

表1 肝細胞がんに対する全身化学療法の治療成績

抗がん剤	症例数	奏効割合 (%)	生存期間(月) (中央値)	報告者	報告年
Mitoxantrone	17	23.5	5.0	Colleoni M	1992
Cisplatin	26	15.3	NA	Okada S	1993
Gemcitabine	28	17.9	4.7	Yang TS	2000
CPT-11	14	7.2	8.2	O'Reilly	2001
Paclitaxel	26	0	3.0	Chao Y	1998
5-FU/mitoxantron/cisplatin	51	27.5	11.6	Ileda M	2005
Doxorubicin vs. best supportive care	60 vs. 46	3	2.7 vs. 2.3 ( $P=0.04$ )	Lai CL	1988
UFT vs. best supportive care	28 vs. 20	17.8	12.0 vs. 6.0 ( $P<0.01$ )	Ishikawa T	2001
Nolatrexed vs. doxorubicin	222 vs. 223	1.4 vs. 4.0	5.5 vs. 8.1 ( $P<0.01$ )	Gish RG	2007
TI38067 vs. doxorubicin	169/170	NA	5.7 vs. 5.6 (NS)	Posey JJP	2005
Cisplatin/5-FU/interferon/ doxorubicin vs. doxorubicin	94 vs. 94	20.9 vs. 10.5	8.6 vs. 6.8 ( $P=0.83$ )	Yeo W	2005
Octreotide vs. placebo	35 vs. 35	0	1.9 vs. 2.0 (NS)	Yuen MF	2002
Tamoxifen (120mg/day) vs. tamoxifen (60mg/day) vs. placebo	120 vs. 74 vs. 130	NA	2.2 vs. 2.1 vs. 2.7 ( $P=0.01$ )	Chow PK	2002

CPT-11 : irinotecan, 5-FU : 5-fluorouracil, NA : not available, NS : not significant

に対するVEGFの関与を報告している<sup>15)</sup>。肝細胞がん患者と健常人で血清VEGF値を比較すると、肝細胞がん患者で有意に上昇しており、また肝細胞がんの進行度と血清VEGF値を比較すると、サイズ、Edmondson grade, 血管浸潤の有無、微小サテライト病変の有無、TNM分類など腫瘍の進行度に一致して血清VEGF値が高値であった。VEGF値と予後との関連では、高VEGF群で予後不良であったことを報告している。このほかの上皮成長因子ではPDGFはチロシンキナーゼ関連型であるPDGF受容体(PDGFR)を介してその生理作用を発現することが知られており、肝細胞がんでは、PDGFR- $\beta$ の過剰発現も示されており、PDGFR- $\beta$ が血管新生に関与していることも示唆されている。また、FGFは内皮細胞や平滑筋細胞、線維芽細胞の増殖および分化の過程において、肝細胞がんに関与している。

## 2. 上皮成長因子受容体およびシグナル伝達経路

大腸がん、肺がんをはじめとするさまざまながん腫で上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor : EGFR)の過剰発現が認められており、肝細胞がんにおいてもEGFRの発現は80%以上と高率であり、2+以上の過剰発現も52~71%に認められ<sup>16)~18)</sup>、EGFR阻害剤の有効性が期待されている。

また、細胞内シグナル伝達経路の中でmitogen-activated protein kinase (MAPK), すなわちRas/Raf, mitogen extracellular kinase (MEK), extracellular signal-related kinase (ERK)シグナル伝達経路は多くのがん腫において細胞増殖や進行に重要な役割を果たしている。後述する、Rafを標的の一つとするsorafenibが肝細胞がん治療で有効な薬剤であることが確認されており、sorafenib第II相試験においてphosphorylated ERK stainingの程度と無増悪期間に相関関係があることが示された<sup>19)</sup>。

さらに、PIK3K/Akt/mTORへと続くシグナル伝達経路はgrowth factor receptorの重要なシグナル伝達経路であり、細胞増殖や生存など、肝細胞がんの維持に必須であると言われている。

このほかインスリンファミリーであるinsulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-IIも肝細胞がんの増殖や生存を制御する重要な因子であり、治療応用へ期待されている。

## 分子標的薬

肝細胞がんにおいて分子生物学的特性が明らかになるにつれ、特性に基づいた分子標的薬による治療への期待が高まってきた。これまでの主な分子標的薬の開発とともに、その治療成績を示す(表2)。

表 2 肝細胞がんに対する分子標的治療の治療成績

抗がん剤	症例数	奏効割合 (%)	増悪までの期間 (月)(中央値) 無増悪生存期間 (月)(中央値)	生存期間(月) (中央値)	報告者	報告年
Sorafenib	137	2	4.2	9.2	Abou-Alfa GK	2006
Sorafenib	27	4	4.9	15.6	Furuse J	2008
Sorafenib vs. Placebo	299 vs. 301	2	5.5 vs. 2.8	10.7 vs. 7.9 ( $P<0.01$ )	Llovet JM	2008
Sorafenib vs. Placebo	150 vs. 76	3	2.8 vs. 1.4	6.5 vs. 4.2 ( $P<0.01$ )	Cheng AL	2009
Sorafenib+Doxorubicin vs. Sorafenib+placebo	47 vs. 47	4.3 vs. 2.0	8.6 vs. 4.8	14.0 vs. 5.6 ( $P<0.01$ )	Abou-Alfa GK	2008
Sunitinib	37	3	4.8	10.4	Faivre SJ	2007
Sunitinib	26	4	4.1	11.6	Zhu AX	2009
Bevacizumab	46	13	6.9	12.4	Siegel AB	2008
Bevacizumab + Erlotinib	34	21	9.0	19.0	Thomas MB	2007
Bevacizumab + Capecitabine + Oxaliplatin	30	13	5.4	10.3	Sun W	2007
Bevacizumab + Gemcitabine + Oxaliplatin	33	20	5.3	9.6	Zhu AX	2006
Erlotinib	38	9	3.2	13	Philip PA	2005
Erlotinib	40	0	3.3	10.8	Thomas MB	2007
Cetuximab	30	0	1.4	9.6	Zhu AX	2007
Cetuximab	32	0	2.0	NA	Gruenwald V	2007
Cetuximab + Gemcitabine + Oxaliplatin	45	24	4.5	9.2	Louafri S	2007
Cetuximab + Gemcitabine + Oxaliplatin	45	20	4.7	9.5	Asnacios A	2008
Gefitinib	31	3	2.8	6.5	O'Dwyer PJ	2006
TSU-68	15	7	NA	NA	Kanai F	2006
Imatinib	15	0	1.16	4.4	Lin AY	2008
Lapatinib	37	5	2.3	6.2	Ramanathan RK	2007
Sunitinib	21	4.7	NA	6.5	Rizell M	2008
Thalidomide	68	6	NA	4.7	Hsu C	2003

NA : not available

## 1. Sorafenib

Sorafenibは前述の、EGFRの下流にあるRafファミリーに対する強力な阻害作用と、MAPキナーゼファミリーに属するp38 $\alpha$ , および腫瘍の進行に関与する受容体型チロシンキナーゼ(VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\beta$ , Flt3およびc-kit)に対する阻害作用などの複数の機序を介して、腫瘍の進行を抑制すると言われているmultikinase inhibitorである。

欧米で、切除不能進行肝細胞がん患者137例を対象とした第II相試験が行われ、増悪までの期間(中央値)は5.5か月、生存期間(中央値)は9.2か月と良好な治療成績が得られ<sup>19)</sup>、第III相試験が計画された。第III相試験では、sorafenibとplaceboを比較する無作為化比較試験が欧米を中心とした21か国のグローバル試験として行われた(SHARP試験)<sup>20)</sup>。本試験は、病理組織学的に診断された肝細胞がんで切除やRFA, TACEなどが適応とならない高度進行例、またはこれらの局所療法に

抵抗性を示す進行例で肝機能がChild-Pugh分類Aである症例を対象とした。Sorafenib 1回400mg, 1日2回(計800mg/日)あるいはplacebo 1日2回が、がんの増悪を認めるまで、または忍容性がある限り連日経口投与された。602例の肝細胞がん患者が登録され、sorafenib投与群299人とplacebo投与群303人が無作為に割りつけられた。奏効割合は、sorafenib群で2%と低値であったものの、病勢制御割合[complete response(CR) + partial response(PR) + stable disease(SD)]は、sorafenib群で43%、placebo群で32%であり、sorafenib群で有意に良好( $P=0.002$ )であった。また、画像上の増悪までの期間(中央値)は、placebo群が2.8か月、sorafenib投与群は5.5か月と、有意な延長(ハザード比: 0.58,  $P<0.001$ )を認め、生存期間(中央値)は、placebo群が7.9か月に対して、sorafenib投与群は10.7か月と生存期間の有意な延長を認めた(ハザード比: 0.69,  $P<0.001$ ) (図2)。SorafenibのGrade 3以上の有害事象は、下痢11

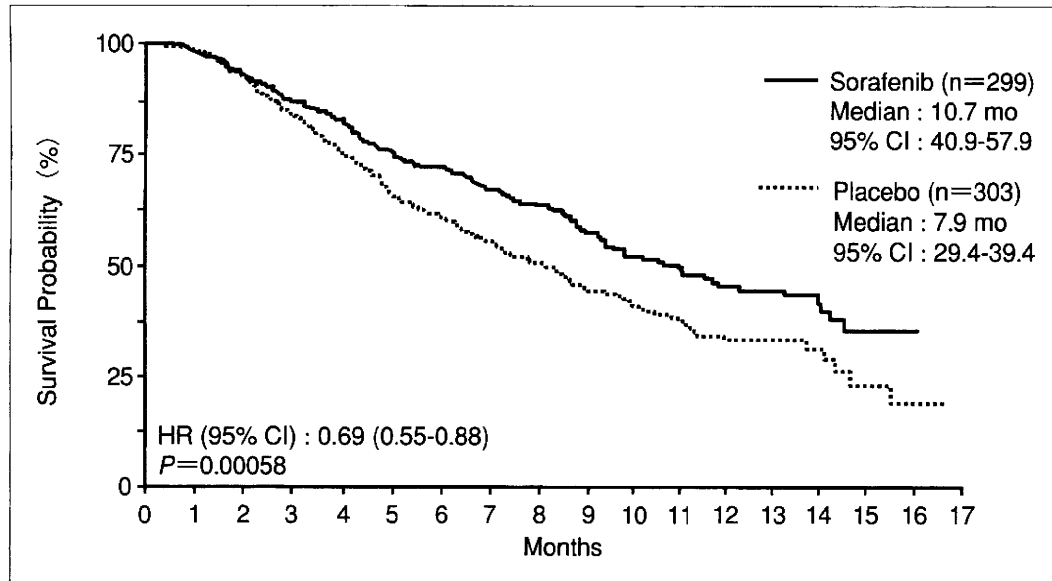


図2 SHARP試験の生存曲線

%, 手足皮膚反応8%, 高血圧2%, 腹痛2%などであり, 忍容性は良好と判断された。

また, 同様のsorafenibとplaceboを比較する無作為化比較試験が, B型肝炎合併肝細胞がんの多い韓国・台湾・中国各国で行われた(Asian-Pacific study)<sup>21)</sup>. 適格規準は前述のSHARP試験と同様であり, sorafenib投与群(150人)とplacebo投与群(76人)の2:1に割りつけられた. Sorafenib群の奏効割合は3.3%とやはり低値であったが, 病勢制御割合は, sorafenib群で35.3%, placebo群で15.8%であり, sorafenib群で有意に良好( $P=0.0019$ )であった. また, 増悪までの期間(中央値)は, sorafenib群で2.8か月に対して, プラセボ群で1.4か月(ハザード比: 0.57,  $P=0.0005$ ), 生存期間(中央値)は, sorafenib群で6.5か月に対して, placebo群で4.2か月(ハザード比: 0.68,  $P=0.014$ )と有意な差が示された. SorafenibのGrade 3以上の有害事象は, 下痢6.0%, 手足皮膚反応10.7%, 倦怠感3.4%などで, 忍容性は良好であると判断された. 本試験の増悪までの期間や生存期間はSHARP試験と比べて不良であったことは, performance status (PS), stageなどより状態の悪い患者が対象になっている影響があったと考えられる. ハザード比が同様であったことより, アジア地区においてもSHARP試験と同様にsorafenibの有用性が示された.

これらの試験でsorafenibは肝細胞がん患者に

において明らかな延命効果が示され, 海外では切除やRFA, TACEなどの局所治療で治療効果が期待できない患者の標準治療として位置づけられている。

本邦においても進行肝細胞がんに対して, sorafenibの薬物動態と安全性を確認し, 日本人における推奨投与量を決定するための第I相臨床試験が行われた<sup>22)</sup>. Sorafenibは, 1回200mgと400mgの1日2回の投与量において, Child-Pugh AとBの肝機能別に計27例が登録された. 主な有害事象は, リパーゼ上昇, アミラーゼ上昇, 発疹, 落屑, 下痢, 手足皮膚反応であった. 投与量規制毒性は400mg/回, 1日2回, Child Pugh Bの投与量レベルで, 手足皮膚反応を1例に認めたのみであった. また, Child-Pugh AとBの患者において有意な薬物動態の違いは認められず, 副作用の頻度は, sorafenib 400mg/回, 1日2回で, 忍容性はあると判断され, 海外と同様, 400mg/回, 1日2回の連続投与が推奨投与法となった. この試験の奏効割合も3.7%と低値であったが, 病勢制御割合は81.5%と良好であり, 増悪までの期間(中央値)は4.9か月, 生存期間(中央値)は15.6か月であり, SHARP試験と同様の結果が得られたと判断された. これらの試験結果をもとに, 本邦でも肝細胞がんに対するsorafenibの保険承認が2009年5月に得られ, 実地臨床に用いられている. 現在, 数多くの無作為化比較試

験はsorafenibを対照群として行われており、sorafenibを超える治療法の開発が期待されている。

Sorafenibと他の薬剤との併用療法も精力的に開発されており、まずsorafenib+doxorubicinとplacebo+doxorubicinの無作為化第II相比較臨床試験の結果が発表された<sup>23)</sup>。前者と後者の奏効割合、増悪までの期間(中央値)、生存期間(中央値)は、それぞれ4.3%と2.0%、8.6か月と4.8か月(ハザード比:0.60,  $P=0.076$ )、14.0か月と5.6か月(ハザード比:0.45,  $P=0.0049$ )であり、sorafenibの有用性が示された。また、この試験ではsorafenibとdoxorubicinの併用療法の増悪までの期間、生存期間がSHARP試験と比べて良好であったことより、細胞障害性の抗がん剤との併用療法なども期待されるようになった。

### 2. Sunitinib

Sunitinibは、VEGFRs, PDGFRs, KIT, RET, FLT3などを標的とする、sorafenibに類似した経口の複数標的型のチロシンキナーゼ阻害剤で、抗血管新生作用のほか、がん細胞の直接殺細胞作用を有する。これまでにimatinib耐性のgastrointestinal stromal tumor(GIST)や腎細胞がんでも有効性が示され、本邦でも保険承認されている。肝細胞がんに対しては、2つの第II相試験の成績が報告されている<sup>24)25)</sup>。Sunitinib 50mg/回または37.5mg/回を1日1回内服し、4週間連続内服、2週間休薬の投与スケジュールで行われた。奏効割合は2.7%、3.2%と低値であるものの、増悪までの期間(中央値)で4.8か月、4.1か月、生存期間(中央値)が10.4か月、11.6か月とsorafenibと同等の成績が報告された。現在、sunitinib 37.5mg/回を用いてのsorafenibとの第III相試験が施行中である。また、第II相試験においてはsunitinibのバイオマーカーとしてinterleukin-6(IL-6)、循環前駆細胞(CPC)が候補としてあげられ<sup>25)</sup>、今後の研究が期待される。

### 3. Bevacizumab

VEGFは、前述のように肝細胞がんの浸潤や転移にかかわっており、このVEGFに対するヒト化モノクローナル抗体のbevacizumabは、その有効性が期待されている。これまでに大腸がん、肺がん、乳がんなどで他剤との併用で有効性が示されており、肝細胞がんに対しては、単剤での

治療成績は無増悪期間中央値6.4か月、奏効割合12.5%を認めた<sup>26)</sup>。また、erlotinibとの併用での第II相試験では、奏効割合は21%、無増悪期間中央値は9.0か月、生存期間中央値19.0か月と良好な成績が報告されている<sup>27)</sup>。

### 4. Erlotinib, Gefitinib, Cetuximab

EGFRに対する阻害剤による治療開発も進んでいる。Erlotinibは、EGFRのチロシンキナーゼ阻害剤である。これまで、肺がん、膵がんが有効性が示されている。肝細胞がんに対しては2つの第II相試験が報告され<sup>16)17)</sup>、それぞれ奏効割合9%と0%、無増悪期間中央値3.2か月と2.8か月、生存期間中央値が13か月と10.8か月であった。GefitinibもEGFRのチロシンキナーゼ阻害薬であり、第II相試験が実施された<sup>28)</sup>。奏効割合3.3%、無増悪期間中央値2.8か月、生存期間中央値6.5か月であった。Cetuximabはキメラ化IgG1モノクローナル抗体であり、EGFRの細胞外ドメインに結合して抗腫瘍効果をもたらす。肝細胞がんに対してはcetuximab単剤での2つの第II相試験が行われた<sup>18)29)</sup>が、奏効例はなく、無増悪生存期間は1.4か月と2.0か月と短く、良好な治療成績は得られなかったため、他剤との併用療法に期待が寄せられている。

### 5. その他の分子標的治療薬

TSU-68はVEGFR, PDGFR, FGFRを主な標的とする阻害剤であり、わが国で第I/II相試験が実施されている<sup>30)</sup>。その他IMC-A12(インスリンファミリーのIGF-IR抗体)、AZD6244(MEK阻害剤)、cediranib(AZD2171; VEGFR阻害剤)、brivanib(VEGFRとFGFRのシグナル伝達経路を阻害するTK阻害剤)、RAD-001(m-TOR阻害剤)などの薬剤で開発が進んでいる。さらに、imatinib, lapatinib, sirolimus, thalidomide, everolimus, valatinib, dasatinibなどさまざまな分子標的治療薬も進行肝細胞がんに対する開発が進んでいる。

このほか海外を中心に第III相試験として進行中の試験も多くあり、その結果が待たれる。

### 術後補助化学療法

肝細胞がんの特徴として障害肝からの発生があげられ、根治後の再発がきわめて多いがんとして知られている。これまで肝切除やRFA後の補



助療法としてinterferonをはじめさまざまな薬剤が試みられてきたが、標準治療は確立されていない<sup>31)</sup>。Sorafenibも含め、分子標的薬を中心とした臨床試験が行われており、今後結果が報告されるものと思われる。

### おわりに

これまで、肝動脈化学塞栓術やエタノール注入法の開発、ラジオ波焼灼療法の安全な施行など、わが国が肝細胞がん治療をリードしてきた。全身化学療法の分野でもこれまでの蓄積を生かして、質の高いグローバル試験を主導していくことが必要である。

### 文 献

- 1) 日本肝癌研究会・編. 臨床・病理 原発性肝癌取り扱い規約(改訂第5版). 東京: 金原出版; 2008.
- 2) 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班・編. 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン(2005年度版). 東京: 金原出版; 2005.
- 3) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003 ; 362 : 1907-17.
- 4) Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the esophagus for bleeding esophageal varices. *Brit J Surg* 1973 ; 60 : 646-54.
- 5) Lin DY, Lin SM, Liaw YF. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 ; 12 : S319-28.
- 6) Van Eeden H, Falkson G, Burger W, et al. 5-Fluorouracil and leucovorin in hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 1992 ; 3 : 404-5.
- 7) Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, et al. Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon Alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 421-7.
- 8) Ishikawa T, Ichida T, Sugitani S, et al. Improved survival with oral administration of enteric-coated tegafur/uracil for advanced stage IV-A hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001 ; 16 : 452-9.
- 9) Chlebowski RT, Brzechwa-Adjukiewicz A, Cowden A, et al. Doxorubicin (75mg/m<sup>2</sup>) for hepatocellular carcinoma : clinical and pharmacokinetic results. *Cancer Treat Rep* 1984 ; 68 : 487-91.
- 10) Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, et al. A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005 ; 103 : 756-62.
- 11) Yeo W, Mok TS, Zee B, et al. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005 ; 97 : 1532-8.
- 12) Zhu AX. Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2008 ; 112 : 250-9.
- 13) Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 ; 67 : 8-15.
- 14) Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008 ; 48 : 1312-27.
- 15) Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004 ; 91 : 1354-60.
- 16) Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 6657-63.
- 17) Thomas MB, Chadha R, Glover K, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007 ; 110 : 1059-67.
- 18) Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, et al. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007 ; 110 : 581-9.
- 19) Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 4293-300.
- 20) Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 378-90.
- 21) Cheng A, Kang Y, Chen Z, 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* 2009 ; 10 : 25-34.
- 22) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, et al. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008 ; 99 : 159-65.
- 23) Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox J, et al. Preliminary results from a phase II, randomized, double-blind study of sorafenib plus doxorubicin versus placebo plus doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma [abstract]. *Eur J Cancer* 2007 ; 43 Suppl : 14th meeting.
- 24) Faivre S, Raymond E, Boucher E, et al. Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma : an open-label, multicentre, phase II study. *Lancet Oncol* 2009 ; 10 : 794-800.
- 25) Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, et al. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma : a phase II study. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 3027-35.
- 26) Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 2992-8.
- 27) Thomas MB, Morris JS, Chadha R, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 843-50.
- 28) O'Dwyer PJ, Giantonio BJ, Levy DE, et al. Gefitinib in advanced hepatocellular carcinoma : results from the Eastern Cooperative Oncology Group's Study E1203. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : abstract 4143.
- 29) Gruenwald V, Wilkens L, Gebel L, et al. A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma : final results. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : abstract 4598.
- 30) Kanai F, Yohida H, Tateishi R, 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* 2008 ; 26 : abstract 4589.
- 31) Ishii H, Yamamoto J, Ikari T. Adjuvant treatments for resectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008 ; 15 : 459-62.

\* \* \*

# 肝臓癌—ソラフェニブ導入と 肝炎ウイルスキャリアの管理

古瀬純司\*<sup>1</sup>・鈴木英一郎\*<sup>2</sup>・長島文夫\*<sup>3</sup>

## abstract

肝細胞癌の化学療法では従来の抗癌剤は一定の抗腫瘍効果を認めるものの生存期間の改善は得られていなかった。2007年、切除不能進行肝細胞癌患者を対象に行われたマルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブのランダム化比較試験により初めて生存期間の延長が報告され、ソラフェニブが肝細胞癌の標準的化学療法と位置付けられている。特徴的な毒性として手足皮膚反応、皮疹、下痢、高血圧などが挙げられ、ソラフェニブの臨床導入に際しては、その特徴の十分な理解と適切な副作用対策が必要である。今後ソラフェニブに続く新しい分子標的薬や併用療法、局所療法後の補助療法など肝細胞癌に対する化学療法の重要性が増すものと考えられる。一方、肝細胞癌ではB型およびC型肝炎ウイルスの感染を背景肝にもつ場合がほとんどであり、化学療法時の肝炎再燃が危惧されることから、抗ウイルス治療の適切な実施が必要となる。

## I はじめに

肝細胞癌は多くの場合、B型肝炎あるいはC型肝炎ウイルスの感染を認め、肝硬変など慢性肝疾患が併存する。したがって、癌の進行度とともに肝障害の程度に応じて治療選択がなされ、肝切除やラジオ波焼灼療法（RFA）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。全身化学療法はこれまで多くのレジメンが臨床試験として試みられてきたが、生存期間の延長が確認された標準治療は確立していなかった。2007年、ソラフェニブを用いたランダム化比較試験により初めて化学療法による延命効果が確認され、新しい標準治療として用いられてきている。本稿では肝細胞癌におけるソラフェニブの導入と肝炎ウイルスの管理について概説する。

## II 肝細胞癌の疫学

わが国における原発性肝癌の死亡数は2006年で33,662人であり、癌の死因の10.2%を占め、肺、胃、大腸に次いで第4位にある。一方、原発性肝癌の罹患数（地域癌登録全国推計値）は2002年で40,604人、男女別罹患数は男性27,876人、女性12,728人と男性で約2倍多い<sup>1)</sup>。背景肝病変として80%以上に肝硬変または慢性肝炎を有し、そのほとんどが肝炎ウイルスによるものであり、HCV抗体陽性者は約70%、HBs抗原陽性者は約15%である<sup>2)</sup>。

## III 肝細胞癌における治療選択と全身化学療法の適応

治療選択は癌進行度と肝障害度に応じて決定され、肝切除、RFAなど局所壊死療法、肝動脈化学塞栓療法（TACE）が腫瘍数、腫瘍径、肝機能に応じて

\*1 杏林大学医学部腫瘍内科教授

\*2 杏林大学医学部腫瘍内科

\*3 杏林大学医学部腫瘍内科准教授

選択される<sup>3)</sup>。肝動注化学療法は門脈腫瘍塞栓など高度進行癌に対して活発に行われてきたが、前向きな臨床試験による十分な検証は行われていない。全身化学療法は臨床試験での実施がほとんどであり、ソラフェニブのランダム化比較試験が行われるまで標準的な治療法は確立していなかった。

肝細胞癌に対する化学療法は、肝外転移例および局所治療、特にTACEが適応困難あるいは無効な例が適応となる。TACEが適応困難という具体的な基準としては、高度の門脈あるいは肝静脈の腫瘍塞栓、10cmを越すような巨大腫瘍などが当てはまる。また、早期濃染が乏しく切除もRFAもできない症例はまれであるが、TACEの効果は期待できず、化学療法の適応に含まれると考えられる。TACE無効の判断は明確な基準やコンセンサスはないが、複数回実施しても腫瘍の壊死効果（リピオドールの沈着）が得られない、あるいは新病変が多数出現するなどが当てはまる。

ソラフェニブによる比較試験によりその有効性が確認され、肝切除やRFAなど局所治療の適応とならない肝細胞癌を対象にわが国でも2009年5月に適応が承認された。局所治療との併用や治療後の補助療法としての有効性や安全性は確認されておらず、今後臨床試験により検証される必要がある。

Child-Pugh Cの肝機能不良例では局所療法と同様、化学療法においても肝障害が増悪するリスクも大きく、原則として禁忌である。またソラフェニブをはじめ多くの分子標的薬はChild-Pugh Aの肝機能良好例を対象に臨床試験が行われており、Child-Pugh Bなど肝機能低下例での安全性は確立していないことを認識しておく必要がある。

#### IV ソラフェニブの臨床試験

ソラフェニブはEGFRの下流であるRAFキナーゼとVEGFR-1-3、PDGFR- $\beta$ などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬である。肝細胞癌においてもRafの高発現が認められ、RAF/MEK/ERKシグナル伝達経路が発癌に関与している<sup>4)</sup>。また肝細胞癌は血管新生の豊富な腫瘍であり、進行度や予後と血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor :

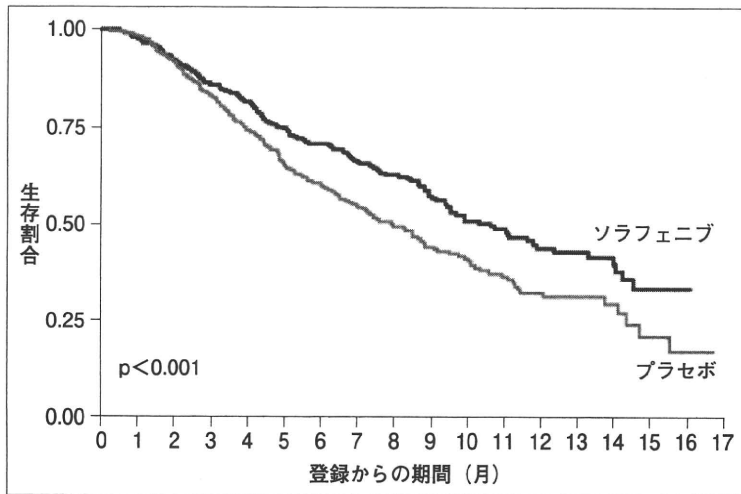
VEGF）との強い関連が報告されている<sup>5)</sup>。これらからRafおよびVEGFRを標的とした治療、すなわちソラフェニブの妥当性が示されている。

ソラフェニブの第I相試験により肝細胞癌例で部分奏効（PR）が得られていたことから<sup>6)</sup>、米国や欧州などでソラフェニブ 400mg、1日2回、連日経口投与の用法用量により第II相試験が行われた<sup>7)</sup>。その結果、奏効率は2%と低率であったが、十分な忍容性が確認され、無増悪期間（TTP）中央値5.5カ月、全生存期間（OS）中央値9.2カ月と有効性も十分期待される結果であった。

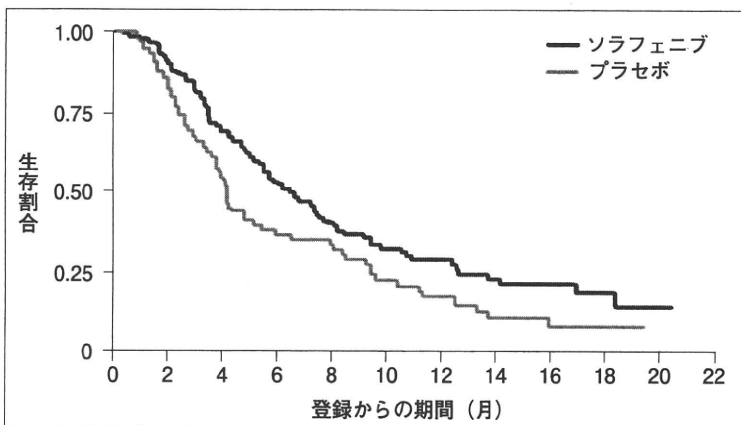
このような背景から、肝細胞癌においてプラセボコントロールによるランダム化比較試験SHARP（Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol）試験が実施された<sup>8)</sup>。プライマリーエンドポイントはOSと症状増悪までの期間であり、主な患者選択基準は、組織学的な肝細胞癌の確認、進行肝細胞癌、ECOG PS 0-2、Child-Pugh A、全身化学療法歴なし、などである。2005年3月から2006年4月までにソラフェニブ群299例、プラセボ群303例が登録された。OS中央値はソラフェニブ群10.7カ月、プラセボ群7.9カ月であり、両者間に明らかな有意差を認めた（ハザード比0.69,  $p < 0.001$ ）（図1）。またTTP中央値もソラフェニブ群5.5カ月、プラセボ群2.8カ月であり、両者間に有意差を認めている（ハザード比0.58,  $p < 0.001$ ）。

SHARP試験では欧州からの登録が90%近くと偏っていたことから、地域差の検証のためAsia-Pacific地域で同様のランダム化比較試験（Asian-Pacific trial）が行われた<sup>9)</sup>。ソラフェニブの投与量はSHARP試験と同量（400mg bid）であり、OS中央値はソラフェニブ群6.5カ月、プラセボ群4.2カ月とソラフェニブ群で有意に良好であった（ハザード比0.68,  $p = 0.014$ ）（図2）。またTTP中央値もソラフェニブ群2.8カ月、プラセボ群1.4カ月と有意差を認めた（ハザード比0.57,  $p < 0.001$ ）。プラセボ群に対するソラフェニブ群のTTPとOSのハザード比はSHARP試験とはほぼ同等であり、肝細胞癌の疫学や地域での違いにかかわらずソラフェニブの有効性が確認された。

わが国では日本人肝細胞癌患者での薬物動態、安



**図1**  
ソラフェニブによるSHARP試験のOS  
Median OSはソラフェニブ群10.7カ月に対し、プラセボ群7.9カ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,  $p < 0.001$ ）。  
〔参考文献8〕より改変〕



**図2**  
ソラフェニブによるAsia-Pacific試験のOS  
Median OSはソラフェニブ群6.5カ月に対し、プラセボ群4.2カ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,  $p = 0.014$ ）。  
〔参考文献9〕より改変〕

全性、推奨用量などを明らかにする目的で第I相試験が行われた<sup>10)</sup>。その結果、他癌腫、米国・欧州と同様の薬物動態および忍容性が確認され、推奨用量も400mg、1日2回と決定された。同試験では症例数は少ないものの、有効性も同等であった。

## V ソラフェニブにおける有害事象とその対策

肝細胞癌患者を対象として行われたランダム化比較試験で報告された頻度の高い有害事象は手足皮膚反応、下痢、疲労、高血圧、食思不振などである（表1）。わが国の第I相試験では、自覚症状として表れる非血液毒性は皮疹、手足皮膚反応、下痢、疲労が1/3以上の症例で認められている（表2）。これらは海外での比較試験とほぼ同様の傾向である。一方、血液毒性やリパーゼ・アミラーゼ上昇など検査して初めて分かる有害事象も明らかになっている。従来の

抗癌剤に比べ血液毒性は少ないが、肝細胞癌では汎血球減少を伴っていることが多く、注意が必要である。リパーゼ、アミラーゼの膵酵素上昇はほぼ全例に認められている。症状もなく、自然に低下する例がほとんどであるが、1例で投与開始後6カ月に急性膵炎と考えられる経過が報告されている<sup>10)</sup>。頻度は少ないとはいえ、腹痛など症状が出現した場合には膵炎も念頭に置いた対応が必要である。

経口剤による治療は原則として外来通院で開始されることが多く、頻度の高い有害事象については、あらかじめ患者に十分な説明を行い、対策を講じておく必要がある（表3）。皮疹、手足皮膚反応、下痢、高血圧などは治療開始から1、2週の早期に起こることが多く、発現すると患者に大きな不安を与えることになる。軽度であれば心配がないこと、悪化する場合は内服を中止して適切な治療薬を用い、早々に来院すること、などの説明を行う。治療開始時に抗

	SHARP試験 (n=297)		Asia-Pacific試験 (n=149)	
	Any Grade	Grade 3/4	Any Grade	Grade 3/4
Constitutional symptoms				
Fatigue	22%	4%	20.1%	3.4%
Weight loss	9%	2%	—	—
Dermatologic events				
Alopecia	14%	0	24.8%	0
Dry skin	8%	0	—	—
Hand-foot skin reaction	21%	8%	45%	10.7%
Rash or desquamation	16%	1%	20.1%	0.7%
Gastrointestinal events				
Anorexia	14%	<1%	12.8%	0
Diarrhea	39%	8%	25.5%	6%
Nausea	11%	<1%	11.4%	0.7%
Vomiting	5%	1%	—	—
Voice changes	6%	0	—	—
Hypertension	5%	2%	18.8%	2%
Abdominal pain	8%	2%	—	—
Bleeding	7%	1%	—	—

表1  
ソラフェニブの主な有害事象  
(ランダム化比較試験から)

表2 日本人での主な有害事象 (日本の第I相試験から)

	n=27	
	Any Grade	Grade 3/4
Hematological		
Leukocytopenia	11.1%	0
Lymphopenia	22.2%	18.5%
Thrombocytopenia	22.2%	7.4%
Non-hematological		
Hypertension	18.5%	18.5%
Fatigue	37.0%	0
Fever	11.1%	0
Weight loss	29.6%	0
Hand-foot skin reaction	44.4%	7.4%
Rash	55.6%	7.4%
Alopecia	18.5%	0
Dry skin	11.1%	0
Pruritus	29.6%	0
Anorexia	22.2%	0
Diarrhea	55.6%	3.7%
Stomatitis	11.1%	0
Lipase	88.9%	59.3%
Amylase	59.3%	14.8%

ヒスタミン剤, 角化軟化剤, 止痢剤などをあらかじめ処方しておくことも勧められる。血圧についても自宅で定期的な測定をしてもらうよう指導する。こ

れらの対策は個々の患者からの情報収集がきわめて重要であり, 看護師・薬剤師などを含めたシステムを作る取り組みが行われている。

## VI 肝炎ウイルスへの対応

疫学の項で述べたように肝細胞癌ではB型肝炎あるいはC型肝炎の感染が基礎疾患にある場合がほとんどである。特にB型肝炎患者では, 化学療法により免疫機構の均衡が破綻し, ウイルスの増殖を認め, 重症肝炎が惹起されることがあり, 対策が必要である。2009年, 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策に関して, 厚生労働省の研究班合同報告が出されている<sup>11)</sup>。それによるとHBs抗原陽性はもちろんHBs抗原陰性でもHBe抗体陽性あるいはHBs抗体陽性の既往感染例ではHBウイルスの再活性化によりB型肝炎が発症し, 劇症化することもあり, HBV-DNA定量で検出感度以上の場合にはエンテカビルあるいはラミブジンの核酸アナログの投与が勧められている。投与期間については明確な基準はないが, 化学療法開始前1週間から化学療法終了後少なくとも12カ月間継続することが推奨されている<sup>11), 12)</sup>。

表3 ソラフェニブの主な有害事象に対する対策

	予防	処方
手足皮膚反応	窮屈な靴, 身体に密着・圧迫する衣服, 熱い湯, 過剰のマッサージ, 長時間の立ち仕事や歩行などを避ける. 冷水浴が勧められる.	保湿クリーム, 尿素, サリチル酸を含む軟膏, 重症例ではステロイド軟膏, 疼痛に対しては鎮痛消炎剤を使用する.
皮疹	皮膚を清潔に保つ. 刺激の少ない石鹸の使用. 直射日光を避ける. ぬるま湯のシャワー, など.	抗ヒスタミン剤 (軟膏, 内服). 重症例ではステロイド軟膏.
下痢		整腸剤, ロペラミドの内服など.
高血圧	自宅での連日の血圧測定を勧める. 高血圧の既往歴がある場合は特に注意.	カルシウム拮抗剤, アンジオテンシン変換酵素阻害薬, アンジオテンシンⅡ受容体ブロッカーなど血圧に応じて降圧剤を併用する.

## VII おわりに

これまでエビデンスに基づく有効な全身療法がなかった肝細胞癌において, 新たな治療選択が加わった意義は大きい. 全身治療の利益を得るためには, 薬剤の特徴を十分理解したうえで適切な適応と副作用対策が肝要である.

### 参考文献

- 1) 財団法人がん研究振興財団: がんの統計'08 (<http://www.fpcr.or.jp/publication/pdf/statistics2008.pdf>)
- 2) 日本肝癌研究会追跡調査委員会: 第17回全国原発性肝癌追跡調査報告 (2002~2003). 肝臓 48: 117-140, 2007
- 3) 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班(編): 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン 2005年版. 金原出版, 東京, 2005
- 4) Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, et al: Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK) - MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. BMC Gastroenterol 3: 19, 2003
- 5) Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al: Prognostic significance of

serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. Br J Surg 91: 1354-1360, 2004

- 6) Strumberg D, Richly H, Hilger RA, 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
- 7) Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al: Phase II study of Sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 24: 4293-4300, 2006
- 8) Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 359: 378-390, 2008
- 9) Cheng AL, Kang YK, Chen Z, 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
- 10) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, et al: Phase I study of Sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 99: 159-165, 2008
- 11) 坪内博仁ほか: 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策-厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査委研究」班劇症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告-. 肝臓 50: 38-42, 2009
- 12) Kohrt HE, Ouyang DL, Keeffe EB: Antiviral prophylaxis for chemotherapy-induced reactivation of chronic hepatitis B virus infection. Clin Liver Dis 11: 965-991, 2007





## 総説

# ES細胞, iPS細胞由来の樹状細胞を利用したワクチン\*

福島 聡<sup>\*\*</sup>,<sup>\*\*\*</sup> 西村 泰治<sup>\*\*</sup> 千住 覚<sup>\*\*</sup>,<sup>\*\*\*\*</sup>

**Key Words** : ES cell, iPS cell, dendritic cells, vaccine, tumor immunity

### はじめに

悪性腫瘍に対して有効な免疫療法を行うためには、腫瘍細胞に特異的に発現する抗原に対して免疫応答を強力に賦活する方法の開発が不可欠である。生体外で培養した樹状細胞(DC)になんらかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチンが、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手段として期待されている<sup>1)</sup>。DC療法を医療として確立するためには、治療に用いるのに必要なDCの安定供給を可能にする技術の開発が不可欠である。筆者らは、細胞ワクチンとして用いるDCを作製するための材料として胚性幹(ES)細胞に着目し、ES細胞由来のDCを用いた免疫療法の研究を行ってきた<sup>2)</sup>。最近、iPS細胞作製法という画期的な技術の開発により、任意の個体の体細胞から多能性幹細胞を作製することが可能となった<sup>3)</sup>。筆者らは、iPS細胞は各種の再生医療のための細胞ソースとしてのみならず、細胞治療に用いるためのDCを作製するための材料として非常に有用であると考えている。本稿では、筆者らの、多能性幹細胞由来のDCを用いたさまざまな疾患の治療法に関する研究について紹介する。

### 多能性幹細胞をDCのソースとして用いる理由

現在、臨床的に施行されているDC療法として、腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン法がある。この抗腫瘍免疫療法に用いられるDCは、アフエレーシス(成分採血)により分離した末梢血白血球中の単球をGM-CSFなどのサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製されている。しかしながら、末梢血単球は、体外で増殖させることができないため、治療に必要な数のDCを得るためには、大量の血液をアフエレーシス処理する必要がある。さらに、単球からDCへの分化誘導効率には細胞ドナーにより大きな個人差があり、アフエレーシスを行っても必ずしも十分な数のDCが得られるとは限らない。このように、末梢血単球由来のDCを用いる方法は、ドナーの負担と細胞供給の不安定性という問題があり、その臨床の有効性が確認されたとしても、医療技術として広く普及するのは困難であると予想される。

ES細胞は、さまざまな細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。ES細胞は旺盛な増殖能力を有しており、適切な条件の下で培養することにより、多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。筆者ら

\* Vaccine utilizing dendritic cells derived from ES cells and iPS cells.

\*\* Satoshi FUKUSHIMA, M.D., Ph.D., Yasuharu NISHIMURA, M.D., Ph.D. & Satoru SENJU, M.D., Ph.D.: 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野 [〒860-8556 熊本市本荘1-1-1]; Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, JAPAN

\*\*\* 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚病態治療再建学分野

\*\*\*\* 独立行政法人科学技術振興機構CREST



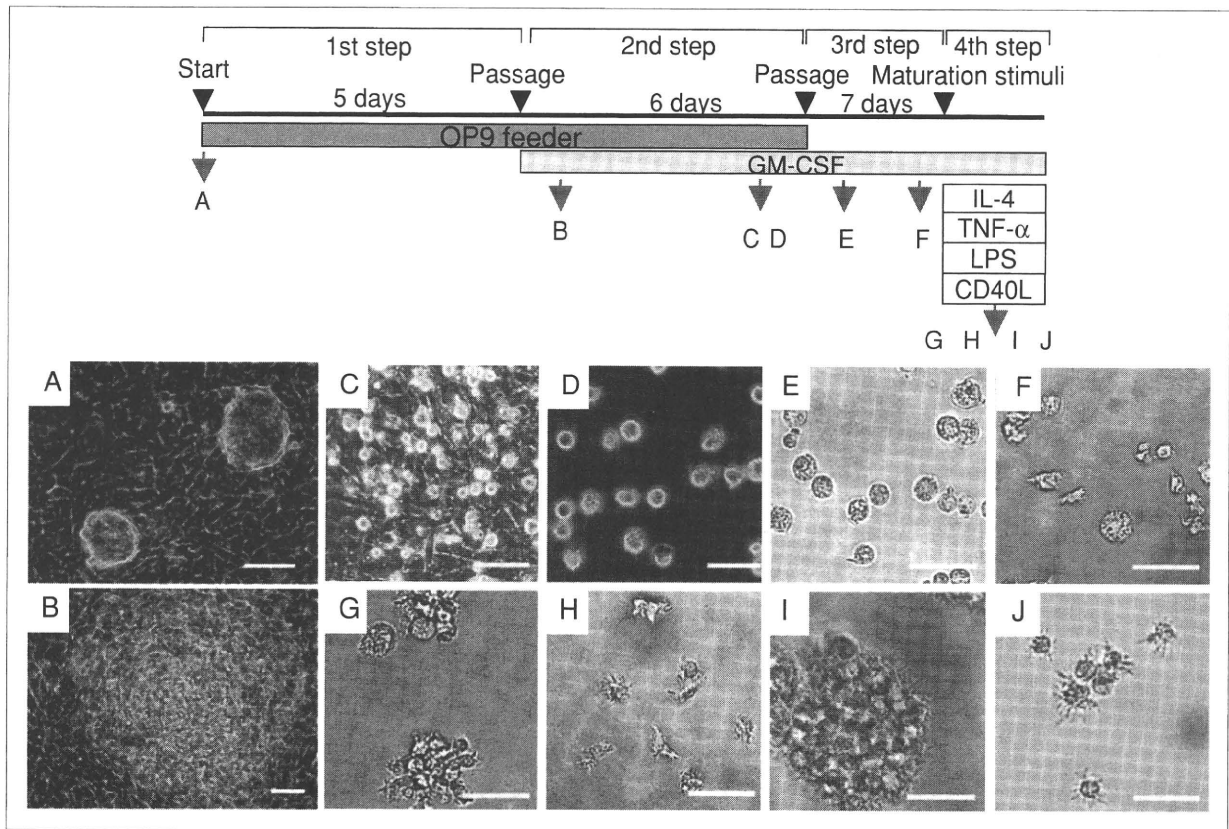


図1 ES-DCの誘導プロトコール

は、無限増殖能を有するES細胞を材料としてDCを作製することが可能になれば、細胞ドナーへ負担をかけることなく必要な数のDCを作製できるようになると考えた。また、ES細胞は電気穿孔法あるいはリポフェクション法により、ウイルスベクターを使用することなく、簡便に遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに遺伝子導入細胞のクローンを作製することもできる。これにより、抗原蛋白質あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能をさまざまに修飾したDCを作製することができるという利点もある。

### マウスES細胞由来のDCによる免疫制御

ES細胞を血液細胞への分化を誘導するOP9細胞と共培養し、適切なタイミングでDCへの分化を促すサイトカインを加えることにより、DCへの分化誘導ができる。マウスES細胞からDC(ES-DC)を作製する以下のような培養プロトコールを示す(図1)。ES-DCは、MHCクラスII分子を介した抗原提示機能と一次MLR刺激活性を有し

ていた。これをさらにTNF- $\alpha$ 、IL-4、および抗CD40刺激抗体の同時添加、あるいはLPSなどで刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟DCとなる。ES-DCは、GM-CSFに依存して分化すること、および、表面マーカー(CD11b陽性)から、ミエロイド系DCに相当すると考えている。

筆者らは、モデル腫瘍抗原として卵白アルブミン(OVA)抗原を発現するES-DCを作製した<sup>2)</sup>。このOVA発現ES-DCをES細胞と同系のマウス個体に移入することにより、OVA抗原に特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)を感作することができた。また、このES-DCは、*in vitro*でマウスの脾臓由来の非感作T細胞と共培養することによっても、OVA抗原特異的なCTLを活性化することができた。さらに、マウスにこのDCを投与することによりOVA抗原に対して感作すると、OVAを発現するマウス腫瘍細胞(MO4)を移植した場合にこれを拒絶できた<sup>4)</sup>。モデル抗原であるOVAを用いた場合だけでなく、腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である。GPC3は、筆者らの研究室がヒトの肝細

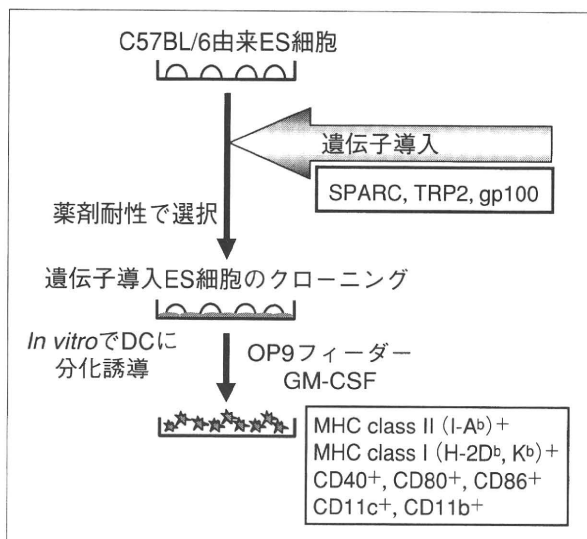


図2 メラノーマ抗原遺伝子導入ES-DCの作製法

胞がんおよびメラノーマに発現する腫瘍抗原として同定したものである<sup>5)</sup>。前述の方法を用いてES-DCにGPC3を強制発現させたものをマウス個体に予防的に投与することにより、GPC3を発現するマウスメラノーマ細胞B16-F10に対する拒絶効果を誘導することが可能であった<sup>6)</sup>。

筆者らは、細胞ワクチンとして使用するES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより、ES-DCが抗原特異的T細胞に遭遇する効率を改善し、抗原を負荷したDCによる免疫効果を向上させる、という試みも行った。生体移入したES-DCがリンパ組織へ遊走できなくても、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DCが存在する場所へT細胞が集まり、その場所で抗原特異的なT細胞を活性化できるのではないかと考えたのである。前述したOVA遺伝子を導入したマウスES細胞に、さらに、T細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、このES細胞からOVAとケモカインを同時に発現するES-DCを作製した<sup>3)</sup>。T細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、生理的に存在するDCからは産生されない、SLC(CCL21)、Mig(CXCL9)、およびlymphotactin(XCL1)の3種類を選択した。前述のOVA遺伝子を導入したES細胞に、さらに、これらのケモカインの遺伝子をそれぞれ導入した。OVAとそれぞれのケモカインを同時に発現するES-DCを作製し、これらのES-DCをマウスに投与したときの免疫効

果を比較した。その結果、この3種類のケモカインのいずれについても、OVAを単独で発現するES-DCよりも、OVAとケモカインを同時に発現するES-DCの方が、より効果的にCTLを活性化できることがわかった。さらに、SLCあるいはMigをOVAと同時に発現するES-DCは、OVA単独発現のES-DCよりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた。とくにSLCの共発現により、もっとも強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた<sup>4)</sup>。

種々の自己免疫疾患は、さまざまな自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、免疫系による攻撃により組織傷害が生ずるものである。免疫抑制剤を用いた治療では、免疫応答能が全般的に低下する結果、感染症に罹患する危険性が高まるという問題がある。そこで、免疫応答能全体を低下させず、標的となっている自己抗原に対する免疫応答のみを特異的に抑制する治療法の開発が切望されている。われわれは、これまで、自己免疫疾患の治療法として、自己免疫の標的となっている自己抗原と免疫抑制分子を同時に発現させたES-DCを生体に投与するという手法をマウスモデルで検討している。そして、ES-DCに自己抗原と同時にPD-L1あるいはTRAILを強制発現させたものを投与することにより、自己免疫疾患[実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)]を治療できることを報告している<sup>7)</sup>。

### 複数抗原を標的とし、NKT細胞の活性化を併用したマウスES-DCによる免疫療法

本稿では、これまでに行ってきたES-DCによるがん免疫療法に対して、さらに強力な効果を得るために複数の抗原を標的とし、NKT細胞の活性化も併用したマウスモデルでの臨床前研究の結果を紹介する。まず、最初にメラノーマ抗原を発現するマウスES-DCを3種類作製した(図2)。C57BL/6マウスのES細胞に、メラノーマ関連抗原として、SPARC、TRP2、gp100 3つの遺伝子をそれぞれ電気穿孔法で導入した。SPARCは当研究室で同定した新規がん抗原であるが、メラノーマで高発現する<sup>8)</sup>。TRP2、gp100はすでに広く認知されているメラノーマ関連抗原であるが、gp100については、マウスメラノーマに対して、mouse gp100で免疫するよりも、humanのgp100

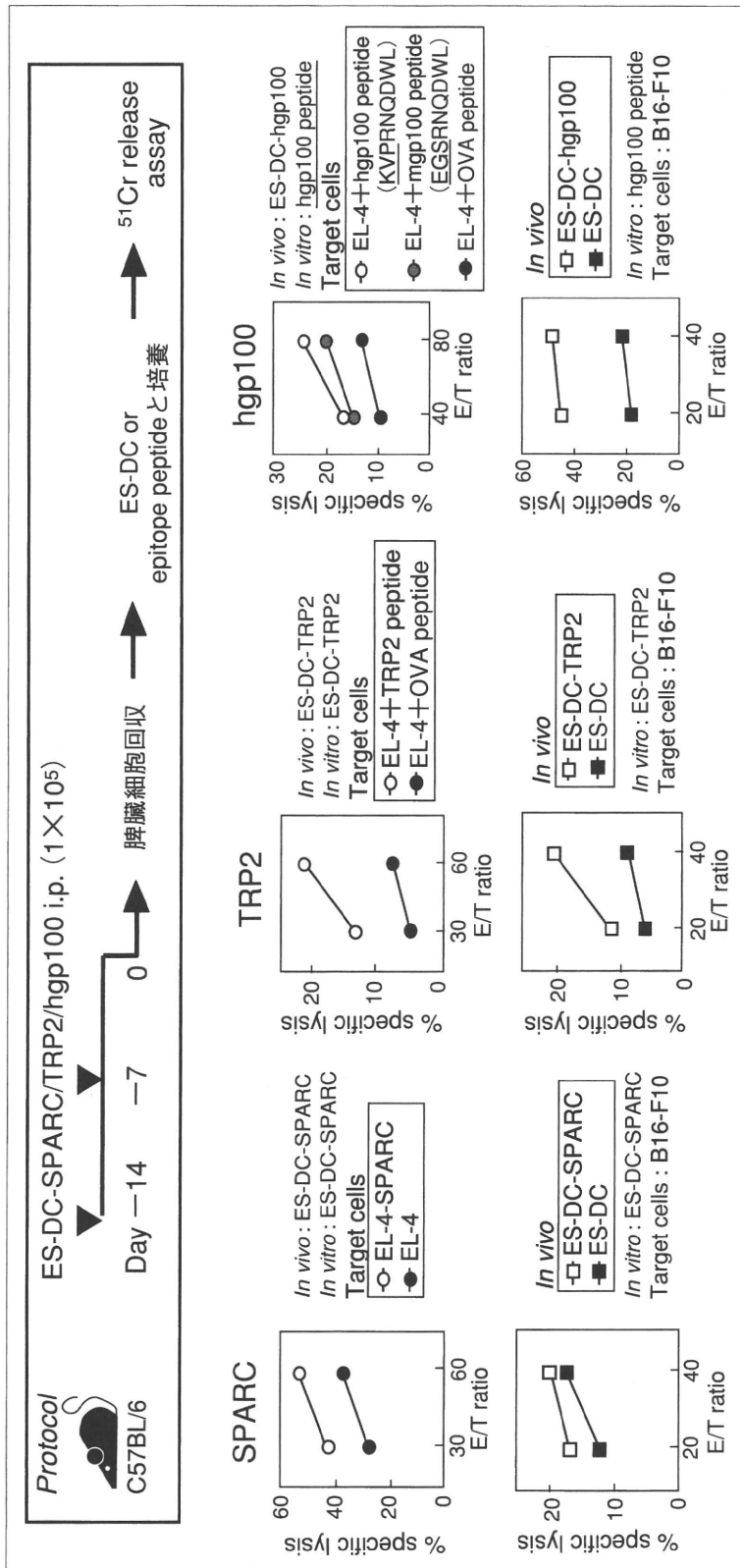


図3 遺伝子導入ES-DCによる抗原特異的CTLの誘導

(hgp100)で免疫するほうが、より強いレスポンスが得られることが知られているため、本研究では human gp100を遺伝子導入した。クローニングした遺伝子導入ES細胞を前述したプロトコールによりDCに分化させた。それぞれの抗原の発現はES-DCに分化した段階でRT-PCR, およびFACSにより確認した。次にSPARC, TRP2, hgp100を発現したそれぞれのES-DCを腹腔内注射し、マウス体内で抗原特異的CTLが誘導できるかを検討した。それぞれのES-DCで1週間おきに2回免疫し、1週間後脾臓細胞を回収した。In vitroでそれぞれの抗原と5日間培養し、 $^{51}\text{Cr}$  release assayで抗原特異的CTLの検出を行った(図3)。免疫するES-DCの抗原の有無、標的細胞の抗原の有無での結果を比較することにより、遺伝子改変ES-DCによって抗原特異的なCTLが誘導されたことが確認された。

次に、抗腫瘍効果を転移モデルで検証した。腹膜播種や原発巣からのリンパ節転移などでの抗腫瘍効果を評価するために、マウスメラノーマの高転移株B16-BL6細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、転移巣を定量化するシステムを用いた。腹膜播種の予防モデルにおけるそれぞれのES-DCの効果を示す(図4)。ES-DC-SPARC, ES-DC-TRP2, ES-DC-hgp100による免疫は、medium対照群に対しては有意に腫瘍の増殖を抑制したが、 $1 \times 10^4$ の腫瘍細胞を腹腔内接種する条件では、遺伝子導入していないES-DCとの有意差が認められなかった。それに対して、これら3種類のES-DCを混合して免疫したところ、腫瘍を完全に拒

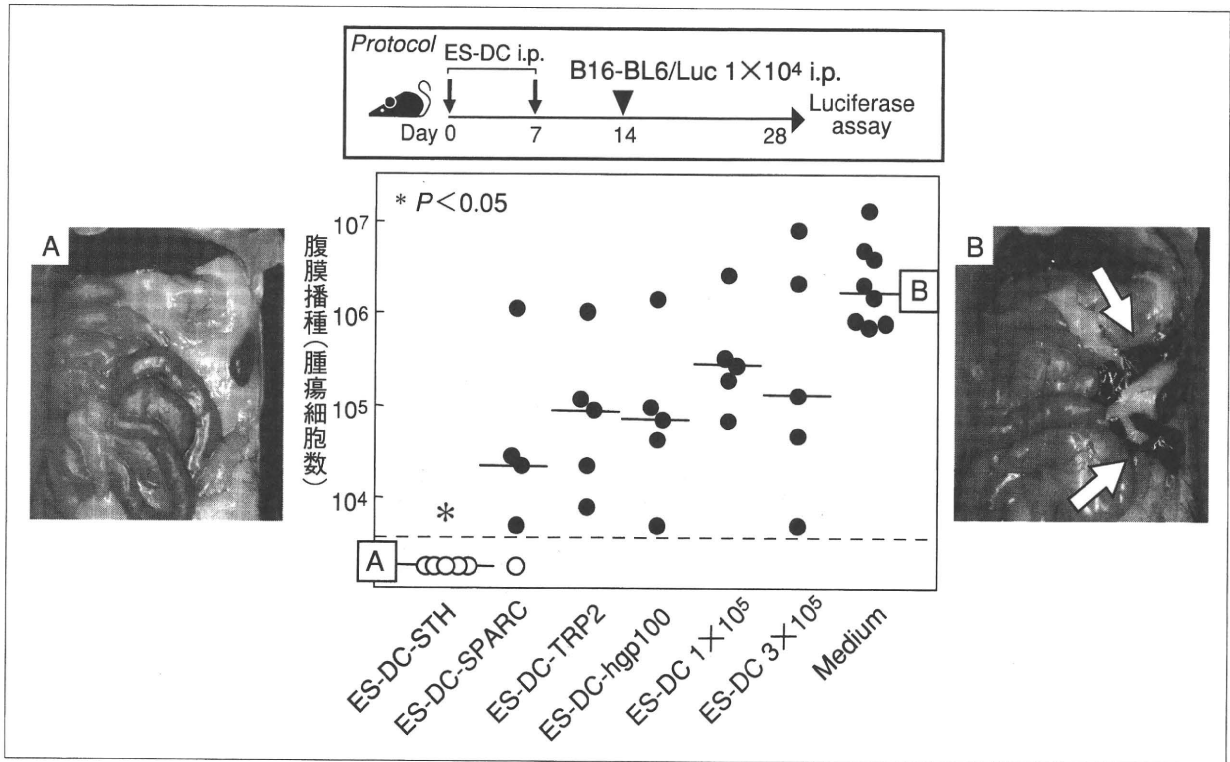


図4 複数抗原標的ES-DCの腹膜播種予防モデルでの効果  
 ES-DC-STH: ES-DC-SPARC+TRP2+hgp100.

絶した。つまり、複数の抗原を標的とすることで、単一抗原で免疫するより、より効果的に腫瘍の増殖を抑制することが腹膜播種モデルで示された。

複数抗原を標的とした免疫療法のシエマを示す(図5)。個々の抗原を認識できるT細胞のプリカーサーには限りがある。よって複数の抗原を標的としたほうが、最終的に動員できるエフェクターの総数は多くなると考えられる。さらに抗腫瘍効果を増強するために、 $\alpha$ -GalCerを用いた。 $\alpha$ -GalCerはDCに発現するCD1d分子によって提示され、効果的にNKT細胞を活性化することが知られている。活性化したNKT細胞は、自身が腫瘍細胞を直接攻撃するだけでなく、IFN- $\gamma$ を大量に産生しエフェクターT細胞を活性化、またNK細胞も活性化するため、これらの相乗効果が期待できる(図5)。腹膜播種モデルで $\alpha$ -GalCer負荷ES-DCの効果の評価した(図6)。図4で示した実験に比べて接種する腫瘍細胞数を5倍に増やしたところ、3種類の抗原ES-DCによる免疫は抗原なしのES-DCとの有意差が認められなかった。一方、 $\alpha$ -GalCerを負荷した抗原なしのES-DCは部分的な効果を示した。さらに $\alpha$ -GalCerをロー

ドした3種類の抗原遺伝子導入ES-DCは腫瘍を完全に拒絶した。つまり、複数抗原標的ES-DCと $\alpha$ -GalCerの相乗効果が観察された。ここまでのデータはすべて免疫が成立したところへ腫瘍を接種する予防モデルであったが、次にソケイリンパ節転移および、腹膜播種の治療モデルでのデータを示す。腫瘍をfootpadあるいは、腹腔内に接種した、3日後、および10日後に各種ES-DCで治療を行った(図7)。 $\alpha$ -GalCerを負荷した3種類の抗原ES-DCはソケイリンパ節転移、腹膜播種のいずれにおいても有意に強い治療効果を示した<sup>9)</sup>。

### ヒトES細胞からのDCの作製

以上のように、遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させたマウスES-DCをマウス個体に移入することにより、抗原特異的なCTLを活性化し、抗腫瘍免疫効果を誘導できることが示された。これらの結果は、ES-DCを用いた抗腫瘍免疫療法が臨床的にも有用ではないかと期待させるものである。筆者らは、ES-DCの臨床応用をめざして、ヒトのES細胞からES-DCを作製する分化誘導法の開発を行った<sup>10)</sup>。ヒトのES細胞は、マウスのES

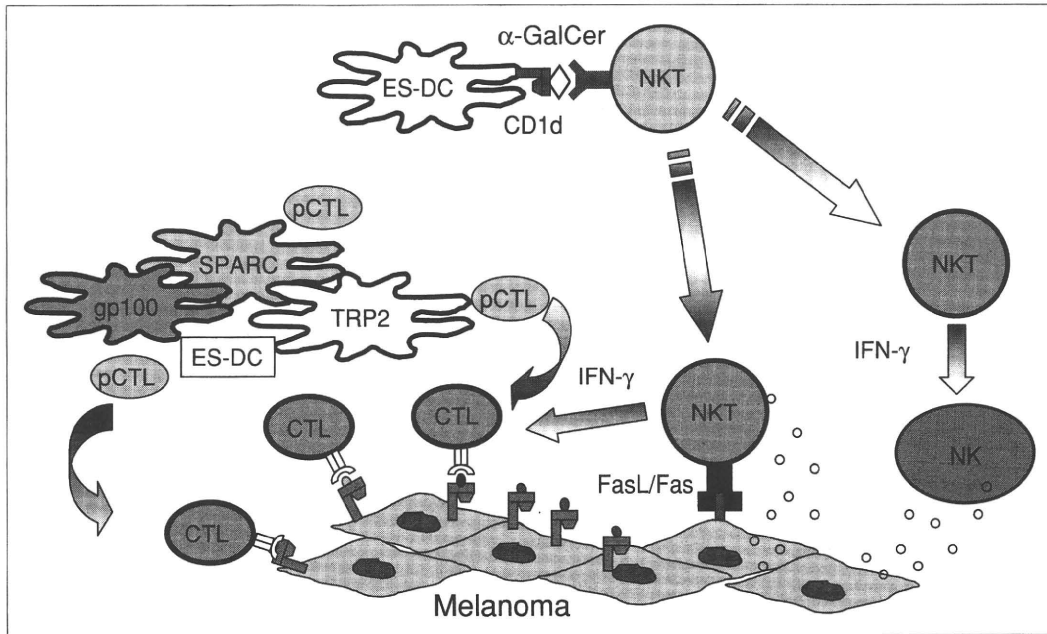


図5 α-GalCerを荷した複数抗原標的ES-DCによる免疫療法のシエマ  
pCTL : CTLプリカーサー.

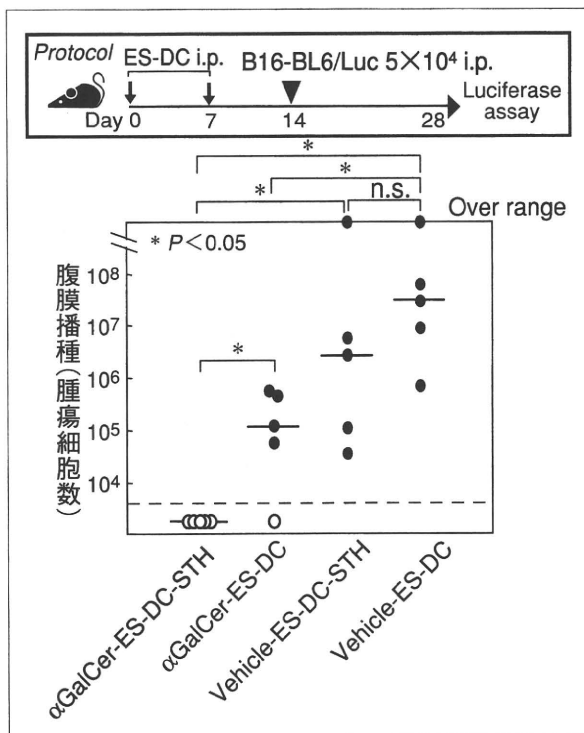


図6 抗原遺伝子導入ES-DCとα-GalCerの相乗効果

細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが、マウスの場合と同様にOP9細胞をフィーダー細胞として用いることにより、血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった。筆者らのヒトのES-DC分化誘導法では、培養系へGM-CSF, およびIL-4を添加するこ

とにより効率よい分化誘導が可能であった。ヒトES-DCもマウスES-DCと同様に蛋白質抗原をプロセスしてT細胞へ提示する活性やアロMLR刺激活性など、DCとしての機能を備えていた。また、マウスES-DCの場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変ES-DCを作製することも可能であった。

### マウスiPS細胞からのDCの作製

筆者らは、マウスのES-DCを作製する方法に準じて、マウスiPS細胞由来のDC[iPS cell-derived dendritic cells (iPS-DC)]を作製することに成功している<sup>12)</sup>。分化誘導の過程における形態の変化や最終的に産生されるDCの機能において、iPS細胞はES細胞とほぼ同等であったが、差異も認められた。iPS細胞は、われわれがこれまでに扱ってきたいろいろな系統のES細胞株と比較すると、すべてのステップにおいて分化の速度がやや遅く、最終的にDCへ分化するまでの期間がやや長くなる傾向があった。また、ES細胞からの分化誘導では、分化段階が進んで成熟するにつれ細胞の増殖能力が低下する、つまり、分化誘導のステップのあとのほうになると細胞があまり増えない傾向があった。ところが、iPS細胞の場合は、分化段階が進み、成熟したDCに近い段階でもある程度の増殖能力を保持している、という

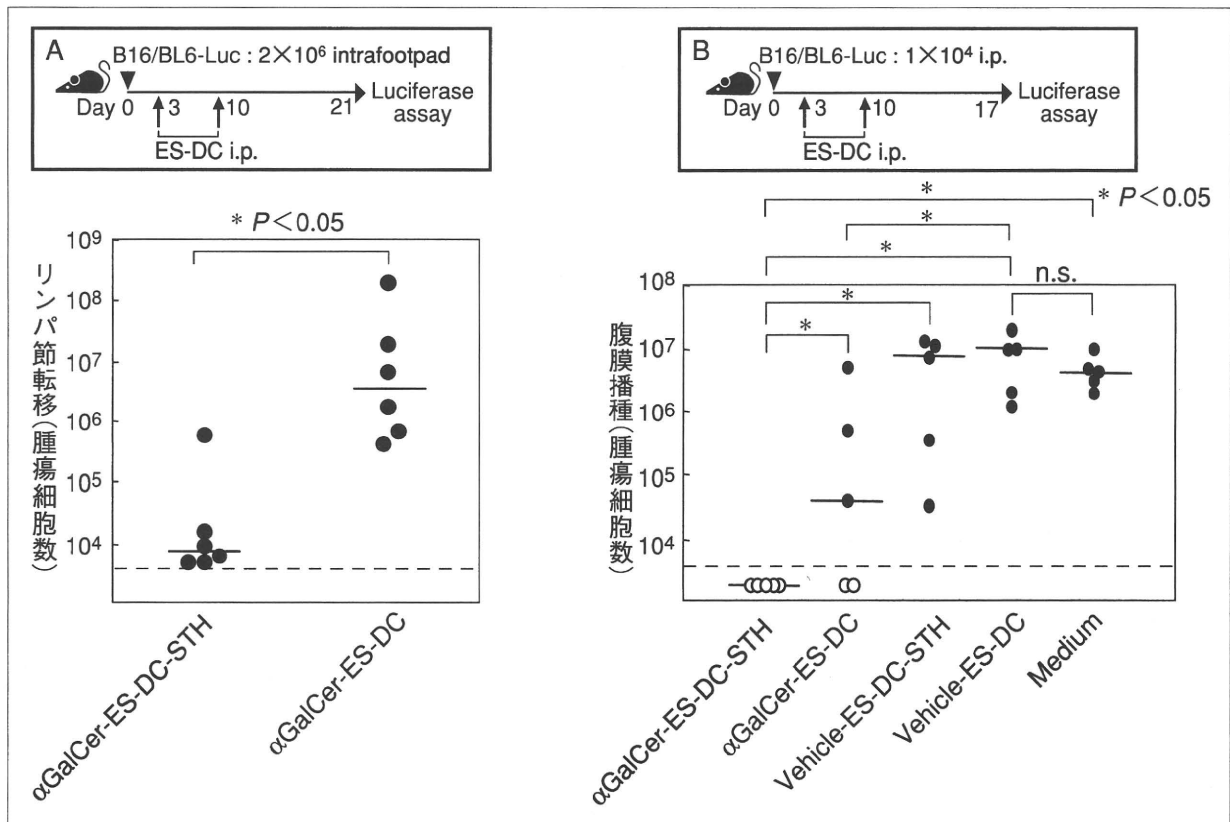


図7  $\alpha$ -GalCer負荷複数抗原標的ES-DCのソケイリンパ節転移, 腹膜播種治療モデルでの効果

違いも認められた。結果的に、Nanog-iPS細胞からは、マウスES細胞よりも、同じ数の未分化細胞から分化誘導培養をスタートした場合、より数多くのDCを得ることができた。

われわれは、さらに、遺伝子導入により抗原を発現させたiPS-DCによる抗腫瘍細胞ワクチンの実験も行った。ES細胞の場合と同様にして、OVA抗原発現iPS-DCを作製しマウス個体へ投与すると、マウス体内においてOVA特異的なCTLが誘導された。そして、OVA抗原発現iPS-DCによる細胞ワクチンを施したマウスは、OVA抗原を発現するメラノーマ(MO4株)に対して拒絶あるいは増殖抑制効果を示した。すなわち、抗原遺伝子を発現させたiPS-DCの投与により、抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を惹起することができた。

### おわりに

ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞の臨床応用にむけた技術は現在めざましく進歩している<sup>11)12)</sup>。よってこれらを癌の免疫療法に用いることができるようになる日はそう遠くはないと考えている。その際に本稿で述べた知見を反映さ

せることで、より強力な臨床効果が得られると期待している。

### 文 献

- 1) Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol 2005 ; 5 : 296.
- 2) 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.
- 3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007 ; 131 : 861.
- 4) 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.
- 5) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocel-



- lular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 306 : 16.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, et al. Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunother* 2009 ; 32 : 219.
- 10) 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.
- 11) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, et al. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by beta 2-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.
- 12) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009 ; 27 : 1021.

\* \* \*

## iPS細胞から樹状細胞への 分化誘導技術と将来の臨床応用

*Generation of dendritic cells from iPS cells aiming at future clinical application*

### Keywords

iPS細胞  
ES細胞  
樹状細胞  
細胞療法  
抗腫瘍免疫

千住 覚

- 1) 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野
- 2) 熊本大学発生医学研究所 幹細胞部門 iPS細胞研究担当
- 3) 科学技術振興機構 CREST

### Summary

We have previously established methods to generate dendritic cells (DC) from mouse and human embryonic stem (ES) cells. We designated them as ES-DC and mouse models have demonstrated the induction of anti-cancer immunity and prevention of autoimmune disease by *in vivo* administration of genetically engineered ES-DC. For the future clinical application of ES-DC, the histoincompatibility between patients to be treated and available human ES cells and the ethical concerns associated with use of human ES cells may be serious obstacles. Recently developed induced pluripotent stem (iPS) cell technology is expected to resolve these issues. We generated and characterized DC derived from mouse iPS cells. The iPS cell-derived DC (iPS-DC) possessed the characteristics of DC including the capacity of T cell-stimulation, antigen-processing and presentation, and cytokine production. Genetically modified iPS-DC expressing antigenic protein primed T cells specific to the antigen *in vivo* and elicited efficient antigen-specific anti-tumor immunity. The issues related to the future medical application of iPS-DC will be discussed.

### はじめに

我々は、過去約10年間にわたって、マウス、サル、およびヒトのES細胞由来から樹状細胞への分化誘導法の開発、および、これを用いた免疫制御療法に関する研究を行ってきた。iPS細胞の発見により、これまでのES細胞を用いた研究の成果を医療応用できる可能性がより具体的なものとなった。我々が実現を目指す医療技術は、治療の目的で移植した細胞が、患者の体内において数日から数週間の間生存し、何らかの治療効果を発揮するということを期待するものである。したがって、移植細胞が必ずしも長期的に生着する必要はなく、再生医療というよりは、iPS細胞を基盤とした細胞医療、あるいは細胞医薬品の作製、というべきかもしれない。本稿では、我々の研究の背景、マウスES細胞の場合との異同等を含めたマウスのiPS細胞から樹

Senju, Satoru

- 1) Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University
  - 2) iPS Cell Research Laboratory, Division of Stem Cell Research, Institute of Embryology and Genetics, Kumamoto University
  - 3) CREST, JST
- E-mail : senjusat@gpo.kumamoto-u.ac.jp