

Fig. 4 A, cytotoxic activities of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and CD4⁻CD8⁻ cells against HLF (a) and HepG2 (b) cells. B, cytotoxic activities of CD4⁻CD8⁻CD14⁻ cells, CD4⁻CD8⁻CD56⁻ cells, and CD4⁻CD8⁻CD14⁻CD56⁻ cells against HLF cells. C, involvement of TRAIL in IFN α -stimulated CD4⁻CD8⁻CD14⁻ and CD4⁻CD8⁻CD56⁻ cell cytotoxicity against HLF cells. Effector cells isolated from PBMC were prestimulated with or without IFN α (500 units/mL) for 24 hours. Target HLF cells and HepG2 cells were pretreated with (closed bars) or without (open bars) 5-FU (0.5 μ g/mL) for 48 hours. Cytotoxic activity was examined, in the presence or absence of 10 μ g/mL anti-TRAIL mAb (C), by 8-hour ⁵¹Cr release assay at an E:T ratio of 20 (A, C) or 40 (B).

neutralizing anti-TRAIL mAb (RIK-2). As shown in Fig. 4C, IFN α -induced cytotoxicity of CD4⁺CD8⁺CD14⁺ cells was almost completely abrogated by anti-TRAIL mAb, irrespective of pretreatment of HLF target cells with 5-FU. In addition, the enhanced cytotoxicity of CD4⁺CD8⁺CD56⁺ cells against 5-FU-treated HLF cells was also significantly inhibited by anti-TRAIL mAb. These results suggest that IFN α -induced cytotoxicity of CD56⁺ NK cells is predominantly mediated by TRAIL and that 5-FU-enhanced cytotoxicity of CD14⁺ monocytes is at least partly mediated by TRAIL.

Increased Expression of TRAIL mRNA in PBMC of HCC Patients Who Responded to IFN α /5-FU Therapy.

The above *in vitro* results suggest the possible contribution of TRAIL to IFN α /5-FU combination therapy. In the next step, we addressed the clinical relevance of the *in vitro* studies by using clinical samples. PBMC from 12 patients with unresectable HCC associated with multiple intrahepatic tumors and Vp3-4, who were treated with IFN α /5-FU combination therapy, were collected 48 hours after the last subcutaneous injection of IFN α . The characteristics of these 12 patients are shown in Table 1. Before starting the therapy, blood samples were also collected as control from all patients. Six patients (responders) showed clinical benefits (complete response [CR] in one of six and partial response [PR] in five of six) whereas the other six (nonresponders) did not (progressive disease [PD] in six of six) according to the Eastern Cooperative Oncology Group criteria. The age of the patients was from 32 to 80. The mean age of the responders was higher (56.8) than that of nonresponders (46.6). All 12 patients had chronic hepatitis that progressed to liver cirrhosis except cases 12. Five patients had hepatitis B virus infection, and seven patients had hepatitis C. Nine of the 12 patients were classified as Child-Pugh class B, whereas two patients were class C, and one patient was class A. In all patients, HCCs were diagnosed as unresectable because of multiple intrahepatic metastasis and the presence of tumor thrombi in the major branch (Vp3) or trunk (Vp4) of the portal vein.

Moreover, two patients had tumors that invaded the bile duct. Extrahepatic metastases were not found, and the stage of the disease was IVA (T₄N₀M₀) in all 12 patients. Five of the six responders had received >4 treatment cycles, which was associated with prolongation of prognosis (from 6 to 23 months), whereas all six nonresponders could not be treated for >2 cycles and died within 6 months. There were no apparent technical side effects resulting from catheter insertion and subcutaneous implantation of the reservoir. Grade 3 leukopenia was observed in three patients (cases 3, 4, and 11) and was well managed by the administration of granulocyte colony-stimulating factor. Grade 3 thrombocytopenia was observed in one patient (case 10) and temporarily necessitated discontinuation of therapy. Three patients reported diarrhea, and it was managed by binding medicine, but was not the reason for interruption of therapy. Case 11 developed gastric ulcer during therapy in addition to diarrhea and leukopenia, and the patient decided to stop the therapy. In contrast, 6 of the 12 patients showed no remarkable adverse effects. Fever was commonly observed but easily controlled by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

The expression of TRAIL mRNA in peripheral blood of these patients was measured by real-time RT-PCR. Although the expression levels of TRAIL mRNA in PBMC varied from one individual to another, the average TRAIL mRNA level increased by 1.5- to 2.5-fold after initiation of therapy in the patients who clinically showed a complete response or partial response (Fig. 5A). In contrast, no such increase was observed in the patients who clinically showed PD. We also measured the fold index of TRAIL/ β -actin, and the result was consistent (data not shown). These results suggest that induction of TRAIL in PBMC correlates with the clinical response to IFN α /5-FU combination therapy.

Expression of TRAIL Receptor and TRAIL in HCC Tissues. To confirm the involvement of TRAIL/TRAIL receptor system in the liver of IFN α /5-FU-treated patients, we further investigated the expression of TRAIL-R1, R2, and TRAIL in HCC tissues of the three patients who exhibited

Table 1 Characteristics of the patients with unresectable hepatocellular carcinoma associated with multiple intrahepatic tumors and Vp3-4, who were treated with IFN α /5-FU combination therapy

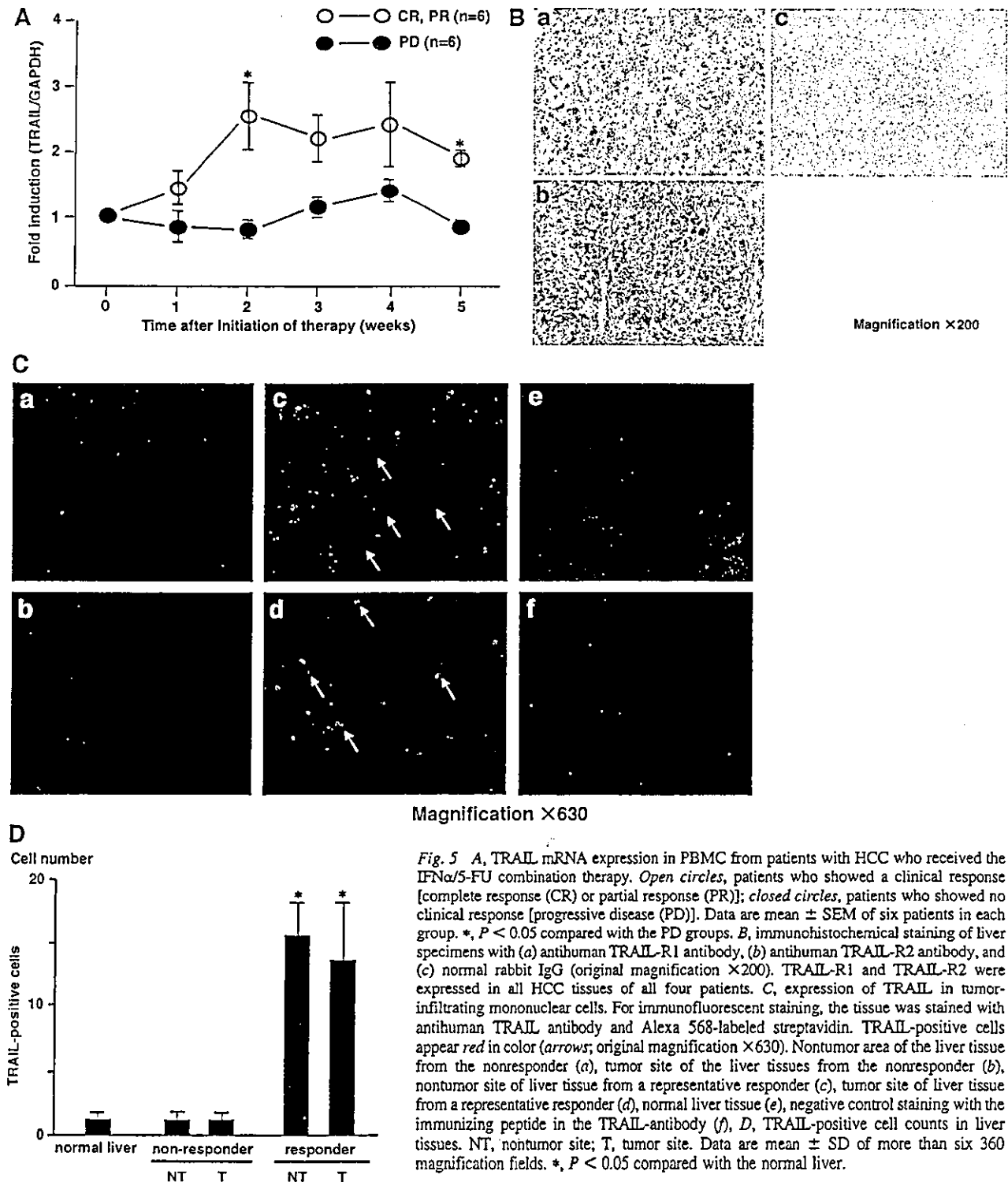
Case	Age	Gender	Hepatitis classification	Child-Pugh	Tumor pathology	Stage of disease	Treatment		Side effects *	Outcome (mos)
							cycles	Response		
1	55	M	HBV	B	Vp4, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	6	PR	Diarrhea	23, dead
2	70	M	HCV	B	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	2	PR	-	17, dead
3	65	F	HCV	B	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	5	PR	Leukopenia	13, dead, lung metastasis
4	54	M	HBV	B	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	6	PR	Leukopenia	13, dead
5	65	F	HCV	C	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	4	PR	-	9, dead
6	32	M	HBV	C	Vp3, multiple, B (+)	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	4	CR	-	6, dead
7	51	M	HBV	B	Vp4, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	2	PD	-	5, dead
8	57	M	HCV	B	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	2	PD	-	4, dead
9	43	M	HBV	B	Vp4, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	3	PD	-	4, dead
10	49	F	HBV	B	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	2	PD	Thrombocytopenia	4, dead
11	80	F	HCV	B	Vp3, multiple, B (+)	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	1	PD	Diarrhea, gastric ulcer, leukopenia	3, dead
12	70	M	HCV	A	Vp3, multiple	T ₄ N ₀ M ₀ Stage IVA	1	PD	Diarrhea	2, dead

Abbreviations: Vp4, tumor thrombosis in the trunk of the portal vein; Vp3, tumor thrombosis in the major branches of the portal vein; B (+), bile duct invasion; CR, complete response; PR, partial response; PD, progressive disease.

* Thrombocytopenia and leukopenia represent platelet and leukocyte counts $<0.4 \times 10^5/\mu\text{L}$ and $2,000/\mu\text{L}$, respectively.

partial response to IFN α /5-FU combination therapy (responders) and one patient who exhibited PD (nonresponder). Both TRAIL-R1 and R2 were expressed in HCC cells of all IFN α /5-FU-treated patients regardless of their clinical benefits. Ex-

pression of TRAIL-R1 and R2 was located mainly in the cytoplasm and plasma membrane. Representative specimens are shown in Fig. 5B-a and 5B-b. Immunohistologic studies also showed TRAIL expression in tumor-infiltrating mononuclear



cells of three responders. Representative specimens are shown in Fig. 5C-c and 5C-d. In contrast, TRAIL-expressing cells were not detected in the nonresponder or in the normal liver (Fig. 5C-a, b, e). Quantitative analysis revealed significantly higher numbers of TRAIL-positive mononuclear cells in the tumor site and nontumor site of liver tissues of responders compared with those of nonresponder and normal liver tissue (Fig. 5D). These results suggest the possible contribution of TRAIL at the tumor site.

DISCUSSION

HCC often invades major adjacent vessels such as the portal vein, causes intra-hepatic metastasis, and finally becomes uncontrollable despite repetitive and multimodal therapy (1). We have previously reported the efficacy of IFN α and 5-FU combination therapy against advanced HCC based on its high responsive rate and low incidence of side effects (8). Although some reports have characterized the synergistic action of IFN α and 5-FU against colon carcinoma cells (9, 10), the reasons for IFN α enhancement of the antitumor effect of 5-FU against HCC has not yet been elucidated. In the present study, we showed in our *in vitro* experiments that TRAIL receptors on HCC cells were up-regulated by 5-FU and that IFN α induced TRAIL on CD4 $^+$ T cells, CD14 $^+$ monocytes, and CD56 $^+$ NK cells. Furthermore, the cytotoxic action of CD14 $^+$ monocytes and CD56 $^+$ NK cells against HCC cells was enhanced through the TRAIL-mediated pathway after treatment of effector cells by IFN α and target HCC cells by 5-FU. These *in vitro* results suggest the possible contribution of TRAIL/TRAIL receptor-mediated antitumor effector mechanism by host innate immune cells to the antitumor effect of IFN α /5-FU combination therapy. Consistent with this notion, a positive correlation between the clinical response and expression of TRAIL in PBMC was observed in patients with HCC who received the combination therapy. Moreover, TRAIL-R1 and R2 were expressed in HCC cells of all IFN α /5-FU-treated patients, and TRAIL-expressing tumor infiltrating cells were found in those patients who responded to the combination therapy.

It is conceivable that the TRAIL-mediated antitumor activity requires the expression of death-inducing TRAIL receptors, TRAIL-R1 and TRAIL-R2, on tumor cells (29, 30). However, it is still not clear whether the basal expression level of TRAIL-R1 or TRAIL-R2 correlates with sensitivity to TRAIL. Previous studies suggested a positive correlation between TRAIL sensitivity and TRAIL-R1 or TRAIL-R2 expression in melanomas, renal cell carcinomas, and Jurkat clones (29–31), whereas other studies suggested no correlation in breast carcinomas and multiple myelomas (32, 33). In HCC cell lines, it has been reported that their TRAIL sensitivity did not correlate with the basal expression level of TRAIL receptors (34, 35). In the present study, three of five HCC cell lines (HuH7, PLC/PRF/5, and HLF) were rather resistant and two of five HCC cell lines (HLE and HepG2) were highly sensitive to soluble TRAIL. Compared with TRAIL-resistant HCC cell lines, the TRAIL-sensitive HCC cell lines expressed higher basal levels of TRAIL-R2. In contrast, the basal expression of TRAIL-R1 did not correlate with TRAIL sensitivity. All five HCC cell lines

showed negative basal expression of TRAIL-R3 and R4, despite different TRAIL sensitivity. These results indicate that the basal expression level of TRAIL-R2 correlates positively with TRAIL sensitivity of HCC cells.

Treatment of HCC cells with TRAIL and 5-FU showed a variable sensitivity to TRAIL among the five HCC cell lines. A synergistic effect was observed against one cell line (HLF) and an additive effect was observed against the other four cell lines. It has been reported that chemotherapeutic agents, such as doxorubicin, camptothecin, and cisplatin, also synergized with TRAIL to induce apoptosis in HCC cell lines (34, 35). These results are consistent with the report that coadministration of recombinant TRAIL and 5-FU exhibited a synergistic antitumor effect in a mouse model (36). Concerning the modulation of TRAIL receptor expression by 5-FU, all TRAIL receptors, including TRAIL-R1 and TRAIL-R2, were significantly up-regulated in four of five HCC cell lines. A similar up-regulation of TRAIL-R2 was observed previously with DNA-damaging chemotherapeutic drugs such as doxorubicin, cisplatin, and etoposide (33, 37, 38). Previous studies suggested that the synergistic effect of TRAIL and chemotherapeutic agents might be induced through the induction of TRAIL-R2 expression (29, 33, 38). Our result also showed that 5-FU synergistically enhanced TRAIL-mediated cytotoxicity through up-regulation of TRAIL-R1 and R2 in HLF cells. Although up-regulation of TRAIL-R1 and R2 by 5-FU was observed, 5-FU additively enhanced TRAIL-mediated cytotoxicity in HuH7, PLC/PRF/5, and HepG2 cells. In addition, neither up-regulation of TRAIL-receptors nor synergy of 5-FU and TRAIL were observed in HLE cells. These results imply that alteration of TRAIL-receptor expression might depend on differences between HCC cell lines. Previous studies suggested that the alternation of other intracellular factors determines the TRAIL sensitivity (31, 39). It has been shown that TRAIL-induced apoptosis could be inhibited by FLIP and Bcl-xL (40, 41). Recent reports showed the importance of Bax and Bak, which regulate the release of cytochrome *c* and Smac/DIABLO from the mitochondria during TRAIL-induced apoptosis (42, 43). Additional studies are needed to address the possible effect of 5-FU on these intracellular molecules in HCC cells.

We showed that IFN α markedly induced TRAIL expression on CD14 $^+$ monocytes and CD56 $^+$ NK cells in PBMC. These results are consistent with previous reports (16, 44). 5-FU did not affect the induction of TRAIL by IFN α . We showed that CD14 $^+$ monocytes and CD56 $^+$ NK cells were the major effector cells that kill target HCC cells *in vitro*, and their cytotoxicity was enhanced by IFN α . This enhancement was predominantly mediated by TRAIL, because neutralizing anti-TRAIL mAb mostly abrogated it. Moreover, when target HCC cells were pretreated with 5-FU, the cytotoxicity by IFN α -stimulated CD14 $^+$ monocytes and CD56 $^+$ NK cells was markedly enhanced, which was also at least partly mediated by TRAIL. These results suggested that the induction of TRAIL by IFN α in innate immune effector cells, such as NK cells and monocytes, and the modulation of TRAIL sensitivity of HCC target cells may be involved in the beneficial effect of IFN α /5-FU combination therapy. Because FasL and perforin, in addition to TRAIL, are key cytotoxic effector molecules used by IFN α -

activated NK cells (45, 46), additional studies are needed to clarify the contribution of these molecules.

Among the HCC patients who received IFN α /5-FU combination therapy, the expression of TRAIL mRNA in PBMC was significantly higher in clinical responders than in nonresponders. This suggests that up-regulation of TRAIL mRNA in PBMC may be a predictor of the clinical response to the combination therapy. Consistently, Lancaster *et al.* (47) reported recently that overexpression of TRAIL mRNA was associated with favorable survival after chemotherapy in ovarian cancers. In addition, we showed the infiltration of TRAIL-expressing mononuclear cells into the TRAIL-R1- and TRAIL-R2-expressing HCC tissue in responders to the combination therapy. These results support the possible contribution of TRAIL to the clinical response.

Despite the development of various treatment modalities, the prognosis of patients with advanced HCC associated with Vp3 remains extremely poor (6). One of the major obstacles is the low sensitivity of this type of HCC to chemotherapeutic drugs (7). Therefore, the development of combination therapy with various agents exerting differential antitumor effects is urgent and mandatory. In this respect, IFN α -induced TRAIL-mediated cytotoxicity by immune effector cells may be promising, because TRAIL exerts antitumor activity without significant toxicity against normal tissues (37, 48, 49). Consistent with this notion, no measurable hepatotoxicity has been observed in patients receiving IFN α /5-FU combination therapy.

In conclusion, the results of our *in vitro* and *in vivo* studies suggest that modulation of the TRAIL/TRAIL receptor-mediated cytotoxic pathway might partially contribute to the antitumor effects of IFN α and 5-FU combination therapy against HCC. Strategies aimed at further increasing TRAIL expression in immune effector cells and further sensitizing tumor cells to TRAIL are expected to augment the therapeutic effect of such treatment.

REFERENCES

- Farmer DG, Rosove MH, Shaked A, Busuttil RW. Current treatment modalities for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1994;219:236-47.
- Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122:1609-19.
- Barnett CC Jr, Curley S. A. Ablative techniques for hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2001;28:487-96.
- Fujii T, Takayasu K, Muramatsu Y, et al. Hepatocellular carcinoma with portal tumor thrombus: analysis of factors determining prognosis. *Jpn J Clin Oncol* 1993;23:105-9.
- Ikai I, Yamaoka Y, Yamamoto Y, et al. Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis: proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 1998;227:433-9.
- Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, et al. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7:28-32.
- Shen DW, Lu YG, Chin KV, Pastan I, Gottesman MM. Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to MRD1 gene expression. *J Cell Sci* 1991;98:317-22.
- Sakon M, Nagano H, Dono K, et al. Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer (Phila)* 2002;94:435-42.
- Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ, Wadler S. Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:1232-9.
- van der Wilt CL, Smid K, Aherne GW, Noordhuis P, Peters GJ. Biochemical mechanisms of interferon modulation of 5-fluorouracil activity in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 1997;33:471-8.
- Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, et al. Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:2881-90.
- Brassard DL, Grace MJ, Borden RW. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 2002;71:565-81.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 1999;189:1451-60.
- Sato K, Hida S, Takayanagi H, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 2001;31:3138-46.
- Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 1999;189:1343-54.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-82.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-90.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science (Wash DC)* 1997;276:111-3.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-97.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (Wash DC)* 1997;277:815-8.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science (Wash DC)* 1997;277:818-21.
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813-820.
- Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* 2003;63:912-6.
- Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H. Nature's TRAIL-on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 2003;18:1-6.
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1999;162:2639-47.
- Phillips TA, Ni J, Pan G, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 1999;162:6053-9.
- Berenbaum MC. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res* 1981;35:269-335.
- Griffith TS, Fialkov JM, Scott DL, et al. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:3093-9.

30. Nguyen T, Zhang XD, Hersey P. Relative resistance of fresh isolates of melanoma to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001;7:966s-973s.
31. Jang YJ, Park KS, Chung HY, Kim HI. Analysis of the phenotypes of Jurkat clones with different TRAIL-sensitivities. *Cancer Lett* 2003;194:107-17.
32. Keane MM, Etenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 1999;59:734-41.
33. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001;98:795-804.
34. Yamanaka T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology* 2000;32:482-90.
35. Shin EC, Seong YR, Kim CH, et al. Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med* 2002;34:114-22.
36. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999;104:155-62.
37. Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 1997;17:141-3.
38. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000;60:847-53.
39. Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res* 2001;61:1645-51.
40. Okano H, Shiraki K, Inoue H, et al. Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2003;83:1033-43.
41. Kim IK, Jung YK, Noh DY, et al. Functional screening of genes suppressing TRAIL-induced apoptosis: distinct inhibitory activities of Bcl-XL and Bcl-2. *Br J Cancer* 2003;88:910-7.
42. Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, et al. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* 2003;63:1712-21.
43. Kim JY, Kim YH, Chang I, et al. Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:3139-48.
44. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 2001;7:94-100.
45. Kirou KA, Vakkalanka RK, Butler MJ, Crow MK. Induction of Fas ligand-mediated apoptosis by interferon-alpha. *Clin Immunol* 2000;95:218-26.
46. Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Vogel W, Tilg H. Interferon-alpha (IFN-alpha) enhances cytotoxicity in healthy volunteers and chronic hepatitis C infection mainly by the perforin pathway. *Clin Exp Immunol* 1999;118:71-7.
47. Lancaster JM, Sayer R, Blanchette C, et al. High expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is associated with favorable ovarian cancer survival. *Clin Cancer Res* 2003;9:762-6.
48. Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999;5:157-63.
49. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 2001;7:383-5.

進行肝癌に対する治療法の進歩

インターフェロン 併用動注化学療法

FU arterial infusion and interferon therapy (FAIT)

永野浩昭*

Hiroaki Nagano

門田守人**

Morito Monden

* 大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科講師, ** 同教授

*, **Department of Surgery and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Osaka University

消化器病セミナー・97:109~118, 2004.12.

へるす出版

はじめに

肝細胞癌に対する治療における初発肝内病巣の制御に対する進歩は目覚ましく、肝切除、化学塞栓療法 (transcatheter arterial embolization : TAE)、経皮的エタノール注入療法 (percutaneous ethanol injection : PEI)、マイクロ波凝固療法 (microwave coagulation therapy : MCT)、ラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation : RFA) などにより、治療効果を上げている。しかし肝細胞癌の場合、仮に初発病巣については十分に治療されたとしても、高率に残肝再発を来すため、再度局所療法が必要になる。このように残肝再発に対する肝内局所治療の反復のなかで、最終的に門脈内腫瘍栓などの脈管侵襲、び慢性結節、遠隔転移などのいわゆる治療抵抗性の病巣となり、いわゆる既存の局所治療は全く効果を示さず、最終的には原病死に至る症例は少なくない。したがって、肝細胞癌治療におけるさらなる予後改善のためには、このような難治性進行肝細胞癌に対する新しい治療法の開発こそが、急務であると考えられる。

最近われわれは、抗癌剤 (フルオロウラシル : 以下 5-FU) の肝動脈内化学療法にインターフェロン (interferon : 以下 IFN) を併用することにより、Vp3 以上の肉眼的門脈内腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌に対して良好な成績をあげてきた¹⁾。本稿においては、この IFN と 5-FU を用いた IFN 併用動注化学療法 (FU Arterial infusion and Interferon Therapy, 以下 FAIT) について、最近の治療成績とともにその研究成果について概説したい。

I 悪性腫瘍に対する IFN 併用化学療法

IFN はその多彩な生理活性により生体に対してさまざまな作用をもたらすが、近年、大腸癌をはじめとした固形癌に対して、5-FU などの抗腫瘍剤と IFN を併用することによって、その抗腫瘍効果が増強されるとの報告がなされている。Wadler ら²⁾ の手術不能の大腸癌患者に IFN と 5-FU の併用療法を試み、76% の有効性を認めたとの報告以降、さまざまな臓器で本療法が試みられてきた。胃癌、食道癌などでも本療法の臨床応用がなされており³⁾⁴⁾、効果についてはさまざまな報告があるものの有効との報告もあり、治療不能な悪性疾患に対する選択肢としての今後が期待されている。

肝細胞癌に対しても同様に、AFP 値の低い肝癌症例で 31% の有効性を認めたとの報告⁵⁾や、進行肝細胞癌症例に 5-FU と IFN に加え cisplatin, methotrexate を併用し 46.7% の有効性を認めたとの報告⁶⁾、cisplatin, doxorubicin を併用し、36 例の手術不能患者のうち 9 人が手術可能となり術後再発もなかったとの報告⁷⁾ などがある。さらに最近では、5-FU の全身投与に加えて、IFN の皮下投与が有効であったとの phase II 臨床試験の報告もある⁸⁾。

これらの知見をふまえ、既存の治療法では十分な治療効果の期待できない高度進行肝細胞癌に対して、われわれは IFN- α と 5-FU を併用した治療法を 1997 年より行い、きわめて良好な結果を得、報告してきた^{9) 10)}。

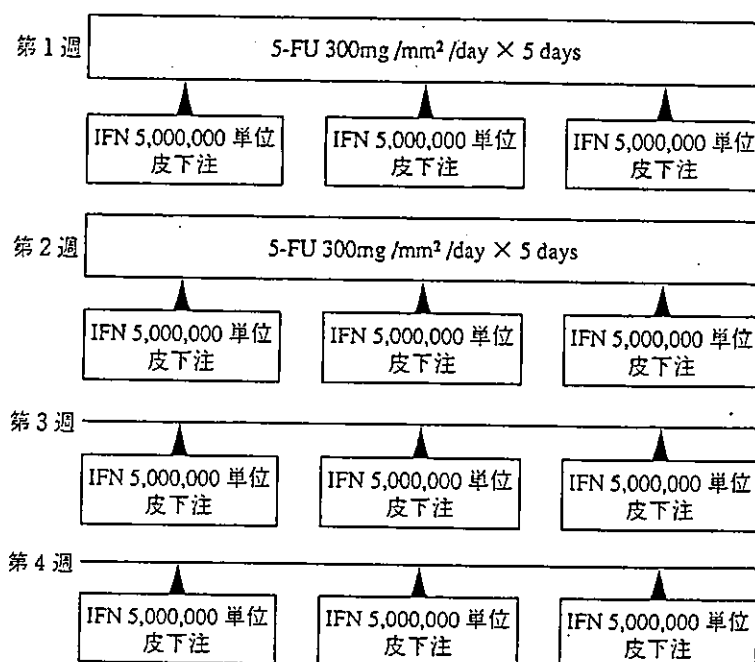


図1 IFN併用化学療法のプロトコール

II 使用薬剤と投与方法, 対象症例

FAITの実際について述べる。非手術症例においてはセルディングー法にて、切除症例では術中に肝動脈内カテーテルを挿入する。5-FUは300mg/m²/日、2週間投与・2週間休薬の4週間を1クールとしてカテーテルより持続動注する。同時にIFN- α を 5×10^6 単位/回、3回/週、4週間を通じて皮下注射で全身投与する(図1)。

当科における本療法の対象は、既存の治療法が全く効を奏さない、門脈一次分枝または門脈本幹に肉眼的門脈内腫瘍栓(Vp3以上)を伴う高度進行肝細胞癌症例としている。また、肝機能が良好で肝切除が可能な症例においても、このような脈管侵襲を伴う症例は、高率に術後早期の残肝内再発を来すため、術後の補助療法として本療法を施行している。また、副作用や抗癌剤動注による肝障害を考慮し、70歳未満、T.Bilが正常、GOT、GPTがともに100未満、血小板が80,000以上、血清Cr<1.5を条件とし、通常は外来通院治療を基本としているため、PS:0, 1が保たれている症例のみを対象としている(表1)。

III 治療成績

現在までにVp3以上の肉眼的門脈内腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌86症例を以下の三つのタイプに分類し、それぞれに治療方針を決定しFAITを施行した。その内訳は、全肝に多発病変と門脈内腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌(A群):55例、片葉の巨大肝癌と門脈内腫瘍栓を伴う症例(B

表1 IFN併用化学療法に適応症例

肝細胞癌	門脈内腫瘍栓 肝外転移	Vp3 以上 なし
年齢		70歳未満
肝機能	GOT	< 100
	GPT	< 100
	T. Bil	正常 (閉塞性黄疸は除く)
血液検査	血小板	80,000 以上
腎機能	血清 Cr	< 1.5
PS		0, 1

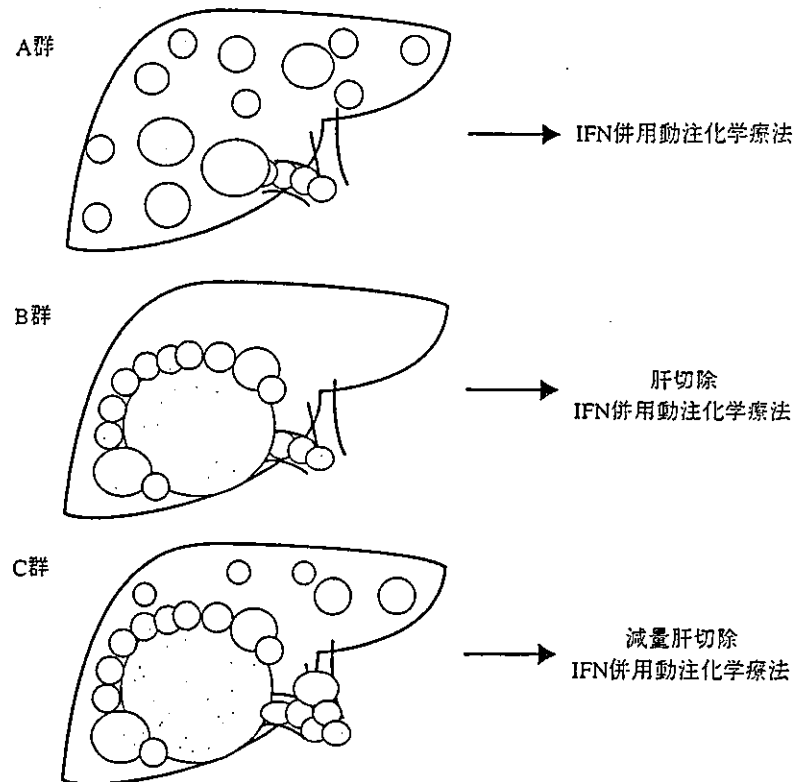


図2 門脈内腫瘍栓を伴う肝細胞癌症例の病型による治療方針

群) : 15例, 片葉の巨大肝癌と多発肝内病変に門脈内腫瘍栓を伴う症例 (C群) : 16例であった。A群に対しては, FAITを繰り返し施行した。B群に対しては, 肉眼的に癌遺残のない肝切除術 (旧原発性肝癌取扱い規約: 相対的非治療切除以上) を施行し, 術後に補助療法としてFAITを最低3クール施行した。C群については, 片葉の巨大腫瘍に対して肝切除術を施行し (減量肝切除), 術後肝内病巣に対してFAITを繰り返し施行した (図2)。治療効果の判定については, CTなどの画像所見および腫瘍マーカーにより評価した。

治療成績は以下のとおりであった。全86症例の観察期間は6~60カ月であった。A群55例については, 肝内病巣に関してCR: 11例, PR: 13例の計24例44%の症例において有効であっ

表2 A群（切除不能症例）の治療成績

	治療効果	症例数	1年生存率
有効例	CR	n = 11	88%
	PR	n = 13	
無効例	NC/PD	n = 31	6%

62%

表3 B群（肝切除および術後補助療法）の治療成績

	1年生存率	3年生存率
肝切除+術後IFN/5-FU施行例 (n = 15)	100%	82%
肝切除+術後IFN/5-FU非施行例 (n = 15)	41%	18%

た。その一方で、31例56%については無効であり、無効例のうちPD症例は全例6カ月以内に癌死した（表2）。55例の1年生存率は62%で、有効例は88%、無効例は6%であった。B群15例については、1年生存率は100%、3年生存率は82%であった（表3）。当科において、B群と同一のステージで肝切除術（旧規約：相対的非治癒切除）を施行し、術後にFAITを施行しなかった症例は現在までに15例あるが、これらの症例の1年生存率は41%、3年生存率は18%で、B群（FAIT施行症例）のほうが治療成績が有意によかった（ $p < 0.05$ ）。C群においては、未だ観察期間は短いものの16例中3例に残肝内多発病巣の完全消失（CR）を認めており、現時点における1年生存率は65%である。

以上のように、FAITは門脈内腫瘍栓を認める進行肝細胞癌症例に対して、きわめて良好な治療成績を上げており、さらなる症例の蓄積が期待される。

IV IFN併用化学療法の作用機序

IFN- α は単剤でも抗腫瘍効果があるとされ、その機序として癌細胞への直接的な抗腫瘍効果（直接作用）と免疫担当細胞を介した間接的抗腫瘍効果（間接作用）とに大別できる。直接作用としては細胞障害作用¹¹⁾、細胞周期遅延作用¹²⁾、癌抗原の発現上昇¹³⁾などが報告されており、間接作用としてはNK細胞の活性化¹⁴⁾、マクロファージ系の活性化¹⁵⁾、T細胞系の活性化¹⁶⁾などが報告されている。

一方、IFN- α と5-FUとの併用による*in vitro*での作用増強の報告も多数なされている。5-FUの中間代謝物質である5-fluoro-2'-deoxyuridine 5-monophosphate (FdUMP)の細胞内濃度がIFN- α によって上昇するとの報告や¹⁷⁾、薬剤併用によるthymidylate synthetase (TS)阻害率の上昇効果¹⁸⁾、腫瘍細胞のapoptosisの増加¹⁹⁾ 20)、cell cycleの遅延²¹⁾などがその機序として報告されている。

これらの報告をふまえてわれわれは、進行肝細胞癌に対するIFN併用化学療法の作用機序につ

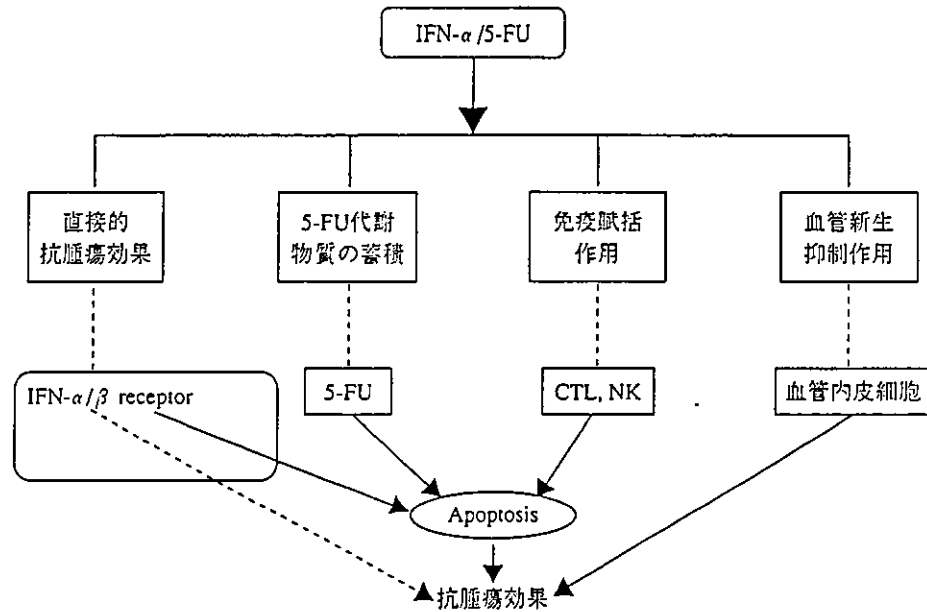


図3 IFN併用化学療法的作用機序

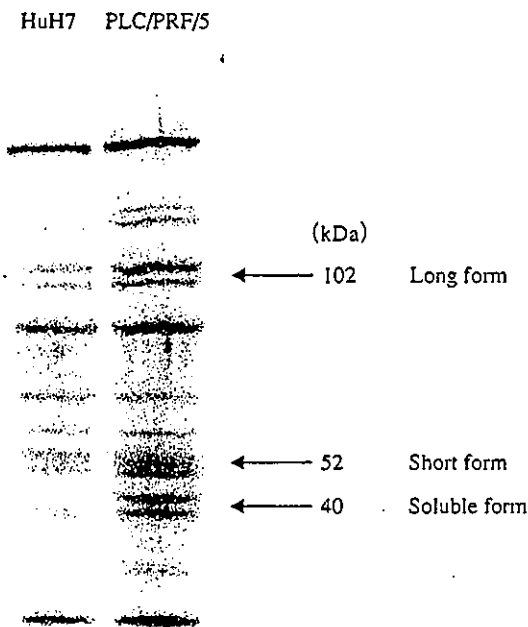


図4 2種類の肝細胞癌細胞株 (HuH7とPLC/PRF/5) でのIFNレセプターの発現

IFN併用化学療法による抗腫瘍効果の高い肝細胞癌細胞株 (PLC/PRF/5) のほうが、抗腫瘍効果の低い肝細胞癌細胞株 (HuH7) よりIFNレセプターの発現が高い (文献22)より改変)。

いて、① IFN- α と5-FUの直接的抗腫瘍効果、② IFN- α と5-FUの併用による血管新生抑制効果、③ IFN- α と5-FUの免疫担当細胞を介した間接的抗腫瘍効果、が関与している可能性があると考えている (図3)。

①については、肝細胞癌株を用いて、IFN- α と5-FUの併用による細胞増殖抑制効果について検討したところ、両薬剤併用による増殖抑制効果の増強、細胞周期の遅延作用および細胞周期関連蛋白の発現の変化を確認した。さらにこの効果は、肝細胞癌株のIFN受容体の発現の強弱が関与していることが明らかになった²²⁾(図4)。さらに最近、この直接的抗腫瘍効果について、IFN

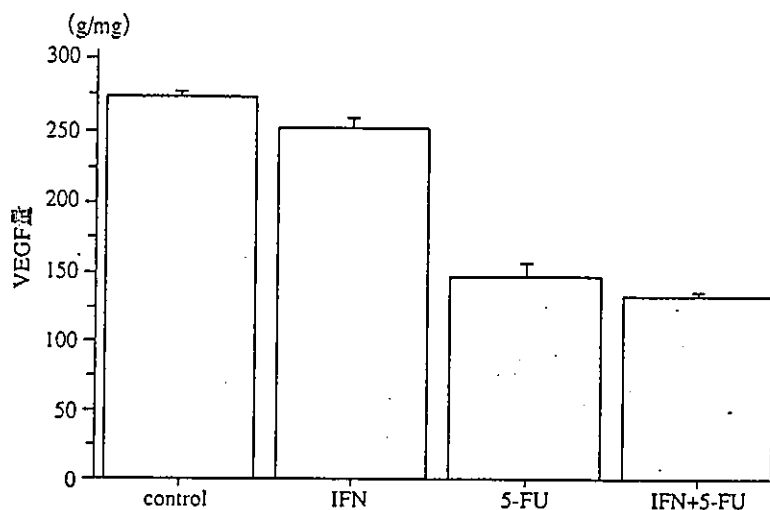


図5 肝細胞癌細胞株 (HuH7) を用いた増殖抑制実験での培養上清中の VEGF 発現量の比較

IFNと5-FUの併用群において、VEGFの発現は抑制されている(文献10)より改変)。

受容体にシグナルが到達してから、細胞内の伝達系路のなかで、Bcl-xLの発現がその抗腫瘍効果について強く関与しているということ²³⁾、さらには臨床例において、IFNの受容体の発現²⁴⁾とその治療効果に何らかの関係があるとの知見も得ている。

次に②については、先の肝細胞癌細胞増殖抑制実験で用いた培養液中の血管新生因子(VEGF)の発現量を測定したところ、IFN- α と5-FUの併用により、その発現が減弱することを確認した¹⁰⁾(図5)。この血管新生抑制効果については、現在、さらにヌードマウスを用いた動物実験の系において、その抗腫瘍効果と血管新生抑制作用について検討中で、血管新生因子、血管新生抑制因子のなかの数種の因子が相互に関与していることがわかってきている。

最後に③についてであるが、現在われわれは、tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) を介した免疫賦活作用による肝細胞癌に対する抗腫瘍効果について検討してきた。まず、肝細胞癌株とリンパ球を用いた実験においては、肝細胞癌株にはTRAILの受容体が、リンパ球においてはTRAILが発現しており、それぞれの活性がIFN- α と5-FUによって調節を受けることを確認した。また、IFN併用動注化学療法を施行した進行肝細胞癌(Vp4, IM3)症例の治療前後の末梢血単核球中のtumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) mRNAを比較検討したところ、治療有効群ではTRAILの発現が治療前に比べて増加傾向を認めしたが、治療無効群では認められないことがわかった¹⁰⁾²⁵⁾(図6)。また、その他の機序として、IFN併用化学療法においてIFNと併用する抗癌剤は、5-FUがその治療効果が高いという点についても、*in vitro*の解析においてすでに報告した²⁶⁾。

これらのことより、本療法の抗腫瘍効果の機序については、IFN受容体を介した直接的抗腫瘍効果に加えて、血管新生抑制効果や、TRAIL/TRAIL receptor系を介した腫瘍監視機構などが関与している可能性があると考えている。また最近では、これら*in vitro*の検討に加えて、臨床検体

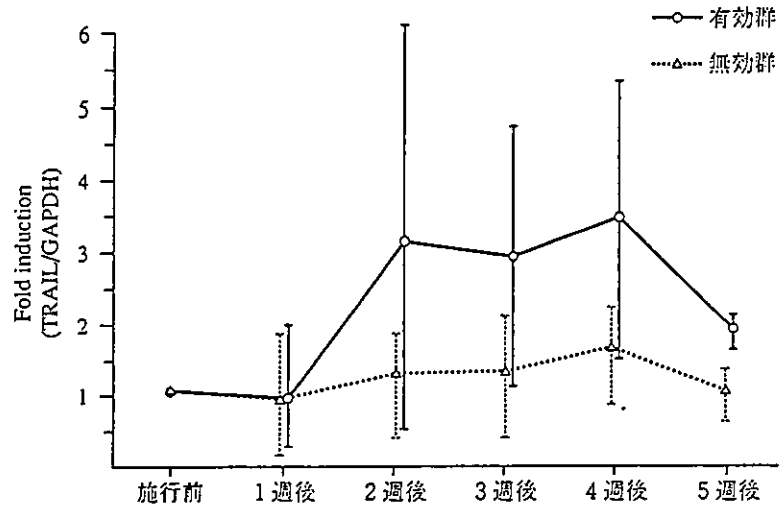


図6 IFN併用動注化学療法を施行した進行肝細胞癌 (Vp4, IM3) 症例の治療前後の末梢血単核球中の TRAIL mRNA を比較
治療有効群では TRAIL の発現が治療前に比べて増加傾向を認めたが、治療無効群では認められない (文献 10) 24) より改変)。

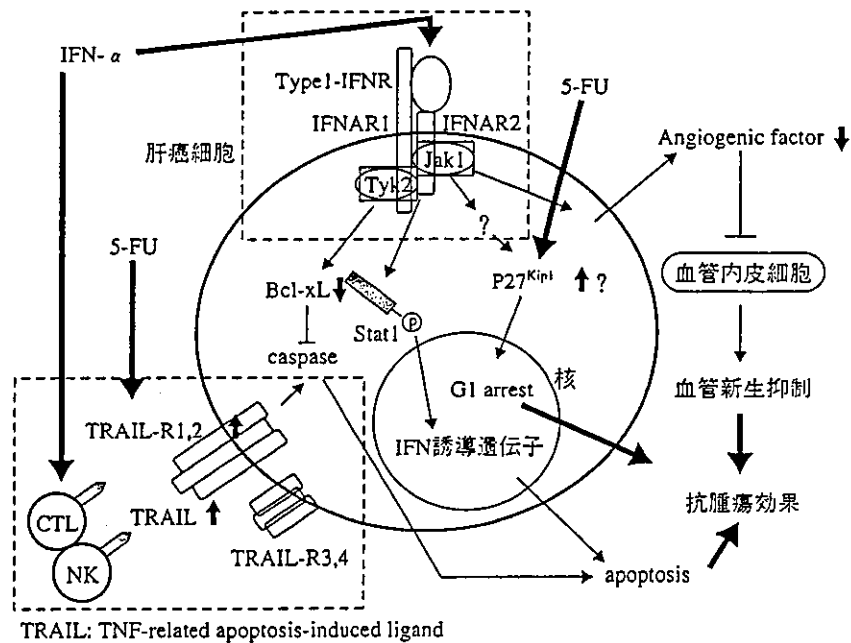


図7 IFN併用化学療法の作用機序に関するわれわれの作業仮説の模式図

を用いて網羅的遺伝子解析を施行することにより、現在では約50%程度の治療効果しか得られない FAIT の治療前効果予測が可能かもしれないとの知見も得ている²⁷⁾。

以上のように、FAITの肝細胞癌に対する抗腫瘍効果の作用機序については、いくつかの因子が関与していることが明らかになってきている。現在までのわれわれの解析結果を概説すると、図7に示すようになる。今後のさらなる検討が必要である。

おわりに

治療抵抗性の進行肝細胞癌に対する治療法として、IFN併用化学療法は新たな選択肢の一つになる可能性が十分にある。現在、本療法については、その有効性について検証すべく厚生労働省の科学研究費（進行肝細胞癌に対する集学的治療に関する研究：14230501，主任研究者：門田守人）を得て、全国レベルでのrandomized control trial (RCT) を施行中である。また、保険適応拡大についても検討中で、昨年より薬剤臨床試験が開始された。本療法の有効性が確立され、今後の肝細胞癌集学的治療の一翼となるべき日が近いことが期待される。

文 献

- 1) Sakon M, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Yamada A, Kawata S, Imai Y, Iijima S, Monden M : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94: 435-42, 2002.
- 2) Wadler S, Schwartz EL : Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. *Cancer Res* 50: 3473-86, 1990.
- 3) Kelsen D, Lovett D, Wong J, Saltz L, Buckley M, Murray P, Heelan R, Lightdale C : Interferon alfa-2a and fluorouracil in the treatment of patients with advanced esophageal cancer. *J Clin Oncol* 10: 269-74, 1992.
- 4) Lee KH, Lee JS, Suh C, Lee YS, Min YI, Ahn SH, Park KC, Kim SK, Kim SH : Combination of 5-fluorouracil and recombinant interferon alpha-2B in advanced gastric cancer. A phase I study. *Am J Clin Oncol* 15: 141-5, 1992.
- 5) Patt YZ, Yoffe B, Charnsangavej C, Pazdur R, Fischer H, Cleary K, Roh M, Smith R, Noonan CA, Levin B : Low serum alpha-fetoprotein level in patients with hepatocellular carcinoma as a predictor of response to 5-FU and interferon-alpha-2b. *Cancer* 72: 2574-82, 1993.
- 6) Urabe T, Kaneko S, Matsushita E, Unoura M, Kobayashi K : Clinical pilot study of intrahepatic arterial chemotherapy with methotrexate, 5-fluorouracil, cisplatin and subcutaneous interferon- alpha-2b for patients with locally advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 55: 39-47, 1998.
- 7) Leung TW, Patt YZ, Lau WY, Ho SK, Yu SC, Chan AT, Mok TS, Yeo W, Liew CT, Leung NW, Tang AM, Johnson PJ : Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 1676-81, 1999.
- 8) Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Brown TD, Vauthey JN, Curley SA, Ellis LM : Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 21: 421-7, 2003.
- 9) Miyamoto A, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Dono K, Nakamori S, Gotoh M, Monden M : Case report: Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of interferon-alpha and oral tegafur/uracil (UFT). *J Gastroenterol Hepatol* 15: 1447-51, 2000.
- 10) 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人 : 肝癌—進行肝癌の治療. *肝胆膵* 43: 945-9, 2001.
- 11) Grander D, Xu B, Einhorn S : Cytotoxic effect of interferon on primary malignant tumour cells. *Studies in various malignancies. Eur J Cancer* 29A: 1940-3, 1993.
- 12) Kimchi A : Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest. *J Cell Biochem* 50: 1-

- 9, 1992.
- 13) Guadagni F, Schlom J, Johnston WW, Szpak CA, Goldstein D, Smalley R, Simpson JF, Borden EC, Pestka S, Greiner JW : Selective interferon-induced enhancement of tumor-associated antigens on a spectrum of freshly isolated human adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 81: 502-12, 1989.
 - 14) Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs D, Rubinstein M, Pestka S, Herberman RB : Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31: 285-9, 1983.
 - 15) Uno K, Shimizu S, Ido M, Naito K, Inaba K, Oku T, Kishida T, Muramatsu S : Direct and indirect effects of interferon on in vivo murine tumor cell growth. *Cancer Res* 45: 1320-7, 1985.
 - 16) Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH : Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 178: 1655-63, 1993.
 - 17) Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ, Wadler S : Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1232-9, 1992.
 - 18) 池田直樹, 卜部健, 種井政信, 西村浩一, 松下栄紀, 稲垣豊, 金子周一, 鷗浦雅志, 小林健一: ヒト肝細胞癌由来培養細胞株PLC/PRF/5の増殖に対するInterferon, 5-Fluorouracilの併用効果の検討. *日癌治会誌* 29: 790-4, 1994.
 - 19) Horowitz RW, Heerdt BG, Hu X, Schwartz EL, Wadler S : Combination therapy with 5-fluorouracil and IFN-alpha2a induces a nonrandom increase in DNA fragments of less than 3 megabases in HT29 colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 3: 1317-22, 1997.
 - 20) Sabaawy HE, Farley T, Ahmed T, Feldman E, Abraham NG : Synergetic effects of retrovirus IFN-alpha gene transfer and 5-FU on apoptosis of colon cancer cells. *Acta Haematol* 101: 82-8, 1999.
 - 21) Wadler S, Schwartz EL, Goldman M, Lyver A, Rader M, Zimmerman M, Itri L, Weinberg V, Wiernik PH : Fluorouracil and recombinant alfa-2a-interferon: an active regimen against advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7: 1769-75, 1989.
 - 22) Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Monden M : Augmentation of anti-tumor activity of 5-FU by IFN- α is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 2881-90, 2000.
 - 23) Kondo M, Nagano H, 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. *Clin Cancer Res* (in press).
 - 24) Kondo M, Nagano H, Sakon M, Yamamoto H, Morimoto O, Arai I, Miyamoto A, Eguchi H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Wakasa K, Ohmoto Y, Monden M : Expression of interferon α / β receptor in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 17: 83-8, 2000.
 - 25) Yamamoto T, Nagano H, Sakon M, Wada H, Eguchi H, Kondo M, Damdinsuren B, Ota H, Nakamura M, Wada H, Marubashi S, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Yagita H, Monden M : Partial contribution of TRAIL/TRAIL receptor pathway to anti-tumor effects of IFN- α /5-FU against hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* (in press).
 - 26) Damdinsuren B, Nagano H, Sakon M, Kondo M, Yamamoto T, Umeshita K, Dono K, Nakamori S, Monden M : Interferon- β is more potent than Interferon- α in inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth when used alone and in combination with anticancer drugs. *Ann Surg Oncol* 10: 1184-90, 2003.
 - 27) Kurokawa Y, Matoba R, Nagano H, 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 in advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 6029-38, 2004.

門脈腫瘍栓(Vp3)合併進行肝細胞癌に対する IFN 併用肝動注化学療法

大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学助教授 左近 賢人
同病態制御外科学教授 門田 守人

はじめに

門脈腫瘍栓(Vp3以上)合併肝細胞癌は、切除可能であってもその予後は1年生存率が49%ときわめて不良であり、また各種の局所療法やTAEも適応とはならない。また、肝細胞癌剖検例の3割にVp3以上の門脈腫瘍栓が認められることから、門脈腫瘍栓(Vp3以上)は肝細胞癌の終末像ともいえる。われわれは1997年に肺・骨転移を伴い、TAEが無効である肝内多発再発例に対してインターフェロン α (IFN α)とUFT(テガフル/ウラシル)の併用が著効した症例を経験した¹⁾。以後、肝外転移のない門脈腫瘍栓(Vp3以上)合併肝細胞癌にターゲットを絞り、5-FUの肝動注化学療法に加え、IFN α の全身投与を併用し、良好な結果を報告してきた²⁾。

IFN α 併用化学療法

進行肝細胞癌に対するIFN単剤による全身療法は一般にLaiら³⁾の報告(IFN α で奏効率31%)を除いて低く、その奏効率は0~7%である。一方、5-FUとIFN α の全身投与では10~20%とより良好な傾向となっている。Vp3以上の進行肝細胞癌に対するIFN α の全身投与と5-FU肝動注化学療法との併用では奏効率が約5割ときわめて良好な成績である(表1)。Kanekoら⁴⁾はIFN α に5-FU, cisplatin, methotrexate, leucovorinの4剤を併用し、小尾ら⁵⁾やわれわれは5-FU単剤との併用療法("basic regimen")であるが、ほぼ同等の効果である。また、1~2割の症例にCRを認めている。IFN α 併用肝動注化学療法がIFN α 療法単独、あるいはそれと全身的5-FU投与との併用に比べて良好な成績となっていることは、本療

表1 Vp3,4合併肝細胞癌に対するIFN α /5-FU併用療法(肝切除との比較)

研究機関	治療法	例数	CR	PR	NC	PD
日本肝癌研究会(2002)	肝切除(手術)	679	49	30	12	
Kaneko(5割)(2002)	CR+PR(13)	45	51	33	11	
	NC+PD(16)		14	7	3.5	
小尾(2003)	CR+PR(27)	53	32			
	NC+PD(24)		0			
当科(2003)	CR+PR(19)	48	95	56	24	
	NC+PD(21)		0	0	6.0	

法の効果発現には肝動注化学療法の関与が大きいことを示唆している。

腫瘍栓(Vp3以上)合併肝細胞癌に対する肝切除とIFN α 併用5-FU動注化学療法の臨床成績

第15回原発性肝癌調査報告によればVp3以上の門脈腫瘍栓合併肝癌の術後1年生存率は約49%である⁶⁾。一方、IFN α 併用5-FU動注化学療法の奏効(CR/PR)例のそれは32~95%である(表1)。当施設における奏効例の50%生存期間は24ヵ月であり、肝切除例より約12ヵ月間長くなっている(図1)。つまり、本法奏効例の成績は肝切除のそれを凌駕するとともに、肝切除だけでは予後の向上が期待できず、化学療法が奏効することが長期生存のための重要な条件であることを意味している。

IFN α 併用肝動注化学療法の適応条件

当施設では現在までうつ病を除き、特に大きな副作用が同定されていない。小尾らも大きな副作用を認めなかったとしている。しかし、全身状態

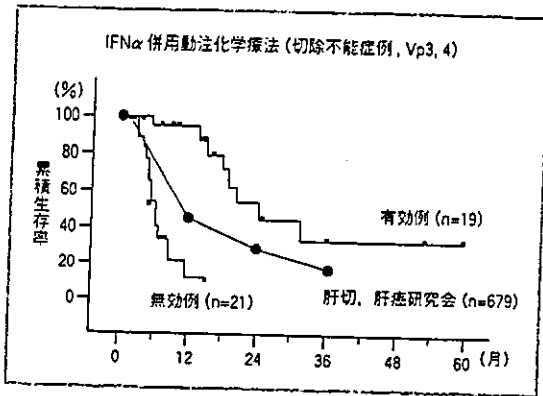


図1 Vp 3,4 合併肝細胞癌に対する IFN α /5-FU 併用療法の治療成績

や肝機能不良例では治療が完遂できないのも事実である。そこで、現在の当施設における適応基準は原則として、①年齢70歳未満、②GOT, GPT (それぞれ100未満)、③黄疸無く(ただし、閉塞性黄疸はこの限りではない)、④血小板数8万以上、⑤血清クレアチニン1.5 mg/dL以下、⑥PS (0, 1)としている。

補助療法としての IFN α 併用肝動注化学療法

食道静脈瘤破裂や動注用カテーテルのトラブルを回避するために、当施設では IM3 であっても減量肝切除を行い、その後補助療法として本療法を施行している。肉眼的に癌の遺残のない症例

(切除可能群)および遺残病巣を認めた IM3 症例(減量切除群)に対して本療法を原則として3クール施行した。減量切除群の1年生存率は約60%と補助療法のない切除可能症例より良好であった。また、遺残病巣の奏効例の1年生存率は80%であった。さらに、残肝に遺残病巣のない切除可能群ではさらに良好な生存率(1年: 100%, 3年: 80%)であった。

抗腫瘍効果の発現機序

IFN α と 5-FU の併用効果の機序を図2に示す。IFN α はタイプ1レセプターを介して Jak による STAT のリン酸化が起こり、IFN α は誘導蛋白質の転写活性が亢進する。その結果、細胞周期の遅延による細胞増殖抑制、血管新生の抑制、アポトーシスの亢進などが起こる。一方、IFN α は NK 細胞や CTL などのリンパ球に作用し、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) などの発現を増強させる。5-FU は TRAIL のレセプターである TRAIL-R の培養肝癌細胞における発現を増強する。したがって、両者の相乗効果により、細胞障害活性の増強が期待できる。さらに、5-FU の代謝に関しては thymidine phosphorylase (TP) の発現増強により FDUMP の生成を亢進させる。このように多様な相乗作用が総合的に働き、抗腫

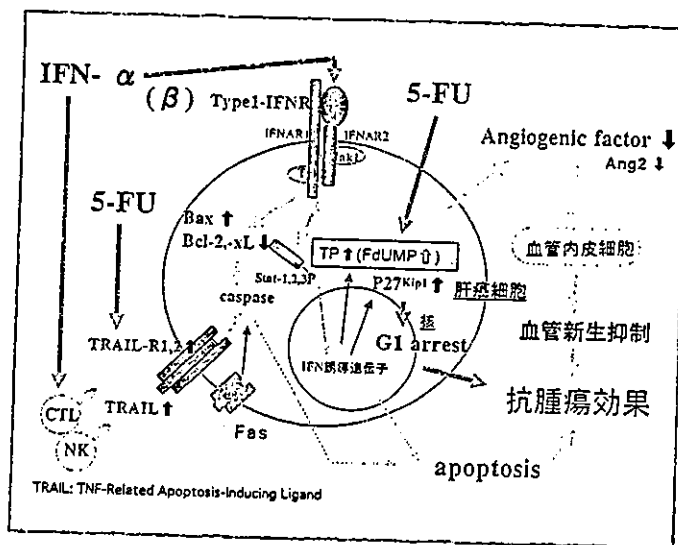


図2 IFN α 併用 5-FU 動注化学療法的作用機序(仮説)

瘍効果をもたらしていると考えられる。

おわりに

IFN α 併用肝動注化学療法は Vp3 以上の門脈腫瘍栓を合併する肝細胞癌の予後を大きく変えた感がある。しかし、約 50% の症例は非奏効例である。今後、効果予測法の確立とともに、肝外病変を含めた無効病巣に対する治療法の開発が重要である。

References

- 1) Miyamoto A, Umeshita K, Sakon M, et al : Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of alpha-interferon and oral tegafur/uracil. J Gastroenterol Hepatol 15 : 1447-1451, 2000
- 2) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. Cancer 94 : 435-442, 2002
- 3) Lai CL, Lau JY, Wu PC, et al : Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma : a randomized controlled trial. Hepatology 17 : 389-394, 1993
- 4) Kaneko S, Urabe T, Kobayashi K : Combination chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma complicated by major portal vein thrombosis. Oncology 62 (Suppl 1) : 69-73, 2002
- 5) 小尾俊太郎, 椎名秀一郎, 寺谷卓為, 他 : 門脈浸潤 (VP3, 4) を伴う進行肝細胞癌に対する IFN 併用 SFU 動注化学療法の有用性. 第 39 回日本肝癌研究会抄録集 pp.115, 2003
- 6) 日本肝癌研究会 : 第 15 回全国原発性肝癌追跡調査報告. 進行印刷出版, 京都, 2002

特集

テーラーメイド医療に向けてのバイオマーカー：
 ● 診断の現況と将来(第41回日本癌治療学会総会より) ●

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—

黒川 幸典*^{1,2} 竹政伊知朗*¹ 左近賢人*¹ 加藤菊也*²
 門田守人*¹

Gene Expression Profiling Analysis to Find Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using PCR-array: Kurokawa Y*^{1,2}, Takemasa I*¹, Sakon M*¹, Kato K*² and Monden M*¹ (*¹Dept of Surgery and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Osaka Univ, *²Taisho Laboratory of Functional Genomics, Nara Institute of Science and Technology)

Many gene expression profiling studies using DNA microarrays have been reported for various human cancers, but an efficient biomarker has not been found in hepatocellular carcinoma (HCC) yet. We have performed various gene expression profiling analyses of HCC using a high throughput quantitative PCR-array system based on adaptor-tagged competitive PCR (ATAC-PCR). Using this PCR-array, we identified many differentially expressed genes among tumor, nontumor and normal liver. This review briefly introduce our PCR-array studies in human HCC and future aspects of such gene expression profiling studies to find novel biomarkers.

Key words: PCR-array, ATAC-PCR, DNA microarray, Gene expression profiling

Jpn J Cancer Clin 50(1): 21~26, 2004

はじめに

ポストゲノム時代といわれる今、癌の臨床医学の分野では、これまでの臨床病理学的エビデンスを基に様々な分子生物学的な手法を用いることで、医療の個別化(テーラーメイド医療)を実現しようとする動きが盛んになっている。癌の個性を解明するためには単に個々の遺伝子を追求するだけでなく、癌の発育、進展に関わる多数の遺伝子を同時に解析することが重要であると考えられ、そのツールの一つとしてDNAマイクロアレイ

が注目されてきた。DNAマイクロアレイは、数千種類の遺伝子の発現情報を1回のアッセイで得られるという特徴があり、現在までに様々な悪性腫瘍を用いた研究結果が報告されている^{1~4)}。これらDNAマイクロアレイがハイブリダイゼーションをベースにしたアッセイ系であるのに対し、われわれはRT-PCRをベースとすることで新たな改良を加えたアダプター付加競合PCR(adaptor-tagged competitive PCR; ATAC-PCR)法⁵⁾を用いたPCRアレイを利用することで、DNAマイクロアレイと同様な網羅的遺伝子発現解析を行ってきた^{6~8)}。本稿では、PCRアレイを利用した肝細胞癌(HCC)の遺伝子発現プロファイリングおよびバイオマーカー探索の現状について概説する。

*1 大阪大学大学院病態制御外科

*2 奈良先端科学技術大学院大学大正製薬ゲノム機能解析講座