

Fig. 7. Suppression of mitochondrial calcein quenching after bafilomycin by Ru360. Rat hepatocytes were loaded with rhodamine-dextran and calcein, as described in Fig. 6, and exposed to 50 nM bafilomycin (Baf) in the presence of 20 μ M Ru360. Note that in comparison to bafilomycin alone (Fig. 6B), mitochondrial calcein quenching was suppressed by Ru360. Arrows identify representative lysosomal structures. One experiment is typical of three or more replicates.

1 mM deferoxamine equivalency). The >10 kDa starch-deferoxamine only enters cells by endocytosis. Strikingly, starch-deferoxamine prevented bafilomycin-induced calcein quenching as effectively as deferoxamine (Figs. 1, 2). These findings are consistent with the conclusion that lysosomes/endosomes release chelatable iron after bafilomycin and that deferoxamine and starch-deferoxamine prevent this release by chelating the intraluminal iron store of these organelles. Indeed, after calcein loading into lysosomes, bafilomycin treatment, especially in combination with deferoxamine or starch-deferoxamine, caused unquenching of calcein fluorescence, signifying a decrease of intraluminal chelatable iron within the lysosomes (Fig. 6). Other approaches to measuring changes of intraluminal lysosomal chelatable iron, such as homogenizing hepatocytes and isolating lysosomes by density gradient centrifugation, were considered but not pursued, because chelatable iron contained in lysosomes would most likely be released before the lysosomes could be purified.

Fe²⁺/H⁺ Exchange as a Mechanism of Lysosomal Iron Release. Changes of chelatable iron also may contribute to normal physiological processes. In Kupffer cells, chelatable iron increases transiently after lipopolysaccharide stimulation, and iron chelators block nuclear factor kappa B activation and cytokine formation.⁴³⁻⁴⁵ Iron chelation also produces hypoxia inducible factor-1 α transactivation and expression of transferrin receptors.^{46,47} An important question is how intracellular iron is mobilized. Proteolysis in lysosomes and proteosomes recycles iron for biosynthetic reactions.⁴⁸ Similarly, heme oxygenase re-

leases iron as heme is degraded. Ferritin and hemosiderin store excess iron in a nonreactive highly chelated form. In plasma, transferrin binds almost all non-heme iron at two iron binding sites. Plasma transferrin is 5 to 10 μ M, and transferrin iron occupancy is approximately 30%, which translates to plasma iron of 3 to 6 μ M.⁴⁹ The endosomal/lysosomal compartment continuously receives iron by transferrin receptor-mediated endocytosis,^{50,51} but how iron is released into the cytosol for cellular needs, such as synthesis of iron-containing proteins, is not known.⁵² A membrane iron transporter, divalent metal transporter-1, mediates H⁺/Fe²⁺ symport by enterocytes across the plasma membrane and early endosomes into the cytosol and may mediate iron release from lysosomes and late endosomes.^{52,53} In our experiments, alkalinization of lysosomes/endosomes with bafilomycin caused release of chelatable iron into the cytosol without disrupting the integrity of individual lysosomes. This finding suggests that a Fe²⁺/H⁺ exchange mechanism may be important in lysosomal iron retention at low lysosomal pH and release at high lysosomal pH.

During oxidative stress and hypoxia/ischemia, lysosomes rupture in hepatocytes and other cells.^{26,48,54,55} In cell lines, lysosomal rupture is a source of iron release and consequent pro-oxidant cell damage.⁵⁶⁻⁵⁸ Lysosomal degradation also occurs in models of apoptosis to hepatocytes.⁵⁹ Overall, chelatable iron may act both as a dynamic regulator of cellular function and as a mediator of cell injury. Like the better characterized calcium ion, chelatable iron may represent both a signal regulating normal

cellular responses and an intracellular mediator of toxicity when iron homeostasis is dysregulated.

Mitochondrial Iron Uptake After Lysosomal Iron Release. Using a technique of cold-loading followed by warm incubation, we were able to load mitochondria selectively with calcein (Fig. 6). After bafilomycin treatment, mitochondrial calcein fluorescence decreased, signifying an increase of chelatable iron within the mitochondria. Both deferoxamine and starch deferoxamine suppressed mitochondrial calcein quenching after bafilomycin (Fig. 6). Thus, chelatable iron released into the cytosol by bafilomycin from lysosomes and endosomes was being taken up into mitochondria.

Previous studies show that isolated mitochondria accumulate Fe^{2+} electrogenically via the mitochondrial Ca^{2+} uniporter.⁶⁰ Fe^{3+} is not transported. We confirmed this observation in intact hepatocytes by showing that Ru360, a highly specific inhibitor of the calcium uniporter,³¹ inhibited bafilomycin-induced quenching of mitochondrial calcein fluorescence (Fig. 7). Thus, mitochondria took up at least a portion of chelatable iron released by lysosomes after bafilomycin via the calcium uniporter. In previous studies of ischemia/reperfusion injury and oxidative stress with t-BuOOH, ROS formation assessed with DCF occurred primarily within mitochondria.^{5,24} Such ROS formation promoted onset of the MPT and subsequent cell death, because mitochondrial depolarization, inner membrane permeabilization, and loss of cell viability were blocked by deferoxamine and antioxidants.^{5,24} Thus, the two hits of ROS generation and increased chelatable iron may be occurring within mitochondria to promote the MPT and cell death.

In conclusion, iron potentiates injury in a variety of diseases of the liver and other organs. Storage of chelatable iron in the lysosomal compartment and the mobilization of lysosomal iron by various stressors may be important events exacerbating hepatocellular injury. In particular, injury from oxidant stress may involve the two "hits" to mitochondria of increased $\text{O}^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2$ and increased chelatable iron to promote formation of highly reactive and toxic OH^{\bullet} . Understanding of these mechanisms may lead to new strategies to minimize iron-dependent hepatocellular injury in various liver diseases.

References

- Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43-50.
- Starke PE, Farber JL. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide: evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem* 1985;260:10099-10104.
- Kyle ME, Miccadei S, Nakae D, Farber JL. Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:889-896.
- Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1993;264:C961-C967.
- Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1997;272:C1286-C1294.
- Lemasters JJ. Rusty notions of cell injury. *J Hepatol* 2004;40:696-698.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002;65:166-176.
- Videla LA, Fernandez V, Tapia G, Varela P. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals* 2003;16:103-111.
- Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G583-G589.
- Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003;3:527-535.
- Christ WJ, Asano O, Robidoux ALC, Perez M, Wang Y, Dubuc GR, et al. E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. *Science* 1995;268:80-83.
- Swanson CA. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol* 2003;30:99-102.
- Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Hosoki Y, Saito H, et al. Iron accumulation in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(Suppl):189S-193S.
- Petersen DR. Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer. *Alcohol* 2005;35:243-249.
- Brewer GJ. Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:323-335.
- Imeryuz N, Tahan V, Sonsuz A, Eren F, Uraz S, Yuksel M, et al. Iron preloading aggravates nutritional steatohepatitis in rats by increasing apoptotic cell death. *J Hepatol* 2007;47:851-859.
- Ma Y, de GH, Liu Z, Hider RC, Petrat F. Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinone fluorescent probes. *Biochem J* 2006;395:49-55.
- Kerkweg U, Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *HEPATOLOGY* 2002;35:560-567.
- Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 2007;54:77-86.
- Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de Groot H. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol* 2004;40:607-615.
- Hochhauser E, Ben Ari Z, Pappo O, Chepurko Y, Vidne BA. TPEN attenuates hepatic apoptotic ischemia/reperfusion injury and remote early cardiac dysfunction. *Apoptosis* 2005;10:53-62.
- Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273:C1783-C1792.
- Nieminen AL, Gores GJ, Bond JM, Imberti R, Herman B, Lemasters JJ. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;115:147-155.
- Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca^{2+} overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2024-H2034.
- Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 1983;134:111-116.
- Zahrebelski G, Nieminen AL, al Ghouli K, Qian T, Herman B, Lemasters JJ. Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes: a laser scanning confocal microscopic study. *HEPATOLOGY* 1995;21:1361-1372.

27. Lemasters JJ, Trollinger DR, Qian T, Cascio WE, Ohata H. Confocal imaging of Ca²⁺, pH, electrical potential, and membrane permeability in single living cells. *Methods Enzymol* 1999;302:341-358.
28. Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik IZ. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am J Physiol* 1995;268:C1354-C1361.
29. Gagliardi S, Rees M, Farina C. Chemistry and structure activity relationships of bafilomycin A1, a potent and selective inhibitor of the vacuolar H⁺-ATPase. *Curr Med Chem* 1999;6:1197-1212.
30. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 1995;307:99-106.
31. Ying WL, Emerson J, Clarke MJ, Sanadi DR. Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry* 1991;30:4949-4952.
32. Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik IZ. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am J Physiol* 1995;268:C1354-C1361.
33. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med Res Rev* 2002;22:26-64.
34. Cederbaum AI. Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Radic Biol Med* 1989;7:559-567.
35. Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol* 2002;76:219-228.
36. Castilho RF, Meinicke AR, Almeida AM, Hermes-Lima M, Vercesi AE. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II) citrate is potentiated by Ca²⁺ and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. *Arch Biochem Biophys* 1994;308:158-163.
37. Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Gores GJ. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G947-G956.
38. Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1339-G1346.
39. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *HEPATOLOGY* 2004;40:185-194.
40. Rossi L, Lombardo MF, Ciriolo MR, Rotilio G. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem Res* 2004;29:493-504.
41. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1997;272:C1286-C1294.
42. Persson HL, Yu Z, Tirosh O, Eaton JW, Brunk UT. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1295-1305.
43. She H, Xiong S, Lin M, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H. Iron activates NF-kappaB in Kupffer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G719-G726.
44. Tsukamoto H. Iron regulation of hepatic macrophage TNFalpha expression. *Free Radic Biol Med* 2002;32:309-313.
45. Xiong S, She H, Takeuchi H, Han B, Engelhardt JF, Barton CH, et al. Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003;278:17646-17654.
46. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610-3615.
47. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002;16:1151-1162.
48. Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys* 2007;462:220-230.
49. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998;35:35-54.
50. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1111-1137.
51. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004;117:285-297.
52. Mackenzie B, Garrick MD. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G981-G986.
53. Tabuchi M, Yoshimori T, Yamaguchi K, Yoshida T, Kishi F. Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEP-2 cells. *J Biol Chem* 2000;275:22220-22228.
54. Wildenthal K, Decker RS. The role of lysosomes in the heart. *Adv Myocardiol* 1980;2:349-358.
55. Ollinger K, Brunk UT. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Biol Med* 1995;19:565-574.
56. Persson HL, Yu Z, Tirosh O, Eaton JW, Brunk UT. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1295-1305.
57. Yu Z, Persson HL, Eaton JW, Brunk UT. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1243-1252.
58. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J* 2006;273:3106-3117.
59. Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Gores GJ. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G947-G956.
60. Flatmark T, Romslo I. Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria: requirement of reducing equivalents and evidence for a unidirectional flux of Fe(II) across the inner membrane. *J Biol Chem* 1975;250:6433-6438.

脂肪肝と肝切除

池 嶋 健 一* 青 山 友 則* 渡 辺 純 夫*

索引用語：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH），メタボリックシンドローム，肝切除術，肝再生，アディポカイン

1 はじめに

近年，生活習慣の欧米化などに伴い本邦でもメタボリックシンドローム関連の諸問題がクローズアップされている。脂肪肝は従来ともすれば臨床的には取るに足らない病態と考えられてきたが，非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の疾患概念の普及につれて肝硬変から肝発癌まで見られる重要な慢性肝疾患との認識が高まりつつある。一方，本邦ではウイルス性肝炎，特にC型肝炎の蔓延による肝細胞癌の発症が多く，ラジオ波焼灼術（RFA）や経カテーテル的治療などの内科的治療が進歩した現在でも，外科的治療としての肝部分切除術は根治性の高さから依然として治療の選択肢として重要な位置を占めている。さらに，肝臓病の領域においても移植医療が推進される中，本邦では肝移植の大半が生体肝移植であることから，レシピエントのみならずドナーも肝切除術に伴うリスクを担わざるを得ない状況にある。古来，肝臓は再生能の高

い臓器の代表として知られているが，脂肪肝では肝再生不全がみられることが実験的，臨床的に明らかである。また，NASHの病態進展にも組織修復機転の障害が重要な役割を演じている可能性が示唆される。

本稿では，特に脂肪肝における肝再生不全のメカニズムに重点を置いて，最近の知見を交えて概説したい。

2 脂肪肝と肝切除術：臨床的側面

肝切除術は原発性および転移性肝癌の切除をはじめ膿瘍や嚢胞切除および外傷などで行われているが，その適応の大半は根治的肝癌治療である。肝切除術では以前より脂肪肝合併例で予後不良症例が指摘されており，特にアルコール性肝障害で術後肝再生不全が生じやすいことは認識されていた。基礎的検討でも，1950年代にはすでに脂肪肝と肝再生不全の関連について報告がみられる¹⁾。しかし，肝癌の背景の大多数はウイルス性の慢性肝疾患や肝硬変が主体であり，非アルコール

Kenichi IKEJIMA et al: Regeneration failure in fatty liver following hepatectomy

*順天堂大学医学部消化器内科 [〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1]

性脂肪肝における肝切除術の術後経過への影響についてはあまり関心が高くはなかった。しかし、先進国を中心とした肥満人口の急増に伴い、非アルコール性脂肪肝の臨床的重要性が広く認識され、脂肪肝合併症例の肝切除術における術後肝不全についても系統的に検討されるようになった。1998年Behrnsらは、脂肪沈着のない肝に対する肝切除術では術後死亡率は3%であったが、脂肪沈着30%以上の脂肪肝では14%と上昇することを報告した²⁾。またBelghitiらは脂肪肝症例での術後合併症発症率は脂肪沈着がない例に比べ約4倍になると報告している³⁾。これらの報告では脂肪肝における肝切除後の再生不全がその原因として推察されている。しかし臨床的には術後経過に伴う様々な要因があるため、術後肝不全の原因が再生不全であることを純粋に証明することは困難であることが多い。

肝移植領域では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、特にprimary non function (PNF)との関連が注目され⁴⁾、高度脂肪肝の場合にはPNF発症リスクから移植の絶対禁忌とされている。本邦でも成人生体肝移植件数は2000年では188件にとどまっていたが、2005年には442件と著増しており⁵⁾、脂肪肝と移植後肝不全の関連が問題視されている。食生活の欧米化などに伴いドナー対象者にも脂肪肝が見られることは珍しくなく、本邦でもドナー死亡例の背景因子としてNASHの関与が報告された⁶⁾。脂肪肝グラフトで肝不全が生じやすい原因としては、主に肝脂肪化による虚血再灌流障害の誘発および肝再生不全が考えられている⁷⁾。生体、死体および脳死にかかわらず肝移植術では虚血状態から再灌流に至るステップは不可避であり、脂肪肝グラフトでは脂肪沈着に

よる微小循環障害、細胞小器官の圧排、ミトコンドリア機能異常による酸化ストレスの増加などにより虚血再灌流障害が惹起されやすく、そのため肝細胞障害が起こりPNFに至ると考えられる。

3 NASHの病態進展と肝再生不全

1980年にLudwigらが報告したNASHは、非飲酒者であるにもかかわらず肝組織像がアルコール性肝炎に極めて類似した像を呈する疾患である⁸⁾。その病態機序としてtwo-hit theoryが提唱されている⁹⁾。これは肥満に伴う脂質代謝異常、インスリン抵抗性やアディポサイトカイン発現異常が肝への過剰な脂肪蓄積を引き起こした後、酸化ストレスや脂質過酸化を誘発し炎症細胞浸潤を惹起させ脂肪性肝炎、肝線維化さらには肝硬変へと進展するという説である。一方、肝臓は再生能力を有する臓器であり炎症や障害に対して再生機構が修復機転の重要な役割を果たしていることは周知のとおりである。メタボリックシンドロームに伴うさまざまな因子が、炎症やストレスなどの攻撃因子を誘導するとともに、それらに対する防御機構の破綻が病態進展に影響していると考えられている。NASHと再生不全の関係については、欧米だけでなく本邦でもその関連が示唆されていたものの、上述の如く最近の肝移植ドナー死亡例の報告で一躍注目された⁶⁾。この症例ではretrospectiveな検討ではあるが摘出肝がすでにBrunt分類stage 2 grade 1のNASHであったことに加えて、移植後6カ月にはレシピエントもstage 4 grade 3の肝硬変の状態となっており、移植片においてもNASH肝組織の再生不全が示唆された。一方、NASH肝不全患者に対して肝移植施行6カ月後、体重増加とともに再びNASHを発症したとの報告もあり興味深

表1 近年の脂肪肝と肝再生に関する主な報告

報告者	報告年	モデル動物	検証方法	再生不全	原因
Selzner et al ¹²⁾	2000	Zucker ラット	70% 肝切除	あり	IL-6 シグナル異常?
Yang et al ¹³⁾	2001	ob/ob マウス	70% 肝切除	あり	JAK/STAT系異常, 肝組織中ATP低下
Picard et al ¹⁴⁾	2002	orotic acid 投与ラット MCD食投与ラット Zucker ラット	70% 肝切除	Zucker ラットのみ あり	steatosisではなく レプチン受容体 機能異常
Leclercq et al ¹⁵⁾	2003	ob/ob マウス	四塩化炭素 投与	あり	レプチン欠損による TNF低下
Yamauchi et al ¹⁶⁾	2003	db/db マウス	70% 肝切除	あり	steatosis ?
DeAngelis et al ¹⁷⁾	2005	21% 高脂肪食投与 マウス	70% 肝切除	あり	I κ B α 発現増強による NF κ B阻害
Veteläinen et al ¹⁸⁾	2007	MCD食投与ラット	70% 肝切除	あり	脂質過酸化, Kupffer cell 機能異常

い¹⁰⁾。また、RichardsonらはNASH患者の肝病理組織においてstageと比例して肝細胞の細胞回転停止を示す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¹¹⁾。このようにNASHと再生不全は密接な関係があると考えられている一方で、そのメカニズムには単なる脂肪沈着だけではない肥満やインスリン抵抗性を基盤とした背景因子が深く関与している可能性が示唆されている。

4

脂肪肝動物モデルにおける再生不全機序の解明

前述のとおり、修復機転の障害という観点から脂肪肝モデル動物に対する肝再生の検証について近年だけでもさまざまな報告がされている(表1)。Yangらは、ob/obマウスでは肝切除後再生不全を認め、かつ術後36時間以内に28%が死亡すると報告した¹³⁾。その

メカニズムとして、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、その結果cyclinD1の誘導阻害を生じ再生不全に至る道筋が考えられている。また、死亡率の上昇は肝切除後のphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)発現減弱による糖新生の低下により低血糖を誘発したことが原因であると考察している。しかし、ob/obマウスの特徴であるレプチン欠損そのものと再生不全との直接的な関係については言及されていない。一方、Leclercqらはob/obマウスに四塩化炭素を投与しその後の肝再生について検討している¹⁵⁾。ob/obマウスでは四塩化炭素投与後の肝再生不全を認めたが、再生の初期シグナルとして重要なTNF- α がコントロールと比較し低下した一方で、STAT3のDNA結合能の増強を認めている。これらの変化がレプチン補充によりコントロールと同

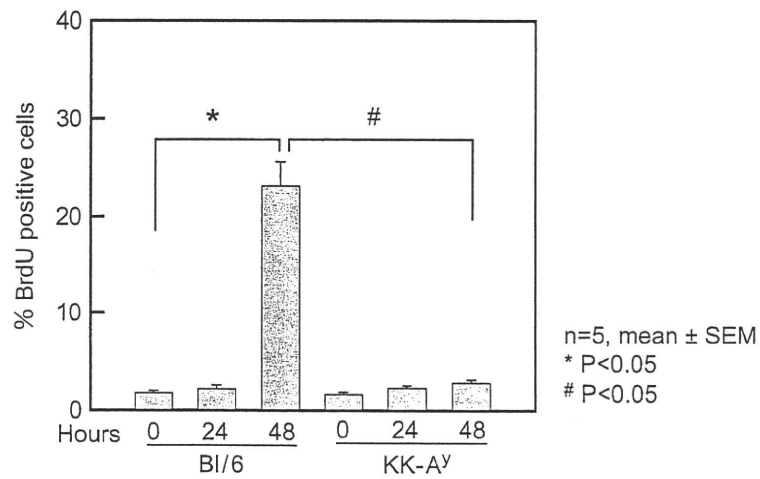
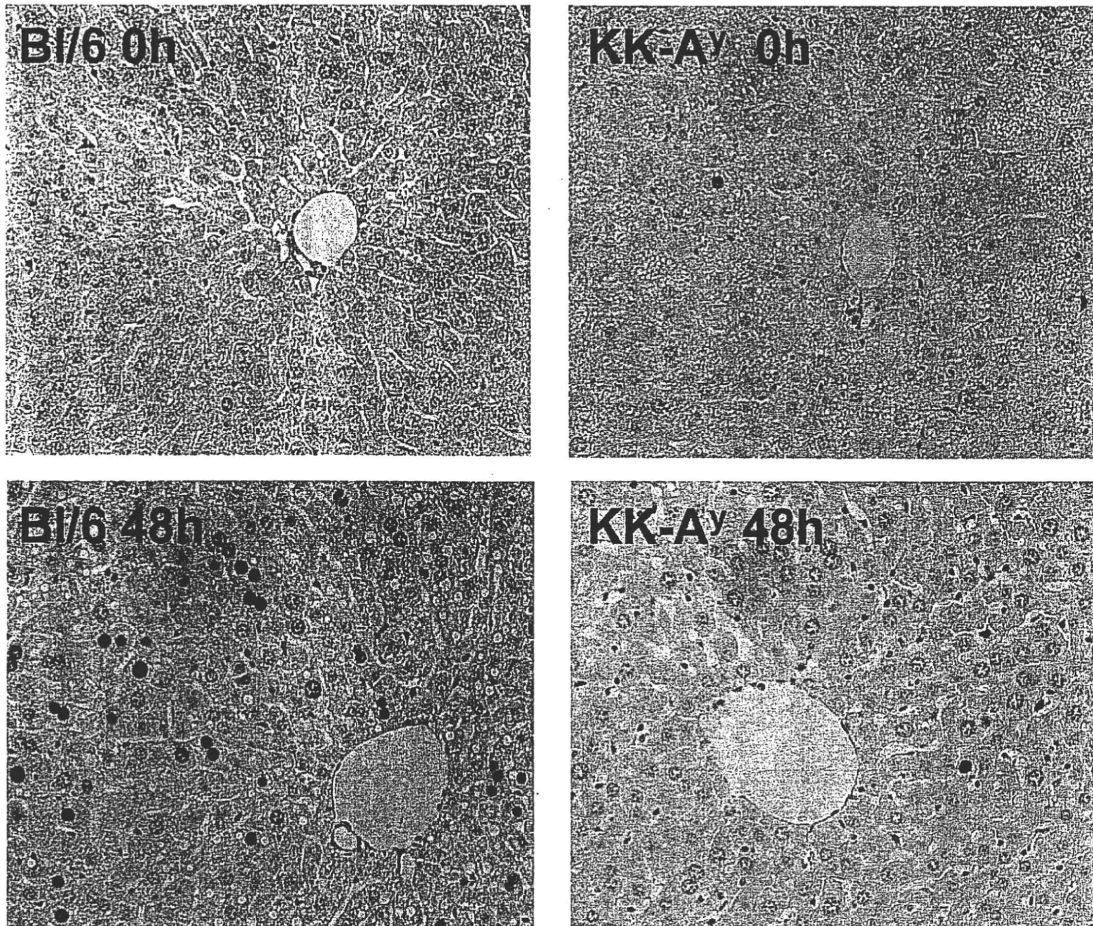


図1 KK-Ayマウス70%肝切除後の肝細胞へのBrdU摂取

様のパターンに改善し、さらに低用量のTNF- α 投与でも同様な改善が得られることから、肝脂肪化ではなくレプチンが再生過程におけるTNF- α の反応性に影響を及ぼし再生不全を惹起すると考えられている。レプチンについては、レプチン受容体異常による脂

肪肝モデルであるdb/dbマウス¹⁶⁾およびZuckerラット¹²⁾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。また、DeAngelisらは21%高脂肪食を負荷した通常のC57BI/6マウスでも肝切除後に再生不全を

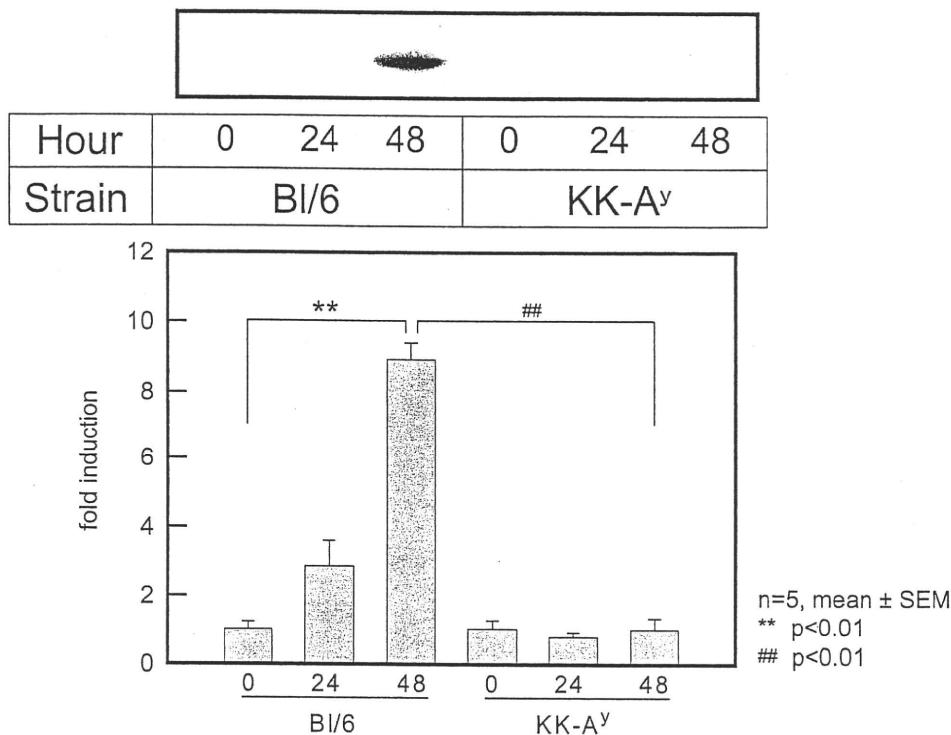


図2 KK-A^yマウス70%肝切除後の cyclin D1発現

認めること報告した¹⁷⁾. このマウスでは肝切除前よりI κ B α の発現増強を認め、これが切除後のNF- κ B活性を阻害しアポトーシス誘導にシフトしたことが再生不全の機序と考えられた. このように、脂肪肝を有するモデルで肝再生不全を認め、それが脂肪性肝炎進展への一因である可能性と考えられることは一致しているものの、その機序としては脂肪化そのものによる再生シグナルの阻害またはアポトーシスの誘導、あるいは脂肪化ではないアディポカイン発現バランスをはじめとする背景因子が原因と考えられるなど議論が分かれている.

5 KK-A^yマウスにおける肝再生不全

このように脂肪肝の再生不全に対する検討はレプチンやレプチン受容体の遺伝子変異を伴うモデルで多く報告があるものの、通常臨床的にメタボリックシンドロームの病態で観察されるのはレプチン受容体異常を伴わない

高レプチン血症、すなわちレプチン抵抗性の状態である. そこで、私たちの研究室ではヒトのメタボリックシンドロームにより近似した表現型を呈するKK-A^yマウスを用いて、脂肪性肝炎の病態解析を行っている. KK-A^yマウスは肥満や2型糖尿病を自然発症するKKマウスに肥満遺伝子A^yを導入することにより作成されたマウスであり、高度な肥満およびインスリン抵抗性を示すとともに、高レプチン血症や低アディポネクチン血症など、メタボリックシンドロームのヒトと同様のアディポカイン発現パターンを呈する. また通常の食餌での飼育でも自然に軽度の脂肪性肝炎を発症し、さらにメチオニン・コリン欠乏(MCD)食の負荷で顕著な脂肪性肝炎の増悪を認める¹⁹⁾.

そこで、今回私たちはこのKK-A^yマウスにおける肝再生機転の検証を行った. KK-A^yマウスに70%肝切除を行うと著明な肝再生不全を呈し(図1)、肝切除後にほとんどcyclin

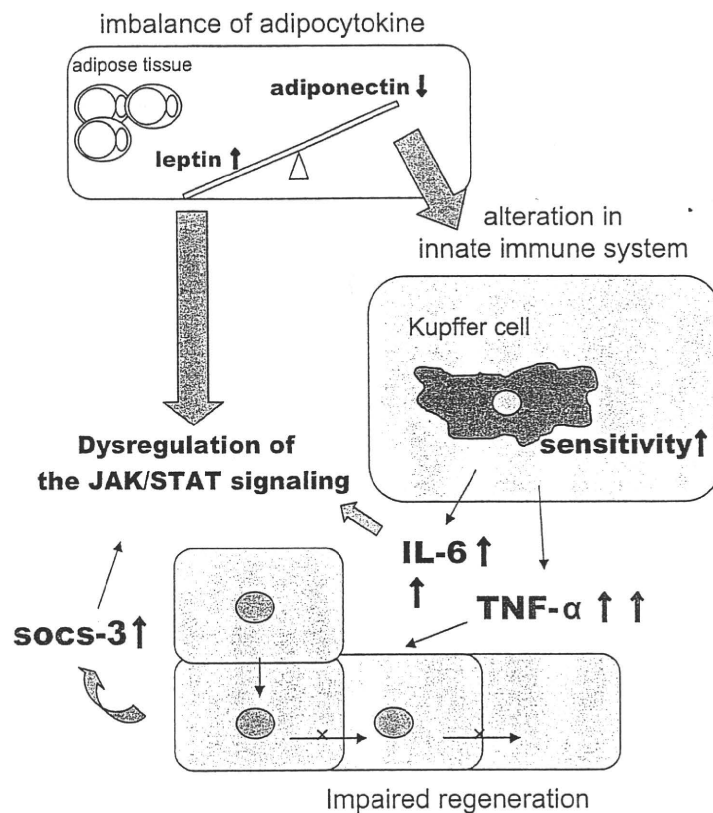


図3 Working Hypothesis

D1の発現誘導を認めず(図2), 48時間以内に約半数が死亡した. KK-A^yマウスではコントロールのC57Bl/6マウスと比較して肝切除後に肝組織中のTNF- α mRNAおよび血中IL-6とレプチン値の著明な上昇を認め, 肝組織中でのSTAT-3高リン酸化状態が遷延した. このSTAT-3の高リン酸化状態の持続がcyclinD1の発現抑制に関与している可能性が考えられた. 一方, KK-A^yマウスでは低アディポネクチン血症に伴いLPS投与後のTNF- α 誘導が増強していることが報告されており²⁰⁾, KK-A^yマウスで肝切除後に生じるTNF- α mRNAやIL-6の異常な上昇にも, 低アディポネクチン血症によるKupffer細胞の活性化異常が影響している可能性が示唆された(図3). なお, KK-A^yマウスでは肝への脂肪沈着を認めるものの, レプチン・レプチン受容体異常モデルほど顕著ではないが, それ

にもかかわらず, ほぼ同様に肝再生不全を呈する点も興味深い.

6 おわりに

脂肪肝における肝切除は, 近年の生体肝移植数の増加に伴うドナー対象者の選択において問題視される一方で, たとえ脂肪肝を有していても少ないドナー対象者からいかに有効に安全に肝を採取し, レシピエントを救命するかが課題となっている. また, 脂肪性肝炎の病態形成には, 脂肪肝を誘発する代謝的背景因子が肝再生不全を惹起しているという問題を良く認識する必要がある. 脂肪肝や脂肪性肝炎の治療として誘因や増悪因子の制御が重要であることはいうまでもないが, 組織損傷修復機構の異常をいかに是正していくかという観点からも, より質の高い治療方法を模索していくことが望まれる.

文 献

- 1) Sutherland AM : Regeneration in the fatty liver of the rat after partial hepatectomy. *J Pathol Bacteriol* 71 : 403-408, 1956
- 2) Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF et al : Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 2 : 292-298, 1998
- 3) Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S et al : Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 191 : 38-46, 2000
- 4) Adam R, Reynes M, Johann M et al : The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 23 : 1538-1540, 1991
- 5) 日本肝移植研究会 : 肝移植症例登録報告. *移植* 41 : 599-608, 2006
- 6) Yamamoto K, Takada Y, Fujimoto Y et al : Nonalcoholic steatohepatitis in donors for living donor liver transplantation. *Transplantation* 15 : 257-262, 2007
- 7) Clavien PA, Harvey PR, Strassberg SM : Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: an overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53 : 957-978, 1992
- 8) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB et al : Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55 : 434-438, 1980
- 9) Day CP, James OF : Steatohepatitis: a tale of two "hits" ? *Gastroenterology* 114 : 843-845, 1998
- 10) Carson K, Washington MK, Treem WR et al : Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 3 : 174-176, 1997
- 11) Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE et al : Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 133 : 80-90, 2007
- 12) 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
- 13) Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK et al : Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* 34 : 694-706, 2001
- 14) Picard C, Lambotte L, Starkel P et al : Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 36 : 645-652, 2002
- 15) Leclercq IA, Field J, Farrell GC : Leptin-specific mechanism for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 124 : 1451-1464, 2003
- 16) Yamauchi H, Uetsuka K, Okada T et al : Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Exp Toxicol Pathol* 54 : 281-286, 2003
- 17) DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R et al : A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology* 42 : 1148-1157, 2005
- 18) Veteläinen R, van Vliet AK, van Gulik TM : Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* 245 : 44-50, 2007
- 19) Okumura K, Ikejima K, Kon K et al : Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-Ay mice. *Hepatol Res* 36 : 217-228, 2006
- 20) Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H et al : Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 40 : 177-184, 2004

* * *

特集II

鉄代謝と消化器疾患

酸化ストレスに伴う肝細胞障害における鉄イオンの細胞内動態と細胞死への影響*

内山 明**
池嶋 健一**
今 一義**
渡辺 純夫**

Key Words : lysosome, ROS, MPT, iron

はじめに

近年, メタボリックシンドロームに伴う肝病変としての非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis : NASH)が注目されており, 脂肪肝に伴う脂肪酸酸化やミトコンドリア機能異常などに起因する活性酸素種(ROS)の増大がその病態に深く関与していると考えられている。さらに, アルコール性肝障害やC型慢性肝炎の病態進展にも酸化ストレスがきわめて重要な役割を演じていると考えられている¹⁾²⁾。肝細胞では, 鉄は細胞膜上のトランスフェリン受容体を介してエンドゾームからリソソーム内に取り込まれ, 鉄を維持するためにリソソーム内が酸性に保たれていることが重要であると考えられている³⁾。リソソーム膜上のvacuolar proton-pumpは, protonをATP依存性にリソソーム内に取り込むことにより, リソソーム内の酸性を維持している⁴⁾。これまで肝細胞内において, 鉄過剰状態が酸化ストレスに伴う肝障害を増悪させる要因となることは報告されているが⁵⁾⁶⁾, 肝細胞障害の過程における鉄イオンの細胞内動態, また, 細胞死への影響についてはほとんど知見がない。そこで今回われわれは, 肝細胞障害において, 酸化ストレスに対する感受性

の亢進が病態増悪に関与している可能性を考え, 酸化ストレス感受性の亢進における肝細胞内の局在変化と2価鉄の役割について, また, 種々の蛍光指示薬を使い細胞内小器官のイオン濃度や膜電位変化を共焦点レーザー顕微鏡を用い詳細に解析した。

方法

1. 初代培養肝細胞の作製

肝細胞における鉄イオンの細胞内動態また細胞死への影響を調べるために, collagenase比重遠心法を用いてC3Heb/HeJ mouse・Sprague-Dawley ratから単離した初代培養肝細胞を用いた。単離した肝細胞は10%FBSを添加したWaymouth's Mediumで培養し実験に供した⁷⁾。

2. 細胞質内の2価鉄イオン濃度測定

単離培養6時間後の肝細胞をcalcein-AM(1 μM, Molecular Probe/Invitrogen), (37°C, 20 min)で染色し, 蛍光減弱を共焦点型レーザー顕微鏡を用いて可視化した。Bafilomycin (BAF, vacuolar proton-pumping ATPase阻害剤, 50 nM)を投与後, calceinの蛍光減弱を測定し細胞質内の2価鉄イオンの濃度変化を評価した。

3. ミトコンドリア内の2価鉄イオン濃度測定(cold-loading and warm-incubation法)

単離培養6時間後のラット肝細胞を, calcein-

* Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury.

** Akira UCHIYAMA, M.D., Kenichi IKEJIMA, M.D., Kazuyoshi KON, M.D. & Sumio WATANABE, M.D.: 順天堂大学医学部消化器内科(〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1); Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, JAPAN

AMで4℃で1時間染色したのち、37℃で12時間培養しミトコンドリアのみcalcein蛍光で染色し、その蛍光減弱を共焦点型レーザー顕微鏡を用いて可視化した。BAF(50 nM)を投与後、calceinの蛍光減弱を測定しミトコンドリア内の2価鉄イオンの濃度変化を評価した⁹⁾。

4. ミトコンドリア膜の透過性の変化(MPT)の評価

肝細胞をtetramethylrhodamine methylester (TMRM, 100 nM)で染色し、共焦点型レーザー顕微鏡を用いて可視化した。

5. 肝細胞ネクロシスと肝細胞内ROSの産生の評価

単離培養4時間後の肝細胞の培養液中に30 μ Mのpropidium iodide (PI, Sigma, St.Louis, MO)添加し、蛍光増強をマイクロプレートリーダーで経時的に測定し、ネクロシスを評価した。また、5-(and-6)-chlormethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCF, MolecularProbe, Eugene, OR)にて染色し、蛍光増強を同様にマイクロプレートリーダーで経時的に測定し、ROSの産生を判定した⁹⁾¹⁰⁾。

結 果

共焦点型レーザー顕微鏡による観察では、BAF投与により2時間後には細胞質内のcalceinの減弱を認めた。また、この現象は、鉄キレート剤(desferal)にて抑制された(図1)。BAF単剤またt-BuOOH単剤(20 μ M)では有意な変化はなかったが、BAFで前処置を行いt-BuOOHを投与したところ、2時間後には58%がネクロシスをきたした(図2)。また、同様に共焦点型レーザー顕微鏡にてミトコンドリア内膜のポテンシャルを評価したところ、BAF単剤群およびt-BuOOH単剤群では、MPTの発生はみられなかったが、BAF+t-BuOOH併用群では、1時間後にはミトコンドリア膜の透過性の変化(mitochondrial permeability transition : MPT)の発生を認め細胞死に至った。ROSの産生増加を測定したところ、t-BuOOH単剤群では、軽度のROSの産生を認めたが、BAF+t-BuOOH群では、ROSの産生が著明に亢進した(図3)。

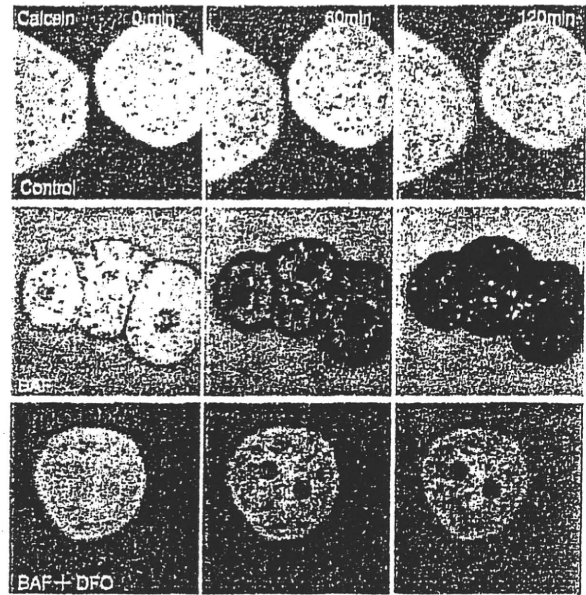


図1 Bafilomycin(BAF)による細胞質内calceinの蛍光減弱および鉄キレート剤(DFO)による抑制

ミトコンドリア内の鉄イオン濃度変化を調べるために、cold-loading and warm-incubation法を用いラット肝細胞のミトコンドリアをcalceinで染色したところ、BAF投与後、ミトコンドリア内のcalceinは減弱を認めた。また、Ru360(ミトコンドリア膜上のcalcium uniporter阻害剤)にて前処置を行うと、BAFによるミトコンドリア内のcalceinの減弱は抑制された(図4)。

考 察

以前よりC型慢性肝炎、アルコール性肝障害およびNASHといった慢性肝疾患の増悪因子として、鉄の重要性は示唆されている。遊離鉄は容易に電子の受け渡しを起こし、Fenton反応($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH \cdot + OH^-$)を介して、ヒドロキシラジカル($OH \cdot$)を産生する触媒として働く。ラジカルの産生はMPTを惹起して、チトクロームcの遊離を介してアポトーシスを誘導すると考えているが²⁾¹¹⁾、2価鉄自体もMPTをひき起こす¹⁾。本研究において、われわれは種々の蛍光指示薬を用い、細胞内小器官のイオン濃度や膜電位変化について、共焦点レーザー顕微鏡による詳細な解析を行った。Calcein蛍光は2価の金属イオンにより減弱する特性を有しており¹²⁾、その特徴を用いて細胞質内の金属イオンの濃度変化を調べた。リソソーム膜上のproton-ATPase阻

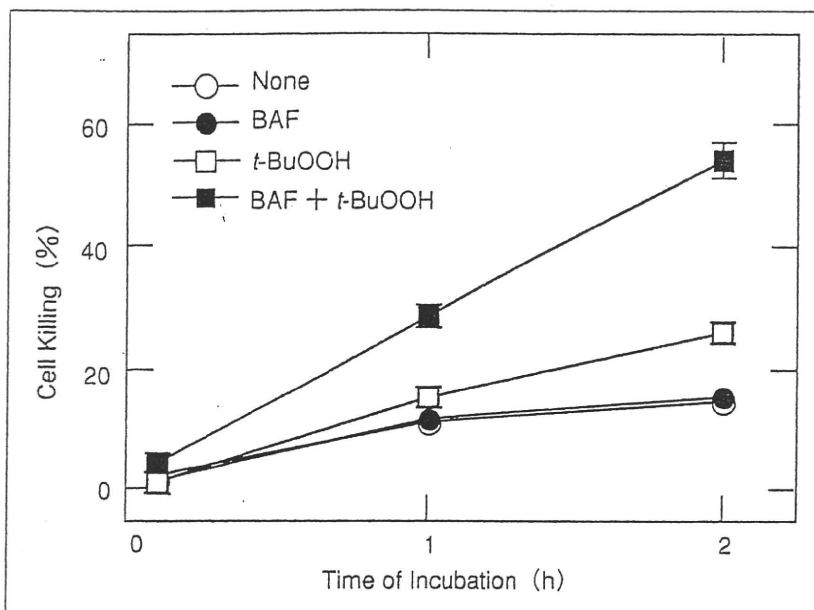


図2 Bafilomycin(BAF)とt-BuOOH併用による肝細胞ネクロシスの誘導

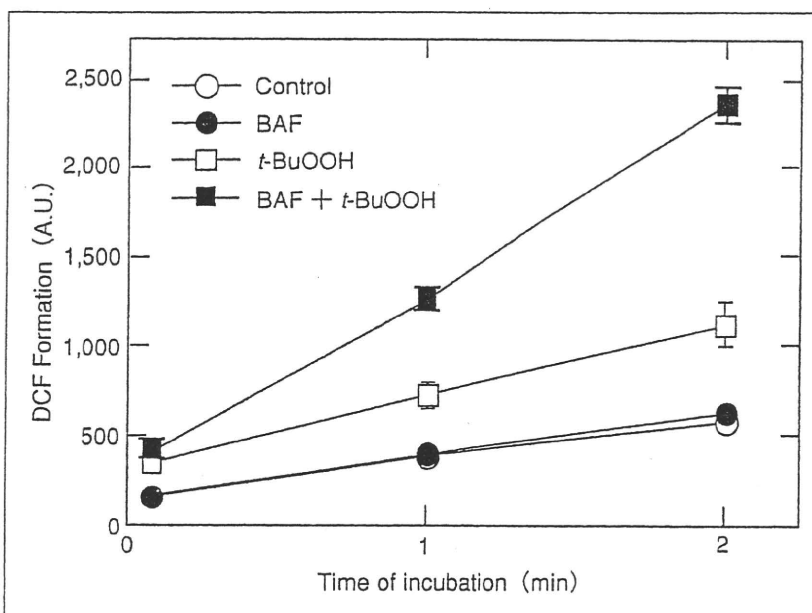


図3 Bafilomycin(BAF)とt-BuOOH併用によるROSの産生

害剤であるBAFを投与したところ、細胞質内の calcien 蛍光は減弱(図 1)、細胞質内の 2 価の金属イオン濃度の上昇が示唆された。さらに鉄キレート剤である desferal にてこの蛍光減弱は抑制された。つまり、BAF 投与によりリソソームのアルカリ化を生じ、2 価鉄イオンがリソソームより細胞質内に遊離したと考えられた。さらに、単離培養した肝細胞に t-BuOOH と BAF を用いて MPT、細胞死また ROS の産生について調べた。t-BuOOH はミトコンドリア内の NADPH または

glutathione の低下をもたらし、ミトコンドリア内の ROS の産生をひき起こす¹³⁾。また、t-BuOOH (> 100 μM) では、MPT を起こし細胞死に至ることが報告されている¹⁴⁾。そこで、リソソームより遊離した 2 価鉄イオンの役割を調べるために、低濃度の t-BuOOH (25 μM) を用いて実験を行った。BAF 単剤ならびに t-BuOOH 単剤では有意差な ROS の産生の亢進や細胞死は認められないが、BAF と併用することにより著明な ROS の感受性の亢進を認め細胞死をきたした(図 2, 3)。2 価鉄イオ

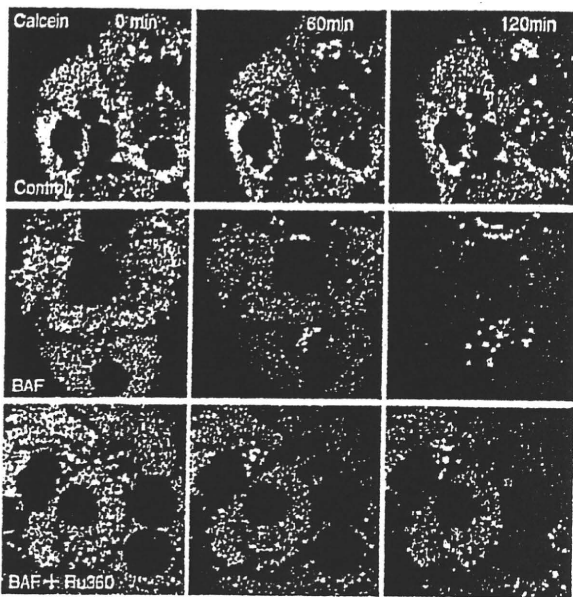


図4 Bafilomycin(BAF)によるミトコンドリア内のcalceinの蛍光減弱とcalcium uniporter拮抗剤(Ru360)による抑制

ンのミトコンドリアへの流入経路を調べるため、cold-loading warm-incubation法によりミトコンドリアをcalceinで染色し、鉄イオン濃度変化について評価した。BAF投与によりミトコンドリア内のcalcein蛍光は減弱し(図4)、ミトコンドリア内の2価鉄イオン濃度の上昇が示唆された。また、この現象はミトコンドリア膜上のcalcium

uniporter拮抗剤であるRu360で前処置することにより抑制され(図4)、リソソームより細胞質内へ遊離された2価鉄イオンは、ミトコンドリア膜上のcalcium uniporterを介した経路でミトコンドリア内に流入したと考えられた。肝細胞質内に2価鉄イオンが増加した状況下では酸化ストレス負荷に対する感受性が亢進し、MPTを生じ肝障害に至るメカニズムが示唆された(図5)。

おわりに

C型慢性肝炎、NASHやアルコール性肝障害などの慢性肝疾患において、鉄の沈着また過剰鉄は、酸化ストレスを上昇させることにより病態を増悪させる。本研究により、酸化ストレスによる肝障害において、リソソームより遊離された鉄はROSの感受性の亢進をもたらし、病態増悪のメカニズムに関与している可能性が示された。

文 献

- 1) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, et al. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. J Hepatol 2004 ; 40(4) : 607-15.
- 2) Lemasters JJ. Rusty notions of cell injury. J Hepatol 2004 ; 40(4) : 696-8.

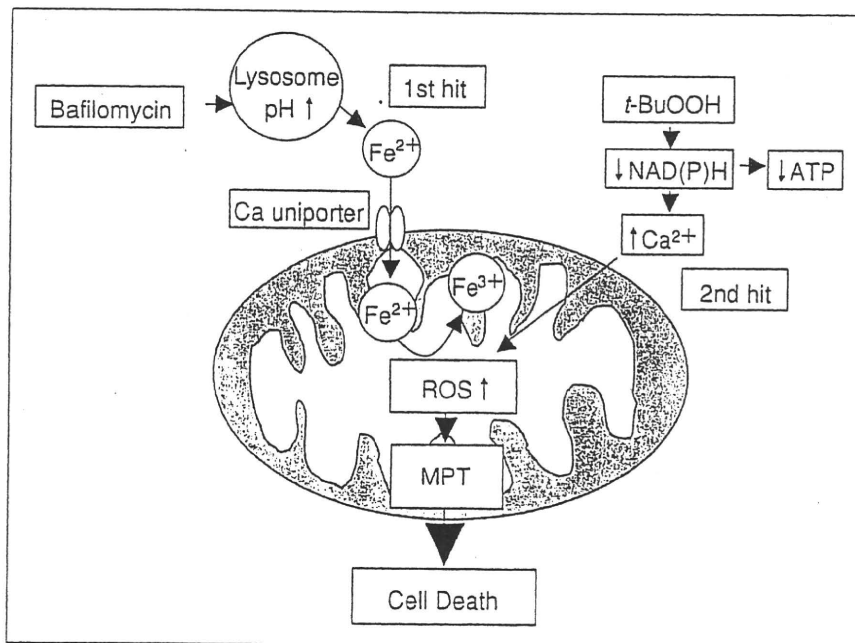


図5 リソソームからの2価鉄の遊離およびミトコンドリアへの流入と酸化ストレスによる細胞死誘導メカニズム

- 3) Ma Y, de GH, Liu Z, et al. Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinone fluorescent probes. *Biochem J* 2006 ; 395(1) : 49-55.
- 4) Gagliardi S, Rees M, Farina C. Chemistry and structure activity relationships of bafilomycin A1, a potent and selective inhibitor of the vacuolar H⁺-ATPase. *Curr Med Chem* 1999 ; 6(12) : 1197-212.
- 5) Kerkweg U, Jacob M, de GH, et al. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells : contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 2003 ; 76(3) : 501-8.
- 6) Rauen U, Kerkweg U, de GH. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes : a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 2007 ; 54(1) : 77-86.
- 7) Qian T, Nieminen AL, Herman B, et al. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997 ; 273(6 Pt 1) : C1783-92.
- 8) Lemasters JJ, Trollinger DR, Oian T, et al. Confocal imaging of Ca²⁺, pH, electrical potential, and membrane permeability in single living cells. *Methods Enzymol* 1999 ; 302 : 341-58.
- 9) Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 ; 290(5) : H2024-34.
- 10) Nieminen AL, Gores GJ, Bond JM, et al. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992 ; 115(2) : 147-55.
- 11) Kon K, Kim JS, Jaeschke H, et al. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004 ; 40(5) : 1170-9.
- 12) Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, et al. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am J Physiol* 1995 ; 268(6 Pt 1) : C1354-61.
- 13) Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, et al. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 1995 ; 307 (Pt 1) : 99-106.
- 14) Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, et al. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH : NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1997 ; 272(4 Pt 1) : C1286-94.

* * *

肥満症・メタボリックシンドロームの治療・管理(合併症の診断と治療)

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)

池嶋健一* 渡辺純夫**

順天堂大学医学部消化器内科学 *准教授 **教授

SUMMARY

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)はメタボリックシンドロームに伴う進行性の肝病変として注目されている。NASHの病態形成にはインスリン抵抗性を基盤として生じるエネルギー過負荷による酸化ストレスや、自然免疫系の失調に伴う炎症性サイトカイン、アディポカイン発現バランスの異常が深く寄与している。NASHの治療は食事・運動療法による肥満の是正に加え、インスリン抵抗性改善薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬などが有用である。

はじめに

現代の欧米やわが国における一般生活習慣は、過食や運動不足に伴う代謝性の変化をもたらし、肥満・糖尿病・脂質代謝異常・高血圧の罹患率が急増している。これらの代謝性素因の重複により動脈硬化性疾患のリスクが高まることから、メタボリックシンドロームの概念が提唱されており、その基盤病態としてはインスリン抵抗性がとくに重要視されている。肝臓は全身の代謝の要としてきわめて重要な役割を果たしている臓器の一つであるが、肥満者に認められる代謝変化の一表現型

としての脂肪肝は従来、良性疾患として軽視される向きがあった。しかし近年、進行性の肝病変である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH: nonalcoholic steatohepatitis)の疾患概念が広く認識されるとともに、それを包含した非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD: nonalcoholic fatty liver diseases)全体が注目されている。本稿では、メタボリックシンドロームに伴うNAFLD・NASHの病態と診断・治療の実際について概説する。

I. 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態

① なぜ肝細胞に脂肪が溜まるのか: NAFLDの発症とインスリン抵抗性

本来、肝臓は糖、タンパク、脂質代謝をはじめとする種々の代謝における中心的臓器であり、全身での需要に見合った栄養素の供給をバランスよく行うという重要な役割を担っている。とくに血糖調節は生命維持の根幹に位置する機能の一つであるが、肝細胞は糖をグリコーゲンとして貯蔵し、必要に応じてグルコースに変換して血中に放出する。しかし、グリコーゲンとしての貯蔵には量的限界

があり、より多量の栄養素を効率よく貯蔵する手段として中性脂肪への変換が行われる。すなわち、肝細胞への脂質の貯留それ自体は必ずしも病的反応とは限らず、むしろ生理的な環境適応反応の一環として位置づけられる。しかし一方、今日の欧米や日本などの生活環境では、過栄養や運動量の低下に伴い脂質の過剰蓄積が生じ、肥満症の部分症としての脂肪肝や脂肪性肝炎が問題になることが多い。

肝細胞への脂肪沈着は、食事由来の糖質や脂質

に加えて、内臓脂肪蓄積とも密接に関連している。肝臓に過剰な糖質・脂質・遊離脂肪酸が流入し、肝細胞のミトコンドリアにおける β 酸化やVLDLを合成して分泌するなどの脂質代謝能を上回ると肝臓に脂肪が沈着する。過剰な糖質は脂質合成転写因子SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein)の活性化を介して肝細胞の脂肪集積を促進し、その一方SREBP-1cはインスリン受容体の基質であるIRS-2のリン酸化を抑制することによりインスリンの作用を阻害する。また、遊離脂肪酸・TNF- α ・レジスチンなどはいずれもインスリン抵抗性を増悪させ、さらにインスリン感受性を改善させるアディポネクチンの内臓脂肪細胞からの分泌も肥満に伴い低下するため、インスリン抵抗性が一層増強して肝臓に脂肪が蓄積されやすくなる(図1)。つまり、インスリン抵抗性や肝脂肪化を惹起するようなさまざまな背景因子

がNASHの形成において重要な役割を担っていると考えられる。

2) NASHの病態進展メカニズム

a. Two-hit theory

NASH進展にかかわる病態生理の作業仮説としては、Dayが提唱したいわゆる“two hit theory”¹⁾が広く認知されている(図2)。これは、NASHの病態を脂肪肝形成のステップと、そこに炎症および線維化が加わって肝病変が進行するステップの2段階に分けて考えようとする見方である。すなわち、肥満やインスリン抵抗性などによって肝細胞に脂肪沈着が生じるプロセスを“first hit”とし、それをベースに酸化ストレスや種々の炎症性サイトカイン・アディポカイン、遊離脂肪酸などの負荷が加わって肝病態が進展するプロセスを“second hit”と定義づけている。この図式はわかりやすいも

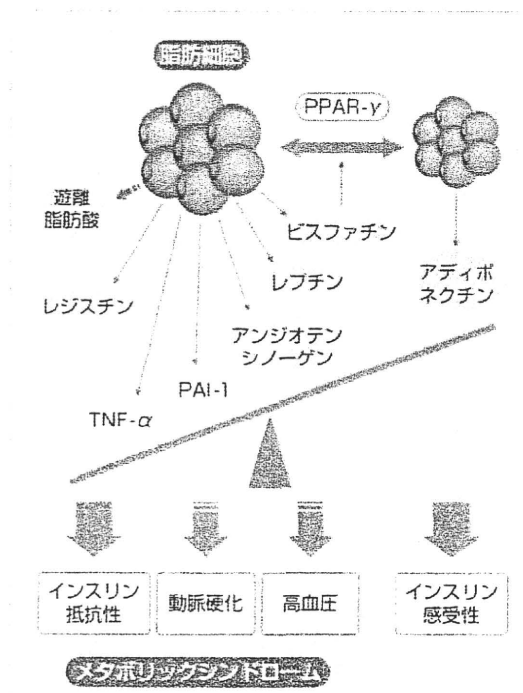


図1 アディポカインのバランス破綻とインスリン抵抗性

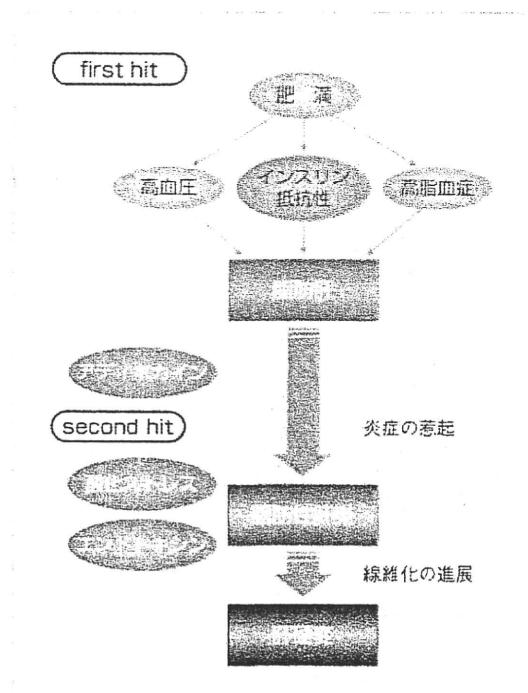


図2 NASHの発症と進展: two-hitモデル

の、実際にはfirst hitとsecond hitを明確に分けることは難しく、むしろ炎症や線維化が進展しやすい遺伝的・環境的背景があるところに過食や運動不足に伴う代謝負荷がかかるとNASHを発症するとも考えられる。

b. 酸化ストレスの重要性

活性酸素種(ROS)や一酸化窒素(NO)由来のペルオキシナイトライトなどのフリーラジカルは生体防御機構をはじめとする種々の生理的現象において重要な役割を果たしているが、過剰な酸化ストレスは細胞・組織傷害性に作用する。NASHにおいても、エネルギー過負荷や自然免疫系賦活に伴い、さまざまな形で酸化ストレスが生じて病態進展に深く関与している。ミトコンドリア機能異常に伴う電子伝達系からの電子漏出や、ミクロソーム代謝系のシトクロームP450(CYP)発現誘導による肝細胞内でのROS過剰産生に加えて、Kupffer細胞や浸潤してきた好中球などの炎症細胞からはNADPHオキシダーゼ由来のヒドロキシラジカルが産生・放出され、細胞障害性に作用している。また、活性化星細胞もNADPHオキシダーゼを発現してROSを産生しており、外因性ラジカルとともにオートクリン作用も相まって、細胞増殖やマトリックス産生を亢進させる刺激になっている。さらに、酸化ストレスがDNA障害

などを介して高発癌化状態の形成に寄与していることも十分に考えられる。

c. 自然免疫系と炎症性サイトカイン・アディポカインの関与

アルコール性肝障害と同様に、腸内細菌由来のエンドトキシンに代表される自然免疫系賦活物質がKupffer細胞や肝内リンパ球を活性化して、炎症性サイトカインやプロスタノイド、フリーラジカルなど種々のメディエーターの産生亢進をきたすことも、NASHの病態形成にきわめて重要である。また、肝臓においては肝線維化の際に活性化してコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生する肝星細胞がレプチンを産生することが知られており、レプチンが肝の炎症およびインスリン抵抗性を調節する一方、Kupffer細胞や類洞内皮細胞からのTGF- β の産生誘導や星細胞の増殖促進およびアポトーシス抑制などを介して肝線維化を促進する因子として作用する²⁾。アディポネクチンはインスリン抵抗性のメカニズムに密接な関連があることからNASHの病態にも寄与していることが容易に推測されるが、最近、アディポネクチンが肝の炎症や線維化を直接制御することが示唆され、肥満に伴う低アディポネクチン血症もNASHの発症・進展の危険因子として重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

II. NASH診断のポイント

1) NAFLDの診断

脂肪肝は、急性妊娠性脂肪肝やReye症候群などの特殊かつ重篤な病態を除けば、全身倦怠感などの不定愁訴以外にはほとんど自覚症状はない。しかし、脂肪肝の成因に関する鑑別では問診の果たす役割がきわめて大きく、併存する疾患や既往歴、治療薬の有無、飲酒を含む嗜好品の使用状況や家族歴などについて詳細に聴取する必要がある。

とくにアルコール性か非アルコール性かの区別は、詳細な問診に拠る以外に正確な鑑別法はない。わが国では一般的に一日当たりのアルコール摂取量が20g以下ないしは日本酒換算で1合以内が適正飲酒量とされており、その範囲までの飲酒は非アルコール性に含めるのが通常である。ちなみに欧米では40g/日程度の飲酒まで非アルコール性とみなされていることが多い。また、過去の飲酒につ

いても正確に聴取する必要があり、積算飲酒量が一つの日安になる。過剰飲酒の生物学的モニタリングとしては血清 γ -GTP値に加えて、平均赤血球容積(MCV)の増大および血清トランスフェリン微小変異(carbohydrate-deficient transferrin: CDT)が有用とされるが、わが国の一般臨床ではCDTは測定できない。

臨床検査値では血清コリンエステラーゼ値の上昇およびAST、ALT値の軽度ないし中等度の上昇が見られるが、血清脂質(総コレステロール、中性脂肪)値は必ずしも相関しない。血清 γ -GTP値は飲酒に伴い著明に上昇することが知られるが、NAFLDでも上昇傾向を示すことが多い。画像診断はより鋭敏で、超音波検査でのbright liver、肝腎コントラスト、肝静脈の不明瞭化、深部エコー減衰、腹部CT検査での肝実質CT値の低下(肝/脾CT値比0.9以下)が特徴的である。

2 NASHハイリスク群の囲い込みと確定診断

NAFLDとNASHの鑑別に関してはインスリン抵抗性の存在(HOMA-R 2.5以上)や高感度CRP、各種の酸化ストレスマーカー(フェリチン、チオレドキシシン)や線維化マーカー(4型コラーゲン、ヒアルロン酸、プロコラーゲンIIIペプチドなど)の上昇などが参考になるが、NASHの確定診断は現在のところ肝生検に頼らざるを得ない。

NASHの病理組織像は、その名称の由来どおりアルコール性肝障害と極似しており、病理組織のみでアルコール性か否かの区別が可能かどうかについては病理医の間でも意見が分かれる。NASHに特徴的な病理所見としては、肝細胞への大滴性の脂肪沈着とともに水腫様変性(ballooning)を認め、Mallory小体、好酸性小体なども観察される。また、巣状壊死などをはじめとする炎症細胞浸潤や、Zone 3を中心とした細胞周囲(pericellular)お

よび傍静脈性(perivenular)の線維化が見られる。NASHとsimple steatosisの区別は、典型的な線維化のある症例では一目瞭然であるが、線維化が軽微な場合は水腫様変性の有無が重視される。一方、肝線維化が進行して肝硬変に至ったNASH症例では肝脂肪化の程度が軽微になってきていることが多く、脂肪肝としての所見が得られにくいことからburnout NASHと呼ばれる。このような場合、過去の肥満歴やメタボリックシンドロームの合併があること、過剰飲酒歴がないことに加えて、病理組織上の特徴的な線維化パターンなどから総合的に判断せざるを得ない。NASHの代表的な病理組織学的分類法としては、Bruniらの分類³⁾・Mattioliらの分類⁴⁾・NAFLD activity score (NAS)⁵⁾などがあげられ、病態進展の評価に有用である。

3 鑑別診断とピットフォール

脂肪性肝炎を呈する病態は多岐にわたる。若年発症のNASHを考えるうえでは、各種の代謝性疾患、とくにWilson病の除外が必須である。また、NASHはその定義上はほかの慢性肝疾患(C型およびB型慢性肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変など)を除外することになっているが、実際にはこれらの疾患とNASHのオーバーラップと考えられる症例も散見されるので注意を要する。C型肝炎はそれ自体インスリン抵抗性を惹起し、脂肪性肝炎の側面を有することが注目されている。自己免疫性肝炎との関連については、NASHでも抗核抗体などの自己抗体の低力価陽性を認めることが少なからずあることや、ステロイド投与による耐糖能異常および脂肪肝誘発が珍しくないことなど、鑑別診断や病態の把握に難渋することがある。薬物性肝障害については、タモキシフェンなど一部の薬剤で“薬剤性NASH”が惹起されることに加え、心身症で多剤服用例に脂肪肝が見られるときなど、判断に苦しむことが少なくない。

Ⅲ. NASHの治療および管理

1 生活習慣改善指導

メタボリックシンドロームに付随して見られるいわゆる狭義のNAFLD・NASHでは当然ながらその基盤となる肥満の解消が最も重視される。適切なカロリー摂取を心がけ、適度な運動を行うように生活習慣指導をする。食事指導では間食の制限、規則正しい食事時間、減塩、十分な食物繊維の摂取などを推奨する。NASHでは鉄分摂取制限が酸化ストレスの軽減に有効である可能性があるが、一般にはバランスの取れた食事を推奨することが望ましい。体重コントロールは必ずしも容易ではないが、急激な減量はかえって病態を悪化させる可能性もあることを説明し、徐々にかつコンスタントに続けることを推奨する。一般療法、薬物療法にかかわらず、NASHの管理上最も重要なポイントはいかに動機づけるかであり、その点で工夫を要する。また、一般療法においては医師以上に看護師、保健師や栄養士などコ・メディカルの果たす役割が大きく、その連携体制の確立が望まれる。

2 薬物療法の実際

一般療法のみで改善傾向が得られない場合や、リバウンドによる増悪を繰り返す場合、またNASHの診断が確定するなど、進行性の肝病変と認識され

表1 NASHの薬物療法

- ① チアゾリジン誘導体(pioglitazone, rosiglitazoneなど)
- ② ビグアナイド剤 (metformin)
- ③ 抗酸化薬 (Vit E, N-acetylcystein, betaine, s-adenosyl methionineなど)
- ④ ワルソデオキシコール酸
- ⑤ フィブラート系薬剤
- ⑥ プロブコール
- ⑦ ACE阻害薬、アンギオテンシン受容体拮抗薬
- ⑧ α -ブロッカー
- ⑨ エイコサペンタエン酸
- ⑩ ポリエノスファチジルコリン (EPL)

る場合には積極的な薬物療法の導入が必要になる。しかし、現時点で脂肪肝に対して保険適応を有する薬剤はきわめて限られている。とくにNASHに対する有効性の観点からは、いずれの薬剤もいまだ十分なエビデンスが得られているとはいえない。NASHに対して試みられている薬物療法の一覧を示す(表1)。

メタボリックシンドロームに合併し、インスリン抵抗性を有するNASHにはインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン系誘導体が有効である。チアゾリジン系薬剤は全身のインスリン抵抗性改善やアディポネクチン発現誘導に加え、肝局所においてもKupffer細胞活性化抑制に伴う微小炎症の改善や、肝星細胞活性化抑制に伴う線維化進展抑制などにより複合的にNASH進展を抑制する作用が期待される(図3)。わが国で臨床に用いられているピオグリタゾン(アクトス[®])は顕性糖尿病にのみ適応が認められており、NASHそのものには保険適応外であるが、糖尿病合併例には推奨で

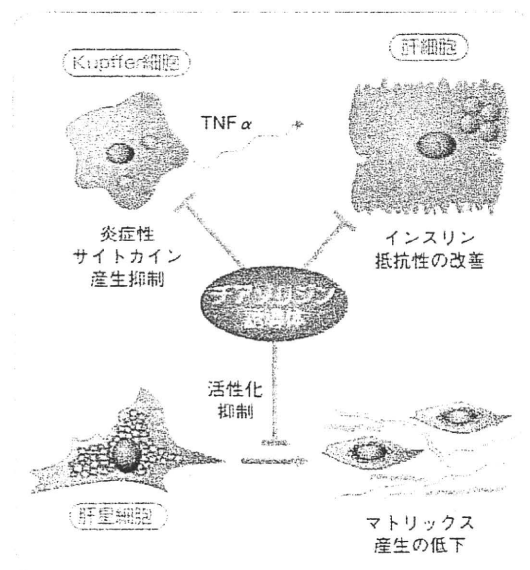


図3 NASHに対するチアゾリジン誘導体の作用