

Table 4 Factors associated with hepatocarcinogenesis on multivariate analysis in patients with chronic hepatitis and cirrhosis

	Chronic hepatitis (<i>n</i> = 463)	Cirrhosis (<i>n</i> = 160)
Age (years): ≤65 vs. >65	<0.001	0.008
Gender: female vs. male		<0.001
Platelets ($\times 10^4/\text{mm}^3$): ≥12.0 vs. <12	0.001	0.007
AST (IU/L): ≤40 vs. >40	0.043	
AFP (ng/mL): <10 vs. ≥10, <20 vs. ≥20	<0.001	0.003
AFP-L3 (%): <5 vs. ≥5, <10 vs. ≥10		0.017

AST aspartate aminotransferase, AFP alpha-fetoprotein, AFP-L3 *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP

Table 5 Factors associated with hepatocarcinogenesis on multivariate analysis in patients with and without IFN treatment

	With IFN (<i>n</i> = 189)	Without IFN (<i>n</i> = 434)
Age (years): ≤65 vs. >65		0.001
Gender: female vs. male	0.005	<0.001
Platelets ($\times 10^4/\text{mm}^3$): ≥12.0 vs. <12.0	0.047	<0.001
Cholinesterase (IU/L): ≥431 vs. <431	0.007	
AFP (ng/mL): <10 vs. ≥10, <20 vs. ≥20	<0.001	<0.001
AFP-L3 (%): <5 vs. ≥5, <10 vs. ≥10		<0.001

IFN interferon, AFP alpha-fetoprotein, AFP-L3 *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP

incidence of HCC on univariate analysis, but US-determined cirrhosis was not identified as a risk factor on multivariate analysis. Histologic assessment of fibrosis and cirrhosis was obtained in only 187 patients (30.0%), and patients with F4 fibrosis had a higher incidence of HCC in our univariate analysis. However, the population of patients with material available for histologic review was only one-third the size of the entire study population, and this small number may have negatively affected our ability to detect the predictive nature of fibrosis at all levels of severity. In contrast to serum ALT, serum AST levels were significantly associated with the incidence of HCC. AST levels are often abnormal in patients with cirrhosis when ALT values are in the normal range, and the AST/ALT ratio is frequently greater than 1 in cirrhotic patients [31]. Elevated AST activity is a surrogate marker for cirrhosis. Aging is associated with a number of events at the molecular, cellular, and physiological levels that influence carcinogenesis and subsequent cancer growth [32]. It has been hypothesized that an age-associated decrease in DNA repair [33] contributes to the development of HCC.

Recent reports have shown that AFP levels fall following the administration of IFN with or without ribavirin [34, 35]. IFN has been shown to have antiviral, anti-inflammatory, and anticancer activities [36]. One study demonstrated an

anticancer effect of IFN when this agent was given following intrahepatic recurrence after HCC resection [37], and in our study, previous treatment with IFN was a factor associated with a reduced incidence of HCC on univariate analysis. The median ages of our patients with and without IFN treatment were 53 years (range 28–71) and 65 years (range 26–84), respectively; the age in those receiving IFN was significantly lower than the age in the group without IFN ($P < 0.0001$). It is thought that age and IFN therapy are confounding factors because IFN therapy has better results in younger patients. Although IFN was not identified as a predictive factor on multivariate analysis, the possibility cannot be denied that IFN may play an important role in modulating AFP levels prior to the onset of HCC.

In conclusion, increased AFP or AFP-L3% levels were significantly associated with an increased incidence of HCC. Among HCV carriers, patients with ≥10 ng/mL AFP or patients with ≥5% AFP-L3% are at very high risk for the development of HCC even if AFP is less than 20 ng/mL or AFP-L3% is less than 10%, which are the most commonly reported cutoff values. Intensive imaging modalities including US, CT, and MRI are recommended every 3–6 months for these patients.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Conflict of interest There is no conflict of interest to disclose.

References

- Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1991;325:675–80.
- Kew MC, Purves LR, Bersohn I. Serum alpha-fetoprotein levels in acute viral hepatitis. *Gut*. 1973;14:939–42.
- Alpert E, Feller ER. Alpha-fetoprotein (AFP) in benign liver disease. Evidence that normal liver regeneration does not induce AFP synthesis. *Gastroenterology*. 1978;74:856–8.
- Eleftheriou N, Heathcote J, Thomas HC, Sherlock S. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with acute and chronic liver disease. Relation to hepatocellular regeneration and development of primary liver cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 1977;30:704–8.
- Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med*. 1995;332:1463–6.
- Bayati N, Silverman AL, Gordon SC. Serum alpha-fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1998;93:2452–6.
- Hu KQ, Kyulo NL, Lim N, Elhazin B, Hillebrand DJ, Bock T. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:860–5.
- Chu CW, Hwang SJ, Luo JC, Lai CR, Tsay SH, Li CP, et al. Clinical, virologic, and pathologic significance of elevated serum

- alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*. 2001;32:240–4.
9. Taketa K. Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology. *Hepatology*. 1990;12:1420–32.
 10. Shimizu K, Katoh H, Yamashita F, Tanaka M, Tanikawa K, Taketa K, et al. Comparison of carbohydrate structures of serum α -fetoprotein by sequential glycosidase digestion and lectin affinity electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 1996;254:23–40.
 11. Mita Y, Aoyagi Y, Yanagi M, Suda T, Suzuki Y, Asakura H. The usefulness of determining des-gamma-carboxy prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1998;82:1643–8.
 12. Sassa T, Kumada T, Nakano S, Uematsu T. Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des-gamma-carboxy prothrombin and *Leus culinaris* agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11:1387–92.
 13. Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Relation between incidence of hepatic carcinogenesis and integration value of alanine aminotransferase in patients with hepatitis C virus infection. *Gut*. 2007;56:738–9.
 14. Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C carriers with normal alanine aminotransferase levels. *J Hepatol*. 2009;50:729–35.
 15. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994;19:1513–20.
 16. Shen L, Li JQ, Zeng MD, Lu LG, Fan ST, Bao H. Correlation between ultrasonographic and pathologic diagnosis of liver fibrosis due to chronic virus hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;28:1292–5.
 17. Iacobellis A, Fusilli S, Mangia A, Clemente R, Festa V, Giacobbe A, et al. Ultrasonographic and biochemical parameters in the non-invasive evaluation of liver fibrosis in hepatitis C virus chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22:769–74.
 18. Caturelli E, Castellano L, Fusilli S, Palmentieri B, Niro GA, del Vecchio-Blanco C, et al. Coarse nodular US pattern in hepatic cirrhosis: risk for hepatocellular carcinoma. *Radiology*. 2003;226:691–7.
 19. Kudo M. Imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma and premalignant/borderline lesions. *Semin Liver Dis*. 1999;19:297–309.
 20. Torzilli G, Minagawa M, Takayama T, Inoue K, Hui AM, Kubota K, et al. Accurate preoperative evaluation of liver mass lesions without fine-needle biopsy. *Hepatology*. 1999;30:889–93.
 21. Tanaka S, Kitamura T, Nakanishi K, Okuda S, Yamazaki H, Hiyama T, et al. Effectiveness of periodic checkup by ultrasonography for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1990;66:210–4.
 22. Takayasu K, Furukawa H, Wakao F, Muramatsu Y, Abe H, Terauchi T, et al. CT diagnosis of early hepatocellular carcinoma: sensitivity, findings, and CT-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol*. 1995;164:885–90.
 23. Ebara M, Ohto M, Watanabe Y, Kimura K, Saisho H, Tsuchiya Y, et al. Diagnosis of small hepatocellular carcinoma: correlation of MR imaging and tumor histologic studies. *Radiology*. 1986;159:371–7.
 24. Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:111–7.
 25. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol*. 2005;43:434–41.
 26. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology*. 1993;18:47–53.
 27. Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:2038–43.
 28. Lu SN, Wang JH, Liu SL, Hung CH, Chen CH, Tung HD, et al. Thrombocytopenia as a surrogate for cirrhosis and a marker for the identification of patients at high-risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2006;107:2212–22.
 29. Kaneko S, Unoura M, Takeuchi M, Terasaki S, Ogino H, Matsushita E, et al. The role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology*. 1994;37:108–13.
 30. Tara K, Shimizu A, Ohkawa S, Harada M, Ito Y, Tamai S, et al. Development of hepatocellular carcinoma associated with increases in DNA synthesis in the surrounding cirrhosis. *Gastroenterology*. 1992;103:595–600.
 31. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem*. 2000;46:2050–68.
 32. Anisimov VN. Biology of aging and cancer. *Cancer Control*. 2007;14:23–31.
 33. Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrist BA. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J*. 2000;14:1325–34.
 34. Murashima S, Tanaka M, Haramaki M, Yutani S, Nakashima Y, Harada K, et al. A decrease in AFP level related to administration of interferon in patients with chronic hepatitis C and a high level of AFP. *Dig Dis Sci*. 2006;51:808–12.
 35. Arase Y, Ikeda K, Suzuki F, Suzuki Y, Kobayashi M, Akuta N, et al. Interferon-induced prolonged biochemical response reduces hepatocarcinogenesis in hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2007;79:1485–90.
 36. Hisaka T, Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Nishida N, Takemoto Y, et al. Interferon-alphaCon1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2004;41:782–9.
 37. Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki Y, Suzuki F, et al. Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor—a prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology*. 2000;32:228–32.

平成22年9月

生物学に関する

試験研究論叢

(第二十五集)

財団法人 両備^{てい えん}櫻園記念財団

肝発癌における鉄代謝異常と脂質代謝異常のクロストーク

平成20年度両備糧園記念財団
研究助成金による研究報告

川崎医科大学内科学(肝胆膵)

日 野 啓 輔

肝発癌における鉄代謝異常と脂質代謝異常のクロストーク

川崎医科大学内科学(肝胆脾) 日 野 啓 輔

は じ め に

C型慢性肝炎の病理学的特徴として肝内鉄過剰や肝細胞の脂肪化が挙げられるが、これらは肝病変進展因子あるいは肝発癌危険因子としても認識されておりC型肝炎の予後を規定する重要な病態である。鉄代謝障害についてはC型慢性肝炎患者において鉄代謝ホルモンであるヘプシジンの産生障害が報告されており¹⁾, C型肝炎ウイルス(HCV)トランスジェニックマウスやレプーリコン細胞においてHCVタンパクによる活性酸素がC/EBP homology protein(CHOP)の発現亢進²⁾やhistone deacetylaseの活性亢進³⁾を介してヘプシジンの転写を抑制することが明らかにされている。一方、肝細胞の脂肪化についてはHCVコアタンパクがmicrosomal triglyceride transfer protein(MPT)活性を抑制し肝からのVLDLの分泌を抑制し⁴⁾,あるいは種々の脂質合成関連分子の転写因子であるsterol regulatory element binding protein(SREBP)-1cの転写を亢進して肝細胞内の中性脂肪が蓄積する⁵⁾ことが報告されている。このようにHCVによる鉄代謝異常, 脂質代謝異常の分子機構が徐々に明らかにされつつあるが, 生体内ではこれらの代謝異常が独立して発現しているとは考えがたく両者の病態がどのようにかかわり合っているかを明らかにすることが重要である。われわれは鉄負荷を行ったHCVトランスジェニックマウスの肝発癌過程において著明な肝細胞の脂肪蓄積を認めた⁶⁾ことから, 鉄代謝異常がどのように肝脂肪化を引き起こすかについて検討した。

材 料 と 方 法

HCV全遺伝子が挿入された8週齢の雄性トランスジェニックマウス(HCV TgM)と同系, 同齢, 同性のC57BL/6マウス(コントロール)に通常餌(carbonyl iron 45 mg/kg餌)あるいは鉄過剰餌(carbonyl iron 225 mg/kg餌)を与える4群を設定し(I群:コントロール+通常餌, II群:HCV TgM+通常餌, III群:コントロール+鉄過剰餌, IV群:HCV TgM+鉄過剰餌), 12か月後に肝組織像, 電子顕微鏡像, 肝内の鉄濃度, 中性脂肪濃度, 各種脂質代謝関連分子の発現について検討した。肝内鉄濃度は原子吸光度により測定した。また, 一部のHCV TgMは通常餌で6か月飼育後さらに6か月間鉄過剰餌とともにN-acetyl cystein(NAC)を同時投与する群としない群を

設定し, 12か月後に同様の検討を行った.

結 果

1. 肝内鉄濃度と中性脂肪濃度との相関

IV群の肝内鉄濃度は $267 \pm 94 \mu\text{mg/g}$ 肝重量でI, II群に比べて有意に高値であり, 多数例のC型慢性肝炎患者の肝内鉄濃度⁷⁾に匹敵した. 肝内鉄濃度は4群すべてのマウスについて検討してみると肝内中性脂肪濃度と有意な正の相関を示した($r=0.63$, $P=0.002$). (図1)

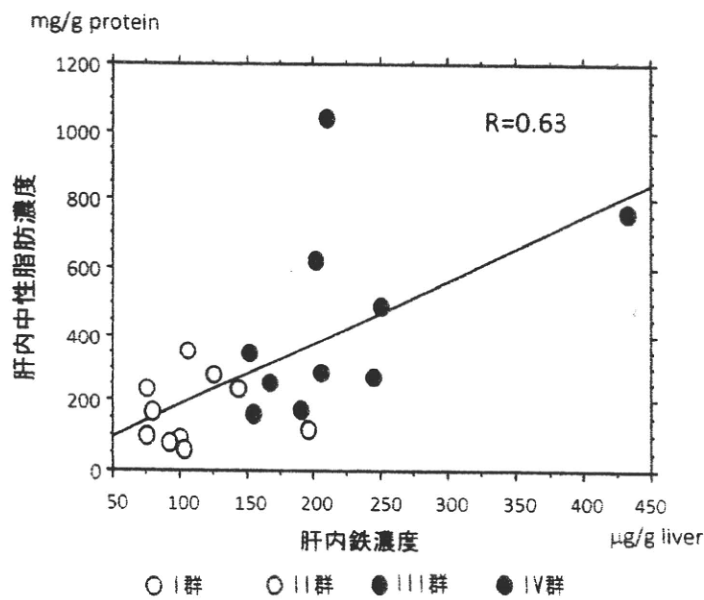


図1 肝内鉄濃度と中性脂肪濃度との相関.

2. carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) とsterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) の発現

CPTはミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸 β 酸化の律速酵素であり, ミトコンドリア外膜のCPT1とミトコンドリア内膜のCPT2が存在する. IV群の肝内CPT1発現量はI群のそれに比べて有意に低下していたが, CPT2発現量は差を認めなかった(図2). われわれは以前鉄負荷HCV TgMでは *in vivo* での脂肪酸分解能が低下していることを報告しているが⁶⁾, CPT1の発現低下はこの成績と一致するものであった. 一方, 脂質合成に必要な種々の分子の転写を促進する転写因子であるSREBP1の発現量はIV群がI群に比べて有意に高く, SREBP1の標的遺伝子であるfatty acid synthetase (FAS)の発現もIV群がI群に比べて有意に高かった(図2). 適当な抗

体がないためSREBP1cとSREBP1aをタンパクレベルで区別できなかったが、マウス肝ではSREBP1aに比べてSREBP1cの発現量が圧倒的に多いことが報告されているので、今回の検討におけるSREBP1の発現は主にSREBP1cを反映していると考えられた。CPT1の発現低下はHCVコアタンパクがミトコンドリア外膜に存在する⁸⁾ことと矛盾しないが、脂肪酸合成中間体であるmalonyl-CoAによりdown regulateされる点を考慮するとむしろ脂肪酸合成亢進を反映している可能性が強いと考えられた。

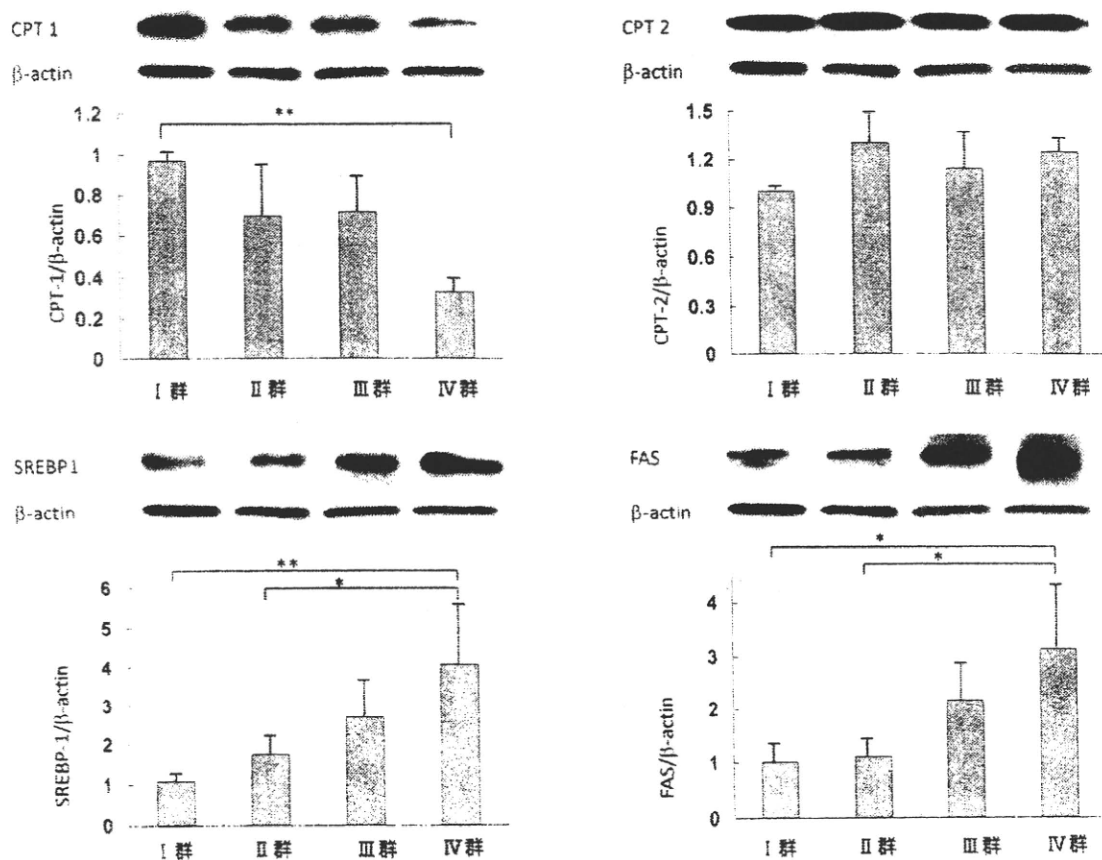


図2 I 群からIV群におけるCPT1, CPT2, SREBP1, FASの発現量 CPT: carnitine palmitoyl transferase, SREBP: sterol regulatory element binding protein, FAS: fatty acid synthetase

3. 小胞体ストレスの亢進

SREBPは通常SREBP cleavage-acting protein(SCAP)と複合体を形成して小胞体に anchorしているが、小胞体ストレスが引き起こされるとSREBPは複合体から分離し、ゴルジ装置へ移行して分断され活性化される。そこで鉄負荷HCV TgMにおけるSREBP1発現亢進の原因を検討するために小胞体ストレスについて検討を行った。小胞体ストレスのシグナルカスケードは小胞体中存在する3つのセンサーであるinositol-requiring enzyme 1(IRE1), RNA-activated protein kinase(PKR)-like ER kinase(PERK), activating transcription factor 6(ATF6)の活性化に

より開始される。IRE1の活性化の活性化は下流に存在するX-box DNA binding protein 1 (XBP-1)の splicing (s XBP-1) で評価し, PERKの活性化はその下流に存在するリン酸化されたeukaryotic initiation factor-2 α (p-eIF2 α)あるいはCHOPの発現で評価し, ATF6の活性化はsplicingされていないXBP-1 (u XBP-1)の発現で評価した。u XBP-1, s XBP-1, p-eIF2 α , CHOPの発現はいずれもI群に比べてIV群で有意に高かった(図3)。

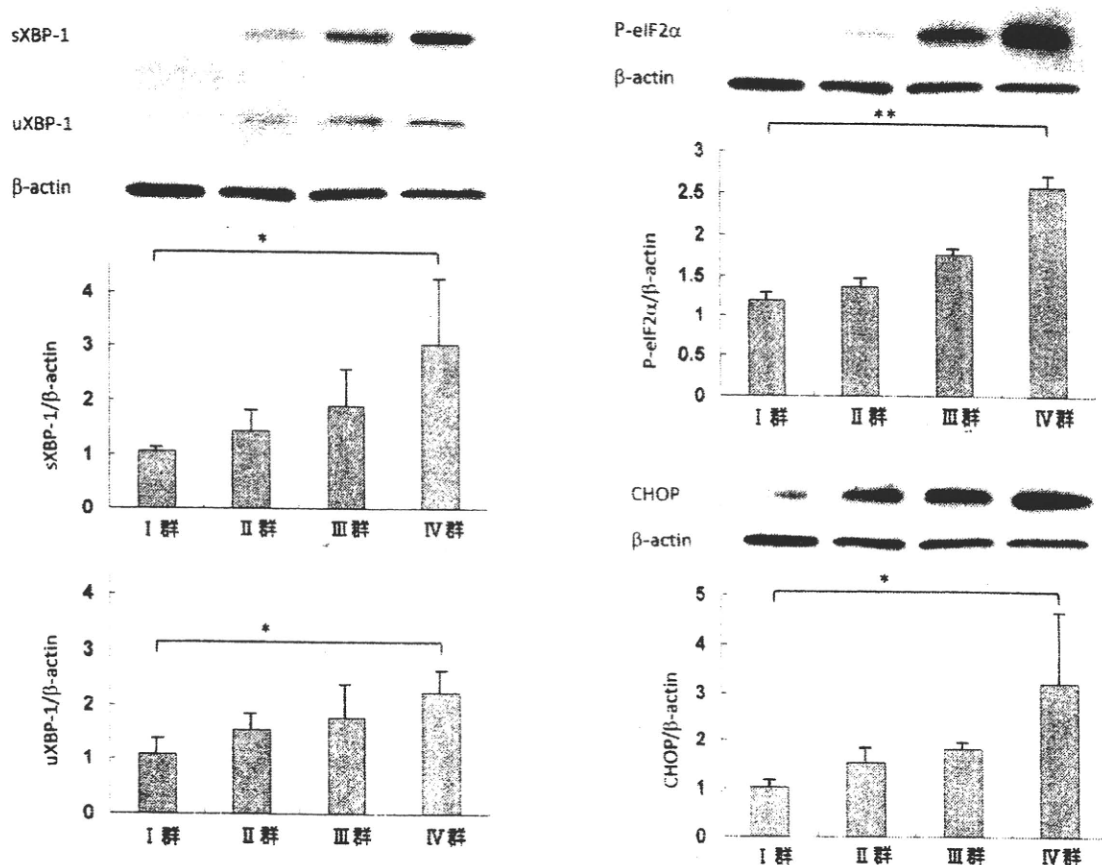


図3 I群からIV群におけるu XBP-1, s XBP-1, p-eIF2 α , CHOPの発現量。XBP-1: X-box DNA binding protein 1, p-eIF2 α : phosphorylated eukaryotic initiation factor-2 α , CHOP: C/EBP homology protein

4. Autophagy

小胞体ストレス下での細胞の形態学的変化のひとつとしてautophagyが報告されているので^{9, 10)}, 鉄負荷HCV TgMの肝臓におけるautophagyについて電子顕微鏡レベルで検討を行った。図4に示すように鉄負荷HCV TgMはautophagosomeが多く認められるが, I群からIII群のマウスではautophagosomeは殆ど観察されなかった。これらは鉄負荷HCV TgMの肝臓における小胞体ストレス亢進と矛盾しない結果と考えられた。



図4 鉄負荷HCV TgMの肝臓の電子顕微鏡像。矢印はautophagosomeを表す。

5. 活性酸素産生と小胞体ストレス

活性酸素種のひとつであるスーパーオキシドが小胞体ストレスに関連したアポトーシスに関連すること¹¹⁾や抗酸化剤が小胞体ストレスを軽減し小胞体におけるタンパクの分泌を改善すること¹²⁾が報告されている。そこで鉄負荷HCV TgMにおける小胞体ストレス亢進の原因を検討する目的で肝内の活性酸素を測定した。Dihydroethidiumはスーパーオキシドにより酸化されてethidium bromideとなりDNAと反応して核を赤く染色する。そこで凍結肝組織をdihydroethidiumで染色し赤く染色された核を定量化することで in situにおける活性酸素の産生量を比較検討した。I群のマウスを除いてすべてのマウスにおいて活性酸素の産生亢進が観察されたが、IV群は他の3群と比べて有意に活性酸素の産生量が多かった(図5)。

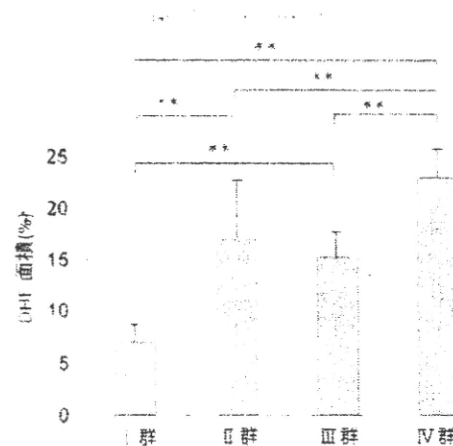
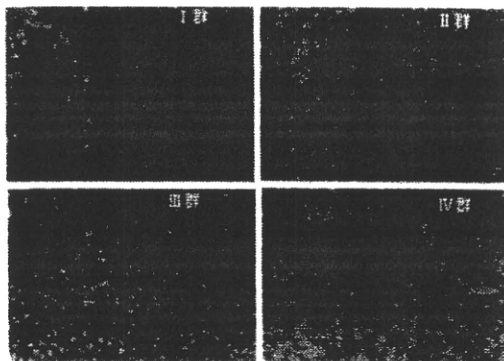


図5 I群からIV群のマウス肝の肝内活性酸素量。凍結肝組織をdihydroethidium(DHE)で染色し赤く染色された核を定量化することでin situにおける活性酸素の産生量を比較検討した。

6. 抗酸化剤による小胞体ストレスの抑制と肝脂肪化の抑制

これまでの検討からHCVタンパク存在下に鉄は相乗的に活性酸素の産生を促進して酸化ストレスを誘導し、これにより小胞体ストレスが亢進することでSREBP1が活性化され結果的に肝脂肪化が引き起こされるのではないかと考えられた。そこで鉄負荷HCV TgMに抗酸化剤を投与することで肝脂肪化が抑制されるか否かについて検討した。鉄過剰餌と同時にNACを投与したHCV TgMはNACを投与しなかった群と比べて著明に肝脂肪化が抑制されるとともに(図6)、活性酸素の産生抑制とともに肝重量/体重比も有意に低下した。さらに小胞体ストレスマーカーであるuXBP-1, sXBP-1, CHOPの発現もNAC投与により有意に抑制され、有意差こそないもののSREBP1の発現も抑制された($p=0.08$)。しかし、NACを投与してもCPT1の発現は変化しなかった。

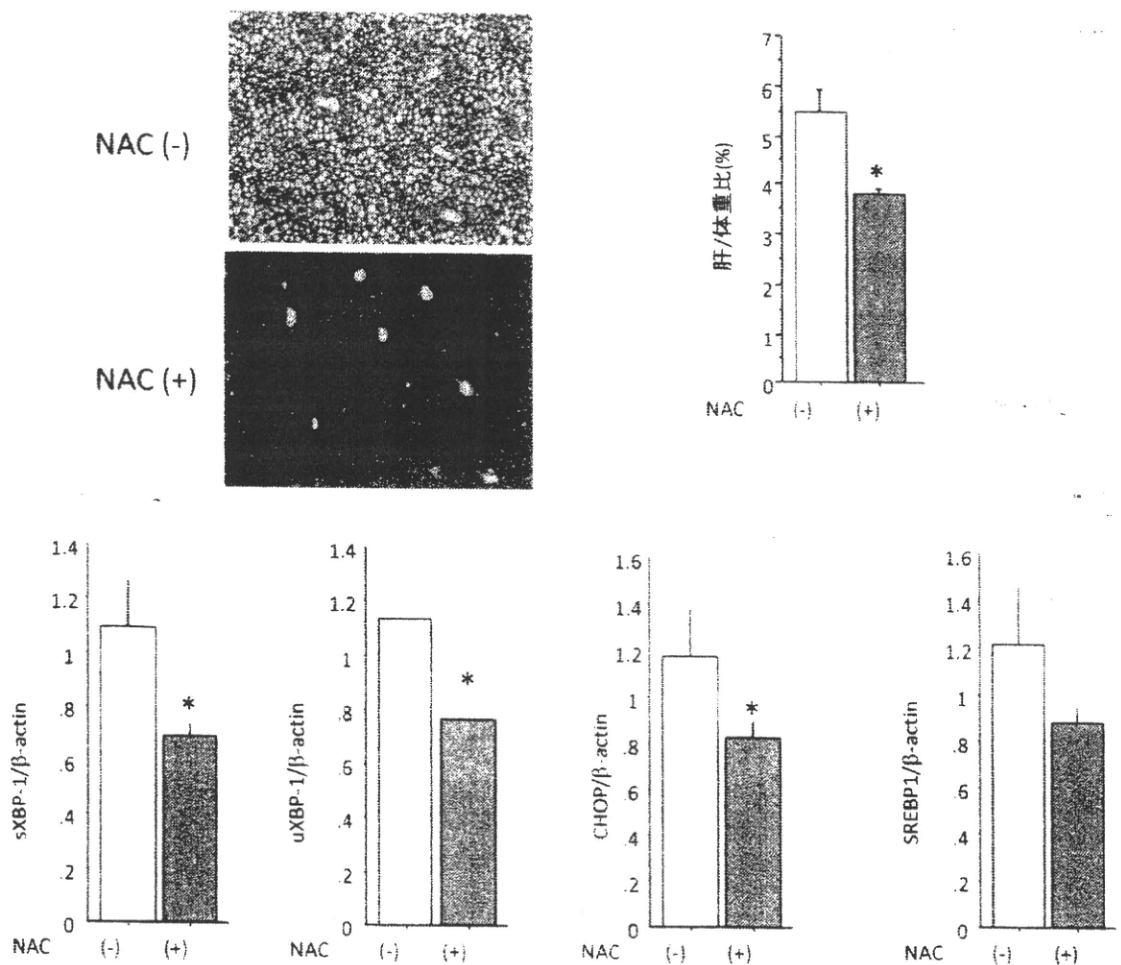


図6 鉄過剰餌と同時にNACを投与したHCV TgMとNACを投与しなかったHCV TgMの肝組織像(HE), 肝/体重比, uXBP-1, sXBP-1, CHOP, SREBP1の発現量の比較。

考 察

HCVタンパクは鉄代謝異常, 脂質代謝異常, インスリン抵抗性など様々な代謝異常を引き起こし, これらの代謝異常はC型肝炎の進展や肝発癌に深く関与している. 各々の代謝異常を引き起こす分子機構は次第に明らかにされつつあるが, 各代謝異常がお互いにどのような影響を及ぼしているかについては殆ど明らかにされていない. 今回の検討ではHCVタンパク存在下での鉄過剰は酸化ストレスを増強することで小胞体ストレスを亢進させ, その結果として脂質合成関連分子の転写因子であるSREBP1の転写後活性化を引き起こし肝脂肪化を引き起こすことが明らかとなった. しかし, 本研究に用いたHCV TgMは炎症や線維化を引き起こさないのので, 今後はC型慢性肝炎患者においても実際に小胞体ストレスが惹起され, 肝脂肪化との関連があるのか否かを検証していくことが重要と考えられる.

要 約

C型肝炎ウイルス全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス(HCV TgM)を用いてC型肝炎における肝病変進展因子, 肝発癌因子である肝臓の鉄蓄積と肝細胞の脂肪化がどのようににかかわり合っているかについて検討した. HCV起因性活性酸素が小胞体ストレスを惹起し, これにより脂質合成関連分子の転写因子であるSREBP1の転写後活性化を引き起こし, 肝脂肪化が促進されることが考えられた.

文 献

- 1) Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H, Kobayashi Y, Iwasa M, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M: *Mol Med*, 13:97-104 (2007)
- 2) Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, Furutani T, Sakai A, Okuda M, Hidaka I, Okita K, Sakaida I: *Gastroenterology*, 134:226-38 (2008)
- 3) Miura K, Taura K, Kodama Y, Schnabl B, Brenner DA: *Hepatology*, 48:1420-9 (2008)
- 4) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Brechot C: *FASEB J*, 16:185-94 (2002)
- 5) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y: *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:

- 1661-6(2007)
- 6) Furutani T, Hino K, Okuda M, Gondo T, Nishina S, Kitase A, Korenaga M, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM, Sakaida I, Okita K: *Gastroenterology*, 130:2087-2098(2006)
 - 7) Rulyak SJ, Eng SC, Patel K, McHutchison JG, Gordon SC, Kowdley KV: *Am J Gastroenterol*, 100:332-337(2005)
 - 8) Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J, Weinman SA: *J Biol Chem*, 280:37481-37488(2005)
 - 9) Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tani I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K: *Mol Cell Biol*, 26:9220-9231(2006)
 - 10) Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ: *J Biol Chem*, 281:30299-30304(2006)
 - 11) Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Du S, Kasai A, Takano Y, Shitamura A, Shimada T, Yao J, Kitamura M: *J Biol Chem*, 283:4252-4260(2008)
 - 12) Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, Kaufman RJ: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:18525-18530(2008)

鉄代謝の臨床 鉄欠乏と鉄過剰：診断と治療の進歩

III. 鉄過剰

3. 慢性肝障害における鉄代謝異常と除鉄療法

日野 啓輔 仁科 惣治 是永 匡紹

トピックス

III. 鉄過剰

3. 慢性肝障害における鉄代謝異常と除鉄療法

日野 啓輔 仁科 惣治 是永 匡紹

要 旨

わが国において肝発癌との関係からその鉄代謝障害が注目されている慢性肝障害は主としてC型慢性肝疾患と非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）である。C型慢性肝疾患における鉄代謝障害機序として hepcidinの産生低下が報告されているが、NASHでの鉄代謝障害機序は未だ不明の点が多い。両疾患のマネージメントにおいて鉄代謝異常を是正していくことは病態進展抑制という観点からも有用と考えられる。

〔日内会誌 99：1248～1254, 2010〕

Key words：C型肝炎，非アルコール性脂肪性肝炎，hepcidin

はじめに

肝臓は体内における最大の鉄貯蔵臓器であり鉄代謝異常と肝疾患は密接な関係にある。Fenton反応に代表される鉄による酸化ストレスの誘導は肝疾患の病態形成に重要な影響を与え、究極的には肝発癌とも関連する。本稿では肝発癌の主な原因疾患であるC型慢性肝炎とメタボリック症候群の増加に伴い最近急増している非アルコール性脂肪性肝炎に焦点を絞り、鉄代謝異常の機序と除鉄の臨床的效果について解説する。

1. C型慢性肝炎

C型慢性肝炎の病態の特徴のひとつとして肝内鉄蓄積がよく知られているが、鉄蓄積の程度は軽微であり症例によっては全く鉄沈着を認めな

い場合もある。この点ではヘモクロマトーシスに見られるような高度の肝内鉄蓄積とは明らかに異なっている。しかし、C型慢性肝炎に対する治療として瀉血が認可されていることからわかるように、軽微な肝内鉄蓄積であっても鉄過剰状態がC型慢性肝炎の病態を進展させることは容易に想像される。ではなぜC型慢性肝炎では肝内の鉄蓄積が起こるのであるだろうか。この点については不明の点が多かったが、われわれはHCV（hepatitis C virus）全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス（HCV TgM）を用いて肝内鉄蓄積機序¹⁾と鉄蓄積に伴う酸化ストレス亢進からの肝発癌機序の解析²⁾を行ったのでその成績を中心に解説する。

1) 鉄蓄積機序

脊椎動物における生体の鉄恒常性維持は十二指腸粘膜上皮からの鉄吸収ならびに網内系からの鉄放出により厳密に調節されている。この点において肝臓で生成、分泌されるペプチドホルモン hepcidinは十二指腸上皮細胞血管側および網

ひの けいすけ、にしな そうじ、これなが
まさあき：川崎医科大学肝胆腸内科学

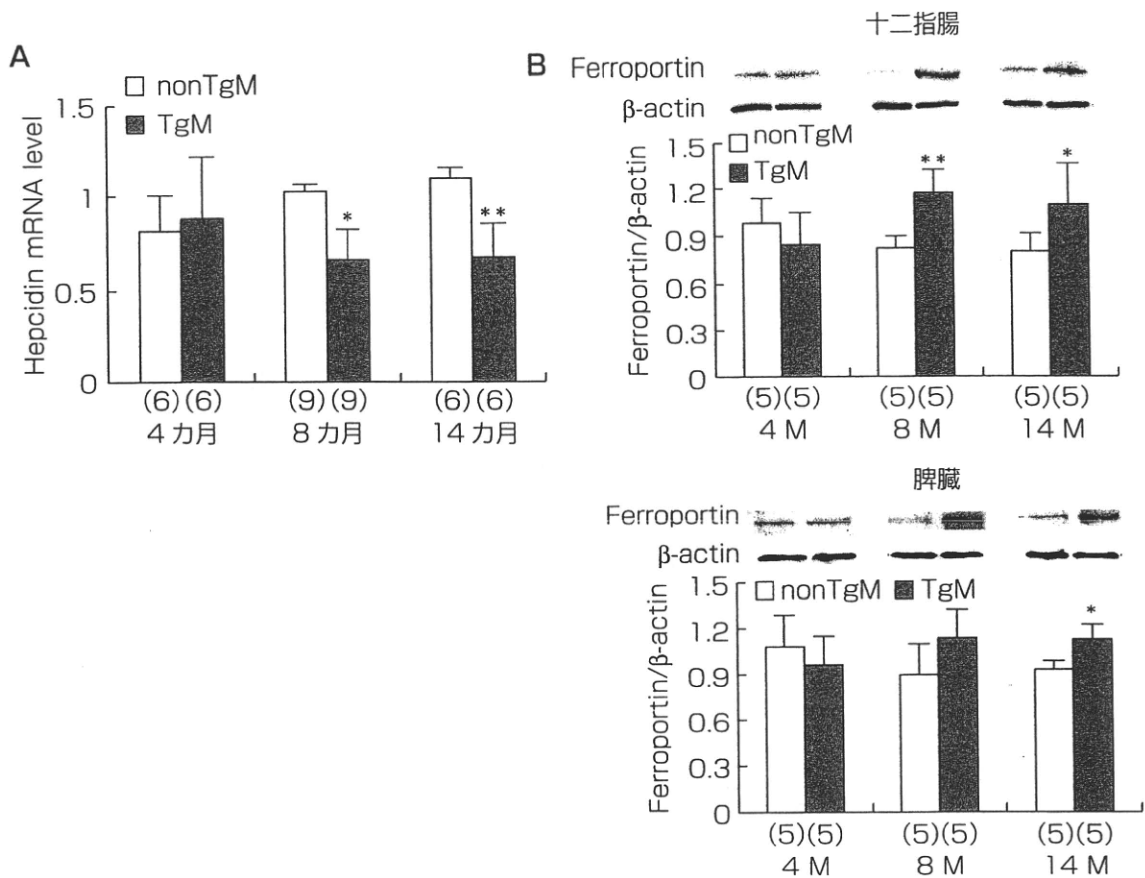


図 1. HCV TgM の肝臓内 hepcidin mRNA, 十二指腸, 脾臓内 ferroportin の発現量

内系マクロファージに存在するferroportinという鉄輸送体の発現を抑制し, 十二指腸からの鉄吸収ならびに網内系からの鉄放出を抑制することで体内の鉄含有量を調節することが明らかにされている. Fujitaらは体内鉄に対するhepcidin量として血清中のhepcidin/ferritin比がC型慢性肝炎患者において有意に低下していることを報告し, 体内鉄に対するhepcidinの産生が相対的に低下していると指摘している³⁾. HCV TgMにおいても肝臓と血清中の鉄濃度が上昇するとともに脾臓の鉄濃度が低下する時期に一致して肝臓のhepcidin mRNA発現量は有意に低下し, これに対応してHCV TgMの十二指腸と脾臓でのferroportinの発現は有意に高かった (図 1). これまでのところhepcidinの転写調節は①鉄あるいは若年性ヘモクロマトーシス関連遺伝子であるhemojuverinによるbone morphogenic protein (BMP), SMADシグナルを介する系, ②IL-6 (interleukin-6) によるJAK-STAT (Janus

kinase-signal transducer and activator of transcription) シグナルを介する系が報告されている. このHCV TgMは肝臓に炎症を起こさないが, lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与しIL-6などの炎症性サイトカインを誘導するとhepcidin mRNAの発現は上昇し②の調節機構は障害されていなかった. 一方, HCV TgMの初代培養肝細胞を用いた検討ではhepcidinのプロモーター活性が有意に低下していた (図 2a). さらにその原因としてhepcidinの転写因子のひとつであるCCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) のhepcidinプロモーター領域への結合能が抑制されていることが明らかとなった (図 2b). C/EBPファミリーにはC/EBP homology protein (CHOP) が存在するが, CHOPはC/EBPと二量体を形成し, C/EBPの標的DNAへの結合を阻害することが知られている. そこでHCV TgMの肝臓におけるCHOPの発現を調べてみると有意に亢進しており, これは肝内の活性酸素の産生と連

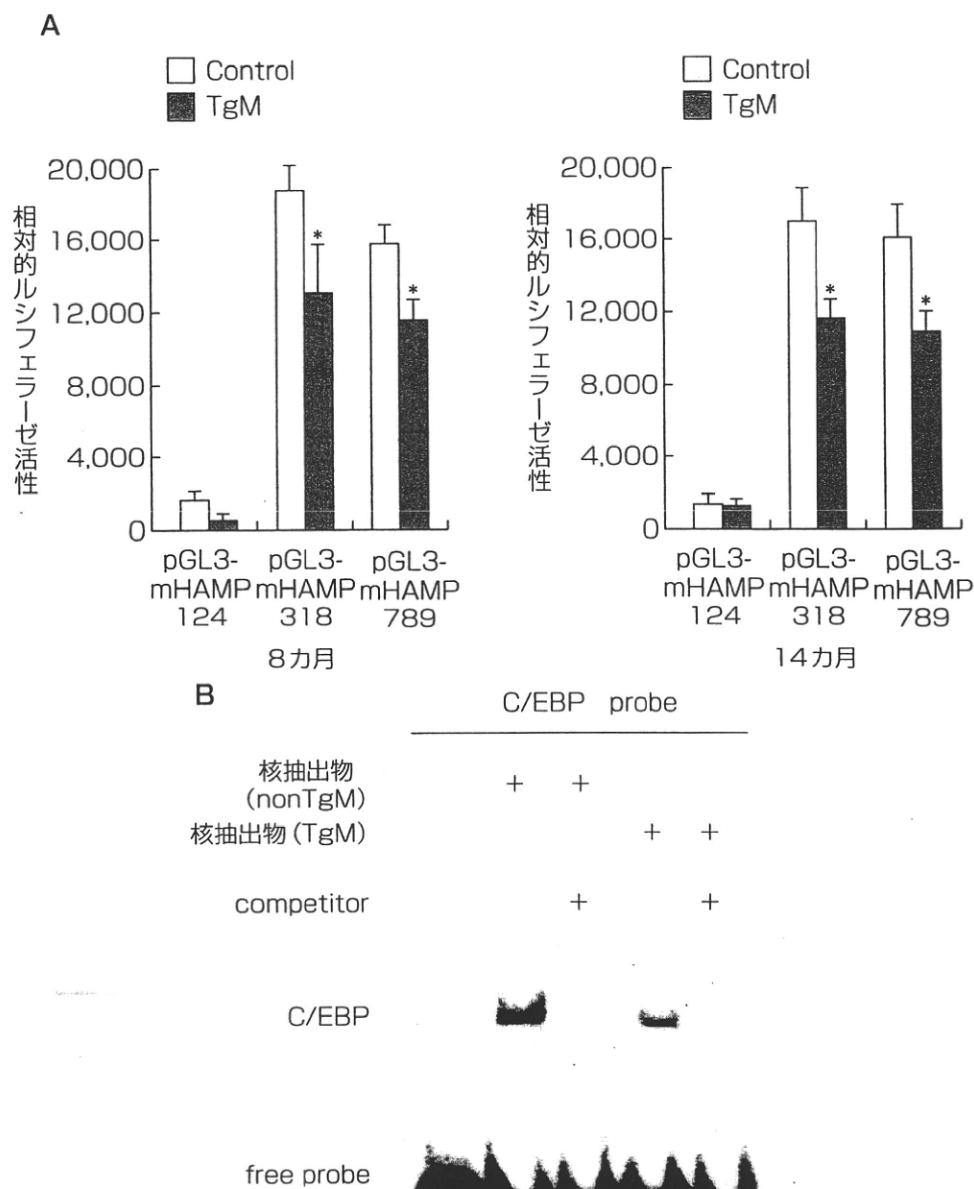


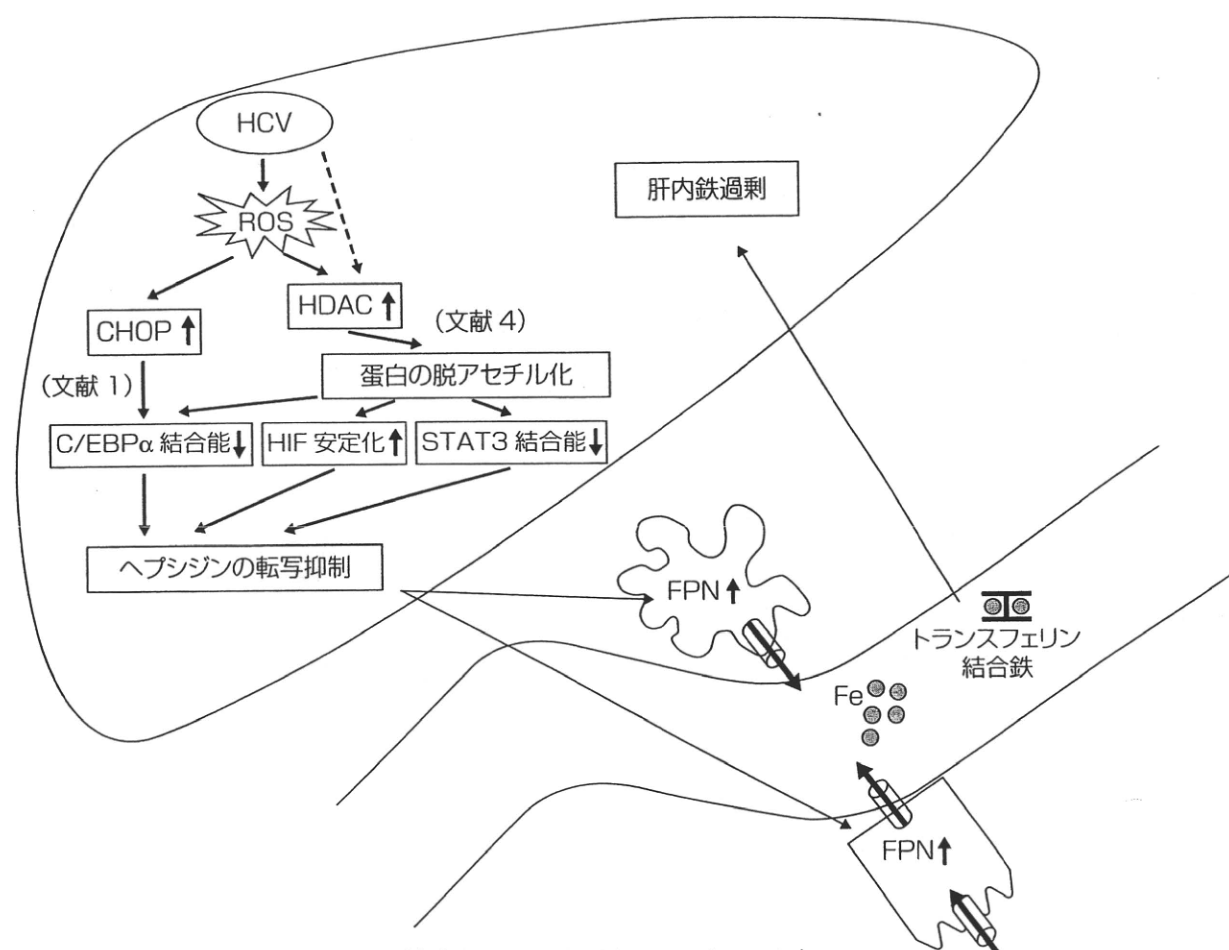
図 2

A : HCV TgM 初代培養肝細胞の hepcidin プロモーター活性
hepcidin プロモーター領域 (pGL3-mHAMP 124, 328, 789) を肝細胞に
transfection し, 相対的ルシフェラーゼ活性によりプロモーター活性を測定した.
B : Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) による C/EBP の DNA 結
合活性の測定
8カ月齢のマウスの肝細胞の核抽出物と horseradish peroxidase でラベルした
C/EBP オリゴヌクレオチドプローブを用いて測定

動していることが明らかとなった。

以上をまとめるとHCV TgMにおける肝内鉄蓄積機構は図3のように考えられる。Brennerらのグループからはhepcidinの転写抑制機構として histone deacetylase (HDAC) 活性の亢進によるヒストンのアセチル化抑制によって転写因子であるC/EBPやSTAT3のプロモーター領域への結

合能が低下することやhepcidinの発現を抑制する hypoxia inducible factorsを安定化させることが報告されているが⁴⁾, HDAC活性亢進の上流にあるのはやはり活性酸素である。このようにHCV感染における鉄代謝障害機構の原因としてhepcidinの転写抑制が挙げられるが, その原因となる活性酸素の産生亢進機構についてはHCVコア



HCV : C型肝炎ウイルス, ROS : 活性酸素, HDAC : histone deacetylase, CHOP : C/EBP homology protein, C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein, HIF : hypoxia inducible factor, STAT : signal transducer and activation of transcription

図3. HCV タンパク存在下における鉄代謝異常機構の模式図

タンパクによるミトコンドリア障害が報告されているが、この詳細については紙面の都合上他書⁵⁾を参考されたい。

2) 鉄蓄積に伴う酸化ストレスと肝発癌

Katoらは瀉血によりC型慢性肝疾患患者の肝発癌が抑制されることを報告し⁶⁾, 肝内鉄蓄積が肝発癌を促進させることを示唆した。しかしその機序については不明な点が多いため、前述のHCV TgMに軽度の鉄過剰餌（通常餌に含有される鉄の5倍濃度）を与えC型慢性肝炎患者と同等の肝内鉄濃度にするにより肝発癌を来たすか否かについて検討した。鉄負荷6カ月目のHCV TgMは肝内の脂肪沈着が亢進し、中心静脈周囲には小滴性脂肪沈着も目立った。さらにミトコンドリアの超微形態異常を認め、脂肪酸

分解も低下した(図4)。鉄負荷12カ月目になると肝内脂質過氧化物とともに8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の蓄積が亢進し、最終的には鉄負荷HCV TgMのみに肝細胞癌を含む肝腫瘍を45% (5/11) 認めた。(図5)。

このようにHCV TgMは肝内鉄濃度がC型慢性肝炎のそれに匹敵してくるとミトコンドリア障害とともに肝内の脂肪沈着が亢進し、遂には酸化ストレスが亢進するとともに酸化的DNA障害が進行し肝発癌を来たすことが明らかになった。しかしこの動物モデルは肝内に炎症や線維化を引き起こさない点がC型慢性肝炎患者と大きく異なっている。炎症と鉄代謝についてはIL-6によるJAK-STATシグナルを介するhepcidinの転写調節機構が存在し、肝内に炎症が強くなるとhep-

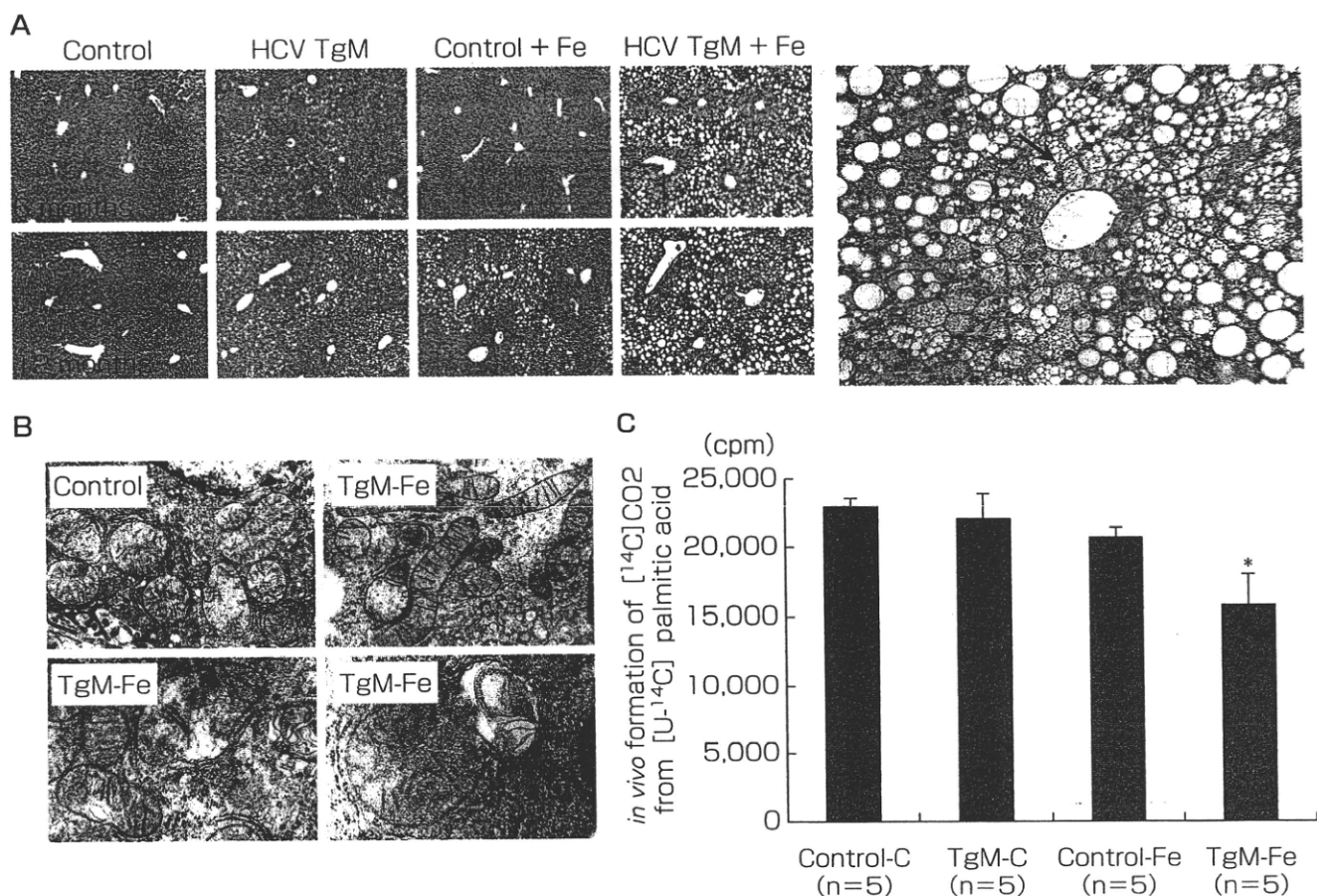


図 4

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

B: コントロールマウスと鉄負荷 HCV TgM の肝臓のミトコンドリアの電子顕微鏡像

C: *in vivo* でのパルミチン酸分解能の比較

^{14}C でラベルしたパルミチン酸を胃チューブを通してマウスに投与し, 6 時間後の呼気中のアイソトープ量 (^{14}C でラベルされた CO_2) を測定することで脂肪酸分解能を測定した。

cidin の転写亢進が予想され, HCV 起因性酸化ストレスによる hepcidin の転写抑制と拮抗する可能性も考えられる。したがって実際の C 型慢性肝疾患における hepcidin の転写調節はより複雑と考えられ, このことは C 型慢性肝疾患患者のなかでも肝内の鉄沈着は様々の程度で起きるという臨床的事実を反映しているように思われる。

2. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH, nonalcoholic steatohepatitis)

NASH では血清 ferritin 値が高値を示すことが多く, その病態に鉄過剰状態が関与しているこ

とが示唆されている。NASH の成立には肝細胞の脂肪沈着に加えて second hit としての酸化ストレスやインスリン抵抗性などが必要と考えられている。この点において鉄は酸化ストレスを増強させるので NASH の病態には重要な因子と考えられる。しかし, なぜ NASH で肝内の鉄蓄積が起るのかについては C 型肝炎ほど明らかにされていないのが現状である。この点について Otagawa らはウサギの NASH モデルを用いて肝内鉄蓄積機序について検討している⁷⁾。この動物モデルの赤血球膜には phosphatidylserine が表出されて赤血球の脆弱性が増し, これにより肝臓の Kupffer 細胞に貪食されやすくなるのが肝内の鉄沈着の一

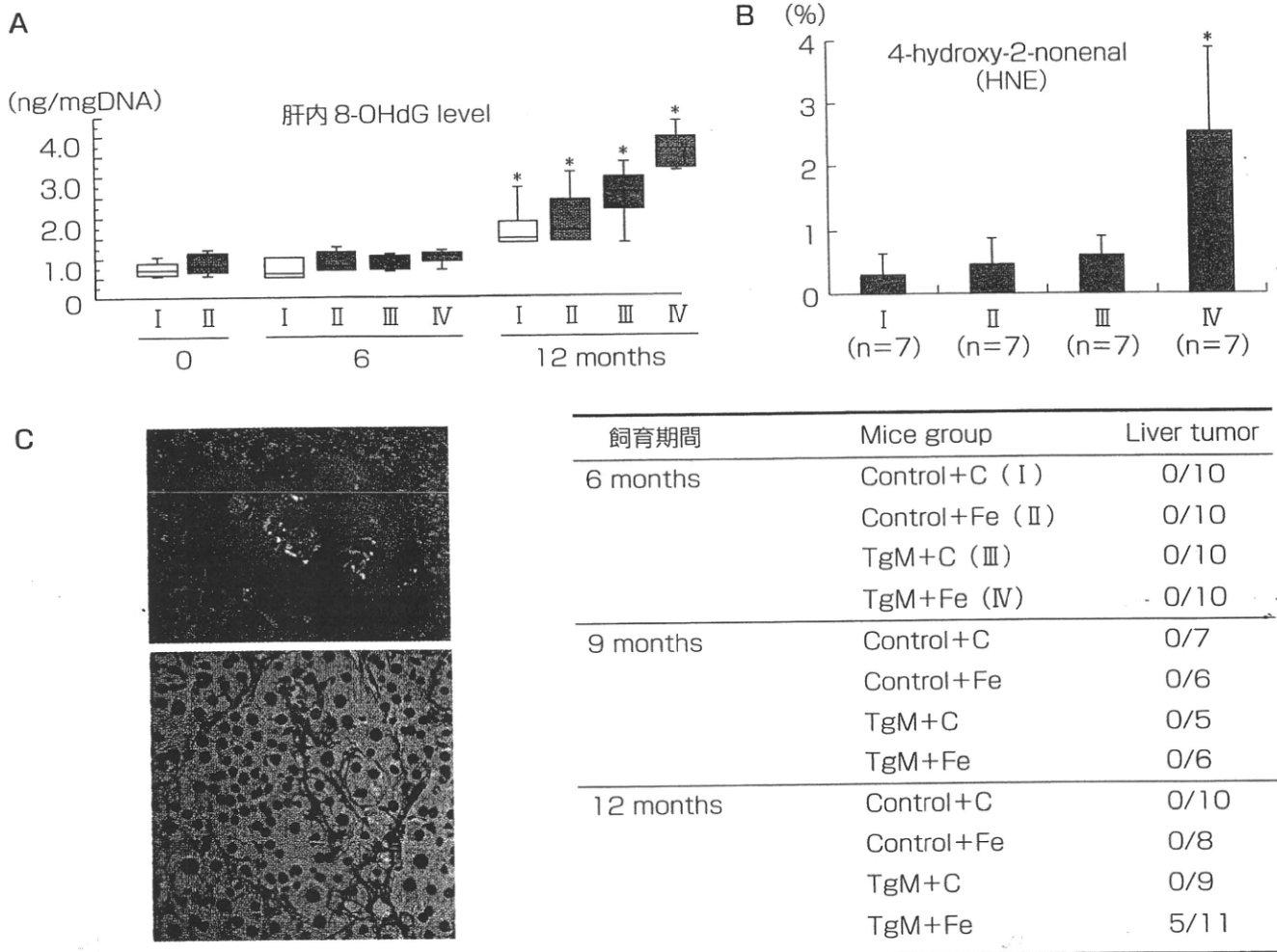


図 5

A : 肝組織内 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 発現量
 B : 12 カ月目の肝組織内脂質過酸化物 (4-hydroxy-2-nonenal, HNE) の発現量
 C : HCV TgM における肝細胞癌

因と考察している。また Yanagitani らはレチノイド受容体機能が障害されているトランスジェニックマウスでは脂肪性肝炎を起こしその後肝癌を発症することを報告しているが⁸⁾, 最近同じグループからレチノイドシグナルが hemojuverin の転写調節に関与していることが報告された⁹⁾。すなわちレチノイドは hemojuverin の転写を抑制することでその下流の transferrin receptor 2 と hepcidin の発現を抑制し、結果としてトランスフェリン鉄の取り込み低下と hepcidin の発現低下による ferroportin の発現亢進が肝細胞からの鉄放出を促進し肝細胞内の鉄を低下させるとしている。この二つの報告を総合すると脂肪性肝炎におけるレチノイドシグナルの障害が肝内鉄過剰を引き

起こす可能性が考えられ興味深い。NASH の病態に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることは周知の事実であるが、C 型肝炎のように酸化ストレスにより hepcidin の発現が低下しているという確証は得られていないのが現状である。NASH の鉄過剰に hepcidin が関与するのか否か、あるいはその他のどのような鉄代謝関連分子が重要な役割を担っているのかについては今後の検討課題である。

3. 除鉄療法の可能性について

C 型慢性肝疾患や NASH での酸化ストレスによる肝組織障害を抑制する意味からもこれらの疾

患に対して肝内の鉄蓄積を軽減することは治療上重要であり、事実C型慢性肝炎に対して瀉血は保険診療として認可されている。SumidaらはパイロットスタディーではあるもののNASHに対して瀉血を行うことにより血清トランスアミナーゼが有意に低下することを報告している¹⁰⁾。NASHの病変進展抑制に瀉血が有効か否かを明らかにするためには前向き randomized control studyが必要と考えられる。

瀉血以外の除鉄療法の試みとしては鉄キレート療法が挙げられる。従来の鉄キレート療法としてはこれまで deferoxamine が用いられてきたが血中半減期が短いため持続点滴か持続皮下注でないと有効性が低く、外来患者で十分な鉄除去率を得るのが困難であった。これに対し輸血による慢性鉄過剰症に対して最近認可された deferasirox は経口の鉄キレート薬であり連日服用することにより十分な鉄キレート作用が期待される。C型慢性肝炎やNASHに対する鉄キレート薬の投与の試みはほとんどなされておらず今後の検討課題かもしれない。

HCV増殖細胞における hepcidin の発現を抑制する histone deacetylase に注目すると、その阻害薬は肝星細胞が筋線維芽細胞に分化することを抑制することが *in vitro* で明らかにされており、また酸化ストレスにより惹起される hypoxia inducible factor の標的遺伝子を不活化する点から抗癌薬として臨床試験も行われている。したがって histone deacetylase 阻害薬はC型肝炎における肝線維化抑制、あるいは除鉄という観点とはやや異なるが hepcidin の発現を亢進させて鉄吸収を抑制するという意味から肝発癌を抑制しうる可能性がある。

おわりに

C型慢性肝炎やNASHの病態には肝内鉄蓄積が関与しており、これは酸化ストレスを引き起こ

して肝硬変や肝細胞癌への進展を促進させる。C型肝炎においては酸化ストレスが鉄代謝障害を引き起こすことが明らかとなってきたが、NASHでは鉄代謝異常が先か、酸化ストレスが先かまだ明らかにされておらず今後の研究課題と考えられる。しかし、両疾患のマネジメントにおいて鉄代謝異常を是正し、酸化ストレスを軽減していくことは大切な治療の一環であることを認識すべきである。

文 献

- 1) Nishina S, et al: Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 134: 226-238, 2008.
- 2) Furutani T, et al: Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 130: 2087-2098, 2006.
- 3) Fujita N, et al: Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med* 13: 97-104, 2007.
- 4) Miura K, et al: Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology* 48: 1420-1429, 2008.
- 5) 日野啓輔: 酸化ストレスからみたC型肝炎の病態. *Frontiers in Gastroenterology* 14: 11-22, 2009.
- 6) Kato J, et al: Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 61: 8697-8702, 2001.
- 7) Otogawa K, et al: Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 170: 967-980, 2007.
- 8) Yanagitani A, et al: Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 40: 366-375, 2004.
- 9) Tsuchiya H, et al: Suppressive effects of retinoid on iron-induced oxidative stress in the liver. *Gastroenterology* 138: 341-350, 2009.
- 10) Sumida Y, et al: Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Hepatol Res* 36: 315-321, 2006.