

TNM分類でのstage IIIが7例、IVAが23例、JISスコア⁶⁾2以下が7例、3以上が23例、CLIPスコア⁷⁾2以下が13例、3以上が17例であった。門脈浸潤の程度はVp1またはVp2が18例、Vp3以上が12例であった。血液生化学検査では血清ビリルビン値が1.1±0.1mg/dL、アルブミン値が3.5±0.1g/dL、プロトロンビン時間が77.2±2.2%、血小板数が14.7±1.4×10⁴/μL、腫瘍マーカーではAFP値が33,715±13,255ng/mL、AFP-L3分画は23.1±4.6%、PIVKA-II値は37,905±17,417 mAU/mLであった。

平均4.2サイクルの5-FU動注/IFN併用療法を行った結果、全体での平均生存期間は7.5ヵ月、1年ならびに2年生存率はそれぞれ53%、33%であった。治療効果は1例(3%)がCR、8例(27%)がPR、13例(43%)がSD、8例(27%)がPDであった。治療効果群(CRまたはPR)の平均生存率は12.7ヵ月、1年/2年生存率は87/69%であったのに対し、治療効果の認められなかった群(SDまたはPD)の平均生存率は7.5ヵ月、1年/2年生存率は40/11%であり、治療効果群では有意に生存率が

良好であった(p=0.019) (図1)。5-FU動注/IFN併用療法のPR症例のうち2例は肝細胞癌のdownstagingに伴いその後肝切除あるいはTACEを受け、1例はカテーテルのdislocationに伴いTACEが行われた。次に5-FU動注/IFN併用療法を受けた患者の生存率に寄与する因子について単変量解析を行ったところ、血清ビリルビン値、CLIPスコア、治療効果が有意な因子として抽出されたが(表2)、多変量解析では治療効果のみが有意な因子として抽出された(表3)。そこで治療効果に関連する因子について単変量解析、多変量解析を行ったが、治療効果を予測する因子は見出し得なかった。PBMC中のIFNAR2発現量を解析し得た11例の治療効果は7例がCRまたはPR、4例がSDまたはPDであった。治療効果群のIFNAR2発現量(6.5±2.4)は治療効果の認められなかった群の発現量に(2.4±0.6)に比べて有意に高かった(p=0.012) (図2)。

副作用としては大半の症例にグレード1または2の発熱、嘔気、食欲不振などの症状を認めた。

表1 患者背景

患者数	30
年齢(mean±SD) (range)	64.7±1.77(48-84)
性差(男/女)	24/6
病因(HBV/HCV/NBNC)	8/18/4
総ビリルビン値(mean±SD, mg/dL)	1.1±0.1
アルブミン値(mean±SD, g/dL)	3.5±0.08
プロトロンビン時間(mean±SD, %)	77.2±2.2
血小板数(mean±SD, ×10 ⁴ /μL)	14.7±1.4
AFP値(mean±SD, ng/mL)	33,715±13,255
AFP-L3分画(mean±SD, %)	23.1±4.6
PIVKA-II値(mean±SD, mAU/mL)	37,905±17,417
Child-Pugh分類(A/B/C)	23/7/0
TNM分類 by LCSGJ(Ⅲ/ⅣA)	7/23
JISスコア(1, 2/3, 4, 5)	7/23
CLIPスコア(1, 2/3, 4, 5)	13/17
門脈浸潤(Vp1 or Vp2/Vp3 or Vp4)	18/12

LCSGJ, Liver Cancer Study Group of Japan;
JIS, Japan integrated staging;
CLIP, Cancer of the Liver Italian Program.

図1 5-FU動注/IFN併用療法奏効群と非奏効群の生存率の比較

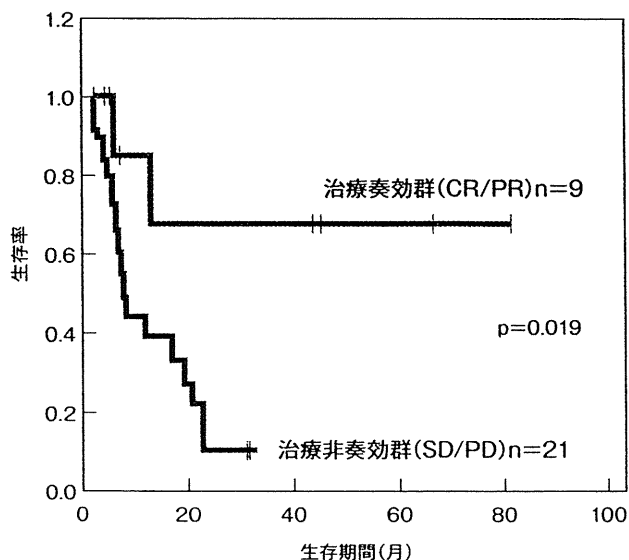


表2 5-FU動注/IFN併用療法治療後の生存率に寄与する因子(単変量解析)

変数	Hazard ratio	95% CI	p value
年齢	0.956	0.907-1.007	0.091
男性	2.675	0.694-10.311	0.153
HBs抗原陽性	0.460	0.169-1.249	0.128
HCV抗体陽性	1.503	0.604-3.735	0.381
総ビリルビン値(mg/dL)	3.222	1.420-7.313	0.005
アルブミン値(g/dL)	0.413	0.143-1.193	0.102
プロトロンビン時間(%)	0.964	0.917-1.014	0.160
血小板数($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0.976	0.918-1.036	0.976
AFP値(<100ng/mL)	1.372	0.551-3.416	0.497
AFP-L3分画(<20%)	1.509	0.610-3.731	0.373
PIVKA-II値(<100mAU/mL)	0.445	0.101-1.954	0.283
Child-Pugh分類 A	2.549	0.950-6.843	0.063
腫瘍ステージ III	2.995	0.858-10.460	0.086
JISスコア(<3)	2.995	0.858-10.460	0.086
CLIPスコア(<3)	3.421	1.222-9.576	0.019
門脈浸潤(<Vp3)	2.288	0.871-6.010	0.093
治療効果(CR or PR)	4.960	1.136-21.668	0.033

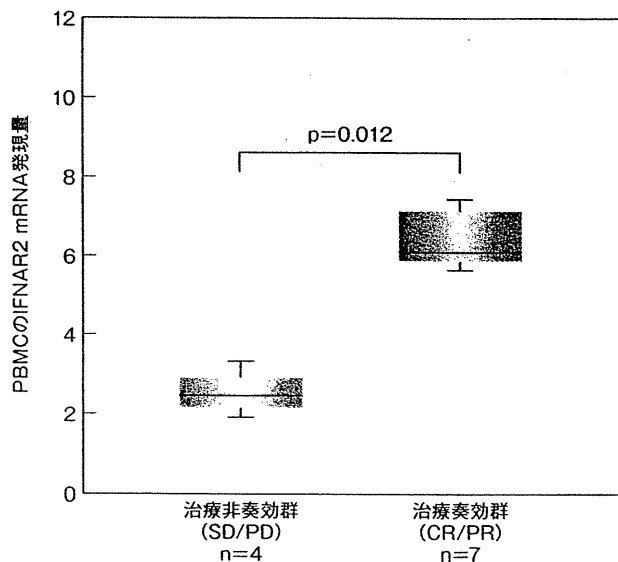
LCSGJ, Liver Cancer Study Group of Japan; JIS, Japan integrated staging; CLIP, Cancer of the Liver Italian Program.

表3 5-FU動注/IFN併用療法治療後の生存率に寄与する因子(多変量解析)

変数	Hazard ratio	95% CI	p value
総ビリルビン値(mg/dL)	1.076	0.484-3.711	0.574
CLIPスコア(<3)	3.434	0.907-13.000	0.069
治療効果(CR or PR)	5.478	1.108-27.093	0.037

グレード3の副作用は口内炎が2例、下痢、出血性胃潰瘍、白血球減少、血小板減少がそれぞれ1例に認められた。カテーテルに伴う合併症としては閉塞が2例、先端の位置移動が1例、カテーテル感染が1例に認められた。

図2 5-FU動注/IFN併用療法奏効群と非奏効群におけるPBMCのIFNAR2 mRNA発現量



考察

5-FU動注/IFN併用療法の作用機序については、IFN- α/β により癌抑制遺伝子であるp53の転写が誘導されることが報告されている⁸⁾。また、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 受容体を介した抗腫瘍効果の可能性⁹⁾、IFNと5-FUが相互に抗腫瘍効果を増強する可能性など¹⁰⁾⁻¹²⁾が報告されている。今後、更なる研究により詳細な作用機序が明らかになると期待される。

本研究での5-FU動注/IFN併用療法の治療奏効率(30%)、平均生存期間(7.5ヵ月)、1年/2年生存率(55/33%)は、本邦で行われたこれまでの5-FU動注/IFN併用療法の成績¹⁾⁻³⁾とほぼ同様であった。今回のCR症例とPR後に肝切除を受けた2例は無再発のまま6年以上生存しており、PR後にTACEが繰り返された2例も約3.5年の生存を認めたことより、少数例ではあるものの5-FU動注/IFN併用療法が奏効し、その後適切な治療が行われれば、たとえ進行肝細胞癌でも長期生存が期待できると考えられる。その一方で70%の症例は治療に反応せず、著しい副作用は認めなかったものの治療によりQOLが損なわれる可能性も認識すべきである。今回の検討において5-FU動注/IFN併用療法を行った患者の生存期間に寄与する因子は唯一治療効果のみであったことから、進行肝細胞癌症例に対して5-FU動注/IFN併用療法の適応を決定するに際してはその治療効果を予測することの重要性が確認された。しかし、残念なことに治療効果を予測する臨床的因子は明らかでなかった。

この点においてOtaらが報告した肝組織中のIFNAR2の発現が5-FU動注/IFN併用療法の治療効果と相関するという報告²⁾は興味深い。しかしながら、進行肝細胞癌では血小板減少や

プロトロンビン活性の低下による出血傾向を合併していることも多く、5-FU動注/IFN併用療法前に肝生検を行うのが困難な場合も多い。筆者らは以前にC型慢性肝炎患者の肝組織とPBMCでのIFNAR2発現量は相関することを報告し¹³⁾、また肝組織でのIFNAR2タンパク発現量とIFNAR2 mRNA発現量が相関することも報告した¹⁴⁾。今回の検討では少数例の検討ながら5-FU動注/IFN併用療法の奏効群においてPBMCでのIFNAR2発現量が非奏効群に比べて有意に高いことが示された。この成績はPBMCでのIFNAR2発現量が進行肝細胞癌症例に対する5-FU動注/IFN併用療法の治療効果予測因子となり得る可能性を示すものであるが、少数例の検討故、多変量解析による評価が行えず真に治療効果を予測する独立因子か否かは不明である。この点については今後多数例での検討を行う必要があると考えている。また、肝組織のIFNAR2発現量が多いとなぜ治療効果と相関するのかその機序についても不明のままであり、この点についても更なる検討が必要と考えられる。

〈文 献〉

- 1) Sakon M et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* **94** : 435-442, 2002.
- 2) Ota H et al : Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon-alpha and intra-arterial 5-fluorouracil ; role of type 1 interferon receptor expression. *Br J Cancer* **93** : 557-564, 2005.
- 3) Obi S et al : Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. *Cancer* **106** : 1990-1997, 2006.
- 4) Uka K et al : Pretreatment predictor of response, time to progression, and survival to intraarterial 5-fluorouracil/interferon combination therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **42** : 845-853, 2007.
- 5) Kamai T et al : Increased interferon alpha receptor 2 mRNA levels is associated with renal cell carcinoma metastasis. *BMC Cancer* **7** : 159, 2007.
- 6) Kudo M et al : Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma : the JIS score compared with the CLIP score. *Hepatology* **40** : 1396-1405, 2004.
- 7) Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators : A new prognostic system for hepatocellular carcinoma : a retrospective study of 435 patients : the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* **28** : 751-755, 1998.
- 8) Takaoka A et al : Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424** : 516-523, 2003.
- 9) Yamamoto T et al : Partial contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) /TRAIL receptor pathway to antitumor effects of interferon-alpha/5-fluorouracil against Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* **10** : 7884-7895, 2004.
- 10) Wadler S et al : Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies : a review. *Cancer Res* **50** : 3473-3486, 1990.
- 11) Schwartz EL et al : Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **182** : 1232-1239, 1992.
- 12) Damdinsuren B et al : Interferon-beta is more potent than interferon-alpha in inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth when used alone and in combination with anticancer drugs. *Ann Surg Oncol* **10** : 1184-1190, 2003.
- 13) Yamaguchi Y et al : Expression of type I interferon receptor in liver and peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C patients. *Dig Dis Sci* **47** : 1611-1617, 2002.
- 14) Fujiwara D et al : Hepatic expression of type I interferon receptor for predicting response to interferon therapy in chronic hepatitis C patients : a comparison of immunohistochemical method vs. competitive polymerase chain reaction assay. *Hepatol Res* **25** : 377-384, 2003.

* * *

討

【小俣】ありがとうございました。

【山本】肝組織中のreceptorと、癌の部分のreceptorと、PBMCのreceptorがなぜ相関するのでしょうか。

【日野】癌の部分はみていません。C型慢性肝炎の肝組織のIFN receptorは末梢血のリンパ球のそれと相関していました。

【山本】肝組織中と末梢血のreceptorの発現が相関する理論的根拠はありますか。

【日野】それは分かりません。

【小俣】SNPアナリシスも含めてgeneticに行っているものが共通にあれば、それはリンパ球も肝臓も同じだと考えます。IL-28もそうですが、基本的にそこが共通ということだと思います。ですから、内因性のreceptorの制御にしても、SNPアナリシスでファンクショナルなものが違うので多分同じだといえます。阪大が組織で染めて報告したのが最初です。それを臨床で使うため

論

には取れるリンパ球であったということで、今後臨床的意義があると思います。

【林】私はこの阪大の外科の成績をいつも審査していました。もう何回も調べていて、1つ分からないことは、IFNの発現が低いといってもIFN receptorが発現しています。当然のことながらIFNを投与したらIFNのシグナルがいくので、なぜIFN receptorの発現の高低で治療効果が出るかという説明にはなっていない気がしますが、先生のお考えはございますか。

【日野】阪大の成績では、全く発現していないものの中にPRは1例もなかったというストーリーは非常に理解できると思います。確かにIFN receptorの発現の程度とその後のシグナルの強弱については、今後の検討課題と考えます。

【小俣】また2年後に症例を増やしてください。ありがとうございました。

* * *

第28回 犬山シンポジウム記録集

肝炎・肝癌の新しい診断と治療

発行日 2011年6月20日 第1版第1刷発行

編集集 犬山シンポジウム記録刊行会

編集・制作 株式会社嵯峨野

発行所 株式会社メディカルトリビューン

〒102-0074 東京都千代田区九段南2-1-30 イタリア文化会館ビル8F

電話 03-3239-7219(販売課) FAX 03-3239-7243

印刷・製本 凸版印刷株式会社

©2011 Printed in Japan
ISBN 978-4-89589-368-8

[検印廃止]

定価はカバーに表示してあります。
落丁・乱丁の場合はお取り替えいたします。

JCOPY

<(社) 出版者著作権管理機構 委託出版物>

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(社) 出版者著作権管理機構(電話 03-3513-6969、FAX 03-3513-6979、e-mail: info@jcopy.or.jp) の許諾を得てください。

第7回「酸化ストレスと肝」研究会 記録

酸化ストレスと 肝疾患

編集 沖田 極

第7巻

目次

【開会の挨拶】 社会保険下関厚生病院 沖田 極 3

Session 1 ● 肝疾患と酸化ストレス(基礎1)

【座長】 東京大学医学部 消化器内科 小池 和彦

- 一般演題1 C型肝炎ウイルスコア蛋白質発現によるTGF β 1/NADPHオキシダーゼ、酸化ストレス、レチノイン酸シグナルへの影響 9
鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生医科学専攻遺伝子医療学部門 星川 淑子 ほか
- 一般演題2 高フルクトース食はジエチルニトロサミン投与によるGST-P陽性肝腫瘍発症を促進する 15
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学 宇都 浩文 ほか
- 一般演題3 リポ多糖体により誘導される酸化ストレスは非アルコール性脂肪肝炎の病態進展に関与する 21
横浜市立大学大学院医学研究科 分子消化管内科学 今城 健人 ほか

Session 2 ● 肝疾患と酸化ストレス(基礎2)

【座長】 大阪府済生会吹田病院 岡上 武

- 一般演題4 HCVcore遺伝子発現マウスを用いた各種脂質代謝関連治療薬の抗酸化作用の検討 31
東京大学大学院医学系研究科 感染制御学 森屋 恭爾 ほか
- 一般演題5 マウス脂肪肝の鉄代謝異常におけるBMP family発現変化に関する検討 35
旭川医科大学 内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 大竹 孝明 ほか
- 一般演題6 過剰鉄とミトコンドリア障害が誘導する酸化ストレスはC型肝炎ウイルス増殖を抑制する 41
川崎医科大学 肝胆臓内科学 是永 匡紹 ほか

Session 3 ● 肝疾患と酸化ストレス(臨床1)

【座長】 東京女子医科大学 消化器内科 橋本 悦子

- 一般演題7 当院における健診および病診連携の活用によるNAFLD患者の拾い上げと栄養指導中心の加療への試み 49
社会保険下関厚生病院 肝臓病センター 木村 輝昭 ほか
- 一般演題8 当院におけるNASHの臨床経過と予後の検討 59
川崎医科大学附属川崎病院 肝臓消化器センター 内科 川中 美和 ほか
- 一般演題9 NASH診断のための各種スコアリングシステムの比較検討 65
市立奈良病院 消化器肝臓病センター 角田 圭雄 ほか

特別講演 1

- グリチルリチンの薬効と抗酸化ストレス 75
【座長】札幌医科大学 分子標的探索講座 新津 洋司郎
【演者】株式会社ミノファーゲン製薬 研究所長 井上 秀雄

特別講演 2

- レドキシゾーム[チオレドキシシン・TBP-2システム]；酸化ストレスと炎症の制御機構 89
【座長】久留米大学 名誉教授 谷川 久一
【演者】京都大学名誉教授 淀井 淳司
京都大学ウイルス研究所・JBPA [日本バイオストレス研究振興アライアンス]

Session 4 ● 肝疾患と酸化ストレス(基礎3)

【座長】鹿児島大学医学部 消化器内科 坪内 博仁

- 一般演題10) DDC投与マウスモデルにおけるMallory-Denk Body形成と性差 103
久留米大学 先端癌治療研究センター 花田 慎一郎 ほか
- 一般演題11) 脂肪性肝炎の病態に対するトランス脂肪酸摂取の関与 109
順天堂大学医学部 消化器内科 今 一義 ほか
- 一般演題12) 新規酸化ストレスマーカー γ -グルタミルジペプチドによる
肝疾患スクリーニング 115
慶應義塾大学 先端生命科学研究所 曾我 朋義

Session 5 肝疾患と酸化ストレス(臨床2)

【座長】川崎病院 肝臓・消化器病センター 内科 山田 剛太郎

- 一般演題13) 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)における鉄蓄積と
鉄代謝関連分子の発現についての検討 127
京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学 光吉 博則 ほか
- 一般演題14) NASH患者におけるangiotensinogenハプロタイプの検討 135
高知大学医学部 消化器内科学 小野 正文 ほか
- 一般演題15) 酸化ストレスマーカー「血清d-ROMs値」とC型慢性肝炎の病態 139
佐賀大学医学部 内科学講座 高橋 宏和 ほか

- 【閉会の挨拶】 147
社会保険下関厚生病院 沖田 極

過剰鉄とミトコンドリア障害が誘導する酸化ストレスはC型肝炎ウイルス増殖を抑制する

是永 匡紹*・池田 正徳**・加藤 宣之**・日野 啓輔*

はじめに

筆者らは、C型肝炎ウイルス(HCV)トランスジェニックマウス(TgM)において、HCVコア蛋白が肝ミトコンドリア呼吸鎖複合体I障害を惹起し、酸化ストレスが亢進することを報告してきた¹⁾。また、別グループからも、シャペロン機能を有するprohibitinによって複合体IVの障害を誘導することが報告され²⁾、C型慢性肝疾患ではミトコンドリア異常を介して、酸化ストレスを亢進させ、肝発癌の一機序になると考えられる。但し、臨床においてALT持続性正常者からの肝発癌は高齢者を除けば非常に稀であり、<HCV蛋白+ミトコンドリア障害>に更なる外的ストレスである肥満、アルコール、鉄蓄積が加わって初めて発癌に至ると推測される。

また、HCV TgMではHCV蛋白が誘導する酸化ストレスの亢進が鉄制御因子ホルモンであるヘプシジン(hepcidin)の発現低下を誘導することで、鉄を取り込みやすく(肝内鉄過剰に)なることや、鉄過剰食を与えることで6ヵ月目にはミトコンドリアの形態異常や肝脂肪化が出現、12ヵ月目には雄にのみ肝発癌が認められることを報告してきた^{3) 4)}。これら一連の仕事は、「肝内鉄過剰は酸化ストレスを亢進するので生体内にとって不利益」を旗印にしているが、「なぜHCVは肝臓内

に鉄を蓄積するのか?」「なぜ宿主は防御できないか?」という疑問には答えがない。

鉄はウイルス増殖に限らず生物に不可欠な物質であり、ウイルスが増殖するために肝細胞を保護すると考えれば、より鉄が必要なかもしれない。一方でC型慢性肝炎では、瀉血を行った後に抗ウイルス療法を行うと治療成績が良いという報告⁵⁾や、ミトコンドリアにはウイルス感知システム(MAVS)が存在しその機能異常が抗ウイルス効果に関与すること⁶⁾を考慮すると、鉄過剰状態ではウイルス排除が困難になりHCVによっては非常に好都合であるが、HCVが増殖するか否かは明らかではない。今回は、鉄とミトコンドリア障害が誘導する酸化ストレスがHCV増殖について影響を与えるかの検討を行った。

材料と方法

HCV replicon増殖細胞に様々な鉄を負荷することにより、HCV活性が影響されるか否かを検討した。このreplicon細胞ではミトコンドリア複合体Iの機能異常が確認されている⁷⁾。Yano et alの報告^{8) 9)}では、Fe(II) SO₄、Fe₃(III) (NO₃)₃を負荷することでHCV増殖は抑制され、抗酸化剤であるビタミンE、C投与ではHCV増殖は増加するとされる。今回Fe(II) SO₄、Fe₃(III) (NO₃)₃

Iron induced oxidative stress interacts with viral replication in full genomic hepatitis C virus replicon cells

*KORENAGA Msaaki et al 川崎医科大学 肝胆臓内科学[〒710-0192 岡山県倉敷市松島577]

**IKEDA Masanori et al 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス分野

以外にも、FeCl₂、FeCl₃、holo-transferrin鉄を用いて、そのHCV増殖抑制の有無を検討した。また、酸化ストレスの亢進の有無は、DCFDA蛍光色素強度を用いて測定し、抗酸化剤としてcoenzyme Q10(CoQ)を使用した。最後に、抗ウイルス療法中の酸化ストレスマーカーを測定し、治療効果との関係を検索した。

結果① 第一鉄投与により酸化ストレスは亢進し、HCV増殖は抑制される

Fe(II) SO₄、Fe₃(III) (NO₃)₃負荷48時間後、HCV増殖は抑制され(図1)、その現象はFeCl₂、FeCl₃を用いても同様であった(図2)。第二鉄(3価鉄)でHCV増殖が低下した理由は不明であるが、第一鉄(2価鉄)を投与した時に酸化ストレスの亢進が確認された。2価鉄は、Fenton反応

図1 Fe(II) SO₄/Fe₃(III) (NO₃)₃はHCV増殖を低下させる

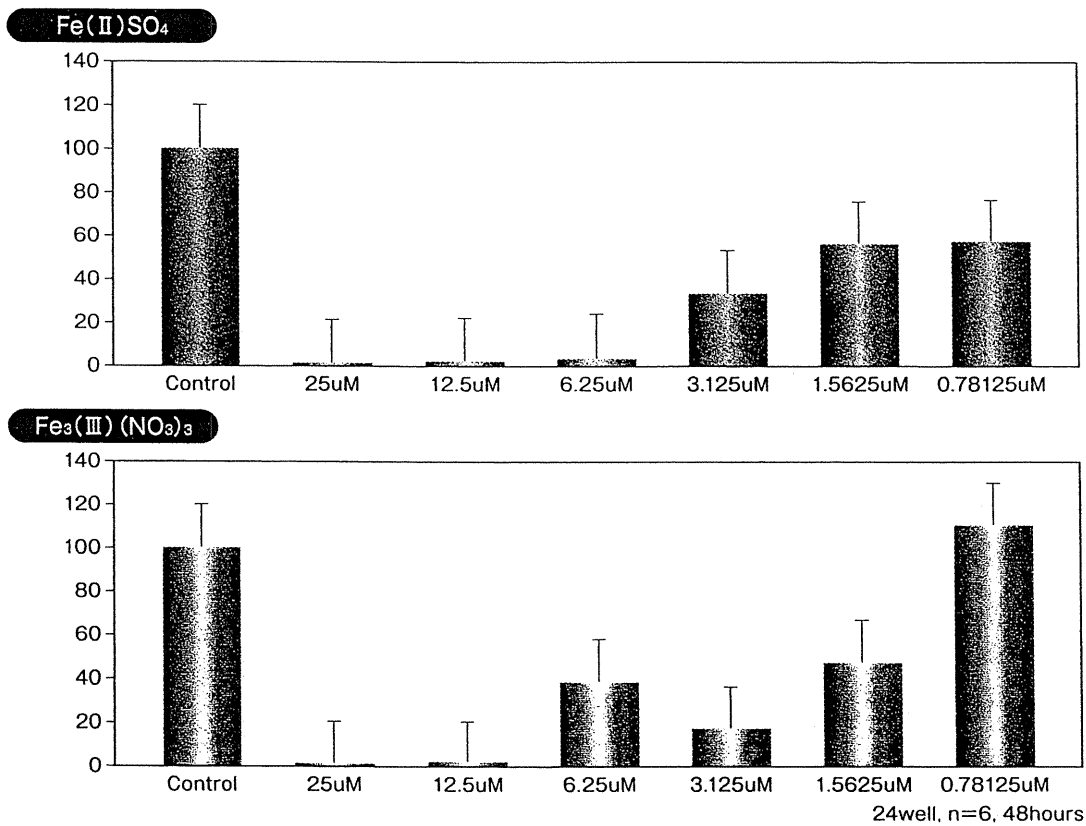
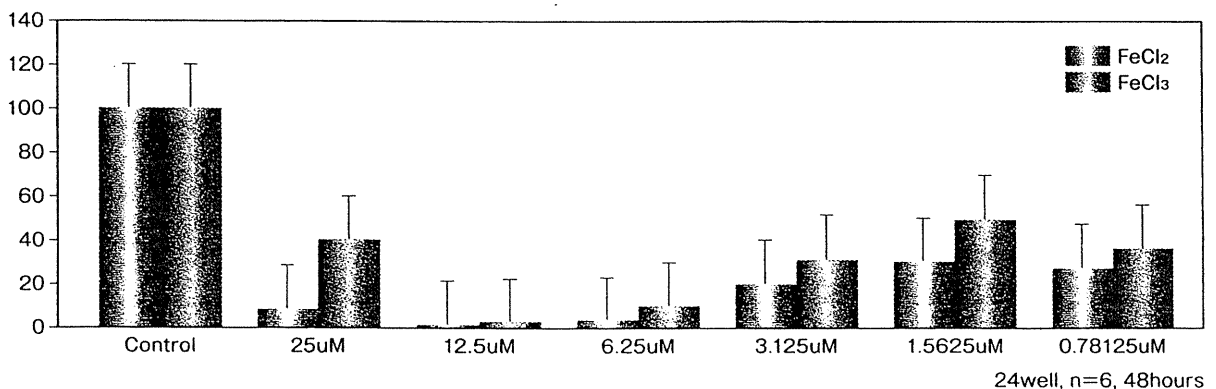


図2 FeCl₂/FeCl₃はHCV増殖を低下させる



を誘導し、強力なラジカルを産生するが観察範囲内では細胞増殖抑制作用は認めなかった(図3) また、鉄負荷24、72時間後も濃度依存性にHCV増殖抑制を認め、IFNを併用することで、相加的にHCV増殖抑制は促進され、鉄はIFNの抗ウイルス作用に影響を及ぼさないことが確認された(図4)。

結果② 酸化ストレスを抑制することで、HCV増殖は亢進する

2価鉄負荷が及ぼす酸化ストレスが、HCV増殖を抑制することが明らかになったため、CoQ (10uM) を2価鉄と併用投与するとHCV増殖抑制効果はcancelされ、鉄負荷を行っていないreplicon細胞ではHCV増殖の増強が確認された(図5)。

この現象は、Vitamin EやN-Acetyl Cysteine (NAC)と投与しても同様であった。

結果③ transferrin鉄と無血清培地を用いてもHCV増殖は抑制される

また、これまでの投与した鉄剤が肝細胞に取り込まれ、肝内鉄過剰を形成し酸化ストレスを亢進しているか否かは不明である。実際BSAのtransferrinが2価鉄を抱合し、ヒト肝細胞に取り込まれるか明確なevidenceがないため、holo-transferrin鉄(0.05-5ng/uL)を血清は除いた培養中に投与し、同様にreplicon細胞のHCV増殖を測定したところ、前述の検討同様にHCV活性が抑制された(図6)。

図3 Fe(II)SO₄/FeCl₂負荷時に酸化ストレス亢進が確認されるが、細胞増殖抑制効果は認められない

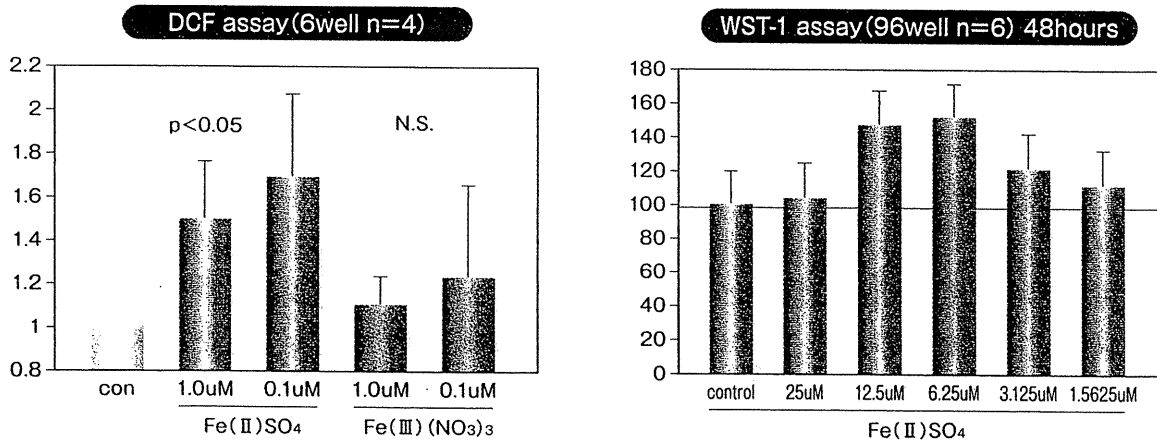


図4 Fe(II)SO₄負荷時によるHCV増殖抑制効果はIFN投与により増強される

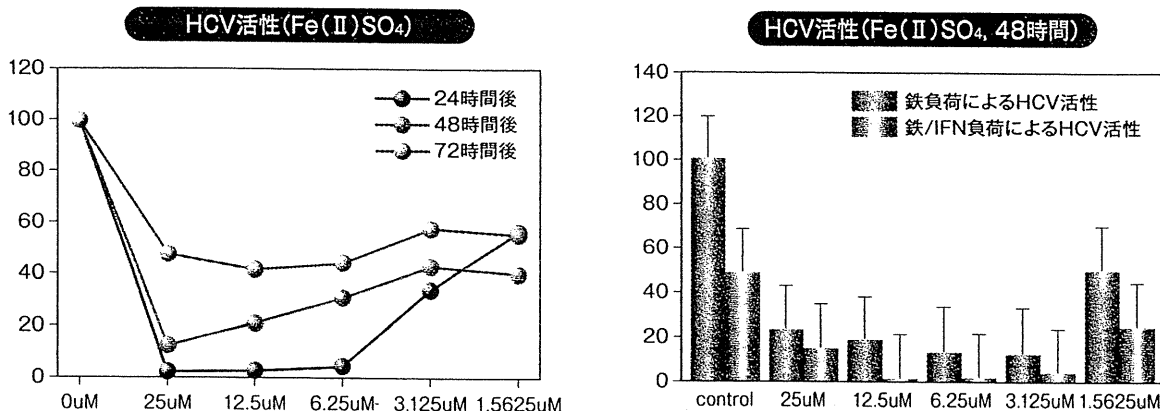


図5 Fe(II)SO₄が誘導するHCV活性低下は、酸化ストレスを抑制することで改善する

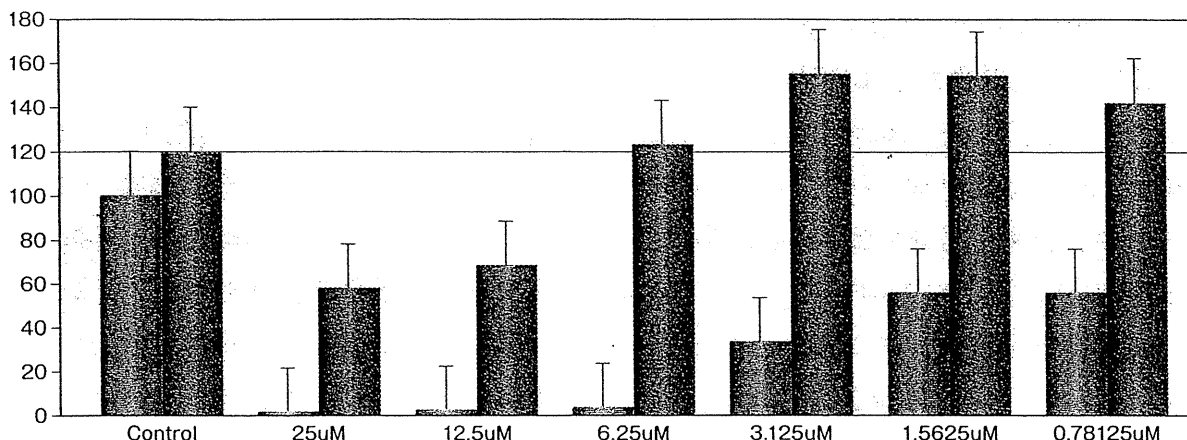
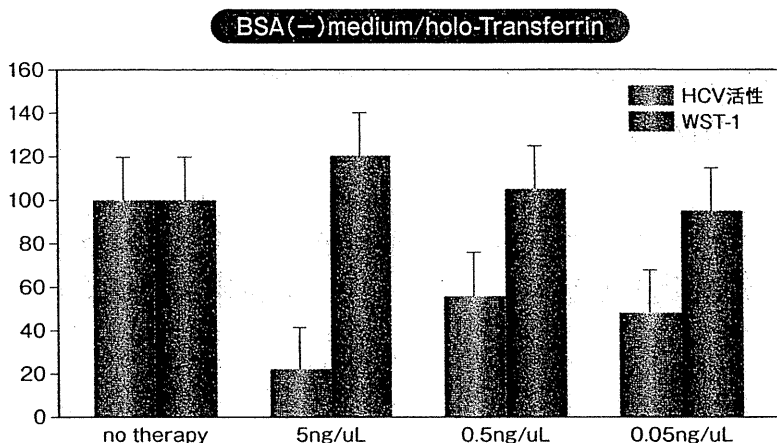


図6 血清をfreeにしても、HCV活性は鉄負荷によって抑制される



結果④ 酸化ストレスの一過性亢進はウイルス排除に必要である

これまでの結果で、酸化ストレス亢進によってHCV増殖が抑制され、抗酸化剤投与によりHCV増殖が亢進するという事が判明したが、これは臨床面でどのような意義をもつのであるか? 実際、瀉血を行うとHCV RNAが減少するという報告は見られないし、リバビリンによる貧血によって治療効果が左右される現在の治療法において、瀉血を行うphysicianは存在しない。筆者らが示したように、鉄剤を加え酸化ストレスを亢進させてから、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法(PegIFN/RBV)を行うことも難しい。そこで、PegIFN/RBV投与中ウイルス排除が早期に行わ

れたearly viral responder (EVR) 症例とそれ以外のlate viral responder (LVR)、non viral responder (NVR) 症例において、投与中の酸化ストレスマーカー(尿中8OHdG)を経時的(2, 4, 12週)に測定すると、EVR例では一過性に尿中8OHdGが上昇し、その後低下するのに対し、LVR/NVR例では経過中に変化を認めなかった(図7)。このことは、ウイルス排除にはやはり酸化ストレスが必要であり、ウイルス排除治療中には抗酸化作用を有する薬剤の併用は避けるべきと推測された。

図7 EVR症例において、投与中の尿中8OHdGが上昇している

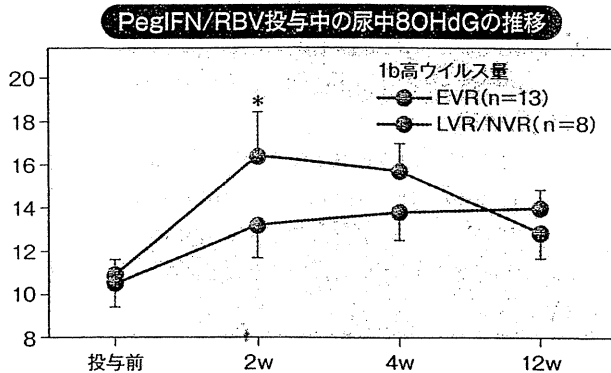
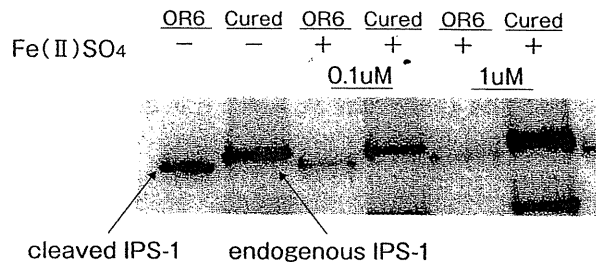


図8 cleavedされたIPS-1は鉄負荷によって減少する



結果⑤ 宿主は鉄過剰が誘導する酸化ストレスによって、ウイルス増殖を調節する可能性がある

最後に2価鉄負荷に伴うMAVSとミトコンドリア障害について確認した。replicon細胞のIPS-1は、HCVによりミトコンドリアからcleavageされていた。鉄負荷によるHCV増殖抑制効果により、その発現は減少していたが、HCVが増殖していないcured細胞の様にミトコンドリア外膜の発現(endogenous)は確認されなかった(図8)。また、ミトコンドリア複合体I発現も鉄負荷により抑制されており、宿主側はミトコンドリアから酸化ストレスを亢進させ、HCV増殖をcontrolする可能性が考えられた。また、鉄負荷によるHCV増殖抑制はMAVS非依存性であることが推察された。この酸化ストレスの亢進によりHCVのウイルス量がどんどん増殖することは避けられるものの、ミトコンドリア障害は継続し、酸化ストレスは亢進し肝発癌促進へとつながるのではないかと考えている。

まとめと考察

今回の検討で、HCV replicon増殖細胞において、鉄負荷による酸化ストレス亢進が、Replicon増殖を抑制していた。他施設からも、*in vitro*ではNS5Bに鉄が結合することでHCVが抑制される

ことやHCV初期感染を抑制することが報告されている^{10) 11)}。

但し、*in vitro*での検討は、急に酸化ストレスが亢進した状態であり、通常のC型慢性肝炎の状態とは異なっている可能性があり、長期的な鉄過剰状態を作成するために、培養液内の鉄濃度を増やすか、*in vivo*でもIFN産生能を確認すべきだと思われる。実際にpreliminaryながらHCV TgMに鉄負荷と抗酸化剤を6ヵ月間併用したモデルでは鉄過剰が抑制され、IPS-1発現が維持されIFN β 発現亢進も確認されている。

本研究の臨床モデルとしてはHCV排除を目的としたPegIFN/RBV投与開始前を想像して欲しい。IFN投与が誘導する酸化ストレスの亢進を、抗酸化作用を有する薬剤(ビタミンE, ウルソデオキシコール酸など)によりblockすることは、抗ウイルス効果を減弱する可能性があり併用は避けるべきである。誤解しないで欲しいことは、ウイルス排除が困難な場合に併用するなどしているのではないということである。

今回の検討より、C型慢性肝炎による鉄過剰状態の形成に、宿主側が酸化ストレスを亢進させHCV増殖をcontrolしている(増殖させ過ぎない)可能性があるも、その継続は、さらなる酸化ストレスを誘導し肝発癌を促進すると推測された。

〈文献〉

- 1) Korenaga M, Wang T, Weinman SA et al : Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species(ROS) production. *JBC* **280** : 37481-37488, 2005.
- 2) Tsutsumi T, Matsuda M, Koike K et al : Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* **50** : 378-386, 2009.
- 3) Furutani T, Hino K, Korenaga M et al : Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* **130** : 2087-2098, 2006.
- 4) Nishina S, Hino K, Korenaga M et al : Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* **134** : 226-238, 2008.
- 5) Desai TK, Jamil LH, Balasubramaniam M et al : Phlebotomy improves therapeutic response to interferon in patients with chronic hepatitis C : a meta-analysis of six prospective randomized controlled trials. *Dig Dis Sci* **53** : 815-822, 2008.
- 6) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I et al : Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* **134** : 1396-1405, 2008.
- 7) Ando M, Korenaga M, Hino K et al : Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int* **28** : 1158-1166, 2008.
- 8) Yano M, Ikeda M, Kato N et al : Comprehensive analysis of the effects of ordinary nutrients on hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* **51** : 2016-2027, 2007.
- 9) Yano M, Ikeda M, Kato N et al : Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology* **50** : 678-688, 2009.
- 10) Fillebeen C, Rivas-Estilla AM, Bisailon M et al : Iron inactivates the RNA polymerase NS5B and suppresses subgenomic replication of hepatitis C Virus. *J Biol Chem* **280** : 9049-9057, 2005.
- 11) Fillebeen C, Pantopoulos K : Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh7.5.1 cells. *J Hepatol* **53** : 995-999, 2010.

* * *

Session 3

肝疾患と酸化ストレス(臨床1)

【座長】 橋本 悦子

東京女子医科大学 消化器内科

第7回「酸化ストレスと肝」研究会 記録

酸化ストレスと肝疾患〈第7巻〉

発行日 2011年8月3日 第1版第1刷発行

編集 沖田 極

編集・制作 株式会社嵯峨野

発行所 株式会社メディカルトリビューン

〒102-0074 東京都千代田区九段南2-1-30 イタリア文化会館ビル8F

電話 03-3239-7219(販売課) FAX 03-3239-7243

印刷・製本 凸版印刷株式会社

©2011 Printed in Japan
ISBN 978-4-89589-367-1

[検印廃止]

定価はカバーに表示してあります。
落丁・乱丁の場合はお取り替えいたします。

JCOPY

〈(社) 出版者著作権管理機構 委託出版物〉

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(社) 出版者著作権管理機構(電話 03-3513-6969、FAX 03-3513-6979、e-mail: info@jcopy.or.jp) の許諾を得てください。

モノグラフ

病気の 分子形態学

日本臨床分子形態学会 編

学際企画

II - 3. C 型肝炎における鉄代謝異常

日野 啓輔, 仁科 惣治, 是永 匡紹

川崎医科大学肝胆腸内科学

キーワード

C型肝炎, 鉄, ヘプシジン, 活性酸素, ミトコンドリア

はじめに

C型慢性肝炎では肝組織内に鉄が蓄積し, 病態進展に重要な役割を果たすことが知られている。事実, C型慢性肝炎に対する治療として瀉血療法が認可されている。本稿では我々の知見を中心に C型肝炎における鉄代謝異常の分子機構について解説する。

1. C型肝炎ウイルス (HCV) コアタンパクによる活性酸素の産生

Okuda らは HCV コアタンパク発現が調節可能な Huh7 細胞において活性酸素 (ROS) や脂質過酸化物が上昇することを報告し, HCV コアタンパクが直接的に酸化ストレスを誘導することを示した¹⁾。細胞内における ROS の最大産生部位はミトコンドリアである。ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系は 5 つの複合体 (呼吸鎖複合体) からなり, 電子の移動による電気勾配と ADP の存在下で ATP を産生するが, この過程でどうしても電子の leak が生理的に起こり, 仮に電子伝達系に障害があれば電子の受け渡しが滞り ROS の産生が増大する。Korenaga らは HCV 構造タンパクを発現するトランスジェニックマウスの肝ミトコンドリア分画において呼吸鎖複合体 I の活性が低下していることを明らかにした²⁾。また, Tsutsumi らはミトコンドリアのシャペロンタンパクである prohibitin と cytochrome c oxidase (呼吸鎖複合体 IV) の interaction が HCV コアタンパクにより阻害されて cytochrome c oxidase の活性が低下すると報告している³⁾。

2. 鉄代謝異常分子機

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⁴⁾。我々は HCV 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 hepcidin 産生低下の分子機序について検討した⁵⁾。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。

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。さらにその原因として hepcidin の転写因子の1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。C/EBP ファミリーには C/EBP homology protein (CHOP) が存在するが、CHOP は CEBP と二量体を形成し、CEBP 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 ROS の産生と連動していることが明らかとなった。また、hepcidin の転写調節経路の1つとして IL-6 による JAK-STAT シグナルを介する系が報告されているが、HCV TgM に 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、JAK-STAT を介する転写調節経路の障害は認めなかった。一方、別のグループからは HCV レプリコンにおける hepcidin 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 CEBP 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⁶⁾、HDAC 活性亢進の上流にあるのはやはり ROS である。以上をまとめると HCV TgM あるいは HCV レプリコンにおける肝内鉄蓄積機構は図1のように考えられるが、HCV 誘導性の ROS が hepcidin の転写を抑制することが HCV 感染における鉄代謝障害機構の主要な原因と考えられる。

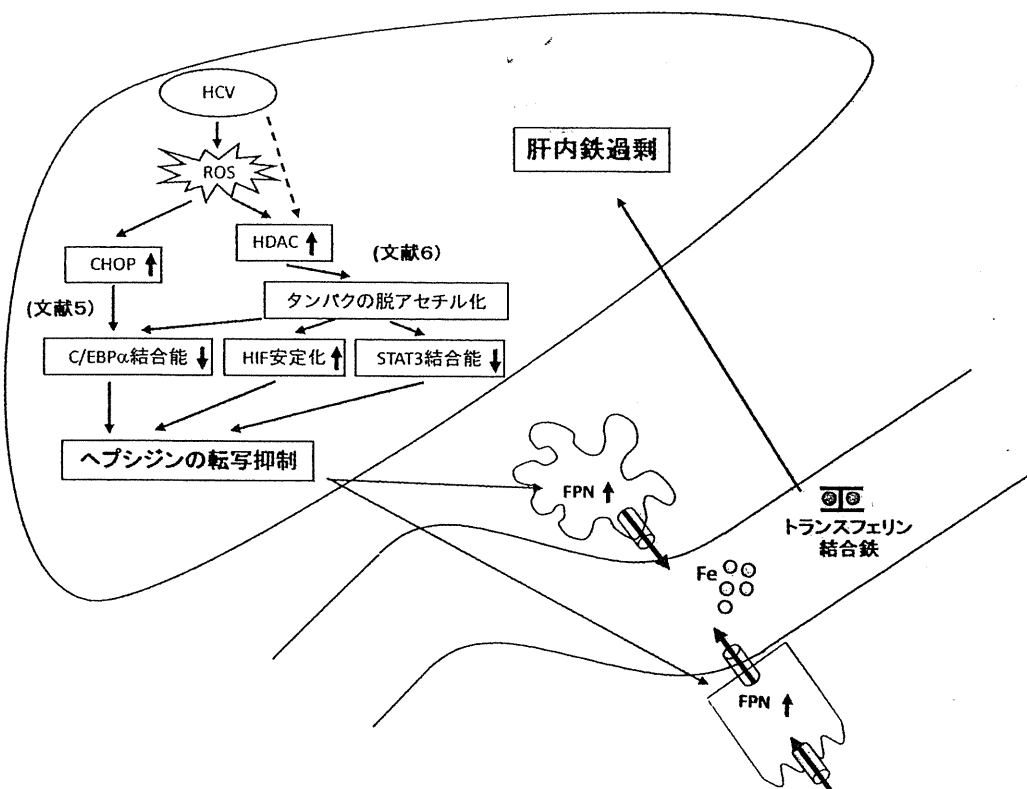


図1 HCV タンパク存在下における鉄代謝異常機構の模式図

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