

プラチンとリピオドール懸濁液と 5-FU を用いた肝動注化学療法は門脈腫瘍塞栓を有する進行肝がんに対する有効な治療法になり得ることが示唆された。

小尾（協力研究者）は進行肝がんにおけるソラフェニブの治療成績を検討した。ソラフェニブで治療した進行肝がんは 44 例、全症例の MST は 6.8 ヶ月であった。TTP は 3.4 ヶ月であり、治療開始後 3 ヶ月の画像評価を行えた 31 例中 CR1 例、PR1 例、SD1 8 例、PD11 例であった。門脈浸潤を伴う症例は 19/44 (43%) 例であり MST は 6.3 ヶ月であった。一方、IFN+5FU 動注化学療法の MST は 9.4 ヶ月であった。現在、ソラフェニブと IFN+5FU 動注化学療法の RCT (UMIN00002401) を開始した。

今井（協力研究者）は肝がんに対するミリプラチンの動注に、多孔性ゼラチン粒による塞栓を併用した肝動脈化学塞栓療法

(TACE) の効果と安全性を検討した。対象は肝がん 182 例、肝がん治療直接効果判定基準 (TE) 4 が 34 例 (29.1%)、TE3 が 37 例 (31.6%)、TE2 が 38 例 (32.5%)、TE1 が 8 例 (6.8%) であり、TE3 以上が得られた例は病期 I/II が 88.6% に対して III/IV は 43.8% と有意に低率であった。初回治療例は TE3 以上が 72.1% であるのに対して、再治療例は 54.0% と低率である傾向が見られた。ミリプラチンを用いた TACE は安全性に関しては問題ないが、病期 III 以上の進行例や再治療例では、抗腫瘍効果が十分でなかった。

宮山（協力研究者）は肝がんに対する肝動脈化学塞栓術 (TACE) の際の診断能の向

上を目的に、prototype の dual-phase cone-beam CT (CBCT) を使用し、肝動脈造影下 CBCT 第 2 相での肝がん周囲のコロナ濃染の有無につき検討した。コロナ濃染は 88.7% の病変で描出可能であり、描出された腫瘍の平均腫瘍径は 18 ± 9 mm で、描出できなかったものの平均腫瘍径は 10 ± 2 mm と有意に小さかった ($p = 0.015$)。尾状葉に存在する肝がんの栄養血管は右肝動脈本幹から分岐するものが最も多く、左肝動脈、右肝動脈前枝、右肝動脈後枝から分岐するものがほぼ同頻度に認められた。それに関連して尾状葉枝や左葉内側区域枝の TACE 後の 6.2% の症例に胆管狭窄の発現をみた。また無漿膜野に存在する肝がんは 53.8% と高率に再発し、それには種々の肝外側副路の関与が確認された。

D. 考察

ソラフェニブは肝がんに対する初の分子標的薬であり、これまでも SHARP 試験や Asian-Pacific 試験でも有効性が報告され、我が国においても 2009 年以來、2010 年 5 月までに少なくとも 777 例以上に使用された (ネクサバール副作用検討報告 バイエル薬品：市販後調査であり、施設間の診療レベルの違いによって副作用の発現頻度に違いが見られる可能性を含んでいる)。治療効果につき、未だ十分な解析は行われていないが、ソラフェニブが著効した症例や予後の改善が認められた症例も散見されている。一方で、本剤投与開始から、比較的早期に肝不全又は肝性脳症が発現した報告例があり、厚生労働省から注意喚起が行わ

れている。本研究班では、独自の副作用調査票を作成し、肝がん治療における我が国を代表する分担研究者及び協力研究者の診療施設の協力を基に、ソラフェニブ投与症例 264 例の有効性と安全性に関する調査を行った。ソラフェニブの適応症例、至適投与法、中止基準、副作用の内容・頻度、副作用対策、効果判定、治療予測因子などにつき、本研究班のデータ、過去の SHARP 試験や Asian-Pacific 試験及びネクサバール副作用検討報告のデータを比較し、ソラフェニブの使用に際し現時点で最も推奨される事柄についてガイドライン化した（「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2010 年度版」-添付資料参照-）。ソラフェニブの至適使用量については、減量開始も考慮されるが、治療効果維持の証拠は得られておらず、実際に本研究班では 77%の症例で標準投与である 800mg で開始されていた。副作用としては Asian-Pacific 試験で見られたように、Hand - Foot - Syndrome (HFS) が 43.6%と高頻度であり、加えて消化器症状・高血圧が本研究班では多い傾向に見られた。肝障害を初め、グレード 3 を超える血液検査値の異常は高頻度（20-30%）であり、投与後 4 週間は週一回以上の採血と診察を行うことが望ましいと考えられた。これらの副作用や治療効果は異なる人種、また肝病変の成因（HBV/HCV 関連あるいはアルコールや NASH）で異なってくる可能性があり、今後さらなる検討の余地があると考えられた。

ミリプラチンは第 2 世代の白金製剤であり、リピオドールと懸濁して肝動脈塞栓療

法に使用される新規抗がん剤である。本研究班ではソラフェニブに加え、ミリプラチンの有効性・安全性を解析した。本研究班では、分担研究者及び協力研究者の診療施設の協力を基に 535 例の登録を得た。ミリプラチン使用では重篤な腎障害を認めず、Child-Pugh 分類 B 症例に対しても使用可能であった。その他、シスプラチンに塞栓物質を併用した際の副作用や有効性、血管障害の有無、治療効果判定について検討した。現在、既に多くの施設で、ミリプラチンに塞栓物質を併用して用いている場合が多く（90%以上）、塞栓効果も塞栓物質を用いることで向上するが、最終的な治療効果に関しては、未だ長期的な観察がなされておらず、今後の課題と考えられる（「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2010 年度版」-添付資料参照-）。

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

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

がん幹細胞に関する研究として金子（分担者）はOncostatin M(OSM)が肝がん幹細胞を分化誘導し、抗がん剤に対する感受性を高める分化誘導療法に応用可能であるかにつき検討し、OSMシグナルは肝細胞系への分化誘導と5-FUに対する感受性を亢進させ、がん幹細胞における抗がん剤抵抗性を克服する新規治療法の発展につながる可能性を示した。汐田（分担者）は肝がん幹細胞で高発現するhTERTの発現制御に関わる遺伝子を同定するため、リボザイムライブラリーの作成を行い、細胞内でhTERTの活性を亢進させるリボザイムの候補を同定した。今後の遺伝子クローニングに期待が持たれる。

池田（分担者）はミリプラチンの有効性・安全性の調査を行い、ガイドラインの作成に大きく貢献した。

がん免疫療法分野に関しては、廣石（分担者）は、肝がん治療後のがん抗原特異的CD8陽性T細胞の存在と予後との関連性を報告し、免疫療法の有用性を示唆した。竹原（分担者）はBcl-xLの機能ドメインに

特異的に結合する小分子ABT-737の肝がん細胞に対する抗腫瘍効果を前臨床モデルで検討した。恩地（分担者）は肝がんに対する腫瘍抗原パルス樹状細胞を用いた免疫療法の第I/II相臨床試験を開始し、樹状細胞の調整法、抗原刺激法など治療効果を上げる技術革新に期待が持たれる。上野（分担者）も樹状細胞の培養条件の一つとして、アミノ酸組成に注目し、CD14+単球のシグナル伝達、及び腫瘍細胞のシグナル伝達を制御する物質として、アミノ酸を含めた肝栄養関連物質が重要な役割を演じていることを示した。

新規抗がん剤を用いた臨床試験に関して古瀬（分担者）は肝機能低下群に対してのソラフェニブの有効性、安全性に関わる臨床試験を開始した。横須賀（分担者）はTS-1とソラフェニブの併用療法の臨床試験を推進し、工藤（分担者）はソラフェニブとlow dose FP療法との安全性、有効性を検討する臨床試験を推進した。佐田（分担者）はシスプラチン(CDDP)とリピオドール懸濁液および5-FUを用いた肝動注化学療法の臨床試験を推進している。小尾（協力研究者）は進行肝がんにおけるソラフェニブの治療成績を検討し、IFN+5FU動注化学療法のRCT(UMIN000002401)にて比較検討を行っている。

今井（協力研究者）は肝がんに対するミリプラチンの動注に、多孔性ゼラチン粒による塞栓を併用した肝動脈化学塞栓療法(TACE)の効果と安全性を検討した。宮山（協力研究者）は肝がんに対する肝動脈化学塞栓術(TACE)の際の診断能の向上を

目的に、prototype の dual-phase cone-beam CT (CBCT) を使用し、肝動脈造影下 CBCT 第 2 相での肝がん周囲のコロナ濃染の有無につき検討した。今後の進展が期待できる。

E. 結論

- 1) ソラフェニブ及びミリプラチンを中心とした新規抗がん剤の治療効果ならびに安全性調査を行った。「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2010 年度版」にまとめた。
- 2) PDGF-C-Tg を用いて非環式レチノイドの肝線維化抑制作用、肝発がん抑制作用が示された。また非環式レチノイドと他の薬剤の併用療法の可能性が示唆された。
- 3) ソラフェニブ+IFN 併用による血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現の基礎的検討がなされた。
- 4) 肝転写因子の一つである Maid はがん抑制因子、線維化抑制因子として働く可能性が示唆された。
- 5) 肝がん幹細胞の分化誘導剤である OSM による肝がん幹細胞を分化誘導し抗がん剤の感受性を上げる治療法の可能性が示された。
- 6) 肝がん局所療法後の腫瘍抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の存在は治療予後と関連することが示された。
- 7) Bcl-xL の機能ドメインに特異的に結合する小分子 ABT-737 の肝がん細胞に対する抗腫瘍効果を前臨床

モデルで検討した。

- 8) 樹状細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験が開始され、免疫学的効果及び安全性の評価がなされた。
- 9) 各種新規抗がん剤を用いた安全性、治療効果比較のための臨床試験が開始された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

新規抗がん剤の研究、およびがん幹細胞に対する治療法の開発

金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：我が国における肝細胞がんの多くはB型もしくはC型肝炎ウイルス感染を背景に発症し、早期発見を行いかつ根治的な治療が施されても経過で再発を繰り返し死に至る悪性度の高いがんである。近年正常組織と同様のがん組織においても幹細胞性を有する一部のがん細胞（がん幹細胞）が同定され、高い腫瘍増生能、抗がん剤抵抗性などがんの維持に必須な細胞集団であることが明らかにされつつある。これまで我々は肝幹細胞マーカーであるEpCAM陽性肝がん細胞が、がん幹細胞の特徴を有し抗がん剤抵抗性である事を同定した。本研究で我々は、正常胎児肝において肝芽細胞を肝細胞へと分化誘導するサイトカインとして知られるOncostatin M(OSM)が肝がん幹細胞の分化誘導療法に応用可能であるかにつき検討を行った。EpCAM陽性がん幹細胞では高率にOSMレセプターの発現が認められ、OSM投与により肝幹細胞マーカーの発現低下と肝細胞マーカーの発現上昇が認められること、分化誘導はOSMレセプター依存性であること、OSMを5-FUと併用することにより、EpCAM陽性肝がん幹細胞の5-FUに対する薬剤耐性が改善することを同定した。OSMは肝がん幹細胞の分化誘導を行い抗がん剤感受性を改善することから、肝細胞がん治療における有力な標的分子と考えられた。

A. 研究目的

肝細胞がんは世界第三のがん死亡原因であるにも関わらず、予後や薬物治療効果予測に基づいた分子診断はいまだ確立されていない。近年、血液がんや一部の固形がんにおいて幹細胞様の特徴を示す細胞群（がん幹細胞）の存在が明らかになり、がんの維持、転移や抗がん剤抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。肝細胞癌においてもいくつかの幹細胞マーカーを用いたがん幹細胞の分離が行われ、免疫不全マウスを用いた検討で強い腫

瘍増生能力と自己複製能力、非対称性分裂能力を有していることが報告されている。興味深いことに、がん幹細胞は従来用いられている細胞障害性の抗がん剤や放射線に関して高い抵抗性を有し、がん治療後の再発への関与が示唆されている。その抗がん剤抵抗性のメカニズムとしては、DNAダメージ修復や細胞周期制御、抗アポトーシスシグナルとの関連が挙げられており、如何にしてがん幹細胞の抗がん剤感受性を高めるかについて現在盛んに研究が行われている。

最近我々は肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いることで肝細胞がんを幹細胞タイプと肝細胞タイプに分類する方法を確立、発症年齢や Wnt シグナル活性の違い、肝切除後の予後など腫瘍としての特徴が大きく異なることを見出した。特に EpCAM 陽性細胞は幹細胞タイプの肝細胞がんにおいてがん幹細胞の特徴を有し、抗がん剤抵抗性を呈することから、肝細胞がん治療における重要なターゲットと考えられる。現在、がん幹細胞の自己複製と非対称性分裂を調整するシグナル伝達系の解析は肝がん幹細胞分画を減少させ、抗がん剤感受性を高めるものとして注目されている。

Oncostatin M (OSM) は IL-6 ファミリーに属するサイトカインで胎児肝では CD45 陽性造血細胞により産生され、正常肝臓器形成過程において肝芽細胞を肝細胞へ分化誘導させるサイトカインとして知られているが、肝細胞がんに及ぼす影響は不明である。本研究において我々は OSM が EpCAM 陽性肝細胞がんに与える影響について検討を行った。

B. 研究方法

サンプル 臨床サンプルとして、金沢大学付属病院で 1999 年から 2007 年にかけて肝切除が行われた 107 例の肝細胞がんおよび背景肝組織を解析に用いた。培養細胞は HuH7、HuH1 細胞を用い、DMEM-10%FBS 培地で培養した。また、1 例の AFP 陽性肝細胞がんの新鮮外科切除標本から EpCAM 陽性細胞分画を分離し、免疫不全マウスへの移植実験に用いた。

免疫組織化学 ホルマリン固定標本を用

いて OSM レセプター (OSMR) と EpCAM の発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット (DAKO)、抗 OSMR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 EpCAM 抗体 VU1D9 (Merck Chemicals) で免疫染色を施行した。また、Vector-red, Vector blue (Vector Laboratory Inc.) を用いて 2 重染色を行った。

フローサイトメーター 培養細胞および初代肝細胞がん細胞から単一細胞浮遊液を作成後、抗 EpCAM 抗体 (Ber-EP4, DAKO)、抗アルブミン抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 CK19 抗体 (DAKO)、抗 AFP 抗体 (Nichirei Biosciences) および Cytotfix/Cytoperm キット (BD Biosciences)、FACSCalibur で解析を行った。

リアルタイム PCR 各サンプルからの Total RNA は Trizol (Invitrogen) を用いて回収し、ABI 7900 Sequence Detection System を用いて解析を行った。

(倫理面の配慮)

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

個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻恒常性制御学講座にて個人情報分担管理者の管理の下保存、データは研究室に設置した専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

C. 研究結果

慢性肝炎、肝硬変および肝細胞がん組織における OSMR の発現について免疫組織化学を用いて解析を行ったところ、OSMR 陽性細胞は慢性肝炎組織ではほとんど認められないが肝硬変組織では門脈周囲の小肝細胞様細胞に発現が認められた（図 1 A、B）（Yamashita T., et al., Cancer Research 2010 から引用）。また、一部の肝細胞がんでは非がん部に比し強い発現が認められ（図 1 C）、特に間質への浸潤傾向の強い細胞で強い発現が認められた（図 1 D）。

図 1A 慢性肝炎組織における OSMR 発現

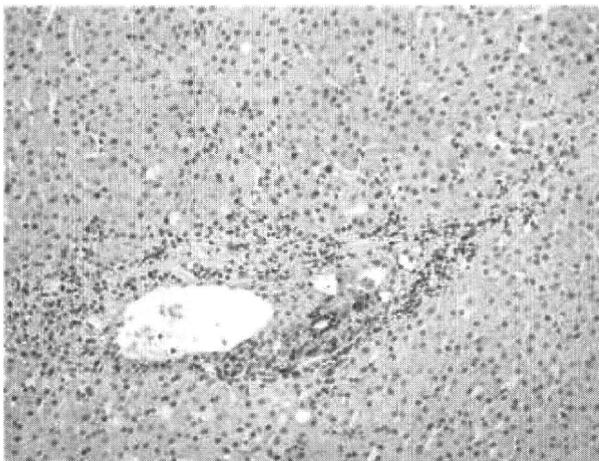


図 1B 肝硬変組織における OSMR 発現

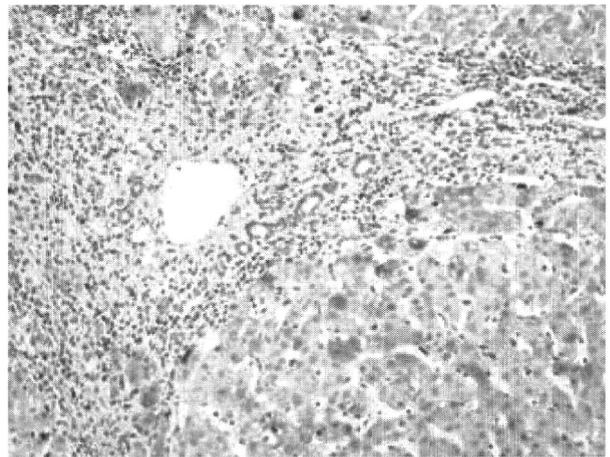


図 1C がん部と非がん部の境界領域

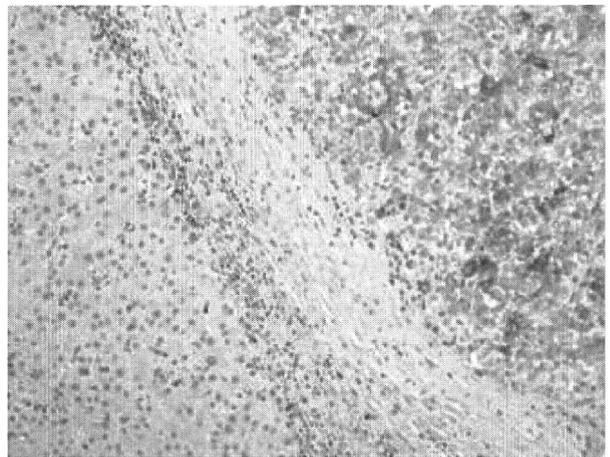
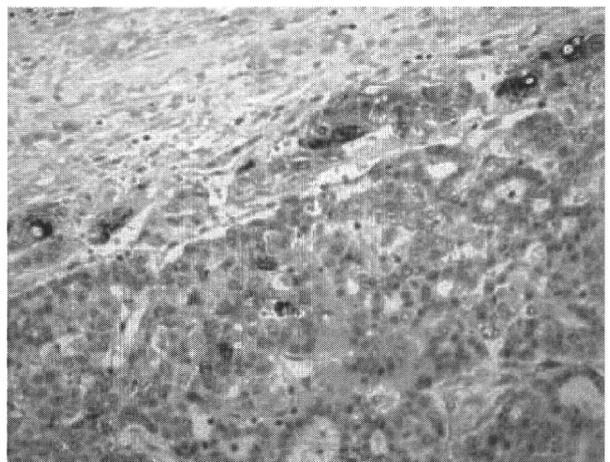


図 1D 間質に浸潤するがん細胞



107 例の肝細胞がん組織における EpCAM と OSMR の発現につき免疫組織化学で検討したところ、38 例が EpCAM 陽性、66 例が

OSMR 陽性の肝細胞がんであった。EpCAM と OSMR の発現には統計的に有意な正の相関が認められ ($P = 0.024$)、かつ OSMR 陽性肝細胞がんは統計的に有意に血清 AFP の上昇 ($P = 0.009$) と組織学的な未分化性 ($P < 0.0001$) と相関した。また、有意差は認めないものの、OSMR 陽性肝細胞がんは若年発症 ($P = 0.052$) と男性に多い傾向 ($P = 0.058$) が認められた。

次いで、OSMR 陽性 AFP 陽性 EpCAM 陽性肝がん培養細胞株である HuH1、HuH7 に対し OSM を投与したところ、OSMR の下流のシグナル伝達因子である STAT3 のリン酸化 (図 2A) と EpCAM 陽性細胞の減少 (図 2B)、肝幹細胞マーカーの遺伝子蛋白発現低下と肝細胞分化マーカーの遺伝子蛋白発現増加 (図 2C, D) が認められた。

図 2A OSM 投与後の STAT3 のリン酸化

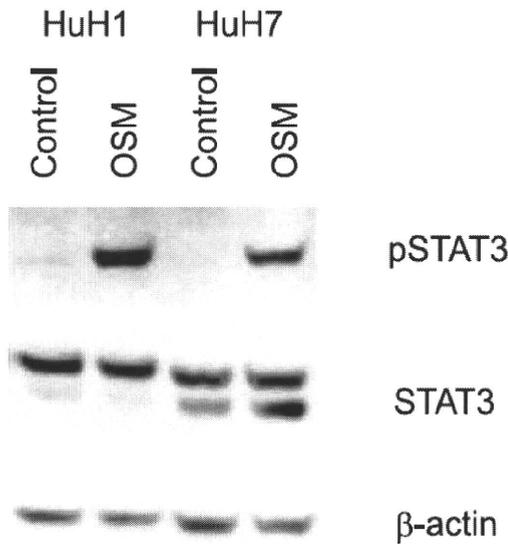


図 2B OSM 投与後の EpCAM 陽性細胞数の減少 (FACS)

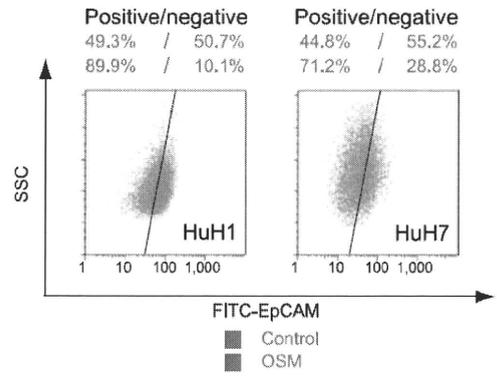


図 2C OSM 投与後の遺伝子発現変化

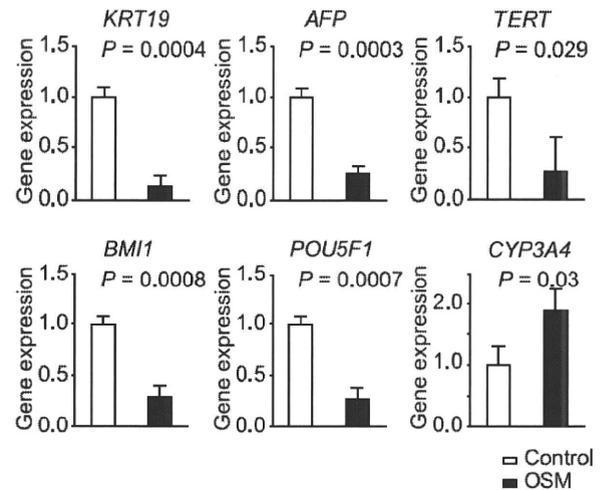
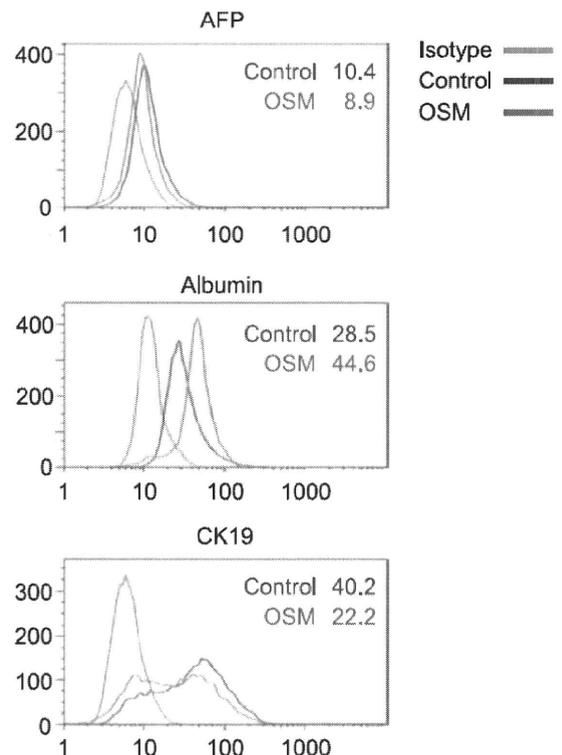
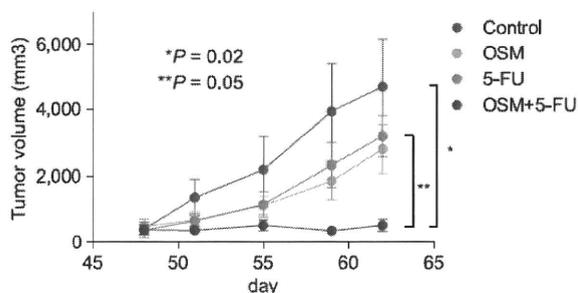


図 2D OSM 投与後の蛋白発現変化 (FACS)



OSM が EpCAM 陽性肝細胞がんの増殖に与える影響をコロニー形成や Ki-67 染色で検討を行ったところ、OSM 処理によりコロニーサイズや S 期の細胞数の増加が認められた。すなわち、OSM は細胞周期が比較的遅いがん幹細胞を dormant な状態から活性化させる一方、OSM 単独では抗腫瘍効果が限られている可能性が示唆された。そこで、OSM を殺細胞性抗がん剤の一つである 5-FU と組み合わせ、抗腫瘍効果について免疫不全マウスへの皮下移植モデルで検討したところ、OSM や 5-FU の単独投与に比べ、OSM と 5-FU を同時投与した場合に最も強い抗腫瘍効果が認められた (図 3)。

図 3 NOD/SCID マウス皮下移植モデルを用いた OSM と 5-FU 併用療法の抗腫瘍効果



D. 考察

正常幹細胞が正常臓器の維持に重要な役割を果たしているのと同様に、がん幹細胞はがん組織の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。実際に EpCAM 陽性肝細胞がんにおいて EpCAM 陽性細胞は陰性細胞へと分化し、かつ陰性細胞の維持に必須であることをこれまでに我々は報告してきた。一方 EpCAM 陽性細胞が 5-FU などの殺細胞性の抗がん剤に対して抵抗性を示す

ことも我々は明らかにしてきた。このような抗がん剤抵抗性を呈するがん幹細胞に対して、どのような治療ストラテジーを構築していくか、現在活発に議論されている。

OSM は OSMR を介して STAT3 のリン酸化と引き続くシグナル伝達系の活性化を起こすことが知られているが、IL-6 とは異なり OSM-OSMR 特異的な肝細胞系への分化誘導を起こすとされている。興味深いことに OSMR は幹細胞性の高いがん細胞で強発現しており、OSM に反応してより肝細胞系への分化誘導を行う一方、細胞周期はむしろ活性化し S 期の細胞数の増加が認められた。すなわち、がん幹細胞の分化誘導単独では S 期の細胞数の増加は起こるものの十分な抗腫瘍効果が得られない可能性がある。一方、OSM は dormant で抗がん剤抵抗性を示すがん幹細胞に対し細胞周期回転を上げることで S 期を標的とする殺細胞性抗がん剤の感受性を亢進させている可能性があり、OSM によるがん幹細胞の分化誘導と 5-FU による非がん幹細胞の殺細胞効果を組み合わせることにより、より有効な悪性度の高い肝細胞がんの治療に結びつく可能性が示唆された。

E. 結論

OSMR は幹細胞タイプの肝細胞がんにおける EpCAM 陽性がん幹細胞で強発現が認められ、OSM シグナル伝達系を介して肝細胞系への分化誘導と 5-FU に対する感受性を亢進させ、がん幹細胞における抗がん剤抵抗性を克服する新規治療法の発展につながると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010;70:4687-97.
- 2) Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2010;30:438-46.
- 3) Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2010;95:217-23.
- 4) Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2010 In press.
- 5) Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Chapter 16. Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. Springer New York 2010.

2. 学会発表

- 1) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S.

Signaling pathways responsible for self-renewal and differentiation in liver cancer stem cells. Japanese Cancer Association Annual Meeting 2010, Osaka, 2010.

- 2) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Yamashita T, Arai K, Takatori H, Nio K, Hara Y, Takamura H, Tani T, Ikeda H, Zen Y, Wang XW, and Kaneko S. Heterogeneity and Hierarchy of Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2010, Boston, 2010.
- 3) Yamashita T Honda M, Nio K, and Kaneko S. Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. American Association of Cancer Research 101st Annual Meeting 2010, Washington D.C., 2010.
- 4) 山下太郎、本多政夫、金子周一. Oncostatin M を用いた幹細胞様肝癌の分化誘導療法の検討、日本肝臓学会総会、山形、2010年。

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

樹状細胞を用いた肝がんの治療研究

中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨：肝細胞がん（肝がん）の局所療法と併用して二次発がん（再発）を抑制する治療法として、肝動脈塞栓療法（TAE）と同時に各種の樹状細胞〔1）未熟群、2）ペプチド刺激群、3）免疫賦活物質OK-432刺激群〕を投与する安全性臨床研究を行った。治療後12カ月以内の再発率は、OK-432刺激群において有意に低下した（Kaplan-Meier法： $P < 0.05$ ）。血清中サイトカインの推移をBio-Plex法を用いて包括的に測定すると、樹状細胞を投与していない対照症例と比較してOK432刺激群においてIL-9, IL-15, TNF α が上昇した。また、骨髄由来抑制細胞（MDSC）を反映する血清アルギナーゼ活性については、治療後の経過で低下傾向を示した。これより、肝がんに対するTAEと併用する樹状細胞は、Th1サイトカインの産生や抑制性免疫細胞の減弱作用によって二次発がんの抑制効果を発揮する可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞がん（肝がん）の局所制御と併用して二次発がんを抑制する治療法として、我々は樹状細胞（DC）を用いた抗腫瘍免疫療法の開発を進めてきた。これまでに肝動脈塞栓療法（TAE）と同時に樹状細胞を投与する手法が安全に施行できることを報告した。樹状細胞は末梢血単球から誘導して治療に用いるために、誘導調整法の違いが抗腫瘍免疫の賦活に深く関わってくる。そこで、調整法の異なる樹状細胞を用いた際の安全性に加えて二次発がんの抑制効果とその機序について検討した。

TAEの際にそれぞれの調整法（未刺激、ペプチド、免疫賦活物質OK-432）によって刺激した樹状細胞を投与し、治療後にラジオ波焼灼療法（RFA）を追加した（TAE+DC+RFA群；合計29例）。対照として、これまでにTAE後にRFA治療が併用された肝がん症例を用いた（TAE+RFA群；22例）。誘導した樹状細胞の機能的な検討として、抗原取込能、サイトカイン産生、細胞障害活性を定量した。投与後の免疫賦活作用は、血清中サイトカイン濃度（Bio-Plex法）、CTL活性（ELISPOT法）によって評価した。

B. 研究方法

肝がん合併C型肝硬変症例に対して、

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安

全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従うとともに、実施機関である「金沢大学医学倫理委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

樹状細胞の各種調整法においては、OK-432 刺激によって抗原取込能は低下したものの、著明な IL-12、IFN- γ 産生能を示し、肝がん細胞株 (Hep3B, PLC/PRF/5) に対する高い細胞障害活性を認めた。樹状細胞投与に関する臨床的安全性について、OK-432 群で発熱が多くみられる傾向にあったが、その他の重篤な副反応、有害事象は認めなかった。治療後 12 カ月以内の再発率に関して、OK-432 刺激樹状細胞を投与した群において有意に低下した (Kaplan-Meier 法: $P < 0.05$)。治療による血清サイトカイン濃度の推移は、OK-432 刺激を用いた TAE+DC+RFA 群において IL-9, IL-15, TNF- α の上昇を認めた。また、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) を反映する血清アルギナーゼ活性については、治療後の経過で低下傾向を示した。CTL 活性において特定のエピトープに対する反応と治療効果との相関を認めなかった。

D. 考察

悪性腫瘍に対する免疫治療の開発において、最も強力な抗原提示能をもつ免疫細胞である樹状細胞を用いる手法が試みられてきた。しかし、広く臨床効果を示す治療法

としては確立されていない。そこで、本研究では樹状細胞の特性を活用した治療法の開発を進めた。

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

治療に用いる樹状細胞の調整法に関しては、GMP グレードで利用できる多くの技術開発が進められており、本研究では代表的な方法としてペプチド刺激と免疫賦活物質 OK-432 を用いた。その結果、OK-432 刺激樹状細胞を投与することによって、治療後の無再発期間が延長し抗腫瘍効果が増強したものと考えられた。そして、抗腫瘍効果を誘導した免疫機構として、Th 1 サイトカインや抑制性免疫細胞への作用によってワクチン効果を発揮した可能性が示唆された。

しかし、本研究の肝がん再発抑制効果は根治的には至っておらず、また長期予後に関する成績も得られていないため、今後はより高い治療効果をめざした樹状細胞治療の開発が期待される。

E. 結論

肝がん合併 C 型肝硬変症例に対する TAE と併用して、免疫賦活物質によって刺激した樹状細胞を投与することは、Th1 サイ

トカインの産生や抑制性免疫細胞の減弱作用によって抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。これより、樹状細胞を用いた免疫治療が肝がんの二次発がん対策として寄与する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following ok432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.
- 2) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 2164-2174.
- 3) Kawano M, Nishida H, Nakamoto Y, Tsumura H and Tsuchiya H: Cryoimmunologic antitumor effects enhanced by dendritic cells in osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2010; 468: 1373-1383.
- 4) Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-

frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res.* 2010; 70: 6556-6565.

- 5) Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by combination of suicide gene therapy and monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* 2010; 12: 1002-1013.

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; **第61回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010.**
- 2) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; **International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa “Cancer and Host Response” (Satellite Symposium of 14th**

**International Congress of Immunology -
Kanazawa, Japan):** Abstract p33-34;
session; oral: Aug. 29, 2010.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝細胞癌に対する樹状細胞を用いた免疫療法の開発

恩地 森一 愛媛大学大学院先端病態制御内科 教授

研究要旨：本年度は、肝細胞癌患者に対する免疫療法の安全性と有効性を探索、評価する目的で、肝細胞癌に対する腫瘍抗原パルス樹状細胞を用いた免疫療法の第I/II相臨床試験を開始した。対象はTNM stage II～IIIであり標準治療としてTACEが行われている患者であり、現在までに5例で投与が終了した。全例においてGrade 3以上の有害事象はみられておらず、本治療法の安全性が確認された。

A. 研究目的

肝細胞癌（HCC）に対する治療としては、肝切除術、TACE、PEIT、RFAなどが行われてきており、腫瘍局所のコントロールは良好な結果が得られるようになった。しかし、その予後は依然として良好とはいえず、ほとんどの症例で再発が重要な予後因子となっている。再発肝癌は既存の治療法でコントロールすることは困難であり、それを補完するような他の治療法が望まれている。このような視点から癌免疫療法に期待が高まっている。今回、HCC患者に対する免疫療法の安全性と有効性を探索、評価することを目的に臨床試験を行った。

B. 研究方法

TNM stage II/IIIで標準治療としてTACEが行われている患者を対象に第I/II相臨床試験を行った。主要評価項目はGrade別副作用発現例数、発現頻度及びGrade3以上の副作用発現頻度（第I相）と抗腫瘍効果（第II相）、副次評価項目は腫瘍抗原特異的免疫応答とした。

DCの調整方法：アフェレーシス用いて末梢血単核球のを採取し、愛媛大学医学部附属病院細胞プロセッシングセンターにおいて抗原パルスDCを作成した。

抗原パルス DC の投与プロトコール：TACE を施行した後に腫瘍抗原をパルスした DC を 2 週間毎に 4 回投与し、その 4 週後に第 1 次評価を行った。血管造影・TACE を追加した後、腫瘍抗原パルス DC を 2 週間毎に 2 回投与し、その 4 週後に第 2 次評価を行った。

（倫理面への配慮）

当臨床試験は愛媛大学医学部附属病院倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

対象患者は 5 例。全例男性であり、HBV 陽性 2 例、HCV 陽性 3 例であった。有害事象としては、CTC grade 1～2 の発熱と DC 投与部位の発赤・腫脹があったが、全例で Grade 3 以上の副作用はみられず、安全性

が確認された。

また、観察が終了した症例のうち1例はSD (stable disease)で経過している。

D. 考察

現在までに、癌免疫療法として国内外でHCCに対するDCを用いた免疫療法が行われているが、その効果は十分とはいえない。

本研究では、腫瘍抗原特異的な免疫活性を効率よく誘導するため、腫瘍抗原をパルスしたDCを用いた新たな免疫療法を開始し、その安全性を確認できたとともに、一部の例では臨床効果が確認できた。今後は、臨床経過の追跡と免疫応答の詳細な解析を行う予定としている。また、より早期のHCC症例に対する免疫療法の臨床試験を計画している。

E. 結論

肝細胞癌に対する樹状細胞を用いた免疫療法を開始し、安全性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirooka M, Koizumi Y, Kisaka Y, Abe M, Murakami H, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Mass reduction by radiofrequency ablation before hepatic arterial infusion chemotherapy improved prognosis for patients with huge hepatocellular carcinoma and portal vein thrombus. *AJR Am J Roentgenol*. 2010 194(2):W221-6.
- 2) Kisaka Y, Hirooka M, Koizumi Y, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Contrast-enhanced sonography with abdominal

virtual sonography in monitoring radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *J Clin Ultrasound*. 2010; 38(3):138-44.

- 3) Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2010 May 17. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発

汐田 剛史 鳥取大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：肝細胞癌（HCC）は、治療抵抗性の難治性固形癌であるため、新規の医薬品開発が喫緊の課題である。近年、腫瘍形成能や化学療法等に対する抵抗性が極めて高い肝癌幹細胞が発癌、転移、再発に関わっていることが多数報告されており、癌治療においては、この癌幹細胞の除去が必要であると推測される。また、肝癌幹細胞とされるepithelial cell adhesion molecule（EpCAM）陽性細胞分画では、癌細胞と比較してhuman telomerase reverse transcriptase（hTERT）が高発現していることが報告されており、癌幹細胞が極めて高い細胞老化回避能を有していることが示唆されている。そこで、本研究では、肝癌幹細胞における治療標的としてhTERTに注目し、新規hTERT発現制御遺伝子の同定の為に、ランダムリボザイムライブラリーによるファンクショナルスクリーニングシステムを構築し、一次スクリーニングを行った。

A. 研究目的

近年、肝細胞癌においても、腫瘍形成能や治療抵抗性の極めて高い肝癌幹細胞の存在が報告されている。癌幹細胞は、その性質から発癌や術後再発転移への関与が示唆されており、癌治療においてこの癌幹細胞の除去は喫緊の課題である。その為、本研究では癌幹細胞で発現が亢進しているとされるhTERT遺伝子の発現抑制による新規治療法開発の為に、hTERT制御遺伝子の同定を行った。

B. 研究方法

hTERT 発現制御遺伝子同定の為に、約600万種の標的認識配列を有するランダムリボザイムライブラリーによる遺伝子発現

抑制を用いたゲノムワイドなファンクショナルスクリーニングシステムを構築した。また、スクリーニングの指標として、hTERT 発現依存的な EGFP 蛍光を用いるために、hTERT 遺伝子上流約 5 kbp の配列を導入した EGFP 発現プラスミド DNA を安定導入した肝癌細胞株を使用した。ライブラリー導入による遺伝子発現抑制後、フローサイトメトリーによる解析を行った。

（倫理面への配慮）

細胞を用いた実験系であるため、配慮の必要なし。

C. 研究結果

スクリーニングに使用する肝癌細胞株を

選択する為に、肝癌細胞株における real-time PCR、Western blot、免疫染色により hTERT mRNA、タンパク発現を確認した。その結果、hTERT 低発現株として PLC/PRF/5、高発現株として HepG2 をスクリーニング使用細胞として選択した。hTERT 遺伝子上流 5 kbp を pEGFP-1 プラスミドへ導入し、hTERT 依存的に EGFP 発現の制御を受ける pHERTpro-EGFP を構築し、これを前述の 2 細胞株へ導入することで安定発現細胞株を樹立した。樹立したクローンの EGFP 蛍光を観察した結果、PLC/PRF/5 の EGFP 蛍光と比較して HepG2 ではより強い EGFP 蛍光が観察された。また、hTERT 遺伝子を発現していない正常ヒト臍帯静脈内非細胞に pHERTpro-EGFP を導入した結果、EGFP 蛍光は観察されなかった。このことから、細胞内において pHERTpro-EGFP は正常に機能していることが示唆された。次に、樹立した細胞株のうち、PLC/PRF/5 を使用した 1 次スクリーニングを行った。リボザイム導入 72 時間後の細胞を回収し、Flow cytometry による解析を行った結果、リボザイム導入細胞では非導入細胞と比較して、EGFP 蛍光強度の増加が認められた。このことから、導入したライブラリー中には hTERT 発現抑制遺伝子を標的としたリボザイムが含まれており、抑制遺伝子が抑制された為に、強い EGFP 蛍光を発する細胞が増えたと推測された。

D. 考察

hTERT 発現制御については、これまで多数の研究が行われており、発現促進遺伝子

として c-Myc、HIF1/2- α 、発現抑制遺伝子として p53、TGF- β 及び Ssmad 3 などが報告されている。しかし、これらの因子は未だ臨床応用されておらず、新規 hTERT 制御遺伝子の同定が必要であると推測される。また、hTERT 遺伝子が複数遺伝子による発現制御を受けている可能性も考えられる。本研究で用いたランダムリボザイムライブラリーは、網羅的かつ複数遺伝子の遺伝子を同時に同定可能であるため、hTERT 制御遺伝子のスクリーニングに極めて有用であると考えられる。今後は、スクリーニングを繰り返すことで、PLC/PRF/5 におけるスクリーニングを繰り返すことで hTERT 発現抑制遺伝子を同定すると共に、hTERT 高発現株 HepG2 におけるスクリーニングも行い hTERT 発現促進遺伝子の同定も行う予定である。

E. 結論

hTERT 制御遺伝子同定を行うために、ランダムリボザイムを用いたファンクショナルスクリーニングシステムを構築し、hTERT 低発現肝癌細胞株 PLC/PRF/5 における 1 次スクリーニングを行った。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし