

課題番号 : 27指1302  
研究課題名 : B型慢性肝炎完治に向けた核酸アナログ製剤の新規効能効果の発見とその基礎的・臨床的検討  
主任研究者名 : 青木孝彦  
分担研究者名 : 村田一素

キーワード : B型慢性肝炎、IFN- $\lambda$ 3、核酸アナログ製剤  
研究成果 :

(1) B型肝炎治療薬である核酸アナログ製剤のうち、アデフォビル、テノフォビル (nucleotide analogs)を服用中の患者血清 interferon (IFN)- $\lambda$ 3 が有意に高値であった。

アデフォビル (ADV)、あるいはテノフォビル (TDF)服用中の患者血清で、IFN- $\lambda$ 3 が高値あることを発見した。それらの経時血清を用いた検討では、それら薬剤の内服後に血清 IFN- $\lambda$ 3 は上昇した。さらに、同現象は核酸アナログ製剤内服中の HIV 患者でも認められたことから、ADV あるいは TDF 自体が IFN- $\lambda$ 3 を誘導しているものと考えられた。

(2) Vitro における ADV あるいは TDF による IFN- $\lambda$ 3 誘導の証明

ADV あるいは TDF が IFN- $\lambda$ 3 を誘導することを各種細胞株およびヒト primary cell を用いて証明した。様々な臓器由来の細胞を用いたが、唯一、ADV, TDF にて IFN- $\lambda$ 3 が誘導されたのは大腸癌細胞株のみであった。同細胞を用いた実験では、ADV, TDF は容量依存性に IFN- $\lambda$ 3 を誘導し、mRNA IL-28B も up-regulate した。また、免疫組織化学染色においても ADV, TDF は有意に同細胞にて IFN- $\lambda$ 3 を誘導することを証明した。以上より、ラミブジン (LAM), エンテカビル (ETV) といった nucleoside analogs 製剤ではなく、ADV, TDF といった nucleotide analogs 製剤が直接、大腸癌細胞株において IFN- $\lambda$ 3 を誘導することを証明した。

(3) 誘導された IFN- $\lambda$ 3 は、抗 HBV 作用を持つ

Recombinant IFN- $\lambda$ 3 を HBs 抗原のみを産生する肝癌細胞株 (PLC/PRF/5 細胞)に添加すると recombinant IFN- $\lambda$ 3 の容量依存性に HBs 抗原産生量を低下させた。また、ADV 処置大腸癌細胞株上清を肝癌細胞株に添加すると 12 時間をピークに interferon-stimulated gens (MX1, OAS2) が誘導された。エンテカビル (ETV) 処置培養上清では、その誘導は有意に低値であった。さらに ADV または ETV で処理した大腸癌細胞株 (WiDr)の上清を PLC/PRF/5 細胞に添加し、上清中の HBs 抗原量を測定すると ADV で処理した上清は PLC/PRF/5 細胞からの HBs 抗原産生量を低下させた。以上より、経口投与された ADV, TDF は消化管にて IFN- $\lambda$ 3 を誘導し、誘導された IFN- $\lambda$ 3 は門脈を介して肝に至ることから、誘導された IFN- $\lambda$ 3 は肝において直接的、あるいは ISG を介して間接的に抗 HBV 効果を示すものと考えられた。

(4) IFN- $\alpha$  (type I IFN)と核酸アナログ製剤の同時投与は IFN- $\lambda$ 3 (type III IFN)産生を相加的に増加させる

ADV または TDF 処置大腸癌細胞株に、IFN- $\alpha$ を追加すると IFN- $\lambda$ 3 は相加的に増加した。さらに経口投与可能な IFN- $\alpha$ 誘導剤でも同様の結果が得られた。

## <結論>

核酸アナログ製剤は、HBV の逆転写酵素を阻害することによって抗ウイルス効果を示す。しかし、我々は世界で初めて、核酸アナログ製剤のうち、ADV、TDF のみが IFN- $\lambda$ 3 を直接誘導することを発見した。さらに、大腸癌細胞株のみで IFN- $\lambda$ 3 が誘導されたことから以下の作用が予想された。経口投与された ADV または TDF は腸管より吸収される際に IFN- $\lambda$ 3 を誘導し、誘導された IFN- $\lambda$ 3 は門脈を介して肝細胞に達し、IFN- $\lambda$ 3 により直接 HBV 複製が抑制され、また同部位にて ISG が誘導される結果、抗 HBV 効果を示すものと考えられた。これらの結果は、最近の本邦の ETV と TDF の無作為試験において、TDF 投与群で HBsAg がより低下するという結果を支持するものと考えられ、今後の新たな治療戦略に有望と考えられる。上記結果は Gut (impact factor: 14.9) に掲載された。

Subject No. : 27 指 1302  
Title : Induction of IFN- $\lambda$ 3 as an Additional Effect of Nucleotide, Not Nucleoside, Analogs: A New Potential Target for Hepatitis B Virus Infection  
Researchers : Kazumoto Murata, Yoshihiko Aoki  
Key word : chronic hepatitis C, IFN- $\lambda$ 3, nucleos(t)ide analogs  
Abstract :

**(1) Nucleotide analogs (adefovir; ADV, tenofovir; TDF) induce IFN- $\lambda$ 3**

We found high serum IFN- $\lambda$ 3 levels in patients treated with ADV or TDF, not lamivudine (LAM), or entecavir (ETV). In vitro examination clearly revealed ADV or TDF induces IFN- $\lambda$ 3 only in colon cancer cell lines. Recombinant IFN- $\lambda$ 3 inhibited HBsAg production from PLC/PRF/5 cells. ADV induces interferon-stimulated genes, compared with ETV. Taken together, orally treated ADV, TDF goes to gastrointestinal (GI) tracts where they induce IFN- $\lambda$ 3. Induced IFN- $\lambda$ 3 goes to the liver through portal vein. Therefore, this phenomenon is clinically important for novel treatment against hepatitis B virus (HBV) infection.

**(2) Nucleotide analogs (ADV, TDF) inhibits IL-10 and reciprocally induces IL-12, TNF- $\alpha$**

We treated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with nucleos(t)ide analogs, following stimulation with lipopolysaccharide (LPS). We found ADV, TDF inhibited IL-10, and reciprocally induced IL-12, TNF- $\alpha$  by BioPlex assay. These results may suggest that combination of ADV or TDF are expected to have anti-HBV effect through activation of cytotoxic lymphocytes or natural killer cells as well as direct effect of IL-12.

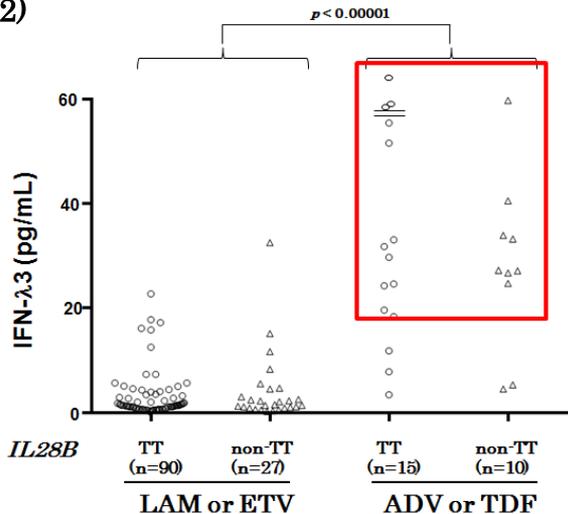
**< Conclusion >**

ADV or TDF induces IFN- $\lambda$ 3 in the GI tract, which goes to the liver through portal vein, following showing anti-HBV effect by direct or indirect (through up-regulation of interferon-stimulated genes). ADV or TDF also inhibits IL-10 production from monocytes, when PBMC are stimulated with LPS, following induction of IL-12 or TNF- $\alpha$ . These cytokine changes may activate cytotoxic lymphocytes or natural killer cells, which may contribute to immunological anti-HBV effects. These effects of ADV, TDF may provide a novel insight and strategies against HBV treatment.

# 「B型慢性肝炎完治に向けた核酸アナログ製剤の新規効能効果の発見とその基礎的・臨床的検討」

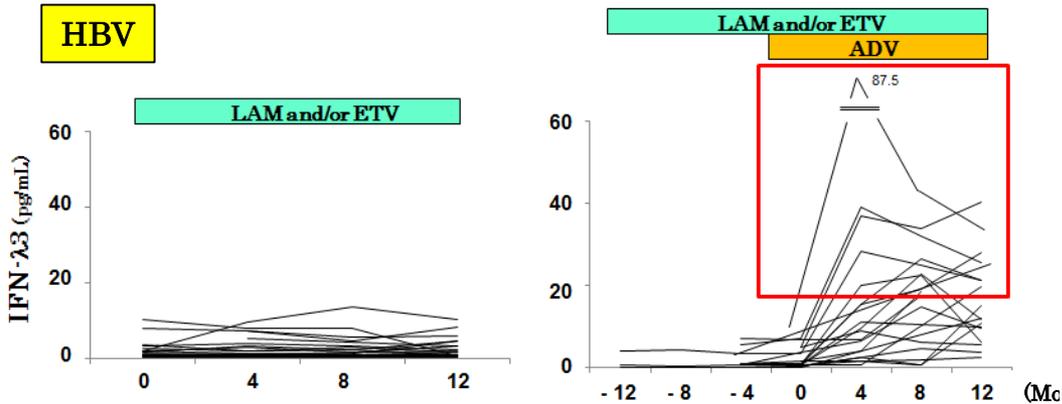
(2013年9月18日国立国際医療研究センター倫理委員会承認: NCGM-A-000208-00)

Nucleos(t)ide analogs treatment  
(n=142)



ADV, TDF内服患者でIFN-λ3↑

HBV



ADV, TDFの投与とともにIFN-λ3↑(病態に係らず)

国際医療研究開発費 (27指1302)

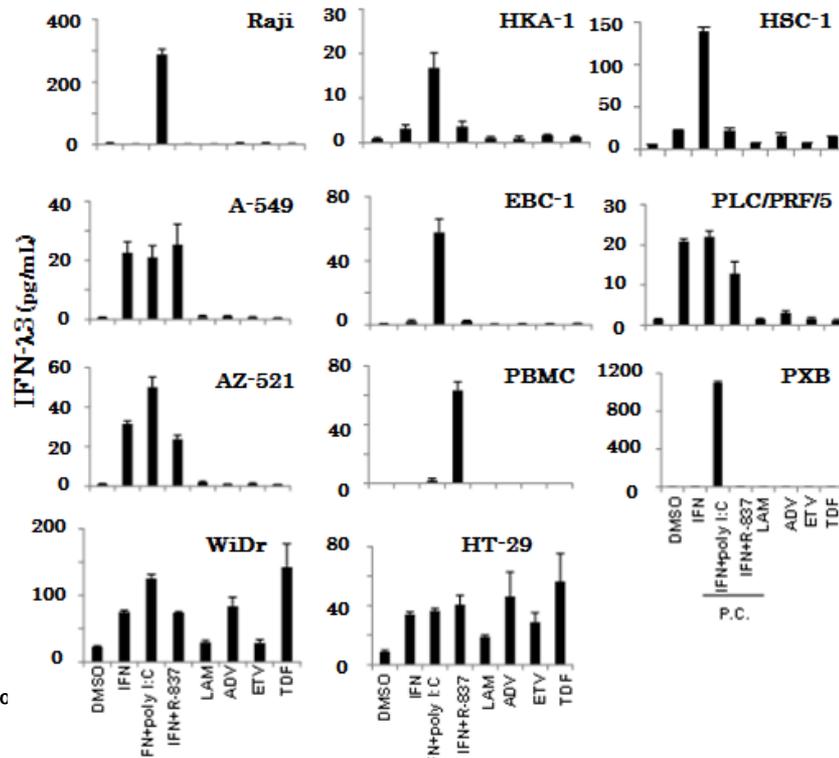
(研究代表者: 村田一素) H27年度: 750万円

H28年度: 560万円

(研究代表者: 青木孝彦)

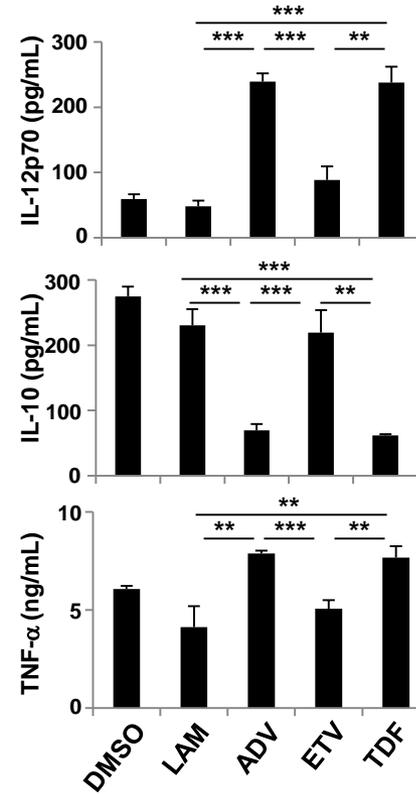
H29年度: 310万円

In vitro examination

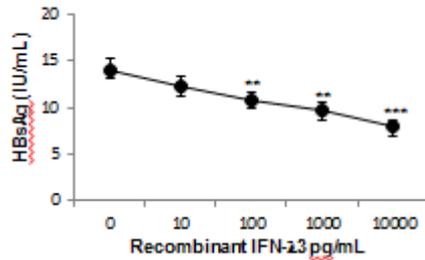
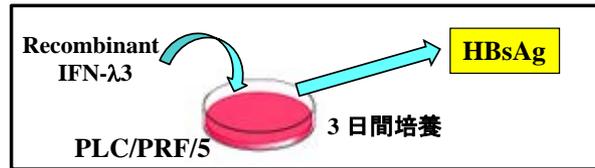
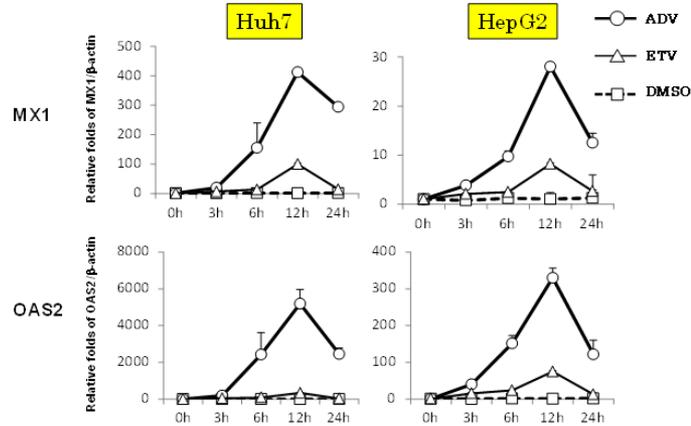
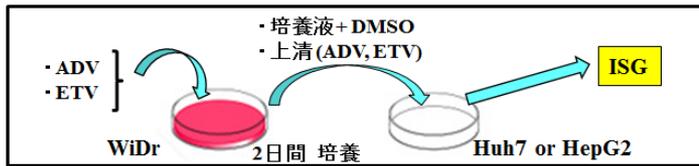


ADV, TDFが大腸癌細胞にてIFN-λ3を誘導

## PBMC + nucleos(t)ide analogs + LPS



ADV, TDFがIL-10を抑制し、IL-12, TNF-αを誘導



IFN-λ3は直接的あるいはISGを介してHBsAg↓

課題番号 : 27指1302  
研究課題名 : B型慢性肝炎完治に向けた核酸アナログ製剤の新規効能効果の発見とその基礎的・臨床的検討  
分担課題名 : 核酸アナログ製剤のIL-10産生抑制機序の解明  
主任研究者名 : 青木孝彦  
分担研究者名 : 村田一素

キーワード : B型慢性肝炎、IFN- $\lambda$ 3、核酸アナログ製剤  
研究成果 :

**(1) B型肝炎治療薬である核酸アナログ製剤のうち、アデフォビル、テノフォビル (nucleotide analogs) は末梢血リンパ球に作用して IL-10 を抑制し、IL-12, TNF- $\alpha$ を誘導した。**

複数名の健康成人より末梢血リンパ球 (PBMC)を抽出し、各核酸アナログ製剤 (ラミブジン : LAM, アデフォビル : ADV, エンテカビル : ETV, テノフォビル : TDF) で処理した後に、lipopolysaccharide (LPS)で刺激をし、その上清中のサイトカインを BioPlex assay を用いて網羅的に解析すると ADV, TDF が有意に IL-10 を抑制し、IL-12, TNF- $\alpha$ を誘導することが判明した。さらに B 型肝炎患者の PBMC を用いて同実験を行ったが同様のパターンを示した。唯一、肝硬変患者の PBMC では全体的なサイトカイン産生能は低下していたが、ADV, TDF が IL-10 を抑制し IL-12, TNF- $\alpha$ を誘導する点は同じであった。

**(2) ADV, TDF は monocyte からの IL-10 を抑制する。**

IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ の各種抗体、リコンビナント蛋白を用いて上記実験を行うと、IL-12, TNF- $\alpha$  は IL-10 のリコンビナント蛋白の併用にて容量依存性に増加し、IL-10 抗体の併用にて容量依存性に低下した。すなわち、上記反応は ADV, TDF が IL-10 産生を低下させることが主反応であり、その反応により IL-12, TNF- $\alpha$ が誘導されていることが判明した。

**(3) ADV, TDF は mammalian target of rapamycin (mTOR)経路を抑制することで IL-10 を抑制する**

PBMC を各種核酸アナログ製剤で処理した後に LPS で刺激し、MAPK 経路および mTOR 経路に関するリン酸化抗体を調べると Akt, p70S6K といった mTOR 経路の蛋白のリン酸化が ADV, TDF によって抑制されていた。さらに、PBMC に mTOR 阻害剤を投与すると IL-10 が抑制され、かつ IL-12, TNF- $\alpha$ が誘導されるといった (1)で見られた現象を再現できた。

**<結論>**

核酸アナログ製剤のうち、ADV, TDF は LPS で刺激した場合に monocyte からの IL-10 を抑制し、その反応により IL-12, TNF- $\alpha$ が誘導されることが判明した。本機序の解明は世界初であることから (IL-12 の誘導は NK 細胞、T 細胞を賦活し、ウイルス排除に向かう) 新たな治療標的として重要であると考えられる。

## 研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1302

研究課題名： B型慢性肝炎完治に向けた核酸アナログ製剤の新規効能効果の発見とその基礎的・臨床的検討

主任研究者名： 青木孝彦

### 論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Induction of IFN-λ3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogs: a new potential target for hepatitis B virus infection	Murata K, Asano M, Matsumoto A, Sugiyama M, Nishida N, Tanaka E, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N, Shirasaki T, Honda M, Kaneko S, Gatanaga H, Oka S, Kawamura IY, Dohi T, Shuno Y, Yano H, Mizokami M	Gut	in press	2016

### 学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
核酸アナログ製剤投与による新規発見サイトカインFactor Xの誘導とそれに伴うHBs抗原低下作用	村田一素、松本晶博、溝上雅史	日本肝臓学会	東京	2015年10月
IFN-λ3 induction by nucleoside, not nucleotide, analogs and its clinical significance in HBV patients	Murata K, Matsumoto A, Inoue T, Sakamoto M, Sugiyama M, Enomoto N, Tanaka E, Mizokami M	American Association for the Study of Liver Diseases	San Francisco	2015年11月
Induction of IFN-λ3 by ASDV or TDF in HBV patients	Murata K, Matsumoto A, Inoue T, Sakamoto M, Sugiyama M, Enomoto N, Tanaka E, Mizokami M	Asian Pacific Association for the Study of the Liver	Tokyo	2016年2月
Nucleotide analogsによるIFN-λ3およびISG誘導とその臨床的意義	村田一素、本多政夫、溝上雅史	日本消化器病学会	東京	2016年4月

研究発表及び特許取得報告について

アデフォビル、テノフォビルによるIFN-λ3誘導とそのHBs抗原低下効果	村田一素、本多政夫、溝上雅史	日本肝臓学会	千葉	2016年5月
IFN-λ3 induction by nucleotide, not nucleoside, analogs and its clinical significance in HBV patients	Murata K, Matsumoto A, Inoue T, Sakamoto M, Sugiyama M, Enomoto N, Tanaka E, Mizokami M	American Association for the Study of Liver Diseases	Boston	2016年11月
Induction of IFN-λ3 as an additional pharmacological effect of ADV or TDF: A new potential target for HBV infection	Murata K, Matsumoto A, Inoue T, Sakamoto M, Sugiyama M, Enomoto N, Tanaka E, Mizokami M	Asian Pacific Association for the Study of the Liver	Beijing	2016年12月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。  
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと