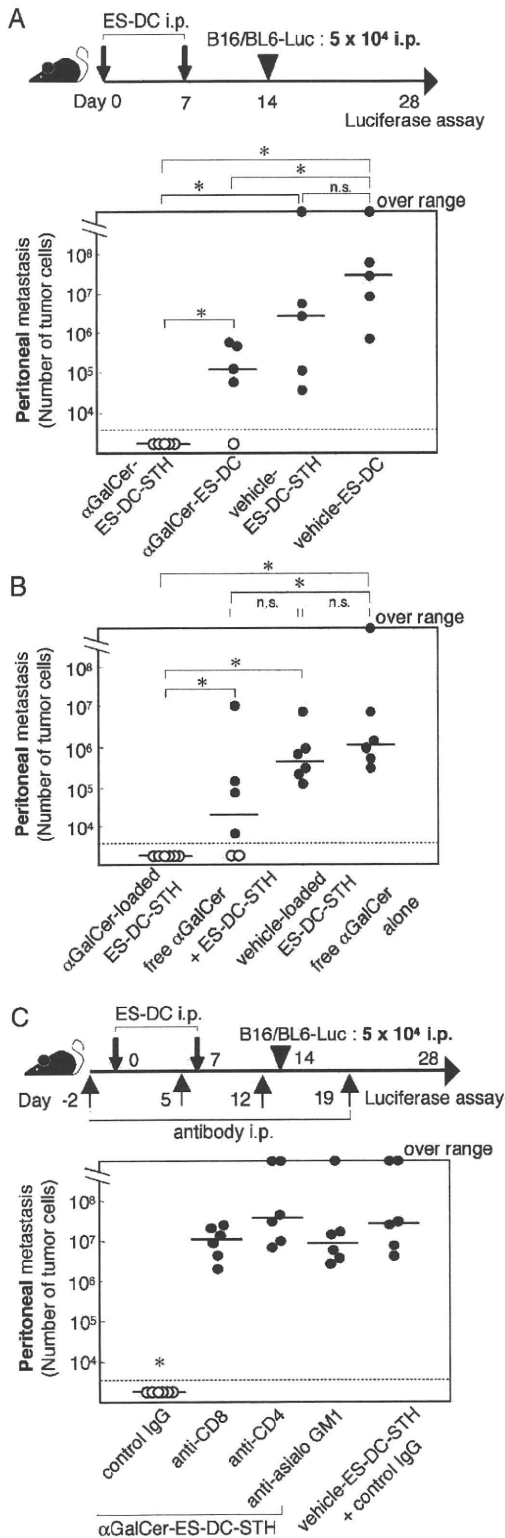


IP into mice twice on days 0 and 7. On day 14, 2×10^6 B16-BL6/Luc cells were inoculated into the footpad of mice. On day 35, the mice were euthanized, the lungs were excised, and luciferase activities were measured. As shown in Figure 7A, in vivo transfer of a mixture of 3 kinds of

TAA-transfectant ES-DC loaded with α -GalCer induced significant protection compared with α -GalCer-loaded ES-DC without TAA also in the spontaneous pulmonary metastasis model. In this model, we have no evidence indicating that the loading of α -GalCer to TAA-expressing ES-DC provided any benefit in regard to inhibiting the local tumor growth in the primary lesion. This result may be owing to the tissue distribution of NKT cells. NKT cells are known to mainly localize in the liver, lung, spleen, bone marrow, and peritoneal cavity.

Finally, the effects of the in vivo transfer of a mixture of 3 kinds of TAA-transfectant ES-DC loaded with α -GalCer in the therapeutic setting on lymph node metastasis and peritoneal dissemination were evaluated. On day 0, 2×10^6 B16-BL6/Luc cells were inoculated into the footpad or 1×10^4 tumor cells were inoculated IP into mice. On days 3 and 10, ES-DC were transferred IP, and on day 21 or 17, respectively, the mice were euthanized and luciferase activities were measured. Multiple TAA-targeted ES-DC loaded with α -GalCer induced significant therapeutic effects compared with α -GalCer-loaded ES-DC without TAA in the model of spontaneous metastasis to inguinal lymph node (Fig. 7B). As shown in Figure 7C, although the in vivo transfer of α -GalCer-loaded ES-DC without TAA or vehicle-loaded ES-DC with TAA showed insufficient effects, a mixture of 3 kinds of TAA-transfectant ES-DC loaded with α -GalCer induced a significant therapeutic effect in the peritoneal dissemination model.



DISCUSSION

The anticancer effects of multiple TAA-targeted immunotherapies against mouse melanoma were evaluated by using α -GalCer-loaded and genetically engineered ES-DC. Four TAA that were naturally overexpressed in melanoma were selected, GPC3, SPARC, TRP2, and gp100. SPARC is expressed in various types of cancer tissues^{35,36} and implicated in evasion of cancers from

FIGURE 6. Preventive anticancer effects of multiple tumor-associated antigen-targeted vaccinations with α -GalCer-loaded ES-DC. A, The mixture of ES-DC-SPARC, ES-DC-TRP2, and ES-DC-hgp100 (3×10^5) loaded with either α -GalCer (α -GalCer-ES-DC-STH) or vehicle (vehicle-ES-DC-STH) or nontransfectant ES-DC loaded with either α -GalCer (α -GalCer-ES-DC) or vehicle (vehicle-ES-DC) were transferred IP into mice twice on days 0 and 7, and 5×10^4 B16-BL6/Luc cells were inoculated IP into mice on day 14. On day 28, the mice were euthanized and the greater omentum and pancreas were excised together and the total luciferase activities were measured. B, 3×10^5 α -GalCer-loaded ES-DC-STH, free α -GalCer ($1 \mu\text{g}/\text{mouse}/\text{transfer}$) combined with ES-DC-STH, vehicle-loaded ES-DC-STH, and free α -GalCer alone ($1 \mu\text{g}/\text{mouse}/\text{transfer}$) were transferred IP into mice twice on days 0 and 7. About 5×10^4 B16-BL6/Luc cells were inoculated and luciferase activities were measured using the same protocol as A. C, CD4^+ T, CD8^+ T, or NK cells were depleted in vivo by the IP transfer of anti-CD4 mAb, anti-CD8 mAb, or polyclonal rabbit anti-asialo GM1 Ab. During this procedure, the mice were immunized with α -GalCer-loaded or vehicle-loaded ES-DC-STH and challenged IP with B16-BL6/Luc cells in the same protocol as A. Dotted line indicates the detection limit (A, $n=5$; B and C, $n=6$; $*P<0.05$). The data are each representative of 2 independent experiments with similar results. ES-DC indicates embryonic stem cell-derived dendritic cells; hgp100, human gp100; IP, intraperitoneal; mAb, monoclonal antibody; NK, natural killer; SPARC, secreted protein acidic and rich in cysteine; TRP2, tyrosinase-related protein-2; α -GalCer, α -galactosylceramide.

immune attack.^{37,38} The present study is the first to demonstrate that SPARC can be a target antigen for cancer immunotherapy. Figures 2B, 3A and 4D show that the effect of SPARC as the target antigen was comparable

with the previously known melanoma-associated antigen, TRP2, or gp100.

CTL specific to each TAA were sensitized by the in vivo transfer of DC transfected with *GPC3*, *SPARC*, *TRP2*, or *hgp100* gene. However, the anticancer effects of ES-DC expressing single TAA in vivo were insufficient (Fig. 4D). These results are quite similar to the situation of recent T cell-targeted cancer immunotherapy. Using DC expressing multiple TAA for cancer immunotherapy makes sense and several studies have been reported.³⁹⁻⁴¹ However, there are very few reports that directly demonstrate the advantage of multiple as compared with single TAA-targeted immunotherapy.⁴² As shown in Figures 3B, C and 4D, preimmunization with the mixture of 3 independent TAA transfectant ES-DC protected the mice more efficiently than the ES-DC expressing single TAA. The enhancement of antitumor immunity by the transfer of a mixture of 3 kinds of TAA-transfectant DC could be owing to an increase of number of CTL attacking tumor cells and a low frequency of immune escape.

In the past decade, α -GalCer has been attracting attention as a novel immunostimulatory reagent for cancer immunotherapy. CD1d is monomorphic and thus CD1d- α -GalCer-complex on DC can stimulate the NKT cells of any recipients. On the basis of the promising results of preclinical studies demonstrating the anticancer effects of α -GalCer-loaded DC,²⁰ several phase 1 clinical studies have been conducted. Although the activation and expansion of NKT cells by the administration of α -GalCer-loaded DC has been observed, the results seemed to be unsatisfactory from the viewpoint of the clinical effects.⁴³⁻⁴⁶ The present study evaluated the effects of loading α -GalCer onto ES-DC-expressing endogenous TAA to induce anticancer immunity. Upon loading with α -GalCer, ES-DC had a capacity to activate NKT cells (Fig. 5). Figure 5C showed that the killing activity induced by the in vivo administration of α -GalCer-loaded ES-DC through the activation of NKT cells was sustained 1 week, and after 2 weeks the effect decreased to the background level. Despite this transient NKT cell activating capacity of α -GalCer-loaded ES-DC, anticancer effects induced by a mixture of 3 kinds of TAA-transfectant ES-DC loaded with α -GalCer showed a potent effect on inhibiting the growth of B16-BL6/Luc at 2 or 5 weeks after the administration as shown in Figures 6

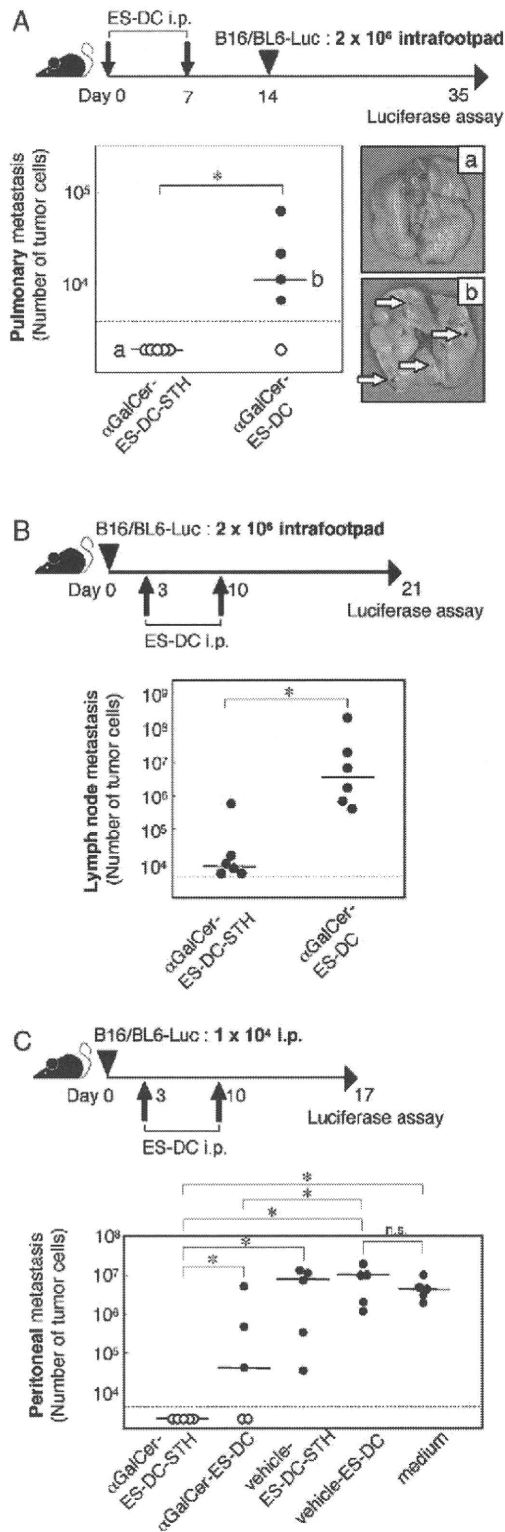


FIGURE 7. Potent anticancer effects of multiple tumor-associated antigen-targeted vaccinations with α -GalCer-loaded ES-DC. A, About 3×10^5 of α -GalCer-ES-DC-STH or α -GalCer-ES-DC were transferred IP into mice twice on days 0 and 7. On day 14, 2×10^6 B16-BL6/Luc cells were inoculated into the footpad of mice. On day 35, the mice were euthanized, the lungs were excised, and luciferase activities were measured. Typical examples of pulmonary metastasis of B16-BL6/Luc cells in mice are shown: above; A, α -GalCer-ES-DC-STH; below; B, α -GalCer-ES-DC. B, On day 0, 2×10^6 B16-BL6/Luc cells were inoculated into the footpad of mice. On days 3 and 10, each ES-DC was transferred IP. On day 21, the mice were euthanized and the luciferase activities of the inguinal lymph nodes were measured. C, On day 0, 1×10^4 B16-BL6/Luc cells were inoculated IP into mice. On days 3 and 10, each ES-DC was transferred IP. On day 17, the mice were euthanized and the luciferase activities of the greater omentum and pancreas were measured. Dotted line indicates the detection limit (A and C, n=5; B, n=6; *P<0.05). The data are each representative of 2 independent experiments with similar results. ES-DC indicates embryonic stem cell-derived dendritic cells; IP, intraperitoneal; α -GalCer, α -galactosylceramide.

and 7. In contrast, α -GalCer-loaded ES-DC without TAA showed an insufficient effect under the same conditions. This suggests that α -GalCer-loaded ES-DC have potent, antigen nonspecific effect in the early phase after administration, but sustained anticancer effect requires activation of TAA-specific CTL induced by ES-DC expressing TAA. Interestingly, the others reported that NKT cells activation induced by α -GalCer-loaded mature DC helped to boost adaptive immunity *in vivo*.⁴⁵ We performed an IFN- γ enzyme-linked immunosorbent spot assay to investigate whether the loading of α -GalCer to TAA-expressing DC would enhance the TAA-specific immunoresponse. However, no significant enhancement was observed when the mice were immunized with α -GalCer-loaded TAA-expressing DC in comparison with the vehicle-loaded TAA-expressing DC (unpublished observation). The preventive effects of the immunization with α -GalCer-loaded TAA-expressing DC (compared with vehicle-loaded TAA-expressing DC) were almost totally abrogated when the CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, or NK cells were depleted (Fig. 6C). Collectively, we considered that the enhanced antitumor effects induced by α -GalCer-loaded TAA-expressing DC came from the cooperative work of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells.

Anticancer immunotherapy with DC loaded with human leukocyte antigen (HLA)-binding peptides derived from TAA has been tested clinically in many institutions. In most cases, the DC are generated by culture of monocytes obtained from peripheral blood of the patients. To generate a sufficient number of DC for treatment, apheresis, a procedure that is sometimes invasive for patients with advanced stages of cancer, is necessary. In addition, the culture to generate DC should be carried out separately for each patient and treatment, and thus the procedure used at present may be too labor-intensive and expensive to be applied broadly in a practical setting. Alternately, the source of ES-DC, ES cells, has the capacity to propagate infinitely and multiple gene-transfectant ES-DC can be generated by the sequential transfection of ES cells with vectors bearing different selection markers.^{18,24,25} Generation and genetic modification of ES-DC from human ES cells is achieved by the currently established method.⁴⁷ It may, therefore, be possible to generate multiple gene-transfectant human ES-DC expressing TAA plus immunostimulating molecules, which could thus more potently stimulate anticancer immunity than monocyte-derived DC do.

Considering the future clinical application of ES-DC, allogenicity (ie, differences in the genetic background) between patients to be treated and ES cells as a source for DC may cause problems. However, it is expected that human ES cells sharing some HLA alleles with the patients will be available for most cases. Mouse ES-DC administered into semiallogenic recipients, sharing 1 major histocompatibility complex (MHC) haplotype with the ES-DC, effectively primed antigen-specific CTL, thus suggesting that ES-DC can survive for a sufficient period to stimulate antigen-specific CTL restricted by the shared MHC class I.⁴⁸ However, in the same semiallogenic setting, the 5 times injection of nonantigen-loaded ES-DC significantly reduced the efficiency of priming of antigen-specific CTL induced by the subsequent injection of antigen-loaded ES-DC (unpublished observation). Therefore, repetitive stimulation with ES-DC expressing allogenic MHC may result in activation and expansion of allogenic MHC class I-reactive CTL, and in such recipients subsequently

transferred ES-DC may be rapidly eliminated. Repeated immunization may be required in clinical applications to induce strong anticancer immunity. Therefore, the problem of the histoincompatibility between ES cell lines and recipients should be resolved. The methods for targeted gene modification of human ES cells and for targeted chromosome elimination of mouse ES cells have been developed. To overcome the problem of histoincompatibility, genetic modification to inhibit expression of endogenous HLA class I in ES-DC may be effective. A disruption of the genes for the molecules necessary for the cell surface expression of HLA class I molecules, such as transporter associated with antigen processing or β 2-microglobulin (β 2M), is presumably feasible. Along this line, we recently reported that the efficient activation of antigen-specific CTL was induced by TAP1 or β 2M disrupted and recipient-matched MHC class I introduced mouse ES-DC.¹⁹ We are now preparing to introduce expression vector encoding for β 2M-linked form of recipient-matched HLA class I heavy chain into TAP1-deficient or β 2M-deficient human ES cells.

Previous studies on ES-DC were performed by using well-established TT2 ES cells.^{15,18,28} The present study confirmed that ES-DC could be generated from B6 ES cells with the same method previously established by using TT2 ES cells.¹⁷ ES-DC generated from B6 ES cells were comparable with TT2 ES cells in differentiation, proliferation, surface phenotype, and antigen presentation. In addition, ES-DC could be generated from other ES cell lines (unpublished observation), thus suggesting that the method to generate ES-DC can be applied to various types of mouse ES cells.

Other studies have reported the generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult human dermal fibroblasts with the defined 4 factors: Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc.⁴⁹ Human iPS cells are similar to human ES cells in morphology, proliferation, surface antigens, gene expression, epigenetic status of pluripotent cell-specific genes, and telomerase activity. DC can be generated from mouse iPS cells (unpublished observation) and testing is underway to determine whether DC could be generated from human iPS cells. Tailor-made medicine may, therefore, someday be possible if "iPS-DC" can be generated in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs H. Suemori and N. Nakatsuji for B6, Dr M. Nishikawa for pCMV-Luc, and Kirin Brewery for α -GalCer.

REFERENCES

1. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004;10:909–915.
2. Finke LH, Wentworth K, Blumenstein B, et al. Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies—outcomes from the 2006 meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC). *Vaccine*. 2007;25(suppl 2):B97–B109.
3. Ostrand-Rosenberg S. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:143–150.
4. Kageshita T, Ishihara T, Campoli M, et al. Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens*. 2005;65:419–428.
5. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma,

- is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306:16–25.
6. 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.* 2004;10:8630–8640.
 7. 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.* 2006;12:2689–2697.
 8. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 1994;8:163–173.
 9. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6612–6621.
 10. Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, et al. Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res.* 2005;11:8079–8088.
 11. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood.* 2004;104:2235–2246.
 12. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007;449:419–426.
 13. Murphy A, Westwood JA, Teng MW, et al. Gene modification strategies to induce tumor immunity. *Immunity.* 2005;22:403–414.
 14. Kaplan JM, Yu Q, Piraino ST, et al. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J Immunol.* 1999;163:699–707.
 15. 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.* 2006;66:2414–2422.
 16. Fairchild PJ, Brook FA, Gardner RL, et al. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol.* 2000;10:1515–1518.
 17. Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood.* 2003;101:3501–3508.
 18. Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al. Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. *J Immunol.* 2004;172:776–786.
 19. Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, et al. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by beta2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2008;181:6635–6643.
 20. Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, et al. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol.* 2002;3:867–874.
 21. Senju S, Iyama K, Kudo H, et al. Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of GTPBP1. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6195–6200.
 22. Niwa H, Masui S, Chambers I, et al. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22:1526–1536.
 23. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991;108:193–199.
 24. Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J Immunol.* 2005;174:1888–1897.
 25. Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J Immunol.* 2007;178:918–925.
 26. Watarai H, Nakagawa R, Omori-Miyake M, et al. Methods for detection, isolation and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat Protoc.* 2008;3:70–78.
 27. Bohm W, Thoma S, Leithauser F, et al. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol.* 1998;161:897–908.
 28. Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake Y, et al. Therapeutic effect of alpha-galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Sci.* 2005;96:889–896.
 29. Overwijk WW, Tsung A, Irvine KR, et al. gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of “self”-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med.* 1998;188:277–286.
 30. Hyoudou K, Nishikawa M, Umeyama Y, et al. Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10:7685–7691.
 31. Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, et al. Inhibition of adhesion and proliferation of peritoneally disseminated tumor cells by pegylated catalase. *Clin Exp Metastasis.* 2006;23:269–278.
 32. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:10913–10918.
 33. Harada M, Seino K, Wakao H, et al. Down-regulation of the invariant Valpha14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *Int Immunol.* 2004;16:241–247.
 34. Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, et al. PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:1449–1458.
 35. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, et al. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol.* 1999;30:339–344.
 36. Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, et al. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:319–325.
 37. Sangalotti S, Stoppacciaro A, Guiducci C, et al. Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *J Exp Med.* 2003;198:1475–1485.
 38. Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res.* 2005;65:5123–5132.
 39. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001;61:6451–6458.
 40. Wang B, He J, Liu C, et al. An effective cancer vaccine modality: lentiviral modification of dendritic cells expressing multiple cancer-specific antigens. *Vaccine.* 2006;24:3477–3489.
 41. Kavanagh B, Ko A, Venook A, et al. Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J Immunother.* 2007;30:762–772.
 42. Mendiratta SK, Thai G, Eslahi NK, et al. Therapeutic tumor immunity induced by polyimmunization with melanoma antigens gp100 and TRP-2. *Cancer Res.* 2001;61:859–863.
 43. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, et al. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood.* 2004;103:383–389.
 44. Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, et al. A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in

- patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1910–1917.
45. Chang DH, Osman K, Connolly J, et al. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med.* 2005;201:1503–1517.
46. Uchida T, Horiguchi S, Tanaka Y, et al. Phase I study of alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:337–345.
47. Senju S, Suemori H, Zembutsu H, et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells.* 2007;25:2720–2729.
48. Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al. Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:5–13.
49. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131:861–872.

IX. 肝癌の治療

腫瘍因子からみた治療戦略

多発肝細胞癌

Treatment strategy of multiple hepatocellular carcinoma

古瀬純司

Key words : 多発肝細胞癌, 肝内転移, 多中心性発生, 肝動脈化学塞栓療法, 化学療法

はじめに

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) は肝内に複数の病変を認める多発肝細胞癌の病態を示す場合が多く, 病変数は治療戦略上大きな要素となる。肝細胞癌に対する治療選択のガイドラインとして, 我が国では肝癌診療ガイドラインが作成され, 単発, 2 または 3 個, および 4 個以上で治療選択が異なってくる。更に肝細胞癌では多発の病態として肝内転移と多中心性発生があり, 治療選択や予後も異なる。

本稿では, 多発肝細胞癌の概念や診断, 治療

選択について概説する。

1. 概念・定義

日本肝癌研究会の全国原発性肝癌追跡調査報告 (第 17 回; 2002-2003) では, 16,187 例中, 単発 57.9%, 2 個以上 42.1% であり, ほぼ半数が多発肝細胞癌である¹⁾。肝内の多発病変については, その成因として, 主病巣からの肝内転移 (intrahepatic metastasis) と多中心性発生 (multicentric occurrence) があり (表 1)²⁾, 治療選択と予後の推定に大きくかかわってくる。

肝細胞癌の多中心性発生の診断として, 分子

表 1 多発肝細胞癌の種類 (文献²⁾より引用)

肝内転移	1) 門脈腫瘍栓 (portal vein tumor thrombus) あるいは, これを基盤として増殖したと考えられる癌病変 2) 最大の癌腫の近傍に多く, 離れるに従って数が少なくなるような癌病変群 3) 孤立性の癌病変でも, 最大の癌腫の近傍にあり, それに比して明らかに小さく, かつ組織型がそれと同様か, 分化度が低い癌病変
多中心性発生	肝細胞癌の複数病変がみられ, 以下のその場で発生し増殖しつつある病変が強く推定される病変 1) 腺腫様過形成 (adenomatous hyperplasia) や既存の肝構築を保つ早期肝細胞癌 2) 中分化, あるいは低分化癌組織の辺縁に高分化癌組織の存在を認める肝細胞癌

Junji Furuse: Department of Internal Medicine, Medical Oncology, School of Medicine, Kyorin University 杏林大学医学部 腫瘍内科

0047-1852/09/¥40/頁/JCLS

生物学的手法や遺伝子解析による試みが行われている。B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) 関連の肝細胞癌において、HBV DNA の組み込みパターンを解析することにより、多中心性発生が証明されている。Sakamoto らは、1 人の患者から切除された 2 つの離れた病変において、Southern blot 法を用いて HBV DNA の clonality を解析し、それぞれ異なった組み込みパターンが認められたことから、これらが独立して発生した肝細胞癌であると報告している³⁾。また、Sheu らは、DNA fingerprinting 法により 9 人中 7 人の肝細胞癌患者において、異なった HBV DNA の clonality をもつ複数の病変があることを確認している⁴⁾。Oda らは、p53 癌抑制遺伝子の変異を検索することにより肝細胞癌の多段階発育や多中心性発生の診断が可能と報告している⁵⁾。

しかし、実際の臨床では、原発巣(多中心性発生)か転移巣(肝内転移)か診断が困難な場合が多く、画像診断での特徴や臨床経過が大きな判断根拠となる。

2. 診 断

多発肝細胞癌の診断としては、複数の病変の検出すなわち数の診断と、それが肝内転移によるものか多中心性発生によるものかの病態診断に分けられる。多くの肝細胞癌では動脈から血流が供給されており、造影早期で濃染され、後期で wash out による欠損像として描出される。早期の高分化型肝細胞癌では動脈血流を受けることが少なく、腫瘍内血流を欠く場合が多い。一部では門脈支配の優位を示す病変もみられる。中分化癌あるいは低分化癌では動脈血流が増大し、最終的には動脈血のみの支配となる⁶⁾。それぞれの病変が異なる画像所見を示し、動脈血流の少ない病変あるいはそれを含む病変では多中心性発生を示唆し、動脈相で濃染する均一な病変は肝内転移を考える。

画像診断の発達により、極めて小病変の検出が可能となり、かなり正確な診断が行われるようになってきた。現在、数の診断として、超音波、dynamic CT、MRI、血管造影、動脈造影

CTが行われている。超音波は最も簡便な検査法として最初に行われることが多く、他の検査法で検出されない早期の小肝癌が描出されることも多い。造影超音波検査により腫瘍内血流の診断や造影後期での filling defect による小病変の検出能も上がっている。CTはmulti-detector-row CT(MDCT)が主流であり、空間分解能、時間分解能の高い画像データ収集により小病変の検出が可能となっている。超音波や造影CT(dynamic CT)の造影パターンにより、腫瘍の性状が把握され、多中心性発生か肝内転移かの診断の補助となる。MRIの画像も急速に向上しており、更に拡散強調画像など新しい診断法が行われている。動脈造影CTは肝動脈から造影してCT撮影を行うCT during hepatic arteriography (CTA)と経上腸間膜動脈的に門脈造影を行って撮影するCT during arterial portography (CTAP)が行われる。肝細胞癌の病変はCTAで高吸収域として描出され、CTAPでは非腫瘍部の肝組織が門脈血流により染まり、腫瘍部は門脈血流を欠くため低吸収域となる。しかし、CTやMRIの診断能が発達しており、血管造影を用いた診断としての意義は少なくなっている。

3. 臨床的特徴と予後

多発肝細胞癌では同時性多発と異時性多発の2つの面を考える必要がある。肝細胞癌は比較的早期から経門脈性の肝内転移をきたしやすい。根治的な治療が行われても、検出されない微小転移巣が既に存在し、早期に多発性の再発を認めることも少なくない。また、多くの肝細胞癌の背景にHBVあるいはC型肝炎ウイルス(HCV)の感染による慢性炎症を伴っており、異時性の多中心性発生も考慮する必要がある。Aizawa らは、C型肝炎の肝線維化の違いにより severe fibrosis と mild fibrosis では累積肝細胞癌発症率はそれぞれ8年で28%、6%、13年で45%、23%であり(年間発症率3.5%、0.75%)、有意差を認めたと報告している(relative risk: 3.48, 95%CI: 1.51-8.06, p=0.004)⁷⁾。

単発例と多発例においては、当然予後に差が

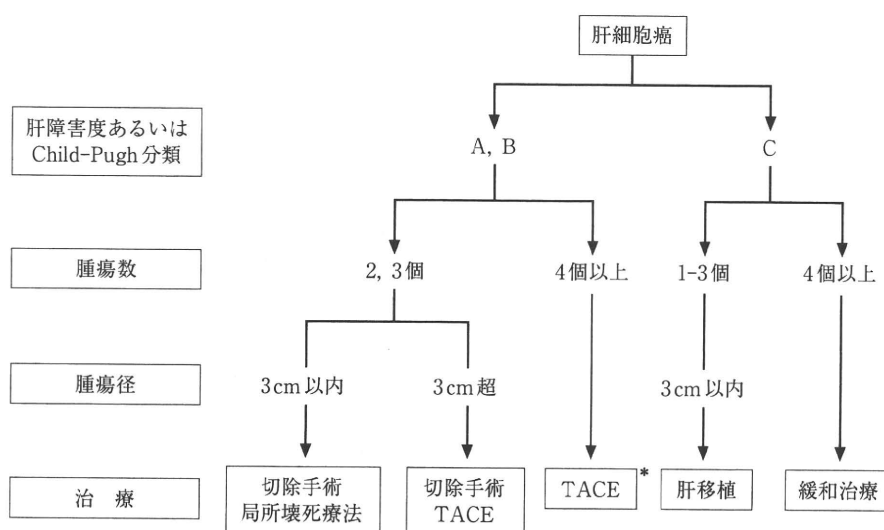


図1 多発肝細胞癌の治療戦略(肝癌診療ガイドライン‘肝細胞癌治療アルゴリズム’⁹⁾を基に作成)

TACE: 肝動脈化学塞栓療法. *TACEの無効例, 血管侵襲, 肝外転移例では今後, 全身化学療法が適応となる.

みられる。日本肝癌研究会の全国原発性肝癌追跡調査報告によると、肝切除において単発、2個、3個以上と腫瘍数の増加に伴い5年生存率もそれぞれ59.2%、46.4%、30.0%と低下している¹⁾。多中心性発生病例と肝内転移例の予後の差については、正確な診断が困難な場合が多く実際の臨床では難しいが、Okusakaらは、根治的に切除された多発肝細胞癌において、原発性肝癌取扱い規約の基準に基づき、多中心性発生病例と肝内転移例に分類し、その予後を検討している⁸⁾。それによると3年無再発生存率と3年生存率はそれぞれ23%、8%と92%、51%であり、多中心性発生病例で有意に良好な予後が得られたとしている⁸⁾。

4. 治 療

肝細胞癌の治療においては、腫瘍数、大きさ、腫瘍塞栓の有無などの進行度と肝障害度に応じた治療選択が必要である。また、同じ多発癌でも多中心性発生病例と肝内転移例では治療戦略も異なってくる。多中心性発生ではそれぞれが局所にとどまっていることから、効果的な局所治療により根治を目指した治療が選択されるべき

である。一方、肝内転移では顕在病変の治療だけでなく、微小転移巣を考慮した治療を選択することが基本的な考え方となり、初回治療あるいは再発時において、肝動脈化学塞栓療法(transcatheter arterial chemoembolization: TACE)など経動脈の治療を組み合わせた併用療法が必要となる。実際の臨床では3個以内であれば多中心性発生の可能性が高く、切除やラジオ波焼灼療法などの局所壊死療法が適応となり、4個以上であれば肝内転移の関与が高いと判断され、TACEが適応となるというのが一般的なコンセンサスである。

多発肝細胞癌の治療戦略として、我が国の肝癌診療ガイドライン‘肝細胞癌治療アルゴリズム’では、肝障害度A, Bかつ2, 3個であれば、腫瘍径3cm以内なら切除あるいは局所壊死療法、3cm超なら切除あるいはTACEが推奨されている(図1)⁹⁾。これは日本肝癌研究会の追跡調査に基づいており、腫瘍径2cm以内では腫瘍数2個および3個での治療成績は肝切除、局所壊死療法(エタノール注入)で差はなく、また腫瘍径2-5cmでも2個あるいは3個での治療成績は両者で有意差はないと報告されている¹⁰⁾。

また切除, エタノール注入療法(PEI), TACEの後ろ向き比較試験では腫瘍径3cm以下, 3個以内, 肝機能良好例で切除とPEIでは差がなかったものの, TACEでは有意に予後不良であったと報告されている¹¹⁾. 局所壊死療法は一般に腫瘍径3cm以下で適応されており, 上記のアルゴリズムのような治療選択となる. 一方, 肝障害度Cの肝機能不良例ではこれらの治療は原則として適応にならない. 3個以内, 腫瘍径3cm以下(単発は5cm以内)であれば肝移植が, それ以外は症状緩和治療が勧められる.

肝障害度A, Bかつ4個以上の場合にはTACEが選択される. 多発肝細胞癌におけるTACEの有用性はランダム化比較試験およびメタアナリシスで検証されている. Llovetらは, 切除不能肝細胞癌を対象(65-77%が多発例)にgelatin spongeとdoxorubicinによるTACE, gelatin spongeのみの塞栓療法(TAE)および保存的治療のみ(対照群)の3群によるランダム化比較試験を行い, 2年生存率がTACE 63%, TAE 50%, 対照群 27%と対照に比べTACEで有意に予後が良好であったと報告している¹²⁾. また, 6つのランダム化比較試験のメタアナリシス(503例)でも塞栓療法による2年生存率の有意な改善が示されている(オッズ比0.53, $p=0.017$)¹³⁾.

門脈腫瘍塞栓や肝静脈腫瘍塞栓を伴う多発肝細胞癌や巨大腫瘍の場合, TACEの適応はなく, 標準的な治療法は確立していない. そのような例に対して動注化学療法が行われることが多い. 動注化学療法では高濃度の抗癌剤を肝細胞癌に直接投与することにより, 局所濃度を高め, 全

身への影響を抑えることが治療の根拠となっている. cisplatin単独, 5-FU+cisplatin, 5-FU+interferonなどのレジメンが主に行われ, 全身化学療法に比べ高い奏効率が得られている. しかし, 生存に関する有用性は十分に検証されており, 肝臓診療ガイドラインでも十分な科学的根拠がないとされている.

全身化学療法は, 切除, 局所壊死療法, TACEなどの局所療法が適応とならない, あるいは無効の場合に適応となる. これまで多くの臨床試験が行われてきたが, 生存期間に寄与する標準治療は確立していなかった. 近年, 癌の進展, 増殖にかかわる様々なシグナル伝達が明らかとなり, それらをターゲットとした分子標的薬の開発が行われてきている. その中で, 上皮成長因子レセプター(EGFR)の下流であるRAFキナーゼとVEGFR-1-3, PDGFR- β などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬 sorafenib を用いて, placebo controlのランダム化比較試験が行われた¹⁴⁾. その結果, 全生存期間中央値は sorafenib 群 10.7カ月, control群 7.9カ月, ハザード比 0.69(95%CI: 0.55-0.87, $p<0.001$)と control群に比べ sorafenib 群で有意な生存期間の改善が確認され¹⁴⁾, 欧米を中心に多くの国で肝細胞癌に適応が承認されている. 我が国でも保険適応の承認が待たれており, 局所治療の適応とならない多発肝細胞癌(肝外転移を含む)に対する標準治療として確立していくものと考えられる. 更に現在, 肝細胞癌に対し, 多くの分子標的薬が開発されており¹⁵⁾, 今後, 多発肝細胞癌の予後改善につながるものと期待される.

■ 文 献

- 1) 日本肝癌研究会追跡調査委員会(委員長工藤正俊): 第17回全国原発性肝癌追跡調査報告(2002-2003). 肝臓 48: 117-140, 2007.
- 2) 日本肝癌研究会(編): 肝内転移と多中心性発生. 臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約, 第5版, p43, 金原出版, 2008.
- 3) Sakamoto M, et al: Multicentric independent development of hepatocellular carcinoma revealed by analysis of hepatitis B virus integration pattern. Am J Surg Pathol 13: 1064-1067, 1989.
- 4) Sheu JC, et al: Multiple hepatocellular carcinomas at the early stage have different clonality. Gastroenterology 105: 1471-1476, 1993.
- 5) Oda T, et al: Mutation pattern of the p53 gene as a diagnostic marker for multiple hepatocellular carcinoma. Cancer Res 52: 3674-3678, 1992.
- 6) Hayashi M, et al: Correlation between the blood supply and grade of malignancy of hepatocellular

- nodules associated with liver cirrhosis: evaluation by CT during intraarterial injection of contrast medium. *AJR Am J Roentgenol* **172**: 969–976, 1999.
- 7) Aizawa Y, et al: Analysis of factors affecting the appearance of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. A long term follow-up study after histologic diagnosis. *Cancer* **89**: 53–59, 2000.
 - 8) Okusaka T, et al: The prognosis of patients with hepatocellular carcinoma of multicentric origin. *Hepatology* **43**: 919–925, 1996.
 - 9) 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン作成に関する研究班：科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン，2005年版，金原出版，2005.
 - 10) Arii S, et al: Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology* **32**: 1224–1229, 2000.
 - 11) Ryu M, et al: Therapeutic results of resection, transcatheter arterial embolization and percutaneous transhepatic ethanol injection in 3225 patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective multicenter study. *Jpn J Clin Oncol* **27**: 251–257, 1997.
 - 12) Llovet JM, et al: Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* **359**: 1734–1739, 2002.
 - 13) Llovet JM, Bruix J: Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* **37**: 429–442, 2003.
 - 14) Llovet JM, et al: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**: 378–390, 2008.
 - 15) Furuse J: Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol* **67**: 8–15, 2008.

Special Articles

肝細胞癌薬物治療の最前線

② 進行肝細胞癌に対する 分子標的薬の臨床試験

杏林大学医学部
腫瘍内科教授
古瀬 純司

同 助教
鈴木 英一郎

同 准教授
長島 文夫

Summary

癌の増殖や転移など、分子生物学的特性に基づく分子標的薬の開発が活発に行われ、多くの癌種で新しい薬剤が用いられてきている。2007年、肝細胞癌においてもマルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブを用いた無作為化比較試験により全生存期間の改善が確認され、進行肝細胞癌の標準治療薬と位置づけられつつある。新しい標準治療の開発には質の高い臨床試験が必須であり、肝細胞癌でもより有効な治療法の確立に向けた取り組みが数多く行われている。

はじめに

肝細胞癌の治療は、一般に癌進行度と肝障害度に応じて治療選択が行われ、肝切除などの局所療法から化学療法までその治療法は多岐にわたる。肝細胞癌に対する治療選択については、わが国では「肝癌診療ガイドライン」による肝細胞癌治療アルゴリズムが出されているが、化学療法については有効な薬剤はもちろん適応についても科学的根拠のある推奨はないとされている。一方、癌の進展・増殖に関わるさまざまな分子生物学的特徴が明らかになり、それらを標的とした分子標的薬の開発が活発に行われ、肝細胞癌においてもマルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブの無作為化比較試験によ

Key words ▶▶▶

■肝細胞癌

■分子標的薬

■臨床試験

■無作為化比較試験

■ソラフェニブ

り生存期間の延長が初めて報告された。しかし、ソラフェニブ単独ではまだ十分満足できる治療成績とはいえ、今後分子標的薬を中心にさまざまな治療法の開発や試みがなされていくものと考えられる。本稿では、最近行われた分子標的薬の臨床試験を中心に、その意義や今後の課題と動向について述べたい。

I ソラフェニブの臨床試験

ソラフェニブは、上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor; EGFR)の下流であるRafキナーゼと血管内皮増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor; VEGFR)-1~3, 血小板由来増殖因子受容体(platelet-derived growth factor receptor; PDGFR)- β などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬である。分子標的治療としては、癌細胞自体の増殖因子であるEGFシグナル伝達経路と血管内皮増殖の両方の阻害が理想的であり、複数の標的分子を阻害するマルチキナーゼ阻害薬が開発されてきた。進行肝細胞癌を対象としたソラフェニブによる無作為化比較試験として、これまで欧州中心のSHARP試験とアジア中心のAsia-Pacific試験の2つが行われており¹⁾²⁾, それぞれの位置づけや役割が異なる。SHARP試験は、単アームの第II相臨床試験の結果を踏まえての有効性と安全性を検証するための無作為化比較試験であり、この試験を理解するには第I, II相臨床試

験の報告から読む必要がある。

さまざまな癌種で行われた第I相臨床試験において肝細胞癌の患者1例で奏効例が認められたため³⁾, 肝細胞癌患者を対象に多数例で有効性と安全性をみることを目的として第II相臨床試験が計画された⁴⁾。すなわち、ソラフェニブを標準治療薬として検証する意味があるか否かの探索的試験という位置づけである。対象はある程度広く、Child-Pugh分類A/Bの両方を含んで3段階に症例集積が行われ、137例と第II相臨床試験としては比較的多数例が登録された。さらに、薬物動態、有効性の予測因子の探索も同時に行われた。その結果、奏効率は2.2%と低かったものの、増悪までの期間(time to progression; TTP)中央値5.5ヵ月、全生存期間(overall survival; OS)中央値9.2ヵ月と有効性が期待

され、第III相臨床試験に進む価値があるものと判断された(表1)。安全性についても、grade 3の毒性は疲労感9.5%, 下痢8.0%, 手足皮膚反応5.1%と、十分な忍容性が認められた⁴⁾。

SHARP(Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol)試験は、プラセボを用いた無作為化比較試験であり、国際試験として実施された¹⁾。プラセボを用いた試験が妥当か否かは、標準治療があるかどうかにかかる。これまで進行肝細胞癌を対象とした第III相臨床試験は、ドキシソルビシン、タモキシフェン、インターフェロン、ドキシソルビシンやシスプラチンなどの併用療法(PIAFレジメン)など多数行われているが、標準治療として認知された治療法は確立されていなかった。2008年のヘルシンキ宣言でもプラセボコントロー

表1. 肝細胞癌に対するソラフェニブの第II相臨床試験⁴⁾

n	137
Tumor response	
Partial response	3 (2.2%)
Minor response	8 (5.8%)
Stable disease (≥ 16 weeks)	46 (33.6%)
Progressive disease	48 (35.0%)
Not available	32 (23.4%)
Median TTP	5.5 months
Median OS	9.2 months
Toxicity	[All grades]
Hand-foot skin reaction	42 (30.7%)
Rash/desquamation	23 (16.8%)
Alopecia	14 (10.2%)
Fatigue	41 (29.9%)
Diarrhea	59 (43.1%)
Nausea	22 (16.1%)
Anorexia	19 (13.9%)
Stomatitis	15 (10.9%)
Vomiting	14 (10.2%)

② 進行肝細胞癌に対する分子標的薬の臨床試験

ル試験は既存の証明された治療法がないときに利用できることとされており、今回のSHARP試験は妥当と考えられる。しかし、それがどこでも受け入れられるかはまた別であり、症例のほとんどが欧州から登録され、米国からの登録例が極めて少なかったという限界もあった。日本は試験自体に参加できていない。

SHARP試験の試験デザインを表2にまとめた。主な患者選択基準は、組織学的な肝細胞癌の確認、進行肝細胞癌、ECOG performance status (PS) 0～2、Child-Pugh分類A、全身化学療法歴なしなどである。主要評価項目は、OSと症状増悪までの期間(time to symptomatic progression)である。第Ⅱ相臨床試験ではChild-Pugh分類Bの患者も含めて行われたが、肝機能不良例では癌の進行以外の要因での死亡リスクが高くなることから、本試験ではソラフェニブの生存への貢献をより確実に検証するため、Child-Pugh分類Aの患者のみが対象とされた。本試験では

コントロールの生存期間中央値を7ヵ月とし、ソラフェニブにより40%の生存期間の改善を見込んで9.8ヵ月として予定症例数を560例に設定している。

2005年3月～2006年4月までにソラフェニブ群299例、プラセボ群303例が登録され、両群の患者背景に有意な差はみられなかった(表3)。主要評価項目であるOSはソラフェニブ群10.7ヵ月、プラセボ群7.9ヵ月であり、ハザード比0.69(95%信頼区間(CI): 0.55～0.87, $p < 0.001$)と、両者間に明らかな統計学的有意差を認めた(表4, 図1)。もう1つの主要評価項目である症状増悪までの期間では、差は認められなかった。副次評価項目であるTTPは、ソラフェニブ群5.5ヵ月、プラセボ群2.8ヵ月であり、ハザード比0.58(95%CI: 0.45～0.74, $p < 0.001$)と、両者間に明らかな統計学的有意差を認めた。ソラフェニブ群に多く認められた主な有害事象(all grades)は、体重減少、脱毛、手足皮膚反応、食欲低下、下痢、声の変化、高血圧、

腹痛であり、特にgrade 3/4の有害事象は手足皮膚反応(ソラフェニブ群 vs プラセボ群: 8% vs < 1%)と下痢(8% vs 2%)で、両者に有意差を認めた。以上をまとめると、ソラフェニブは十分な忍容性があり、進行肝細胞癌患者の生存期間延長が確認された初めての治療薬であると報告された。その結果、2007年秋に欧米で肝細胞癌に対する適応が承認されている。

SHARP試験の成功により、ソラフェニブは進行肝細胞癌に対する標準治療薬として認識されてきたが、いくつかの課題も挙げられている(表5)。SHARP試験と並行して、アジア太平洋地域の患者での安全性と有効性を確認するため、アジア太平洋地域での第Ⅲ相臨床試験(Asian-Pacific試験)が行われた²⁾。Asian-Pacific試験では、SHARP試験と同じ用法・用量でソラフェニブ群とプラセボ群に2:1で割り付けられた。両試験の背景因子の違いをみると、Asian-Pacific試験ではB型肝炎(hepatitis B; HB)ウイルス患者が70%以上と多

表2. 進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブとプラセボの無作為化第Ⅲ相臨床試験(SHARP試験)のデザイン¹⁾

主要評価項目	OS Time to symptomatic progression
副次評価項目	TTP
デザイン	国際多施設共同 二重盲検プラセボ対照無作為化第Ⅲ相臨床試験(ソラフェニブ群 vs プラセボ群)
割付因子	門脈腫瘍栓 and/or 肝外転移 ECOG PS 地域
仮説	生存期間中央値を7ヵ月から9.8ヵ月(40%)に改善 検出力90%, $\alpha = 0.02$ (片側), 予定症例数560例, 死亡数424例

表 3. 進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブとプラセボの無作為化第Ⅲ相臨床試験 (SHARP 試験および Asia-Pacific 試験) の患者背景

	SHARP study ¹⁾		Asia-Pacific study ²⁾	
	Sorafenib	Placebo	Sorafenib	Placebo
n	299	303	150	76
Median age	64.9	66.3	51	52
Male	87%	87%	85%	87%
Region : Europe and Australia	88%	87%	—	—
HCV/ HBV/ Alcohol	29/ 19/ 26%	27/ 18/ 26%	71/ 11/ NA%	78/ 4/ NA%
ECOG PS 0/ 1/ 2	54/ 38/ 8%	54/ 39/ 7%	25/ 69/ 5%	28/ 67/ 5%
BCLC stage B/ C	18/ 82%	17/ 83%	4/ 96%	4/ 96%
Macroscopic vascular invasion	36%	41%	36%	34%
Extrahepatic spread	53%	50%	69%	68%
Lymph nodes	30%	21%	31%	34%
Lung	22%	19%	52%	45%
Child-Pugh A	95%	98%	97%	97%

BCLC stage : Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification

表 4. 進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブとプラセボの無作為化第Ⅲ相臨床試験 (SHARP 試験および Asia-Pacific 試験) の治療成績

	SHARP study ¹⁾		Asia-Pacific study ²⁾	
	Sorafenib	Placebo	Sorafenib	Placebo
n	299	303	150	76
Median OS	10.7 mo ^a	7.9 mo	6.5 mo ^c	4.2 mo
TTP	5.5 mo ^b	2.8 mo	2.8 mo ^d	1.4 mo
Overall response				
Partial response	2%	1%	3.3%	1.3%
Stable disease	71%	67%	54.0%	27.6%
Progressive disease	18%	24%	30.7%	54.0%
Overall incidence of treatment-related adverse events	80%	52%	81.9%	38.7%

ハザード比 (sorafenib/placebo) … a : 0.69 (p < 0.001), b : 0.58 (p < 0.001), c : 0.68 (p = 0.014), d : 0.57 (p = 0.0005)

数を占めていること、PSが悪い症例が多いこと、BCLC stage Cの割合が高いこと、肝外転移、特に肺転移が多いことが挙げられる(表 3)。治療成績は、PS不良例やより進行した患者が多いことが反映

したためか TTP と OS そのものは SHARP 試験に比べて短かったが、TTP と OS のハザード比は同等の成績が得られている(表 4, 図 2)。すなわち、肝細胞癌の疫学や地域での違いを超えてソラフェニブの

有効性が確認されたことになる。

Ⅱ 日本でのソラフェニブに関する臨床試験

わが国では、日本人での薬物動態、安全性、推奨用量などを明らかに

②進行肝細胞癌に対する分子標的薬の臨床試験

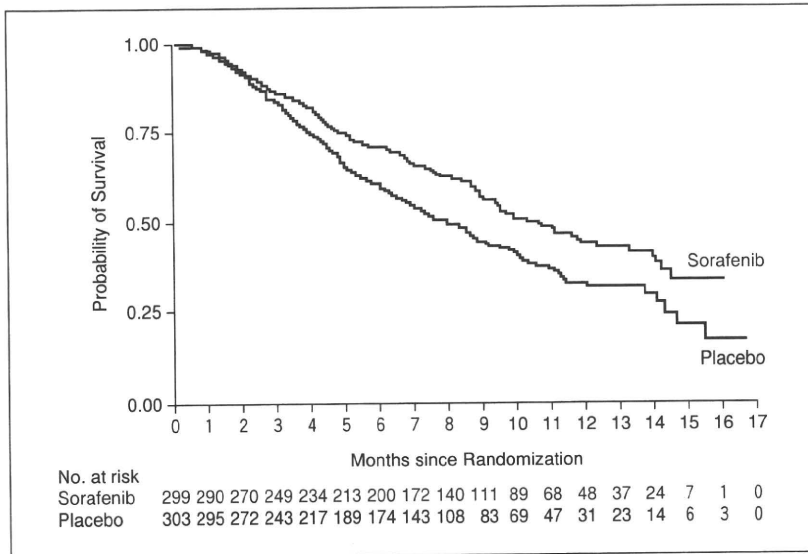


図1. ソラフェニブによるSHARP試験のOS¹⁾
OS中央値は、ソラフェニブ群10.7ヵ月に対しプラセボ群7.9ヵ月と、ソラフェニブ群で有意な生存期間の延長が得られた(ハザード比0.69(95%CI: 0.55~0.87, p<0.001))。

表5. SHARP試験で挙げられたソラフェニブの意義と問題点

意義
●統計学的に生存期間の延長が証明された初めての治療法である。
●40%の生存期間を延長するという仮説が証明された。
●十分な忍容性があり、臨床的に使用できる。
問題点
●Child-Pugh分類Aの患者のみを対象としている。
●登録のほとんどが欧州からに限定されている。
●利益を受ける対象患者が明確ではない。
●コストの問題。

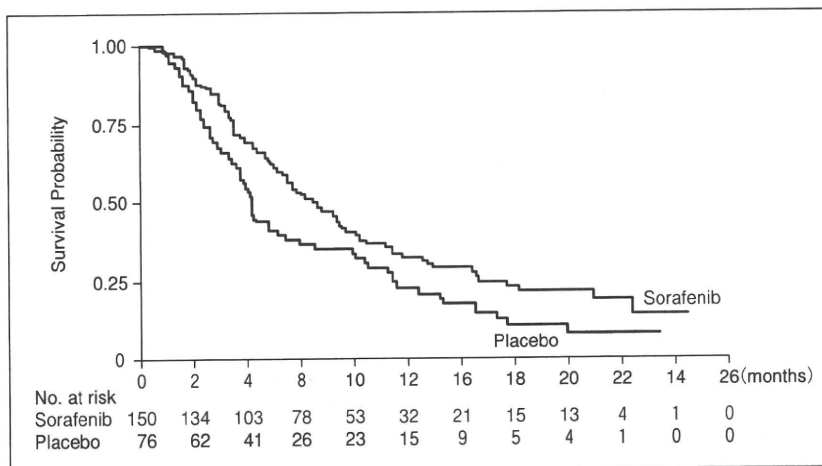


図2. ソラフェニブによるAsia-Pacific試験のOS²⁾
OS中央値は、ソラフェニブ群6.5ヵ月に対しプラセボ群4.2ヵ月とソラフェニブ群で有意に良好であり、SHARP試験と同等のハザード比であった(ハザード比0.68(95%CI: 0.50~0.93, p=0.014))。

する目的でソラフェニブの第I相臨床試験が行われた⁵⁾⁶⁾。肝細胞癌、他癌種ともに米国・欧州と同様の薬物動態および忍容性が確認されたことから、推奨用量も400mg 1日2回内服(bid)と決定された。肝細胞癌患者での第I相臨床試験では、用量は200mg bidと400mg bidの2レベルで、それぞれChild-Pugh分類A/Bの患者6例ずつを予定して計画された。その結果27例が登録され、奏効率3.7%、TTP中央値4.9ヵ月、OS中央値15.6ヵ月と、欧米で行われた第II相臨床試験と同等以上の治療成績が得られた。また、有害事象も皮疹(56%)、下痢(56%)、手足皮膚反応(44%)、疲労(37%)、食欲低下(22%)、高血圧(19%)と、欧米と同様のプロファイルであった。用量規定毒性は400mg bidの1例で手足皮膚反応を認めたのみであり、日本人でも忍容性は十分あるものと考えられた。

日本においても肝細胞癌での適応承認を得るためには、ソラフェニブを用いた無作為化比較試験が求められる。欧米と同様の用法・用量が決定されたことからSHARP試験に参加することも可能であったが、全身化学療法歴のない患者でのプラセボコントロール試験の実施は難しいと判断された。一方、肝動脈化学塞栓療法(transcatheter arterial chemoembolization; TACE)後であれば全身化学療法は併用しないのが通常であるため、TACEで効果が得られた症例を対象にプラセボコントロー

ルの無作為化比較試験が実施された⁷⁾。ソラフェニブは、局所治療が適応とならない進行肝細胞癌での有効性が証明された後、局所治療との併用療法や補助療法としての有用性が期待されている。本試験は局所治療の補助療法としては初めての試験であり、その意義は極めて大きいものと考えられる。本試験では、1回あるいは2回のTACEで25%以上の腫瘍の壊死あるいは縮小が得られた患者をランダム化して、ソラフェニブ群とプラセボ群に割り付けた。主要評価項目は増悪までの期間であり、両群で400例以上の大規模な比較試験である。本臨床試験はすでに追跡期間に移行しており、近い将来結果が明らかになるものと期待される。さらに、わが国では肝動注療法が盛んに行われており、ソラフェニブとの併用が期待されている。しかし、ソラフェニブへの上乗せの有効性と安全性は全く確立されておらず、第I相からの臨床試験が求められる。現在、厚生労働省奥坂班でシスプラチン(CDDP)肝動注との併用による第I相臨床試験などが行われている。

III 肝機能不良例での適応

わが国でもソラフェニブは2009年5月に肝細胞癌に対する適応が追加承認され、すでに一般臨床での使用が可能である。その適応はSHARP試験に基づいて切除不能の進行肝細胞癌が対象であり、Child-Pugh分類B/Cの肝機能不良例では有用性は確立されていない

いとされている。欧米の第II相臨床試験では137例中38例がChild-Pugh分類Bの患者であり、2008年のASCOにおいてChild-Pugh分類Bの患者38例のサブ解析結果が報告された⁸⁾。それによると、Child-Pugh分類Bの患者はChild-Pugh分類Aの患者98例に比べ、薬物動態ではやや血液濃度が高くなるものの曲線下面積(area under the curve; AUC)_{0-8h}(mg.h/L)とC_{max}(mg/L)ともに類似しており、また毒性の発現も大きな差は認めなかったとされている。しかし、ビリルビン上昇、腹水、脳症など肝機能に関連する毒性の頻度が高く、治療期間やTTP、OSも短かったとされた⁸⁾。わが国での第I相臨床試験ではChild-Pugh分類A/Bの患者が同数で検討され、AUC_{0-12h}とC_{max}は両者で差は認めず、推奨用量も同じように決定された⁷⁾。しかし、同試験の症例数は少なく、またChild-Pugh分類Bはscoreで7~9点と多様であり、多数例での検討が必要である。現在、わが国でChild-Pugh分類A/Bの患者を同時期に登録して前向きに評価する第II相臨床試験が計画されている。同試験では、主要評価項目をTTP、副次評価項目を安全性とOSに設定している。

IV ソラフェニブ以外の分子標的薬の臨床試験

進行肝細胞癌患者を対象としたソラフェニブ以外の薬剤による臨床試験としては、①ソラフェニブとのhead to headの無作為化比較

試験(first line)、②標準治療であるソラフェニブへの上乗せ効果を狙う併用療法の比較試験、③ソラフェニブ耐性後のプラセボコントロールによる比較試験(second line)に分けられる。多くの分子標的薬において単独あるいは併用による第I相臨床試験あるいは第II相臨床試験が行われ、有効性が示唆される結果が報告されている(表6)^{9)~22)}。

First lineの化学療法としては、スニチニブとプリバニブがすでに大規模な無作為化比較試験に進んでいる。スニチニブはVEGFR-2, PDGFR, c-Kitを主な標的としたソラフェニブに類似のマルチキナーゼ阻害薬である。これまで米国と欧州・アジアを中心に2つの第II相臨床試験が行われ¹⁷⁾¹⁸⁾、ソラフェニブとほぼ同等の成績が報告された(表6)。米国での試験では37.5mg/日、4週間連続内服後2週間休薬のスケジュールが用いられ、忍容性が確認されているが¹⁸⁾、欧州・アジアの試験では50mg/日、4週間連続内服後2週間休薬のスケジュールが用いられ、grade 3/4の血小板減少(43%)、好中球減少(24%)、中枢神経症状(24%)、脱力感(22%)、出血(14%)、4名の死亡例が出ている¹⁷⁾。スニチニブの無作為化比較試験では37.5mg/日の用量が設定され、1,200例と非常に多数の症例集積が予定されている。

エルロチニブはEGFRチロシンキナーゼ阻害薬であり、早くから第II相臨床試験が行われた。これ

②進行肝細胞癌に対する分子標的薬の臨床試験

表6. ソラフェニブ以外の分子標的薬による第I相あるいは第II相臨床試験⁸⁾⁻²²⁾

Agent	Targets	n	Response rate	Median PFS/TTP	Median OS	Author
Erlotinib	HER1/EGFR	38	9%	3.2 mo	13.0 mo	Philip (2005) ⁹⁾
Erlotinib		40	0	3.1 mo	6.3 mo	Thomas (2007) ¹⁰⁾
Lapatinib	HER1/EGFR+HER2	40	5%	2.3 mo	6.2 mo	Ramanathan (2006) ¹¹⁾
Cetuximab	EGFR	32	0	8 wk	—	Gruenwald (2007) ¹²⁾
Cetuximab		30	0	1.4 mo	9.6 mo	Zhu (2007) ¹³⁾
Bevacizumab	VEGF	46	13%	6.9 mo	12.4 mo	Siegel (2008) ¹⁴⁾
Bevacizumab/erlotinib	VEGF+EGFR	40	25%	9.0 mo	15.6 mo	Thomas (2009) ¹⁵⁾
Bevacizumab/erlotinib		51	6%	—	—	Hsu (2009) ¹⁶⁾
Sunitinib	VEGFR-2/PDGFR/c-Kit	37	3%	4.8 mo	10.4 mo	Falvre (2007) ¹⁷⁾
Sunitinib		34	3%	3.9 mo	9.8 mo	Zhu (2008) ¹⁸⁾
TSU-68	VEGFR/PDGFR/FGFR	36	9%	2.1 mo	13.1 mo	Kanai (2008) ¹⁹⁾
Brivanib	FGFR, VEGFR	55*	9%	2.8 mo	10.0 mo	Raoul (2009) ²⁰⁾
		46**	3%	1.4 mo	9.8 mo	
ABT-869	VEGFR, PDGFR	44	7%	5.4 mo	9.3 mo	Toh (2009) ²¹⁾
RAD-001	mTOR	39	3%	—	—	Chen L (2009) ²²⁾

* : first line, ** : second line

まで2つの第II相臨床試験が行われ⁹⁾¹⁰⁾, いずれも奏効率は低く, 無増悪生存期間(progression free survival; PFS)も3ヵ月程度とそれ程よくない。単独での開発は行われておらず, ソラフェニブへの上乗せ効果を狙った併用療法がプラセボを用いた第III相臨床試験として実施されている⁷⁾。その他, ソラフェニブとの併用としてはRAD-001が第I/II相臨床試験として実施されている⁷⁾。

ベバシズマブは単独¹⁴⁾あるいはエルロチニブとの併用¹⁵⁾¹⁶⁾, さらにゲムシタピン+オキサリプラチンとの併用²³⁾など, 多くの第II相臨床試験が行われている。なかでもベバシズマブ+エルロチニブは, 米国のMD Anderson Cancer Centerで行われた第II相臨床試験に

おいて奏効率, TTP, OSともに良好な治療成績が得られ, ソラフェニブに勝るものと期待された。しかし, 多施設での再現性やベバシズマブ単独でも良好な成績が得られており, 併用の意義が明らかではないなどの問題点から, 大規模な第III相臨床試験は行われていない。現在, TTPを主要評価項目としてベバシズマブ+エルロチニブとソラフェニブの無作為化第II相臨床試験が実施されている⁷⁾。

おわりに

肝細胞癌においても, 分子標的薬により初めて生存期間の延長に寄与する化学療法が確立した。今後, ソラフェニブを中心に, head to head(first line), second line, あるいはソラフェニブとの併用と

しての新しい分子標的薬, さらに根治治療後の補助療法やTACEとの併用療法など, 多くの臨床試験が実施あるいは計画されている。いずれも, それぞれの薬剤の特徴を生かした使い方と質の高い臨床試験による開発が必要と考えられる。

References

- 1) Llovet JM, et al : Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med **359** : 378-390, 2008
- 2) Cheng AL, et al : Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma : a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Oncol **10** : 25-34, 2009
- 3) Strumberg D, et al : Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular

- endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol* **23** : 965-972, 2005
- 4) Abou-Alfa GK, et al : Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **24** : 4293-4300, 2006
- 5) Minami H, et al : Phase I and pharmacokinetic study of sorafenib, an oral multikinase inhibitor, in Japanese patients with advanced refractory solid tumors. *Cancer Sci* **99** : 1492-1498, 2008
- 6) Furuse J, et al : Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **99** : 159-165, 2008
- 7) <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hepatocellular+carcinoma>
- 8) Abou-Alfa GK, et al : Is sorafenib (S) safe and effective in patients (pts) with hepatocellular carcinoma (HCC) and Child-Pugh B (CPB) cirrhosis? *J Clin Oncol* **26** (suppl.) : 2008 (ASCO 2008, abstract #4518)
- 9) Philip PA, et al : Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* **23** : 6657-6663, 2005
- 10) Thomas MB, et al : Phase II study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* **110** : 1059-1067, 2007
- 11) Ramanathan RK, et al : Phase II study of lapatinib, a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase 1 and 2 (Her2/Neu) in patients (pts) with advanced biliary tree cancer (BTC) or hepatocellular cancer (HCC). A California Consortium (CCC-P) Trial. *J Clin Oncol* **24** (suppl.) : 2006 (ASCO 2006, abstract #4010)
- 12) Gruenewald V, et al : A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma : Final results. *J Clin Oncol* **25** (18S) : 2007 (ASCO 2007, abstract #4598)
- 13) Zhu AX, et al : Phase II study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* **110** : 581-589, 2007
- 14) Siegel AB, et al : Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **26** : 2992-2998, 2008
- 15) Thomas MB, et al : Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Oncol* **27** : 843-850, 2009
- 16) Hsu C, et al : A phase II study of bevacizumab (B) and erlotinib (E) in combination for Asian patients (pts) with advanced/metastatic hepatocellular carcinoma (HCC) : An interim safety report. *J Clin Oncol* **27** (suppl.) : 2009 (ASCO 2009, abstract #4585)
- 17) Faivre SJ, et al : Assessment of safety and drug-induced tumor necrosis with sunitinib in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* **25** (18S) : 2007 (ASCO 2007, abstract #3546)
- 18) Zhu AX, et al : Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma : a phase II study. *J Clin Oncol* **27** : 3027-3035, 2009
- 19) Kanai F, et al : Final result of a phase I/II trial of the oral anti-angiogenesis inhibitor TSU-68 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **26** (suppl.) : 2008 (ASCO 2008, abstract #4589)
- 20) Raoul JL, et al : An open-label phase II study of first- and second-line treatment with brivanib in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* **27** (suppl.) : 2009 (ASCO 2009, abstract #4577)
- 21) Toh H, et al : A phase II study of ABT-869 in hepatocellular carcinoma (HCC) : Interim analysis. *J Clin Oncol* **27** (suppl.) : 2009 (ASCO 2009, abstract #4581)
- 22) Chen L, et al : Randomized, phase I, and pharmacokinetic (PK) study of RAD001, an mTOR inhibitor, in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* **27** (suppl.) : 2009 (ASCO 2009, abstract #4587)
- 23) Zhu AX, et al : Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **24** : 1898-1903, 2006

特集

肝・胆道・膵がん治療の動向—最新のエビデンス

肝がん

5) 全身化学療法^{*}の動向^{*}

鈴木英一郎**
長島文夫**
古瀬純司**

Key Words : hepatocellular carcinoma, systemic chemotherapy, sorafenib, molecular targeted drug

はじめに

肝がんにおける全身化学療法はほかのがん腫と比べ、標準治療確立が遅れていたが、近年分子生物学的特徴が明らかになりつつあり、それに基づいた治療開発が行われ、急速な進歩を遂げつつある。本稿はこれまでの全身化学療法における取り組みと、分子レベルでの特徴およびそれを踏まえた治療薬開発について述べる。なお、日本肝癌取り扱い規約では原発性肝がんとして肝細胞がんと肝内胆管がんなどが記載されているが¹⁾、両者の性質はまったく異なり、肝細胞がんが9割以上を占め、かつ肝内胆管がんは全身化学療法では胆道がんとして分類されることが多いため、ここでは肝細胞がんについて述べる。

全身化学療法の適応

肝細胞がんに対しては、肝切除術、ラジオ波焼灼療法(RFA)などの穿刺壊死療法、肝動脈化学塞栓術(TACE)などの局所療法が標準治療として確立されている²⁾。しかし、これらの治療が抵抗性となった例、あるいは適応とならない例は全身化学療法の適応となる。すなわち、肝外転移

を有する例、門脈腫瘍塞栓を有する例が主な治療対象となる。海外で主に用いられているバルセロナグループ³⁾での治療方針を示す(図1)。

肝細胞がんがほかのがん腫と異なる点は、がんの進展度だけでなく、肝機能も重要な予後因子になることである。すなわち、治療を行う際には肝機能を十分考慮の上で治療選択を行う必要がある。肝細胞がん患者の多くは慢性肝疾患・肝硬変を合併しており、肝機能が低下していることが多く、注意を要する。肝機能には主にChild-Pugh分類が用いられることが多いが⁴⁾、治療対象はChild-Pugh分類AまたはBであり、Child-Pugh分類Cの場合はその適応ではないとされる。

全身化学療法の変遷

これまで進行肝細胞がんに対しては、さまざまな細胞障害性抗がん剤あるいはホルモン剤が試みられてきた。

単剤では代謝拮抗剤である5-fluorouracil(5-FU)は以前より用いられてきたが、奏効率は10%程度であり十分な治療効果は得られていない⁵⁾。Biological modulationを期待されたleucovorin⁶⁾あるいはinterferon⁷⁾との併用も有効なレジメンとならず、経口フッ化ピリミジン系薬剤であるUFTも無作為化比較試験が行われたが少数例の検討にとどまりその有用性は明らかではなかった⁸⁾。

Anthracycline系であるdoxorubicinも古くから

* Systemic chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma.

** Eiichiro SUZUKI, M.D., Fumio NAGASHIMA, M.D., Ph.D. & Junji FURUSE, M.D., Ph.D.: 杏林大学医学部腫瘍内科〔〒181-8611 三鷹市新川6-20-2〕; Department of Internal Medicine, Medical Oncology, Kyorin University, School of Medicine, Mitaka 181-8611, JAPAN

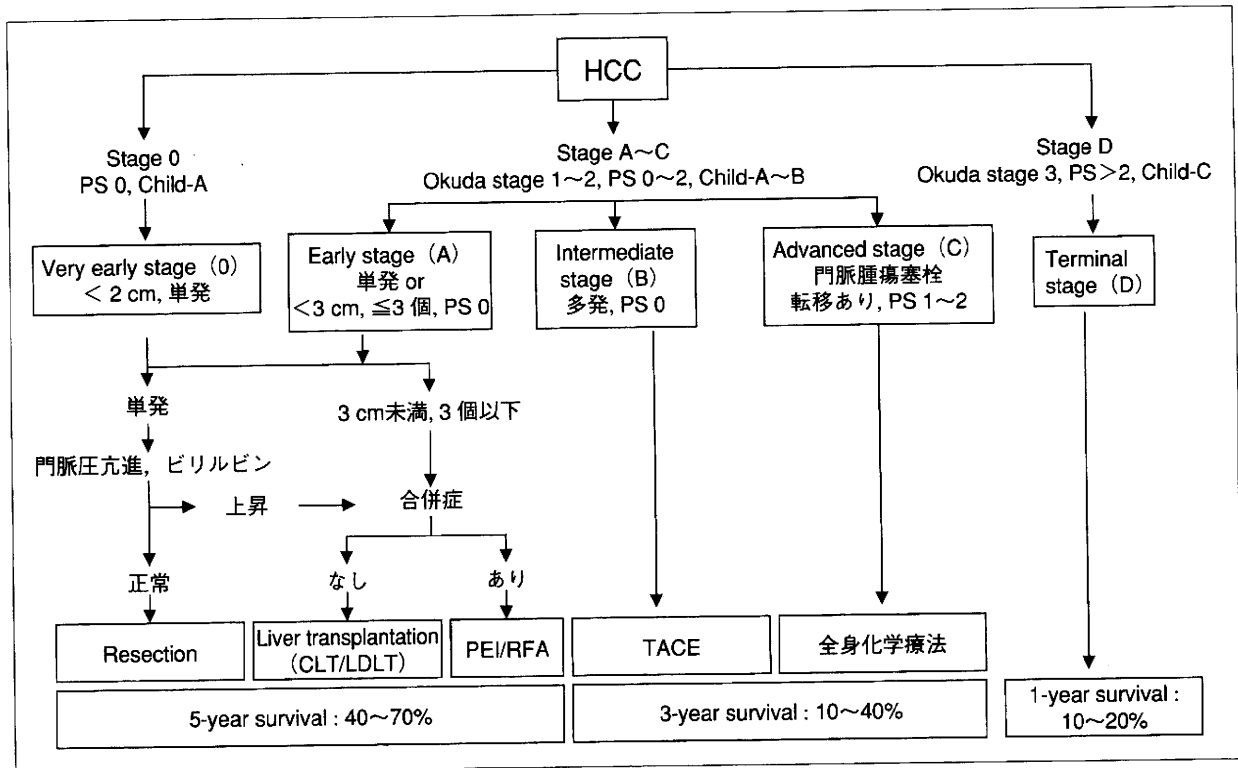


図 1 Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging and treatment schedule

CLT : cadaveric liver transplantation, HCC : hepatocellular carcinoma, LDLT : living donor liver transplantation, PEI : percutaneous ethanol injection, PS : performance status, RFA : radiofrequency ablation, TACE : transcatheter arterial chemoembolization

用いられている抗がん剤であり、無作為化比較試験で無治療群と比べ有意に生存期間の延長がみられたが、25%の症例で致命的な合併症が認められ、標準治療として認知されなかった⁹⁾。

このほか無作為化比較試験も含め、mitoxantrone, cisplatin, paclitaxel, tamoxifen, octreotide, gemcitabineなどの薬剤による臨床試験が行われてきたがいずれも有意に生存期間を延長するに至らなかった。他がん腫と同様、多剤併用療法も試みられており、5-FU, mitoxantrone, cisplatinの併用療法(FMP療法)¹⁰⁾や、cisplatin, doxorubicin, 5-FU, interferonの併用療法(PIAF療法)¹¹⁾など、高い奏効率の報告もみられたが、第III相試験まで行われたもののうち、無治療群、あるいはdoxorubicinと比べ有意な生存期間延長を示すレジメンはなく、標準治療確立には至らなかった。これまでの無作為化比較試験を中心とした臨床試験の結果を示す(表 1)。

近年は、細胞障害性抗がん剤あるいはホルモン剤での治療での治療に限界がみられたことから分子標的薬による治療開発が行われてきた。

肝細胞がんの分子生物学的特徴

1. 血管新生因子

肝細胞がんは腫瘍血管が豊富な腫瘍であり、その発がん・増殖には、血管新生が重要な役割を果たしている^{12)~14)}。その血管新生の増殖因子としては、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)、血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor : PDGF)、線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor : FGF)など数多く知られている。これら因子は肝細胞がんの血管形成や転移など、悪性化の過程にも関与していると言われる。このうちVEGFは、細胞分裂や遊走、分化を刺激したり、微小血管の血管透過性を亢進させたりする働きを持つ強力な血管内皮細胞の増殖因子であり、中心的関与をしていると言われる。VEGFは肝組織における血管内皮細胞だけでなく、肝細胞がん自体にも発現していることが報告され、肝細胞がん自体の浸潤能の亢進にも関与していることが示唆されている。Poonらは肝細胞がんの進行や予後に