

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 : 村田一素

分担研究者名 : なし

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。

C型慢性肝炎治療における interleukin (IL)-28B の臨床的意義については確立されているが、B型慢性肝炎においては明らかにされていない。そこで、B型慢性肝炎 254例における血清 IFN- $\lambda$ 3 を測定したところ、病態との関連は見いだせなかった。しかし、その評価中にアデフォビル (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、その経時血清を用いた検討にて、それら薬剤の内服と共に血清 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 誘導による IFN- $\lambda$ 3 の産生組織を推測するために IFN- $\lambda$ 3 産生の報告があるリンパ球、皮膚、肺、肝、消化管の各細胞株を用いて、核酸アナログ製剤によって IFN- $\lambda$ 3 を誘導可能な細胞株についてスクリーニングを行った。すべての細胞株は陽性コントロール (IFN- $\alpha$ および Toll-like receptor (TLR)3 agonist または TLR7 agonist)のいずれかの投与にて IFN- $\lambda$ 3 を産生したことから、スクリーニングを行ったすべての細胞で IFN- $\lambda$ 3 産生能があることが確認された。しかし、核酸アナログ製剤 (ADV または TDF)にて IFN- $\lambda$ 3 産生を認めたのは大腸癌細胞株のみであった。さらに、それは薬剤容量依存性で、mRNA レベル、免疫組織化学染色でも確認できたことから、ADV または TDF の直接刺激にて IFN- $\lambda$ 3 が産生されることを確認した。

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

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 Recombinant IFN- $\lambda$ 3 および ADV 処置大腸癌細胞株上清を HBsAg 産生肝癌細胞株に添加すると有意に HBsAg 低下作用を認めた。

(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。

## <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。上記結果をまとめて現在投稿中である。

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  
Key word : chronic hepatitis C, IFN- $\lambda$ 3, nucleos(t)ide analogs  
Abstract :

### **(1) High serum IFN- $\lambda$ 3 levels in patients treated with nucleotide analogs**

A critical role of interferon (IFN)- $\lambda$ 3 is established in chronic hepatitis C; however, its clinical significance for hepatitis B virus (HBV) infection remains elusive.

Serum IFN- $\lambda$ 3 was measured in 254 HBV patients by a chemiluminescence enzyme immunoassay. There were no differences in serum IFN- $\lambda$ 3 levels among patients with respect to disease progression, *IL-28B* polymorphisms, or hepatitis B e antigen positivity status. However, serum IFN- $\lambda$ 3 levels were higher in patients treated with ADV or tenofovir disoproxil fumarate (TDF), compared with those treated with lamivudine (LAM) or ETV, without any differences in their clinical backgrounds, which was confirmed by serial measurements within each patient. Interestingly, similar observation was obtained in human immunodeficiency virus (HIV) infection treated with TDF, suggesting nucleotide analogs themselves induce IFN- $\lambda$ 3.

### **(2) Induction of IFN- $\lambda$ 3 *in vitro***

To confirm the induction of IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\lambda$ 3 was quantified by treating several cell lines with different origins (lymphocytes, skin, lung, gastrointestinal tracts, liver) that were reported to have its potential production. All the cells tested produced IFN- $\lambda$ 3 by positive controls, but only colon cancer cells produced IFN- $\lambda$ 3 by nucleos(t)ide analogs. ADV or TDF induced IFN- $\lambda$ 3 production only in colon cancer cells in a dose-dependent manner, which was further confirmed by up-regulation at the mRNA level and positive immunohistochemical staining.

### **(3) Anti-HBV effects of induced-IFN- $\lambda$ 3**

The supernatant of ADV-treated cells significantly up-regulated interferon-stimulated genes (MX1 and OAS2), and inhibited HBsAg production in hepatoma cells, compared with those of ETV-treated cells, as well as recombinant IFN- $\lambda$ 3.

### **(4) Additive effects of IFN- $\alpha$ on IFN- $\lambda$ 3 production**

IFN- $\lambda$ 3 production was enhanced when colon cancer cells were treated with ADV or TDF, together with IFN- $\alpha$ .

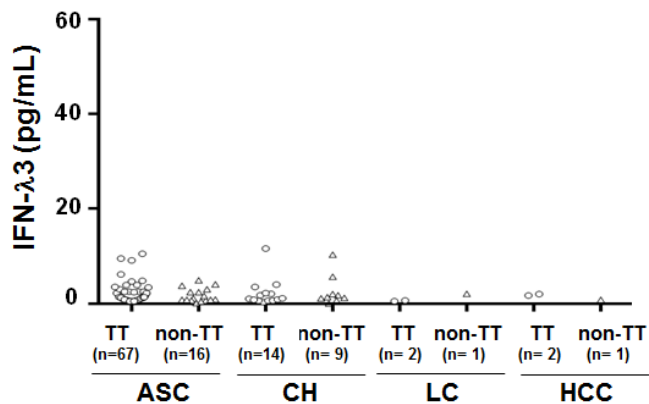
### **<Conclusions>**

Nucleos(t)ide analogs target reverse-transcriptase of HBV. We provide the first demonstration that nucleotide analogs (ADV and TDF) have an additional effect to induce IFN- $\lambda$ 3. Oral administration of nucleotide analogs induces IFN- $\lambda$ 3 in the gastrointestinal tracts, which flow into the liver via portal veins, where it may inhibit HBV directly or via ISG. Our findings could provide novel insights and potential targets of HBV treatment.

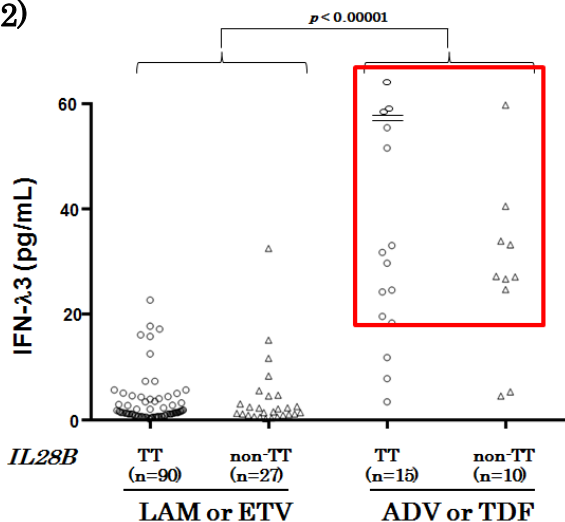
# 「B型慢性肝炎完治に向けた核酸アナログ製剤の新規効能効果の発見とその基礎的・臨床的検討」

(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)

Treatment-naïve  
(n=112)



NUC treatment  
(n=142)

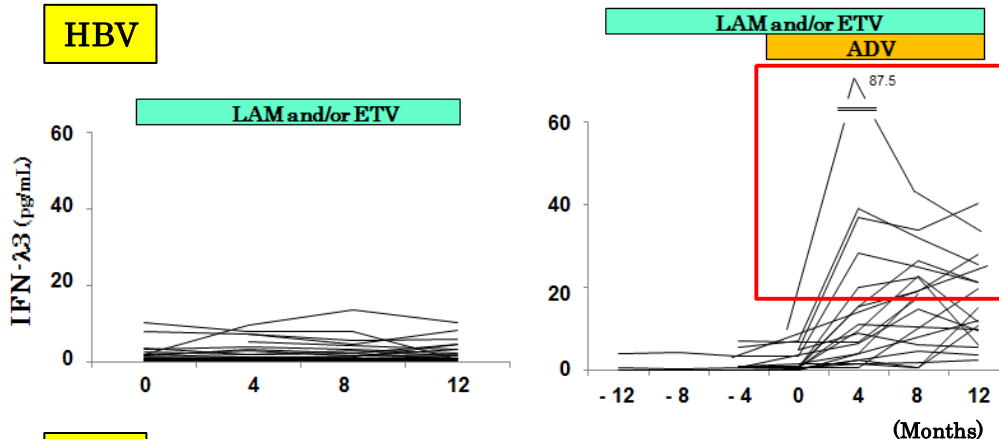


ADV, TDF内服患者でIFN-λ3↑

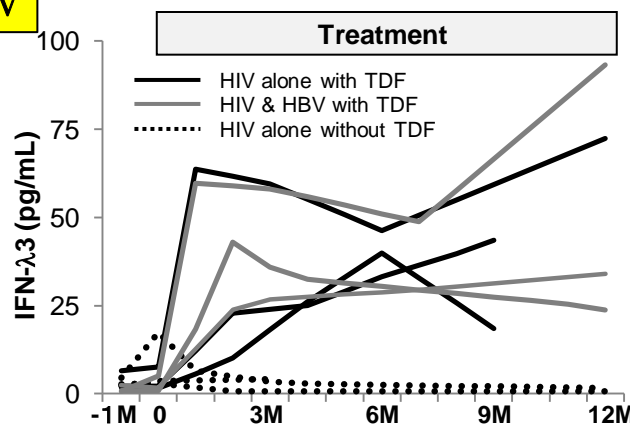
国際医療研究開発費 (27指1302)

(研究代表者: 村田一素) H27年度: 750万円

HBV

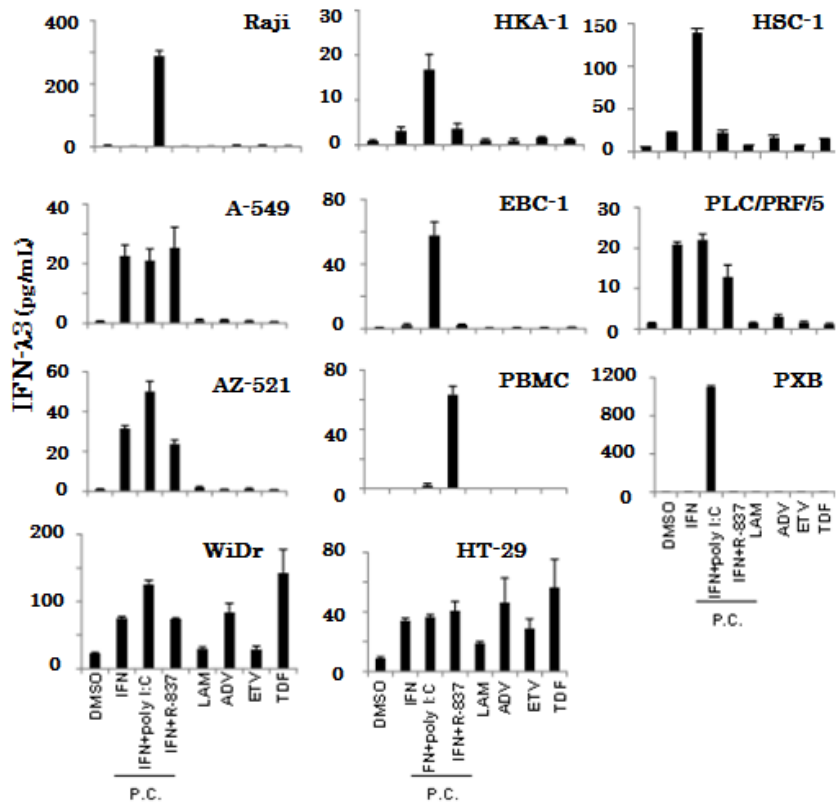


HIV

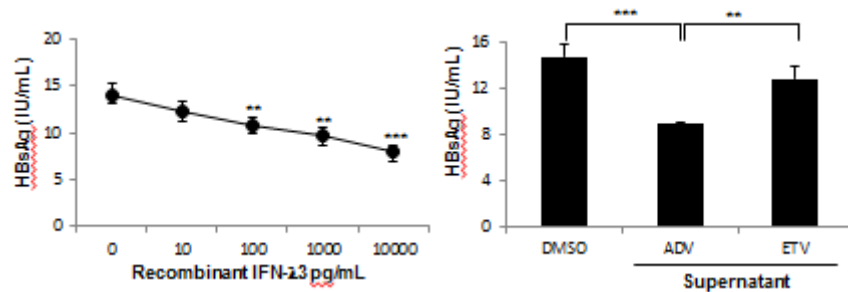
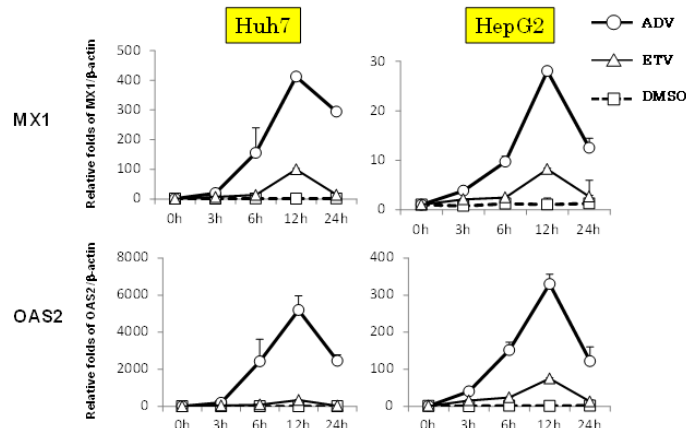
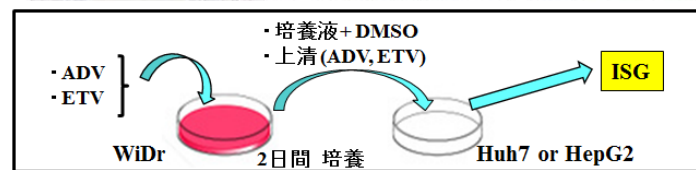
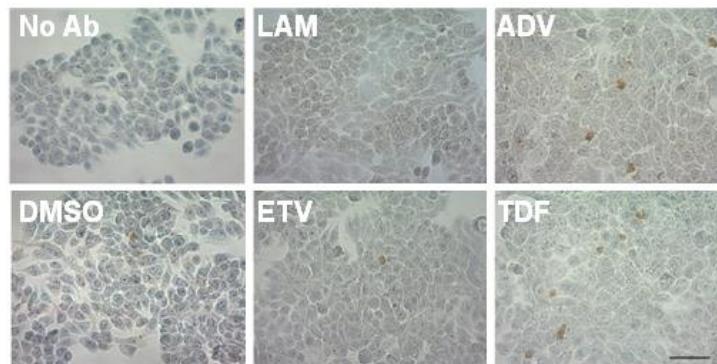


ADV, TDFの投与とともにIFN-λ3↑(病態に係らず)

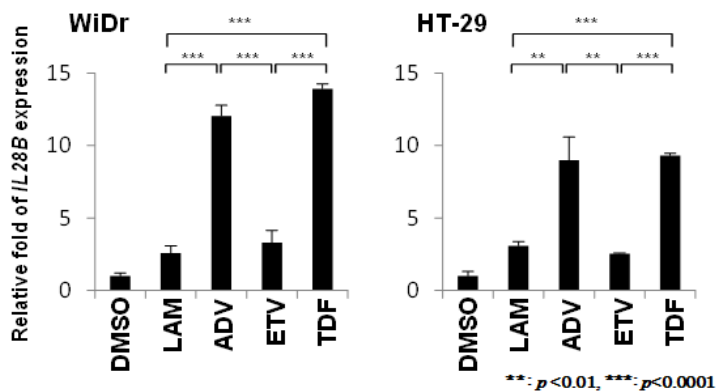
# Screening



# 免疫組織化学染色



# mRNA IL-28B



ADV, TDFは大腸癌細胞株でIFN-λ3を誘導

IFN-λ3は直接的あるいはISGを介してHBsAg↓

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：村田一素

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Association of serum IFN-λ3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection.	Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, et al	J Gastroenterol	50 (8)	2015
A thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus.	Hiramine S, Sugiyama M, Murata K, et al	J Gastroenterol	50 (10)	2015
Regional disparities in interferon therapy for chronic hepatitis C in Japan: a nationwide retrospective cohort study.	Masaki N, Yamagiwa Y, Murata K, et al	BMC Public Health	15	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
核酸アナログ (NA)/Peg-IFNシークエンシャル治療におけるHBs抗原量低下予測因子の検討	松本晶博、村田一素、田中榮司	第51回 日本肝臓学会総会	熊本	2015. 5. 21-22
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	JDDW 2015	東京	2015. 10. 8-11
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,	The 66th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases	San Francisco, USA	2015.11.13-17

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
インターフェロン治療効果予測方法及びそれを用いたB型肝炎患者の治療用医薬組成物	特願2015-068502	村田一素、溝上雅史、杉山真也	H27. 3. 30	日本

※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。