

図1 IFNを用いたC型肝炎治療効果を規定する各種因子

れまでにC型肝炎治療にかかわる様々な因子が報告されてきたなかで、2009年に報告された*IL28B* 遺伝子多型によって、治療前効果予測が現実的なものとなった。現在では個々の症例の事前評価により、治療効果予測のみでなく治療に伴う副作用出現予測まで可能となり、個々の症例に応じた治療法や治療内容の選択が可能となってきた。

本稿では、HCV治療にかかわる種々の因子について概説し、C型肝炎治療におけるテーラーメイド医療の現状を述べる。

### 1. GWASによる疾患感受性因子の同定

これまでの臨床研究から、C型慢性肝炎に対するIFN療法の治療前効果予測因子としては、ウイルス側の因子、薬剤による因子、宿主側の因子が想定されていた(図1)。従来、PEG-IFN/RBV併用療法における治療効果に関連する宿主側因子として、年齢、性差、肝線維化進展度、インスリン抵抗性など多数報告されていたが、これらの因子とウイルス側因子であるHCV遺伝子型(genotype)、ウイルス量、コア領域やNS5A領域のアミノ酸変異などを総動員し解析しても、治療前の効果予測は約50%程度にとどまることが知られていた。ウイルス因子、薬剤因子に比較して、宿主因子、特に疾患関連遺伝子の同定には、多岐にわたる個々の症例の要因を考慮しなければならず、多大な費用と労力を要していた。

一般に、ある疾患の発症、薬剤反応性、副作用などに関与する遺伝子の同定を目指すとき、従来はある候補遺伝子からアプローチする手法が用いられていた。すなわち、推定される病態機序などから選ばれた遺伝子の変異や多型について患者群、健常者群におけるcase-control studyを行い、疾患関連遺伝子を同定する。この方法では、ある程度の成功率で疾患関連遺伝子を同定できるが、真に強く関連している遺伝子とは限らない。一方、ヒトゲノム計画の成功により、ヒト遺伝子は個人差として約300個に1個、全ゲノムで約1,000万カ所の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)が存在し、このSNPが個々の疾患の発症、薬剤反応性や副作用に大きく関与することが続々と明らかとなっていった。更に近年、ヒトの様々な多因子疾患にかかわる遺伝子を網羅的に探索する戦略としてゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)が大きな注目を浴びるようになった。この背景としては、大規模なSNP解析技術の進歩が大きな役割を果たしており、ゲノムワイドに均一に配置された約90万カ所(日本人では62万カ所)のSNPsを一括タイピングすることが可能となったことが挙げられる。日本人集団の場合、GWASにより全ゲノムの約80%が網羅可能であるものと考えられている。この手法を用いて著者らを含めた世界中から、C型慢性肝炎のIFN治療反応性に極めて強く関連するSNP同定の報告がなされた<sup>1-3)</sup>。

## 2. PEG-IFN/RBV 併用治療効果と *IL28B* SNPs(rs8099917, rs12979860)

著者らは、PEG-IFN/RBV 併用療法の有効性に関連する SNP を同定するために、治療効果に影響するウイルス因子は 1 型高ウイルス量の症例に限定し、更に薬剤因子である服薬量を予定服薬量の 80% 以上が投与された群を対象として、GWAS を実施した<sup>3)</sup>。すなわち、PEG-IFN/RBV 併用療法が有効(再燃例も含む)であった日本人患者と無効であった患者 142 人に関して、ヒト遺伝子の中で個人差があるとされる約 90 万カ所を Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用い分析した。その結果、19 番染色体の *IL28B* 遺伝子周辺に治療無効に関連する有意な SNPs を発見した(図 2-a)。別のコホート(検証群 172 人)を用いて、*IL28B* 遺伝子および遺伝子周辺を詳細に検討した結果、治療反応性に強く関与する SNPs は複数存在し、しかもすべてが連鎖不平衡(複数の遺伝子座の遺伝的多型の間にランダムでない相関がみられること)であった(図 2-b)。この代表的な SNP である rs8099917(マイナーアリル G)の治療効果別のアリル頻度を解析すると、治療反応群(著効群+再燃群)では、メジャーホモ(TT)の割合が高く、無効群ではヘテロまたはマイナーホモ(TG+GG)の割合が高く、マイナーアリルを有する患者では治療抵抗性であることが示された(図 3-a)。更に、従来からインターフェロン治療効果に寄与する因子として報告されている年齢、性別、血小板数、肝線維化、HCV-RNA 量を含めて多変量解析を行ったところ、これらの因子をはるかに凌ぐ危険率約 30 倍の確率( $p=2.68 \times 10^{-32}$ )で、rs8099917 の SNP が PEG-IFN/RBV 併用療法の無効に寄与していることが明らかとなった<sup>3)</sup>。

一方、PEG-IFN/RBV 併用療法の有効性に関連する GWAS について、同時期に欧米からも報告があり、いずれの報告も *IL28B* 遺伝子多型が関与する結果であった。Ge らの報告では、白人(871 人)、黒人(191 人)、ヒスパニック(75 人)

で検討した結果、白人において *IL28B* 遺伝子から 3 kb 上流の SNP(rs12979860)が著効に強く関連することがわかった。興味深いことに、rs12979860 のメジャーアリル(C-アリル)の頻度は、アジアで最も高く(80-90%)、続いて白人(European-Americans)およびヒスパニック(Hispanics)が 70-80%、そして黒人(African-Americans)は 30-50% と低値であり、以前より指摘されているアフリカ系で IFN 治療反応性が悪いことを遺伝的に説明する結果であった(図 3-b)<sup>1)</sup>。一方、Suppiah らは、著者らと全く同じ SNP である rs8099917 が最も有意な SNPs として報告している<sup>2)</sup>。rs12979860 と rs8099917 は一見異なる塩基多型に見えるが、これらの SNPs はゲノム上の近傍した位置にあり、HapMap データによると連鎖不平衡が成立していると考えられ(図 2-b)、実際に日本人では 99% 一致した結果であり、GWAS 解析に使用したプラットフォームの違いと考えられる。したがって、日本人においては最初に報告された rs8099917 が代表的な SNP として臨床応用されている。

## 3. HCV 感染における IFN $\lambda$ の 抗ウイルス効果

*IL28B* は 19 番染色体長腕に位置し約 1.5 kb と非常に小さく、IFN $\lambda$ 3 をコードするが、これは通常の C 型肝炎の治療に使用されている IFN $\alpha$  や  $\beta$  とは異なる IFN $\lambda$  の 1 種である(図 2-b)。IFN $\lambda$  には、1, 2, 3 が存在しそれぞれ *IL29*, *IL28A*, *IL28B* がコードする。IFN $\lambda$  は、レセプターは異なるが IFN $\alpha$ / $\beta$  と同じシグナル伝達系である JAK/STAT 経路を活性化し、その下流に存在する IFN 誘導遺伝子群(interferon-stimulated genes: ISGs)を誘導して抗ウイルス効果をもたらすことが報告されている<sup>4,5)</sup>。しかし、実際に C 型肝炎患者において *IL28B* 遺伝子多型がどのような機序で IFN 治療(特に IFN $\alpha$  投与の治療)効果に影響するかはいまだ不明である。しかしながら、*IL28B* 遺伝子多型による機能的差異が C 型肝炎治療効果に影響することが示唆されることから、現在欧米を中心に C 型肝炎慢性肝炎患者に対する IFN $\lambda$ 1 の臨床試験(現在

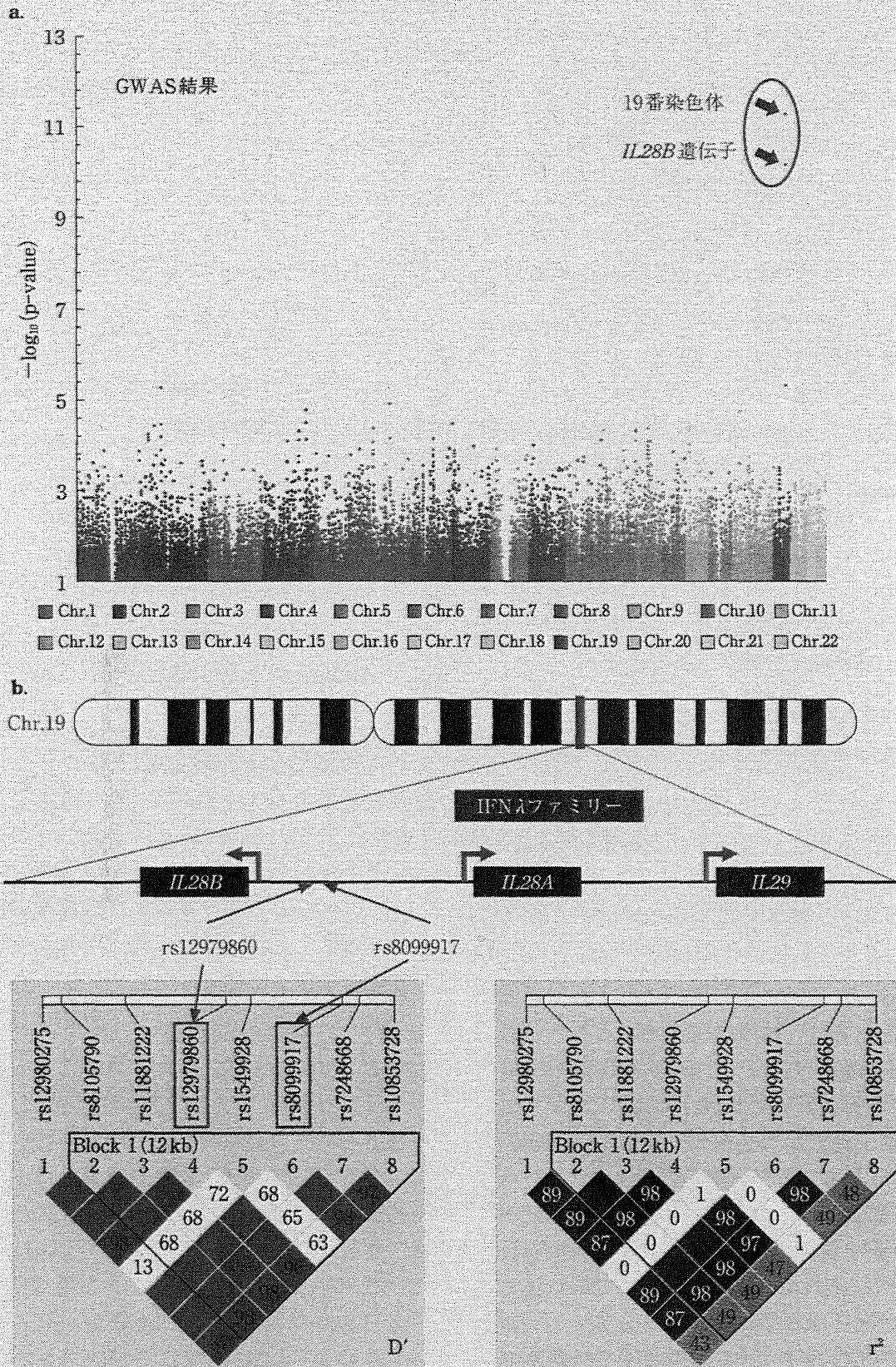


図 2-a ゲノムワイド関連解析結果

PEG-IFN/RBV 併用療法が有効(再燃例も含む)例と無効例で各染色体上のそれぞれの SNP のアレル頻度について比較し算出した p 値のプロット. 19 番染色体の *IL28B* 遺伝子周辺に治療無効に関連する有意な SNPs を発見した<sup>3)</sup>.

-b IFNλ ファミリーの遺伝子構造と治療効果に寄与する SNPs の HapMap データ

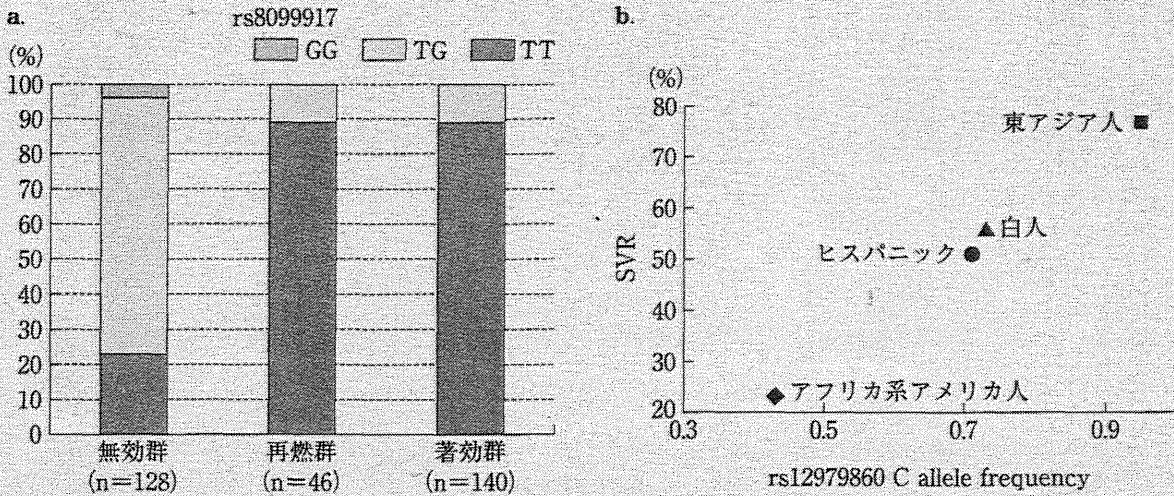


図3 日本人における *IL28B* 遺伝子多型と PEG-IFN/RBV 治療効果、および人種間の SVR 率とアリル頻度の関連

- a. 日本人における *IL28B* 遺伝子多型の代表的な SNP である rs8099917 について治療効果別にみると、無効群ではマイナーアリル (TG+GG) の割合が高い。
- b. 治療反応性である rs12979860 のアリル 'C' 頻度は、SVR 率と相関する。(文献<sup>9)</sup>より改変)

phase II が進行中) が既に開始され、自覚的な副作用が少なくその有効性が期待されている<sup>6)</sup>。

#### 4. C型急性肝炎の自然経過に關与する *IL28B* 遺伝子多型

一方、*IL28B* 遺伝子多型は HCV の自然排除にも關与することが明らかとなっている (図 4-a)<sup>7-9)</sup>。すなわち、HCV を自然に排除した患者 388 例と持続感染が成立した患者 620 例のコホート研究において、治療感受性である rs12979860 の遺伝子型 (CC) では、HCV の自然排除を促進することが報告された<sup>7)</sup>。その後、異なるコホート研究において、rs8099917 に関しても同様の内容が報告された<sup>8)</sup>。更に興味深いことに、オーストラリアのグループから、治療感受性である rs8099917 のメジャーホモ (TT) の自然排除率が高いことに加え、HCV 自然排除の予測因子として肝炎発症時の黄疸合併が挙げられ、更にこの黄疸合併頻度がメジャーホモ (TT) 群で有意に高いことが報告された<sup>9)</sup>。このことは、ウイルス感染細胞の排除に作用する細胞性免疫応答にも *IL28B* 遺伝子多型が影響することを示唆する。C 型急性肝炎症例に対して、現在までの知見を基にテーラーメイド医療を導入すると、図 4-b のフローチャートが想定される<sup>9)</sup>。

#### 5. PEG-IFN/RBV 併用療法に伴う副反応に關与する薬理遺伝学的な遺伝子多型

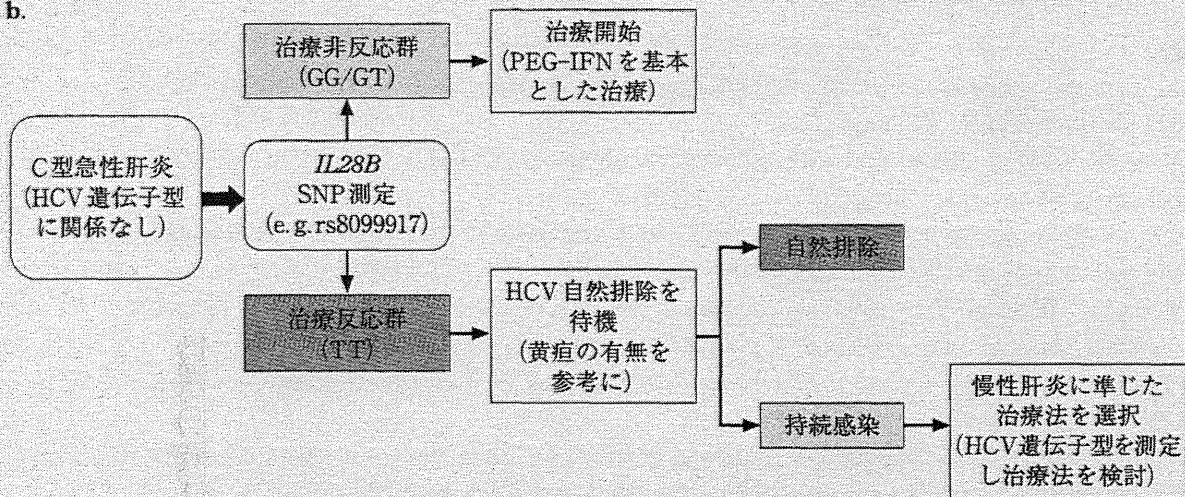
これまでに PEG-IFN/RBV 併用療法による副作用は多数報告があり、特に RBV に關連した溶血性貧血により治療途中における投与薬剤の減量や中断を余儀なくされることが知られていた。しかしながら、これら副反応が軽微な症例も存在し、薬剤反応性に影響を及ぼす遺伝子的素因の存在が示唆されていた。

2010 年、PEG-IFN/RBV 併用療法を行った 1,286 例の C 型慢性肝炎症例について、治療開始 4 週後のヘモグロビン減少量と關する SNPs の GWAS 解析が欧米から報告された<sup>10)</sup>。その結果、20 番染色体短腕上 (20p13 領域) に優位な關連を示す SNP が幾つか存在することがわかり、その後の探索により ITPA 遺伝子座の 2 カ所の機能性 SNP (rs1127354, rs7270101) が溶血性貧血と關連することが判明した。その後、同様の検討が日本人の C 型慢性肝炎 923 例を対象に行われた<sup>11)</sup>。日本人では上記 SNP rs7270101 の遺伝子多型は存在せず、したがって日本人における PEG-IFN/RBV 併用療法に伴う貧血に關する SNP は、他の人種と異なり rs1127354 のみ

a.

Study	Thomas DL, et al		Rauch A, et al			Grebely J, et al
研究デザイン	候補遺伝子探索		GWAS			候補遺伝子探索
SNPs	rs12979860		rs8099917			rs8099917
対象	European	African	HCV 単独感染	HCV/HIV 重複感染	combined	Australian
p value	$1.0 \times 10^{-7}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.96 \times 10^{-5}$	$8.25 \times 10^{-5}$	$6.07 \times 10^{-9}$	$4.4 \times 10^{-2}$
OR (95%CI)	2.6 (1.85-3.84)	3.1 (1.75-5.88)	2.49 (1.64-3.79)	2.16 (1.47-3.18)	2.31 (1.74-3.04)	3.78 (1.04-13.76)

b.

図 4-a HCV 自然排除に関連する SNP 報告内容<sup>7-9)</sup>-b C 型急性肝炎診療におけるフローチャート(案)(文献<sup>9)</sup>より改変)

であった。

一方、従来から IFN に関連した血小板減少と好中球減少も知られており、これら IFN 誘発性の副作用についても GWAS 解析が行われた<sup>12,13)</sup>。好中球減少に関連する SNP は抽出されなかったが、血小板減少に関連する SNP は 20 番染色体上に幾つか存在し、それらは上記の貧血に関連する SNP(rs1127354, rs7270101)と強い連鎖不平衡を示し、各 SNP が独立して血小板減少に関連していた。これらは RBV 誘発性貧血に対する生体反応に伴った血小板増加が影響すると解釈された<sup>12)</sup>。著者らは、日本人を対象に上記と同様に GWAS を行い、更に PEG-IFN/RBV 併用療法に伴う貧血と血小板減少の関連性を詳細に検討した<sup>15)</sup>。ヘモグロビン減少量による層別化の結果、ヘモグロビン減少値の

いかにかわらず rs1127354 が血小板減少に関連することを報告した。

以上より、RBV 誘発性貧血のみでなく IFN 誘発性血小板減少にも関連する ITPA 遺伝子多型(特に日本人の場合は rs1127354 のみ)を検査することにより、適切な PEG-IFN と RBV の投与量が設定でき、不用意な治療中断を避けることができるかもしれない。

### おわりに

現在、先進医療として厚生労働省が認可した‘IL28B の遺伝子診断によるインターフェロン治療効果の予測評価’により、IL28B 遺伝子多型検査が特定の施設で可能となり、これまでにない高い確率で治療効果を予測することができるようになった(約 80% の的中率)。治療効果

予測の更なる的中率向上が必要であるものの、この因子の同定によりテーラーメイド医療が現実のものとなりつつある。2011年9月に保険承認されたプロテアーゼ阻害剤(テラプレビル)を追加した3剤併用療法においても、*IL28B* 遺伝子多型は治療効果予測因子として重要であることが報告されている<sup>14</sup>。すなわち、*IL28B* の SNP rs8099917 がメジャーホモであれば約90%のSVRが得られるが、マイナーアリルを有するヘテロあるいはマイナーホモで、かつHCVコア

領域のaa70番のアミノ酸がアルギニン以外の変異を有する場合は、治療難治であり、SVRは20%にも満たない。したがって、治療無効と予測される症例は、次世代の新規治療法(HCVのNS5A阻害剤とNS3阻害剤の経口2剤併用療法<sup>15</sup>)などを待つか、あるいは少量長期IFN治療(発癌抑止目的)を選択することも考慮する必要がある。C型肝炎診療はまさに個別化治療の時代に突入した。

## ■ 文 献

- 1) Ge D, et al: Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**(7262): 399-401, 2009.
- 2) Suppiah V, et al: *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* **41**(10): 1100-1104, 2009.
- 3) Tanaka Y, et al: Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* **41**(10): 1105-1109, 2009.
- 4) Kotenko SV, et al: IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* **4**(1): 69-77, 2003.
- 5) Sheppard P, et al: *IL-28*, *IL-29* and their class II cytokine receptor *IL-28R*. *Nat Immunol* **4**(1): 63-68, 2003.
- 6) Muir AJ, et al: Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* **52**(3): 822-832, 2010.
- 7) Thomas DL, et al: Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**(7265): 798-801, 2009.
- 8) Rauch A, et al: Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* **138**(4): 1338-1345, 2010.
- 9) Grebely J, et al: Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. *Hepatology* **52**(4): 1216-1224, 2010.
- 10) Fellay J, et al: *ITPA* gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* **464**(7287): 405-408, 2010.
- 11) Ochi H, et al: *ITPA* polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy—a genome-wide study of Japanese HCV virus patients. *Gastroenterology* **139**(4): 1190-1197, 2010.
- 12) Thompson AJ, et al: Genome-wide association study of interferon-related cytopenia in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 2011. (Epub ahead of print)
- 13) Tanaka Y, et al: Genome-wide association study identified *ITPA/DDRKG1* variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* **20**(17): 3507-3516, 2011.
- 14) Akuta N, et al: Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* **52**(2): 421-429, 2010.
- 15) Chayama K, et al: Dual therapy with the NS5A inhibitor BMS-790052 and the NS3 protease inhibitor BMS-650032 in HCV genotype 1b-infected null responders. *Hepatology*, 2011. (Epub ahead of print)

## &lt;症例報告&gt;

多剤耐性変異を認めた悪性リンパ腫合併 B 型慢性肝炎に対し  
テノフォビルが著効した一例

渡邊 綱正<sup>1)</sup> 菅内 文中<sup>2)</sup> 楠本 茂<sup>3)</sup> 新海 登<sup>4)</sup> 飯尾 悦子<sup>1)4)</sup>  
松浦健太郎<sup>4)</sup> 日下部篤宣<sup>4)</sup> 宮木 知克<sup>4)</sup> 野尻 俊輔<sup>4)</sup> 田中 靖人<sup>1)\*</sup>

要旨：症例は 33 歳男性。B 型肝炎無症候性キャリアの経過観察中に悪性リンパ腫を発症し、2001 年よりラミブジン (LVD) 投与が開始された。2005 年に breakthrough hepatitis を発症し、アデフォビル (ADV) 追加併用療法に移行した。2007 年にはエンテカビル (ETV) 単独治療へ変更された。2008 年、2 回目の breakthrough hepatitis と悪性リンパ腫の再発を認め、再度 LVD + ADV 併用療法に変更した。しかし、ALT 上昇とウイルス量高値が持続したため、耐性検査が実施された。L80I, L180M, A181T, T184I, M204I/V の変異を確認し、多剤耐性変異と判断した。倫理委員会承認のもと、テノフォビル (TDF) + LVD 併用療法を開始し、ウイルス量の低下と肝炎の改善が得られた。合併する悪性リンパ腫に対して、化学療法後に B 型肝炎キャリアである実兄から同種骨髄移植を施行した。移植後ドナー由来の野生株によるウイルス血症を呈したが、治療継続により改善した。今回、多剤耐性変異株、かつドナー由来の野生株ウイルスに対し、TDF が著効した症例を経験したため報告する。

索引用語： テノフォビル 多剤耐性変異 breakthrough hepatitis  
B型慢性肝炎 同種骨髄移植

## はじめに

厚生労働省研究班が定めた平成 23 年度の B 型肝炎治療ガイドラインによれば、35 歳未満は drug free を目指す IFN を中心とした治療を基本とし、35 歳以上では HBV DNA の持続的陰性化および ALT 値の持続正常化を目指した核酸アナログ製剤の長期投与が基本となっている。さらに、HBe 抗原の有無と HBV DNA 量により、治療薬と治療期間の細分化を推奨している。わが国で B 型肝炎治療に保険認可されている核酸アナログ製剤は、2000 年に登場したラミブジン (lamivudine ; LVD)<sup>1)2)</sup>、2004 年のアデフォビル (adefovir dipivoxil ; ADV)<sup>3)4)</sup>、

2006 年にエンテカビル (entecavir ; ETV)<sup>5)6)</sup> が使用可能である。現在、核酸アナログ未使用例での第 1 選択薬は ETV が推奨され、今後の耐性変異出現は少数例と予測されるが<sup>7)</sup>、これまでの LVD 使用例や LVD 耐性変異出現に対する ADV 併用例も少なくない。今後は、これら各種核酸アナログ製剤の使用期間の長期化に伴い、多剤耐性ウイルスの出現が懸念される。

我々は、B 型肝炎を合併した悪性リンパ腫の治療経過中に、肝機能増悪と悪性リンパ腫の再発を呈し、早急な B 型肝炎ウイルス (HBV) コントロールを必要とする症例を経験した。耐性ウイルス検査の結果、LVD、ADV、ETV のいずれの薬剤にも耐性を有した多剤耐性株による breakthrough hepatitis (BTH) であったため、テノフォビル (tenofovir disoproxil fumarate ; TDF) を用いた rescue 療法を施行した。多剤耐性 HBV に対して TDF が奏功し、再発性悪性リンパ腫に対する全身化学療法および HBV キャリアをドナーとする同種骨髄移植が安全に施行できた 1 例を経験したので、HBV DNA 塩基配列の解析を加えて報告する。

- 1) 名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学
- 2) 名古屋市厚生院附属病院消化器内科
- 3) 名古屋市立大学大学院医学研究科腫瘍・免疫内科学
- 4) 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学

\*Corresponding author: ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp  
<受付日2011年8月22日><採択日2011年11月28日>

Table 1 Laboratory data on admission

<CBC>		<Blood chemistry>		<Virus markers>	
WBC	3590 / $\mu$ l	TP	6.8 g/dl	HBsAg	14000 COI
Neut	59 %	Alb	4.2 g/dl	(CLIA)	
Ly	31 %	T-Bil	0.5 mg/dl	HBsAb	0.5 mIU/ml
Mo	10 %	D-Bil	0.2 mg/dl	HBeAg	256 COI
Eo	1 %	AST	82 IU/L	HBeAb	0.1 %
Ba	0 %	ALT	122 IU/L	HBcAb	100 %
RBC	$441 \times 10^4$ / $\mu$ l	LDH	187 IU/L	HBV-DNA	6.5 log copies/ml
Hb	15.0 g/dl	ALP	230 IU/L	(RTD-PCR)	
Hct	43.1 %	$\gamma$ -GTP	49 IU/L	HBV Genotype	C
Plt	$20.3 \times 10^4$ / $\mu$ l	Ch-E	165 IU/L	(RFLP)	
		BUN	14 mg/dl	HBV precore	Wild type
<Coagulation>		Creat	0.7 mg/dl	(PCR-ELMA)	
PT	83.7 %	AMY	50 IU/L	HBV core promoter	Mutant type
PT-INR	1.11 INR	T-Cho	154 mg/dl	(PCR-ELMA)	
APTT	91.1 %	TG	69 mg/dl	HCV Ab 3rd	(-)
		Na	143 mEq/L		
		K	3.7 mEq/L	<Immunology>	
		CL	105 mEq/L	IgG	1026 mg/dl
		CRP	0.04 mg/dl	IgA	256 mg/dl
				IgM	120 mg/dl

## 症 例

患者：33歳，男性。

現病歴：20歳代にB型慢性肝炎(無症候性キャリア)と診断され，経過観察されていた。2000年に鼠径リンパ節腫脹をきっかけに悪性リンパ腫(ろ胞性リンパ腫) stage IV(節外病変として上咽頭と小腸浸潤あり)と診断された。HBV合併を考慮して化学療法は施行せず，腫瘍量の制御目的に脾臓への局所放射線照射(計28.8 Gy)が選択された。その後，2001年1月にLDHの再上昇を認め，左腋窩リンパ節からの再生検によりびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma：DLBCL)と診断された。B型慢性肝炎は無症候性であったが，2001年2月からLVD 100 mg/日を開始した後に，化学療法(CHO療法)及び自家末梢血幹細胞移植を施行し，DLBCLは寛解維持となった。以降もLVDを継続服用していたが，2005年4月にbreak-through hepatitis (BTH)を発症し(この時点での耐性ウイルス検査は未施行)，LVD継続投与のままにADV 10 mg/日を追加した。LVD+ADV併用療法により肝炎は鎮静化し，良好なウイルスコントロールを得ていたが，新規核酸アナログ剤であるETVの登場に伴い，2007

年9月にLVD+ADV併用療法からETV 0.5 mg/日の単独投与に治療変更された。2008年5月に2回目のBTHを認め，さらに翌6月には急激なリンパ節腫大に伴う呼吸困難感が出現し，早急なHBVコントロールと再発DLBCLに対するサルベージ治療目的で当院紹介となった。

既往歴：22歳：アデノイド摘出術。

家族歴：母：B型慢性肝炎，兄：B型慢性肝炎(無症候性キャリア)。

生活歴：飲酒：なし，喫煙：なし。

入院時現症：身長170 cm，体重69 kg，血圧111/64 mmHg，脈拍81/分，意識清明，眼瞼結膜に貧血なし，眼球結膜に黄疸なし，左鎖骨上部から正中にかけて約5×3 cmの一塊となった弾性硬なリンパ節を触知。頸部呼吸狭窄音聴取せず(ただし前屈姿勢で呼吸困難感出現あり)，心音・呼吸音正常，腹部平坦，軟，圧痛なし，肝脾触知せず，羽ばたき振戦なし。

来院時検査所見(Table 1)：(2008.6.23所見；LVD+ADV併用療法前)血液検査にてAST 82 IU/L，ALT 122 IU/L，T-Bil上昇なく，PT 92.0%と肝予備能は保持されていた。CLIAによるHBs抗原14000 COI，HBe抗原陽性，HBV DNA 6.5 log copies/mlと血中ウイルス



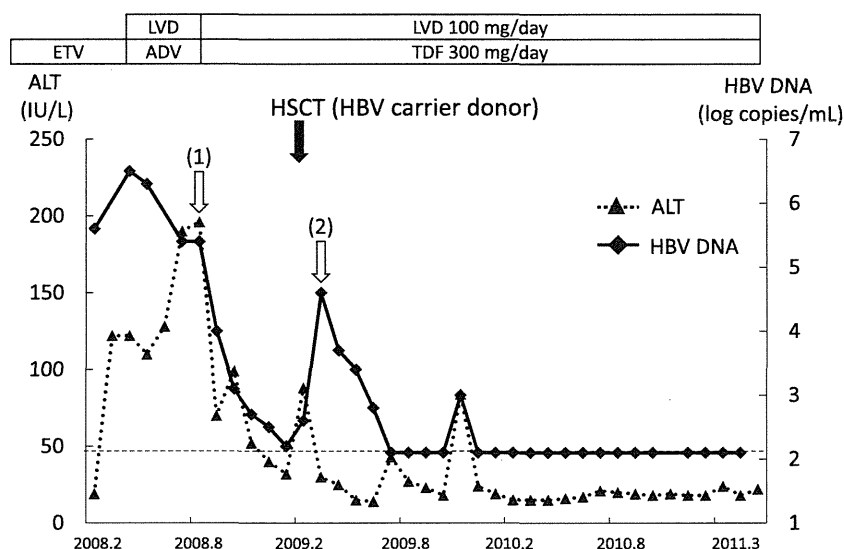


Fig. 1 HBV viral load dynamics (black diamond shapes) and course of ALT (black triangles) during different treatment (ETV: entecavir; LVD: lamivudine; ADV: adefovir; TDF: tenofovir). HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation. Hollow arrows indicate sampling times for HBV polymerase gene sequence analysis (see also Fig. 2)

Table 2 Sequence mutations of prior TDF/LVD treatment regimens

	rt A domain	rt B domain					rt C domain	rt D domain	rt E domain		
	L80	I169	V173	L180	A181	T184	A194	S202	M204	N236	M250
LVD	I		L	M					I/V		
ADF					T					T	
ETV		T		M		I		G/C	I/V		I/V
TDF							T				

Gray areas indicated the existences of the mutations in this case.

量の増大を認めた。HBV precore (nt1896)/core promoter(nt1762/1764)は Wild/Mutant type であり, Genotype は C であった。

来院後経過 (Fig. 1) : 経過より ETV 耐性株出現による BTH を疑い, ETV 単独投与から再度 LVD 100mg/日 + ADV 10 mg/日の併用療法に変更した。LVD 耐性株に ETV を使用した場合, 高率に ETV 耐性株が出現すること, これまでに多剤使用歴を有することなどから, HBV DNA の逆転写酵素 (RT) 領域のアミノ酸配列を調べた。患者血清から抽出した HBV DNA を PCR

法にて増幅した後, INNO-LiPA HBV DR (ver 2 plus ver 3) と direct sequence 法およびクローニング法にてウイルス変異を決定した (Table 2)。LVD 耐性変異である L80I, L180M, M204I/V を有し, さらに ADV 耐性変異である A181T と ETV 耐性変異である L180M, T184I, M204I/V も存在した。なお, クローニングの結果, RT 領域 domain B と C の major クローン配列は L180M + A181T + M204I であり, minor クローンとして L180M + T184I + M204V が検出された。以上より, 多剤耐性 HBV 株による BTH と診断された。

Amino acid No.	71	<b>80</b>	84			120
	AB246345	NLLSSNLSWLSLDVSAAFYH	IPLHPAAMPHELLVGSSGLPR	YVARLSSTSR		
(1) 2008/08		-----I---M-----				
(2) 2009/02		-----				
Amino acid No.	121					170
	AB246345	NINYQHGTMQDLHDSCSRN	LYVSLLLLYKTFGRKLHLY	SHPIILGFRKIP		
(1) 2008/08		-----				
(2) 2009/02		-----				
Amino acid No.	171	<b>180</b>	<b>184</b>	191	<b>204</b>	220
	AB246345	MGVGLSPFLLAQFTSAICS	VVRRAFP	HCLAF	SYMDDVVLGAKSVQHLES	L
(1) 2008/08		-----MT--I-----	I-----		<b>Ψ</b> -----	
(2) 2009/02		-----				
Amino acid No.	221		237		256	260
	AB246345	FTSITNFLSLGLIHLNPN	KTKRWGYS	LNF	MGYVIGCWGTL	
(1) 2008/08		-----T-----			S-----	
(2) 2009/02		-----			S-----	

#### Ψ: I/V mixed type

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of HBV reverse transcriptase region at different times. The reference sequences indicate the amino acid sequences of HBV genotype C clone at GenBank accession number AB246345. The analyzed points are (1) at commencement of TDF/LVD (2008. 08) and (2) at 1 weeks after HSCT (2009. 02).

LVD+ADV 併用療法開始7週時点のALTは196IU/Lと高値を維持し、またHBV DNAは5.4 log copies/mlと1 log程度の減少に留まっていた。一方、B型肝炎に対する治療継続中も呼吸困難感の改善を認めないことから、再発DLBCLに対する可及的速やかな化学療法導入が必要不可欠であった。したがって、当院倫理委員会承認のもと、8月12日よりADVに変えてTDF 300 mg/日の投与を開始した。TDF+LVD併用療法の開始後より速やかなHBV DNA量の低下と肝機能の改善を認め、DLBCLに対するサルベージ療法である化学療法(R-DeVIC療法を3コース)と放射線療法(限局的照射野として上縦隔、左鎖骨窩、左頸部へ、total 24 Gy照射)を速やかに施行することができた。年齢も若く、また実兄のHLAが一致していたため、引き続き同種骨髄移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: allo-HSCT)が検討された。しかし、同胞である兄も同様にHBV無症候性キャリアであり、さらに血中HBV DNA量は8.8 log copies/ml以上と高値を示していた。移植ドナーとしては抗ウイルス剤使用によるウイルス量の低下を推奨したが<sup>8)</sup>、ドナー本人から投与期間

の明確でない核酸アナログ治療に対する同意が得られなかった。したがって、ドナー感染HBVに薬剤耐性変異がないことを確認した後に、ウイルス量高値のまま2009年2月にallo-HSCTが行われた。HSCT施行後に血中ウイルス量の上昇と肝酵素の上昇を認めたが、HBV DNA塩基配列解析より当初レシビエントで認めた多剤耐性変異株は検出されず、ドナー由来のHBV野生株による再感染が原因と考えられた(Fig. 2)。HBV野生株であればTDF+LVD併用療法が十分に効果を有すると考え、TDF+LVD併用療法が継続された。その後、血中ウイルス量はすみやかに低下し、以降BTHの再燃なく現在まで経過し、さらにHSCT後2年6か月時点でDLBCLは完全寛解を維持している。

#### 考 察

平成23年度のわが国のガイドラインでは、初回治療例へのETV投与、およびLVD投与例でもHBV DNA感度未満の場合はETVへの切り替えが推奨されている。しかし、ETV切り替え例には微量のLVD耐性ウイルスを有する症例も存在し、長期投与によるETV耐性出

現の可能性は否定できない。また、LVD 耐性例に対する ADV 併用療法の抗ウイルス効果は概ね良好であるが、一部の症例では治療効果が低く、投与期間の長期化により少数例ながら多剤耐性変異の出現が予測される。ガイドラインによれば、LVD、ADV、ETV のいずれの薬剤にも耐性株が出現した場合は、ETV+ADV 併用療法あるいは TDF を推奨している。しかしながら、わが国では TDF は B 型慢性肝炎に対する保険認可が無く、TDF 使用症例の蓄積が乏しいため、現時点では TDF の有効性に関する一般的な見解はない。

TDF は ADV と類似した構造を有し、野生株ないし LVD 変異株に対する *in vitro* での抗ウイルス効果は同程度とされている<sup>9)</sup>。一方、TDF は ADV に比較して腎障害の発生頻度が低く、ADV の 30 倍量の投与が可能であり<sup>10)</sup>、優れた抗ウイルス効果を発揮することが期待されている。実際、ADV 単独投与との二重盲検試験による治療成績では、TDF 単独 48 週投与による HBe 抗原陽性例と HBe 抗原陰性例における HBV DNA 陰性化率は 76%、93% であり、ADV 単独療法の成績を有意に上回るものであった<sup>10)</sup>。また、TDF 耐性発現については 3 年間の継続投与で 0% と報告されている<sup>11)</sup>。

さらに海外から、LVD と ADV の両薬剤耐性ウイルスに対する TDF を用いた治療がいくつか報告されている。Choe らは、LVD+ADV 併用療法中の virologic breakthrough ないし治療反応不良を示した B 型肝炎硬変 6 例に対して TDF+LVD 併用療法を行ったところ、6 例中 5 例では rt181 や rt236 の ADV 耐性変異が確認されていたが、全例が 12 カ月以内に HBV DNA が感度以下となり、TDF が有効であったと報告している<sup>12)</sup>。また、Bommel らの報告では、LVD、ADV 使用 131 例に対して平均 23 カ月の TDF 単独治療を行ったところ、1 例も virologic breakthrough を認めず、79% が HBV DNA 感度以下に低下した。興味深いことに、LVD 耐性変異に対する TDF 治療効果は良好であったが、ADV 耐性変異に対する TDF 治療効果は減弱する (HBV DNA 感度以下の割合は、LVD 耐性変異例が 100% に対して、ADV 耐性変異例では 52%) ことが報告されている<sup>13)</sup>。一方、Patterson らは、LVD 治療不応かつ ADV 治療反応不良の 60 例に対して、前治療が ADV 単独治療例は TDF 単剤投与、ADV+LVD 併用例は TDF+LVD 併用投与とし、さらに TDF 単独 24 週投与における反応不良例は TDF+LVD 併用に移行する前向き検討を実施している。結果は 48 週後に 46%、96 週後に 64% が HBV DNA 感度以下に低下し、また TDF 使用前の LVD 耐性

変異 rt204 と ADV 耐性変異 rt181 や rt236 による治療効果への影響はなかったと報告している<sup>14)</sup>。

これらの報告は、多剤耐性症例に対して TDF が有効であることを示すとともに、ADV 耐性変異出現例では TDF 単独投与による治療効果が減弱する可能性があることを示唆している。したがって、ADV 耐性を既に有していた今回の症例では、TDF 単独投与ではなく TDF+LVD 併用療法が選択された。

当症例は、ETV の登場に伴い、それまで経過良好であった LVD+ADV 併用療法から ETV 単独投与に治療変更された。ETV 投与開始時点で耐性ウイルス検査は行われていないが、LVD 治療中に発生した BTH のエピソードから、LVD 耐性変異が既に存在することが予測される。LVD 耐性変異獲得例における ETV の genetic barrier は低く、容易に ETV 耐性変異を獲得することが理解されるが、ETV 発売当初はまだこのことが周知されておらず、服薬コンプライアンスおよび naïve 症例に対する強力な抗ウイルス効果のみを優先した ETV 単独療法への変更が一部で行われていた。現在の認識では LVD 耐性獲得症例には ADV add-on 治療が原則であるが、当時の状況を考えると当症例のごとく ETV 単独への切り替え症例が少なからず存在することが予測され、今後は多剤耐性変異ウイルスの出現が危惧される。

また、合併する悪性リンパ腫に対して、HBV キャリアをドナーとした HSCT が実施された。HBV 陽性ドナーからの骨髄移植では、HBV が高率にレシピエントに感染するため、通常はドナーに対する核酸アナログによるウイルスコントロールとレシピエントに対する HBV ワクチン投与が推奨されている<sup>8)</sup>。しかしながら、当ケースでは移植前のウイルスコントロールに対するドナーの同意が得られず、さらにレシピエントは既に HBV 感染が成立していることから、いずれの予防的処置も行うことはなかった。実際、移植後に一過性のウイルス量増加を認めたが、感染したウイルスはドナー由来の野生株であり、継続する TDF+LVD 併用療法により良好な経過を示した。我々が調べた限りでは、異なる HBV 株の重複感染に対する核酸アナログ製剤の予防効果についての報告は少なく、その頻度は不明であるが、もし重複感染が成立した場合でも耐性変異がない薬剤を選択することにより HBV の増殖は抑制可能で、重篤な肝炎を併発する危険性は少ないことが予測される。

## 結 語

LVD, ADV, ETV のいずれにも耐性を示す多剤耐性変異出現例による BTH を発症した悪性リンパ腫合併 B 型慢性肝炎に対して, TDF が著効した一例を経験した。今後, わが国でも核酸アナログ製剤投与の長期化に伴い, 多剤耐性変異を有する症例の出現が予測されることから, HBV に対する TDF 保険承認が待たれる。

謝辞 : 臨床データをご提供いただいた, 愛知県立がんセンター血液・細胞療法部 田地浩史先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Lai CL, Chien RN, Leung NW, et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61—68
- 2) Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 105—117
- 3) Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 800—807
- 4) Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808—816
- 5) Chang TT, Gish RG, de Man R, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1001—1010
- 6) Lai CL, Shouval D, Lok AS, et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1011—1020
- 7) Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137: 1593—1608 e1-2
- 8) Yeo W, Johnson PJ. Diagnosis, prevention and management of hepatitis B virus reactivation during anticancer therapy. *Hepatology* 2006; 43: 209—220
- 9) Ying C, De Clercq E, Nicholson W, et al. Inhibition of the replication of the DNA polymerase M550V mutation variant of human hepatitis B virus by adefovir, tenofovir, L-FMAU, DAPD, penciclovir and lobucavir. *J Viral Hepat* 2000; 7: 161—165
- 10) Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008; 359: 2442—2455
- 11) Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2011; 140: 132—143
- 12) Choe WH, Kwon SY, Kim BK, et al. Tenofovir plus lamivudine as rescue therapy for adefovir-resistant chronic hepatitis B in hepatitis B e antigen-positive patients with liver cirrhosis. *Liver Int* 2008; 28: 814—820
- 13) van Bommel F, de Man RA, Wedemeyer H, et al. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology* 2010; 51: 73—80
- 14) Patterson SJ, George J, Strasser SI, et al. Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B. *Gut* 2011; 60: 247—254

## A case report of successful therapy with tenofovir for a multi-drug resistant chronic hepatitis B patient complicated with malignant lymphoma

Tsunamasa Watanabe<sup>1)</sup>, Fuminaka Sugauchi<sup>2)</sup>, Shigeru Kusumoto<sup>3)</sup>, Noboru Shinkai<sup>4)</sup>,  
Etsuko Iio<sup>1)4)</sup>, Kentarou Matsuura<sup>4)</sup>, Atsunori Kusakabe<sup>4)</sup>, Tomokatsu Miyaki<sup>1)</sup>,  
Syunsuke Nojiri<sup>4)</sup>, Yasuhito Tanaka<sup>1)\*</sup>

A 33-year-old man who diagnosed with malignant lymphoma was treated with lamivudine (LVD) for chronic hepatitis B in 2001. Because he experienced the first breakthrough hepatitis in 2005, adefovir (ADV) was added to the LVD regimen for dual therapy. In September 2007, LVD plus ADV combination therapy was replaced by entecavir (ETV) monotherapy. Eight months later, in May 2008, hepatitis B virus (HBV) DNA level elevated, followed by the second breakthrough hepatitis. After then, switching from ETV to LVD plus ADV could not suppress HBV-DNA level and ALT flare because sequencing analysis showed the evidence of multiple drug resistance with L80I, L180M, A181T, T184I and M204I/V mutations. In this case, after getting the approval of the ethical committee, we applied him the combination therapy with LVD and tenofovir (TDF), that decreased the serum HBV DNA and ALT concentration within a few months and obtained the complete remission of malignant lymphoma by allogeneic bone marrow transplantation.

**Key words:** tenofovir multi-drug resistant mutation breakthrough hepatitis  
chronic hepatitis B allogeneic bone marrow transplantation

*Kanzo* 2012; 53: 35—41

- 1) Department of Virology & Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
- 2) Department of Gastroenterology, Nagoya City Koseiin Medical Welfare Center
- 3) Department of Medical Oncology and Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
- 4) Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

\*Corresponding author: ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp

## Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells

ELENA SANDALOVA,\* DILETTA LACCABUE,<sup>‡</sup> CAROLINA BONI,<sup>‡</sup> TSUNAMASA WATANABE,<sup>§</sup> ANTHONY TAN,\* HO ZI ZONG,\* CARLO FERRARI,<sup>‡</sup> and ANTONIO BERTOLETTI\*<sup>||,¶</sup>

\*Infection & Immunity Program, Singapore Institute for Clinical Sciences, A\*STAR, Singapore; <sup>‡</sup>Unit of Infectious Diseases and Hepatology, Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma, Parma, Italy; <sup>§</sup>Department of Virology & Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; <sup>||</sup>Program of Emerging Viral Diseases, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore; and <sup>¶</sup>Department of Medicine, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore

CLINICAL LIVER

**BACKGROUND & AIMS:** During viral infection, the activities of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells are carefully regulated to prevent severe damage of the infected organs. We investigated the mechanisms that control the functions of activated T cells. **METHODS:** We measured the size of the population of activated and proliferating CD8<sup>+</sup> T cells and the functional pattern of CD8<sup>+</sup> T cells specific for the entire hepatitis B virus proteome and for selected heterologous virus (Epstein–Barr virus, human cytomegalovirus, and influenza virus) using blood samples from 18 patients with acute hepatitis B. We analyzed the effects of different modulatory mechanisms, such as inhibitory molecules, suppressive cytokines (interleukin-10), and arginase, on the activities of CD8<sup>+</sup> T cells. **RESULTS:** In patients with acute hepatitis B, the expansion of activated and proliferating (HLA-DR/CD38<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>/Bcl-2<sup>low</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells did not quantitatively match their specific functions *ex vivo*; virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells had functional impairments that were temporally restricted to the acute phase of viral hepatitis. These impairments in function were not limited to HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells but were also observed in CD8<sup>+</sup> T cells with specificities for other viruses. We investigated possible causes of antigen-independent CD8<sup>+</sup> T cell inhibition and found that the increased levels of arginase observed in patients with acute hepatitis could suppress the function of activated, but not resting, CD8<sup>+</sup> T cells. **CONCLUSIONS: The increased level of arginase in patients with acute hepatitis B suppresses the functions of activated CD8<sup>+</sup> T cells. This mechanism might limit the amount of liver damage caused by activated CD8<sup>+</sup> T cells in patients with acute HBV infection.**

**Keywords:** Immune Regulation; Liver Disease; Virology; Treatment.

Infection of parenchymal organs with noncytotoxic viruses poses problems to the immune system because infected cell elimination might cause organ failure. The immune system can master such a balance because evolution toward fulminant hepatic failure is quite rare (approximately 1%) in patients with acute hepatitis B (AHB)<sup>1</sup> despite infection of most liver cells.<sup>2,3</sup> Patients with AHB are able to eliminate the virus from the hepatocytes by

developing an acute liver inflammation that recovers and does not leave any chronic pathological liver conditions.<sup>1</sup>

This ability to control the infection and the degree of liver damage is related to the balance between the quantity of infected hepatocytes and the efficiency of the T-cell response, and several factors are in place to avoid liver destruction by CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>4</sup> Important self-save mechanisms are represented by the capacity of hepatocytes to eliminate the infecting virus noncytotoxicity through the action of interferons (IFNs) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ <sup>5,6</sup> and by the hepatocyte resistance to perforin-mediated killing.<sup>7,8</sup> Other mechanisms that regulate CD8<sup>+</sup> T cell function have been recently suggested. PD-1 expression on hepatitis B virus (HBV)-specific CD8<sup>+</sup> T cells has been reported to be essential to avoid excessive T cell-mediated liver damage, in relation to its ability to inhibit T-cell function,<sup>9</sup> whereas production of interleukin (IL)-10 during the early stages of AHB has been proposed to attenuate natural killer and HBV-specific T-cell responses.<sup>10</sup> Furthermore, pioneering works of Wands and Isselbacher<sup>11</sup> and Chisari *et al*<sup>12</sup> described more than 30 years ago the presence of soluble factors (then identified as arginase)<sup>13</sup> during viral hepatitis able to suppress T-cell proliferation.

Such a scenario of multiple controls of the T-cell response during acute hepatitis is, however, complicated by our recent observation that acute HBV infection triggers a very vigorous expansion of an activated/proliferating CD8<sup>+</sup> T cell population (~25% of total CD8<sup>+</sup> T cells).<sup>14</sup> To understand how the function of such a large population of activated CD8<sup>+</sup> T cells is regulated during acute viral hepatitis, we studied the frequency and function of HBV- and heterologous virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in AHB. We observed that an efficient CD8<sup>+</sup> T cell functional suppression, independent from HBV-specific recognition, is operative during acute hepatitis. A characterization of the immunologic mechanisms responsible for such an effect showed that arginase, released either by

**Abbreviations used in this paper:** AHB, acute hepatitis B; CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein–Barr virus; GFP, green fluorescent protein; HCMV, human cytomegalovirus; ICS, intracellular cytokine staining; IFN, interferon; IL, interleukin; P, patient; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; TCR, T-cell receptor; TNF, tumor necrosis factor.

© 2012 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.041>

damaged hepatocytes<sup>13</sup> or by neutrophils<sup>15</sup> or other immune cells,<sup>16</sup> is a major determinant of CD8<sup>+</sup> T cell functional suppression.

## Materials and Methods

### Patients and Samples

Samples were taken from patients or healthy volunteers attending clinics in Parma, Italy. The local review board and ethical committee approved the study. Eighteen patients with AHB and 2 patients with drug-induced hepatitis were studied. In 11 of them, Epstein-Barr virus (EBV)-, cytomegalovirus (CMV)-, influenza-, or/and HBV pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells were detected (Table 1). Five healthy volunteers were also enrolled. The age of the subjects ranged from 20 to 54 years. Patients were selected on the basis of appearance of jaundice, high alanine aminotransferase (ALT) levels (>1000 U/L except patient [P] 10; see Table 1), and serologic profile of HBV infection (hepatitis B surface antigen positive, antibody to hepatitis B core antigen immunoglobulin [Ig] M, antibody to hepatitis B core antigen positive, and HBV DNA positive).

### Virologic Measurements

Hepatitis B surface antigen, hepatitis B e antigen, antibody to hepatitis B surface antigen, antibody to hepatitis B core antigen IgG and IgM, antibody to hepatitis B e antigen, antibody

to hepatitis D virus, antibody to hepatitis C virus, antibody to HIV-1, and antibody to HIV-2 were determined by commercial enzyme immunoassay kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL; Ortho Clinical Diagnostic, Johnson & Johnson (New York, NY); DiaSorin, Vercelli, Italy). HBV DNA was quantified by PCR Cobas Amplicor Test (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland).

### Reagents

HLA-peptide pentamers were purchased from Proimmune (Oxford, England). All fluorescence-activated cell-sorted antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). For enzyme-linked immunosorbent spot assays, the capture mouse anti-human IFN- $\gamma$  antibody, biotinylated anti-human IFN- $\gamma$  antibody, and streptavidin alkaline phosphatase were purchased from Mabtech (Stockholm, Sweden). Fifteen-mer peptides overlapping by 10 residues (total 313 peptides) were pooled into 16 mixtures as described in Tan et al.<sup>17</sup> The peptides covered the overall sequence of HBV genD (GenBank accession number AF121241) and HBV genB (GenBank accession number AF121243) and were purchased from Chiron Mimotopes (Victoria, Australia). IL-15 and IL-10 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and arginase was from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY). The arginase inhibitor nor-NOHA was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) and anti-IL-10 antibody from eBioscience (Vienna, Austria).

### Functional Assays

Intracellular cytokine staining and enzyme-linked immunosorbent spot assays were performed as described in Sandalova et al.<sup>14</sup> and Tan et al.<sup>17</sup> using specific peptides or pools of peptides covering the whole HBV proteome.

### Recovery and Inhibition of T-Cell Responses

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with AHB or healthy individuals were incubated in vitro in AIM-V medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 2% AB serum (Invitrogen) or 50% AB/patient serum where indicated for 48 hours. For the serum, IL-10, and arginase inhibition assays, the cells were incubated with or without 50% patients'/healthy serum, 10 pg/mL of IL-10, or 200  $\mu$ g/mL of arginase. Intracellular cytokine staining (ICS) was performed for pentamer-positive populations, and the percentage of inhibition was calculated based on the percentage of IFN- $\gamma$ -positive (or CD107a) virus-specific cells.

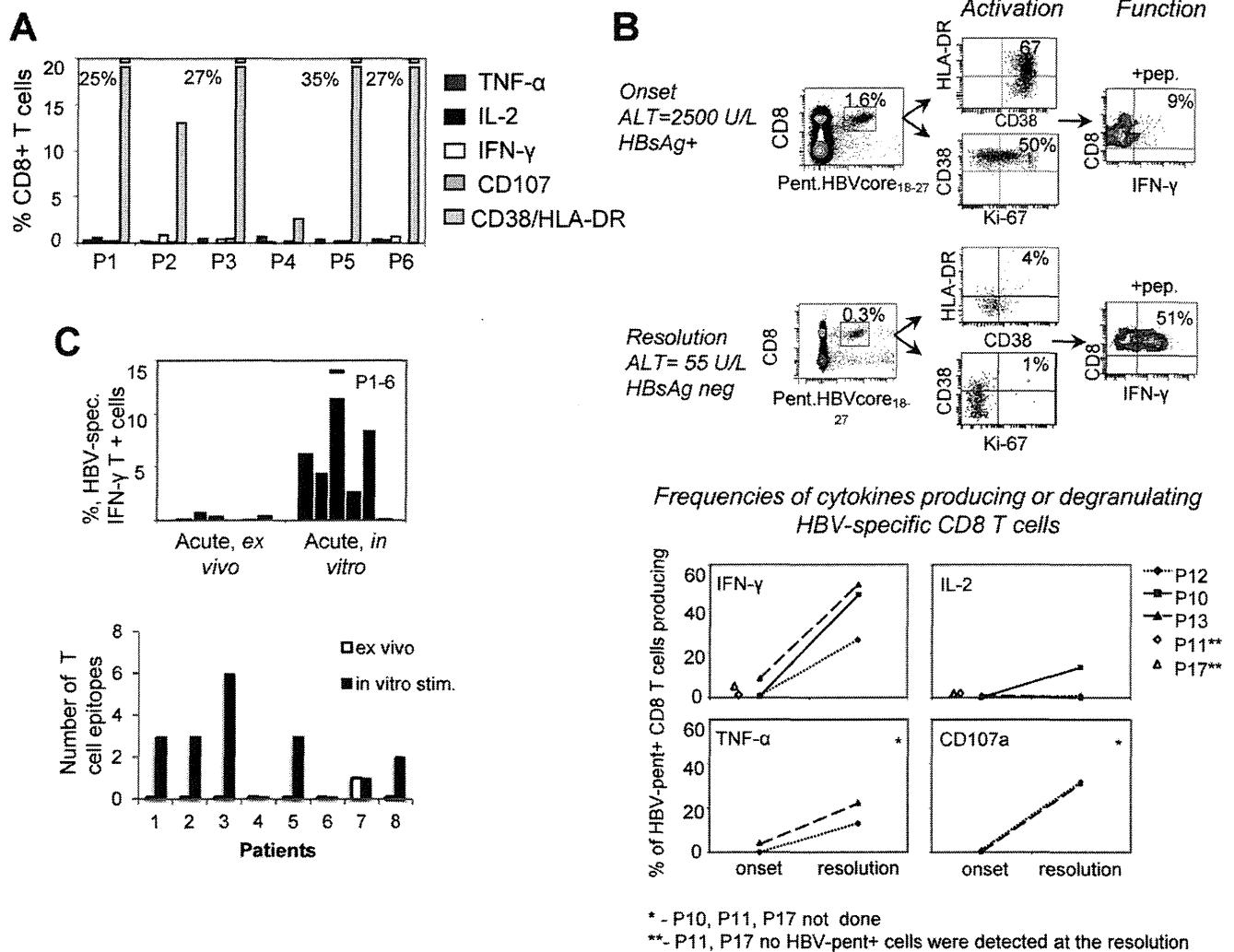
### Inhibition of T-Cell Responses via Killing Assay

HEPG2-Core green fluorescent protein (GFP), a hepatocyte cell line expressing HBV core and transduced with lentiviral vector/GFP, were plated at 100,000 cells/well overnight on a 96-well flat clear-bottom black plate (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgium) and used as target. Core 18-27V T-cell receptor (TCR) T cells produced using a healthy donor's PBMCs (described in Gehring et al.<sup>18</sup>) were thawed the next day and treated with 0.02 U/mL, 0.2 U/mL, and 2 U/mL recombinant Arginase 1 (Enzo Life Sciences) for 6 hours in AIM-V serum-free medium (Invitrogen) and then added to targets at an effector-to-target ratio of 0.7:1. HEPG2-Core GFP without effectors was used as negative control. The effector cells were removed the next day, and the plate was washed 3 times with 1 $\times$  phosphate-buffered saline before fixing with 1 $\times$  phosphate-buffered saline plus 1% formaldehyde. The plate was left to dry and GFP fluorescence mea-

**Table 1.** AHB at Clinical Onset

Patient	ALT (U/L)	Hepatitis B		
		surface antigen	Hepatitis B e antigen	Pentamer positive
P1	3441	Positive	Positive	NF
P2	3029	Positive	Positive	NF
P3	3280	Positive	Positive	NF
P4	1520	Positive	Positive	NF
P5	3188	Positive	Positive	NF
P6	1362	Positive	Positive	NF
P7	5460	Positive	Positive	EBVBZLF1 <sub>190-197</sub> EBVEBNA3A <sub>193-201</sub> EBVLMPP2 <sub>340-349</sub> CMVpp65 <sub>265-275/417-426</sub>
P8	2349	Positive	Positive	NF
P9	1443	Positive	Positive	HBVcore <sub>18-27</sub> CMVpp65 <sub>495-504</sub>
P10	648	Positive	Positive	HBVcore <sub>18-27</sub> CMVpp65 <sub>495-504</sub> FLUMP <sub>58-66</sub>
P11	1197	Positive	Positive	HBVcore <sub>18-27</sub> CMVpp65 <sub>495-504</sub> FLUMP <sub>58-66</sub>
P12	1164	Positive	Positive	HBVcore <sub>18-27</sub> FLUMP <sub>58-66</sub>
P13	1107	Positive	Positive	HBVcore <sub>18-27</sub> CMVpp65 <sub>495-504</sub>
P14	5650	Positive	Positive	EBVLMPP2 <sub>419-427</sub> CMVpp65 <sub>495-504</sub> FLUMP <sub>58-66</sub>
P15	1207	Positive	Positive	FLUMP <sub>58-66</sub>
P16	1673	Positive	Positive	EBVEBNA1 <sub>407-417</sub> CMVpp65 <sub>123-131</sub> FLUMP <sub>58-66</sub>
P17	2346	Positive	Positive	CMVpp65 <sub>495-504</sub> CMVpp65 <sub>123-131</sub> FLUMP <sub>58-66</sub> HBVcore <sub>18-27</sub>
P18	2602	Positive	Positive	HBVenv <sub>183-191</sub> CMVpp65 <sub>123-131</sub>

NF, not found.



**Figure 1.** Dysfunction of HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in AHB infection. (A) Discrepancy between activated/proliferating and functional CD8<sup>+</sup> T cells. Bars represent the frequency of TNF- $\alpha$ /IL-2/IFN- $\gamma$ -producing, degranulating (CD107a<sup>+</sup>), and CD38/HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in 6 patients with AHB ex vivo. (B) Direct ex vivo visualization of activation (CD38/HLA-DR<sup>+</sup> and CD38/Ki-67<sup>+</sup>) and IFN- $\gamma$  production of HBV pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells in representative patients at the onset and after resolution of acute HBV infection. PBMCs were stained with HBV core-18-27 pentamer and CD38, HLA-DR, and Ki67 or stimulated with c18-27 peptide (100 nmol/L) for 4 hours before ICS. Graphs show the frequencies of HBV pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or IL-2 or degranulating (CD107a<sup>+</sup>) after peptide stimulation in the indicated patients with AHB at the onset and resolution. (C) PBMCs of AHB were stimulated with pools of peptides covering the whole HBV proteome ex vivo or expanded in vitro for 10 days. The upper graph compares production of IFN- $\gamma$  ex vivo and after in vitro expansion. The lower graph shows the number of responses that were found ex vivo and after in vitro expansion.

sured with the Tecan Infinite 200 PRO plate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland).

## Results

### HBV-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Function During Acute Hepatitis

We have recently shown that patients with AHB present a high frequency of circulating activated/proliferating CD8<sup>+</sup> T cells, composed of a large quantity of HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells and inflated by IL-15 activated herpes virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>14</sup> To directly quantify the whole HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire, PBMCs of 6 patients with AHB (P1–6) were stimulated directly ex vivo with pools of overlapping peptides covering the whole HBV proteome. Different functional assays including ICS for IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2 and

degranulation by CD107a (Figure 1A) and IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunosorbent spot assays (Supplementary Figure 1A) were used, and the frequency of functional and activated CD8<sup>+</sup> T cells was compared. A substantial discrepancy between activated CD8<sup>+</sup> T cells and HBV-specific functional T-cell numbers was evident. At the onset of hepatitis, approximately one fourth of CD8<sup>+</sup> T cells (see P1, P3, P5, and P6; Figure 1A) are activated, but less than 1% of T cells respond to HBV antigens by producing Th1 cytokines or degranulating, suggesting that the majority of activated HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells do not respond to peptide stimulation. This finding was confirmed by selecting 4 patients with HLA-A201<sup>+</sup> AHB, in whom HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells could be directly visualized by HBV-specific pentamers (P10–13 and P17; Table 1). HBV



pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells were then tested directly ex vivo for their expression of activation (CD38 and HLA-DR) and proliferation (Ki-67) markers and for the functional ability to respond to the specific HBV peptide stimulation. Figure 1B shows that at the onset of acute hepatitis, at least 90% of HBV-HLA pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells are unresponsive to peptide-specific stimulation, despite expressing activation and proliferation markers, but regain their ex vivo functionality when acute hepatitis progresses toward resolution.

In some subjects, in whom HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells could be directly visualized longitudinally, restoration was robust, whereas in others it was only partial (Supplementary Figure 1B).

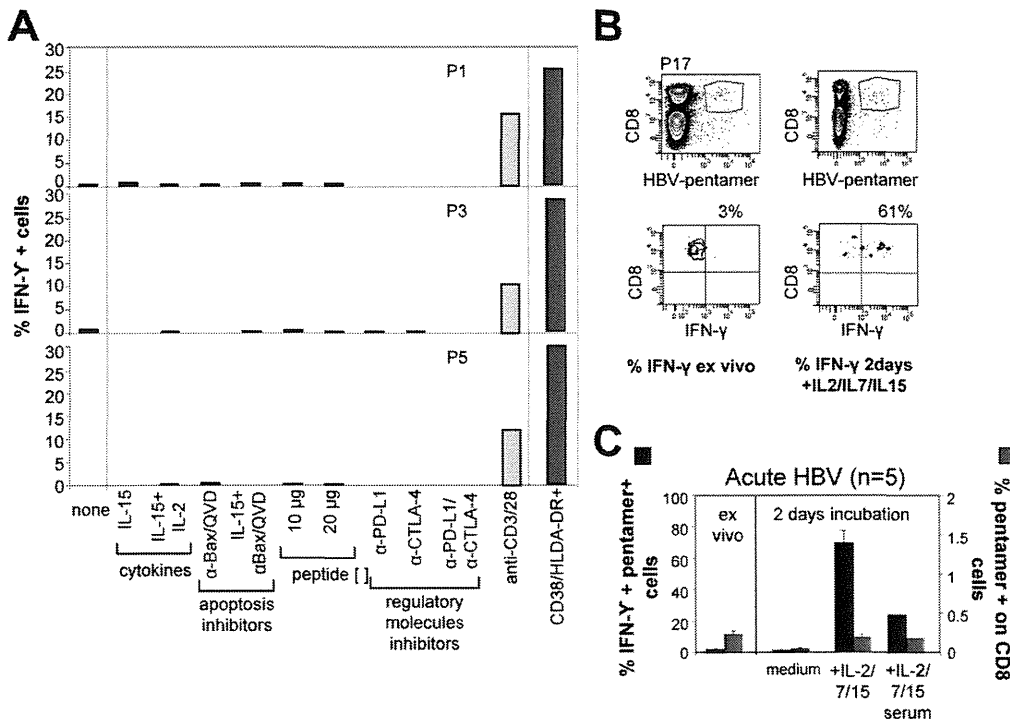
**Reverting HBV-Specific T-Cell Functional Suppression**

Functional data derived from the ex vivo analysis of the HBV-specific T-cell response in AHB contrasts with the prior description of a strong and multi-specific T-cell response in the same patients.<sup>19</sup> This apparent discrepancy could be related to the different experimental systems used. The concept of strong and multi-specific T-cell responses during acute HBV infection derives from experiments performed after in vitro expansions of T cells,<sup>19</sup> whereas here the functional “exhaustion” was detected by analyzing HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells ex vivo. Indeed, when we compared

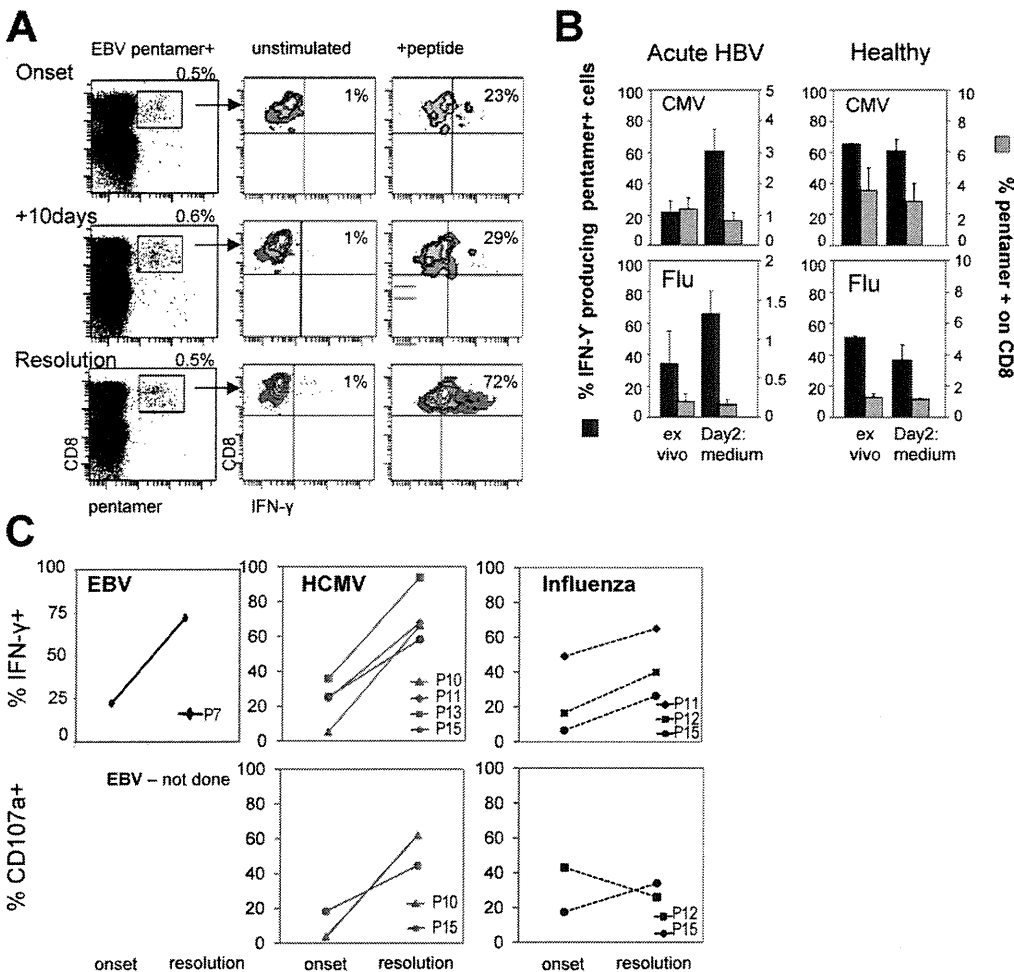
HBV-specific T-cell responses ex vivo and after in vitro expansion, the magnitude and multi-specificity of HBV-specific T cells (Figure 1C) were restored after in vitro culture. To better analyze the causes of such restoration, a series of experiments was performed. A negligible restoration of function was detected when ex vivo HBV-specific T-cell function of AHB was tested in the presence of antibodies able to block inhibitory receptors expressed on exhausted T cells (PD-1, CTLA-4)<sup>20–22</sup> or of antiapoptotic drugs<sup>23</sup> or with addition of T-cell stimulatory cytokines (IL-15, IL-2)<sup>24</sup> (Figure 2A). In contrast, a 2-day incubation in media containing IL-2, IL-7, and IL-15 led to a robust restoration of the ability of CD8<sup>+</sup> T cells to produce IFN- $\gamma$  (from 5% to 65% of HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) (Figure 2B and C). However, the restoration of the HBV-specific response is abrogated if the medium contains 50% of the patient’s serum (Figure 2C; IL-2/7/15<sup>+</sup> serum). Thus, activated HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells of AHB need cytokines to survive, but soluble factors present in patients’ sera contributed to HBV-specific T-cell functional impairment.

**CD8<sup>+</sup> T Cell Functional Inhibition During Acute Hepatitis Is Not Restricted to HBV-Specific T Cells**

To further analyze whether soluble factors can alter CD8<sup>+</sup> T cell functionality, effector memory CD8<sup>+</sup> T



**Figure 2.** Analysis of functional recovery of HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. (A) Patients’ PBMCs were stained with CD38 and HLA-DR or stimulated with known specific peptides in different conditions: (1) in medium alone; (2) with IL-15 alone or IL-15 and IL-2; (3) increasing the concentration of specific peptides; (4) with apoptosis inhibitors, anti-Bax peptide, and QVD alone or with IL-15; and (5) blocking PD-L1, CTLA-4, or both. The cells were incubated for 12 hours and then stimulated with specific peptides overnight in the presence of brefeldin A, and ICS was performed. The experiment was performed in 3 individual patients. (B and C) PBMCs of patients with AHB were stimulated with peptide ex vivo or after 2 days of in vitro culture in medium alone or with IL-2, IL-7, and IL-15 or in 50% patients’ serum with IL-2, IL-7, and IL-15. Fluorescence-activated cell sorter plots show the IFN- $\gamma$  production by HBV pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells ex vivo and after 2 days of culture. Graphs show IFN- $\gamma$  production by HBV pentamer-positive cells (black bars) and the frequency of pentamer-positive cells (gray bars).



**Figure 3.** Functional inhibition of heterologous CD8<sup>+</sup> T cells during AHB. (A) Production of IFN- $\gamma$  by EBV pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells during AHB. PBMCs were stained with EBV BZLF1190–197 and EBNA193–201 pentamers and stimulated with the relevant peptides. After 4 hours of incubation with brefeldin A, ICS was performed as described in Materials and Methods. The cells were gated on CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and EBV pentamer positive. Data of a representative patient at the onset, 10 days after onset, and at resolution of acute HBV infection are shown. (B) Altered IFN- $\gamma$  production and CD107a<sup>+</sup> expression on EBV, HCMV, and influenza pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells in 5 patients with AHB over time. (C) Frequencies of CMV (n = 4) or influenza (n = 3) pentamer-positive CD8<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$ -positive pentamer-positive cells in patients with AHB compared with healthy controls (n = 3) ex vivo and after 2 days in culture with IL-2, IL-7, and IL-15.

cells specific for viruses unrelated to HBV (human CMV [HCMV], EBV, and influenza-named heterologous viruses) were studied. Heterologous virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in AHB were visualized with specific HLA pentamers, and synthetic peptides corresponding to the specific viral epitopes were used to stimulate the cells directly ex vivo. The frequency of heterologous virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells was constant over time without signs of attrition (Figure 3A and data not shown), but their functionality (IFN- $\gamma$  production and degranulation) was partially inhibited during the acute phase of hepatitis (Figure 3A and B).

Similar to HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, functional recovery of heterologous virus-specific T-cell function was observed by incubating PBMCs of AHB for 2 days in culture (Figure 3C). In this case, the addition of cytokines (IL-2, IL-7, and IL-15) was optional, because the survival of heterologous virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells present in acute hepatitis was not dependent on the presence of IL-2, IL-7, and IL-15. In vitro incubation did not affect the functionality of heterologous virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells present in healthy individuals (Figure 3C and data not shown).

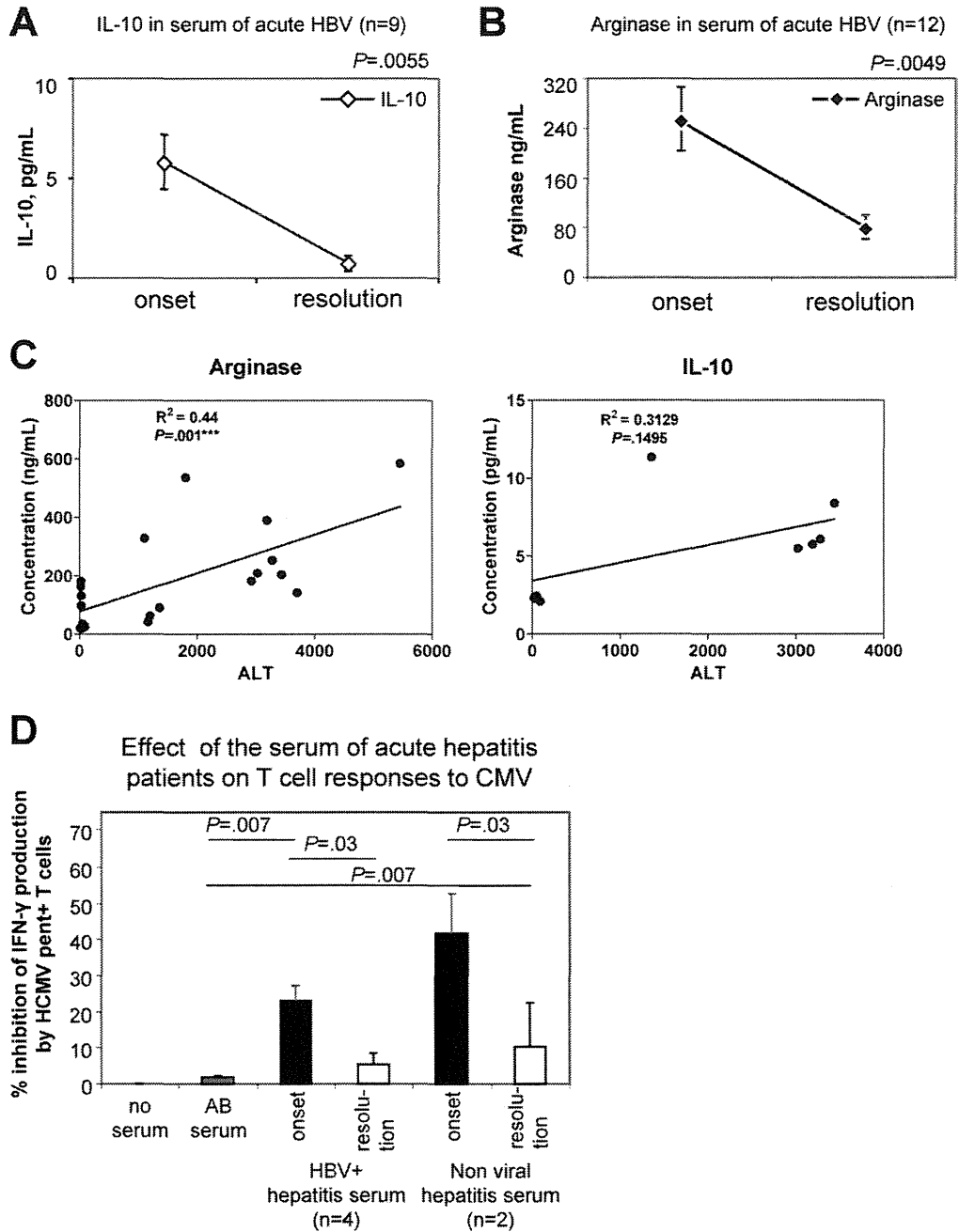
Thus, these data show that antigen-independent mechanisms of T-cell suppression are active during acute hepatitis and that soluble factors are likely implicated. Both HBV- and heterologous-specific CD8<sup>+</sup> T cells regain function when incubated with normal me-

dia with cytokines, but not with acute hepatitis sera (Figures 2E and 3C).

#### Soluble Factors Present in the Serum of Patients With Acute Hepatitis Inhibit CD8<sup>+</sup> T Cell Function

The role of soluble factors in inhibiting T-cell proliferation in patients with acute and chronic hepatitis was suggested 30 years ago.<sup>11,12</sup> Arginase released by the injured liver parenchyma was shown to affect T-cell responsiveness<sup>13</sup> and more recently has been implicated in causing low proliferation of intrahepatic T cells in patients with chronic hepatitis B.<sup>25</sup> Furthermore, arginase can be produced by other cell types such as neutrophils,<sup>15</sup> which participate in the development of acute hepatitis.<sup>26</sup> One other soluble factor, IL-10, is an immune regulatory cytokine that has been associated with the delayed expansion of HBV-specific T-cell response during acute hepatitis.<sup>10</sup>

To understand whether IL-10 and arginase can be responsible for the inhibition of CD8<sup>+</sup> T cell function, we first measured their concentrations in patients with AHB. IL-10 and arginase values were elevated at the onset of acute hepatitis in comparison with disease resolution (Figure 4A and B). The linear regression analysis showed significant correlation of serum ALT and arginase values;



CLINICAL LIVER

**Figure 4.** Sera of patients with acute hepatitis inhibit CD8<sup>+</sup> T cell function. (A) IL-10 and (B) arginase were measured in patients' serum (n = 9; n = 12) at the onset of acute hepatitis and at the resolution. (C) Correlation of serum levels of arginase I and IL-10 with ALT. Linear regression analysis of serum arginase I levels (left panel) and IL-10 levels (right panel) against ALT from patients with acute HBV (n = 12) was performed. A P value of <.05 indicates a gradient with significant deviation from 0. (D) Effect of the serum of AHB on T-cell responses to HCMV. PBMCs of healthy individuals with a defined CMV response were cultured for 48 hours in presence of IL-15 (10 ng/mL) and 50% of the serum of HBV-positive patients or patients with drug-induced hepatitis at onset or resolution (n = 4); alternatively, healthy AB serum or no serum was used. (Acute onset sera ALT levels ranged from 3500 to 2600 U/L, arginase from 220 to 160 pg/mL, and IL-10 from 8 to 6 pg/mL.) After incubation, ICS was performed for IFN- $\gamma$  after 5 hours of stimulation with specific peptide. Percent inhibition by serum was calculated based on the percent of IFN- $\gamma$ -positive CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. The number of patients' sera tested is indicated.

however, the correlation of ALT and IL-10 levels was not significant (Figure 4C).

We then tested whether the serum of AHB could inhibit virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell functions. PBMCs containing HCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were incubated with IL-15 for 48 hours (which activates HCMV-specific T cells<sup>14</sup>) in the presence of serum (50% of cell medium) of healthy individuals or patients with AHB (n = 4) collected during the acute phase (ALT level >2000 U/L) and after recovery (ALT level <60 U/L). After incubation, IFN- $\gamma$  production was tested by ICS after 5 hours of stimulation with specific peptides. Incubation with patients' sera collected during the acute phase inhibited IFN- $\gamma$  production of HCMV-specific activated T cells (Figure 4D). Interestingly, sera of 2 patients with drug-related subfulminant hepatis

(ALT level >1500 U/L) were equally suppressive (Figure 4D).

### Arginase Suppresses Activated CD8<sup>+</sup> T Cell Function

To decipher whether IL-10 or arginase can mediate the observed inhibitory effect observed, HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells or PBMCs of healthy donors containing HCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were incubated with IL-10 and arginase and their ability to recognize specific targets was tested.

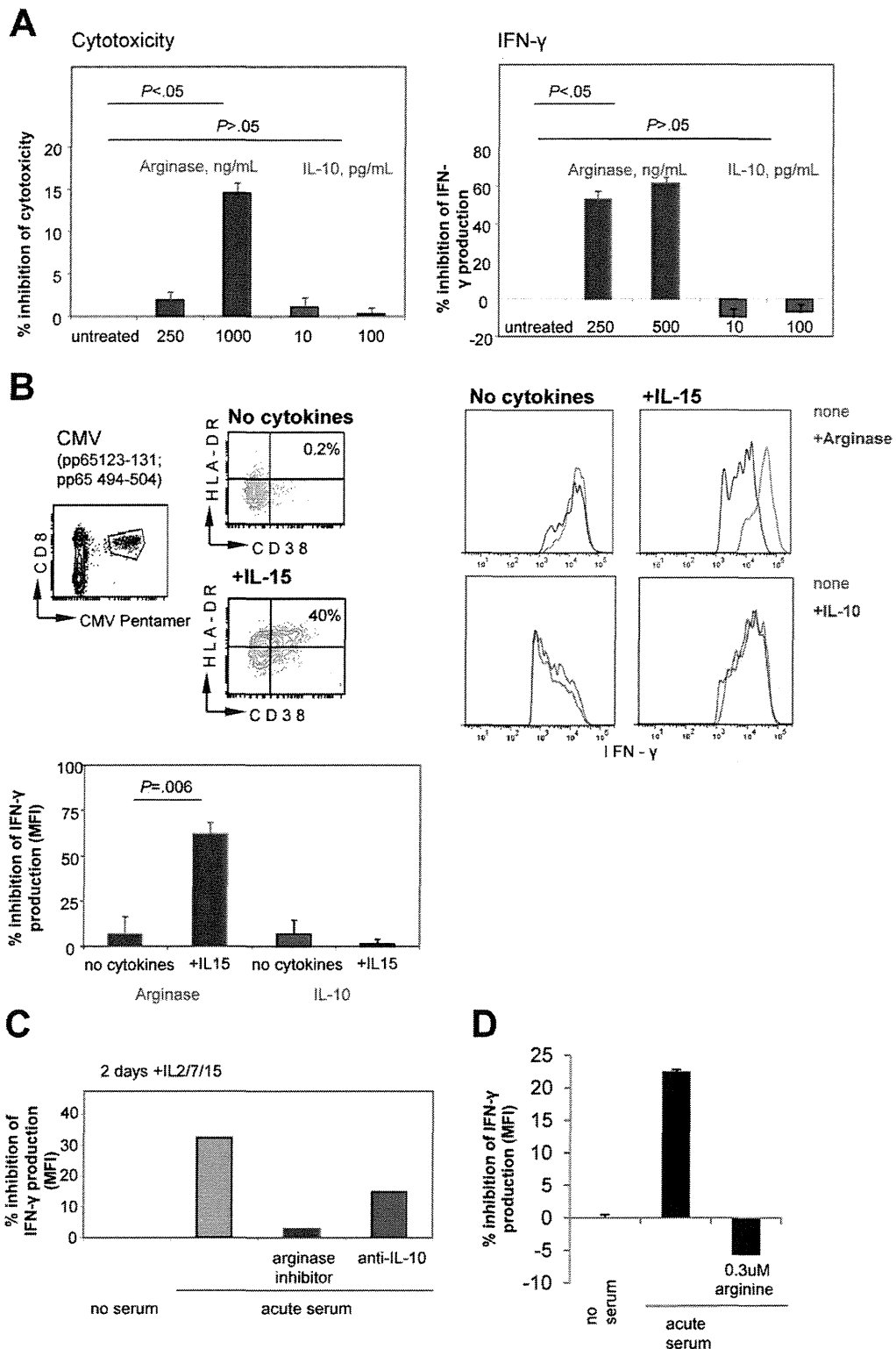
Arginase inhibited HBV- and HCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cell function (cytotoxicity and cytokine production), confirming the ability of this enzyme to alter the function of

effector T cells<sup>16</sup> (Figure 5A and B). Note, however, that concentrations of arginase higher than those detected in the sera of acute patients (which are ~250 ng/mL) were necessary to inhibit cytotoxicity (Figure 5A and Supplementary Figure 2).

In contrast, IL-10 did not show any inhibitory effects on the function of effector T cells, in line with its preferential effect on antigen-presenting cells and T-cell induc-

tion.<sup>27</sup> Interestingly, only cytokine-activated HCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were suppressed by arginase (Figure 5A and B), whereas the function of resting HCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells was altered neither by arginase nor by IL-10. Similar results were confirmed on EBV and influenza-specific CD8<sup>+</sup> T cells (Supplementary Figure 3).

To confirm that arginase present in the serum of patients with acute hepatitis is responsible for the inhibitory



CLINICAL LIVER