

- 2) Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008 ; 135 : 1176-84.
- 3) Aoyama T, Ikejima K, Kon K, et al. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A^y mice. *Hepatology* 2009 ; 49 (5) : 1636-44.
- 4) Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, et al. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis : one-year results of the randomized placebo-controlled fatty liver improvement with rosiglitazone therapy (FLIRT) trial. *Gastroenterology* 2008 ; 135 : 100-10.
- 5) Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007 ; 356 (24) : 2457-71.
- 6) Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005 ; 100 (5) : 1082-90.
- 7) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001 ; 34 : 745-50.
- 8) Hirose A, Ono M, Saibara T, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007 ; 45 : 1375-81.
- 9) Caligiuri A, De Franco RM, Romanelli RG, et al. Anti-fibrogenic effects of canrenone, an antialdosteronic drug, on human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 504-20.
- 10) Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004 ; 40 : 1222-5.
- 11) Kurtz TW. Treating the metabolic syndrome : telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator. *Acta Diabetol* 2005 ; 42 (suppl 1) : S9-16.
- 12) Sugimoto K, Qi NR, Kazdová L, et al. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* 2006 ; 47 : 1003-9.
- 13) Li Z, Oben JA, Yang S, et al. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004 ; 40 : 434-41.
- 14) Dubisson L, Desomouliere A, Decourt B, et al. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002 ; 35 : 325-31.
- 15) Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 1243-52.
- 16) Ikejima K, Takei Y, Honda H, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 1399-410.
- 17) Lang T, Ikejima K, Yoshikawa M, et al. Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 323 : 1091-5.
- 18) Saibara T, Onishi S, Ogawa Y, et al. Bezafibrate for tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 1999 ; 353 (9166) : 1802.
- 19) Assy N, Grozovski M, Bersudsky I, et al. Effect of insulin-sensitizing agents in combination with ezetimibe, and valsartan in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006 ; 12 (27) : 4369-76.
- 20) Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis : results of a randomized trial. *Hepatology* 2004 ; 39 : 770-8.

16. 肝星細胞活性化に対する PTEN の抑制効果

順天堂大学医学部 消化器内科

高島基樹 池嶋健一 今一義
山科俊平 鈴木聡子 渡辺純夫

The Tumor Suppressor Protein PTEN Inhibits Rat Hepatic Stellate Cell Activation

Motoki Takashima, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon,
Shunhei Yamashina, Satoko Suzuki and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

はじめに

肝線維化の進展は慢性肝疾患に共通する重要な病態であるが、いまだ抜本的な治療法は見つかっていない。肝線維化において中心的役割を果たす肝星細胞は線維化刺激によって内包しているビタミン A を失い、筋線維芽細胞様に形態変化する。さらに細胞増殖は盛んになり細胞外マトリックスを産生することによって肝線維化を構築する。

一方、癌抑制蛋白である PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) は非癌細胞に対しても増殖抑制等の作用を発揮することが近年注目されている。PTEN 欠損や変異は多くの癌細胞で認められており^{1,2)}、PTEN 発現変化は肺線維症、気管支喘息、関節リウマチなどでも報告されている³⁻⁵⁾。PTEN は細胞内シグナル経路において PI3K により PIP2 からリン酸化された PIP3 を逆に脱リン酸化することにより、この経路を阻害する。PIP3 は細胞増殖・生存をつかさどる Akt のリン酸化に必要であり、PTEN 発現によって癌細胞および非癌細胞の増殖等が阻害されるとの報告が多くなされている^{6,7)}。しかし肝線維化での PTEN の役割に関

しての報告はなく、当研究は肝線維化の過程で主軸的な役割を果たしている肝星細胞活性化における PTEN の役割について検討したものである。

なお、本稿は口演抄録である。

I 方 法

まずわれわれは雄性 SD 系ラットより単離培養した肝星細胞にアデノウイルスベクターを用いて PTEN を強発現させ、位相差顕微鏡で細胞形態変化を観察するとともに細胞数の経時的変化を計測した。また、Caspase3/7 活性測定によりアポトーシス誘導を評価した。活性化星細胞の指標である α -SMA 発現、細胞周期関連蛋白である PCNA と CyclinD1 の発現および各シグナル伝達分子 (Akt, p70S6k, Erk) のリン酸化を Western blot 法で検討した。

II 結 果

培養早期の未活性化肝星細胞に PTEN を強発現させた際には、その後の培養時間経過に伴う細胞進

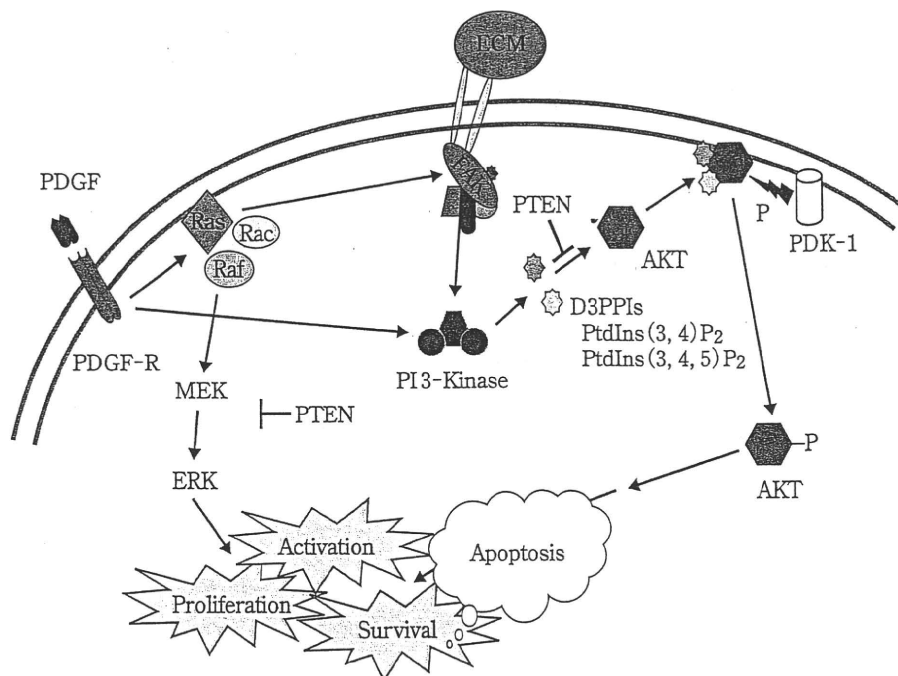


図 1 肝星細胞での PTEN を介したシグナル伝達

展などの活性化に伴う形態変化が乏しく、 α -SMA 発現もコントロール群に比べ 80%抑制された。また、PTEN 強発現により肝星細胞の増殖が有意に抑制され、PCNA, CyclinD1 などの細胞周期関連蛋白の発現も 90%減少した。また、PTEN 強発現によりアポトーシス関連酵素である Caspase3/7 の活性増加が認められた。PTEN を強発現した星細胞では、血清刺激に伴う Akt およびその下流分子 p70S6k のリン酸化が有意に抑制されるのみならず、MAP kinase 系の主分子である Erk のリン酸化も同時に抑制された。しかし、これらの現象は培養時間経過に伴いすでに活性化した肝星細胞に PTEN を強発現した際には観察されなかった。

III 考 察

Akt は Bad, GSK-3 β , forkhead family 蛋白などのアポトーシス促進分子を不活化することによって細胞増殖へ導くことが知られており、PTEN が Akt を抑制することによって肝星細胞をアポトーシスへと導いたと考えられる。また、以前に p70S6k の下流分子である mTOR の阻害薬であるラパマイシンの投与によって細胞周期が阻害されたとの報告もあり⁸⁾、PTEN による PI3K-Akt-p70S6k 経路の抑制に

よって細胞周期関連蛋白 (CyclinD1, PCNA) の発現が阻害されたことが示唆される。

以上より肝星細胞において PTEN が PI3K-Akt 経路の抑制を介して細胞増殖および活性化に伴う形態変化の抑制分子として機能することが明らかになった。今回、興味深いことに PTEN 過剰発現は未活性化肝星細胞の活性化プロセスを抑制するが、すでに活性化した細胞に対しての抑制作用は乏しかった。活性化星細胞においては PTEN 発現プロファイルに差異があるのか、アデノウイルスの導入での実験アプローチの問題なのか、さらなる考察が必要であり今後の検討課題と考える。

本実験から PTEN を標的分子としたアプローチは線維化の予防ないし進展早期での介入に有用であると考えられた。PTEN は肝星細胞活性化の過程で細胞増殖および生存シグナルの重要な制御因子として作用していることが示唆された (図 1)。

(本研究はノースカロライナ大学 Richard Rippe 准教授との共同研究である)

文 献

- 1) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene

- mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997 ; 275 : 1943-7.
- 2) Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 356-62.
 - 3) Kwak YG, Song CH, Yi HK, Hwang PH, Kim JS, Lee KS, et al. Involvement of *PTEN* in airway hyperresponsiveness and inflammation in bronchial asthma. *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 1083-92.
 - 4) White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL, Dickie EG, Livant DL, Markwart S, et al. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts : a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168 : 436-42.
 - 5) Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis : lack of Expression of the tumour suppressor *PTEN* at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res* 2000 ; 2 : 59-64.
 - 6) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival : a play in three Akts. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 2905-27.
 - 7) White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, et al. Negative regulation of myofibroblast differentiation by *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med* 2006 ; 173 : 112-21.
 - 8) Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G. Target of rapamycin (*TOR*) : balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr Opin Genet Dev* 1999 ; 9 : 49-54.

* * *

17. 肝細胞内脂肪滴蓄積と肝細胞死における 肝細胞内貯蔵鉄の役割

順天堂大学医学部 消化器内科

今 一 義 池 嶋 健 一 青 山 友 則
山 形 寿 文 渡 辺 純 夫

The Role of Chelatable Iron on Hepatic Trans-free Fatty Acid-induced Lipid Accumulation and Oxidative Stress-related Necrosis in Isolated Mice Hepatocytes

Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Tomonori Aoyama,
Hisafumi Yamagata and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

KEY WORDS

Free fatty acid, Oxidative stress, Iron

はじめに

非アルコール性脂肪肝炎 (non alcoholic steatohepatitis : NASH) は大滴性脂肪肝, 肝細胞の膨化, 壊死, 炎症細胞浸潤, 肝細胞周囲の線維化を特徴とする慢性肝疾患である。NASH の発症機序として, 肥満, 過栄養, 糖尿病による肝細胞の脂肪沈着に酸化ストレスなどの 2 次的ストレスが加わることによる肝細胞障害, 炎症細胞の活性化が重要であると考えられているが, 脂肪沈着と肝細胞死の関連についてはまだ不明な点が多い¹⁾。

遊離脂肪酸は経口摂取もしくは脂肪細胞から遊離されることによって血行性に肝臓に至り, また肝細胞内でも細胞質内で合成される。過剰に供給された遊離脂肪酸は肝細胞障害を惹起するが, 細胞障害性

は遊離脂肪酸の質によって異なる。トランス脂肪酸は不飽和脂肪酸の一種であるが, 2 重結合部分がトランス型になっており, マーガリンやショートニングなどの硬化油を精製する際に形成される。トランス脂肪酸の摂取が血中コレステロールの上昇, 動脈硬化の促進を惹起して虚血性心疾患の危険因子になることが明らかにされ^{2,3)}, 米国の一部の州では使用を禁止されている。しかしながら, トランス脂肪酸の脂肪性肝炎の病態に対する影響はこれまでわかっていない。また, 鉄イオンはフェントン反応を介してラジカル産生の触媒となり酸化ストレスを亢進させることが知られているが, 脂肪酸の肝細胞障害性と鉄イオンの関連は不明である。

そこで今回われわれは, トランス脂肪酸を負荷したマウス初代培養肝細胞を用いて, 肝細胞内脂肪滴

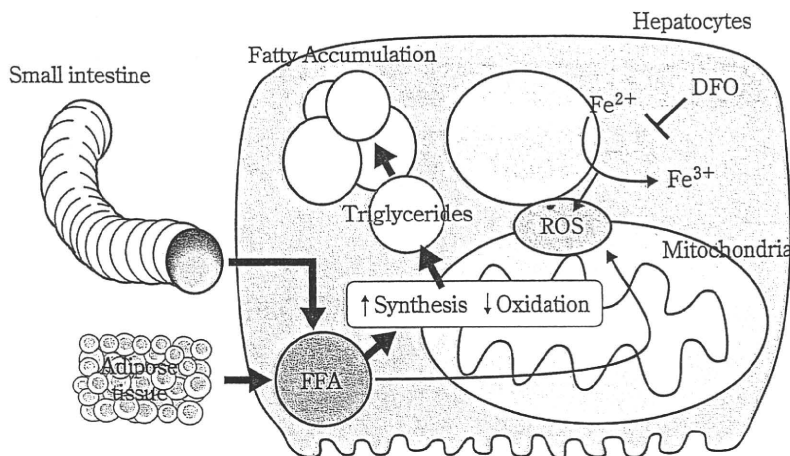


図1 遊離脂肪酸による脂肪滴沈着とラジカル産生のメカニズム
遊離脂肪酸が脂質産生系の亢進および脂質酸化系の抑制を介して肝細胞内に脂肪沈着を誘導する。また、鉄イオンはフェントン反応を介して脂質代謝に影響する可能性がある。

の蓄積と細胞死における肝細胞内貯蔵鉄の役割について検討した。なお、本論文は「第17回肝病態生理研究会」における口演抄録である。

I 方法

雄性 C57Bl/6 マウスよりコラゲナーゼ灌流法で肝細胞を単離し、初代培養肝細胞を作製した⁴⁾。10% 血清を添加した Waymouth 培地で1時間培養後、同培地中にオレイン酸 (18:1 (n-9), シス脂肪酸) 1 mM もしくは同量のエライジン酸 (トランス脂肪酸) を添加して培養した。一部の肝細胞では同時に鉄キレート剤の deferoxamine (1 mM, DFO) を同時に添加して培養した。12 時間の培養後、培地を KRH buffer に交換して実験に供した。酸化ストレス誘導のため、微量の *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH, 20 μM) を添加した。脂肪滴は Oil Red 法で可視化した。肝細胞のネクロシスを判定するために propidium iodide (30 μM) で染色し、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて (Ex 535 nm, Em 625 nm) 経時的に測定した。酸化ストレスを定量するため、5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CMH₂DCE, 5 μM) で染色し (Ex 485 nm, Em 535 nm), 経時的に測定した。

II 結果

培養 12 時間後の Oil Red O 染色ではオレイン酸と比較してエライジン酸は肝細胞内の脂肪滴沈着を多く誘導した。微量の *t*-BuOOH 添加後 30 分は無処置の肝細胞ではネクロシスの増加を認めなかったのに対して、オレイン酸で前処置を行った肝細胞では 30 分の時点で軽度のネクロシスの増加を認め、エライジン酸で前処置を行った肝細胞ではより早期の 20 分後からネクロシスが有意に誘導された (12.7 ± 1.4% *p*; < 0.001 vs. control)。酸化ストレスを測定すると、*t*-BuOOH 添加前はいずれの処置群も差を認めなかったが、*t*-BuOOH を添加してラジカル産生を誘導すると、オレイン酸で処置した肝細胞よりもエライジン酸で前処置された肝細胞では ROS が有意に強く誘導された。deferoxamine で鉄をキレートするとエライジン酸添加による脂肪滴沈着は減少し、エライジン酸処置群における *t*-BuOOH 添加による酸化ストレスの増加、ネクロシスの誘導がいずれも有意に抑制された。

III 考察

NASH の初期の病態形成には肝脂肪化と肝細胞障害の発現が重要である。今回の検討で、トランス脂肪酸のエライジン酸は、シス脂肪酸であるオレイン

酸と比較して、単離した肝細胞に対して有意に肝細胞内の脂肪沈着、ラジカル誘導刺激に対する酸化ストレス応答性の亢進、ネクロシスの増加を惹起した。従来の 2 hit theory では NASH の病態はまず肝脂肪化の形成という 1st hit ありきと考えられていたが、最近では 1st hit と 2nd hit という順番に病態が形成されるのではなく、脂肪化と肝細胞障害は同時に互いに影響しながら進展するとの考え方をされるようになってきている。本研究の結果は、トランス脂肪酸の過剰摂取がその双方の病態に直接影響する可能性を示唆するものである (図 1)。

遊離脂肪酸が肝細胞内に脂肪滴を形成するメカニズムに関しては、 β 酸化、 ω 酸化といった脂質酸化経路の抑制、脂肪新生の促進によるものが考えられているが、トランス脂肪酸とシス脂肪酸による脂肪蓄積の相違がどの経路に依存しているのかは不明である。また、細胞膜上のトランスポーターとの親和性、脂肪酸受容体との結合などに相違がある可能性もあり、今後の検討を要する。

鉄イオンは細胞のホメオスターシス維持に必須のイオンであるが、過剰鉄はヒドロキシナイトライトをはじめとしたラジカル産生の触媒として酸化ストレスを亢進させて慢性肝疾患の増悪因子として知られている。肝細胞内の鉄イオンの多くは蛋白分解の際に抽出され、リソゾーム内に蓄えられているが、deferroxamine はエンドサイトーシスによってリソゾーム内に取り込まれ、リソゾーム内の鉄イオンをキレートする⁵⁾。今回、肝細胞の鉄をキレートすることによってトランス脂肪酸による肝細胞内脂肪滴蓄積が減少し、肝細胞の酸化ストレス応答性の亢進も抑制され、鉄イオンがトランス脂肪酸による肝細胞

障害経路になんらかの関与をしていることが示された。また、トランス脂肪酸による肝細胞障害を細胞膜における脂肪酸の取り込みの相違としてとらえた場合は、肝細胞膜にも鉄イオンが含まれており、deferroxamine が肝細胞膜の鉄イオンをキレートした結果、エライジン酸の取り込みを阻害した可能性も考えられた。

本研究によって、トランス脂肪酸が肝脂肪化・酸化ストレス応答性の亢進を介して脂肪性肝炎の病態を増悪させる可能性が示され、トランス脂肪酸による増悪メカニズムに肝細胞内鉄イオンが関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002 ; 16 : 663-78.
- 2) Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2006 ; 354 : 1601-13.
- 3) Oomen CM, Ocke MC, Feskens EJ, van Erp-Baart MA, Kok FJ, Kromhout D. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study : a prospective population-based study. *Lancet* 2001 ; 357 : 746-51.
- 4) Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004 ; 40 : 1170-9.
- 5) Uchiyama A, Kim JS, Kon K, Jaeschke H, Ikejima K, Watanabe S, et al. Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology* 2008 ; 48 : 1644-54.

* * *

脂肪性肝炎における肝再生不全に対する pioglitazone の改善効果

順天堂大学医学部消化器内科

青山 友則 池嶋 健一 今 一義 山形 寿文
山科 俊平 佐藤 信紘 渡辺 純夫

「アルコールと医学生物学」Vol.28 (2009) 別刷

東洋書店

脂肪性肝炎における肝再生不全に対する pioglitazone の改善効果

順天堂大学医学部消化器内科

青山 友則 池嶋 健一 今 一義 山形 寿文
山科 俊平 佐藤 信紘 渡辺 純夫

1. はじめに

アルコール性肝障害では肝切除後肝不全やグラフト不全を起こすことが知られている。一方、アルコール性肝障害と非アルコール性脂肪性肝炎 (non alcoholic steatohepatitis : NASH) はその組織学的特徴がきわめて類似するのみならず、病態にも共通したメカニズムが示唆されている。アルコール性肝障害と同様に再生不全をはじめとした組織修復機転障害が NASH の病態進展に影響していることが考えられているが、それに対する治療アプローチは確立されていない。本研究では、インスリン抵抗性を基盤とし軽度の脂肪性肝炎を自然発症する KK-A^y マウスに対しチアゾリジン誘導体である pioglitazone を投与し、肝切除後の肝再生不全に対する効果およびそのメカニズムについて検討した。

2. 実験材料および方法

(1) 動物モデルの作成

雄性 KK-A^y および C57Bl/6 マウスに Higgins and Anderson 法にて 70% 肝切除を行いその後の生存を観察した。また、一部の KK-A^y マウスに pioglitazone (25 mg/kg) を 5 日間経口投与し、同様に肝切除を行った。屠殺 2 時間前に bromodeoxyuridine (BrdU ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO ; 50 mg/kg in PBS) を投与

した。

(2) 免疫組織化学

肝細胞への BrdU 摂取は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて抗 BrdU モノクローナル抗体 (DakoCytomation Norden A/S, Glostrup, Denmark) による免疫組織化学で検討した。

(3) Western blot

凍結肝組織から蛋白成分を抽出し Bradford 法により濃度測定を行った。50 mg の抽出蛋白を SDS-PAGE 電気泳動により分離し、PVDF 膜に転写した。その後、抗 cyclin D1 抗体、抗 STAT-3 リン酸化抗体 (Tyr705) および抗 STAT-3 抗体 (Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA) にてそれぞれ incubate し、二次抗体として HRP (horseradish peroxidase) 標識抗体を用いた。特異的バンドを ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) にて検出した。

(4) Real-time PCR

凍結肝組織より Guanidium/CsTFA 法で total RNA を調整し、MMLV reverse transcriptase および oligo dT プライマーを用いて cDNA を作成した。Real-time PCR は既報の通り ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems 社製) を用いて行い、threshold cycle (C_T) 値を用いて定量的に評価した¹⁾。

Pioglitazone restores regeneration failure following partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A^y mice.
Tomonori Aoyama, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon, Hisafumi Yamagata, Shunhei Yamashina, Nobuhiro Sato, Sumio Watanabe. Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

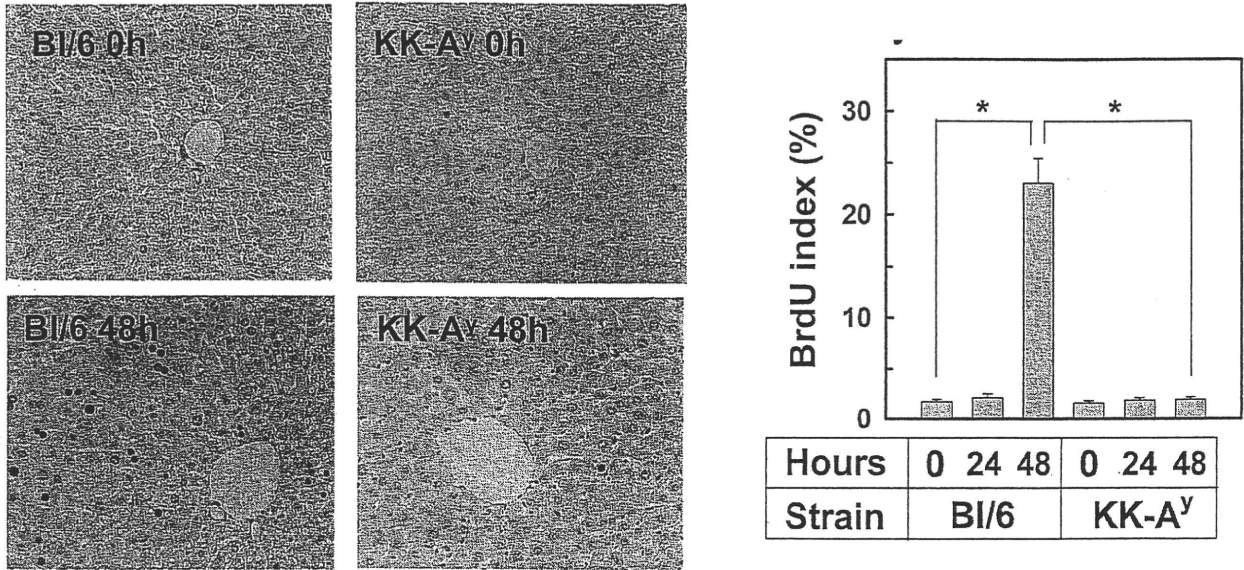


Fig. 1 肝切除後の肝細胞への BrdU 摂取

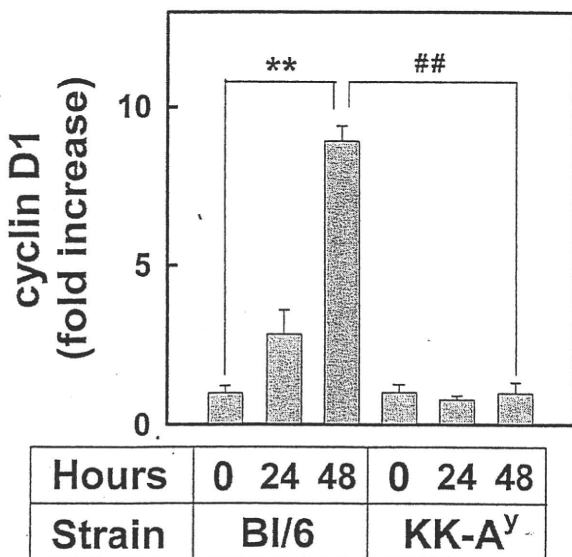
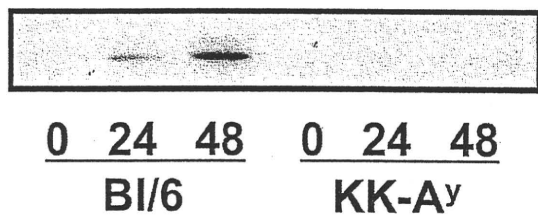


Fig. 2 肝切除後の肝組織中 cyclin D1 発現

(5) ELISA

血清アディポネクチン、レプチンおよび IL-6 は ELISA 法により測定した (レプチン: 生化学バイオビジネス株式会社, 東京; アディポネクチン: 大塚製薬株式会社, 東京; IL-6: eBioscience, San Diego, CA.).

3. 結 果

(1) 肝切除後の生存率, BrdU 摂取および肝組織中 cyclin D1 の変化

肝切除後 48 時間までに全ての C57BI/6 マウスは生存したが, KK-A^y マウスは半数が死亡した。肝切除後 48 時間の肝細胞の BrdU 摂取率は BI/6 では 22% に上昇したが, KK-A^y マウスでは 2% 以下に留まった ($p < 0.05$)。肝組織中 cyclin D1 発現は肝切除 48 時間後には C57BI/6 マウスでは cyclin D1 の発現レベルが約 9 倍に上昇したが, KK-A^y マウスでは殆ど上昇しなかった。一方, 肝切除 5 日前より pioglitazone を投与した KK-A^y マウス (KK-A^y+pio マウス) は肝切除後 48 時間で全て生存し, 生存率の改善を認めた。また肝切除後 48 時間の BrdU 摂取率は約 8% まで増加した。さらに KK-A^y+pio マウスの肝組織中 cyclinD1 発現も肝切除後 24 時間で KK-A^y マウスと比べ約 4 倍に上昇した ($p < 0.05$) (Fig. 1, 2)。

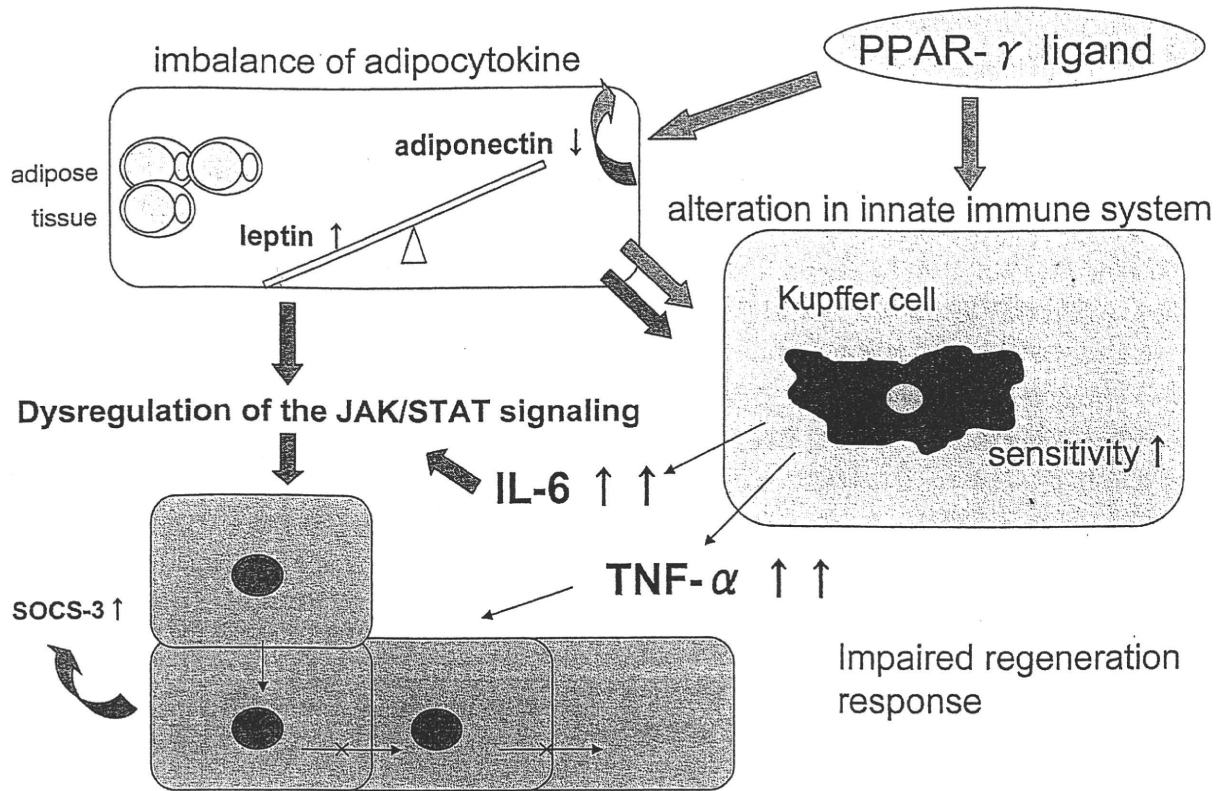


Fig. 3 Working Hypothesis

(2) 肝切除後の肝組織中 TNF- α mRNA, 血清アディポネクチンの変化

肝組織中 TNF- α mRNA は KK-A γ マウスで肝切除後 1 時間に C57Bl/6 マウスと比較し 8.9 倍と著明な上昇を認めしたが, KK-A γ +pio マウスでは 2.1 倍に留まった. 一方, 血清アディポネクチンは KK-A γ マウスで低アディポネクチン血症が認められたが, KK-A γ +pio マウスでは C57Bl/6 マウスと同等なレベルまで改善した.

(3) 肝切除後の血清 IL-6, レプチンの変化

血清 IL-6 は KK-A γ マウスで C57Bl/6 マウスと比較し肝切除後 24 時間をピークとした上昇を示したが, KK-A γ +pio マウスではピークは 6 時間にシフトし, かつ上昇は C57Bl/6 マウスと同等なレベルまで抑制された. また血清レプチンは KK-A γ マウスで肝切除後 24 時間をピークとした著明な上昇を示したが, KK-A γ +pio マウスではピークが 6 時間にシフトし, かつ上昇が抑制された.

(4) 肝組織中 STAT-3 リン酸化, socs-3 mRNA の変化

肝組織中 STAT-3 リン酸化は, C57Bl/6 マウスでは肝切除後 3 時間に増強しその後速やかに減弱したが, KK-A γ マウスでは肝切除後 3 時間に増強するもその後減弱せず, リン酸化の遷延を認めた. 一方, KK-A γ +pio マウスではリン酸化の遷延を認めず, C57Bl/6 マウスと同様なパターンを示した. 肝組織中 socs-3 mRNA 発現も同様に KK-A γ マウスでは肝切除後持続的な発現増強を認めしたが, KK-A γ +pio マウスでは C57Bl/6 マウスと同等なレベルに留まった.

4. 考 察

肝切除術では以前より脂肪肝合併例が予後不良因子として認識されており, 特にアルコール性肝障害で術後肝不全を呈することが指摘されていた. 一方, アルコール性肝障害のメカニズムの一つとして腸内細菌由来のエンドトキシン増加による Kupffer 細胞の機能異常が考えられている^{2),3)}.

また、アルコール性肝障害による肝切除後の肝再生不全についても基礎的検討が行われており、そのメカニズムとして肝細胞内の代謝性変化による cell cycle への影響や⁴⁾、TNF- α に対する感受性変化が報告されている⁵⁾。他方、生活習慣の欧米化とともに、本邦でも問題視されている NASH は非飲酒者においてインスリン抵抗性を基盤として進展する脂肪性肝炎である。NASH 病態機序の一つとしてアディポサイトカインのバランス変化に伴う自然免疫系への影響が肝再生を含めた組織修復機転の破綻を惹起させ病態を進展させることが考えられているが⁶⁾、その詳細は不明である。本研究ではヒトのメタボリックシンドロームに極めて類似した表現形を呈する KK-A γ マウスに対し肝切除を行い肝再生について検討した。その結果 KK-A γ マウスでは肝切除後 48 時間の BrdU 摂取をほとんど認めず、肝切除後の肝再生が著しく障害されていた。一方、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体 pioglitazone の投与により KK-A γ マウスの肝再生不全は一部改善した。KK-A γ マウスでは pioglitazone 投与により肝切除後のアディポネクチンおよびレプチンの発現が control pattern に変化する傾向を示した。また肝切除後、特に Kupffer 細胞を主体として産生される再生の初期反応に重要な TNF- α および IL-6 の分泌が改善し、JAK/STAT 系の反応の正常化を認めた。以上のことから KK-A γ マウスでは、PPAR- γ ligand による直接的な Kupffer 細胞への作用およびアディポサイトカイン発現バランスの是正が、肝切除後の肝再生促進に寄与したものと考えられた (Fig. 3)。

5. 結 語

KK-A γ マウスで認められた肝再生不全は pioglitazone 投与により肝再生の一部改善を認めた。そのメカニズムとしてアディポサイトカイン発現是正による肝切除後早期のサイトカイン発現の正常化が考えられた。メタボリックシンドロームに伴うアディポサイトカインのバランス変化が、脂肪性肝炎における肝再生機転障害の原因の一つとして考えられた。

文 献

- 1) Okumura K, Ikejima K, Kon K, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, et al. Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A(y) mice. *Hepatology* 2006; 36: 217-228.
- 2) Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; 20: 453-460.
- 3) Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995; 108: 218-224.
- 4) Wands JR, Carter EA, Bucher NL, Isselbacher KJ. Inhibition of hepatic regeneration in rats by acute and chronic ethanol intoxication. *Gastroenterology* 1979; 77: 528-531.
- 5) Akerman PA, Cote PM, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby G, Diehl AM. Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor-alpha. *Hepatology* 1993; 17: 1066-1073.
- 6) Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 2008; 43: 509-518.

13. メタボリック症候群における肝再生不全： pioglitazoneによる改善効果とそのメカニズムの検討

青山友則*・池嶋健一*・今 一義*・奥村京子*・渡辺純夫*

1. はじめに

非アルコール性脂肪性肝炎(non alcoholic steatohepatitis : NASH)進展のメカニズムとして、インスリン抵抗性を基盤とした酸化ストレスの増加に伴う細胞障害の増悪とともに、肝再生をはじめとした組織修復機転の破綻が考えられている¹⁾。一方、脂肪肝および脂肪性肝炎を有するモデルで肝再生不全を呈することが報告されているが、それに対する治療アプローチは未だ確立されていない。今回私達は、KK-A^yマウスに対しチアゾリジン誘導体であるpioglitazoneを投与し、肝切除後の肝再生不全に対する効果およびそのメカニズムについて検討した²⁾。

2. 実験材料および方法

(1)動物モデルの作成

雄性KK-A^yおよびC57Bl/6マウスにHiggins and Anderson法³⁾にて70%肝切除を行い、その後の生存を観察した。また、一部のKK-A^yマウスにpioglitazone (25mg/kg)を5日間経口投与し、同様に肝切除を行った。屠殺2時間前にbromodeoxyuridine (BrdU; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 50 mg/kg in PBS)を投与した。

(2)免疫組織化学

肝細胞へのBrdU摂取は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、抗BrdUモノクローナル

抗体(DakoCytomation Norden A/S, Glostrup, Denmark)による免疫組織化学で検討した。

(3) Western blot

凍結肝組織から蛋白成分を抽出し、Bradford法により濃度測定を行った。50mgの抽出蛋白をSDS-PAGE電気泳動により分離し、PVDF膜に転写した。その後、抗cyclin D1抗体、抗STAT-3リン酸化抗体(Tyr705)および抗STAT-3抗体(Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA)にてそれぞれincubateし、二次抗体としてHRP (horseradish peroxidase)標識抗体を用いた。特異的バンドをECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)にて検出した。

(4) Real-time PCR

凍結肝組織よりGuanidium/CsTFA法でtotal RNAを調整し、MMLV reverse transcriptaseおよびoligo dTプライマーを用いてcDNAを作成した。Real-time PCRは既報の通りABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems 社製)を用いて行い、threshold cycle (C_T)値を用いて定量的に評価した⁴⁾。

(5) ELISA

血清アディポネクチン、レプチンおよびIL-6は、ELISA法により測定した(レプチン:生化学バイオビジネス株式会社, 東京; アディポネクチン:大塚製薬株式会社, 東京; IL-6:eBioscience, San Diego, CA.)。

3. 結果

(1) 肝切除後の生存率, BrdU摂取および肝組織中cyclin D1の変化

肝切除後48時間までに全てのC57Bl/6マウスは生存したが, KK-A^yマウスは半数が死亡した. 肝切除後48時間の肝細胞のBrdU摂取率は, Bl/6では22%に上昇したが, KK-A^yマウスでは2%以下に留まった($p < 0.05$). 肝組織中cyclin D1発現は, 肝切除48時間後にはC57Bl/6マウスではcyclin D1の発現レベルが約9倍に上昇したが, KK-A^yマウスではほとんど上昇しなかった(図2). 一方, 肝切除5日前

よりpioglitazoneを投与したKK-A^yマウス(KK-A^y+pioマウス)は, 肝切除後48時間で全て生存し, 生存率の改善を認めた. また, 肝切除後48時間のBrdU摂取率は約8%まで増加した. さらに, KK-A^y+pioマウスの肝組織中cyclinD1発現も, 肝切除後24時間でKK-A^yマウスと比べ約4倍に上昇した($p < 0.05$).

(2) 肝切除後の肝組織中TNF- α mRNA, 血清アディポネクチンの変化

肝組織中TNF- α mRNAは, KK-A^yマウスで肝切除後1時間にC57Bl/6マウスと比較し8.9倍と著明な上昇を認めたが, KK-A^y+pioマウスでは2.1倍に留

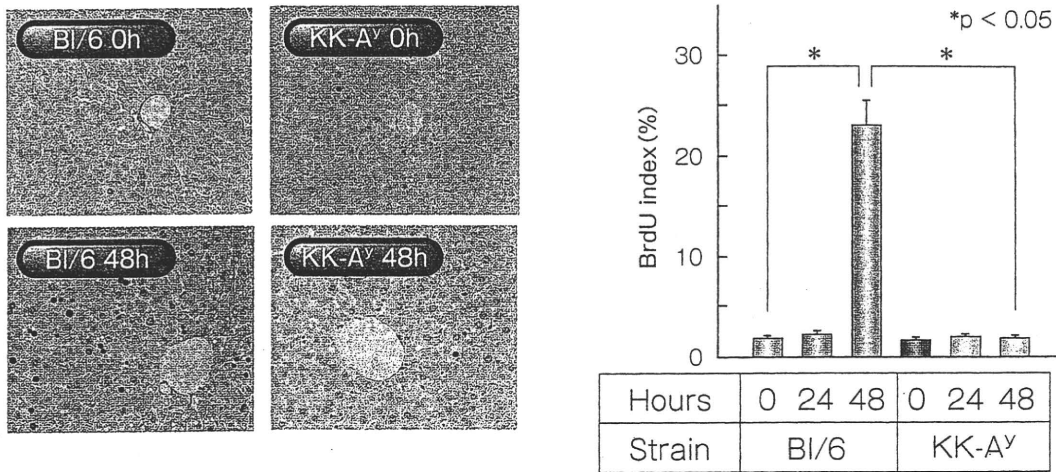


図1 肝切除後の肝細胞へのBrdU摂取

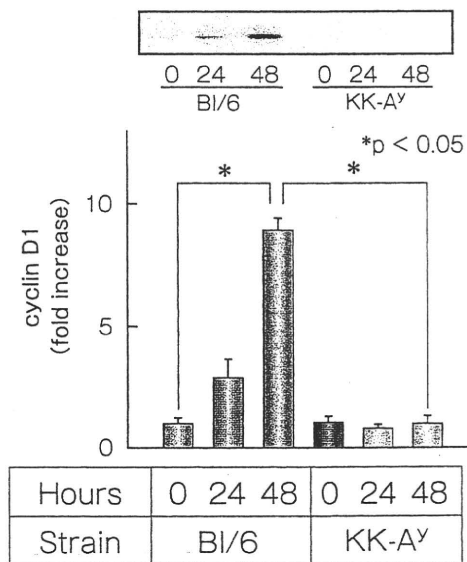


図2 肝切除後の肝組織中cyclin D1発現

まった。一方、血清アディポネクチンについては、KK-A^yマウスで低アディポネクチン血症が認められたが⁵、KK-A^y+pioマウスではC57Bl/6マウスと同等なレベルまで改善した。

(3) 肝切除後の血清IL-6, レプチンの変化

血清IL-6は、KK-A^yマウスでC57Bl/6マウスと比較し肝切除後24時間をピークとした上昇を示したが、KK-A^y+pioマウスではピークは6時間にシフトし、かつ上昇はC57Bl/6マウスと同等なレベルまで抑制された。また、血清レプチンはKK-A^yマウスで肝切除後24時間をピークとした著明な上昇を示したが、KK-A^y+pioマウスではピークが6時間にシフトし、かつ上昇が抑制された。

(4) 肝組織中STAT-3リン酸化, socs-3 mRNAの変化

肝組織中STAT-3リン酸化は、C57Bl/6マウスでは肝切除後3時間に増強し、その後速やかに減弱したが、KK-A^yマウスでは肝切除後3時間に増強するもその後減弱せず、リン酸化の遷延を認めた。一方、KK-A^y+pioマウスではリン酸化の遷延を認めず、C57Bl/6マウスと同様なパターンを示した。肝組織中socs-3 mRNA発現も同様に、KK-A^yマウスでは肝切除後持続的な発現増強を認めたが、KK-A^y+pioマウスではC57Bl/6マウスと同等なレベルに留まった。

4. 考察

脂肪肝と肝再生不全については、肝切除後の術後肝不全の原因として、その関連が以前より指摘されていた。しかし、肝切除の多くは肝癌に対して行われており、かつその背景肝の主体はウイルス性肝炎やアルコール性肝障害であることが大半であったため、脂肪肝そのものによる肝切除後の術後経過については系統的な解析が困難であった。一方、近年の移植技術の進歩とともに肝移植件数が増加したことから、90年代前半より欧米をはじめとして脂肪肝グラフトと術後肝不全の関係が指摘され始めた。脂肪肝グラフトの肝不全の原因として、脂肪蓄積に起因する肝再生不全、虚血再灌流

障害などが考えられているが⁵、明らかになっていない。

他方、生活習慣の欧米化とともに本邦でも問題視されているNASHは、非飲酒者においてインスリン抵抗性を基盤として進展する脂肪性肝炎である。NASHの病態機序は様々なメカニズムが報告されているが、その一つとして再生を含めた組織修復機転の破綻が考えられている。Richardsonらは、NASH患者の肝病理組織においてstageと比例してheptocyte cell-cycle arrestを示すp21の発現増強が認められたとともに、このp21の発現がstageだけではなくHOMA-IRとも相関を認められたことを報告した⁶。一方、脂肪肝モデルでありレプチン欠損を有するob/obマウスにおいて、Yangらは肝切除後再生不全を認め、かつ術後36時間以内に28%が死亡したことを報告した。肝再生不全の機序としてob/obマウスではアポトーシス誘導は認めないものの、肝切除後24時間でSTAT3の高リン酸化状態を呈するとともに、肝組織中のATP低下を併発したため、cyclinD1の誘導阻害を生じ再生不全に至ったと考えられた。また、死亡率の上昇は肝切除後のphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 発現減弱によるgluconeogenesisの低下により、低血糖を誘発したことが原因と考えられた⁷。レプチンについては、レプチン受容体異常を有し脂肪肝を呈するdb/dbマウス⁸およびZuckerラット⁹でも同様に肝切除後再生不全を認め、レプチンが再生に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。このように脂肪肝やNASHと再生不全は密接な関連があると考えられる一方で、そのメカニズムとしては単なる肝脂肪沈着だけではなく、インスリン抵抗性やアディポサイトカイン発現バランス異常などの背景因子も大きく関与していると考えられている。

KK-A^yマウスは、インスリン抵抗性を基盤として肥満・2型糖尿病および軽度の脂肪性肝炎を呈する動物モデルである。また、KK-A^yマウスは、低アディポネクチン血症および高レプチン血症を伴うことから⁴、ヒトのメタボリックシンドロームに極めて類似した表現形を呈する動物モデルとして認識

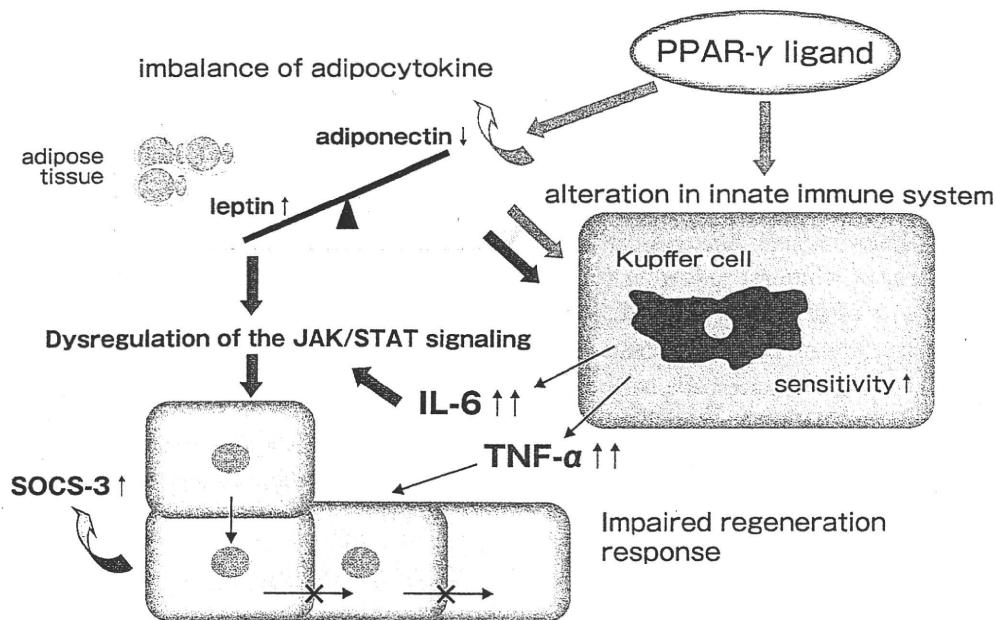


図3 Working Hypothesis

されている。本研究では、KK-A^yマウスに対し70%肝切除を行い、肝再生について検討した。その結果KK-A^yマウスでは肝切除後48時間のBrdU摂取をほとんど認めず、肝切除後の肝再生が著しく障害されていた。一方、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体pioglitazoneの投与により、KK-A^yマウスの肝再生不全は一部改善した。KK-A^yマウスでは、pioglitazone投与により肝切除後のアディポネクチンおよびレプチンの発現がcontrol patternに変化する傾向を示した。また、肝切除後、特にKupffer細胞を主体として産生される再生の初期反応に重要なTNF- α およびIL-6の分泌が改善し、JAK/STAT系の反応の正常化を認めた。以上のことから、KK-A^yマウスでは、PPAR- γ ligandによる直接的なKupffer細胞への作用およびアディポサイトカイン発現バランスの是正が、肝切除後の肝再生促進に寄与したものと考えられた(図3)²⁾。

5. 結語

KK-A^yマウスで認められた肝再生不全は、pioglitazone投与により肝再生の一部改善を認めた。そのメカニズムとして、アディポサイトカイン発現是正による肝切除後早期のサイトカイン発現の正常化が考えられた。メタボリックシンドロームに伴うアディポサイトカインのバランス変化が、脂肪性肝炎における肝再生機転障害の原因の一つとして考えられた。

文 献

- 1) Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A : Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* **43** : 509-518, 2008.
- 2) Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, Watanabe S : Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure following partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A^y mice. *Hepatology* 2009 (in press)
- 3) Higgins GM AR : Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12** : 186-202, 1931.
- 4) Okumura K, Ikejima K, Kon K, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y *et al* : Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A (y) mice. *Hepatol Res* **36** : 217-228, 2006.
- 5) Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Castaing D *et al* : The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* **23** : 1538-1540, 1991.
- 6) Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, Dixon JB *et al* : Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis : association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* **133** : 80-90, 2007.
- 7) Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK, Huang J, Diehl AM : Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers : implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* **34** : 694-706, 2001.
- 8) Yamauchi H, Uetsuka K, Okada T, Nakayama H, Doi K : Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Exp Toxicol Pathol* **54** : 281-286, 2003.
- 9) Selzner M, Clavien PA : Failure of regeneration of the steatotic rat liver : disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* **31** : 35-42, 2000.

4 NAFLD/NASHの 発症機序

こん かずよし いけしまけんいち
今一義・池嶋健一
 わたなべ すみお
渡辺純夫

順天堂大学医学部消化器内科



今一義
 1996年順天堂大学医学部卒業。99年同大学医学部消化器内科入局。2002年米国ノースカロライナ大学薬理学教室留学。04年順天堂大学医学部消化器内科助手。07年より同大学医学部消化器内科助教、現在に至る。研究テーマは脂肪性肝炎および酸化ストレス。

Key words : 2 hit theory, 酸化ストレス, 小胞体ストレス

Abstract

NASHの発症機序としては、まず単純性脂肪肝を発症し、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどの2nd hitが加わることによって脂肪性肝炎に至る、いわゆる2 hit theoryが従来より提唱され、広く受け入れられている。これまでの知見で、NASHの病態にインスリン抵抗性を基盤とした高血糖、高インスリン血症、高遊離脂肪酸血症に加え、脂肪細胞から分泌されるアディポカイン、腸管由来のエンドトキシン、自然免疫機構の異常などの複数の因子が複雑に関与していることが明らかになってきた。一方で今もなお単純性脂肪肝とNASHを発症するケースを分かち決定的な因子は不明であり、今後さらなる研究が必要である。

はじめに

NASHの病態が注目されるようになってから約10年が経過している。NASHの発生機序として、まず肥満、高血糖から単純性脂肪肝を発症し(1st hit)、酸化ストレスや炎症細胞の活性化が加わる(2nd hit)ことによって脂肪性肝炎に至るといふいわゆる2 hit theoryが提唱され、広く受け入れられている。NAFLD(非アルコール性脂肪性肝疾患)は単純性脂肪肝とNASHを両方含めた疾患概念だが、臨床のNAFLDの症例で単純性脂肪肝とNASHを鑑別する方法としてスコアリングシステムや超音

波、MRIを用いた様々な検討が行われてきているものの、肝生検抜きで単純性脂肪肝と初期のNASHの鑑別をするのは困難であるという状況は今日まで変わっていない。NAFLDの患者の1割程度にNASHが含まれ、NASHの2割から3割が進行性であると報告されているが、NASHの患者では肝障害による致死率が高いことが明らかになっており、NASHの発症メカニズムをより深く理解することは基礎的な面だけではなく臨床的にも極めて重要な課題である。これまでの知見で、多数の因子がNASHの病態に関与していて、かつそれらが相互に影響しあっていることが明らかになってきている。ここではそれらのNASHの発症機序として知られているものを概説したい。

1. NASH/NAFLDの背景因子

臨床的にNASHないしはNAFLDの背景因子としてまず挙げられるのは、いわゆるメタボリックシンドロームに含まれる肥満、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常がある。その他にも、ステロイドやテトラサイクリン系の抗生物質による薬剤性のNASH、小腸短絡術後による

The pathophysiologic mechanisms of NAFLD and NASH: Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe. Juntendo University, School of Medicine, Department of Gastroenterology.

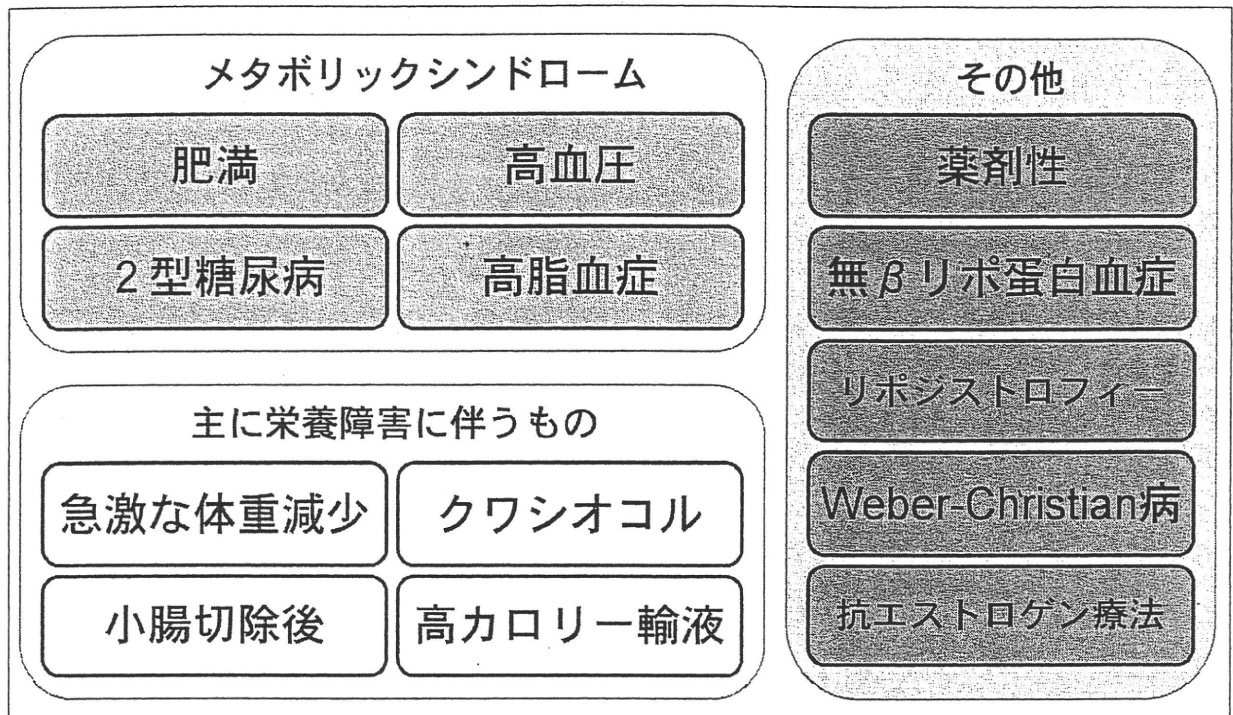


図1 NASH/NAFLDの原因疾患

ものやクワシオコル (kwashiorkor) など栄養障害に起因するものがある (図1)。NASHの概念が提唱された初期のころはNASHは女性に多いとされていたが、その後の検討では性別の関与を否定する報告もある。急性妊娠性脂肪肝とReye症候群も脂肪性肝炎を生じるが、その他の原因による脂肪性肝炎とは臨床経過が大きく異なることから、別のカテゴリで扱われるケースが多いようである。逆に、C型慢性肝炎は厳密にはNASHとはいえないが、高い頻度で脂肪肝を生じる。インスリン抵抗性を有するC型慢性肝炎の症例では病期の進行がはやく、インターフェロンなどの治療に対して抵抗性を有するとの報告があり、NASHと共通した機序が病態の増悪に関与している可能性が考えられ、注目されている。

2. 肝細胞内の脂肪蓄積

肝細胞の脂肪蓄積は、肝細胞における脂質の取り込みもしくはトリグリセリド合成による脂質の供給と、 β ・ ω 酸化、VLDLによる脂質の代謝・放出の均衡が崩れることによって生じる。腸管で吸収された中性脂肪は、遊離脂肪酸 (FFA) の状態で筋組織および肝臓に輸送される。また、脂肪細胞からもFFAが供給される。肝細胞内に取り込まれたFFAは β ・ ω 酸化を受けてアセチルCoAになってエネルギー源として消費される。そして、余剰のFFAは肝細胞内で中性脂肪に再合成されるか、 β リポ蛋白とVLDLを形成し、肝外に排出される。供給過剰、排泄の低下が起こると中性脂肪への再合成が促進し、肝細胞内に中性脂肪が貯留することになる。インスリン抵抗性の状態では血中のFFAが増加しており、肝臓への供給過剰な状態になっている。また、ミトコンドリアの機能障害が生じると、 β 酸化による脂質代謝機能が低下すると考えられ

る。また、小腸短絡術後ではアミノ酸や必須脂肪酸の吸収低下、クワシオコルではアミノ酸、ビタミンの欠乏によってリポ蛋白合成障害が惹起され、肝細胞からのトリグリセリドの放出が阻害されるために脂肪肝を生じると考えられている。もっとも、肝細胞の脂肪蓄積そのものは、有害なFFAを安定した中性脂肪に置き換えることによって、肝臓を守る機構であると考えられてきた。実際、脂肪蓄積のメカニズムを直接阻害すると肝細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかになっており、脂肪蓄積自体が病態を悪化させるというよりも、脂肪蓄積が起こるような病態自体が問題であると考えべきである。

3. NASHの発症機序

1) 2 hit theory

NASHの病理像の特徴として、肝細胞内脂肪貯留、肝細胞の膨化、肝小葉内の炎症細胞の集簇像、肝細胞周囲の線維化がある。これまでNASHの病態が形成される際のプロセスとして、まず肥満、インスリン抵抗性によって単純性脂肪肝が形成され(1st hit)、その上で酸化ストレス、炎症性サイトカインといった2次的なストレス(2nd hit)がかかることによって炎症、線維化が惹起されるといういわゆる2 hit theoryが提唱され、広く認知されている。その後の検討で、NASHの病態にインスリン抵抗性を基盤とした高血糖、高インスリン血症、高遊離脂肪酸血症に加え、脂肪細胞から分泌されるアディポカイン、腸管由来のエンドトキシン、自然免疫機構の異常などの多数の因子が酸化ストレスや小胞体ストレスなどの障害プロセスを経て、しかも相互に影響しながら複雑に病態に関与していることが明らか

かになってきた。これらの障害機序の多くは従来の1st, 2nd hitの両方に関与し、単純にまず脂肪肝ありきと説明するのは困難になってきている。とはいうものの、肝細胞の脂肪蓄積を前提とした考え方はNASHの発症機序を整理し、理解するうえで有効であることには変わりはない。すなわち、肝脂肪化を来たす病態を背景にして、肝細胞障害、炎症細胞浸潤、線維化がいかんして起こるかが問題である。

2) 肝内代謝障害と酸化ストレス

糖尿病の初期段階では血中インスリン値が高値であるにもかかわらず血糖値が正常～高値になっていることが知られており、インスリンの感受性が低下していると考えられることからインスリン抵抗性と呼称される。肥満患者では脂肪細胞から放出されるFFAが高値になっているが、FFAは肝細胞の脂肪沈着を誘導するだけではなく、ジアシルグリセロールの代謝を活発化させることによってprotein kinase C (PKC)やJun N-terminal kinase (JNK)の活性化を誘導し、IRS-1およびIRS-2の異所性セリンリン酸化を促進することによって、インスリン抵抗性を惹起する。JNKは肝細胞のアポトーシス、炎症細胞の活性化にも関与する因子であることから、JNKの活性化は肝炎への進展にも影響していると考えられる。また、FFA自体が肝細胞の脂質過酸化、小胞体ストレス、リソゾームからのカテプシンB放出を誘導し、アポトーシス、ネクローシスを引き起こすことによって肝細胞障害の原因になる。

脂質の供給が過剰になると脂質分解系も促進され、ミトコンドリアにおける β 酸化が亢進する。 β 酸化のプロセスでラジカルが誘導され、酸化ストレス亢進の原因になることがわかっている。また、ミトコンドリアはATP