



肝疾患診断医療連携パス(医療者用)

医療機関	かかりつけ医	済生会吹田病院 消化器内科 肝臓グループ			
スケジュール	紹介	診察	検査入院	結果説明	
紹介基準	<input type="checkbox"/> HCV抗体陽性 <input type="checkbox"/> HBs抗原陽性 <input type="checkbox"/> ALT ≥ 31IU/l <input type="checkbox"/> 血小板 < 15万/μl	B型肝炎	<input type="checkbox"/> 血液検査 <input type="checkbox"/> 腹部超音波検査 <input type="checkbox"/> 肝生検 (肝生検は原則お勧めします)	肝生検入院	結果説明 <input type="checkbox"/> 抗ウイルス剤・インターフェロン (IFN)による治療が必要 <input type="checkbox"/> 肝機能の改善、肝硬変療法 <input type="checkbox"/> 肝硬変 <input type="checkbox"/> B型肝炎無症候性キャリア
		C型肝炎	<input type="checkbox"/> 血液検査 <input type="checkbox"/> 腹部超音波検査 <input type="checkbox"/> 肝生検 (肝生検は原則お勧めします)	肝生検入院	結果説明 <input type="checkbox"/> インターフェロンによる治療が必要 <input type="checkbox"/> 肝機能の改善、肝硬変療法 <input type="checkbox"/> 肝硬変
		NASH	<input type="checkbox"/> 血液検査 <input type="checkbox"/> 腹部超音波検査 <input type="checkbox"/> 肝生検 (肝生検は原則お勧めします) <input type="checkbox"/> CT検査	肝生検入院	結果説明 <input type="checkbox"/> 単純性脂肪肝 <input type="checkbox"/> 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) <input type="checkbox"/> 肝硬変
		その他	<input type="checkbox"/> 血液検査 <input type="checkbox"/> 画像診断 ...超音波・CT・MRIなど、 ※患者の容態や検査結果に応じて検査を実施	必要に応じて肝生検入院	結果説明 <input type="checkbox"/> 単純性脂肪肝 <input type="checkbox"/> 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) <input type="checkbox"/> ウイルス性肝炎 (B型・C型) <input type="checkbox"/> 肝硬変 <input type="checkbox"/> 悪性腫瘍 <input type="checkbox"/> その他
患者及び家族への説明等	<input type="checkbox"/> SOL、腫瘍あり <input type="checkbox"/> 腫瘍マーカー高値 ・AFP ・PIVKA II	肝腫瘍	<input type="checkbox"/> 血液検査 <input type="checkbox"/> 画像診断 ...超音波・CT・MRIなど、 必要に応じて検査を実施	癌が疑われる場合は、 検査入院を実施 <input type="checkbox"/> 腹部血管造影 <input type="checkbox"/> 肝腫瘍生検	結果説明 <input type="checkbox"/> 肝腫瘍なし <input type="checkbox"/> 肝腫瘍あり <input type="checkbox"/> その他
		<input type="checkbox"/> 病状説明 <input type="checkbox"/> 検査・治療の説明 <input type="checkbox"/> 肝疾患診断医療連携パスの説明 <input type="checkbox"/> 紹介受診日は絶食での来院を指示ください	<input type="checkbox"/> 紹介状等の確認 <input type="checkbox"/> 検査等の説明	<input type="checkbox"/> 診断結果等の説明 <input type="checkbox"/> 今後の治療方針の説明 <input type="checkbox"/> 医療連携パスの今後の活用について	
備考	<input type="checkbox"/> 地域医療センターに連絡し予約を取る <input type="checkbox"/> 紹介状等の作成	<input type="checkbox"/> 検査予約 <input type="checkbox"/> 入院予約		<input type="checkbox"/> 報告書等の作成(診断後)	

※この医療連携パス(診療計画表)は、現時点で予想されるものであり、症状に応じて変更になる場合があります。

今後の治療方針

【パス適応】

- 慢性肝炎医療連携パス (強ミノール)
- IFN医療連携パス (かかりつけ医でIFN療法のフォロー)
- 肝硬変医療連携パス (代償性症例)
- NASH・NAFLD医療連携パス (生活習慣病が基礎疾患の症例)

【経過観察】

- B型肝炎無症候性キャリア (病院:半年に1回は検査実施)
- 単純性脂肪肝 (病院:1年に1回は検査実施)

【その他・パス適応外】

- 肝腫瘍 (手術適応等)
- 肝硬変(非代償性) (病院:診察・治療を実施)
- B型肝炎のうち抗ウイルス療法適応 IFN療法適応 (病院:診察・治療を実施)
- その他パス適応に当てはまらない症例 (病院:診察・治療を実施)

※病状が安定したらかかりつけ医へ

今後の治療方針確定後、病院から報告書にて連絡します。

図4 肝疾患診断医療連携パス(医療者用)



肝疾患診断医療連携パス(患者様用)

医療機関	かかりつけ医	済生会吹田病院 消化器内科 肝臓グループ			かかりつけ医
スケジュール	紹介	診察	検査入院	結果説明	診断結果後受診
診察・検査	現在の状態を知るために以下の検査を行います。 <input type="checkbox"/> 血液検査 <input type="checkbox"/> 血液一般検査 <input type="checkbox"/> 肝機能検査 <input type="checkbox"/> ウイルスマーカー検査 <input type="checkbox"/> 腫瘍マーカー検査 <input type="checkbox"/> 画像検査 <input type="checkbox"/> 胸部・腹部	<input type="checkbox"/> 必要に応じて、血液検査および画像検査の実施または予約を行います。 採血 CT MRI	<input type="checkbox"/> 肝生検をします。 採血 気軽に質問ください	<input type="checkbox"/> 診断結果等を説明のため受診していただきます。 気軽に質問ください	<input type="checkbox"/> 定期的に診察・検査・投薬等を実施します。 検査 レントゲン おくすり
患者様及びご家族への説明等	<input type="checkbox"/> 検査結果を基に今後の検査・治療に関してあなたと相談させていただきます。 <input type="checkbox"/> 容態に応じて血液検査を実施しますので、食事をぬいてお越しください。(水分可)	<input type="checkbox"/> 検査等の説明をします。 <input type="checkbox"/> 肝生検が必要な場合は、入院予約をします。	<input type="checkbox"/> 詳しい内容は、院内で配布するクリニカルパスを参照してください。	<input type="checkbox"/> 診断結果を説明します。 <input type="checkbox"/> 今後の治療方針を説明します。 <input type="checkbox"/> 医療連携パスの今後の活用について説明します。	<input type="checkbox"/> 報告書等に基づいて今後の定期受診について説明します。
備考	★紹介状や予約通知書等を受取ってください。 紹介状/検査結果の紙や検査の結果などの大切に保管が記録されています。	★地域医療センター80番窓口へお越しください。	★入院受付1番窓口へお越しください。	★報告書は、かかりつけ医へ郵送させていただきます	地域連携パス おくすり

※この医療連携パス(診療計画表)は、現時点で予想されるものであり、症状に応じて変更になる場合があります。

図5 肝疾患診断医療連携パス(患者用)

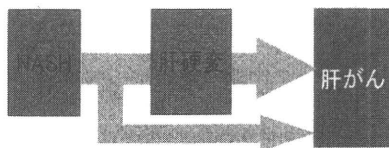


NASH・NAFLD 医療連携パス(医療者用)

NASH → 肝硬変 (病態の進展予防)

医療機関	かかりつけ医	済生会吹田病院
スケジュール	定期受診	□3ヶ月後 □6か月後 年 月 日
達成目標	病院の治療方針に従って診察および検査を行い以下の項目を目標とする。 ■肝機能の悪化がない ■生活習慣病のコントロールができています	■肝機能の悪化がない ■生活習慣病のコントロールができています ■肝臓がない
診察	■自覚症状の確認 (倦怠感・体重変動等) ■検査データの確認	■自覚症状の確認 (倦怠感・便秘・体重変動等) ■検査データの確認
検査	■肝機能検査*1 ■血液一般*2	■肝機能検査 ■血液一般 ■腫瘍マーカー
	■超音波	■腹部超音波検査(原則6ヶ月に1回)
	■放射線	■CT(原則1~2年に1回)
	その他	
治療・処置	■生活習慣病治療薬 (アクトス・ARB・脂質改善剤等)	■処置: 瀉血(適宜、病院にて) ■必要に応じて現在の治療薬に対するコメント
指導	■食事指導 ■生活指導	■管理栄養士による栄養管理 ■生活指導
その他	■報告書等の確認 ■臨床症状・検査で異常所見がある場合は病院へ紹介	■報告書等の作成 ■3ヶ月または6ヶ月後の予約

※この医療連携パス(診療計画表)は、現時点で予想されるものであり、症状に応じて変更になる場合があります。
 検体検査: *1)肝機能: AST, ALT, γ-GTP, Alb, BS, LDL, HDL, TG
 *2)血液一般: WBC, RBC, Hb, Plt



NASH・NAFLD医療連携パス

- 対象症例
生活習慣病を基礎疾患を持ち、NASHと診断した患者
- パスの目的
1) 病態の進展予防
2) 肝硬変・肝臓の予防および早期発見・治療
3) 合併症の把握と治療
- 基本原則
1) 病院への通院は、3ヶ月または6ヶ月毎とする。
2) 検体検査について、原則として保険診療範囲内で1~2ヶ月に1回かかりつけ医で実施する。
3) 超音波検査について、原則として6ヶ月毎病院で実施する。
4) CTは、原則として1~2年に1回病院で実施する。
5) 薬剤投与について、かかりつけ医が行うが、年末年始や連休などは、病院側も適宜行う。
6) 他の合併症も含めた日常の管理は、かかりつけ医が行う。

※検査の役割分担は、病院、かかりつけ医との相談で決めることもある

平成 年 月 日

済生会吹田病院
消化器内科

図6 NASH/NAFLD 医療連携パス(医療者用)

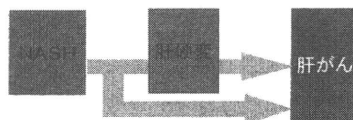


NASH・NAFLD 医療連携パス(患者様用)

NASH → 肝硬変 (病態の進展予防)

医療機関	かかりつけ医	済生会吹田病院
スケジュール	定期受診	□3ヶ月後 □6か月後 年 月 日
診察	★あなたの病状をかかりつけ医の先生にも連絡し、病院主治医とかかりつけ医があなたの治療方針を共有して、治療していきます。 	★吹田病院の外来にて現在の状態を確認するため、診察を行います。 ★担当医師から血液検査や 画像診断の結果に関して説明があります。
検査	現在の状態を知るために以下の検査を行います 血液検査 □血液一般検査 □肝機能検査 	以下の検査を必要に応じて行います。 血液検査 □血液一般検査 □肝機能検査 □腫瘍マーカー など 画像診断 □腹部超音波検査 □CT検査 □MRI検査 その他 □上部消化管内視鏡検査
治療・処置	内服薬 □生活習慣病治療薬 	処置: □瀉血(適宜、病院にて) □必要に応じて現在の治療薬に対する説明
指導	□食べ過ぎに注意し、肥満は避けましょう。 □アルコールは肝臓を悪くするので、禁酒しましょう。 □睡眠はしっかりとしましょう。 □入浴は、ぬるめにして、長湯はよくないのでもやめましょう。 	★管理栄養士による栄養管理の説明があります。
症状	□食欲がない 身体がだるい 腹部が強くなる □便の色が変化(黒色便) □体重のチェック □ 	
その他	□病状に変化があった場合は、かかりつけ医に相談しましょう。	□再来受付欄を通し、60番窓口へ □3ヶ月後の予約票を受け取る □6か月後の予約票を受け取る

※この医療連携パス(診療計画表)は、現時点で予想されるものであり、症状に応じて変更になる場合があります。
 検体検査: *1)肝機能: AST, ALT, γ-GTP, Alb, BS, LDL, HDL, TG
 *2)血液一般: WBC, RBC, Hb, Plt



肝臓の三大疾患

数ある肝臓の疾患のなかでも、日本で圧倒的に多いのがC型肝炎とB型肝炎、そして増加しつつあるのが、非アルコール性脂肪性肝疾患(NASH)です。いずれも肝硬変や肝臓へ進行する可能性が高いため、早期の発見と適切な治療が必要な代表的な肝疾患です。

NASH・NAFLD医療連携パス

- (通院)
定期受診は、かかりつけ医で、病院には、3ヶ月または6ヶ月毎の受診です。
- (薬剤)
内服薬・注射は、かかりつけ医で行います。
- (検体検査)
血液検査・肝機能検査・腫瘍マーカーは、かかりつけ医で行い、病院は、必要に応じて検査を実施します。
- (画像診断)
画像診断は、原則として、病院で行います。
・超音波検査: 6か月毎に1回
・CTまたはMR: 年に1回
・上部内視鏡検査: 必要に応じて行います。
- (食事)
1日3食(腹8分目)、生活のリズムにあわせて規則的に摂りましょう。また、たんぱく質・炭水化物・脂肪の三大栄養素はバランスよくとることが大切です。
- (生活)
・アルコールは原則禁止です。
・睡眠はなるべく1日7時間以上。
※その他、かかりつけ医や担当医師の指示に従ってください。
※病状に変化があった場合は、かかりつけ医に相談してください。

平成 年 月 日

済生会吹田病院
消化器内科

図7 NASH/NAFLD 医療連携パス(患者用)

を受けているのは少数であることがあげられる。すなわち多くの患者は、主に一般内科、循環器内科、代謝糖尿内科など地域の実地医家のもとで診療をうけていると考えられる。これらの患者を、地域のなかから掘り起こして、適切に診断し、進行例には治療を行うことが必要である。そのためにも地域連携は重要であり、地域連携パスは有用なツールとなり得る。

4 地域への啓蒙

まず、生活習慣病の診療にあたっている実地医家の先生方にNASH/NAFLDについて、知識を深めていただく必要がある。われわれの病院では、地域の実地医家の先生方を対象とした勉強会を病院主催で定期的に行い、また、院内の地域連携室を通じて、後述の肝疾患診断医療連携パスを用いてご紹介いただけるように便宜をはかっている。さらに、地域の住民を対象に、肝臓病教室を開催し、肝疾患の啓蒙に努めている(図3)。

5 肝疾患診断医療連携パス(図4, 図5)

肝疾患診断医療連携パスとは、かかりつけ医の先生方から病院へむけて最初に発行していただくパスである。対象となる病態は、1. HBV・HCV陽性 2. ALT 31 IU/ml以上 3. 血小板数15万 μ l未満 4. 肝腫瘍を認めるのいずれかを認める場合、病院へご紹介いただくこととしている。この条件で、NASH/NAFLDを含む肝疾患がほとんどが網羅される。病院では各種血液検査・画像検査を行うとともに、必要に応じて肝生検を行い、確定診断を行っている。特にNAFLDと考えられた場合、肝生検を積極的に行い、simple steatosisか、進行する病態であるNASHであるかを病理学的に診断している。最近では、

肝生検の必要性や合併症について、すでにかかりつけ医の先生方からインフォームド・コンセントを得ている場合もあり、ストレスなく診療がすすむことが多い。

6 NASH・NAFLD医療連携パス(図6, 図7)

NASH/NAFLDと診断した患者の医療連携に用いるパスがNASH・NAFLD医療連携パスである。すなわち、対象は生活習慣病を基礎疾患として持ち、NASH/NAFLDと診断された患者である。NASH/NAFLDは慢性肝疾患であり、肝発癌の母地になり得るため³⁾、このパスの目的は、1. 病態の進展予防 2. 肝硬変・肝癌の早期発見・治療 3. 合併症の把握と治療の3項目としている。

また、パス運用の基本原則は、他の慢性肝疾患に準じて次のとおりである。1)病院への通院は、3カ月または6カ月ごととする。2)検体検査について、原則として保険診療範囲内で1~2カ月に1回かかりつけ医で実施する。3)超音波検査について、原則として6カ月ごと病院で実施する。4)CTは、原則として1~2年に1回病院で実施する。5)薬剤投与について、かかりつけ医が行うが、年末年始や連休などは、病院側も適宜行う。6)他の合併症も含めた日常の管理は、かかりつけ医が行う。

一方、NASH/NAFLDは慢性肝疾患で、肝発癌の背景になり得るといふ側面とともに、生活習慣病の肝臓での表現形であることから、体重を減量し、脂肪を燃焼させて、肥満の是正をすることが重要であり、身体計測や食事指導は特に重要である^{4,5)}。このパスで病院を受診する際には、医師による診察のほか、希望があれば、身体計測(体重・腹囲・体成分分析装置を用いた体脂肪量・筋肉量測定)、

腹部超音波検査，管理栄養士による食事指導を1回の受診で一連の流れとして行い，患者やかかりつけ医の先生の利便性をはかっている。

今後は，理学療法士に参加してもらい，運動指導を加えること，患者用に身体計測値や検査値を表やグラフにして配布することなどで生活習慣の是正の動機づけをはかることを考えている。われわれの病院では糖尿病や骨粗鬆症の地域連携パスも展開されている。同じ患者で，複数の疾病をもつ方もあり，疾患の種類を超えたフォーマットの統一なども今後の課題である。

7 おわりに

生活習慣の欧米化に伴い，わが国のNAFLD/NASH罹患者はさらに増加することが予想される。地域全体で，これらの患者を診断し，治療することが必要である。そのために地域

連携パスは有用なツールである。

文 献

- 1) Deepak NA, Hashimoto E, Laurentius AL et al : How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and there local differences? J Gasroenterol Hepatol 22 : 788-793, 2007
- 2) 渡邊絢香, 宇都弘文, 今村也寸志, 他 : 本邦におけるNASH/NAFLDの頻度, 生活習慣病を伴わないNAFLDの頻度. 肝胆膵 60 : 901-906, 2010
- 3) Hashimoto E, Yatsuji S, Tobar M et al : Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol 44 : 89-95, 2009
- 4) Bellentani S, Grave RD, Suppini A et al : Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease:the need for a multidisciplinary approach. Hepatology 47 : 746-754, 2008
- 5) 上野隆登, 森田恭代, 佐田通夫 : NAFLDに対する食事・運動療法. 肝胆膵 60 : 999-1005, 2010

* * *

非アルコール性脂肪肝炎—最新の知見

岡 上 武

別 刷

日 本 医 師 会 雑 誌

第 139 卷・第 9 号

平 成 22 (2010) 年 12 月

非アルコール性脂肪肝炎—最新の知見

岡上 武

●はじめに

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) には、予後良好な単純性脂肪肝 (simple steatosis; SS) と予後不良な非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) があり、肥満・糖尿病などの生活習慣病を基礎に SS が発症し (first hit)、内臓脂肪細胞から分泌される TNF α などのアディポサイトカイン、脂質過酸化、鉄蓄積などの因子 (second hit) が加わり NASH が発症すると考えられている。NASH 発症には遺伝的要素も大きいですが、誌面の関係上、最近の治験を中心に、診断法、予後に関する最新の知見を簡単に述べる。

①血液生化学的診断法

SS に比し NASH でより高値を示す検査は、インスリン抵抗性指標の HOMA-IR (homeostasis model assessment insulin resistance)、鉄過剰蓄積マーカーの血清フェリチン、AST/ALT、肝細胞アポトーシスのマーカーの soluble CK18、線維化マーカーの IV 型コラーゲン 7s で、NASH では内臓脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは低下し、線維化を反映する血小板数は低下傾向を示す。Sumida らは SS と NASH を鑑別するために血清フェリチン、血中インスリン値 (IRI)、線維化マーカーの IV 型コラーゲン 7s をスコア化し (NAFIC score と命名：男性は血清フェリチン 300ng/ml、女性は 200ng/ml 以上で 1 点、IRI $\geq 10\mu\text{U/ml}$ = 1 点、IV 型コラーゲン 7s $\geq 5.0\text{ng/ml}$ = 2 点)、2 点以

上の例は NASH の可能性が高いので、そのような例には積極的に肝生検を推奨している¹⁾。

②予後

NASH の 10~30% は 10 年以内に肝硬変・肝がんに進展するといわれており、本邦では Yatsuji らが NASH と C 型慢性肝炎で比較検討し、NASH 肝硬変の年率発がん率 2.3% (C 型 6.0%)、肝がん再発率 69.8% (C 型 83.1%)、5 年生存率 55.2% (C 型 50.6%) と報告している²⁾。また、米国では NASH 肝硬変 195 例と C 型肝硬変 315 例を 3.2 年フォローし、軽度飲酒が加わると、NASH 肝硬変の年率発がん率 2.6%、C 型肝硬変 4.0% が、それぞれ 4.0%、6.5% に上昇したと報告している³⁾。

③治療 (図 1)

肥満を伴う NASH は 5% 以上の体重減少で肝機能が改善するが⁴⁾、進展例には脂質代謝改善薬、抗酸化薬、インスリン抵抗性改善薬、抗線維化薬などが試みられてきた。しかし、NASH では個々の症例で発症・進展因子が異なるため、画一的治療は困難で、多くは一定の評価を得るに至っていない⁴⁾。

最近、糖尿病非合併 NASH にピオグリタゾン (PGZ)、ビタミン E、プラセボの 96 週間投与比較試験が行われ、プラセボ以外の両群で ALT 低下、脂肪肝・小葉内炎症の改善がみられたが、ビタミン E がより有効で、肝組織改善は 43% (PGZ 群 34%) と報告された⁵⁾。また、UDCA 大量 (23~28mg/kg/日) 18 か月間投与で肝臓の炎症は有意に改善し、特に 50 歳以下の男性患者で顕著と報告されている⁶⁾。一方、エゼチミブの 48 週間投与で、肝機能のみならず肝組織も改善することをわれわれも示した⁷⁾。

Recent Treatment Strategy for Nonalcoholic Steatohepatitis

Takeshi Okanoue : Center of Gastroenterology and Hepatology, Saiseikai Suita Hospital

大阪府済生会吹田病院院長 (消化器・肝臓病センター)

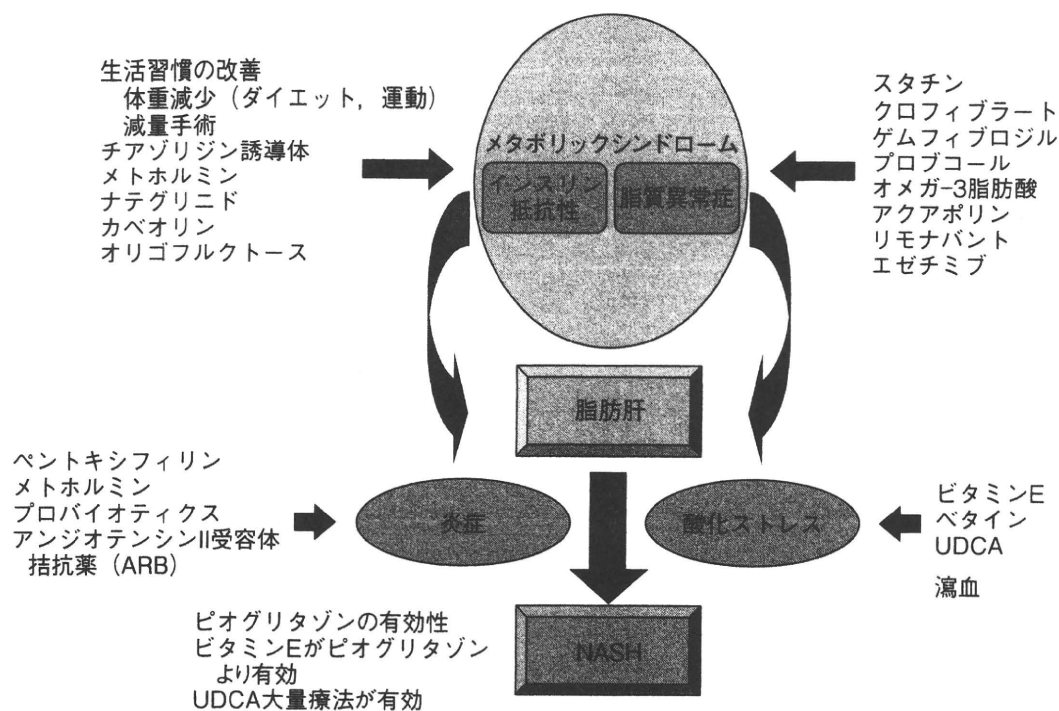


図1 NASHの治療

●おわりに

NASHの最新の知見を述べたが、NASHは肝硬変に進展するとC型肝硬変に匹敵するほど予後不良であり、治療法の確立が望まれる。

文 献

- Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, *et al* : A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2010 Sep 15. [Epub ahead of print]
- Yatsuji S, Hashimoto E, Tobari M, *et al* : Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2009 ; 24 : 248-254.
- Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, *et al* : The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010 ; 51 : 1972-1978.
- Musso G, Gambino R, Cassader M, *et al* : A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010 ; 52 : 79-104.
- Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, *et al* : Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 1675-1685.
- Leuschner UF, Lindenthal B, Herrmann G, *et al* : High-dose ursodeoxycholic acid therapy for nonalcoholic steatohepatitis : a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 2010 ; 52 : 472-479.
- Park H, Shima T, Yamaguchi K, *et al* : Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2010 Jul 24. [Epub ahead of print]

消化器の臨床

Clinics in Gastroenterology

別 刷

● Vol.13 No.6 2010 (2010年12月・2011年1月号) ●

ヴァンメディカル

[肝疾患]

NASHからの発癌とその予防

岡上 武*・安居幸一郎**



NASHは肝硬変に進展すると年率2～3%の確率で肝癌が発生し、肝癌が発見される年齢は72歳前後が多い。NASH肝癌の多くは線維化の進展した背景肝を有するが、男性では1/3あまりが軽度～中等度の線維化例から発癌している。NASH肝癌の予防法は確立されていないが、多くのNASHは肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病を基礎にしており、生活習慣をあらためNASH進展を防止することが基本で、インスリン抵抗性や酸化ストレスを改善する治療も有効と思われる。

Key Words

NASH/肝癌/生活習慣病/酸化ストレス/インスリン抵抗性

はじめに

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) から肝癌が発生することはよく知られているが、大規模かつ詳細に検討した報告はなく、その実態は明らかとは言いがたい。従来わが国の肝細胞癌 (肝癌) の9割近くはB型やC型肝炎由来のウイルス性で、いわゆる非B非C型肝癌は10%あまりであったが、ここ20年間で非B非C型肝癌が徐々に増加し最近では20%近くになり、その増加の一部はNASH由来の肝癌と考えられている。

肥満、糖尿病と肝発癌

10年以上前から肥満¹⁾や糖尿病患者^{2,3)}では種々の癌の発生頻度が高いことが報告され、特に肝癌の発生率は非肥満者、非糖尿病患者に比して有意に高く、男性では2～4倍高率であることが明らかになっている。米国での検討では肝癌発生の危険性はbody mass index (BMI) に比例し、BMI \geq 36 kg/m²では男性で4.52倍、女性で1.68倍と報告されている¹⁾。糖尿病に関しても男性での肝発癌率は非糖尿病患者の2倍で²⁾、わが国からの報告でも男女ともに糖尿病患者の死因のトップは肝癌と報告されている (図1)³⁾。肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧症などのいわゆる生活習慣病

*大阪府済生会吹田病院院長

**京都府立医科大学消化器内科准教授

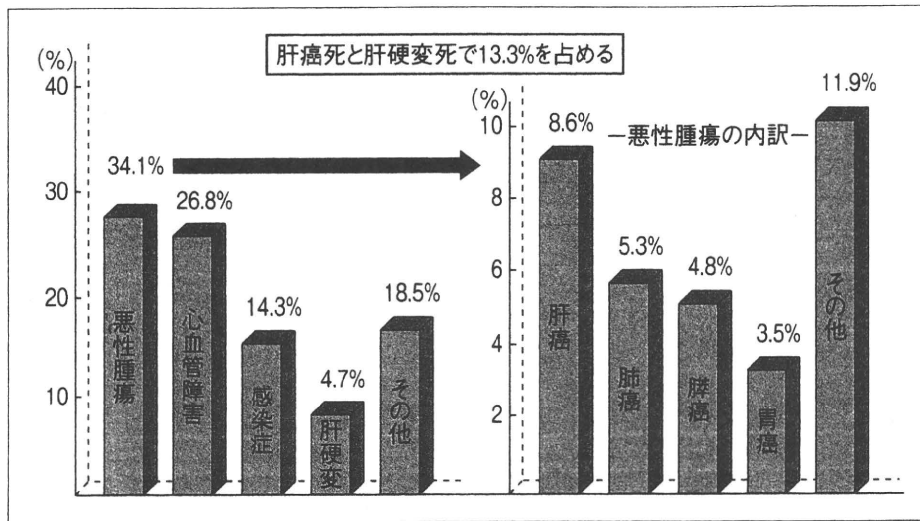


図1 1991～2000年の10年間に糖尿病で死亡した18,385名の死因 (文献3より改変)

を有する患者では、非飲酒者であっても高率に脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) を合併し、そのなかの2割前後は炎症や線維化を伴い、肝硬変・肝癌に進展する可能性の高いNASHである。NAFLDのうち単純性脂肪肝 (simple steatosis : SS) は一般に予後良好であるが、NASHの大部分は進行性である。米国や本邦からの報告の糖尿病患者における肝癌がすべてNASH由来とは断定できないが、非糖尿病者に比して肝硬変や肝癌発生の危険性が有意に高いことは事実である。

NASHからの発癌機序

肝癌合併NASHの背景肝組織所見の多くは線維化進展例であるが、筆者が研究代表者を務める厚生労働省肝炎等克服緊急対策事業のNASH研究班で集積したNASH肝癌症例の検討では、肝癌の20%前後は軽度～中等度の線維化 (F1, F2) を伴うNASHを背景に発癌し、特に男性例ではF1, F2が全体の1/3以上であった (表1)。NASHでは脂質過酸化、鉄過剰蓄積などからの酸化ストレスによ

る核DNA障害や内臓脂肪細胞由来の炎症性サイトカイン、インスリン抵抗性などが加わり発癌しやすくなっている。これらはP-ten knock-out mouse, 鉄添加NASHモデルマウスの実験でも証明されている。

NASHの経過と肝癌の特徴

NASHは種々の生活習慣病を合併している例から肥満・糖尿病など生活習慣病を全く合併していない例、やせ型NASHなどその背景はさまざま、したがって線維化の進展や発癌に関する予後は生活習慣病を複数有する例とそうでない例で当然大きな差がある。

Adamsら⁴⁾は肝生検で診断した103例のNAFLD患者を平均3.2年フォローし、経時肝生検の結果37%で肝線維化が進展し、34%は不変、29%は改善を示し、進展に寄与する因子は糖尿病合併と初回肝生検時に軽度線維化と報告した。Argoら⁵⁾はNASHの進展に関する10論文をまとめてNASH 221例の線維化進展に関して解析し、平均5.3年のフォローで37.6%が進展し、年齢、初回の炎症の程度のみが線維化進展の因子と報告した。

表 1 NASH 肝癌の背景

	症例数 (n=87)	男性 (n=54)	女性 (n=33)	P
年齢 (歳)	72 (69-75)	72 (69-75)	72 (68-75)	0.52
BMI (kg/m ²)	26.0 (23.8-28.3)	26.0 (23.8-28.8)	26.2 (23.9-27.7)	0.54
肥満の頻度	54 (62%)	35 (65%)	19 (58%)	0.50
糖尿病合併率	51 (59%)	31 (57%)	20 (61%)	0.77
脂質異常症合併率	24 (28%)	13 (24%)	11 (33%)	0.35
高血圧合併率	47 (54%)	22 (41%)	25 (76%)	0.001
線維化の程度				0.003
1	10 (11%)	10 (18%)	0 (0%)	
2	15 (17%)	10 (18%)	5 (15%)	
3	18 (21%)	13 (25%)	5 (15%)	
4	44 (51%)	21 (39%)	23 (70%)	

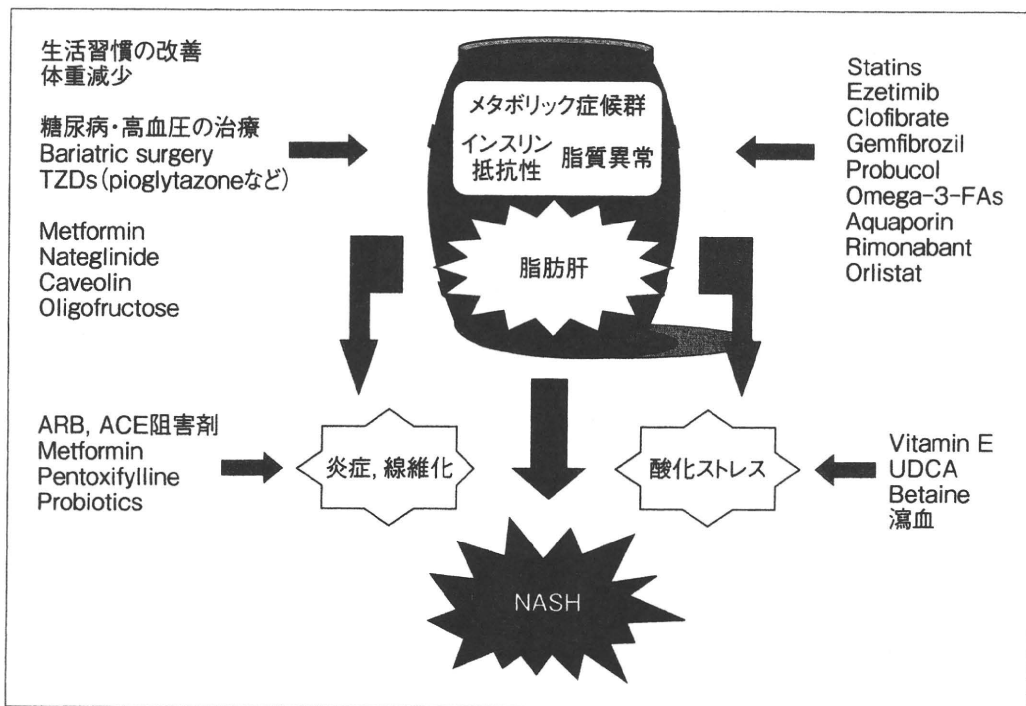


図 2 NASH の治療

NASH からの肝発癌に関しては71例 13.7年のフォローで2例 (2.8%) しかみられなかったとの報告⁶⁾があるが、当然のことながらフォロー開始時の線維化や炎症の程度、年齢によりその率は大きく左右される。わが国では、東京女子医科大学からの報告でNASH 肝硬変からの発癌率は5年で11.3% (年率2.2%)⁷⁾とされており、C型肝硬変からの6.0%よりはかなり低い。一方米国からは、Aschaら⁸⁾がNASH 肝硬変からの年率発癌

率は2.6%でC型肝硬変の4.0%よりは低いが、NASHは肝硬変に進展すると年率2~3%の確率で発癌すると考えてよい。

筆者が研究代表者を務める厚生労働省NAFLD研究班で集計したNASH 肝癌87例の内訳は、表1に示すように、男性54例、女性33例で、平均年齢はそれぞれ72歳 (69-75)、72歳 (68-75)で男女ともに70歳以上の高齢者に多く、BMIはそれぞれ26.0、26.2であった。肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などの生

活習慣病を合併している性別（男性 vs 女性）の頻度は、それぞれ65% vs 58%, 57% vs 61%, 24% vs 33%, 41% vs 76%で、女性肝癌患者では高血圧合併率が有意に高かった。また、興味あることに背景肝病変は男女間でかなり差があり、男性では20例（36%）が軽度～中等度の線維化例（F1:10例, F2:10例）であったのに対し、女性ではF1例からの肝癌はなく、F2例が5例（15%）のみで、他は進行したNASHを背景にした肝癌であった。男性では高齢になると比較的線維化の軽度な例からでも肝癌が発生する可能性がかなり高く、注意が必要と思われる結果である（未発表データ）。腫瘍マーカーに関しては、AFP, PIVKA IIともに陰性である例が多く、早期発見には定期的な画像検査が極めて重要である。

従来、NASH由来の肝癌の多くは肝硬変など進行したNASHを背景としていると報告されているが、NASHが進行すると脂肪滴が減少・消失するため（burn-out NASH）、長期フォローできた症例でなければ burn-out NASH由来の肝癌は原因不明の肝癌と診断されていることが多い。原因不明肝硬変・肝癌では生活習慣病の合併率が高いことから、burn-out NASHがこれらのなかに一定の割合で存在していることは間違いない。

NASHからの発癌予防

SSから肝癌が発生することはほとんどなく、多くは比較的線維化の進展した例から発癌しており、予防の第一はまずNASHの背景因子への対策（食事・運動療法、糖尿病や高血圧の治療など）で、これにより二次的に炎症や線維化を抑制する。さらにアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（ARB）やアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤がNASHの

線維化抑制に有効と言われ、発癌には酸化ストレス、インスリン抵抗性が関与しており、またC型肝炎と同様鉄蓄積もみられることから、抗酸化ストレスとしてのVitamin E投与、徐鉄のための瀉血が有効と考えられる（図2）。しかし、いずれの治療も発癌抑制を目的とした大規模な randomized controlled trial studyは行われておらず、発癌抑制を目指した治療に関しては今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K *et al* : Overweight, obesity and mortality from cancer in prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med* **348** : 1625-1638 (2003)
- 2) EL-Serag HB, Tran T, Everhart JE : Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **126** : 460-468 (2004)
- 3) 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, 18,325名での検討—。 *糖尿病* **50** : 47-71 (2007)
- 4) Adams LA, Sanderson S, Lindor KD *et al* : The histological course of nonalcoholic fatty liver disease : a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* **42** : 132-138 (2005)
- 5) Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi MS *et al* : Systemic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **51** : 371-379 (2009)
- 6) Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL *et al* : Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* **44** : 865-873 (2006)
- 7) Yatsuji S, Hashimoto E, Tobar M *et al* : Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* **24** : 248-254 (2009)
- 8) Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R *et al* : The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **51** : 1972-1978 (2010)

特集 鉄過剰症—その病態と治療

糖尿病・肥満・非アルコール性脂肪肝(NAFLD)と
鉄代謝異常

岡上 武 光吉 博則 安居幸一郎

別 刷

日 本 医 師 会 雑 誌

第 139 卷・第 2 号

平 成 22 (2010) 年 5 月

糖尿病・肥満・非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) と鉄代謝異常

岡上 武*¹ 光吉博則*² 安居幸一郎*³

キーワード●NAFLD, 鉄代謝, ヘプシジン

■はじめに

近年、わが国では肥満・糖尿病患者など生活習慣病の増加と共に脂肪肝が増加している。飲酒や肝炎ウイルス感染などが関与しない脂肪肝を非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease ; NAFLD) と呼び、単純性脂肪肝 (simple steatosis ; SS) と非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis ; NASH) に分類される。SS は肝病変としては予後良好だが、NASH は肝硬変や肝がんへ進展するリスクがある。本邦では成人の 20% 以上が NAFLD と推定され、その 10% 以上が NASH である。

Day らは NAFLD の病態進展形式を、肥満によるインスリン抵抗性で SS が生じ (1st hit)、これに 2 次的な障害が加わると NASH が発症する (2nd hit) という「two hit theory」で説明している¹⁾。2nd hit で重要な因子は酸化ストレスで¹⁾、肝脂肪化は脂肪酸の過剰な酸化により活性酸素を発生させる²⁾。さらに、NAFLD の肝組織中には高頻度に鉄蓄積が観察されるが、鉄はフェントン反応を介して強力な活性酸素であるヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) を産生する。その結果、脂質過酸化の連鎖反応で肝細胞障害、炎症、線維化が惹起される。一方、NAFLD における鉄蓄積の原因は不明で、その理由の 1 つは

鉄代謝メカニズムの複雑さにあるが、ヘプシジン (hepcidin) の発見を契機に鉄代謝は分子レベルでの解明が進んでいる³⁾。

Ⅰ 鉄代謝における肝臓の役割

鉄は生体に必須の元素であるが、過剰な鉄は有毒である。ヒトは能動的に鉄を体外に排出できないため、鉄の吸収制御で体内鉄の総量を調節している⁴⁾。鉄は十二指腸から吸収されてトランスフェリン (Tf) と結合し、骨髄で赤血球のヘモグロビン鉄に利用される。赤血球は寿命を迎えるとマクロファージに取り込まれ、そこでヘモグロビン鉄が処理されて再び骨髄で利用される。リサイクルされない余分な鉄は肝臓などでフェリチンとして貯蔵される⁴⁾。肝臓は鉄の貯蔵を監視し、鉄が過剰になると肝細胞でヘプシジンが合成される。

ヘプシジンは、十二指腸粘膜やマクロファージ細胞膜に存在する鉄輸送蛋白であるフェロポルチン (ferroportin ; FPN) の発現を低下させ、十二指腸やマクロファージからの鉄供給を抑制する⁴⁾。すなわち、肝臓は鉄代謝の恒常性を維持する重要な臓器の 1 つである。ヘプシジンの合成には細胞膜上の HFE (hemochromatosis gene)、トランスフェリンレセプター 2 (TfR2)、ヘモジュベリン (hemojuvelin ; HJV) などが関

Iron Metabolism Disorder in Nonalcoholic Fatty Liver Disease

*¹Takeshi Okanoue : Saiseikai Suita Hospital, *²Hironori Mitsuyoshi, *³Kohichiroh Yasui : Molecular Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine

*¹大阪府済生会吹田病院院長, *²京都府立医科大学大学院医学研究科学内講師 (消化器内科), *³准教授

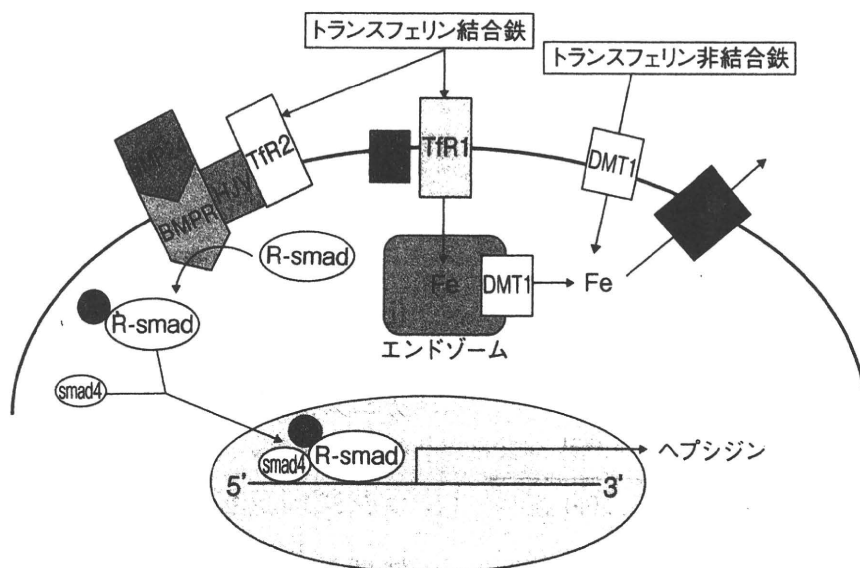


図1 鉄代謝関連分子

与するが⁵⁾, 詳細なメカニズムは不明である。そのほかの重要な鉄代謝関与分子には, トランスフェリンレセプター1(TfR1), divalent metal transporter 1(DMT1)がある⁴⁾。TfR1とDMT1はそれぞれトランスフェリン結合鉄, トランスフェリン非結合鉄を細胞内に取り込む。図1にこれらの鉄代謝関連分子の概要を示す。

II NAFLDにおける鉄代謝障害の実態

血清フェリチン値は体内鉄貯蔵量を反映し, 肝臓は最大の鉄貯蔵臓器であることから, 臨床的に血清フェリチン値は肝臓での鉄蓄積の指標として用いられている。血清フェリチンの正常値は, 男性18.6~261ng/ml, 女性4.0~64.2ng/mlで, 女性は閉経以降に血清フェリチン値が上昇する。すなわち, 女性は閉経以降鉄過剰蓄積が起りやすい状況にあり, 閉経以降にNASHの頻度が高くなる一因になっている。

筆者らはNAFLD肝生検時には全例に鉄染色を実施しているが, SS, NASHとも40%前後が鉄染色陽性である。血清フェリチン値はSSに比してNASHで有意に高値となり, SSとNASHの鑑別の1つに血清フェリチン値を用いている⁶⁾。

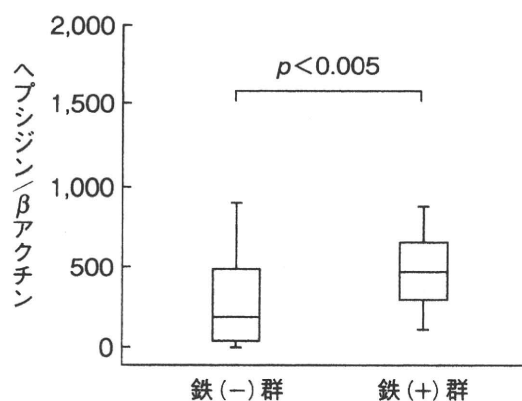


図2 ヘプシジン発現の比較

III NAFLDにおけるヘプシジンの発現

すでに述べたように, 肝臓で合成されるヘプシジンは全身の鉄代謝を制御する重要な蛋白である⁴⁾。筆者らはNAFLD症例の肝生検組織を用いて, RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法でヘプシジンの発現レベルを検討した。肝組織中の鉄が蓄積している症例 [鉄(+群)] と蓄積していない症例 [鉄(-)群] で比較した結果, ヘプシジンの発現は鉄(+群)が鉄(-)群に比較して有意に高値であった(図2)。これらの成績は一見矛盾しているようにみえる。すなわち, 負の鉄代謝調節因子であるヘプシジンは鉄(+群)で発現が低下してい

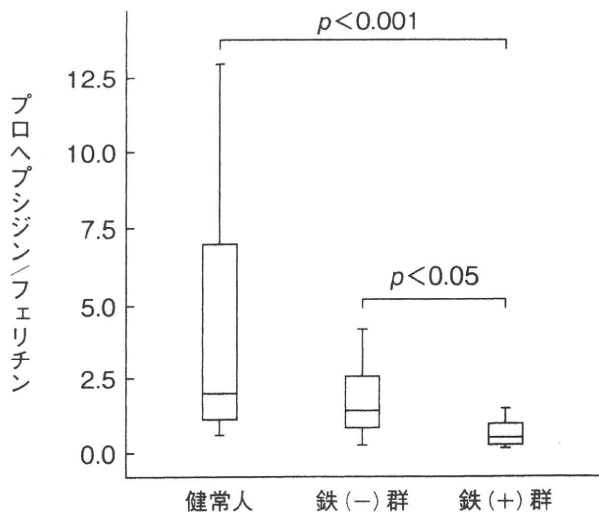


図3 血清中のプロヘプシジン/フェリチン値

る結果が予測されたが、実際にはその逆であった。しかし、同様の成績は別のグループからも報告されている⁷⁾。

Barisaniらは尿中ヘプシジンを測定し、NAFLDでは鉄(+))群が鉄(-))群に比較してヘプシジン値が有意に高値と報告している⁷⁾。鉄(+))群でヘプシジン発現が高い理由は不明であるが、彼らはフェリチンで補正したヘプシジン値が鉄(+))群で低下していることから、鉄(+))群では十分なヘプシジン合成が阻害されている可能性を示唆している。

筆者らも血清中のプロヘプシジン(ヘプシジンの前駆体)をフェリチンで補正した値を検討したが、Barisaniらと同様の成績であった(図3)。さらに、健常人との比較で鉄(+))群はプロヘプシジン/フェリチン値が有意に低下していたが、健常人と鉄(-))群の間に有意差は認められなかった(図3)。これらの成績からNAFLDではヘプシジン合成能が低下し、そのために肝臓に鉄が過剰に蓄積する可能性が考えられる。

一方、ヘプシジン合成細胞にはトランスフェリン結合鉄がヘプシジン合成を促進させる経路が存在する⁵⁾(図1)。この経路ではbone morphogenetic protein (BMP)、BMPレセプター(BMPR)、HFE、TfR2、HJVなどが関与し、smadのリン酸化が重要なことが判明している。これ

らの経路には未解明の部分も多いが、NAFLDの鉄代謝異常と密接に関連している可能性がある。

■ おわりに

NAFLDの病態において、肝臓の鉄蓄積は酸化ストレス障害を惹起し、SSからNASHへの進展や発がんの重要な因子となる。鉄蓄積のメカニズムは明らかでない点も多いが、肝細胞で合成されるヘプシジンが重要と考えられる。ヘプシジンは生体の鉄過剰状態を抑制する負の調節因子として注目される分泌蛋白である⁴⁾。NAFLDでは鉄(+))群のヘプシジン発現が鉄(-))群に比較して高値であるが、フェリチンで補正したヘプシジン値は逆に低値である。これらの成績から、肝臓に鉄が蓄積する原因の1つにヘプシジンの合成障害が考えられる。今後、ヘプシジン合成の経路が明らかになれば、NAFLDの鉄代謝異常の解明につながると期待される。

..... 文 献

- 1) Day CP, James OF : Steatohepatitis : a tale of two "hits" ? *Gastroenterology* 1998 ; 114 : 842-845.
- 2) Browning JD, Horton JD : Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 147-152.
- 3) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al : A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 7811-7819.
- 4) Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC : Balancing acts : molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004 ; 117 : 285-297.
- 5) Fleming MD : The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008 ; 151-158.
- 6) Sumida Y, Yoshikawa T, Okanoue T : Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2009 ; 39 : 213-222.
- 7) Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, et al : Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol* 2008 ; 49 : 123-133.

Characterization of the Interaction between Diferric Transferrin and Transferrin Receptor 2 by Functional Assays and Atomic Force Microscopy

Katsuya Ikuta^{1,2*}, Alexandre Yersin³, Atsushi Ikai^{2,3}, Philip Aisen² and Yutaka Kohgo¹

¹Division of Gastroenterology and Hematology/Oncology, Department of Medicine, Asahikawa Medical College, 2-1-1-1 Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan

²Department of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA

³Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259-B8 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

Received 11 August 2009;
received in revised form
29 December 2009;
accepted 13 January 2010

Edited by W. Baumeister

Transferrin receptor 2 (TfR2), a homologue of the classical transferrin receptor 1 (TfR1), is found in two isoforms, α and β . Like TfR1, TfR2 α is a type II membrane protein, but the β form lacks transmembrane portions and therefore is likely to be an intracellular protein. To investigate the functional properties of TfR2 α , we expressed the protein with FLAG tagging in transferrin-receptor-deficient Chinese hamster ovary cells. The association constant for the binding of diferric transferrin (Tf) to TfR2 α is $5.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, which is about 50 times lower than that for the binding of Tf to TfR1, with correspondingly reduced rates of iron uptake. Evidence for Tf internalization and recycling via TfR2 α without degradation, as in the TfR1 pathway, was also found. The interaction of TfR2 α with Tf was further investigated using atomic force microscopy, a powerful tool used for investigating the interaction between a ligand and its receptor at the single-molecule level on the living cell surface. Dynamic force microscopy reveals a difference in the interactions of Tf with TfR2 α and TfR1, with Tf–TfR1 unbinding characterized by two energy barriers, while only one is present for Tf–TfR2. We speculate that this difference may reflect Tf binding to TfR2 α by a single lobe, whereas two lobes of Tf participate in binding to TfR1. The difference in the binding properties of Tf to TfR1 and TfR2 α may help account for the different physiological roles of the two receptors.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: iron metabolism; transferrin; transferrin receptor 2; atomic force microscopy; functional assay

*Corresponding author. 2-1-1-1 Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan. E-mail address: ikuta@asahikawa-med.ac.jp.

Present address: A. Yersin, Gymnase de Beaulieu, Rue du Maupas 50, 1004 Lausanne, Switzerland.

Present address: A. Ikai, Innovation Laboratory, Tokyo Institute of Technology (S2-8), 4259, Nagatsuta-Cho, Midori-Ku, Osaka, Japan.

Abbreviations used: TfR2, transferrin receptor 2; TfR1, transferrin receptor 1; Tf, diferric transferrin; AFM, atomic force microscopy; CHO, Chinese hamster ovary; PBS, phosphate-buffered saline; TCA, trichloroacetic acid; PTA, phosphotungstic acid; GFP, green fluorescent protein; BSA, bovine serum albumin.

Introduction

Iron is essential for all living organisms and is required for numerous metabolic processes. In vertebrates, and at least in some invertebrates with circulatory systems, almost all circulating iron is carried by diferric transferrin (Tf) to provide iron for cellular needs. The initial event in the cellular uptake of iron is the binding of Tf to transferrin receptor 1 (TfR1)¹ on the plasma membrane of cells, followed by endocytosis of the Tf–TfR1 complex. HFE²—the protein that, when mutated, is responsible for hereditary hemochromatosis—has been shown to combine with TfR1

71 and to reduce its affinity for Tf,³⁻⁶ but the
 72 physiological functions of HFE are still not fully
 73 understood. In the acidified Tf-bearing endosome,
 74 iron is released from Tf and carried into the cytosol
 75 by divalent metal transporter 1.⁷⁻⁹ After the release
 76 of its iron, Tf, still bound to the receptor in the
 77 acidified endosome, is recycled to the cell mem-
 78 brane and released from TfR1 at the cell surface
 79 where iron-free Tf is not bound by the receptor at
 80 pH 7.4. Most cells other than hepatocytes have been
 81 thought to depend chiefly or exclusively on the
 82 TfR1 cycle for securing iron from Tf.¹⁰⁻¹²

83 A second transferrin receptor, transferrin receptor
 84 2 (TfR2), was cloned and identified as a new
 85 member of the transferrin receptor class.¹³ TfR2
 86 has two isoforms: TfR2 α and TfR2 β . TfR2 α
 87 is thought to be a type II membrane protein like
 88 classical TfR1.¹⁴ TfR2 β is probably an intracellular
 89 protein because its amino acid sequence lacks
 90 transmembrane portions. Although its affinity for
 91 Tf is less than that for TfR1, TfR2 α binds Tf and
 92 therefore may participate in cellular iron uptake,
 93 while the physiological function of TfR2 β is un-
 94 known. Mutations of the TfR2 gene reduce hepcidin
 95 expression, resulting in iron overload and indicating
 96 that TfR2 may function primarily as a regulator of
 97 hepcidin production. However, the precise mech-
 98 anisms of TfR2 α involvement in cellular iron met-
 99 abolism have not been elucidated, largely due to lack
 100 of information about the properties of the TfR2 α
 101 protein. We therefore aimed to characterize the
 102 interactions of TfR2 α with Tf by functional assays
 103 and atomic force microscopy (AFM), a powerful tool
 104 for investigating the interaction between a ligand
 105 and its receptor at the single-molecule level on a
 106 living cell surface.¹⁵

107 Results

108 Total protein contents

109 TfR1-deficient Chinese hamster ovary (CHO)
 110 TRVb cells were transfected with a TfR2 α expression
 111 vector or mock vector, with no detectable change in
 112 cell morphology observed in culture wells by light
 113 microscopy. The total protein contents were $113 \pm$
 114 20 pg/cell ($n=10$) for wild-type TRVb cells, $127 \pm$
 115 19 pg/cell ($n=10$) for TRVb-TfR2 α cells, and $120 \pm$
 116 15 pg/cell ($n=10$) for TRVb mock cells. Thus,
 117 transfection of TRVb cells with the TfR2 α expression
 118 vector did not cause any remarkable change in
 119 cellular protein concentration.

120 Expression of TfR2 α and its binding to Tf

121 Transfection of TRVb cells with the TfR2 α
 122 expression vector resulted in much higher Tf
 123 binding at 4 °C compared to wild-type TRVb cells
 124 or the mock-transfected clone (Fig. 1). Tf binding to
 125 TRVb cells and TRVb mock cells showed a
 126 nonsaturable, almost linear, behavior characteristic

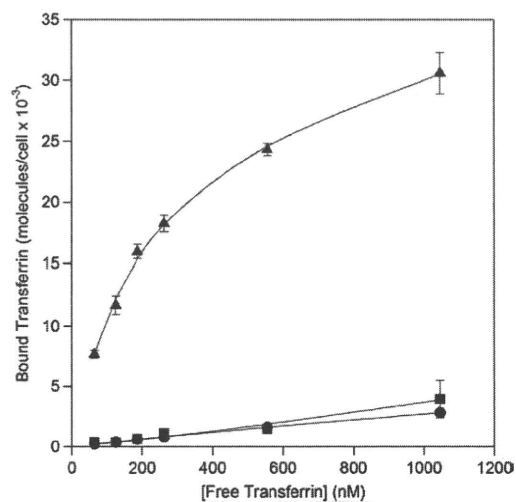


Fig. 1. Tf binding to TRVb (●), TRVb-TfR2 α (▲), and TRVb mock cells (■) at 4 °C. Cells were incubated with [¹²⁵I]Tf at 4 °C for 1 h, washed to remove unbound Tf, and then solubilized for counting. TRVb-TfR2 α cells showed a saturable binding curve, with an association constant of 5.6×10^6 M⁻¹ and 2.8×10^4 binding sites/cell. The experiment was performed in triplicate.

of nonspecific binding. In contrast, expressed cell surface Tf binding sites in TRVb-TfR2 α cells saturated at 2.8×10^4 Tf molecules/cell, with the association constant K_a calculated to be 5.6×10^6 M⁻¹. Since TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells were maintained at 30 μ g/ml puromycin, but TRVb cells were maintained without puromycin, TRVb mock cells were used as controls for further studies.

120 Cell-associated Tf at 37 °C

121 Total cell-associated Tf at 37 °C increased as a
 122 function of Tf concentration in TRVb-TfR2 α cells
 123 (Supplementary Fig. 1). The cell-associated Tf of
 124 TRVb mock cells, however, also increased as a
 125 function of Tf concentration, even though cell-
 126 associated Tf was less than that seen in TRVb-
 127 TfR2 α cells. To determine whether transfection was
 128 responsible for this increase in cell-associated Tf in
 129 mock cells, we measured cell-associated Tf in wild-
 130 type TRVb cells at 37 °C. There was no remarkable
 131 difference between wild-type TRVb and TRVb mock
 132 cells, indicating that transfection itself did not cause
 133 the Tf association in mock cells (data not shown).
 134 Since TRVb cells lack detectable TfR1, this associa-
 135 tion with Tf must be receptor-independent. The
 136 difference between cell-associated Tf in TRVb-TfR2 α
 137 cells and cell-associated Tf in TRVb mock cells as
 138 a function of Tf concentration—presumably due to Tf
 139 bound to TfR2 α and Tf internalized via TfR2 α in the
 140 former, but not in the latter—approached a constant
 141 value.

Q1

t1.2 **Table 1.** Tf internalized by TRVb-TfR2 α cells via TfR2 α

t1.3	Procedure	Molecules/cell
t1.4	[1] Total Tf associated with TRVb-TfR2 α cells after incubation for 1 h at 37 °C	47,800
t1.5	[2] Cell-associated Tf after acid washing	26,500
t1.6	[3] Tf removed by acid washing	21,300
t1.7	[4] Tf initially bound to TfR2 α at the cell surface ($10/9 \times [3]$)	23,700
t1.8	[5] Tf initially bound to TfR2 α at the cell surface but resistant to acid washing	2370
t1.9	[6] Tf internalized by all pathways ([2]-[5]), also non-specifically bound and resistant to acid washing	24,100
t1.10	[7] Tf in mock cells (non-specifically bound and resistant to acid wash)	6600
t1.11	[8] Tf internalized via TfR2 α in TRVb-TfR2 α cells ([6] and [7])	17,500

158 **Efficiency of the acid wash method**

159 Our acid wash method removed approximately
 160 90% of the cell surface membrane-bound Tf in
 161 TRVb-TfR2 α cells compared to normal phosphate-
 162 buffered saline (PBS) washing (data not shown). In
 163 addition to acid washing, washing with F-12
 164 medium was necessary to remove bound Tf,
 165 suggesting that, like TfR1, TfR2 α binds apotransfer-
 166 rin at acidic pH but not at neutral pH.¹⁴ Addition
 167 of cold Tf into F-12 medium at pH 7.4 did not enhance
 168 the effectiveness of washing, verifying that washing
 169 at pH 7.4 is sufficient for removing cell-surface-
 170 bound apotransferrin.

171 **Evidence for Tf internalization mediated by**
172 **TfR2 α**

173 After 1 h of incubation at 37 °C, cell-associated Tf
 174 in TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells repre-

sents both internalized Tf and nonspecific cell-
 surface-bound Tf that are resistant to acid washing.
 Tf in TRVb-TfR2 α cells was 26,500 molecules/cell,
 much higher than the 6600 molecules/cell seen in
 TRVb mock cells (Table 1). Although the effective-
 ness of the acid wash method is only about 90%, the
 difference in cell-associated Tf between transfected
 cells and mock cells is too great to be attributed to
 residual cell-surface-bound Tf and therefore repre-
 sents Tf internalized via TfR2 α . We calculate that
 about 17,500 Tf molecules/cell are internalized by
 TfR2 α (Table 1).

Iron uptake

Iron uptake by TRVb-TfR2 α cells after 1 h of
 incubation at 37 °C was not clearly different from
 that by TRVb mock cells, even though there were
 small differences at high concentrations of Tf
 (Fig. 2a). To investigate whether or not induced
 TfR2 α protein actually can donate iron to the cells,
 we determined the time course of ⁵⁹Fe uptake. Only
 after 1 h did a difference between TRVb-TfR2 α cells
 and TRVb mock cells become clear (Fig. 2b). Thus,
 TfR2 α -associated Tf could donate iron to cells,
 although its rate of donation is much less than that
 provided by Tf associated with TfR1. The data also
 indicate that CHO cells exhibit receptor-independ-
 ent iron uptake from Tf, as described earlier.¹⁶

Efflux of Tf

To investigate the fate of Tf taken up through
 TfR2 α , we incubated TRVb-TfR2 α cells with ¹²⁵I-
 labeled Tf and acid-washed them before the time
 course of efflux was determined (Fig. 3). At time 0, Tf
 internalization by TRVb-TfR2 α cells was higher than

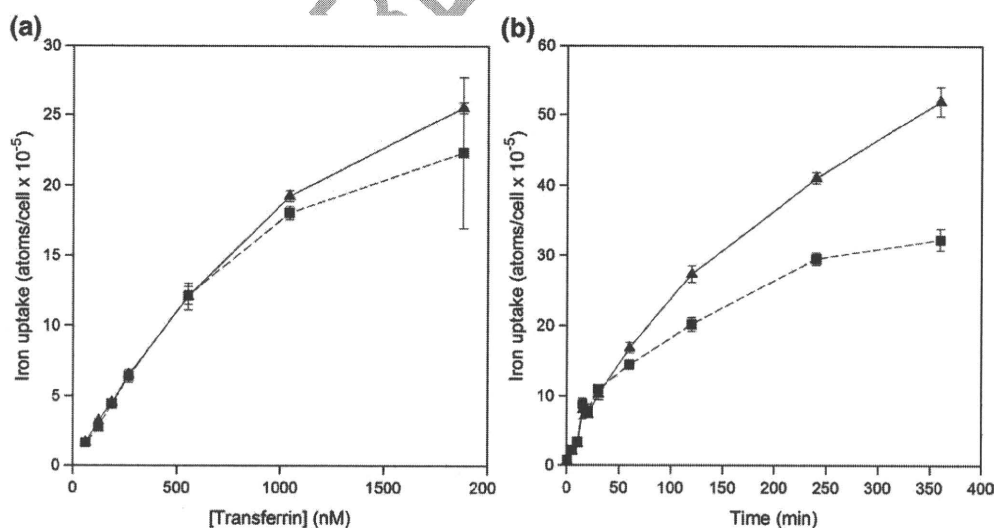


Fig. 2. Iron uptake at 37 °C as a function of Tf concentration (a). TRVb-TfR2 α cells (\blacktriangle) and TRVb mock cells (\blacksquare) were incubated with [⁵⁹Fe]Tf at 37 °C for 1 h, washed to remove unbound Tf, and then solubilized for counting. This experiment was performed in triplicate. Iron uptake at 37 °C with time was also investigated (b). TRVb-TfR2 α cells (\blacktriangle) and TRVb mock cells (\blacksquare) were incubated with 8.1×10^{-7} M [⁵⁹Fe]Tf at 37 °C for the indicated time, washed to remove unbound Tf, and then solubilized for counting. This experiment was also performed in triplicate.

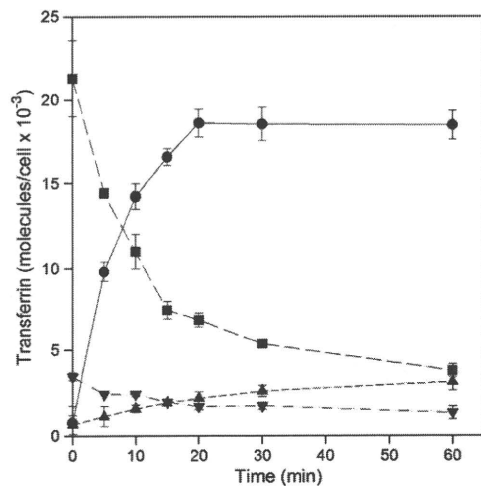


Fig. 3. Time course of Tf efflux. TRVb-TfR2 α cells and TRVb mock cells were incubated with 3.5×10^{-7} M [125 I]Tf at 37 °C for 1 h, washed to remove unbound Tf, and then acid-washed to remove Tf bound to cell surface receptors. Cells were then incubated at 37 °C for the indicated times, the medium was collected, and solubilized cells were taken for counting. Tf exocytosed into the medium from TRVb-TfR2 α cells (●) and TRVb mock cells (▲), and Tf retained in TRVb-TfR2 α cells (■) and TRVb mock cells (▼), are shown. Experiments were performed in triplicate.

208 Tf internalization by TRVb mock cells, in keeping
209 with Tf internalization by TfR2 α , as discussed above.
210 Internalized Tf mediated by TfR2 α was exocytosed
211 from TRVb-TfR2 α cells; approximately 80% of Tf
212 taken up via TfR2 α was released by 30 min. The
213 indication is that an effective efflux route exists for Tf
214 taken up by TfR2 α , suggesting that TfR2 α , like TfR1,
215 is recycled by the cells.

216 In a further investigation of the TfR2 α pathway,
217 the degradation of Tf internalized by TfR2 α was
218 determined. After 60 min, approximately 90% of Tf
219 exocytosed from TRVb-TfR2 α cells was precipitable
220 by trichloroacetic acid (TCA)/phosphotungstic acid
221 (PTA), indicating that Tf bound to TfR2 α has
222 recycled without substantial degradation in cells.

223 Pulse-chase study

224 To determine the fraction of cell-membrane-
225 bound Tf that is internalized and the recycling
226 time, we performed a pulse-chase experiment
227 (Supplementary Fig. 2). Almost all Tf initially
228 bound to TfR2 α at 4 °C was released into the culture
229 medium after 10 min of incubation at 37 °C, and
230 there was no significant internalization of cell-
231 surface-bound Tf in the single cycle of this pulse-
232 chase study.

233 Absence of TfR1–TfR2 heterodimers

234 The effectiveness of anti-FLAG M2 antibody and
235 anti-TfR1 antibody in immunoprecipitation had

236 been confirmed before these experiments were
237 undertaken (data not shown). HuH-7 cells, which
238 express detectable TfR1 by Western blot analysis,
239 were transiently transfected with the TfR2 α expres-
240 sion vector, and cell lysates were taken for immu-
241 noprecipitation and Western blot analysis
242 (Supplementary Fig. 3). Western blot analysis by
243 anti-TfR1 antibody for the samples without immu-
244 noprecipitation showed that HuH-7 cells and
245 HuH-7 cells transfected with TfR2 α express almost
246 identical amounts of TfR1. Furthermore, Western
247 blot analysis by anti-TfR2 antibody for the samples
248 not subjected to immunoprecipitation showed that
249 HuH-7 cells transfected with TfR2 α express more
250 TfR2 α proteins than nontransfected HuH-7 cells.
251 These data indicated that the transiently trans-
252 fected cells overexpressed TfR2 α protein and that
253 the antibodies were highly effective for Western blot
254 analysis. When immunoprecipitation was
255 performed with anti-TfR1 antibody, a band was
256 clearly detected in transfected and nontransfected
257 cells, but no band was found with the anti-TfR2
258 antibody. If a TfR1–TfR2 heterodimer were pres-
259 ent, anti-TfR1 antibody would precipitate that
260 protein, and Western blot analysis with anti-TfR2
261 antibody would show the band. When immuno-
262 precipitation was performed with anti-FLAG M2
263 antibody, a 100-kDa band was detected only in
264 transfected cells when the anti-TfR2 antibody was
265 used as the primary antibody in Western blot
266 analysis, indicating that transient transfection
267 resulted in expression of immunoprecipitable
268 TfR2 α protein. No band was detected when anti-
269 TfR1 was used as the primary antibody. Prolonged
270 exposure of the blotted membrane to the develop-
271 ing solution did not make a difference. The
272 possibility that the N-terminal FLAG tag in
273 TfR2 α interferes with dimer formation is unlikely,
274 since the recombinant TfR1 lacking the first 120 N-
275 terminal intracellular residues spontaneously
276 dimerizes.¹⁷ These results indicate that no detect-
277 able heterodimer of TfR1 and TfR2 α was formed
278 by the TfR2 α -transfected HuH-7 cells. Therefore,
279 our experiments detect TfR2, not the heterodimer
280 of TfR1 and TfR2.

281 Specificity of detection by AFM

282 HLF cells (human hepatoma) were transiently
283 cotransfected with TfR2 α and green fluorescent
284 protein (GFP) for identification, and tested with a
285 Tf-coated tip. Retraction force curves were recorded
286 with a Tf-coated tip and showed specific unbinding
287 events between Tf on the tip and TfR2 α at the cell
288 surface (in Tris-buffered saline, pH 7.4) (Fig. 4a).
289 The probability of binding between the Tf-coated
290 tip and the TfR2 at the cell surface reached 26%
291 ($n=7$ cells). In contrast, when nontransfected cells
292 were tested with a Tf-coated tip, this probability
293 was only 6% ($n=12$ cells, $p<0.001$, t test). This
294 indicated that transient transfection of the TfR2 α
295 expression vector was adequate for the investiga-
296 tion using AFM (Fig. 4b).