

II. 分担研究報告

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）
分担研究報告書

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 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：我が国における肝細胞がんの多くはB型もしくはC型肝炎ウイルス感染を背景に発症し、早期発見を行いかつ初回治療で根治的な治療が施されても経過で再発を繰り返し死に至る悪性度の高いがんである。近年正常組織と同様にがん組織においても幹細胞性を有する一部のがん細胞（がん幹細胞）が同定され、高い腫瘍増生能、抗がん剤抵抗性などがんの維持に必須な細胞集団であることが明らかにされつつある。しかしながら、なぜ幹細胞性を有するがん細胞が抗がん剤抵抗性を示すのか、その機序に関しては未だ不明の点が多い。これまで我々は肝幹細胞マーカーであるEpCAM陽性肝がん細胞が、がん幹細胞の特徴を有し抗がん剤抵抗性である事を同定した。本研究で我々は、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、正常胎児肝芽細胞でも同様に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、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と考えられた。

A. 研究目的

肝細胞がんは世界第三のがん死亡原因であるにも関わらず、予後や薬物治療効果予測に基づいた分子診断はいまだ確立されていない。近年、一部の血液がんや固形がんにおいて幹細胞様の特徴を示す細胞群（がん幹細胞）の存在が明らかになり、がんの維持、転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。肝細胞癌においてもいくつかの幹細胞マーカーを用いたがん幹細胞の分離が行われ、

免疫不全マウスを用いた検討で強い腫瘍増生能力と自己複製能力、非対称性分裂能力を有していることが報告されている。興味深いことに、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。その抗がん剤抵抗性のメカニズムとしては、DNAダメージ修復や細胞周期制御、抗アポトーシスシグナルとの関連が挙げられているが、詳細については今後さらなる検討が必要である。

最近我々は肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いることで肝細胞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、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ることを見出した。特に EpCAM 陽性細胞は幹細胞タイプの肝細胞がんにおいて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すことから、肝細胞がん治療における重要なターゲットと考えられ、EpCAM 陽性細胞を標的とした治療法の開発を現在進めている。一方包括的遺伝子発現解析の検討から、最近我々は DNA ダメージ応答遺伝子の一つである nuclear dUTPase が高発現している肝細胞がんでは外科切除後の再発率が有意に高く、高悪性度のがんであることを見出した。

本研究において我々は、EpCAM 陽性肝細胞がんにおいて 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った。

B. 研究方法

サンプル 臨床サンプルとして、金沢大学付属病院で 1997 年から 2006 年にかけて肝切除が行われた 82 例の肝細胞がんおよび背景肝組織を解析に用いた。培養細胞は HuH7 細胞を用い、DMEM-10%FBS 培地で培養した。また、胎児肝組織については 12 週齢のヒト胎児肝組織を含む組織アレイ (BioChain Institute, Inc., Hayward, CA) を用いて評価を行った。

免疫組織化学 ホルマリン固定標本を用いて dUTPase と EpCAM の発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット (DAKO, Carpinteria, CA)、抗 DUT 抗体 (Abnova, Taipei, Taiwan)、抗 EpCAM 抗体 VU1D9 (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) で免疫染色を施行した。また、Vector-red, Vector blue (Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA) を用いて 2 重染色を行った。

細胞増殖、浸潤、コロニー形成解析 細胞増殖は MTS 試薬 (Promega, Madison, WI) を用いて解析した。細胞遊走、浸潤能については BD BioCoat™ Matrigel Matrix (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて解析を行った。コロニー形成能については 0.36% の軟寒天培地を用いて評価を行った。

(倫理面の配慮)

サンプルを提供する患者には、研究内容の説明及び研究協力への依頼につき説明文書を用いて説明し (① 遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、② 研究の目的・方法、③ 研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、④ 同意撤回及びサンプルの廃棄、⑤ プライバシーの保護及び機密保持、⑥ 経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、

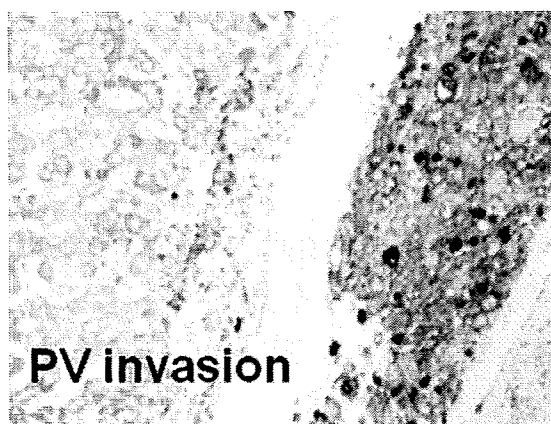
金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻恒常性制御学講座にて個人情報分担管理者の管理の下保存、データは研究室に設置した専用コンピューターにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

C. 研究結果

組織アレイにより胎児肝組織と成人肝組織における EpCAM と dUTPase の発現につき免疫組織化学を用いて比較検討したところ、EpCAM、dUTPase とともに成人肝組織では胆管細胞のみに発現が認められ、肝細胞では発現が認められなかったが、胎児肝においてはほとんどの肝芽細胞が EpCAM 陽性かつ nuclear dUTPase 陽性であった。

同様に 107 例の肝細胞がん組織における EpCAM と dUTPase の発現につき免疫組織化学で検討したところ、38 例が EpCAM 陽性、39 例が nuclear dUTPase 陽性の肝細胞がんであった。EpCAM と dUTPase の発現には統計的に有意な正の相関が認められ ($P = 0.012$)、かつ 2 重染色では門脈腫瘍浸潤が認められる部位で両者の強発現が認められた (図 1)。

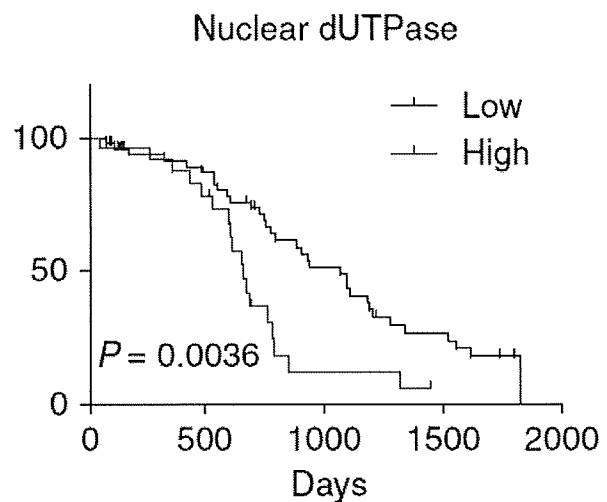
図 1 門脈腫瘍塞栓部位の免疫組織化学



グレイ : EpCAM、黒 : dUTPase

興味深いことに、nuclear dUTPase が肝細胞がん細胞の 50%以上で発現している場合には、統計的に有意に外科切除後の再発が高頻度に認められた (図 2、Takatori H. et al Liver International 2010 から引用)。

図 2 外科切除後の無再発生存曲線

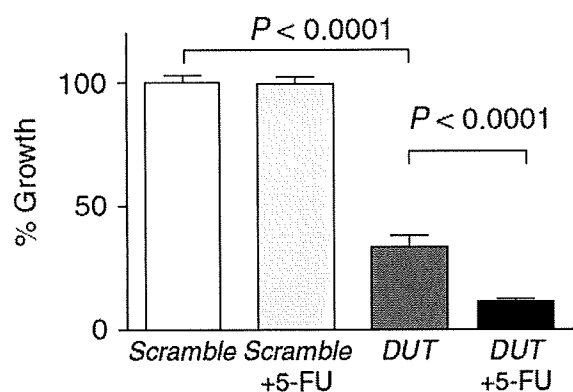


さらに幹細胞タイプの肝細胞がん培養細胞である HuH7 を EpCAM 陽性分画と陰性分画に分離し、dUTPase の発現を検討したところ、nuclear dUTPase は EpCAM 陽性細胞でのみ発現が認められた。以上の結果から、nuclear dUTPase は EpCAM 陽性肝がんにおけるがん幹細胞で強く発現が認められること、nuclear dUTPase 陽性肝がんは悪性度が高く予後が不良であることが示唆された。

次に dUTPase をターゲットにした治療法の有用性を評価するために、dUTPase を特異的に抑制する siRNA を用いて HuH7 細胞で検討を行った。dUTPase の遺伝子発現を約 25%程度に抑制することで、HuH7 の増殖、浸潤、コロニー形成能力は著しく障害

された。更に興味深いことに、dUTPase の発現抑制により、HuH7 細胞は殺細胞効果が認められない程度の低濃度の抗がん剤 (5-FU) に対し感受性を示すことが明らかになった (図 3、Takatori H. et al Liver International 2010 から引用)。

図 3 MTS アッセイを用いた細胞増殖試験



D. 考察

正常幹細胞が正常臓器の維持に重要な役割を果たしているのと同様に、がん幹細胞はがん組織の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。実際に EpCAM 陽性肝細胞がんにおいて EpCAM 陽性細胞は陰性細胞へと分化し、かつ陰性細胞の維持に必須であることをこれまでに我々は報告してきた。一方 EpCAM 陽性細胞が 5-FU などの殺細胞性の抗がん剤に対して抵抗性を示すことも我々は明らかにしてきた。このような抗がん剤抵抗性を呈するがん幹細胞に対して、どのような治療ストラテジーを構築していくか、現在活発に議論されている。

dUTPase は UTP を UMP へと脱リン酸化することで、UTP プールを一定のレベルに保ち、ウラシルの DNA への組み込みを抑えることで DNA ダメージを抑制していると考え

られている。一方 5-FU はチミンの合成を抑制するとともに、ウラシルの DNA への組み込みを起こすことで遺伝子変異を誘導し、DNA 障害を起こすと考えられている。本研究において、我々は dUTPase の活性化ががん幹細胞で認められ、かつ dUTPase の発現抑制を行うことで 5-FU に対する耐性が改善することを同定した。Nuclear dUTPase の発現は胎児肝における肝芽細胞でも認められ、正常肝細胞では認められないものの肝細胞がんでは再び活性化することから、AFP などと同様がん胎児性蛋白のひとつである可能性が考えられる。幹細胞性を制御するシグナル伝達系が Nuclear dUTPase の発現調節を行っている可能性が高いが、その転写調節メカニズムは未だ不明な点が多く、今後のさらなる検討が必要である。一方、dUTPase 活性を阻害する薬剤の開発はがん幹細胞に対して特異的に作用し、5-FU を含めた抗がん剤感受性を亢進させると考えられ、薬剤スクリーニングシステムの開発も含め、今後がん幹細胞に対する治療法開発において重要な課題となると考えられた。

E. 結論

Nuclear dUTPase は幹細胞タイプの肝細胞がんにおける EpCAM 陽性がん幹細胞で強発現が認められ、5-FU に対する抵抗性に関わっている可能性が考えられた。

dUTPase 阻害薬の開発は、がん幹細胞における抗がん剤抵抗性を克服する新規治療法の発展につながると考えられ、今後のさらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi E, Takamura T, Sakurai M, Mizukoshi E, Zen Y, Takeshita Y, Kurita S, Arai K, Yamashita T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S. Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients: tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis. *Diabetes Care*. 2010;33(2):284-6.
- 2) Takatori H, Yamashita T, et al., dUTP pyrophosphatase expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2010; 30(3): 438-46.
- 3) Yamashita T, et al., EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009; 136(3):1012-24.
- 4) Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*. 2009;284(22):14809-18.
- 5) Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Nakamura S, Kumazaki M, Kurita S, Misu H, Togawa N, Fukushima T, Fujimura A, Kaneko S. The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380(3):684-8.

2. 学会発表

- 1) EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor initiating cells with stem/progenitor cell features. AACR 2009 Annual Meeting, Minisymposium, Cancer and Stem Cell Biology
- 2) ゲノミクスからみた肝細胞癌の幹細胞性とその診断、治療への応用、犬山シンポジウム、2009年
- 3) EpCAMを用いた肝細胞癌分類の確立、肝癌幹細胞の同定とその治療への応用、日本肝臓学会総会、ワークショップ 2009年

G. 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

樹状細胞を用いた肝がんの治療研究

中本 安成 金沢大学附属病院消化器内科 講師

研究要旨：肝細胞がん（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。肝がん合併C型肝硬変症例に対して、TAEの際に投与する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、有害事象は認めなかった。本研究の結果より、肝がんに対するTAEと併用して、ペプチドまたはOK-432によって調整された樹状細胞を安全に投与できることが示された。

A. 研究目的

肝細胞がん（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、我々は樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法の開発を進めてきた。これまでに肝動脈塞栓療法（TAE）と同時に樹状細胞を投与する手法が安全に施行できることを報告した。樹状細胞は末梢血単球から誘導して治療に用いるために、誘導調整法の違いが抗腫瘍免疫の賦活に深く関わってくる。そこで、調整法の異なる樹状細胞を用いた際の安全性臨床研究を行うとともに抗腫瘍免疫の反応性に関して検討した。

B. 研究方法

肝がん合併C型肝硬変症例に対するTAE

Eの際に経カテーテル的に投与する樹状細胞の誘導調整法に関して以下の3群を比較した。1）未熟群（n=10）：末梢血単球からGMPグレードのGM-CSF、IL-4刺激のみで培養した未熟樹状細胞を用いた。2）ペプチド群（n=6）：未熟樹状細胞に対して腫瘍抗原ペプチド（SART-3）を添加、培養した。3）OK-432群（n=12）：未熟細胞に免疫賦活物質OK-432刺激を用いて誘導した。得られた樹状細胞の活性化、成熟度の変化をフローサイトメトリーにて検討した。安全性臨床研究として、それぞれ 5×10^6 個の樹状細胞を投与した際の副反応、有害事象を比較した。各種腫瘍抗原エピトープに対する細胞性免疫（CTL）反応はELISPOT法を用いて定量した。

(倫理面への配慮)

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」及び各法令に従うとともに、実施機関である「金沢大学医学倫理委員会」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

未熟群と比べて、ペプチド群における樹状細胞の表面マーカーに変化を認めなかった。これに対して、OK-432 群では成熟度・活性化マーカーCD83 の発現が 100 倍以上に亢進していた。FITC-dextran を用いた樹状細胞の貪食能は成熟化とともに低下した。樹状細胞投与に関する臨床的安全性について、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、有害事象は認めなかった。樹状細胞投与 2-4 週後における AFP 抗原エпитープに対する CTL 反応は、OK-432 群で高率に誘導される傾向があった。

D. 考察

悪性腫瘍に対する免疫治療の開発において、最も強力な抗原提示能をもつ免疫細胞である樹状細胞を用いる手法が試みられてきた。しかし、広く臨床効果を示す治療法としては確立されていない。そこで、本研究では樹状細胞の特性を活用した治療法の開発を進めた。

樹状細胞は、がん細胞を含めた標的細胞

のアポトーシス（細胞死）を認識すると、活性化してその標的に対する強い免疫反応を誘導することが知られている。本研究においては、TAE によって細胞死に陥った肝がん組織に樹状細胞を直接投与した。これより、標的であるがん細胞に対する抗腫瘍免疫反応を誘導する最適の微小環境を構築した。

治療に用いる樹状細胞の調整法に関しては、GMP グレードで利用できる多くの技術開発が進められており、本研究では代表的な方法としてペプチド刺激と免疫賦活物質 OK-432 を用いた。調整法による細胞成熟度の違いによって、がん抗原の認識から T リンパ球への提示に至るステップ、免疫反応の誘導に重要なサイトカイン産生が様々に変化する。そして、それぞれの方法に関する細胞の機能的評価を検証した上で、安全性の確認を慎重に行う必要があると考えられる。今後は、安全性に加えてがんに対する免疫誘導能が高く臨床的制御効果を示す手法の開発が期待される。

E. 結論

肝がん合併 C 型肝硬変症例に対する TAE と併用して、ペプチドまたは OK-432 によって調整された樹状細胞が安全に投与できることが示された。さらに、樹状細胞の誘導調整法を工夫することによって、肝がんに対する抗腫瘍免疫反応が亢進し二次発がん制御に寄与できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer 2009 (in press).

2) Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. Oncogene 2009 (in press).

3) Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. J. Immunol. 183: 3053-3063, 2009.

2. 学会発表

1) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #1725; Immunological factors associated with prolonged recurrence-free survival following transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; 第 60 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 50 (4, Suppl.) 1103A; 一般; poster: Nov. 3, 2009.

2) Kitahara M, Nakamoto Y, Mizukoshi E,

Kaneko S: #1236; Effective antitumor immune responses of OK432-stimulated monocyte-derived dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma.; 第 60 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 50 (4, Suppl.) 878A; 一般; poster: Nov. 1, 2009.

G. 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

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）
分担研究報告書

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 愛媛大学大学院先端病態制御内科 教授

研究要旨：当科では、肝細胞癌に対する免疫療法として樹状細胞の腫瘍局所内投与を行ってきたが、その臨床効果は十分とはいえなかった。昨年度より愛媛大学医学部附属病院にGMPレベルの細胞プロセッシングセンターが設立されたことをうけ、当大学の倫理委員会の承認後、新たな臨床試験を開始した。本研究では、アフエレーシスを用いた末梢血単核球の大量採取や肝細胞癌に高頻度に発現する数種類の腫瘍抗原タンパクを樹状細胞にパルスして投与することなど新たな試みを行っている。

A. 研究目的

当科では、肝細胞癌(HCC)では樹状細胞(DC)の機能低下がみられることや肝細胞癌組織内には成熟DCがみられないことを報告してきた。また、免疫療法としてPEITを併用したDCの腫瘍局所内投与を行ってきたが、その臨床効果は十分とはいえなかった。

愛媛大学医学部附属病院にGMPレベルの細胞プロセッシングセンターが設立されたことをうけ、新たな臨床試験を開始することを目的とした。

B. 研究方法

HCC 癌部に高発現する3種類の腫瘍抗原タンパク(GMPレベル)の供与を受けた(韓国 Creagene 社との共同研究)。前臨床試験として、マウスモデルにおける解析を行った後、ヒトでの臨床応用に向けて、アフエレーシスを用いた末梢血単核球の採

取方法と腫瘍抗原パルス DC の培養方法を確立する。

C. 研究結果

- 1) 前臨床試験：腫瘍抗原を高発現させた肝癌細胞株を移植したマウスモデルでは、抗原パルス DC 投与により抗腫瘍効果と腫瘍抗原特異的免疫応答の誘導がみられた。
- 2) 抗原パルス樹状細胞の調整：アフエ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 DC の培養系、抗原パルス DC の調整方法を確立した。
- 3) 愛媛大学医学部附属病院倫理委員会の承認(愛大医病倫 0809003 号)を受け、第 I/II 相の臨床試験を開始した。

D. 考察

HCC に対する治療としては、肝切除術、

TACE、PEIT、RFA などが行われてきており、腫瘍局所のコントロールは良好な結果が得られるようになった。しかし、その予後は依然として良好とはいえず、ほとんどの症例で再発が重要な予後因子となっている。再発肝癌は既存の治療法でコントロールすることは困難であり、それを補完するような他の治療法が望まれている。このような視点から癌免疫療法に期待が高まっている。しかし、現在までに、国内外でHCCに対するDCを用いた免疫療法が行われているが、その効果は十分とはいえない。

本研究では、腫瘍抗原特異的な免疫活性を効率よく誘導するため、腫瘍抗原をパルスしたDCを用いた免疫療法の安全性を中心に、臨床効果についても検討することとしている。将来的には、早期HCC治療後の再発予防を目指したい。

E. 結論

肝細胞癌に対する樹状細胞を用いた免疫療法の臨床試験を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirooka M, et al. Virtual puncture line in radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma of the caudate lobe. AJR Am J Roentgenol 2009; 193: W149-151.
- 2) Uehara T, et al. Usefulness of the hyperechoic rim for assessing the therapeutic efficacy of radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma patients. Hepatol Res 2009; 39: 954-962.

- 3) Hirooka M, et al. Efficacy of laparoscopic radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma compared to percutaneous radiofrequency ablation with artificial ascites. Dig Endosc 2009; 21: 82-86.

2. 学会発表

なし

G. 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

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）
分担研究報告書

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 鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子医療学 教授

研究要旨：肝癌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、新規の肝癌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。さらにスクリーニングを行うためのヒト肝癌細胞を選択するため、hTERT遺伝子発現量を検討した。

A. 研究目的

肝癌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、新規の肝癌治療法を開発する。

B. 研究方法

ヒト肝癌細胞株を用いて、ランダムリボザイムライブラリーによるスクリーニングを行い、上記遺伝子を同定する。そのため、各種ヒト肝癌細胞株で hTERT 遺伝子発現量を検討し、スクリーニングに用いる細胞を決定する。

C. 研究結果

1. スクリーニングのための、ランダムリボザイムライブラリーを作製した。
2. スクリーニングに用いるヒト肝癌細胞株を選択するため、ヒト肝癌細胞株 5 株における hTERT mRNA 発現について Real time-RT-PCR 法を用いて検討した。その結

果、HepG2 の mRNA 発現量が最も高いことが明らかとなった。さらに、肝癌細胞株 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。

D. 考察

ヒト肝癌細胞では、その細胞株ごとに hTERT 遺伝子発現量が異なる。hTERT 遺伝子を制御する遺伝子をスクリーニングする際には、hTERT 遺伝子を正に制御する遺伝子と負に制御する遺伝子の両者の同定は、細胞株を変えることで可能であると推測される。

E. 結論

スクリーニングに使用するランダムリボザイムライブラリーを作製した。肝癌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するため、ランダムリボザ

イムライブラリーを用いるための各種肝癌細胞での hTERT 発現量を検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

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 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科 教授

研究要旨：肝細胞癌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．本研究では，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．

A. 研究目的

本邦でも切除不能肝細胞癌に対してソラフェニブが認可されたが，単剤での有効性は限定的であり，治療効果の改善が望まれている．一方，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，大腸癌・肺癌・乳癌をはじめ様々な癌腫に対する適応を取得している．現在，肝細胞癌に対して第III相試験が実施中である．肝細胞癌に対しても，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がある．我々は，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．

B. 研究方法

進行肝細胞癌患者に対する TS-1+ソラフェニブ併用療法の用量制限毒性の発現率を調べ，その最大耐用量および推奨用量を決定する．有効性は RECSIT，安全性は CTCAE ver. 3.0 を用いる（介入試験，非盲検，非対照，単一治療群，安全性・有効性，第 I

相試験，Dose escalation study）．

（倫理面への配慮）

併用による安全性は確立しておらず，有害事象の発生には十分注意して試験を進める．

C. 研究結果

本報告書作成段階で2名の被験者に対して試験実施中である．現在まで重篤な有害事象は発生していない．

D. 考察

本邦でも切除不能肝細胞癌に対してソラフェニブが承認を取得したが効果は限定的である．より有効で安全な治療法開発が望まれている．

E. 結論

本邦でも切除不能肝細胞癌に対してソラフェニブが承認を取得したが効果は限定的である．より有効で安全な治療法開発が望まれている．

F. 研究発表

なし

1. 論文発表

3. その他

該当なし

特になし

2. 学会発表

- 1) 小笠原定久，金井文彦，鳥谷部武志，
篠崎勇介，大岡美彦，岡部真一郎，吉川
正治，横須賀收．当科にてソラフェニブ
により肝機能障害を認めた3例．第1回
日本肝がん分子標的治療研究会，2010，
神戸．（第1回日本肝がん分子標的治療
研究会抄録集 p76）
- 2) 小笠原定久，金井文彦，佐藤新平，小
尾俊太郎，山口武人，畔元亮作，水本英
明，森本直樹，平田信人，鳥谷部武志，
篠崎勇介，大岡美彦，三方林太郎，岡部
真一郎，吉川正治，横須賀收．進行肝細
胞癌におけるソラフェニブに関する多施
設調査研究．第1回日本肝がん分子標的
治療研究会，2010，神戸．（第1回日本
肝がん分子標的治療研究会抄録集
p77）
- 3) 大岡美彦，金井文彦，小笠原定久，鳥
谷部武志，篠崎勇介，多田基久，千葉哲
博，岡部真一郎，吉川正治，横須賀收．
進行肝細胞癌を対象としたTS-1+ソラフ
ェニブ併用療法の第I相試験．第1回日
本肝がん分子標的治療研究会，2010，神
戸．（第1回日本肝がん分子標的治療研
究会抄録集 p81）

G. 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

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）
分担研究報告書

肝発癌と線維化の接点に関与するMaidシグナルの研究

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

研究要旨：我々は転写制御分子であるMaidがヒト肝前癌性病変のマーカーになることを明らかにしてきた。今回我々はMaid分子の肝臓病態における役割を検討するため ZebrafishとMaid KO miceを用いて解析を行った。Zebrafishの系においてもMaidの発現は肝臓で最も高く、発生が進むにつれ増加し、肝部分切除後の肝再生時においても発現を強く認めた。Maidの発現はfociに強く、肝細胞癌の進行に伴い低下するため、Maidは肝発癌を制御していると考えられた。MaidKOマウスで CC14投与による肝線維化誘導時、肝線維化の増強が認められることより、Maidは肝線維化抑制に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

我々はMaidのヒトホモログ Human Homologue of Maid (HHM)のクローニングし、HHMが肝臓特異的な遺伝子発現を制御し、ヒト肝前癌性病変のマーカーになりうることを報告してきた。最近Maid KOマウスで肝臓特異的に発癌が見られることから、癌抑制遺伝子として機能が注目されている。我々はゼブラフィッシュを用いて、ゼブラフィッシュのMaidを単離し、その機能解析を行った。またMaid KO マウスを使用し、CC14持続投与による肝線維化モデルを作成し、Maidの肝線維化における意義を検討した。

B. 研究方法

ゼブラフィッシュに対して 100 p. p. m.

の DEN(diethylnitrosamine)を含む水で 3～8 週間飼育した後に薬剤を含まない水で 2～6 ヶ月飼育したのち肝臓を採取し、肝発癌について評価した。また部分肝切除を行い肝再性の評価をした。作成した Maid KO mice に四塩化炭素 (CC14) 0.5 ml/kg 週二回腹腔内投与を 8 週間行い、CC14 による肝障害・肝線維化モデルを作成し、Normal mice での CC14 による肝障害・肝線維化モデルとの肝線維化等を比較検討した。

C. 研究結果

卵巣より作製した cDNA より Maid cDNA をクローニングし、抗体を作製し各臓器における発現を調べたところ、受精卵において発生が進むにつれ Maid の発現が増加し

た。部分肝切除後の mRNA の変化では発現の増加を認めた。DEN 曝露により肝腫瘍を誘導したところ、DEN 曝露期間が 3 週間では 4.3%の個体に腫瘍を認め、8 週間では腫瘍が 50%の個体に見られた。Foci や tumor における Maid の発現を免疫組織染色で検討したところ、Foci では Maid の発現が高く、肝細胞癌の進行に伴い 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 Azan, Sirius Red 染色により肝線維化増強が認められ、 α SMA の発現も増加していた。

D. 考察

Maid は肝が再生する際に発現が誘導され、Foci 部に一致していることより、その発現増加は肝発がん初期に誘導されると考えられる。一方で CC14 投与により誘導される肝線維化は Maid KO マウスで誘導されることより、Maid は肝線維化、肝発がんにおいて重要な役割を果たすシグナルと考えられた。

E. 結論

Maid は細胞の分化、増殖と肝線維化に密接に関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Terai S. Fish model leads to new findings in liver disease. *Hepatology Research*. 2010. in press.

2. 学会発表

1) 寺井崇二 藤澤浩一 坂井田功. 肝発癌予

防における Maid シグナルの重要性について. 第 95 回日本消化器病学会 2009.5

2) 寺井崇二 山本直樹 坂井田功. 硬変肝における HHM(Maid)による TGF-beta シグナルの抑制の可能性について. 第 13 回日本肝臓学会大会 2009.10

3) K Fujisawa, S Terai, I Sakaida. Expression of Zebrafish homologue of Maid (ZHM) in liver tumors induced DEN. 第 60 回 Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Disease (USA) Boston 2009.11

G. 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

肝癌に対する癌免疫誘導機構の解析

林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨： α -galactosylceramide (α -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。 α -GalCerの投与により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、 α -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。以上の結果は α -GalCerは肝先天免疫及び獲得免疫を樹状細胞を介して効率よく活性化することを示し、 α -GalCerによる癌免疫治療法の可能性を示唆するものであった。また我々は既報にてInterleukin-12 (IL-12)による癌免疫治療の有用性を報告しているが、本年度はマウス大腸癌肝転移モデル及びIFN- γ ノックアウトマウスを用いてIL-12による抗腫瘍効果にはNK細胞由来のIFN- γ が、抗腫瘍免疫誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

A. 研究目的

肝臓内を構成しているリンパ球は、他臓器に比較してNKT細胞やNK細胞といった先天免疫細胞の比率が高く、これら先天免疫細胞を活性化することで、肝内微小肝癌の転移を抑制することが期待される。 α -galactosylceramide (α -GalCer)の生体への投与は、樹状細胞に取り込まれNKT細胞の活性化し、引き続いてNK細胞の活性化がおこり先天免疫が活性化されるが、獲得免疫の誘導に関して詳細は不明である。より強力な先天免疫の活性化とそれに続く獲得免疫の誘導を目指して、本研究では α -GalCerによる肝癌治療後の獲得免疫メカニズムを検討した。我々はこれまで

Interleukin-12 (IL-12)による癌免疫治療について報告してきた。IL-12は抗腫瘍免疫に関わる重要なサイトカインとして知られている。IFN γ はIL-12刺激によりT細胞、NK細胞、NKT細胞などから産生される抗腫瘍免疫の中核的サイトカインである。しかし、それぞれのサブセットから産生されるIFN γ 、特にNK細胞より産生されるIFN γ の抗腫瘍免疫における重要性はまだ明らかではない。本研究では、IFN γ ノックアウト (GKO) マウスを使用することによりIL-12による肝臓NK細胞の活性化および抗腫瘍効果におけるNK細胞の産生するIFN γ の関与を検討した。

B. 研究方法

BALB/c マウスにおいて p53 抗原を発現する CMS4 細胞による肝腫瘍あるいは脾腫瘍を作成した。α-GalCer にてこれらの腫瘍の治療後 14 日目に単離した脾臓の CD8 陽性 T 細胞を用いて、p53 抗原由来ペプチド特異的 CTL の誘導を IFN γ ELISPOT 法にて検討した。また肝・脾腫瘍治療後 14 日目に CMS4 細胞を右背部の皮下に再移植し、その腫瘍径を経時的に測定することで、CMS4 腫瘍特異的獲得免疫の誘導を評価した。次に α-GalCer あるいはコントロールとして Vehicle 投与後に肝臓および脾臓から DC を単離し、フローサイトメトリーによる表面抗原分子の発現、ELISA 法によるサイトカイン産生能、混合リンパ球反応 (MLR) による DC の抗原提示能を評価した。さらに α-GalCer 投与後単離した肝あるいは脾 DC と p53 ペプチドを用いた p53 ペプチド-DC ワクチンを行うことで、α-GalCer 刺激後の肝および脾 DC の p53 特異的 CTL の誘導能を IFN γ ELISPOT 法にて評価した。一方 IL-12 癌治療における NK 細胞由来 IFN- γ の意義に関する実験では、6~10 週齢の野生型マウス、IFN γ ノックアウト (GKO) マウス、Rag2 ノックアウトマウスの雌を使用した。遺伝子導入には IL-12 発現プラスミドを hydrodynamic-based transfection により尾静脈より急速静注した。プラスミド投与 4 日後に肝臓リンパ球を抽出し、YAC-1 をターゲットとした ⁵¹Cr release assay を施行した。プラスミド投与 2 日前にマウス大腸癌細胞 CT26 を脾注し、マウス肝転移モデルを作製し、2

週間後に抗腫瘍効果を検討した。

C. 研究結果

α-GalCer による治療の結果、CMS4 肝腫瘍治療後の方が CMS4 脾腫瘍治療後に比して、より強い p53 特異的 CTL が誘導された。CMS4 皮下腫瘍再移植実験においても、CMS4 肝腫瘍治療後の方が CMS4 脾腫瘍治療後に比して、皮下腫瘍の増大が抑制される傾向にあった。α-GalCer 投与により肝 DC 数は有意に増加し、特に CD11b(+)CD8(-) である CD8(-) conventional DC の増加を認めた。一方脾 DC では有意な変化は認められなかった。抗原提示関連分子の発現は肝 DC 及び脾 DC いずれも α-GalCer 投与により有意に増加し、両者に有意な差は認められなかった。肝 DC では IL-12、TNF α などの Th1 系サイトカインの著明な産生を認めしたが、脾 DC ではこれらの産生は低かった。MLR においても α-GalCer 投与後の肝 DC の方が脾 DC に比して抗原提示能が高かった。また p53 ペプチド-DC ワクチンの結果、肝 DC は脾 DC に比して有意に高い抗原特異的な CTL 誘導能を示した。一方 IL-12 癌治療における NK 細胞由来 IFN- γ の意義に関する実験では、IL-12 の hydrodynamic-based transfection により投与翌日を最高に血清中に IL-12 産生を認め、それに伴い投与 3 日後を最高に血清中に IFN γ の産生を認めた。野生型マウスの肝臓リンパ球では IL-12 発現プラスミド投与後の YAC-1 に対する細胞傷害活性を認め、肝転移も完全に抑制された。しかし、GKO マウスではいずれの作用も抑制された。FACS の解析では

肝臓における IFN γ の主要な産生細胞は NK 細胞であった。Western blotting の解析では rIL-12 刺激下において野生型マウス由来の脾細胞では STAT1 のリン酸化を認めるのに対し、GKO マウス由来の脾細胞では STAT1 のリン酸化は認めなかった。DX5 陽性細胞と陰性細胞の比較では DX5 陰性細胞に比し DX5 陽性細胞で STAT4 及びリン酸化 STAT4 は強発現していた。Rag2 ノックアウトマウスでは YAC-1 に対する細胞障害活性、抗腫瘍効果いずれも保たれており、NK 細胞のみで十分な抗腫瘍効果を認めた。リンパ球移入実験では野生型マウス脾臓リンパ球は CT26 脾注翌日に GKO マウスの尾静脈より投与した。IFN γ 産生能を有する野生型マウスの脾臓リンパ球及び IL-12 発現プラスミドを GKO マウスに投与すると YAC-1 に対する細胞傷害活性は回復し、肝転移巣も抑制され、IL-12 による抗腫瘍効果が回復した。DX5 陽性細胞と DX5 陰性細胞の移入実験では、DX5 陽性細胞移入時のみ YAC-1 に対する細胞障害活性、抗腫瘍効果が回復し、NK 細胞の産生する IFN γ の重要性が明らかとなった。

D. 考察と結論

α -GalCer 投与により、脾 DC に比して肝 DC はより効率良く活性化し、強い抗原提示能や獲得免疫誘導能を呈した。さらに引き続いて肝獲得免疫も効率良く誘導されることが明らかとなった。以上の結果は α -GalCer を用いた癌免疫治療が肝腫瘍に対して有効である可能性を示唆するものであった。また IFN γ 産生能を有する NK 細胞

を GKO マウスに移入することにより IL-12 の肝転移腫瘍に対する抗腫瘍効果は回復した。IL-12 による抗腫瘍効果において、NK 細胞は先天免疫のエフェクターとしてのみならず IFN γ 産生誘導のメディエーターとしても重要であることが明らかとなった。本研究結果は、肝臓に対する癌免疫誘導の詳細なメカニズムの一端を明らかにしており、新たな肝臓治療の開発につながるものと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Yamamoto M, Ohkawa K, Miyagi T, Hayashi N. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment *Journal of Hepatology* 50: 1155-1162, 2009.
- 2) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer chemotherapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 69: 8050-8057, 2009.
- 3) Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Mochizuki K, Yakushijin T, Kurashige N, Inoue Y, Igura T, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Effect of interferon- α 2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with