

200400679 A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 門田 守人

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究	1
門田 守人	

II. 分担研究報告

1. 進行肝細胞癌に対するインターフェロン併用肝動注化学療法—シスプラチン, 5-FU を用いた Randomized control trial(RCT)—に関する研究	11
金子 周一	
2. 進行肝がんの治療戦略に関する研究	13
寫原 康行	
3. 5-FU+IFN- α 併用による肝癌細胞増殖抑制機序に関する研究	16
神代 正道	
4. 門脈腫瘍塞栓を合併する進行肝がんに対する IFN+5FU 動注化学療法に関する研究	19
小俣 政男	
5. 肝細胞癌の集学的治療における肝動脈塞栓療法 of 役割に関する研究	22
中村 仁信	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究

総括研究報告書

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究

分担研究者 門田守人 大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科 教授

研究要旨:国民病と言われているウイルス性肝炎の終末像である肝細胞癌は極めて予後不良である。特に、脈管侵襲、多発病巣、遠隔転移などをともなう高度進行肝細胞癌は治療の対象外とされ、標準的な治療が全く無く、また新しい治療の開発も積極的にはなされていないのが現状である。このような既存の治療が奏功しない、高度進行肝癌に対する新しい治療法の実現は、肝細胞癌全体の予後向上に寄与することは間違いない。

われわれは、数年前より門脈内腫瘍栓をともなう高度進行肝細胞癌に対しインターフェロン(IFN- α)併用 5-fluorouracil(5FU) 動注化学療法を施行し、その有効性(約5割の奏効率)について報告してきた。今後この治療を進展させるためには、適切な評価法に基づく本療法の有効性の裏付けが必要であるとともに、それに併行して本療法の作用機序の詳細について解明することが重要課題となる。

本研究においては、臨床的検討として、進行肝細胞癌に対するIFN併用化学療法の実効性の検証を目的として、Randomized Controlled Trial (以下RCT)を施行した。

また、その一方で本療法の作用機序を、分子生物学的手法や免疫組織学的手法などの方法を用いて、①IFN- α レセプター及びそのシグナル伝達機構、②血管新生因子との関係、③IFN- α の免疫学的機序、特にT細胞、NK細胞における各種 Death Ligandとそのレセプターの関与、などについて検討した。

臨床研究については、昨年度より臨床試験を開始した。2003年10月より臨床試験登録を開始し、2004年3月末までに、34症例が既に登録された。

基礎的検討については、①IFN- α レセプター及びそのシグナル伝達機構:本併用療法時の細胞周期関連分子の遺伝子・蛋白発現に関して、IFN- α \rightarrow IFN- α receptor \rightarrow JAK kinase \rightarrow STAT などといった細胞内シグナル伝達分子の発現と本療法の効果に関与について検討したところ、STAT、Bcl-XIの関与が明らかになり、さらにはIFN受容体のtransfectionモデルにおいて、受容体の発現と抗腫瘍効果についての関係を証明した。②抗血管新生作用関連分子: nude mouse ヒト腫瘍移植モデルを使用し、固形癌での血管新生について、蛋白レベルでの発現評価(免疫組織染色)を施行したところ、IFN/5FUにより、腫瘍内のMVD(microvessel-density)の低下と、angiopoietin2の関与が示された。③免疫作用関連分子:本併用療法時のTリンパ球上のTRAIL発現や腫瘍細胞上のTRAIL receptor (TRAIL-R)の発現を評価し、培養肝腫瘍細胞傷害能を検討した。その結果、5FUやIFNはTRAIL-RやTRAILの発現を増強し、さらにIFN/5FU併用の方がIFNや5FUの単剤投与より、培養肝腫瘍細胞傷害能を有意に増強させ、この機序に関する免疫担当細胞はNK細胞であることを証明した。

現時点においては、基礎的検討による有用性についてのみ証明されたところではあるが、今後の臨床試験の結果により、進行肝癌の新規治療として証明される可能性が十分にある。本研究の成果は本邦のみならず世界的にも極めて重要なものとなると期待される。

A. 研究目的

肝細胞癌に対する治療は手術の他、肝動脈塞栓療法やアルコール注入、熱凝固療法など、数多く開発されてきたが、その多くは比較的早期の癌のみが対象となる治療法であった。このような初期の段階に対する治療のみでは、仮に切除が可能であった症例でもその5年生存率は約50%、無再発生存率ともなれば25%前後と、その根治性に関してははなはだ不十分である。さらなる予後の向上には、既存の治療が効果を示さない、所謂、“治療抵抗性”高度進行肝細胞癌に対して、十分な注意が払われなければならない。

このような状況下で、我々は、予後が数ヶ月と思われる門脈腫瘍内瘻栓(Vp3以上)合併肝細胞癌などの高度進行肝癌に対してインターフェロン- α (IFN- α)の皮下注と5-fluorouracil(5FU)の動注化学療法をパイロットスタディーとして施行し、その有効性(約5割の奏功率)を報告した。現在までの検討から、他の消化器癌とは異なり、肝細胞癌では特異的にIFN- α の効果が認められ、5-FUと併用することにより、さらなる予後の改善が期待できるのではないかと考えられる。

そこで本研究においては、まず、肝細胞癌治療の経験豊富な施設を中心に、IFN併用の有無によるRandomized Controlled Trial(RCT)を計画し、その有効性を確認すると同時に本療法の作用機序に関する基礎的検討を施行する。そして、その機序解明に基づき、分子標的治療、免疫治療、遺伝子治療を視野に入れた治療抵抗性肝癌に対する新しい治療法へと展開する。

B. 研究方法

1. 臨床的検討

<高度進行肝細胞癌におけるIFN- α 併用化学療法のRCT>

十分なインフォームドコンセントのもと、積極的に治療抵抗性の進行肝細胞癌(IM3, Vp0, 1, 2)に対して、IFN- α の皮下注の有無による5-FUの動注化学療法の有効性の確認の意味で、RCTを施行する。

対象症例の選択基準:

- (1) 進行肝細胞癌(IM3, Vp0, 1, 2)肝内転移が3区域以上に及ぶIM3肝細胞癌で、肉眼的門脈内腫瘍栓を門脈第1次分枝より中枢に認めないもの(Vp3-4は除く)
いわゆる既存治療(TAEなど)が無効な多発肝細胞癌症例

- (2) 年齢は20歳以上、70歳未満
- (3) 骨髄、肝、腎、心肺機能が十分に保たれ、全身状態(Performance Status: PS)が0, 1

(白血球 $\leq 4,000/\text{mm}^3$ 、血小板 $\leq 80,000/\text{mm}^3$ 、血清T.Bil $\leq 1.5\text{mg/dl}$ 、血清AST $< 100\text{IU/l}$ 、血清ALT $< 100\text{IU/l}$ 、血清Crnn $\leq 1.5\text{mg/dl}$)

治療方法:

4週間を1クールとする。全症例において、2週間(第1, 2週)、5FU $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}\cdot\text{週}$ 5日間を24時間かけて持続動注する。IFN- α 併用群においては、4週間の間、IFN- α を週3回皮下注する。非併用群においては、投与しない。

観察項目:

2クール施行前後における、抗腫瘍効果:

画像診断として、造影CT

(multi-detector CT)を、腫瘍マーカーとしてAFP、PIVKA-IIを測定し抗腫瘍効果について検討する。

いずれの症例も、治療効果がないと判定した時点で、他治療への変更は可能である。

2. 基礎的検討

<IFN- α レセプター及びそのシグナル伝達機構に対する検討>

本併用療法時の細胞周期関連分子の遺伝子・蛋白発現をさらに詳細に検討した上で、

IFN- α \rightarrow IFN- α receptor \rightarrow JAK kinase \rightarrow STATといった細胞内シグナル伝達分子の発現の多寡等と本療法の効果との関与について検討した。さらにIFN受容体を細胞内にtransfectし、その重要性について検討した。

<抗血管新生作用分子に関する検討>

nude mouseヒト腫瘍移植モデルを使用し、固形癌での血管新生の評価及び各種の血管新生因子のmRNAレベル(定量的RT-PCR法)及び蛋白レベルでの発現量の評価(免疫組織染色)を行った。

<免疫学的機序としてTRAILおよび同レセプター発現の基礎的臨床的検討>

本併用療法時のTリンパ球上のTRAILの発現や腫瘍細胞上のTRAIL receptor (TRAIL-R)の変化について、mRNAレベル(RT-PCR法)、蛋白レベル(Flowcytometry法)で評価した。さらにその抗腫瘍活性について、培養肝癌細胞傷害能をKilling-Assayをもちいて検討した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1. 臨床的検討

<高度進行肝細胞癌における IFN- α 併用化学療法 of RCT>

治療抵抗性の進行肝細胞癌(IM3, Vp0, 1, 2)の症例において、IFN 併用化学療法の有効性について確認するための臨床第 II 相試験としての RCT(多施設共同臨床試験)を、前述したプロトコールに従い現在施行中である。2005 年 3 月末までに、34 症例が既に登録された。

2. 基礎的研究

<IFN- α レセプター及びそのシグナル伝達機構に対する検討>

IFN- α レセプター及びそのシグナル伝達機構については、STAT、Bcl-X1 等が関与していることが明らかになった。また、IFN 受容体の transfection モデルにおいて、受容体の発現と抗腫瘍効果についての直接的関係を証明した。

<抗血管新生作用分子に関する検討>

nude mouse ヒト腫瘍移植モデルにおいては、5FU/IFN 併用により、5FU や IFN の単剤投与より、腫瘍内の MVD (microvessel-density) を有意に減少させることが分かった。各種の血管新生因子(angiopoietin など)の mRNA レベル(定量的 RT-PCR 法)及び蛋白レベルでの発現評価(免疫組織染色)について検討したところ、angiopoietin2 が MVD の現象に関与している可能性が示された。

<免疫学的機序として TRAIL および同レセプター発現の基礎的検討>

5FU は腫瘍細胞上の TRAIL-R の発現を、IFN は、T リンパ球上の TRAIL 発現を増強させることが mRNA レベル(RT-PCR 法)や蛋白レベル(Flowcytometry 法)で証明された。さらに、5FU/IFN 併用使用は、5FU や IFN の単剤投与と比較して、有意に培養肝癌細胞傷害能を増強させ、この TRAIL/TRAIL-R を介した抗腫瘍効果における免疫担当細胞は NK 細胞である可能性が示された。

D. 考察

既存の治療法により治療効果の認められない進行肝細胞癌に対する 5FU/IFN 併用化学療法の有用性については、本研究による全国レベルでの多施設第 II 相臨床試験により、その有用性が

証明される可能性は高い。

その根拠の一つとして、基礎的解析ではあるが、IFN- α レセプター及びそのシグナル伝達機構に対する検討、抗血管新生作用関連分子に関する検討、免疫学的機序として TRAIL および同レセプター発現の基礎的検討の 3 つの異なる検討により、それぞれ 5FU/IFN 併用化学療法の有用性を支持する結果が導かれた。このことは、分担研究者らの基礎的検討により得られた結果とも合致し本療法の可能性について十分に指示される結果であると思われる。

E. 結論

5FU/IFN 併用化学療法が本研究によって“治療抵抗性”の高度進行肝細胞癌に対する新規治療として証明される可能性は高い。現時点においては、基礎的検討においてのみ証明されたところではあるが、臨床試験の結果によっては、肝癌治療の“breakthrough”となることが十分に期待される。

F. 健康危険情報

現時点においては特にはないが、本年度より開始した多施設共同第 II 相比較臨床試験により、肝動注もしくは IFN 皮下注による有害事象が明らかになる可能性はある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bazarragchaa D., Nagano H., Kondo M., Yamamoto H., Hiraoka N., Yamamoto T., Marubashi S., Miyamoto A., Umeshita K., Dono K., Nakamori S., (Wakasa K.), Sakon M., Monden M.: Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: Relevance to tumor dedifferentiation. Int J Oncol 26, 319-327, 2005.
- 2) Kondo M., Nagano H., Sakon M., Wada H., Damdinsuren B.,

- Yamamoto H., Hiraoka N., Eguchi H., Miyamoto A., Yamamoto T., Ota H., Nakamura M., Marubashi S., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Sakon M., Monden M.: Combination of interferon alpha and 5-fluorouracil induces apoptosis through interferon alpha/beta receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *Clinical Cancer Research* 11, 1277-1286, 2005
- 3) Nagano H., Sakon M., Eguchi H., Kondo M., Yamamoto T., Ota H., Nakamura M., Wada H., Bazarragchaa D., Marubashi S., Miyamoto A., Takeda Y., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Monden M.: Hepatic resection followed by IFN- α and 5-FU for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombus in the major portal branch. *Hepatology*. (in press)
- 4) Xu Xundi., Sakon M., Nagano H., Hiraoka N., Yamamoto H., Hayashi N., Dono K., Nakamori S., Umeshita K., (Ito Y.), Matsuura N., Monden M.: Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* 11, 25-32, 2004.
- 5) Aoki T., Miyamoto A., Marubashi S., Nagano H., Umeshita K., Fujiwara Y., Dono K., Nakamori S., Sakon M., Monden M.: Clinical value of alterations in p73 gene, related to p53 at 1p36, in human hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* 24, 441-446, 2004.
- 6) Kurokawa Y., Matoba R., Hiroaki N., Sakon M., Takemasa I., Nakamori S., Dono K., Umeshita K., Ueno N., Ishii S., Kato K., Monden M.: Molecular Prediction of Response to 5-Fluorouracil and Interferon- α Combination Chemotherapy on Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 6029-6038, 2004.
- 7) Kurokawa Y., Matoba R., Takemasa I., Nagano H., Dono K., Nakamori S., Umeshita K., Sakon M., Ueno N., Oba S., Ishii S., Kato K., Monden M.: Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 41, 284-291, 2004.
- 8) Kurokawa Y., Matoba R., Nakamori S., Takemasa I., Nagano H., Dono K., Umeshita M., Monden M., Kato K.: PCR-array Gene Expression Profiling of Hepatocellular Carcinoma. *J.Exp.Clin.Cancer Res* 23(1), 135-141, 2004.
- 9) Yamamoto T., Nagano H., Sakon M., Wada H., Egishi H., Kondo M., Damdinsuren B., Ota H., Nakamura M., Marubashi S., Miyamoto A., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Yagita H., Monden M.: Partial Contribution of Tumor Necrosis

- Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand(TRAIL)/TRAIL Receptor Pathway to Antitumor Effects of Interferon- α /5-Fluorouracil against Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Res* 10, 7884-7895, 2004.
- 10) Kurokawa Y., (Matoba R.), Takemasa I., Nakamori S., Tsujie M., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., (Ueno N.), (Kita H.), (Oba S.), (Ishii S.), (Kato K.), Monden M.: Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study. *Journal of Hepatology* 39, 1004-1012, 2003.
- 11) 永野浩昭, 門田守人: インターフェロン併用動注化学療法. *消化器病セミナー* 97, 109-118, 2004.
- 12) 左近賢人, 門田守人: 門脈腫瘍(Vp3)合併進行肝細胞癌に対するIFN併用肝動注化学療法. *Frontiers in Gastroenterology* 9(1), 90-92, 2004.
- 13) 黒川幸典, 竹政伊知朗, 左近賢人, (加藤菊也), 門田守人: PCRアレイを用いた肝細胞癌の網羅的遺伝子発現解析—新しいバイオマーカーの探索—. *癌の臨床* 50(1), 21-26, 2004.
- 14) 梅下浩司, 左近賢人, 永野浩昭, 門田守人: 特集:最近の癌再発の診断法と治療法IV. 肝癌2. 治療. *外科* 66(3), 289-294, 2004.
- 15) 左近賢人, 永野浩昭, 門田守人: 進行肝細胞癌に対する化学療法の最前線. *日本内科学会雑誌* 93(8), 158-163, 2004.
- 16) 近藤礎, 永野浩昭, 左近賢人, 宮本敦史, 丸橋繁, 山本為義, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 進行肝癌. *臨床と研究* 81(8), 86-89, 2004.
- 17) 中村将人, 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人: 進行した肝癌の治療化学療法(5-FU+IFNを含めて). *Pharma Medica* 22(7), 51-54, 2004.
- 18) 金昌徳, 山本為義, 中村将人, 新井勲, 廬震輝, 徐迅適, 永野浩昭, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 5-FU+Interferon- α 併用療法における5-FU代謝関連酵素活性の検討—ヌードマウス可移植性ヒト肝細胞癌株における検討—. *癌と化学療法* 31(10), 1511-1515, 2004.
- 19) 和田浩志, 山本浩文, 永野浩昭, 門田守人: 腫瘍血管新生と血管新生阻害薬. *外科治療* 91(5), 625-633, 2004.
- 20) 中村将人, 永野浩昭, 左近賢人, 近藤礎, 山本為義, 太田英夫, 和田浩志, Damdinsuren Bazarrageshaa, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 多発転移後長期生存を得た肝細胞癌の1例. *癌と化学療法* 31(11), 1939-1942, 2004.
- 21) 和田浩志, 永野浩昭, 堂野恵三, 近

- 藤礎, 山本為義, 太田英夫, 中村将人, 吉岡慎一, Damdinsuren Bazarragchaa, 楊玉波, 丸橋繁, 宮本敦史, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 5-FU, Adriamycin, CDDP (FAP) による3剤併用肝動注化学療法が奏効した局所進行胆管細胞癌の2例. 癌と化学療法 31(11), 1711-1713, 2004.
- 22) 和田浩志, 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人: 特集 消化器癌治療のコンセンサス(II); 肝胆膵肝細胞癌(両葉多発). 消化器外科 27, 1769-1776, .
- 23) 中村将人, 永野浩昭, 左近賢人, 山本為義, 太田英夫, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 村上卓道, 中村仁信, 門田守人: 肝細胞癌切除後両葉多発再発に対して1回のTAEにより長期無再発生存を得た1例. 肝臓 45(6), 320-328, 2004.
- 24) 宮本敦史, 永野浩昭, 堂野恵三, 丸橋繁, 武田裕, 門田守人: 進行肝細胞癌の治療一予後の改善を考えて. 医学と薬学 52(5), 777-782, 2004.
- 25) 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人: 新しい領域一進行肝細胞癌に対する治療一. アニムス 34, 30-33, 2004.
- 26) 太田英夫, 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人: 高度進行肝細胞癌に対する IFN- α /5-FU 併用動注化学療法. カレントセラピー 22(5), 53-58, 2004.
- 27) 大須賀慶悟, (村上卓道), (中田早紀), (友田要), 永野浩昭, 門田守人, (中村仁信): 動注. 癌と化学療法 31(13), 2114-2117, 2004.
2. 学会発表
- 1) Nakamura M., Nagano H., Sakon M., Yamamoto T., Wada H., Ota H., Damdinsuren B., Kondo M., Marubashi S., Miyamoto A., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Monden M.: Fas/FasL system plays a role in the combination therapy of interferon-alpha and fluorouracil for hepatocellular carcinoma as immune response for the tumor cells.. American Association for the study of Liver Diseases 55th Annual Meeting 2004. 10.29-11.2. (Boston, Massachusetts U.S.A.)
- 2) Kurokawa Y., Takemasa I., Nagano H., (Kato K.), Monden M.: Molecular prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma.. The 21th Congress of Pan-Pacific Surgical Association Japan Chapter 2004. 11.5-11.7. (Cairns, Australia)
- 3) Ota H., Nagano H., Sakon M., Kondo M., Eguchi H., Yamamoto T., Nakamura M., Wada H., Damdinsuren B., Marubashi S., Miyamoto A., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., (Wakasa K.), Monden M. : Combined intraarterial fluorouracil and subcutaneous interferon- α therapy for advanced

- hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches; clinical response and interferon alpha receptor 2 expression. 55th American Association for the Study of Liver Disease 2004. 10.29-11.2. (Boston, Massachusetts, USA)
- 4) Nagano H., Sakon M., Kondo M., Yamamoto T., Ota H., Nakamura M., Wada H., Yoshioka S., Damdinsuren B., Marubashi S., Miyamoto A., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Monden M.: Liver surgery followed by intraarterial infusion of 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. 19th World Congress of International Society for Digestive Surgery 2004. 12.8-12.11. (Yokohama, Japan)
- 5) Damdinsuren B., Nagano H., Yamamoto H., Wada H., Kondo M., Yamamoto T., Ota H., Nakamura M., Marubashi S., Miyamoto A., Umeshita K., Dono K., Nakamori S., Sakon M., Monden M.: Stronger interferon signaling effects higher response to type I interferons in hepatocellular carcinoma. American Association for the study of Liver Diseases :55th Annual Meeting 2004. 10.29-11.2. (Boston, Massachusetts U.S.A.)
- 6) 黒川幸典, 永野浩昭, 左近賢人, 竹政伊知朗, 中森正二, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, (石井信), (加藤菊也), 門田守人: 肝細胞癌術後 5-FU/IFN- α 併用療法の効果予測—PCR-array による遺伝子発現解析から—. 第104回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 7) 太田英夫, 永野浩昭, 左近賢人, 近藤礎, 山本為義, Damdinsuren B, 中村将人, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, (若狭研一), 門田守人: 高度進行肝細胞癌症例に対する IFN- α /5FU 併用動注化学療法の治療効果と IFN レセプター発現に関する検討. 第104回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 8) 和田浩志, 永野浩昭, 近藤礎, 太田英夫, 中村将人, Damdinsuren B, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 肝細胞癌細胞株におけるインターフェロン- α /5-FU併用動注. 第104回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 9) Damdinsuren B, 永野浩昭, 左近賢人, 山本浩文, 山本為義, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 梅下浩司, 堂野恵三, 中森正二, 門田守人: Interferon alpha receptor-2 and anti-tumor effect of type I interferons in hepatocellular carcinoma cells. 第104回日本外

- 科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 10)中村将人, 永野浩昭, 左近賢人, 山本為義, 太田英夫, 和田浩志, Damdinsuren B, 丸橋繁, 三井屋もと, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 肝細胞癌株における vitaminK の抗腫瘍効果の検討—interferon- α /5-FU との併用において—. 第 104 回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 11)和田浩志, 永野浩昭, 太田英夫, 中村将人, 近藤礎, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 肝内転移を伴う局所進行胆管細胞癌に 5-FU・アドリアシン・シスプラチンによる 3 剤用肝動注化学療法が奏効した一例. 第 25 回癌免疫外科研究会第 26 回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング 2004. 5.20-5.21. (京都市)
- 12)Damdinsuren B, 永野浩昭, 山本浩文, 近藤礎, 山本為義, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 梅下浩司, 堂野恵三, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: Differences in binding and signaling of type I interferons in HCC cells. 第 40 回日本肝臓学会総会 2004. 6.3-6.4. (浦安市)
- 13)和田浩志, 永野浩昭, 左近賢人, 楊玉波, 太田英夫, 中村将人, Damdinsuren B, 近藤礎, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, (若狭研一), 門田守人: 肝細胞癌切除例における血管新生因子の発現に関する検討. 第 40 回日本肝臓学会総会 2004. 6.3-6.4. (浦安市)
- 14)中村将人, 永野浩昭, 左近賢人, 山本為義, 太田英夫, 和田浩志, Damrinsuren B, 近藤礎, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 進行肝細胞癌に対する interferon- α /5-FU 併用動注療法における免疫学的機序の検討—FAs/FasL pathway の関与について—. 第 40 回日本肝臓学会総会 2004. 6.3-6.4. (浦安市)
- 15)黒川幸典, 竹政伊知朗, 中森正二, 永野浩昭, 堂野恵三, 梅下浩司, 左近賢人, (加藤菊也), 門田守人: 肝細胞癌における術後肝内転移再発の遺伝子診断(PCR-array)の確立. 第 13 回日本がん転移学会総会 2004. 6.10-6.11. (東京都)
- 16)Damdinsuren B, 永野浩昭, 山本浩文, 近藤礎, 山本為義, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 梅下浩司, 堂野恵三, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: Mechanism of stronger growth inhibitory effect of IFN- β than IFN- α in HCC. 第 40 回日本肝癌研究会 2004. 6.24-6.25. (つくば市)
- 17)黒川幸典, 永野浩昭, 左近賢人, 竹政伊知朗, 中森正二, 堂野恵三, 梅下浩司, (石井信), (加藤菊也), 門田

- 守人: 遺伝子診断(PCR-array)による肝細胞癌術後 5-FU/IFN- α 併用尾両方お効果予測. 第 59 回日本消化器外科学会定期学術集会 2004. 7.21-7.23. (鹿児島市)
- 18)黒川幸典, 永野浩昭, 左近賢人, 竹政伊知朗, 中森正二, 堂野恵三, 梅下浩司, (的場亮), (加藤菊也), 門田守人: 肝細胞癌 5-FU/IFN- α 併用療法の感受性試験-PCR-arrayによる遺伝子診断を利用して. 第 42 回日本癌治療学会総会 2004. 10.27-10.29. (京都市)
- 19)吉岡慎一, 竹政伊知朗, 永野浩昭, 山崎誠, 小森孝通, 黒川幸典, 左近賢人, (松原謙一), 門田守人: ヒト全遺伝子型 DNA チップを用いた高度進行肝細胞癌に対する 5-FU/IFN- α 併用療法の効果予測の検討. 第 63 回日本癌学会学術総会 2004. 9.29-10.1. (福岡市)
- 20)丸橋繁, 高橋秀典, 橋本和彦, 久保田勝, 和田浩志, 中村将人, 太田英夫, 山本為義, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 肝細胞癌に対する肝移植適応基準. 第 40 回日本肝癌研究会 2004. 6.24-6.25. (つくば市)
- 21)永野浩昭, 左近賢人, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 進行肝細胞癌に対する Interferon α (IFN)併用化学療法と外科治療の適応拡大. 第 104 回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 22)永野浩昭, 左近賢人, 門田守人: 進行肝細胞癌に対する Interferon α (IFN) 併用化学療法と外科治療. 第 90 回日本消化器病学会総会 2004. 4.21-4.23. (仙台市)
- 23)永野浩昭, 左近賢人, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 吉岡慎一, 近藤礎, Damdinzuren B, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: Interferon α (IFN) 併用化学療法を機軸とした進行肝細胞癌に対する治療戦略. 第 40 回日本肝臓学会総会 2004. 6.4-6.4. (浦安市)
- 24)永野浩昭, 左近賢人, 門田守人: 生物学的特性に基づく高度進行肝細胞癌に対する治療法の開発とその機序の解明. 第 13 回日本癌病態治療研究会 2004. 6.1-6.2. (千葉市)
- 25)永野浩昭, 丸橋繁, 堂野恵三, 宮本敦史, 久保田勝, 橋本和彦, 高橋秀典, 後藤邦仁, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 肝細胞癌に対する生体肝移植の位置付けと今後の展望. 第 40 回日本肝癌研究会 2004. 6.24-6.25. (つくば市)
- 26)永野浩昭, 左近賢人, 宮本敦史, 黒川幸典, (加藤菊也), 丸橋繁, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 肝細胞癌切除後 10 年生存への総合戦略. 第 59 回日本消化器外科学会定期学術集会 2004.

- 7.21-7.23. (鹿児島市)
- 27)黒川幸典, 中森正二, 門田守人: 網羅的遺伝子発現解析による肝細胞癌に対する 5-FU/IFN- α 併用療法の感受性マーカー遺伝子の探索. 厚生労働省がん研究助成金中森班 第2回班会議 2004. 11.17. (豊中市)
- 28)太田英夫, 永野浩昭, 左近賢人, 近藤礎, 山本為義, Damdinsuren B, 中村将人, 和田浩志, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, (若狭研一), 門田守人: 高度進行肝細胞癌症例に対する IFN- α /5FU 併用動注化学療法の治療効果とIFNレセプター発現に関する検討. 第104 回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 29)太田英夫, 永野浩昭, 左近賢人, 矢野雅彦, 関本貢嗣, Damdinsuren B, 中村将人, 和田浩志, 吉岡慎一, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, (若狭研一), 門田守人: 各種消化器癌における IFN α / β レセプター発現と肝転移巣に対する IFN 併用化学療法の可能性に関する検討. 第40 回日本肝臓学会総会 2004. 6.3-6.4. (浦安市)
- 30)中村将人, 永野浩昭, 左近賢人, 山本為義, 太田英夫, 和田浩志, 吉岡慎一, 湯地, Damdinsuren Bazarragchaa, 近藤礎, 丸橋繁, 宮本敦史, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 門田守人: 高度進行肝細胞癌に対する IFN 併用化学療法につ

いて. 第39 回近畿肝癌談話会 2004. 8.-8. (大阪市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究

分担研究報告書

進行肝細胞癌に対するインターフェロン併用肝動注化学療法

—シスプラチン, 5-FU を用いた Randomized control trial(RCT)—に関する研究

分担研究者 金子周一 金沢大学大学院医学系研究科がん遺伝子治療学 教授

研究要旨:進行肝細胞癌に対するインターフェロン併用 5-FU 肝動注化学療法に CDDP を併用する RCT を施行している. 2003 年 10 月から 2005 年 2 月まで 33 例がエントリーした(CDDP 併用群 16 例,なし群 17 例). 治療法は 5-FU 300mg/m²/day を 24 時間持続動注 (day1-5, day8-12), インターフェロン α -2b 3MIU/body 週 3 回 4 週間筋注. CDDP 併用群では 20mg/m²/day を day1,8 に 1.5 時間かけて肝動注した. 治療クール数は平均 1.9 クールで最高 7 クール施行した. 1 クール以上終了した症例の奏効率 (RECIST ガイドライン)は CDDP 併用群 11 例で CR1 例, PR3 例, SD6 例, PD1 例で奏効率 36.0%あり, 併用なし群 14 例で CR0 例, PR3 例, SD6 例, PD5 例で奏効率 21.0%であった (p=0.41). PD 率は CDDP 併用群で 9%, なし群で 36% (p=0.12)であった. 平均生存期間は CDDP 群 279 日, なし群 311 日 (p=0.94)と有意差を認めなかった. CDDP 併用群の 3 例が脳出血,治療拒否,肝不全にて脱落し, 5 例が 1 クール未終了であった. 観察期間は短く今後更に検討が必要であると考えられる.

A. 研究目的

当科で RCT にて CDDP 肝動注化学療法に対するインターフェロン併用効果を検討したが, インターフェロンの効果はみられなかった. また以前の多剤併用肝動注化学療法と比較し治療効果が劣っていた(27% vs. 56%, p=0.045). 近年インターフェロン併用 5-FU 肝動注化学療法で約 50%とう良好な成績が報告されている. 今回インターフェロン併用 5-FU 肝動注化学療法に対する CDDP 併用の効果を RCT にて検討した.

B. 研究方法

(対象症例選択)

症例選択基準は①高度脈管侵襲 (Vv2, Vp2, B2 以上)または②両葉多発 (肝細胞癌が 5 結節以上)の肝細胞癌とし, 年齢 20 歳以上, PS 2 以下, Hb 8.0g/dl 以上, WBC 2,000/mm³ 以上, 血小板 30,000/mm³ 以上, BUN 30mg/dl 以下, クレアチニン 2.0mg/dl 以下, PT 30%以上, T.Bil 5mg/dl 以下とした.

(割付方法)

CDDP の併用の有無については TAE の有無で層別化割付をした.

(治療方法)

投与法は 5-FU 300mg/m²/day を 24 時間持続動注し(day1-5, day8-12), インターフェロン α -2b 3MIU/body を週 3 回 4 週間筋注した. CDDP 併用群では

20mg/m²/day を day1,8 に 1.5 時間かけて肝動注した。

(治療効果判定)

治療効果判定は RECIST ガイドラインを用い、統計学的手法には χ^2 検定、Kaplan-Meier 法、log-rank test を用いた。

(倫理面への配慮)

倫理面については治療計画および同意説明書について当院IRBの審査を受け承認を得た(2003年10月)。

C. 研究結果

2003年10月から2005年2月末まで33例がエントリーした。CDDP併用群が16例、なし群が17例。平均年齢65.6歳(41-82)歳、初発13例、再発20例で、併存肝病変は28例が肝硬変であった。化学療法の対象理由は両葉多発症例19例、高度脈管侵襲14例であった。背景肝疾患の原因はHCV24例、HBV5例、アルコール2例、NBNC2例であった。肝障害度はA/B/Cそれぞれ9/18/6例で、JISスコアは2/3/4それぞれ5/21/7例であった。CDDP併用群の3例が脳出血、治療拒否、肝不全にて脱落し、5例が1クール未終了であった。治療クール数は平均1.9クールで最高7クール施行した。1クール以上終了した症例での奏効率はCDDP併用群11例でCR1例、PR3例、SD6例、PD1例で奏効率36.0%あり、併用なし群14例でCR0例、PR3例、SD6例、PD5例で奏効率21.0%であった($p=0.41$)。PD率はCDDP併用群で9%、なし群で36%($p=0.12$)であった。平均生存期間はCDDP群279日、なし群311日と有意差を認めなかった($p=0.94$)。

D. 考察

CDDP併用群で奏効率が高い傾向があり、またPD率はCDDP併用群で低い傾向があった。平均生存期間は両群で

有意差は認めなかった。観察期間が短く今後更に検討が必要であると考えられる。

E. 結論

進行肝細胞癌に対してインターフェロン併用5-FU肝動注化学療法にCDDPを併用するRCTを施行した。CDDPの治療への効果については、観察期間が短く今後更に検討が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定

2. 学会発表

- 1) 山下竜也, 飯田宗穂, 金子周一, P234, 多発肝細胞癌に対する肝動注化学療法の適応拡大, 第90回日本消化器病学会総会 2004.4.22
- 2) 山下竜也, 柿木嘉平太, 金子周一: O-6, 進行肝細胞癌に対するシスプラチンを中心とした肝動注化学療法—当科10年間の検討—. 第40回日本肝臓病学会総会 2004.6.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究
分担研究報告書

進行肝がんの治療戦略に関する研究

分担研究者 瀧原康行 京都大学消化器外科 助教授

研究要旨:過去16年の当科における肝切除成績の検討より、近年の肝細胞癌症例では著明な予後の改善が認められた。しかしながら、Stage IV-A、腫瘍径10cm以上、血管侵襲あり、低分化型では有意な予後の改善が認められなかったことより、大型、低分化型、脈管侵襲を伴う肝がんに対する対策が必要であることが判明した。一方、高度脈管侵襲を伴う肝がんに対する切除成績(1年生存率90.7%)は、過去の報告(1年生存率38%)に比べ飛躍的に向上した。高度脈管侵襲を伴う肝がんにおいて手術と肝動注による集学的治療により予後の改善が得られたと考えられる。

A. 研究目的

近年、肝細胞癌の治療法としてラジオ波焼灼療法、肝移植が保険適応になり急速に適応が拡大されてきている。しかしながら、依然高度脈管侵襲を伴う進行肝がん症例も多くみられ標準治療法の確立が期待される。我々は肉眼的治癒切除可能であれば、そのような症例であっても積極的に肝切除を行ってきた。そこで、進行肝がんの切除成績向上のための問題点を明らかにし、予後改善のための治療戦略を確立するために以下の検討を行った。

B. 研究方法

1. 肝がん切除症例の予後解析

肝細胞癌初回手術症例を1985-1990年の前期、1991-2000年の後期に分け予後を比較検討した。

2. FDP-PETを用いた低分化型、早期再発の術前予測

2003年5月から2004年8月までの術前にFDG-PETを施行した肝細胞癌切除症例30例における癌部、非癌部のSUV(Standardized Uptake Value)を測定し、組織型及び6ヶ月以内の再発の有無との関連性を検討した。

3. 末梢血 soluble FasLを用いた早期再発の術前予測

同時期34症例の術前、術後1Wの末梢血 sFasL および AFPmRNA を ELISA 法 および RT-PCR にて測定し早期再発の有無との関連性を検討した。

4. 高度脈管侵襲を伴う HCC に対する肝動注を併用した集学的治療

2001-2004年肝切除262症例のうち高度脈管侵襲(Vp3-4, Vv2-3, B3-4)を伴う肝細胞癌症例(P0, N0, M0)44例および肝切除不能で初回治療が肝動注の13症例の予後を検討した。

尚、手術及び肝動注による合併症の可能性に関して十分説明し患者の同意を得た。

C. 研究結果

1. 前期、後期症例 (n=212, 398) の5年生存率は各々39.1%, 58.0%で有意な予後の改善が認められた ($p < 0.0001$)。Stage II、III、肝障害度 A、腫瘍径 10cm 以内、血管侵襲なし、中分化型で生存率の向上が顕著である一方、Stage IV-A、腫瘍径 10cm 以上、血管侵襲あり、低分化型では有意な予後の改善が認められなかった。

2. 低分化型の SUV (9.63 ± 6.03 , mean \pm SD) は中分化型 (5.10 ± 2.12)、高分化型 (3.51 ± 1.69) に比べて有意に高値 ($p=0.017$, $p=0.029$) であった。また再発症例の SUV (7.73 ± 4.71) は無再発症例 (4.79 ± 2.96) に比べて有意に高値 ($p=0.049$) であった。

3. 末梢血 AFPmRNA の検出の有無と早期再発に関して有意な相関は認めなかったが、低 sFasL 群に比べ、高 sFasL 群に有意に早期再発を認めた (5.9% vs. 35.3%, $p < 0.05$)。低 sFasL 群で disease-free survival period の延長を認めた ($p=0.02$)。

4. 44 例の1、3 年累積生存率は 90.7%, 56.5%と過去 (1985-2000 年) の成績 (1 年生存率 38%) と比較し飛躍的に向上した。切除不能肝動注 13 症例のうち5例が肝動注を中心とした集学的治療により肉眼的治癒切除が可能となり肝切除を施行した (術前肝動注群)。術前肝動注群は 1 年生存率 100%、平均生存期間は 678 日で予後延長の傾向があった (vs. 非切除群 336 日)。

D. 考察

過去 16 年の当科における肝切除成績の検討より、著明な予後の改善が認められた。しかしながら、Stage IV-A、腫瘍径 10cm 以上、血管侵襲あり、低分化型

では有意な予後の改善が認められなかったことより、大型、低分化型、脈管侵襲を伴う肝がんに対する対策が必要であることが判明した。一方、高度脈管侵襲を伴う肝がんに対する切除成績は過去の報告 (1 年生存率 38%) に比べ飛躍的に向上した。高度脈管侵襲を伴う肝がんにおいて手術と肝動注による集学的治療により予後の改善が得られたと考えられる。高度脈管侵襲を伴う肝がんに対する標準療法の確立のため

1. 門脈腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌に対する術後肝動注療法 (低用量 CDDP+5FU) 再発予防効果に関する第 III 相比較臨床試験

2. 手術不能肝細胞癌患者に対する肝動脈注入化学療法 (低用量 CDDP+5FU vs. IFN+5FU) に関する比較臨床試験

を開始している。

さらに FDG-PET および sFasL により早期再発危険群、予後不良群の予測が可能となり、FDG-PET 高度集積例、sFasL 陽性例に対しての積極的な術後補助療法による予後改善の可能性が示された。

E. 結論

さらなる肝切除成績の改善には、大型、低分化型、脈管侵襲を伴う症例に対する対策が必要である。FDG-PET による再発高危険群の絞込みと脈管侵襲陽性例に対する肝動注をはじめとする集学的治療が有用である。

F. 健康危険情報

現在進行中である第 III 相比較臨床試験により肝動注による有害事象が明らかになる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 波多野悦朗, 猪飼伊和夫, 東達也, 手良向聡, 鳥塚達郎, 佐賀恒夫, 上杉毅彦, 畠原康行: 肝細胞癌切除後予後予測における FDG-PET の意義. 第 104 回日本外科学会定期学術集会 2004.4.8
- 2) 波多野悦朗, 猪飼伊和夫, 東達也, 手良向聡, 鳥塚達郎, 佐賀恒夫, 上杉毅彦, 畠原康行: 原発性肝癌における FDG-PET の有用性. 第 90 回日本消化器病学会総会 2004.4.22(仙台市)
- 3) 波多野悦朗, 猪飼伊和夫, 畠原康行: NASH に伴う肝癌切除症例の検討. 第8回日本肝臓学会大会シンポジウム 2004.10.21(福岡市)
- 4) 波多野悦朗, 猪飼伊和夫, 田浦康二郎, 藤井英明, 畠原康行: 高度門脈腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌に対する集学的治療(肝切除プラス肝動注療法. 第42回日本癌治療学会シンポジウム 2004.10.27(京都市)
- 5) 波多野悦朗, 玉置信行, 田浦康二郎, 藤井英明, 猪飼伊和夫, 畠原康行: 巨大肝細胞癌に対する anterior approach の有用性. 第42回日本癌治療学会ビデオシンポジウム 2004.10.28(京都市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

進行肝がんに対する集学的治療に関する研究

分担研究報告書

5-FU+IFN- α 併用による肝癌細胞増殖抑制機序に関する研究

分担研究者 神代正道 久留米大学医学部病理学 教授

研究要旨:IFN- α と 5-FU 併用投与は、HAK-1B 肝癌細胞株に対して *in vitro* では相乗的増殖抑制作用は示さなかったが、ヌードマウスを用いた *in vivo* の実験モデルでは、細胞周期進行停止誘導効果が増強され、相乗的増殖抑制効果が誘導された。相乗効果発現とアポトーシス誘導や血管新生阻害との関連性は明らかではなかった。また、I型 IFN receptor の AR2鎖の有意な発現低下を IFN- α と 5-FU 併用投与群で認め、相乗効果発現との関連性が推察された。また、肝癌細胞株6株の isobologram を使用した IFN- α と 5-FU 併用の *in vitro*における増殖抑制作用の検討を行い、相乗効果と相加効果が3株ずつに認められた。検討した6種類の 5-FU の代謝酵素 (Thymidylate synthase、Orotate phosphoribosyl transferase、Thymidine phosphorylase、Uridine phosphorylase、Thymidine kinase、Dihydropyrimidine dehydrogenase)や I型 IFN receptor の AR1鎖や AR2鎖の発現は、細胞株間で異なっていたが、相加・相乗効果との関連性は明らかではなかった。

A. 研究目的

進行肝細胞癌に対する IFN- α と 5-Fu を使用した集学的治療法の有効性を証明するために肝細胞癌細胞株を使用し *in vitro* 及び *in vivo* で、相乗的増殖抑制効果の発現に関して検討を行った。

B. 研究方法

実験①我々の施設で独自に樹立したヒト肝細胞癌細胞株 (HAK-1B) を使用した。HAK-1B 細胞を IFN- α (0-100 IU/ml)、5-FU (0-100 μ M) 単独または同時添加あるいは非添加で 96 時間培養し、MTT assay 法による生細胞数の測定

を行った。(2)40 匹のヌードマウスの皮下に 1.0×10^7 個の HAK-1B を接種し、径が 5-10 mm の腫瘍が出現した時点で 4 群に分け(n=10)、IFN- α 単独、5-FU 単独、IFN- α +5-FU 併用、PBS 単独(コントロール)の投与を行った。

5-FU(7mg/mouse)は、14 日間連続で皮下に移植した持続注入ポンプ (alzet micro-osmotic pump model-1002、DURECT Corporation 供与)で持続投与し、IFN- α (5000IU/mouse)は 14 日間毎日皮下注射を行い、sacrifice まで腫瘍径の計測を行った。15 日目に sacrifice し得られた腫瘍の重量、組織内の apoptotic cell の数、BrdU 陽性細胞の数、核分裂像、腫瘍周囲近傍及び内の筋性血管の

数(MVD)を検討した。ELISA 法にてマウス腫瘍組織中の IFNAR-2 の定量を行った。

実験②我々の施設で独自に樹立した6種類のヒト肝細胞癌細胞株(KIM-1, KYN-1, KYN-2, KYN-3, HAK-1A, HAK-1B)を用いて、種々の濃度の IFN- α 単独、5-FU 単独あるいは併用投与し120時間後に WST-8 法により細胞数を測定した。50%増殖抑制濃度 IC50 を計算し、Isoborogram 的解析を行った。また、6種類の細胞株における6種類の 5-FU の代謝酵素(Thymidylate synthase (TS)、Orotate phosphoribosyl transferase (OPT)、Thymidine phosphorylase (TP)、Uridine phosphorylase (UP)、Thymidine kinase (TK)、Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD))や I 型 IFN receptor の AR1 鎖や AR2 鎖の発現に関して、Taqman probe を使用した Real time PCR (ABI 7300 Real time PCR system)を使用して測定を行った。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

実験①(1)*in vitro* で HAK-1B は 5-FU の濃度依存性に増殖抑制されたが IFN- α による相乗効果は見られなかった。(2)ヌードマウスの腫瘍径及び重量において最も腫瘍増殖抑制効果が得られたのは IFN- α +5-FU 併用群で sacrifice 時の計測で腫瘍体積はコントロール群の 29.3%、重量は 54.7%まで縮小していた。併用群では apoptosis 数、MVD はコントロール群や IFN- α 単独群に比べ apoptosis は増加し MVD は低下していたが、5-FU 単独群との間に差は見られなかった。BrdU 陽性細胞数は、併用群と 5-FU 単独群で増加していたが、核分裂像

は、併用群で有意に減少していた。(3)IFNAR-2 は他群に比べ併用群で有意に減少していた($p < 0.01$)。

実験②Isoborogram 解析により、6株中3株で相乗的増殖抑制効果が見られ、3株で相加的増殖抑制効果が見られた。TS, OPT, TP, UP, TK, DPD など6種類の 5-FU の代謝関連酵素の発現や I 型 IFN receptor の AR1 と AR2 chain の mRNA level の発現を、相乗効果が見られた3株と相加効果が見られた3株と比較したが一定の傾向は見られなかった。

D. 考察

肝癌細胞株 HAK-1B では、*in vitro* では、相乗的増殖抑制効果は生じなかったが、ヌードマウスをもちいた *in vivo* の実験においては、IFN- α と 5-FU の併用投与により相乗的増殖抑制効果が見られた。腫瘍の組織学的検討により、BrdU 陽性の S 期細胞の増加と核分裂像の減少が見られ、併用により S 期細胞周期進行停止が増強され相乗的効果が発現したものとされた。腫瘍の IFNAR-2 鎖量を定量すると併用群で他群に比べ有意に IFNAR-2 鎖量が減少しており、相乗効果発現機序との関連性が推察されたが、IFN- α が 5-FU の作用を増強しているのか、5-FU が、IFN- α の作用を増強しているのかという点までは解明に至らなかった。*in vitro* における Isoborogram 解析を用いた6株の肝癌細胞株の増殖抑制に関する実験では、3株ずつで相加・相乗効果が見られた。これらの細胞株で、6種類の 5-FU の代謝関連酵素の発現や I 型 IFN receptor の AR1 と AR2 chain の mRNA level の発現レベルと相加・相乗効果との関連性を検討したが、明らかな関連性は見られず、今後、IFN- α 刺激による6種類の 5-FU の代謝関連酵素の発現の変化や、5-FU

刺激によるI型IFN receptorのAR1・AR2 chain、JAK1, Tyk2, STAT1, STAT2, p48 などの変化を検討する必要があると思われる。

E. 結論

IFN- α と5-FUの併用により *in vivo* 及び *in vitro* で相乗的増殖抑制作用の誘導が見られた。相乗的細胞増殖抑制がIFN- α による5-FUの代謝酵素の modulationにより生じているのか、あるいは、5-FU処理によるIFNのreceptorやシグナル伝達因子の modulationにより生じているのか関連性を今後検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hisaka T, Yano, H, Kojiro M et al: Interferon- α Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. Journal of Hepatology. 41:782-789, 2004.

2. 学会発表

- 1) Yano H., Ogasawara S, Takayama A, Momosaki S., Yamaguchi R., Akiba J., Nishida N., Kojiro S., Kojiro M.: Pegylated interferon- α -2b at the clinical dose inhibits human hepatocellular carcinoma cell growth in nude mice. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (Boston, MA, USA) 2004.11.1
- 2) 神代咲子, 矢野博久, 桃崎征也, 小笠原幸子, 山口倫, 秋葉純, 神代正道: 5-FUとIFN- α (OIF)の併用による肝癌細胞株の増殖抑制効果の

検討—*in vitro* 及び *in vivo* の検討—
第40回日本肝臓学会総会
2004.6.3 (浦安市)

- 3) 矢野博久, 小笠原幸子, 高山朗子, 桃崎征也, 山口倫, 秋葉純, 西田直代, 竹本由美, 神代咲子, 神代正道. PEG-IFN- α -2bの *in vitro* 及び *in vivo* におけるヒト肝癌細胞の増殖抑制作用. 第63回日本癌学会総会 2004.9.30 (福岡市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし