



Title	慢性B型肝炎患者に対する核酸アナログ治療の腎機能・脂質代謝への影響の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鈴木, 和治
Description	配架番号 : 2538
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14073号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77943
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuharu_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 鈴木 和治

学 位 論 文 題 名

慢性 B 型肝炎患者に対する核酸アナログ治療の腎機能・脂質代謝への影響の検討
(Effect of Nucleos(t)ide analogues for HBV infected patients on renal function and lipid metabolism)

【背景と目的】B 型肝炎ウイルス（HBV）は全世界で 4 億人の感染者を有し、肝硬変・肝癌の主要な原因疾患である。本邦では、肝癌死亡者は 3 万人前後で推移しており、HBV の持続感染に起因する肝癌は全体の約 20%を占め、公衆衛生上の大きな問題となる。確立された HBV 関連肝癌のリスク因子としては、HBV DNA 高値、ALT 高値、高齢、男性などがあげられ、肝硬変への進展、肝発癌抑制のため、日本肝臓学会の B 型肝炎治療ガイドラインでは HBV 感染患者に対し、インターフェロンもしくは、エンテカビル(ETV)、テノホビルジソプロキシル(TDF)といった核酸アナログ(NA)の内服治療が推奨されている。核酸アナログは高い治療効果と安全性が報告されるが、生涯内服加療が必要となり長期での肝内外への影響が重要となる。近年、HBV キャリア年齢が上昇し、糖尿病、脂質異常症、高血圧、腎障害といった併存症を有する症例が増加し、同併存症例においては HBV 関連肝癌の発症率上昇が報告された。そこで我々は核酸アナログ治療による腎機能および脂質代謝にどのような影響を及ぼすのかといった点に注目し検討をおこなうこととした。

《核酸アナログと腎機能への影響》すべての NA は腎排泄であり、腎機能により容量の調整が必要である。TDF は尿細管障害のリスクがあり、腎機能低下症例では使用に慎重をきすことより、透析症例、腎機能障害を有する症例に対し ETV の使用が推奨される。しかしながら長期間の効果ならびに腎機能への影響、透析症例に効果安全性は十分に明らかになっていない。

《核酸アナログと脂質代謝への影響》HBV 患者に対する TDF は ETV と比較し Total-cholesterol(TC)、LDL-c(LC)、HDL-c(HC)を優位に低下させるとの報告があり、また、HIV 患者において TDF 使用により TDF が脂質代謝に影響を及ぼし、かつ心不全発症イベントを低下させると報告された。しかし、それらの TDF の脂質代謝に及ぼす機序は解明されておらず、また動脈硬化に対する影響も十分に明らかにされていない。

【対象と方法】《第一章》当院ならびに関連施設からなる NORTE study group にて、ETV 治療を開始された患者で、治療前と治療開始後 1 年毎の腎機能の推移、ALT 正常化、HBV-DNA 陰性化、ウイルス学的無効の検討をおこなった。なお、腎機能は糸球体濾過量推測値(eGFR)を Cockcroft-Gault 式により計算をした。《第二章》当院、JCHO 北海道、市立函館病院での ETV ならびに TDF の症例において、治療開始前ならびに開始後半年から 1 年の間での TC、LC、HC、酸化 LDL の推移の検討をおこなった。さらに、in vitro の検討では、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞ならびにヒト横紋筋腫由来細胞株である RD 細胞に対し、TDF、ETV を添加し脂質代謝に関連する因子の検討をおこなった。また、in vivo の検討では 4 週の雄 C57B6/J マウスに TDF、ETV の経口投与を連日 9 週間おこない、心筋ならびに肝組織の脂質代謝に関連する因子の検討をおこなった。

【結果】《第一章》2006 年から 2018 年に ETV で加療された 567 症例を対象とし、うち 294 症例を根治困難な悪性腫瘍、HCV、HIV の共感染、データ不十分のため除外をし、273 症例（CKD Stage G1-2(eGFR>61)/G3(31-60)/G4-5(30<)/透析 ; 233/25/5/10) での ETV の治療効果・

腎機能への影響を検討した。治療開始 36 ヶ月後の ALT、HBV-DNA 正常化率は腎機能に関係なく 90%以上であり、腎機能によらず ETV が高い効果を示すことが確認できた。また、273 症例のうち、透析 10 症例と非透析 263 症例との ALT、HBV-DNA 正常化率、ウイルス学的無効を検討したがいずれも有意差は認めず同程度の高い効果を確認することができた。また、5 年後の eGFR の推移では、全症例において有意に低下を認めたが($P<0.001$)、その中でも G3/4 の症例では 48.8 (中央値、mL/min/1.73m²) から 56.0 へと上昇の傾向を示した($P=0.184$)。《第二章》2006 年から 2017 年に ETV、TDF で加療された 567 症例を対象とし、うち 401 症例を根治困難な悪性腫瘍、糖尿病、脂質異常症の内服加療中、データ不十分、保存血清の欠損のため除外をし、全 118 症例(うち、TDF/ETV ; 58/60 症例)で脂質の検討をおこなった。TDF 群では既報と同様に TC(治療前平均値: 186(mg/dl))、治療後: 168($P<0.001$) HC (前: 65、後: 55($P<0.001$)) と有意に低下し、さらに動脈硬化と強く関連する酸化 LDL (前: 122(U/L)、後: 109($P<0.016$)) においても有意に低下を示した。次に in vitro での検討をおこなった。まず、DMSO、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M を添加し 5 日間培養後に培養上清中の脂質の測定をおこなった。TC、LC、HC は TDF 50 μ M 群において有意に低下をみとめ($P<0.01$)、臨床データの結果と同様の結果であった。次に、HepG2 細胞を上記の条件で培養後細胞を回収し脂質取り込みに関連のある受容体に対しウエスタンブロット(WB)法にて検討をおこなったところ、LDL-R、SR-BI は変化は認めなかったが、スカベンジャー受容体の CD36 に対しては TDF 50 μ M を添加したもので発現の亢進が確認できた。また、HepG2 細胞、RD 細胞に対し FACS をおこない CD36 陽性細胞の細胞表面での発現の亢進を認めた。そこで、HepG2 細胞に CD36 を siRNA を用いて knock-down すると培養上清中は、Mock siRNA を導入後に TDF を添加したものと比べ、TC、LC の上昇を認め、TDF により発現が亢進された CD36 が脂質の取り込みに関与している事が示唆された。次に TDF が CD36 を亢進する機序に対する検討をおこなった。PPAR、LXR、PXR の活性化が肝においては CD36 発現と関与しこれら活性化を Reporter assay にて検討したところ、PPAR のみ TDF 50 μ M での発現の亢進が確認できた。続いて、PPAR α 、 σ 、 γ の活性化について詳細な解析を行ったところ、PPAR α のみ TDF 投与にて活性化がみられた。以上より、TDF は一部で PPAR α の発現上昇を介して CD36 の発現上昇させることを確認できた。次に CD36 の siRNA 導入しさらに TDF を添加し 7 日間培養したものに WB をおこなった。CD36siRNA 群で CPT-1 発現の低下を認めたが TDF を添加すると、CD36 は低下したが、CPT-1 については発現の亢進を認めており、TDF の作用は CD36 を介さずに CPT-1 を亢進させることが示唆された。次に、PPAR α を siRNA にて knock-down(KO)し TDF を添加した。CD36 KO 群では、CPT-1 の発現の低下がみられ、またそれらに TDF を添加したが、CPT-1 は低下したままであり TDF はやはり PPAR α の経路を亢進させることが示唆された。またマウスにおいても肝、心筋組織で TDF を経口投与した群において WB での CD36 の発現の亢進を確認することができた。

【考察】《第一章》我々は、腎機能によらず、ETV 治療の高い効果を示すことを明らかにした。また、CKD G4-5 において腎機能が改善する傾向である事を明らかにした。《第二章》脂質の検討では臨床データより TDF の脂質への影響は既報と同様であったが、動脈硬化と強く関連する酸化 LDL をも低下させる事を新規に見出した。また、さらに培養細胞、動物実験において PPAR α の活性化を介した CD36 の発現亢進を介した脂質低下作用をあきらかにした。既報において CD36 が酸化 LDL、HDL の吸収に関わるとの動物実験での報告があり、CD36 発現亢進が脂質代謝の変化に重大な役割を有することが示唆された。

【結論】《第一章》ETV は腎機能障害、透析症例においても高い効果が確認でき、高度腎機能障害患者において腎機能に影響を及ぼさないことが確認できた。(K Suzuki et al; Hepatology Research 2019 in press) 《第二章》TDF は TC、LC、HC、酸化 LDL を有意に低下させた。TDF は PPAR α の発現の亢進を介した脂質の取り込みに関与する CD36 発現を亢進させることを明らかにした。(in submission)