



Nagoya City University Academic Repository

学 位 の 種 類	博士（医学）
報 告 番 号	甲第1567号
学 位 記 番 号	第1122号
氏 名	浅野 麻衣
授 与 年 月 日	平成 29 年 3 月 24 日
学位論文の題名	<p>Induction of IFN-λ3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogs: a new potential target for hepatitis B virus infection</p> <p>(ヌクレオチド型核酸アナログ製剤による追加効果としての IFN-λ3 誘導について : B 型慢性肝炎治療における新たな標的の可能性)</p> <p>Gut. 2016 Oct 27. pii: gutjnl-2016-312653. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312653.</p>
論文審査担当者	<p>主査 : 田中 靖人</p> <p>副査 : 城 卓志, 溝上 雅史</p>

論 文 内 容 の 要 旨

C 型慢性肝炎において、interleukin-28B (IL-28B)の遺伝子多型は、ペグインターフェロン・リバビリン療法における治療効果と強い関連を示すことは良く知られている。IL-28B 遺伝子多型は、直接抗ウイルス効果を示す interferon (IFN)- λ 3 蛋白の発現に関連しているので、B 型慢性肝炎においても IL-28B 遺伝子多型と治療効果との関連が想定されるが、今までの遺伝子レベルでの検討では一定の見解は得られていない。その理由として、今までは遺伝子レベルのみの検討であったことが考えられるため、我々は蛋白レベルの検討が必要と考えた。そこで当施設にて独自に開発した IFN- λ 3 高感度測定系を用いて B 型慢性肝炎患者における血清 IFN- λ 3 値を測定し、その臨床的意義と核酸アナログ製剤(nucleos(t)ide analog, NUC)投与との関連性を検討した。

B 型慢性肝炎患者 254 例の血清 IFN- λ 3 値を測定したところ、病態や IL-28B 遺伝子多型との関連は認められなかった。しかし、nucleoside analog (lamivudine, LAM または entecavir, ETV) 投与中の患者と比較し、nucleotide analog (adefovir piroxil, ADV または tenofovir disoproxil fumarate, TDF)投与中の患者血清において高い IFN- λ 3 値を示すことを見出した。そこで、NUC 投与開始から経時的に採取した血清を用いて IFN- λ 3 値を測定すると nucleoside analog 投与では血清 IFN- λ 3 値の変化はなかったが、nucleotide analog 投与後に血清 IFN- λ 3 値は上昇し、高値を維持した。同現象は HIV 患者でも認められたことから、病態によるのではなく nucleotide analog そのものが IFN- λ 3 産生を誘導しているものと考えられた。

そこで、IFN- λ 3 産生の報告がある各種細胞株（皮膚、肺、肝、胃、大腸）を用いて nucleotide analog が IFN- λ 3 を誘導するかを検討した。これらの細胞株のうち、大腸癌細胞株のみで nucleotide analog は IFN- λ 3 を誘導し、さらに薬剤容量依存性を示した。また、nucleotide analog はメッセージレベルでも IL-28B を有意に発現させた。大腸癌細胞株を用いた免疫組織化学染色にて ADV, TDF 投与時に IFN- λ 3 蛋白陽性染色細胞数は LAM, ETV 投与時と比較して有意に多く認められた。

一方、リコンビナント IFN- λ 3 蛋白を HBs 抗原を産生する PLC/PRF/5 細胞に投与すると上清中の HBs 抗原は容量依存的に低下した。また、ADV または ETV で大腸癌細胞株を処理し、その上清を肝癌細胞株に投与して肝癌細胞株内の IFN-stimulated genes (ISGs)を解析すると ADV 投与時に有意に強く ISG を誘導した。さらに同上清を PLC/PRF/5 細胞に投与・培養し、上清中の HBs 抗原を測定すると ADV 処理上清は ETV 処理上清と比較して有意に HBs 抗原を低下させた。すなわち、経口投与された ADV, TDF が腸管細胞に到達し、腸管細胞にて IFN- λ 3 を誘導する。誘導された IFN- λ 3 は門脈を介し、肝内に流入すると IFN- λ 3 の直接効果、あるいは ISG を介した間接効果にて HBs 抗原を低下させると考えられた。本現象は、ETV または TDF 投与後の HBV DNA 量は同程度低下したにも関わらず、HBs 抗原量は TDF 投与群において ETV 投与群に比して有意に低下したという結果の説明になるものと考えられる。また、最近、ペグインターフェロン単独、TDF 単独よりも、ペグインターフェロンと TDF の併用療法で HBs 抗原消失例が多かったとする報告がなされた。大腸癌細胞株を TDF とインターフェロンを併用して培養すると誘導される IFN- λ 3 量は TDF 単独あるいはインターフェロン単独と比較して相加的に増加したことから、同臨床知見も IFN- λ 3 で説明可能と考えられる。

従来、NUC は B 型肝炎ウイルス (HBV)の逆転写酵素を阻害して HBV の増殖を抑制するのみと考えられてきたが、本研究によって ADV, TDF といった nucleotide analog には腸管細胞にて

IFN-λ3 を誘導するといった追加薬理効果があることを明らかとした。IFN-λ3 は IFN-alpha と異なり、副作用が少ないことが報告されていることもあり、IFN-λ3 を標的とした新たな B 型慢性肝炎治療の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Interleukin28B (IL28B)遺伝子は、直接抗ウイルス効果を示す interferon (IFN)- λ 3 蛋白の発現に関連しているので、B 型慢性肝炎においても治療効果との関連が想定されたが、今までの遺伝子レベルでの検討では一定の見解は得られていない。申請者は、B 型慢性肝炎患者 254 例の血清 IFN- λ 3 値を測定したところ、病態や IL-28B 遺伝子多型との関連は認めなかった。しかし、nucleoside analog (lamivudine, LAM または entecavir, ETV) 投与中の患者と比較し、nucleotide analog (adefovir pivoxil, ADV または tenofovir disoproxil fumarate, TDF) 投与中の患者血清において高い IFN- λ 3 値を示すことを報告した。同現象は HIV 患者でも認められたことから、病態によるのではなく nucleotide analog そのものが IFN- λ 3 産生を誘導しているものと考えられた。

そこで、IFN- λ 3 産生の報告がある各種細胞株（皮膚、肺、肝、胃、大腸）を用いて nucleotide analog が IFN- λ 3 を誘導するかを検討した。興味深いことに、これらの細胞株のうち、大腸癌細胞株のみで nucleotide analog は IFN- λ 3 を誘導し、それは薬剤容量依存性を示した。一方、リコンビナント IFN- λ 3 蛋白を HBs 抗原のみを産生する PLC/PRF/5 細胞に投与すると上清中の HBs 抗原は容量依存性に低下した。また、ADV または ETV で大腸癌細胞株を処理し、その上清を肝癌細胞株に投与して肝癌細胞株内の IFN-stimulated genes (ISGs)を解析すると ADV 投与時に有意に強く ISG を誘導した。以上より、ADV, TDF といった nucleotide analog は HBV の逆転写酵素を阻害して、その増殖を抑制するのみと考えられてきたが、本研究によってこれらの nucleotide analog には腸管細胞にて IFN- λ 3 を誘導するといった追加薬理効果があることが明らかとなった。IFN- λ 3 は IFN- α と異なり、副作用が少ないことが報告されていることもあり、IFN- λ 3 を標的とした新たな B 型慢性肝炎治療の可能性が示唆された。

審査委員会では、主査の田中教授より「今回の研究の背景、IFN- λ 3に注目した理由は何か?」、 「核酸アナログの中で、ADVまたはTDFの投与によりIFN- λ 3が誘導されるメカニズムは?」、「大腸癌細胞株のみIFN- λ 3が誘導される理由は何か?」など論文内容に関する10項目の質問、次に第一副査 城卓志教授より「IL28B SNPとIFN- λ 3蛋白量の関係」、「ADVまたはTDFの投与によりIFN- λ 3以外のサイトカインは出るか?」、「NucleotideとNucleosideの生理活性の違いはあるか?」、「IFN- λ 3 を誘導する薬剤開発の現状について」など研究内容と臨床面に関して10項目の質問があった。また指導教授である第二副査 溝上雅史教授より「IFN- λ 3の実験に関する質問」に加えて、「IFN- λ の種類について」、「B型肝炎の慢性化メカニズムについて」などの主科目を中心とした質問があったが、いずれも良好な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野（肝炎・免疫学分野）に関する知識を習得しているものと判断された。

本研究の結果より、ADV, TDFといったnucleotide analogは腸管細胞にてIFN- λ 3を誘導し、門脈を介し肝内に流入するとIFN- λ 3の直接効果、あるいはISGを介した間接効果にてHBs抗原を低下させるものと考えられた。今後、IFN- λ 3を標的とした新たなB型慢性肝炎治療の可能性が示唆された。よって本論文の著者には博士（医学）の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 田中靖人

副査 城卓志、溝上雅史