

鉄過剰を伴うNAFLDと診断された男性患者の瀉血治療と 鉄関連遺伝子の検索

Phlebotomy and genetic study for a male patient with non-alcoholic fatty liver disease associated with iron overload

坂侑樹、松岡恵理香、佐竹沙也果、滝浪由季乃、花岡千穂、廣瀬有香、前羽美佳、
高木裕介、高村実央、土屋和明、尾崎喜峰、水谷友昭、服部亜衣、巽康彰、林久男*
Yuuki Ban, Erika Matsuoka, Sayaka Satake, Yukino Takinami, Chiho Hanaoka, Yuka
Hirose, Mika Maeba, Yuusuke Takagi, Mio Takamura, Kazuaki Tsuchiya,
Yoshimine Ozaki, Tomoaki Mizutani, Ai Hattori, Yasuaki Tatsumi, Hisao Hayashi

愛知学院大学 薬学部 薬物治療学講座

Laboratory of Medicine, School of Pharmacy, Aichi-Gakuin University,
1-100 Kusumoto, Chikusa, Nagoya 464-8650, Japan

We encountered a 47-year-old man with biochemical liver dysfunction associated with obesity. Along with 6.1kg body weight gain, serum levels of alanine aminotransferase had increased linearly over the last 3 years. Laboratory tests including serum ferritin determination and abdominal ultrasonography indicated non-alcoholic fatty liver disease associated with iron overload. The patient made an informed choice of phlebotomy among the 3 options of weight reduction, oral medication with ursodeoxycholic acid and iron removal by phlebotomy to manage metabolic disorder. A 10-session series of 400mL phlebotomy every 2 weeks induced normalization of liver function test results and anemia-free iron deficiency. There was no nutritional education including diet therapy given and body weight did not change during the treatment period. Maintenance therapy by blood donation was recommended thereafter. After obtaining informed consent for genetic study of iron overload syndrome, five genes, *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2* and *SLC40A1*, were directly sequenced. There was no identifiable mutation responsible for iron overload in this patient. The case study suggests that some patients with metabolic syndrome might be affected by non-genetic iron overload treatable by iron reduction with phlebotomy.

keywords: phlebotomy, iron overload, non-alcoholic fatty liver disease, *HFE*, *TFR2*

【はじめに】

鉄の細胞毒性はヘモクロマトーシスと晩発性皮膚ポルフィリン症でよく知られている。わが国ではこれらの遺伝性疾患が極めて稀なため、鉄毒性に対する関心は低いのが現状である。しかし、最近の研究では、感染症であるウイルス性慢性肝炎と、今や患者の急増が懸念される非アルコール性脂肪性肝障害 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) でも増悪因子になる可能性が指摘されている¹⁾。NAFLDないし非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) はメタボリック症

候群の肝臓版であり²⁾、治療としては、体重減少につきるが、実際は難しい。従って、ウルソデオキシコール酸などの肝底護薬を使用するが、効果は服用期間だけに限られ、根本的な治療ではない。Sumidaらは、本症に対する瀉血治療により血清中の肝細胞逸脱酵素、alanine aminotransferase (ALT) 値の低下することを報告し、注目されている³⁾。その機序は、鉄を排除することにより酸化ストレスの発生を抑制するものと考えられる。

肝臓は鉄を貯蔵する主要臓器である。肝細胞に入った鉄はフェリチンの産生を誘導し、その内部に3価鉄とし

*Corresponding author.
Hisao Hayashi, MD
Tel: +81 52 757 6778; fax: +81 52 757 6799.
E-mail address: hhayashi@dpc.agu.ac.jp

て蓄えられる。さらに鉄負荷がかかると、フェリチンはライゾソームに入り、ヘモジデリンと呼ばれる顆粒として蓄えられる。これらの生体の持つ鉄過剰対応を凌駕する負荷がかかると諸臓器障害を発現する病態がヘモクロマトーシスである。最近、ヘモクロマトーシスを含めた遺伝性鉄過剰症の原因遺伝子がクローニングされ、鉄過剰の分子病態が明らかにされつつある。わが国でも頻度の高いウイルス慢性肝炎やNAFLDに遺伝性鉄過剰症の遺伝的背景が関与するのかどうか、関心が高まっている。そこで、血清フェリチン値の高いNAFLDの1例について、瀉血治療を行いその効果を判定するとともに5種類の鉄過剰関連遺伝子、*HFE*⁴⁾、*HAMP*⁵⁾、*HJV*⁶⁾、*TFR2*⁷⁾、*SLC40A1*^{8,9)} の解析を実施した。

【対象患者と方法】

患者

MTさん (1958.6.29生)、男性

初診；2005年12月 (47歳)

主訴；検診毎に肝機能障害が増悪

現病歴；3年前から会社の定期健診で体重が65.7、66.4、70.6kgと徐々に増加していた。Table 1および Fig. 1のごとく、ALT値が経時的に上昇し、肝機能障害が顕性化した。飲酒歴なし。

身長160cm、体重71.8kg。血液検査では、ALT 188IU/L、血清フェリチン 1184ng/mLと鉄過剰を伴う肝細胞障害を示すが、肝炎ウイルスはすべて陰性、各種自己抗体も陰性であった。腹部超音波検査ではbright liverと報告されNAFLDに矛盾していない。

患者の選択による治療

治療として、自己管理による体重減少、ウルソデオキシコール酸の内服、瀉血による除鉄の3種類のあること、治療効果に差異のないことを説明した。本人の希望は、瀉血治療であったので、本治療および遺伝子解析に対する書面による同意を得た。C型慢性肝炎に対する瀉血治療と同じように、血清フェリチン10ng/mLを目標に400m

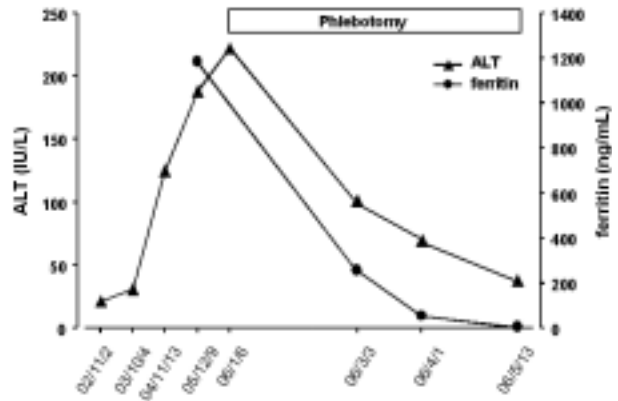


Fig.1, With weight gain during the last 3 years, serum levels of alanine aminotransferase had increased linearly. Laboratory data including serum ferritin determination and abdominal ultrasonography indicated non-alcoholic fatty liver disease associated with iron overload. Patient made an informed choice of phlebotomy after reviewing 3 options consisting of weight reduction, oral medication of ursodeoxycholic acid and iron removal by phlebotomy to manage metabolic disorder. A 10-session series of 400mL phlebotomy every 2 weeks induced normalization of liver function test results and anemia-free iron deficiency. Maintenance therapy by blood donation was recommended thereafter.

Lの瀉血を2週間毎に行った。

検索対象とした鉄過剰関連遺伝子

遺伝子配列の解析方法は、以前述べられた方法に基づいて行われた¹⁰⁾。患者の末梢血よりDNAを採取し、以下の5つの遺伝子、*HFE* (Exon1-Exon6)、*HAMP* (5'UTR-Exon3)、*HJV* (Exon1-Exon4)、*TFR2* (Exon1-Exon18)、*SLC40A1* (Exon1-Exon8) の各 Exon および一部 5'UTR について特異的プライマーを用い PCR で増幅したものをダイレクトシーケンス法により配列を決定した。なおシーケンスで得た結果は、既存の健常人の遺伝子配列と比べ変異を検索した。

1996年、Federらがヘモクロマトーシス患者に*HFE*のC282Y/C282Yを報告し、白人患者の85%の責任遺伝子変異であることが分かった⁴⁾。次いで、2000年、Camasche

Table 1. Laboratory data of patient

	2002/11/2	2003/10/4	2004/11/13	2005/12/9	2006/1/6	2006/3/3	2006/4/1	2006/5/13	2007/4/13
Albumin (g/dL)	4.5	4.4	4.4	4.5	4.3	4.1	4.0	3.8	3.9
AST (IU/L)	19	21	63	107	106	50	35	28	44
ALT (IU/L)	21	31	125	188	222	101	70	38	74
γGTP (IU/L)	22	23	48	99	106	60	49	28	47
Ferritin (ng/dL)	nd	nd	nd	1184	nd	257	52	6	67
Hb (g/dL)	14.8	15.2	15.5	15.3	14.1	14.5	nd	12.3	nd

llaらはnon-HFE患者のトランスフェリン受容体2 (TFR2) に変異のあることを確認した⁷⁾。欧米ではこの2つの遺伝子が古典的な病型を引き起こすとされる。2003年、Roettoらによりヘプシジン (HAMP) の遺伝子変異では重症型のヘモクロマトーシスになることが報告され⁶⁾、翌年には1qに存在することが推定されていた若年型ヘモクロマトーシスの遺伝子、HJVがPapanikolaouらにより同定された⁵⁾。また、主に網内系の鉄蓄積症であるフェロポルチン病はSLC40A1に責任変異のあることが報告された^{8,9)}。その後の研究から、本症は、上述のヘモクロマトーシスとは異なり、常染色体優性遺伝であること、黄色人種や黒人にも広く見つかっていること、鉄の細胞毒性が軽微であることから注目されている。

肝細胞では、HFE、TFR2とHJVの3つの蛋白がHAMPによるヘプシジンの産生を支配し、循環血液に出た活性型のヘプシジン25は網内系細胞と腸管上皮に発現している鉄の汲み出し蛋白であるフェロポルチンに結合し、その汲み出し能を抑制することで体内貯蔵鉄量の調節をする。すなわち、これらの鉄輸送関連蛋白に遺伝的障害のあるヘモクロマトーシスでは、ヘプシジンの分泌が障害され、網内系細胞と腸管上皮のフェロポルチンの発現を抑制しないため、過剰鉄の存在下でも鉄の腸管吸収が持続亢進し、発病に至るとの仮説が有力視されている³⁾。

【結果】

2006/1/6より400mLの瀉血を2週間毎に行い、約5ヶ月で、血清フェリチンが10ng/mL以下となり、ALT値は正常化した (Table 1および Fig.1)。以後は献血に協力するよう勧めた。1年後の再検査では、肝機能の再燃があり血清フェリチンの上昇を伴っていた。

【遺伝子解析結果】

Table 2に示すように解析した5種の遺伝子には、鉄過剰を引き起こす原因遺伝子変異は同定できなかった。参考までにわが国で報告された変異と文献を掲載した。

【考察】

わが国のヘモクロマトーシス

欧米の白人のヘモクロマトーシスの8割前後はHFEのC282Y変異によるが、日本人には極めて稀で、九州から1例の報告がある¹¹⁾。HJVによる病型は、日本では2家系の3例が見つかっている。欧米では若年型として知られているが、日本人ではいずれも古典型 (50歳前後に発症) であった¹⁰⁾。TFR2は、日本人のmajor geneと考えられ、3家系で5例の患者が報告されている^{12,13)}。以上の患者はすべてホモ接合体保有者であったが、最近、TFR2の混合ヘテロ接合体保有者が1例同定された (札幌市内満田記念病院土田健一先生との私信)。また、フェロポルチン病のtype Aの1家族2例¹⁴⁾とtype Bの1例¹⁵⁾の報告がある。

ほかに、わが国で同定された鉄過剰症としてフェリチンのH鎖に変異のある1家系の3例がある¹⁶⁾。これはフェロポルチン病と同じように常染色体性優性遺伝とされる。わが国内でHAMPに起因する病型の報告はまだない。

瀉血とは

治療用に血液を抜くことを瀉血と呼ぶ。手技は献血と同じである。瀉血はヘモクロマトーシスと多血症に対する古典的な治療法である。1969年、晩発性皮膚ポルフィリン症に対する治療効果が報告され、第3の治療対象疾患に加わった¹⁷⁾。C型慢性肝炎に対する瀉血治療は、2006年4月、わが国で保険収載された¹⁸⁾。IFNが無効に帰した症例ないしその適応のない症例に対する補助療法である。その治療効果は血清ALT値を速やかに低下させ、その後も長期にわたり低値に維持させることである。方法としては、繰り返し瀉血することにより貯蔵鉄を排除し (初期瀉血)、その後も必要に応じて瀉血を追加し軽い鉄欠乏状態を保つ (維持治療)。このように体内で鉄を枯渇させることにより、ヘム蛋白から分解された鉄や腸管で吸収された鉄を速やかに骨髓に取り込ませる。そこでヘモグ

Table 2. Exons analyzed in this study and mutations reported in Japanese

Gene	Exons analyzed	Mutations reported in Japanese patients	References
HFE	E1-E6	C282Y	11
HAMP	5' UTR, E1-E3	non	
HJV	E1-E4	Q312X, D249H	10
TFR2	E1-E18	AVAQdel, L490R, V561X	12, 13
SLC40A1	E1-E8	A117G, R489S	14, 15

All exons and boundaries of the 5 genes reported to be responsible for genetic iron overload syndromes were analyzed. In HAMP, 5'UTR with IRE was also subjected for analysis. There was no identifiable mutation responsible for iron overload, although 8 mutations of 4 genes have been reported in Japanese patients.

ロビン (Hb) に組み込ませることにより、鉄を源とする酸化ストレス、すなわち反応性の高い体内鉄を減少しラジカル産生を低いレベルに抑えるものと考えられる。

過剰鉄と疾患

生体にとって過剰な鉄は有害である。例えば、2価鉄イオンはフリーラジカルの産生を促進して細胞を傷害する。ヘモクロマトーシスでは不整脈、心不全、心筋梗塞のリスクが増大すると報告されている。また、肝硬変に進展すると高率に発がんする。発がん予防には線維化の進展しない病期での除鉄が必須である。この病型の糖尿病はインスリン依存性であり、動脈硬化も加速されるので、嚴重なインスリン治療が不可欠である。軽微な鉄過剰であるC型慢性肝炎とNAFLDにおいても、鉄による酸化ストレスの管理は補助治療として重要である。基礎疾患に対する根本治療である抗ウイルス治療と肥満対策が効を奏すれば問題は解消される。しかし、現実はずいぶん、鉄の酸化ストレス対策を必要とする患者が多い。

NASHとNAFLD

NASHは肝細胞の脂肪化、炎症、壊死と、間質の繊維化を特徴とする組織学的診断名である。NASHのうち約25%の患者が、10～15年の経過を経て肝硬変に進展する。本症のように肝生検による組織学的情報を欠く症例では、病歴としてアルコール性肝障害の除外されること、他の慢性肝障害の原因が除外されるなどから、NAFLDと診断した。

NAFLDに随伴する状態として、II型糖尿病、インスリン抵抗性、肥満、脂質代謝異常(症)が挙げられる。二次的要因として、肝障害薬物(アミオダロン、ニフェジピン、エストロゲン)、手術(空腸回腸瘻、広範囲の小腸切除、胆管や脾臓の手術)や他の状態(経管栄養、低βリポ蛋白血症、環境毒素)などがある。NAFLDに対する確立された治療法はない。随伴する病態を改善する、あるいはコントロールすることが勧められる。末期の肝不全の症例に対しては肝移植を考慮するが、再発する可能性がある。

NAFLDにおける鉄蓄積と瀉血効果

除鉄による酸化ストレスの抑制効果は、晩発性皮膚ポルフィリン症やC型慢性肝炎に限らず^{17,18)}、NASHにもあることが報告されていたが²⁾、我々の経験もこれを支持するものである。過栄養に伴う肝臓の脂肪変性では、僅かな貯蔵鉄でも細胞毒性を発揮することを示唆する。遺伝的に鉄輸送関連遺伝子の変異のないことから、この患者の鉄過剰に至った背景は不詳である。初期瀉血は著効を示したが、維持瀉血が不十分であり、治療の継続によ

り、肝病変の鎮静化と線維化の進展抑制に努める必要がある。

【まとめ】

この男性患者の血清ALT値の上昇の原因は、ウイルスが陰性であること、飲酒家ではないなど、既知の肝障害因子の関与は否定的であった。血清フェリチン値から鉄の酸化ストレスが関与している可能性を考慮して瀉血治療を行ったところ、ALT値の正常化がみられた。鉄過剰の遺伝子背景を検討したが既知の遺伝子には変異が見られなかった。遺伝子背景のない鉄過剰がNAFLDの増悪因子になっていると判断される。なお、この患者の遺伝子検査は、本学部倫理委員会の承認を得たものである。

REFERENCES

- Hayashi H., Tatsumi Y., Hattori A., Saibou Kougaku, 27, 242-245 (2008).
- Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, Kato T, Takeda N, Okuda J, Ida K, Kawahito Y, Yoshikawa T, Okanoue T., *Am J Gastroenterol* 102, 2708-2715 (2007).
- Sumida Y., Kanemasa K., Fukumoto K., Yoshida N., Sakai K., Nakashima T., Okanoue T., *Hepatol Res.*, 36, 315-321 (2006).
- Feder JN., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy DA., Basava A., Dormishian F., Domingo R Jr, Ellis MC., Fullan A., Hinton LM., Jones NL., Kimmel BE., Kronmal GS., Lauer P., Lee VK., Loeb DB., Mapa FA., McClelland E., Meyer NC., Mintier GA., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass CE., Quintana L., Starnes SM., Schatzman RC., Brunke KJ., Drayna DT., Risch NJ., Bacon BR., Wolff RK., *Nat. Genet.*, 13, 399-408 (1996).
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C., *Nat. Genet.*, 33, 21-22 (2003).
- Papanikolaou G., Samuels ME., Ludwig EH., MacDonald ML., Franchini PL., Dube MP., Andres L., MacFarlane J., Sakellaropoulos N., Politou M., Nemeth E., Thompson J., Risler JK., Zaborowska C., Babakaiff R., Radomski CC., Pape TD., Davidas O., Christakis J., Brissot P., Lockitch G., Ganz T., Hayden MR., Goldberg YP., *Nat. Genet.*, 36, 77-82 (2004).
- Camaschella C., Roetto A., Cali A., De Gobbi M., Garozzo G., Carella M., Majorano N., Totaro A., Gasparini P., *Nat. Genet.*, 25, 14-15 (2000).
- Njajou OT., Vaessen N., Joosse M., Berghuis B., van Dongen JW., Breuning MH., Snijders PJ., Rutten WP.,

- Sandkuijl LA., Oostra BA., van Duijn CM., Heutink P., *Nat. Genet.*, 28, 213-214 (2001).
- 9 Montosi G., Donovan A., Totaro A., Garuti C., Pignatti E., Cassanelli S., Trenor CC., Gasparini P., Andrews NC., *J. Clin. Invest.*, 108, 619-623 (2001).
- 10 Koyama C., Hayashi H., Wakusawa S., Ueno T., Yano M., Katano Y., Goto H., Kidokoro R., *J. Hepatol.*, 43, 740-742 (2005)
- 11 Sohda T., Okubo R., Kamimura S., Ohkawara T., *Am J Gastroenterol* 96, 2487-2488 (2001)
- 12 Hattori A., Wakusawa S., Hayashi H., Harashima A., Sanae F., Kawanaka M., Yamada G., Yano M., Yoshioka K., *Hepatol Res.*, 26, :154-156 (2003).
- 13 Koyama C., Wakusawa S., Hayashi H., Suzuki R., Yano M., Yoshioka K., Kozuru M., Takayama Y., Okada T., Mabuchi H., *Haematologica*, 90, 302-307 (2005).
- 14 Koyama C., Wakusawa S., Hayashi H., Ueno T., Suzuki R., Yano M., Saito H., Okazaki T., *Intern. Med.*, 44, 990-993 (2005).
- 15 Liu W., Shimomura S., Imanishi H., Iwamoto Y., Ikeda N., Saito M., Ohno M., Hara N., Yamamoto T., Nakamura H., Hada T., *Intern. Med.*, 44, 285-289 (2005).
- 16 Kato J., Fujikawa K., Kanda M., Fukuda N., Sasaki K., Takayama T., Kobune M., Takada K., Takimoto R., Hamada H., Ikeda T., Niitsu Y., *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 191-197 (2001).
- 17 Kalivas JT., Pathak MA., Fitzpatrick TB., *Lancet* 1, 1184-1187 (1969).
- 18 Hayashi H., Takikawa T., Nishimura N., Yano M., Isomura T., Sakamoto N., *Am J Gastroenterol*, 89, 986-988 (1994).