



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14073
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94632
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuharu_Suzuki.pdf



学位論文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

鈴木 和治

学位論文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

鈴木 和治

目 次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・	1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・	2-5 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・	6-7 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・	8 頁

《第一章》透析および高度腎機能障害を有する慢性型肝炎患者に対するエンテカビル治療の効果、安全性の検討

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・	9-10 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・	11-13 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・	14-27 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・	28-30 頁

《第二章》慢性B型肝炎患者における核酸アナログ製剤が脂質代謝に与える影響の検討

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・	31 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・	32-39 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・	40-55 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・	56-58 頁
総括・・・・・・・・・・・・・・・・	59 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・	60 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・	61 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・	62-67 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kazuharu Suzuki, Goki Suda, Yoshiya Yamamoto, Ken Furuya, Masaru Baba, Megumi Kimura¹, Osamu Maehara, Tomoe Shimazaki, Koji Yamamoto, Taku Shigesawa, Akihisa Nakamura, Masatsugu Ohara, Naoki Kawagishi, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa and Naoya Sakamoto

Entecavir treatment of hepatitis B virus-infected patients with severe renal impairment and those on hemodialysis

Hepatology Research 2019 Jul 1. doi: 10.1111/hepr.13399.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 鈴木和治, 須田剛生, 重沢拓, 中村晃久, 大原正嗣, 川岸直樹, 梅村真知子, 中井正人, 荘拓也, 森川賢一, 小川浩司, 坂本直哉

HBV 感染者に対する核酸アナログ投与の脂質代謝に及ぼす影響の検討

第 54 回 日本肝臓学会総会 ポスターセッション 2 HBV 臨床 2

2018 年 6 月 14 日-15 日, 大阪, 日本

2. 鈴木和治, 須田剛生, 坂本直哉

高度腎機能障害合併 HBV 感染患者に対する核酸アナログの効果、安全性の検討

第 27 回 日本消化器関連学会週間 ワークショップ 11 B 型肝炎診療 ; 未来への展望を踏まえた現在の在り方

2019 年 11 月 21-24 日, 神戸, 日本

3. Kazuharu Suzuki, Goki Suda, Yoshiya Yamamoto, Ken Furuya, Masaru Baba, Megumi Kimura, Osamu Maehara, Tomoe Shimazaki, Koji Yamamoto, Taku Shigesawa, Akihisa Nakamura, Masatsugu Ohara, Naoki Kawagishi, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa and Naoya Sakamoto

Entecavir treatment of hepatitis B virus-infected patients with severe renal impairment and those on hemodialysis

The Liver Meeting (American Association for the Study of the Liver Diseases) 2019 Poster Session1 HBV therapeutics: Approved Agents

2019 年 11 月 8-12 日, ボストン, アメリカ合衆国

要 旨

【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・肝癌の主要な原因となっている。本邦では、肝癌死亡者は3万人前後で推移し、その中でHBVの持続感染に起因する肝癌は全体の約15%を占め、公衆衛生上の大きな問題となっている。その為、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製剤 (NA) の内服治療が推奨されている。しかし、NAは高い治療効果、安全性が報告されているが、ほぼ一生内服加療が必要であり長期投与による有害事象が懸念されている。近年、HBV感染者の高齢化により、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ている。さらに、これら併存症を有する症例においては、HBV関連肝癌が高率に発症する事が報告された。そこで長期内服が必要となるNAの腎機能および脂質代謝に与える影響に関する詳細な検討は、臨床上重要であると考えられる。

《第一章・NAの腎機能への影響》全てのNAは腎排泄であり、腎機能により用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にならざるを得ず、実臨床において透析及び腎機能障害を有する症例に対してはETVの使用が推奨されている。しかしながら腎機能障害を有する症例におけるETVの長期治療効果ならびに腎機能への影響、透析症例に対する治療効果、安全性は十分に検証されていないのが現状である。

《第二章・NAの脂質代謝への影響》慢性B型肝炎患者へのTDF治療はTotal-cholesterol (TC)、LDL-c (LC)、HDL-c (HC) を有意に低下させるといった報告がある。一方、TDFが脂質代謝におよぼす機序は未だ十分に解明されておらず、さらにTDFの脂質低下作用が動脈硬化に与える影響も不明である。

【対象と方法】《第一章》北海道大学病院 (以下、当院) と研究協力施設からなるNORTE study groupにて、慢性B型肝炎に対してETV治療を開始された患者を対象とした。治療開始前の腎機能をCKD Stageを用いてG1-2 (eGFR > 60) / G3 (eGFR 30-59) / G4-5 (eGFR < 30) /透析症例と分類した。CKD Stage別に開始1年毎のeGFR、生化学的効果 (ALT 正常化率)、ウイルス学的効果 (HBV-DNA 陰性化率)、ウイルス学的無効の検討を行った。《第二章》当院、JCHO 北海道病院、市立函館病院にて慢性B型肝炎に対してETVならびにTDF治療を開始された患者を対象とした。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、non HDL-cの変化を検討した。続いて、TDFの血清の脂質低下

作用の詳細な機序を検討する為に、*in vitro* の検討を行った。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、TDF、ETV を投与しそれぞれの細胞における脂質代謝機構の変化の検討を行った。最後に、*in vivo* の検討として、4 週齢の雄 C57B6/J マウスに TDF、ETV の経口投与を連日 9 週間行い、肝組織ならびに心筋における脂質代謝に関連する因子の変化に対し検討を行った。

【結果】《第一章》2006 年から 2018 年に 567 症例が参加施設において ETV で加療されていた。567 症例中、根治困難な悪性腫瘍症例、HCV、HIV の重複感染例、データ追跡困難であった全 294 症例を除外し、273 症例を解析対象とした。治療開始前の CKD Stage は、G1-2/G3/G4-5/透析症例それぞれ 233 (85.3%) / 25 (9.2%) / 5 (1.8%) / 10 (3.7%) 例であった。治療開始 36 ヶ月後の ALT 正常化率は、69.0/84.2/100/100 (%)、HBV-DNA 陰性化率は 96.1/100/75.0/100 (%) といずれの CKD Stage においても ETV 治療の高い効果を確認できた。また、透析 (10 例) / 非透析 (263 例) の比較検討でも ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率に有意差はなく、透析症例においても同様に高い治療効果を確認できた。また 5 年後の eGFR の変化をみると、CKD Stage G1/2 の症例において 82.9 (中央値、mL/min/1.73m²) から 74.8 (mL/min/1.73m²) へと有意に低下を認めたが (P<0.001)、CKD Stage G3/4 の症例では 48.8 (mL/min/1.73m²) から 56.0 (mL/min/1.73m²) へと低下は認められなかった (P=0.184) 。《第二章》2006 年から 2017 年に ETV、TDF で治療を開始された 519 症例中、根治困難な悪性腫瘍症例、糖尿病または脂質異常症に対し内服加療中の症例、データ追跡困難であった全 401 症例を除外し 118 症例 (TDF 群/ ETV 群：各 58/60 例) を解析対象とした。さらに 118 症例に対し TC、LC、HC、HBV-DNA 量で propensity score matching を行い、TDF 群/ETV 群：36 例/36 例に対し解析を行った。TDF 群における治療前/治療開始後の変化は、TC が 186/164 mg/dl (P<0.001)、HC が 72/60 mg/dl (P<0.001) と有意に低下がみられた。さらには動脈硬化と強く関連する酸化 LDL が 119/101 U/L (P=0.022)、non HDL-c が 114/104 mg/dl (P=0.041) と有意に低下がみられた。一方、ETV 群においてはいずれも有意な変化は認めなかった。次に TDF の脂質低下作用の機序を検討する事とした。HepG2 細胞に DMSO、TDF 50μM、ETV 0.25μM を投与し 5 日間培養後に培養上清中の脂質の測定を行った。TDF 50μM 投与群において TC、LC、HC は有意に低下をみとめ (P<0.01)、臨床データと同様に TDF の脂質低下作用を確認できた。次に、HepG2 細胞に DMSO、TDF 50μM、ETV 0.25μM を投与し 5 日間培養後細胞を回収し、脂質の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) にて発現の変化を検討した。LDL-R、SR-B I は変化を認めなかった一方、スカベンジャー受容体である CD36 に対しては TDF 50μM を投与したもので発現の上昇が確認できた。また、HepG2 細胞、RD 細胞

に DMSO、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M を投与し 5 日間培養後に細胞を回収し CD36 の抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析を行った。HepG2 細胞、RD 細胞いずれにおいても TDF を投与した細胞で CD36 陽性細胞の増加を認めた。以上より TDF により発現が上昇した CD36 が脂質の取り込みに関与すると考え、それを確かめるために、HepG2 細胞に CD36 の siRNA を導入し knock-down した後に培養上清中の脂質を測定した。siRNA を導入した群は control siRNA を導入したものと比べ、培養上清中の TC、LC の有意な上昇 ($P<0.01$) を確認した。さらに、CD36 を knockdown した HepG2 細胞に TDF を投与し 5 日間培養後の培養上清中の脂質を測定した所、TDF による TC、LC の低下はみられなかった。この結果により、TDF により発現が上昇した 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 発現上昇を来す機序に関し検討を行った。既報において PPAR、LXR、PXR が肝細胞における CD36 の発現を制御する因子として報告されている。そこで、これらの転写因子の応答配列下に reporter gene が導入されたプラスミドを細胞にトランスフェクションし、DMSO、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M 投与によるレポーター活性（ルシフェラーゼ活性）の変化を検討した。これらの転写因子のうち、PPAR のみ TDF の投与で活性化が起こる事が確認できた。続いて、同様に Reporter assay にて PPAR のサブタイプである α 、 σ 、 γ について詳細な解析を行った所、PPAR α のみが TDF の投与で活性化が確認できた。以上より、TDF は一部で PPAR α を介して CD36 の発現を上昇させる可能性が示唆された。この仮説を検証する為に、HepG2 細胞に TDF を投与し細胞内 PPAR α 応答遺伝子群 (CPT-1 等) の発現変化を検討した。TDF 投与により HepG2 細胞内の PPAR α 応答遺伝子群の有意な上昇が確認された。次に、HepG2 細胞に PPAR α の siRNA を導入し knock-down した後に TDF を投与し細胞内 CD36、CPT-1 蛋白発現変化を解析した。PPAR α knock-down により、CD36、CPT-1 発現の低下がみられ、さらに TDF 投与後も、CD36、CPT-1 発現は低下したままであった。すなわち、TDF は PPAR α 活性化を介して、CD36、CPT-1 発現を上昇させる事が示唆された。更に、HepG2 細胞に CD36 の siRNA を導入し knock-down した後に、TDF を投与し CPT-1 蛋白発現の変化を解析した。CD36 の knock-down により CPT-1 発現の低下を認めた一方、TDF を投与にて CD36 knock-down に関わらず CPT-1 発現の低下は認められなかった。すなわち、TDF は CD36 を介さずに直接的に PPAR α の活性化を介して CPT-1 発現を上昇させる事が示唆された。

最後に TDF、ETV 投与後のマウスの肝、心筋組織に CPT-1、CD36 蛋白発現の変化を検討した。TDF を経口投与した群でのみ in vitro の解析結果と同様に CPT-1、CD36 発現の上昇を確認する事ができた。

【考察】今回、ETV 開始後の eGFR の変化を腎機能別に検討した所、CKD Stage G3/4 において腎機能の低下がみられなかった。一因として ETV 治療により HBV

の活動性が抑えられ、HBV 関連腎症が改善した事が推察される。しかし、腎生検を行った症例は一部であり今後さらなる検討が必要である。NA の脂質代謝への影響の検討では、TDF 投与は動脈硬化と関連のある酸化 LDL、non HDL-c を低下させる事が新規に明らかになった。TDF の脂質低下作用の機序として TDF は PPAR α 活性化を介し、脂質の取り込みに関わる CD36 発現を上昇させる作用が関与する事が示された。最近になり慢性 B 型肝炎患者に対する TDF 治療は ETV 治療と比較し肝発癌を有意に抑制する可能性が複数報告された。PPAR α の活性化が肝内の脂肪代謝を改善し、肝発癌の原因となりうる脂肪肝炎を改善せるといった報告もあり、今回発見した TDF の PPAR α 活性化作用が肝内の脂質代謝を改善し、肝発癌を抑制した可能性も推察される。

【結論】本検討において、今まで十分解明されていなかった透析症例および高度腎機能障害を有する慢性 B 型肝炎患者においても ETV 治療は、高い効果、安全性を示す事が明らかになった。NA の脂質代謝への影響の検討では TDF 治療が脂質低下作用を有しさらには動脈硬化と強い関連がある酸化 LDL、non HDL-c をも低下させる事を明らかにした。TDF が脂質代謝を変化させる機序として PPAR α 活性化を介し、脂質の取り込みに関わる CD36 の発現上昇が関与する可能性が示唆された。

略 語 表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである。

AASLD	The American Association for the Study of Liver Diseases
AFP	Alpha fetoprotein
Alb	Albumin
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
Ccr	Creatinine clearance
CD36	Cluster of differentiation 36
CH	Chronic hepatitis
CKD	Chronic kidney disease
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
COX	Cyclooxygenase
CPT-1:	Carnitine acyltransferase I
DGAT:	Diacylglycerol acyltransferase
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoxyribonucleic acid
EASL	European Association for the Study of the Liver
ETV	Entecavir
FTC	Emtricitabine
FIB-4	Fibrosis-4
HBV	Hepatitis B virus
HBcrAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B envelope Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HD	Hemodialysis
HDL-c	High density lipoprotein cholesterol
HIV	human immunodeficiency virus
Hb	Hemoglobin
IFN	Interferon
L-FABP	Liver fatty acid binding protein

LAM	Lamivudine
LC	Liver cirrhosis
LDL-c	Low density lipoprotein cholesterol
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LXR	Liver X receptor
Oxidized LDL	Oxidized Low density lipoprotein cholesterol
Non HDL-c	Non High density lipoprotein cholesterol
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	Pregnane X receptor
Plt	Platelet
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Real time-Polymerase Chain Reaction
SR-B I	Scavenger receptor class B type I
T-chol	Total cholesterol
TAF	Tenofovir alafenamide
TDF	Tenofovir disoproxil fumarate
TG	Triglyceride
Tx	Treatment

緒 言

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・肝癌の主要な原因となっている (Lee, 1997)。HBV感染の自然経過として母子感染の10-20%、成人の急性感染の2-10%が慢性肝炎に移行し、更に年に約2%が肝硬変へ移行する。さらに慢性肝炎からは年に0.5-0.8%に、肝硬変からは年に3-7%に肝発癌が認められる (Lok, 2002)。全世界では、HBV関連の肝硬変または肝細胞癌にて年間約88万人が死亡している (Mahoney, 1999)。また、本邦では、肝癌死亡者は年間3万人前後で推移しており、全体の肝癌発症のうち約15%がHBVの持続感染に起因するものである (Umemura et al., 2009)。以上のように、HBV感染は公衆衛生上の大きな問題点であり、適切な治療介入が重要である。

B型肝炎に対する日本肝臓学会の治療ガイドラインでは慢性B型肝炎患者に対し肝硬変への進展、肝発癌抑制を目的とした治療指針が示されている。慢性肝炎の症例ではALTが30 U/L以上、HBV-DNAが2000 IU/ml以上、ならびに肝硬変の症例ではALTに関わらず、HBV-DNAが陽性であれば、抗ウイルス治療としてインターフェロンもしくは核酸アナログ製剤 (エンテカビル (ETV)、テノホビル ジソプロキシル (TDF)、テノホビル アラフェナミドフマル酸塩 (TAF)) の内服が推奨される (Drafting Committee for Hepatitis Management and the Japan Society of hepatology, 2014)。インターフェロン治療は高い副作用発現率と低い効果から導入は低率であり (Wong et al., 1993)、現状、多くの症例で核酸アナログ製剤が使用されている。

核酸アナログ製剤はもともとHIV感染症の治療薬として開発された経緯のある抗ウイルス薬である。HBV増殖過程での逆転写を阻害し、強力にHBV-DNAの増殖を抑制する作用を有する。各種核酸アナログ製剤の有効性について HBe 抗原陰性例において治療開始48週後のALT正常化率は、ETV 86%、TDF 71%、TAF 83%、HBV-DNA陰性化率はETV 91%、TDF 93%、TAF 93%といずれも高い効果を期待する事ができる (Buti et al., 2016; Lai et al., 2006; Marcellin et al., 2008)。しかしながら、核酸アナログ製剤はHBVの複製を強力に抑制はするが、肝臓からウイルスを排除できず、ほぼ一生涯にわたり内服が求められる。そこで長期間内服が必要となる核酸アナログ製剤自体の腎機能および脂質代謝に与える影響に関する詳細な検討は、臨床上重要であると考えられ、本研究で検討を行う事とした。

《第一章》

透析および高度腎機能障害を有する慢性 B 型肝炎患者に対する エンテカビル治療の効果、安全性の検討

緒 言

近年、HBV キャリアの高齢化に伴い腎機能障害といった併存症を有する症例が増加しており、治療に際し注意が必要となる (Liu et al., 2018)。

全ての核酸アナログ製剤は腎で排泄されるため、腎機能に基づいた用量の調整が必要である。一方、各々の核酸アナログ製剤の開発治験では、高度腎機能障害、透析患者は対象として除外されている。TDF はミトコンドリア障害に起因した近位尿細管障害により低リン血症、糸球体障害が報告されており (Ng et al., 2015)、腎機能低下症例においては、使用に注意を要する。TAF は透析および高度腎機能障害を有する患者への使用は推奨されていない。以上より、実臨床においては透析および高度腎機能障害を有する慢性 B 型肝炎患者に対して ETV による治療が推奨されるが、効果、安全性に対する検証は不十分である。最近になり、ETV 治療が腎機能に与える影響についてのレトロスペクティブな報告がなされた。Wong ら (Wong et al., 2018) は、ETV 治療後の eGFR の変化を検討し、治療開始前後での eGFR の低下は認められなかったと報告した。一方、観察期間中央値は 2.4 年と限られており、長期における腎機能への影響、高度腎機能障害を有する患者における効果、安全性の検討は不十分である。また、ETV 治療の透析症例に対する効果、安全性の報告はさらに限られている。現在まで、HBV 感染を有する透析症例に対し、ETV 治療開始後 1 年以上経過をみられた報告はわずか 5 症例にとどまっている (Ridruejo et al., 2010)。加えて、腎機能に基づいて ETV の用量を調整した上での効果、安全性を検討した報告はさらに限られる。

以上より、研究開始時の臨床的問題点をまとめる。

- ①高度腎機能障害を有する慢性 B 型肝炎患者に対する ETV 治療の効果、安全性並びに腎機能への影響に関する検討が不十分である。
- ②腎機能に基づいて ETV の用量を調整した上での治療効果、安全性に関する検討が不十分である。
- ③HBV 感染を有する透析症例に対する ETV 治療の効果、安全性に関する検討が不十分である。

分である。

そこで今回、上記の検討を行う事とした。

方 法

1. 研究の種類・デザイン

多施設後ろ向き観察研究

2. 対象となる患者

対象者のうち、以下の選択基準 (1) を全て満たし、かつ除外基準 (2) のいずれにも該当しない場合を適格とした。

(1) 選択基準

- ①北海道大学病院ならびに関連施設からなる NORTE study group にて慢性 B 型肝炎に対して ETV 治療が行われた患者
- ②本研究への参加について自由意思による同意が得られた患者、もしくは研究の参加について拒否しない患者
- ③治療開始時の年齢が 20 才以上で 1 年以上外来もしくは入院で経過を観察していた患者
- ④腎機能を含めた適切な臨床情報を有する患者

(2) 除外基準

- ①HIV、HCV の共感染を有する患者
- ②自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、原発性硬化性胆管炎を既往に有する患者
- ③根治困難な肝細胞癌を含めた悪性腫瘍を有する患者
- ④重度の心疾患（心筋梗塞、心不全、不整脈等）に罹患している患者

3. 検討項目

2006 年 1 月から 2018 年 1 月までに参加施設にて慢性 B 型肝炎に対し初回治療として ETV による加療を開始された患者を対象とし、CKD stage 別に開始 1 年毎の eGFR、生化学的効果（Alanine aminotransferase (ALT) 正常化率）、ウイルス学的効果（HBV-DNA 陰性化率、ウイルス学的無効の検討を行った。

4. 観察及び測定項目とその実施方法

検討項目は治療前並びに、治療開始後 1 年毎のタイミングで医療記録の収集を行った。腎機能は estimated glomerular filtration rate (eGFR) を用いて検討を行った。

eGFR 計算式 (単位 : mL/min/1.73 m²) : $194 \times \text{血清クレアチニン}^{-1.094} \times \text{年齢}^{-0.287} \times 0.739$ (女性の場合)

腎機能は eGFR を CKD Stage に基づきに分類した (表 1) 。また、ETV は添付文書に従い、腎機能に応じ投与用量を調整した (表 2) 。

表 1 . eGFR と CKD Stage 分類

CKD Stage	eGFR (mL/min/1.73 m ²)
G1	> 90
G2	60–89
G3	30–59
G4	15–29
G5	< 15

表 2 . 腎機能に応じた ETV の投与用量

Ccr (ml/min)	ETV 用量
>50	0.5mg を連日内服
30<Ccr<50	0.5mg を 2 日に 1 度内服
10<Ccr<30	0.5mg を 3 日に 1 度内服
Ccr <10 もしくは 透析	0.5 mg を 7 日に 1 度内服

5. 肝炎ウイルス検査、生化学検査測定

B 型肝炎ウイルス検査は、外注検査にて行った (SRL, Tokyo, Japan) 。HBs 抗原は Architect HBsAg-QT assay (chemiluminescence immunoassay :CLIA 法, Abbott Laboratory, Tokyo, Japan, 検出感度下限 0.05IU/mL) で、HBV-DNA は Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV test, v2.0 (real-time polymerase Chain Reaction: PCR 法, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan, 検出感度範囲 20-170,000,000 IU/mL, 2.1-9.0 log₁₀ copies/mL) で測定を行った。

血清 ALT 値を含む生化学検査は治療開始前と 1 年毎にデータを集計した。ALT 正常化は the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) criteria (男性 : 30 U/L、女性 : 19 U/L 以下) を用いて定義した。

6. 肝線維化予測式

肝線維化予測として FIB-4 index を使用した (Vallet-Pichard et al., 2007) 。FIB-4 index >3.25 を肝線維化進行例とした。

FIB-4 index 計算式 : $(\text{年齢} \times \text{AST}) / (\text{血小板数} \times \sqrt{\text{ALT}})$

7. 治療効果判定および観察項目

治療効果判定として治療開始前と治療開始 1 年毎に、ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率、HBs 抗原、eGFR、ウイルス学的無効について腎機能別に比較検討した。ウイルス学的無効については、Virological breakthrough と suboptimal virologic response について評価を行った。Virological breakthrough は HBV DNA 量が最低値より $1 \log_{10}$ copies/mL 以上上昇がみられた症例、suboptimal virologic response は ETV 治療開始 12 ヶ月以降でも HBV-DNA が $4 \log_{10}$ copies/mL 未満に低下がみられなかった症例と定義した。

8. 倫理的遵守事項

本研究は「ヘルシンキ宣言 (2013 年 10 月改定)」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」を遵守して実施され、あらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会の承認及び病院の許可を得て行われた (自主臨床研究番号：自 016-0387/0466) 。研究参加に対して書面による同意が得られた症例、または参加を辞退しなかった症例を対象とした。

9. 統計解析

統計解析には SPSS version 21.0 (IBM Japan, Tokyo, Japan) を用いた。HBs 抗原、eGFR の変化量については、paired T test を、カテゴリー変数の解析には χ^2 検定を使用し、連続変数の解析には Mann-Whitney の U 検定を使用した。いずれの検定においても、両側検定で、P 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意であると判断した。

結 果

患者背景

図 1 に示すように、今回参加施設において 2006 年から 2018 年に 567 症例が慢性 B 型肝炎に対し ETV で加療された。567 症例中、根治困難な悪性腫瘍症例、HCV、HIV の重複感染症例、臨床データが不十分、通院が 1 年以内であった全 294 症例を除外し、273 症例を解析対象とした。

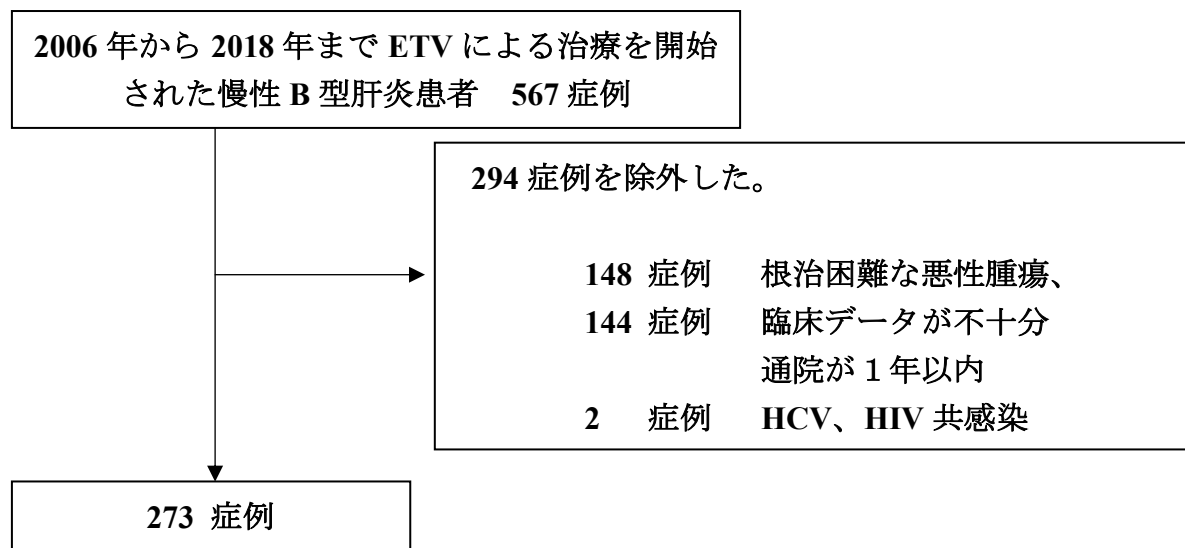


図 1 . Study Flow

全症例の患者背景

表 3 の患者背景に示すように、273 症例の年齢の中央値は 57 歳 (20-88 歳) で、全症例のうち 33 症例 (12.1%) が 70 歳以上であった。eGFR をそれぞれの CKD Stage 別にみると 273 例中、CKD Stage G1/2 が 233 症例 (85.3%)、G3 が 25 症例 (9.2%)、G4/5 が 5 症例 (1.8%)、透析が 10 症例 (3.7%) であった。線維化別にみると、全症例において FIB-4 index >3.25 の症例は 33.0% であった。また、全症例の観察期間中央値は 5 年 (1-10 年) であった。

表 3. 全症例ならびに、CKD Stage 別の患者背景

CKD stage		G1/2	G3	G4/5	HD
eGFR	All range	>60	30-59	<30	
Total number (%)	273	233 (85.3%)	25 (9.2%)	5 (1.8%)	10 (3.7%)
Age (years) ^a	57 (20-88)	56 (20-88)	65 (35-87)	58 (49-88)	61 (25-86)
Sex (male/female)	145/128	122/111	15/10	2/3	6/4
Baseline platelet count (×10 ⁴ /μL) ^a	16.5 (0.9-45.2)	16.4 (0.9-45.2)	17.1 (8.1-37.2)	24.6 (1.5-27.9)	11.8 (3.3-28.9)
Baseline AST level (IU/L) ^a	46 (10-2540)	49 (10-2540)	39 (13-604)	53 (30-80)	20 (12-254)
Baseline ALT level (IU/L) ^a	55 (5-2522)	57 (12-2522)	42 (9-544)	74 (26-159)	20 (5-266)
Alb (g/dl) ^a	4.1 (2.2-5.1)	4.1 (2.2-5.1)	4.2 (2.5-4.8)	5.1 (2.2-8.8)	4.1 (2.1-8.8)
Baseline Creatinine (mg/dl) ^a	0.70 (0.39-12.80)	0.69 (0.39-1.00)	0.99 (0.73-1.99)	1.71 (1.40-2.00)	8.30 (3.65-12.80)
eGFR (ml/min/1.73m ²) ^a	78.6 (3.5-166.0)	82.4 (60.6-166.0)	53.3 (30.6-59.8)	28.8 (24.0-29.8)	5.2 (3.5-11.8)
FIB-4 index ^a	2.38 (0.43-72.20)	2.35 (0.43-72.20)	2.89 (0.81-7.75)	1.65 (1.07-36.15)	2.79 (0.66-8.76)
FIB-4 index >3.25 n (%)	90 (33.0%)	79 (33.9%)	5 (20.0%)	1 (20.0%)	5 (50.0%)
Genotype (B/C/unknown)	46/137/90	36/121/76	7/9/9	3/4/3	3/4/3
HBs antigen (IU/ml) ^a	1220.0 (0.0-257000.0)	1361.0(0.0-257000.0)	679.4 (1.1-130950.0)	703.0 (3.2-36924.0)	703.0 (3.2-36924.0)
HBV-DNA (Log copies/ml) ^a	5.8 (2.1-9.1)	5.9 (2.1-9.1)	5.4 (2.1-8.1)	4.1 (2.1-8.8)	4.1 (2.1-8.8)
History of malignancy	68 (24.9%)	48 (20.6%)	7 (28.0%)	2 (20.0%)	2 (20.0%)
Follow up duration (year) ^a	5 (1-10)	6 (1-10)	4 (1-10)	5 (1-10)	1 (1-10)
Carrier/CH/LC	14/196/63	12/166/55	1/20/4	0/5/0	1/5/4

^a : 中央値 (最小値-最大値)

全症例ならびに、CKD Stage 別の治療成績

ETV 治療開始後 1 年毎にデータを収集し、それぞれ治療開始後 12 ヶ月、24 ヶ月、36 ヶ月における全症例および CKD Stage 別の ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率、ウイルス学的無効を表 4 に示した。治療開始 36 ヶ月後の ALT 正常化率は、全症例中 71.6%であり、CKD Stage 別にみると G1-2/G3/G4-5/HD でそれぞれ 69.0/84.2/100/100 (%)、治療開始 36 ヶ月後の HBV-DNA 陰性化率は全症例中 96.2%であり、CKD Stage 別にみると G1-2/G3/G4-5/HD でそれぞれ 96.1/100/75.0/100 (%) といずれの CKD Stage においても ETV 治療の高い効果を確認できた。また、どの CKD Stage においても 12 ヶ月、24 ヶ月、36 ヶ月と時間を追うごとに、ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率がともに上昇する傾向がみられた。ウイルス学的無効についても全症例中 2.5%と低い結果であった。

表 4. 全症例ならびに、CKD Stage 別の ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率、ウイルス学的無効

CKD stage	ALL range	G1/2	G3	G4/5	HD
Total number (%)	273	233 (85.3%)	25 (9.2%)	5 (1.8%)	10 (3.7%)
ALT normalization					
12 months n (%)	176/273 (64.5%)	146/233 (62.7%)	17/25 (68.0%)	4/5 (80.0%)	9/10 (90.0%)
24 months n (%)	156/234 (66.7%)	131/202 (64.9%)	17/23 (73.9%)	5/5 (100.0%)	3/4 (75.0%)
36 months n (%)	151/211 (71.6%)	127/184 (69.0%)	16/19 (84.2%)	4/4 (100.0%)	4/4 (100.0%)
HBV-DNA disappearance					
12 months n (%)	230/273 (84.2%)	196/233 (84.1%)	21/25 (84.0%)	3/5 (60.0%)	10/10 (100.0%)
24 months n (%)	218/234 (94.0%)	187/200 (93.5%)	23/23 (100.0%)	4/5 (80.0%)	4/4 (100.0%)
36 months n (%)	200/208 (96.2%)	174/181 (96.1%)	19/19 (100.0%)	3/4 (75.0%)	4/4 (100.0%)
Insufficient Virological response					
Total	7 (2.5%)	5 (2.1%)	1(4.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)
Virological breakthrough	5 (1.8%)	3 (1.3%)	1 (4.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)
Suboptimal response	2 (0.7%)	2 (0.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

ウイルス学的無効であった 7 症例

表 4 に示した通り、ウイルス学的無効は 7 症例に認めた。個々の症例については表 5 に示す通りである。うち 5 症例は virological breakthrough、2 症例は suboptimal response であった。Virological breakthrough の 4 症例のうち 3 症例 (75%) は、ETV に対し薬剤耐性を有している事を認めた。

表 5. ウイルス学的無効（Virological breakthrough または suboptimal response）であった 7 症例

Pt	Age	Sex		CKD Stage	eGFR	Previous Tx		Resistance Mutation	History of HCC	Duration (years)
1	32	F	CH	G1	92.7	LAM/Interferon	VB	L180M, M204V, M250V		4
2	71	F	LC	G2	73.8		VB	Undetectable	○	8
3	53	M	LC	G2	70.0		VB	L180M, M204V, S202S/G		6
4	36	M	CH	G2	86.2		SR	Undetectable		
5	45	M	CH	G2	68.0		SR	Undetectable		
6	57	M	LC	G3b	39.0		VB	No analyzing	○	5
7	54	M	CH	G4	28.8		VB	L180M, S202G		8

F: Female, M: Male, VB: Virological breakthrough, SR: suboptimal response

腎機能別にみた HBs 抗原の変化について

ETV 開始 1 年後と 5 年後の HBs 抗原の変化について全症例ならびに CKD Stage を G1/2 と G3/4/5/HD とに分け比較検討を行った。表 6 に示す通り、治療開始 1 年後に評価可能であった全 161 症例において、HBs 抗原は有意に低下した。CKD Stage G1/2 においても有意に低下を認め、CKD Stage G3/4/5/HD は低下の傾向を認めた。また、治療開始 5 年後に評価可能であった全 70 症例ならびに CKD Stage G1/2 で HBs 抗原の有意な低下を認め、CKD Stage G3/4/5/HD は低下の傾向を認めた。

表 6. 治療 1 年後（上段）と 5 年後（下段）の HBs 抗原の推移

	Baseline	1 yr	P value
ALL (n=161)	1411.0 (0.0-257000.0)	1240.0 (0.0-198480.0)	0.003
G1/2 (n=135)	1550.0 (257000.0)	1380.0 (0.0-198480.0)	0.014
G3/4/5/HD (n=26)	713.7 (0.6-130950.0)	534.0 (0.1-15077.0)	0.061
	Baseline	5 yrs	P value
ALL (n=70)	1958.0 (1.0-36924.0)	869.5 (0.1-26500.0)	0.003
G1/2 (n=61)	1916.0 (1.0-30475.0)	907.0 (0.1-26500.0)	0.009
G3/4/5/HD (n=9)	2000.0 (295.0-36924.0)	116.0 (0.1-10846.0)	0.155

中央値（最小値-最大値）

腎機能障害別 (CKD Stage G1/2 vs G3/4/5/HD) にみた患者背景と治療効果の比較

腎機能障害の有無による効果、患者背景を比較する為に CKD Stage G1/2 と CKD Stage G3/4/5/HD とに分け比較検討を行った。2 群の患者背景、治療開始 12 ヶ月後の効果は表 7 の通りである。患者年齢は CKD Stage G3/4/5/HD 群で有意に高く、ALT、AST 値、HBV-DNA 値は有意に低い結果であった。治療開始 12 ヶ月後の ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率、ウイルス学的無効症例については両群間で有意差は認められなかった。

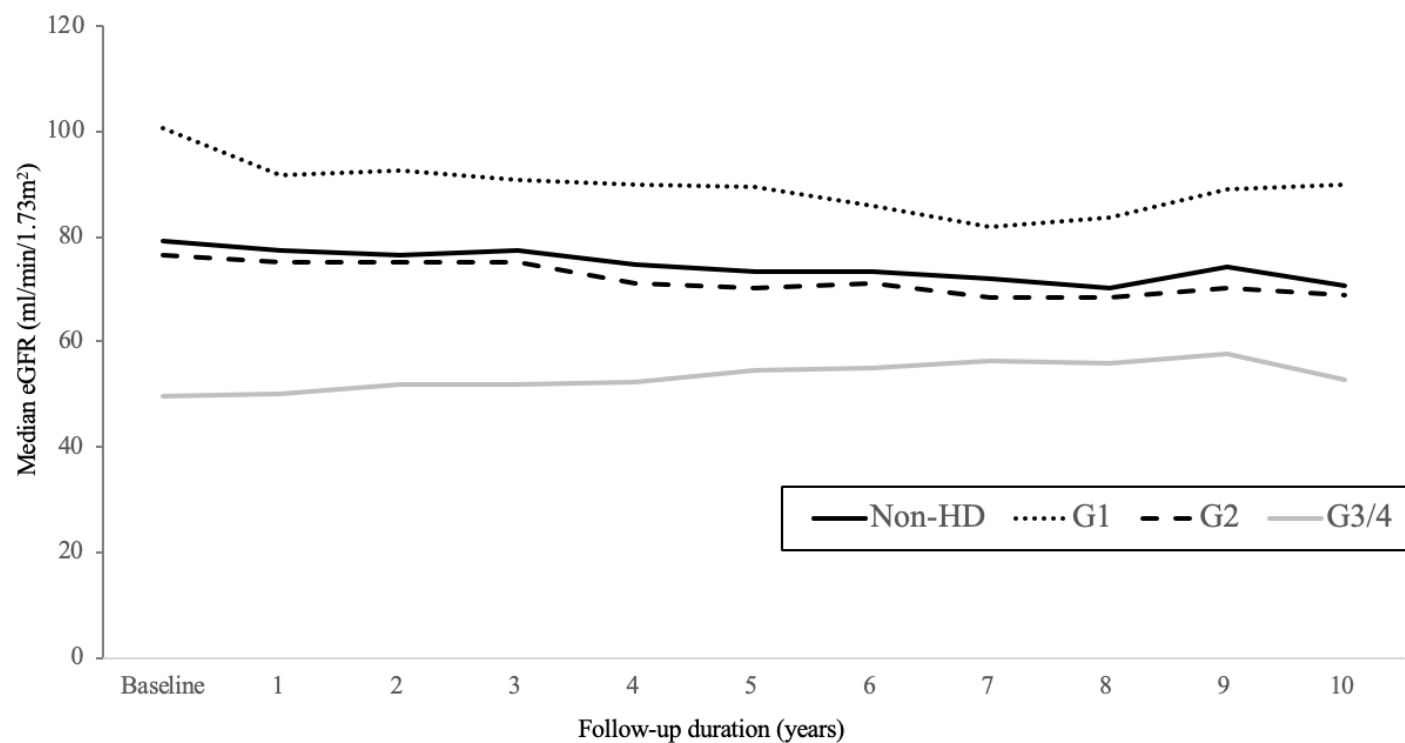
表 7. 腎機能障害別 (CKD Stage G1/2 vs G3/4/5/HD) にみた患者背景の比較

CKD stage	G1/2	G3/4/5/HD	
eGFR (ml/min/1.73m ²)	>60	≤60	
Total number (%)	233 (85.3%)	40 (14.7%)	P value
Baseline characteristics			
Age (years) ^a	56 (20-88)	64 (25-88)	P<0.001
Sex (male/female)	122/111	23/17	P=0.608
Baseline platelet count (×10 ⁴ /μL) ^a	16.4 (0.9-45.2)	17.0 (1.5-37.2)	P=0.456
Baseline AST level (IU/L) ^a	49 (10-2540)	33 (12-604)	P=0.004
Baseline ALT level (IU/L) ^a	57 (12-2522)	37 (5-544)	P=0.001
Baseline Creatinine (mg/dl) ^a	0.69 (0.39-1.00)	1.26 (0.73-12.80)	P<0.001
eGFR (ml/min/1.73m ²) ^a	82.4 (60.6-166.0)	46.2 (3.5-59.8)	P<0.001
HBs antigen (IU/ml) ^a	1361.0 (0.0-257000.0)	679.4 (0.6-130950.0)	P=0.166
HBV-DNA (Log copies/ml) ^a	5.9 (2.1-9.1)	5.1 (2.1-8.8)	P=0.015
Result			
ALT normalization (12 months n (%))	146/233 (62.7%)	30/40 (75.0%)	P=0.154
HBV-DNA disappearance (12 months n (%))	196/233 (84.1%)	34/40 (85.0%)	P>0.999
Insufficient Virological Response	5 (2.1%)	2 (5.0%)	P=0.273

^a: 中央値 (最小値-最大値)

非透析全症例と CKD Stage 別の ETV 治療による eGFR の変化について

追跡可能であった、非透析全症例 (Non-HD) と CKD Stage 別 (G1、G2、G3/4) の eGFR の推移を図 2 に示す。下段は追跡可能であった解析対象症例数を示している。非透析全症例ならびに CKD Stage G1 と G2 の eGFR は時間経過とともに緩やかに低下を認めたが、CKD Stage G3/4 については低下が認められなかった。



	Baseline	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Non-HD	263	263	230	207	184	163	131	113	88	61	37
G1	75	75	67	61	54	48	39	30	23	16	12
G2	158	158	135	123	111	100	83	74	57	40	20
G3/4	30	30	28	23	19	15	9	9	8	5	5

図2. 非透析全症例 (Non-HD) と CKD Stage 別の eGFR の推移 (上段) ならびに、解析対象症例数 (下段)

非透析全症例、CKD Stage G1 と G2 の eGFR は時間経過とともに緩やかに低下を認めたが、CKD Stage G3/4 については低下は認めなかった。

5年間経過を追跡可能であった全 163 症例で治療開始前と治療開始 5 年後の eGFR の変化を比較検討したものを表 8 に示す。非透析全症例 (Non-HD) ならびに CKD Stage G1、G2 において eGFR はいずれも有意な低下を認めた ($P<0.001$)。一方で、CKD Stage G3/4 においては、eGFR は開始前が 48.8 (mL/min/1.73 m²) であったのに対し治療開始 5 年後は 56.0 (mL/min/1.73 m²) であり、有意な低下は認められなかった ($P=0.184$)。

表 8. 非透析全症例と CKD Stage 別の ETV 治療による eGFR の変化

	Baseline	5 year	P value
Non-HD (n=163)	80.5 (24.0-166.0)	73.5 (16.8-130.0)	<0.001
G3/4 (n=15)	48.8 (24.0-59.2)	56.0 (23.1-66.7)	0.184
G1/2 (n=148)	82.9 (60.6-166.0)	74.8 (16.8-130.0)	<0.001
G1 (n=48)	97.6 (90.0-166.00)	89.6 (16.8-130.0)	<0.001
G2 (n=100)	76.1 (60.6-89.80)	70.1 (33.4-110.4)	<0.001

中央値 (最小値-最大値)

透析患者における ETV 治療の効果について

透析全 10 症例において ETV 治療の効果に対し検討を行った。各々の症例の詳細を表 9 に示す。10 症例中 6 症例は男性であった。ETV 導入の理由として、3 症例が肝硬変、2 症例が肝細胞癌発症、1 症例が慢性 B 型肝炎の急性発症、3 症例が腎移植待機、1 症例がステロイド開始における再活性化予防目的であった。全症例で ETV 治療開始 1 年後には HBV-DNA の陰性化がみられ、また全症例において投与継続が困難となる有害事象はみられなかった。

表 9. 透析全 10 症例の患者背景

Pt	Age	Sex	Basic kidney disease	Indications for HBV Tx	ETV dose (mg/week)	Baseline					1 year after ETV treatment	
						LC	HBsAg Status	HBsAg Levels (IU/ml)	HBV DNA Levels (Log copies/ml)	ETV Tx duration (yr)	HBV DNA Levels (Log copies/ml)	HBsAg Levels (IU/ml)
1	54	M	Diabetic nephropathy	LC	0.5	○	Positive	2077	4.8	1	Undetectable	1955
2	60	F	IgA nephropathy	Developing HCC	0.5		Negative	3760	5.4	10	Undetectable	4562
3	25	M	unknown	LC	0.5	○	Positive	-	3.8	9	Undetectable	-
4	86	M	unknown	Acute on chronic	0.5		Positive	36924	8.8	6	Undetectable	0.05
5	51	F	unknown	Developing HCC	0.5	○	Negative	703	3.5	7	Undetectable	513
6	69	F	IgA nephropathy	Waiting for KT	0.5		Negative	1329.24	4.3	1	Undetectable	1453.93
7	62	M	Renal abscess	Waiting for KT	0.5		Negative	64	4.9	1	Undetectable	53.21
8	61	M	Focal glomerulosclerosis	Waiting for KT	0.5		Negative	108	2.6	1	Undetectable	113.3
9	77	M	Polycystic kidney disease	LC	0.5	○	Negative	3.24	3.2	1	Undetectable	7.3
10	50	F	unknown	Preventing HBV re-activation	0.5		Negative	4.01	2.1	1	Undetectable	0.82

KT: Kidney transplantation

非透析症例と透析症例における患者背景と治療効果の比較

ETV は表 9 で示した通り透析症例においても良好な治療効果が明らかとなった。次に透析症例 (HD) と非透析症例 (non-HD) とで患者背景と治療効果について比較検討を行った。2 群の患者背景、治療開始 12 ヶ月後の効果は表 10 の通りである。透析症例群 (HD) において ALT、AST 値、HBV-DNA 値が有意に低い結果であった。治療開始 12 ヶ月後の ALT 正常化率、HBV-DNA 陰性化率、ウイルス学的無効症例については両群間で有意差は認められなかった。

表 10. 非透析症例と透析症例における患者背景と治療効果の比較

CKD stage	non-HD	HD	
Total number (%)	263 (96.3%)	10 (3.7%)	P value
Baseline characteristics			
Age (years) ^a	57 (20-88)	61 (25-86)	P=0.428
Sex (male/female)	139/124	6/4	P=0.754
Baseline platelet count (×10 ³) ^a	16.6 (0.9-45.2)	11.8 (3.3-28.9)	P=0.190
Baseline AST level (IU/L) ^a	47 (10-2540)	20 (12-254)	P<0.001
Baseline ALT level (IU/L) ^a	56 (9-2522)	20 (5-266)	P<0.001
Baseline Creatinine (mg/dl)	0.70 (0.39-2.00)	8.30 (3.65-12.80)	P<0.001
eGFR (ml/min/1.73m ²) ^a	79.4 (24.0-166.0)	5.2 (3.5-11.8)	P<0.001
HBs antigen (IU/ml)	1230.0 (0.0-257000.0)	703.0 (3.2-36924.0)	P=0.392
HBV-DNA (Log copies/ml) ^a	5.9 (2.1-9.1)	4.1 (2.1-8.8)	P=0.014
Result			
ALT normalization (12 months n (%))	167/263 (63.5%)	9/10 (90.0%)	P=0.102
HBV-DNA disappearance (12 months n (%))	220/263 (83.7%)	10/10 (100.0%)	P=0.371
Insufficient Virological Response	7 (2.6%)	0 (0.0%)	P>0.999

^a: 中央値 (最小値-最大値)

考 察

核酸アナログ製剤は高い ALT 正常化率と HBV-DNA 陰性化率が期待でき、かつ薬剤耐性の出現率は低く、現在多くの慢性 B 型肝炎患者に使用されている。しかしながら、核酸アナログ製剤内服により肝臓から HBV を排除する事はできず、ほぼ生涯内服継続を要する。その為に、長期的な使用による核酸アナログ製剤の有害事象が臨床上問題となる。日本肝臓学会、AASLD (アメリカ肝臓学会)、EASL (ヨーロッパ肝臓学会) は、慢性 B 型肝炎患者に対する核酸アナログ製剤の第一選択として ETV、TDF、TAF の使用を推奨している (Drafting Committee for Hepatitis Management and the Japan Society of Hepatology, 2014; European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the Liver, 2017; Terrault et al., 2018)。しかしながら、各々の核酸アナログの臨床治験において、腎機能低下症例、透析症例は検討対象から除外されている為に、その効果、安全性は十分に明らかとなっていない。TDF の長期投与は特に高齢者や、元来腎機能障害を有する患者においては有意に腎機能の低下を引き起こすといった報告があり使用に注意を要する (Gallant et al., 2005; Tsai et al., 2018)。近年登場した TAF は TDF と同様の治療効果が期待できる薬剤であるが eGFR が 15 mL/min/1.73 m² 未満の腎機能障害を有する症例および透析症例においては使用は推奨されていない。以上の点より実臨床において腎機能障害を有する慢性 B 型肝炎患者において ETV の使用が推奨されるが、特に高度腎機能障害および透析症例に対しての治療効果、安全性に関する検討は十分行われていない。

つい最近になり、ETV 治療の腎機能に及ぼす影響に関して報告された。Trinh ら (Trinh et al., 2018) は、TDF と ETV 治療開始前後の腎機能の推移を比較検討し、ETV は TDF と比べ eGFR が 60 mL/min/1.73 m² 未満の症例において腎機能が改善する事を示した。同様に、今回の検討では CKD Stage G3/4 において eGFR の低下は認められなかった (表 8)。Trinh らの検討では、観察期間中央値は 44 ヶ月で比較的長期間にわたり観察をされていたが、高度腎機能障害患者は含まれていなかった。

同様に、Wong ら (Wong et al., 2018) は、TDF、ETV 治療と無治療患者において治療開始前後の腎機能の推移を比較検討し報告している。Wong らは ETV 治療において無治療患者と比しても腎機能の変化に差はみとめなかったと報告した。ここでは、CKD Stage G3/4 の症例が 170 症例と比較的多く含まれていたが、観察期間中央値が 2.4 年と比較的短く、Trinh ら (Trinh et al., 2018) の検討と同様に透析患者は検討からは除外されている。また、Wong らと Trinh らの検討において、腎機能に応じた ETV の投与量は規定されておらず、ETV の腎機能に応じた用量を調整した上での治療効果、

安全性については明らかとはなっていなかった。

そこで、今回、透析症例を含めた高度腎機能障害を有する慢性 B 型肝炎患者に対する ETV 治療の効果、安全性に着目をし検討を行った。図 1、表 3 で示した通り、現在までの報告では最多となる透析症例 10 症例及び CKD Stage3/4 の 30 症例を含む全 273 症例を対象とし検討を行った。結果として、ETV は腎機能によらず、HBV-DNA 消失率、ALT 正常化率、ウイルス学的無効については同様の高い効果を示した。さらに、腎機能に応じ ETV の用量を調整したとしても、高い治療効果が期待できる事が初めて示された (表 7)。

ETV 開始後の腎機能の推移の検討では、腎機能が比較的良好な CKD Stage G1/2 の症例においては、治療開始前と比較し治療開始 5 年後の eGFR は有意に低下が認められた。一方、腎機能障害を有する CKD Stage G3/4 の症例においては eGFR の低下は認められなかった (図 2、表 8)。本検討の全症例の治療開始前の年齢中央値は既報 (Trinh et al., 2018; Wong et al., 2018) と比較し高く、加齢に伴う腎機能の低下が一因として考察される (Walker et al., 1992)。ただ CKD Stage G3/4 は CKD Stage G1/2 と比べ年齢中央値が高いといった背景があるにも関わらず、腎機能の低下がみられなかった事は非常に興味深い結果である。それゆえ、慢性 B 型肝炎患者に対する ETV 治療は腎機能障害を有する症例に対し、腎機能の改善といった良い影響を及ぼす可能性が示唆された。一因として腎機能低下がみられた症例には元来 HBV 関連腎症を有し、ETV により HBV の活動性が抑えられ結果として腎機能が改善した事が推察される。しかし、レトロスペクティブな検討ゆえ ETV 開始前に腎生検を行った症例はごくわずかにとどまり、HBV 関連腎症との関連性は不明である。今後、腎機能障害を有する症例に対し腎生検を行った上でのより詳細な検討が求められる。

肝機能の上昇がみられない HBV 感染を有する透析患者に対する核酸アナログ製剤の投与が、予後を改善させるとのエビデンスは乏しい (European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the Liver, 2017)。現在の所、HBV 感染を有する透析患者の核酸アナログ製剤開始の適応は、腎移植待機、肝硬変症例、肝発癌に限られている。今回検討した透析 10 症例は、主に肝発癌、肝硬変、腎移植待機を機に ETV の投与を開始された。しかしながら、透析症例に対する核酸アナログ製剤治療の検討は限られており、多くは現在第一選択薬としては推奨されていないラミブジン治療に関する報告である (Fabrizi et al., 2010)。現状として、透析症例における ETV 治療の効果、安全性を検討した報告は極めて限られている。Ezequiel ら (Ezequiel Ridruejo, 2010) は、透析症例 7 症例における ETV 治療の効果について検討を行ったが、1 年以上観察が行われていた症例は 5 症例のみに限られていた。今回の検討では透析 10 症例と非透析 263 症例と比較し ETV は同程度の治療効果を示す事が明らかになった (表 9、表 10)。

以上をまとめると、今回、観察期間中央値が 5 年と既報と比べ長期にわたり検討を行う事ができた。さらに、腎機能に基づき ETV の用量を調整したとしても良好な治療効果が期待できる事を初めて示した。また、NORTE study group は本邦における C 型肝炎を有する透析症例へ有効性、安全性のエビデンスを報告してきた。その中で、多くの HBV 感染を有する透析患者を集積し、10 症例といった今まで最多の症例において検討を行う事ができた。

本検討の limitation は、後方視的検討であり、HBV 関連腎症の有無、ETV 開始前の HBV の耐性変異の検討といった臨床データを収集できていない事である。そして、腎機能障害別にみた治療開始前の年齢、ALT 値、HBV-DNA 量といった患者背景に差異があり、それらが治療開始後の比較検討に影響を及ぼしている可能性が否定する事ができない。また、今回、既報と比べ長期にわたり検討を行う事ができたが、核酸アナログ製剤の内服はほぼ一生にわたるため、より長期にかつより大多数の症例における前方視的な検討が今後必要であると考えられる。

結論として、本検討により透析症例および高度腎障害を有する慢性 B 型肝炎患者における ETV 治療は、高い効果を有する事が明らかにされた。

《第二章》

慢性B型肝炎患者における核酸アナログ製剤が脂質代謝に与える影響の検討

緒 言

近年、HBV キャリアの高齢化により、糖尿病、脂質異常症、高血圧、腎障害などの併存症を有する症例が増加しており (Liu et al., 2018)、併存例においてはHBV 関連肝臓病が高率に発症する事が報告された (Yu et al., 2017)。

一方で、核酸アナログ製剤が脂質代謝に与える影響については、近年いくつかの報告がされつつある。HBV 感染者に対する TDF 治療は、ETV 治療と比べ血中の T-chol、LDL-c、HDL-c を有意に低下させると報告された (Shaheen et al., 2017)。さらに、HIV 感染者に対し TDF を有するレジメン (TDF/FTC) の使用により、HBV 感染者への TDF 治療と同様に T-chol、LDL-c、HDL-c が有意に低下した事が示された (Santos et al., 2015)。しかし、HBV 感染者、HIV 感染者を対象とした TDF 治療の脂質変化に対するいずれの検討においても LDL-c とともに HDL-c の低下がみられており、TDF 治療の動脈硬化進展に与える影響については現時点では明らかになっていない。つい最近になり TDF を有するレジメンの使用歴のある、もしくは現時点で使用されている HIV 感染者において、TDF を一度も使用されていない患者と比べ、心不全の発症が有意に低い事が示された (Chen et al., 2017)。同論文では、一因として TDF 治療による脂質代謝の変化が心不全の発症を抑制した事が考察された。さらに重要な事として、最近になり慢性 B 型肝炎患者に対する TDF 治療は ETV 治療と比較し肝臓病を有意に抑制する可能性が複数報告された (Lim and Ko, 2019)。以上の事をまとめると、核酸アナログ製剤により脂質代謝への影響が異なる可能性が示唆され、それらが心不全発症、肝臓病へも影響している可能性が考えられた。しかし、それらに対する詳細な解析や、脂質代謝への影響の機序は現時点では不明である。

そこで、今回慢性 B 型肝炎患者に対する核酸アナログ製剤が脂質代謝に与える影響とその機序について検討を行う事とした。

方 法

臨床検体を用いた検討

1. 研究の種類・デザイン

多施設後ろ向き観察研究

2. 対象となる患者

対象者のうち、以下の選択基準 (1) をすべて満たし、かつ除外基準 (2) のいずれにも該当しない場合を適格とした。

(1) 選択基準

- ①2005 年 1 月から 2017 年 8 月までに北海道大学病院、市立函館病院、JCHO 北海道病院にて、HBV 感染症による慢性肝炎及び肝硬変症に対して ETV もしくは、TDF による治療が行われた患者
- ②研究目的の使用に対し承諾を得た上で血清が保存されている患者
- ③本研究への参加について自由意思による同意が得られた患者、もしくは研究の参加について拒否しない患者
- ④治療開始時の年齢が 20 才以上で少なくとも 6～12 ヶ月外来もしくは入院で経過をみられていた患者
- ⑤適切な臨床情報を有する患者

(2) 除外基準

- ①HIV、HCV の共感染を有する患者
- ②自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、原発性硬化性胆管炎を既往に有する患者
- ③根治困難な肝細胞癌を含めた悪性腫瘍を有する患者
- ④重度の心疾患 (心筋梗塞、心不全、不整脈等) に罹患している患者
- ⑤糖尿病、脂質異常症を既往に有し、内服加療を受けている患者

3. 検討項目

2005 年 1 月から 2017 年 8 月までに北海道大学病院、市立函館病院、JCHO 北海道病院にて HBV 感染症による慢性肝炎及び肝硬変症に対し ETV もしくは TDF による治療を開始された患者を対象とした。治療開始前と治療開始 6～12 ヶ月後の 2 点における血液中の脂質変化 (HDL-c、T-chol、LDL-c、non-HDL-c、酸化 LDL) 及びウイルス

ス学的効果 (HBV-DNA、HBs 抗原、HBcr 抗体) について検討を行った。酸化 LDL (Aviram, 1996) 、 non HDL-c (Packard and Saito, 2004) は動脈硬化の進展ならびに心血管疾患発症に強い関連性が示されている。なお non HDL-c は (T-chol - HDL-c) で計算される。

4. 観察及び測定項目とその実施方法

検討項目は ETV もしくは TDF による治療開始前と治療開始 6～12 ヶ月後の 2 点において医療記録もしくは保存血清より収集、測定を行った。酸化 LDL については全症例、保存血清より測定を行った。

5. 肝炎ウイルス検査、生化学検査測定

B 型肝炎ウイルス検査は外注検査にて行った (SRL, Tokyo, Japan) 。HBs 抗原は Architect HBsAg-QT assay (chemiluminescence immunoassay: CLIA 法, Abbott Laboratory, Tokyo, Japan, 検出感度下限 0.05 IU/mL) で、HBV-DNA は Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV test,v2.0 (real-time polymerase Chain Reaction: PCR 法, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan, 検出感度範囲 20-170,000,000 IU/mL, 2.1-9.0 log₁₀ copies/mL) で、HBcr 抗原は、Lumipulse HBcrAg (chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA 法, Fujirebio, Tokyo, Japan, 正常値 2.9 Log U/mL 以下) で測定を行った。

6. 観察項目

治療開始前と治療開始 6～12 ヶ月後の 2 点における、通常採血を含む臨床データ、HDL-c、T-chol、LDL-c、酸化 LDL、non HDL-c、HBV-DNA、HBs 抗原、HBcr 抗原を医療記録もしくは保存血清より収集、測定し比較検討を行った。

7. 倫理的遵守事項

本研究は「ヘルシンキ宣言 (2013 年 10 月改定)」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」を遵守して実施され、あらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会の承認及び病院長の許可を得て行われた (自主臨床研究番号：自 016-0387) 。

研究参加に際しては書面による同意が得られた症例または、参加を辞退しなかった患者を対象とした。

8. 統計解析

統計解析には SPSS version 21.0 (IBM Japan, Tokyo, Japan) を用いた。T-chol、LDL-c、

HDL-c、酸化 LDL、non HDL-c、HBs 抗原、HBcr 抗原、HBV-DNA の変化量については、paired T test を、カテゴリー変数の解析には χ^2 検定を使用し、連続変数の解析には Mann-Whitney の U 検定を使用した。いずれの検定においても、両側検定で、P 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意であると判断した。

培養細胞を用いた in vitro での検討

1. 細胞培養

培養肝細胞株として、ヒト肝芽腫由来細胞株である HepG2 細胞を、また培養筋細胞株としてヒト横紋筋腫由来細胞株である RD 細胞を使用した。HepG2 細胞は 10%の牛胎児血清と 1%のストレプトマイシンを溶解した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地に用いて培養を行った。RD 細胞は 10%の牛胎児血清と 1%のストレプトマイシンを溶解した Eagle's minimum essential medium を培地に用いて培養を行った。それぞれの細胞を 6 well プレートに 4×10^5 個播種し、24 時間培養後コントロールとして Dimethyl sulfoxide (DMSO)、TDF 5 μ M もしくは 50 μ M、ETV 0.25 μ M を投与した培養上清に交換した。5 もしくは 7 日間培養後に培養上清中の脂質及び細胞の脂質代謝調整因子に関して検討を行った (詳細は以下の方法 2~7 の通りである。)。ETV と TDF は MedChemExpress (Monmouth, Junction, NJ, USA) より購入した。ETV と TDF の濃度は慢性 B 型肝炎患者における経口投与後の血中濃度より定められたものを用いた (Murata et al., 2018)。

2. 培養上清中の脂質の測定

上記の (1. 細胞培養) に記載した細胞培養方法に準じ、HepG2 細胞を 6 well プレートに 4×10^5 個播種し、24 時間培養を行った。その後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し、0.1% (重量/体積) の Bovine serum albumin (BSA) を溶解した DMEM に培養上清を交換した。また、交換した培養上清には、予めコントロールとして DMSO 及び TDF 5 μ M、50 μ M、ETV 0.25 μ M を投与しておいたものを使用した。5 日間培養後に回収した培養上清に対し、15,000 $\times$ g の速度で 5 分間遠心分離を行い、さらにその上清を回収し脂質の測定を行った。今回、HepG2 細胞に CD36 の siRNA を導入し knock-down 後の培養上清の検討を行ったが、siRNA の導入については以下の (5. CD36 および PPAR α の small interfering RNA (siRNA) による knock-down) 記載の方法に準じ行った。培養上清中の脂質はゲル濾過高速液体クロマトグラフィーによる粒子サイズに基づいた分離と酵素法によるオンライン脂質検出を組み合わせた方法 (LipoSEARCH[®]: Skylight Biotech, Akita, Japan) により測定を行った。LipoSEARCH[®] の方法を述べる。培養上清に含まれる脂質はゲル濾過 HPLC カラムにより粒子サイズに従い順次溶出される。カラムからの溶出液は中性脂肪の酵素反応ラインとコレステロールの酵素反応ラインに二分され、それぞれの反応コイル内で酵素反応を経て連続的に 550 nm の吸光度として記録される。得られたクロマトグラムデータを特許アルゴリズムにより解析を行い、培養上清中の T-chol、HDL-c、LDL-c の濃度を測定した。

3. ウェスタンブロット法

培養後に回収した細胞は界面活性剤を含んだタンパク質抽出用の緩衝液を用いてホモジナイズし、蛋白抽出を行った。調整した蛋白サンプルを 20 μ g ずつドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて分離し、フッ化ポリビニリデンのメンブレンにトランスファーした。それらのメンブレンをそれぞれの一次抗体を溶解した wash buffer につけ一晩 4°C で培養した (それぞれ使用した抗体の製品名、製品番号、製造会社は以下の表 1 1 に示す)。その後、メンブレンに 2 次抗体としてオルオキシダーゼ標識抗体を添加し、ウェスタンブロット解析システム (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を使用し化学発光させバンドを検出した。

表 1 1. 使用した一次抗体の製品名、製品番号、製造会社

β actin	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
CD36	D8L9T	CELL Signaling technology, CO, Denver, USA
CPT-1	ab128568	Abcam, Cambridge, UK
SR-B I	ab52629	Abcam, Cambridge, UK
LDLR	ab52818	Abcam, Cambridge, UK
L-FABP	GTX109142	Genetech, South San Francisco, IL, USA
CD36 (マウス)	18836-1-AP	Proteintech, Rosemont, IL, CA, USA

4. RNA 分離および定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)

HepG2 細胞の total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し抽出した。リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した細胞を、Buffer RLT を用いて破碎後に回収した。回収した細胞を QI shredder を用いてホモジナイズした。得られた細胞溶解液と同量の 70% エタノールを加え RNeasy スピнкаラムにアプライし 8000 $\times$ g で 15 秒遠心操作を行なった。その後 RNeasy スピнкаラムに Buffer RPE を添加し再度遠心操作を行った。最終的に RNeasy スピнкаラムに RNA フリー水を 40 μ l 加え遠心操作し、RNA を抽出し定量を行った。得られた RNA は Quanti Tect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を使用し、cDNA に逆転写を行った。qRT-PCR 法として、1 μ l の cDNA と 12.5 μ l の Platinum SYBR Green PCR Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含む 25 μ l の混合物を使用して増幅を行った。95°C で 2 分間の初期変性の後、7700 シーケンス検出器 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で 40 サイクルの 2 段階のサイクル手順 (95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間のアニーリングと伸長) にて行った。遺伝子発現レベルは、同じサンプルから増幅した β アクチンの mRNA をコントロールとして $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて解析した。またそれらで得られたデータは、Sequence Detection System

software (Applied Biosystems) を用いて解析した。各々のプライマーの配列は表 1 2 に示す。

表 1 2. 使用したプライマーの配列

	Forward	Reverse
β actin	TTGCCGACAGGATGCAGAA	GCCGATCCACACGGAGTACT
CD36	TGGAACAGAGGCTGACAACCTT	TTGATTTTGATAGATATGGGATGC
PPAR α	ATGGTGGACACGGAAAGC	TTAATCGTCCTCTACGAC
CPT-1	CTGTGCGCCCCCTTGTTGGATG	GGGCTGCCTGCACGTCTGTATT
L-FABP	ATGAGTTTCTCCGGCAAGTAC	TCCTTCCCCTTCTGGATGAGC
DGAT1	GCGGCTGTGGTCTTACTG	CTGCGGCACCATGAGTT
DGAT2	GGTCCTGTCCTTCCTTGT	AGTTGCCTGCCAGTGTAG

5. CD36 および PPAR α の small interfering RNA (siRNA) による knock-down

CD36 の 2 種類の siRNA (siRNA① ; SI02622886, siRNA② ; SI03065195, GeneSolution siRNA, QIAGEN) と PPAR α の siRNA (13702583, Stealth RNAi, Invitrogen Life Technologies) を使用した。siRNA を 6well plate に細胞数が 3×10^5 となるよう播種した HepG2 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養を行った。以上の過程により、siRNA がトランスフェクションされた HepG2 細胞を得る事ができる。いずれも RT-PCR にて Control siRNA をトランスフェクションしたものと比較し、目的の遺伝子が knock-down されている事を確認した。

6. ルシフェラーゼアッセイ

HepG2 細胞を 96well プレートに 1.2×10^4 個播種し、1 晩培養を行った。それぞれの well に 100 ng の PPAR 応答配列下流にレポーター遺伝子が導入された PPAR plasmid DNA (Signal PPAR Reporter (luc) Kit 336841 CCS-3026L QIAGEN) もしくは LXR 応答配列下流にレポーター遺伝子が導入された LXR plasmid DNA (Signal LXR Reporter (luc) Kit 336841 CCS-0041L QIAGEN) と 0.5 μ l の Lipofectamine[®] LTX (15338100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を加え、24 時間培養した。以上の過程によりそれぞれの応答配列下流にレポーター遺伝子を持った plasmid DNA がトランスフェクションされた HepG2 細胞を得る事ができる。その後予め DMSO、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M を投与しておいた培養上清に交換し、48 時間培養後それらの細胞に対するルシフェラーゼ活性を Dual Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、Luminometer (GloMax-Multi Detection System, Promega) により測定を行った。

PPAR family (PPAR (human) Reporter Assays Panel (#IB00131-32P, INDIGO biosciences, State Collage, PA, USA)) と PXR (Pregnane X (human) Receptor Assay Kit (No. 17528, INDIGO biosciences, State Collage, PA, USA)) については哺乳類の細胞に PPAR family もしくは PXR の応答配列下流にレポーター遺伝子を導入された Reporter 細胞を使用した。Reporter 細胞を Recovery medium に投入し 96well plate に 100 μ l ずつ分注し、4 時間培養を行った。次に、TDF 50 μ M、5 μ M、ETV 0.25 μ M、DMSO を Compound Screening Medium に希釈し、Reporter 細胞を有した 96well plate に 100 μ l ずつ分注し、24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

7. フローサイトメトリー

HepG2 細胞と RD 細胞は 6well プレートに 4×10^5 個播種し、24 時間培養後に、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M を含む培養上清に交換し、5 もしくは 7 日間培養した。回収した細胞を $2 \sim 3 \times 10^5$ 個/100 μ l の濃度になるように 1 $\times$ FACS buffer に再懸濁し、セルストレイナーを通過させた後、100 μ l ずつ測定チューブに分注した。CD36 の抗体 (561821, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) は 2.5 μ l ずつ (50 倍希釈) 各チューブに入れ、氷上、暗所で 30 分培養した後に、洗浄操作を 2 回行い、最終的に 1 $\times$ FACS buffer 500 μ l に再懸濁してフローサイトメーター (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) により、解析および目的細胞の分離を行った。なお死細胞は 7-Amino-Actinomycin D の取り込みを指標に除外した。

動物を用いた in vivo での検討

1. 動物実験

日本 SLC 社より購入した 4 週齢の雄 C57B6/J マウスを実験対象動物として使用した。それぞれ滅菌水道水と通常食を制限なく与え、マイクロアイソレーターケージにて飼育を行った。なお、本検討で行われた動物実験は動物実験施設ならびに北海道大学の利用指針に基づき事前に承認を得た上で行った（動物実験計画書承認番号：18-0162）。

2. 研究デザイン

4 週齢の雄 C57B6/J マウス 6 匹を無作為に 2 匹ずつ、コントロール群、TDF 投与群、ETV 投与群に分けた。TDF (Gilead Sciences, Foster City, CA, USA)、ETV (Takata pharmaceutical, Saitama, Japan) は 1 回の投与量つき 0.5ml の滅菌水道水に溶解し、ゾンデを用いて連日胃内に投与した。投与用量として TDF は体重 1 kg あたり 100mg、ETV は体重 1 kg あたり 0.1mg と定めた。なお、それぞれの投与用量は HBV 感染マウスに対し TDF、ETV の HBV 抑制効果を検討した実験を参考 (Julander et al., 2003; Murakami et al., 2016) にした。またコントロール群においても 0.5ml の滅菌水道水を連日胃内に投与した。全 6 匹のマウスは 9 週飼育後に、十分な腹腔内麻酔のもとサクリファイスを行い、心臓、肝臓を採取した。

3. ウエスタンブロット法

心筋、肝組織は界面活性剤を含んだタンパク質抽出用の緩衝液を用いてホモジナイズを行い、抽出された蛋白を使用した。使用した 1 次抗体は、表 1 1 に示す通りである。

研究結果

臨床検体を用いた検討

患者背景

図3に示すように、今回参加施設において2005年から2017年に519症例が慢性B型肝炎に対しETVもしくはTDFで加療された。519症例のうち、根治困難な悪性腫瘍症例、早期死亡症例、糖尿病または脂質異常症に対する内服治療中の症例、臨床データが不十分であった401症例を除外した118症例が解析対象 (TDF 群/ETV 群 : 58/60例) となった。さらに118症例をT-chol、LDL-c、HDL-c およびHBV-DNA 量で propensity score matching を行い、TDF 36 症例、ETV 36 症例で解析を行った。

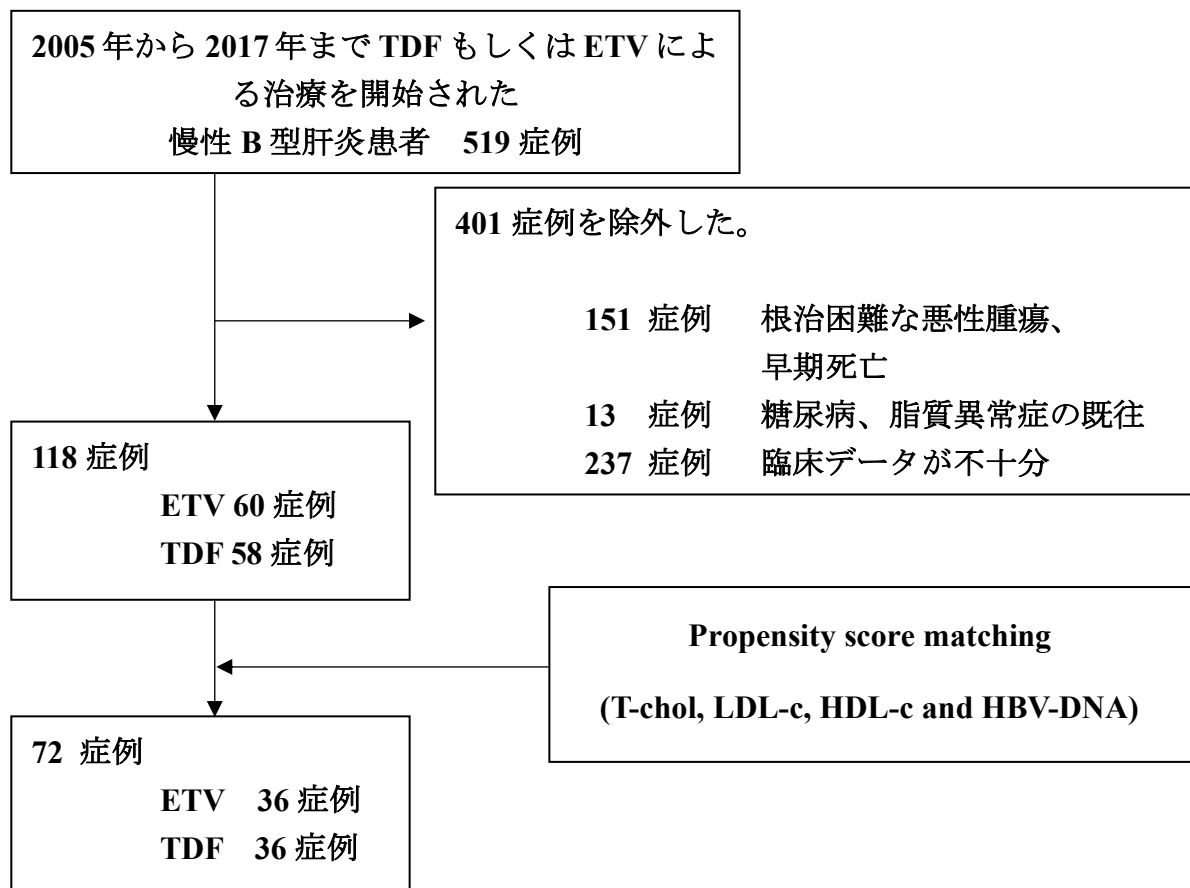


図3. Study flow

患者背景は表 1 3 に示す。全 72 症例の年齢平均値は 58 ± 13 歳で、12 症例 (16.7%) が 70 歳以上であった。TDF 群は ETV 群と比べほぼ、同様の患者背景にマッチされたが、AST、FIB-4 index が有意に低値であった。

表 1 3. 全患者および ETV、TDF 別の患者背景

	All range	ETV	TDF	
Total number	72	36	36	P value
Age (years) ^a	58 ± 13	59 ± 12	56 ± 13	0.427
Age (years) >70 n (%)	12 (16.7%)	8 (22.2%)	4 (11.1%)	0.343
Sex (male/female)	44/28	19/17	25/11	0.226
Chronic hepatitis/Liver cirrhosis	62/10	30/6	32/4	0.735
Baseline platelet count (×10 ⁴ /μL) ^a	17.8 ± 6.3	16.9 ± 6.0	18.7 ± 6.4	0.132
Baseline AST level (IU/L) ^a	61 ± 64	76 ± 82	45 ± 30	0.011
Baseline ALT level (IU/L) ^a	89 ± 135	118 ± 177	61 ± 61	0.053
Alb (g/dl)	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3	0.057
Baseline AFP (ng/ml)	5.5 ± 5.4	7.4 ± 6.6	3.8 ± 2.8	0.458
Baseline Creatinine (mg/dl)	0.80 ± 0.29	0.74 ± 0.18	0.86 ± 0.35	0.248
eGFR (ml/min/1.73m ²) ^a	79.6 ± 20.9	81.8 ± 18.8	77.4 ± 22.4	0.421
FIB-4 index ^a	2.97 ± 4.14	3.28 ± 4.13	2.66 ± 4.13	0.016
FIB-4 index >3.25 n (%)	15 (20.8%)	9 (26.0%)	6 (16.7%)	0.562
Genotype (B/C/unknown)	12/47/13	6/20/10	6/27/3	0.749
HBs antigen (IU/ml)	17025.6 ± 36769.8	6893.0 ± 10626.7	24476.0 ± 46174.5	0.905
HBe Antigen positive (%)	31.9	25.7	38.2	0.443
HBV-DNA (Log copies/ml)	5.7 ± 2.1	5.9 ± 1.7	5.6 ± 2.5	0.785
HBcrAg (LogU/ml)	4.9 ± 1.6	4.7 ± 1.5	5.1 ± 1.6	0.396
Baseline lipid profile				
T-chol (mg/dl)	187 ± 36	188 ± 37	186 ± 34	0.846
HDL-c (mg/dl)	75 ± 29	78 ± 35	72 ± 22	0.481
LDL-c (mg/dl)	86 ± 29	84 ± 31	89 ± 28	0.461
Oxidized LDL (U/L)	125 ± 50	134 ± 49	119 ± 50	0.243
Non HDL-c	112 ± 34	110 ± 34	114 ± 34	0.842

^a : 平均値 ± 標準偏差

Oxidized LDL : 酸化 LDL

血清脂質の変化

治療開始前と治療開始 6～12 ヶ月後での脂質の変化を表 1 4 に示す。ETV 群は、T-chol、HDL-c、LDL-c、酸化 LDL、non HDL-c いずれも変化は認めなかったが、TDF 群における治療開始前と治療後 6～12 ヶ月後の変化は、T-chol (以下平均値；治療前/後) が 186/164 mg/dl ($P<0.001$)、HDL-c が 72/60 mg/dl ($P<0.001$) と有意に低下を認めた。また、LDL-c が 89/83 mg/dl と低下の傾向を認めた ($P=0.161$)。さらに重要な事として動脈硬化と強く関連する酸化 LDL は 119/101 U/L ($P=0.022$)、non HDL-c は 114/104 mg/dl ($P=0.041$) と有意に低下を認めた。

表 1 4. 脂質の変化

ETV	Baseline	6-12 months	P value
T-chol (mg/dl)	188 ± 37	194 ± 38	0.281
HDL-c (mg/dl)	78 ± 35	80 ± 31	0.739
LDL-c (mg/dl)	84 ± 31	91 ± 31	0.127
Oxidized LDL (U/L)	134 ± 49	125 ± 43	0.449
Non HDL-c (mg/dl)	110 ± 34	114 ± 41	0.544

TDF	Baseline	6-12 months	P value
T-chol (mg/dl)	186 ± 34	164 ± 33	<0.001
HDL-c (mg/dl)	72 ± 22	60 ± 19	<0.001
LDL-c (mg/dl)	89 ± 28	83 ± 29	0.161
Oxidized LDL (U/L)	119 ± 50	101 ± 36	0.022
Non HDL-c (mg/dl)	114 ± 34	104 ± 30	0.041

平均値 ± 標準偏差

抗 HBV 作用

治療開始前と治療開始 6～12 ヶ月後での HBsAg、HBV-DNA、HBcrAg の変化を表 1 5 に示す。全症例ならびに、ETV、TDF いずれも有意に低下もしくは低下の傾向がみられた。

表 1 5. B 型肝炎ウイルスマーカーの変化

ALL	Baseline	6-12 months	P value
HBs antigen (IU/ml)	17025.6 ± 36769.8	8010.2 ± 18767.5	0.006
HBV-DNA (Log copies/ml)	5.7 ± 2.1	2.4 ± 0.7	<0.001
HBcrAg (LogU/ml)	4.9 ± 1.6	4.5 ± 1.4	<0.001
ETV	Baseline	6-12 months	P value
HBs antigen (IU/ml)	6893.0 ± 10626.7	3924.6 ± 5784.5	0.064
HBV-DNA (Log copies/ml)	5.9 ± 1.7	2.4 ± 0.6	<0.001
HBcrAg (LogU/ml)	4.7 ± 1.5	4.0 ± 1.2	0.003
TDF	Baseline	6-12 months	P value
HBs antigen (IU/ml)	24476.0 ± 46174.5	10928.5 ± 23652.9	0.016
HBV-DNA (Log copies/ml)	5.6 ± 2.5	2.4 ± 0.7	<0.001
HBcrAg (LogU/ml)	5.1 ± 1.6	4.8 ± 1.5	0.009

平均値 ± 標準偏差

以上より、TDF 治療により T-chol、HDL-c が有意に低下し、LDL-c が低下する傾向を認めた。さらに、TDF 治療により動脈硬化進展と関連のある酸化 LDL と non HDL-c が有意に低下する事が明らかとなった。

培養細胞を用いた in vitro での機序の検討

次に、核酸アナログ製剤の脂質代謝への影響に対する機序を解明するために、培養細胞を用いて in vitro の検討を行った。

HepG2 細胞に対し TDF、ETV 投与後の培養上清中の脂質の変化

HepG2 細胞の培養上清にコントロールとして DMSO 及び TDF 5 μ M、50 μ M、ETV 0.25 μ M を投与し 5 日間培養後の培養上清中の脂質の変化を検討した。図 4 に示す通り、DMSO 投与群と比較し、TDF 5 μ M、50 μ M 群いずれにおいても T-chol、LDL-c、HDL-c の有意な低下を認め ($P<0.01$)、臨床データ (表 1 4) と同様の結果が再現された。また、ETV 0.25 μ M 群においては DMSO 投与群と比較し HDL-c については有意な低下を認めた ($P<0.01$) が、TDF 群と比較し低下はわずかであった。T-chol、LDL-c の変化は認めなかった。

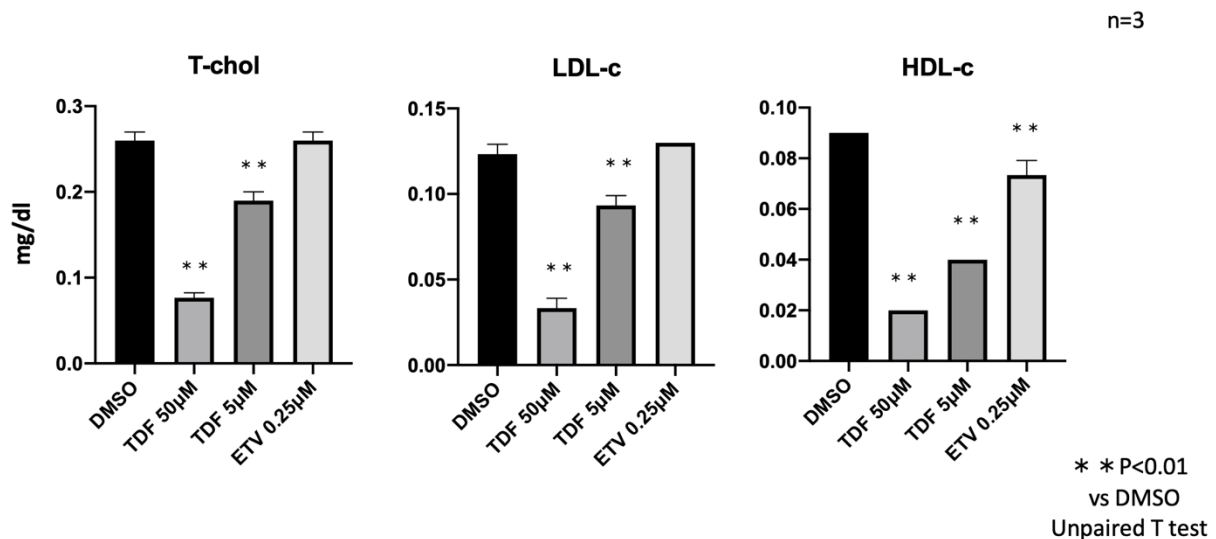


図 4. HepG2 細胞に対し TDF、ETV 投与後の培養上清中の脂質の変化

TDF の投与で培養上清中の T-chol、LDL-c、HDL-c の低下を認めた。

HepG2 細胞に対し TDF、ETV 投与後の脂質の取り込みに関連する受容体の変化

HepG2 細胞の培養上清に DMSO、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M を投与し、5 もしくは 7 日間培養後に細胞を回収し、脂質の取り込みに関連のある受容体 (SR-B I、LDLR、CD36) の抗体を用いてウェスタンブロット法にて蛋白発現の変化を検討した。結果を図 5 A に示す。LDL-c の受容体である LDL-R、HDL-c の受容体である SR-B I は明らかな変化は認められなかったが、CD36 の蛋白発現上昇が TDF 50 μ M 投与群のみで確認できた。また、同条件で培養した細胞に対し CD36 の抗体を用いてフローサイトメ

トリーにて解析を行った所、TDF を投与した細胞において CD36 陽性細胞の増加が確認された (図 5 B)。

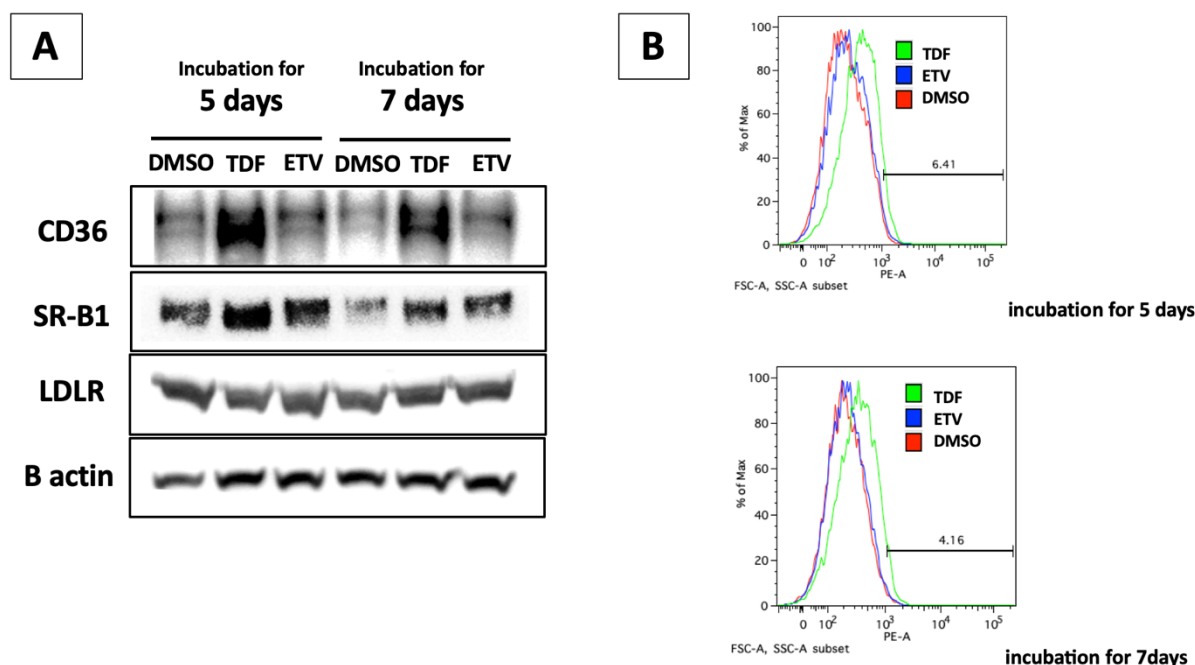


図 5. HepG2 細胞に対し TDF、ETV 投与後の脂質の取り込みに関連する受容体の変化

A : TDF、ETV 投与後のウェスタンブロット法での脂質の取り込みに関連する蛋白発現の解析

B : CD36 抗体を用いたフローサイトメトリーの結果

TDF の投与で CD36 蛋白発現の上昇および細胞表面上の CD36 陽性細胞の増加を認めた。

以上の結果より、TDF により発現が上昇した CD36 が肝細胞への脂質の取り込みに関与している可能性が示唆された。

HepG2 細胞に対し CD36 knock-down 後の培養上清中の脂質の変化

そこで、CD36 の肝細胞における脂質取り込みに対する影響を検討するため、HepG2 細胞に CD36 の siRNA を導入し knock-down したものを 5 日間培養し、培養上清中の脂質変化を検討した。図 6 A に示すように siRNA にて CD36 は高率に knock-down が確認された。培養上清中の脂質変化を図 6 B、C、D に示す。CD36 を knock-down した群 (CD36 siRNA) は Control 群と比べ T-chol、LDL-c の有意な上昇 ($P < 0.01$) が確認された。すなわち、CD36 が肝細胞における脂質取り込みに強く関与している事が確

認された。

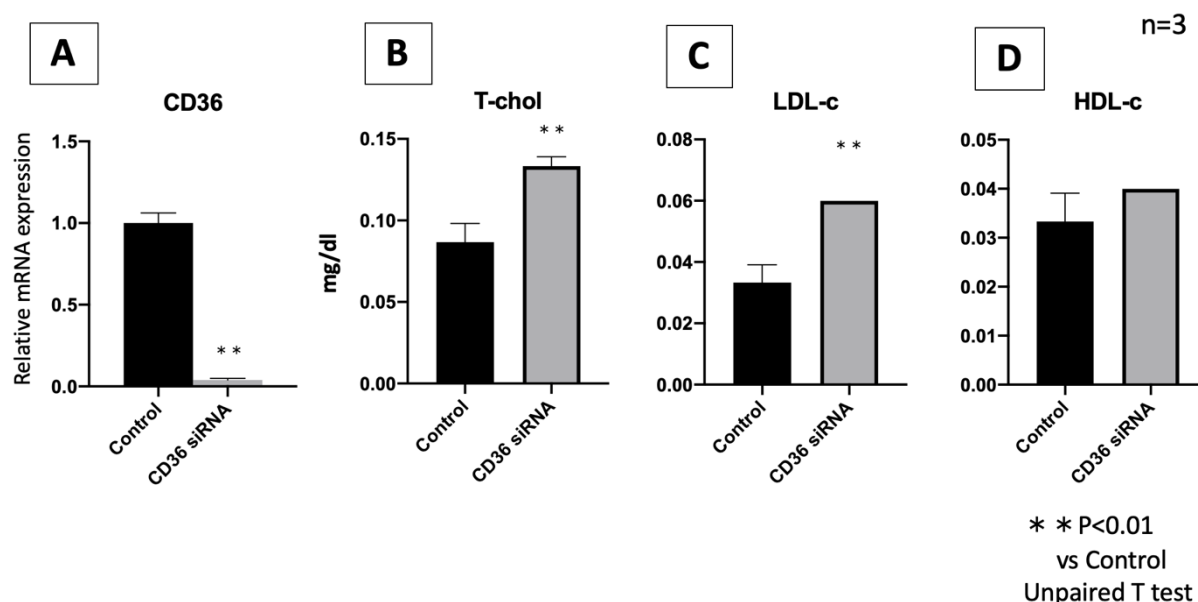


図 6. HepG2 細胞に対し CD36 knock-down 後の培養上清中の脂質の変化

A : CD36 knock-down 後の RT-PCR における CD36 発現変化

B、C、D : 培養上清中の T-cho、LDL-c、HDL-c の変化

CD36 siRNA の導入により CD36 が高率に knock down された事を確認した。CD36 を knock down した所、培養上清中の T-cho、LDL-c の上昇を認めた。

HepG2 細胞に対し CD36 knock-down 後の TDF 投与による培養上清中の脂質の変化

続いて、HepG2 細胞に CD36 の siRNA を導入し knock-down した後に TDF 50 μ M を投与し 5 日間培養後の培養上清中の脂質を測定した。図 7 A に示すように siRNA にて CD36 は高率に knock-down が確認された。培養上清中の脂質変化を図 7 B、C、D に示す。Control siRNA 導入後に DMSO を投与した群 (Control +DMSO) と比較し、Control siRNA 導入後に TDF を投与した群 (Control+TDF 50 μ M) では T-cho、LDL-c、HDL-c の有意な低下 ($P<0.05$) がみられたが、CD36 knock-down 後に TDF を投与した群 (CD36 siRNA+TDF 50 μ M) は Control siRNA 導入後に DMSO を投与した群 (Control +DMSO) と比べ T-cho と LDL-c の低下はみられなかった。すなわち、CD36 を knock-down する事により TDF の脂質低下作用がキャンセルされた事が考えられる。これら結果により、TDF により発現が上昇した CD36 が脂質の取り込みに関与している事が推察された。

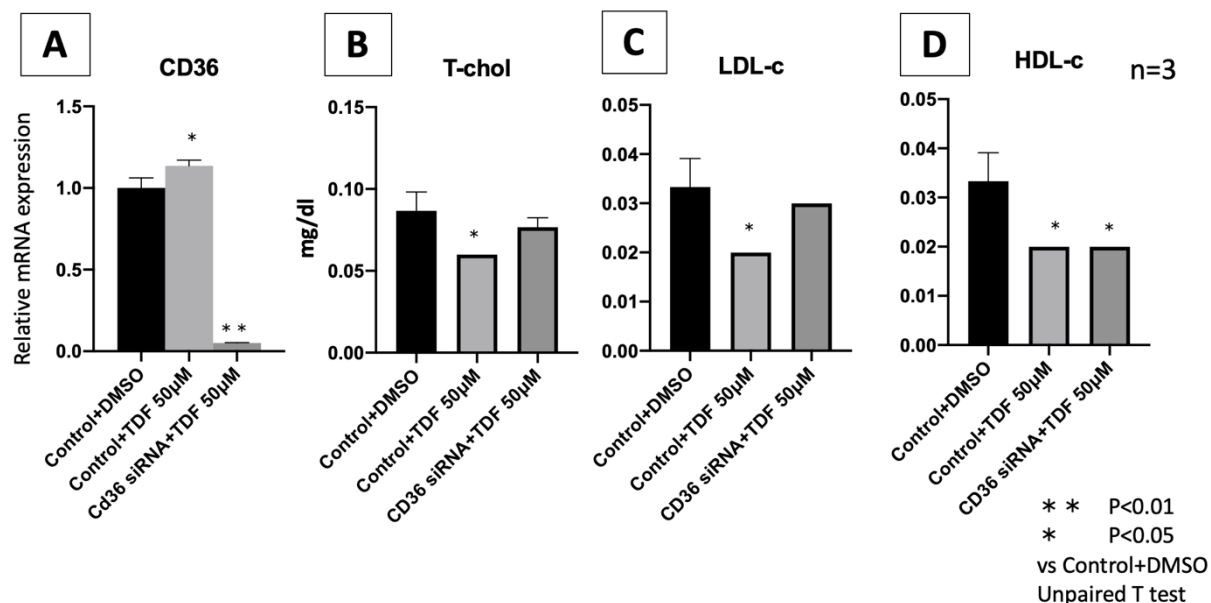


図 7. HepG2 細胞に対し CD36 knock down 後の TDF 投与による培養上清中の脂質の変化

A : CD36 knock-down 後の RT-PCR における CD36 発現変化

B、C、D : 培養上清中の T-cho、LDL-c、HDL-c の変化

CD36 siRNA の導入により CD36 が高率に knock down された事を確認した。CD36 を knock down した所、TDF を投与しても培養上清中の T-cho、LDL-c の低下は認められなかった。

TDF が CD36 発現上昇をきたす機序の検討

次に TDF が CD36 発現上昇をきたす機序に関し検討を行った。既報において Peroxisome proliferator-activated receptor (ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体、以下 PPAR)、Liver X receptor (以下 LXR)、Pregnane X receptor (以下 PXR) が肝細胞における CD36 の発現を制御する因子として報告されている (Zhou et al., 2008)。そこで、これらの転写因子の応答配列下にレポーター遺伝子が導入されたプラスミドを細胞にトランスフェクションし、DMSO、TDF 50μM、ETV 0.25μM 投与によるレポーター活性 (ルシフェラーゼ活性) の変化を検討した。結果として、PPAR のみが TDF 50μM 投与群において活性化を確認できた (図 8)。

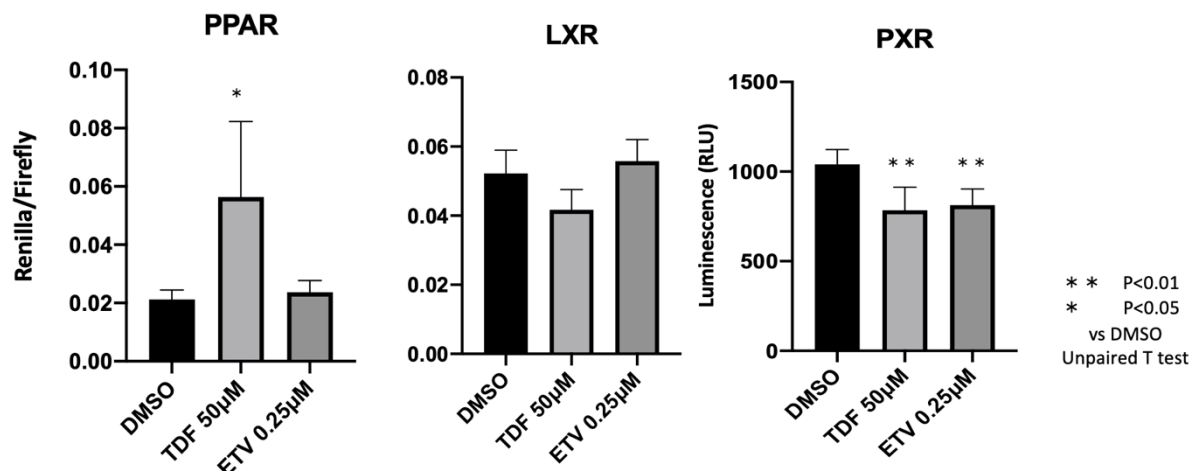


図 8. PPAR、LXR、PXR の Reporter assay

TDF の投与において PPAR の活性化を認めた。

PPAR のサブタイプ解析

また、PPAR は α 、 γ 、 σ といったサブタイプがあり (Tyagi et al., 2011)、それらの活性化について同様に Reporter assay を用いて詳細な解析を行った所、TDF50μM 投与において PPAR α の活性化が確認できた (図 9)。以上より、TDF は一部で PPAR α 活性化を介して CD36 の発現を上昇させる可能性が示唆された。

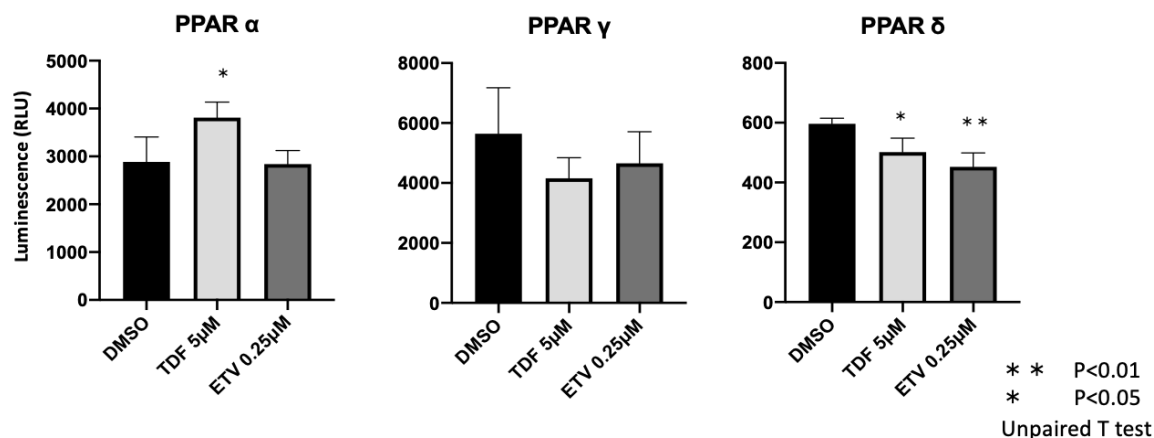


図 9. PPAR α 、 γ 、 σ の Reporter assay

TDF の投与において PPAR α の活性化を認めた。

HepG2 細胞に対し TDF、ETV 投与後の PPAR α 応答遺伝子群の発現変化

この仮説を検証する為に、HepG2 細胞に DMSO、TDF 50 μ M、ETV 0.25 μ M、を投与し 5 日間培養後の細胞内 PPAR α 応答遺伝子群 (CD36、L-FABP、CPT-1、DAGT1、

DAGT2) の発現変化を RT-PCR にて検討した。TDF 投与により HepG2 細胞内の PPAR α 応答遺伝子群の有意な上昇が確認された (図 1 0)。

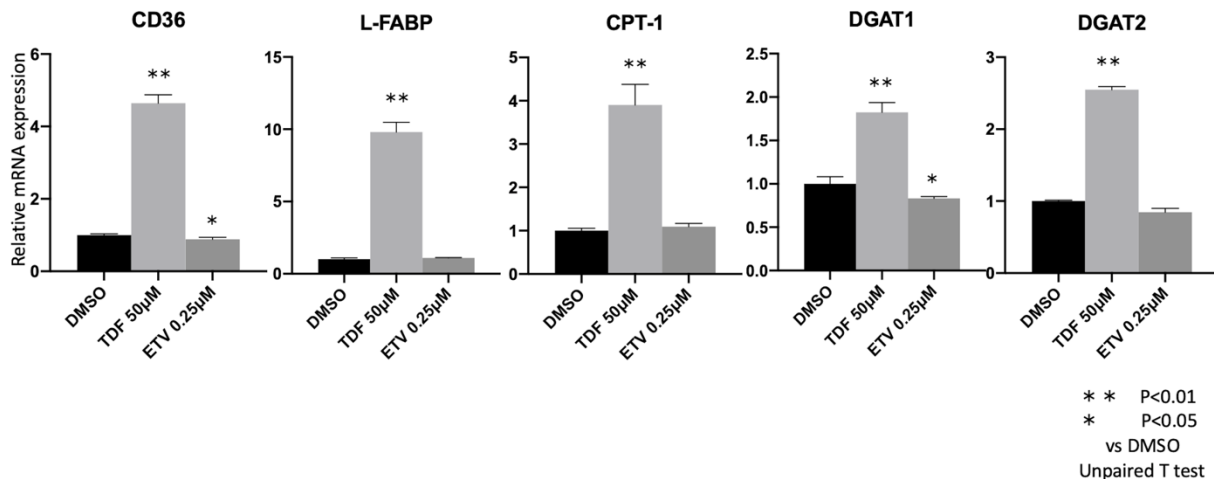


図 1 0. HepG2 細胞に対し TDF、ETV 投与による PPAR α 応答遺伝子群の発現変化
PPAR α 応答遺伝子群の発現亢進を認めた。

以上より、TDF は一部で PPAR α の活性化を介して CD36 の発現上昇をさせるという仮説に矛盾しない事を確認できた。

HepG2 細胞に対し CD36 knock-down 後の TDF 投与による CPT-1 (PPAR α 応答遺伝子) の発現解析

CD36 発現上昇後に脂質の取り込みが上昇すると PPAR α の活性化が 2 次的に起こる可能性がある。そこで、HepG2 細胞に CD36 の siRNA を導入し knock-down した後に、TDF を投与し 7 日間培養後の CD36、CPT-1 (PPAR α 応答遺伝子の一つ) の発現変化を解析した。図 1 1 A に示すように siRNA にて CD36 は高率に knock-down が確認された。図 1 1 B は CD36 と CPT-1 蛋白発現をウェスタンブロット法において解析した結果である。CD36 を knock-down した両群 (siRNA①及び siRNA②) で Control siRNA を導入した群 (Control siRNA) と比べ CPT-1 発現の低下を認めた一方、CD36 knock-down 後に TDF 50 μ M の投与を行うと、CD36 を knock-down した両群 (siRNA①及び siRNA②) は Control siRNA を導入した群 (Control siRNA) と比べ CPT-1 発現の低下は認められなかった。すなわち、TDF は CD36 発現を介さずに CPT-1 発現を上昇させる事が示唆された。

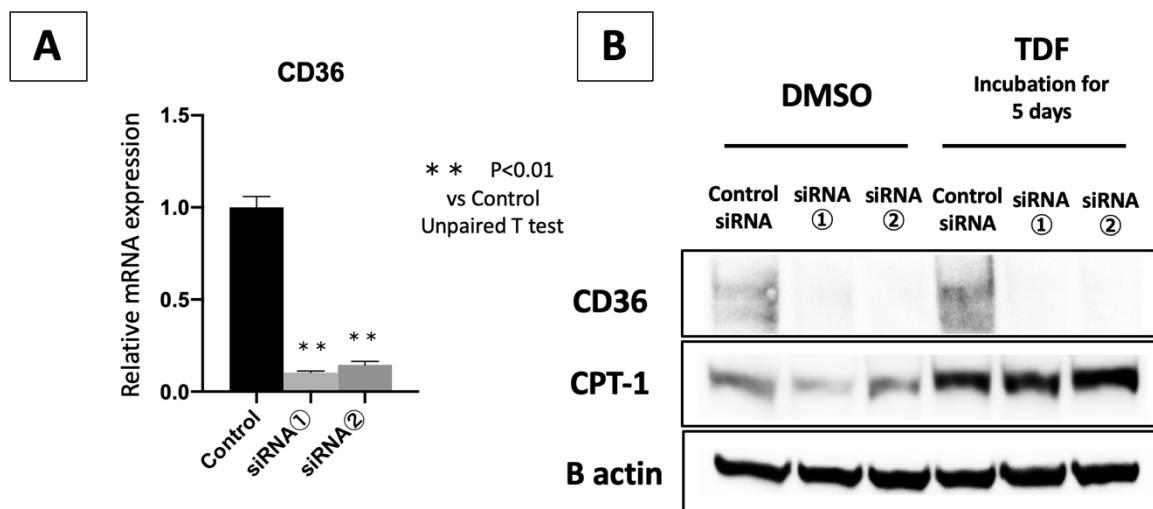


図 1 1 . HepG2 細胞に対し CD36 knock down 後の CD36、CPT-1 発現解析

A : CD36 knock-down 後の RT-PCR における CD36 発現変化

A : CD36 knock-down 後の TDF 投与によるウエスタンブロット法での CD36、CPT-1 発現解析

CD36 siRNA の導入により CD36 が高率に knock down された事を確認した。また、CD36 の knock down により CPT-1 発現蛋白の低下を認めた。一方、TDF を投与すると CPT-1 発現蛋白の低下は認められなかった。

PPAR α knock-down 後の TDF 投与による CD36、CPT-1 の発現解析

続いて、HepG2 細胞に PPAR α の siRNA 導入し knock-down 後に TDF 50 μ M を添加し 3 日間培養後の CD36 発現変化を RT-PCR にて解析した。図 1 2 A に示すように siRNA にて PPAR α は高率に knock-down が確認された。また、図 1 2 B に示すように、CD36 の発現は、Control siRNA を導入後に TDF を投与した群 (Control+TDF 50 μ M) は、CD36 の発現上昇はみられた一方、PPAR α knock-down 後に TDF を投与した群 (PPAR α siRNA+TDF 50 μ M) は CD36 の発現上昇はみられなかった。すなわち、TDF 投与による CD36 発現上昇は、PPAR α の活性化を介す事が示唆された。

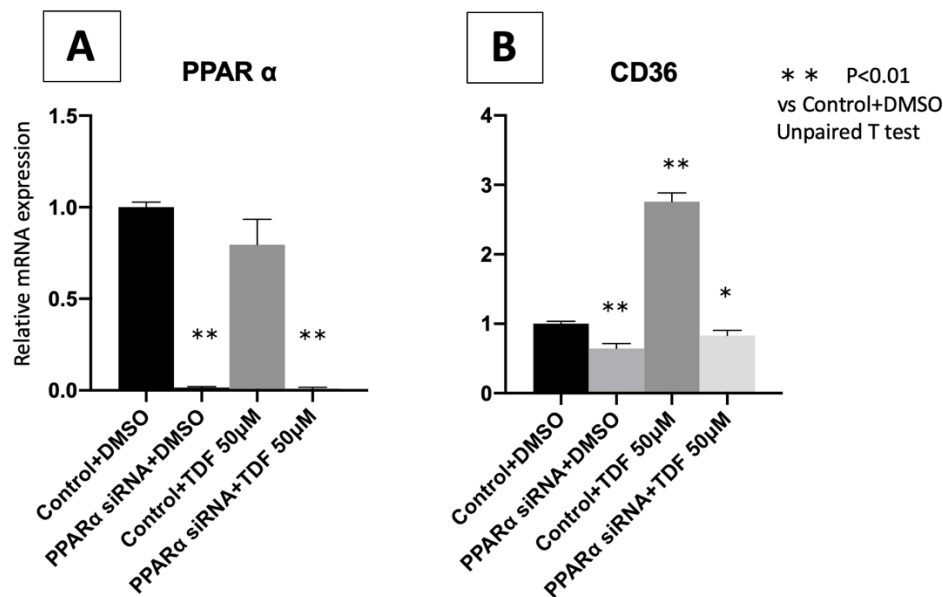


図 1 2 . PPAR α knock-down 後の TDF 投与による RT-PCT での PPAR α 、CD36 の発現変化

A : PPAR α knock-down 後の RT-PCR での PPAR α 発現変化

B : PPAR α knock-down 後の TDF 投与による RT-PCR での CD36 発現変化

PPAR α siRNA の導入により PPAR α が高率に knock down された事を確認した。また、PPAR α の knock down により CD36 発現の低下がみられ、TDF を投与しても同様に CD36 発現の低下を認めた。

さらに、HepG2 細胞に PPAR α の siRNA を導入し knock-down した後に TDF 50 μ M を投与し 7 日間培養したものに対しウエスタンブロット法で CD36、CPT-1 蛋白の発現変化を解析した (図 1 3)。図 1 3 A に示すように siRNA にて PPAR α は高率に knock-down が確認された。図 1 3 B に示すように、は CD36 と CPT-1 蛋白発現をウエスタンブロット法において解析した結果である。PPAR α を knock-down した群 (PPAR α siRNA) は、Control (Control siRNA) と比べ CD36、CPT-1 発現の低下が確認された。また、PPAR α を knock-down 後に TDF 50 μ M を投与する (siRNA) と、PPAR α を knock-down した群 (siRNA) は Control (Control siRNA) 群と比べ DMSO 投与時と同様に CD36、CPT-1 発現の低下が確認された。今回と図 1 2 B の結果とともに、TDF の CD36 と CPT-1 (PPAR α 応答遺伝子群) の発現上昇作用は PPAR α の活性化を介する事が明らかにされた。

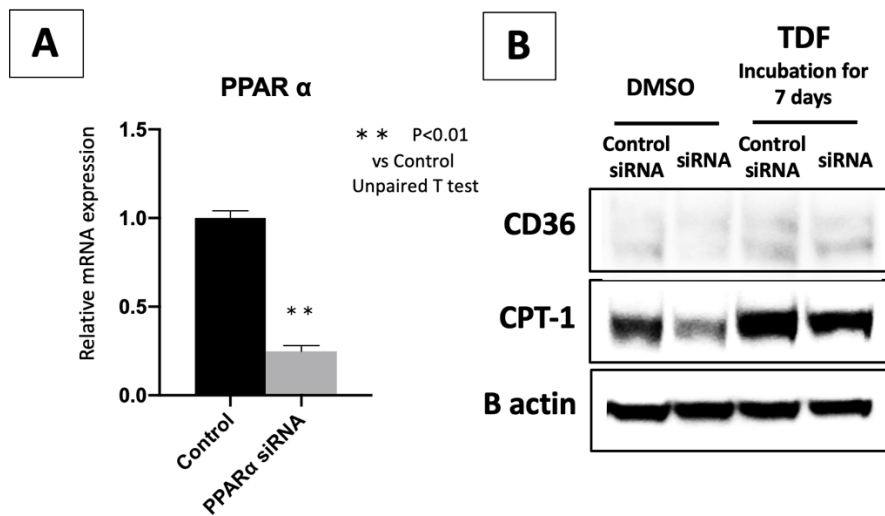


図 1 3. PPAR α knock-down 後の TDF 投与による CD36、CPT-1 発現解析

A : PPAR α knock-down 後の RT-PCR での PPAR α 発現変化

B : PPAR α knock-down 後の TDF 投与によるウエスタンブロット法での CD36、CPT-1 発現変化

PPAR α siRNA の導入により PPAR α が高率に knock down された事を確認した。また、PPAR α の knock down により CD36, CPT-1 (PPAR α 応答遺伝子群) 蛋白発現の低下がみられ、TDF を投与しても同様に CD36, CPT-1 蛋白発現の低下を認めた。

RD 細胞での TDF、ETV 投与後の脂質代謝に関連する因子の変化

次に、ヒト横紋筋腫由来細胞株である RD 細胞に対し TDF $50\ \mu\text{M}$ 、ETV $0.25\ \mu\text{M}$ を投与し、ウエスタンブロット法において脂質代謝に関連する因子の発現を解析した。図 1 4 A に示す通り、TDF $50\ \mu\text{M}$ の投与により CPT-1 蛋白発現の上昇がみられた。また、同条件で培養した細胞に対し CD36 の抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析を行った所、TDF $50\ \mu\text{M}$ を投与した細胞において CD36 陽性細胞の増加を確認する事ができた。以上より、RD 細胞においても TDF により細胞内の CPT-1 発現上昇ならびに細胞表面上の CD36 発現が上昇する事を明らかにされた。

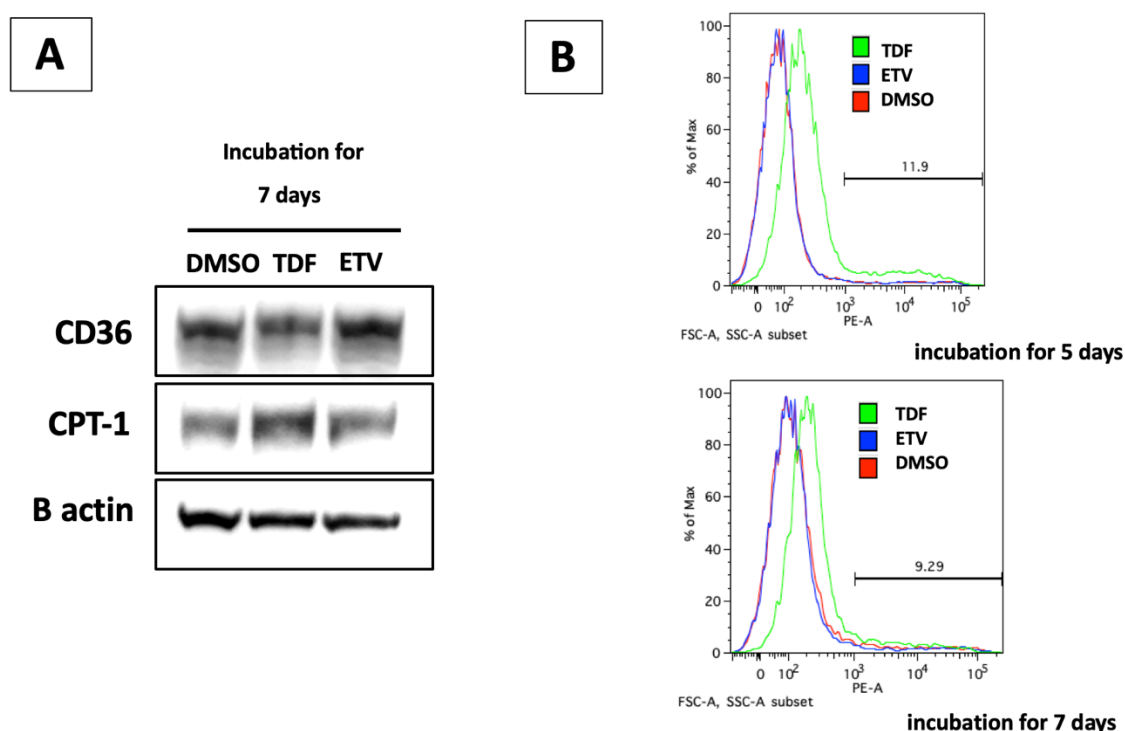


図 1 4. RD 細胞に対し TDF、ETV 投与後の CD36、CPT-1 発現解析

A : TDF、ETV 投与後のウエスタンブロット法での CD36、CPT-1 蛋白発現の解析

B : CD36 抗体を用いたフローサイトメトリーの結果

TDF の投与において CPT-1 蛋白発現の上昇ならびに、細胞表面上の CD36 陽性細胞の増加を認めた。

マウスを用いた *in vivo* での検討

最後に、マウスを用いて *in vivo* における TDF の作用を検討した。4 週齢の雄 C57B6/J マウス 6 匹を無作為に 2 匹ずつ 3 群にわけ、9 週間連日、TDF、ETV、コントロールとして滅菌水道水の経口投与を行った。9 週投与後に心筋組織、肝組織に対し CPT-1、CD36 の抗体を用いてウエスタンブロット法にて蛋白発現を解析した。TDF 群はコントロール群、ETV 群と比べ、肝組織、心筋組織において CD36、CPT-1 の発現上昇を認めた（図 1 5）。

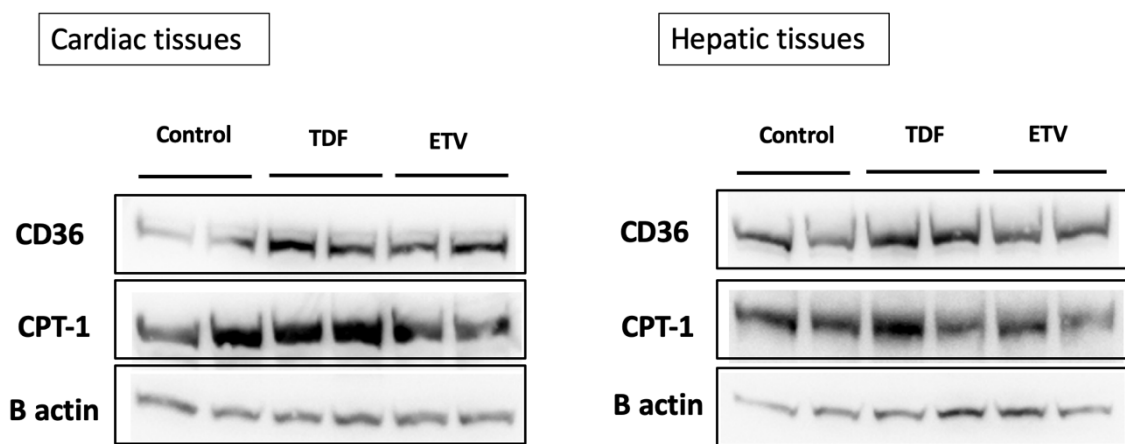


図 1 5. TDF、ETV 経口投与後のマウスの心筋、肝組織におけるウエスタンブロット法での CD36、CPT-1 発現解析

心筋組織、肝組織において TDF 群で CD36、CPT-1 蛋白の発現上昇を認めた。

考 察

核酸アナログ製剤は高い ALT 正常化率と HBV-DNA 陰性化率が期待でき、かつ薬剤耐性はまれであり現在多くの慢性 B 型肝炎患者に使用されている。しかしながら、核酸アナログ製剤の内服により肝臓から HBV を排除する事はできず、ほぼ一生内服継続を必要とする。その為に長期的な使用による核酸アナログ製剤の有害事象を含む肝外病変への影響が臨床上問題となる。現在、慢性 B 型肝炎患者に対する核酸アナログ製剤として使用が推奨されている ETV と TDF は、臨床治験において脂質代謝の変化についての検討はされていない。その為に核酸アナログ治療が脂質代謝に与える影響については十分に明らかとなっていない。

つい最近になり、核酸アナログ治療の脂質代謝に及ぼす影響に関して報告された。Shaheen ら (Shaheen et al., 2017) は、HBV 感染者を対象とした検討で、ETV と比較し TDF 治療により T-chol、HDL-c、LDL-c の有意な低下がみられた事を報告した。また Santos ら (Santos et al., 2015) は HIV 感染者を対象とした検討で、TDF を有するレジメン (TDF/FTC) の使用により、T-chol、HDL-c、LDL-c の有意な低下がみられた事を報告した。しかしながら、TDF 治療が脂質低下を引き起こす機序については不明である。加えて、HBV 感染者、HIV 感染者を対象とした TDF 治療の脂質変化に対するいずれの検討においても LDL-c とともに HDL-c の低下がみられており、TDF 治療の動脈硬化進展に与える影響の検討は十分に行われていない。

そこで、今回慢性 B 型肝炎患者に対する核酸アナログ製剤が脂質代謝に与える影響について検討を行う事とした。図 3 で示した通り慢性 B 型肝炎に対し ETV もしくは TDF による治療を開始された全 72 症例 (TDF/ETV:36/36 症例) を対象とし検討を行った。結果として、TDF 治療により T-chol、HDL-c は有意に低下し、LDL-c は低下する傾向が確認された。さらに、重要な事として動脈硬化の進展ならびに心血管疾患発症リスクと強い関連が知られる酸化 LDL と non HDL-c についても有意に低下する事が初めて示された (表 1 3)。

酸化 LDL は、血管内皮下で LDL-c が COX などの刺激により酸化刺激を受ける事で生じる。マクロファージは酸化 LDL を取り込む事で泡沫細胞となり、動脈硬化を引き起こす (Aviram, 1996)。実臨床においても Koenig ら (Koenig et al., 2011) は血清中の酸化 LDL の上昇は、心血管疾患発症リスクと関連性がある事を示している。また、Packard ら (Packard and Saito, 2004) は non HDL-c の上昇が心血管疾患発症リスクと関連性がある事を示した。本検討で TDF 治療により酸化 LDL と non HDL-c の低下がみられた事が初めて明らかにされた。すなわち、TDF 治療が動脈硬化進展を抑制

する可能性が示唆された。

TDF が脂質低下を引き起こす機序については今まで明らかにされていなかった。今回の検討で、TDF が PPAR α の活性化を介しコレステロール・脂質吸収に関与する CD36 発現を上昇させる事を初めて明らかにされた (図 5)。CD36 は、血小板、単核食細胞、脂肪細胞、肝細胞、筋細胞、および一部の上皮に存在するスカベンジャー受容体である (Silverstein and Febbraio, 2009)。肝臓における CD36 の発現は血中の様々な脂質の取り込みに関与する事が知られている。肝の CD36 は脂肪酸 (Koonen et al., 2007)、酸化 LDL (Luangrath et al., 2008)、HDL-c (Brundert et al., 2011) の取り込みに関わる事が *in vitro* ならびに *in vivo* において明らかにされている。今回の検討においても、TDF 治療により血中の酸化 LDL および HDL-c の低下がみられた (図 1 3)。以上より、TDF により発現が上昇した CD36 が血中の酸化 LDL、non-HDL-c を含む脂質の低下に関与した事が推察された。

さらに、*in vitro*、*in vivo* の検討で TDF が心筋細胞の CD36 発現を上昇させる事が明らかにされた (図 1 4、1 5)。心臓におけるエネルギーは心筋細胞内の脂肪酸代謝により産生され (Kolwicz et al., 2013)、CD36 は脂肪酸代謝に重要な役割を果たす事が知られている。Guo ら (Guo et al., 2018) は、心筋に特異的な CD36 を高発現させたマウスに心不全発症モデルを作成し CD36 の発現の有無により心機能の変化を検討した。CD36 を発現させていない群と比べ、CD36 を高発現させた群では心筋の脂肪酸代謝の亢進により心不全の発症が有意に低くみられた事が示された。以上より、TDF は心筋の CD36 発現の上昇を介し心筋の脂肪酸代謝を亢進させる可能性が示唆された。

最近になり、TDF が心不全発症を抑制する事が明らかにされた。Chen ら (Chen et al., 2017) は、HIV 感染者において TDF を一度でも使用されたもしくは現在使用している患者には心不全の発症が有意に低くみられたと報告した。同論文では、一因として TDF 治療による脂質代謝の変化が心不全の発症を抑制した事が考察された。今回の検討により、TDF が心不全発症を抑制した機序として、酸化 LDL や non HDL-c といった動脈硬化進展に関連のある因子を低下させ、心血管疾患発症抑制を介し心不全発症を低下させた事、並びに心筋の CD36 発現上昇が脂肪酸代謝の亢進を引き起こし、結果として心不全発症を抑制した事が考察される。

今回、TDF が CD36 発現上昇を引き起こす機序として PPAR α を活性化させる事が初めて示された (図 8、9)。最近になり慢性 B 型肝炎患者に対する TDF 治療は ETV 治療と比較し肝発癌を有意に抑制する可能性が複数報告された (Lim and Ko, 2019)。In vivo の検討において、PPAR α の活性化が肝内の脂肪代謝を改善し (Takei et al., 2017)、肝発癌の原因となりうる脂肪肝炎を改善させる (Honda et al., 2017) といった報告もあり、TDF の PPAR α 活性化作用が肝内の脂質代謝を改善し、肝発癌を抑制した可能性も推察される。

結論として、TDF 治療が脂質低下作用を有し、さらには動脈硬化と強い関連がある酸化 LDL、non HDL-c をも低下させる事を明らかにした。TDF が脂質代謝を変化させる機序として PPAR α 活性化を介し、脂質の取り込みに関わる CD36 の発現上昇が関与する可能性が示唆された。

総 括

本研究において、以下の知見が得られた。

- ・透析症例および高度腎障害を有する慢性 B 型肝炎患者における ETV 治療は、高い効果を有する事が明らかとなった。

- ・慢性 B 型肝炎患者に対する TDF 治療は、T-chol、LDL-c、HDL-c を低下させた。更に重要な事として、TDF 治療は動脈硬化、心血管疾患発症リスクに関連がある酸化 LDL、non HDL-c をも低下させる作用を初めて明らかにした。

- ・TDF の脂質代謝調節の機序の一部として、in vitro ならびに in vivo での基礎的な検討により PPAR α の活性化を介して上昇した CD36 発現が、脂質の取り込みに影響を与える可能性を初めて明らかにした。

また、申請者は現在、TDF の脂質代謝調節作用について引き続き基礎研究を行っている。近年、慢性 B 型肝炎患者において TDF 治療は ETV 治療と比べ肝発癌を抑制するとの臨床的な報告がなされたが (Lim and Ko, 2019) 、その機序は明らかとなっていない。慢性 B 型肝炎患者において、高コレステロール血症を含めたメタボリック症候群と関連する因子は肝発癌と関連するといった報告 (Yu et al., 2017) もあり、肝細胞内の脂質代謝の変化が肝発癌に与える影響に着目し、今後も引き続き検討を行っていく予定である。

謝 辞

先ず、本研究にご協力頂いた全ての患者様とそのご家族に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究に対する心構えや信念、実験方法、データ解釈、論文作成など、様々な面において御指導・御援助頂きました北海道大学病院消化器内科特任助教 須田剛生先生には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

また、臨床における技術指導や、検体の採取などにご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 肝臓グループの諸先生方、市立函館病院消化器内科 山本義也先生、JCHO北海道病院消化器内科 古屋乾先生、馬場英先生、NORTEグループスタディの諸先生方に、心より深く感謝申し上げます。

2020年3月

鈴木 和治

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aviram, M. (1996). Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 599-608.

Brundert, M., Heeren, J., Merkel, M., Carambia, A., Herkel, J., Groitl, P., Dobner, T., Ramakrishnan, R., Moore, K.J., and Rinninger, F. (2011). Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J. Lipid Res.* 52, 745-758.

Buti, M., Gane, E., Seto, W.K., Chan, H.L., Chuang, W.L., Stepanova, T., Hui, A.J., Lim, Y.S., Mehta, R., Janssen, H.L., *et al.* (2016). Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 1, 196-206.

Chen, R., Scherzer, R., Hsue, P.Y., Jotwani, V., Estrella, M.M., Horberg, M.A., Grunfeld, C., and Shlipak, M.G. (2017). Association of Tenofovir Use With Risk of Incident Heart Failure in HIV-Infected Patients. *J. Am. Heart Assoc.* 6.

Drafting Committee for Hepatitis Management, G., and the Japan Society of, H. (2014). JSH Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatol. Res.* 44 Suppl S1, 1-58.

European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e., and European Association for the Study of the, L. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 67, 370-398.

Ezequiel Ridruejo, R.A., Cristina Alonso, Oscar G. Mandó, Marcelo O. Silva, (2010). Entecavir Treatment for Chronic Hepatitis B Infection in End-Stage Renal Disease and Kidney Transplantation. *Dialysis & Transplantation* 39, 397-400.

Fabrizi, F., Messa, P., Dixit, V., and Martin, P. (2010). Therapy with nucleos(t)ide analogues:

current role in dialysis patients. *Int. J. Artif. Organs* 33, 329-338.

Fazio, S., and Linton, M.F. (2004). The role of fibrates in managing hyperlipidemia: mechanisms of action and clinical efficacy. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6, 148-157.

Gallant, J.E., Parish, M.A., Keruly, J.C., and Moore, R.D. (2005). Changes in renal function associated with tenofovir disoproxil fumarate treatment, compared with nucleoside reverse-transcriptase inhibitor treatment. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1194-1198.

Guo, Y., Wang, Z., Qin, X., Xu, J., Hou, Z., Yang, H., Mao, X., Xing, W., Li, X., Zhang, X., *et al.* (2018). Enhancing fatty acid utilization ameliorates mitochondrial fragmentation and cardiac dysfunction via rebalancing optic atrophy 1 processing in the failing heart. *Cardiovasc. Res.* 114, 979-991.

Honda, Y., Kessoku, T., Ogawa, Y., Tomeno, W., Imajo, K., Fujita, K., Yoneda, M., Takizawa, T., Saito, S., Nagashima, Y., *et al.* (2017). Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, improves the pathogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci. Rep.* 7, 42477.

Julander, J.G., Colonno, R.J., Sidwell, R.W., and Morrey, J.D. (2003). Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 59, 155-161.

Koenig, W., Karakas, M., Zierer, A., Herder, C., Baumert, J., Meisinger, C., and Thorand, B. (2011). Oxidized LDL and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Clin. Chem.* 57, 1196-1200.

Kolwicz, S.C., Jr., Purohit, S., and Tian, R. (2013). Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.* 113, 603-616.

Koonen, D.P., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.L., Ong, H., Vance, D.E., and Dyck, J.R. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 2863-2871.

Lai, C.L., Shouval, D., Lok, A.S., Chang, T.T., Cheinquer, H., Goodman, Z., DeHertogh, D.,

Wilber, R., Zink, R.C., Cross, A., *et al.* (2006). Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 354, 1011-1020.

Lee, W.M. (1997). Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 337, 1733-1745.

Lim, Y.S., and Ko, M.J. (2019). Notice of Retraction and Replacement. Choi et al. Risk of hepatocellular carcinoma in patients treated with entecavir vs tenofovir for chronic hepatitis B: a Korean nationwide cohort study. *JAMA Oncol.* 2019;5(1):30-36. *JAMA Oncol.* 5, 913-914.

Liu, A., Le, A., Zhang, J., Wong, C., Wong, C., Henry, L., and Nguyen, M.H. (2018). Increasing co-morbidities in chronic hepatitis B patients: experience in primary care and referral practices during 2000-2015. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 9, 141.

Lok, A.S. (2002). Chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 346, 1682-1683.

Luangrath, V., Brodeur, M.R., Rhainds, D., and Brissette, L. (2008). Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1290-1295.

Mahoney, F.J. (1999). Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 351-366.

Marcellin, P., Heathcote, E.J., Buti, M., Gane, E., de Man, R.A., Krastev, Z., Germanidis, G., Lee, S.S., Flisiak, R., Kaita, K., *et al.* (2008). Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 359, 2442-2455.

Murakami, E., Tsuge, M., Hiraga, N., Kan, H., Uchida, T., Masaki, K., Nakahara, T., Ono, A., Miki, D., Kawaoka, T., *et al.* (2016). Effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones. *J. Infect.* 72, 91-102.

Murata, K., Asano, M., Matsumoto, A., Sugiyama, M., Nishida, N., Tanaka, E., Inoue, T., Sakamoto, M., Enomoto, N., Shirasaki, T., *et al.* (2018). Induction of IFN-lambda3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection. *Gut* 67, 362-371.

Ng, H.H., Stock, H., Rausch, L., Bunin, D., Wang, A., Brill, S., Gow, J., and Mirsalis, J.C. (2015). Tenofovir disoproxil fumarate: toxicity, toxicokinetics, and toxicogenomics analysis after 13 weeks of oral administration in mice. *Int. J. Toxicol.* 34, 4-10.

Packard, C.J., and Saito, Y. (2004). Non-HDL cholesterol as a measure of atherosclerotic risk. *J. Atheroscler. Thromb.* 11, 6-14.

Ridruejo, E., Adrover, R., Alonso, C., Mandó, O.G., and Silva, M.O. (2010). Entecavir treatment for chronic hepatitis B infection in end-stage renal disease and kidney transplantation. *Dial. Transplant.* 39, 397-400.

Santos, J.R., Saumoy, M., Curran, A., Bravo, I., Llibre, J.M., Navarro, J., Estany, C., Podzamczar, D., Ribera, E., Negro, E., *et al.* (2015). The lipid-lowering effect of tenofovir/emtricitabine: a randomized, crossover, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 61, 403-408.

Shaheen, A.A., AlMattooq, M., Yazdanfar, S., Burak, K.W., Swain, M.G., Congly, S.E., Borman, M.A., Lee, S.S., Myers, R.P., and Coffin, C.S. (2017). Tenofovir disoproxil fumarate significantly decreases serum lipoprotein levels compared with entecavir nucleos(t)ide analogue therapy in chronic hepatitis B carriers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 46, 599-604.

Silverstein, R.L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal* 2, re3.

Takei, K., Han, S.I., Murayama, Y., Satoh, A., Oikawa, F., Ohno, H., Osaki, Y., Matsuzaka, T., Sekiya, M., Iwasaki, H., *et al.* (2017). Selective peroxisome proliferator-activated receptor- α modulator K-877 efficiently activates the peroxisome proliferator-activated receptor- α pathway and improves lipid metabolism in mice. *J. Diabetes Investig.* 8, 446-452.

Terrault, N.A., Lok, A.S.F., McMahon, B.J., Chang, K.M., Hwang, J.P., Jonas, M.M., Brown, R.S., Jr., Bzowej, N.H., and Wong, J.B. (2018). Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 67, 1560-1599.

Trinh, S., Le, A.K., Chang, E.T., Hoang, J., Jeong, D., Chung, M., Lee, M.H., Wang, U., Henry, L., Cheung, R., *et al.* (2018). Changes in Renal Function in Patients With Chronic HBV Infection Treated With Tenofovir Disoproxil Fumarate vs Entecavir. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*

Tsai, H.J., Chuang, Y.W., Lee, S.W., Wu, C.Y., Yeh, H.Z., and Lee, T.Y. (2018). Using the chronic kidney disease guidelines to evaluate the renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in hepatitis B patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 47, 1673-1681.

Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A.S., Kaushal, C., and Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 236-240.

Umemura, T., Ichijo, T., Yoshizawa, K., Tanaka, E., and Kiyosawa, K. (2009). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan. *J. Gastroenterol.* 44 Suppl 19, 102-107.

Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Nalpas, B., Verkarre, V., Nalpas, A., Dhalluin-Venier, V., Fontaine, H., and Pol, S. (2007). FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 46, 32-36.

Walker, W.G., Neaton, J.D., Cutler, J.A., Neuwirth, R., and Cohen, J.D. (1992). Renal function change in hypertensive members of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Racial and treatment effects. The MRFIT Research Group. *JAMA* 268, 3085-3091.

Wong, D.K., Cheung, A.M., O'Rourke, K., Naylor, C.D., Detsky, A.S., and Heathcote, J. (1993). Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 119, 312-323.

Wong, G.L., Chan, H.L., Tse, Y.K., Yip, T.C., Lam, K.L., Lui, G.C., Szeto, C.C., and Wong, V.W. (2018). Chronic kidney disease progression in patients with chronic hepatitis B on tenofovir, entecavir, or no treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 48, 984-992.

Yu, M.W., Lin, C.L., Liu, C.J., Yang, S.H., Tseng, Y.L., and Wu, C.F. (2017). Influence of Metabolic Risk Factors on Risk of Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Death in Men With Chronic Hepatitis B: A Large Cohort Study. *Gastroenterology* 153, 1006-1017.e1005.

Zhou, J., Febbraio, M., Wada, T., Zhai, Y., Kuruba, R., He, J., Lee, J.H., Khadem, S., Ren, S., Li, S., *et al.* (2008). Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 134, 556-567.