

図8 臨床経過(症例8)

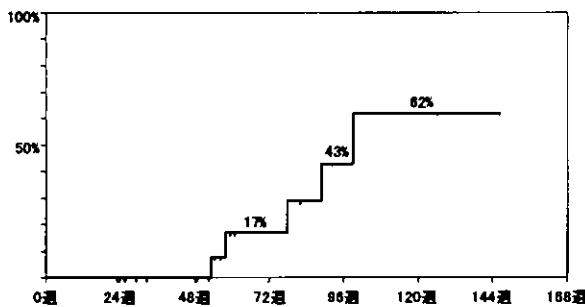


図9 ラミブジン継続投与によるviral break-through発現率

D. 考察

ラミブジンは副作用が少なく安全性の高い薬剤であるが、長期に投与すると耐性ウイルスの出現 (viral break-through) による肝炎の悪化 (BTH) をきたす可能性がある。しかし投与を中止すると HBV 再増殖により肝炎が再燃 (PTF) する可能性がある。このためラミブジン治療においては、投与を継続すべきか中止すべきかが大きな問題である。

今回の検討の結果、ラミブジン中止例では HBV-DNA の再上昇が高頻度に見られるが、HBV-DNA 再上昇後も PTF をおこさない例があることが明らかになった。また PTF が発現した症例では、ラミブジン再投与により速やかに HBV-DNA が低下し肝炎も軽快した。従って、PTF 発現時のラミブジン再投与を念頭におき、諸条件が整った症例ではラミブジン投与の中止を試みることができると思われる。またラミブジン中止後に PTF が発現しなかった症例は、発現した症例に比し若年で肝線維化が軽度であり、これらの点につき今後さらに症例を集積して検討する必要がある。

長期継続投与例では、120 週投与後に 62% の症例に viral break-through が見られたが、

viral break-through 後も BTH をおこす例とおこさない例があることが示された。BTH が発症した 3 例中 2 例は肝庇護剤投与で改善し、臨床経過は良好であった。インターフェロン投与を必要とした BTH 例は難治性であったが、今後アデフォビルやエンテカビルなどの新しい抗ウイルス剤の認可を待ち、これらの投与による治療が可能であると思われる。

ラミブジン中止後に PTF をおこす例とおこさない例、および長期継続投与後に BTH をおこす例とおこさない例を、あらかじめ予測判定することは困難であり、今後さらに症例を集積してこの点を解明する必要がある。現時点では、ラミブジン投与を中止できる可能性のある症例では投与中止を試み、その後 PTF をきたした場合にはラミブジン再投与を考慮し、さらに長期継続投与により BTH が発症した場合は、肝庇護剤または別の抗ウイルス剤を併用投与するのが妥当な治療法であると思われた。

E. 結論

PTF および BTH が発症するか否かを事前に予測することは困難であり、今後さらに多数例の解析が必要である。ラミブジン投与中止後の PTF に対しては、ラミブジン再投与とその後の長期継続投与を考慮し、BTH 出現時には肝庇護剤または他の抗ウイルス剤を投与するのがよいと思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野））
分担研究報告書

肝炎ウイルス等の標準的治療困難例に対する治療法の確立に関する研究

インターフェロン（IFN- α ）による肝細胞 NF- κ B 活性の制御

分担研究者 中尾 一彦 長崎大学保健管理センター助教授

研究要旨 NF- κ B は炎症反応や細胞生存に関わる転写因子である。これまで、肝炎ウイルス感染により肝細胞において NF- κ B の活性化が生じること、肝癌細胞のアポトーシス抵抗性に NF- κ B が関与していることが報告されている。本研究では、NF- κ B 活性に与えるインターフェロン（IFN- α ）の影響を検討した。（1）B型肝炎ウイルス（HBV）の genome DNA 並びに HBX による NF- κ B の活性化は IFN- α によって容量、時間依存性に抑制された。（2）TNF-related apoptosis-inducing ligand（TRAIL）による NF- κ B の活性化は IFN- α によって阻害され、その結果、TRAIL による肝癌細胞のアポトーシス誘導が増強された。また IFN- α 処理により TRAIL の death receptor の発現増強、抗アポトーシス遺伝子で survivin の発現抑制がみられた。IFN- α の生物活性の一つに NF- κ B の活性調節作用があることが明らかになった。

研究協力者

濱崎 圭輔 長崎大学医学部第一内科
石川 博基 長崎大学医学部第一内科
大畑 一幸 長崎大学医学部第一内科

A. 研究目的

肝細胞における B 型肝炎ウイルスならびに TNF-related apoptosis-inducing ligand（TRAIL）による NF- κ B 活性化に対するインターフェロン（IFN- α ）の影響を *in vitro* 実験系を用いて検討する。

B. 研究方法

（1）HBV による NF- κ B 活性化に対する IFN- α の影響

培養ヒト肝癌細胞 HuH-7 に Full genome HBV DNA ないし HBX 発現ベクターと NF- κ B レポータープラスミドを遺伝子導

入し、ルシフェラーゼアッセイにより NF- κ B 活性化を確認後、IFN- α 、 γ を添加し、NF- κ B 活性に与える影響を検討した。

（2）TRAIL による NF- κ B 活性化に対する IFN- α の影響

培養ヒト肝癌細胞 HuH-7、HepG2、Hep3B、PLC/PRF/5 細胞に TNF-related apoptosis-inducing ligand（TRAIL）単独、ないし IFN- α 前処置～併用投与後、アポトーシス誘導の有無を PI 染色により検討した。TRAIL による NF- κ B 活性化に対する IFN- α の影響をルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイにより検討した。また、TRAIL の death receptor 発現、抗アポトーシス蛋白 survivin の発現に及ぼす IFN- α の影響を western blotting、FACS flow cytometry、RNase protection assay により検討した。

C. 研究結果

(1) HBVによるNF- κ B活性化に対するIFN- α の影響

Full genome HBV DNA並びにHBx発現ベクター遺伝子導入によるNF- κ Bの活性化はI κ B α 、IKK α の dominant negative

発現ベクターの導入ならびにIFN- α 処理により容量、時間依存的に抑制された。一方、IFN- γ には抑制効果がみられなかった。図1にHBx (A)、Full genome HBV DNA (B)によるNF- κ B活性化に対するIFN- α の容量依存的抑制効果を示した。

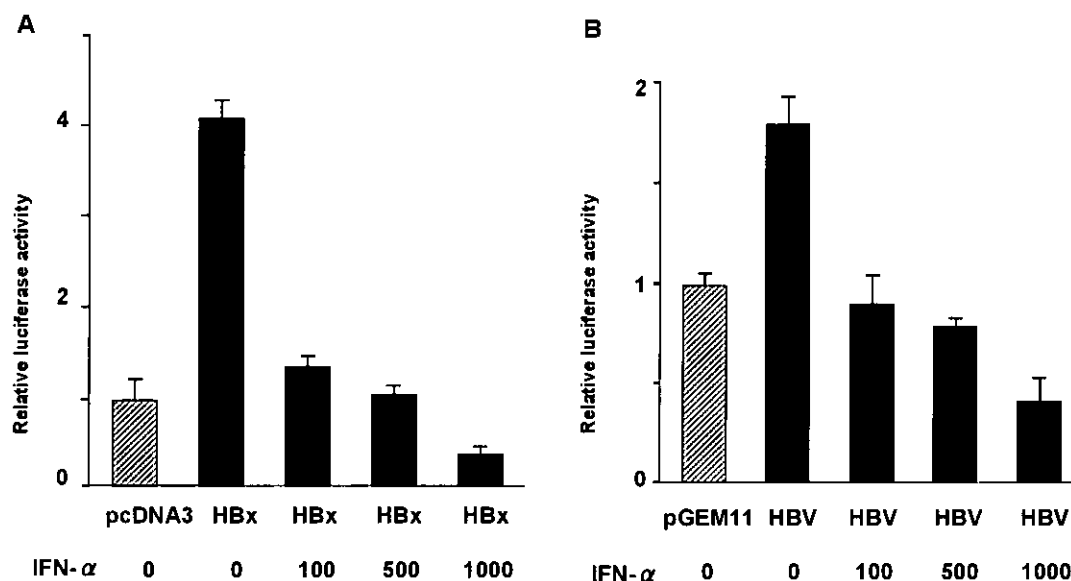


図1.

(2) TRAILによるNF- κ B活性化に対するIFN- α の影響

HuH-7、Hep3B、PLC/PRF/5細胞においてIFN- α の併用によりTRAIL誘導アポトーシスの明らかな増強が見られたが、HepG2細胞では見られなかった。ルシフェラーゼアッセイでは、HuH-7細胞においてIFN- α の併用によりTRAILによるNF- κ B活性化は抑制された。ゲルシフトアッセイの結果、TRAILによりp65-p50のヘテロダイマーからなるNF- κ Bが形成され、核へ移行しNF- κ B認識DNA配列に結合することが解った。HuH-7細胞において、IFN- α の併用によりp65-p50の形成は阻害された。HepG2細胞

では、IFN- α 併用によるNF- κ B活性化阻害は認めなかった。HuH-7、Hep3B細胞において、IFN- α によりTRAIL death receptorの1つであるDR5の発現は増強され、抗アポトーシス蛋白survivinの発現は抑制された。HepG2細胞では、これらの変化を認めなかった。HuH-7細胞において、survivin遺伝子の強制発現により、TRAIL+IFN- α によるアポトーシスは部分的に抑制された。図2にHuH-7細胞におけるTRAILによるNF- κ B活性化に対するIFN- α の影響；(A)ルシフェラーゼアッセイ、(B)ゲルシフトアッセイの結果を示した。

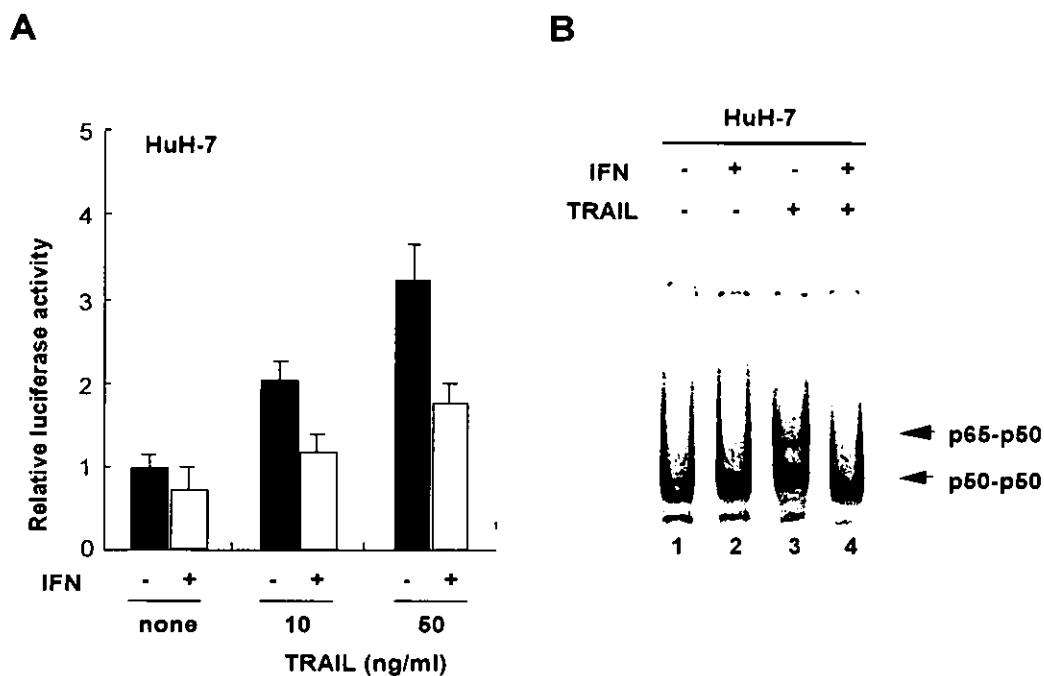


図 2.

D. 考察

HBX による NF- κ B 活性化は、IKK α -I κ B α よりも上流のレベルで生じていることが明らかになった。近年、TNF レセプターが HBX による NF- κ B 活性化に重要であるという報告がなされたが、我々の結果もこれに矛盾しない。IFN- α は、HBX による NF- κ B 活性化を時間依存的に抑制したことから、この抑制効果は IFN- α 誘導蛋白を介したものと推察される。NF- κ B が肝細胞からの IL-6、IL-8 などサイトカイン産生を促進することを考えると、IFN- α は NF- κ B 活性化阻害により、HBV 感染によって惹起される炎症に対して抑制的に作用することが示唆される。

TRAIL は、IFN- α の刺激によって樹状細胞などから産生され、癌細胞特異的にアポトーシスを誘導することから、癌治療への臨床応用が期待されている。しかし、TRAIL に

対して抵抗性を示す癌もあり肝癌もその一つと考えられている。一方、IFN- α と 5-FU の併用療法は進行肝癌に対して有効であるとの報告がある。今回の検討により、IFN- α は TRAIL による肝癌細胞のアポトーシスを増強した。その作用点の一つとして、TRAIL による NF- κ B の活性化阻害が考えられた。

NF- κ B は抗アポトーシス蛋白 (IAP family など) の発現誘導に関わっており、NF- κ B の活性化が阻害されたことで肝癌細胞の生存シグナルが弱まり、結果として TRAIL による細胞死シグナルが強まったものと推測される。また、肝癌細胞で発現が亢進している抗アポトーシス蛋白 survivin の発現も IFN- α で抑制された。以上のことから、IFN- α は肝癌細胞をアポトーシス感受性状態に誘導することができるのではないかと考えられ、TRAIL や 5-FU など抗癌剤の

modulator として作用する可能性が示唆される。

E. 結論

IFN- α は NF- κ B 活性抑制作用を持ち、肝臓における炎症や細胞死の制御に関わっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Hamasaki K, Nakata K, Eguchi K.

Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma using angiostatin gene. *Hepatology*. 2003 Mar;37 (3) :696-704.

2) Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K.

Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation.

Oncogene. 2003 Mar 20;22 (11) :1653-62.

3) Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K.

Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication.

FEBS Lett. 2003 May 22;543 (1-3) :51-4.

4) Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection.

Cancer. 2003 Jun 15;97 (12) :3036-43.

5) Nakao K, Hamasaki K, Wakihama N, Maeda M, Ohtsubo N, Sagiike T, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K, Ishii N.

Analysis of anti-HBs levels in healthcare workers over 10 years following booster vaccination for hepatitis B virus.

Vaccine. 2003 Sep 8;21 (25-26) :3789-94.

6) Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, Shigeno M, Nishimura D, Ishikawa H, Hamasaki K, Eguchi K.

Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells.

FEBS Lett. 2003 Oct 23;553 (3) :304-8.

2. 学会発表

1) 大畑一幸、濱崎圭輔、阿比留正剛、重野賢也、中川祐一、市川辰樹、石川博基、中尾一彦、江口勝美：C型慢性肝疾患における肝細胞脂肪化の肝発癌に対する影響の検討
第100回日本内科学会講演会、2003.04.01-04.03、福岡

2) 大畑一幸、松本幸二郎、佐伯哲、柳謙二、濱田久之、西村大介、阿比留正剛、重野賢也、中川祐一、市川辰樹、石川博基、濱崎圭輔、中尾一彦、江口勝美：ヒト肝癌細胞株 (HuH-7) におけるB型肝炎ウイルス誘導性 NF-kB シグナル伝達機構に対する interferon- α の影響
第89回日本消化器病学会総、2003.04.24-04.26、さいたま

3) 市川辰樹、中尾一彦、江口勝美：特発性肝硬変により生体肝移植後に非アルコール性脂肪性肝炎を再発した症例の検討
第89回日本消化器病学会総、2003.04.24-04.26、さいたま

4) 中尾一彦、林稔展、佐伯哲、市川辰樹、石川博基、濱崎圭輔、江口勝美、石井伸子：

アポトーシス誘導肝癌細胞と樹状細胞を用いた肝癌免疫療法の基礎的検討

第 39 回日本肝臓学会総会、2003.05.22-05.23、福岡

5) 佐伯哲、中尾一彦、永山雄二、林稔展、松本幸二郎、柳謙二、市川辰樹、石川博基、濱崎圭輔、石井伸子、江口勝美： α -fetoprotein (AFP) 遺伝子発現ベクターを用いた肝癌免疫治療の基礎的検討

第 39 回日本肝臓学会総会、2003.05.22-05.23、福岡

6) 石川博基、中尾一彦、松本幸二郎、市川辰樹、濱崎圭輔、江口勝美：angiostatin 遺伝子を用いた肝癌に対する抗血管新生遺伝子治療の基礎的検討

第 39 回日本肝臓学会総会、2003.05.22-05.23、福岡

7) 市川辰樹、中尾一彦、濱崎圭輔、石川博基、重野賢也、中川祐一、大畑一幸、西村大介、柳謙二、佐伯哲、松本幸二郎、江口勝美：Calcineurin inhibitor による interferon の細胞内シグナルの干渉

第 7 回日本肝臓学会大会、2003.10.15-10.16、大阪

8) 中尾一彦、濱崎圭輔、大畑一幸、市川辰樹、石川博基、西村大介、佐伯哲、松本幸二郎、石井伸子、江口勝美：インターフェロンレセプター (IFNAR2) 遺伝子プロモーター領域の SNP と B 型肝炎ウイルスキャリアア予後との関連

第 7 回日本肝臓学会大会、2003.10.15-10.16、大阪

9) 濱崎圭輔、中尾一彦、松本幸二郎、佐伯哲、西村大介、大畑一幸、石川博基、江口勝美：B 型肝炎ウイルスに対する siRNA の抗ウイルス作用の検討

第 7 回日本肝臓学会大会、2003.10.15-10.16、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし