

主 論 文

The Serum Oxidative/Anti-oxidative Stress Balance Becomes Dysregulated in Patients with Non-alcoholic Steatohepatitis Associated with Hepatocellular Carcinoma

(NASH 及び NASH 関連肝臓癌における血清酸化ストレス/抗酸化ストレスバランス障害の検討)

[緒言]

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease ; NAFLD) は近年増加している慢性肝疾患の一つである。多くの NAFLD は非進行性の非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver ; NAFL) であるが、一部に炎症及び肝線維化進行を伴い肝硬変、肝癌 (Hepatocellular carcinoma ; HCC) へと進展し得る非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis ; NASH) を認める。NAFL および NASH は、脂肪肝の存在は共通しているが、遺伝的背景や脂質の性状が異なると考えられている。

酸化ストレスは NAFLD の炎症に関与していると考えられており、Reactive oxygen species (ROS) は代表的な酸化ストレスである。ミトコンドリアは細胞の最も重要な ROS 産生器官であり、ミトコンドリア機能障害は NAFLD の進行において中心的な役割を果たしている可能性がある。ミトコンドリアにより酸化ストレス・抗酸化力のバランスが適切に維持されていることが病態進展防止に重要であると考えられる。

本研究の目的は、NAFLD 患者および NASH 関連 HCC 患者において酸化ストレスと抗酸化能とのバランスを調べ、病態に酸化ストレスがどのように関係しているか、を明らかにし、最適な酸化ストレス管理を探索することである。循環 ROS マーカーである Reactive oxygen metabolite (ROM) の測定と、抗酸化能マーカーである OXY 測定を行い、ROM と OXY のバランスである oxidative index を計算、ROM・OXY・oxidative index と NASH 患者の臨床パラメーターの相関および臨床経過を調べた。

[材料と方法]

患者

2009 年 8 月から 2013 年 12 月までの期間に岡山大学病院に入院し、肝生検により組織学的に確認された NAFL 患者 14 人 (NAFL) および NASH 患者 44 人 (NASH)、肝生検はないが、NASH 関連 HCC と考えられた患者 11 人 (NASH-HCC) を対象とした。NASH 群の 1 人および NASH-HCC 群の 2 人は、糖尿病治療のためにインスリンを使用しているが、ビタミン E などの抗酸化剤で治療されていた患者はいなかった。

まず、全患者の ROM および OXY の血清レベルを測定、ROM、OXY、oxidative index と臨床特性との関連を全患者で評価し、相関関係を調べた。次に、各患者群の酸化ストレスマーカーの特徴を調べた。最後に、12 人の NAFLD 患者 (NAFL1 人、NASH11 人) を追跡し、介入前と比較した。

本研究は、岡山大学大学院医歯学研究科倫理委員会 (承認番号 1635) の承認を受けて行っている。

血清サンプル

空腹時血液サンプルは入院時または外来診療時に採取され、ROM および OXY の血清レベルを含む生化学的データを得た。

血清 ROM および OXY レベルの測定

血清 ROM レベルの測定は、FRAS4 (Diacron International, Grosseto, Italy) を用いて行った。全血清抗酸化能は、FRAS4 (Diacron International) を用いて OXY 吸着試験により測定した。OXY 吸着試験は、次亜塩素酸 (HClO) 溶液中で酸化活性の発生を防止する血清の能力を評価し、1mL の試料で消費された HClO ($\mu\text{molHClO}/\text{mL}$) で表される。酸化ストレスと抗酸化活性のバランスは標準化 ROM と標準化 OXY の差により算出される oxidative index で評価した。

肝生検組織診断

肝組織像は、NAFL 患者 14 人、NASH 患者 44 人全員で評価を行った。

NAFLD の評価については 2 つの分類を用いた。

Matteoni らの分類 : type 1 ; 脂肪化のみ、type 2 ; 小葉の炎症を伴う脂肪化、type 3 ; 肝細胞の風船様変化を伴う脂肪化、type 4 ; 肝細胞の風船様変化及びマロリー硝子体または線維化を伴う、という分類で、type 1 と 2 は NAFL、type 3 と 4 は NASH と診断した。

Kleiner DE らの NAFLD Activity Score (NAS) : steatosis (0-3)、lobular inflammation (0-3)、hepatocellular ballooning(0-2)。これらのスコアの合計によって、患者を NAFL-NAS (0-2)、境界型 NAS (3-4)、または NASH-NAS (>4) に分類した。

統計解析

統計解析は、JMP ソフトウェアパッケージ (Version 11.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

[結果]

臨床的特徴

NASH 患者は、NAFL 患者よりも年齢が高く、血小板数が低く、AST が高く、HOMA-IR が高く、より高いインスリン抵抗性を示した。NASH-HCC 患者は、NASH 患者よりも年齢が高い傾向があり、血小板数、ALT が低かった。

酸化ストレス関連マーカーと臨床的特徴との相関

酸化ストレスマーカー ROM は、BMI、HbA1c、CRP、組織学的活動性、および NAS の炎症および ballooning score と正の相関を示し、男性よりも女性において高かった。多変量解析では HbA1c と CRP が有意であった。抗酸化力 OXY は、血小板数、アルブミンおよびクレアチニンと正の相関を示し、年齢と負の相関があった。oxidative index は、BMI および HbA1c と正の相関があり、クレアチニンと負の相関があり、また男性よりも女性で高い傾向があった。

NAFL、NASH、および NASH-HCC における酸化ストレス関連マーカー

NASH では ROM が健常人及び NAFL よりも高い傾向があり、NASH-HCC では OXY が NAFL・NASH よりも低かった。oxidative index は患者群間で有意差がなかった。患者群間で ROM・OXY を含めた多変量解析を行うと、NASH と NAFL では HOMA-IR の上昇が、NASH と NASH-HCC では高齢が有意な因子であった。

治療介入による酸化ストレス関連マーカーの変化

食事・運動療法および薬物療法を行った 12 名の患者の酸化ストレスマーカーを平均 70 ヶ月後に再測定した。ROM は有意に変化しなかったが、OXY は改善していた。ピオグリタゾンで治療した患者は体重が増加したが、ROM の低下および OXY の改善を示していた。

[考察]

本研究によって、NAFLD 患者のうち糖代謝異常を合併した活動性の強い肝炎患者が高い酸化ストレスを示すことが示唆された。肥満および糖尿病状態が、肝臓のミトコンドリア酸化ストレスを増加させ、肝炎の活動性が増すと考えられた。

抗酸化力は進行した肝硬変が疑われるような高齢の患者で低下していた。抗酸化システムは、ROS による細胞損傷を防ぎ、回復を促進するための重要な経路である。NASH-HCC では、高い酸化ストレスがある一方で、抗酸化能が相対的に低下しており、加齢による抗酸化能の低下が示唆された。また、HCC では抗酸化遺伝子である AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 活性が低下しているといった報告もあり、加齢や HCC の存在に関連する環境変化が NASH-HCC 患者の抗酸化力低下に影響している事が推察される。

現在、各国ガイドラインは、NASH のどの病期においてもビタミン E による抗酸化治療を推奨している。本研究の結果から、高い ROM を有する活動性の高い症例は抗酸化剤治療が適していると思われるが、NASH 関連 HCC 患者は酸化ストレスの除去よりも、ミトコンドリア機能をサポートし抗酸化力を改善させる治療の方が好ましい可能性がある。今回の研究で、インスリン抵抗性改善薬を中心とした治療によって OXY が改善することが明らかになっており、特に NASH-HCC の予後改善のために有益である可能性がある。

[結論]

酸化ストレスは NAFLD の活動性のマーカーと相関し、抗酸化力は若い、肝予備能の良い症例で保たれていた。NASH 関連 HCC 患者は高齢で、抗酸化力が低下している傾向を認めた。NAFLD の治療方針を考えるうえで、活動性の高い症例においては酸化ストレスを除去すること、進行した NASH 及び肝癌症例では抗酸化力のサポートに重点を置くことが肝要であると考えられた。

