

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<sup>8</sup> 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。

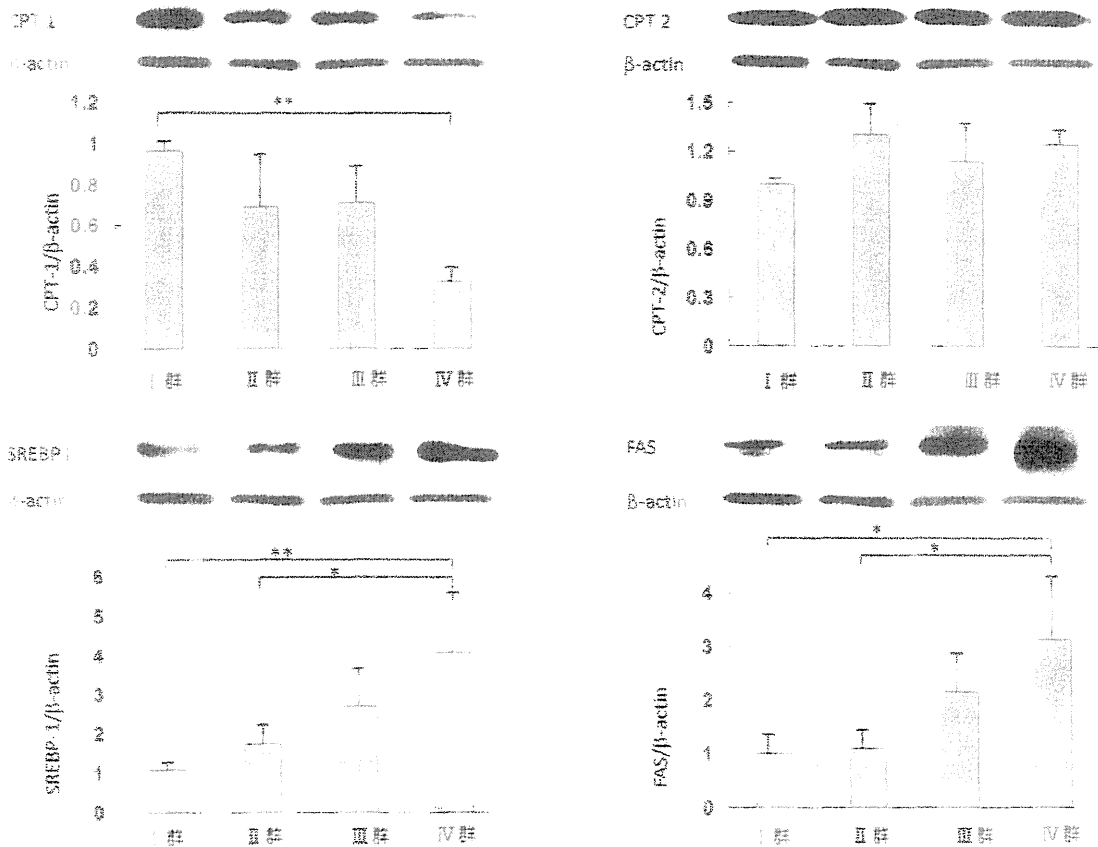


図2 I群からIV群におけるCPT1、CPT2、SREBP1、FASの発現量。CPT: carnitine palmitoyl transferase, SREBP: sterol regulatory element binding protein, FAS: fatty acid synthetase

### 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。そこで肝臓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に存在する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  $\alpha$  (p-eIF2  $\alpha$ ) 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  $\alpha$ , 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)。

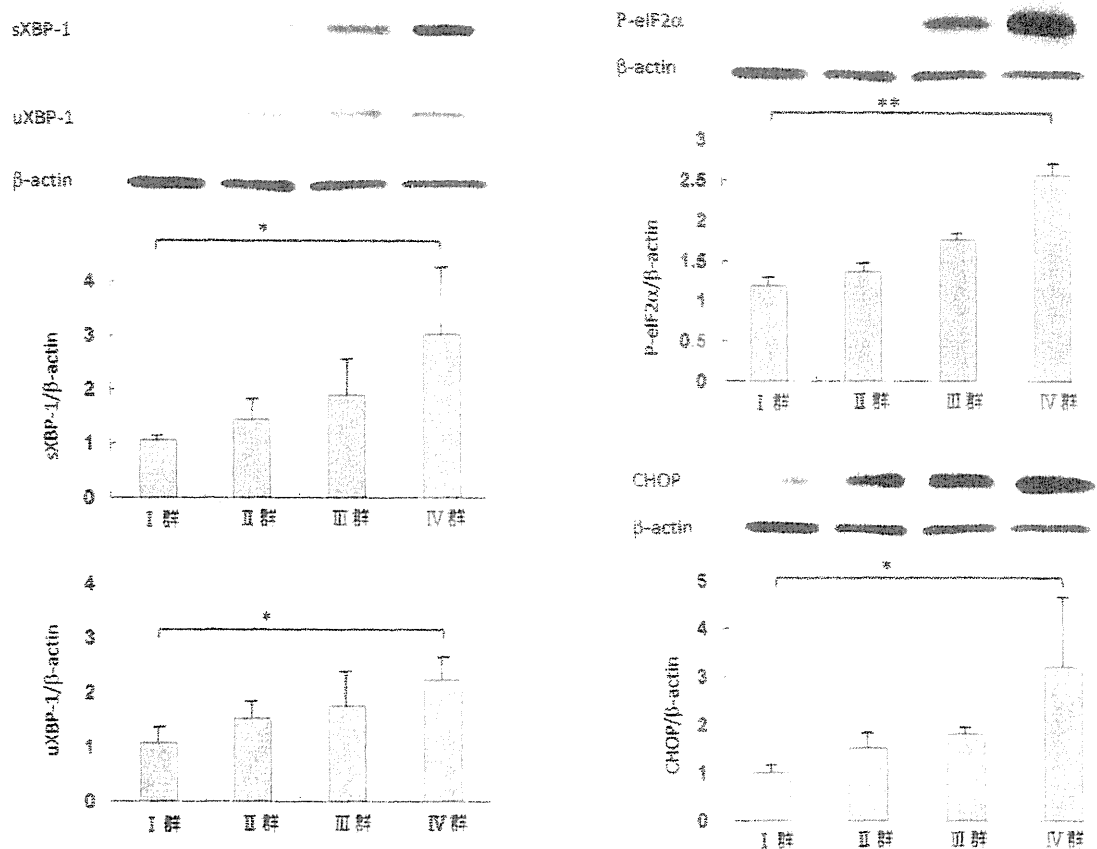


図3 I群からIV群におけるu XBP-1, s XBP-1, p-eIF2  $\alpha$ , CHOPの発現量。XBP-1: X-box DNA binding protein, p-eIF2  $\alpha$ : phosphorylated eukaryotic initiation factor-2  $\alpha$ , CHOP: C/EBP homology protein

#### 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<sup>9,10)</sup>、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。

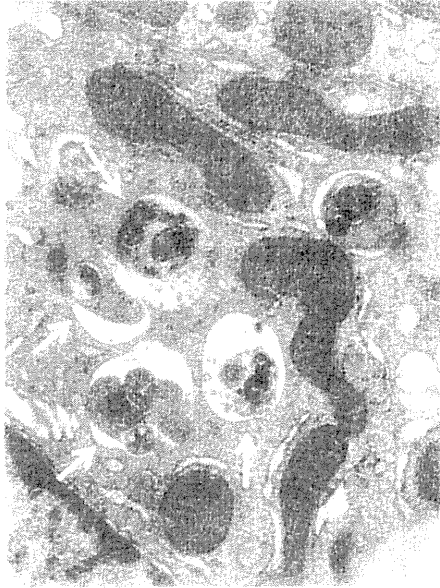


図4. 高脂肪HFD TgMの肝臓の電子顕微鏡像。矢印はautophagosomeを表す

### ④ 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一連の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質分泌を改善することが報告されている。そこで高脂肪HFD TgMにおける小胞体ストレス発進の原因を検討する目的で肝臓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2-amino-6-methylquinoxaline (AMQ)に反応して核を赤く染色する。そこで締結肝組織を用いて肝臓中のAMQを染色し、染色された核を定量化することから in situにおける活性酸素の産生量を比較検討した。結果として、高脂肪HFD TgMにおいて活性酸素産生亢進が観察されたが、IV群は他の3群と比較して有意に活性酸素の産生量が多かった(図5)。

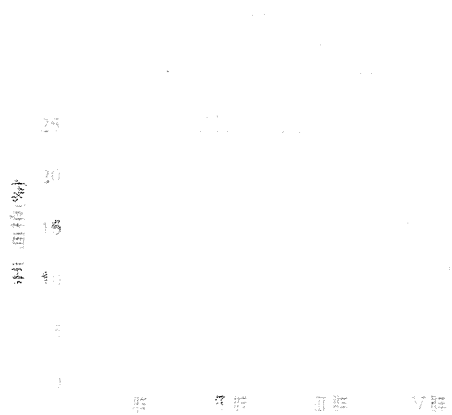
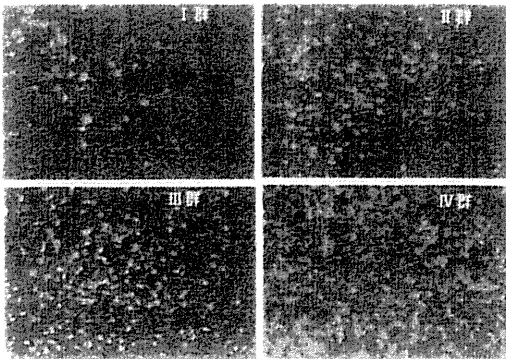


図5. Ⅰ群からⅣ群の肝臓の核内活性酸素量(AMQ)を定量化するためにAMQを用いて核を赤く染色された核を同定することから、肝臓中の活性酸素の産生量を比較検討した。

## 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。

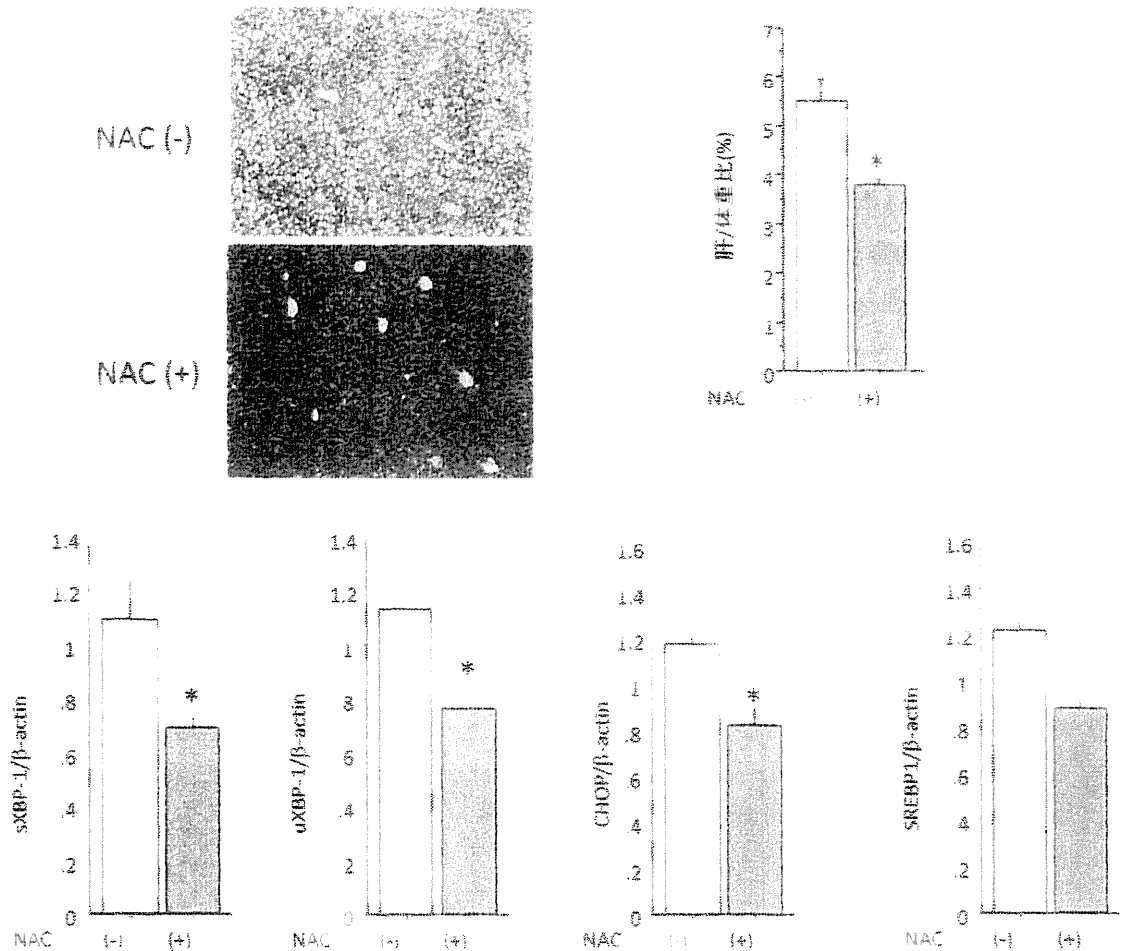


図6 鉄過剰餌と同時にNACを投与したHCV TgMとNACを投与しなかったHCV TgMの肝組織像(HE)、肝/体重比、uXBP-1, sXBP-1, CHOP, SREBP1の発現量の比較

## 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ため、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と考えられた。

## 文 献

- 1) Fujita N, Sugimoto R, Takei M, Irawa 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, Karenaga M, Vecchi C, Pietrangeli 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: *Ann 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, Shinada 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: *Engl 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効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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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：川崎医科大学肝胆脾内科学



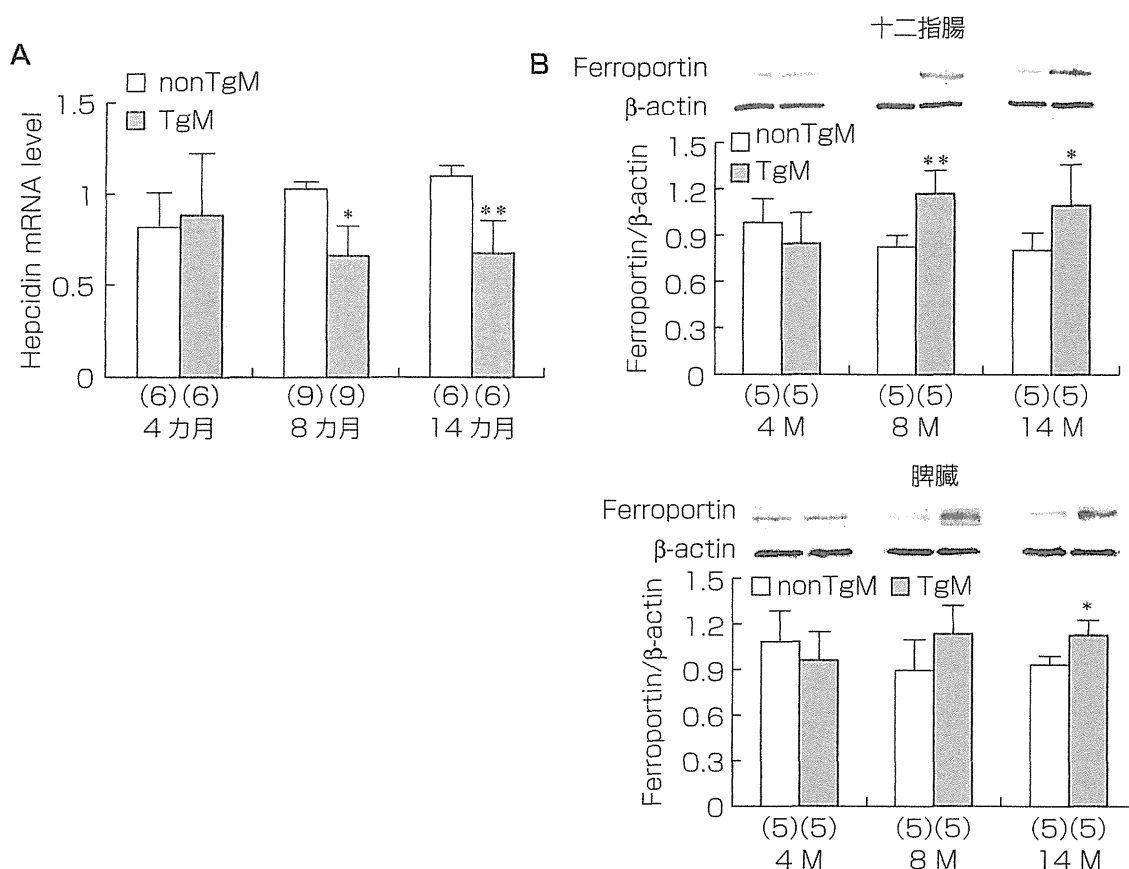


図 1. HCV TgM の肝臓内 hepcidin mRNA, 十二指腸, 脾臓内 ferroportin の発現量

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<sup>3)</sup>. 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い. 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

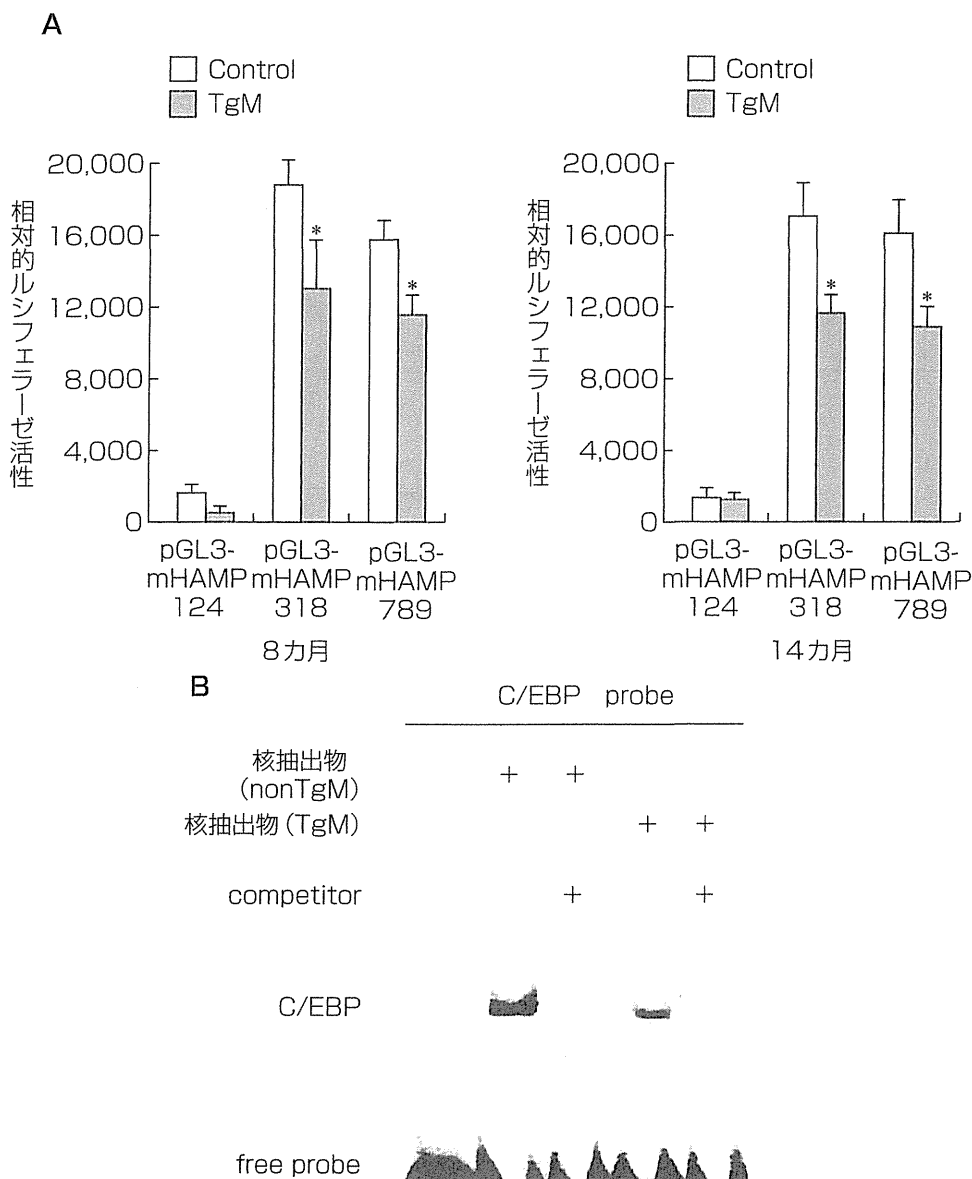


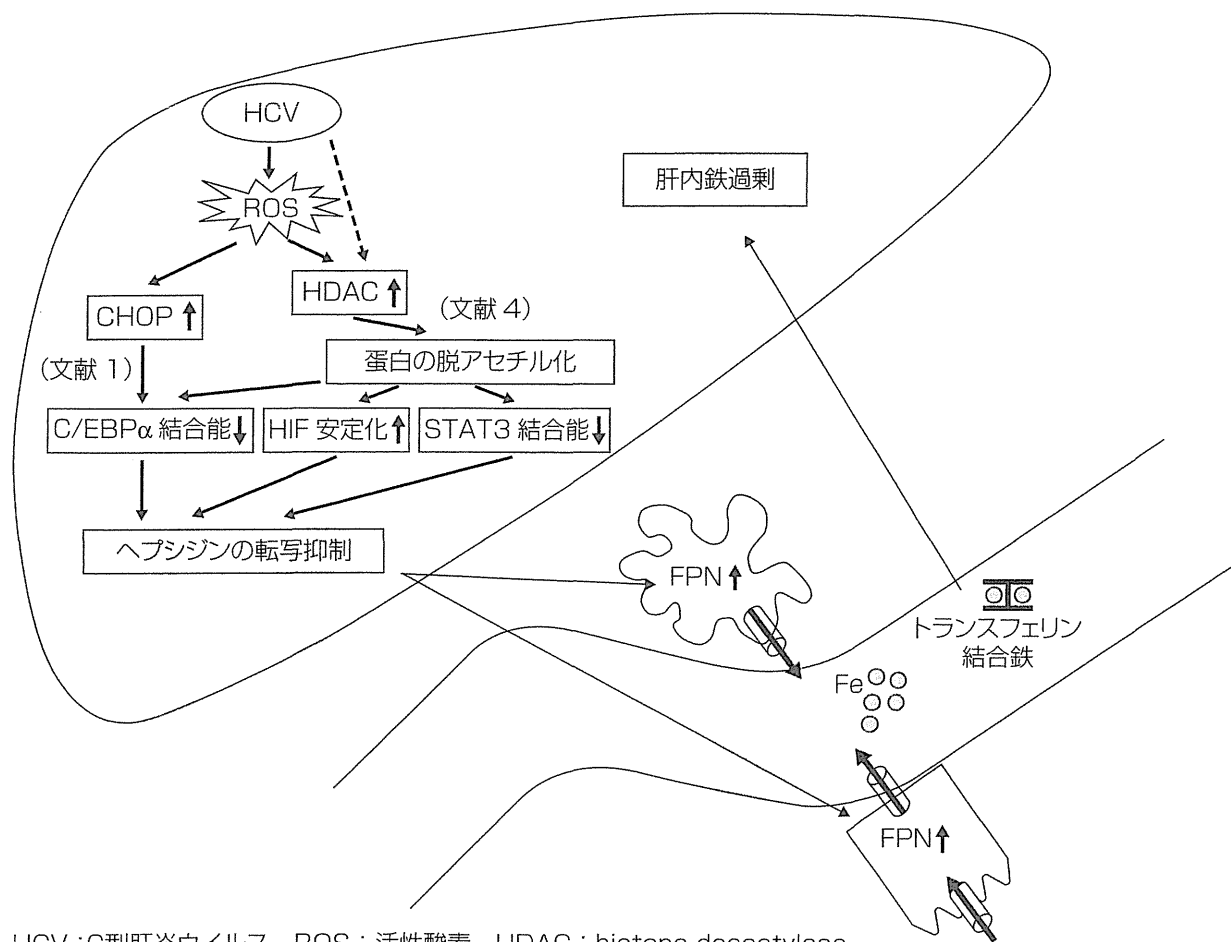
図 2

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<sup>4)</sup>, 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<sup>9)</sup>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<sup>6)</sup>、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酸化物質とともに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-

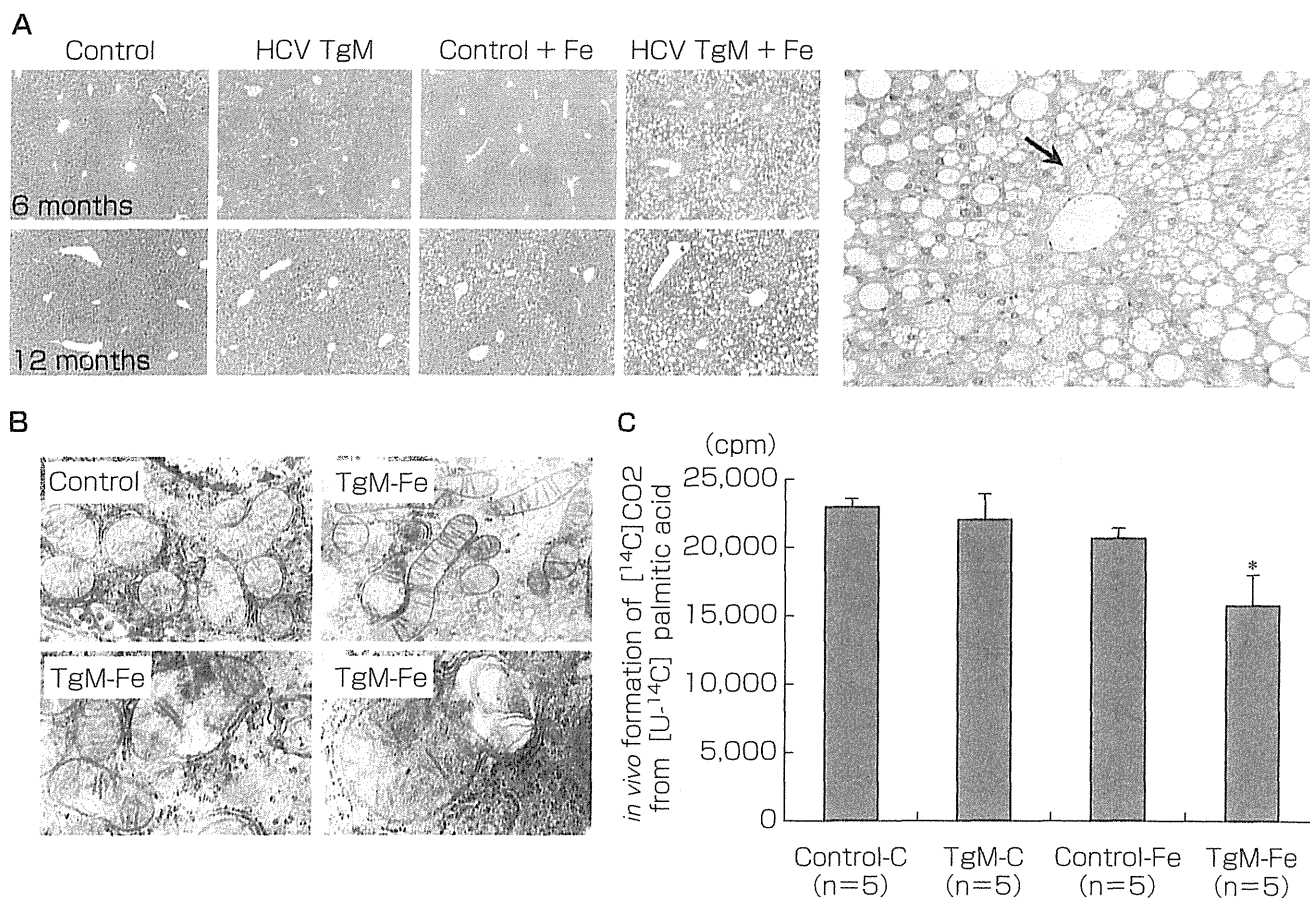


図 4

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

<sup>14</sup>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 (<sup>14</sup>C でラベルされた CO<sub>2</sub>) 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った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こるのかについては 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<sup>7)</sup>。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

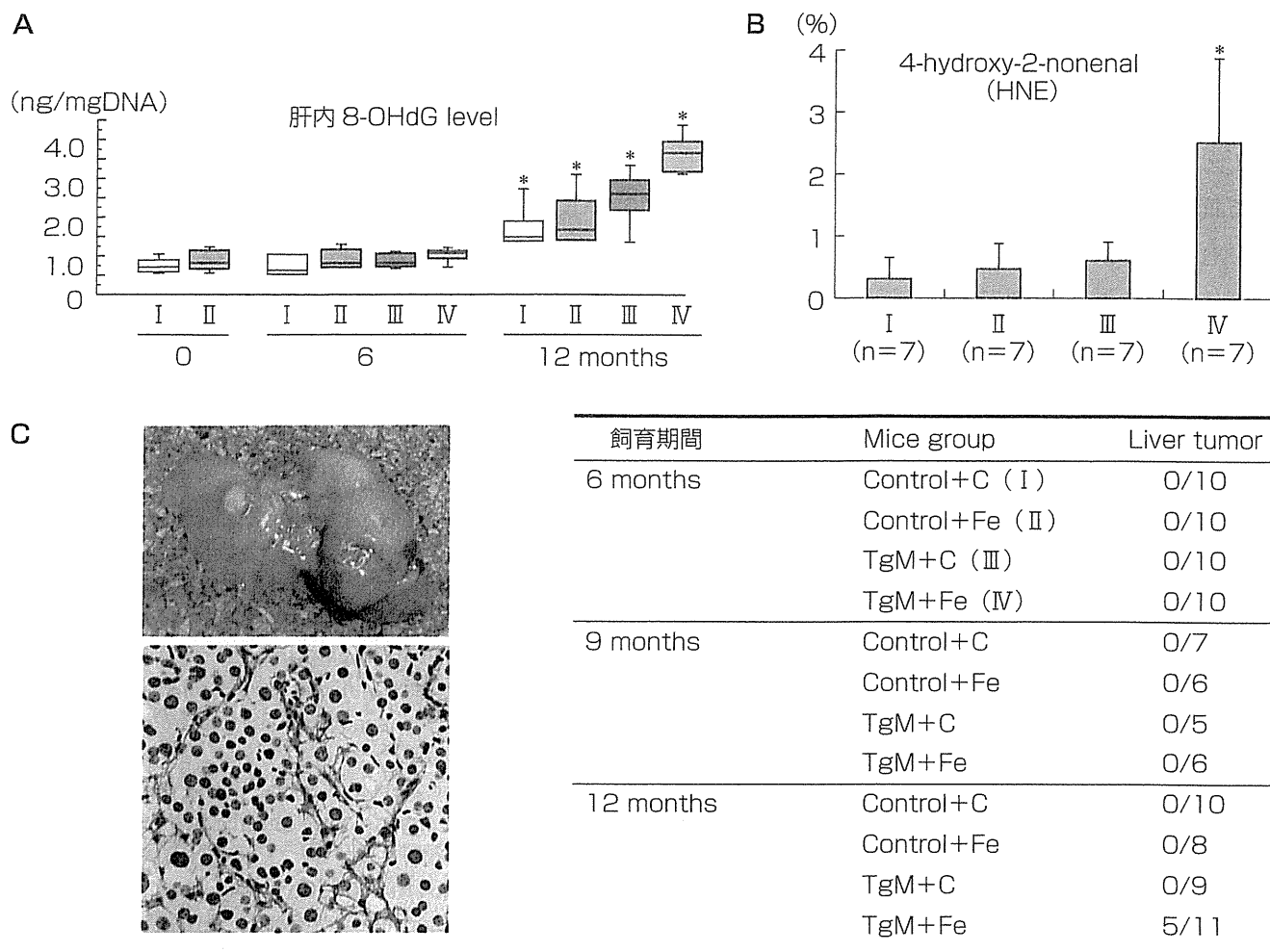


図 5

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質 (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<sup>8)</sup>、最近同じグループからレチノイドシグナルが hemojuverin の転写調節に参与していることが報告された<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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ならば有効性が低く、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腫瘍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もい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: Hecpudin 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) Otagawa 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: Suppressing 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.

特集 鉄過剰症—その病態と治療

## C型慢性肝炎・非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における鉄代謝と酸化ストレス

日野 啓輔    仁科 惣治    古谷 隆和

別 刷

日本医師会雑誌

第139巻・第2号

平成22(2010)年5月

# C型慢性肝炎・非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における鉄代謝と酸化ストレス

目野啓輔\*<sup>1</sup> 仁科惣治\*<sup>2</sup> 古谷隆和\*<sup>3</sup>

キーワード ● 活性酸素, ミトコンドリア, ヘプシジン, トランスジェニックマウス

## ■ 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。フェントン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, 究極的には肝発がんとも関連する。

本稿では, 肝発がん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急増しているNASH (nonalcoholic steatohepatitis; 非アルコール性脂肪性肝炎)における鉄代謝異常と酸化ストレスについて解説する。

## ■ C型慢性肝炎

C型慢性肝炎の病態の特徴の1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み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分かるように, 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; 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, 肝内鉄蓄積機序<sup>1)</sup>と鉄蓄積に伴う酸化ストレス亢進からの肝発がん機序の解析<sup>2)</sup>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のヘプシジン (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フェロポルチン (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, 体内鉄に対するヘプシジン量として血清中のヘプシジン/フェリチン比が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, 体内鉄に対するヘプシジンの産生が相対的に低下していると指摘している<sup>3)</sup>。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, 肝臓のヘプシジン mRNA 発現量は有意

Iron Metabolic Disorder and Oxidative Stress in Chronic Hepatitis C and Nonalcoholic Steatohepatitis

\*<sup>1</sup>Keisuke Hino, \*<sup>2</sup>Sohji Nishina : Department of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical University,

\*<sup>3</sup>Takakazu Furutani : Department of Gastroenterology and Hepatology, Shuto General Hospital

\*<sup>1</sup> 川崎医科大学教授 (肝胆膵内科学), \*<sup>2</sup> 臨床助教, \*<sup>3</sup> 周東総合病院消化器内科



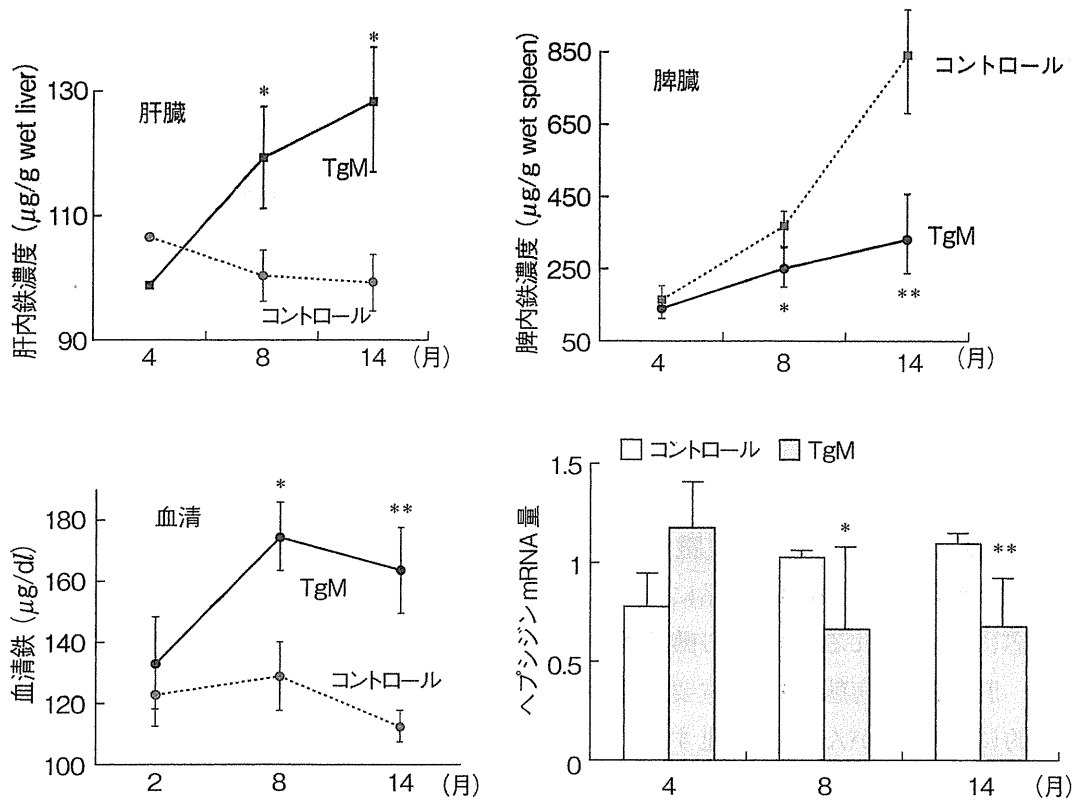


図1 HCV TgM の肝臓、血清、脾臓内鉄濃度と肝臓内ヘプシジン mRNA の発現量  
 $*$   $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$

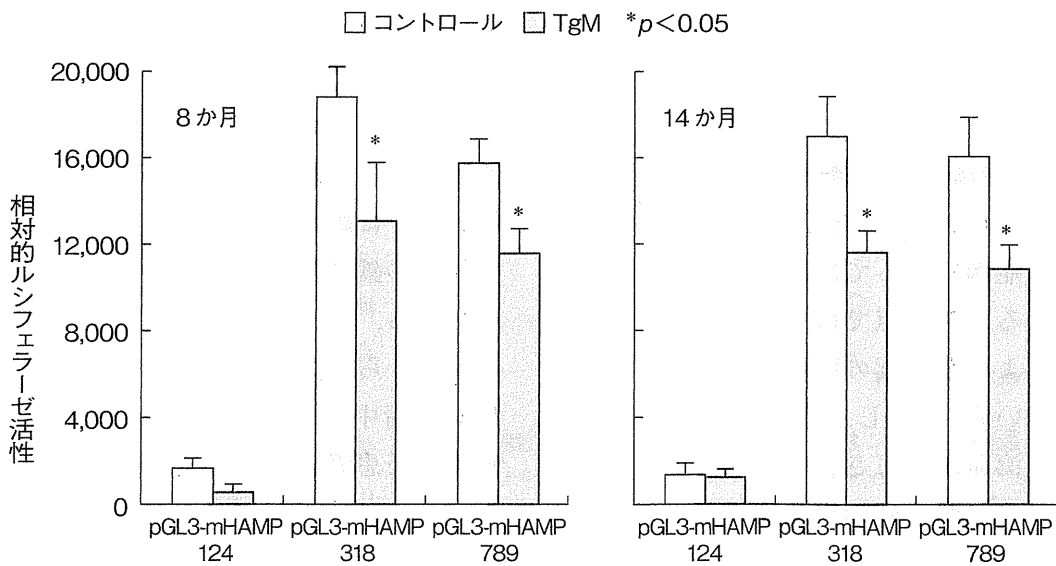


図2 HCV TgM 初代培養肝細胞のヘプシジン転写活性  
 ヘプシジンプロモーター領域 (pGL3-mHAMP 124, 318, 789) を肝細胞に transfection し、  
 相対的ルシフェラーゼ活性により転写活性を測定した。

に低下し(図1), HCV TgM の初代培養肝細胞を用いた検討ではヘプシジンの転写活性が有意に低下していた(図2)。

さらに、その原因としてヘプシジンの転写因

子の1つであるCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) のヘプシジン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3)。C/EBPファミリーにはC/EBP

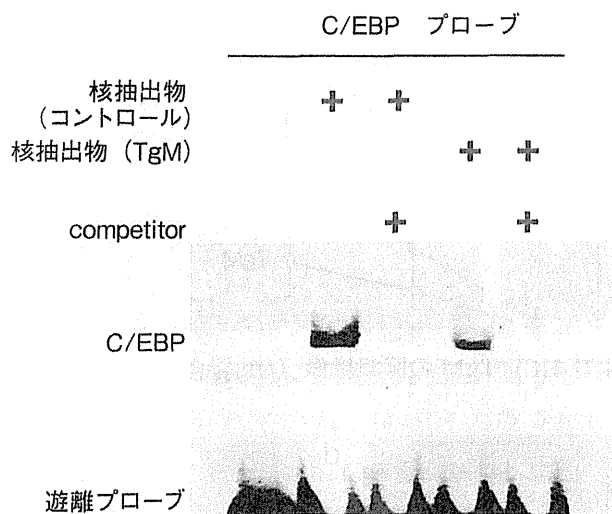


図3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) による C/EBP の DNA 結合活性の測定

8 か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。

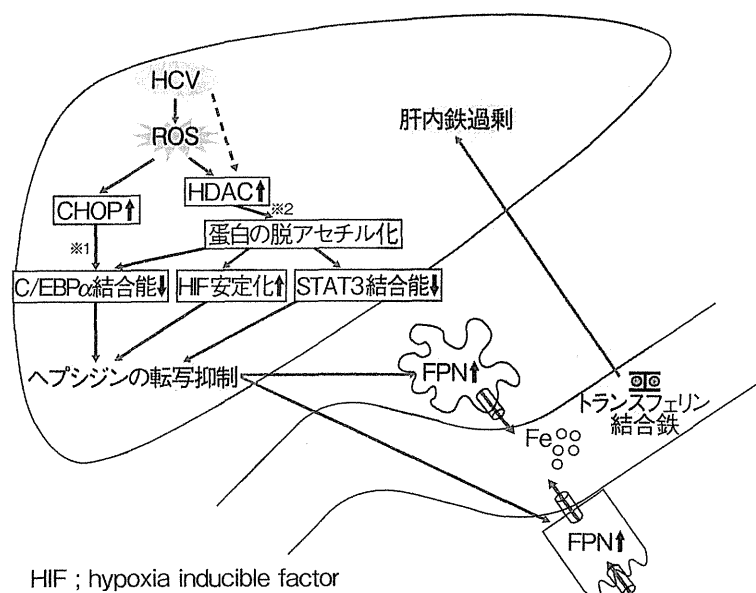


図4 HCV 蛋白存在下における鉄代謝異常機構の模式図  
 (\*<sup>1</sup>Nishina S, et al : Gastroenterology 2008 ; 134 : 226 - 238, \*<sup>2</sup>Miura K, et al : Hepatology 2008 ; 48 : 1420 - 1429)

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 (reactive oxygen species ; ROS) の産生と連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4のように考えられる。別のグループからはヘプシジンの転写抑制機構として、ヒストンデアセチラーゼ (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 STAT (signal transducer and activator of transcription) 3 のプロモーター領域への結合能低下が報告されているが<sup>4)</sup>、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ヘプシジンの転写抑制があげられる。その原因となる活性酸素の産生亢進機構については、HCV コア蛋白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誌面の都合上、他書を参考されたい。

## 2. 鉄蓄積に伴う酸化ストレスと肝発がん

Kato らは瀉血により C 型慢性肝炎患者の肝発がんが抑制されることを報告し<sup>5)</sup>、肝内鉄蓄積が肝発がん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がんを来すか否かについて検討した。

6 か月目の鉄負荷 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5~7)。鉄負荷 12 か月目になると、肝内脂質過酸化物質 (4-hydroxy-2-nonenal ; HNE) と共に 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の蓄積が亢進し、最終的には鉄負荷 HCV TgM のみに肝細胞がんを含む肝腫瘍を 45% (5/11) 認めた (図8, 9)。

このように、HCV TgM は肝内鉄濃度が C 型

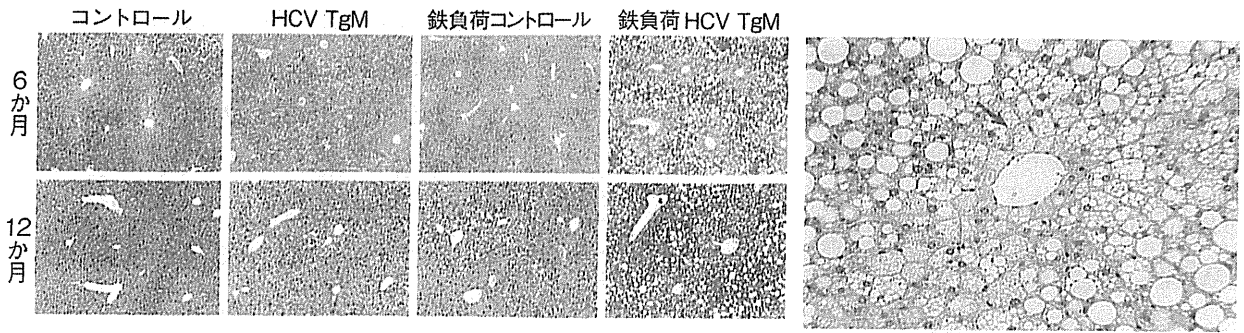


図5 通常餌と鉄負荷のコントロールマウスおよび HCV TgM の肝組織像 (HE 染色)

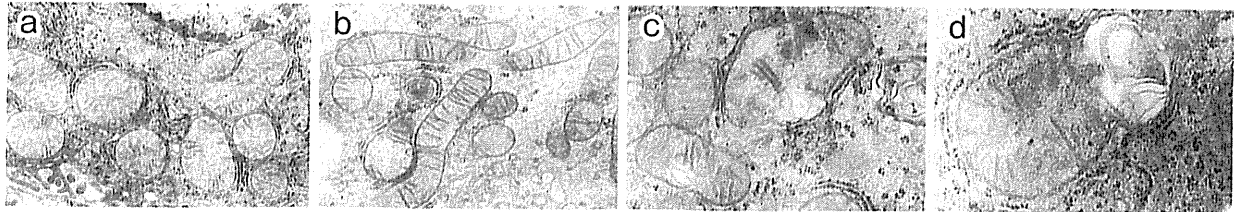


図6 コントロールマウス (a) と鉄負荷 HCV TgM (b ~ d) の肝臓ミトコンドリアの電子顕微鏡像

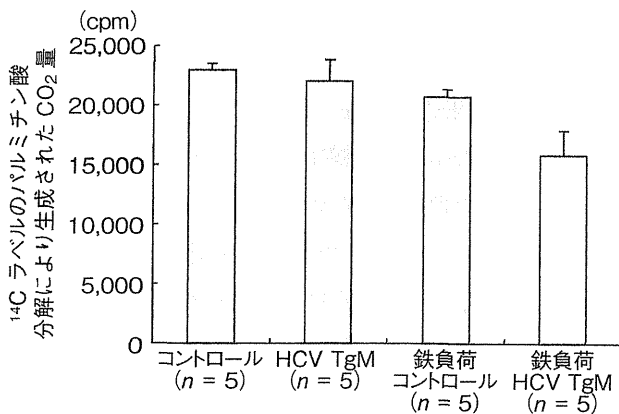


図7 *In vivo* でのパルミチン酸分解能の比較

<sup>14</sup>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 (<sup>14</sup>CでラベルされたCO<sub>2</sub>)を測定することで脂肪酸分解能を測定した。

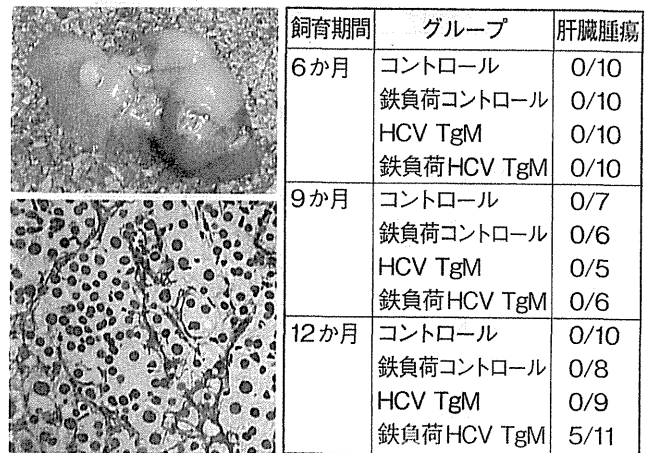


図9 HCV TgM における肝細胞がん

は酸化ストレスが亢進するとともに酸化的DNA障害が進行し肝発がんを来する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シグナルを介するヘプシジンの転写調節機構が存在し、肝内で炎症が強くなるとヘプシジンの転写亢進が予想され、HCV起因性酸化ストレスによるヘプシジン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ヘプシジンの転写調節はよ

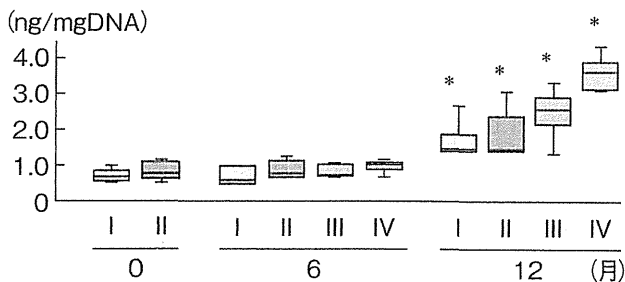


図8 肝内8-OHdG発現量

I: コントロール, II: HCV TgM, III: 鉄負荷コントロール, IV: 鉄負荷 HCV TgM

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共に肝内の脂肪沈着が亢進し、ついに

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さまざまな程度で起きるといふ臨床的事実を反映しているように思われる。

## ■ NASH

NASHでは血清フェリチン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こるかについてはC型慢性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、Otogawa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<sup>6)</sup>。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因と考察している。

また、Yanagitaniらはレチノイン酸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、その後肝がんを発症することを報告しているが<sup>7)</sup>、最近同じグループから、レチノイドシグナルがヘモジュベリン(hemojuvelin)の転写調節に関与していることが報告された<sup>8)</sup>。すなわち、レチノイドはヘモジュベリンの転写を抑制することでその下流のトランスフェリンレセプター2とヘプシジンの発現を抑制し、結果としてトランスフェリン鉄の取り込み低下とヘプシジンの発現低下によるフェロポルチンの発現亢進が、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2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型慢性肝炎のように酸化ストレスによりヘプシジン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においてヘプシジンが低下しているのか不変なのか、あるいは亢進しているかについては現在controversialであり、今後のさらなる検討が必要である。

## ■ 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、これにより酸化ストレスが引き起こされ、肝硬変や肝細胞がんへの進展が促進される。C型慢性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もい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 : *Gastroenterology* 2008 ; 134 : 226-238.
- 2) Furutani T, et al : *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 2087-2098.
- 3) Fujita N, et al : *Mol Med* 2007 ; 13 : 97-104.
- 4) Miura K, et al : *Hepatology* 2008 ; 48 : 1420-1429.
- 5) Kato J, et al : *Cancer Res* 2001 ; 61 : 8697-8702.
- 6) Otogawa K, et al : *Am J Pathol* 2007 ; 170 : 967-980.
- 7) Yanagitani A, et al : *Hepatology* 2004 ; 40 : 366-375.
- 8) Tsuchiya H, et al : *Gastroenterology* 2009 ; 136 : 341-350.