

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 Sep;62(3):751-761. doi: 10.1002/hep.27774. Epub 2015 Apr 8.

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.

要旨 NASH 患者では IRP 活性化による DMT 1 の発現促進を介した腸管からの鉄吸収亢進が肝内鉄蓄積の一因である。また鉄吸収試験は NASH 患者において除鉄療法の有用性を推測するために有用である可能性が示唆された。

1. 非アルコール性脂肪性肝疾患と鉄代謝異常

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の有病率は 20 ~ 30% と推計され、増加している。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は NAFLD の重症型である。成因としてはまず肝細胞への脂肪沈着が起こること (first hit) で脂肪肝が発症し、次に酸化ストレスを引き起こすフリーラジカル等の肝細胞傷害要因 (second hit) が加わることで NASH が発症・進展していくとする two-hit theory が支持されている。second 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ヒドロキシラジカルを含む活性酸素種 (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が、鉄の蓄積する機序は解明されていない。鉄吸収は十二指腸上皮細胞の管腔側に局在する divalent metal transporter1 (DMT1) と基底膜側に局在する ferroportin (FPN) という鉄トランスポーターを介して行われる。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 iron regulatory protein (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る。他に肝臓で産生される hepcidin が鉄代謝を負に制御することが知られている。本研究では NAFLD 患者における腸管からの鉄吸収動態、十二指腸での鉄吸収関連分子の発現および血清 hepcidin 濃度を検索し、NASH 患者における肝内鉄蓄積の機序を明らかにすることを目的とした。

2. 経口鉄吸収試験¹⁾

鉄吸収は control 群、SS 群と比較して、NASH 群で有意に亢進していた。Tf sat も control 群、SS 群と比較して NASH 群で有意に亢進していた。

3. 十二指腸組織における DMT1 mRNA と FPN mRNA の発現と血清 hepcidin 値

control 群と比較して NASH 群では有意に DMT1 mRNA 発現が亢進していた。FPN mRNA はいずれの群間にも差がなかった。LC-MS/MS で測定した hepcidin 中央値は control 群が 21.5, SS が 29.4, NASH 群が 33.7 ng/mL であった。SS 群と NASH 群では hepcidin が上昇していた。

4. NASH 患者血清を用いて培養した Caco-2/TC7 細胞単層膜における DMT1 誘導

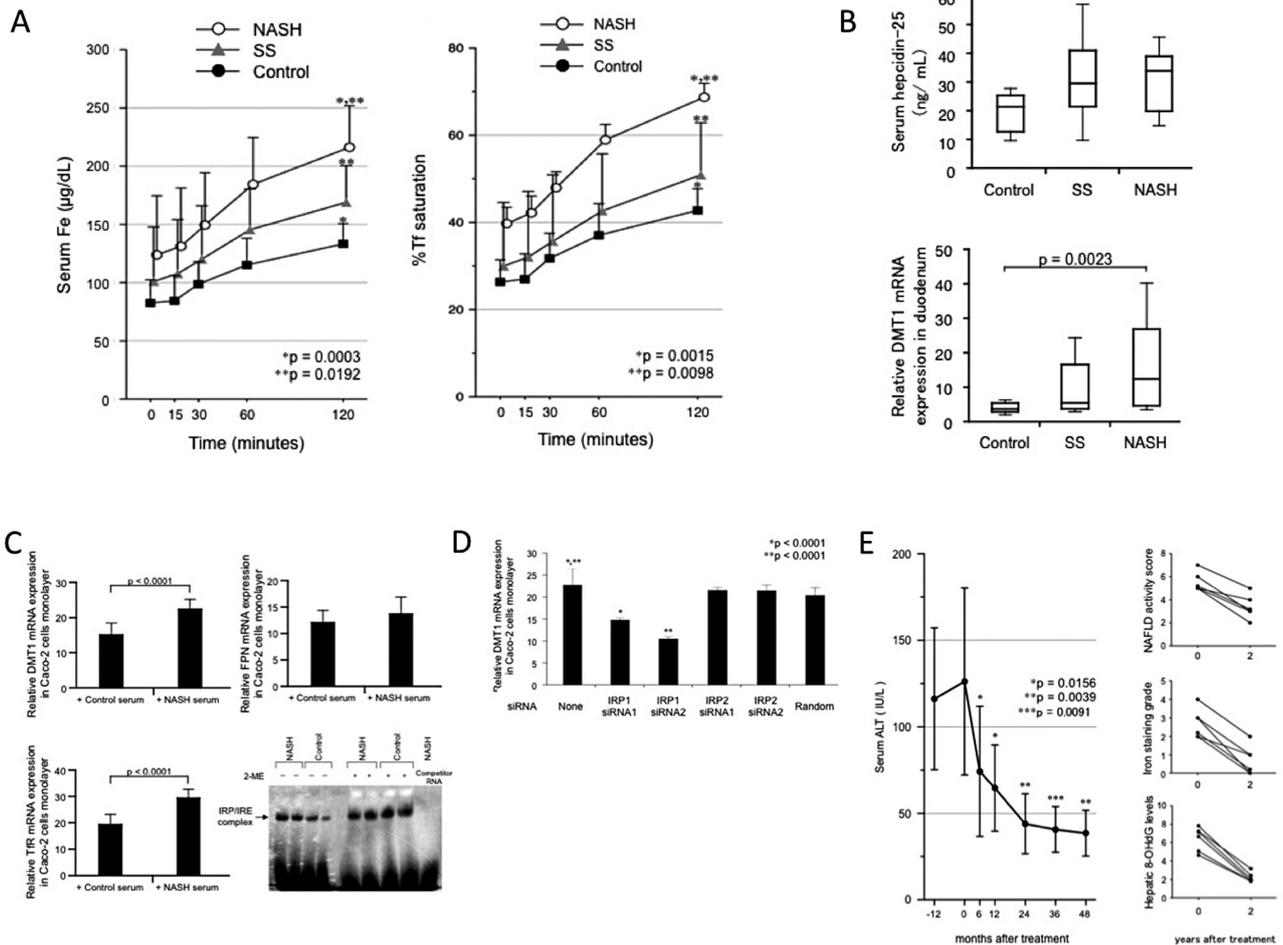
Caco-2/TC7 細胞単層膜を control あるいは NASH 例の血清と共に培養し、DMT1 および FPN 発現の差異を検索した。Control 群に比べ NASH 群では有意に DMT1 mRNA 発現が増強していた。一方、FPN mRNA 発現には両群間に有意差が認められなかった。DMT1 と同様に 3' 非翻訳領域に IRE 配列を有する transferrin receptor (TfR) も NASH 群で有意に発現が増強していた。

5. NASH 患者血清を用いて培養した Caco-2/TC7 細胞単層膜における IRP 活性亢進

Caco-2/TC7 細胞単層膜における IRP 活性を EMSA により検討した。IRE-IRP complex の量は NASH 血清を用いて培養した Caco-2/TC7 細胞単層膜において増加しており、NASH 患者血清に IRP の活性化をもたらす液性因子が存在することが推測された。

6. siRNA を用いた IRP1 knock down による DMT1 発現の減少

IRP には 2 つのアイソフォーム (IRP1 と IRP2) がある。siRNA を用いて IRP1 を knock down した場合に、有意



- A. 12時間絶食後、午前9時の採血から血清鉄を測定した。その後100mgのクエン酸第一鉄ナトリウム内服の15、30、60、120分後にそれぞれ採血をして血清鉄ならびに%トランフェリン飽和度(Tf sat)を測定した。
- B. 血清 hepcidin25 値は LC-MS/MS で測定した。十二指腸鉄吸収関連分子 mRNA 発現は TaqMan real-time RT-PCR で測定した。
- C. Caco-2/TC7 細胞単層膜をcontrol 血清あるいは NASH 血清とともに培養し、各細胞より total RNA と細胞質蛋白を抽出し、Taqman RT-PCR で十二指腸関連分子 mRNA 発現量を、EMSA で IRP 活性を測定した。
- D. IRP 1 と IRP 2 に対する siRNA を用いて各遺伝子発現を knock down し、Taqman RT-PCR で DMT 1 mRNA 発現を測定した。
- E. フェリチンが 10 µg/L 未満又はヘモグロビン濃度 (Hb) が 11.0 g/dL 未満を維持するように瀉血と鉄制限食事療法を行い、肝障害の程度を追跡した。

に DMT1 mRNA 発現が低下することが示された。

7. 鉄過剰を有する NASH 患者に対する瀉血療法

NASH と診断後に内服治療抵抗性で、1年後にも ALT 値の改善が認められずかつ病理学的に肝に鉄沈着が認められ、同意が得られた9例に瀉血療法²⁾を導入した。瀉血療法開始6ヶ月後よりALT値は有意に低下し、4年間の経過においてそれが維持された。瀉血療法開始2年後に肝生検を行ったところ、NAS、肝組織内鉄沈着の grade および肝内 8-OHdG 量は治療前と比較していずれの項目にも改善が認められた。

8. 参考文献

- 1 Kobune M, Miyanishi K, Takada K, Kawano Y, Nagashima H, Kikuchi S, et al. Establishment of a simple test for iron absorption from the gastrointestinal tract. *Int J Hematol*

2011;93:715-719.

- 2 Kato J, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa G, Takada K, Takimoto R, et al. 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.

保木寿文

略歴

2008年札幌医科大学医学部卒業

2010年札幌医科大学腫瘍・血液内科学講座(第四内科)入局

2015年札幌医科大学大学院修了

2015年留萌市立病院消化器内科