

200933039A

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

# 肝がんの新規治療法に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本 多 政 夫

平成22 (2010) 年 3 月

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

肝がんの新規治療法に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本多 政夫

平成22（2010）年 3月

## 肝がんの新規治療法に関する研究

### 研究組織

<u>研究代表者</u>		
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系	教授
<u>研究分担者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
中本 安成	金沢大学附属病院消化器内科学	講師
恩地 森一	愛媛大学大学院医学系研究科、先端病態制御内科学、消化器内科	教授
汐田 剛史	鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子医療学、消化器内科	教授
横須賀 収	千葉大学大学院医学研究院、腫瘍内科学	教授
坂井田 功	山口大学大学院医学系研究科、消化器病態内科学	教授
林 紀夫	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学・消化器病学	教授
古瀬 純司	杏林大学医学部、腫瘍内科学	教授
上野 義之	東北大学大学院医学研究科、消化器病態学	准教授
廣石 和正	昭和大学医学部内科学講座、消化器内科学部門	准教授
西口 修平	兵庫医科大学内科学肝胆膵科、消化器病学	教授
工藤 正俊	近畿大学医学部、消化器内科	教授
森脇 久隆	岐阜大学大学院医学系研究科、消化器病態学分野	教授
山本 和秀	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科、消化器・肝臓内科	教授
池田 健次	虎の門病院肝臓センター、肝臓内科	肝臓科部長
佐田 通夫	久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門、消化器病学	教授

# 目 次

## I. 総括研究報告

### 肝がんの新規治療法に関する研究

本多 政夫 ----- 1

## II. 分担研究報告

### 1. 新規抗がん剤の研究、およびがん幹細胞に対する治療法の開発

金子 周一 ----- 15

### 2. 樹状細胞を用いた肝がんの治療研究

中本 安成 ----- 20

### 3. 肝細胞癌に対する樹状細胞を用いた免疫療法の開発

恩地 森一 ----- 23

### 4. 肝癌幹細胞を標的とする肝癌治療法開発に関する研究

汐田 剛史 ----- 25

### 5. 進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験

横須賀 収 ----- 27

### 6. 肝発癌と線維化の接点に關与するMaidシグナルの研究

坂井田 功 ----- 29

7. 肝癌に対する癌免疫誘導機構の解析 林 紀夫	31
8. 肝機能の低下した進行肝細胞がん患者における全身化学療法の安全性と有効性に関する研究 古瀬 純司	35
9. 「肝硬変患者の免疫機構に關与する遊離アミノ酸の研究」に関する研究 上野 義之	40
10. 肝細胞癌における腫瘍抗原特異的細胞性免疫応答 広石 和正	42
11. インターフェロンによる血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現の基礎的検討 西口 修平	45
12. 1) 原発性肝癌における腫瘍細胞の分子生物学的特徴に関する研究 2) 進行肝細胞癌に対するソラフェニブと低用量シスプラチン/ フルオロウラシル肝動注療法の併用化学療法の第 I / II 相臨床試験 工藤 正俊	50
13. 非環式レチノイドを用いた併用肝発癌化学予防に関する研究 森脇 久隆	55

14. 肝細胞癌の糖鎖変化に関する研究		
山本 和秀	-----	57
15. 肝細胞癌患者におけるCell Searchシステムを用いた 血中循環癌細胞(CTC)の検出		
池田 健次	-----	62
16. 新規抗がん剤の研究、および併用療法の開発研究		
佐田 通夫	-----	65
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	71
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	81

# I. 総括研究報告

肝がんの新規治療法に関する研究

研究代表者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

研究要旨：肝がんの治療成績・予後改善を目的として以下の研究を行った。全体研究としてソラフェニブを中心とした新規抗がん剤の治療効果ならびに安全性調査を開始した。64症例中、高血圧(27%)、手足症候群(9%)、及び肝機能障害(30%)が高頻度に認められた。より詳細な副作用の解析と治療効果に関しては症例の蓄積と十分な観察機関を要する。個別研究として血小板由来増殖因子トランスジェニックマウスを用いて非環式レチノイドの肝線維化抑制作用、肝発がん抑制作用が示された(本多)。非環式レチノイドと他の薬剤の併用療法の可能性が示唆された(森脇)。インターフェロンによる血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現の基礎的検討がなされた(西口)。肝転写因子の一つであるMaidはがん抑制因子、線維化抑制因子として働く可能性が示唆された(坂井田)。肝がん症例の血清の糖鎖分析が行われた(山本)。肝がん幹細胞の抗がん剤抵抗性の機序の一つとしてnuclear dUTPaseが重要な働きをしている可能性が示唆された(金子)。また肝がん幹細胞で高発現するテロメラーゼをターゲットとした基礎研究が行われた(汐田)。循環がん細胞の同定は肝がんの転移症例で特異性が高く有用であることが示された(池田)。肝がん局所療法後の腫瘍抗原特異的CD8陽性T細胞の存在は治療予後と関連することが示された(廣石)。α-GalCerを用いたがん免疫療法の効果増強作用がマウスモデルで示された(林)。樹状細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験が開始され、免疫学的効果及び安全性の評価がなされた(中本、恩地)。またアミノ酸組成による樹状細胞活性化の違いが検討された(上野)。各種新規抗がん剤を用いた安全性、治療効果比較のための臨床試験が開始された(古瀬、横須賀、工藤、佐田)。これらの研究を推進させることで、効果的な肝がん治療が選択され、治療成績の向上が期待できると考えられた。

A. 研究目的

肝がんはウイルス性慢性肝炎の病態のひとつである。インターフェロンをはじめとする治療によって肝がんの発症が抑えられ、肝切除およびラジオ波焼灼療法の導入によって早期肝がんの治療成績が向上した。進行肝がんの治療は長らく良好な成績を上げられなかったが、分子および細胞生物学の進歩によって、治療成績は劇的に改善しつつある。分子標的薬ソラフェニブが欧米の

進行肝がん症例の生存期間を有意に延長し、我が国に於いても使用されるに至った。我が国において開発された非環式レチノイドの国内第Ⅲ相臨床試験がほぼ終了し、さらに複数の有望な新規抗がん剤の臨床試験が進行している。しかし、これらの抗がん剤と従来の治療法との位置づけは不明であり、重篤な副作用も懸念される。

本研究班は、全体研究と研究者による個別研究から構成される。班全体の研究とし



て、各研究者の施設における新規抗がん剤を含めた化学療法の成績をまとめる。これによって、新規化学療法の評価と適正な患者対象の選択や使用法、副作用の課題を研究する。また、研究期間内に、我が国の肝がん化学療法の診療指針を示す。

個別の研究として、新規抗がん剤研究および新規治療法開発研究を行う。非環式レチノイドをはじめとする新規治療薬の作用機序に関する研究、がん幹細胞を標的とする治療法の開発研究、免疫療法の条件の最適化を行う。また、新規抗がん剤の治療効果を予測するバイオマーカーを探索し、有用性を解析する。研究者の肝がんの基礎研究実績は十分に欧米の研究者をリードしており、これらの研究者独自の研究を組み合わせ、がんに対する優れた内外の研究成果を迅速に肝がん治療に導入する。

## B. 研究方法

研究は班全体で行う全体研究と、班員が個別に行う個別研究より構成される。

### 1. 全体研究（研究分担者全員）

#### 1) 新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査

ソラフェニブに代表される新規抗がん剤の治療効果並びに安全性について調査を行う。

#### 2) 多施設共同臨床試験（ISHCC RCT/Cohort）

他施設共同臨床試験として以下の2つを予定する。

##### i) 「進行肝がんに対する肝動注化学療

法と Sorafenib 療法の無作為化比較試験」

Randomized control study comparing intra-hepatic arterial chemotherapy (IHAC) with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma (ISHCC-RCT)

##### ii) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法と Sorafenib 療法の有効性に関する前向きコホート研究」

Efficacy of intra-hepatic arterial chemotherapy (IHAC) vs. sorafenib on advanced hepatocellular carcinoma; a prospective cohort study (ISHCC-cohort)

進行肝がんに対する肝動注化学療法と Sorafenib 療法の治療効果、安全性を比較する目的で行う。インターフェロン(IFN)、5-FU 及びシスプラチン(CDDP)などを組み合わせた肝動注化学療法は進行肝がんに対して有効であることが我々の施設を始め幾つかの施設から既に報告されている。肝動注化学療法と Sorafenib 療法の有効性、安全性を比較することにより、的確な治療法の選択や予後の改善が可能になる。症例のエントリーの手順は図1のようになる。Sorafenib 療法の無作為化比較試験の同意が得られた症例においては、肝動注化学療法と Sorafenib 療法の何れかが無作為に割り当てられる。無作為化比較試験の同意が得られない症例に対しては、前向きコホート研究の説明を行い、同意が得られた場合、肝動

注化学療法と Sorafenib 療法のいずれの治療が任意で選択され、治療が遂行される。

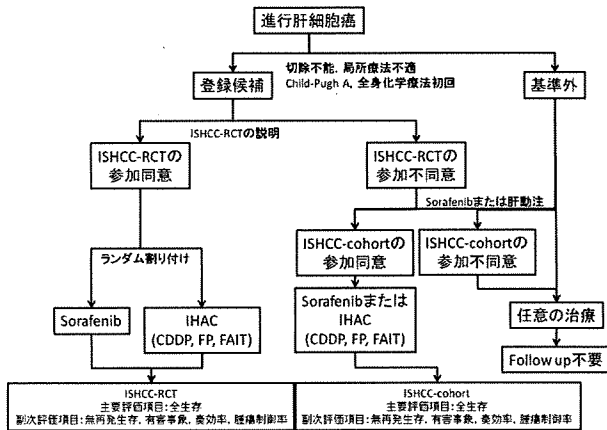


図1 多施設共同臨床試験 (ISHCC RCT/Cohort)

これらの他施設共同臨床試験により進行肝がん症例の生存・再発・有害事象に関するデータを収集・検討する。また、進行肝がんに対する抗がん剤適正使用のガイドライン化を目指す。

## 2. 個別研究

非環式レチノイドをはじめとする新規治療薬の作用機序に関する研究、がん幹細胞を標的とする治療法の開発研究、免疫療法の条件の最適化などを行う。また、新規抗がん剤の治療効果を予測するバイオマーカーを探索し、有用性を解析する。

平成 21 年度の個別研究の目的・方法を以下に略記する。

我が国で臨床試験がほぼ終了しつつある非環式レチノイドの発がん抑制機構の解明を血小板由来増殖因子 (PDGF-

C) トランスジェニックマウスを用いて行う (本多)。

非環式レチノイドと他の薬剤を組み合わせることにより、より効果的な肝発がん予防法を開発することが可能である。ヒト肝がん細胞を、非環式レチノイドと抗 HER2 抗体の Trastuzumab や、HDAC 阻害剤のバルプロ酸で併用処理し、細胞増殖の抑制効果について検討する (森脇)。

がん組織の形成・増大にはがん細胞の増殖のみならず周囲組織との相互作用が必要であり、特に血管新生の誘導は重要と考えられている。IFN の血管新生抑制効果を培養細胞や SCID マウス皮下腫瘍移植モデルを用いて検討する (西口)。

Maid のヒトホモログ Human Homologue of Maid (HHM) の発現を DEN (diethylnitrosamine) 投与ゼブラフィッシュの肝臓を用いて解析する。また Maid KO mice に四塩化炭素 (CC14) を投与し肝障害・肝線維化に与える影響を検討する (坂井田)。

がん幹細胞は従来用いられている抗がん剤や放射線に関して高い抵抗性を有し、がん治療後の再発への関与が示唆されている。EpCAM 陽性肝がんにおいて DNA ダメージ応答遺伝子のなかでも特に nuclear dUTPase に着目し、幹細胞性と抗がん剤抵抗性との関連について検討を行う (金子)。

肝がん幹細胞に高発現する human telomerase reverse transcriptase

(hTERT) 遺伝子発現を制御する遺伝子を同定し、新規肝がん治療法を開発する(汐田)。

血清中の糖鎖パターンの変化は肝がんの診断や治療効果予測・早期判定に有用である可能性がある。糖鎖マーカーとして欧米で報告されている GP73、またフコシル化ヘモペキシンを肝がん症例の血清を用いて検討する(山本)。

血液中の循環がん細胞(circulating tumor cell: CTC)を検出し、肝がんにおける CellSearch による CTC の検出の有効性について検討する(池田)。

肝がんには Glypican-3、NY-ESO-1、MAGE-1 といったがん抗原の発現が報告されているが、それらのがん抗原に対して強い免疫応答を惹起することができれば、がんの縮小が期待できる。肝がん患者を対象に各種がん抗原に対する細胞性免疫応答の解析を行う(廣石)。

$\alpha$ -galatosylceramide( $\alpha$ -GalCer)は肝先天免疫を活性化するが、続いて獲得免疫も強く誘導する。 $\alpha$ -GalCer 投与による獲得免疫の誘導を肝臓及び脾臓に腫瘍を接種し解析する(林)。

肝がんを高発現する GMP レベルの 3 種類の腫瘍抗原タンパクを用いて腫瘍抗原パルス樹状細胞の培養方法を確立する(恩地)。

肝がんの局所制御と併用して二次発がんを抑制する治療法として、肝動脈塞栓療法(TAE)と同時に各種調整法に

より誘導した樹状細胞を投与する安全性臨床研究を行う(中本)。

肝硬変患者では各種免疫細胞の機能が低下する。肝硬変患者の免疫細胞機能を改善または抑制する作用を有するアミノ酸を同定しその作用・メカニズムを研究する(上野)。

現在、ソラフェニブは進行肝がんに対する標準治療薬として汎用されている。しかしこれまでの比較試験では、対象は Child-Pugh A の肝機能良好な患者に限られており、肝機能不良例での安全性や有効性は確立していない。Child-Pugh B の肝機能低下例を含めた進行肝がん患者を対象として、安全性と有効性を検証する前向き第 II 相試験を実施する(古瀬)。

肝がんに対するソラフェニブ単剤療法の効果は限定的であり、さらなる治療効果の改善が望まれている。ソラフェニブと TS-1 の併用療法の至適投与量決定・安全性評価のための第 I 相試験を行う(横須賀)。

肝がんの分子生物学的特徴を明らかにし、診断法の開発および治療に有用な遺伝子を特定する。また進行肝がんに対するソラフェニブと低用量シスプラチン/フルオロウラシル肝動注療法の併用化学療法の第 I / II 相臨床試験を行う(工藤)。

CDDP とリピオドール懸濁液および 5-FU を用いた肝動注化学療法の門脈腫瘍塞栓を有する肝がん患者に対する治療効果を前向きに検討する(佐田)。

(倫理面の配慮)

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮する。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従う。全体研究（新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査及び多施設共同臨床試験（ISHCC RCT/Cohort））に於いては金沢大学で作成された申請書類に基づき各実施機関に於いて「倫理委員会」の審査体制のもとに行う。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化する。

C. 研究結果

以下に本年度の全体研究と個別研究の研究結果を略記する。

1. 全体研究成果

1) 新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査

平成22年1月8日までに登録のあった64例の集計結果を以下の表に示した。

平成22年1月8日時点での集計  
 登録症例 64症例  
 年齢 平均 68.6歳(36-87)

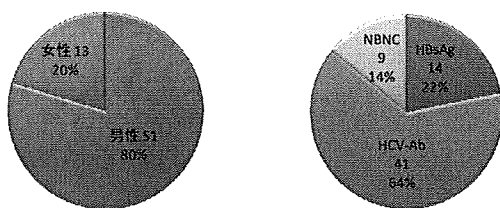


図 2

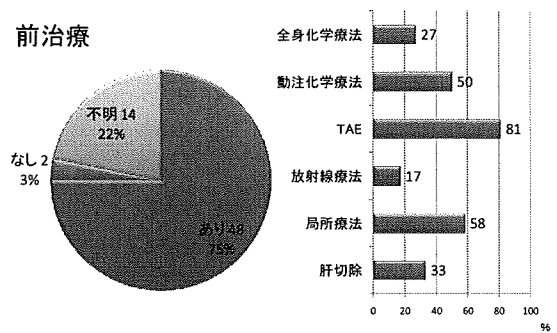


図 3

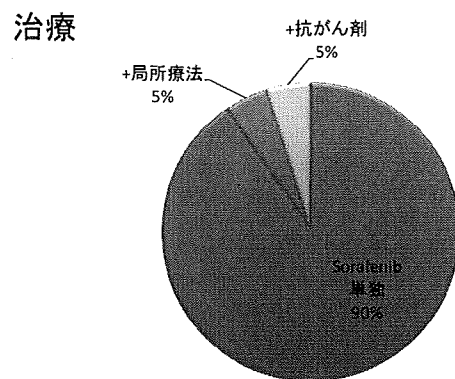


図 4

• 治療効果

CR 0(0%)  
 PR 0(0%)  
 SD 12(19%)  
 PD 11(17%)  
 判定保留・不明 41(64%)

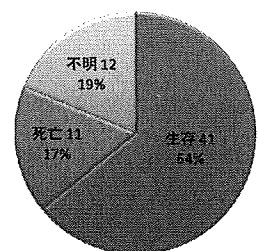


図 5

• 非血液学的		(SHARP trial)* n=297
G3以上:	21/63 (33%)	
• HFS	3 (9%)	23 (7.7%)
• 高血圧	9 (27%)	5 (1.7%)
• 食欲不振	3 (9%)	1 (0.3%)
• 呼吸困難	2 (6%)	1 (0.3%)
• 肝性脳症	1 (3%)	0 (0.0%)
• 間質性肺炎	1 (3%)	—
• 下痢	1 (3%)	25 (8.4%)

図 6

• 血液学的		(SHARP trial)* n=297
G3以上:	48/50 (96%)	
• 白血球減少	7 (14%)	1 (0.3%)
• 好中球減少	8 (16%)	2 (0.7%)
• Hb低下	5 (10%)	4 (1.3%)
• 血小板減少	9 (18%)	2 (0.7%)
• AST上昇	15 (30%)	5 (1.7%)
• ALT上昇	9 (18%)	2 (0.7%)
• γGTP上昇	11 (22%)	—
• T-Bil上昇	7 (14%)	5 (1.7%)
• Amy上昇	8 (16%)	0 (0.0%)
• Cre上昇	2 (4%)	0 (0.0%)
• Na上昇	5 (10%)	—
• P低下	4 (8%)	0 (0.0%)
• Alb低下	3 (6%)	—

図 7

症例は 51 人 (80%) が男性、13 人 (20%) が女性であり、平均年齢は 68.6 歳であった (図 2)。C 型肝炎関連が 41 例 (64%) であり、前治療として TAE (81%)、肝局所療法 (58%)、肝動注化学療法 (50%) などが行われていた (図 3)。新規抗がん剤の治療内容としてソラフェニブ単独例が 90% を占めた (図 4)。治療効果に関しては、観察期間の関係上、判定保留が 41 例 (64%)、SD が 12 例 (19%)、PD 11 例 (17%) であ

った (図 5)。副作用に関しては Hand - Foot - Syndrome (HFS) が 3 例 (9%) に認められ、高血圧が 9 例 (27%) に認められた (図 6)。血液生化学的検査では AST の上昇が 15 例 (30%) に認められた (図 7)。副作用に関しては SHARP study での報告に比べ多い傾向が認められたが、公平な評価は症例数の蓄積を待たなければならない。治療効果に関しても観察期間が短く今後の観察を要する。

## 2) 多施設共同臨床試験 (ISHCC RCT/Cohort)

i) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法と Sorafenib 療法の無作為化比較試験」

ii) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法と Sorafenib 療法の有効性に関する前向きコホート研究」

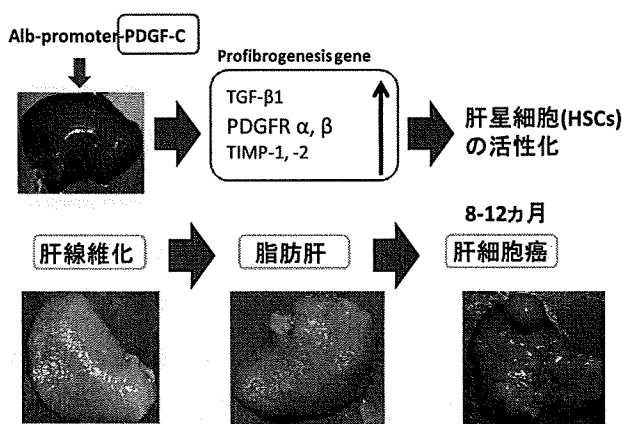
金沢大学で作成した申請書に添って各施設の倫理委員会にて申請後、症例のエントリーを開始する。

## 2. 個別研究成果

以下に本年度の個別研究の研究成果を列挙する。

非環式レチノイド (NIK-333、一般名; ペレチノイン) は武藤ら (N Engl J Med. 1996 Jun 13; 334(24):1561-7.) により肝がんの再発を抑制することが報告されて以来、肝がんの発生を抑制する薬剤として注目を集めてきた。現在、国内第Ⅲ相臨床試験「C 型肝炎ウイルス陽性

肝がんに対する再発抑制効果の検討」が終了し、今後、実臨床での効果が期待される。しかしながらその作用機序は十分に明らかにされておらず、特に肝線維化抑制効果に関する検討は十分に行われていない。本多（研究代表者）は血小板由来増殖因子（PDGF-C）トランスジェニックマウス（Tg）を用いて、NIK-333の作用を解析した。PDGF-C-Tgは肝細胞特異的遺伝子であるアルブミンプロモーターの制御下にPDGF-Cを肝で過剰発現させたマウスであり、肝線維化、血管新生の増加に伴い、肝細胞の脂肪化を誘導し、やがて肝がんが発生する（図8）。NIK-333を生後4週から0.03%、0.06%濃度で餌に混じり投与を行ったところ、生後24週に於いて、肝線維化、脂肪化の顕著な抑制が認められた。また48週後ではコントロールPDGF-C-Tgでは高頻度に肝腫瘍の発生を認めたが、NIK-333投与群では有意に肝腫瘍形成が抑制されていた（図9）。



（図8. PDGF-C-Tgによる線維化、脂肪化、発癌）

今後、線維化抑制機構、発現抑制機構に関して詳細な解析を行う。NIK-333はソラフェニブをはじめとする分子標的薬と比べ、副作用が少なく、今後実臨床で十分に効果が期待できる薬剤と考えられる。また、線維化抑制効果も本研究で明らかとなった。

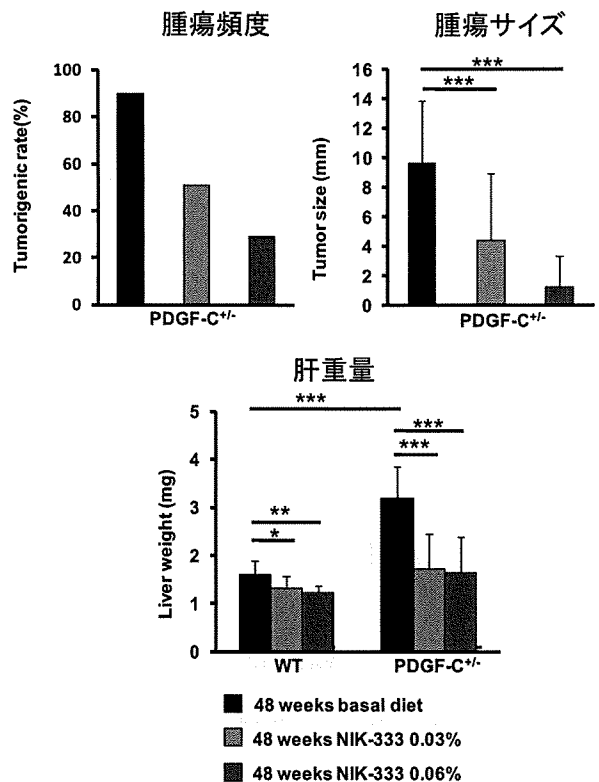


図9 NIK-333による腫瘍頻度、径、肝重量の改善

レチノイドそれ自身は強い抗がん作用を持ち合わせておらず、進行肝がんの治療には適応できない可能性がある。森脇（分担者）は非環式レチノイドとHER2抗体のTrastuzumabやHDAC阻害剤のバルプロ酸と併用することによって、より効果的な肝がん予防法を開発することを目的とした研究を行った。Trastuzumabは、RXR αをリン

酸化する受容体型チロシンキナーゼとMAPKの活性を阻害することで、またバルプロ酸は、ヒストン修飾を制御するとともに、Aktの活性化を阻害することでアポトーシスを誘導し、肝がん細胞の増殖を相乗的に抑制した。今後、非環式レチノイドとの併用療法の検討により、効果の高い肝発がん予防、抗がん作用が期待できると考えられる。

西口（分担者）は肝がんに対するIFNの抗腫瘍効果の機序を検討した。培養細胞の解析より、IFNは血管内皮細胞と肝がん細胞に対しても同様に増殖抑制効果とアポトーシスの誘導能を示した。ヒト肝がん細胞Hep3B移植SCIDマウスにおいてヒトIFNよりもマウスIFNの方が高い有効性を示した。したがってIFNの抗腫瘍効果の機序として、直接的な肝がん細胞の増殖抑制作用のみならず、血管新生抑制を含む間質への作用がより重要であることが示唆された。

ヒトホモログ Human Homologue of Maid (HHM)は肝臓特異的な遺伝子発現を制御し、ヒト肝前がん性病変との関連が示唆されている。坂井田（分担者）はゼブラフィッシュのMaidを単離し、その機能解析を行った。受精卵において発生が進むにつれMaidの発現が増加した。DEN曝露によるFociではMaidの発現が高く、肝がんの進行に伴いMaidの発現は低下した。MaidKOマウスでCC14投与によりcontrolに比べて肝線維化増強が認められた。以上よりMaidは線維化抑制と発がん初期に関わる分子と推測された。

山本（分担者）は肝がん患者の血清中の

フコシル化蛋白を含む糖鎖パターンの変化を解析した。GP73は、肝がん患者のみならず非がん患者でも少なからず検出され、ダイナミックレンジも小さいため、がんと非がんとの鑑別能は低かった。フコシレーテッドヘモペキシンは非がん患者に比べ肝がん患者では明らかに高値であった。しかし、腫瘍径との相関は認めなかった。今後、フコシル化ヘモペキシン産生細胞を同定する。

金子（分担者）は肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いることで肝がんを幹細胞タイプと肝細胞タイプに分類する方法を確立した。幹細胞タイプと肝細胞タイプでは発症年齢やWntシグナル活性の違い、肝切除後の予後など腫瘍としての特徴が大きく異なっていた。特にEpCAM陽性細胞はがん幹細胞の特徴を有しており、抗がん剤抵抗性を呈し高い浸潤能力を示したことから、肝がん治療における重要なターゲットと考えられた。EpCAM陽性がん細胞ではDNAダメージ応答遺伝子の一つであるnuclear dUTPaseが高発現していること、dUTPase陽性肝がんでは肝切除後に高率に再発することが明らかとなった（図10）。さらに、dUTPase阻害によりEpCAM陽性肝がんの5-FUに対する薬剤耐性が改善することを同定した。Nuclear dUTPaseはがん胎児性蛋白の一つである可能性が高く、その阻害薬の開発は正常肝細胞に影響を与えることなくがん幹細胞の抗がん剤耐性を改善する有力な標的分子になり得ると考えられた。

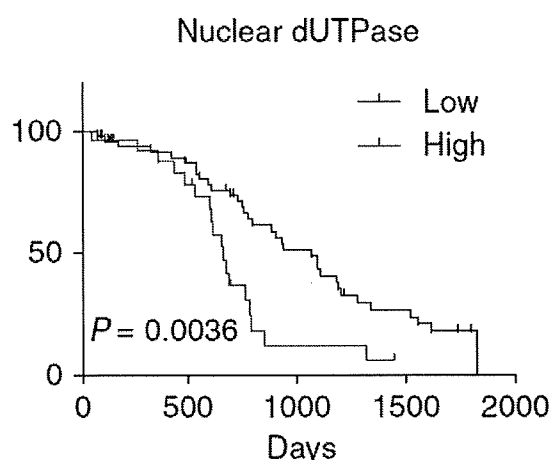


図 10 外科切除後の無再発生存曲線

汐田（分担者）は肝がん幹細胞に高発現する hTERT 遺伝子発現を制御する遺伝子を同定し、新規の肝がん治療法を開発するために、ランダムリボザイムライブラリーを作製した。ヒト肝がん細胞株 5 株における hTERT mRNA 発現は、HepG2 が最も高いことが明らかとなった。さらに、肝がん細胞株 5 株における hTERT タンパクの発現を免疫染色によって検出した結果、hTERT タンパクの発現は、Hep3B を除く 4 株において、mRNA 発現順位と相関していた。

池田（分担者）は血液中の循環がん細胞（circulating tumor cell: CTC）の有用性を肝がん症例に於いて検証した。対象は肝外転移を有する肝がん 15 例と Stage I, II の肝がん 11 例、肝がん非合併慢性肝疾患 6 例とした。転移 15 例中 CTC 陽性は 8 例（53.3%）、陰性は 7 例（46.7%）であった。対照群の 17 例では CTC が陽性となった症例はなかった。以上のことから肝がん症例での血液中循環がん細胞の測定は、進行肝がんの病態の把握、治療効果予測、予後予測に有用である可能性が示唆された。

廣石（分担者）は肝がん局所療法により完治できたと考えられた患者を対象に、治療前後で、MAGE-1 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原に対する肝がん患者の末梢 CD8 陽性細胞の IFN- $\gamma$  産生能を ELISpot 法で解析した。80%の症例でがん抗原特異的な ELISpot 陽性の免疫応答が認められた。多変量解析の結果、治療後のがん抗原に対する免疫応答が無再発期間と関連が認められた。ペプチドワクチン療法などにより肝がん特異的免疫を誘導することにより肝がん再発が防止できる可能性が示唆された。

林（分担者）は  $\alpha$ -galatosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を用いたがん免疫増強効果の可能性を検討した。 $\alpha$ -GalCer は肝先天免疫を活性化し、続いて獲得免疫も強く誘導する。 $\alpha$ -GalCer の投与により脾臓樹状細胞に比べ肝樹状細胞は抗原提示能及びサイトカイン産生能いずれも有意に増強し、 $\alpha$ -GalCer により活性化した肝樹状細胞を用いたペプチドワクチンの結果、肝樹状細胞は強力な獲得免疫の誘導が可能であることが明らかとなった。 $\alpha$ -GalCer は樹状細胞を介して肝先天免疫及び獲得免疫を効率よく活性化することが示された。

恩地（分担者）はがん免疫療法の臨床実施を目的として、前臨床試験として、腫瘍抗原を高発現させた肝がん細胞株を移植したマウスモデルにおいて抗原パルス樹状細胞投与し、抗腫瘍効果と腫瘍抗原特異的免疫応答を誘導した。またアフェレーシスを用いた末梢血単核球の大量採取と愛媛大学医学部附属病院細胞プロセッシングセンターにおいて樹状細胞の培養系、抗原パルス



樹状細胞の調整方法を確立した。肝がんに対する樹状細胞を用いた免疫療法の第 I/II 相の臨床試験を開始した。

中本（分担者）は肝がんの局所制御と併用して二次発がんを抑制する治療法として、肝動脈塞栓療法 (TAE) と同時に各種調整法により誘導した樹状細胞を投与する安全性臨床研究を行った。樹状細胞の誘導調整法に関して、1) 未熟群、2) ペプチド刺激群、3) 免疫賦活物質 OK-432 刺激群、の 3 群を比較した。未熟群、ペプチド群と比べて、OK-432 群では成熟度・活性化マーカーの発現が著明に亢進していた。安全性においては、OK-432 群で発熱が多くみられる傾向にあったが、その他の重篤な副反応、有害事象は認められず樹状細胞を安全に投与できることが示された。

上野（分担者）は肝硬変患者の免疫細胞機能を改善または抑制する作用を有するアミノ酸を同定しその作用・メカニズムの研究を行った。肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度に一致した GMP グレードの無血清培地を作成し、これに個々のアミノ酸を添加し、免疫細胞 (T-cell, B-cell, Monocyte, DC etc) の機能を解析した。20 種類のアミノ酸の中で L-cystine が単球からの TNF- $\alpha$  の産生増加効果を有していた。

ソラフェニブは進行肝がんに対する標準治療薬として汎用されているが、これまでの比較試験では、対象は Child-Pugh A の肝機能良好な患者に限られており、肝機能不良例での安全性や有効性は確立していない。古瀬（分担者）は、肝機能低下例を含めた進行肝がん患者を対象として、安全性と有

効性を検証する前向き第 II 相試験を開始した。

TS-1 は 5-FU の抗腫瘍活性を増強し、かつ副作用の軽減をはかった薬剤であり、大腸がん・肺がん・乳がんをはじめ様々ながん腫に対する適応を取得している。現在、肝がんに対して第 III 相試験が実施中である。横須賀（分担者）は TS-1 とソラフェニブと併用することで抗腫瘍効果が増強する可能性を踏まえ、TS-1 とソラフェニブ併用療法の至適投与量決定・安全性評価のための第 I 相試験を計画した。

工藤（分担者）は肝がんの分子生物学的特徴を明らかにし、診断法の開発および治療に有用な遺伝子を特定するため、ラフェニブを投与した 60 例を対象に、CGH 解析及び遺伝子発現プロファイル解析から、治療効果、予後予測モデルを構築する。

佐田（分担者）は CDDP とリピオドール懸濁液および 5-FU を用いた肝動注化学療法の門脈腫瘍塞栓を有する肝がん患者に対する治療効果を前向きに検討した。51 名の門脈腫瘍塞栓を有する肝がん患者を対象として抗腫瘍効果、累積生存率、無増悪期間、副作用を評価した。抗腫瘍効果に関しては 51 例中 10 例が complete response (CR), 34 例が partial response (PR) であった。全症例の平均生存期間は 33 カ月であった。多変量解析の結果予後に影響を及ぼす因子は治療効果であり、重篤な副作用は少なかった。以上より、CDDP とリピオドール懸濁液と 5-FU を用いた肝動注化学療法は門脈腫瘍塞栓を有する進行肝がんに対する有効な治療法になりえることが示

唆された。

#### D. 考察

2009年、肝がんの分子標的薬としてソラフェニブが日本でも保健収載され、一般臨床でも使用されるに至った。SHARP study 及び Asian-Pacific study では生存期間を2-3ヶ月延長させると報告された。我が国に於いてもその治療効果が期待されているが、一方、副作用の面からその安全性が懸念される情報がある。バイエルの市販後調査によれば、平成21年10月末までに、本剤投与後の肝不全が7例、肝性脳症（肝性昏睡，脳症，代謝性脳症含む）が28例、肝不全・肝性脳症の併発が1例（計36例）報告された。そのうち、肝不全6例、肝性脳症5例、肝不全・肝性脳症の併発1例（計12例）が死亡した。肝不全、肝性脳症は原疾患である肝がんの増悪においても認められ、必ずしも因果関係が明らかでは無いものの、本剤投与開始から、比較的早期に肝不全又は肝性脳症が発現した報告例があったことから、厚生労働省から注意喚起が行われた。副作用が懸念される一方、多数症例に使用した施設からソラフェニブが著効した症例や予後の改善が認められた症例も散見され、我が国における有効性、安全性の評価を行う必要性が急務となった。本班の全体研究の研究課題の一つとしてソラフェニブの有効性と安全性の評価を挙げ、本年度、各分担者より、64例臨床情報を得た。高血圧やHFSが高頻度で認められると同時に、肝機能障害（AST上昇や胆道系酵素の上昇を含む）が高頻度

に認められた。今後、症例の蓄積を行い、使用に際しての留意点を明確にすべき必要がある。またこのような副作用に見合った臨床効果が得られるか否か、治療効果につき適切な評価を加える必要がある。このような分子標的薬の副作用、治療効果をあらかじめ予測する分子マーカーの同定が今後必要である。また、分子標的薬の治療効果を如何に判定するかも一つの課題であり、腫瘍内の血流の変化や凝固因子、腫瘍マーカー（PIVKA-II）の奇異な変動を示す症例があり、それらの意義付けも重要である。

本班の全体研究のもう一つの研究課題としてソラフェニブと肝動注化学療法と比較試験を行う。ソラフェニブを代表とする分子標的薬剤と従来のあるいは、他の新しい抗がん剤を含めた化学療法との治療効果、安全性を比較することにより、進行肝がんの治療方針が明瞭になると考えられる。

本班の個別研究は、新規抗がん剤の薬効とがん分子生物学に根ざした新しい治療法に関する研究、がん免疫療法、新規抗がん剤を用いた臨床試験に大別される。本多（代表者）は、非環式レチノイドの線維化抑制作用、発がん抑制作用をPDGF-C-Tgを用いて検証した。ソラフェニブをはじめ他の分子標的薬もPDGFレセプターをターゲットにしている点を考えると、非環式レチノイドがそれら分子標的薬と共通した経路を抑制している可能性も示唆される。また、森脇（分担者）により非環式レチノイドと他の抗がん剤との併用療法も検討され、今後適応拡大も含め、効果が期待される薬剤と言える。西口（分担者）はIFNの抗腫瘍

効果としての血管新生抑制効果をマウスモデルにて検証した。近年、がんの間質と腫瘍細胞増殖との関連について多くの報告があり、IFN が間質系、すなわち血管や線維化に働いていることを示した興味深い検討である。がん関連分子として坂井田（分担者）は Maid について線維化、がん化との関連を検討した。Maid が、がん抑制分子として臨床上有用な働きをしていることが期待される。山本（分担者）は肝がん症例血清の糖鎖の検討を行い、今後の進展が期待できる。

がん幹細胞に関する研究として金子（分担者）は幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いて、肝がんの分類を行った。また肝がん幹細胞が化学療法耐性である分子機序を解明する手がかりとして、nuclear dUTPase が、がん幹細胞で発現が高いことを見出し、5-FU 耐性と関連している可能性を示唆した。今後 nuclear dUTPase の発現制御、幹細胞維持機構との関連、nuclear UTPase の発現制御によるがん幹細胞を標的とした治療研究が注目される。汐田（分担者）は肝がん幹細胞で高発現する hTERT の発現制御に関わる遺伝子を同定するため、リボザイムライブラリーの作成を行っている。今後の遺伝子クローニングに期待が持たれる。

池田（分担者）は血液循環腫瘍細胞の同定を行い、肝がんの転移症例で高い特異性を示した。多数症例での検討、治療後の変化、予後予測との関連が明確になれば臨床での有用性が期待できる。

がん免疫療法分野に関しては、廣石（分

担者）は、肝がん治療後のがん抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の存在と予後との関連性を報告し、免疫療法の有用性を示唆した。林

（分担者）は  $\alpha$ -GalCer を用いて、がん免疫療法を増強する基礎的実験に成功し、 $\alpha$ -GalCer と自然免疫、後天免疫の誘導を樹状細胞機能の観点からも明らかにした。中本（分担者）、恩地（分担者）は樹状細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験を推進しており、樹状細胞の調整法、抗原刺激法など治療効果を上げる技術革新に期待が持たれる。上野（分担者）も樹状細胞の培養条件の一つとして、アミノ酸組成に注目し、免疫担当細胞のシグナル伝達、及び腫瘍細胞のシグナル伝達を制御する物質として、アミノ酸を含めた肝栄養関連物質が重要な役割を演じているとが示唆された。

新規抗がん剤を用いた臨床試験に関して古瀬（分担者）は肝機能低下群に対してのソラフェニブの有効性、安全性に関わる臨床試験を開始した。横須賀（分担者）は TS-1 とソラフェニブの併用療法、工藤（分担者）はソラフェニブと low dose FP 療法との安全性、有効性の検討、佐田（分担者）はシスプラチン（CDDP）とリピオドール懸濁液および 5-FU を用いた肝動注化学療法の臨床試験を開始した。今後の進展が期待できる。

## E. 結論

- 1) ソラフェニブを中心とした新規抗がん剤の治療効果ならびに安全性調査を開始した。ソラフェニブ投与により高血圧(27%)、Hand - Foot

- Syndrome (HFS) (9%)、及び肝機能障害(30%)が認められたが、より詳細な解析と治療効果判定には症例の蓄積と十分な観察機関を要する。

- 2) PDGF-C-Tg を用いて非環式レチノイドの肝線維化抑制作用、肝発がん抑制作用が示された。また非環式レチノイドと他の薬剤の併用療法の可能性が示唆された。
- 3) IFN による血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現の基礎的検討がなされた。
- 4) 肝転写因子の一つである Maid はがん抑制因子、線維化抑制因子として働く可能性が示唆された。
- 5) 肝がん幹細胞の抗がん剤抵抗性の機序の一つとして nuclear dUTPase が重要な働きをしている可能性が示唆された。
- 6) 循環がん細胞 (circulating tumor cell: CTC) の同定は肝がんの転移症例でも特異性が高く有用であることが示唆された。
- 7) 肝がん局所療法後の腫瘍抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の存在は治療予後と関連することが示された。
- 8)  $\alpha$ -GalCer を用いたがん免疫療法の効果増強作用がマウスモデルで示された。
- 9) 樹状細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験が開始され、免疫学的効果及び安全性の評価がなされた。
- 10) 各種新規抗がん剤を用いた安全性、

治療効果比較のための臨床試験が開始された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

特になし