

6. 慢性肝障害における鉄代謝異常

日野 啓輔*・仁科 惣治**

Hino Keisuke Nishina Sohji

古谷 隆和***・是永 匡紹****

Furutani Takakazu Korenaga Masaaki

*川崎医科大学 内科学 (肝・胆・膵) 教授

**社会保険小倉記念病院 消化器科

***厚生連 周東総合病院

****山口大学大学院 消化器病態内科学

Summary

わが国において肝発癌との関係からその鉄代謝障害が注目されている慢性肝障害は、主としてC型慢性肝疾患と非アルコール性脂肪性肝炎である。C型慢性肝疾患における鉄代謝障害機序として、C型肝炎ウイルスが惹起する酸化ストレスにより鉄吸収のnegative regulatorであるhepcidinの低下が提唱されている。一方、同様に酸化ストレスが病態の中心を占める非アルコール性脂肪性肝炎も肝内の鉄蓄積をみとめるが、未だその鉄代謝障害機序については明確にされていないのが現状である。

はじめに

肝臓は体内における最大の鉄貯蔵臓器であり、この点からも慢性肝疾患と鉄代謝異常の関連が容易に推測される。ヘモクロマトーシスは肝内鉄過剰を米す代表的な疾患であるが、厳密には体内諸臓器における鉄蓄積症の一部としての肝内鉄過剰であるため、慢性肝障害に基づく鉄代謝異常とはやや趣が異なる。そこで本稿では日本の代表的慢性肝疾患であり、かつ鉄代謝異常とその病態との関係が注目されているC型肝炎ウイルス (HCV) 関連慢性肝疾患 (C型慢性肝疾患) ならびに非アル

コール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) における鉄代謝異常について解説する。

1. C型慢性肝疾患

C型慢性肝炎やC型肝硬変の病態の特徴のひとつとして、肝内鉄蓄積が知られている。C型慢性肝疾患における肝内鉄蓄積の特徴はその程度が軽微であることで、症例によっては全く鉄沈着を認めない場合もあり、この点ではヘモクロマトーシスに見られるような高度の肝内鉄蓄積とは異なる。

HCV (C型肝炎ウイルス) NASH (nonalcoholic steatohepatitis; 非アルコール性脂肪性肝炎)

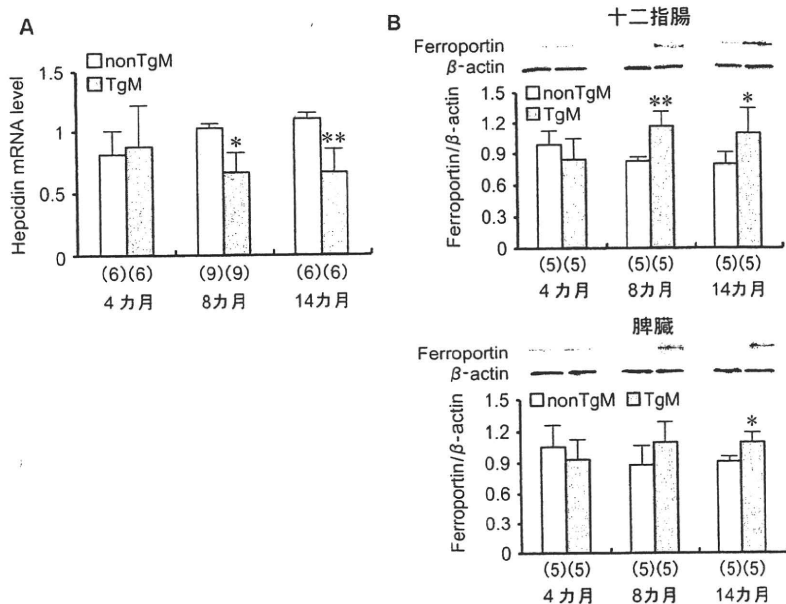


図1 肝組織内 hepcidin mRNA (A) および十二指腸と脾臓 (B) における ferroportin のタンパク発現量

HCV TgM (TgM) はコントロールマウス (nonTgM) に較べて肝内鉄濃度が高くなる時期 (8カ月, 14カ月) に一致して肝臓の hepcidin 発現が低下し、これに対応して十二指腸と脾臓の ferroportin の発現は高くなる。

る。Kato らは長期の瀉血 (除鉄) 療法により C 型慢性肝炎から肝硬変への進展あるいは肝発癌が抑制されることを報告しており¹⁾、事実、C 型慢性肝疾患の病態進展抑制を目的とした瀉血療法は保険診療として認可されている。このように治療の観点から C 型慢性肝疾患の鉄蓄積は注目されてきたが、なぜ肝内に鉄蓄積が引き起こされるかについては不明のままであった。われわれは HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (HCV TgM) を使って C 型慢性肝疾患における鉄代謝異常について解析を行ったので、その成績²⁻³⁾ を中心に解説する。

1) なぜ C 型慢性肝疾患では肝内鉄蓄積が起こるのか?

HCV TgM はコントロールマウス (C57BL/6) に較べて 8 カ月齢頃から肝内鉄濃度、血清鉄濃度が有意に高く、逆に脾臓内鉄濃度は有意に低かつ

た。さらに肝組織内の鉄沈着は Kupffer 細胞より肝細胞に強く認められた。これまでのところ脊椎動物において鉄を特異的に排出する機構は明らかにされておらず、生体の鉄恒常性維持は十二指腸粘膜上皮からの鉄吸収ならびに網内系からの鉄放出により厳密に調節されている。この点において肝臓で生成、分泌されるペプチドホルモン hepcidin は十二指腸上皮細胞血管側および網内系マクロファージに存在する ferroportin という鉄輸送体の発現を抑制し、十二指腸からの鉄吸収ならびに網内系からの鉄放出を抑制することで体内の鉄含有量を調節することが明らかにされている⁴⁾。HCV TgM の肝内 hepcidin mRNA 発現量はコントロールに較べて有意に低く、これに対応して HCV TgM の十二指腸と脾臓での ferroportin の発現は有意に高かった (図 1)。これまでのところ hepcidin の転写調節は、① 鉄あるいは若年性

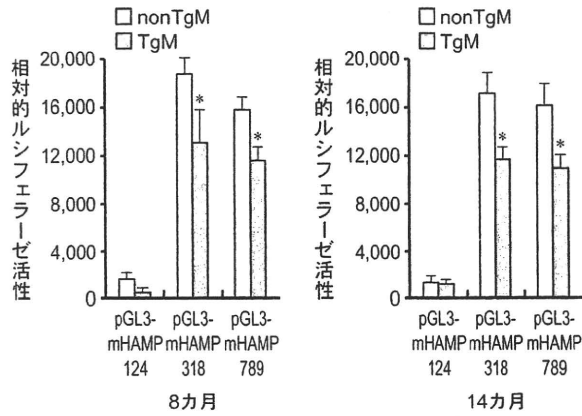


図2 HCV TgM 初代培養肝細胞の hepcidin プロモーター活性

hepcidin プロモーター領域 (pGL3-mHAMP 124, 328, 789) を肝細胞に transfection し、相対的ルシフェラーゼ活性によりプロモーター活性を測定した。

ヘモクロマトーシス関連遺伝子である hemojuverin による bone morphogenic protein (BMP), SMAD シグナルを介する系^{5, 6}, ② IL-6 による JAK-STAT シグナルを介する系が報告されている⁷。この HCV TgM は肝臓に炎症を起こさないが, lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与し IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導すると, hepcidin mRNA の発現は上昇し, ② の調節機構は障害されていなかった。一方, HCV TgM の初代培養肝細胞を用いて hepcidin のプロモーター活性を測定したところ, コントロールに比べて有意に低下していた(図2)。さらに転写因子である CCAAT/enhancer binding protein (CEBP) の hepcidin プロモーター領域への結合能が低下していることが明らかとなった(図3)。この原因として, 活性酸素による CEBP homology protein (CHOP) の発現亢進が関与していると考えられた(図4)。なぜなら, CHOP は CEBP と二量体を形成し, CEBP の標的 DNA への結合を阻害することが知られているからである。以上, HCV TgM

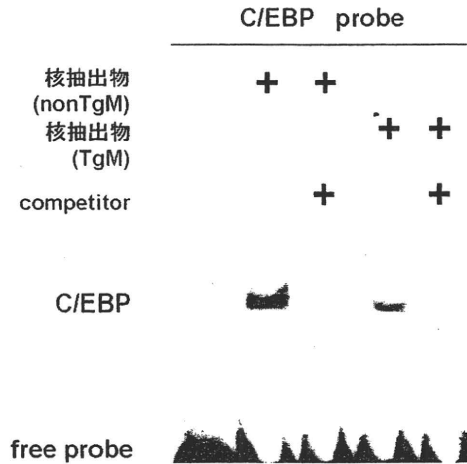


図3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) による C/EBP の DNA 結合活性の測定

8カ月齢のマウスの肝細胞の核抽出物と horseradish peroxidase でラベルした C/EBP オリゴヌクレオチドプローブを用いて測定した。Competitor には非標識の C/EBP オリゴヌクレオチドプローブを用いた。

における鉄過剰のメカニズムを簡単にまとめると, 図5のようになる。

最近, hepcidin の転写調節について, 新しいメカニズムが報告されたので紹介する。HCV レプリコン細胞や HCV コアと NS3 から 5 までを発現する細胞において, HCV 起因性の活性酸素が histone deacetylase 活性を亢進させヒストンのアセチル化を抑制することで, 転写因子である CEBP α や STAT3 の hepcidin プロモーター領域への結合能を低下させることが報告されている⁸。この研究では IL-6 により STAT3 のリン酸化が起きるにもかかわらず hepcidin の転写促進に繋がらない点, われわれの動物モデルによる *in vivo* の成績と異なっている。

2) HCV タンパクはどのようにして活性酸素を産生するのか?

以上の成績から, 活性酸素による酸化ストレス

BMP (bone morphogenic protein) LPS (lipopolysaccharide) CEBP (CCAAT/enhancer binding protein)
CHOP (CEBP homology protein)

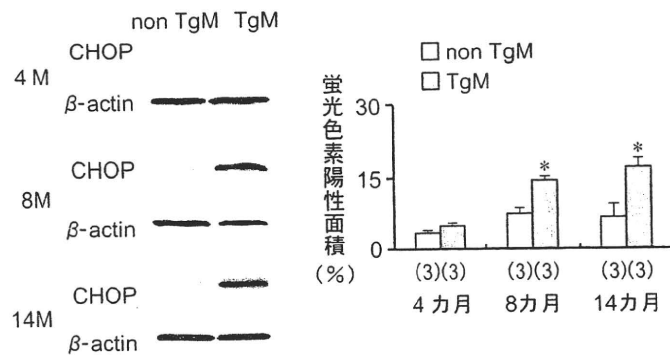


図4 肝臓におけるC/EBP homology protein (CHOP)発現レベル(western blotting)と活性酸素量

細胞内のスーパーオキシド (O_2^-) 存在下に dihydroethidium (DHE) は ethidium bromide に酸化され、核内 DNA に結合した状態で安定化し赤色蛍光として観察される。この蛍光色素の面積を算出し、肝細胞内スーパーオキシド量を比較した。

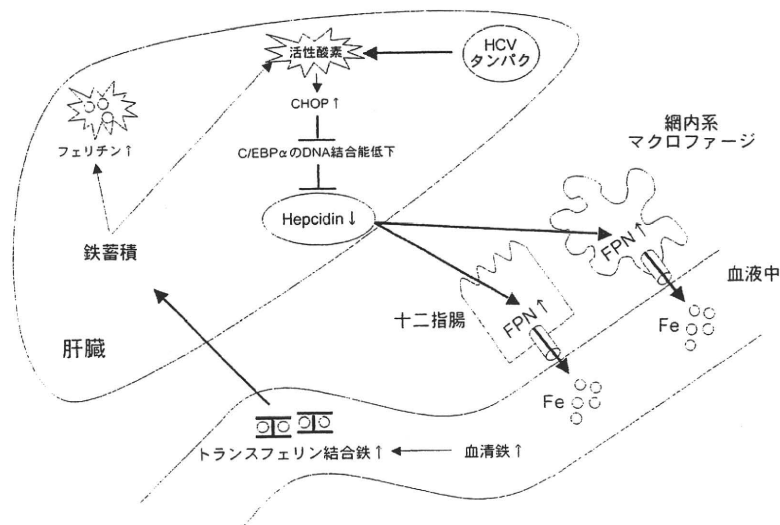


図5 HCV TgM における鉄代謝異常機構の模式図

HCV タンパクにより産生される活性酸素は CHOP の発現を亢進させ、これにより C/EBP α の DNA 結合活性が低下し、ヘプシジンの転写が抑制される。ヘプシジンの発現低下はフェロポーチン (FPN) の発現を亢進し、十二指腸からの鉄吸収ならびにマクロファージからの鉄放出が増加して、結果的に肝の鉄蓄積をひき起こす。

が hepcidin の転写調節に重要な役割を果たしているのは明らかであるが、では HCV タンパクはどのようにして活性酸素を産生するのであろうか。

全く異なる二つの研究室から、HCV コアタン

パクがミトコンドリアへのカルシウムの流入を促進することにより、ミトコンドリア内の活性酸素 (スーパーオキシド) が増加することが報告されている^{9, 10)}。ミトコンドリアへのカルシウム流入により一酸化窒素 (NO) の合成が亢進することが

明らかにされているが¹⁰⁾、これによりミトコンドリアの酸化的リン酸化が障害される可能性がある。また、ミトコンドリア内のカルシウム濃度が上昇するとクエン酸回路の多くの脱水素酵素が活性化されることが知られており、電子伝達系への電子供与が促進されて活性酸素産生の一因ともなりうるということが考えられる。一般的にミトコンドリア内のカルシウム濃度は、ミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} uniporter と呼ばれるカルシウム選択的イオンチャンネルを介する流入と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換チャンネルを介する流出により調節されるが、コアタンパクは Ca^{2+} uniporter によるカルシウムの取り込みを促進するが、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換チャンネルには何ら影響を与えないとしている。カルシウムはミトコンドリア外膜に存在する voltage-dependent anion channel (VDAC) を介して流入し、VDAC は Ca^{2+} uniporter と一種の複合体を形成してミトコンドリアへカルシウムを取り込むと考えられている。これまで HCV タンパクがミトコンドリア内膜に存在するという報告はなく、HCV タンパクが直接的に Ca^{2+} uniporter に影響を及ぼすとは考えにくい³⁾、外膜に存在する HCV タンパクが何らかの機序により Ca^{2+} uniporter を活性化してミトコンドリアへのカルシウムの取り込みを促進していると想定されるが、この点については今後の研究課題である。

3) 鉄代謝障害はC型慢性肝疾患の肝発癌にどのような影響を与えるのか?

1) で述べたように、炎症がない状態でも HCV タンパクによる酸化ストレスの亢進により hepcidin の転写抑制から鉄代謝異常が引き起こされることが明らかとなったが、このような鉄代謝異常がC型慢性肝疾患の肝発癌にどのような影響を与えるのだろうか。この課題を明らかにするために、われわれは上記 HCV TgM に軽度の鉄過

剰餌を与えてC型慢性肝疾患患者に匹敵する肝内鉄濃度にし、肝発癌の有無ならびに発癌過程について検討した³⁾。予備実験として carbonyl iron, ferrocen, ferric citrate の3種類の鉄過剰餌(通常餌の10倍の鉄濃度)をコントロールマウスに6~9カ月投与したところ、carbonyl iron による鉄過剰餌がC型慢性肝疾患患者の肝内鉄濃度に匹敵したので、HCV TgM あるいはコントロールマウスに通常餌(carbonyl iron 45 mg/kg 餌)または鉄過剰餌(carbonyl iron 225 mg/kg 餌)を与える4群を設定し、6カ月目と12カ月目に肝の組織学的変化ならびに肝腫瘍の有無について検索した。鉄負荷6カ月目のHCV TgM は他の3群に較べて肝内の脂肪沈着が亢進し、中心静脈周囲には小滴性脂肪沈着も目立った(図6)。さらにミトコンドリアの超微形態異常(図7)を認め、脂肪酸分解も低下した(図8)。鉄負荷12カ月目になると、HCV TgM は肝内脂質過酸化(図9)とともに8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)(図10)の蓄積が亢進した。最終的には鉄負荷HCV TgM のみに肝細胞癌を含む肝腫瘍を45%(5/11)認めた。

このように、HCV TgM は肝内鉄濃度がC型慢性肝疾患のそれに匹敵してくるとミトコンドリア障害とともに肝内の脂肪沈着が亢進し、遂には酸化ストレスが亢進するとともに酸化的DNA障害が進行し肝発癌を来すことが明らかになった。C型慢性肝疾患においても肝脂肪化を経て肝発癌を認めることは稀でなく、この点においても、このHCV TgM はC型慢性肝疾患における肝発癌に鉄代謝異常がどのようにかかわっているかを解析する有用なモデルと考えられた。しかし、この動物モデルがC型肝炎患者と最も異なる点は、肝内に炎症や線維化を起こさないことである。炎症と鉄代謝については先に述べたように、IL-6による

NO(一酸化窒素) VDAC (voltage-dependent anion channel)

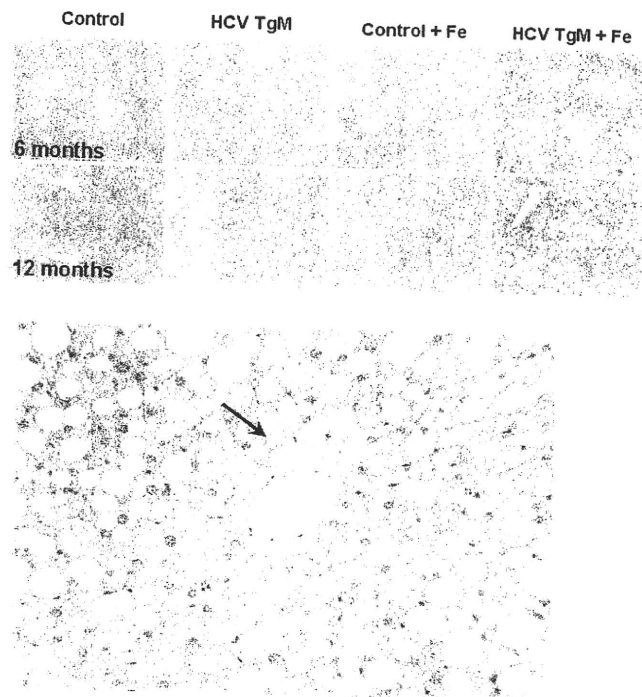


図6 鉄負荷 HCV TgM(HCV TgM + Fe), 鉄負荷コントロールマウス (control + Fe), 通常餌の TgM(HCV TgM), および通常餌のコントロールマウス (control) の肝組織像 (HE 染色)
中心静脈周囲には矢印で示すような小滴性脂肪の沈着が顕著である。

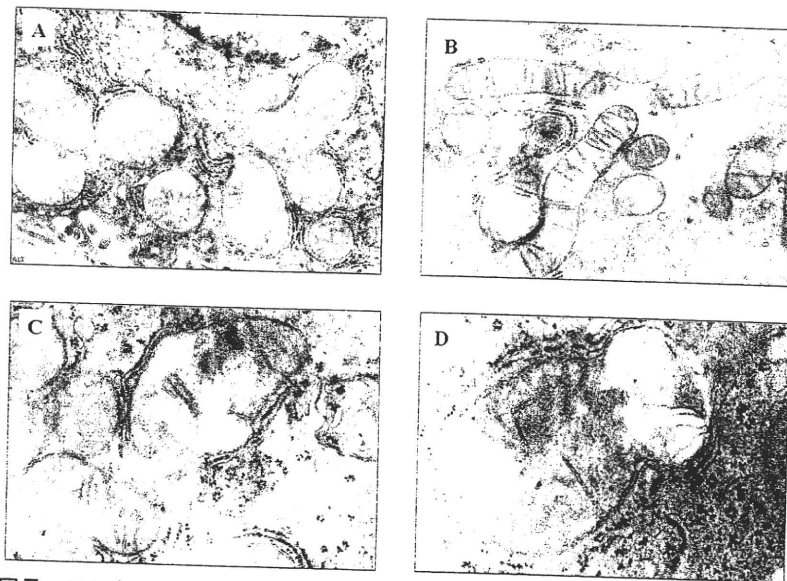


図7 コントロールマウス (A) と鉄負荷 HCV TgM (B, C, D) の肝臓のミトコンドリアの電子顕微鏡像
鉄負荷 HCV TgM の肝臓のミトコンドリアはコントロールマウスと比べて、大小不同や膨化 (B), クリステの乱れ (C), 内膜腔の bulding (D) などの形態異常が認められる。

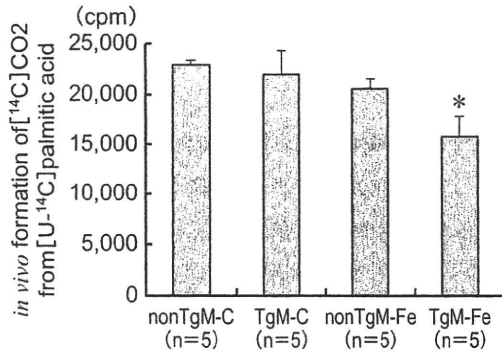


図8 *In vivo*でのパルミチン酸分解能の比較

^{14}C でラベルしたパルミチン酸を胃チューブを通してマウスに投与し、6時間後の呼気中のアイソトープ量 (^{14}C でラベルされた CO_2) を測定することで脂肪酸分解能を測定した。

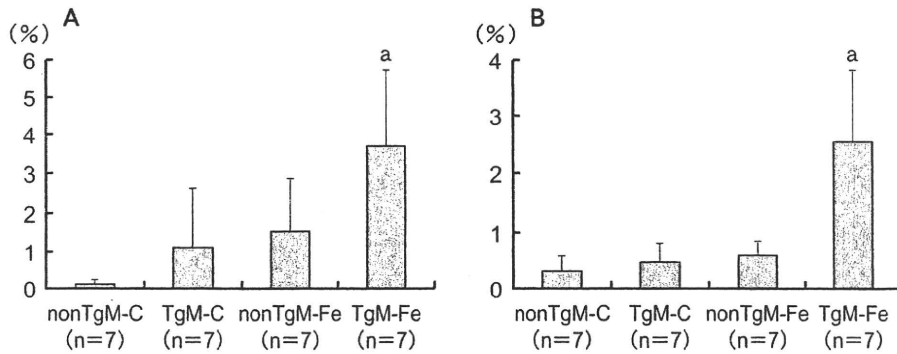


図9 12カ月目の肝組織内脂質過酸化物質 (4-hydroxy-2-nonenal ; A, 4-hydroxy-2-hexenal ; B) の比較

4-hydroxy-2-nonenal と 4-hydroxy-2-hexenal の免疫染色を行い、その陽性面積の割合で比較検討した。

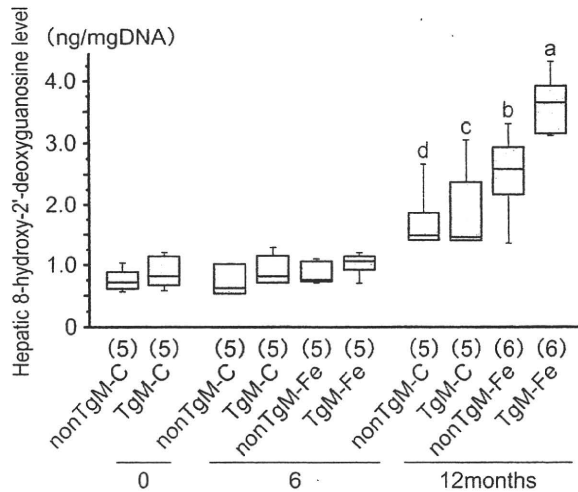


図10 12カ月目の肝組織内8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の免疫染色とその陽性面積の比較

肝組織内の8-OHdG量はELISAで測定した。データは箱ヒゲ図で示す。12カ月目では鉄負荷HCV TgMは、他の3群に比べて有意に8-OHdG量が多く(a)、また他の3群もそれぞれ飼育開始時、6カ月目と比べて8-OHdG量は有意に上昇していた(b, c, d)。

JAK-STAT シグナルを介する hepcidin の転写調節機構が存在する。肝内に炎症が強くなると hepcidin の転写亢進が予想され、HCV 起因性酸化ストレスによる hepcidin の転写抑制と拮抗することになる。一方で、IL-6 による hepcidin の転写調節も抑制されているという *in vitro* の報告⁸⁾もあり、HCV 感染における炎症による hepcidin の転写調節機構は更なる検討を要すると思われる。いずれにしても実際の C 型慢性肝疾患における hepcidin の転写調節はより複雑と考えられ、このことは C 型慢性肝疾患患者のなかでも肝内の鉄沈着は様々の程度で起きるといふ臨床的事実を反映しているように思われる。

2. 非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH)

NASH の病態に鉄過剰状態が関与していることは、C 型慢性肝炎の場合と同様、瀉血により肝機能検査値が改善することからも明らかである¹¹⁾。しかし、なぜ NASH で肝内の鉄蓄積が起こるのかについては、C 型肝炎ほど明らかにされていないのが現状である。この点について Otagawa らは、ウサギの NASH モデルを用いて肝内鉄蓄積機序について検討している¹²⁾。この動物モデルの赤血球膜には phosphatidylserine が表出されて赤血球の脆弱性が増し、これにより肝臓の Kupffer 細胞に貪食されやすくなるのが肝内の鉄沈着の一因と考察されている。

また Yanagitani らは、レチノイン酸シグナル伝達が障害されているトランスジェニックマウスでは脂肪性肝炎を起こし、その後肝癌を発症することを報告しているが¹³⁾、最近同じグループから、レチノイドシグナルが hemojuverin の転写調節に関与していることが報告された¹⁴⁾。すなわち、レチノイドは hemojuverin の転写を抑制することでその下流の transferrin receptor 2 と

hepcidin の発現を抑制し、結果としてトランスフェリン鉄の取り込み低下と ferroportin の発現亢進による肝細胞からの鉄放出によって肝細胞内の鉄を低下させるとしている。この二つの報告を総合すると、脂肪性肝炎におけるレチノイドシグナルの障害が肝内鉄過剰を引き起こす可能性が考えられ興味深い。NASH の病態に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることは周知の事実であるが、C 型肝炎のように酸化ストレスにより hepcidin の発現が低下しているという確証は得られていないのが現状である。NASH において hepcidin が低下しているのか不変なのか、あるいは亢進しているかについては現在 controversial であり、今後の更なる検討が必要である。

3. 肝内鉄蓄積を軽減するための新たな治療の可能性について

C 型慢性肝疾患や NASH での酸化ストレスによる肝組織障害を抑制する意味からも、これらの疾患に対して肝内の鉄蓄積を軽減することは治療上重要であり、事実、瀉血が臨床的に一定の効果をあげているが、ここでは瀉血以外に今後期待される鉄蓄積軽減のためのアプローチを簡単に解説する。

鉄過剰症に対する鉄キレート療法としてはこれまでデフェロキサミン (デスフェラル®) が用いられてきたが、血中半減期が短いため持続点滴か持続皮下注でないとう有効性が低く、外来患者で十分な鉄除去率を得るのが困難であった。これに対し、最近認可されたデフェラシロクス (エクジェイド®) は経口の鉄キレート剤であり、連日服用することにより十分な鉄キレート作用が期待される。

HCV 増殖細胞における hepcidin の発現を抑制する histone deacetylase に注目すると⁸⁾、その阻害剤は肝星細胞が筋線維芽細胞に分化することを抑制することが *in vitro* で明らかにされてお

り¹⁵⁾, また酸化ストレスにより惹起される hypoxia inducible factor の標的遺伝子を不活化する¹⁶⁾点から, 抗癌剤として臨床試験も行われている。したがって, histone deacetylase 阻害剤は C型肝炎における肝線維化抑制ならびに hepcidin の発現を亢進させて鉄吸収を抑制するという観点から肝発癌を抑制しうる可能性がある。

また, NASH での鉄蓄積にレチノイドシグナルの障害が関与している可能性について言及したが, 既に非環式レチノイドが肝癌再発を有意に抑制することが10年以上も前に報告されており¹⁷⁾, この肝癌再発抑制機構に肝内鉄蓄積の軽減が寄与したか否かは非常に興味深いところである。経口鉄キレート剤, histone deacetylase 阻害剤, レチノイドいずれも異なった切り口からの鉄過剰状態を改善する可能性をもった薬剤であり, 今後の臨床試験が期待される。

文 献

- 1) Kato J, 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
- 2) Nishina S, et al : Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* **134** : 226-238, 2008
- 3) Furutani T, et al : Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* **130**:2087-2098, 2006
- 4) Nemeth E, et al : Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**:2090-2093, 2004
- 5) Lin L, et al : Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* **110** : 2182-2189, 2007
- 6) Babitt JL, et al : Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* **38** : 531-539, 2006
- 7) Pietrangelo A, et al : STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin *in vivo*. *Gastroenterology* **132** : 294-300, 2007
- 8) Miura K, et al : Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology* **48** : 1420-1429, 2008
- 9) Li Y, et al : Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *Faseb J* **21** : 2474-2485, 2007
- 10) Piccoli C, et al : Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. *Hepatology* **46** : 58-65, 2007
- 11) Sumida Y, et al : Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis : A pilot study. *Hepatol Res* **36** : 315-321, 2006
- 12) Otagawa K, et al : Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis : implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* **170** : 967-980, 2007
- 13) Yanagitani A, et al : Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* **40** : 366-375, 2004
- 14) Tsuchiya H, et al : Suppressive effects of retinoid on iron-induced oxidative stress in the liver. *Gastroenterology* in press
- 15) Niki T, et al : A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology* **29** : 858-867, 1999
- 16) Xu WS, et al : Histone deacetylase inhibitors : molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26** : 5541-5552, 2007
- 17) Muto Y, et al : Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* **334** : 1561-1567, 1996

日本臨牀 67 卷 増刊号 3 (2009 年 5 月 28 日発行) 別刷

肝 癌

—基礎・臨床研究のアップデート—

XIII. 肝癌診療と医療経済学

肝癌治療と医療経済学

日野啓輔 石田 博 井上裕二 沖田 極

肝癌治療と医療経済学

Cost effectiveness in the treatment for hepatocellular carcinoma

日野啓輔¹ 石田 博² 井上裕二² 沖田 極³

Key words : 費用対効果, マルコフモデル, 期待余命

はじめに

肝癌は我が国における癌死亡原因の第4位(2005年厚生労働省「人口動態統計」)であり、少なくとも今後数年間は増え続けると予想される悪性疾患である。比較的大きな肝癌を治療対象とする欧米と異なり、我が国での治療対象は早期肝癌から進行肝癌にまで及び、更には根治後の肝癌再発抑制治療に至るまで幅広い治療が行われている。こうした現状は肝癌の進展度に応じた種々の治療法を生み出し、1つの治療に限定されない集学的治療の普及へとつながったが、その一方で我が国の肝癌の治療方針はまだまだ施設によりかなり異なるというのが現状である。治療選択にあたっては再発率や生存率などからみた治療効果が重要な選択基準になることは明白であるが、今後急速に高齢化社会を迎える我が国においてはQOLならびに医療経済学的観点からの肝癌治療選択も極めて重要である。

本稿では、費用対効果からみた肝癌治療選択の重要性を概説するとともに、著者らが行った病期からみた肝細胞癌治療における費用対効果の研究を紹介し、更には肝癌再発抑制のためのインターフェロン(IFN)治療の費用対効果についても言及する。

1. C型肝細胞癌に関する費用対効果の検討の現状

欧米に比較して我が国では医療効果について費用対効果およびQOLの観点から検討した研究は少ない。HCV持続感染が肝細胞癌発生の危険因子であることは周知の事実であるため、肝細胞癌スクリーニングの有無からみたHCV関連肝硬変症の予後に関する前向き調査は倫理的な観点からも行いにくい。そこでマルコフモデルを用いた肝細胞癌スクリーニングの費用対効果の検討が報告されている¹⁾。同論文は米国からのものであり、肝細胞癌の治療手段が外科切除、脳死肝移植、生体肝移植のいずれかであるところが我が国と大きく異なっており興味深い。後述する著者らの小肝細胞癌に対する治療別の費用対効果解析には肝移植という選択肢が含まれていないため、まず肝移植を治療の中心とした費用対効果解析を紹介する。このモデルでは肝細胞癌を小(2cm以下)、中(3-5cm)、大(5cm以上)に分け、小、中肝細胞癌のみを治療対象とし、コホート開始年齢を45歳として、80歳時か死亡時までフォローすることを条件としている。肝細胞癌のためのスクリーニングは比較的我が国と類似しており、6カ月サイクルのAFP値と腹部超音波検査からなり、AFP値が20 μ g/Lを超えるか腹部超音波検査で腫瘍性

¹Keisuke Hino: Division of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical College 川崎医科大学 肝胆膵内科

²Haku Ishida, Yuji Inoue: Division of Medical Informatics and Decision Sciences, Yamaguchi University Hospital 山口大学医学部附属病院 医療情報部 ³Kiwamu Okita: Shimonoseki Kohsei Hospital 社会保険下関厚生病院

表1 HCV関連肝硬変症における肝細胞癌スクリーニング費用対効果(文献¹⁾より改変)

	費用(\$)	QALYs*	増分費用対効果比(\$/QALYs)
自然経過	53,200	14.754	
スクリーニング +外科的切除術	63,500	15.243	26,100
スクリーニング +脳死肝移植	173,500	17.334	46,700
スクリーニング +生体肝移植	245,400	18.561	50,400

*生活の質(QOL)で補正した期待余命。

病変が検出されればヘリカルCT検査を行い、CT所見が陽性であれば肝硬変の程度(代償性、非代償性)と肝細胞癌の大きさに応じて治療が選択されることになっている。表1に示すようにHCV関連肝硬変症の自然経過と比較して、スクリーニング+外科的切除術、スクリーニング+脳死肝移植、スクリーニング+生体肝移植では期待余命がそれぞれ0.49, 2.58, 3.81年延長し、増分費用対効果は生涯医療費として最も高額であった生体肝移植においても\$50,400/QALYsであった。また、肝細胞癌のスクリーニングは結果的に肝細胞癌の治療効果と治療経費に最も影響することも明らかにされている。

我が国においても非代償性肝硬変や肝細胞癌(ミラノ基準内)に対する生体肝移植が認可されたので、今後、肝細胞癌治療の選択肢として肝移植症例が増加すると予想される。したがって、本論文のように肝細胞癌スクリーニングを行い早期に肝細胞癌の治療として肝移植を行うことが費用対効果的にみても有意義であるとする成績は今後の肝細胞癌に対する治療指針の一つになりうると思われる。

2. 費用対効果からみた小肝細胞癌に対する外科的切除術と内科的局所療法の比較

欧米に比べて我が国のウイルス性慢性肝疾患患者では早期肝細胞癌、すなわち単発の小さな肝細胞癌の状態で見られることが多く、その際の治療としては外科的切除術か内科的局所療法が選択されることが多い。生存率など治療効

果の比較については多く報告されているが、費用対効果からみた検討は行われていない。そこで、著者らの行った費用対効果分析について簡単に紹介する。

a. 肝細胞癌治療の費用対効果解析のためのモデルの作成

一般的に費用対効果分析には一定の病態推移を前提としたマルコフモデルが用いられることが多いが、肝癌の治療では種々の腫瘍因子および背景肝の状態に応じて異なる治療が適切に選択されるため、それらが確率的に行われると仮定してモデルを作成した。すなわち、肝細胞癌の初発から死亡に至る経過を治療遷移モデルとして作成し、患者データを適用することによりモデルの妥当性および修正を行った。今回の治療遷移モデルは、治療と対応する肝細胞癌の病態(腫瘍径、個数、背景肝など)の対応関係が一定であることが前提となっている。プレリミナリーモデルとして単発の小肝細胞癌(3cm以下)の初発症例をコホートとし、外科的治療とPEIT, RFAなどの内科的局所療法の2つの決断枝から肝疾患およびその他の死亡による2つのabsorbing stateを含む16のhealth stateからなるマルコフモデルを想定した。

b. 遷移確率の決定

治療遷移モデル作成のための遷移確率は、各治療間における期間(median)とその後各種治療がどのような比率で選択されるかを求めることとし、一部の遷移確率(慢性肝炎から肝硬変への年次移行率と代償性肝硬変から非代償性肝硬変への年次移行率および外科的切除術と内科的局所療法に伴う死亡率)は文献データによったが、その他は解析コホートからのデータにより算出した。

c. 肝細胞癌における医療費の推定

ある一定時期に肝細胞癌で入院した患者をコホートとして、慢性肝炎および肝硬変症の医療費については外来の標準的な受診モデル(検査、薬剤投与を含む)を考慮し、また非代償性肝硬変症については入院医療費を上記と同様の方法で推定し、外来費用に加算してその年間医療費を推定した²⁾。

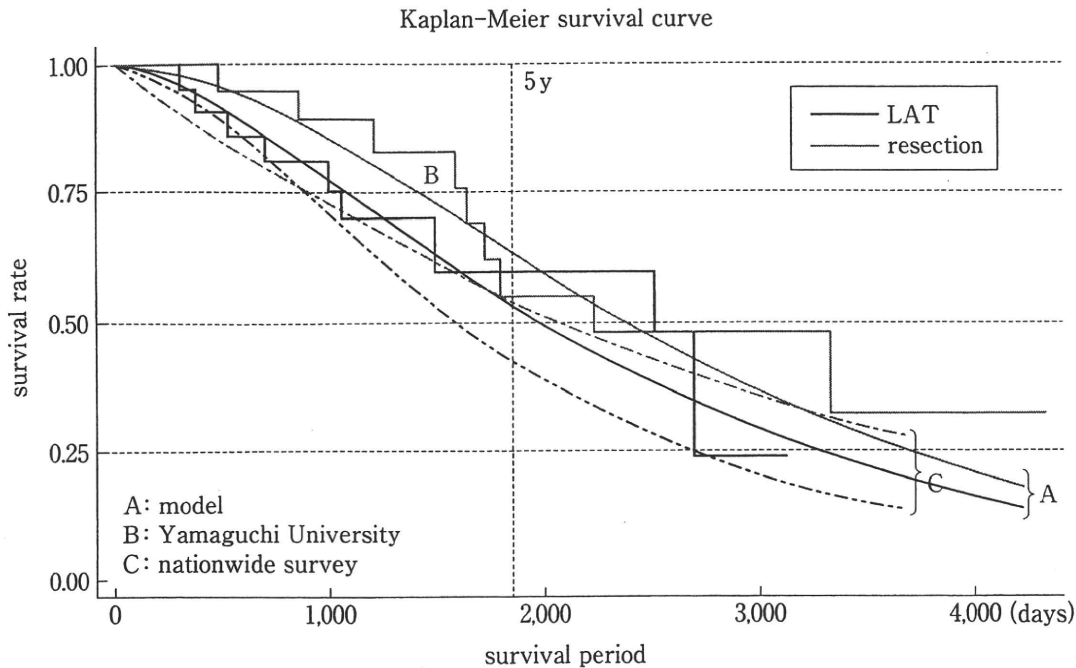


図1 生存曲線(モデル・実患者データ・全国原発性肝癌追跡調査)

表2 単発小肝細胞癌における経皮的局所療法と肝切除の費用対効果

初回治療	費用(円)	期待余命(年)	増分費用対効果比(円/年)
割引なし			
経皮的局所療法	8,230,000	6.44	1,674,000
肝切除術	10,074,000	7.54	
割引あり(3%/年)			
経皮的局所療法	7,301,000	5.63	1,906,000
肝切除術	8,918,000	6.48	

d. モデルの検証

図1は構築したモデルで単発小肝細胞癌(3cm以下)の初回治療として肝切除術および内科的局所療法について、モデルによる生存曲線、症例データから作成したKaplan-Meier曲線および第16回原発性肝癌追跡調査(日本肝癌研究会)における生存曲線を比較したものである。今回作成したモデルの生存曲線は、症例データによるKaplan-Meier曲線に類似したものでありモデルとしては妥当と考えられた。

e. 費用対効果

医療費をモデルに入れて求めた費用対効果分析の結果を表2に示す。肝切除術は割引(discount)なしの条件で内科的局所療法に比し、約

1.1年の期待余命の延長をもたらし、約180万円の生涯医療費の増加により、増分費用対効果は167万円/年となった。また、年3%の割引条件では、約191万円/年の増分費用対効果であった。

3. 肝癌再発抑制のためのインターフェロン(IFN)治療の費用対効果

HCVに起因する肝細胞癌は治療後も高率に再発を繰り返すことを考えると、究極的な肝細胞癌の治療は治療後の再発抑制ともいえる。最近、我が国においてはC型肝炎治療後の再発抑制を目的としてIFN治療を行う症例が増加している。この点に関してHoshidaらは、外科

切除後の肝細胞癌再発抑制を目的としたIFN治療の費用対効果について報告している³⁾。マルコフモデルを用いた解析ではIFN治療により期待余命は6.1年延長し、生涯医療費が\$77,000増加することより、増分費用対効果は年3%の割引条件で\$15,700と算出されHCVに起因する肝細胞癌の外科的肝切除後のIFN治療の費用対効果が明らかにされている。また、IFN治療により外科的切除後から死亡までの肝細胞癌再発率は87.6%から62.9%に低下すると予測さ

れている。

おわりに

従来の肝細胞癌治療の評価と異なり、このような肝細胞癌における費用対効果の解析は肝細胞癌という疾患の特異性、複雑性から容易なものではないが、高齢化社会を迎える我が国においては今後の肝細胞癌治療の重要な選択基準の一つになっていく可能性があると思われる。

■ 文 献

- 1) Partel D, et al: Cost-effectiveness of hepatocellular carcinoma surveillance in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3: 75-84, 2005.
- 2) 石田 博ほか: 肝細胞がんにおける合併症と治療を考慮した医療費推定の試み. *医療情報学* 24: 667-674, 2005.
- 3) Hoshida Y, et al: Cost-effectiveness of adjuvant interferon therapy after surgical resection of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Liver* 22: 479-485, 2002.

酸化ストレスの抑制はC型肝炎の肝発癌を抑制しうるか?

Can the hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C be suppressed by reducing oxidative stress?



吉岡奈穂子(写真) 日野啓輔

Naoko YOSHIOKA and Keisuke HINO

川崎医科大学内科学(肝・胆・膵)

◎C型慢性肝炎の治療はC型肝炎ウイルス(HCV)の排除であるが、現在の標準的治療でも約半数の症例ではウイルス排除が困難である。そこで、ウイルスが排除できなくてもC型肝炎の高率な肝発癌を抑制する治療の確立も重要となる。C型肝炎の肝発癌機構はいまだ全貌が明らかにされたわけではないが、すくなくとも酸化ストレスが深く関与していることがこれまでの研究から明らかにされている。本稿ではC型肝炎における酸化ストレス亢進の機序を概説するとともに、ウイルス排除によらないC型肝炎からの肝発癌抑制効果を示した治療のなかで、酸化ストレスを軽減することで肝発癌を抑制した研究に焦点をあて、酸化ストレスを軽減することでC型肝炎の肝発癌を抑制しうるかどうかについて考察する。



Key word : 活性酸素, ミトコンドリア, 鉄, 瀉血, インターフェロン, 分枝鎖アミノ酸

わが国の肝細胞癌の90%以上は肝炎ウイルス感染に起因し、その大半はC型肝炎ウイルス(HCV)感染によって引き起こされることは周知の事実である。ペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン併用療法によっても約半数はウイルスの排除が困難であり、このためウイルス共存下での肝発癌抑制は重要な臨床課題である。

HCVによる肝発癌機構はいまだ不明の点も多いが、C型肝炎の病態形成ならびに肝発癌に酸化ストレスが関与していることは多くの研究により明らかにされている。本稿では、酸化ストレスの抑制がC型肝炎からの肝発癌を抑制しうるかどうかについて考察する。

C型肝炎における酸化ストレス亢進機序

1995年 Farinati ら¹⁾によって、C型肝炎患者の肝組織には鉄沈着や脂質過酸化物の蓄積が認められ病態形成に酸化ストレスが重要な役割を占めることが報告され、その後もC型肝炎と酸化ストレスとの関係を示す臨床成績が数多く報告されている。酸化ストレスを引き起こす分子は活性酸素であるが、Okuda ら²⁾は *in vitro* において HCV コア

蛋白が活性酸素の産生を亢進することを報告し、Korenaga ら³⁾は活性酸素の産生にコア蛋白によるミトコンドリア電子伝達系複合体Iの活性阻害が関与することを明らかにした。さらに最近の報告では、HCV コア蛋白によるミトコンドリアへのカルシウムイオンの流入促進が、複合体Iの活性阻害も含めて活性酸素の産生を亢進させる可能性を指摘している^{4,5)}。

このように HCV による直接的な活性酸素の産生亢進、すなわち酸化ストレス亢進機序が存在する一方で、著者らは HCV により引き起こされる鉄代謝異常が酸化ストレスをさらに増強することを報告した⁶⁾。すなわち、HCV による活性酸素が鉄吸収の抑制ホルモンである hepcidin の転写を抑制することで鉄過剰を引き起こすことを示した。最近別のグループから、histone deacetylase 活性亢進によるヒストンのアセチル化抑制が hepcidin の転写を抑制することも報告されている⁷⁾。

C型肝炎の肝発癌に酸化ストレスがどのように関与しているか

上記のように、HCV 蛋白による酸化ストレスが

肝細胞内に蓄積すると肝障害のみならず酸化的 DNA 損傷を引き起こし、これが肝発癌を促進するであろうということは容易に想像がつくが、ではいったいどのようにして肝発癌をきたすのであろうか。

実験データからも示されるように、HCV コア蛋白が引き起こす酸化ストレスの magnitude はそれほど大きいものではなく、事実、臨床的にも HCV 持続感染者が均一に肝発癌を引き起こすわけではない。加齢、アルコール、線維化進展、男性、肥満、インスリン抵抗性、鉄過剰などが加わることによって発癌が高率になることが臨床的にも示されている。興味深いことにこれらの二次的因子はいずれも酸化ストレス増強因子であり、C 型肝炎の肝発癌には酸化ストレスの増強が必要であると考えられる。

加齢やアルコールは、ミトコンドリア障害やミクロソームで活性酸素の発生源となる CYR2E1 を活性化することにより酸化ストレスを誘導することが知られている。また、高齢になると活性酸素に対する細胞の感受性が高くなることも *in vitro* で明らかにされている⁸⁾。肝内の酸化ストレスの亢進は Kupffer 細胞の活性化によるサイトカインの放出を引きこし、星細胞が活性化されて肝線維化が進展する。著者らは、HCV 感染時年齢が高齢であるほどその後の肝硬変の進展率や肝細胞癌の合併率がきわめて高いことを報告したが⁹⁾、まさしくこれらの基礎的データを裏づける臨床成績だと考えている。

肥満は多くの癌発生の危険因子であるが、アメリカで行われた 16 年にわたる大規模な prospective study においてとくに肝細胞癌の相対危険度が高いことが明らかにされており¹⁰⁾、わが国でも C 型慢性肝炎患者の BMI が増加するにつれて肝発癌が有意に増加することが報告されている¹¹⁾。肥満による肝発癌機序は今後さらに明らかにされていくと予想される。肥満と肝内の脂肪蓄積がかならずしも結びつくわけではないが、肝組織に脂肪化を認める C 型慢性肝炎症例は、そうでないものに比べて肝発癌率が高いことが臨床的に報告され¹²⁾、基礎的検討からは HCV コアトランスジェニックマウスにおいて、PPAR α の活性化¹³⁾や pro-

表 1 鉄負荷 HCV トランスジェニックマウスにおける肝腫瘍の発生¹⁵⁾

飼育期間	マウス	マウスの数	肝腫瘍の発生
6 カ月	nonTgM-C	10	0/10
	TgM-C	10	0/10
	nonTgM-Fe	10	0/10
	TgM-Fe	10	0/10
9 カ月	nonTgM-C	7	0/7
	TgM-C	6	0/6
	nonTgM-Fe	5	0/5
	TgM-Fe	6	0/6
12 カ月	nonTgM-C	10	0/10
	TgM-C	8	0/8
	nonTgM-Fe	9	0/9
	TgM-Fe	11	5/11

nonTgM-C：通常餌で飼育のコントロールマウス、TgM-C：通常餌で飼育のトランスジェニックマウス、nonTgM-Fe：鉄過剰餌で飼育のコントロールマウス、TgM-Fe：鉄過剰餌で飼育のトランスジェニックマウス。

teasome activator である PA28 γ ¹⁴⁾が肝脂肪化と発癌に重要であることが明らかにされている。

また、著者らは鉄過剰が肝発癌に及ぼす機序を検討する目的で、HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウスに軽度の鉄過剰餌を与え、C 型慢性肝炎患者と同等の肝内鉄濃度を有する動物モデルを作成した¹⁵⁾。その結果、肝内の鉄蓄積とともに肝脂肪化が著明となり、ミトコンドリアの形態ならびに機能異常を経て肝内酸化ストレスが亢進し、ついには酸化的 DNA 障害の指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の蓄積とともに高率な肝発癌を認めた(表 1)。

酸化ストレス抑制からみた肝発癌阻止のための strategy

C 型肝炎の病態形成に酸化ストレスが大きく関与し、HCV の直接的な作用のみならず酸化ストレス増強因子の関与が肝発癌にはきわめて重要であることを述べてきたが、ここでは HCV の排除によらない酸化ストレス抑制が肝発癌を阻止しうるかどうかについて考察する。

1. HCV の増殖抑制は酸化ストレスを軽減し、肝発癌を抑制しうるか?

わが国では retrospective ではあるものの数多くの大規模なコホート研究において、C 型慢性肝炎に対するインターフェロン (IFN) 治療は、かなら

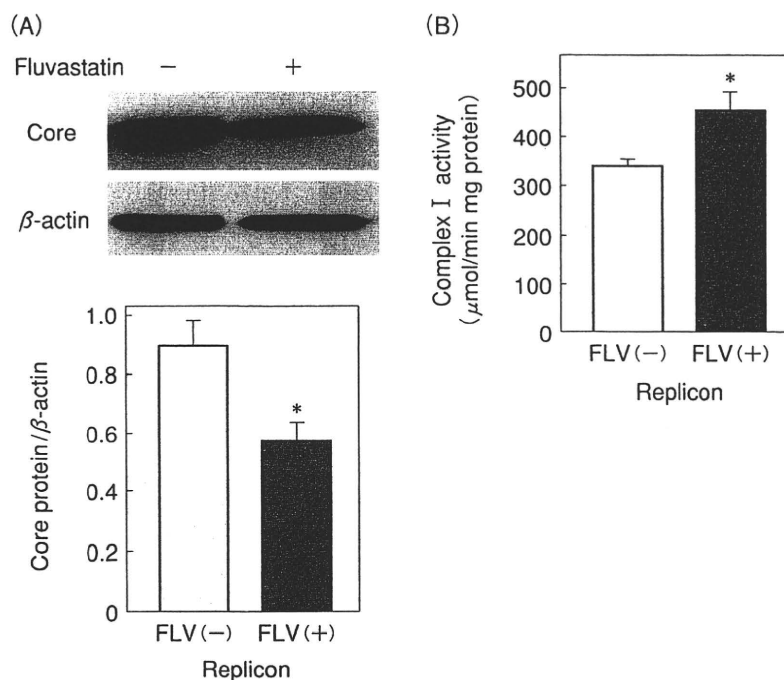


図 1 FluvastatinによるHCVコア蛋白の発現抑制とミトコンドリア電子伝達系複合体 I 活性の回復¹⁷⁾

A: HCV レプリコン細胞における Fluvastatin による HCV コア蛋白の発現抑制。

B: レプリコン細胞における Fluvastatin による複合体 I 活性の回復。

*: $p < 0.05$.

ずしも HCV を排除できなくとも肝発癌を抑制することが示されてきた¹⁶⁾。事実、臨床の現場においては、これらの成績をもとに肝発癌抑制を目的とした IFN の少量長期投与が行われている。著者らは IFN による HCV 排除ではなく、HCV 増殖抑制が HCV の惹起する酸化ストレスを軽減するかどうかについて実験的検討を行った。HCV 全遺伝子が挿入されたレプリコン細胞にスタチンのひとつである Fluvastatin を添加し、HCV の増殖を部分的に抑制すると、コントロールのレプリコン細胞に比べてミトコンドリア電子伝達系の複合体 I の活性が回復した¹⁷⁾(図 1)。冒頭でも述べたように HCV による活性酸素の産生亢進には複合体 I の活性低下が関与しており³⁾、この点からも HCV の増殖を抑制する、すなわちコア蛋白の発現を抑えることで酸化ストレスが軽減されることが明らかとなった。

この結果を臨床的観点から考察すると、HCV がかならずしも排除されなくとも IFN 少量投与などにより HCV の増殖が長期に抑えられれば、HCV 起因性の酸化ストレスが軽減され、ひいては

肝発癌が抑制されるというシナリオが浮かんでくる。しかし最近、アメリカにおいて低用量の PEG-IFN 長期投与が C 型肝炎の線維化の進行や肝発癌を抑制するかどうかを prospective に検討したいわゆる HALT-C Study の結果が発表され、IFN の少量長期投与は肝発癌を抑制しないことが示された¹⁸⁾。日本人研究者にとってはかなりショッキングな結果ではあるが、HALT-C Study の患者年齢は治療群、コントロール群がそれぞれ 51 歳と 50 歳と若年であり、これまでわが国で報告されてきた IFN の発癌抑制効果に関する retrospective study の対象年齢とはかなり隔たりがみられる。加齢とともに C 型肝炎からの肝発癌率が上昇することを考えると、日米の成績の差については今後さらなる検討が必要と思われる。

2. 強力ネオミノファーゲンC® (SNMC)

SNMC はわが国において肝炎の抗炎症効果を期待して広く用いられている注射薬である。長期に炎症を抑制することにより肝発癌が抑制するかどうかはいまだ議論のあるところであるが、Arase らは retrospective な大規模コホート研究に

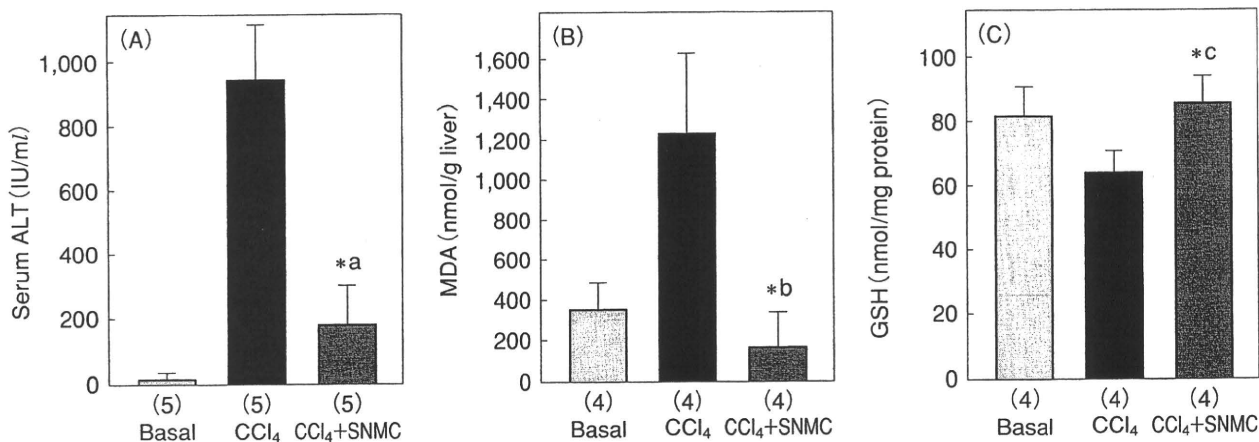


図 2 HCVトランスジェニックマウスにおけるSNMCの抗酸化作用²¹⁾

HCVトランスジェニックマウスにおいて四塩化炭素(CCl₄)による血清ALT値(A), 肝内malondialdehyde(MDA)(B)の上昇と肝内還元型グルタチオン(C)の低下は, SNMCにより回復した。

*^a: $p=0.0009$ vs. mice with CCl₄, *^b: $p=0.0006$ vs. mice with CCl₄, *^c: $p=0.005$ vs. mice with CCl₄.

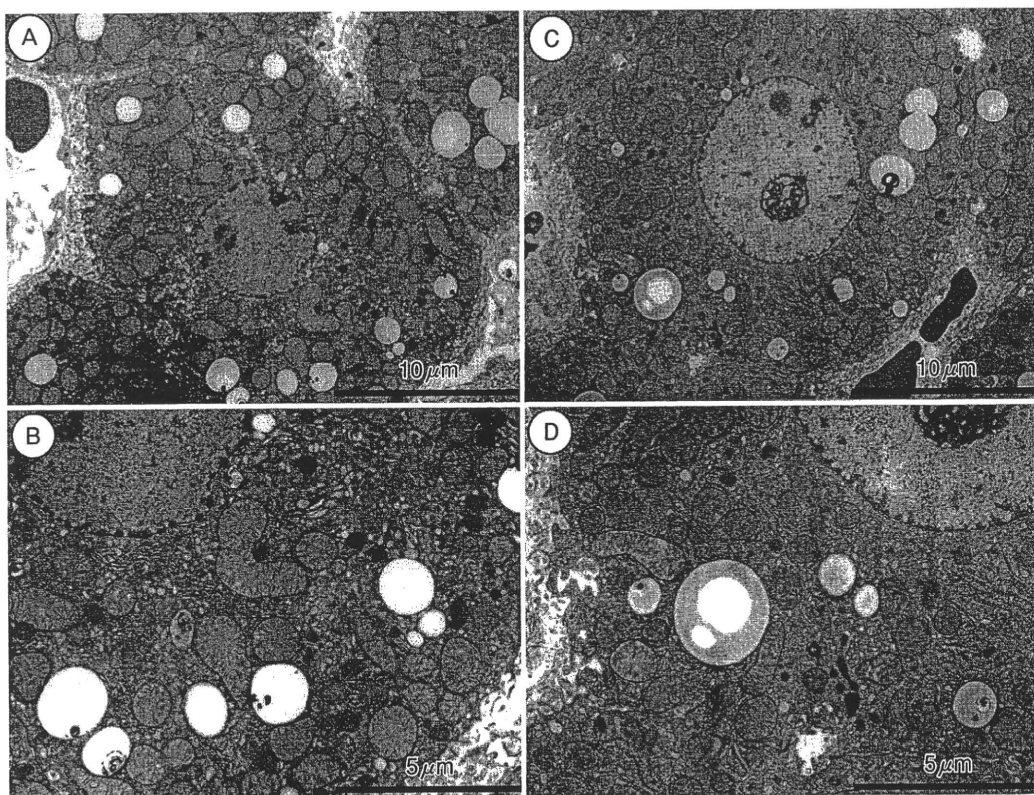


図 3 HCVトランスジェニックマウスにおけるSNMCのミトコンドリア保護作用²⁰⁾

CCl₄によるミトコンドリアの膨化や大小不同といった形態異常(A, B)は, SNMCにより軽減された(C, D)。

において, SNMCによる長期にわたるトランスアミナーゼの安定化はC型慢性肝炎の肝発癌を抑制しうることを報告している¹⁹⁾。著者らはSNMCの肝発癌抑制に抗酸化ストレスが関与しているかどうかについて, HCV全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウスを用いて基礎的検討を行った。トランスジェニックマウスに四塩化炭素を腹

腔内投与し, その30分後にSNMCを投与すると血清ALT値と脂質過酸化物質であるmalondialdehydeが有意に低下し, 肝内還元型グルタチオン量が増加するとともに四塩化炭素によるミトコンドリアの形態異常が改善した²⁰⁾(図2, 3)。以上より, SNMCが抗酸化作用を発揮してミトコンドリアを保護することで, HCV蛋白存在下の肝発癌を抑

制する可能性が考えられる。

3. 瀉血

前述したように鉄過剰による酸化ストレスは肝発癌因子のひとつである。鉄過剰による酸化ストレスが病変の進展に関与しているとされる場合は、瀉血療法が治療のオプションとなりうるし、事実、C型慢性肝炎の治療のひとつとして瀉血は保険診療に認可されている。瀉血療法の目的は除鉄であり、除鉄により直接的な活性酸素発生の抑制が期待される。Katoらは、C型慢性肝炎患者に6年間瀉血を行うことにより肝内の8-OHdGが有意に低下し、瀉血を行わなかったコントロール群に比べて肝硬変への進展率や肝発癌率が低下したことを報告している²¹⁾。

瀉血とは異なるが、鉄キレートという観点からはこれまでデフェロキサミン(デスフェラル)が用いられてきたが、血中半減期が短いため持続点滴か持続皮下注でないとう有効性が低く、外来患者で十分な鉄除去率を得るのが困難であった。これに対し最近認可されたデフェラシロクス(エクジェイド®)は経口の鉄キレート剤であり、連日服用することにより十分な鉄キレート作用が期待される。

4. Retinoid(レチノイド)

レチノイドとは、ビタミンA(レチノール)ならびにレチノイン酸とその合成誘導体を総称したものである。食物から吸収されたレチノイドは脂肪酸と結合したエステルとして肝星細胞に貯蔵されるが、需要に応じてレチノールとして血中に分泌され、標的細胞内で酸化され、活性型レチノイドであるレチノイン酸となる。

Yanagitaniらは、レチノイン酸受容体 α の dominant negative 受容体を肝に高発現するトランスジェニックマウスでは脂肪性肝炎を起こしその後肝癌を発症することを報告しているが²²⁾、最近同じグループから、レチノイドシグナルが hemojuverin の転写調節に関与していることが報告された²³⁾。すなわち、レチノイドは hemojuverin の転写を抑制することでその下流の transferrin receptor 2 と hepcidin の発現を抑制し、結果としてトランスフェリン鉄の取込み低下と ferroportin の発現亢進による肝細胞からの鉄放出によって肝細胞

内の鉄を低下させるとしている。この2つの報告を総合すると、脂肪性肝炎におけるレチノイドシグナルの障害が肝内鉄過剰を引き起こす可能性が考えられ興味深い。一方、合成レチノイドである非環式レチノイドにより肝癌再発が有意に抑制されるという prospective study が報告されている²⁴⁾。レチノイドが細胞分化やアポトーシスに重要な役割を果たすことが知られているが、今後酸化ストレス抑制の観点からの肝発癌抑制効果についての解明も期待される。

5. 分枝鎖アミノ酸

分枝鎖アミノ酸は、肝硬変に対する栄養改善療法として臨床的にも広く使われている。最近、646例の非代償性肝硬変を対象としたわが国の多施設 prospective study において、分枝鎖アミノ酸投与群は非投与群に比べてイベント発生率(肝癌発生、静脈瘤破裂、肝不全の進行)が有意に低下し、分枝鎖アミノ酸投与群の BMI 25 以上症例や AFP 20 ng/ml 以上の症例において肝発癌リスクが低下することが明らかにされた²⁵⁾。Ohnoらは肝硬変症における分枝鎖アミノ酸の肝発癌抑制効果機序として、酸化ストレス抑制効果について検討している。すなわち、6カ月の分枝鎖アミノ酸投与により血清フェリチン、高感度CRP、尿中8-OHdGが有意に低下したのに対し、対照群では逆に尿中8-OHdGと15-F2t-Isoprostaneが有意に上昇し、分枝鎖アミノ酸の抗酸化作用が臨床的に示されている²⁶⁾。このように肝硬変症に対する分枝鎖アミノ酸投与は酸化ストレスの軽減により肝発癌を抑制する効果が期待されるが、その機序についてはさらなる検討が必要と考えられる。

おわりに

C型肝炎の肝発癌に酸化ストレスが深く関わっていることは明らかであり、酸化ストレスを増強する因子の排除は肝発癌抑制の観点からも重要である。加齢や性別は別として肥満やアルコールなどの因子は排除可能であり、この点からも生活習慣の是正は肝発癌抑制効果をもたらすと期待される。また、たとえHCV排除に至らなくとも酸化ストレスを抑制するさまざまな strategy によりすこしでも肝発癌を抑えることも、重要な治療

のオプションと考えられる。

文献

- 1) Farinati, F. et al. : *J. Hepatol.*, **22** : 449-465, 1995.
- 2) Okuda, M. et al. : *Gastroenterology*, **122** : 366-375, 2002.
- 3) Korenaga, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **280** : 37481-37488, 2005.
- 4) Li, Y. et al. : *Faseb J.*, **21** : 2474-2485, 2007.
- 5) Piccoli, C. et al. : *Hepatology*, **46** : 58-65, 2007.
- 6) Nishina, S. et al. : *Gastroenterology*, **134** : 226-238, 2008.
- 7) Miura, K. et al. : *Hepatology*, **48** : 1420-1429, 2008.
- 8) Tanguy, S. et al. : *Mech. Ageing Dev.*, **124** : 229-235, 2003.
- 9) Murakami, C. et al. : *J. Clin. Gastroenterol.*, **28** : 148-152, 1999.
- 10) Calle, E. E. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **348** : 1625-1638, 2003.
- 11) Ohki, T. et al. : *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **6** : 459-464, 2008.
- 12) Ohata, K. et al. : *Cancer*, **97** : 3036-3043, 2003.
- 13) Tanaka, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **118** : 683-694, 2008.
- 14) Moriishi, K. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** : 1661-1666, 2007.
- 15) Furutani, T. et al. : *Gastroenterology*, **130** : 2087-2098, 2006.
- 16) Hino, K. et al. : *J. Antimicrob. Chemother.*, **53** : 19-22, 2003.
- 17) Ando, M. et al. : *Liver Int.*, **28** : 1158-1166, 2008.
- 18) Di Bisceglie, A. M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **359** : 2429-2441, 2008.
- 19) Arase, Y. et al. : *Cancer*, **79** : 1494-1500, 1997.
- 20) Hidaka, I. et al. : *Liver Int.*, **27** : 845-853, 2007.
- 21) Kato, J. et al. : *Cancer Res.*, **61** : 8697-8702, 2001.
- 22) Yanagitani, A. et al. : *Hepatology*, **40** : 366-375, 2004.
- 23) Tsuchiya, H. et al. : *Gastroenterology*. (in press)
- 24) Muto, Y. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **334** : 1561-1567, 1996.
- 25) Muto, Y. et al. : *Hepatol. Res.*, **35** : 204-214, 2006.
- 26) Ohno, T. et al. : *Hepatol. Res.*, **38** : 683-688, 2008.

* * *