



特集◇HCV 検査と治療の最前線

慢性 C 型肝炎の補助療法 — グリチルリチン製剤等 —

富山 恭行¹⁾・日高 勲²⁾・日野 啓輔¹⁾

1) 川崎医科大学内科学(肝・胆・膵) 2) 山口大学大学院消化器病態内科学

Key words: グリチルリチン, 肝庇護療法, 肝細胞癌

はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染は肝細胞癌(HCC)や肝硬変への進展といった肝疾患の進行に関連している。ペグインターフェロン・リバビリン併用療法による抗ウイルス療法は50~85%の患者に有効とされているが、適応外の患者や無効例においてはウイルス共存下での肝発癌抑制が必要である。ALTの持続正常化はHCCの発生を含む慢性肝炎の合併症を減らす上で重要であり、血清ALT値の低下を目標とする肝庇護療法は肝炎を鎮静化し肝硬変やHCCへの進展を抑制するため、依然として重要な治療法である。本稿では、C型肝炎における肝庇護療法と肝発癌抑制効果について概説する。

I. 強力ネオミノファーゲンシー®
(SNMC)

酸化ストレスはHCV感染による重要な肝障害機序の一つと考えられており、臨床的にはC型肝炎患者において種々の酸化ストレスマーカーの上昇が報告されている。酸化ストレスにより引き起こされる酸化的DNA障害は遺伝子の不安定化をもたらす、ひいては発癌に関与す

ると考えられる。しかしHCV蛋白自身によって誘導される酸化ストレスはそれほど大きいものとは考えられず、加齢、アルコール、線維化進展、男性、肥満、鉄過剰、インスリン抵抗性といった臨床的要因によって、C型肝炎患者の進行が促進されることが知られており、HCV蛋白とこれらの二次的要因の相互作用によって誘導される酸化ストレスが発癌に関与すると考えられている。実際に、われわれは鉄負荷HCVトランスジェニックマウスにおいて、鉄過剰食投与6カ月目に著明な肝脂肪化とミトコンドリア障害を認め、投与12カ月目に肝内脂質過酸化物の増加や酸化的DNA障害の指標である8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアニン(8-OHdG)の増加とともにHCCが発生することを報告した¹⁾。

本邦ではグリチルリチン含有製剤である強力ネオミノファーゲンシー®(SNMC)が30年以上にわたり慢性肝炎の治療に用いられてきた。SNMCは0.2%のグリチルリチンと0.1%のシステイン、2%のグリシンを含有しており、静脈投与が可能な製剤である。グリチルリチンは甘草の根の水溶性抽出物であり、抗アレルギー作用、抗炎症作用、解毒作用を有している。SNMCの抗炎症作用は肝細胞膜の保護作用に

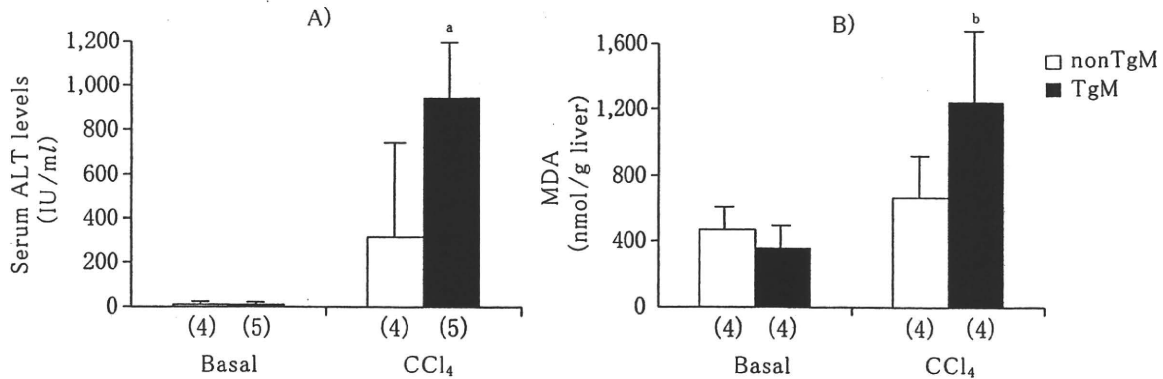


図1 四塩化炭素 (CCl₄) 投与前後の血清 ALT 値 (A) と肝内マロンジアルデヒド (MDA) 含有量 (B) (文献⁶より引用)

ノントランスジェニックマウスにおいては血清 ALT 値 (A), 肝内 MDA 含有量 (B) はいずれも上昇しなかったが, HCV トランスジェニックマウスにおいては CCl₄投与により有意に上昇し, CCl₄誘導性肝障害を引き起こした。

TgM: HCV トランスジェニックマウス nonTgM: ノントランスジェニックマウス

^a: $p < 0.0001$ vs basal mice ^b: $p < 0.005$ vs basal mice

() 内の数字は各群における検討した動物の匹数を示す。

よるものと考えられている。Suzuki らの二重盲検無作為抽出比較試験によると, 日本の慢性肝炎患者において SNMC 投与により血清 ALT 値の有意な低下を認めた²⁾。またヨーロッパにおける無作為抽出試験においても, C 型慢性肝炎に対する SNMC 26 週投与により血清学的・組織学的改善を認めたと報告されている³⁾。さらに Arase らは retrospective な大規模コホート研究において, 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 型慢性肝炎患者の肝発癌を抑制し得ることを報告しており⁴⁾, その後の Ikeda らによる解析でも SNMC 治療群は非治療群と比較して有意に発癌率が低値であったことを報告している⁵⁾。

筆者らは SNMC の肝発癌抑制効果として抗酸化作用が関与しているか否かについて HCV 全遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (HCV TgM) を用いて基礎的検討を行った⁶⁾。ごく少量の四塩化炭素 (10 μ g/kg body weight) を腹腔内投与したところコントロールマウスでは血清 ALT 値も肝内脂質過酸化物質 (malondialdehyde) も有意な上昇を認めなかったが, HCV TgM ではともに有意な上昇を認めた (図1)。このようにコントロールマウスでは有意な障害を起こさない軽微な酸化ストレスに対して

も HCV TgM では肝障害が惹起され, 酸化ストレスに対する感受性が亢進していることが明らかとなった。

四塩化炭素投与 30 分後に SNMC 50 μ l (ヒトでは約 100 cc に相当) を投与すると血清 ALT 値や肝内脂質過酸化物質の上昇はキャンセルされ, 四塩化炭素により有意に低下した肝内グルタチオン (GSH) 量も basal level に復活した (図2)。四塩化炭素の代謝は小胞体のチトクローム P450 オキシゲナーゼシステムを介するトリクロロメチルフリーラジカルの生成から始まるということが知られており, 生体内において四塩化炭素を代謝する主なチトクロームアイソザイムは CYP2E1 である。本検討で用いた四塩化炭素の量は明らかな CYP2E1 の増加は認めず, SNMC によってもその発現量に明らかな変化は認めなかった。一方, ごく少量の四塩化炭素投与にもかかわらず, HCV TgM においてはミトコンドリアの膨化や大小不同といった形態学的異常を認め, これらの変化は SNMC によって改善された (図3)。

さらに SNMC により肝内 GSH 合成の律速酵素である γ -GSH mRNA 発現量の上昇を認めた。このように SNMC は四塩化炭素誘導肝障害に対して抗酸化作用を発揮するとともに, ミ

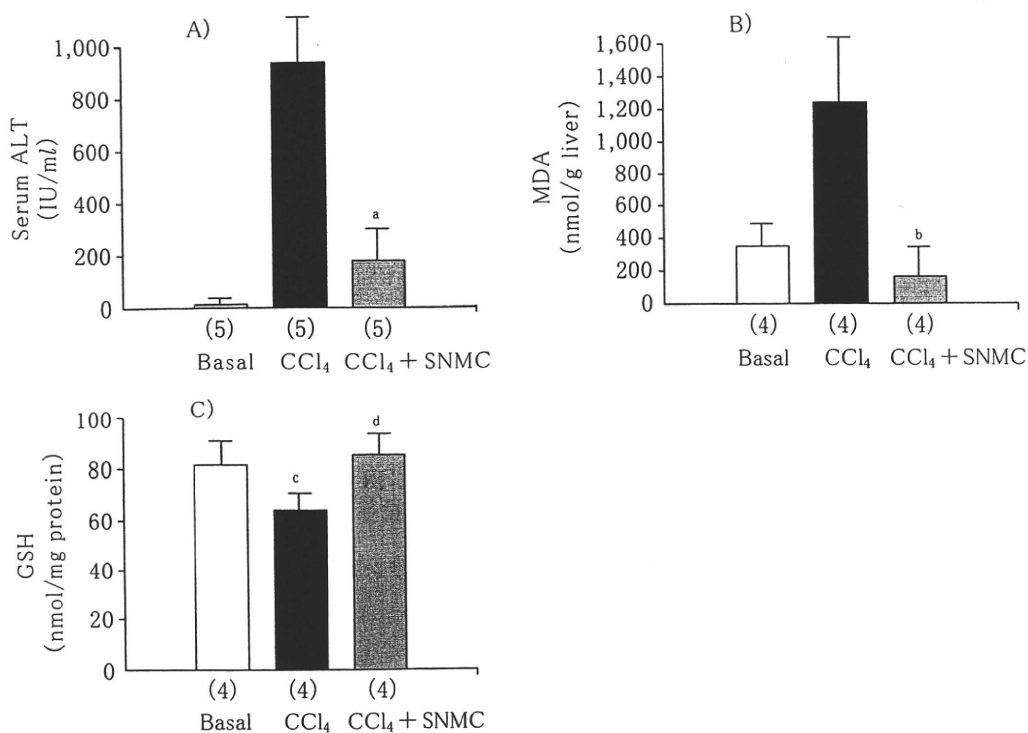


図 2 HCV トランスジェニックマウスにおける強力ネオミノファーゲンシー (SNMC) の抗酸化作用 (文献⁶⁾より引用)

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), 肝内マロンジアルデヒド (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: $p=0.01$ vs basal mice ^d: $p=0.0005$ vs mice with CCl₄

() 内の数字は各群における検討した動物の匹数を示す。

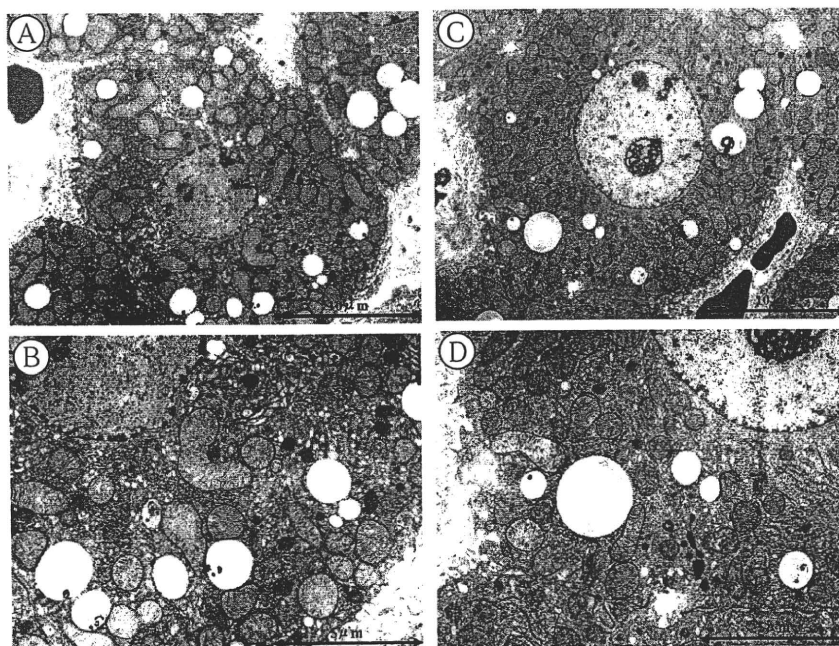


図 3 HCV トランスジェニックマウスにおける強力ネオミノファーゲンシー (SNMC) のミトコンドリア保護作用 (文献⁶⁾より引用)

四塩化炭素 (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)。

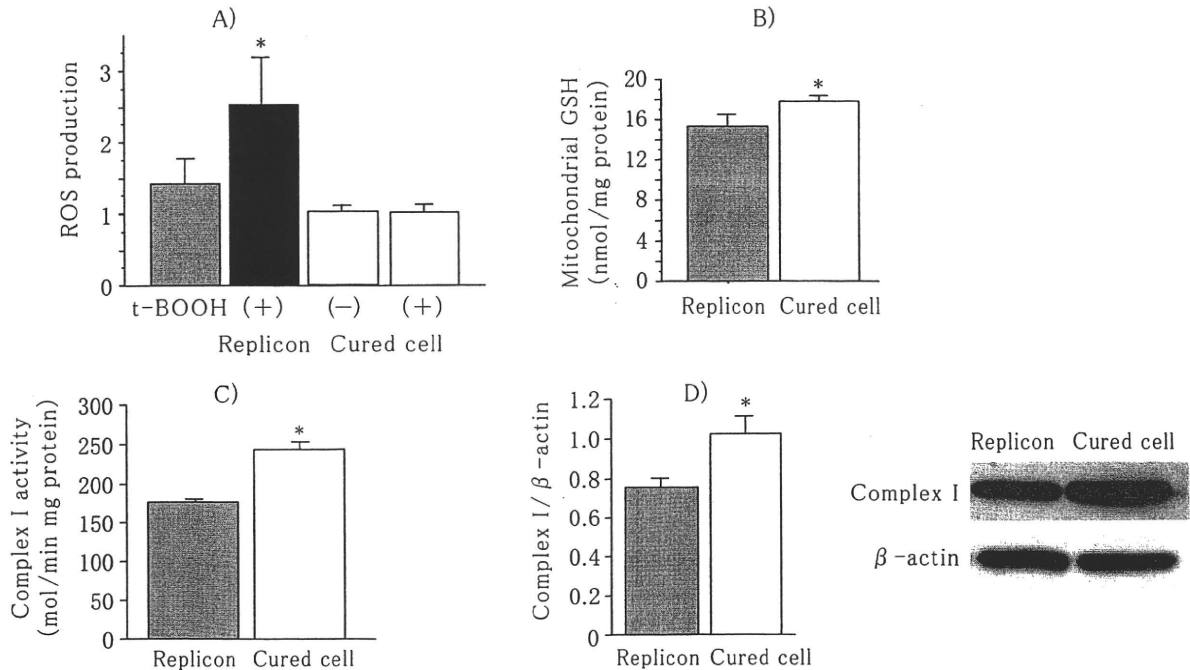


図4 HCV レプリコン細胞と cured cell における活性酸素、ミトコンドリア GSH 産生量ならびに電子伝達系複合体 I の活性と発現量 (文献⁹⁾より引用)

HCV レプリコン細胞の活性酸素 (ROS) はコントロール状態と tertiary butyl hydroperoxide (t-BOOH) 刺激下で測定した。IFN による HCV 増殖抑制化では ROS の産生は抑制され (A), ミトコンドリア GSH 産生量は増加し (B), 電子伝達系複合体 I の活性 (C) ならびに発現量 (D) は回復した。

* : $p < 0.05$

トコンドリア保護作用があることが明らかとなった。従来より SNMC は肝細胞膜保護作用を中心とした抗炎症効果が注目されていたが、このように抗酸化作用も有しており、酸化ストレスが肝発癌に重要な役割を果たす C 型慢性肝疾患においては抗炎症作用に加えて抗酸化作用が何らかの肝発癌抑制効果を発揮していると推測された。

II. インターフェロン (IFN) 少量長期投与

C 型慢性肝炎や代償性 C 型肝硬変患者における発癌予防には、インターフェロン (IFN) を中心としたウイルス駆除療法が唯一の根治的治療であるが、ALT の正常化を目標として行う IFN 少量長期投与は HCV の排除を目的としないため、肝底護療法の一つと考えられる。本邦における多数の retrospective な大規模コホート研究において、IFN 少量長期投与は肝発癌を抑制する可能性が示されている⁷⁾。一方、

最近発表されたいわゆる HALT-C study の結果、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⁸⁾。しかし HALT-C study における対象患者は若年者が多く、高齢化が顕著な本邦における C 型慢性肝炎患者とはかなり隔たりがみられる。加齢とともに発癌率が上昇することを加味してもこの結果がそのまま本邦の患者に当てはまるとは限らず、今後は IFN の少量長期投与の肝発癌抑制効果について本邦の患者を対象とした randomized controlled trial (RCT) を世界に発信する必要があると思われる。

その一方で IFN 少量長期投与の肝発癌抑制効果機序については不明の点も多い。筆者らは HCV レプリコン細胞を用いて、HCV 排除ではなく増殖抑制により HCV の惹起する酸化ストレスが抑制されることを報告したので紹介する⁹⁾。HCV 全遺伝子が組み込まれたレプリコン細胞に IFN を添加し HCV 増殖を完全に抑制すると (cured cell), 細胞内の活性酸素の産

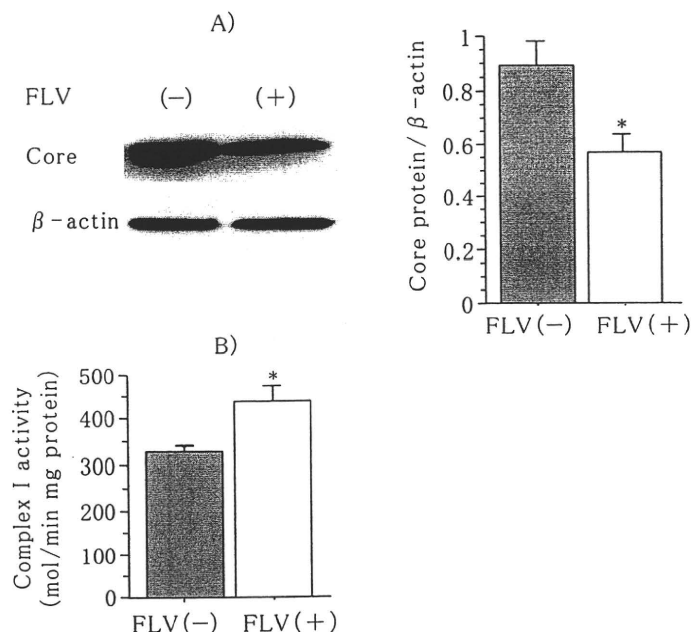


図 5 HCV レプリコン細胞に対するフルバスタチン (FLV) の HCV 増殖抑制効果と電子伝達系複合体 I 活性の回復

HCV レプリコン細胞は FLV により HCV コア蛋白の発現が抑制され (A), それに伴い電子伝達系複合体 I の活性も回復した (B)。

* : $p < 0.05$

生は抑制され、ミトコンドリア内の GSH 量が増加し、電子伝達系複合体 I の活性ならびに発現量は回復することが明らかとなった (図 4)。一方、HCV 増殖抑制効果が明らかにされているフルバスタチンをレプリコン細胞に添加すると、HCV コア蛋白の発現は消失しないものの抑制され、これに伴い電子伝達系複合体 I の活性も回復した (図 5)。IFN 治療により HCV が排除され SVR となった場合にはその後の肝発癌率は著明に低下することはよく知られた事実であるが、*in vitro* においても HCV 増殖が完全に抑制されると細胞内の酸化ストレス状態が解除されと考えられる。さらに興味深いことに、HCV 増殖の部分的な抑制であってもある程度酸化ストレスが抑制されることは、IFN 少量長期投与のように HCV 排除を伴わない HCV 増殖抑制においても抗酸化状態を誘導し得る可能性を示唆するものではないかと考えている。

III. ウルソデオキコール酸 (UDCA)

ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は古くから胆石溶解剤として用いられてきたが、C 型慢性肝炎には 2007 年 3 月に保険適応が認められ、600~900 mg/日の使用が可能になった。Omata らは UDCA 二重盲験試験において、596 人の C 型慢性肝炎患者を 150 mg/日投与群、600 mg/日投与群、900 mg/日投与群の 3 群に分けて検討したところ、UDCA 600 mg/日群と 900 mg/日投与群との間では有意差はみられなかったが、150 mg/日投与群と比較して ALT, AST, γ -GTP 値が有意に改善したと報告している¹⁰⁾。UDCA による肝発癌抑制効果については、C 型肝硬変 102 例の retrospective な検討ではあるが、UDCA 投与群では 56 例中 10 例 (17.9%)、非投与群では 46 例中 18 例 (39.1%) に肝発癌がみられ、UDCA 投与群で有意に発癌率が低かったとの報告がある¹¹⁾。UDCA による ALT 改善効果が発癌率を低下させる可能性はある

が、現在のところ UDCA が肝発癌の抑制や生存率を改善するという RCT はなく、十分なエビデンスは存在しない。

IV. 瀉血療法

前述したように鉄過剰による酸化ストレスは C 型慢性肝炎の病態に深く関わっており、肝発癌の一因と考えられる。瀉血療法は 1994 年に Hayashi ら¹²⁾ が C 型慢性肝炎に対する有用性を報告して以来多数の臨床研究が行われており、2006 年 4 月に保険適応となった。Yano らの多施設ランダム化試験において、瀉血療法群では血清 ALT 値の有意な改善とともに肝線維化が有意に抑制されることが明らかにされた¹³⁾。また Kato らは C 型慢性肝炎患者に対して 6 年間瀉血療法を行うことにより肝内の 8-OHdG が有意に低下し、肝硬変への進展率や肝発癌率が低下することを報告¹⁴⁾、さらに 44～144 カ月にわたる瀉血療法は 5 年目、10 年目の肝発癌を有意に抑制することを明らかにした¹⁵⁾。これらの報告から除鉄療法は肝線維化を抑制し肝発癌抑制効果を有することが期待される。

なお、瀉血により体内鉄が減少すると代償性に鉄代謝ホルモンであるヘプシジンの産生が減少し、十二指腸からの鉄吸収が亢進するため、瀉血療法においては鉄制限食による食餌療法を同時に行う必要がある。

V. 分岐鎖アミノ酸

分岐鎖アミノ酸は肝硬変期の栄養療法として広く用いられている。分岐鎖アミノ酸は肝臓で代謝酵素が少ないため末梢組織、とくに筋肉で代謝される。肝硬変患者では肝臓でのアミノ酸代謝が低下しそれを代償するためにエネルギー源として分岐鎖アミノ酸が燃焼されることになる。さらに肝硬変では肝萎縮によりグリコーゲンの貯蔵が減少し、末梢組織のインスリン抵抗性が上昇するため、ブドウ糖の利用効率が低下し、逆に分岐鎖アミノ酸は骨格筋で燃焼されやすいため、エネルギー源としての利用率が健常

者の 45% から肝硬変では 95% まで上昇する。最近行われた非代償性肝硬変 646 例を対象とした多施設 prospective study において、分岐鎖アミノ酸投与群は非投与群と比較して肝発癌、静脈瘤破裂、肝不全の進行といったイベント発生率が有意に低下した¹⁶⁾。また、BMI 25 以上の症例や α -フェトプロテイン (AFP) 20 ng/ml 以上の症例では分岐鎖アミノ酸投与により肝発癌率が有意に低下することが明らかにされた¹⁷⁾。

分岐鎖アミノ酸の作用機序として、蛋白合成を促進する情報伝達機構の活性化、糖代謝異常の改善、抗腫瘍作用などが報告されているが、肝硬変の肝発癌抑制機構についてはいまだ不明の点も多い。最近、分岐鎖アミノ酸投与による酸化ストレスの軽減¹⁸⁾が肝発癌を抑制する機序の一つとして報告されたが、今後さらなる検討が必要である。

VI. 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。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ン酸となる。レチノイン酸は二つの異なった核内レセプターであるレチノイン酸レセプター (RAR) とレチノイド X レセプター (RXR) と結合し、上皮細胞の増殖・分化・アポトーシスの抑制に重要な役割を担っている。肝癌細胞では RXR α がリン酸化されることで転写活性を失い、さらにユビキチン/プロテオソーム系による分解を受けなくなるため細胞内に蓄積し、正常の RXR α の機能を阻害し、RXR α を介した正常な細胞応答の破綻が肝発癌の主要なメカニズムの一つと考えられている¹⁹⁾²⁰⁾。RXR 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レチノイン酸シグナルが抑制され、脂肪性肝炎を起こした後に肝癌を発症することが報告されている²¹⁾。さらに 100

倍量のレチノイン酸を投与することでレチノイン酸シグナルが回復すると肝癌の発生が抑制されることも示されている。

臨床的には初発肝細胞癌に対して外科的切除などの根治治療がなされた症例に対して、合成レチノイドである非環式レチノイドあるいはプラセボを投与する単一ランダム化比較試験において、非環式レチノイドは2次発癌を有意に抑制し、生存率も改善させることが明らかにされている²²⁾。

おわりに

C型慢性肝炎に対する肝庇護療法と肝発癌抑制効果について述べた。C型慢性肝炎における肝発癌に酸化ストレスが深く関与していることが多くの研究から明らかにされつつあり、酸化ストレスの排除が肝発癌への進展を抑止する可能性がある。C型慢性肝炎に対する治療はウイルスの排除が第一選択であるが、患者の高齢化が進む本邦において抗ウイルス療法の難治例や非適応例に対する治療法の確立は重要な課題である。肝庇護療法は高ウイルス療法と並び重要な位置づけを担っており、肝発癌抑制を目標として患者に応じた治療法の選択が今後ますます必要になるものと思われる。

文 献

- 1) Furutani T, Hino K, Okuda M et al : Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* **130** : 2087-2098, 2006.
- 2) Suzuki H, Ohta Y, Takino T et al : Effects of glycyrrhizin on biochemical tests in patients with chronic hepatitis. *Asian Med J* **26** : 423-438, 1983.
- 3) Orsent H, Hansen BE, Willems M et al : Biochemical and histological effects of 26 weeks of glycyrrhizin treatment in chronic hepatitis C : a randomized phase II trial. *J Hepatol* **45** : 539-546, 2006.
- 4) Arase Y, Ikeda K, Murashima N et al : The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* **79** : 1494-1500, 1997.
- 5) Ikeda K, Arase Y, Murashima N et al : A long-term glycyrrhizin injection therapy reduces hepatocellular carcinogenesis rate in patients with interferon-resistant active chronic hepatitis C : a cohort study of 1,249 patients. *Dig Dis Sci* **51** : 603-609, 2006.
- 6) Hidaka I, Hino K, Korenaga M et al : Stronger Neo-Minophagen CTM, a glycyrrhizin-containing preparation, protects liver against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Liver Int* **27** : 845-853, 2007.
- 7) Hino K, Okita K : Interferon therapy as chemoprevention of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C. *J Antimicrob Chemother* **53** : 19-23, 2003.
- 8) Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT et al : Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *N Engl J Med* **359** : 2429-2441, 2008.
- 9) Ando M, Korenaga M, Hino K et al : Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int* **28** : 1158-1166, 2008.
- 10) Omata M, Yoshida H, Toyota J et al : A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut* **256** : 1747-1753, 2007.
- 11) Tarao K, Fujiyama S, Ohkawa S et al : Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14** : 164-169, 2005.
- 12) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N et al : Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* **89** : 986-988, 1994.
- 13) Yano M, Hayashi H, Wakusawa S et al : Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* **97** : 133-137, 2002.
- 14) 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.
- 15) Kato J, Miyanishi K, Kobune M et al : Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* **42** : 830-836, 2007.
- 16) Muto Y, Sato S, Watanabe A et al : Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3** : 705-713, 2005.
- 17) Muto Y, Sato S, Watanabe A et al : Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* **35** : 204-214, 2006.
- 18) Ohno T, Tanaka Y, Sugauchi F et al : Suppressive effect of oral administration of branched-chain amino acid granules on oxidative stress and inflammation in HCV-positive patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* **38** : 683-688, 2008.
- 19) Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Adachi S et al : Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **61** : 7675-7682, 2001.
- 20) Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R et al : Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **35** : 332-340, 2002.
- 21) Yanagitani A, Yamada S, Yasui S et al : Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* **40** : 366-375, 2004.
- 22) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M : 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.

*

*

*

State of the Art

酸化ストレスからみた C 型肝炎の病態



川崎医科大学内科学(肝・胆・脾)教授

日野 啓輔

(Hino, Keisuke)



はじめに

筆者の知る限りではC型肝炎の病態における酸化ストレスの関与が初めて報告されたのは1995年のJournal of Hepatologyに発表されたFarinatiらの論文¹⁾ではないかと推測される。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た。今日ではC型肝炎における酸化ストレスの関与は周知の事実となっているが、酸化ストレスがどのようにかかわっているのかこの14年間にさまざまな角度から検討が行われ多くの論文が発表されている。しかしながらどのようにして酸化ストレスが生じるのかその根幹の機序についてはいまだ不明の点も多い。本稿ではC型肝炎ウイルス(HCV)による酸化ストレス誘導機序について考察するとともに、

酸化ストレスがどのようにC型肝炎の病態形成に関与しているのかを解説する。

HCV コア蛋白による 活性酸素の産生

MoriyaらはHCVコア遺伝子導入トランスジェニックマウスにおいて肝組織に炎症所見がないにもかかわらず還元型グルタチオン(GSH)の低下や加齢による肝内脂質過酸化物の増加を明らかにし、*in vivo*での酸化ストレスの亢進をはじめて報告した²⁾³⁾。OkudaらはHCVコア蛋白発現が調節可能なHuh7細胞において活性酸素種(ROS)や脂質過酸化物が上昇することを報告し⁴⁾、HCVコア蛋白が直接的に酸化ストレスを誘導することを示した。その一方で抗酸化系の各種遺伝子発現は亢進しており、酸化ストレス状態でアポトーシスを回避する機序の1つと考えられるがこれは後述する肝発癌との関連において重要である。

肝細胞を問わず ROS の最大産生部位はミトコンドリアである。通常、解糖系より得られるピルビン酸やコハク酸を基質としてミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系に電子を供給する。電子伝達系は5つの複合体(呼吸鎖複合体)からなり、電子が移動するごとに水素イオン(H^+)が引き抜かれその電気勾配と ADP の存在下で ATP を作り出す。この過程でどうしても電子の leak が生理的に起こるとされ、仮に電子伝達系に障害があれば電子の受け渡しが滞り ROS の産生が増大する。電子の leak は複合体 I および III から起こり、I は matrix 側へ、III は細胞質側へ leak するとされ、

この2つの障害は ROS 産生に関連すると考えられている。

Otani, Korenaga らは HCV コア蛋白発現が調節可能な Huh 7 細胞を用いて少量の tertiary butyl hydroperoxide (tBOOH) で刺激後の ROS 産生を confocal microscopy で経時的に観察し、ROS がミトコンドリアより徐々に染まることから HCV コア蛋白による ROS の産生部位は主としてミトコンドリアであることを明らかにした⁵⁾(図1)。それでは HCV コア蛋白は実際に電子伝達系複合体 I あるいは III を障害するのであろうか。この点に対して Korenaga らは HCV 構造蛋白を発現

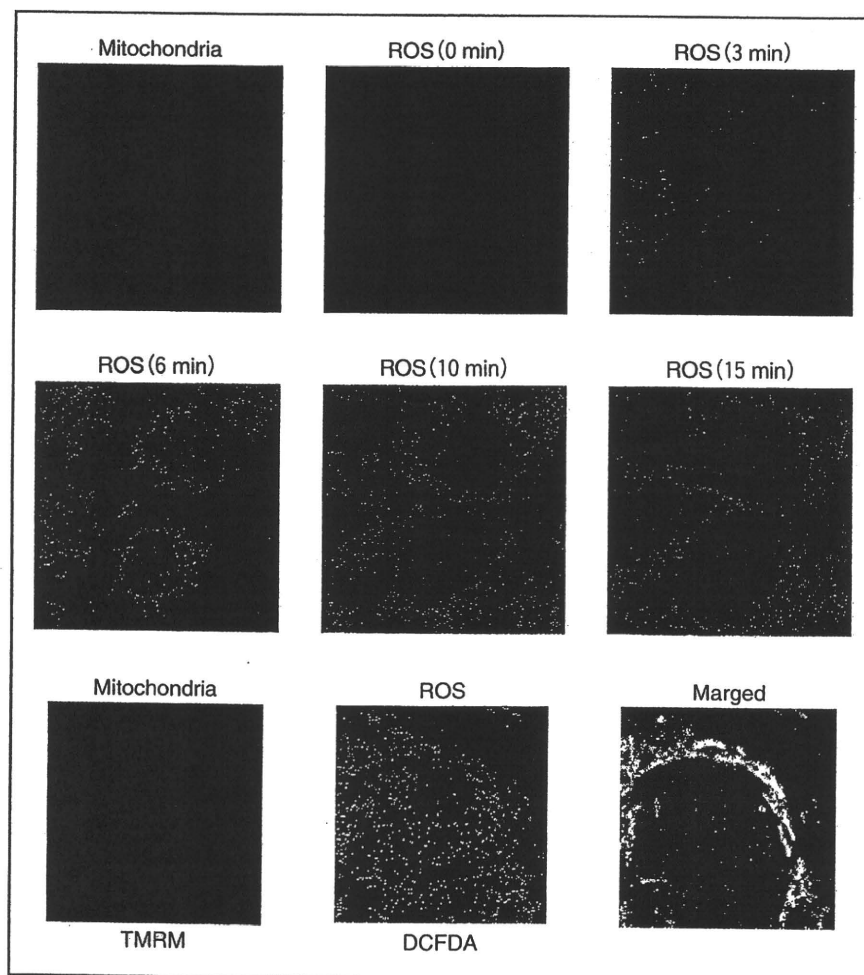


図1 ミトコンドリアと ROS の局在

TMRM : tetramethylrhodamine, ミトコンドリア膜電位依存性 dye
DCFDA : dihydrodichlorocarboxyfluorescein diacetate, ROS センサー



するトランスジェニックマウスの肝ミトコンドリア分画において複合体 I の活性が低下していることを明らかにし、同時に intact なミトコンドリアに複合体 I の基質であるグルタミン酸とリンゴ酸を添加した際の ROS の産生がトランスジェニックマウスで有意に高く、ミトコンドリア内 GSH が有意に低いことを報告している⁶⁾。すなわち HCV コア蛋白がミトコンドリアの複合体 I を障害することによって ROS が産生されると考えられる。しかしながら同論文では同時に HCV コア蛋白がミトコンドリア外膜に局在することも報告しており、Schwer らも HCV コア蛋白がミトコンドリアと小胞体の接点ともいえるべき mitochondrial-associated membrane fraction に局在することを報告している⁷⁾。ここで新たな疑問が浮かび上がる。ミトコンドリア外膜に存在する HCV コ

ア蛋白はミトコンドリア内膜に存在する複合体 I をどのように障害するのであろうか。

Li らは HCV コア蛋白と CYP2E1 を発現する Huh7 細胞ならびに HCV 構造蛋白を発現するトランスジェニックマウスからの肝ミトコンドリアを用いて、HCV コア蛋白がミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} uniporter とよばれるカルシウム選択的イオンチャンネルによるカルシウムの取り込みを促進させることを明らかにしている⁸⁾ (図 2)。興味深いことに全く別のラボからも HCV 全蛋白を発現する培養細胞を用いて Ca^{2+} uniporter の活性亢進という同様の結果が報告されている⁹⁾。この 2 つの報告ではミトコンドリア内のカルシウム濃度が上昇することでミトコンドリア膜電位の低下、mitochondrial permeability transition (MPT) が引き起こされ、ミトコンドリア内の

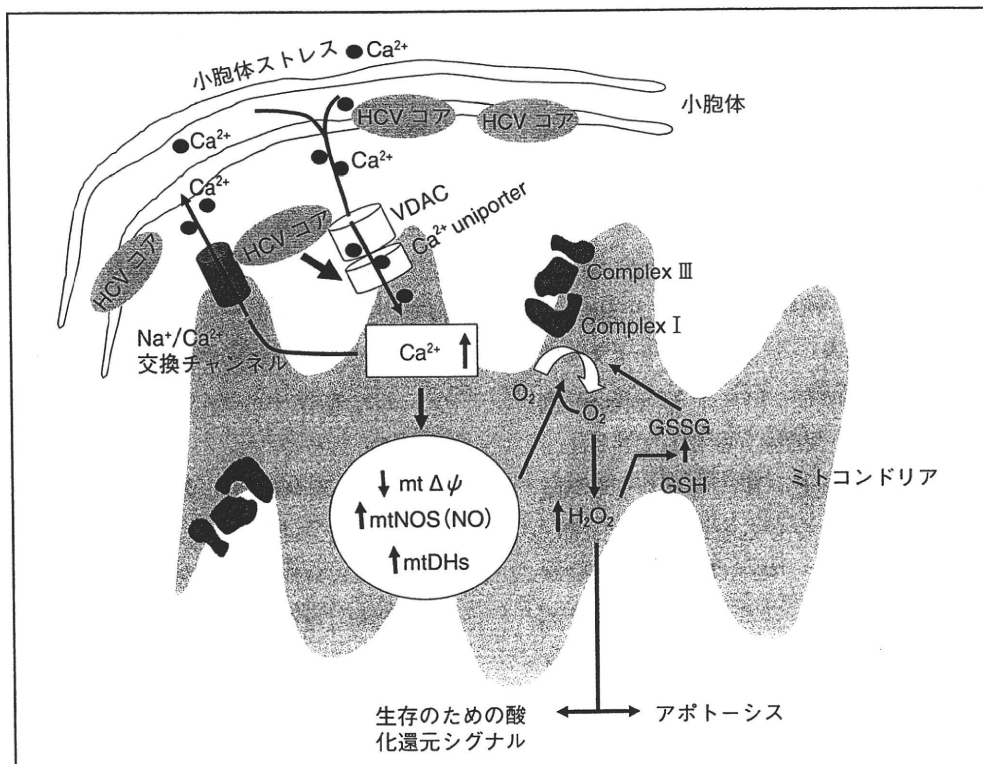


図 2 小胞体—ミトコンドリア近接部位における HCV コア蛋白による酸化ストレス誘導機序

VDAC : voltage-dependent anion channel, $\text{mt} \Delta \psi$: ミトコンドリア膜電位, mtNOS : ミトコンドリア酸化窒素合成酵素, mtDHs : ミトコンドリア脱水素酵素, $\text{O}_2^{\cdot -}$: スーパーオキシド, H_2O_2 : 過酸化水素, GSH : 還元型グルタチオン, GSSG : 酸化型グルタチオン, Complex I, III : ミトコンドリア電子伝達系複合体 I, III (文献 8, 9 より引用改変)

ROS (スーパーオキシド)が増加することが示されている。さらにミトコンドリアへのカルシウム流入により一酸化窒素の合成が亢進することが示されているが⁹⁾、これによりミトコンドリアの酸化リン酸化が障害される可能性がある。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 ROS 産生亢進の一因ともなりうる。ここで重要なことは Ca^{2+} uniporter 阻害薬によりミトコンドリアへのカルシウム流入とそれに引き続くイベントが抑制されることから、 Ca^{2+} uniporter を介するカルシウムの流入が一連のミトコンドリア障害とそれに引き続いて起こる酸化ストレスの first hit であることである。換言すればミトコンドリアへのカルシウム流入を抑制することは、HCV 蛋白により引き起こされる酸化ストレスを抑える分子標的とも考えられる。小胞体における HCV 蛋白の局在が小胞体ストレスを引き起こし、小胞体内でのカルシウムの調節に障害を来すと考えられるので、小胞体に隣接するミトコンドリア外膜にコア蛋白が存在する⁷⁾ことはこの点で理にかなっているように思える。しかし HCV 蛋白が直接的にミトコンドリア内膜上の Ca^{2+} uniporter に影響を及ぼすとは考えにくく、一方で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。したがって、HCV 蛋白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ろう。

C 型肝炎における 酸化ストレス増強因子

前項では HCV コア蛋白による ROS の産生機

序を概説したが、これらの実験データから示される酸化ストレスのマグニチュードはそれほど大きいものではなく、事実 HCV 持続感染者が一様に肝線維化の進展や肝発癌を来すわけではない。加齢、アルコール、肥満、鉄蓄積などは C 型肝炎の進展増悪因子としてよく知られているが、興味深いことにこれらの 2 次的因子はいずれも酸化ストレス増強因子であり、C 型肝炎の病態修飾には酸化ストレスの増強が必要であると考えられる。

筆者らは以前に輸血後肝炎の既往がある C 型慢性肝炎患者 213 人について感染時年齢と肝硬変、肝細胞癌への進展率について検討を行い、感染期間の長さではなく感染時年齢が高いほどその後の C 型肝炎の進展速度が速いことを報告した¹⁰⁾。また、大規模なコホート研究において 65 歳以上 C 型慢性肝炎患者では感染期間に関係なく肝線維化が進行していることが明らかにされている¹¹⁾。アルツハイマー病に代表されるように加齢によるミトコンドリア障害、特に抗酸化作用の低下はよく知られた事実である。また、加齢により ROS 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¹²⁾。このように加齢という因子は C 型肝炎における酸化ストレスを増強し病変の進行を促進すると考えられる。

アルコールの代謝経路の 1 つに小胞体・ミクロソームに存在する cytochrome P 450 (CYP, 特に CYP 2 E 1) がある。アルコール負荷において CYP 2 E 1 は NADPH cytochrome P 450 還元酵素から電子をうけることにより ROS を産生する。したがって C 型肝炎における慢性的なアルコール摂取は CYP 2 E 1 の発現を誘導し、ROS の産生を増強する。Otani, Korenaga らは HCV コア蛋白発現が調節可能な Huh 7 細胞に CYP 2 E 1 を stable transfection し、CYP 2 E 1 による ROS 産生の相乗効果を示し、それに伴い細胞死も増大することを報告している⁵⁾。また HCV コア蛋白 + CYP 2 E 1 発現細胞ではミトコンドリア GSH が低下しており、ミトコンドリア内での抗酸化作用



を低下させることでミトコンドリア依存性の細胞死を引き起こすと推測される。

肥満は皮下脂肪型肥満と内臓脂肪型肥満に大別されるが、特に後者が肝脂肪化には重要である。内臓脂肪型肥満によりインスリン抵抗性と代償性高インスリン血症が惹起され、遊離脂肪酸の肝臓への流入が増加するとともに、肝臓における脂肪酸代謝・肝臓からの脂肪酸放出の両者が阻害されることにより肝脂肪化が引き起こされる。C型慢性肝炎においてもBody Mass Index (BMI) 高値や2型糖尿病合併は肝脂肪化や線維化と関連することが示されている¹³⁾。筆者らは肝脂肪化を伴うC型慢性肝炎組織と脂肪化を伴わないC型慢性肝炎組織の肝内脂質過酸化物の発現量を比較したところ、図3に示されるように肝脂肪化を伴うC型慢性肝炎組織では有意に肝内脂質過酸化物の発現が高かった¹⁴⁾。このように肥満による肝脂肪化はC型肝炎における酸化ストレス増強因子と考えられる。

C型肝炎における肝内の鉄蓄積もよく知られた事実である。鉄は生体内で重要な働きをもつ一方でフェントン反応によりROSの1つであるヒドロキシラジカルを産生する。ヒドロキシラジカルはROSのなかでも特に強い組織障害性をもつこ

とが明らかにされており、この点からも鉄は慢性肝炎において肝障害を増悪させる危険因子であることは広く知られている。1994年にはHayashiらによりC型慢性肝炎に対する瀉血の有効性が世界に先駆けて報告されており¹⁵⁾、現在わが国では瀉血はC型慢性肝炎の治療法として保険診療に認可されている。Katoらは6年間の瀉血療法と鉄制限食の併用により肝組織内における酸化的DNA障害の指標である8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の蓄積が有意に低下し、肝硬変や肝細胞癌への進展が抑制されたことを報告している¹⁶⁾。これらの臨床成績は鉄蓄積がC型肝炎における酸化ストレス増強因子であることを明確に示すものである。

HCVによる病態修飾としての肝脂肪化と鉄蓄積

前項で述べたようにC型肝炎の病変進展にはsecond hitとしての酸化ストレス増強因子が重要であるが、HCV自体による病態修飾がさらなる酸化ストレスを増強することも事実である。本項ではHCVがもたらす肝脂肪化と鉄蓄積について解説する。

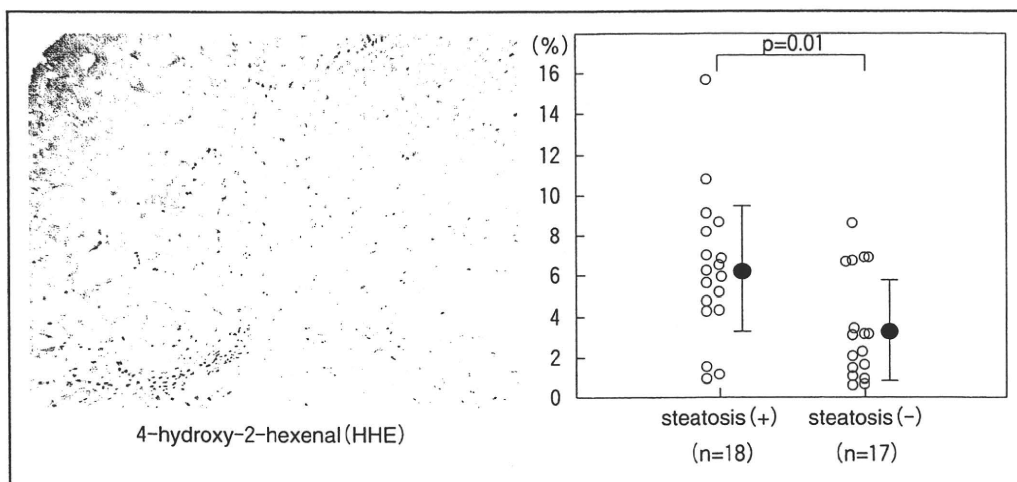


図3 肝生検組織内の脂質過酸化物(4-hydroxy-2-hexenal : HHE)の免疫染色と肝脂肪化の有無別にみたHHE陽性面積の比較

1. HCV による肝脂肪化

肝脂肪化は C 型慢性肝炎組織の特徴の 1 つとしてよく知られているが、最近になり HCV による肝脂肪化の機序が徐々に明らかになってきている。HCV コア蛋白が microsomal triglyceride transfer protein (MTP) 活性を抑制し、肝からの VLDL の分泌を抑制し、肝細胞内に中性脂肪が蓄積することが報告された¹⁷⁾。Moriishi らは脂質合成亢進の観点から詳細な肝脂肪化の機序について報告している¹⁸⁾。sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c は中性脂肪などの合成にかかわる種々の酵素群の転写を調節する転写因子であるが、この SREBP-1c の転写調節には LXR α , RXR α などの核内レセプターが関与し、通常は脂質の ligand との結合により核内受容体型転写因子は活性化される。しかし、HCV コア蛋白は ligand 非依存性に、しかしプロテアソーム活性化因子である PA28 γ の存在下に LXR α , RXR α の SREBP-1c 標的配列への結合を増強して SREBP-1c の転写を活性化し、肝脂肪化を引き起こすことが明らかにされた¹⁸⁾。さらに最近では HCV コアトランスジェニックマウスにおいて peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α の持続的な活性化が肝脂肪化に必須であることも報告されている¹⁹⁾。このように HCV コア蛋白自体による肝脂肪化はさらなる酸化ストレスの増強因子として C 型肝炎の病変進展を引き起こすと考えられる。

2. HCV による鉄代謝異常

肝内鉄蓄積も肝脂肪化と同様に C 型肝炎の特徴的病態としてよく知られている。しかしながら鉄蓄積の機序についてはこれまで不明の点多かった。本項目では筆者らの 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)での成績²⁰⁾を紹介しながら鉄蓄積の機序について考察する。

HCV TgM はコントロールマウス(C57 BL/6)

に比べて 8 ヶ月齢ごろから肝内鉄濃度、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った。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²¹⁾。HCV TgM の肝内 hepcidin mRNA 発現量はコントロールに比べて有意に低く、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 4)。これまでのところ hepcidin の転写調節は、①鉄あるいは若年性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²²⁾²³⁾、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²⁴⁾。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 5-A)。さらに転写因子である CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 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 5-B)。この原因として ROS による C/EBP homology protein (CHOP) の発現亢進が関与していると考えられた(図 6)。なぜなら CHOP は C/EBP と二量体を形成し、C/EBP の標的 DNA への結合を阻害する

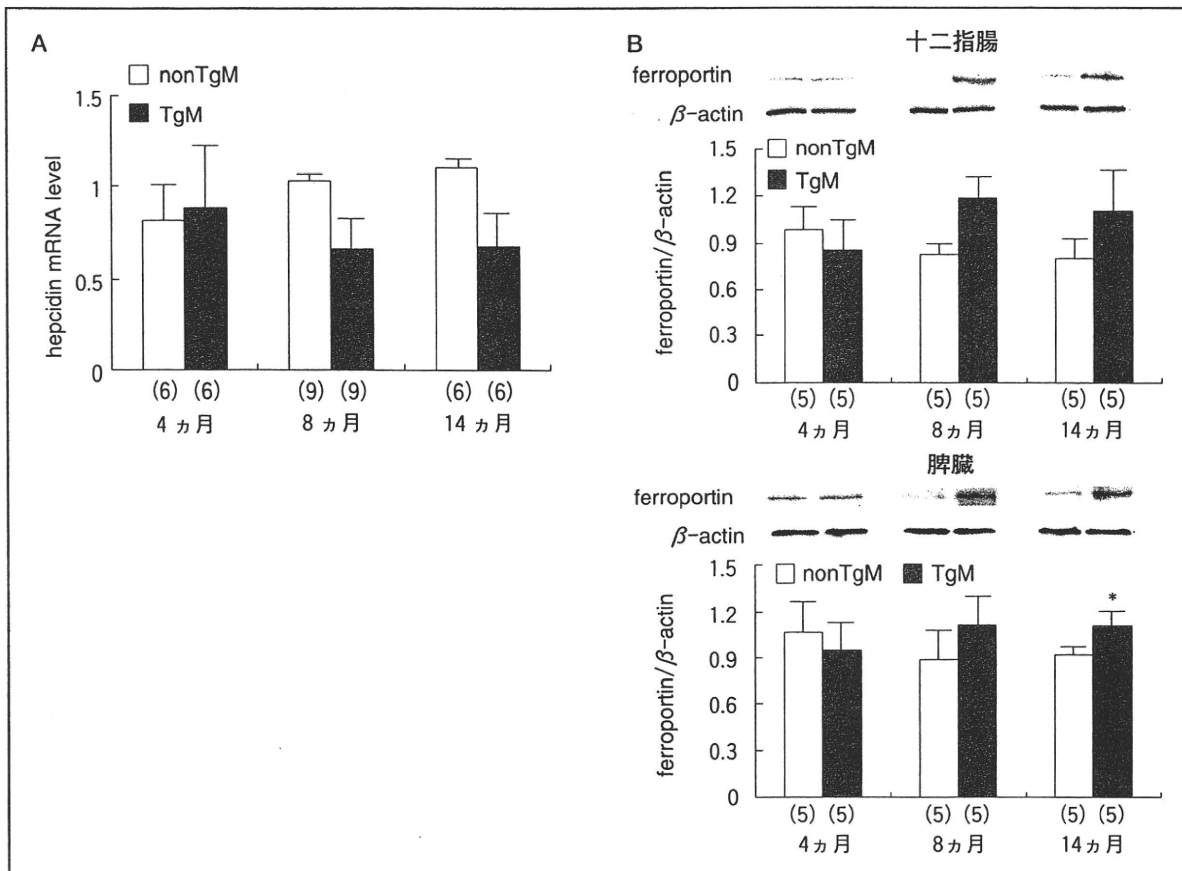


図4 肝組織内 hepcidin mRNA (A) および十二指腸と脾臓における ferroportin の蛋白発現量 (B)

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

ことが知られている。以上, HCV TgM における鉄過剰のメカニズムを簡単にまとめると図7のようになる。

最近になり HCV 起因性 ROS による hepcidin の転写調節について新しいメカニズムが報告された。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 ROS 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 CEBPα 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示されている²⁵⁾。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が, 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。いずれにしても C 型肝炎の鉄代謝障害に hepcidin の低下が関与しているのは事実のようであり, Nagashima らにより C 型慢性肝炎患者で hepcidin の発現調節 (実際には前駆蛋白である prohepcidin 量を測定) が障害されていることが報告されており²⁶⁾, Fujita らは C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療により HCV が排除されると hepcidin の産生障害が回復することを報告している²⁷⁾。

酸化ストレスによる肝発癌

これまで述べてきたように HCV 自体が引き起こす酸化ストレス, second hit としての酸化スト

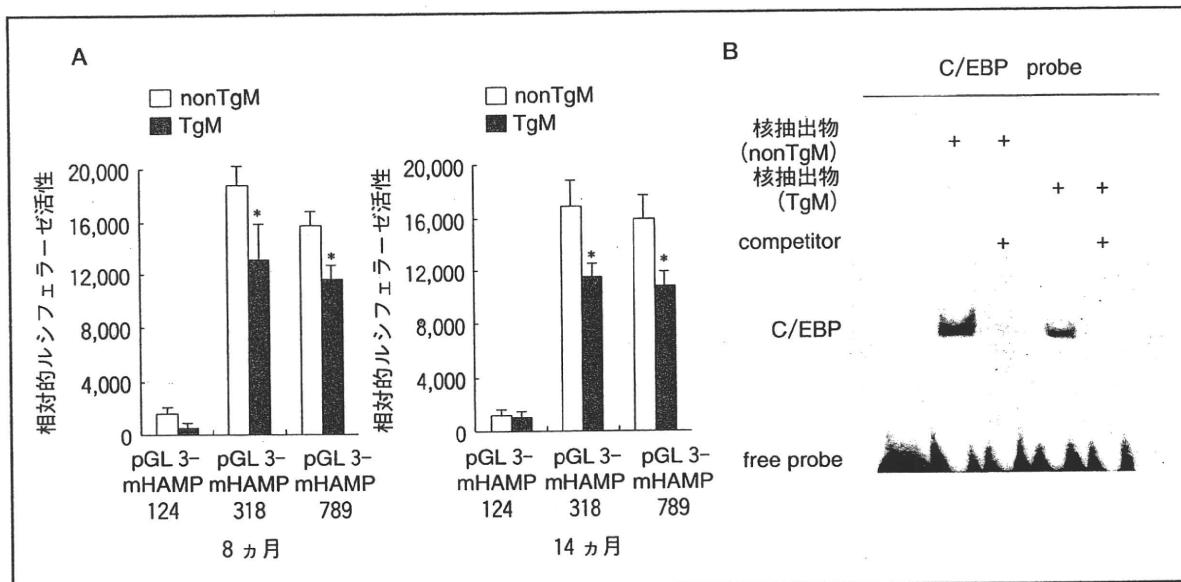


図5 HCV TgM 初代培養肝細胞の hepcidin プロモーター活性(A)と electrophoretic mobility shift assay (EMSA) による転写因子 C/EBP の DNA 結合活性の測定

A: hepcidin プロモーター領域(pGL 3-mHAMP 124, 318, 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。*: $p < 0.05$

B: 8ヵ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。

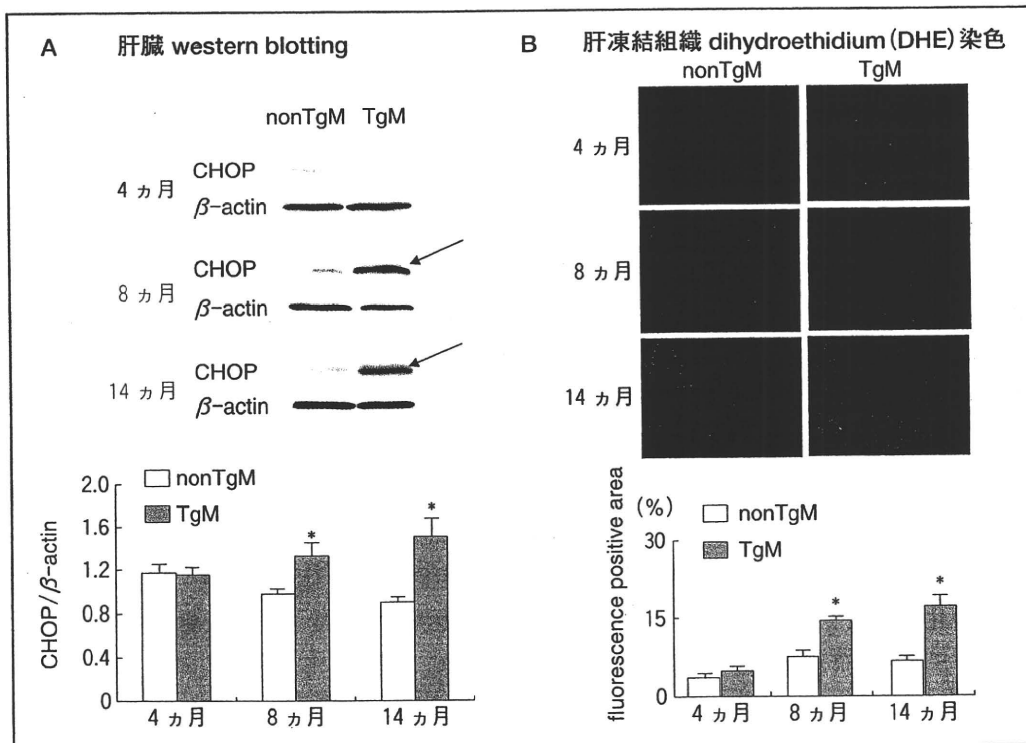


図6 肝臓における CHOP 発現量(western blotting)と ROS 量

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。

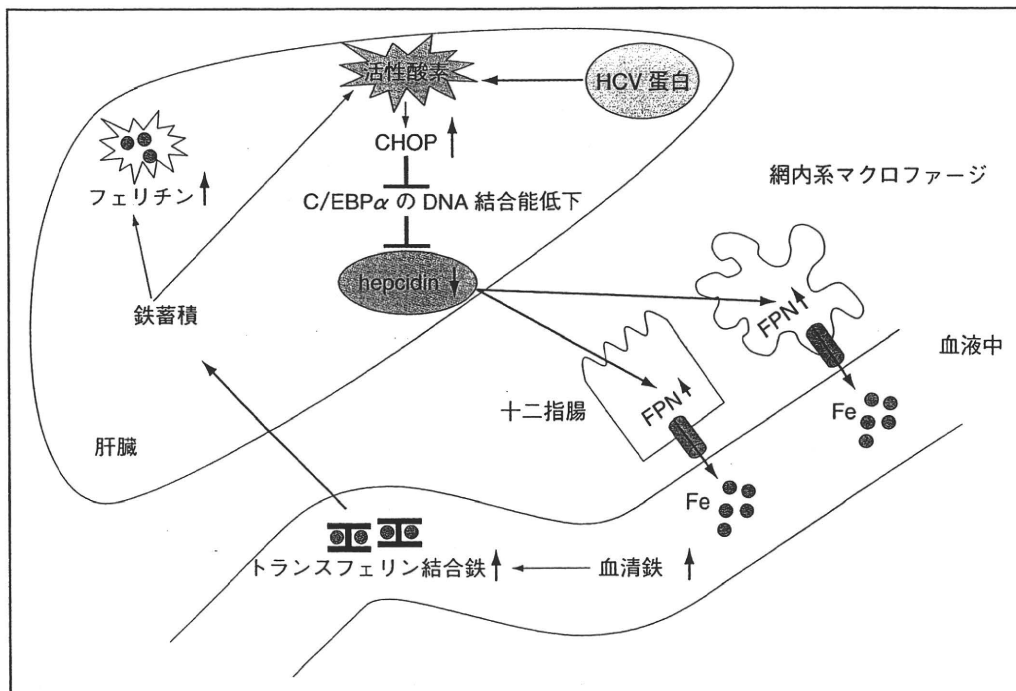


図7 HCV TgM における鉄代謝異常機構の模式図

HCV 蛋白により産生される ROS は CHOP の発現を亢進させ、これにより C/EBP α の DNA 結合能が低下し、hepcidin の転写が抑制される。hepcidin の発現低下は ferroportin (FPN) の発現を増加させ、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、結果的に肝の鉄蓄積を引き起こす。

レス増強因子、さらには HCV による肝脂肪化や鉄蓄積による酸化ストレスの増強が絡み合って C 型肝炎からの高率な肝発癌の一因になっていると考えられる。一方で酸化ストレスの増強はアポトーシスを誘導しやすいが、冒頭でも述べたように ROS を消去する抗酸化系の各種遺伝子は代償性に亢進しており⁴⁾、いわば酸化的 DNA 障害をもつ細胞が排除されない状態は高癌化状態ともいえる。

筆者らは複合的な酸化ストレス状態でどのように肝発癌を来すかについて検討したのでその成績を紹介する²⁸⁾。HCV TgM あるいはコントロールマウス(C57BL/6)に通常餌(carbonyl iron 25 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 ヶ月目と 12 ヶ月目に肝内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 ヶ月目、12 ヶ月目の HCV TgM の肝内鉄濃度は C 型慢性肝炎患者

のそれとほぼ同等であった。鉄負荷 6 ヶ月目の HCV TgM は他の 3 群に比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 8)。さらにミトコンドリアの超微形態異常(図 9-A)を認め、脂肪酸分解も低下した。鉄負荷 12 ヶ月目になると HCV TgM は肝内脂質過氧化物とともに 8-OHdG (図 9-B, C)の蓄積が亢進した。この際に特記すべき点は鉄負荷 HCV TgM のみならず、他の 3 群もマウスも加齢とともに肝内の 8-OHdG 量が有意に増加していることである。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(表 1)。このように HCV TgM は HCV 蛋白に加えて自らが引き起こす鉄過剰やさらには加齢が加わることで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ることが明らかになった。

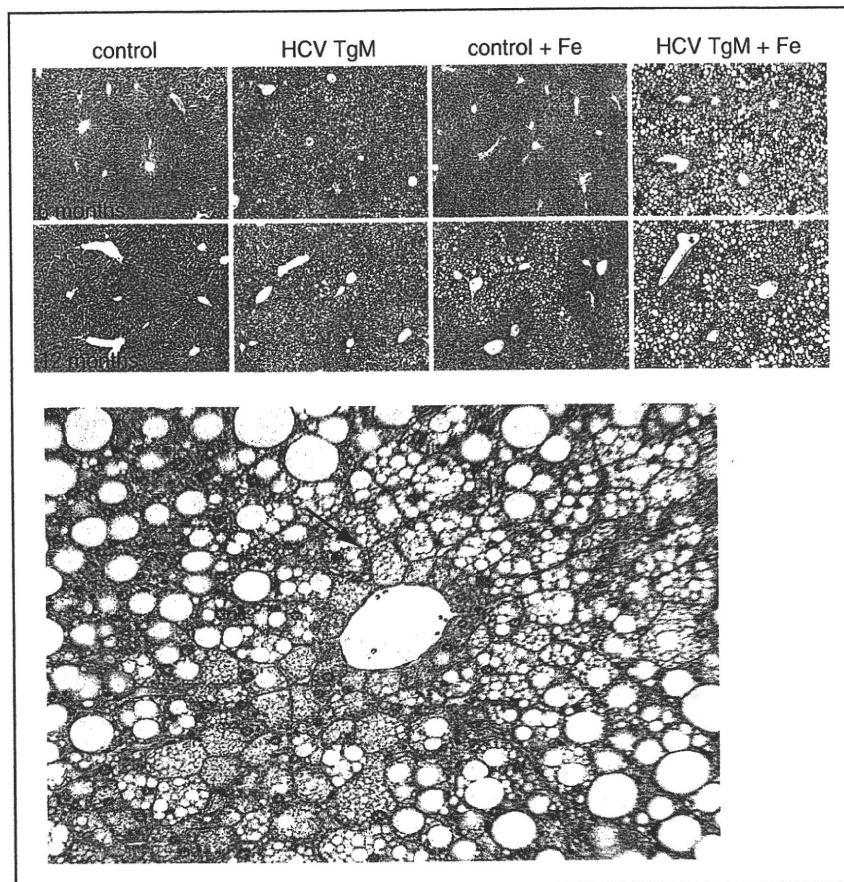


図8 鉄負荷 HCV TgM (HCV TgM+Fe), 鉄負荷コントロールマウス (control+Fe), 通常餌の TgM (HCV TgM), および通常餌のコントロールマウス (control) の肝組織像 (HE 染色)

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。



おわりに

本稿では酸化ストレスからみた C 型肝炎の病態について解説した。酸化ストレスの引き金となる HCV を排除することが治療の基本であることはいうまでもないが、現在のペグインターフェロンとリバビリン併用療法をもってしても約半数の患者では HCV の排除が困難である。非アルコール性脂肪性肝炎が生活習慣病として認識されているが、C 型肝炎も酸化ストレスを軽減するという点においては同様な認識が重要と考えられる。すなわち禁酒はもちろんのこと体重減少やバランスの取れた食生活、さらには治療介入としての酸化

ストレス軽減は病変の進展阻止のための基本的な戦略であることを認識すべきである。

References

- 1) Farinati F, Cardin R, De Maria N, et al : Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 22 : 449-456, 1995
- 2) Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al : The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4 : 1065-1067, 1998
- 3) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, et al : Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 61 : 4365-4370, 2001
- 4) Okuda M, Li K, Beard MR, et al : Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression

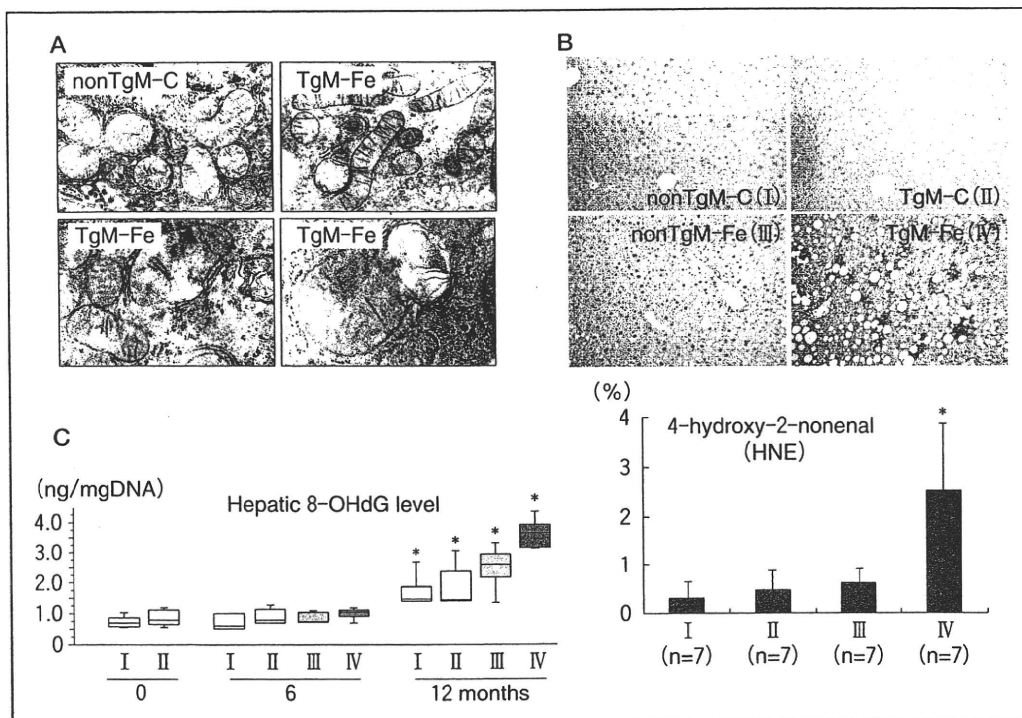


図9 鉄負荷6ヵ月後のHCV TgM (TgM-Fe)と鉄負荷なしのコントロールマウス(nonTgM-C)の肝ミトコンドリア電子顕微鏡像(A), 12ヵ月目の肝組織内脂質過酸化物質(4-hydroxy-2-nonenal: HNE)の比較(B), および12ヵ月目の肝組織内8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)量の比較(C)

A: 鉄負荷HCV TgMの肝ミトコンドリアはコントロールに比べて大小不同や膜の膨化、クリステの乱れ、内膜腔のbulgingなどの形態異常が認められる。B: HNE量は免疫染色による陽性面積の割合で比較した。C: 鉄負荷HCV TgMは他の3群に比べて8-OHdG量が多く、また他の3群もそれぞれ飼育開始時、6ヵ月目と比べて8-OHdG量は多かった。

are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122 : 366-375, 2002

- 5) Otani K, Korenaga M, Beard MR, et al : Hepatitis C virus core protein, cytochrome P 450 2 E 1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. *Gastroenterology* 128 : 96-107, 2005
- 6) Korenaga M, Wang T, Li Y, et al : Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 280 : 37481-37488, 2005
- 7) Schwer B, Ren S, Pietschmann T, et al : Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* 78 : 7958-7968, 2004
- 8) Li Y, Boehning DF, Qian T, et al : Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *FASEB J* 21 : 2474-2485, 2007
- 9) Piccoli C, Scrima R, Quarato G, et al : Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mito-

chondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. *Hepatology* 46 : 58-65, 2007

- 10) Murakami C, Hino K, Korenaga M, et al : Factors predicting progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with transfusion-associated hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 28 : 148-152, 1999
- 11) Thabut D, Le Calvez S, Thibault V, et al : Hepatitis C in 6,865 patients 65 yr or older : a severe and neglected curable disease? *Am J Gastroenterol* 101 : 1260-1267, 2006
- 12) Tanguy S, de Leiris J, Besse S, Boucher F : Ageing exacerbates the cardiotoxicity of hydrogen peroxide through the Fenton reaction in rats. *Mech Ageing Dev* 124 : 229-235, 2003
- 13) Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, et al : Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 29 : 1215-1219, 1999
- 14) Kitase A, Hino K, Furutani T, et al : In situ detection

表1 鉄負荷 TgM (TgM+Fe), コントロールマウス (Control+Fe), 通常餌 TgM (TgM+C), コントロールマウス (Control+C) の肝腫瘍発生率

Feeding period	Mice group	Liver tumor
6 months	Control + C	0/10
	Control + Fe	0/10
	TgM + C	0/10
	TgM + Fe	0/10
9 months	Control + C	0/7
	Control + Fe	0/6
	TgM + C	0/5
	TgM + Fe	0/6
12 months	Control + C	0/10
	Control + Fe	0/8
	TgM + C	0/9
	TgM + Fe	5/11

of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids in chronic hepatitis C : correlation with hepatic steatosis. *J Gastroenterol* **40** : 617-624, 2005

- 15) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N, et al : Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* **89** : 986-988, 1994
- 16) 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
- 17) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, et al : Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion : a model of viral-related steatosis. *FASEB J* **16** : 185-194, 2002
- 18) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, et al : Critical role of PA 28 gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104** : 1661-1666, 2007
- 19) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, et al : PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest* **118** : 683-694, 2008
- 20) Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al : Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* **134** : 226-238, 2008
- 21) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al : Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306** : 2090-2093, 2004
- 22) Lin L, Valore EV, Nemeth E, et al : Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP 2/4. *Blood* **110** : 2182-2189, 2007
- 23) Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al : Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* **38** : 531-539, 2006
- 24) Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, et al : STAT 3 is required for IL-6-gp 130-dependent activation of hepcidin *in vivo*. *Gastroenterology* **132** : 294-300, 2007
- 25) Miura K, Taura K, Kodama Y, et al : Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology* **48** : 1420-1429, 2008
- 26) Nagashima M, Kudo M, Chung H, et al : Regulatory failure of serum prohepcidin levels in patients with hepatitis C. *Hepatology* **36** : 288-293, 2006
- 27) Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, et al : Patients with chronic hepatitis C achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *J Hepatology* **49** : 702-710, 2008
- 28) Furutani T, Hino K, Okuda M, et al : Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* **130** : 2087-2098, 2006