

きる。また、高血圧を有する際には、肝病変進展抑制の観点からもレニン・アンジオテンシン系および交感神経系亢進の制御が重要であり、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) や ACE 阻害薬が推奨される。

### ③ 長期フォローアップと肝発癌スクリーニングの重要性

従来、脂肪肝は病的意義が少なく予後良好であると考えられていたが、NASHの概念が浸透するにつれ、その予後についても問題視されるようになってきている。NASHの予後については不明の点が多いが、欧米の報告をもとに5～10年の経過観察で5～20%が肝硬変に進行するとされる。しかしながら、NASHの発症、病態進展にも人種差

や環境因子などが大きく影響することから、わが国のNAFLD・NASHの長期予後についてプロスペクティブな大規模疫学調査が望まれる。

また、NASHにも肝癌が発生することがあるので、NASHの進行が疑われる際には定期的な画像診断などでの確認を忘れずに受けるよう勧めることが望ましい。現在、ウイルス性慢性肝炎は肝発癌高リスク群として定期的なスクリーニング検査が行われているが、NASHはまだまだ見過ごされていることが多く、その結果かNASHに見られる肝癌はサイズも大きく進行した例が多い。NASHの場合、腹部超音波では十分な観察ができないこともあり、腹部CTやMRIなどを取り入れたスクリーニング対策を講じる必要がある。

#### おわりに

今年4月からメタボリックシンドロームをターゲットにした特定健診・特定保健指導が実施されることから、NASHが疑われる症例も一層増加することが予想される。NASHが疑われる場合には的確な治療方針決定のため肝生検などの精査を積極的に受けるとともに、長期に渡る地道な生活習

慣改善や薬物治療が必要であることを説明する必要がある。一方、肝病変の増悪・進展もさることながら、メタボリックシンドロームの一部分症として動脈硬化性疾患の発症・増悪の危険因子になることをしっかり理解してもらうことが肝要である。



#### 参考文献

- 1 Day CP, James OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114: 842-845, 1998.
- 2 Ikejima K, Okumura K, Lang T, et al: The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato Res*, 33 (2): 151-154, 2005.
- 3 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al: Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*, 94: 2467-2474, 1999.
- 4 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al: Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116: 1413-1419, 1999.
- 5 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41: 1313-1321, 2005.

# NASH/NAFLDの 成因と病態

Pathogenesis of NASH/NAFLD

今 一義・池嶋 健一・渡辺 純夫

順天堂大学医学部消化器内科



今 一義 (こん かずよし)  
1996年順天堂大学医学部卒業。2002年  
米国ノースカロライナ大学チャペルヒル  
校留学。'05年順天堂大学医学部消化  
器内科助手。'07年同助教。研究テー  
マ：メタボリックジンドローム、酸化  
ストレスと肝疾患

Key Words:

NASH, metabolic syndrome,  
oxidative stress

## ■ Abstract ■

NASH/NAFLDの発症には様々な因子が関与するが、最も重要な鍵になるのはメタボリックシンドロームと、その背景にあるインスリン抵抗性である。これまでインスリン抵抗性は肝脂肪化を引き起こす1st hitとして認知されてきたが、ラジカルの産生、アディポカイン、炎症性サイトカインなどの多数の因子を介して、単純性脂肪肝からNASHに至るいわゆる2nd hitとも密接に関与していることが明らかになってきた。NASHは肝線維化、癌化をも合併し、そのメカニズムはまだ不明な点が多いが、注目度が高く、研究が進められているジャンルでもある。

### ■はじめに

NAFLDの成因に、メタボリックシンドロームで代表されるようなインスリン抵抗性を背景としたエネルギー代謝異常が、密接にかかわっていることは広く認知されている。しかしながら、NAFLDの病態には多数の因子が関与しており、病態の解明を困難にする原因になっている。特に、肝心の単純性脂肪肝とNASHを分ける決定的因子は何かということになると、不明な点が多い。NASHの治療法が確立されていないこともあり、病態の解明は極めて重要であるといえる。ここでは、これまでにNASHの成因とし考えられてきたものを取りあげ、病態形成・進展における臨床的・基礎的

知見がどこまで進んできたかについて概説したい。

### ■NASH/NAFLDの背景因子

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、高脂血症がある。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は否定的な報告が多くなっている。

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NASHには該当しないが、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。

■Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima and Sumio Watanabe  
The Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

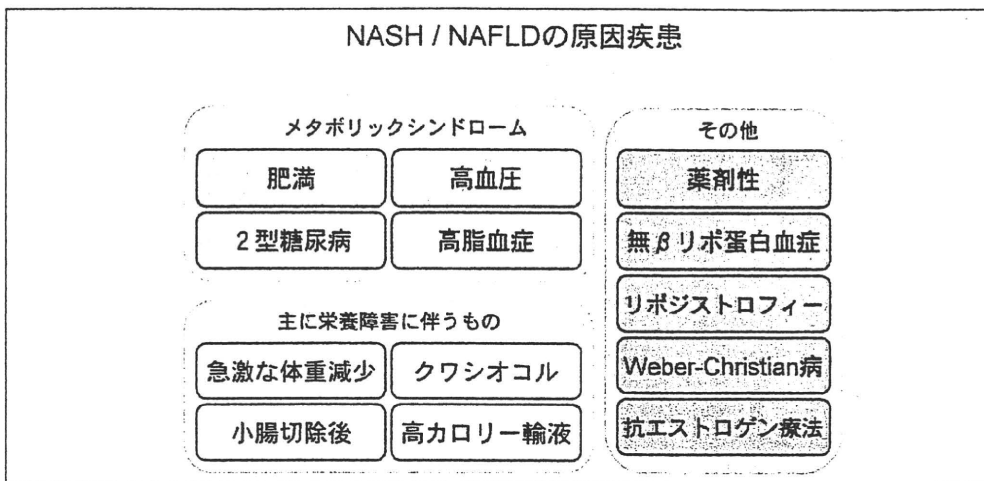


図1 NASH / NAFLDの原因疾患

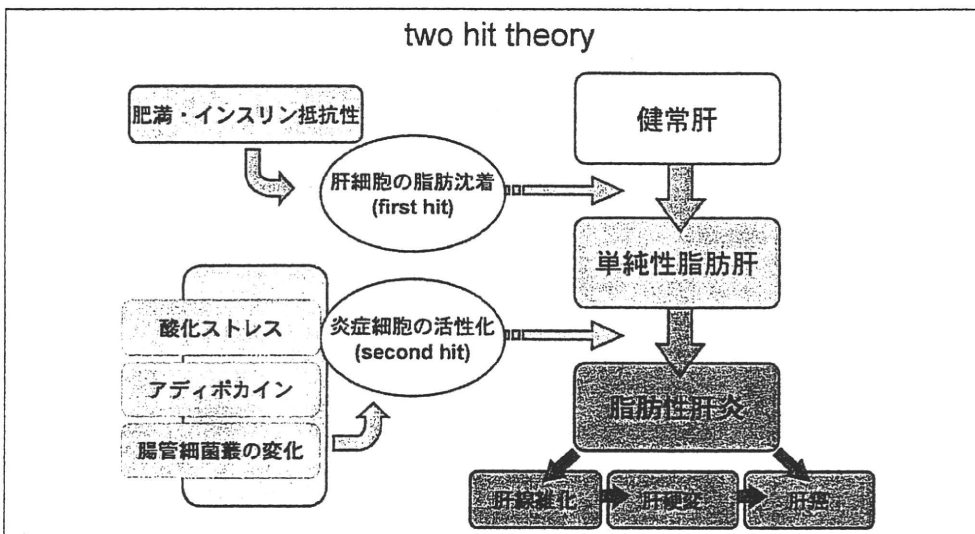


図2 two hit theory

■NASH/NAFLDの発症メカニズム

1) 脂肪肝の形成

NAFLDの特徴的な所見である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、 $\beta$ - $\omega$ 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）の状態です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 $\beta$ - $\omega$ 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、 $\beta$ 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、 $\beta$ 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。

2) 2 hit theory

NASHの病態形成が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二次的なストレス(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

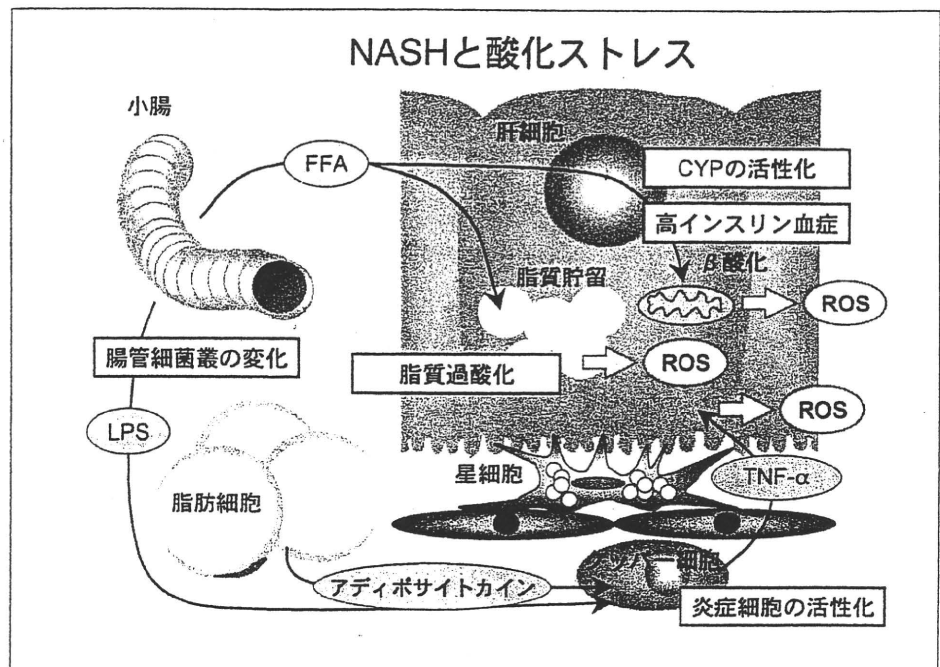


図3 NASHと酸化ストレス

されている(図2)。2nd hitの原因としては複数の因子が指摘されているが、有力な候補としてはまず脂肪細胞から分泌されるサイトカイン(アディポカイン)が挙げられる。アディポカインのひとつであるアディポネクチンは肝細胞の保護作用、炎症細胞の抑制作用を有するが、肥満の症例ではアディポネクチンの分泌が低下していることがわかっている<sup>2, 3)</sup>。

NASHではアルコール性肝障害と酷似した病理像を呈することから、アルコール性肝障害に類似した病態生理を有するのではないかと考えられている(図3)。アルコール性肝障害の発症に、マイクロゾーム内の代謝酵素CYP2E1の活性亢進が関与していることは以前より知られているが、肥満患者ではCYP2E1の活性が亢進しており、体重減少によって活性が低下したとの報告がある<sup>1)</sup>。CYP2E1は主にマイクロゾームに発現するが、その代謝過程でラジカルを産生する。また同様に、アルコール性肝障害では腸管透過性が亢進し、腸管由来のエンドトキシンが門脈を介して肝循環に流入することによって、クッパー細胞をはじめとした肝炎症細胞を活性化させることによって肝障害を惹起するが<sup>5)</sup>、NASHでも似通ったメカニズムが病態に関与している可能性がある。肥満患者では腸管

細菌叢の変化を認める。また、NASHの患者では内因性のエタノール濃度が増加しているとの報告もある<sup>6)</sup>。

鉄の関与も指摘されている。過剰な遊離鉄イオンはFenton反応を介してラジカル産生の触媒となる。欧米では、遺伝性ヘモクロマトーシスの責任遺伝子であるHFE遺伝子のC282YおよびY63Dの変異がNASHの線維化進行例で有意に多かったとの報告がある。本邦ではHFE遺伝子の変異は稀であり同様のメカニズムの関与は考えにくい。NASHの患者では血中フェリチンが上昇しており、鉄が何らかの形でNASHの病態に関与している可能性が考えられる。

遊離脂肪酸(FFA)もNASHの病態に重要な因子である。FFAはinsulin receptor substrate 1 (IRS-1)の発現を低下させ、インスリン抵抗性を惹起する。また、FFAは脂質過酸化を誘導し、細胞膜障害を引き起こす。また、FFAは肝細胞内のリソゾームからカテプシンBを遊離させ、肝細胞にアポトーシスを誘導する可能性が指摘されている<sup>7)</sup>。

ミトコンドリアはATP産生の中心的役割を担っているが、酸化的リン酸化の過程でラジカルを生じる。NASHの肝組織ではクリステの消失や巨大ミトコンドリア、ミトコンドリアDNAの変異が認

められる。ミトコンドリアの機能異常はATP産生能の低下、ラジカルの産生増加を引き起こし、酸化ストレス増加の原因となっている可能性がある。

ただし、NASH自体が多種の因子によって引き起こされる症候群ともいえるものであり、まず単純性脂肪肝ありきという2 hit theoryがどの症例でも当てはまるかとなると、異論も多い。

### ■NASHにおける肝線維化と癌化

NASHが一躍注目されるようになった背景として、これまで予後が極めて良好と考えられていた脂肪肝が、肝線維化の進展による肝硬変、そして最終的に肝不全もしくは肝細胞癌に進展しうることが示されてきたことがある。

NASHにおける肝線維化メカニズムを考慮する上で、インスリン抵抗性と活性化肝星細胞の関連を考察することが重要である。肝星細胞はDisse腔に存在し、活性化すると線維芽細胞様の形態に変化し、コラーゲンを大量に産生し、肝線維化の過程において中心的な役割を担う。まず、アディポカインのひとつであるレプチンが重要である。レプチンは中枢神経に作用して摂食を抑制させる働きを有するが、肥満患者では血中レプチン濃度が上昇している。これは肥満患者ではレプチンの作用が低下しレプチン抵抗性の状態になっていると考えられる。

一方、レプチンは星細胞の活性化に関与しており、レプチン欠損マウスでは肝線維化刺激に対する応答性が低下している。また、活性化星細胞自体もレプチンを産生する。NASHの患者において、高レプチン血症が肝線維化の促進因子となっていることが示唆される<sup>8)</sup>。また、核内レセプターのPPARも肝線維化にかかわる因子として重要である。ピオグリタゾンをはじめとしたチアゾリジン誘導体は糖質・脂質の代謝に密接にかかわる核内レセプターのPPAR- $\gamma$ のリガンドであるが、活性化肝星細胞ではPPAR- $\gamma$ の発現が低下している。PPAR- $\gamma$ リガンドはPPAR- $\gamma$ の発現を維持し、肝星細胞の活性を低下させる働きを持つ<sup>9)</sup>。

NASHの発癌にいたる機序はまだ十分には解明できていない。前述したNASHにおけるラジカルの産生亢進が肝細胞のDNA障害を惹起し、癌化に至ると考えられている。また、NASHの発癌にはphosphatase and tensin homolog (PTEN)の関与が考えられる。PTENは癌抑制遺伝子のひとつであり、ホスホイノシチド3-キナーゼ経路を介するシグナル伝達を低下させることによりAktキナーゼの活性を低下させる働きを有する。実験的にマウスで肝特異的にPTENをノックアウトすると、NASHに酷似した肝病理像を呈する。NASH患者由来の肝癌組織では、肝癌に隣接した部位でPTENの発現が低下している<sup>10)</sup>。PTENの発現低下が肝脂肪化・肝発癌の両面に関与している可能性が考えられる。

### ■おわりに

NASH/NAFLDの病態生理には多数の因子が関与しており、今後の研究が期待される。

#### 参考文献

- 1) Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol.* 2007 Nov;128(5):837-47.
- 2) Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Faga E, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology.* 2005 Nov;42(5):1175-83.
- 3) Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, et al. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol.* 2007 Oct;47(4):556-64.
- 4) Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2003 Aug;38(2):428-35.
- 5) Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, et al. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology.* 1998 Aug;115(2):443-51.
- 6) Nair S, Cope K, Risby TH, Diehl AM. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2001 Apr;96(4):1200-4.
- 7) 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 Jul;40(1):185-94.
- 8) Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, et al. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2005 Oct;33(2):151-4.
- 9) Kon K, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Kitamura T, et al. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 15;291(1):55-61.
- 10) Watanabe S, Horie Y, Suzuki A. Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2005 Oct;33(2):161-6.

# 脂肪肝から肝臓へ—NASHの病態を考える

柳沼礼子\* 池嶋健一 渡辺純夫

## 要旨

- ・非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver diseases; NAFLD)はメタボリックシンドローム患者の肝機能障害の主要な原因である。
- ・非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)は、有意な飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝炎様の肝組織像を呈し、脂肪沈着・壊死炎症細胞浸潤・pericellular/perivenular fibrosis を特徴とする。
- ・NASH症例のうち20~40%は進行性で最終的には肝硬変・肝臓を合併する。
- ・欧米のNAFLD罹患率は約30%、NASHは2~3%といわれている。
- ・NASH形成のメカニズムとして、肝細胞の脂肪沈着をfirst hit、炎症細胞の活性化をsecond hitとするtwo hit theoryが提唱されている。
- ・インスリン抵抗性・脂質代謝異常・炎症性サイトカイン/アディポカインの分泌異常がNAFLD/NASHの病態形成に関与する。
- ・C型慢性肝炎は脂肪性肝炎像を呈し、肝脂肪化は肝線維化の進展やインターフェロン治療奏効率の低下と相関する。
- ・脂肪肝は放置せず、NASHを念頭に精査することが望まれる。

## はじめに

近年、過食や運動不足により、肥満・糖尿病・脂質代謝異常・高血圧の罹患率は増加している。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(MetS)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特に重要視されている<sup>1,2)</sup>。

一方、肝臓は消化・解毒・産生・貯蔵にかかわる重要な臓器の一つであるが、NAFLD(nonalcoholic fatty liver diseases)は血清トランスアミナーゼ高値の原因としてもっとも多いものの<sup>3,4)</sup>、長い間、肥満患者に認められる比較的良性的疾患

として軽視されてきた。Ludwigら<sup>5)</sup>が提唱したNASH(nonalcoholic steatohepatitis)は、近年の肥満人口の急激な増加とともに注目を集めるようになった。NASHの20~40%は進行性で最終的には肝硬変・肝臓を合併することが明らかになり、NAFLDはもはや単なる良性的疾患ではなく、むしろ適切な注意を払うべき重要な疾患であることが示された。

本稿では、まず実際の日常診療において役立つポイントを提示し、そのうえでNASHの病態形成にかかわる諸因子について概説する。

## 日常診療におけるNASH診断の手掛かり

NASHとは臨床病理学的な概念であり、十分な

\*YAGINUMA Reiko, IKESHIMA Kenichi, WATANABE Sumio 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)

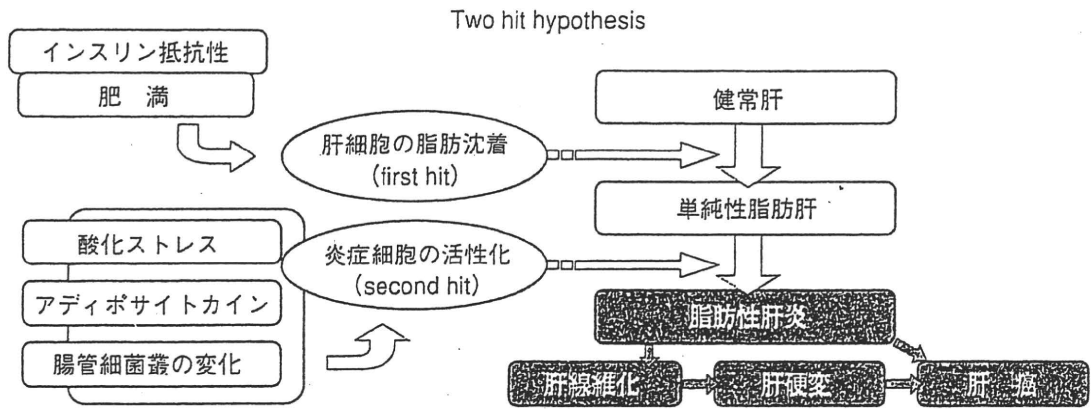


図1 NASHの発生機序(文献<sup>6)</sup>より引用し一部改変)

臨床情報のうえに病理学的診断が加わることで初めて確定診断に至る。まず、過度の飲酒歴がないこと(エタノール換算で1日20g以下)を確認し、ウイルス性肝疾患、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis; PBC)、Wilson病、ヘモクロマトーシスなどの他の肝疾患を除外する。

一般にNASHでは、①持続的トランスアミナーゼ高値(多くは正常値の4倍以内、ALT優位)、②血清線維化マーカーの上昇(血清ヒアルロン酸・P-III-P、IV型コラーゲン)、③血清フェリチン高値、④血清チオレドキシシン高値、⑤MetSの合併、などを認めることが多い。また、NAFLD/NASHの画像所見として、超音波検査でのbright liver・肝腎コントラスト・深部エコーの減衰や、CT検査での肝/脾CT値比<0.9の肝低吸収域、さらにはMRI検査のT1強調像で高信号を示すことも診断の一助となり得る。

臨床的な検索によってこれらの項目のいくつか該当する場合は、NASHとの確定診断を行うのに肝生検を要するため、肝臓専門医へのコンサルトが望まれる。

## NASHとメタボリックシンドローム

### 1. NASH/NAFLDの病理組織学的特徴

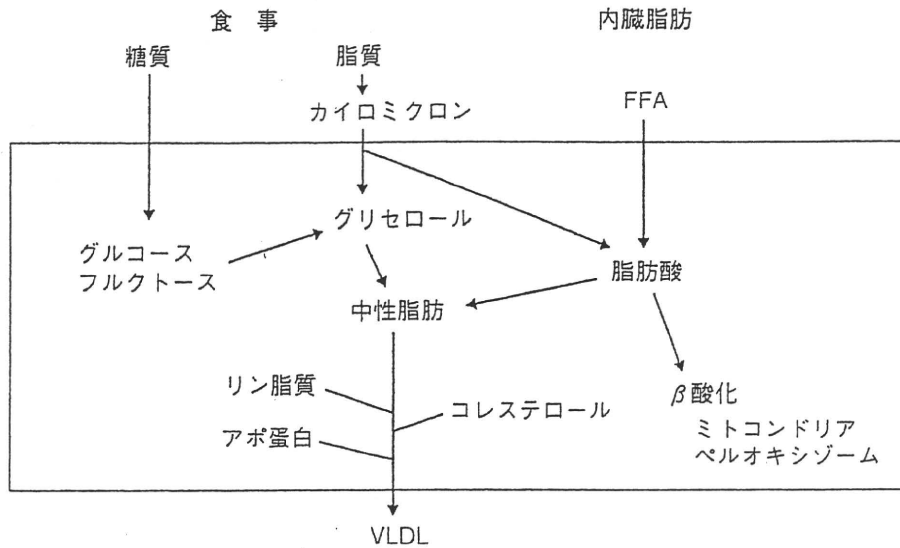
NASH形成の病態生理学的なメカニズムとして“two hit theory”という仮説がある。例えば、肥満やインスリン抵抗性などによってもたらされた肝細胞への脂肪沈着を“first hit”、そして酸化

ストレスや遊離脂肪酸(free fatty acid; FFA)あるいは炎症細胞の活性化などによって引き起こされた肝細胞の障害を“second hit”と定義されている。つまり、このような二つの段階を踏むことによって、健常肝から単純性脂肪肝、さらには脂肪性肝炎へと進展するのではないかという考え方が、現在、広く受け入れられている<sup>6)</sup>(図1)。

NASHの病理組織像は、大滴性脂肪性変化や風船化した肝細胞、Mallory 硝子体や好酸性小体などを認めることが多い。また、巣状壊死などをはじめとする炎症細胞浸潤がみられ、その結果としてZone 3のperisinusoidal/pericellular fibrosisをもたらし、最終的には肝硬変・肝癌へ進展する。代表的なNASHの病理組織学的分類法として、Bruntらの分類<sup>7)</sup>、Matteoniらの分類<sup>8)</sup>、NAFLD activity score(NAS)<sup>9)</sup>などがあげられる。

### 2. NAFLD/NASHの臨床像

最近のpopulation-based cohort studyによると、18~65歳の米国人のうち、34%に多飲歴のない脂肪肝を認めた<sup>10)</sup>。さらに、NAFLD患者の肝臓関連死は、一般人口の死亡原因と比べて高位(第3位:全死亡の13%)であった<sup>11)</sup>。これによってNAFLDが臨床的に無視できない重要な疾患であることが示唆された。また、肥満や耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧は、それぞれがNAFLD/NASH発症のリスクファクターであるが<sup>11~15)</sup>、最近の報告により、MetSとNAFLDが相関していることも示されるようになった<sup>16)</sup>。もはや肝脂肪化はMetSの一つの発現形であると



糖質・脂質・FFAの流入 > β酸化・VLDL生成

図2 脂肪肝の発生機序

いえるであろう。

### 3. NASH 進展のメカニズム

NASH 進展のメカニズムとして“two hit theory”が有名であるが、“first hit”といわれている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。肝に過剰な糖質・脂質・FFAが流入し、これがミトコンドリアにおけるβ酸化や、VLDLによる脂質代謝能を上回ると、肝臓に脂肪が沈着する(図2)。また、過剰な糖質が、脂質合成転写因子SREBP(sterol regulatory element binding protein)-1cの活性化を引き起こし、肝細胞の脂肪集積を促進し、その一方でSREBP-1cはインスリン受容体の基質であるIRS-2のリン酸化を抑制し、インスリンの作用を阻害する。

FFA・TNF-α・レジスチンなどのインスリン抵抗性を増悪させる物質の作用と、内臓脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンなどのインスリン感受性を改善させる物質の作用とを比較し、前者がより優位となった場合にインスリン抵抗性が惹起され、肝に脂肪が蓄積される。つまり、インスリン抵抗性や肝脂肪化を惹起するようさまざまな背景因子が、NASH形成において重要な役割を担っていると考えられる。

最近、肝選択的にインスリンレセプターをノックアウトしたマウスは、著明なインスリン抵抗性

および耐糖能異常を示し、このマウスの肝細胞は脂肪滴の集積や巨大ミトコンドリアといった異常像を呈しており<sup>17)</sup>、またミトコンドリアの酸化リン酸化の遺伝的な低下がインスリン抵抗性の生起に関与することも示された<sup>18)</sup>。これらの報告により、ミトコンドリアの機能異常がNASHの病態形成に寄与していることが推察される。

次に、“second hit”といわれている酸化ストレスによって引き起こされる炎症細胞の活性化について述べるが、肝への脂肪沈着の機序と同様に、実際には“first hit”あるいは“second hit”というように単純明快に区別するのは難しい。

まず、ミトコンドリアへの過剰なFFAなどのさまざまな基質の負荷が、活性酸素種(ROS)の産生に大きな役割を果たしており、ミトコンドリアにおける酸化ストレスをもたらす。肝細胞では、ミトコンドリアやペルオキシゾームにおいて脂肪酸が酸化を受け、生じたアセチルCoAはミトコンドリアのTCAサイクルに入りATPを産生するが、過剰な脂肪酸負荷によって、ミトコンドリアでの酸化の過程においてROSを過剰産生する。

また、高濃度のROSは、ミトコンドリアのDNA損傷や細胞膜脂質過酸化を引き起こして酸化ストレスをもたらす。さらに、NFκBの活性化などを介して、TNFαをはじめとする炎症性サイ





表 肝脂肪化の C 型慢性肝炎 IFN 治療奏効率への関与

文献	患者数 (Study Design)	治療方法	Genotype (%)			脂肪肝		SVR rate (%)	
			1	2	3	脂肪肝 (%)	Overall	脂肪肝あり	脂肪肝なし
Poynard, et al Hepatology 2003	1428 (retrospective)	48W IFN $\alpha$ -2b or 48W pegIFN $\alpha$ -2b plus Riba	68	15	15	65	54	35	57
Sanyal, et al Am J Gastroenterol 2003	137 (retrospective)	IFN plus Riba or PegIFN alone or plus Riba	90	4	3	47	25	14	35
Romero-Gomez, et al Gastroenterology 2005	159 (prospective)	Peg IFN plus Riba	71	23	6	No data	52	18	53.7
Harrison, et al Clin Gastroenterol Hepatol 2005	315 (retrospective)	IFN or pegIFN plus Riba	76	24		100	40	28	44 (>33% steatosis)
Thomopoulos, et al J Gastroenterol Hepatol 2005	116 (retrospective)	IFN or pegIFN plus Riba	41	8	34	45	52	39	66
D'Souza, et al Am J Gastroenterol 2005	59 (prospective)	PegIFN $\alpha$ -2a plus Riba	63	37		83	55	55	56
Camma, et al Hepatology 2006	291 (prospective)	PegIFN plus Riba	100			57	36	25	50 (>1% steatosis)
Yaginuma, et al Hepatol Res 2006	80 (retrospective)	24W IFN $\alpha$ -2b plus Riba	84	16		66	50	30	58 (>33% steatosis)
Jian, et al Liver Int 2006	98 (prospective)	24W or 48W pegIFN $\alpha$ -2a plus Riba	39	45	13	14	58	29	62
Soresi, et al Liver Int 2006	112 (prospective)	48W PegIFN $\alpha$ -2a plus Riba	72	14	13	64	41	33	55

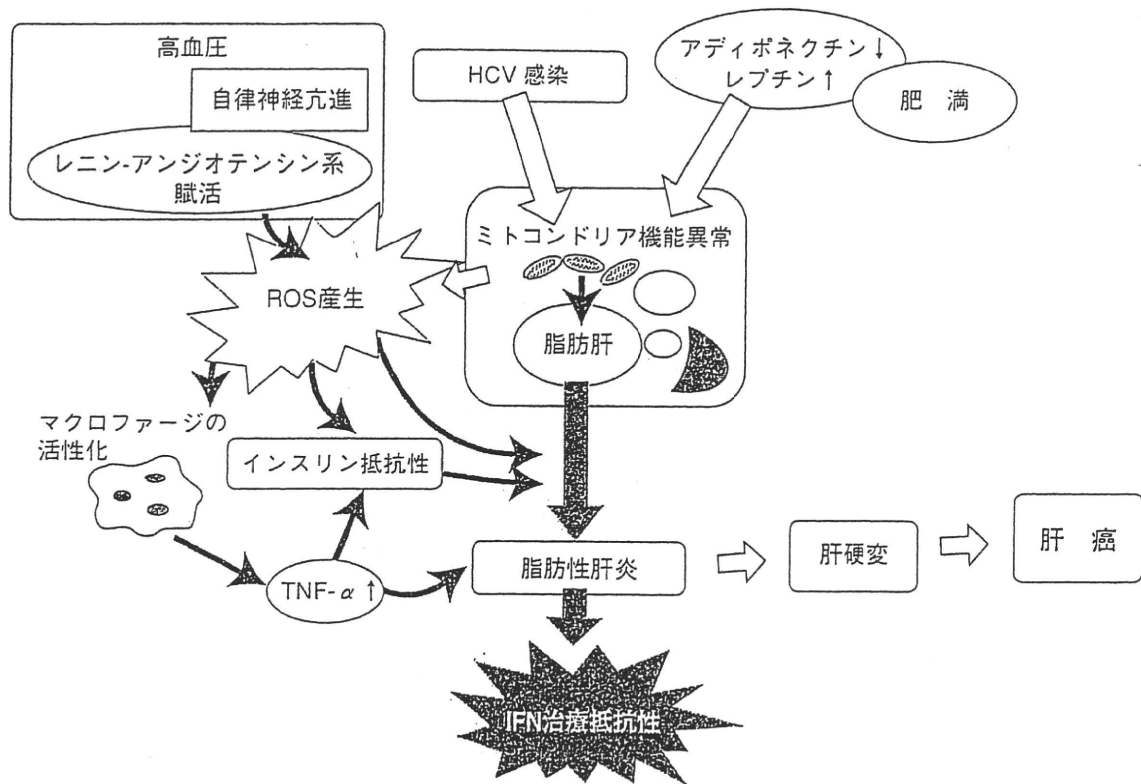


図3 メタボリックシンドロームとC型慢性肝炎の治療抵抗性

謝の中心的役割を担っており、肝脂肪化がインスリン抵抗性や脂質代謝異常、高血圧に参与している事実は重要である。このような観点から、脂肪肝を軽視することなく、NASHの存在を念頭に精査加療されることを期待する。

..... 文 献 .....

- 1) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 285 : 2486-2497, 2001
- 2) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ : The metabolic syndrome. Lancet 365 : 1415-1428, 2005
- 3) Angulo P : Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 346 : 1221-1231, 2002
- 4) Clark JM, Brancati FL, Diehl AM : Nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 122 : 1649-1657, 2002
- 5) 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
- 6) Day CP, James OF : Steatohepatitis : a tale of two "hits"? Gastroenterology 114 : 842-845, 1998
- 7) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al :

Nonalcoholic steatohepatitis : a proposal for grading and staging the histological lesions. Am J Gastroenterol 94 : 2467-2474, 1999

- 8) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al : Nonalcoholic fatty liver disease : a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology 116 : 1413-1419, 1999
- 9) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al : Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 41 : 1313-1321, 2005
- 10) Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al : Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States : impact of ethnicity. Hepatology 40 : 1387-1395, 2004
- 11) Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al : The natural history of nonalcoholic fatty liver disease : a population-based cohort study. Gastroenterology 129 : 113-121, 2005
- 12) Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, et al : The natural history of nonalcoholic steatohepatitis : a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. Hepatology 11 : 74-80, 1990
- 13) Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al : Nonalcoholic steatohepatitis : an expanded clinical entity. Gastroenterology 107 : 1103-1109, 1994
- 14) Teli MR, James OF, Burt AD, et al : The natural

- history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 22 : 1714-1719, 1995
- 15) Farrell GC, Larter CZ : Nonalcoholic fatty liver disease : from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43 : S99-S112, 2006
- 16) Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al : The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 143 : 722-728, 2005
- 17) Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al : Nonalcoholic steatohepatitis : association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120 : 1183-1192, 2001
- 18) Mohlig M, Isken F, Ristow M : Impaired mitochondrial activity and insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350 : 2419-2421 (author reply 2419-2421), 2004
- 19) Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, et al : Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 43 : 682-689, 2006
- 20) 八辻 賢, 橋本悦子, 戸張真紀, 他 : 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)による肝硬変とC型肝硬変の比較検討—門脈圧亢進症と肝細胞癌(HCC)を中心に. *肝臓* 47 : A478, 2006
- 21) Sasaki Y : Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol* 41 : 1135-1148, 2006
- 22) Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al : Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 113 : 1774-1783, 2004
- 23) Zein NN : Etenarcept as an adjuvant to interferon and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus infection : a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Hepatol* 42 : 315-322, 2005

---

第 48 回 千里ライフサイエンス技術講習会

---

## FRAP と Photoactivation

日 時 : 平成 20 年 9 月 5 日 (金) 10 : 00~17 : 00

場 所 : 千里ライフサイエンスセンタービル 6 階千里ルーム

コーディネーター : 平岡 泰 (大阪大学大学院生命機能研究科教授)

プログラム : 午前 : 講義 ; 生細胞蛍光イメージング・FRAP の基礎

午後 : 実習 1 ; FRAP による GFP 融合タンパク質の流動性の計測。

実習 2 ; Photoactivation による GFP 融合タンパク質の流動性の計測。データ解析。

講 師 : 原口徳子 (情報通信研究機構神戸研究所主任研究員), 木村 宏 (大阪大学大学院生命機能研究科准教授), 平岡 泰 (大阪大学大学院生命機能研究科教授)

講習対象者 : レーザー走査型共焦点顕微鏡の基本操作の経験があり, FRAP 計測を学びたい方

定 員 : 20 名。申し込みが定員を超過した場合は, 定員数の若干の増員と参加者の調整をさせていただきます。

参加費 : 10,000 円 (テキスト 6,300 円を含む)

申込締切 : 平成 20 年 8 月 5 日 (火) (財団必着)。

申込方法 : 氏名, 所属, 役職名または学年, 〒, 所在地, 電話, メールアドレスを明記の上, E-mail で下記宛お申込みください。申込締切後, 参加いただく方に参加費の振込先口座番号をお知らせいたしますので, そこに参加費をお振込みください。入金を確認次第, 領収書兼参加証をお届けいたします。

申 込 先 : 千里ライフサイエンス振興財団 村上和久

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町 1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル 8 階

TEL : 06-6873-2001 E-mail : sng@senri-life.or.jp

(主催) 財団法人千里ライフサイエンス振興財団

(共催) 大阪大学大学院生命機能研究科, 情報通信研究機構神戸研究所

(協賛) カールツァイスマイクロイメージング(株), オリパス(株), (株)ニコンインステック

## 12. 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

順天堂大学医学部 消化器内科

内 山 明 池 嶋 健 一  
今 一 義 渡 辺 純 夫

### Translocation of Iron from Lysosomes into Mitochondria is a Key Event during Oxidative Stress-induced Hepatocellular Injury

Akira Uchiyama, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon  
and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

#### KEY WORDS

Lysosomes, 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 (NASH) が注目されており、肝脂肪化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 C 型慢性肝炎やアルコール性肝障害などの慢性肝疾患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<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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傷害を増悪させる要因となることは報告されているが<sup>5~7)</sup>、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。

なお、本稿は口演抄録である。

## I 実験材料および方法

## II 結 果

## 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 C3H/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<sup>8)</sup>。

## 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  $\mu$ M, 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, 50nM) 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-AM で 4°C で 1 時間染色したのち、37°C 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<sup>9)</sup>。

## 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  $\mu$ M の propidium iodide (PI, Sigma, St. Louis, MO) を添加し、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)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub>, Molecular Probe, 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<sup>10,11)</sup>。

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  $\mu$ 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 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)。

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 法を用いた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 拮抗剤) 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)。

## III 考 察

以前より C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害および非アルコール性脂肪性肝炎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し、Fenton 反応 ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \cdot + \text{OH}^-$ ) を介して、ヒドロキシラジカル ( $\text{OH} \cdot$ ) を産生する触媒として働く。ラジカルの産生はミトコンドリア膜の透過性の変化 (mitochondrial permeability transition : 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<sup>12,12)</sup>、2 価鉄自体も MPT を引き起こす<sup>13)</sup>。

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

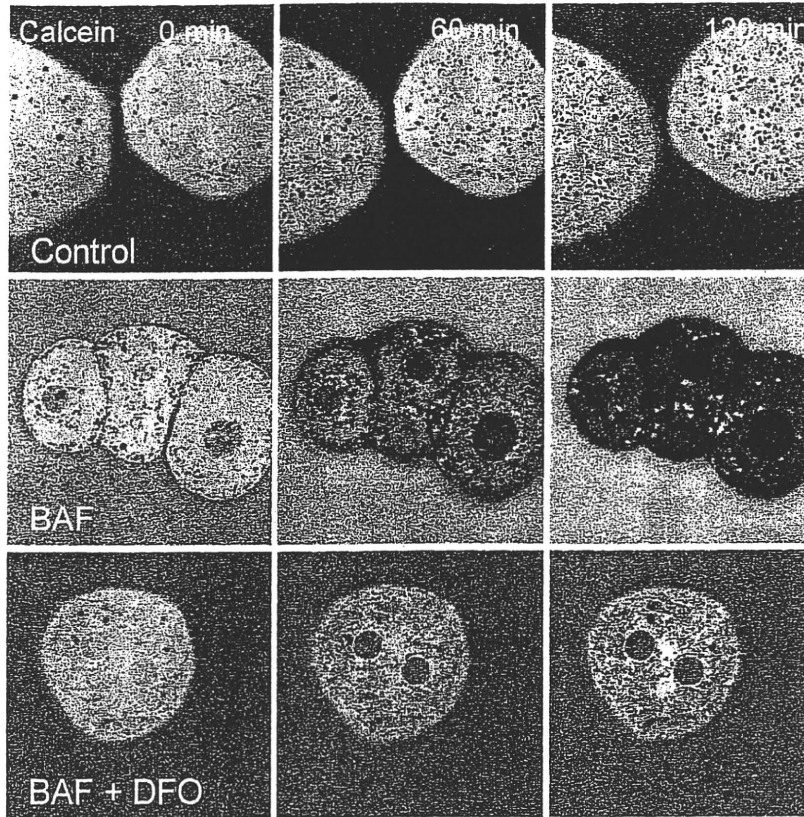


図 1 Bafilomycin による細胞質内 calcein の蛍光減弱および鉄キレート剤による抑制

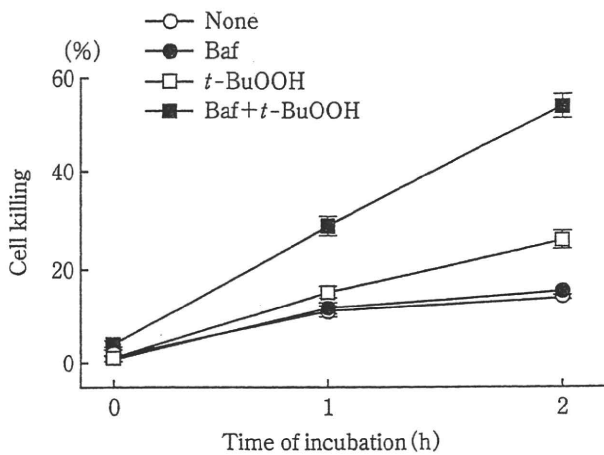


図 2 Bafilomycin と *t*-BuOOH 併用による肝細胞ネクロシスの誘導

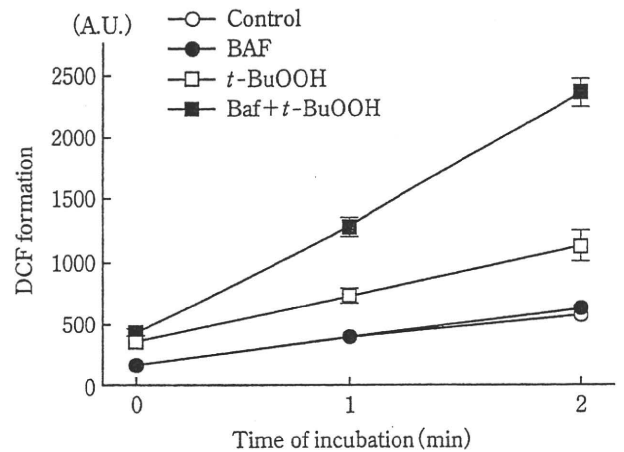


図 3 Bafilomycin と *t*-BuOOH 併用による ROS の産生

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<sup>14)</sup>、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 阻害剤である BAF を投与したところ、細胞質内の calcein 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

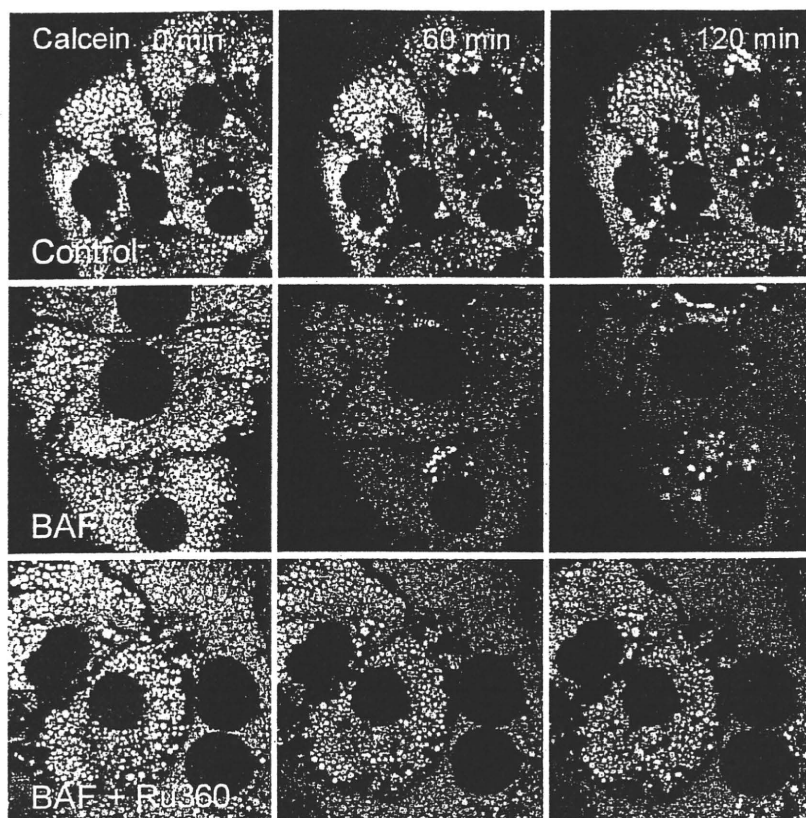


図 4 Bafilomycin によるミトコンドリア内の calcein の蛍光減弱と calcium uniporter 拮抗剤による抑制

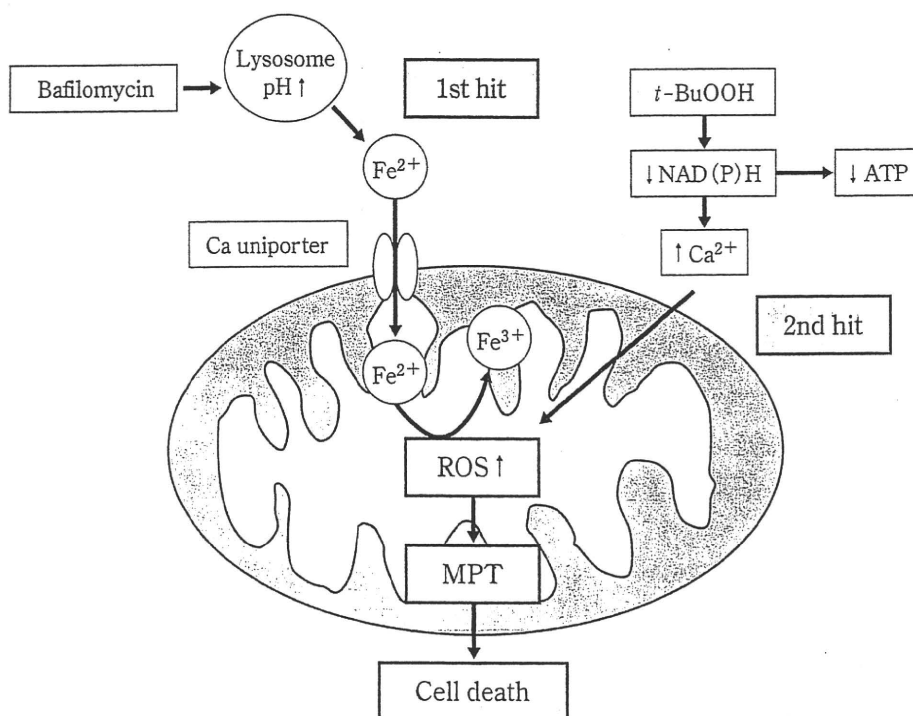


図 5 リソソームからの 2 価鉄の遊離およびミトコンドリアへの流入と酸化ストレスによる細胞死誘導メカニズム



ミトコンドリア内の NADPH または glutathione の低下をもたらす、ミトコンドリア内の ROS の産生をひき起こす<sup>15)</sup>。

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<sup>16)</sup>。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 5)、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。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ことが報告されている。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す、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。

## 要 旨

【目的】酸化ストレスの増大は慢性肝炎の病態進展に深く関与しており、その一因として鉄過剰に伴う活性酸素種 (ROS) の産生が重要視されている。しかし肝細胞障害時における鉄の細胞内動態については不明の点が多い。そこでわれわれは、酸化ストレス誘導肝細胞障害における、肝細胞内の 2 価鉄の局在変化と役割について、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を詳細に解析した。

【方法】マウスおよびラット初代培養肝細胞を用い、calcein, TMRM, propidium iodide (PI) で細胞染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2 価イオンの局在、ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) および細胞死の過程を観察した。また DCF 蛍光により ROS 産生を測定した。

【結果】液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤 Bafilomycin (BAF ; 50nM) 添加 2 時間後には細胞質の calcein 蛍光強度が 47.8% 減弱したが、desferal (DFO) および starch-desferal (sDFO) により細胞質とリソソームの鉄をそれぞれキレートすることにより calcein 蛍光強度減弱が抑制された。この現象よりリソソームから細胞質への Fe<sup>2+</sup> 流入を反映していることが判明した。BAF および *tert*-butylhydroxide (*t*-BuOOH ; 25 μM) おのおの単独投与では MPT は認められなかったが、BAF/*t*-BuOOH 共添加では MPT 発生に続き細胞死が観察された。ROS 産生も BAF と *t*-BuOOH おのおの単独添加で 46% および 65% であったが、共添加時には 212% と著明に増加した。肝細胞を低温下でミトコンドリアのみ calcein 染色して観察すると、ミトコンドリアの calcein 蛍光は BAF 添加により消失したが、この現象は DFO, sDFO および Ca-uniporter 阻害剤 Ru360 によりそれぞれ抑制された<sup>17)</sup>。

【結論】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 2 価鉄は ROS の感受性の亢進をもたらす、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 (本研究は、サウスカロライナ医科大学 John J. Lemasters 教授との共同研究である)。

## 文 献

- 1) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de GH. 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.
- 3) 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(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<sup>+</sup>-ATPase. *Curr Med Chem* 1999 ; 6 (12) : 1197-212.
- 5) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de GH. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol* 2004 ; 40 (4) : 607-15.
- 6) Kerkweg U, Jacob M, de GH, Mannherz HG, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells : contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 2003 ; 76 (3) : 501-8.
- 7) 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.
- 8) Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997 ; 273 (6 Pt 1) : C1783-92.
- 9) Lemasters JJ, Trollinger DR, Qian T, Cascio WE, Ohata H. Confocal imaging of Ca<sup>2+</sup>, pH, electrical potential, and membrane permeability in single living cells. *Methods Enzymol* 1999 ; 302 : 341-58.
- 10) Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> 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.
- 11) 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 (2) : 147-55.
- 12) Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004 ; 40 (5) : 1170-9.
- 13) Rauen U, Petrat F, Sustmann R, de GH. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol* 2004 ; 40 (4) : 607-15.
- 14) 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 (6 Pt 1) : C1354-61.
- 15) 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 (Pt 1) : 99-106.
- 16) 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 (4 Pt 1) : C1286-94.
- 17) 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 (5) : 1644-54.

\* \* \*

## 19. KK-A<sup>y</sup>マウスにおける肝再生不全

### —Pioglitazone による改善効果の検討—

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 柳沼礼子 山科俊平  
渡辺純夫

#### Effect of Pioglitazone on Liver Regeneration Failure Following Partial Hepatectomy in Obese KK-A<sup>y</sup> Mice

Tomonori Aoyama, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon, Hisafumi Yamagata,  
Reiko Yaginuma, Shunhei Yamashina and Sumio Watanabe

Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine

#### はじめに

非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) はインスリン抵抗性やアディポサイトカイン発現異常に伴い脂肪肝から脂肪性肝炎, さらに肝硬変へと進行することが知られている<sup>1)</sup>が, その病態進展には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。また, NASH の治療方法としてはさまざまな薬剤の有用性が報告されているものの<sup>2)</sup>, とくに組織修復をターゲットとした治療についてはいまだ確立されていない。このような脂肪肝と肝再生不全の関連を背景として, 今回私たちは, ヒトのメタボリックシンドロームにきわめて類似した表現形を呈する KK-A<sup>y</sup>マウスに対し, 肝切除を行い肝再

生について検討した。また, KK-A<sup>y</sup>マウスに対しインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体 pioglitazone を投与し肝再生への効果について調べた。

なお, 本稿は口演抄録である。

#### I 方 法

雄性 KK-A<sup>y</sup>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。肝細胞への BrdU 摂取を免疫染色で検討した。肝組織中の cyclin D1 発現および STAT-3 リン酸化を Western blot 法で検出した。血清 IL-6, アディポネクチンおよびレプチンは ELISA 法で測定した。肝組織中 TNF- $\alpha$  および socs-3 mRNA は real time RT-PCR 法で検出した。また, KK-A<sup>y</sup>マウスに対し pioglitazone (25 mg/kg) を 5 日間経口投与し, その

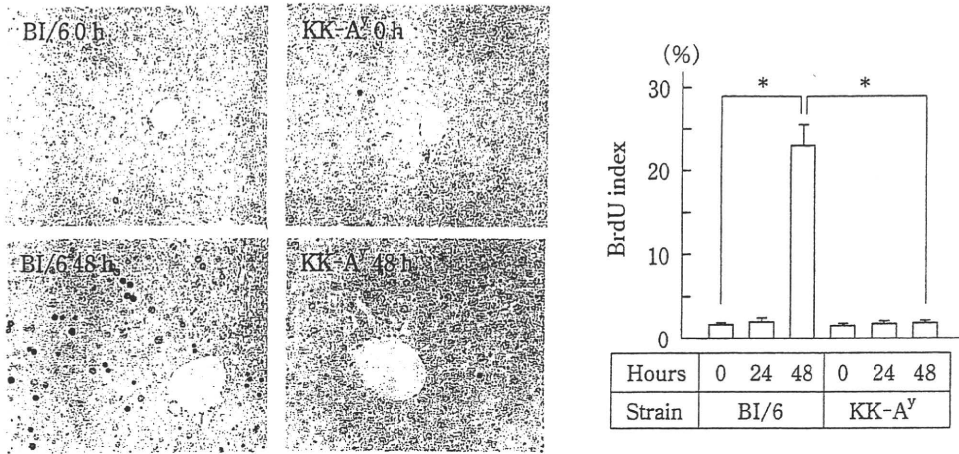


Fig. 1 肝切除後の肝細胞への BrdU 摂取

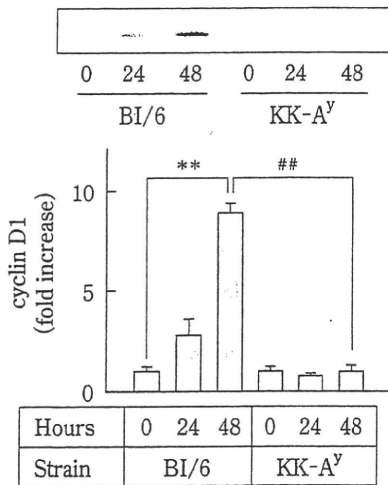


Fig. 2 肝切除後の cyclin D1 発現

後同様に肝再生を検討した。

## II 結 果

肝切除後 48 時間までにすべての BI/6 マウスは生存したが、KK-A<sup>y</sup> マウスは半数が死亡した。肝切除 48 時間後の肝細胞の BrdU 摂取率は BI/6 では 22% に上昇したが、KK-A<sup>y</sup> マウスでは 2% 以下に留まった ( $p < 0.05$ )。また、肝切除 48 時間後には BI/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<sup>y</sup> マウスでは殆ど上昇しなかった (Fig. 1, 2)。

一方、pioglitazone を前投与した KK-A<sup>y</sup> マウス (KK-A<sup>y</sup>+pio マウス) は肝切除後 48 時間でもすべて生存しており、生存率の著明な改善を認めた。肝

細胞 BrdU 摂取率は KK-A<sup>y</sup>+pio マウスでは 8% と有意に改善した ( $p < 0.05$ )。肝組織中 cyclin D1 発現も肝切除後 24 時間で KK-A<sup>y</sup> マウスと比べ約 4 倍に上昇した ( $p < 0.05$ )。また、肝組織中 TNF- $\alpha$  mRNA は KK-A<sup>y</sup> マウスで肝切除後 1 時間に BI/6 マウスと比較し 8.9 倍と著明な上昇を認めたが、KK-A<sup>y</sup>+pio マウスでは 2.1 倍に留まった。血清 IL-6 は KK-A<sup>y</sup> マウスで BI/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<sup>y</sup>+pio マウスではピークは 6 時間にシフトし、かつ上昇は BI/6 マウスと同等なレベルまで抑制された。さらに、KK-A<sup>y</sup> マウスでは肝切除後持続的な STAT-3 のリン酸化および socs-3 mRNA の発現増強を認めたが、pioglitazone 投与によりいずれも減弱し BI/6 マウスと同様なパターンを示した。血清アディポネクチンは KK-A<sup>y</sup> マウスで低アディポネクチン血症が認められたが、KK-A<sup>y</sup>+pio マウスでは BI/6 マウスと同等なレベルまで改善した。血清レプチンは KK-A<sup>y</sup> 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<sup>y</sup>+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。

## III 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