

鉄と肝疾患

加藤 淳二, 宮西 浩嗣

札幌医科大学医学部 腫瘍内科学講座

Iron and liver disease

Junji KATO, Koji MIYANISHI

Department of Medical Oncology, Sapporo Medical University, School of Medicine

ABSTRACT

Free iron in the liver is believed to facilitate the formation of reactive oxygen species (ROS), including hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), which cause oxidative damage of numerous cellular components such as lipids, proteins, and nucleic acids, and also upregulate collagen synthesis. The $\cdot\text{OH}$ radical is known to generate promutagenic bases such as 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG). In our studies in cases of chronic hepatitis C, long-term iron reduction therapy reduced the activity of hepatitis, suppressed fibrosis, and prevented hepatocarcinogenesis. In nonalcoholic steatohepatitis (NASH) livers, hepatic iron accumulation as well as oxidative DNA damage significantly increased. Humoral factor(s) in the NASH serum may upregulate DMT1 expression in the small intestine. Iron reduction therapy for NASH patients has the potential to reduce disease activity as well as hepatic oxidative damage. We found that an intronic single nucleotide polymorphism (SNP) in the MUTYH gene was associated with increased risk for hepatitis C virus (HCV)-induced hepatocellular carcinoma and MUTYH-null mice with iron-associated oxidative stress were susceptible to development of liver tumors unless they were prevented by dietary anti-oxidants. These findings may contribute to establish methods for preventing liver tumors.

(Accepted November 13, 2019)

Key words: liver disease, iron overload, oxidative stress, hepatocarcinogenesis, reactive oxygen species

はじめに

肝臓は生体において、鉄貯蔵の役割を担っている。ヒトの体内には約 4 g の鉄が存在するが、肝細胞ではその多くがフェリチン結合鉄として貯蓄されており、その量は約 1 g である。毎日 1 mg 程度までの鉄が便、尿、汗、皮膚から排泄され、それに見合った鉄量が主に十二指腸で吸収される。しかしながら腸管からの鉄吸収量が増加、あるいは肝細胞での鉄取り込みが亢進する病態では、肝細胞内に鉄が過剰に蓄積され、フリーラジカルの産生を介して肝細胞障害が惹起される。鉄は高等生物の生命維持にとって必須な元素である一方で、2 価と 3 価の酸化数をもつ遷移金属元素であることから、酸素を活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) に変換させる反応を触媒することにより生体への毒性を発揮する。ROS の中でも H_2O_2 と Fe^{2+} の作用で $\text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$ が生成される Fenton 反応

では最も毒性の強い hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) が多量に生じる。 $\cdot\text{OH}$ はライソゾーム膜、細胞質膜、核膜、ミトコンドリア膜などの障害、カスパーゼカスケードの活性化によるアポトーシスの誘導、脂肪鎖の過酸化などを惹起し、細胞障害を引き起こす¹⁾。フェリチン結合鉄は無毒であるが、細胞内に鉄が過剰になると、毒性のある遊離鉄分画が増加する。当講座では肝疾患において鉄過剰が生じる機序、それに対する治療や肝発癌における鉄過剰の関与についての研究を続けてきた。本稿ではこれら研究成果の概要を紹介する。

1. The Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットにおける鉄毒性

Fas 抗原の mRNA は、胸腺、肝、腎、心、卵巣に発現している。しかし Fas ligand としての作用をもつ Fas 抗体をラットに全身投与すると、肝組織のみが広汎に細胞死に陥ることが報告されている²⁾。他の

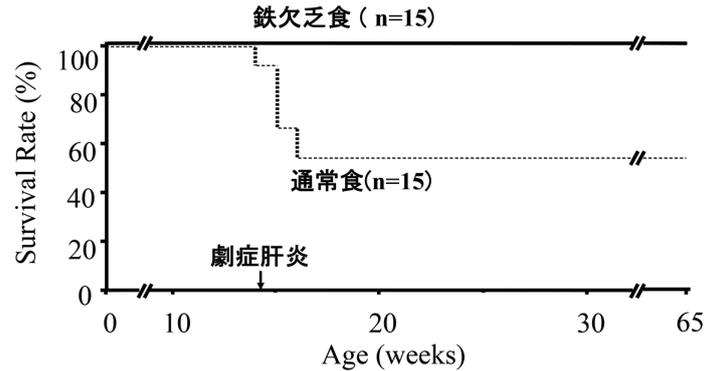


図1. 鉄欠乏食および通常食栄養を施したLECラットの生存曲線

臓器に比較し肝には大量の鉄が貯蔵されていることから、これは Fas を介した細胞死において鉄の存在が重要な役割を担っていることを示すものと考えられる。

LECラットはセルロプラスミンへの銅転入酵素(ATB7B)の遺伝子異常を持つことが知られているウィルソン病のモデル動物である。生後14~16週には半数が劇症肝炎を発症して死亡し、残った半数は65週以降肝癌を発症して死亡する。低銅食でこのラットを飼育すると、肝炎と肝癌の発生を防ぐ事が出来る。通常ウィルソン病は、ヘモクロマトーシスと異なり肝癌の発生率はそれほど高くはない。そこで我々は他の原因を検索し、このラットの肝臓には銅の他に鉄も過剰に沈着していることを見出した³⁾。二価の金属元素はいずれもラジカル産生を促す事が知られているが、銅と鉄の両者が細胞内に存在すると、このラジカル産生は飛躍的に高まる。

このラットを鉄欠乏食で飼育すると、劇症肝炎が生じず、有意に生存期間が延長した(図1)。さらに鉄欠乏食が発癌に与える影響を検討したところ、鉄欠乏食ラットでは肝癌が発生しなかった。これらの事実は鉄イオンがある種の条件下では、極めて高い細胞毒性を有する変異原性を示すことを示唆し、その後の当講座の研究につながるものとなった。

2. 除鉄療法によるC型肝炎鎮静化と肝発癌抑制効果

C型慢性肝炎患者の肝細胞内には鉄が過剰に沈着していることが、古くから知られている。除鉄療法のメカニズムは人工的に鉄欠乏性貧血状態をつくることで骨髄の造血を促進し、肝からの鉄動員を高めてROSの産生を低下させるというものである。当講座の症例では、治療開始後ただちに全例でASTとALTが低下し始め、16週後には約6割が正常域に、全例がALT値80 IU/l以下に低下した。1年以後は、血清ALT値はさらに低下し(平均35 IU/l)、同レベルを維持することが可能であった。さらには、生検により経過を追ったところ、対照群ではfibrosisは有意に増悪

していたのに対して、除鉄群では有意に改善していた⁴⁾(図4)。・OHは肝炎を惹起するのみならず、グアニンのC8位に付加して8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)等の変異原性塩基を形成する。この8-OH-dGは本来のペアであるCのみならず、AやTとも対合するため、G:C→A:T型のDNA変異を誘発することが知られている⁵⁾。酸化DNA傷害の指標の一つとしてC型慢性肝炎患者の肝組織における8-OH-dG発現レベルを検討したところ、治療前には対照(HCV非感染者)の約10倍に増加していたが、除鉄療法7年後には正常化していた。実際に10年以上にわたり除鉄療法を受けた患者(新犬山分類でF2またはF3)35人を対象に肝発癌率を解析したところ、年次発癌率は除鉄療法を受けていない対照群と比較して有意に低下していた⁶⁾。そのみならず、経過中の血清フェリチン値が低い群において有意な発癌率低下が認められた。この事実はC型慢性肝炎における鉄代謝異常を介したROS産生増加が肝発癌と密接な関係にあることを裏付けるものとなった。

3. 慢性肝炎における鉄過剰の発生機序

消化管内の鉄は主に十二指腸と近位小腸の絨毛上皮細胞より吸収される。消化管内で鉄は疎水性の3価鉄イオン(Fe^3)として存在し、絨毛上皮細胞での吸収には2価鉄イオン(Fe^{2+})へ変換され、 Fe^{2+} はトランスポーターdivalent metal transporter1(DMT1)を介して絨毛上皮細胞内に取り込まれる⁷⁾。上皮細胞内の Fe^{2+} は基底膜側に運搬されて、Ferroportin1(FPN)を通じて血中に輸送され^{8,9)}、 Fe^{2+} から Fe^{3+} に変換された後、トランスフェリン(Tf)と結合して門脈血中を運搬される。また、肝で産生されるヘプシジンはFPNの作用を抑制する方向に働く。当講座では血清ヘプシジン濃度をLC-MS/MSで測定し、C型慢性肝炎患者の濃度が低値であることを確認した。網内系細胞等ではヘプシジンがFPNのinternalizationやdegradationを惹起し、細胞外への鉄の移送を抑制する

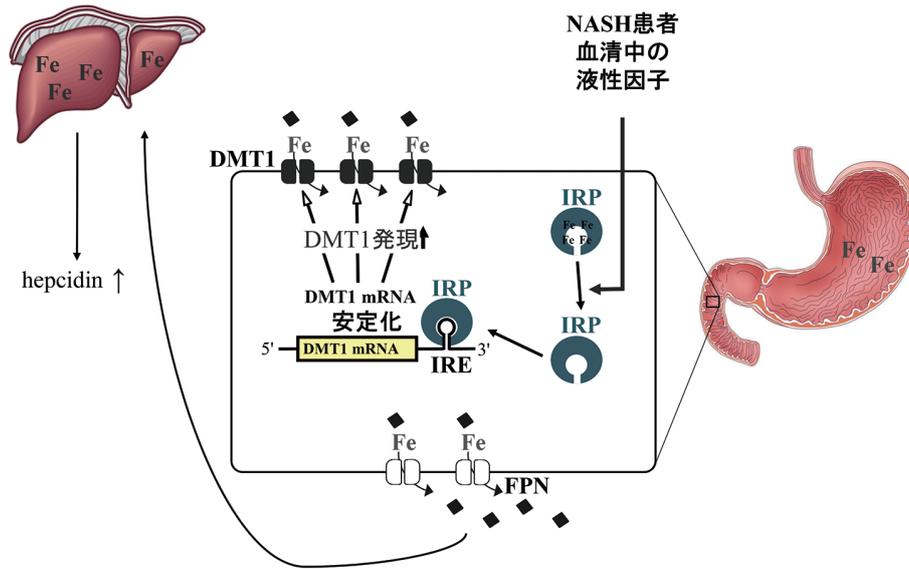


図 2. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) 患者に鉄過剰が生じる機序

DMT : divalent metal transporter 1, IRP; iron regulatory protein, IRE; iron responsive element, FPN: ferroportin

ことが知られていることから、十二指腸鉄吸収関連分子である FPN と DMT1 の mRNA ならびに蛋白発現量を測定した。DMT1 mRNA は control 群と差を認めなかったが、FPN mRNA は C 型慢性肝炎患者で発現が亢進していた。同様に十二指腸の FPN の免疫染色でも FPN の発現亢進が認められた。つまり、十二指腸上皮細胞では hepcidin が FPN 蛋白のみならず、mRNA レベルで発現を調節している可能性が示唆された。そこで Caco-2/TC7 細胞を transwell 内で長期間培養することにより十二指腸上皮のモデルとなる単層膜を作製し、ヘプシジンが FPN と DMT1 に与える影響を検索した。Caco-2 cell monolayers では DMT1 mRNA 発現量はヘプシジン濃度による変化を認めなかったが、FPN mRNA 発現量はヘプシジン濃度依存性に発現が抑制されていた。以上から、CHC 患者における鉄過剰の原因として腸管からの鉄吸収亢進が関連しており、その機序として血清ヘプシジン低下による十二指腸粘膜での FPN 発現増強が一因であることを解明した¹⁰⁾。

最近 C 型慢性肝炎患者が減少している一方で、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者が増加している。NAFLD はメタボリックシンドロームの肝病変であり、有病率は 20~30% と推計され、肥満の増加とともに増えてきている。非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は NAFLD の重症型である。成因としては、肝細胞への脂肪沈着が起こることで脂肪肝が発症し、酸化ストレスを引き起こすフリーラジカル等の複数の肝細胞障害要因が加わることで NASH が発症・進展していくとする multiple-parallel hit hypothesis が広く支持されている。Hit の 1 つとして肝内鉄蓄積が

注目され、肝内の過剰遊離鉄は ROS の生成を促進し、NASH における酸化ストレス増加の原因として推定されている。一般的に軽度から中等度の肝内鉄蓄積が NAFLD 患者で認められるとする報告は多いが、その原因や臨床的意義には議論があるところであった。当講座では NAFLD 患者の半数程度に鉄吸収過剰が生じていることを示した。さらにその機序として iron regulatory protein (IRP) 活性化による DMT1 発現増強がその一因であることを明らかにした¹¹⁾。DMT1 mRNA は 3' 非翻訳領域に iron responsive element (IRE) を持ち、鉄欠乏状態では活性化した IRP が IRE に結合することにより DMT1 の発現が転写レベルで促進され、鉄吸収亢進がもたらされる。IRP には IRP1 と IRP2 の 2 種類が存在し、両者はともに鉄濃度の低い場合のみ IRE に結合し、鉄濃度の高い場合には鉄-硫黄クラスターの形成に伴う構造変化により IRE への結合能を失い、mRNA が不安定化する。当講座の検討では、NASH 患者血清とともに培養した Caco-2 細胞における DMT1 発現に関与する IRP が IRP1 であることを示した。そして、その同定には至らなかったが、NASH 患者血清に鉄-硫黄クラスターの形成を抑制するような、IRP1 活性を増強する液性因子の存在を示唆した (図 2)。

4. NASH および NASH からの肝発癌における ROS

近年、NASH からの肝発癌に関する報告が散見される。当講座では、NASH から進展した肝細胞癌 (HCC) 患者 (NASH-HCC) における癌部、非癌部の 8-OH-dG 量を他の原因による HCC 患者ならびに単純性脂肪肝 (SS)、HCC 未発症の NASH 患者 (NASH without HCC)

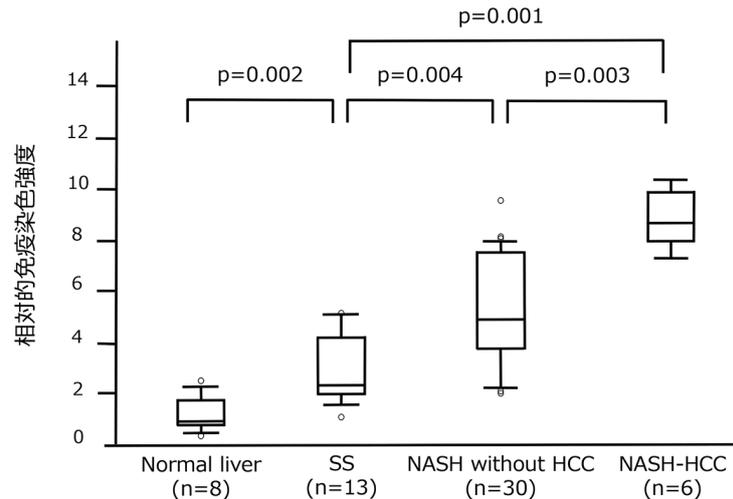


図3. 各脂肪性肝疾患別の背景肝の8-OH-dG量 (Box plot)

正常肝臓における染色強度の平均値を1とした場合の相対的な染色強度を数値化した。Bars: $X0.25+1.5(X0.75-X0.25)$, median, $X0.25-1.5(X0.75-X0.25)$

のそれらと比較することによって、NASHからの発癌に酸化了的DNA傷害が関与していることを示した¹²⁾(図3)。NAFLDは成人の数割に認められる。定期的な通院をしていない患者も多く存在し、HCC発見時には根治的治療が困難である症例に遭遇することが稀ではない。肝内8-OH-dG量を反映する簡便なマーカーの開発などにより、今後NAFLDからの肝発癌危険群を囲い込む必要があると考えられる。

また前述のごとく、C型慢性肝炎に対する長期間の除鉄療法が肝炎鎮静化、線維化抑制と肝発癌抑制をもたらすことは明らかとなっている。NASH患者においても瀉血療法を施行した報告が散見されるが、必ずしもNASH全例に瀉血療法が有効ではなく、血清フェリチン高値や組織学的に肝鉄沈着などにより鉄過剰が示された一部の例においてのみ、瀉血療法がALTを低下させることが報告されていた¹³⁾¹⁴⁾。当講座の検討では、食事療法および薬物療法不応性で鉄過剰が確認されたNASH症例において、除鉄療法が4年間にわたりALT低下を示すこと、組織学的改善および肝内鉄量ならびに肝8-OH-dG量の減少に寄与することを示した。この点からは簡便に鉄吸収能を測定できる方法の開発により、NASH患者の中から除鉄療法が有効と考えられる症例を選択できる可能性が示唆された¹¹⁾。

5. 肝発癌と酸化了的DNA損傷修復酵素

8-OH-dGによるDNA損傷を修復する酵素としては、MUTYH, OGG1およびMTH1が挙げられる。しかし、肝発癌とこれら酵素活性個体差の関連性は明らかではなかった。MUTYH, OGG1およびMTH1の19個のSNPについてiPLEXアッセイを用いて解析したところ、MUTYHのrs3219487においてのみで肝細胞

癌を発症したC型慢性肝炎患者(n=20)と発症していないC型慢性肝炎患者(n=20)との間にgenotype間の有意差を認めた。G/A遺伝子型は、G/G遺伝子型と比較して、HCC発生リスクが高かった。対象を拡大し、患者背景因子を含め検討したところ、肝細胞癌を発症した患者では有意に年齢が高く、血小板数が少なかった。rs3219487遺伝子型は、肝細胞癌を発症した患者においてA/AまたはG/A遺伝子型(Aキャリア)が有意にG/Gよりも多かった。これらの因子について多変量解析を行ったところ、高齢とAキャリアが肝細胞癌発生の独立した危険因子として抽出された。さらに、HCCの10年間の累積発生率は、G/Gの17.6%と比較して、Aキャリアで38.0%と高かった。Cox比例ハザード回帰モデルでは、 $P < 0.1$ 未満の変数は、年齢、血小板数およびMUTYH遺伝子型であった。性別、年齢および血小板数を調整した後に多変量解析を行ったところ、AキャリアがHCC発生の独立危険因子として抽出された。末梢血単核球細胞のMUTYH mRNAレベルは、AキャリアがG/Gに比べて有意に低く($p=0.0157$)、当該SNPがイントロンSNPであるものの、Aキャリアにおいて発現低下が生じるものと考えられた。そこで、転写活性に及ぼすイントロン変異の影響をプロモーターアッセイにより検討した。rs3219487のメジャーアレル配列と転写開始点より2KBの配列を含むp-2KB+ IVS6+ 35Gは、Huh7細胞およびHepG2細胞においてrs3219487のマイナーアレル配列を含むp-2KB+ IVS6+ 35Aよりも転写活性が高く、rs3219487のメジャーアレル配列と転写開始点より1KBの配列を含むp-1KB+ IVS6+ 35Gとrs3219487のマイナーアレル配列を含むp-1KB+ IVS6+ 35Aはほぼ等しい活性を示した

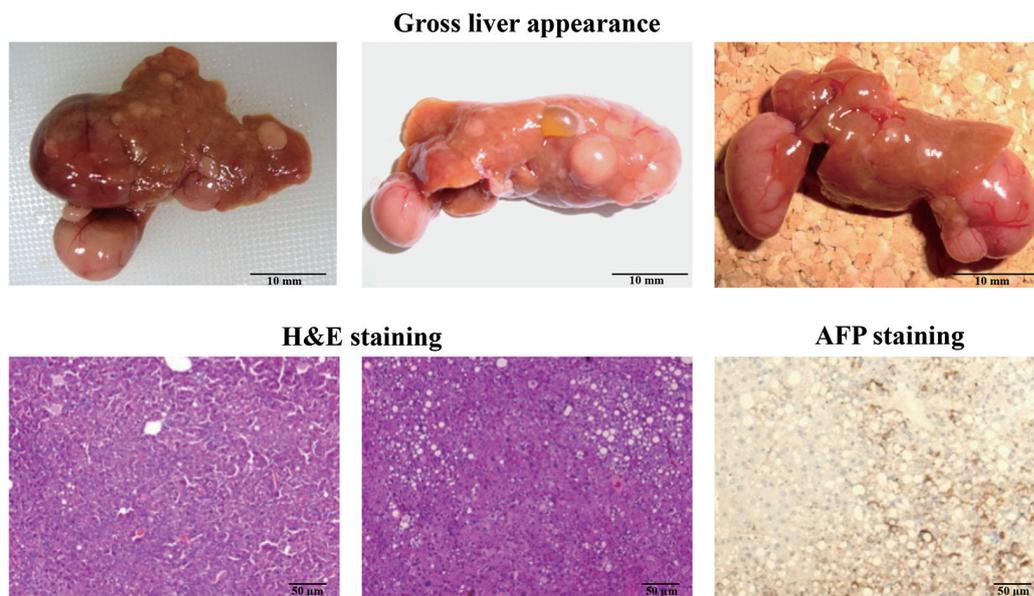


図4. MUTYH ノックアウトマウスにおける鉄過剰食による肝発癌

ことから、rs3219487が-2KBから-1KBの範囲に存在するプロモーター配列に干渉することで、MUTYH発現の低下が惹起されるものと考えられた。

これらの結果については、MUTYH ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験によっても証左した。6ヶ月の介入により、鉄過剰食を与えたマウス群では肝組織に軽度の肝脂肪化と炎症細胞浸潤が生じ、12ヶ月の介入においてその程度が増強していた。血清ALT値は6ヶ月の介入で鉄過剰食群において標準食群に比較して上昇傾向となり、12ヶ月の介入ではより有意に上昇した。genotype間に有意差は認められなかった。肝組織のプルシアンブルー染色を行ったところ12ヶ月介入後の鉄過剰食群では全例に鉄沈着が確認でき、肝臓の鉄重量は、鉄過剰食群で有意に増加していた。6ヶ月の介入では、いずれのmiceにおいても肝腫瘍が認められなかった。12ヶ月の介入では、MUTYH ノックアウトマウスの鉄過剰食群で12例中4例に肝腫瘍が認められた。発生した肝腫瘍は、いずれも大型で多発しており、HE染色ではN/C比の増大と不規則な細索状配列が認められ、脂肪沈着を伴う部分も散見された。腫瘍部はいずれもAFP染色陽性であり、ヒト肝細胞癌と同様の病理所見であった(図4)。食事に追加した抗酸化薬(N-acetyl cysteine; NAC)により、MUTYHヘテロマウスおよびMUTYHノックアウトマウスにおいても、12ヶ月の鉄過剰食介入によって肝腫瘍は認められなくなった。したがって、鉄過剰を伴う肝疾患患者におけるMUTYH活性低下は、肝発癌の危険因子であり、抗酸化薬による発癌予防の可能性が示唆された¹⁵⁾。

おわりに

肝臓は鉄代謝異常による鉄過剰症の主要な標的臓器の1つである。C型慢性肝炎やNAFLDにおいては、慢性肝障害の増悪因子となり得る。このような症例には除鉄療法が有効である可能性があり、特に標準的治療法の確立していない、NAFLDにおいて、鉄吸収異常発生機序に基づいた新たな治療法の開発が待たれる。NAFLD罹患者が増加の一途をたどっていることより、今後肝発癌の増加も懸念され、有効な危険群の囲い込みと肝発癌の予防法の確立が急務とされている。肝内酸化ストレスの増多や酸化的DNA損傷修復酵素活性低下が肝発癌の危険因子である可能性があり、これに着目したNASH肝癌の予防が期待される。

文献

1. Bacon BR, Britton RS. The pathology of hepatic iron overload; a free radical-mediated process? *Hepatology* 1990; 11: 127-137
2. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Gagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364: 806-809.
3. Kato J, Kobune M, Kohgo Y, Sugawara N, Hisai H, Nakamura T, Sakamiaki S, Sawada N, Niitsu Y. Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats. *J Clin Invest* 1996; 98: 923-933.
4. Kato J, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa R, Sato Y, Fujikawa K, Takahashi M, Takayama T, Ikeda T, Niitsu Y. Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in

- chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 2001; 61: 8697-8702
5. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267: 166-172
 6. Kato J, Miyanishi K, Kobune M, Makamura T, Takada K, Takimoto R, Kawano Y, Takahashi S, Takahashi M, Sato Y, Takayama T, Niitsu Y. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2007; 42: 830-836
 7. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388: 482-488
 8. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Mrennan K, Wehr K, Borrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Fazaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5: 299-309
 9. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Dreher A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403: 776-781
 10. Sato M, Miyanishi K, Tanaka S, Sakurada A, Sakamoto H, Kawano Y, Takada K, Kobune M, Kato J. Increased Duodenal Iron Absorption through Upregulation of Ferroportin 1 due to the Decrement in Serum Hepcidin in Patients with Chronic Hepatitis C. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; 2154361. doi: 10.1155/2018/2154361
 11. Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada K, Kawano Y, Sakurada A, Sato M, Kubo T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2015; 62: 751-761
 12. Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M, Kawano Y, Hoki T, Kubo T, Hayashi T, Sato Y, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2013; 48: 1249-1258
 13. Sumida Y, Kanemasa K, Fukumoto K, Yoshida N, Sakai K, Nakashima T, Okanoue T. Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Hepatol Res* 2006; 36: 315-321
 14. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, Vanni E, Fargion S. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1251-1258
 15. Sakurada A, Miyanishi K, Tanaka S, Sato M, Sakamoto H, Kawano Y, Takada K, Nakabeppu Y, Kobune M, Kato J. An intronic single nucleotide polymorphism in the MUTYH gene is associated with increased risk for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Free Radica Biol Med*. 2018; 129: 88-96

別刷請求先：加藤 淳二

〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部 腫瘍内科学講座

TEL: 011-611-2111 (内線 32600)

FAX: 011-612-7987

E-mail: jkato@sapmed.ac.jp