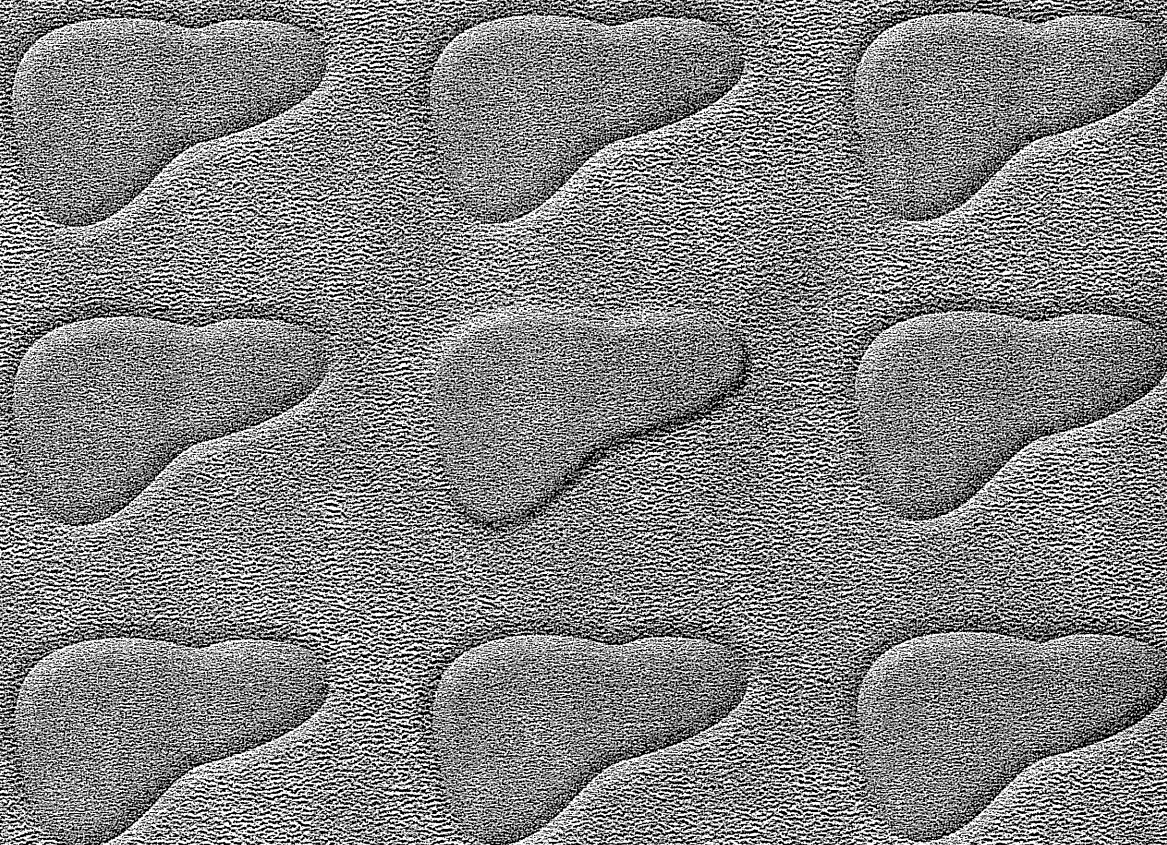


- Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. (2010). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53. *Biochem Biophys Res Commun* 403(2), 194-7.
- Swanton, C., Mann, D. J., Fleckenstein, B., Neipel, F., Peters, G., and Jones, N. (1997). Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* 390(6656), 184-7.
- Toth, Z., Maglente, D. T., Lee, S. H., Lee, H. R., Wong, L. Y., Brulois, K. F., Lee, S., Buckley, J. D., Laird, P. W., Marquez, V. E., and Jung, J. U. (2010). Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes. *PLoS Pathog* 6(7), e1001013.
- Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. (2010). KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile. *Biochem Biophys Res Commun* 394(3), 482-7.
- Ueda, K., Sakakibara, S., Ohsaki, E., and Yada, K. (2006). Lack of a mechanism for faithful partition and maintenance of the KSHV genome. *Virus Res* 122(1-2), 85-94.
- Uetz, P., Dong, Y. A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., Rajagopala, S. V., Roupelieva, M., Rose, D., Fossum, E., and Haas, J. (2006). Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* 311(5758), 239-42.
- Verma, S. C., Choudhuri, T., Kaul, R., and Robertson, E. S. (2006). Latency-associated nuclear antigen (LANA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with origin recognition complexes at the LANA binding sequence within the terminal repeats. *J Virol* 80(5), 2243-56.
- Wies, E., Mori, Y., Hahn, A., Kremmer, E., Sturzl, M., Fleckenstein, B., and Neipel, F. (2008). The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 111(1), 320-7.
- Xiao, B., Verma, S. C., Cai, Q., Kaul, R., Lu, J., Saha, A., and Robertson, E. S. (2010). Bub1 and CENP-F can contribute to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome persistence by targeting LANA to kinetochores. *J Virol* 84(19), 9718-32.
- Ye, F. C., Zhou, F. C., Xie, J. P., Kang, T., Greene, W., Kuhne, K., Lei, X. F., Li, Q. H., and Gao, S. J. (2008). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent gene vFLIP inhibits viral lytic replication through NF-kappaB-mediated suppression of the AP-1 pathway: a novel mechanism of virus control of latency. *J Virol* 82(9), 4235-49.
- Yoo, J., Kang, J., Lee, H. N., Aguilar, B., Kafka, D., Lee, S., Choi, I., Lee, J., Ramu, S., Haas, J., Koh, C. J., and Hong, Y. K. (2010). Kaposin-B enhances the PROX1 mRNA stability during lymphatic reprogramming of vascular endothelial cells by Kaposi's sarcoma herpes virus. *PLoS Pathog* 6(8).

# 肝癌診療 マニュアル

編集 社団法人 日本肝臓学会



わが国では肝細胞癌の死亡者数は年間3万人を超え、悪性新生物による死亡の第3位を占めている。肝細胞癌の72%はC型肝炎ウイルス(HCV)感染を背景としており、16%にB型肝炎ウイルス(HBV)感染が認められる。したがって、肝細胞癌の究極的予防とはHBV、HCV感染を根絶することである。

B型肝炎の予防は1986年以降の母児感染の予防により、C型肝炎の予防は1989年以降の献血のスクリーニングにより、ともに新規のキャリア発生は非常に低いレベルに抑えられており、長期的には肝細胞癌発生の予防は達成されることが考えられる。しかしHBV、HCVともそれぞれ約150万人、200万人のキャリアは依然残されており、これらB・C型慢性肝疾患において肝細胞癌の発生を予防することが急務である。

## a. 抗ウイルス療法

### 1) B型慢性肝疾患

#### a) B型慢性肝疾患からの自然経過による発癌と肝発癌予防治療の対象

HBV持続感染者は肝細胞癌進展へのハイリスク群であり、台湾では非感染者に比し223倍のリスクがあるとされている<sup>1)</sup>。肝細胞癌併発の危険因子は、高年齢、ウイルスの著しい増殖、肝硬変、男性、アルコール多飲などである。わが国におけるB型慢性肝炎610例における前向きコホート研究では、累積肝細胞癌発生率は5年2.1%、10年4.9%、15年18.8%と報告されている<sup>2)</sup>。さらに、B型肝硬変180例における前向きコホート研究では累積肝細胞癌発生率は5年1.2%、10年27.2%、15年27.2%とされている<sup>3)</sup>。B型慢性肝疾患のなかでも、特にHBe抗原陽性例、HBe抗原陰性でもHBV DNA高値例で肝細胞癌発生率が高いとされており、これらが肝発癌を予防すべ

き治療の対象となると考えられる。

具体的にはHBeAg陽性陰性にかかわらずALT正常、HBV DNA $\geq$ 20,000 IU/ml(1 IU/mlは5.6 copies/mlにあたる)で、35歳以上の場合は、まず肝生検を行いS2以上の線維化または中等度以上の炎症所見の慢性肝炎像を示す者は治療の対象とする。ALT異常、HBV DNA $\geq$ 20,000 IU/mlは治療対象とすることが欧米では推奨されている<sup>4)</sup>。また、代償性肝硬変でHBV DNA $\geq$ 20,000 IU/mlも治療すべき対象である。

#### b) インターフェロンによるB型慢性肝炎・肝硬変からの肝発癌予防(表3-1)

HBe抗原陽性B型慢性肝疾患101例を対象とし、プラセボ群31例、プラセボ+インターフェロン群34例、プレドニゾロン+インターフェロン群36例に無作為に割り付け、平均8.4年(1.1~11.5年)の経過観察を行った結果、インターフェロン投与群67例中1例、プラセボ投与群34例中4例に肝細胞癌が認められ、インターフェロン投与群において有意に発癌が抑制されたと報告されている(p=0.013)。しかし、12例の肝硬変を除く慢性肝炎に限って検討すると、インターフェロン投与群、非投与群における発癌率に有意差は認められなかった<sup>5)</sup>。

ほかに、インターフェロン治療の肝細胞癌発生に及ぼす影響は、非ランダム化比較試験1件<sup>6)</sup>とインターフェロン投与群のみを経過観察した2件<sup>7,8)</sup>において検討されている。これらの報告のうち2件<sup>6,8)</sup>において、インターフェロン治療効果の認められた症例では肝細胞癌発生のリスクが低下する可能性が示唆されている。

以上、B型慢性肝炎に対する発癌阻止を目的としたインターフェロン治療は、行うことを考慮してもよいが十分な科学的根拠はないと考えられる。また、肝細胞癌発生のリスクが低下する可能性が

表 3-1 B 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療と肝細胞癌発生率

筆頭著者	平均経過観察 期間(年)	平均年齢(歳)	肝硬変症例	肝細胞癌症例(%)		
				インターフェロン投与群		コントロール
				responders	non-responders	
Lin <sup>4a</sup>	7	32	12(12%)	1/28(3.8%)	0/39(0)	4/34(11.8%)
Papatheodoridis <sup>5b</sup>	6	48	125(31%)	1/57(1.8%)	16/152(10.5%)	15/195(7.7%)
Lampertico <sup>6c</sup>	5.5	46	35(35%)	2/30(7%)	5/71(7%)	NA
Van Zonneveld <sup>7d</sup>	9	34	30(19%)	2/54(3.7%)	6/111(5.4%)	NA

a: ランダム化比較試験(RCT), HBe 抗原陽性例

b: 非ランダム化比較試験, HBe 抗原陰性例

c: ケース研究, HBe 抗原陰性例

d: ケース研究, HBe 抗原陽性例

あるのは、インターフェロン治療効果の認められる症例に限られる。

### c) インターフェロンによる B 型肝硬変からの肝発癌予防

インターフェロン治療が代償性 B 型肝硬変からの発癌リスクを減少させるか否かを検討した Camma らの 7 論文のメタアナリシスでは、インターフェロン治療は絶対的肝発癌リスクを 6.4% 減少させるが、各研究間のばらつきが大きく、ばらつきの少ないヨーロッパのグループにおける検討では差が認められなかったと報告されている<sup>9)</sup>。これら非ランダム化比較試験のうち、4 つの報告では、インターフェロン投与群と非投与群で発癌率に差は認められないとされた。他方、インターフェロン投与は B 型肝硬変における発癌を抑制するとの報告が 3 つ認められる。前述したランダム化比較試験(RCT)では、全症例中 B 型肝硬変は 12 例に過ぎず、肝硬変からの発癌例を検討するには症例が少なすぎる<sup>4)</sup>。

以上のように、B 型肝硬変に対する発癌抑止を目的としたインターフェロン投与を行うことを考慮してもよいが、科学的根拠は十分ではない。

### d) ラミブジンによる B 型慢性肝炎・肝硬変からの肝発癌予防

HBe 抗原陽性または HBe 抗原陰性 HBV DNA 陽性 B 型慢性肝疾患のうち、慢性肝炎線維化進展例および代償性肝硬変例を対象とした 651 例における RCT では、32.4 か月の観察期間中ラミブジン群では 436 例中 17 例(3.9%)、プラセボ群で

は 215 例中 16 例(7.4%)に発癌が認められ、ラミブジン群で 1/2 に発癌が抑制されたとされている<sup>10)</sup>。以上、線維化が進展した B 型慢性肝炎や代償性 B 型肝硬変における肝細胞癌の予防には、ラミブジンを中心とした抗ウイルス療法が推奨される。どのような B 型慢性肝疾患で発癌予防効果が得られるのか、どのくらいの期間治療すべきか、また薬剤耐性株の出現しにくいアデフォビル、エンテカビルなどの抗ウイルス剤を用いた検討など、今後、抗ウイルス剤による B 型慢性肝疾患からの発癌阻止に関する科学的根拠の集積が望まれる。

他方、非代償性 B 型肝硬変に対するラミブジン治療では、生化学的、臨床的改善がみられるにもかかわらず、肝発癌が阻止できるか否か不明である。

## 2) C 型慢性肝疾患

### a) C 型慢性肝疾患からの自然経過による発癌と肝発癌予防治療の対象

C 型慢性肝疾患において発癌に関連する因子を検討した報告では、Ikeda らは肝線維化ステージが高度であること、 $\gamma$ -GTP 値が高値であること、輸血歴がないこと、血清アルブミン値が低値であること、飲酒歴があることと指摘した<sup>2)</sup>。Yoshida らも男性、高齢、肝線維化ステージ高値、インターフェロン治療歴なし、が発癌に関連する因子であると報告した<sup>11)</sup>。特に、C 型慢性肝炎では線維化が進展した例や肝硬変において、より高率に肝細

表 3-2 C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の有無, 治療効果による発癌抑止効果に関する論文

筆頭著者	症例数	経過観察(年)	治療効果判定基準	治療効果	危険率(95%CI)	P	
Kasahara <sup>15)</sup>	1,022	3.0	生化学的	著効例	1.0	0.18	
				再燃例	3.12(0.59~16.6)		
				無効例	7.90(1.74~35.83)		0.008
Imai <sup>13)</sup>	419	3.9	生化学的	未治療例	1.0	0.007	
				著効例	0.06(0.01~0.46)		
				再燃例	0.51(0.20~1.27)		0.15
				無効例	0.95(0.48~1.84)		>0.2
Ikeda <sup>14)</sup>	1,643	5.1	生化学的	未治療例	1.0	0.012	
				著効例	0.32(0.13~0.78)		
				無効例	0.96(0.55~1.70)		0.90
Yoshida <sup>17)</sup>	2,890	4.3	ウイルス学的	未治療例	1.0	<0.001	
				排除例	0.20(0.10~0.39)		
				未排除例	0.63(0.43~0.92)		<0.02
			生化学的	ALT 持続正常例	0.27(0.09~0.86)	0.03	
				著効例	0.20(0.10~0.38)	<0.001	
				ALT 軽度異常例	0.36(0.21~0.62)	<0.001	
ALT 高度異常例	0.91(0.62~1.34)	>0.2					
Tanaka <sup>16)</sup>	738	4.8	生化学的	未治療例	1.0	0.007	
				著効例	0.16(0.04~0.62)		
				再燃例	0.27(0.09~0.79)		0.02
				無効例	0.74(0.37~1.48)		0.39

胞癌を併発する。わが国における肝線維化ステージ別の発癌率は、Ikeda らによれば、線維化の程度が、F0~F1 で 0.0~0.6%/人/年、F2 で 0.4~1.0%/人/年と低率であるが、F3 からの場合 3.8~5.0%/人/年<sup>2)</sup>、肝硬変では 4.3~5.3%/人/年<sup>3)</sup> と高率である。したがって、線維化進展例、肝硬変が肝発癌を予防すべき治療の対象になると考えられる。他方、線維化は軽度であっても、ALT 高値、肝細胞に irregular regeneration がみられる例でも肝細胞癌発生のリスクが高いとされていることより、このような症例も予防治療の対象となると考えられる。

#### b) インターフェロンによる

##### C 型慢性肝炎からの肝発癌一次予防

C 型慢性肝炎(非肝硬変)例におけるインターフェロン治療の発癌抑止効果を検討した RCT は、現在に至るまで発表されていない。インターフェロン非投与群と投与群を比較した前向きコホート研究では、インターフェロン治療の有無は肝細胞癌発生に影響しないと報告されている<sup>12)</sup> が、後ろ向

きコホート研究ではインターフェロン治療自体が肝細胞癌発生のリスクを有意に低下させる<sup>11,13)</sup>、有意ではないが低下させる傾向が認められる<sup>14)</sup> とされている。

インターフェロン治療効果と肝細胞癌発生のリスクとの関係に関する論文を表 3-2 に示す。肝細胞癌併発のリスクはインターフェロン治療にてウイルス排除が認められた例で未治療例の 1/5 に低下していたが、ウイルスの排除が認められなくてもインターフェロン治療終了時点で ALT の正常化が認められる再燃例やインターフェロン治療終了後 6 か月以上持続的に ALT の正常化が認められる生化学的著効例でも肝細胞癌の発生は未治療例、無効例に比し 1/4~1/2 に有意に抑制されることが示されている<sup>11,13-16)</sup>。また、C 型慢性肝疾患に対するインターフェロン治療の有無と肝細胞癌発生率との関係を検討した 4,614 例のメタアナリシス(C 型慢性肝炎のみならず C 型肝硬変症例が多数含まれている)では、インターフェロン治療は肝細胞癌発生のリスクを 13%減少させ、そ

の効果は生化学的著効例で顕著であることが示された<sup>9)</sup>。以上の結果より、インターフェロン治療にて未治療群に比し肝細胞癌発生が抑止されること、インターフェロンにてウイルスの排除のみならず生化学的効果が認められれば肝細胞癌の発生は予防されることが明らかとなった。

現在までのところ、インターフェロンとリバビリンの併用療法またはペグインターフェロンとリバビリンの併用療法によるC型慢性肝炎における肝細胞癌抑止効果について検討された論文は認められないが、併用療法はインターフェロン単独療法に比し、より高いウイルス排除率がみられるので、より高い発癌抑止効果が期待される。したがって、C型慢性肝炎患者の発癌予防には、インターフェロンを中心としたウイルス駆除療法が推奨され、肝細胞癌予防のための治療目標はウイルスの排除または肝機能の正常化である。

#### c) インターフェロンによるC型肝硬変からの肝発癌一次予防

C型肝硬変に対するインターフェロン治療の肝発癌に及ぼす影響を検討したRCTは2件ある。1件ではインターフェロン投与群、非投与群の肝細胞癌発生率に差は認められないと報告された<sup>17)</sup>が、ほかの1件ではインターフェロン投与は肝細胞癌の発生を抑制するとの結果であった<sup>18)</sup>。インターフェロン非投与群を設定した非ランダム化比較試験は7件報告されており、1件を除いてインターフェロン治療はC型肝硬変において肝細胞癌発生を抑止するとされている。また、メタアナリシス2本においても同様に、C型肝硬変患者に対するインターフェロン治療による肝細胞癌予防効果が肯定されている<sup>9)</sup>。以上の予防効果は、ウイルスの排除が認められた例で顕著である。現在までのところ、C型肝硬変においてインターフェロンとリバビリンの併用療法による肝細胞癌抑止効果について検討された論文は1件あり、非治療群に比し併用療法群では肝細胞癌の発生が抑制されたとしている。インターフェロンまたはペグインターフェロンとリバビリンの併用療法は、インターフェロン単独療法に比しより高いウイルス排除率がみられるので、より高い発癌抑止効果が期

待される。

上記の報告は代償性C型肝硬変において報告されたものであり、非代償性においてはインターフェロン治療の安全性に関する科学的根拠はない。

以上、代償性C型肝硬変における肝細胞癌の予防には、インターフェロンを中心としたウイルス駆除療法が推奨される。

#### d) 肝細胞癌に対する根治療法後の

##### インターフェロンによる肝発癌二次予防

肝細胞癌に対する肝切除またはエタノール注入療法後に、インターフェロン投与群、非投与群に無作為に割り付けたRCTは4件認められ<sup>20-23)</sup>、症例数は少ないもののいずれの報告でもインターフェロン治療は肝細胞癌の再発を有意に抑制している。今後、以上の報告に基づき大規模な比較試験による検討が必要である。以上より、肝細胞癌併発C型慢性肝疾患における肝細胞癌根治療法後の再発阻止、すなわち二次予防には、インターフェロン治療を行うことが推奨される。

## b. 肝庇護療法

### 1) グリチルリチン製剤

慢性肝炎、肝硬変に対するグリチルリチン製剤の静脈内投与は、トランスアミナーゼ値の改善を目的に、特にC型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法の適応がない症例や無効例を対象として広く行われている。グリチルリチン製剤の肝発癌抑制についてのRCTは報告されておらず、後ろ向きコホート研究が1つある。この報告では、C型慢性肝炎に対するグリチルリチン製剤の静脈内投与は肝発癌リスクを減少させると結論づけている<sup>24)</sup>。以上より、C型慢性肝炎患者に対する発癌予防としてグリチルリチン製剤の静脈内投与は推奨されるが、その科学的根拠は弱い。

### 2) ウルソデオキシコール酸(UDCA)

C型慢性肝炎においては、UDCA投与により細胞障害性の胆汁酸がUDCAに置換され、肝細胞膜が保護されると考えられている。また、UDCAの免疫調節作用やアポトーシス抑制作用が肝細胞膜の保護に役立つ。600~900 mg/日の

UDCA 投与が血清 ALT 値の改善に有効であるが、UDCA 長期投与に肝発癌予防効果があるか否かについては、いまだ報告されていない。

### 3) 除鉄療法

瀉血療法にて血清 ALT 値は低下し、C 型慢性肝炎の治療法として瀉血の有用性が示唆されている。長期間の除鉄は肝細胞癌発生を抑制する可能性を示唆したが、今後、大規模な比較試験による検討が必要である。

### 4) 小柴胡湯

小柴胡湯は7種の生薬を混合した漢方薬で、慢性肝炎患者に広く投与されている。肝硬変を対象とした RCT では、小柴胡湯投与は肝細胞癌併発率を減少させたが有意ではないと報告された。しかし、HBs 抗原陰性例では小柴胡湯投与により非投与群に比し5年目の累積発癌率は有意に低下していた<sup>25)</sup>。本研究はC型肝炎ウイルスが発見される前に開始されたが、その後HBs 抗原陰性肝硬変の大多数がC型肝炎ウイルスに起因することが明らかにされたことを考慮すると、C型肝炎硬変からの発癌を小柴胡湯が抑制した可能性は大きいと考えられる。ただし、肝硬変に対する小柴胡湯投与はわが国では禁忌である。

### 5) ビタミン K<sub>2</sub>

40例の女性のウイルス性肝硬変患者(38例はC型肝炎硬変)を対象としたビタミン K<sub>2</sub> 投与の RCT では、ビタミン K<sub>2</sub> 投与群で肝細胞癌併発率が有意に低率であった。以上のように、ビタミン K<sub>2</sub> 投与がC型肝炎硬変からの肝発癌を予防する可能性が示唆された。しかし、症例数が少なく確固たる科学的根拠があるとはいえない。今後、大規模な比較試験による検討が必要である。

### 【文献】

- 1) Beasley RP, et al : Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet* 2 : 1129-1133, 1981
- 2) Ikeda K, et al : Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepati-

- tis : a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 28 : 930-938, 1998
- 3) Ikeda K, et al : A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis : a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18 : 47-53, 1993
- 4) Emmet B, et al : A treatment algorithm for management of chronic hepatitis B virus infection in the United States : An up date. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4 : 936-962, 2006
- 5) Lin SM, et al : Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 29 : 971-975, 1999
- 6) Papatheodoridis GV, et al : The long-term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 34 : 306-313, 2001
- 7) Lampertico P, et al : Long-term suppression of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B by 24-month interferon therapy. *Hepatology* 37 : 756-763, 2003
- 8) Van Zonneveld M, et al : Long-term follow-up of alpha interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 39 : 804-810, 2004
- 9) Camma C, et al : Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis : an evidence-based approach. *J Hepatol* 34 : 593-602, 2001
- 10) Liaw F, et al : Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 351 : 1521-1531, 2004
- 11) Yoshida H, et al : Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma : national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 131 : 174-181, 1999
- 12) Niederau C, et al : Prognosis of chronic hepatitis C : results of a large prospective cohort study. *Hepatology* 28 : 1687-1695, 1998
- 13) Imai Y, et al : Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 129 : 94-99, 1998
- 14) Ikeda K, et al : Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C : a long-term observation study of 1643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 29 : 1124-1130, 1999
- 15) Kasahara A, et al : Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 27 : 1394-1402, 1998
- 16) Tanaka H, et al : Effect of interferon therapy on the incidence of hepatocellular carcinoma and mortality of patients with chronic hepatitis C : a retrospective cohort study of 738 patients. *Int J Cancer* 87 : 741-749, 2000
- 17) Valla DC, et al : Treatment of hepatitis C virus-re-

- lated cirrhosis : a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology* 29 : 1870-1875, 1999
- 18) Nishiguchi S, et al : Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 357 : 196-197, 2001.
- 19) Papatheodoridis GV, et al : Effect of interferon therapy on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis : a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 15 : 689-698, 2001
- 20) Ikeda K, et al : Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor- A prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 32 : 228-232, 2000
- 21) Kubo S, et al : Effects of long-term postoperative interferon-alpha therapy on intrahepatic recurrence after resection of hepatitis C virus - related hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 134 : 963-967, 2001
- 22) Shiratori Y, et al : Interferon therapy after tumor ablation improves prognosis in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 138 : 299-306, 2003
- 23) Mazzaferro V, et al : Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis.
- 24) Arase Y, et al : The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 79 : 1494-1500, 1997
- 25) Oka H, et al : Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to (TJ-9). *Cancer* 76 : 743-749, 1995
- (笠原彰紀, 平松直樹, 林 紀夫)



**Human BDCA3<sup>+</sup> dendritic cells are a potent producer of IFN- $\lambda$  in response to  
hepatitis C virus**

Sachiyo Yoshio<sup>1</sup>, Tatsuya Kanto<sup>1\*</sup>, Shoko Kuroda<sup>1</sup>, Tokuhiko Matsubara<sup>1</sup>, Koyo Higashitani<sup>1</sup>,  
Nariyasu Kakita<sup>1</sup>, Hisashi Ishida<sup>1</sup>, Naoki Hiramatsu<sup>1</sup>, Hiroaki Nagano<sup>2</sup>, Masaya Sugiyama<sup>3</sup>,  
Kazumoto Murata<sup>3</sup>, Takasuke Fukuhara<sup>4</sup>, Yoshiharu Matsuura<sup>4</sup>, Norio Hayashi<sup>5</sup>, Masashi  
Mizokami<sup>3</sup>, and Tetsuo Takehara<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of  
Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka, Japan

<sup>2</sup> Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka,  
Suita, Osaka, Japan

<sup>3</sup> The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and  
Medicine, 1-7-1, Kohnodai, Ichikawa 272-8516, Japan.

<sup>4</sup> Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka  
University

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1002/hep.26182

5 Kansai Rosai Hospital, 3-1-69 Amagasaki, Hyogo, Japan

\*Corresponding author: Tatsuya Kanto, M.D., Ph.D.

Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of

Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, 565-0871 Japan

E-mail: kantot@gh.med.osaka-u.ac.jp

Telephone: +81-6-6879-3621, Fax: +81-6-6879-3629

#### Keywords

IL-28B, single nucleotide polymorphism, CD81, JFH-1; TLR3

Funding: Supported in part by a Grant-In-Aid for Scientific Research from the Ministry of

Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan and a Grant-In-Aid from the

Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

Conflicts of interest: None of the authors do have commercial or other associations that might

HEP-12-1228-R1

Hepatology

pose a conflict of interest.

Abbreviations : Ab, antibody; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell-cultured hepatitis C virus;

HSV, herpes simplex virus; IHL, intrahepatic lymphocyte; IRF, interferon regulatory factor;

ISGs, interferon-stimulated genes; JEV, Japanese encephalitis virus; Lin, lineage; mDC,

myeloid DC; MOI, multiplicity of infection; PBMC, peripheral blood mononuclear cell;

pDC, plasmacytoid DC; Poly IC, polyinosine-polycytidylic acid; RIG-I, retinoic

acid-inducible gene-I; SNPs, single nucleotide polymorphisms; TLR, Toll-like receptor; TRIF,

TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

HEP-12-1228-R1

Hepatology

## ABSTRACT

The polymorphisms in *IL-28B* (IFN- $\lambda$ 3) gene are strongly associated with the efficacy of HCV clearance. Dendritic cells (DCs) sense HCV and produce IFNs, thereby playing some cooperative roles with HCV-infected hepatocytes in the induction of interferon-stimulated genes (ISGs). BDCA3<sup>+</sup> DCs are discovered as a producer of IFN- $\lambda$  upon toll-like receptor 3 (TLR3) agonist. We thus aimed to clarify the roles of BDCA3<sup>+</sup>DCs in anti-HCV innate immunity. Seventy healthy subjects and 20 patients with liver tumors were enrolled. BDCA3<sup>+</sup>DCs, in comparison with plasmacytoid DCs and myeloid DCs, were stimulated with TLR agonists, cell-cultured HCV (HCVcc) or Huh7.5.1 cells transfected with HCV/JFH-1. BDCA3<sup>+</sup>DCs were treated with anti-CD81 antibody, inhibitors for endosome acidification, TRIF-specific inhibitor or ultraviolet-irradiated HCVcc. The amounts of IL-29/IFN- $\lambda$ 1, IL-28A/IFN- $\lambda$ 2 and IL-28B were quantified by subtype-specific ELISA. The frequency of BDCA3<sup>+</sup>DCs in PBMC was extremely low but higher in the liver. BDCA3<sup>+</sup>DCs recovered from PBMC or the liver released large amounts of IFN- $\lambda$ s, when stimulated with HCVcc or HCV-transfected Huh7.5.1.

HEP-12-1228-R1

Hepatology

Accepted Article

BDCA3<sup>+</sup>DCs were able to induce ISGs in the co-existing JFH-1-positive Huh7.5.1 cells. The treatments of BDCA3<sup>+</sup>DCs with anti-CD81 antibody, cloroquine or bafilomycin A1 reduced HCVcc-induced IL-28B release, whereas BDCA3<sup>+</sup>DCs comparably produced IL-28B upon replication-defective HCVcc. The TRIF-specific inhibitor reduced IL-28B release from HCVcc-stimulated BDCA3<sup>+</sup>DCs. In response to HCVcc or JFH-1-Huh7.5.1, BDCA3<sup>+</sup>DCs in healthy subjects with IL-28B major (rs8099917, TT) released more IL-28B than those with IL-28B minor genotype (TG). **Conclusion:** Human BDCA3<sup>+</sup>DCs, having tendency of being accumulated in the liver, recognize HCV by a CD81-, endosome- and TRIF-dependent manner and produce substantial amounts of IL-28B/IFN- $\lambda$ 3, the ability of which is superior in subjects with IL-28B major genotype.

HEP-12-1228-R1

Hepatology

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the most serious health problems in the world.

More than 170 million people are chronically infected with HCV and are at high risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Genome-wide association studies have successfully identified the genetic polymorphisms (single nucleotide polymorphisms, SNPs) upstream of the promoter region of the IL-28B/IFN- $\lambda$ 3 gene which are strongly associated with the efficacy of pegylated interferon- $\alpha$  (PEG-IFN- $\alpha$ ) and ribavirin therapy or spontaneous HCV clearance (1-4).

IFN- $\lambda$ s, or types III IFNs, comprise a family of highly homologous molecules consisting of IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) and IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B). In clear contrast with type I IFNs, they are released from relatively restricted types of cells, such as hepatocytes, intestinal epithelial cells or dendritic cells (DCs). Also, the cells that express hetero-dimeric IFN- $\lambda$  receptors (IFN- $\lambda$ R1 and IL-10R2) are restricted to cells of epithelial origin, hepatocytes or DCs (5). Such limited profiles of cells expressing IFN- $\lambda$ s and their receptors define the biological uniqueness of IFN- $\lambda$ s. It has been shown that IFN- $\lambda$ s convey anti-HCV activity by inducing

HEP-12-1228-R1

Hepatology

Accepted Article

various interferon-stimulated genes (ISGs) (5), the profiles of which were overlapped but others were distinct from those induced by IFN- $\alpha/\beta$ . Some investigators showed that the expression of IL-28 in PBMC was higher in subjects with IL-28B major than those with minor, however the levels of IL-28 transcripts in liver tissue were comparable regardless of IL-28B genotype (2, 6).

At the primary exposure to hosts, HCV maintains high replicative levels in the infected liver, resulting in the induction of IFNs and ISGs. In a case of successful HCV eradication, it is postulated that IFN- $\alpha/\beta$  and IFN- $\lambda$  cooperatively induce anti-viral ISGs in HCV-infected hepatocytes. It is of particular interest that, in primary human hepatocytes or chimpanzee liver, IFN- $\lambda$ s, but not type-I IFNs, is primarily induced after HCV inoculation, the degree of which is closely correlated with the levels of ISGs (7). These results suggest that hepatic IFN- $\lambda$  could be a principal driver of ISG induction in response to HCV infection. Nevertheless, the possibility remains that DCs, as a prominent IFN producer in the liver, play significant roles in inducing hepatic ISGs and thereby suppressing HCV replication.

Dendritic cells (DCs), as immune sentinels, sense specific genomic and/or structural components of pathogens with various pattern recognition receptors and eventually release IFNs and inflammatory cytokines (8). In general, DCs migrate to the organ where inflammation or

HEP-12-1228-R1

Hepatology

cellular apoptosis occurs and alter their function in order to alleviate or exacerbate the disease conditions. Therefore, the phenotypes and/or capacity of liver DCs are deemed to be influenced in the inflamed liver. In humans, the existence of phenotypically and functionally distinct DC subsets has been reported: myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC) (9). Myeloid DCs predominantly produce IL-12 or TNF- $\alpha$  following pro-inflammatory stimuli, while pDCs release considerable amounts of type I IFNs upon virus infection (9). The other type of mDCs, mDC2 or BDCA3<sup>+</sup>(CD141) DCs, have been drawing much attention recently, since human BDCA3<sup>+</sup>DCs are reported to be a counterpart of murine CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DCs (10). Of particular interest is the report that BDCA3<sup>+</sup>DCs have a potent capacity of releasing IFN- $\lambda$  in response to toll-like receptor 3 (TLR3) agonist (11). However, it is still largely unknown whether human BDCA3<sup>+</sup>DCs are able to respond to HCV.

Taking these reports into consideration, we hypothesized that human BDCA3<sup>+</sup>DCs, as a producer of IFN- $\lambda$ s, have crucial roles in anti-HCV innate immunity. We thus tried to clarify the potential of BDCA3<sup>+</sup>DCs in producing type III IFNs, by using cell-cultured HCV (HCVcc) or hepatoma cells harboring HCV as stimuli. Our findings show that BDCA3<sup>+</sup>DCs are quite unique DC subset, characterized by a potent and specialized ability to secrete IFN- $\lambda$ s in

HEP-12-1228-R1



Accepted Article

response to HCV. The ability of BDCA3<sup>+</sup>DCs to release IL-28B upon HCV is superior in subjects with IL-28B major (rs8099917, TT) to those with minor (TG or GG) genotype, suggesting that BDCA3<sup>+</sup>DCs are one of the key players in IFN- $\lambda$ -mediated innate immunity.

HEP-12-1228-R1

Hepatology

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects.

This study enrolled 70 healthy volunteers (male / female; 61 / 9) (age; mean  $\pm$  SD, 37.3  $\pm$  7.8 yrs.) and 20 patients who underwent surgical resection of liver tumors at Osaka University Hospital (**Supplementary table 1**). The study was approved by the ethical committee of Osaka University Graduate School of Medicine. Written informed consent was obtained from all of them. All healthy volunteers are negative for HCV, hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV) and had no apparent history of liver, autoimmune or malignant diseases.

### Reagents.

The specifications of all antibodies used for FACS or cell sorting TLR-specific synthetic agonists, pharmacological reagents and inhibitory peptides are listed in the supplementary materials.

**Separation of dendritic cells from PBMC or intra-hepatic lymphocytes.**

HEP-12-1228-R1

We collected 400 mL of blood from each healthy volunteer and processed for PBMCs.

Non-cancerous liver tissues were obtained from patients who underwent resection of liver tumors (Supplementary table). For the collection of intrahepatic lymphocytes (IHLs), liver tissues were washed thoroughly with phosphate-buffered saline to remove the peripheral blood adhering to the tissue and ground gently. After Lin-negative (CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup> and CD56<sup>-</sup>) cells were obtained by the MACS system, each DC subset with the defined phenotype was sorted separately under FACS Aria (BD). The purity was more than 98%, as assessed by FACS Canto II (BD). Sorted DCs were cultured at  $2.5 \times 10^4$ /well on 96-well culture plates.

#### **Immunofluorescence staining of human liver tissue**

Tissue specimens were obtained from surgical resections of non-cancerous liver from the patients as described above. Briefly, the 5 $\mu$ m sections were incubated with the following antibodies: mouse biotinylated anti-human BDCA3 antibody (Miltenyi-Biotec), and mouse anti-human CLEC9A antibody (Biolegend) and subsequently with secondary goat anti-rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 or goat anti-mouse Alexa Fluor<sup>®</sup>594 (Invitrogen, Molecular Probes) antibodies. Cell nuclei were counterstained with Dapi-Fluoromount-GTM (SouthernBiotech,

HEP-12-1228-R1

Hepatology

Birmingham, AL). The stained tissues were analyzed by fluorescence microscopy (Model

BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan).

#### Cells and viruses.

The *in vitro* transcribed RNA of the JFH-1 strain of HCV was introduced into FT3-7 cells (12) or Huh7.5.1 cells. The stocks of cell-cultured HCV (HCVcc) were generated by concentration of the medium from JFH-1-infected FT3-7 cells. The virus titers were determined by focus forming assay (13). The control medium was generated by concentration of the medium from HCV-uninfected FT3-7 cells. Infectious JEVs were generated from the expression plasmid (pMWJEATG1) as reported previously (14). HSV (KOS) was a generous gift from Dr. K. Ueda (Osaka University). Huh7.5.1 cells transduced with HCV JFH-1 strain was used for the co-culture with DCs. The transcripts of interferon-stimulated genes (ISGs) in Huh7.5.1 were examined by RT-PCR methods using gene-specific primers and probes (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### Secretion assays.

HEP-12-1228-R1