

et al., 1979; De Silva and Reeves, 1985; Duffy and Stouffer, 2002; Espey et al., 1986; Mikuni et al., 1998; Priddy et al., 1990).

In brief, Ptgs2 converts arachidonic acid, which is released from membrane phospholipid by the enzyme cytosolic phospholipase A2 (Pla2g4a) (Duffy et al., 2005; Kol et al., 1997), to the endoperoxide PGH₂. PGH₂ is then isomerized to PGE₂ by one of three PGE synthases, cytosolic PGE synthase (Ptges3) and two membrane-bound PGE synthases, Ptges and Ptges2 (Samuelsson et al., 2007; Sun et al., 2006). It has been reported that Ptges is the enzyme responsible for ovarian production of PGE₂ using Ptgs2-derived PGH₂ as a substrate (Hara et al., 2010; Murakami et al., 2000). Ovulatory stimuli were reported to up-regulate the expression of Ptges together with that of Ptgs2 (Filion et al., 2001; Guan et al., 2001). However, correlations between these molecular events and the anovulatory phenotype of ArKO mice have not been elucidated.

Recently, we demonstrated that administration of appropriate doses of 17 β -estradiol (E2) and gonadotropins at certain time points could induce ovulation in immature ArKO females (Toda et al., 2012). These observations prompted us to examine whether the ovulatory induction in ArKO mice is accompanied by alterations in PGE₂ metabolism, as reported in the wild-type (WT) ovary. To this end, we measured expression levels of genes related to PGE₂ metabolism and ovarian contents of PGE₂ in the ArKO ovary before and after ovulatory stimulations.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

Animal experiments were carried out in accordance with our institutional guidelines. All animals were maintained on a 12-h light/dark cycle at 22–25 °C and given water and phytoestrogen-low rodent chow (NIH-07PLD, Oriental Yeast Ltd., Tokyo, Japan). ArKO mice were generated by targeted disruption of *Cyp19* by homologous recombination (Toda et al., 2001). They were backcrossed repeatedly to yield a C56BL/6j genetic background. Female mice at 4 weeks old were used in the present study. WT mice were randomly divided into three groups. One group was an untreated group (Group 1). The mice in the other two groups were treated with conventional superovulation regimen: intraperitoneal (ip) injection of 5 international units (IU) of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (Serotropin[®], ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) followed 48 h later by injection of 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). The ovaries were collected at 4 h (Group 2) or 15 h (ovulated) (Group 3) after the hCG administration. Female ArKO mice were randomly divided into six groups. ArKO mice in Group 4 were untreated. ArKO mice in Group 6 were injected ip with

25 IU of PMSG followed 48 h later with 25 IU of hCG. The ovaries were collected at 4 h after the hCG administration. ArKO mice in the other four groups (Groups 5, 7–9) received subcutaneous injection of E2 (10 mg/kg body weight), which was dissolved in sesame oil at a concentration of 15 mg/ml, on Days (D) 1, 4 and 5. The ovaries of ArKO mice in Group 5 were collected at 24 h after the last injection of E2. ArKO mice in Groups 7 and 8 were injected 25 IU of PMSG on D4 and 25 IU of hCG on D6. The ovaries were collected at 4 h (Group 7) or 15 h (ovulated) (Group 8) after the hCG administration. ArKO mice in Group 9 were injected 5 IU of gonadotropins. The ovaries were collected at 4 h after the hCG injection. The treatments are summarized in Table 1.

2.2. RNA preparation and real-time quantitative PCR analysis

Ovaries from nine to 12 mice were pooled and used for total RNA preparation (Zarlenga and Gamble, 1987). Conditions for cDNA synthesis and real-time quantitative PCR (RT-QPCR) were as described previously (Toda et al., 2012). Expression levels of mRNA of the following genes were examined: *Pla2g4a* (phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent), NM_008869.3), *Ptgs2* (NM_011198.3), *Ptges* (microsomal prostaglandin E synthase 1, NM_022415.3), *Ptges2* (prostaglandin E synthase 2, NM_133783.2), *Ptges3* (NM_019766.4), *Ptger2* (PGE receptor 2, (subtype EP2), NM_008964.4), *Ptger4* (prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4), NM_001136079.1), *Ptgr2* (prostaglandin reductase 2, NM_029880.3), *Hpgd* (NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, NM_008278.2) and *Est* (sulfotransferase family 1E, member 1, NM_023135.2). *Cyclophilin A* (peptidylprolyl isomerase A (Ppia), NM_008907.1) was used as an invariant control, and the relative quantification for a given gene was corrected to the cyclophilin A mRNA level. Total RNA was independently prepared twice from three pools of ovaries. Quantification of mRNA expression was done three times for each set of RNA samples by real time-quantitative PCR. The nucleotide sequences of primers and the sizes of amplified fragments are shown in Table 2.

2.3. Western blot analyses

Ovaries from five mice before or after ovulatory stimulation were pooled and used for ovarian extract preparation as described previously (Toda et al., 2012). Protein concentrations were quantified using a bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Ovarian extracts (50 μ g) were run on 7.5% SDS-polyacrylamide electrophoresis gels and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). After blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) (Millipore Corp., Kankakee, IL, USA) in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), the membranes were incubated overnight at 4 °C with

Table 1
Summary for animal treatment.

Experimental group	Genotype	Treatment				Ovary collected at
		Day 1	Day 4	Day 5	Day 6	
1	WT		Without treatment			
2	WT		PMSG (5)		hCG (5)	4
3	WT		PMSG (5)		hCG (5)	15
4	ArKO		Without treatment			
5	ArKO	E2	E2	E2		
6	ArKO		PMSG (25)		hCG (25)	4
7	ArKO	E2	E2/PMSG (25)	E2	hCG (25)	4
8	ArKO	E2	E2/PMSG (25)	E2	hCG (25)	15
9	ArKO	E2	E2/PMSG (5)	E2	hCG (5)	4

Immature WT mice at 4 weeks of age were injected intraperitoneally (ip) with 5 international units (IU) of PMSG on Day 4 followed 48 h later with 5 IU of hCG on Day 6 to promote synchronized follicle growth and ovulation. ArKO mice were stimulated with E2 on Days 1, 4 and 5 (10 mg/kg BW, subcutaneous injection), PMSG on Day 4 (25 IU or 5 IU/mouse) and hCG on Day 6 (25 IU or 5 IU/mouse). Ovaries were collected at follicular growth stage as indicated at preovulatory differentiation stage as indicated by 4 (4 h after hCG injection) and after ovulation as indicated by 15 (15 h after hCG injection).

Table 2
Primers for RT-QPCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
<i>Est</i>	GTGGAAAAATGCAAGGAGGA	GGGTGGCAGGTGAGTTTTTA	135
<i>Hpdg</i>	GGATTACACGCTCAGCAG	AATTCATCATAGCCTTGA	170
<i>Pla2g4a</i>	ATGGCCTTGGTGAGCGACTC	TCTGGATCTGCTACCGCTGC	175
<i>Ptger2</i>	GCTAATGGAGGACTGCAAGAGTCGTCAG	GCAGGTTCCCAGCAGGTCACTGAG	226
<i>Ptger4</i>	CATTCCCGCAGTGATGTTTCATCTTC	GCTATAGTCACACAGTGCCTGGTCTCC	220
<i>Ptges</i>	AACGACATGGAGACAATC	TGGAGAAACAGGAGAACT	199
<i>Ptges2</i>	TGGTGTGCTGCGAGTGATG	CAGGTACCAAGGCTGGATGTG	78
<i>Ptges3</i>	CCTCTGCCCGTTCACCAT	TTAAAATTATCGTTCCTC	160
<i>Ptgr2</i>	CCCGGGCGGAGTGGATGTCT	TGCAGGGGGCAGTGGAGGAG	154
<i>Ptgs2</i>	GTGCACTATGGTTACAAAA	CATCTGCTACGGGAGGAAG	79
<i>Ppia</i> (Cyclophilin A)	ATGGCACTGGCGGAGGTCC	TTGCCATTCCTGACCCAAA	241

rabbit anti-Ptgs2 antibody (Cayman Chemical Co., MI, USA) diluted 1:1000 in IMMUNO SHOT (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo). After washed, they were incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit immunoglobulin peroxidase-linked antibody (Cell Signaling Technology) diluted 1:2000 in 5% BSA in TBST. Detection of immunoreactive bands and quantification were carried out as described previously (Toda et al., 2012). The same membranes were used to detect β -actin with peroxidase-conjugated monoclonal anti- β -actin antibody (clone Ac-15, Sigma–Aldrich, MI, USA) diluted 1:50,000 in TBST containing 5% BSA.

2.4. Measurement of ovarian PGE₂ contents

The ovaries were quickly dissected from each animal after the treatments and snap-frozen in liquid nitrogen. The ovaries were homogenized in ice-cold 0.1 M phosphate buffer containing 1 mM EDTA and 10 μ M indomethacin, pH 7.4. PGE₂ was pre-purified through a Solid Phase Extraction Cartridge column (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, PGE₂ contents were measured using a PGE₂ EIA Kit (514010, Cayman Chemical). Ovarian PGE₂ contents are presented as pg/mg protein.

2.5. Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean \pm standard error. Mann–Whitney *U* test was used for analysis (InStat software, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). *p* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. mRNA expression of genes involved in PGE₂ metabolism in ArKO ovaries

Firstly, we assessed the effects of the current superovulation regimen on transcript levels of a subset of genes involved in PGE₂ metabolism by RT-QPCR analysis (Fig. 1). Significant inductions in mRNA expression of *Ptgs2* and *Ptger4* were detected in the WT ovary at 4 h after the hCG administration compared with those in the untreated WT ovaries; nevertheless, mRNA expression of *Ptger4* was merely twofold higher than that in the untreated ovary (Fig. 1, Groups 1 and 2). Modest induction of *Ptger4* gene after the superovulation stimulation was also reported (Takahashi et al., 2006; Tamba et al., 2010). In contrast, significant suppression of mRNA expression of *Hpdg*, encoding an enzyme responsible for biological inactivation of PGE₂ (Tai et al., 2006), was observed in the WT ovary after the gonadotropin treatments (Group 2). In addition, suppression of mRNA expression of *Ptges*, *Ptges2*, *Ptger2*, and

Ptgr2 was observed by the gonadotropin treatment, reaching approximately 50% of the untreated WT levels of the respective genes. After ovulation, mRNA expression of *Ptgs2* and *Ptger4* was decreased significantly, while the expression of *Ptger2* and *Ptgr2* was slightly increased when compared to the mRNA expression levels at 4 h after the hCG administration in WT mice (Groups 2 and 3). The ovulatory stimulation did not alter the mRNA expression levels of *Pla2g4a* and *Ptges3* significantly in the WT ovary.

In the untreated ArKO ovary, the mRNA expression of *Pla2g4a*, *Ptgs2* and *Hpdg* was enhanced as compared to the expression levels of respective genes in the untreated WT ovary (1.8-fold, 3.2-fold, and 2.4-fold over the untreated WT levels of the respective genes, respectively). In contrast, the mRNA expression of *Ptges*, *Ptges2*, *Ptger2* and *Ptger4* was suppressed (70%, 50%, 60% and 45% of the untreated WT levels, respectively) (Groups 1 and 4). Treatment of ArKO mice with E2 alone increased mRNA expression of *Ptges*, *Ptges2* and *Ptger4* (2.0-fold, 1.8-fold and 3.3-fold over the untreated ArKO levels, respectively), whereas it reduced the mRNA expression of *Pla2g4a* and *Ptgs2* (51% and 34% of the untreated ArKO levels, respectively) (Groups 4 and 5). The ovulatory treatment increased expression of *Ptgs2*, *Ptges2* and *Ptger4* mRNA at 4 h after the hCG administration in E2 plus PMSG-primed ArKO mice (Group 7). Furthermore, mRNA level of *Hpdg* was significantly reduced after the ovulatory stimulation in ArKO mice. Significant induction of *Pla2g4a* and *Ptgs2* mRNA expression was noted in ArKO mice supplemented with gonadotropin alone (Group 6): 2.3-fold and 1.5-fold over the untreated ArKO levels, respectively. In the ovulated ArKO ovaries, mRNA expressions of *Pla2g4a*, *Ptgs2*, *Ptges* and *Ptger4* were reduced markedly as compared to the expression levels at 4 h after the hCG administration: 39%, 5%, 42% and 26% of the mRNA expression levels at 4 h after the hCG administration, respectively (Groups 7 and 8), while mRNA expression of *Hpdg* was left at a reduced level after ovulation. Assessment of the mRNA expression of *Ptges3*, *Ptger2* and *Ptgr2* in the ArKO ovary before and after ovulatory stimulation revealed no significant variation in their mRNA levels. Furthermore no significant difference was observed in the mRNA levels of genes related to PGE₂ metabolism between the ArKO ovaries treated with ovulatory and non-ovulatory doses of gonadotropins (Groups 7 and 9).

Induction of mRNA expression and protein of the *Ptgs2* gene has been demonstrated to be associated with estrogen inactivation catalyzed by estrogen sulfotransferase (*Est*) (Gershon et al., 2007). Thus, we examined the mRNA expression of *Est* in ArKO ovary before and after ovulatory stimulation. Marked induction was observed in the WT ovary at 4 h after hCG administration (Group 2). The mRNA expression level sharply declined after ovulation (Group 3) (Fig. 2). The basal ovarian expression of *Est* mRNA was elevated significantly in the ArKO mice (Group 4) compared with that of the WT ovary and the mRNA expression level was significantly reduced by E2 administration (Group 5). As observed in

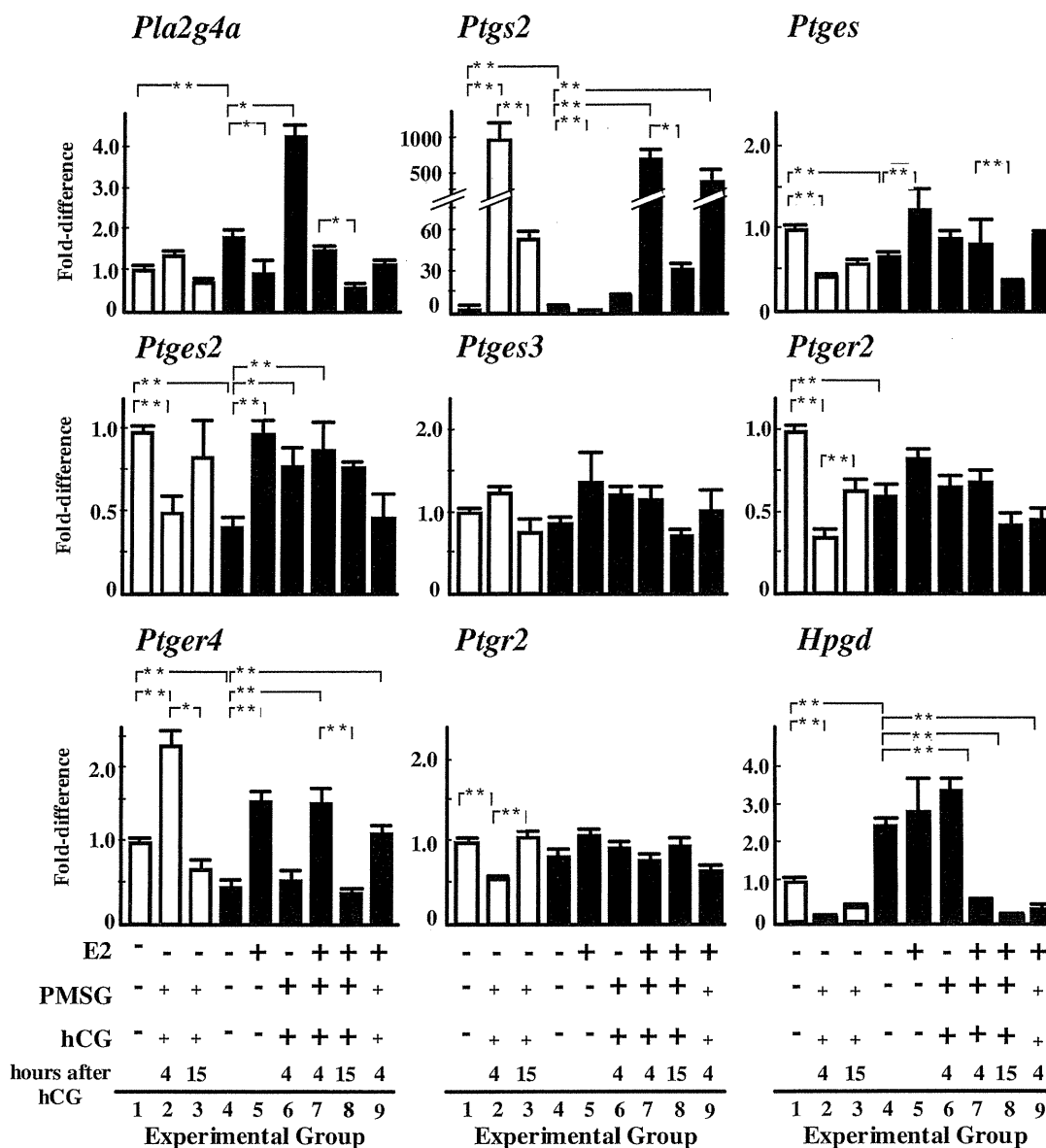


Fig. 1. RT-QPCR analysis on expression of genes related to PGE₂ metabolism in the ovary. WT (open bar) and ArKO (closed bar) mice were treated according to the schedule shown in Table 1. Bar illustrates fold difference compared with the expression level in WT ovaries without treatment. The numbers under the graphs indicate the experimental groups in Table 1. Results were expressed as mean ± standard error of three independent experiments (*P < 0.05 and **P < 0.01).

the WT ovary, significant induction and reduction of *Est* mRNA expression were observed at 4 h after the hCG administration and after ovulation in the ArKO ovaries, respectively (Groups 7 and 8). Furthermore, the RT-QPCR analysis revealed that the mRNA induction was independent of the gonadotropin dose (Groups 7 and 9).

3.2. Ovarian PGE₂ contents

Next, we measured ovarian contents of PGE₂ (Fig. 3). As reported by Davis et al. (1999), WT ovaries showed a significant increase in PGE₂ contents at 4 h after the hCG treatment: 60-fold over the amounts in untreated WT ovary (Group 2), followed by a decrease by more than 80% of the peak level after ovulation (Group 3). Similarly, PGE₂ contents increased significantly by

ovulatory doses of gonadotropins in ArKO mice and decreased after ovulation (Groups 7 and 8). When ArKO mice were administered gonadotropins alone, ovarian PGE₂ contents did not increase, but rather decreased (Group 6): 45% of the levels of untreated ArKO mice, indicating an absolute requirement of estrogen for preovulatory induction of PGE₂ production. When ArKO mice were stimulated with non-ovulatory doses of gonadotropins, only 16% of the content in the ArKO ovary treated with ovulatory doses was detected (Group 9).

3.3. Ovarian Ptgs2 expression

Western blot analysis confirmed significant induction of Ptgs2 expression in the ovary at 4 h after hCG treatment (Fig. 4, Groups 2 and 7), followed by reduction in the expression level after

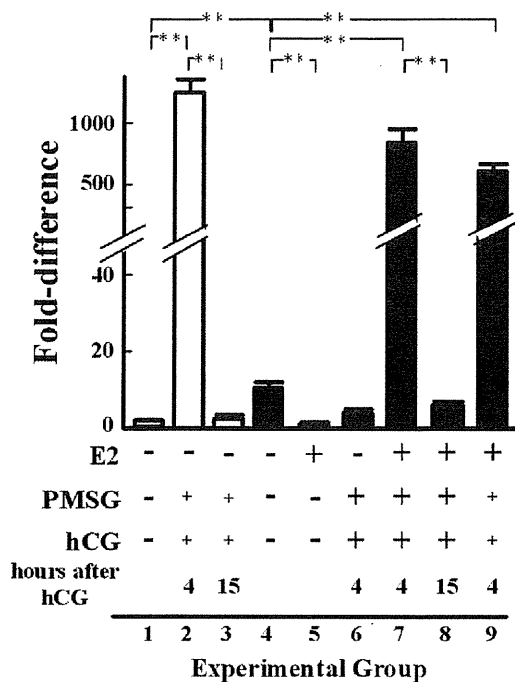


Fig. 2. RT-QPCR analysis of the *Est* gene expression in the ovary. WT (open bar) and ArKO (closed bar) mice were treated according to the schedule shown in Table 1. Bar illustrates fold difference compared with the expression level in WT ovaries without treatment. The numbers under the graph indicate the experimental groups in Table 1. Results were expressed as mean \pm standard error of three independent experiments (** $P < 0.01$).

ovulation in both WT and ArKO ovaries (Groups 3 and 8), further confirming that estrogen is absolutely required for the preovulatory induction of PGE₂ synthesis in the ovary (Group 6).

4. Discussion

Recent studies using ArKO mice have led to the conclusion that actions of E2 within the ovary are vital for controlling the breakdown of oocyte nests prior to the formation of primordial follicles (Britt et al., 2000, 2004). However, the role of E2 at late stages of follicular maturation has not been studied in detail, in part, because of the lack of a regimen to induce ovulation in ArKO mice. Recently, we established a procedure to induce ovulation in ArKO mice (Toda et al., 2012), which opened the way to analyze the functions of estrogen at the ovulatory stage.

In the present study, we examined the mRNA expressions of genes related to PGE₂ metabolism as well as its ovarian contents in ArKO mice before and after the ovulatory stimulations, as PGE₂ has been established to regulate the expression of a great variety of genes involved in ovulation (Hizaki et al., 1999; Russell and Robker, 2007; Segi et al., 2003). We observed alterations in the mRNA expression levels in nine out of 10 genes examined except for *Ptgs3* at 4 h after hCG administration in the WT ovary; nevertheless, relevance of these alterations to ovarian physiology remains to be clarified. A similar mRNA expression pattern observed in the WT ovary was detected in four out of the nine genes, three up-regulated (*Ptgs2*, *Est*, and *Pger4*) and one down-regulated (*Hpgd*), in the ArKO ovary after ovulatory stimulation.

The mRNA expression of the *Ptgs2* gene, which encodes a key enzyme for PGE₂ production (Narumiya et al., 1999; Segi et al., 2003), was greatly induced after administration of E2 plus gonadotropins in ArKO mice. A positive correlation between expressions of *PTGS2* and *CYP19* genes has been documented in breast cancers

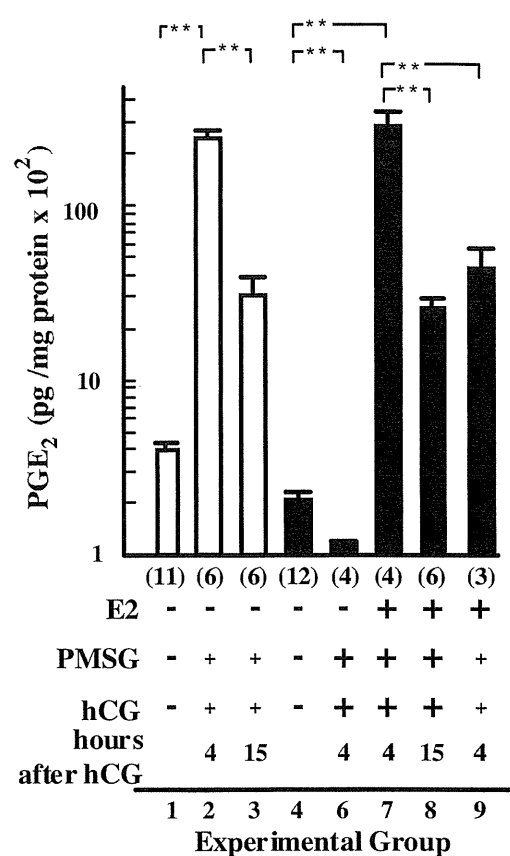


Fig. 3. Production of prostaglandin E2 in the ovary. WT (open bar) and ArKO (closed bar) mice at 4 weeks of age were treated according to the schedule shown in Table 1. Bar illustrates PGE₂ contents per mouse as pg/mg protein. The values in parentheses represent the number of mice examined. The numbers under the graph indicate the experimental groups in Table 1. Results were expressed as mean \pm standard error (** $P < 0.01$).

(Brodie et al., 2001), in which PGE₂ was shown to increase E2 production through enhancement of *CYP19* gene expression (Zhao et al., 1996). In the present study, we showed a novel correlation between the two components, namely that E2 is a vital factor to induce PGE₂ production in the preovulatory ovary.

Present RT-QPCR analysis revealed that expression of the *Est* gene seems to be under the direct regulation of estrogen; enhancement and reduction in the mRNA levels were respectively observed in untreated and E2-supplemented ArKO ovaries, indicating that transcription of the *Est* gene is controlled by estrogen-dependent negative feedback regulation. Although it seems paradoxical, the current study also revealed an absolute requirement of estrogen for the marked induction of the *Est* gene in the preovulatory ovary. Thus, expression of *Est* gene is regulated negatively by E2 without gonadotropins, whereas the negative effects of E2 have to be abolished by co-stimulation with gonadotropin. As documented in the human endometrium (Rubin et al., 1999), progesterone might be responsible for the transcriptional regulation of the *Est* gene in the ovary. Actually, marked elevation in the ovarian contents of progesterone was detected in the preovulatory ovary of ArKO mice only when the mice were stimulated with E2 plus gonadotropins (Toda et al., 2012). The mRNA expression of the *Ptger4* gene, but not the *Ptger2* gene, was found to be induced by ovulatory stimulation in both WT and ArKO mice, as reported previously by global transcript analysis (Tamba et al., 2010). These findings support the assertion that a signaling pathway through *Ptger4* participates in

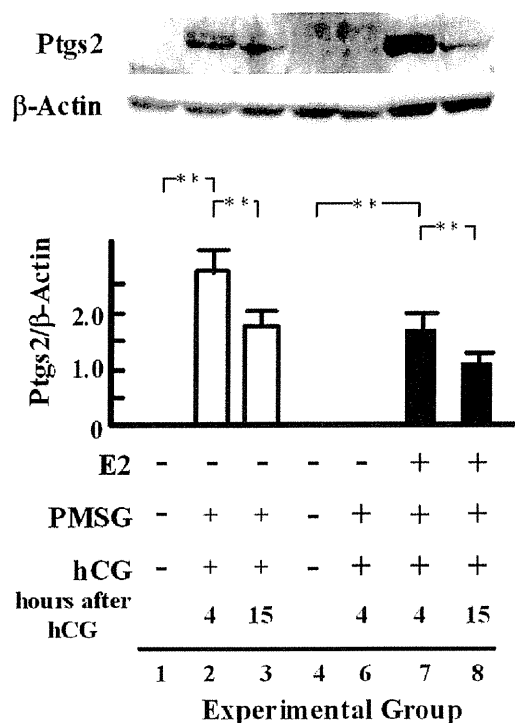


Fig. 4. Expression of Ptgs2 protein in the ovary. WT and ArKO mice at 4 weeks of age were treated according to the schedule shown in Table 1 (5 mice per group, $n = 3$). Bar illustrates quantitative analysis of Ptgs2 protein against β -actin in WT (open bar) and ArKO (closed bar) mice. The numbers under the graph indicate the experimental groups in Table 1. Results were expressed as mean \pm standard error of tree independent experiments (** $P < 0.01$).

regulation of the ovulatory process (Takahashi et al., 2006). However, it should be mentioned that changes in mRNA levels of the *Ptger4* gene might not necessarily reflect its protein levels in vivo, while studies using knockout mouse indicated that *Ptger2* is more tightly associated with reproductive functions than *Ptger4* (Hizaki et al., 1999). In contrast to the three up-regulated genes, the mRNA levels of *Hpgd* gene, encoding an enzyme that inactivates PGE_2 (Tai et al., 2006), were significantly decreased by the ovulatory stimulation. Nevertheless, administration of E2 alone was not sufficient to alter the expression levels of the gene, suggesting that factors other than E2 participate in the controls of the mRNA levels in the ovary.

In the present study, we interpreted our observations as estrogen actions within the ovary. However, because current study was conducted under the in vivo conditions, the question remains as to whether the observed effects of estrogen are results of its intra-ovarian actions or those of cross talk between ovary and other organ systems including hypothalamus/anterior pituitary gland.

We proposed previously that the ovarian ratio between estrogen and androgen contents is an important parameter for ovulatory induction, in addition to the ovarian content of each of the sex steroid hormones (Toda et al., 2012). In the present study, ovarian PGE_2 contents appear to be in good agreement with outcomes after ovulatory stimulation. It is plausible that enhanced production of PGE_2 at the appropriate time points after ovulatory stimulation might be achieved favorably under an ovarian sex steroid milieu showing the appropriate ratio between estrogen and androgen contents. Therefore, these results imply that the enhancement of PGE_2 production might be one of the therapeutic strategies for patients who are anovulatory due to estrogen insufficiency.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant in aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (to T. Saibara, 21590849).

References

- Algire, J.E., Srikanthakumar, A., Guilbault, L.A., Downey, B.R., 1992. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 67–69.
- Barbosa, I., Maia, H.J., Lopes, T., Elder, M.G., Coutinho, E.M., 1979. Effect of indomethacin on prostaglandin and steroid synthesis by the marmoset ovary in vivo. *Int. J. Fertil.* 24, 142–144.
- Bley, M.A., Saragüeta, P.E., Barañao, J.L., 1997. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 62, 11–19.
- Britt, K.L., Drummond, A.E., Cox, V.A., Dyson, M., Wreford, N.G., Jones, M.E., Simpson, E.R., Findlay, J.K., 2000. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the *Cyp19* (aromatase) gene. *Endocrinology* 141, 2614–2623.
- Britt, K.L., Saunders, P.K., McPherson, S.J., Misso, M.L., Simpson, E.R., Findlay, J.K., 2004. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol. Reprod.* 71, 1712–1723.
- Brodie, A.M., Lu, Q., Long, B.J., Fulton, A., Chen, T., Macpherson, N., DeJong, P.C., Blankenstein, M.A., Nortier, J.W., Slee, P.H., van de Ven, J., van Gorp, J.M., Elbers, J.R., Schipper, M.E., Blijham, G.H., Thijssen, J.H., 2001. Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 79, 41–47.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Clarke, I.J., Burger, H.G., 1981. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 24, 105–113.
- Chandras, C., Ragoobir, J., Barrett, G.E., Bruckdorfer, K.R., Graham, A., Abayasekara, D.R., Michael, A.E., 2004. Roles for prostaglandins in the steroidogenic response of human granulosa cells to high-density lipoproteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 222, 1–8.
- Cheng, G., Weihsua, Z., Makinen, S., Makela, S., Saji, S., Warner, M., Gustafsson, J.A., Hovatta, O., 2002. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol. Reprod.* 66, 77–84.
- Davis, B.J., Lennard, D.E., Lee, C.A., Tian, H.F., Morham, S.G., Wetsel, W.C., Langenbach, R., 1999. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 (IL-1) β . *Endocrinology* 140, 2685–2695.
- De Silva, M., Reeves, J.J., 1985. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 75, 547–549.
- Drummond, A.E., Findlay, J.K., 1999. The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 57–64.
- Duffy, D.M., Seachord, C.L., Dozier, B.L., 2005. An ovulatory gonadotropin stimulus increases cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) expression and activity in granulosa cells of primate periovulatory follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5858–5865.
- Duffy, D.M., Stouffer, R.L., 2001. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 731–739.
- Duffy, D.M., Stouffer, R.L., 2002. Follicular administration of a cyclooxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Hum. Reprod.* 17, 2825–2831.
- Espey, L.L., Norris, C., Saphire, D., 1986. Effect of time and dose of indomethacin on follicular prostaglandins and ovulation in the rabbit. *Endocrinology* 119, 746–754.
- Evans, G., Dobias, M., King, G.J., Armstrong, D.T., 1983. Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. *Biol. Reprod.* 8, 22–28.
- Filion, F., Bouchard, N., Goff, A.K., Lussier, J.G., Sirosi, J., 2001. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 34323–34330.
- Fisher, C.R., Graves, K.H., Parlow, A.F., Simpson, E.R., 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6965–6970.
- Gershon, E., Hourvitz, A., Reikhav, S., Maman, E., Dekel, N., 2007. Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in *SULT1E1*-deficient mice. *FASEB J.* 21, 1893–1901.
- Guan, Y., Zhang, Y., Schneider, A., Reinddeau, D., Mancini, J.A., Davis, L., Komhoff, M., Breyer, R.M., Breyer, M., 2001. Urogenital distribution of a mouse membrane-associated prostaglandin E(2) synthase. *Am. J. Physiol.* 281, F1173–F1177.
- Hara, S., Kamei, D., Sasaki, Y., Tanemoto, K., Nakatani, Y., Murakami, M., 2010. Prostaglandin E synthases: understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* 92, 651–659.
- Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S., Ichikawa, A., 1999. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10501–10506.
- Joyce, I.M., Pendola, F.L., O'Brien, M., Eppig, J.J., 2001. Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid expression in mouse granulosa cells during ovulation. *Endocrinology* 142, 3187–3197.

- Kol, S., Ruutinen-Altman, K., Ben-Shlomo, I., Payne, D.W., Ando, M., Adashi, E.Y., 1997. The rat ovarian phospholipase A2 system: gene expression, cellular localization, activity characterization, and interleukin-1 dependence. *Endocrinology* 138, 322–331.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., Dey, S.K., 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91, 197–208.
- Merk, F.B., Boticelli, C.R., Albright, J.T., 1972. An intrafollicular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary: an electron microscope study. *Endocrinology* 90, 992–1007.
- Mikuni, M., Pall, M., Peterson, C.M., Peterson, C.A., Hellberg, P., Brannstrom, M., Richards, J.S., Hedin, L., 1998. The selective prostaglandin endoperoxide synthase-2 inhibitor, NS-398, reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat. *Biol. Reprod.* 59, 1077–1083.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh-ishi, S., Kudo, I., 2000. Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32783–32792.
- Murdoch, W.J., Peterson, T.A., Van Kirk, E.A., Vincent, D.L., Inskip, E.K., 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.* 35, 1187–1194.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226.
- Nuttinck, F., Reinaud, P., Tricoire, H., Vigneron, C., Peynot, N., Mialot, J.P., Mermillod, P., Charpigny, G., 2002. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 93–101.
- Priddy, A.R., Killic, S.R., Elstein, M., Morris, J., Sullivan, M., Pate, I.L., Elder, M., 1990. The effect of prostaglandin synthetase inhibitors on human preovulatory follicular fluid prostaglandin, thromboxane, and leukotriene concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 235–242.
- Richards, J.S., Pangas, S.A., 2010. New insights into ovarian function. *Handbook Exp. Pharmacol.* 198, 3–27.
- Richards, J.S., Rolfes, A.I., 1980. Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. *J. Biol. Chem.* 255, 5481–5489.
- Robker, R.L., Richards, J.S., 1998. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol. Endocrinol.* 12, 924–940.
- Rubin, G.L., Harrold, A.J., Mills, J.A., Falany, C.N., Coughtrie, M.W., 1999. Regulation of sulphotransferase expression in the endometrium during the menstrual cycle, by oral contraceptives and during early pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 995–1002.
- Russell, D.L., Robker, R.L., 2007. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum. Reprod. Update* 13, 289–312.
- Samuelsson, B., Morgenstern, R., Jakobsson, P., 2007. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol. Rev.* 59, 207–224.
- Segi, E., Haraguchi, K., Sugimoto, Y., Tsuji, M., Tsunekawa, H., Tamba, S., Tsuboi, K., Tanaka, S., Ichikawa, A., 2003. Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse preovulatory follicles and oviducts during superovulation. *Biol. Reprod.* 68, 804–811.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, D., Mendelson, C.R., Bulun, S.E., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15, 342–355.
- Sirois, J., 1994. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135, 841–848.
- Sirois, J., Dore, M., 1997. The late induction of prostaglandinG/Hsynthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology* 138, 4427–4434.
- Sirois, J., Simmons, D.L., Richards, J.S., 1992. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles: induction in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 11586–11592.
- Sun, T., Deng, W.B., Diao, H.L., Ni, H., Bai, Y.Y., Ma, X.H., Xu, L.B., Yang, Z.M., 2006. Differential expression and regulation of prostaglandin E synthases in the mouse ovary during sexual maturation and luteal development. *J. Endocrinol.* 189, 89–101.
- Tai, H.H., Cho, H., Tong, M., Ding, Y., 2006. NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions. *Curr. Pharm. Des.* 12, 955–962.
- Takahashi, T., Morrow, J.D., Wang, H., Dey, S.K., 2006. Cyclooxygenase-2 derived prostaglandin E2 directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 37117–37129.
- Tamba, S., Yodoi, R., Morimoto, K., Inazumi, T., Sukeno, M., Segi-Nishida, E., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Narumiya, S., Sugimoto, Y., 2010. Expression profiling of cumulus cells reveals functional changes during ovulation and central roles of prostaglandin EP2 receptor in cAMP signaling. *Biochimie* 92, 665–675.
- Toda, K., Hayashi, Y., Ono, M., Saibara, T., 2012. Impact of ovarian sex steroids and ovulatory gene expression in aromatase-null mice. *Endocrinology* 153, 386–394.
- Toda, K., Takeda, K., Okada, T., Akira, S., Saibara, T., Kaname, T., Yamamura, K., Onishi, S., Shizuta, Y., 2001. Targeted disruption of the aromatase P450 gene (*Cyp19*) in mice and their ovarian and uterine responses to 17 β -oestradiol. *J. Endocrinol.* 170, 99–111.
- Zarlenga, D.S., Gamble, H.R., 1987. Simultaneous isolation of preparative amounts of RNA and DNA from *Trichinella spiralis* by cesium trifluoroacetate isopycnic centrifugation. *Anal. Biochem.* 162, 569–574.
- Zhao, Y., Agarwal, V.R., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1996. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 137, 5739–5742.

糖尿病とNASH/NAFLD

西原利治* 湯川晋弘*
腰山裕一* 小野正文*

索引用語：肥満，インスリン抵抗性，脂肪肝，BMI，HbA1c

はじめに

1940年代に日本では深刻な食料事情の悪化を経験した。小児の身長・体重の伸びは40年前のレベルにまで低下したため、1950年代には栄養状態の改善が強く推奨され、食事の欧米化が図られた。その結果、1970年にかけてカロリー摂取量は増加し、1950年代14 g/日であった脂肪の摂取量も56 g/日へと急増した¹⁾。可処分所得の増加により1960年以降はアルコールの摂取量も増加し、MEOS系やCYP2E1などアルコールを代謝する酵素が誘導され、肝臓への代謝負荷が高まったことにより、アルコール性肝障害の増加が社会問題となった²⁾。このため、厚生労働省により適正飲酒に向けた重点的な取り組みが行われ、週3回清酒1合相当量以上の飲酒者数を男性では35%、女性では7%にまで押さえ込むことができた³⁾。

1970年代に入ると癌や脳卒中など働き盛りの労働者に発生する成人病に罹患する症例

が続出した。このため広く職場健診が行われるようになり、減塩指導や降圧剤の適正使用が進み、脳出血の症例数が劇的に減少する成果が得られた。しかし、肥満対策は実施が困難で、生活習慣の変容を背景とする体重増加を背景とした糖尿病や脂質異常症など脳心血管イベントの危険因子の保有率を低減する試みはいまだ成功していない。実際、児童や成人男性と中高年女性では脂肪の摂取量が高止まりし、運動不足と相まって、肥満人口の増加がごく最近まで続いてきた(図1)⁴⁾。生活習慣病の危険因子を軽減するためには、若年女性を中心に成果をあげているカロリー摂取量を低減する試みを男性や児童に広げていく地道な努力が必要であろう。

本稿では、男性の検診受診者のデータを基に、検診が指摘する肝障害の実態を明らかにし、肥満や脂肪肝を背景として発症するNASH症例と対比することにより、糖尿病と非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)との関連を検討してみたい。

Toshiji SAIBARA *et al*: Type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease

*高知大学消化器内科 [〒783-8505 高知県南国市岡豊町]

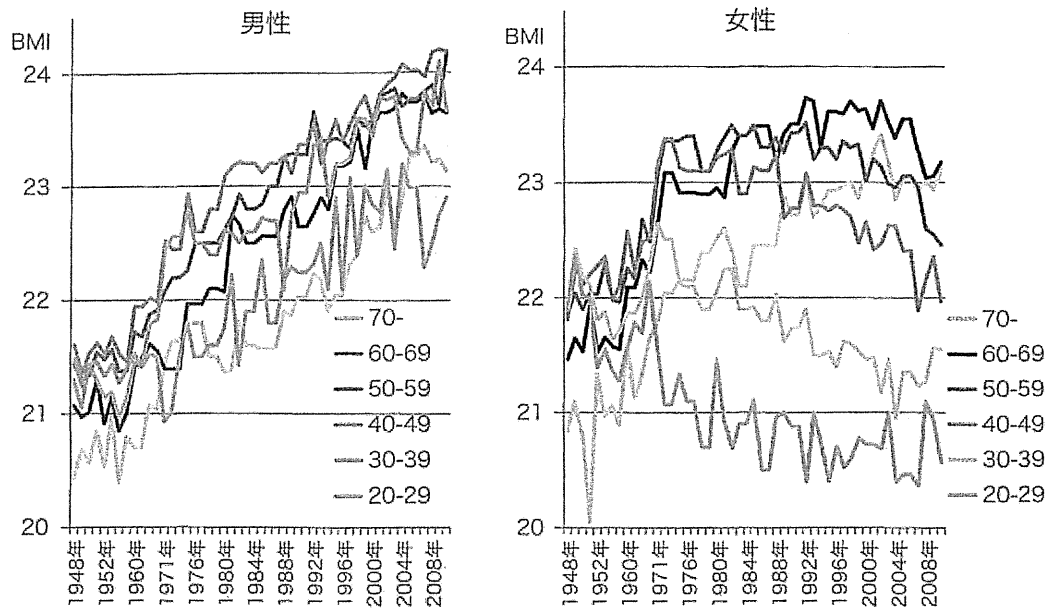


図1 日本人におけるBMIの推移

2 肥満とインスリン感受性の低下

健常者では食後に極めて高濃度のブドウ糖が門脈を介して肝臓に流入するため、肝細胞はインスリンの働きにより糖を取り込みグリコーゲンとして肝細胞に貯蔵する。同時に摂取されたトリグリセライドは胆汁によってミセル化された後に吸収され、リンパ管を介して胸管から大循環へ直接流入する。もし、グリコーゲンとして貯蔵可能な量を超える糖質を摂取すると、肝細胞は飽和したグリコーゲンの合成を止め、代わりに脂肪酸の合成を開始する。合成された脂肪酸はトリグリセライドとなってVLDLとして肝静脈に放出される。前者は食後早期のカイロミクロン血症、後者は食後に生じる乳び血漿の原因となる。これらに含まれるトリグリセライドの多くは毛細血管に存在するリポ蛋白リパーゼの働きにより脂肪酸に戻されて消費され、あるいは脂肪組織に貯蔵されるため、インスリンの感受性の低下は肥満や脂肪肝進展の契機となる

可能性が高い。

肥満症例ではトリグリセライドやコレステロールの合成が亢進している場合が多いため健常者に比して血中脂質の濃度が上昇しやすく、全身のマクロファージが酸化した脂質を貪食するようになると、脂肪化した肝細胞の周辺でも非特異的な炎症性細胞浸潤が始まる。こうして肥満に伴い増加した内臓脂肪組織内の炎症性細胞浸潤に留まらず、CRP産生臓器である肝臓内でも炎症性サイトカインが過剰に分泌されるようになると、末梢血では高感度CRPが高値を示し始める。炎症性サイトカインの過剰分泌の結果、脂肪組織や肝細胞におけるインスリンシグナル伝達が抑制され、脂肪組織や肝細胞ではインスリン感受性が低下する。

3 脂肪肝と肝障害

食事の欧風化により乳児の栄養状態は改善したが、過食と運動不足により小児や成人男性、中高年女性の体重が増加すると末梢組織

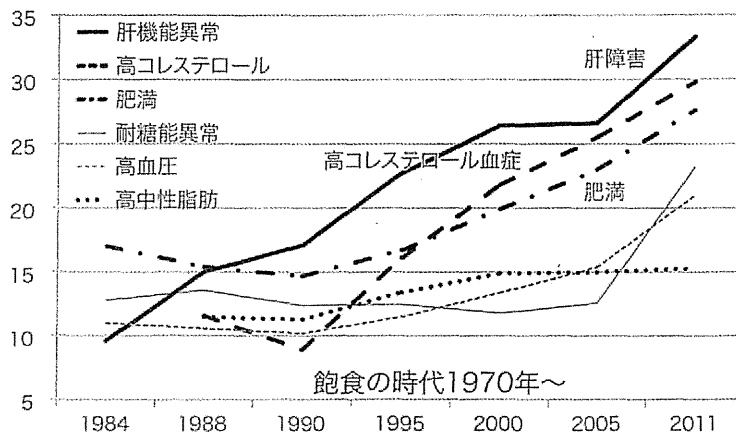


図2 人間ドック学会による2項目の検査異常

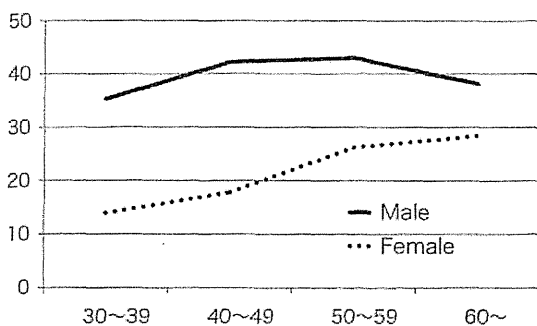


図3 2011年度の肝機能異常頻度

におけるインスリン感受性が低下し、夜間を中心に末梢脂肪組織から脂肪酸の放出が高まり、過剰の脂肪酸が肝臓へ流入するようになる。夜間にケトン体産生に必要な脂肪が肝に負荷されると、脂肪酸はトリグリセライドとなり肝細胞内に脂肪滴として蓄えられるようになる。これが脂肪肝である。

人間ドック学会の統計が得られるようになった1984年以降、肝障害の増加は続き、2011年にはついに検診受診者の33.3%に達した(図2)⁴⁾。その内訳をみると、すでに本邦では検診受診者の35%で脂肪肝が観察されるほど肥満人口が増加しているため、脂肪肝を呈する頻度に応じて女性では中高年、男性ではすべての年代で肝障害がとくに高頻度に

観察される(図3)³⁾。このことは、腹部超音波検査で脂肪肝の存在が確認された飲酒歴のない男性では半数、女性では1/4がALT>30 IU/Lを呈するのに比して、脂肪肝を認めない男性でALT>30 IU/Lを示す頻度は1割、女性ではわずか2%に過ぎないことから伺える。

NAFLDはこのように脂肪肝を呈する症例で慢性の肝障害を有する症例からなる症候群で、単純性脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、さらには肝硬変まで幅広い病態を包含する疾患概念である。NAFLDでは必ずしもALT値が異常高値を示すとは限らないため、検診受診者の少なくとも2割をNAFLDが占めると推定されている。NAFLD症例はインスリンに対する感受性が低下しているために、食後高血糖の頻度は高く、インスリン分泌は過剰になりやすい。過剰に分泌されたインスリンは遷延性の血糖低下を生じ、過食の原因となりやすい。持続血糖測定(CGM)を行うと、食後に生じる血糖値の変動幅が健常者に比して大きく、血糖が低下しやすい午後3時過ぎに一致して間食を摂取する傾向が認められる。仮に1日に50 kcal過剰に摂取すれば毎日5gずつ体重が増加し、

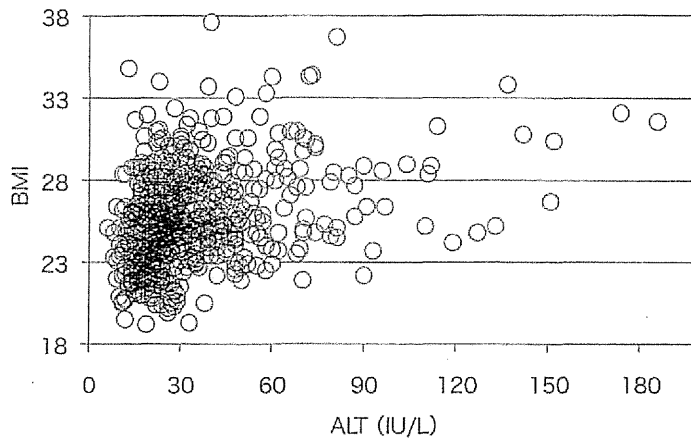


図4 脂肪肝症例におけるBMI

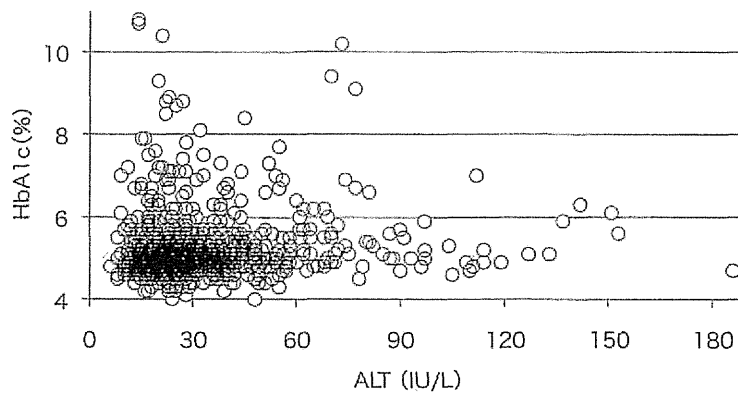


図5 脂肪肝症例におけるHbA1c値

1カ月で150 g, 1年で2 kg体重が増加するため, NAFLDでは肥満が形成されやすい。検診受診者のALT値とBMIの相関をみれば, 一目瞭然である(図4)。

4 糖尿病と肝障害

NAFLDではインスリン感受性の低下が広く観察されるため, 糖尿病は重要な危険因子である⁵⁾。糖尿病症例の肝組織所見は疾患活動性の高い症例が多いとされているが^{6~8)}, その原因のひとつに糖尿病症例では脂肪肝の程度が強いことが報告されている⁹⁾。メタボリックシンドロームは心血管イベントの予知

因子として提唱された指標であるため, 内臓肥満を伴う症例では心血管イベントの頻度が高いのは当然であるが, NAFLDを合併した糖尿病ではNAFLDを伴わない糖尿病よりもさらに心血管イベントの高いことが知られており, 減量手術を考慮されることが多い¹⁰⁾。

検診受診者におけるALT値とHbA1c値の関連をみると, HbA1cが高値を示す症例では半数強がALT<30 IU/Lである(図5)。逆にALT値が高値を示す症例ではHbA1cは正常値に留まることが多い。この意味するところは血糖のコントロールの善し悪しと肝障害との間に直接的な関連はないということであ

り、インスリンに対する感受性が低下したために過剰なインスリン分泌の持続する症例では肝障害が顕在化しやすいことを示唆している。また、インスリンの分泌が荒廃してHbA1cが高値を示す症例には2種類あることに留意が必要である。ひとつはインスリンの分泌が十分でないため、軽度のインスリン抵抗性によりインスリン分泌能が失われた症例群で、肥満を伴わない2型糖尿病の大部分が属する。このような症例に過剰なインスリン分泌を生じるような治療を行って肥満が生じない限り、肝臓に線維化の生じるような肝障害は惹起されないであろう。もうひとつの群は肥満による肝障害を伴う群であり、肝障害が遷延して肝臓の線維化が進展する過程でインスリンの分泌が枯渇し始めたためHbA1cが徐々に高値を示すようになった症例が大半である。肝障害を伴う肥満を背景とした糖尿病の治療に際してはインスリン感受性の改善を旨とし、病態を良く理解した治療が求められる。

5 おわりに

近年、肝硬変や肝細胞癌などの肝疾患が糖尿病症例の死因として重要であることがウイルス性慢性肝疾患の少ない欧米から報告されている。本邦でも糖尿病症例の13%は肝疾患関連死を遂げるにも関わらず、依然、進展した肝細胞癌の紹介は跡を絶たない。その背景には糖尿病症例における肝障害の合併率は40~70%と報告されているにも関わらず¹³⁾、糖尿病診療において肝障害の存在が顧みられていない現状があるのではなかろうか。欧米ではほとんどの症例が肥満を背景とするのに対して、本邦ではC型肝炎などの合併が多いと考えるむきも多い。あるいはインスリン分泌能の低い非肥満の糖尿病

が多いとの反論もあろう。しかし、成人の2割がNAFLDと診断される本邦で、糖尿病におけるNAFLDの頻度が低いことは到底あり得ない。実際、われわれのB型・C型慢性肝炎、飲酒者を除外した脂肪肝症例における検討では、HbA1cが5.8%以上の症例におけるALT>30 IU/Lの症例の頻度は4割を超える(図5)。今後はこのような症例にも積極的に目を向け、NASH/NAFLDの早期発見に努める必要がある。

文 献

- 1) 厚生労働省：国民栄養の現状 (http://www0.nih.go.jp/eiken/chosa/kokumin_eiyou/)
- 2) Takada A, Tsutsumi M : National survey of alcoholic liver disease in Japan (1968-91) . J Gastroenterol Hepatol 10 : 509-516, 1995
- 3) 平成22年国民健康・栄養調査結果の概要 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000020qbb-att/2r98520000021c19.pdf>)
- 4) 2011年人間ドックの現況 (http://www.ningendock.jp/concerned/press/pdf/dock-genkyou_h23.pdf)
- 5) Argo CK, Caldwell SH : Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. Clin Liver Dis 13 : 511-531, 2009
- 6) Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM et al : Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. Am J Med 107 : 450-455, 1999
- 7) Ong JP, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, Goodman Z, Younoszai ZM. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. Obes Surg 15 : 310-315, 2005
- 8) Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G et al : Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology 37 : 917-923, 2003
- 9) Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A et al : Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. Diabetes Care 31 : 165-169, 2008

10) Targher G, Bertolini L, Poli F et al : Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 54 : 3541-3546, 2005

11) Tolman KG, Fonseca V, Tan MH et al : Narrative review: hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141 : 946-956, 2004

* * *

特集 生活習慣病としての肝疾患

～非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)/ 非アルコール性
脂肪肝炎 (NASH) の現状と対応～

2. NAFLD/NASH の疫学 ～小児と成人における相違～

西本正子*¹⁾・越智経浩*²⁾・西原利治*³⁾

本邦では成人の2割超が脂肪肝を背景とする非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に罹患しており、男性では増加しつつあるが、女性では横這いあるいは減少傾向にある。肝臓の線維化が速やかに進展して肝硬変や肝細胞癌の発生母地となる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) には、男女とも2%が罹患している。小児の健診では腹部超音波検査や血液検査が行われないので、NAFLD に関する情報は乏しく、高度肥満児を中心にその頻度は2～5%と目されている。肝生検所見に基づいて診断される NASH については、中高生の高度肥満児では成人と同様の組織像を示すが、幼児や小児の NASH についてはその病態はもとより、どのような肝組織像を呈する症例が多いのか未だ明らかではない。

1. はじめに

人間ドック学会から、2011年に検診を受診した成人で顕性の肝障害を呈した頻度は33.3%と報告されている。(図1)¹⁾。男性では30歳代から70歳代に至るまでのすべての年代で、これを上回る40%前後を示したが、若年女性での肝障害の頻度は15%に留まり、中高年女性でも30%を超えることはなかった。このため男性ではアルコール性肝障害と肝炎ウイルスによる肝障害を除いた約25%、女性では20%の成人が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) については男女とも2%が罹患していると推計される。(図2)。他方、小児の健診では腹部超音波検査や血液検査は行われていないため、小児の NAFLD/NASH についてはほとんど検討がなされていない。

本稿では NAFLD/NASH に関する成人の疫学

データに加えて、小児で入手可能な情報を紹介したい。

2. NAFLD と肥満

NAFLD は脂肪肝を背景とする慢性進行性の肝疾患で、飲酒や肝炎ウイルス感染、既知の代謝異常など慢性肝疾患をきたす病態が除外された症例で構成される。そして高血圧や脂質異常、糖尿病などの生活習慣病の合併頻度が高いので、生活習慣病の肝臓における表現型と考えられている²⁾。8,000人を超える成人の検診受診者を用いた多施設共同研究により、NAFLD について詳細な解析が行われた³⁾。その報告によれば、男女ともに NAFLD の罹患頻度は BMI (body mass index) 依存性に増加し、男性では BMI が 20 を超えるとその頻度は 10% を超え、22 を超えると 35%、24 を超えると 55% に達する。同様に、女性でも 22 を超えると 20%、24 を超えると 30%、26 を超

*高知大学医学部消化器内科学講座 ¹⁾(にしもと・まさこ) ²⁾(おち・つねひろ) ³⁾教授(さいばら・としじ)

——■特集・生活習慣病としての肝疾患～非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)/非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の現状と対応～——

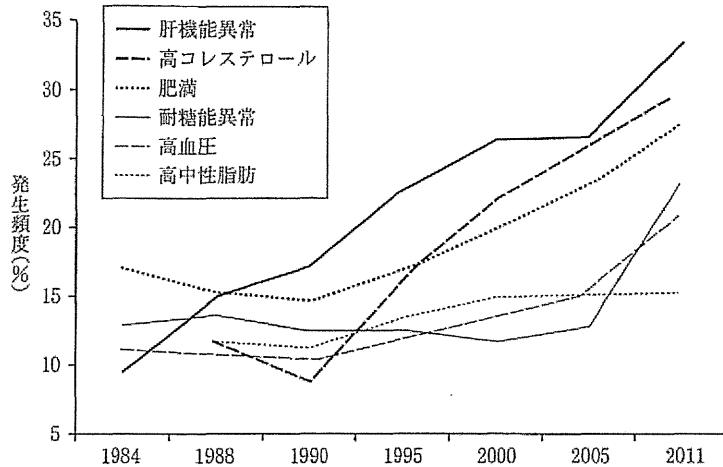


図1 人間ドック学会による6項目異常の推移

1980年代の初頭より肝障害を示す検診受診者が増加し、10年遅れでコレステロールが高値を示す症例が増加した。男性と閉経期以降の女性における肥満人口の増加が、このような変化をもたらしたと考えられている。

(文献1より)

えると60%に達することが示されている。また、BMIが28を超えると男女ともほぼ80%の有病率となることが明らかになった。

ところが、小児では成長の因子が加わるため、このような詳細な検討は世界的にも全く行われていない。

3. NASHの有病率

肥満の程度、性差、個人の遺伝的背景因子に加えてよる修飾に加えて、生活習慣病の罹病期間や加齢の影響を受けて、NAFLDの肝組織像は脂肪肝からNASHの終末像である肝硬変、肝細胞癌まで多様である。NAFLDの約1割を占め、肝硬変への移行率が高く、肝疾患関連死の誘因となるNAFLDは特にNASHと呼ばれ、成人における有病率は男女ほぼ同率の2%と推定されている。NASHでは速やかに肝臓の線維化が進展するため、脳・心血管疾患ばかりでなく、肝硬変や肝細胞癌による肝関連死増加への対策が求められる。このような症例を同定するためには、肝障害を伴った脂肪肝症例を早期に発見し、肝生検により肝細胞の風船様変性、あるいは肝線維化の進展を

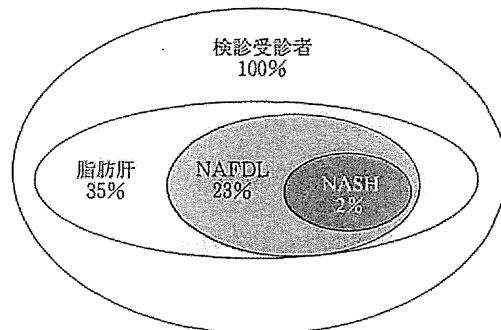


図2 検診受診者におけるNAFLD/NASHの頻度

検診受診者における各病態罹患者の頻度を示した。

NAFLD：非アルコール性脂肪性肝疾患

NASH：非アルコール性脂肪肝炎

(筆者ら作成)

証明する必要がある²⁾。しかし、肝生検は侵襲的な検査で、小児で施行されることは稀なため、小児における有病率は明らかではない。

4. NAFLDの有病率の推移

1970年代には男女ともに成人のBMIが増加

NAFLD：非アルコール性脂肪性肝疾患，NASH：非アルコール性脂肪肝炎，BMI：body mass index

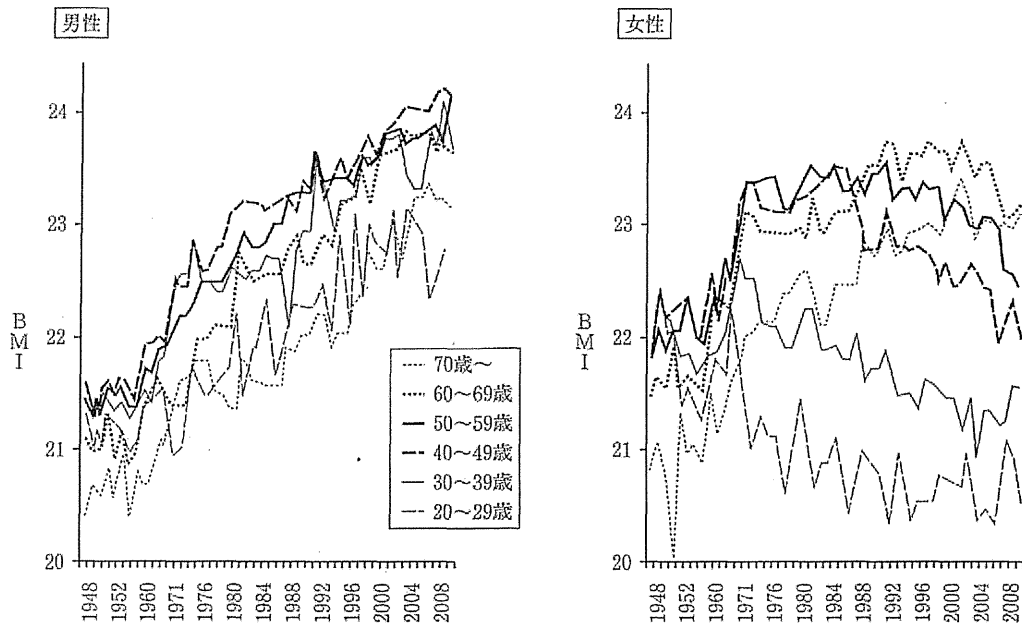


図3 年代別 BMI の推移

20 歳代、30 歳代、40 歳代、50 歳代、60 歳代、70 歳以上に区分し、年代ごとの平均体重と平均身長より算出した BMI の継年の推移を示す。

BMI : body mass index

(筆者ら作成)

し、1980 年代初頭には 30～70 歳男性、40～70 歳女性の BMI の平均値が 23 となった。(図 3)。この時期に肝障害を有する人口の増加が明らかとなった。(図 1)。その後、40～70 歳女性の BMI は微増に留まったが、30～70 歳男性では増加を続け、24 に迫る勢いである。この間、肝障害を有する成人の人口は増え続け、今日に至っている。非ウイルス性非アルコール性肝障害は男性に多く、その多くは脂肪肝症例に偏在するという特徴を有する。このことから、1980 年代以降に顕在化し、増加した肝障害は男性と閉経後の女性を中心とする肥満人口の増大が原因と見なすことができる。すべての年齢層の男性で肥満人口は今なお増加を続けており、NAFLD/NASH の罹患者数は今後も男性を中心に緩やかに増加することが予想される。(図 3)。

他方、20 歳代女性を中心に 1970 年代から始まった減量への取り組みが 40 年経った今日では 60 歳代にまで広がり、BMI の顕著な改善として実を結びつつある。このため、今後も同様の傾向

が続けば NAFLD の頻度はさらに男性優位となり、現在性差はないとされる NASH の有病率が男性優位へと移行するのも時間の問題であろう。

5. 小児における疫学

本邦における小児の栄養状態は、体重の継年的な変動からある程度推測することが可能で、3つの時期に分けることができる。(図 4)⁴⁾。第一期は 20 世紀初頭から 1930 年初頭にかけてで、都市部の栄養状態に比し、田舎では栄養状態が不良であり、小児の体格にも差異が認められたため、その改善が図られた時期である。第二期は、第二次世界大戦前後から復興期である。戦後の混乱に際しては、栄養状態が極端に悪化した。この時期に生まれた子供が思春期に入る 1960 年代には、高度経済成長に支えられて国民全体の食事摂取量は大幅に増加し、栄養状態の改善が達成された。その原動力となったのは、食事の欧風化を推進した生活改善運動であり、成人における脂肪の摂取量は 12g/日から 54g/日へと劇的に増加した⁵⁾。脂

■特集・生活習慣病としての肝疾患～非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)/非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の現状と対応～

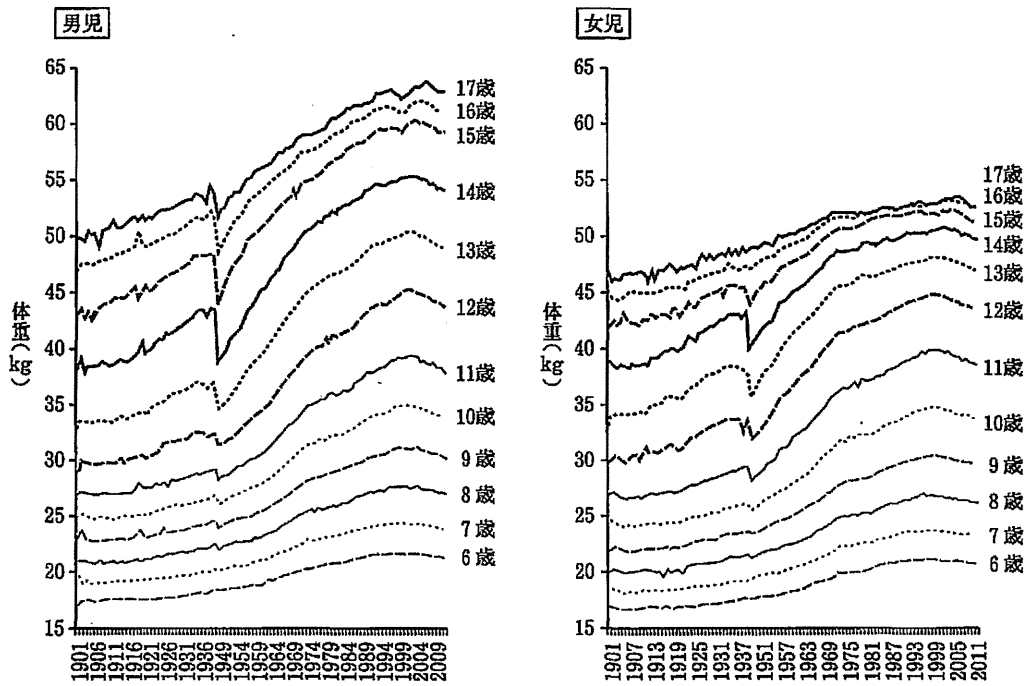


図4 児童体重の推移

20世紀初頭から今日に至る小児の年齢別平均体重の推移を示した。第二次世界大戦に際して、学童の体重が大きく低下し、その後の高度経済成長に伴って増加したことが示されている。

(文献4より)

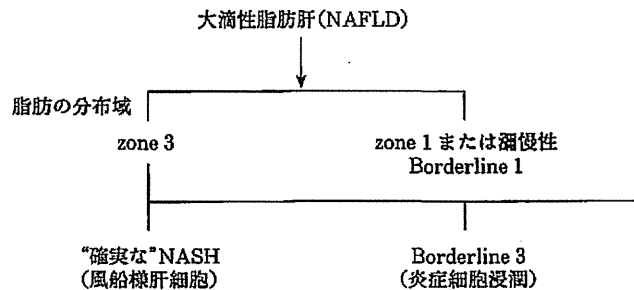


図5 NAFLD/NASH の分類

肝線維化を伴わない NAFLD の新たな分類では、肝小葉の zone 3 に病変の首座が存在し、風船様肝細胞を認めるものを “definite NASH”, steatohepatitis は認めるが風船様肝細胞を認めない症例は Borderline 3, 病変の首座が zone 1 に存在する症例は Borderline 1 に分類される。

NAFLD：非アルコール性脂肪性肝疾患

NASH：非アルコール性脂肪肝炎

(文献15より)

2. NAFLD/NASH の疫学～小児と成人における相違～■

肪摂取量の増加はインクレチン分泌能の増強をもたらし⁶⁾、インスリンの分泌能を大幅に増強し、肥満を支えるインスリン分泌量の確保に寄与し、肥満人口増加の基礎が築かれた。

小児では成人と異なり成長の因子が加わるために、肥満判定は身長別標準体重を基に相対評価が実施されてきた。しかし、その集団の体格が継年的にどのように変動しているのかといった状況把握には不向きであり、2000年を境に年齢別平均体重が増加から減少に転じた変化を検出することができなかった。(図4)。そこで2000年以降の第三期では、この変動を感知する方策として、性別、年齢別、身長別に標準体重を定めて、そのcut-off値を固定する方法が新たに採用され、2006年度から実施されている。

肥満児童の頻度は、この30年間で日本では2倍⁷⁾、欧米では3倍に増えた⁸⁾と報告されている。欧米では思春期の肥満は7～8割が成人の肥満に移行する⁹⁾と言われる今日、肥満児はNAFLDの有力な予備群と考えられる。しかし、小児の健診には腹部超音波検査や血液検査が取り入れられていないため、脂肪肝の頻度や肝障害の頻度についての全国調査は行われておらず、少数例での検討に基づいて2～5%の有病率と報告されている^{10)～12)}。世界的にもNAFLDの有病率に関するデータは乏しく、年齢によって異なるが思春期では3%程度と推定されているに過ぎない¹³⁾¹⁴⁾。

NASHでは主に中心静脈域を中心に肝細胞への脂肪の沈着が観察される。しかし、例外的に門脈域を中心とした肝細胞への脂肪沈着を認めることがあり、NASHの1%を占める。このような症例は通常の肥満を背景とするNASHとは異なる病態である可能性がありBorderline 1に分類される。(図5)¹⁵⁾。この群は小児のNASHでは重要な位置を占めると報告されているが、その病態は明らかとは言えない¹⁶⁾。

6. おわりに

「小児は成人のミニアチュアではない」としばしば言われるが、小児におけるNAFLD/NASHの特殊性を考えれば、NAFLD/NASHもその例に漏れないのかもしれない。NASHの診断には、脂肪肝を背景とした肝臓の線維化あるいは風船様肝細胞

の存在を証明すれば十分で、種々の代謝異常により類似の変化を生じる可能性がある。もし、Wilson病という疾患概念がなければ、風船様肝細胞の出現を根拠にNASHと診断されるWilson病のあることはよく知られた事実であり、小児のNASHではBorderline 1やBorderline 3をきかず未知の疾患が存在する可能性を考慮しておく必要がある。

文 献

- 1) 公益社団法人日本人間ドック学会 人間ドック健診統計調査委員会：2011年「人間ドックの現況」。
http://www.ningen-dock.jp/concerned/press/pdf/dock-genkyou_h23.pdf
- 2) 日本肝臓学会編：NASH・NAFLDの診療ガイド2010。文光堂、東京。2010。
- 3) Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, et al: JSG-NAFLD. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol* 47: 586-595, 2012.
- 4) e-Stat 政府統計の総合窓口：<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001038310&cycod=0>
- 5) 糖尿病ネットワーク：<http://www.dm-net.co.jp/gotoh/2006/07/43.html>
- 6) Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, et al: 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1409-1417, 2011.
- 7) 岡田知雄：児童生徒の肥満・生活習慣病。日本医師会雑誌 141: 1503-1506, 2012.
- 8) International Association for the Study of Obesity：<http://www.iaso.org/>
- 9) Klish WJ: Childhood obesity: pathophysiology and treatment. *Acta Paediatr Jpn* 37: 1-6, 1995.
- 10) Tazawa Y, Noguchi H, Nishinomiya F, et al: Serum alanine aminotransferase activity in obese children. *Acta Paediatr* 86: 238-241, 1997.
- 11) Noguchi H, Tazawa Y, Nishinomiya F, et al: The relationship between serum transaminase activities and fatty liver in children with simple obesity. *Acta Paediatr Jpn* 37: 621-625, 1995.

—— 特集・生活習慣病としての肝疾患 ～非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)/ 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の現状と対応～ ——

- 12) Tsuruta G, Tanaka N, Hongo M, et al : Nonalcoholic fatty liver disease in Japanese junior high school students : its prevalence and relationship to lifestyle habits. J Gastroenterol 45 : 666-672, 2010.
- 13) Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH : Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. J Pediatr 136 : 727-733, 2000.
- 14) Park HS, Han JH, Choi KM, et al : Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents. Am J Clin Nutr 82 : 1046-1051, 2005.
- 15) Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al : American Gastroenterological Association ; American Association for the Study of Liver Diseases ; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease : practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. Gastroenterology 142 : 1592-1609, 2012.
- 16) Alisi A, Feldstein AE, Villani A, et al : Pediatric nonalcoholic fatty liver disease : a multidisciplinary approach. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 9 : 152-161, 2012.



やさしい肝臓病の自己管理 改訂版

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学教授 林 紀夫 編

A4判 124頁 定価 2,310円 (本体 2,200円+税5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2343-5 C0047

おもな内容

1. 肝臓病とは
2. 肝機能検査
3. 肝臓の画像検査
4. 急性肝炎
5. B型慢性肝炎
6. C型慢性肝炎
7. 肝硬変
8. 肝がん
9. 自己免疫性肝炎・原発性胆汁性肝硬変
10. 脂肪肝・NASH (非アルコール性肝脂肪肝炎)
11. 日常生活上の注意

医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (03)10-1-33353
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

NASH患者からの肝癌発症の頻度と危険因子

小野正文* 岡本宣人* 西原利治*

索引用語：NASH, 肝細胞癌, 疫学, 危険因子

1 はじめに

C型肝炎やB型肝炎などのウイルス性肝障害は、わが国における肝細胞癌(HCC)発症の背景肝疾患の大部分を占めており、現在も重要な慢性肝疾患である。しかし、ウイルス性肝炎が関係しない、いわゆるNonBNonC-HCCが肝細胞全体の5~10%程度を占めると報告されており、アルコール性肝障害とともに、その多くが非アルコール性脂肪肝炎(NASH)によるものではないかと考えられるようになってきている。しかし、いわゆるBurn-outしたNASHでは、肝細胞の風船様腫大のみならず脂肪化も消失している場合があり、組織学的にもNASHと診断ができないなど、NASHの割合が正確に捉えられていない側面もある。

本稿では、NASH患者からのHCC発癌に関する疫学、HCC発症の危険因子や背景病態などから、再発・予後に関する問題などをウイルス性肝炎との比較を交えて概説する。

2 疫学

1. HCC患者に占めるNASHの頻度

HCC発症の背景肝病変のうち1番多いのはC型肝炎であるが、NASHからのHCC発癌頻度についてはあまり多くの報告があるとはいえず、詳細な検討がなされていないのが現状である。

その中で、英国からの報告では、2007年~2008年における162名のHCC患者のうち、C型肝炎(HCV-HCC)は23.3%、B型肝炎(HBV-HCC)は19%、アルコール性(ALD-HCC)は12.7%であったのに対し、NASH(NASH-HCC)は24.0%と1番多い原因であったと報告されている¹⁾。一方、わが国からの報告では、1990年~2006年にHCCのために肝切除された1,168名の患者のうちNASH関連HCCはわずかに8名(全体の1%)であった²⁾。さらに、広島大学病院にて1995年~2009年にHCCで治療を受けた1,374名の患者背景肝病変の調査結果によると³⁾、HCV-HCCが67%、HBV-HCCが17%であり、15%

Masafumi ONO et al: Incidence and risk factors for development of HCC in NASH patients

*高知大学医学部消化器内科学 [〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮]

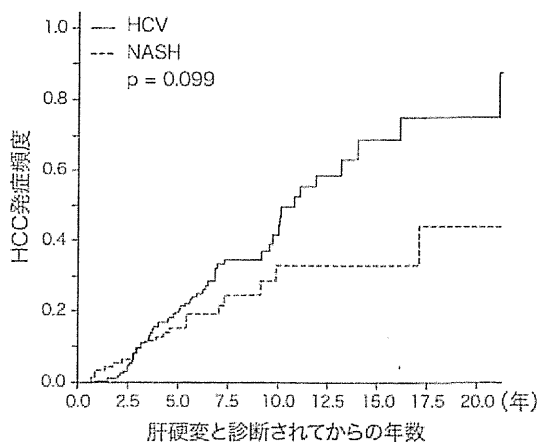


図1 NASH肝硬変およびC型肝硬変からの年次発癌率(文献8より改変引用)

(209名)はHBs抗原とHCV抗体がともに陰性のHCCであった(NonBNonC-HCC)。さらに、NonBNonC-HCC 209名中の58名において肝切除が行われていたため、背景肝病変の組織学的検討をしたところ、29% (17名)がNASHと診断されており、その割合は全体の約5%であった。

以上の報告から、わが国におけるNASH-HCCは、全HCCの1~5%程度であると想定されており、HCVやHBVと比べ明らかに頻度が少ないと考えられる。一方、欧米ではNASH-HCCは全HCCの20~25%程度と、今やウイルス性肝炎からのHCC発症を凌ぐ勢いといわざるを得ない。わが国においても、今後のウイルス性肝炎からのHCC発症の減少と、肥満や糖尿病、メタボリック症候群患者の増加に伴って、NASH-HCCが、徐々に増加するものと予想される。

2. NASHからのHCC発癌率

Yatsujiらは、NASH肝硬変からのHCC発癌率についてC型肝硬変と比較検討を行っている⁹⁾。それによると、1990年~2006年に東京女子医科大学病院にて組織学的にNASH

肝硬変と診断のついた68名と、同じく肝組織にて肝硬変と診断がつき、年齢・性別をマッチさせたC型肝硬変69名をprospectiveに経過観察を行ったところ、5年発癌率がNASH肝硬変で11.3%、C型肝硬変で30.5%と、NASH肝硬変では明らかに低率であった。また、高度線維化進展NASH (F3, F4 stage) 89症例からの5年累積発癌率は7.6%であり、欧米に比して高い発癌進展率であるとの報告もある⁵⁾。

Cleveland ClinicのAschaらも同様に、NASH肝硬変(195名)からのHCC発癌率をC型肝硬変(315名)からの発癌率と比較検討し報告している¹⁰⁾。それによると、NASH肝硬変からのHCC発癌は年率2.6%であり、C型肝硬変の4.0%と比べ明らかに低率であったと報告している(図1)。この報告のC型肝硬変からのHCC発癌率は、Yatsujiらの報告や、これまでの日本の報告に比べると⁷⁾明らかに低頻度ではあるが、それでもNASH肝硬変からのHCC発癌は、C型肝硬変の約2~3分の1程度と考えられる。

3 NASH発癌の危険因子

1. 肥満による影響

肥満が癌の発症に重要な役割を果たしていることが示されており、Calle EEらは米国において肥満、過体重の方がより発癌に強く関わっていることを報告している(図2)¹¹⁾。特に、BMI35以上の高度肥満者におけるHCC死亡リスクは正常体重の者と比べ男性で4.52倍、女性で1.68倍であると報告している。癌腫による死亡が高いリスクとなっており、その中でも際立って肝癌の発症が多いことは注目されている。

多くのNASH患者が肥満を有している事実から、肥満がNASHそのものの発症危険因子