

氏名	いのまた しんじろう 猪俣 慎二郎		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	乙第1854号		
学位授与の日付	令和2年10月1日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当（論文博士）		
学位論文題目	Changes in the Serum Hcpidin-to-ferritin Ratio with Erythroferone after Hepatitis C Virus Eradication Using Direct-acting Antiviral Agents （直接作用型抗ウイルス剤を用いた HCV 駆除後の血清ヘプシジン／フェリチン比とエリスロフェロンの変化）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	廣松 賢治
	（副査） 福岡大学	教授	廣瀬 伸一
	福岡大学	准教授	吉田 陽一郎

内容の要旨

【目的】

C型肝炎ウイルス（HCV）感染では、鉄過剰が多くみられる。肝産生蛋白ヘプシジンは、鉄代謝制御における中心的なホルモンとして知られている。HCV感染ではヘプシジン分泌が低下することで鉄吸収が促進され、鉄過剰につながるとされているが不明な点も多い。

ヘプシジンは鉄過剰、炎症、造血、低酸素などの多様な因子で制御されている。近年、エリスロポエチン（EPO）刺激で赤芽球より分泌されるエリスロフェロン（ERFE）が、ヘプシジン抑制因子として同定された。しかしHCV感染とERFEの関係や、HCV駆除後の変化についてはほとんど知られていない。

これまで、インターフェロン（IFN）やリバリビリン（RBV）を用いたHCV駆除後に、低下していたヘプシジン分泌が回復したという報告が散見される。しかしIFNはヘプシジンを誘導し、RBVは溶血性貧血をきたし鉄代謝に影響するため、その評価には問題があった可能性がある。

現在ではHCV駆除には直接作用型抗ウイルス剤（DAA）を用いることがほとんどで、IFNやRBV治療に比べ副作用が少なく抗ウイルス効果も高い。しかもDAAは鉄代謝への影響は少ないと考えられるため、HCV駆除前後での鉄代謝変化の評価に適していると考えられる。

今回我々はDAAによるHCV駆除において、ヘプシジンを含む鉄代謝変化を治療前後で

評価し、ERFE の関与も検討した。

【対象と方法】

本研究は、前向き単施設の非対照研究として開始前に UMIN 登録を行った。研究プロトコールは福岡大学病院 IRB で承認され、ヘルシンキ宣言に基づき実施した。全症例でインフォームドコンセントに関する同意書を取得した。

2016 年 2 月から 2017 年 7 月までに、26 名の HCV genotype 1b 感染の慢性肝炎あるいは代償性肝硬変症例が登録された。治療としてレディパスビル 90 mg とソフォスブビル 400 mg を 1 日 1 回 12 週間投与した。また持続的ウイルス学的著効 (SVR) を評価するため、更に 12 週間観察した。

B 型肝炎感染や自己免疫疾患、慢性炎症性疾患、貧血、活動性肝細胞癌、高度腎障害や心不全、高度糖尿病症例は除外した。なおヘモクロマトーシス責任遺伝子の C282Y 変異の有無については、本邦では稀なため評価しなかった。

Primary outcome として、治療前と比較した SVR 達成時 (24 週) のヘプシジンを含む鉄代謝変化を評価した。血清鉄、トランスフェリン飽和度 (TSAT)、フェリチン、ヘプシジン値を baseline および 1, 4, 12 および 24 週で測定した。ERFE は baseline および 12, 24 週で評価した。血液は夜間絶食として翌朝に採取、直ちに血清に分離し-80°C で保存し後日検査を行った。

血清ヘプシジンは hepcidin-25 を liquid chromatography-tandem mass spectrometry により測定した (MC プロット社)。血清 ERFE 測定は ELISA キットを用いて測定した。

サンプルサイズ計算 ; Primary outcome は 24 週でのヘプシジン変化量であるので、ヘプシジンの平均値や標準偏差、および変動係数から必要症例数は 23 症例と算出された。最終的に脱落を考慮し 25 症例とした。

【結果】

2 症例が脱落し最終的に 24 症例で解析を行った。全例 SVR を達成した。Baseline で TSAT かつフェリチン値が正常範囲の症例は 25%のみであった。中等度の ALT 上昇がみられたが、肝予備能は保たれており、肝線維化も軽度であった。血清フェリチン値は高値であったが、ヘプシジン値は正常範囲であった (Table 1)。血清ヘプシジンとフェリチン値には正相関がみられた (Table 2)。血清ヘプシジン/フェリチン比は血清 ALT およびヘモグロビン値と逆相関がみられた (Table 3)。

DAA による HCV 駆除後、血清フェリチンおよびヘプシジン値は治療前と比較し有意に低下した (Fig. 1A, B)。また鉄や TSAT も有意に低下した (ともに $p=0.003$)。一方で血清ヘプシジン/フェリチン比は有意に上昇し (Fig. 1C)、血清 ERFE 値は有意に低下した (Fig. 2)。血清ヘプシジン/フェリチン比上昇と血清 ERFE 値低下には相関がみられた (Fig. 3)。

【結論】

Baseline では鉄過剰にも関わらず血清ヘプシジンは正常範囲であった。理由として良好な肝機能や貧血症例の除外が考えられた。血清ヘプシジン値がフェリチン値と正相関

していたことは重要で、鉄過剰に対しヘプシジンは一定の反応はしていたものの、相対的に不十分であったことを示唆している。さらに重要なことは、正常範囲のヘプシジン分泌能が鉄過剰をきたすとは考えがたいことである。これらの結果は、HCV 感染における鉄過剰の原因がヘプシジン以外にあることを示唆している。また血清ヘプシジン／フェリチン比が ALT と逆相関していたことは、肝炎が高度であるほど鉄過剰に対するヘプシジン分泌能が低下していたことを示唆している。

これまでの研究で、EPO は間接的にヘプシジンを抑制すること、HCV 感染では血清 EPO 値が上昇していることが報告されている。EPO により誘導される、ヘプシジン抑制因子である ERFE は本研究では上昇しており、不十分なヘプシジン分泌に影響していたかもしれない。

HCV 駆除により baseline と比較し血清鉄や TSAT およびフェリチン値は低下したが、むしろヘプシジン値は低下した。これらの結果は、ウイルス駆除後の鉄過剰軽減はヘプシジンによりもたらされたものではないことを示している。むしろ先行する鉄低下によりヘプシジン低下がもたらされたのかもしれない。一方、HCV 駆除後に血清ヘプシジン／フェリチン比は上昇、ERFE は低下し、互いに相関していた。

これらの結果は、HCV 駆除によって鉄過剰に対する不十分なヘプシジン分泌能が回復した、すなわち鉄代謝が改善したことを示唆している。その変化には ERFE 値低下が影響していた可能性がある。

審査の結果の要旨

本論文は、慢性 C 型肝炎ウイルス HCV 感染において認められる鉄代謝制御異常、ヘプシジン分泌抑制におけるエリスロフェロンの関与を検討した臨床研究である。肝細胞から産生されるヘプシジンは鉄過剰や炎症により発現が上昇し、赤血球新生や低酸素によりその発現は抑制される。慢性 HCV 感染では肝細胞からのヘプシジン分泌の抑制がみられ鉄過剰の原因となっているが、慢性 HCV 感染において貯蔵鉄上昇に対するヘプシジンの分泌抑制がおこる機序は不明である。本論文では、慢性 HCV 感染において特徴的に認められる貯蔵鉄上昇に対するヘプシジン分泌能の低下、即ち、ヘプシジン/ferritin 比の低下が、直接作用型抗ウイルス剤 direct-acting antiviral agents (DAA) による C 型肝炎ウイルス駆除により改善されること、さらに、ヘプシジン分泌を抑制する作用のあるエリスロフェロンが C 型肝炎ウイルス駆除後低下することを初めて見出した。これらのことより、慢性 HCV 感染において認められる鉄代謝異常、ヘプシジンの分泌抑制の原因がエリスロフェロン産生亢進である可能性が示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

1. 斬新さ

直接作用型抗ウイルス剤 DAA を用いた HCV 駆除後のヘプシジン変化についての初めての報告である。さらに、HCV 駆除前後のヘプシジン/フェリチン比上昇とエリスロフェロン低下には相関関係を認めた。このことは、HCV 感染での鉄代謝制御異常におけるエリスロフェロンの関与を初めて示唆するものであり新規性が高い。

2. 重要性

2014年にエリスロフェロンは赤血球新生系のエリスロポエチンの下流の因子としてヘプシジン抑制因子として近年注目されるようになった分子であるが、実はこのエリスロフェロンは2012年に報告されている myonectin（骨格筋から産生されるマイオカインの一種）と全く同一の分子である。Myonectinは脂肪細胞や肝細胞の脂肪酸の取り込みを増加させるなど脂質代謝に関わる分子である。このMyonectin（エリスロフェロン）の慢性HCV感染患者での上昇を明らかにした本研究は、HCVが肝細胞内で宿主細胞の脂肪滴をウイルス粒子形成の場として利用するなど宿主の脂質代謝との密接な関係があることを考えると非常に興味深く、今後のHCV研究のパラダイムシフトをもたらす重要な知見であると考えられる。

3. 研究方法の正確性

本研究は primary outcome である HCV 駆除後のヘプシジン値の変化量の推定から sample size 計算を行った前向き臨床研究である。開始前に UMIN 登録も行っており、正確性や客観性、統計解析に必要な症例数が確保されている。

4. 表現の明確さ

目的、方法、結果については図表を含め明確かつ詳細に表現されている。本研究は、結果の考察にあたっては統計学的手法を用いて評価しており、明確な結果であると考えられた。

5. 主な質疑応答

Q1 ヘプシジンは HCV 感染における鉄代謝においては主要な player ではなかったということか？ そうであれば何が主要な player なのか？

A1 HCV 慢性肝炎患者治療前のヘプシジン値は必ずしも低値ではなく治療後にむしろ減少傾向にあった。ヘプシジン値のみで解釈すると、ヘプシジンは HCV 感染における鉄代謝においては主要な役割を担っていなかったとも考えられる。しかしながら、ヘプシジンは貯蔵鉄量（血清フェリチン）により誘導されるものであり、血清フェリチン値の多寡

の影響を受ける。したがって、ヘプシジン値のみではなく、ヘプシジン/フェリチン比でデータを解釈する必要がある。Fig. 1c で示すように、慢性 HCV 感染では治療前（ベースライン）で低下していたヘプシジン/フェリチン比がウイルス駆除後増加している点が本研究の重要なポイントと考える。

Q2 鉄過剰は酸化ストレスの原因となり ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ 過程で Fenton 反応により ROS が発生)、鉄自体が肝障害に影響していると考えられるか？

A2 これまでの報告で、HCV 駆除せずとも瀉血で鉄量を減らすことにより、肝機能が改善し肝発癌が軽減することが分かっている。慢性 HCV 感染における線維化、発癌などの進行過程に鉄、ROS 産生が病態に大きく関与しているものとする。

Q3 DAA による HCV 駆除後のヘプシジン変化の報告はこれまでない？

A3 現時点ではない。

Q4 HCV にとって鉄は有利なのか？

A4 HCV 増殖に鉄が必要という報告と、鉄は増殖を抑制するという報告があり、判断が分かれている。細菌に関しては増殖に鉄が必須であることから、ヘプシジンが鉄を低下させる抗菌ペプチドとして発見された経緯がある。

Q5 肝疾患では鉄が上昇するのか？また HCV 駆除後に炎症所見やフェリチン以外の鉄代謝マーカーが低下することがあったか？

A5 ウイルス性肝疾患でも非ウイルス性肝疾患でも鉄上昇はみられる。しかし HCV 感染では特に上昇している。炎症所見に関しては、炎症性疾患を除外しており、例えば CRP は治療前から陰性で治療後の変化もなかった。鉄代謝マーカーに関しては、鉄やトランスフェリン飽和度も有意な低下がみられた。

Q6 ヘプシジン値やフェリチン値の程度で臨床的な差があったか？バイオマーカーになり得るか？

A6 値の差による臨床的な差はみられず、現時点ではバイオマーカーとしては使えないと考えられる。ただし症例数がさらに集積すれば、可能性があるかもしれない。

Q7 エリスロフェロンは上昇していたが、エリスロポエチンは測定していない？

A7 測定していない。

Q8 エリスロフェロンとマイオネクチンは同一遺伝子であり、マイオネクチンは脂質代謝に影響している。HCV 増殖は脂質を利用しており、関係があるのではないか？エリスロフェロンと脂質代謝に焦点をあててはどうか？

A8 実際に HCV 増殖には脂質が不可欠であり、HCV 駆除後に LDL-C が上昇することも分かっている。今後の研究として検討したい。

Q9 データが正規分布をとらない場合、どのように統計計算を行ったのか？

A9 まず各データおよび治療前後の差 (Δ) について正規性の検定を行った。正規分布していた場合は、それぞれの差を t 検定で解析した。正規分布しなかった場合は対数をとって、それでも正規分布しない場合は Wilcoxon の符号付き検定で解析した。

Q10 ヘプシジンの HCV に対する抗ウイルス効果が報告されている。それならば HCV が宿主のヘプシジンを低下させているのではないか？

A10 それについては未確認で、検討したい。

Q11 エリスロフェロンと HCV の関係について述べたのは初めてのことか？もう少し数を増やして検討してはどうか？

A11 HCV におけるエリスロフェロンの検討は本研究が初めてであり、今後症例数を増やして検討したい。

Q12 ヘプシジンの大きさはどれくらいなのか？

A12 本研究ではヘプシジン-25 を測定しており、25 基のアミノ酸から組成されている。他にヘプシジン-20 等もあるが、ほとんどの研究においてヘプシジン-25 が用いられている。

以上、内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確さ、表現の明瞭性、および質疑応答の結果を踏まえ、審査委員で討議の結果、本論文は博士学位論文に値すると評価された。