

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09448

研究課題名(和文) 核酸アナログ製剤によるサイトカイン誘導とB型肝炎ウイルス排除を目指した基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study for HBV clearance using cytokines induced by nucleotide analogues

研究代表者

村田 一素 (MURATA, KAAUMOTO)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40345971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 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(ADV)、テノフォビル(TDF)には interferon (IFN)-lambda3を誘導すること、末梢血リンパ球からのinterleukin (IL)-10産生を抑制し、IL-12を誘導することを見出した。また、IFN-alphaの同時投与は、それぞれ相加・相乗効果を示した。の原因として癌細胞で亢進しているシグナルを抑制することを示した。また、さらに強力にIFN-lambda3を誘導する候補薬剤を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究にて、現在使用されている核酸アナログ製剤のうちADV・TDFには、B型肝炎ウイルス(HBV)排除に有利な免疫状態を誘導するという追加効果があることが判明した。さらに、強力にIFN-lambda3を誘導する候補薬剤も見出した。また、ADV・TDFは肝発癌抑制効果があることも見出したことから、これらを利用したHBV排除、発がん抑制に関する新たな治療戦略が構築されることが考えられる。

研究成果の概要(英文)： We found that adefovir (ADV) or tenofovir (TDF) induced IFN-lambda3, and inhibited interleukin (IL)-10 and induced IL-12, all of which immunologically lead toward hepatitis B virus (HBV) elimination. Combination of ADV or TDF with IFN-alpha showed additional and synergistic effects on those cytokines production. A mechanistic analysis revealed that ADV or TDF inhibited signals that enhanced in tumor cells. We also found several powerful inducers by screening.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：B型肝炎 サイトカイン 免疫賦活 核酸アナログ製剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における C 型肝炎ウイルス (HCV) による肝臓死亡数は同治療開始より減少傾向にあるが、近年のウイルス排除が可能な経口剤の登場により、将来的にその肝臓死亡数はさらに減少するものと予想される。一方、B 型肝炎ウイルス (HBV) による肝臓死亡数は、母子感染対策としての HBV ワクチンの開始 (1984 年)、核酸アナログ製剤 (NUC) の開始 (2000 年にラミブジンが保険収載された) にも係らず、この 40 年間は未だ減少傾向を認めていない。NUC の登場により HBV の制御は良好となり、炎症の抑制および肝臓の出現抑制が可能となってきたにも係らず、肝臓死亡数が減少しない理由の一つとして、NUC は HBV の逆転写酵素を阻害し、ウイルス増殖を抑制するが、肝細胞核内に形成された cccDNA (covalently closed circular DNA) には効果がないことが挙げられる。cccDNA はウイルスのいわゆる“鋳型”となり、ウイルス精製に關与するためである。cccDNA を排除しない限り、NUC にて血清中の HBV DNA が検出感度以下になったとしても、服薬の中止にて容易に再発をきたし、重症肝臓障害をきたす恐れがある。そのために B 型慢性肝炎患者は数十年という単位で NUC の内服が必要で (Bogliione L, et al. *Liver Int* 2013)、患者の負担および医療経済を考慮するとウイルス排除あるいは off-therapy は重要な課題である。肝臓の出現率は HBs 抗原の陰性化に伴い低下することから、現在では HBs 抗原の消失が治療目標となっている (Tseng TC, et al. *Gastroenterology* 2012)。一方、インターフェロン (IFN) は cccDNA や他の様々な複製過程に作用し、HBs 抗原消失も期待されるが小数例にしか効果がない。すなわち、現在の治療法では HBV の制御は可能であるが、ウイルス排除には至らないため、新たな治療戦略が求められている。

最近、我々は NUC のうち、nucleoside analog (ラミブジン、エンテカビル) ではなく、nucleotide analog (アデフォビル、テノフォビル) には HBV の逆転写酵素阻害以外に長官細胞にて IFN- λ 3 を誘導するという新たな薬理的追加効果があることを世界に先駆けて発見した (Murata K, et al. *Gut* 2018)。IFN- λ 3 には HBV の複製を抑制するとの報告があること、さらに我々の検討においても IFN- λ 3 は肝細胞内で interferon-stimulated genes (ISG) を誘導し、かつ HBs 抗原低下作用を認めたとことから、nucleotide analog を用いた治療戦略が期待される。しかし、このような追加作用を持っていても現実では nucleotide analog の単独療法で HBs 抗原が消失することはまれであることから何らかの工夫が必要である。また、最近、nucleotide analog であるテノフォビルと Peg-IFN との併用療法にて今までになく高い確率で HBs 抗原の消失が得られたとの報告がなされた (Marcellin P, et al. *Gastroenterology* 2016)。このことは、IFN- α と nucleotide analog の併用が IFN- λ 3 産生に何らかの影響を及ぼすことを示唆している。また、NUC 投与中の HIV 患者においてラミブジン (nucleoside analog) 投与中では、急性 B 型肝炎の発症が認められたが、テノフォビル (nucleotide analog) 投与中では、まったく感染が認められなかった (Gatanaga H, et al. *Clin Infect Dis* 2013)。この現象は単に HBV 逆転写酵素阻害作用のみでは説明が付かず、nucleotide analog 製剤が IFN- λ 3 以外の宿主免疫に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

B 型慢性肝炎では、NUC の登場によって病態のコントロールは容易になったものの、ウイルス排除に至る例は少なく、ほとんどの症例では何十年もの NUC 継続内服が必要である。最近、我々は NUC のうち、nucleotide analog が単に HBV の逆転写酵素を阻害するだけでなく、腸管細胞における IFN- λ 3 誘導という追加薬理効果があることを発見した。IFN- λ 3 による抗 HBV 効果は既に報告されていることから治療への展開が期待される。そこで本研究では、nucleotide analog の IFN- λ 3 産生機序の解明、高 IFN- λ 3 を誘導する薬剤の探索、IFN- α との併用療法の基礎的解析、

などから HBV 排除を目指した治療を模索していく。

3. 研究の方法

腸管細胞における nucleotide analog 製剤による IFN- λ 3 誘導機序の解明

我々は既に 5 種類の大腸癌細胞のうち、IFN- λ 3 を産生する株と非産生株があることを突き止めている。そこで、それらの発現遺伝子の差異について microarray を用いて解析した。責任遺伝子候補が判明したため、siRNA を用いた抑制 (knock-out, KO) および責任遺伝子欠損細胞に同遺伝子を導入 (knock-in, KI) し、nucleotide analog による IFN- λ 3 誘導能を解析した。また、同細胞株 (KO, KI) を樹立し、nucleotide analog による IFN- λ 3 誘導能を解析した。

低分子化合物ライブラリーを用いた IFN- λ 3 誘導物質のスクリーニングおよび解析

アデフォビルやテノフォビルに IFN- λ 3 誘導作用があることは証明したが、臨床ではそれらの単独療法では HBs 抗原低下などの効果は明らかでない。そこで、さらに強力に IFN- λ 3 を誘導するような物質の探索を行い、臨床応用を目指す。まず、大量にかつ簡便にスクリーニングを行うために IL-28B プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド(当研究室に既に保有)を IFN- λ 3 産生能を有する大腸癌細胞に導入し、stable cell line を樹立する。それを用いて低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。

Nucleotide analog によるサイトカイン誘導能の証明およびその機序の解明

前述したように我々は preliminary 実験において、nucleotide analog が末梢血リンパ球に作用して、あるサイトカインの産生を抑制することを確認している。そこで、健常者約 20 名、B 型慢性肝炎患者 約 40 名から採血し、リンパ球を精製し、サイトカイン産生についての確認を行った。また、健常者と肝炎患者でのサイトカイン産生能について比較検討した。なお、本研究は倫理審査で承認されている。さらに、その機序の解析のために magnetic-activated cell sorting (MACS)を用いて各種血球細胞の除去あるいは精製を行い、同サイトカインの産生責任細胞を探索した。さらに、同サイトカイン産生責任細胞を用いて、サイトカイン産生におけるシグナル伝達路を western blotting や各種シグナル阻害剤を用いて探索した。

IFN- α との併用による IFN- λ 3 および他サイトカインの誘導能の変化

臨床的にテノフォビルと Peg-IFN の併用療法にて、高率に HBs 抗原消失例が認められたことから、大腸癌細胞株を用いて各種核酸アナログ製剤単独と IFN- α との併用時における IFN- λ 3 誘導能を比較検討した。さらに、経口 IFN- α 誘導剤(市販)を用いて、同様の実験を行った。

4. 研究成果

腸管細胞における nucleotide analog 製剤による IFN- λ 3 誘導機序の解明

我々は、nucleotide analog (アデフォビル、テノフォビル)による IFN- λ 3 誘導には、X 因子(論文投稿中のため、仮称とする)が必要不可欠であることを発見した。IFN- λ 3 誘導機序が判明したため、今後、創薬に発展させていきたい。

低分子化合物ライブラリーを用いた IFN- λ 3 誘導物質のスクリーニングおよび解析

既存薬物低分子化合物ライブラリーの約 7,000 化合物をスクリーニングし、いくつかのヒット化合物を同定した。今後、詳細を検討し、創薬に発展させていきたい。

Nucleotide analog によるサイトカイン誘導能の証明およびその機序の解明

末梢血リンパ球を nucleotide analog (アデフォビル、テノフォビル) で培養した後に、lipopolysaccharide (LPS)にて刺激すると、interleukin (IL)-10 産生の抑制、IL-12 の誘導を認めた。nucleoside analog (ラミブジン、エンテカビル) では、このような効果は認めなかった。さらに、その機序の検討により、nucleotide analog は mammalian target of rapamycin (mTOR)経路のうち、Akt の細胞膜への移行を阻害することによって、Akt のリン酸化を阻害することが判明した。この成果は、Hepatology に掲載された。

IFN- α との併用による IFN- λ 3 および他サイトカインの誘導能の変化

nucleotide analog (アデフォビル、テノフォビル) と IFN- α との併用により、IFN- λ 3 産生は相加的に、IL-12 は相乗的に増加することを見出した。経口 IFN- α 誘導剤でも同様の効果を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 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	4. 巻 67
2. 論文標題 Induction of IFN-lambda3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for hepatitis B virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 362-371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2016-312653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto A, Nishiguchi S, Enomoto H, Kang JH, Tanaka Y, Shinkai N, Kurosaki M, Enomoto M, Kanda T, Yokosuka O, Yatsunami H, Nagaoka S, Okuse C, Kagawa T, Mine T, Takaguchi K, Saito S, Hino K, Ikeda F, Sakisaka S, Morihara D, Miyase S, Tsuge M, Chayama K, Hiramatsu N, Suzuki Y, Murata K, Tanaka E	4. 巻 53
2. 論文標題 Combinational use of hepatitis B viral antigens predicts responses to nucleos(t)ide analogue/peg-interferon sequential therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 247-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-017-1360-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata K, Saito A, Katagiri S, Ariizumi S, Nakano M, Yamamoto M	4. 巻 45
2. 論文標題 Association of des-gamma-carboxy prothrombin production and Sonazoid-enhanced ultrasound findings in hepatocellular carcinoma of different histologic grades	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Ultrason	6. 最初と最後の頁 223-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-017-0816-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村田一素、前仲勝実、溝上雅史	4. 巻 1
2. 論文標題 核酸アナログ製剤によるIFN-lambda誘導とそれを標的としたB型肝炎治療薬の探索	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mebio	6. 最初と最後の頁 80-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida N, Sugiyama M, Sawai H, Nishina S, Sakai A, Ohashi J, Khor SS, Kakisaka K, Tsuchiura T, Hino K, Sumazaki R, Takikawa Y, Murata K, Kanda T, Yokusuka O, Tokunaga K, Mizokami M	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the BTNL2 gene for response to a hepatitis B vaccine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.29876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawai H, Nishida N, Sugiyama M, Murata K, Hino K, Nishina S, Matsumoto A, Tanaka E, Sakamoto N, Ogawa K, Yamamoto K, Tamori A, Yokosuka O, Kanda T, Sakaida I, Itoh Y, Eguchi Y, Oeda S, Mochida S, Yuen MF, Seto WK, Poovorawan Y, Posuwan N, Mizokami M, Tokunaga K	4. 巻 8
2. 論文標題 Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26217-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue E, Murakawa M, Asahina Y, Murata K, Mizokami M, Watanabe M	4. 巻 49
2. 論文標題 The association of serum IFN- 3 levels with hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients treated with direct-acting antiviral agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 500-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada N, Murayama A, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Tanaka T, Moriishi K,	4. 巻 22
2. 論文標題 Anti-viral effects of interferon- 3 on hepatitis B virus infection in cell culture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 283-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata K, Kang JH, Nagashima S, Matsui T, Karino Y, Yamamoto Y, Atarashi T, Oohara M,	4. 巻 125
2. 論文標題 IFN- 3 as a host immune response in acute hepatitis E virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 154816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2019.154816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata K, Tsukuda S, Suizu F, Kimura A, Sugiyama M, Watashi K, Noguchi M, Mizokami M	4. 巻 71
2. 論文標題 Immunomodulatory mechanism of acyclic nucleoside phosphates in treatment of hepatitis B virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1533-1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村田一素、杉山真也	4. 巻 262
2. 論文標題 アデフォビル、テノフォビルによるIFN- 3誘導とその意義	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1327-1330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村田一素、前仲勝実、溝上雅史	4. 巻 1
2. 論文標題 核酸アナログ製剤によるIFN- 誘導とそれを標的としたB型肝炎治療薬の探索	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mebio	6. 最初と最後の頁 80-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 村田一素、前仲勝実、溝上雅史
2. 発表標題 IFN- λ を標的とした新規B型肝炎治療薬の探索
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Murata K, Sugiyama M, Otsuguro S, Maenaka K, Mizokami M
2. 発表標題 Induction of IFN- λ by ADV or TDF as a new potential target for HBV infection
3. 学会等名 International HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本晶博、村田一素、田中榮司
2. 発表標題 TDF/Peg-IFN併用療法におけるHBsAg量低下の初期反応
3. 学会等名 第21回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田一素、杉山真也、溝上雅史
2. 発表標題 新規治療薬探索のためのアデフォビル・テノフォビルによるIFN- λ 誘導機序の解明
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murata K, Sugiyama M, Mizokami M
2. 発表標題 Adefovir or tenofovir reciprocally augment pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated PBMC by inhibiting IL-10 production in CD14+monocytes
3. 学会等名 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田一素、杉山真也、溝上雅史
2. 発表標題 核酸アナログ製剤による免疫賦活サイトカイン誘導とそのIFN-alpha 併用効果
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata K, Sugiyama M, Mizokami M
2. 発表標題 Novel immune-modulatory and anti-tumor effect of acyclic nucleoside phosphonates
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata K, Sugiyama M, Mizokami M
2. 発表標題 Adefovir or tenofovir affects lipopolysaccharide-mediated cytokine production in CD14+monocytes through mammalian target of
3. 学会等名 International HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----