

表1 ヒト腫瘍抗原の同定方法

|   |
|---|
| 1) がん細胞に特異的に反応する T 細胞株 (クローン) を利用した, がん細胞由来の cDNA 発現ライブラリーのスクリーニング (cDNA 発現クローニング法) (MAGE ほか) |
| 2) がんを高発現する既知のがん関連抗原由来のペプチドを合成してそれに対する CD8 陽性キラー T 細胞の反応を検討する手法 (リバースイムノロジー法)                 |
| 3) がん患者血清中の抗腫瘍抗原 IgG を利用した, がん細胞由来の cDNA 発現ライブラリーのスクリーニング (SEREX 法) (NY-ESO-1, HSP105 ほか)     |
| 4) cDNA マイクロアレイ解析による, 遺伝子発現の組織特異性が抗腫瘍免疫の誘導に適したがん抗原候補の同定と, その抗原性の解析 (GPC3 ほか)                  |

特異抗原, ③変異ペプチド抗原, ④がん遺伝子・がん抑制遺伝子産物, ⑤がん胎児性蛋白質, ⑥がん細胞で発現が増強している蛋白質, などが挙げられるが, その同定方法として表 1 に示す 4 つが挙げられる。CT 抗原と総称される抗原は, 名前が示すとおりに種々のがん組織および正常組織では免疫系から隔離された testis (精巣, 睪丸), 卵巣, 胎盤のみに発現する抗原群で, ヒトのメラノーマで同定された最初の癌抗原 MAGE, SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) で同定された NY-ESO-1 が代表的な CT 抗原である。

## 2.4 T 細胞により認識されるがん拒絶抗原ペプチドの同定方法と HLA 多型を考慮したがんの免疫療法

以上のような方法で同定されたがん抗原が, がん拒絶抗原と認められるためには, その抗原由来のペプチドで誘導した CTL が, がん細胞上の HLA クラス I 分子に結合する同ペプチドを認識してがん細胞を傷害することを証明しなければならない。HLA クラス I 分子に結合するペプチドは通常 9 ないし 10 個のアミノ酸からなり, HLA の多型性に対応して変化する。それぞれのクラス I 分子に結合するペプチドの結合モチーフはほぼわかっており, われわれはインターネット上でサイトにアクセスして抗原のアミノ酸配列を入力するだけで簡単に目的の HLA クラス I 分子に結合するペプチドを予測することができる ([http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/))。実際本当に結合するかどうかは, T2 細胞や RMA-S 細胞を用いたアッセイで確認できる<sup>2)</sup>。

欧米白人では HLA-A2 の頻度が高いこと, メラノーマの患者が多いことなどの理由により, がん拒絶抗原ペプチドとして, 現在までにメラノーマ由来の HLA-A2 拘束性のものが圧倒的に多く同定されている。日本人でも HLA-A2 の抗原頻度は 40% と比較的高いが, HLA-A 分子の中で日本人に最も頻度が高いのは 60% を占める HLA-A24 である。どちらも持っていない日本人は 15% しかいない。したがって, われわれが同定したような, ほとんどのがん患者のがんに

において高発現しているがん抗原に関して、HLA-A24あるいは-A2拘束性のがん拒絶抗原ペプチドを同定することにより、多くの日本人がん患者を対象としたペプチドワクチンや樹状細胞(DC)ワクチン、さらにはCTLの養子免疫療法などの免疫療法が可能となると考えられる。

## 2.5 がん特異的抗原 Glypican-3 (GPC3) と HSP105 の同定

### 2.5.1 cDNA マイクロアレイ解析による肝細胞がん拒絶抗原, GPC3 の同定

われわれは、東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授との共同研究により、cDNA マイクロアレイを利用した2万種類を超える遺伝子の肝細胞がん(HCC)と正常組織における発現解析データを用いて、上記の理想的ながん抗原としてふさわしいHCC特異的な新規がん胎児性抗原としてGPC3を同定した<sup>3)</sup>。マウスモデルでGPC3ががん拒絶抗原としても有用であることを証明し、マウスGPC3を導入したES細胞由来樹状細胞の抗腫瘍効果も証明した<sup>4, 5)</sup>。さらに、ヒトHLA-A2, A24によりキラーT細胞に提示されるGPC3ペプチドを同定した<sup>6)</sup>。

### 2.5.2 膵がんのSEREX法により同定したHSP105

がん細胞由来のcDNAライブラリーを大腸菌に発現させ、その蛋白質を患者の血清中の抗がん抗原IgG抗体でスクリーニングするSEREX法により数多くのがん抗原の候補が同定されている。HSP105はわれわれが同定した極めて汎用性の高いがん特異的抗原であり、ほとんどの大腸がん、乳がん、膵がんをはじめ、食道がん、子宮がん、卵巣がん、膀胱がん、メラノーマなど様々ながんが高発現している。正常組織で高発現しているのは免疫系の攻撃から守られている精巣のみであり、理論上HSP105を標的とした免疫療法は有害事象を起こすことなくがんだけを拒絶できる<sup>7)</sup>。HSP105はがん細胞のアポトーシスの抑制に関わっており、siRNAでHSP105の発現を落とすと様々ながん細胞がアポトーシスに陥ることを発見した<sup>8)</sup>。

## 2.6 マウスモデルを用いたこれらの抗原を標的とした免疫療法の安全性と有効性の解析

HSP105に関しては、HSP105-DNAや蛋白を用いたワクチンの有効性もすでにマウスモデルを用いて証明しているが、これらはペプチドワクチンと異なり患者のHLAに関係なく使い、CTLのみでなくCD4陽性ヘルパーT細胞(Th)も誘導できる<sup>9-11)</sup>。

精巣や胎盤は免疫学的に攻撃されないように隔離された臓器であり、したがって、GPC3やHSP105を標的とする免疫療法を開発すれば、有害事象のないがんの予防・治療法が可能になってくる。われわれはGPC3とHSP105について、ヒトのHLA-A24あるいは、-A2遺伝子導入マウスを用いてのCTLエピートープペプチドの同定に成功しており、マウスを用いた*in vivo* 腫瘍免疫の実験系において、これらのがん抗原に対する免疫応答が、自己免疫現象を伴うことなく抗腫瘍免疫を誘導できることを証明している。

### 2.6.1 マウスを用いた GPC3 ペプチドワクチンの安全性と有効性の証明

最善のプロトコール作成のため、マウスを用いて、臨床試験で用いる 2 種類の GPC3 ペプチドと共に投与する至適アジュバントの検討を行った<sup>12)</sup>。不完全フロイントアジュバント (IFA) との併用投与群においてのみ、GPC3 特異的な CTL が誘導された。ペプチド単独では無効で、IFA と混合すると有効になることを証明し、臨床試験ではペプチドと IFA の混合物を投与することとした。次に、ペプチド投与量によって免疫応答の誘導能に相違が見られるかを検討した結果、CTL の誘導能はペプチド投与量に依存し、最大投与量 50 $\mu$ g の投与群で最も多くの CTL が誘導された。次に投与回数について検討した。2 回以上の免疫で、抗原特異的な免疫応答が観察された。ペプチドワクチンに用いるアジュバントとして、少なくとも IFA は必須であると考えられた。その他のアジュバントの併用による免疫増強効果に関しては今後の検討課題である。また、ペプチドワクチンにおけるペプチド投与量についてのこれまでのコンセンサスとして、免疫応答の強弱はペプチド量には依存しないと考えられている。しかしながらわれわれが行ったマウスの実験では、ペプチド投与量に依存して強い免疫を誘導できるとの結果に至った。ただ、単純に体重換算すると、マウスでの 50 $\mu$ g はヒトでの 100mg に相当し、コストも膨大となるばかりか、その溶液を皮内注射するとなれば 1 回に数十カ所も注射しなければならない量であり、現実的には不可能である。臨床第 I 相試験では、投与回数を 3 回、投与量を 0.3, 1.0, 3.0mg の 3 段階とし、安全性を確認しながら容量を増やしていく設定にし、免疫学的モニタリングにより次相の至適投与量を決める方針にした。

## 2.7 GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 1 相試験

肝細胞がんにおいては、海外では目立った成績を示すがんワクチンは開発されていない。国内では、われわれが、HLA-A24, -A2 陽性進行肝細胞がん患者を対象に、GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 1 相試験を実施している。安全性に問題はなく、ほぼ全例の血液中にペプチド特異的な CTL の頻度の増加が検出され、その頻度はペプチド投与量が多いほど増えることが示唆された。また、CD8 陽性 CTL が、ペプチドワクチン後のがん組織内に多数浸潤してがん細胞を攻撃していることを、複数の患者さんで証明できた。約 60% の症例において初回ワクチン投与後 2 カ月の間に腫瘍マーカー PIVKA-II の低下を認め CT や MRI の画像検査での評価では約 60% の症例で 2 カ月間がんの増悪なし (安定 SD) であった。30mg, 3 回投与の 1 例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果 (部分奏効 PR) が出現した。GPC3 ペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果も示された。もう他に治療法がない進行肝細胞がん患者にとっても有用であると考えられた。現在、次相の推奨投与量を決定するために試験を継続中である。今後はもう他に治療法がない進行肝細胞がん患者にとって有用であるかを第 2 相試験で検

証するとともに、このようなワクチン療法は元来、腫瘍がない、あるいはCTで見えない腫瘍があったとしても腫瘍量が少ない状態でこそ威力を発揮すると考えられ、手術やラジオ波焼灼療法 (RFA) などの肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第2相試験を実施する。GPC3は肝細胞がんだけでなく、悪性黒色腫、小児がん (肝芽腫、神経芽腫、腎芽腫)、卵巣明細胞がん、卵黄嚢腫瘍、絨毛がん、肺扁平上皮がんにも発現しており、それらのがん種に対しての応用も期待される。

## 2.8 Rosenberg SA らによるヒトがんに対する強力な免疫療法の報告

米国立がん研究所 (NCI) の Rosenberg SA らは、体外で培養した CTL を戻す養子免疫療法 Adoptive-Cell-Transfer therapy に、T 細胞の Homeostatic Proliferation という考え方を組み合わせた免疫療法について発表した<sup>13)</sup>。Homeostatic Proliferation とは、体内のリンパ球の数は一定に保たれており、その数を減らしてやると、新たに移入されたリンパ球が生き延びて一定数に達するまで増殖するという現象である。あらかじめシクロホスファミドとフルダラビンの前投与により患者のリンパ球数を減らしておいて、そこへ大量に増やしておいた、がん細胞を傷害する CTL を移入すると、CTL が体内で長期にわたって生存し、ついには転移性メラノーマ約 50% の例で劇的な腫瘍縮小をもたらし、今までのがんの免疫療法では考えられないほどの抗腫瘍効果が観察された<sup>13)</sup>。最近では、抗がん剤と全身放射線照射にて体内リンパ球除去前処置後、体外で大量培養した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を体内へ戻す TIL 養子細胞免疫療法によって、奏効率 70% という驚異的な結果を報告している<sup>14)</sup>。一方、この治療で用いられた CTL は、MART-1, gp100 といったメラノサイト分化抗原由来のペプチドを用いて誘導したもので、この治療により、正常メラノサイトへの攻撃による白斑やぶどう膜炎などの自己免疫現象も観察された<sup>13)</sup>。このことは、がんを拒絶できるほどの免疫療法が行われた場合、その CTL を誘導するのに使われた抗原が自己の正常臓器にも発現するものであれば、その臓器を傷害してしまう可能性があることを示している。すなわちわれわれは、がん特異的に発現する、あるいは重要な正常臓器には発現しないがん拒絶抗原を同定しなければならない。免疫療法も工夫したり他の治療と併用したりすることでペプチドワクチンよりもさらに有効な画期的治療法となりうる可能性を十分に秘めている。日本ではメラノーマの患者は少ないが、日本人に多いがんを対象に、がん特異抗原を用いて培養した CTL の養子免疫療法を開発することで、日本人のがん治療に大きなブレークスルーが起ることは十分期待できる。われわれも、がん患者末梢血単核球 (PBMC) より、GPC3 由来エピトープペプチドを用いて、抗原特異的 CTL の増殖が可能な条件を検討し、ペプチド特異的 CTL を効率よく誘導し増幅させる技術を確立して、GMP グレードの細胞培養施設 Cell Processing Center (CPC) を利用した GPC3 由来エピトープペプチド特異的



CTLの養子免疫療法の実施を目指している。

## 2.9 おわりに

現在、がんの補助療法あるいは手術などの局所療法が無効ながんに対する治療法として主流の抗がん剤は、確かに有効な場合もあるが、無効で有害事象だけが生じる場合も少なくない。最近脚光をあびている分子標的治療薬は高額であることも問題である。まだ元気なのに、「あなたにはもう治療法はありません」と宣告される患者も少なくない。われわれが実施するがん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上、重篤な有害事象は起こりえず、有効性さえ証明できれば、標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらワクチン等の免疫療法によりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考ええる。ワクチンはより安価に提供でき、開業医などこの医療施設でもできる治療である。さらには、がん特異抗原を用いて抗腫瘍T細胞を大量に培養して投与する養子免疫治療法の開発により、患者個々にオーダーメイドで有害事象のない画期的な治療が可能になれば、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者のQOLの改善にとっても大きな役割を果たすものと考ええる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、がん特異的免疫療法ががん治療を変える可能性は十分にあると信じている。

## 文 献

- 1) van der Bruggen P *et al.* *Science*, **254**, 1643 (1991)
- 2) 中面哲也ほか, *実験医学*, **22** (5) (増刊; 免疫研究のフロンティア), 215 (2004)
- 3) Nakatsura T *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **306**, 16 (2003)
- 4) Nakatsura T *et al.* *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8630 (2004)
- 5) Motomura Y *et al.* *Cancer Res.*, **66**, 2414 (2006)
- 6) Komori H *et al.* *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2689 (2006)
- 7) Nakatsura T *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **281**, 936 (2001)
- 8) Hosaka S *et al.* *Cancer Sci.*, **97**, 623 (2006)
- 9) Yokomine K *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **343**, 269 (2006)
- 10) Miyazaki M *et al.* *Cancer Sci.*, **96**, 695 (2005)
- 11) Yokomine, K *et al.* *Cancer Sci.*, **98**, 1930 (2007)
- 12) Motomura Y *et al.* *Int. J. Oncol.*, **32**, 985 (2008)
- 13) Dudley ME *et al.* *Science*, **298**, 850 (2002)
- 14) Dudley ME *et al.* *J Clin Oncol.*, **26**, 5233 (2008)

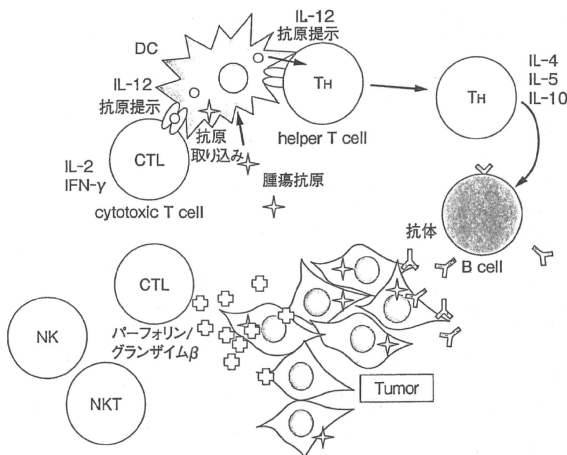
## 2. メラノーマに免疫療法は有効か？

## 1 序論

メラノーマは、免疫原性の高い腫瘍であるため、効率よく抗腫瘍免疫応答を誘導することにより腫瘍拒絶を期待できる（図1）。生体内での腫瘍拒絶に重要な免疫系細胞は、腫瘍が発現する分子を標的とするCD8陽性の細胞傷害性T細胞（CTL）のほか、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞などがあり、樹状細胞（DC）やヘルパーT細胞によって抗原認識や活性化が行われる。こうした抗腫瘍免疫応答を活用するがん免疫療法は、能動免疫療法と受動免疫療法に分けられる（表1）。

1980年代より行われてきた免疫賦活剤やサイトカインなどによる免疫賦活療法、体外で刺激増殖させたリンパ球を移入する養子免疫療法および、1990年代から開発が進められてきたがんワクチンなどの抗原特異的免疫療法などは、一部の患者に劇的な腫瘍拒絶をもたらすものの、多くの症例における効果は限定的であることが明らかとなった<sup>1)</sup>。

2000年代に入ってから、免疫学の進歩により、制御性T細胞（Treg）などの新たな細胞群



【図1】 腫瘍に対する免疫応答

NK: natural killer cell

NKT: natural killer T cell

DC: dendritic cell

CTL: cytotoxic T lymphocyte

の発見に伴って、がん微小環境における免疫回避機構の解明が進みつつある。現在では、細胞性免疫および液性免疫を増強させる努力とともに、抗腫瘍免疫応答を妨げる主たる要因の1つである免疫回避機構を打開する手法も工夫されてきており、メラノーマにおける免疫療法は新たな段階に入ったといえる。本項では、メラノーマに対する免疫療法のエビデンスを紹介するとともに、その有用性について概説する。

## 表11 メラノーマに対する免疫療法

### 能動免疫法

- サイトカイン療法 / 生物療法
- 抗原特異的免疫療法
  - 抗原ペプチド, 蛋白, DNA
- 樹状細胞療法
  - 樹状細胞 + 抗原ペプチド, 蛋白, DNA
  - 樹状細胞 + 自己腫瘍溶解物
- 腫瘍破壊によるワクチン療法
  - 放射線, 温熱, 凍結, PDT など
- 修飾がん細胞ワクチン
- 免疫増強法
  - アジュバント
  - 熱ショック蛋白

### 受動免疫法

- 細胞移入 / 養子免疫療法
  - 腫瘍浸潤リンパ球
  - 活性化リンパ球
  - TCR 遺伝子導入リンパ球
- ミニ移植

PDT: photodynamic therapy

## 2 コンセンサス

免疫療法全体を振り返った2004年のメタアナリシスによるとメラノーマに対する免疫療法の奏効率は3%と振るわない<sup>1)</sup>。しかしながら、最近5年間に発表された臨床研究の結果を詳細にみていくことにより、成績不振を打開するヒントをみいだすことが可能である。高用量IL-2療法は、単独でも16%の奏効率が認められる<sup>2)</sup>が、gp100 210Mとのコンビネーションでは22~24%に上昇する<sup>3,4)</sup>。Tregを抑制する工夫として、非骨髄破壊性/骨髄破壊性前処置と養子免疫療法のコンビネーションがきわめて優れた治療成績をあげている<sup>5)</sup>ことが示唆しているように、Tregなどの免疫回避機構を打開する手法が今後の免疫療法の開発のなかで重要な位置を占めていることは疑う余地がない。その1つであるCTLA4モノクローナル抗体療法は、Tregを抑制することにより、抗腫瘍免疫応答を回復・促進させる治療法であり、単剤では用量依存性に抗腫瘍効果がみられ、3mg/kg/週、10mg/kg/3~4週または15mg/kg/3月の投与スケジュールで12~17%の奏効率が得られている<sup>6,7)</sup>。そして他の免疫療法と共通する点として、臨床効果が数月から数年の長期にわたり持続する点も確認された。さらに、gp100

などのペプチド併用で12.5%<sup>8)</sup>や高用量 IL-2 併用で22%<sup>9)</sup>、樹状細胞ワクチン併用で25%<sup>10)</sup>の奏効率が報告されていることから、単剤よりも IL-2 やワクチン併用によって、より優れた治療効果を期待できる。

### 3 エビデンス

#### 1) Atkins MB, et al (J Clin Oncol. 1999; 17: 2105-16)<sup>2)</sup>

目的: 転移性メラノーマに対する高用量 IL-2 の静脈内投与による治療効果と毒性の評価。

対象: 米国における 270 名の転移性メラノーマ患者 (1985~1993 年)。

方法: 多施設共同での後ろ向き臨床研究。

結果: 米国 NCI を含む多施設において、60 または 72 万 IU/kg の IL-2 の静脈内投与が 8 時間毎に 14 回行われた。奏効率は、CR が 6.2%、PR が 9.6% で、CR+PR は 16% であった。その効果は 4~106 カ月 (中央値 9 カ月) 持続した。そのうち、CR の 59% は 7 年にわたり無増悪生存を維持し、長期生存に寄与した。その毒性は、肺水腫や消化器症状など Grade 4 のものが 1~3% 発生したが速やかに回復し、治療を継続することが可能であった。しかし、6 例 (2%) が敗血症で亡くなった。

#### 2) Rosenberg SA, et al (Nat Med. 2004; 10: 909-15)<sup>1)</sup>

目的: 免疫療法の有効性の検討。

対象: 米国 NCI を含む多施設において、ペプチドワクチン、ウイルスワクチン、遺伝子導入腫瘍細胞ワクチン、樹状細胞ワクチン、熱ショック蛋白ワクチンを受けた 765 症例のがん患者。うち 661 例のメラノーマ症例。

方法: メタアナリシス。

結果: 評価した 765 例全体の奏効率は 3.8% であった。そのうちメラノーマ症例 661 例の奏効率は 3% であった。著者らは、この低い奏効率がすなわちがんワクチン療法の終着点を告げるものではなく、抜本的な改善の必要性を強く示唆すると論じ、制御性 T 細胞などによる免疫回避機構を打破するための CTLA-4 モノクローナル抗体療法やリンパ球除去+養子免疫療法によってがん免疫療法の新たな展開が期待できるとしている。

#### 3) Smith FO, et al (Clin Cancer Res. 2008; 14: 5610-8)<sup>3)</sup>

目的: 高用量 IL-2 の静脈内投与単独、または、高用量 IL-2 + ワクチンのコンビネーションで治療された転移性メラノーマ患者について、4 年以上の生存に関連する予後因子の特定および奏効率の評価。

対象: 米国における 684 名の転移性メラノーマ患者 (1985~2006 年)。

方法: 多施設共同での後ろ向き臨床研究。

結果: 684 例のうち 305 例には高用量 IL-2 単独の治療が行われ、379 例には IL-2 と

ペプチドワクチンが行われた。その結果、奏効率は、IL-2 単独の患者群が 12.8% であったのに対し、gp100 210M ペプチドワクチンとのコンビネーションが行われた群は 22% と有意に優れていた ( $p=0.01$ )。gp100 210M が含まれないペプチドワクチンとのコンビネーションによる奏効率は 13.8% であったことから、IL-2 と gp100 210M ワクチンとのコンビネーションの有用性が確認された。また、皮膚または皮下転移のみの患者においても治療成績が有意に良好であった。

4) Sosman JA, et al (J Clin Oncol. 2008; 26: 2292-8)<sup>4)</sup>

**目的:** メラノーマ抗原の改変ペプチドである gp100 210M は、高用量 IL-2 との併用により優れた臨床成績を上げている。この第 II 相臨床試験では、IL-2 の異なる投与スケジュールを設定し比較検討する。

**対象:** HLA-A\*0201 陽性の 131 例の進行期メラノーマ患者 (1998~2003 年)。

**方法:** 多施設共同での前向き臨床研究 (第 II 相臨床試験)。

**結果:** HLA A\*0201 拘束性のペプチド gp100 210M が 3 週毎に計 4 回皮下投与され、同時に 60 万単位/kg の IL-2 が 8 時間毎に投与された。異なる IL-2 の投与回数とスケジュールによって 3 つのグループが設定された。評価可能であった 121 例患者の奏効率は、11 例の CR と 9 例の PR を含む 16.5% であった。3 群のうち、初回と 2 回目に IL-2 の投与が行われた群の OR が 23.8% で最も優れていた。

5) Engell-Noerregaard L, et al (Cancer Immunol Immunother. 2009; 58: 1-14)<sup>11)</sup>

**目的:** これまで行われた樹状細胞療法の有効性の評価、および、投与方法やヘルパー抗原の比較検討、免疫モニタリングと臨床効果の相関を検討。

**対象:** 多施設の 626 例のメラノーマ患者。

**方法:** メタアナリシス。

**結果:** これまで世界中で行われた 626 例の樹状細胞療法の治療成績のまとめによると、CR+PR は約 9%、SD を含めると約 30% であった。投与経路はリンパ節内投与と皮下投与の治療成績が皮内投与や静脈内投与のそれよりも優れており、ヘルパー抗原の併用をした群が併用しない群よりも優れていた。また免疫モニタリングでは、遅延型過敏反応よりも IFN  $\gamma$  産生細胞の数の上昇が臨床効果と相関していた。

6) Rosenberg SA, et al (Curr Opin Immunol. 2009; 21: 233-40)<sup>5)</sup>

**目的:** 養子免疫療法 (ACT) における骨髄非破壊性免疫抑制前処置および骨髄破壊性免疫抑制前処置の有効性の評価。

**対象:** 米国 NCI の転移性メラノーマ患者 93 名。

**方法:** 前向き臨床研究。

**結果:** 再発メラノーマに対し、シクロホスファミドとフルダラビンによる骨髄非破壊性免疫抑制前処置に高用量 IL-2 を併用した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) による ACT

を実施したところ、43例中4例のCRを含む21例(49%)に奏効した。このACTに、全身放射線照射(TBI)の前処置を組み合わせることにより、2GyのTBI併用で25例中2例のCRを含む13例(52%)、12GyのTBI併用では25例中7例のCRを含む18例(72%)に奏効した。しかもCRの13例のうち12例ではCR持続期間が18から75カ月と長期間持続するという、きわめて優れた効果を認めた。

Dudley ME, et al (J Clin Oncol. 2008; 32: 5233)

Dudley ME, et al (J Clin Oncol. 2005; 23: 2346)

7) Johnson LA, et al (Blood. 2009; 114: 535-46)<sup>12)</sup>

目的: メラノーマ反応性のT細胞受容体(TCR)を遺伝子導入したリンパ球を用いた遺伝子治療の有効性の評価。

対象: 米国NCIの転移性メラノーマ患者36名(2007~2008年)。

方法: 前向き臨床研究。

結果: 米国NCIにて、MART-1 A2ペプチド拘束性およびgp100 A2ペプチド拘束性T細胞レセプターを、それぞれ20例と16例の転移性メラノーマ患者に対して、レトロウイルスを用いて遺伝子導入した自己末梢血リンパ球を用いた養子免疫を行ったところ、それぞれの奏効率は30%と19%(1例のCRを含む)であった。一部の患者には正常メラノサイトが免疫系に破壊される現象も認められた。メラノーマ特異性の高いTCRを発現したT細胞による腫瘍拒絶の効果が確認された。

8) Camacho LH, et al (J Clin Oncol. 2009; 27: 1075-81)<sup>6)</sup>

目的: 進行期メラノーマ患者に対するCTLA4モノクローナル抗体トレメリムマブ投与における有害事象の調査と治療効果の評価。

対象: テキサス大学MD Andersonがん研究所病院など米国の8施設のIII期とIV期のメラノーマ患者(第I相試験28例, 第II相試験89例)。

方法: 多施設共同での前向き臨床試験。

結果: 第I相試験においては、3mg/kg/month投与群, 6mg/kg/month投与群, 20mg/kg/month投与群が設定された。第II相試験においては、10mg/kg/month投与群41例と15mg/kg/month投与群43例について評価が行われた。いずれの群においてもCR1例+PR3例がみられ、奏効率は8/84例(約10%)であり、SDを含めると32/84例(約38%)であった。CR+PR+SDの32例中12例は6カ月以上効果が持続した。

9) Wolchok JD, et al (Lancet Oncol. 2010; 11: 155-64)<sup>7)</sup>

目的: 進行期メラノーマに対するCTLA4モノクローナル抗体イピリムマブ単剤の抗腫瘍効果と有害事象の調査。

対象: 切除不能のIII期およびIV期の12カ国・217名のメラノーマ患者(2006~

2007年).

方法: 多施設共同での無作為割付け比較試験による第II相臨床試験(3種類のイピリムマブの投与量設定で3群間での比較検討が行われた).

結果: 10mg/kg (n=73), 3mg/kg (n=72) および 0.3mg/kg (n=72) を3週ごとに4回投与した. 10mg/kg 投与群では11.1%, 3mg/kg 投与群では4.2%, 0.3mg/kg 投与群では0%の奏効率が得られた. 自己免疫関連の有害事象のうちGrade 3~4の主要なものは自己免疫性腸炎であり, その発生率は, それぞれの群において15.4%, 0.28%, 0%の頻度であった. イピリムマブは用量依存性に効果が認められた. 10mg/kgでの第III相試験が予定されている.

10) Attia P, et al (J Clin Oncol. 2005; 23: 6043-53)<sup>8)</sup>

目的: 転移性メラノーマに対するgp100ペプチドワクチン併用CTLA-4モノクローナル抗体療法の抗腫瘍効果の評価.

対象: 米国NCIのHLA-A\*0201陽性IV期メラノーマ患者56名.

方法: 前向き臨床研究.

結果: 56例に対して, イピリムマブ3mg/kgの3週毎投与もしくは2回目を降1mg/kgの投与が行われ, HLA-A\*0201拘束性gp100ペプチド210Mおよび288Vの1mg投与が併用された. 肺, 肝, 脳, リンパ節, 皮下転移の縮小が認められ, CR2名, PR5名を含む7名(12.5%)に奏効した. 治療効果は4カ月から34カ月の持続が認められた.

#### 4 根拠となった臨床研究の問題点と限界

米国NCIで行われている非骨髄破壊性/骨髄破壊性前処置とTILを用いたACTのコンビネーションは, そのきわめて優れた治療成績から, これまでの免疫療法の歴史のなかでも画期的な治療法といえる. しかしながら, こうした養子免疫療法においては, 各々の患者からTILを樹立, 培養し, 腫瘍特異性を確認する一連の過程に, 高い技術と大きな労力が必要とされ, かつ本邦では保険適応のないIL-2を併用するなど, 本邦での実現には高いハードルがあるといわざるを得ない.

#### 5 (本邦の) 患者に適応する際の注意点

本邦での免疫療法は, ごく一部のがん橋渡し研究やがん拠点病院などの臨床試験を除き, その多くは民間のクリニックや研究所において自由診療として行われているのが現状である. そのため, 治療プロトコル, 細胞調整の適正化や免疫モニタリングの評価が十分行われていないことが懸念される. また, 上述のようにIL-2が本邦での保険適応でないことも大きな問題の1つである. [4]で述べたように, TILを使った養子免疫療法の本邦での実現は困難であるが, TCR遺伝子導入末梢血リンパ球を用いたACTは本邦においても実現可能な方法であろう. また, CTLA4モノクローナル抗体療法に関しては, 本邦においても多施設共同での臨床試験が望まれる.

■文献■

- 1) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004; 10: 909-15.
- 2) Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2105-16.
- 3) Smith FO, Downey SG, Klapper JA, et al. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5610-8.
- 4) Sosman JA, Carrillo C, Urba WJ, et al. Three phase II cytokine working group trials of gp100 (210M) peptide plus high-dose interleukin-2 in patients with HLA-A2-positive advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2292-8.
- 5) Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21: 233-40.
- 6) Camacho LH, Antonia S, Sosman J, et al. Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1075-81.
- 7) Wolchok JD, Neyns B, Linette G, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 155-64.
- 8) Attia P, Phan GQ, Maker AV, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 6043-53.
- 9) Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol.* 2005; 12: 1005-16.
- 10) Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B, et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 6267-76.
- 11) Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, et al. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58: 1-14.
- 12) Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009; 114: 535-46.

〈木庭幸子〉



# Postoperative serum $\alpha$ -fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma

DAISUKE NOBUOKA<sup>1,2</sup>, YUICHIRO KATO<sup>2</sup>, NAOTO GOTOHDA<sup>2</sup>, SHINICHIRO TAKAHASHI<sup>2</sup>, TOSHIO NAKAGOHRI<sup>2</sup>, MASARU KONISHI<sup>2</sup>, TAIRA KINOSHITA<sup>2</sup> and TETSUYA NAKATSURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology and

<sup>2</sup>Department of Surgery, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan

Received December 18, 2009; Accepted March 3, 2010

DOI: 10.3892/or\_00000888

**Abstract.** We evaluated the clinical value of perioperative  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) levels in predicting recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) after curative resection, with a focus on the time course as surveillance tools. A total of 165 consecutive HCC patients who had undergone curative hepatectomy at our institution from 2005 to 2007 and whose serum AFP and DCP had been measured before and after hepatectomy were included in this study. The minimum postoperative levels within a 4-month period were used for analysis. Among the patients with a positive level of AFP before operation, the number of patients whose AFP level did not change from positive to negative after operation in the group with recurrence exceeded that in the group without recurrence (48/60, 80.0% vs. 4/23, 17.4%), and the difference was significant ( $P < 0.001$ ). Minimum postoperative AFP level was found to be a significant independent risk factor for recurrence by multivariate analysis ( $P < 0.001$ ). There was no statistically significant correlation between AFP level and grade of hepatitis activity ( $P = 0.599$ ). Postoperative AFP level is a

useful tool for predicting recurrence after curative hepatectomy. A positive level of AFP after operation might suggest a site of residual viable cancer. The need for effective adjuvant therapy and close follow-up is suggested in patients with a positive postoperative AFP level.

## Introduction

Primary liver cancer, which consists predominantly of hepatocellular carcinoma (HCC), is the fifth most common cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality, and is becoming more prevalent not only in South-East Asia and Africa but also in Western countries (1-4). Therefore, great interest in HCC has recently developed all over the world.

Surgical resection is the most effective treatment for curable HCC. Although the short-term prognosis of HCC patients has improved due to advances in surgical technique and perioperative management, the long-term prognosis remains far from satisfactory due to frequent recurrence because of not only metastasis from the primary tumor but also multicentric carcinogenesis based on underlying hepatitis or cirrhosis. Therefore, control of recurrent disease is a major challenge in HCC treatment and, especially, the establishment of effective adjuvant therapy to prevent recurrence is required. However, there is no universal consensus at present (5). Secondly, because the outcome in cases of HCC recurrence is likely to be improved by early detection, postoperative surveillance is also required.

Serum levels of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) are well known as tumor markers of HCC (6). Although many study groups have indicated that preoperative levels of these tumor markers were prognostic factors for HCC (7-11), the clinical usefulness of postoperative levels for early detection of HCC recurrence remains unclear.

This study evaluated the clinical value of perioperative serum AFP and DCP levels in predicting HCC recurrence after curative resection, with a focus on the time course as surveillance tools.

## Materials and methods

**Patient selection.** From January 2005 to December 2007, 192 consecutive patients with HCC underwent hepatectomy at the

---

*Correspondence to:* Dr Tetsuya Nakatsura, Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan  
E-mail: tnakatsu@east.ncc.go.jp

**Abbreviations:** AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; DCP, des- $\gamma$ -carboxy prothrombin; HCC, hepatocellular carcinoma; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; US, ultrasonography; TMN, tumor-node-metastasis; UICC, International Union against Cancer; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; ALT, alanine aminotransferase; AFP-L3, *Lens culinaris* agglutinin-reactive  $\alpha$ -fetoprotein; GPC3, glypican-3; HBsAg, hepatitis B s antigen; anti-HCV, anti hepatitis C virus antibody; AST, aspartate aminotransferase; T. Bil, total bilirubin; Alb, albumin; ChE, cholinesterase; PLT, platelet; PT, prothrombin time; ICG-R15, indocyanine green-retention at 15 min

**Key words:** hepatocellular carcinoma recurrence,  $\alpha$ -fetoprotein, Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, tumor marker, hepatectomy

Table I. Baseline characteristics of study patients (n=165).

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| Age (years)   | 67.2±8.6                              |
| Gender (male/female)  | 138 (83.6)/27 (16.4)                  |
| Viral infection [HBsAg(+)/anti-HCV(+)/both(+)/both(-)]  | 30 (18.2)/97 (58.8)/6 (3.6)/32 (19.4) |
| Diabetes (present/absent)   | 44 (26.7)/121 (73.3)                  |
| Tumor occurrence (initial/recurrent)  | 108 (65.5)/57 (34.5)                  |
| Child-Pugh classification (Class A/B/C)   | 150 (90.9)/15 (9.1)/0 (0.0)           |
| AST (IU/l)  | 56.2±38.1                             |
| ALT (IU/l)  | 57.2±44.6                             |
| T. Bil (mg/dl)  | 0.9±0.3                               |
| Alb (g/dl)  | 3.9±0.3                               |
| ChE (IU/l)  | 247.0±71.0                            |
| PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )  | 15.9±16.9                             |
| PT (%)  | 78.7±10.9                             |
| ICG-R15 (%)   | 17.2±10.4                             |
| Preoperative AFP (ng/ml)  | 1464.0±6038.2                         |
| Minimum postoperative AFP (ng/ml)   | 695.7±7755.1                          |
| Preoperative DCP (mAU/ml)   | 1539.8±6204.2                         |
| Minimum postoperative DCP (mAU/ml)  | 39.9±125.3                            |
| Tumor size (cm)   | 3.9±2.9                               |
| No. of nodules (solitary/multiple)  | 108 (65.5)/57 (34.5)                  |
| Histological differentiation (well/moderate/poor)   | 29 (17.6)/92 (55.8)/44 (26.7)         |
| Macroscopic vascular invasion (present/absent)  | 7 (4.2)/158 (95.8)                    |
| Microscopic vascular invasion (present/absent)  | 43 (26.1)/122 (73.9)                  |
| Intrahepatic metastasis (present/absent)  | 14 (8.5)/151 (91.5)                   |
| Stage (UICC) (I/II/III/IV)  | 86 (52.1)/62 (37.6)/15 (9.1)/2 (1.2)  |
| Operative procedure   |                                       |
| (trisegmentectomy/central bisegmentectomy/  | 2 (1.2)/2 (1.2)/                      |
| hemihepatectomy/segmentectomy/  | 18 (10.9)/15 (9.1)/                   |
| subsegmentectomy/partial resection)   | 14 (8.5)/114 (69.1)                   |
| Surgical margin (mm)  | 2.7±4.2                               |
| Histological findings of non-cancerous lesions (liver cirrhosis/<br>chronic hepatitis/normal liver) | 60 (36.4)/90 (54.5)/15 (9.1)          |

Continuous variables are expressed as mean and standard deviation. Values in parentheses are percentages.

National Cancer Center Hospital East, Japan. Among them, 165 patients were enrolled in this study, excluding 14 who underwent non-curative resection, 9 who were lost to serial follow-up, and 4 who took oral warfarin, a DCP-inducing agent. Baseline characteristics of the patients are shown in Table I. None of the patients in this study received postoperative adjuvant therapy, including interferon.

**Diagnosis of HCC.** HCC was diagnosed using dynamic computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI), considering hyper-attenuation in the arterial phase with washout in the late phase to indicate definite HCC (12). Intraoperatively, ultrasonography (US) was performed to determine whether other nodules were present in the liver or not (13). All nodules were confirmed to be HCC histopathologically after surgical resection. Pathological stage was assigned according to the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the International Union against Cancer (UICC)

(14), and curative resection was defined as a negative surgical margin histopathologically. Tumor recurrence was defined as a newly developed lesion on CT or MRI.

**Measurement of serum AFP and DCP concentrations.** Serum AFP and DCP concentrations were determined within 1 month before operation and at least once within a 4-month period after operation, using a commercially available electrochemiluminescence immunoassay kit (Roche Co., Tokyo, Japan) and chemiluminescent enzyme immunoassay kit (Eisai Co., Tokyo, Japan), respectively. The minimum postoperative level was used for analysis, and the levels of the tumor markers before and after operation were compared. In this study, the cut-off levels for AFP and DCP were set as 10 ng/ml and 40 mAU/ml, respectively.

**Statistical analysis.** Continuous variables were expressed as mean and standard deviation. The number of patients whose

Table II. Sensitivity of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) and combination of both.

|                              | AFP (%)                   |      | DCP (%)                    |      | Combination of AFP and DCP (%) |      |
|------------------------------|---------------------------|------|----------------------------|------|--------------------------------|------|
|                              | (Cut-off level; 10 ng/ml) |      | (Cut-off level; 40 mAU/ml) |      |                                |      |
| Sensitivity before operation | 83/165                    | 50.3 | 101/165                    | 61.2 | 130/165                        | 78.8 |
| Sensitivity at recurrence    | 63/114                    | 55.3 | 46/114                     | 40.4 | 82/114                         | 71.9 |

tumor marker levels changed from positive to negative after operation was compared using  $\chi^2$  test. Recurrence rates were analyzed according to the Kaplan-Meier estimate, and differences between subgroups were compared using the log-rank test. Multivariate Cox's proportional hazard regression was used to determine the effect of all of the potential variables. Univariate regression analysis was used to evaluate the correlation between AFP level and grade of hepatitis activity. Kruskal-Wallis rank test was used to evaluate the correlation between AFP level and grade of underlying chronic liver disease. Mann-Whitney U test was used to evaluate the correlation between AFP level and recurrence. For all statistical tests, differences were considered significant at P-values <0.05. Data were analyzed with the statistical package, Dr. SPSS II® for Windows (SPSS Japan, Tokyo, Japan).

## Results

**Sensitivity of AFP and DCP.** The sensitivity rates of preoperative AFP and DCP for detection of HCC were 50.3% (83/165) and 61.2% (101/165), respectively. The combination of AFP and DCP increased the sensitivity to 78.8% (130/165) (Table II).

Until the end of follow-up, tumor recurrence was identified in 114 patients (69.1%). Of these, 106 (93.0%) had intrahepatic recurrence distant from the primary site, 3 (2.6%) had local tumor recurrence and 13 (11.4%) had extrahepatic recurrence (some patients had a first relapse at more than one site). The cumulative probability of overall recurrence was 46.2, 64.5 and 74.5% at 1, 2 and 3 years, respectively. The sensitivity of AFP, DCP, and their combination at the time for detecting recurrence was 55.3% (63/114), 40.4% (46/114) and 71.9% (82/114), respectively (Table II).

**The time course of AFP and DCP.** Among the 83 patients with a positive AFP level before operation, the value decreased and changed to negative after curative operation in 31 patients (37.3%), whereas it remained positive in 52 (62.7%). On the other hand, among the 101 patients with a positive DCP level before operation, the value changed to negative after operation in 85 (84.2%), whereas it remained positive in 16 (15.8%). The rate of negative change of AFP was significantly lower than that of DCP (P<0.001).

Fig. 1 shows the changes in perioperative AFP level in patients with (Fig. 1A and B) and without (Fig. 1C and D) recurrence. Among the patients with a positive level of AFP before operation, the number of patients whose AFP level remained positive after operation in the group with recurrence exceeded that in the group without recurrence (48/60, 80.0% vs. 4/23, 17.4%) (Fig. 1A and C), and the difference was

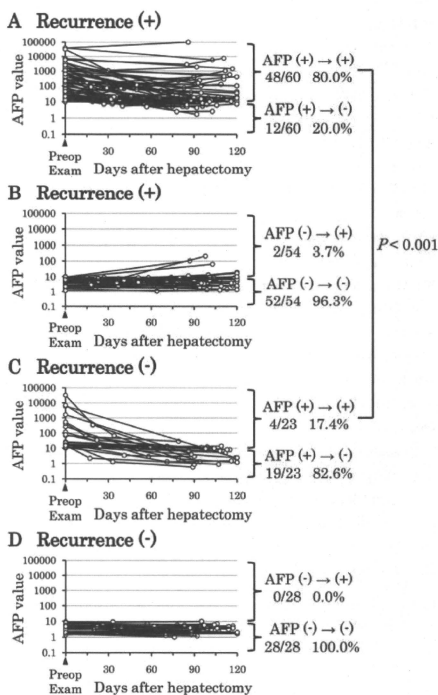


Figure 1. Pre- and postoperative serum  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) level. (A) Patients with recurrence and positive AFP preoperatively. (B) Patients with recurrence and negative AFP preoperatively. (C) Patients without recurrence and positive AFP preoperatively. (D) Patients without recurrence and negative AFP preoperatively. Among the patients with a positive preoperative AFP level, the number of patients whose AFP level remained positive after operation in the group with recurrence exceeded that in the group without recurrence (P<0.001). Preop exam, preoperative examination.

significant (P<0.001). From a different viewpoint, among the 52 patients whose AFP level was positive both before and after operation, 48 (92.3%) experienced recurrence later (Fig. 1A and C). Among the 82 patients whose AFP level was negative before operation, only 2 (2.4%) had a positive AFP level after operation, and both of them (2/2, 100.0%) experienced recurrence (Fig. 1B and D).

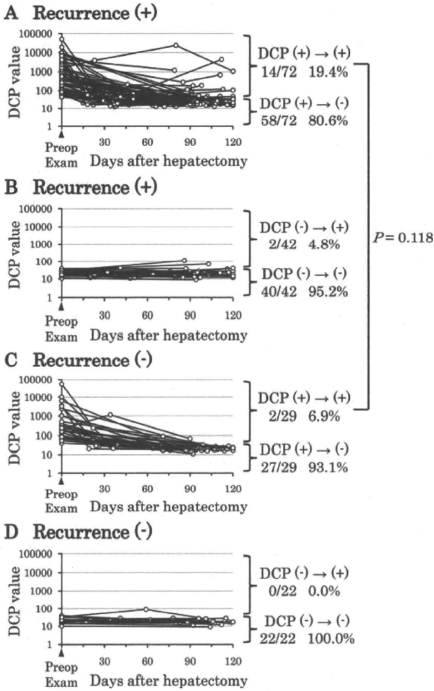


Figure 2. Pre- and postoperative serum des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) level. (A) Patients with recurrence and positive DCP preoperatively. (B) Patients with recurrence and negative DCP preoperatively. (C) Patients without recurrence and positive DCP preoperatively. (D) Patients without recurrence and negative DCP preoperatively. There was no significant difference in the number of patients whose DCP remained positive between the group with and without recurrence ( $P=0.118$ ). Preop exam, preoperative examination.

Fig. 2 shows the changes in perioperative DCP level. In contrast to AFP, there was no significant difference in the number of patients whose DCP remained positive between the two groups (14/72, 19.4% vs. 2/29, 6.9%;  $P=0.118$ ) (Fig. 2A and C). However, from a different viewpoint, among the 16 patients whose DCP level was positive both before and after operation, 14 (87.5%) experienced recurrence later (Fig. 2A and C). Among the 64 patients whose DCP level was negative before operation, only 2 (3.1%) had a positive DCP level after operation, and both of them (2/2, 100.0%) experienced recurrence (Fig. 2B and D).

**Accuracy of minimum postoperative AFP and DCP.** The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of minimum postoperative AFP, DCP and the combination of both for HCC recurrence were calculated. The sensitivity of minimum postoperative

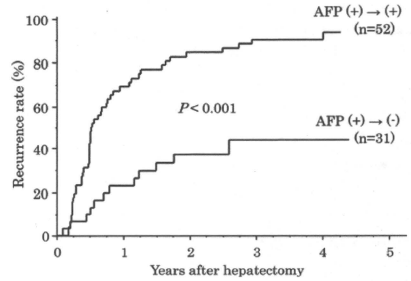


Figure 3. Overall cumulative recurrence rate curve according to minimum postoperative  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) level. Recurrence rate was higher in the patients whose AFP level remained positive after operation than in those whose AFP level was changed from positive to negative ( $P<0.001$ ).

AFP (43.9%), DCP (14.0%) and even the combination of both (50.0%) was rather low. However, when classified by preoperative level, the minimum postoperative AFP level in patients with a positive preoperative level had higher sensitivity (80.0%) while maintaining high specificity (82.6%) and PPV (92.3%) (Table III).

**Univariate and multivariate analyses to identify the risk factors for HCC recurrence.** The differences in cumulative recurrence rate of patients among the various risk factors stratified were evaluated by log-rank test. Age ( $P=0.031$ ), tumor occurrence (initial/recurrent) ( $P<0.001$ ), minimum postoperative AFP level ( $P<0.001$ ), minimum postoperative DCP level ( $P=0.002$ ), tumor size ( $P=0.026$ ), number of nodules ( $P=0.007$ ), microscopic vascular invasion ( $P<0.001$ ), intrahepatic metastasis ( $P<0.001$ ) and pathological stage ( $P<0.001$ ) were found to be significantly related to recurrence, whereas preoperative levels of AFP ( $P=0.408$ ) and DCP ( $P=0.375$ ) were not. Thereafter, multivariate analysis using Cox's proportional hazard model was performed to assess the independent importance of each variable studied. Tumor occurrence (initial/recurrent) ( $P<0.001$ ), minimum postoperative AFP level ( $P<0.001$ ), and intrahepatic metastasis ( $P=0.004$ ) were found to be significant independent risk factors for recurrence after curative hepatectomy (Table IV). Fig. 3 shows the overall cumulative recurrence rate curve according to pre- and postoperative AFP level. When limited to the patients with a positive AFP level before operation, 52 patients whose AFP value remained positive after operation had significantly higher recurrence rate than 31 whose value changed to negative ( $P<0.001$ ). Among the patients with a positive minimum postoperative AFP level, 70.4% (38/54) experienced recurrence within 1 postoperative year, 22.2% (12/54) after this time period and only 7.4% (4/54) did not experience recurrence until the end of follow-up.

**Correlation between AFP level and hepatitis.** To evaluate the correlation between AFP level and grade of hepatitis activity, we compared minimum postoperative AFP level with simultaneous alanine aminotransferase (ALT) level. Univariate

Table III. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of minimum postoperative  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP), and combination of both for detection of hepatocellular carcinoma (HCC) recurrence.

|                                  | Sensitivity (%) |      | Specificity (%) |       | PPV (%) |       | NPV (%) |      |
|----------------------------------|-----------------|------|-----------------|-------|---------|-------|---------|------|
| Minimum postoperative AFP        |                 |      |                 |       |         |       |         |      |
| Overall                          | 50/114          | 43.9 | 47/51           | 92.2  | 50/54   | 92.6  | 47/111  | 42.3 |
| Regarding preoperative AFP level |                 |      |                 |       |         |       |         |      |
| Negative                         | 2/54            | 3.7  | 28/28           | 100.0 | 2/2     | 100.0 | 28/80   | 35.0 |
| Positive                         | 48/60           | 80.0 | 19/23           | 82.6  | 48/52   | 92.3  | 19/31   | 61.3 |
| Minimum postoperative DCP        |                 |      |                 |       |         |       |         |      |
| Overall                          | 16/114          | 14.0 | 49/51           | 96.1  | 16/18   | 88.9  | 49/147  | 33.3 |
| Regarding preoperative DCP level |                 |      |                 |       |         |       |         |      |
| Negative                         | 2/42            | 4.8  | 22/22           | 100.0 | 2/2     | 100.0 | 22/62   | 35.5 |
| Positive                         | 14/72           | 19.4 | 27/29           | 93.1  | 14/16   | 87.5  | 27/85   | 31.8 |
| Combination of both AFP and DCP  |                 |      |                 |       |         |       |         |      |
| Overall                          | 57/114          | 50.0 | 45/51           | 88.2  | 57/63   | 90.5  | 45/102  | 44.1 |

Table IV. Cumulative recurrence rate stratified by variables using Kaplan-Meier method.

|  | No. of patients | Univariate analysis           |           |           |         | Multivariate analysis |             |         |
|--|-----------------|-------------------------------|-----------|-----------|---------|-----------------------|-------------|---------|
|  |                 | Estimated recurrence rate (%) |           |           | P-value | Odds ratio            | 95% CI      | P-value |
|  |                 | 1-year                        | 2-year    | 3-year    |         |                       |             |         |
| Age (years) (<70/≥70)  | 88/77           | 44.4/48.1                     | 55.7/75.5 | 66.3/85.3 | 0.031   | 1.390                 | 0.953-2.027 | 0.088   |
| Gender (male/female)   | 138/27          | 45.0/51.9                     | 63.0/71.4 | 73.9/77.1 | 0.691   |                       |             |         |
| HBsAg (positive/negative)  | 36/129          | 44.4/46.7                     | 60.5/65.7 | 72.3/75.2 | 0.585   |                       |             |         |
| Anti-HCV (positive/negative)   | 103/62          | 45.9/46.8                     | 66.9/60.1 | 78.9/66.0 | 0.300   |                       |             |         |
| Diabetes (present/absent)  | 44/121          | 36.7/49.6                     | 61.8/65.4 | 78.5/73.2 | 0.779   |                       |             |         |
| Tumor occurrence (initial/recurrent)                                     | 108/57          | 35.1/67.6                     | 55.1/83.6 | 67.1/90.1 | <0.001  | 2.935                 | 1.868-4.611 | <0.001  |
| Child-Pugh (class A/B)   | 150/15          | 44.8/60.0                     | 64.3/66.7 | 74.7/75.0 | 0.695   |                       |             |         |
| AST (IU/l) (<80/≥80)   | 132/33          | 45.6/48.5                     | 64.9/63.6 | 75.2/71.7 | 0.861   |                       |             |         |
| ALT (IU/l) (<80/≥80)   | 132/33          | 47.9/39.4                     | 66.6/57.6 | 76.7/66.1 | 0.363   |                       |             |         |
| T. Bil (mg/dl) (<1.5/≥1.5)   | 156/9           | 45.6/55.6                     | 64.3/66.7 | 75.0/66.7 | 0.795   |                       |             |         |
| PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) (<100/≥100)                            | 34/131          | 44.7/46.6                     | 63.4/64.9 | 78.0/72.5 | 0.885   |                       |             |         |
| PT (%) (<70/≥70)   | 31/134          | 32.8/49.3                     | 59.7/65.9 | 71.5/75.4 | 0.437   |                       |             |         |
| ICG-R15 (%) (<15/≥15)  | 75/90           | 46.7/45.8                     | 62.9/65.9 | 76.4/74.1 | 0.884   |                       |             |         |
| Preoperative AFP (ng/ml) (<10/≥10)                                       | 82/83           | 40.4/51.9                     | 61.7/67.3 | 73.9/75.1 | 0.408   |                       |             |         |
| Minimum postoperative AFP (ng/ml) (<10/≥10)                              | 111/54          | 34.4/70.4                     | 54.0/85.2 | 65.1/90.7 | <0.001  | 2.331                 | 1.574-3.453 | <0.001  |
| Preoperative DCP (mAU/ml) (<40/≥40)                                      | 64/101          | 47.0/45.6                     | 64.5/64.4 | 68.9/79.3 | 0.375   |                       |             |         |
| Minimum postoperative DCP (mAU/ml) (<40/≥40)                             | 147/18          | 43.0/72.2                     | 61.9/85.2 | 72.2/92.6 | 0.002   | 1.438                 | 0.787-2.626 | 0.237   |
| Operative procedure (<segmentectomy/≥segmentectomy)                      | 127/38          | 44.3/52.6                     | 64.8/63.2 | 75.0/72.4 | 0.600   |                       |             |         |
| Tumor size (cm) (<5/≥5)  | 129/36          | 42.8/58.3                     | 60.9/77.8 | 72.1/83.3 | 0.026   | 1.489                 | 0.887-2.500 | 0.132   |
| No. of nodules (solitary/multiple)                                       | 108/57          | 39.0/59.7                     | 59.2/74.5 | 70.3/82.5 | 0.007   | 0.851                 | 0.443-1.635 | 0.628   |
| Histological differentiation (well/moderate and poor)                    | 29/136          | 37.9/47.9                     | 56.3/66.3 | 60.7/78.4 | 0.095   |                       |             |         |
| Macroscopic vascular invasion (present/absent)                           | 7/158           | 71.4/45.1                     | 71.4/64.1 | 71.4/74.5 | 0.236   |                       |             |         |
| Microscopic vascular invasion (present/absent)                           | 43/122          | 69.8/37.9                     | 82.1/58.2 | 85.1/70.7 | <0.001  | 1.726                 | 0.951-3.130 | 0.073   |
| Intrahepatic metastasis (present/absent)                                 | 14/151          | 85.7/42.5                     | 85.7/62.6 | 92.9/72.6 | <0.001  | 3.066                 | 1.425-6.594 | 0.004   |
| Surgical margin (mm) (0/>0)  | 54/111          | 53.7/42.5                     | 71.6/60.9 | 83.4/69.7 | 0.080   |                       |             |         |
| Stage (UICC) (I/II, III and IV)  | 86/79           | 31.5/62.0                     | 51.6/78.5 | 65.2/84.6 | <0.001  | 1.352                 | 0.631-2.900 | 0.438   |
| Histological findings of non-cancerous lesions (cirrhosis/non-cirrhosis) | 60/105          | 50.6/43.8                     | 72.8/59.7 | 83.5/68.5 | 0.118   |                       |             |         |

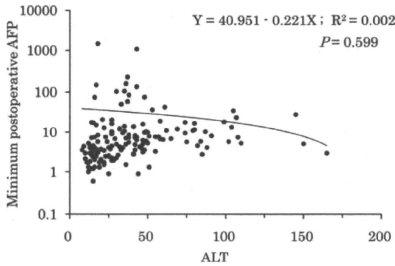


Figure 4. Correlation between minimum postoperative  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) and alanine aminotransferase (ALT) levels. There was no significant correlation ( $P=0.599$ ).

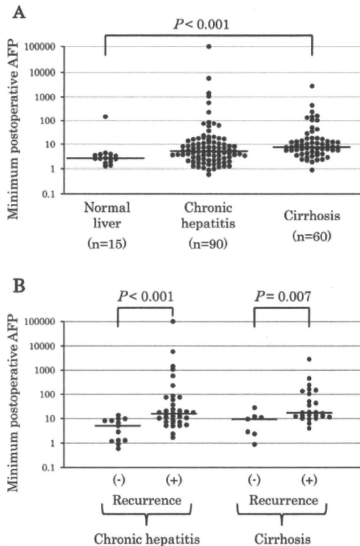


Figure 5. Correlation between minimum postoperative  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) and histological findings of non-cancerous lesions. (A) Patients were divided into three groups according to grade of underlying chronic liver disease. As underlying liver disease became more severe, minimum postoperative AFP level became greater ( $P<0.001$ ). (B) Furthermore, patients limited to those with a positive preoperative AFP level in each group were divided into two subgroups - with and without recurrence. Minimum postoperative AFP level in patients with recurrence exceeded that in patients without recurrence in the chronic hepatitis group ( $P<0.001$ ) and cirrhosis group ( $P=0.007$ ). Bars are medians.

regression analysis showed no statistically significant correlation ( $P=0.599$ ) (Fig. 4). To evaluate the correlation between AFP level and grade of underlying chronic liver disease, we compared minimum postoperative AFP level with histological findings of non-cancerous lesions. Fig. 5A shows

minimum postoperative AFP level of the patients divided into three groups according to underlying chronic liver disease. As chronic liver disease became more severe, minimum postoperative AFP level became greater, and the difference was statistically significant by Kruskal-Wallis rank test ( $P<0.001$ ). Furthermore, when patients were limited to those with a positive preoperative AFP level and the patients in each group were divided into two subgroups - those with and without recurrence, minimum postoperative AFP level of the patients with recurrence exceeded that of the patients without recurrence in the chronic hepatitis group ( $P<0.001$ ) and cirrhosis group ( $P=0.007$ ) (Fig. 5B).

## Discussion

In this study, we demonstrated that postoperative AFP level is a useful tool for predicting HCC recurrence after curative hepatectomy. The evidence for this is that most of the patients who experienced recurrence later did not show a negative change in AFP level after curative resection. Moreover, minimum postoperative AFP level was a significant independent risk factor for recurrence. On the other hand, most of the patients who experienced recurrence later as well as those who never experienced recurrence showed a negative change in DCP level after operation, and minimum postoperative DCP was not a significant risk factor in multivariate analysis. There was no statistically significant correlation between AFP level and grade of hepatitis activity, and thus a positive level of AFP after operation might suggest a site of residual viable cancer.

Imaging modalities, including US, dynamic CT and dynamic MRI, are the gold standard for diagnosis of HCC. However, in general, since they can only detect a cancer site greater than approximately 1 cm in diameter, smaller cancer sites are missed before operation. Although intraoperative US is used to try to detect other cancer sites that have not been detected before operation, the limitations of US include its operator dependence and its poor ability to differentiate early HCC from dysplastic nodules in the cirrhotic liver. Therefore a positive level of AFP after operation might suggest a viable residual cancer site that has been undetectable by imaging modalities.

One reported problem of AFP and DCP is low sensitivity (15,16). Although measurement of two tumor markers is recommended (17-19), the sensitivity for small HCC is not yet satisfactory. However, this study showed that, when classified by preoperative level, the sensitivity of minimum postoperative AFP level was high (80.0%), whereas that of minimum postoperative DCP level was still low (19.4%). This is because AFP is superior to DCP for the diagnosis of small HCC (20). Another reported problem of AFP is low specificity because of a high false-positive rate with benign conditions such as acute and chronic active hepatitis (21-24). Several authors have demonstrated that *Lens culinaris* agglutinin-reactive  $\alpha$ -fetoprotein (AFP-L3) can distinguish between HCC and hepatitis by detecting a sugar chain microheterogeneity (25-27). Our previous studies have demonstrated that glypican-3 (GPC3) is a novel tumor marker of HCC and is especially useful in the early stages because of its high sensitivity (28-31).

A limitation of our study is that it is difficult to determine whether an elevation of AFP is due to a residual cancer site or active hepatitis. However, our results showed no statistically significant correlation between levels of AFP and ALT, which is a well known marker of hepatitis activity (32,33). Although the histological findings of non-cancerous lesions showed a statistically significant correlation with AFP level, our results showed that patients who had higher postoperative AFP levels were most likely to experience recurrence. Moreover, not the grade of underlying chronic liver disease but postoperative AFP level was a significant risk factor for recurrence by univariate and multivariate analyses. Therefore, in most cases, a positive level of AFP after operation might mean a residual viable cancer site and not liver cirrhosis.

Generally, two different mechanisms are responsible for HCC recurrence (34). One is recurrence due to metastasis, originating from cancer cell dissemination from the primary tumor. The other is multicentric carcinogenesis of a new tumor based on underlying hepatitis or cirrhosis. However, they are not easily distinguishable (35). Instead, we distinguished between recurrence within 1 postoperative year and that after this time period as described previously (36). The result was that the majority of patients whose postoperative AFP level remained positive experienced recurrence within 1 postoperative year. Therefore, a positive level of AFP after operation suggests a site of residual viable cancer that has already occurred before operation.

In order to prevent HCC recurrence from a viable but undetectable cancer site, establishment of effective adjuvant therapy is urgently needed. We have just started a phase II clinical trial of GPC3-derived peptide vaccine for adjuvant therapy after curative operation or ablation. GPC3 is an ideal target for anticancer immunotherapy because its expression is detected specifically in most HCCs even in the early stages and is correlated with a poor outcome (37-41).

In conclusion, we have shown that minimum postoperative AFP level is an important risk factor for recurrence after curative hepatectomy. A positive level of AFP after operation might suggest a residual viable cancer site. The need for effective adjuvant therapy and close follow-up is suggested in patients with a positive postoperative AFP level. In addition, further studies will be needed to find novel useful serum markers that have better sensitivity for early detection of HCC recurrence.

#### Acknowledgements

This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants for Research on hepatitis from the Ministry of Health, Labor and Welfare.

#### References

- Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-543, 2001.
- McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS and Fraumeni JF Jr: International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer* 94: 290-296, 2001.
- El-Serag HB and Rudolph KL: Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557-2576, 2007.
- El-Serag HB: Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res* 37 (Suppl. 2): S88-S94, 2007.
- Ishii H, Yamamoto J and Ikari T: Adjuvant treatments for resectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 15: 459-462, 2008.
- Kudo M: Hepatocellular carcinoma 2009 and beyond: from the surveillance to molecular targeted therapy. *Oncology* 75 (Suppl. 1): S1-S12, 2008.
- Nomura F, Ohnishi K and Tanabe Y: Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. *Cancer* 64: 1700-1707, 1989.
- Shimada M, Takenaka K, Fujiwara Y, *et al*: Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein positive status as a new prognostic indicator after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 78: 2094-2100, 1996.
- Toyoda H, Kumada T, Osaki Y, *et al*: Staging hepatocellular carcinoma by a novel scoring system (BALAD score) based on serum markers. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1528-1536, 2006.
- Carr BI, Kanke F, Wise M and Satomura S: Clinical evaluation of *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci* 52: 776-782, 2007.
- Cucchetti A, Piscaglia F, Caturelli E, *et al*: Comparison of recurrence of hepatocellular carcinoma after resection in patients with cirrhosis to its occurrence in a surveilled cirrhotic population. *Ann Surg Oncol* 16: 413-422, 2009.
- Honda H, Ochiai K, Adachi E, *et al*: Hepatocellular carcinoma: correlation of CT, angiographic and histopathologic findings. *Radiology* 189: 857-862, 1993.
- Tagikawa Y, Sugawara Y, Yamamoto Y, *et al*: New lesions detected by intraoperative ultrasound during liver resection for hepatocellular carcinoma. *Ultrasound Med Biol* 27: 151-156, 2001.
- Sobin LH and Wittekind CH: UICC: TNM classification of malignant tumors, 6th edition. Wiley-Liss, New York, 2002.
- Fujiyama S, Izuno K, Gohshi K, Shibata J and Sato T: Clinical usefulness of des-gamma-carboxy prothrombin assay in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 36: 1787-1792, 1991.
- Sherman M: Surveillance for hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 28: 450-459, 2001.
- Izuno K, Fujiyama S, Yamasaki K, Sato M and Sato T: Early detection of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis by combined assay of des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein: a prospective study. *Hepatogastroenterology* 42: 387-393, 1995.
- Toyoda H, Kumada T, Kiriyaama S, *et al*: Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 111-117, 2006.
- Makuchi M, Kokudo N, Arai S, *et al*: Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res* 38: 37-51, 2008.
- Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, *et al*: Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol* 101: 2038-2043, 2006.
- Kew M: Alpha-fetoprotein in primary liver cancer and other diseases. *Gut* 15: 814-821, 1974.
- Bloomer JR, Waldmann TA, McIntire KR and Klatskin G: Alpha-fetoprotein in non-neoplastic hepatic disorders. *JAMA* 233: 38-41, 1975.
- Alpert E and Feller ER: Alpha-fetoprotein (AFP) in benign liver disease. Evidence that normal liver regeneration does not induce AFP synthesis. *Gastroenterology* 74: 856-858, 1978.
- Bayati N, Silverman AL and Gordon SC: Serum alpha-fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 93: 2452-2456, 1998.
- Okuda K, Tanaka M, Kanazawa N, *et al*: Evaluation of curability and prediction of prognosis after surgical treatment for hepatocellular carcinoma by lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *Int J Oncol* 14: 265-271, 1999.
- Hayashi K, Kumada T, Nakano S, *et al*: Usefulness of measurement of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein as a marker of prognosis and recurrence of small hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 94: 3028-3033, 1999.

27. Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, *et al.*: Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative ablation using three tumor markers. *Hepatology* 44: 1518-1527, 2006.
28. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, *et al.*: Glypican-3, over-expressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 16-25, 2003.
29. Nakatsura T and Nishimura Y: Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19: 71-77, 2005.
30. Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, *et al.*: Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol* 34: 649-656, 2009.
31. Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, *et al.*: Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol Rep* 22: 149-154, 2009.
32. Terao K, Takemiya S, Tamai S, *et al.*: Relationship between the recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) and serum alanine aminotransferase levels in hepatectomized patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis and HCC. *Cancer* 79: 688-694, 1997.
33. Goldstein NS, Blue DE, Hankin R, *et al.*: Serum alpha-fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C. Relationships with serum alanine aminotransferase values, histologic activity index, and hepatocyte MIB-1 scores. *Am J Clin Pathol* 111: 811-816, 1999.
34. Nakashima O and Kojiro M: Recurrence of hepatocellular carcinoma: multicentric occurrence or intrahepatic metastasis? A viewpoint in terms of pathology. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8: 404-409, 2001.
35. Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, *et al.*: Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 38: 200-207, 2003.
36. Choi GH, Kim DH, Kang CM, *et al.*: Prognostic factors and optimal treatment strategy for intrahepatic nodular recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 15: 618-629, 2008.
37. Nakatsura T, Komori H, Kubo T, *et al.*: Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* 10: 8630-8640, 2004.
38. Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, *et al.*: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res* 66: 2414-2422, 2006.
39. Komori H, Nakatsura T, Senju S, *et al.*: Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 2689-2697, 2006.
40. Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, *et al.*: HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induce specific CTLs: preclinical study using mice. *Int J Oncol* 32: 985-990, 2008.
41. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, *et al.*: Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 100: 1403-1407, 2009.