.3	5.0
10	39/M	9ヶ月/2000mL	28.1	24.5	118	77	16.2	14.3	134	100	306	34	2	0	11.7	3.7
11	64/M	11ヶ月/1200mL	30.4	30.1	37	49	15.0	14.2	96	94	339	46	4	2	10.0	10.7
Mean			28.1*	27.1*	99.6 [†]	64.6 [†]	15.0 [†]	13.9 [†]	148 [†]	115 [†]	463 [†]	116 [†]	4.8 [†]	3.1 [†]	20.7 [†]	13.8 [†]

* P = 0.02.

† P < 0.01.

したい。また、今後 NASH の根本的な病態や病因の解明が進み、機序に基づいたより特異的で有効な治療法が開発されることを期待したい。

文 献

- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al: Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc.* 55: 434-438, 1980.
- Day CP, James O: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 542-545, 1998.
- George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, et al: Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 114: 311-318, 1998.
- Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, et al: Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 96: 2448-2455, 2001.
- Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, et al: Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 39: 179-187, 2004.
- Horiike S, Kawanishi S, Kaito M, et al: Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 43: 403-410, 2005.
- Deugnier YM, Loreal O, Turlin B, et al: Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their biochemical correlations. *Gastroenterology* 102: 2050-2059, 1992.
- Fujita N, Sugimoto R, Takeo H, et al: Hfe expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med.* 13: 97-107, 2007.
- Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, et al: Sustained responders recover from impaired hepcidin secretion after peginterferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 49: 702-710, 2008.
- 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.
- Koike K: Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res.* 33: 145-150, 2005.
- Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, et al: Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Rad Biol Med.* 42: 353-362, 2007.
- Fujita N, Sugimoto R, Ma N, et al: Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis C and B. *J Viral Hepat.* 15: 498-507, 2008.
- Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N, et al: Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol.* 89: 986-988, 1994.
- Yano M, Hayashi H, Yoshioka K, et al: A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol.* 39: 570-574, 2004.
- Iwasa M, Iwata K, Kaito M, et al: Efficacy of long-term dietary restriction of total calories, fat, iron, and protein in patients with chronic hepatitis C. *Nutrition* 20: 368-371, 2004.
- Kato J, Kobune M, Nakamura T, et al: Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy

- and low iron diet. *Cancer Res.* 61: 8697-8702, 2001.
- 18) Yamamoto M, Iwasa M, Iwata K, et al: Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 22: 498-503, 2007.
- 19) Shimada M, Hashimoto E, Taniani M, et al: Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 37: 154-160, 2002.
- 20) Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP, et al. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxoG. *Nature* 349: 431-434, 1991.

NASH の成因と病態 4

脂肪化による肝発癌のメカニズム

藤田尚己 竹井謙之

ふじた なおき、たけい よしゆき；三重大学大学院 病態制御医学講座消化器内科学，三重大学医学部附属病院 肝炎相談支援センター

● はじめに

「飽食の時代」と言われる高カロリー・高脂肪の欧米型食生活への変化に加え，自動車社会の発達や喫煙・飲酒などの生活習慣の変化により，近年わが国においても肥満人口の急激な増加が大きな社会問題となっている。非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) は 1980 年に Ludwig¹⁾ が提唱した疾患概念であり，すでに四半世紀が経過したが，メタボリックシンドロームの一般社会における認知に伴い，NASH の病態も広く認識されるに至った。その病態は，動脈硬化の進展に伴う虚血性疾患と深く関連するのみならず，肝硬変や肝癌への進展例も多数報告されている^{2,3)}。一方，米国における大規模な疫学調査の結果，糖尿病が肝癌発症の独立した因子となることが指摘され^{4,5)}，またわが国でも糖尿病患者における死因の第 1 位が肝癌であったという事実⁶⁾，さらには C 型肝炎トランスジェニック (Tg) マウスでの肝脂肪化に引き続く肝発癌の報告⁷⁾ など，これらはいずれも肝脂肪化による肝発癌の可能性を示唆している。その発癌機構に関してはいまだ研究段階にあり詳細は不明であるが，さまざまな NASH 肝発癌動物モデルが知られている。ここではそれらを提示することを中心として肝脂肪化の発癌機構について考察したい。

● NASH 発症動物モデル

NASH 発症モデルの代表的なものは，ob/ob マウスをはじめとするレプチン欠乏およびレプチン受容体変異によるレプチン作用障害に基づく NASH 自然発症モデルであるが，その多くは肝発癌を認めない (表 1)。さらに CDAA (コリン欠乏アミノ酸置換) 食に代表される多くの食餌誘発性 NASH モデルが考案されているが，これらも通常の飼育期間では肝癌を発症しない。肝発癌を伴う NASH モデルの多くは遺伝子改変による NASH モデルであり，以下にその代表的なものを紹介する。

● 酸化ストレスによる肝発癌機構

NASH 発症にはまず肝に脂肪沈着が起こり (first hit)，これになんらかの second hit が加わることによって発症するとする two hits theory が普及している⁸⁾。second hit 本体の解明はいまだ研究途上であるが，その有力な候補として酸化ストレスがあげられている^{9~11)}。肝細胞内に過剰な脂質 (中性脂肪) が蓄積すると，脂質代謝バランスに異常が生じる。肝細胞内では主にミトコンドリア，ミクロソーム，ペルオキシソームが脂質代謝に関与しているが，代謝バランス異常の結果としてこれらそれぞれの細胞内小器官に由来する酸化ストレスが発生する (図 1)¹⁰⁾。ミトコンドリアは生理的条件下で脂肪酸

表 1 主な NASH 動物モデルの比較

	肥満	インスリン抵抗性	肝での炎症	肝線維化	酸化ストレス	肝発癌 (発癌時期)
I. 自然発症モデル						
ob/ob マウス	○	○	○	×	○	×
db/db マウス	○	○	○	×	○	×
Zucker (fa/fa) ラット	○	○	○	×	○	×
FLS マウス	△	○	○	△	○	○ (60 週)
II. 食餌誘発 (CDAA) 性モデル						
C57BL/6 マウス	×	×	○	○	○	○ (84 週)
Zucker (fa/fa) ラット	△	○	○	×	○	×
III. 遺伝子改変モデル						
RARE Tg マウス	×	?	○	○	○	○ (48 週)
AOX KO マウス	×	?	○	○	○	○ (40 週)
MATO マウス	○	×	○	○	○	○ (72 週)
PTEN KO マウス	×	×	○	○	○	○ (78 週)
Aromatase KO マウス	○	○	○	△	○	×
SREBP-1c Tg マウス	×	○	○	○	○	×
PPAR α KO マウス	×	×	○	×	?	×

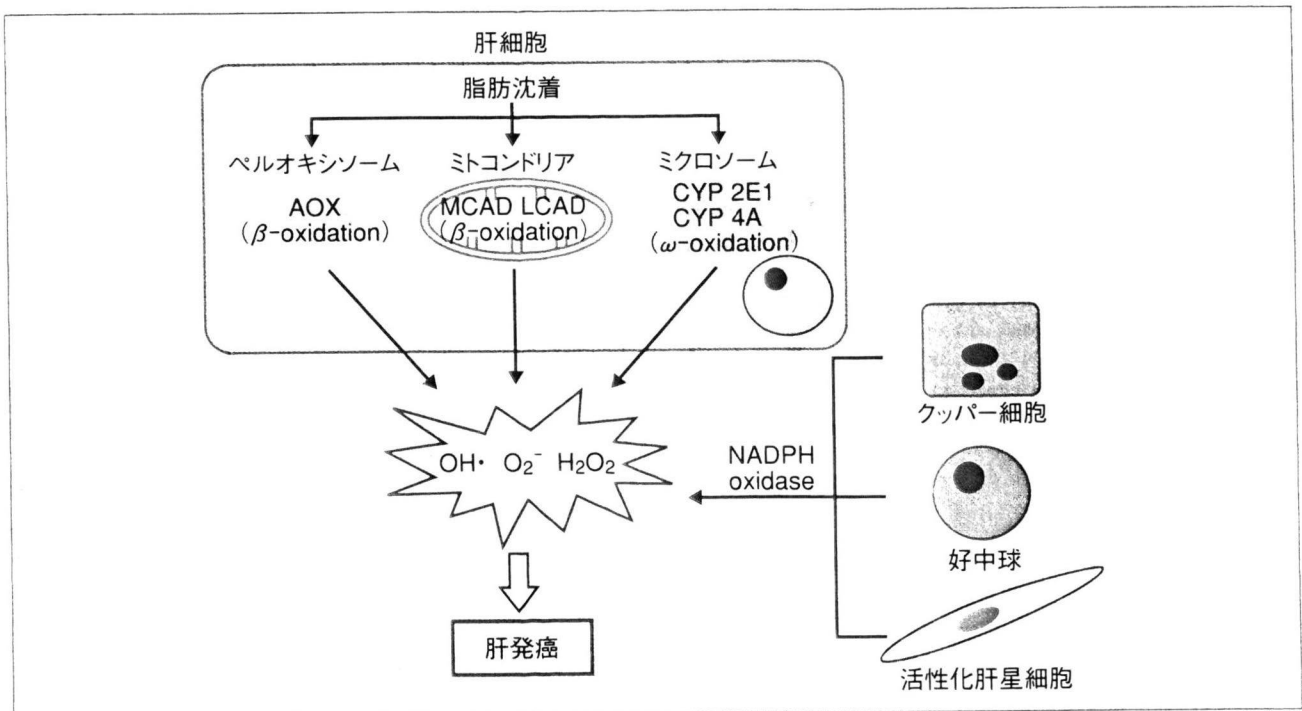


図 1 肝脂肪化における酸化ストレスを介した肝発癌機構

を酸化してエネルギーを供給するが、脂肪酸の量が過剰になるとミトコンドリアの呼吸鎖複合体に過剰な電子を供給する。その結果、電子伝達系から多くの O_2^- が発生する¹⁰⁾。さらには過剰な脂肪酸の酸化を補助するためにマイクロソームのチトクローム (CYP) やペルオキシソーム

での酵素群が誘導されるが、CYP による ω 酸化も O_2^- を誘導する。また、ペルオキシソームでの β 酸化は acyl-CoA oxidase (AOX) を介して過酸化水素を生じる。また、クッパー細胞や浸潤してきた好中球などの炎症細胞からも NADPH オキシダーゼ由来のヒドロキシラジカ

ル ($\cdot\text{OH}$) が産生・放出される。また、活性化肝星細胞も NADPH オキシダーゼを発現しており、このように肝脂肪化によりさまざまな経路を介して発生する酸化ストレスが発癌に関与する機序が想定される (図 1)。

Shiota らのグループは、核内受容体であるレチノイン酸受容体 α のドミナントネガティブ遺伝子 (RARE) の Tg マウスを作成した¹²⁾。本マウスでは 4 か月齢になると肝組織内に小滴性脂肪滴と、好中球を中心とした炎症細胞浸潤が認められ脂肪性肝炎を発症する。さらに本マウスでは、12 か月齢を過ぎたころから肝癌が発生し、さらに月齢が進むにつれて発癌率は増加、生後 18 か月で 27% のマウスに肝癌を認める。このマウスではミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系酵素の発現は低下しているが、ペルオキシソームでの AOX や bifunctional enzyme (BFE) の発現量は増加し、さらには PPAR α の活性化に続き CYP4A10, CYP4A12, CYP4A14 などのミクロソーム脂肪酸 ω 酸化酵素が亢進し、それと同時に多くの酸化ストレスが発生している。以上のことより、レチノイン酸シグナルの欠如は脂肪酸酸化の亢進をきたし、酸化ストレスを介した DNA 障害によって発癌に至ると想定される。

また、AOX ノックアウト (KO) マウスでも、脂肪性肝炎の発生に引き続き 10 か月を過ぎたころから肝癌が発生し、15 か月齢ではすべてのマウスに発癌すると報告されている¹³⁾。AOX はペルオキシソーム系脂肪酸 β 酸化の律速酵素であるため、AOX KO マウスではペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化が途中で寸断され、ペルオキシソーム内で分解されるべき極長鎖脂肪酸が肝細胞内に蓄積し肝脂肪化が起これると考えられている。このマウスにおいても PPAR α の活性化に伴い、CYP4A1, CYP4A3 の発現亢進と酸化ストレスの過剰発現が認められ、これにより発癌すると考えられている。

methionine adenosyltransferase (MAT)-1 A 欠損 (MATO) マウスは 8 か月齢にて脂肪性肝炎を発症し、18 か月にて肝内に酸化ストレスが蓄積するとともに肝発癌してくる遺伝子改変マウ

スである¹⁴⁾。MAT は、肝臓内にて methionine を S-adenosylmethionine (AdoMet) に変換する際に必要な酵素である。AdoMet は VLDL 合成に必須である phosphatidylcholine (PC) に代謝されるため、AdoMet の欠乏により肝臓から中性脂肪が血中に放出されずに脂肪肝を発生する。本マウスに AdoMet を補充することによって、肝発癌が抑制されることも報告されている¹⁵⁾。

食餌誘発性 NASH 動物モデルにおける肝発癌の報告は多くはないが、Denda らは C57BL/6 マウスに CDAA 食を長期 (84 週間) 摂取させることによって肝癌が発生したと報告している。やはり肝内 8-OHdG の上昇など、酸化ストレスによる発癌機序を想定している¹⁶⁾。

● インスリン抵抗性による肝発癌機構

ヒト肝癌においてはその多くは硬変肝を発生母地として発症するが、肝硬変には高率に耐糖能異常が合併する。特に肝硬変患者は強いインスリン抵抗性状態にあり、食後、高インスリン血症が持続する¹⁷⁾。インスリンに肝細胞増殖作用があることは以前よりよく知られていたが、インスリンシグナルの下流は細胞増殖シグナルにもつながっている。よって、高インスリン状態が肝発癌に関与している可能性がある。実際、Inoue らは CHO 細胞に dominant negative なインスリン受容体を導入することによって同細胞にインスリン抵抗性状態を惹起させると、ERK (extra cellular signal-regulated kinase) などの細胞増殖活性が亢進し、癌細胞へと形質転化することを報告している¹⁸⁾。さらに Saito ら¹⁹⁾ は、臨床的に肝癌の増殖速度とインスリン抵抗性との関係を検討し、インスリン抵抗性の強い患者ほど肝癌の doubling time が短いことを報告している。これらはいずれもインスリン抵抗性に肝発癌および癌増殖促進作用のある可能性を示しており、今後ピオグリタゾンなどのインスリン抵抗性改善薬の発癌抑制効果の検証なども興味もたれる。

一方、NASH 動物モデルにおいては多くの NASH 自然発症モデルにインスリン抵抗性を認めるが、その多くに肝発癌はみられない (表 1)。

そのなかで注目されるのは、FLS (fatty liver Shionogi) マウスである。同マウスは、生後間もなくから肝臓に中性脂肪が沈着するとともに、インスリン抵抗性を基盤とする糖尿病を発症する。そして、さらには生後1年以上の経過にて肝癌が発生する²⁰⁾。そういった意味では、本マウスモデルはヒト NASH により近い病態を形成している可能性があり、今後本マウスを用いたさらなる解析がヒト NASH からの肝癌の解明に役立つ可能性がある。

一方、遺伝子改変 NASH モデルにおいては、肝癌化するマウスの多くに明らかなインスリン抵抗性は認められず、逆に Aromatase KO マウスや SREBP (sterol regulatory element-binding protein)-1c Tg マウスなど明らかなインスリン抵抗性を示すマウスにおいては発癌の報告はない(表1)。そのなかで興味深いのは PTEN (phosphatase and tensin homolog) KO マウスである。PTEN は PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) を基質とする脱リン酸化酵素をコードする癌抑制遺伝子で、全身性に KO すると胎生致死となるが、Horie ら²¹⁾は Cre-loxP システムを用いて肝細胞特異的な PTEN KO マウスを作成した。本マウスでは、脂肪性肝炎に引き続き肝癌を発症してくる。PTEN は PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) 系に抑制的に作用するため、Akt の活性化を介して脂肪酸合成促進、脂肪酸β酸化亢進に働く一方、ERK の活性が亢進し肝細胞の増殖促進にも働く。本マウスではインスリン感受性はむしろ亢進しており、そういった意味ではヒトの NASH とは病態がやや異なる。

● 肝線維化と肝癌

上記のように、ヒトにおける肝癌ではその原因を問わず多くの場合、その発癌母地として肝硬変を合併しているが、このことは肝線維化による発癌の可能性を示している。

Kitade らは、肝線維化進展が NASH 発癌に重要であることを Zucker ラットを用いて示している²²⁾。Zucker ラットはレプチン受容体の変異ラットであるが、このラットに CDAA 食を与え

て飼育した場合、コントロールラットと同様に肝脂肪化は認めるものの、Zucker ラットでは肝線維化が完全に抑制され、さらには 80 週齢において CDAA 食飼育コントロールラットでは肝発癌を認めたのに対し、Zucker ラットでは発癌を認めなかったと報告している。肝線維化におけるレプチンの重要性は以前より指摘されており²³⁾、上記の結果は、レプチンを介した肝線維化の肝発癌へ関与を明示している。

● おわりに

脂肪性肝炎からの肝癌動物モデルの多くは脂質代謝異常に伴う酸化ストレスの発生と細胞増殖シグナルの亢進を伴っており、ヒト NASH においても同様の肝癌機序が想定される。今後、脂肪化や糖尿病の肝癌へのより詳細な関与や機序の解明がなされ、これらに対する治療介入による肝癌抑制の試みが待たれるところである。

文献

- 1) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc* 1980 ; 55 : 434-8.
- 2) Shimada M, Hashimoto E, Taniani M, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2002 ; 37 : 154-60.
- 3) Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006 ; 44 : 865-73.
- 4) El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 ; 126 : 460-8.
- 5) Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, et al. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States : a population based case control study. *Gut* 2005 ; 54 : 533-9.
- 6) 堀田饒, 中村二郎, 岩本安彦ほか. アンケート調査による日本人糖尿病の死因 : 1991~2000 年の 10 年間, 18,385 名での検討. *糖尿病* 2007 ; 50 : 47-61.
- 7) Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998 ; 4 : 1065-7.
- 8) Day CP, James OF. Steatohepatitis : a tale of two "hits" ? *Gastroenterology* 1998 ; 114 : 842-5.
- 9) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003 ; 38 : 32-8.
- 10) Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of

- hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 147-52.
- 11) Fujita N, Miyachi H, Tanaka H, et al. Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 ; 18 : 424-32.
 - 12) Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, et al. Retinoic acid receptor α dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 2004 ; 40 : 366-75.
 - 13) Fan C-Y, Pan J, Usuda N, et al. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 15639-45.
 - 14) Martinez-Chantar ML, Corrales FJ, Martinez-Cruz LA, et al. Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1 A. *FASEB J* 2002 ; 16 : 1292-4.
 - 15) Garcea R, Daino L, Pascale R, et al. Inhibition of promotion and persistent nodule growth by S-adenosyl-L-methionine in rat liver carcinogenesis : role of remodeling and apoptosis. *Cancer Res* 1989 ; 49 : 1850-6.
 - 16) Denda A, Kitayama W, Kishida H, et al. Development of hepatocellular adenomas and carcinomas associated with fibrosis in C57BL/6 J male mice given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn J Cancer Res* 2002 ; 93 : 125-32.
 - 17) Johnson DG, Alberti KG, Faber OK, et al. Hyperinsulinism of hepatic cirrhosis : diminished degradation or hypersecretion? *Lancet* 1977 ; 1 : 10-3.
 - 18) Inoue S, Fukuda K, Kudara T, et al. Augmented growth response to IGF-1 via increased IRS-1 in Chinese hamster ovary cells expressing kinase-negative insulin receptors. *Diabetologia* 1999 ; 42 : 763-72.
 - 19) Saito K, Inoue S, Saito T, et al. Augmentation effect of postprandial hyperinsulinaemia on growth of human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2002 ; 51 : 100-4.
 - 20) Soga M, Kishimoto Y, Kawamura Y, et al. Spontaneous development of hepatocellular carcinomas in the FLS mice with hereditary fatty liver. *Cancer Lett* 2003 ; 196 : 43-8.
 - 21) Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 1774-83.
 - 22) Kitade M, Yoshiji H, Kojima H, et al. Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Hepatology* 2006 ; 44 : 983-91.
 - 23) Ikejima K, Takei Y, Honda H, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 1399-410.

肝疾患における鉄代謝異常

藤田尚己* 竹井謙之

要旨

- ・生体内に鉄が過剰蓄積すると、酸化ストレスの発生を介してさまざまな臓器障害が引き起こされる。そのため体内の鉄調整には hepcidin をはじめとするさまざまな鉄調整関連分子機構が働いている。
- ・鉄過剰症には古くより遺伝性ヘモクロマトーシスが知られているが、近年のさまざまな鉄調整関連分子の同定によって、多くの遺伝子変異により本症が発症することが明らかとなった。
- ・C型慢性肝炎患者においては、肝臓を中心とした体内に鉄の過剰蓄積を認める。この鉄過剰が酸化ストレスの発生を介して肝病態の進展に関与しており、瀉血や鉄制限食による鉄過剰の改善が肝障害の改善に繋がる。C型肝炎における鉄過剰の原因として肝臓における hepcidin の発現異常が考えられる。
- ・非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)においても、その病態進展にやはり鉄過剰の関与が想定されているが、その原因機序の同定や鉄過剰改善の臨床的効果に関しては今後の検討課題である。

生体における鉄調整機構 (その中心的臓器としての肝臓)

鉄は生体内において約4g存在し、生体内微量元素の中ではもっとも多く存在している。体内の鉄のおよそ70%は赤血球中のヘモグロビンに存在し、その酸素運搬能に寄与している。20%前後はフェリチンやヘモジデリンといった貯蔵鉄として肝臓を中心に存在する。そして、残りの数%はミオグロビンやヘム酵素、フラビン酵素に配位し、電子伝達系の作動やDNAやRNA合成に関与している。このように鉄は生命維持に必要不可欠な分子である。

一方、鉄は過剰に存在すると生体に害を及ぼす。細胞内で過剰に鉄が存在すると毒性を回避す

るよう隔離貯蔵されるが、同時に自由鉄も増加する。自由鉄のうち2価鉄(Fe^{2+})は、Fenton反応によってもっとも有害な活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)であるヒドロキシラジカル($OH\cdot$)を発生させる。これにより脂質過酸化の亢進、DNA損傷、アポトーシスの誘導などが起こり、細胞傷害が発生する¹⁾。

したがって、体内における鉄量は厳格に維持される必要があるが、その詳細なメカニズムは長らく不明であった。近年、分子生物学の進歩によりさまざまな鉄代謝関連分子が同定され(表1)、その分子機構の概要が明らかになりつつある。

食物由来の Fe^{3+} はDcytbにより Fe^{2+} に還元され、DMT1により腸管上皮細胞に取り込まれる(図1)。そして、基底膜側に発現している唯一の鉄汲み出し蛋白であるferroportinによって細胞

*FUJITA Naoki, TAKEI Yoshiyuki 三重大学大学院医学系研究科病態制御医学講座消化器内科学
(〒514-8507 津市江戸橋 2-174)

表1 代表的な鉄代謝関連分子

HFE	遺伝性ヘモクロマトーシス患者の8割以上が同遺伝子に変異を有する(C282Y, H63D)(type-1)。
Hepcidin	細胞表面で transferrin receptor 1(TfR1) および β_2 -microglobulin と結合する。同遺伝子の変異により遺伝性若年性ヘモクロマトーシスが発症する(type-2B)。生体内における鉄代謝動態を司る肝細胞より分泌されるホルモン。
Hemojuvelin(HJV)	Ferroportin の発現を抑制し、消化管からの鉄吸収や網内系からの鉄放出を抑制する。同遺伝子の変異により遺伝性若年性ヘモクロマトーシスが発症する(type-2A)。Hepcidin の発現調整に関与。
Transferrin receptor 2(TfR2)	同遺伝子の変異により遺伝性ヘモクロマトーシスが発症する(type-3)。Transferrin の receptor 分子(TfR1 のホモログ分子)。肝細胞に限局的に発現。TfR1 より Tf に対する affinity が低い。Hepcidin の発現調整に関与? 鉄過剰のセンサー?
Ferroportin	同遺伝子の変異により遺伝性ヘモクロマトーシスが発症する(type-4)。唯一の細胞からの鉄排泄を担う分子。
DMT1	消化管上皮細胞から血管内への鉄の取り込みや網内系からの鉄の放出を担う。消化管上皮細胞での2価鉄の吸収や細胞内 endosome から細胞質への鉄の取り込みに関与。
ZIP14	肝細胞における non-transferrin-binding iron(NTBI)の取り込みに関与。
Heme carrier protein(HCP)	消化管上皮細胞におけるヘム鉄の吸収に関与。

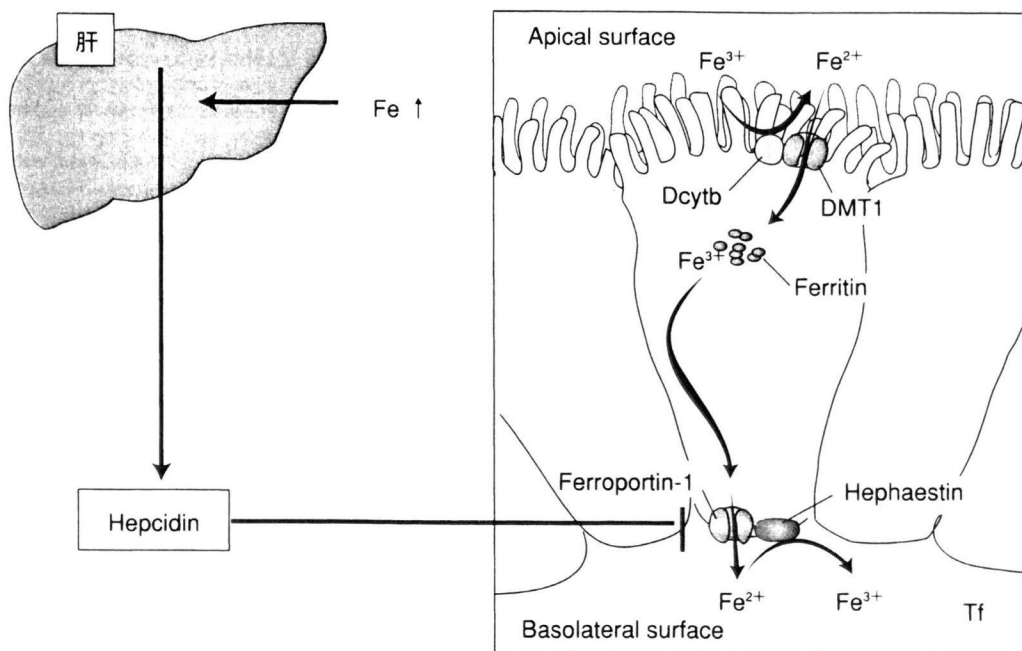


図1 十二指腸における鉄吸収機構と hepcidin の関与(本文参照)

外に転送された Fe^{2+} は, hephaestin によって Fe^{3+} に酸化される。この Fe^{3+} は血液内で transferrin と結合し肝臓などに運搬され, 主に transferrin receptor(TfR)を介してそれぞれの細胞内に取り込まれる。

生体においては積極的に鉄を排出する機構は存在せず, 体内の鉄量は消化管での鉄吸収効率に

よってほぼ規定されるが, この調整を行うホルモンが hepcidin であり, さまざまな鉄代謝異常症においてその発現異常が関与していることが明らかとなった。Hepcidin は肝臓で産生され, 消化管や網内系において ferroportin と結合し, その働きを抑える²⁾。鉄過剰時には hepcidin の発現増加により鉄吸収は抑えられ, 逆に鉄欠乏時には

hepcidin の発現は低下する。

鉄過剰による臓器障害

生体に鉄が過剰沈着する病態は、一括して鉄過剰症候群(iron overload syndrome)と呼ばれる。

1. 遺伝性ヘモクロマトーシス(hereditary hemochromatosis ; HH)

HH は欧米諸国に多い遺伝性疾患で、肝臓をはじめとした諸臓器に鉄の過剰沈着をきたし、前述のように酸化ストレスの発生などを介して臓器障害をもたらす。この疾患の原因遺伝子として HFE が同定され、欧米の HH 患者の約 80% に HFE 遺伝子の C282Y に変異が存在することが見いだされたが、本邦ではまれである。その後 hemojuvelin(HJV), TfR2, ferroportin, hepcidin (HAMP) などの遺伝子変異も HH の原因となることが判明し、現在は原因遺伝子ごとに HH の分類が行われている(表 2)。

2. 二次性鉄過剰症

遺伝的素因がないにもかかわらず、二次的に鉄過剰症が生じることがある。ヘモグロビン合成に先天的な異常を認めるサラセミアや鉄芽球性貧血などでは、骨髄中で無効造血をきたすとともに長期にわたり大量の輸血が行われるため、続発性の鉄過剰症となる。慢性肝疾患患者では、これまで知られていた HH など鉄代謝異常を直接の原因とする肝障害ばかりでなく、C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis ; NASH)などの慢性肝疾患にもしばしば鉄過剰症がみられ、これが病態と関与することが注目されるようになった。

また、最近のトピックスとしては、原因不明の難治性鉄欠乏性貧血の原因に胃の *Helicobacter pylori* 感染が関与していることが指摘されており、除菌により貧血の改善をみることがある³⁾。さらに、過剰の鉄は動脈硬化や発癌、さらにはインスリン抵抗性を介して糖尿病などの生活習慣病の予後を悪化させる因子としても近年注目されつつある⁴⁾。

表 2 鉄過剰症候群(iron overload syndrome)

1. 原発性鉄過剰症
 - 1) 遺伝性ヘモクロマトーシス
 - Type-1 : HFE 遺伝子異常(C282Y, H63D)
 - Type-2A : Hemojuvelin 遺伝子異常
 - Type-2B : Heparin 遺伝子異常
 - Type-3 : TfR2 遺伝子異常
 - Type-4 : Ferroportin 遺伝子異常
 - 2) その他の遺伝性異常
 - H-Ferritin, DMT1, セルロプラスミン, TfR1 などの遺伝子異常
2. 続発性(二次性)鉄過剰症
 - 1) 無効造血をきたす疾患
 - サラセミア, 鉄芽球性貧血, MDS など
 - 2) 医原性
 - 過剰輸血や長期の鉄剤投与
 - 3) 食事性鉄過剰症
 - アフリカ型鉄過剰症など
 - 4) 肝疾患に伴う鉄過剰症
 - C 型慢性肝炎, アルコール性肝障害, 非アルコール性脂肪性肝炎など

C 型慢性肝炎にみられる鉄過剰症の病態への関与

1. 頻度

C 型慢性肝炎患者では、肝を中心とした体内に鉄の過剰蓄積を認めることが報告されてきた(図 2)が、その発生頻度は報告者により多少の違いを認めた。これは食習慣やヘモクロマトーシス関連遺伝子の浸透率の違いなどの各国の特性によるものと思われた。当科にて肝生検が施行された C 型慢性肝炎 103 例の検討では、血清フェリチンの異常高値を 60 例(58.3%)に認め、さらにはプルシアンブルーにより肝組織中の鉄沈着をみると、軽微なものも含めると実に 90 例(87.4%)に鉄沈着陽性所見を認めた⁵⁾。

2. 鉄過剰の肝病態進展への関与

では、C 型慢性肝炎で高頻度にみられる鉄過剰状態の肝病態に及ぼす影響はどうであろうか。前述の C 型慢性肝炎 103 例において、肝内鉄沈着量と各種臨床データとの相関をみたところ、肝内鉄沈着量はトランスアミン値や肝線維化を反映する血小板値と有意な相関関係にあった(図 3)⁵⁾。

鉄の肝病変進展に及ぼすメカニズムとしては、

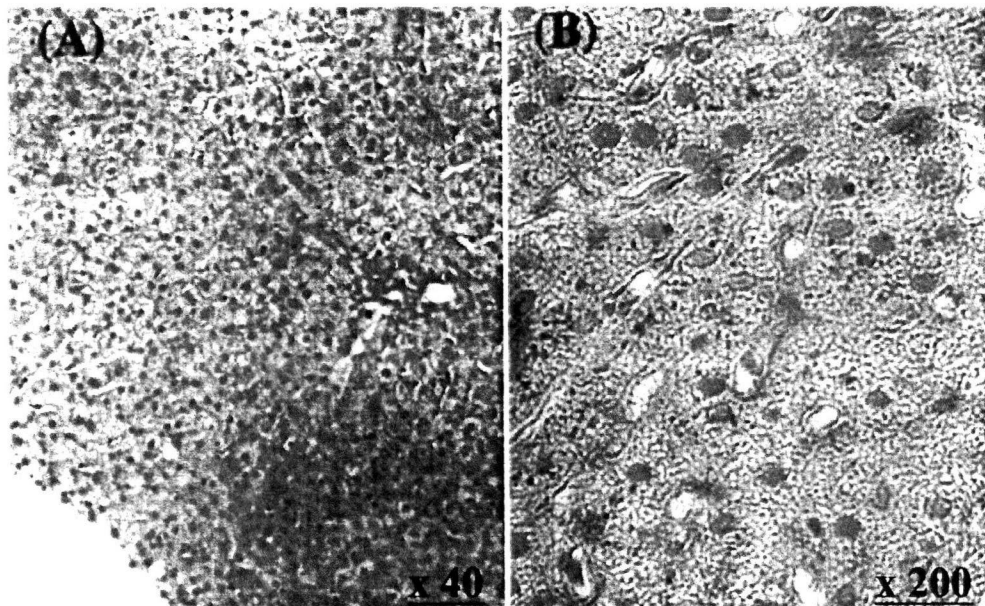


図2 C型慢性肝炎にみられる肝内鉄過剰蓄積(プルシアンブルー染色)
 65歳、男性患者(HCV RNA=1540 KIU/ml, Genotype 1b)にエコー下肝生検を施行。
 A：門脈域周囲を中心に青く過剰な鉄染色陽性所見を認める。
 B：強拡大にて鉄は肝細胞内を中心に点状に沈着しているのがわかる。また、類洞内にも鉄の沈着所見を認める。

先に述べたように ROS の関与が想定される。前述の C 型肝炎 103 例中、蛍光抗体免疫染色法による肝組織中の 8-OHdG 量(核酸レベルでの酸化ストレスマーカー)⁶⁾の測定が可能であった 77 例で検討したところ、C 型肝炎では肝細胞の核内を中心に 8-OHdG の発現が亢進しており⁷⁾、さらに肝内 8-OHdG 量は鉄沈着量と強い正の相関関係にあった(図 3)^{7,8)}。

3. 鉄過剰の発生機序

このように、C 型肝炎においては高頻度に鉄過剰が認められるが、その発生機序は不明であった。そこでわれわれは、C 型肝炎における hepcidin の動態について検討した。C 型肝炎 56 例の肝内での hepcidin mRNA 量を real-time PCR 法にて測定したところ、B 型肝炎や非ウイルス性肝障害患者に比し有意に hepcidin の発現量が低下していることを認めた(図 4)⁹⁾。また、血清中における hepcidin の活性型を測定し同様の結果を確認している¹⁰⁾。また、ペグインターフェロン+リバビリン療法によってウイルスが消失することで hepcidin の発現量が回復することも確認した(図 4)¹⁰⁾。以上より、C 型肝炎における肝内鉄過

剰の原因として、肝臓での hepcidin の発現異常が関与している可能性が示唆された。

4. 鉄過剰改善の効果

瀉血療法はヘモクロマトーシスに対する治療として古くから行われてきた除鉄法だが、Hayashiらは C 型肝炎における瀉血療法の有効性を報告し¹¹⁾、国内における多施設無作為対照比較試験においてもその有効性が示された¹²⁾。また、瀉血後は鉄欠乏により hepcidin の発現が低下し、消化管からの鉄吸収が亢進するため¹³⁾、瀉血療法に鉄制限食を併用することが望ましい。われわれは実際に約 1 年間の瀉血療法と鉄制限食の組み合わせにより、血清フェリチン値にあわせて ALT 値が低下、さらには血液中の酸化ストレスマーカーである 8-isoprostane 値も低下することを確認した(図 5)¹⁴⁾。

NASH にみられる鉄過剰

近年、インスリン抵抗性と鉄との関連が注目されている⁴⁾。糖尿病領域において、血清フェリチン値がインスリン抵抗性の指標となるといった報

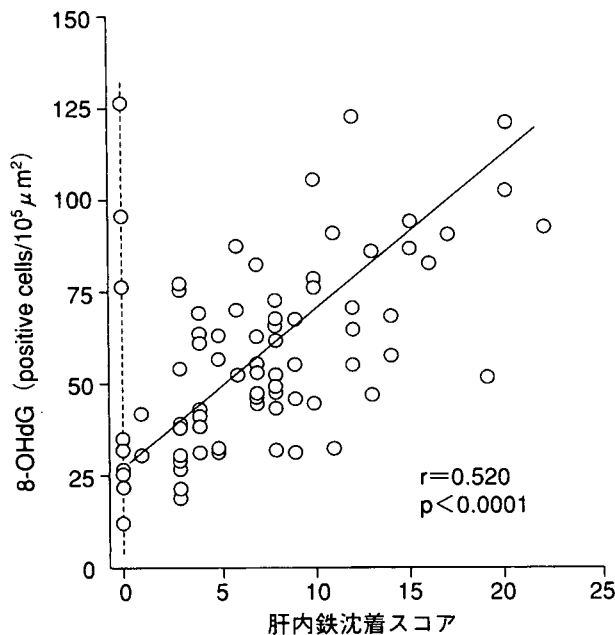
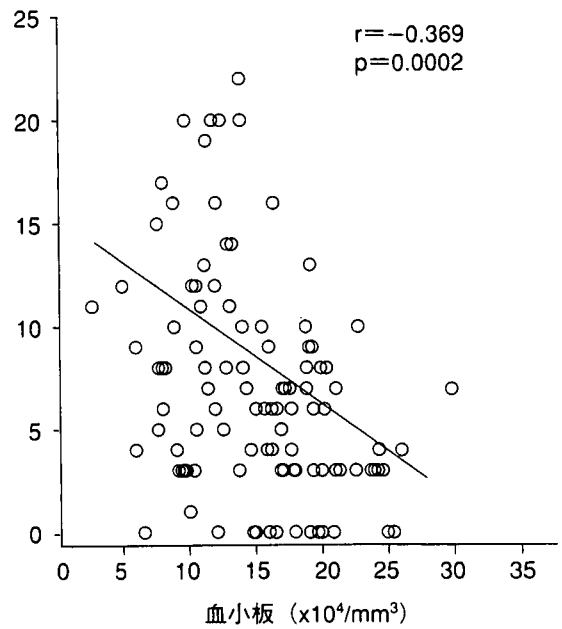
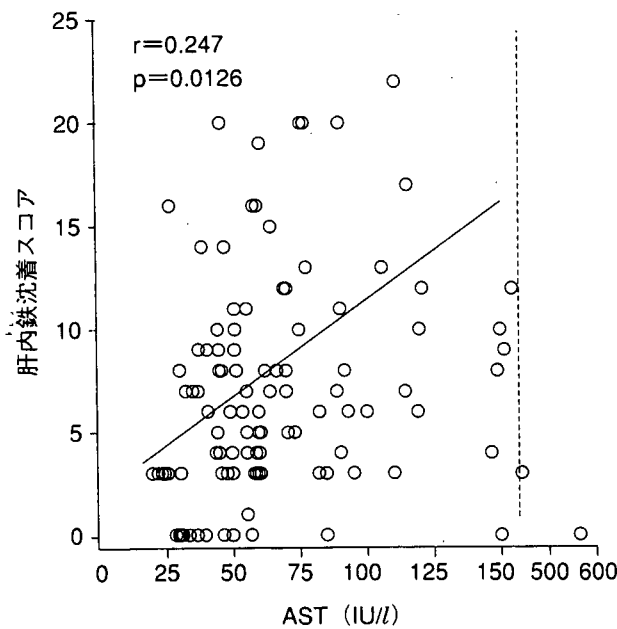


図3 C型慢性肝炎における肝内鉄沈着スコアと臨床データとの相関(文献^{5,7)}より引用し改変)

C型肝炎において、肝内鉄沈着スコアはAST値、血小板値、さらには免疫染色による肝内8-OHdG量と有意な相関関係にあった。

告がなされ、貯蔵鉄の増加と糖尿病の発症との関係が論じられている。鉄の蓄積は直接的に、あるいは酸化ストレスを介してインスリンのシグナル伝達や代謝を阻害し、インスリン抵抗性を惹起する可能性がある。また、逆に高インスリン状態が transferrin receptor 1(TfR1)の発現を亢進させ、細胞内への鉄取り込みが増加する可能性も指摘されている。このような事実から、フランスの研究グループから insulin resistance-associated hepatic iron overload(IR-HIO)といった疾患概

念が提唱されている¹⁵⁾。原因の明らかでない鉄蓄積症例を検討すると、大多数で肥満、脂質異常症、耐糖能異常などのインスリン抵抗性を有していたという。

非アルコール性脂肪性肝障害(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)は、単純性脂肪肝(fatty liver; FL)から、肝硬変や肝癌に進展しうる NASH まで、さまざまな病態を含む疾患概念である。FLからNASH進展には、インスリン抵抗性を基盤として second hit が加わることが必

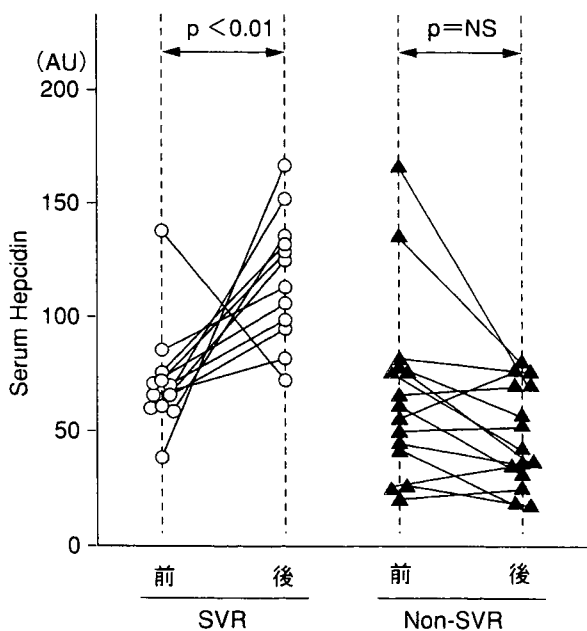
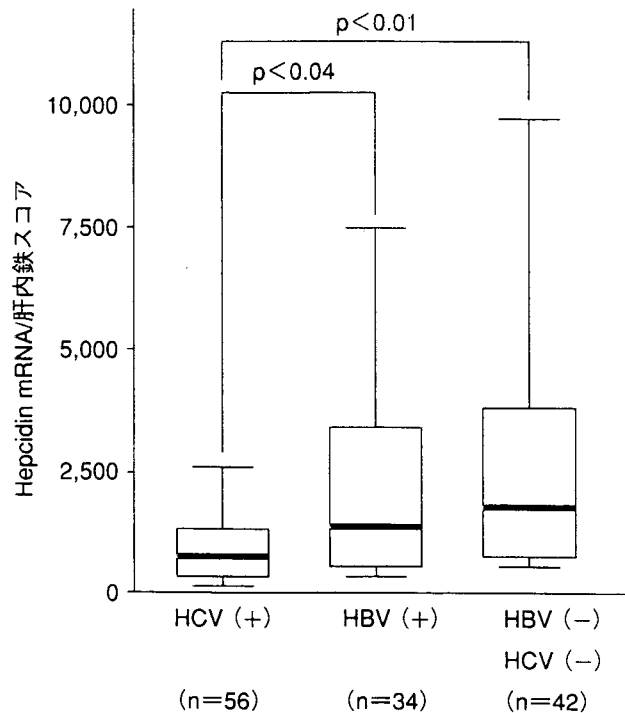
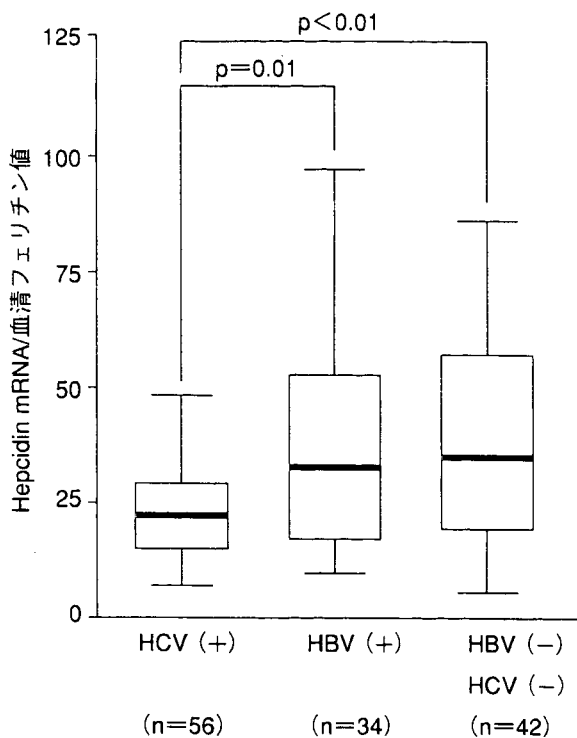


図4 C型慢性肝炎にみられる相対的な hepcidin 量の低下(文献^{9,10}より引用し改変)

C型肝炎 [HCV(+)] はB型肝炎 [HBV(+)] や非B非C型肝炎障害 [HBV(-)HCV(-)] 患者に比較して鉄過剰に対する相対的な [血清フェリチン値や肝内鉄スコアとの比] 肝内 hepcidin mRNA 量の減少を認める。また、C型肝炎患者に48週のペグインターフェロン+リバビリン治療を施行前後で血清中の活性型 hepcidin 量を測定すると、著効例(SVR)ではウイルスの消失に伴い hepcidin の増加を認めたが、非著効例(Non-SVR: 治療後も血中にウイルスが残存)では有意な変化を認めなかった。

要とされるが、この second hit の詳細は明らかではない。NASH ではしばしば体内の鉄過剰蓄積があり、酸化ストレスの発生を介して second hit の原因となっている可能性がある。1994年、NASH において、血清フェリチン値やトランスフェリン飽和度が高値で肝臓に鉄沈着を認めるとの報告がなされ¹⁶⁾、その後 George らが鉄の沈着が高度なものほど肝線維化の程度も強いと報告した¹⁷⁾。わ

れわれも NASH では FL に比べて血清フェリチン値が高く、肝内鉄沈着も高度で、その病態に鉄による酸化ストレスが関与している可能性を報告している¹⁸⁾。

一方、NASH に対する治療法としては、インスリン抵抗性改善薬などの有効性が指摘されているが、いまだ食事や運動療法以外に確実な治療法は確立されていない。NASH/NAFLD に対する瀉