

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

進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第 I 相試験

横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 教授

研究要旨：2009年9月より進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第 I 相試験を行っている (UMIN-CTR 000002590)。試験デザインは3 on 3 cohort study。1cycleは3週間とし、投与方法はソラフェニブ連日投与、TS-1は2週投与1週休薬としている。主要評価項目は1cycleでの用量制限毒性 (Dose limiting toxicity : DLT) の発現率。2011年1月末時点で、Cohort 1を DLT発現率1/6例、Cohort 2 を0/3例で通過し、Cohort 3 (ソラフェニブ800mg連日投与+TS-1 80%用量を2週投与1週休薬) を0/3例で通過し、現在Cohort 4で試験継続中である。登録された症例は、年齢：53-79歳(中央値60歳)、性別：男性11名・女性1名、背景肝：C型肝硬変6名・B型肝炎5名・非B非C1名。12名全員がChild pugh Aである。腫瘍ステージは stage 3が4名、stage 4Aが3名、stage 4Bが5名。現時点までに、倦怠感、嘔気、下痢、脱毛、嘔声、高血圧、腹痛、発熱、AST/ALT上昇、T-BIL上昇、AMY上昇、血小板減少を有害事象として認めている。そのうちgrade3 (CTCAE ver3.0) のAST/ALT上昇、腹痛を1例に認め、用量制限毒性と判定。その他の有害事象についてはgrade 1または2である。

A. 研究目的

ソラフェニブは肝細胞癌の生命予後を改善する初めての全身化学療法であるが、効果は限定的である。有効性を高めるため、様々な分子標的薬や細胞障害性抗悪性腫瘍薬との併用試験が実施されている。TS-1は我が国オリジナルの薬剤であり、胃癌、大腸癌、膵癌、乳癌、肺癌など多くの癌種に適応取得しており、また肝細胞癌に対する知見も進行中である。本研究ではTS-1とソラフェニブ併用療法の推奨用量を決定するための第I相試験である。

B. 研究方法

標準治療無効もしくは対象とならない進行肝細胞癌患者さんを対象としている。試験デザインは3+3 cohort study。1cycleは3週間とし、投与方法はソラフェニブ連日投与、TS-1は2週投与1週休薬としている。主要評価項目は1cycleでの用量制限毒性 (Dose limiting toxicity : DLT) の発現率。

(倫理面への配慮)

本研究は抗悪性腫瘍薬併用試験であり安全性に関しては十分配慮し、有害事象発生

時には速やかに適切な診察・検査・処置を行う。また試験実施に係るデータや同意書等の取り扱いに関しては被験者の秘密保護について十分配慮する。本試験の参加により被験者の費用負担が増えないような対策を講じている。IRB の承認を得た同意説明文書を用いて十分な説明を行い、自由意思による文書同意を取得している。施設 IRB の承認および UMIN への登録を行って実施している (UMIN-CTR000002590)。

C. 研究結果

本第 I 相試験は現在 Cohort 4 が進行中であり、TS-1 とソラフェニブを併用する際の推奨用量はまだ決定されていない。来年度中には決定される予定である。

D. 考察

本邦におけるソラフェニブの使用成績調査の結果から、我が国では海外の試験結果と比較して、手足皮膚症候群や肝障害の頻度が高いことが明らかとなってきた。併用による有害事象発生に関しては十分な配慮を行い進めていく。

E. 結論

Cohort 1 でトランスアミナーゼの上昇がみられ 3 例が追加されたが、その後は特に問題となる有害事象もなく、dose escalation は行われ、現在 Cohort 4 (TS-1 80mg/m², ソラフェニブ 800mg/日、いずれも 100%) が進行中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogasawara S, Kanai F, Obi S, Sato S, Yamaguchi T, Azemoto R, Mizumoto H, Koushima Y, Morimoto N, Hirata N, Toriyabe T, Shinozaki Y, Ooka Y, Mikata R, Chiba T, Okabe S, Imazeki F, Yoshikawa M, Yokosuka O. Safety and tolerance of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*. In Press.
- 2) Ishibashi H, Maruyama H, Takahashi M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Assessment of hepatic fibrosis by analysis of the dynamic behaviour of microbubbles during contrast ultrasonography. *Liver Int*. 2010; 30: 1355-63.
- 3) Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in mice. *Hepatology*. 2010; 52: 1111-23.
- 4) Sudo K, Yamaguchi T, Ishihara T, Nakamura K, Hara T, Denda T, Tawada K, Imagumbai T, Araki H, Sakai M, Hatano K, Kawakami H, Uno T, Ito H, Yokosuka O. Phase II Study of Oral S-1 and Concurrent Radiotherapy in Patients with Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Jun 2.
- 5) Imada H, Kato H, Yasuda S, Yamada S, Yanagi T, Kishimoto R, Kandatsu S, Mizoe

- JE, Kamada T, Yokosuka O, Tsujii H. Comparison of efficacy and toxicity of short-course carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma depending on their proximity to the porta hepatis. *Radiother Oncol*. 2010; 96: 231-5.
- 6) Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M. Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2010; 103: 223-31.
- 7) Imada H, Kato H, Yasuda S, Yamada S, Yanagi T, Hara R, Kishimoto R, Kandatsu S, Minohara S, Mizoe JE, Kamada T, Yokosuka O, Tsujii H. Compensatory enlargement of the liver after treatment of hepatocellular carcinoma with carbon ion radiotherapy - relation to prognosis and liver function. *Radiother Oncol*. 2010; 96: 236-42.
- 8) Aoki R, Chiba T, Miyagi S, Negishi M, Konuma T, Taniguchi H, Ogawa M, Yokosuka O, Iwama A. The polycomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. *J Hepatol*. 2010; 52: 854-63.
- 9) Ito K, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Bekku D, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O. Risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Gastroenterol*. 2010; 45: 243-9
- 10) Maruyama H, Takahashi M, Ishibashi H, Okabe S, Yoshikawa M, Yokosuka O. Changes in tumor vascularity precede microbubble contrast accumulation deficit in the process of dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Eur J Radiol*. 2010 ; 75: 102-6.
2. 学会発表
- 1) 大岡美彦、金井文彦、吉川正治、岡部真一郎、小笠原定久、鳥谷部武志、篠崎勇介、横須賀收. 進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験. 第1回日本肝がん分子標的治療研究会. 平成22年1月16日. 神戸.
- 2) 大岡美彦、金井文彦、小笠原定久、鳥谷部武志、篠崎勇介、千葉哲博、岡部真一郎、吉川正治、横須賀收. 進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験(経過報告). 第2回日本肝がん分子標的治療研究会. 平成22年6月19日. 東京.
- 3) 大岡美彦、金井文彦、小笠原定久、篠崎勇介、千葉哲博、横須賀收. 進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験(経過報告). 第3回日本肝がん分子標的治療研究会. 平成23年1月15日. 下関.
- 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

肝癌におけるMaidシグナルの重要性に関する検討

坂井田 功 山口大学大学院消化器病態内科学 教授

研究要旨：Maidは細胞の分化、増殖に関与する分子であり、Maidノックアウトマウスで肝発癌が認められることから、肝発癌に関与していることが考えられる。またTGF-betaのシグナルを抑制することが知られている。Maid KOマウスを作製し四塩化炭素投与したところ、細胞増殖性の亢進、線維化の亢進が認められた。また大量スクリーニングが可能な魚類においてMaidの解析を行い、Maidは細胞の分化、増殖に関与し、肝癌抑制に関与することがわかった。Maidを制御することで肝発がんの予防ができる可能性が考えられる。

研究協力者

寺井 崇二 准教授

山本 直樹 講師

藤澤 浩一 助教

評価した。

（倫理面への配慮）

全ての動物実験は山口大学医学部動物実験委員会の審査を受け許可を得ており、「山口大学医学部動物実験指針」、「動物の保護及び保管に関する法律」（法律第105号）及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」（総理府告示第6号）の規制に基づいて行っている。

A. 研究目的

我々はこれまでにHuman Homologue of Maid (HHM)が、肝臓特異的な遺伝子発現制御、ヒト肝前癌性病変のマーカーになりうることについて報告している。またHHMが発癌制御に関与していること、TGF-betaの調節に関与していることが考えられることから、HHMを用いた発癌制御、線維化抑制を検討する。

B. 研究方法

Maid ノックアウトマウスを作製し、四塩化炭素を腹腔内投与して評価した。魚類ではDENを含む水で飼育し、細胞増殖性を

C. 研究結果

DEN 処理により得られたゼブラフィッシュ肝で Maid は癌前癌性病変で発現が増加し、HCC などの癌では発現が低下していた。Maid を過剰発現させたトランスジェニックメダカを DEN 処理したところ、BrdU 陽性細胞数が少なかった。Maid KO マウスを作製し四塩化炭素を投与したところ、肝線

維化亢進が認められ、Ki67 陽性細胞の増加、EpCAM 陽性細胞は減少が認められた。

D. 考察

Maid は肝発癌制御に関与していると考えられており、四塩化炭素投与で細胞増殖性が亢進していること、メダカでの Maid の過剰発現で細胞増殖性の低下がみられることから Maid は細胞増殖抑制に働くことが考えられる。DEN 処理で得られた肝組織でも Foci では発現が高く、HCC などの癌部では発現が低いことが免疫組織染色で確認できたことから発癌制御に関わっていると考えられる。また HHM は細胆管癌でも HHM 陽性の細胞の存在を確認しており、HHM は肝臓における幹細胞、癌幹細胞の発生を制御している可能性が示唆される。

E. 結論

Maid シグナルは線維化と肝前駆細胞の増殖の両方に関与する重要なシグナルである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 藤澤浩一、寺井崇二、山本直樹、佐伯一成、高見太郎、坂井田功。ゼブラフィッシュ Maid は肝腫瘍のマーカー分子である。第46回日本肝臓学会総会。山形。2010
- 2) Fujisawa koichi, Terai Shuji, Yamamoto Naoki, Saeki Issei, Takami Taro, Sakaida Isao. Expression of Zebrafish homologue

of Maid (ZHM) in liver tumors induced by DEN. The 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (ISHSR). Los Angeles. 2010

- 3) 山本直樹、寺井崇二、坂井田功。骨髄由来肝幹細胞の肝硬変修復時における様々な動態と微細構造解析。第9回日本再生医療学会総会。広島。2010
- 4) Terai Shuji, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao. Disruption of Maid accelerates liver fibrosis and cell proliferation in CC 14 induced cirrhosis mice. AASLD Liver meeting 2010. Boston. 2010

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

寺井崇二、高見太郎、坂井田功、沖田極

新規肝細胞癌の腫瘍マーカー抗 HHMIgG の発見 (特許出願 2004-267065) (平成16年9月14日)

肝細胞癌の新規腫瘍マーカーとしての機能を有する抗 HHM IgG 抗体、肝癌のスクリーニング法および肝癌進行マーカーとしての利用 (特許第 4465467 号) (平成22年3月5日)

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

Bcl-xL阻害剤ABT-737による肝がんの分子標的治療

竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 准教授

研究要旨： Bcl-xLは肝がんの40%で高発現しているアポトーシス抑制分子である。Bcl-xLの機能ドメインであるBH3 binding groove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。ABT-737は肝がん細胞株に対して高濃度でアポトーシスを誘導したが、ヌードマウスの皮下腫瘍モデルでは有意な腫瘍退縮効果を示さなかった。ABT-737の投与により肝がん細胞株のMcl-1の分解が遅延しMcl-1が蓄積することがこのアポトーシス耐性の原因であることがMcl-1 siRNAを用いた阻害実験により示された。ソラフェニブはMcl-1の発現を転写レベルで腫瘍特異的に抑制することから、ABT-737とソラフェニブの併用治療が期待される治療戦略であると考えられた。

共同研究者

疋田隼人 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

ソラフェニブは現在肝がんにも認可された唯一の分子標的薬剤であるが、腫瘍の縮小をきたすことは極めて稀である。ソラフェニブは内皮細胞に対しては血管新生阻害作用、腫瘍細胞に対しては oncogenic kinasesによる腫瘍増殖に対する抑制作用を持っているが、アポトーシス誘導能は乏しく、このことがこの薬剤が殺細胞的ではなく静細胞的な効果を示す原因であると考えられる。本研究では肝がんに対するアポトーシス耐性の解除を目指した分子標的治療の開発を目的に研究を行う。

B. 研究方法

肝がん細胞株に ABT-737 あるいはソラフェニブを投与し、アポトーシス誘導を Caspase-3/7 測定、WST アッセイにて評価した。Huh7 細胞をヌードマウスに皮下に移植し、ABT-737 を腹腔内に連日投与し、経時的に腫瘍サイズを計測した。Bcl-xL、Mcl-1 発現はウエスタンブロットにより検討した。

（倫理面への配慮）

動物を用いた実験は、施設の動物実験倫理審査委員会の承認のもと、動物愛護に関して十分に配慮し、実施した。

C. 研究結果

Huh7、Hep3B 肝がん細胞株は高濃度（8

～16 μ M) の ABT-737 処理によりアポトーシスが誘導された。ABT-737 (50 mg/kg) は Huh7 ゼノグラフトモデルに対しては有意な腫瘍縮小効果を示さなかった。肝がん細胞株は ABT-737 の投与により Mcl-1 発現が増強した。この原因として mcl-1 mRNA の発現増強は認めなかったが、Mcl-1 の分解が遅延することがサイクロヘキサマイド添加実験により示された。Mcl-1 siRNA を投与し肝がん細胞株の Mcl-1 発現を低下させると、比較的低濃度の ABT-737 (4 μ M) により肝がん細胞株はアポトーシスをおこした。ソラフェニブは転写レベルで Mcl-1 の発現を腫瘍特異的に抑制した。

D. 考察

Bcl-xL と Mcl-1 は肝がん細胞にアポトーシス耐性を付与する分子である。ソラフェニブは Mcl-1 の発現を腫瘍特異的に転写レベルで抑制するが、これだけではアポトーシスを誘導することはできない。同時にもう一つのアポトーシス耐性関連分子である Bcl-xL の機能を阻害することにより、ソラフェニブの静細胞的な効果を殺細胞的な効果に変換できる可能性がある。

E. 結論

ABT-737 は肝がん細胞株の Mcl-1 の分解を阻害するが、Mcl-1 の発現をノックダウンすることにより強いアポトーシスを誘導した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology** **52**: 1310-1321, **2010**.

2. 学会発表

1) 第96回日本消化器病学会総会 2010年4月22日(木)～24日(金)新潟県民会館、新潟市民芸術文化会館、新潟市音楽文化会館、朱鷺メッセ シンポジウム5：消化器癌に対する分子標的治療の現状 S5-7 肝細胞癌における Bcl-xL及びMcl-1をターゲットとした分子標的治療 足田隼人、竹原徹郎、林紀夫

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

肝機能の低下した進行肝細胞癌患者における全身化学療法の安全性と有効性に関する研究

古瀬 純司 杏林大学医学部内科学腫瘍内科 教授

研究要旨：進行肝細胞癌に対する全身化学療法として、マルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブとプラセボによる第Ⅲ相試験が実施され、ソラフェニブ治療群で生存期間の改善が確認された。現在、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汎用されている。しかしこれまでの比較試験では、対象はChild-Pugh Aの肝機能良好な患者に限られており、肝機能不良例での安全性や有効性は確立していない。一般臨床では化学療法の適応となる中等度肝機能が低下したChild-Pugh Bの患者も少なくない。本研究では肝機能低下例を含めた進行肝細胞癌患者を対象として、安全性と有効性を検証する前向き第Ⅱ相試験を実施し、平成22年12月現在、19例が登録されている。

A. 研究目的

進行肝細胞癌に対する化学療法として、マルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブのプラセボ対照第Ⅲ相試験が行われ、ソラフェニブ治療群で生存期間の改善が確認されたことから、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位置づけられている。わが国でも2009年5月保険適応が承認され、一般臨床でも用いられている。しかし、わが国では前向きな臨床試験として、27例による第Ⅰ試験のみであり、有効性と安全性の確認のため、多数例での検討が必要である。またこれまでの比較試験では対象はChild-Pugh Aの肝機能の良好な患者に限られており、肝機能低下例での安全性や有効性は確立していない。以上から、本研究では肝機能低下例を含めた進行肝細胞癌におけるソラフェニブの安全性と有効性について明らかにするため、前向き第Ⅱ相試験

を実施する。

B. 研究方法

ソラフェニブによる単アーム前向き第Ⅱ相試験を実施する。対象は肝切除や肝移植、局所壊死療法、肝動脈化学塞栓療法など局所治療により根治が期待できない進行肝細胞癌患者とした。

1) 主な適格規準

- (1) 組織学的もしくは臨床的に肝細胞癌（但し、混合型を除く）であることが確認されている
- (2) 肝切除術や肝移植術の適応がなく、局所壊死療法（エタノール注入療法やラジオ波焼灼術など）および肝動脈化学塞栓療法により根治が見込めない
- (3) 年齢は20才以上79歳以下
- (4) 測定可能病変を有する
- (5) ECOG Performance Status 0-2

- (6) 主要臓器の機能が保持されている。
- (7) 肝機能がChild-Pugh scoreで5-8点
- (8) 前治療から少なくとも4週間以上経過している
- (9) 全身化学療法の治療歴を有さない
- (10) 患者本人からの文書による同意
- (11) 少なくとも8週以上の生存が期待できる

2) 除外規準

- (1) 治療に反応しない中等量または大量の腹水、胸水を有する
- (2) 重篤な合併症を有する
- (3) 妊婦・授乳中および妊娠の可能性または意思がある症例、又は挙児を希望する
- (4) 経口摂取が困難である
- (5) 強力なCYP3A4を誘導する薬剤を内服している。(ワーファリンなどのクマリン誘導体の内服は慎重投与の上許容される)
- (6) その他、医師が本試験を安全に実施するのに不相当と判断する

3) 治療方法

使用薬剤： ソラフェニブ

ソラフェニブは、1回投与量400mg、1日2回連日経口投与する。原則として、病勢の増悪を認めず、忍容性がある限り継続する。6-8週ごとにCTまたはMRIにて評価を行う。

4) 評価項目2-1-1 有効性評価項目

- (1) 主要評価項目： 無増悪期間
- (2) 副次的評価項目： 奏効割合、全生存期間
- (3) 安全性評価項目
有害事象の種類、発現頻度およびその

重症度

- (4) バイオマーカーの検討
末梢血、腫瘍組織の解析

(倫理面への配慮)

本研究における治療に際しては、患者には文書を用いて十分な説明を行い、患者自身による同意を本人より文書で取得する。データの取り扱いに関して、直接個人を識別できる情報を用いず、データベースのセキュリティを確保し、個人情報の保護を遵守する。

C. 研究結果

平成 22 年 4 月より登録を開始し、平成 22 年 12 月現在、7 施設から 19 例が登録されている。19 例の患者背景は、年齢中央値 66 歳、男性 13 例、女性 3 例、performance status 0 16 例、1 6 例、肝炎ウイルス B 型 7 例、C 型 9 例、非 B 非 C 1 例、Child-Pugh A 18 例(score 5 点 10 例、6 点 8 例)、B 1 例である。評価のできた 14 例において、治療期間は中央値 1.8 カ月、3 カ月以上継続できたのは 5 例 (36%)であった。これまで報告された重篤な有害事象は、Grade 3 肝障害 3 例 (21%)、Grade 3 手足皮膚反応、Grade 3 骨髄抑制、咽頭浮腫、各 1 例 (7%)を認めたが、肝障害の 3 例はいずれも Child-Pugh score 6 点であった。また、Child-Pugh B の 1 例は食道静脈瘤出血を認めた。

D. 考察

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、ラジオ波焼灼療法、肝動脈塞栓化学療法（TACE）などの局所療法が中心となっている。しかし、肝外転移例やTACEが無効な例など化学療法が適応となる症例も少なくないことから、有効な治療法が必要である。

近年、分子標的薬の開発が盛んに行われ、肝細胞癌でも多くの臨床試験が行われるようになってきていた。その中で、RAFキナーゼ、VEGFR-1-3、PDGFR- β などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬ソラフェニブを用いたプラセボ対照のランダム化比較試験（SHARP試験）の結果、ソラフェニブ治療群はプラセボ群に比べ有意な生存期間の延長が確認された。わが国では肝細胞癌に対する第I相試験により、SHARP試験と同じ推奨用量が示され、2009年5月、わが国でも肝細胞癌に適応が承認されている。現在、ソラフェニブによる化学療法は肝外転移を有する例や局所治療が適応にならない進行例に対する標準治療として位置づけられている。

これまでの比較試験では、Child-Pugh Aの肝機能良好例のみを対象としており、肝機能低下例での安全性と有効性は確立していない。一般臨床において肝機能低下例も少なくなく、これらの患者におけるソラフェニブの安全性と有効性を明らかにすることが求められている。Child-Pugh Cの高度肝機能不良例は化学療法の適応はないことから、本研究ではChild-Pugh AとBの患者を対象に前向きな臨床試験を計画した。現在19例が登録されているが、ほとんどがChild-Pugh Aであり、Bは1例のみである。

ソラフェニブの適正使用の推奨がChild-Pugh Aとされており、これまで安全性の確認されていないBの症例の登録が慎重に行われている結果と考えられる。Child-Pugh Aのうち、score 5点と6点では6点の症例で肝障害が強く出ている傾向があり、注意が必要である。今後さらに症例を集積していく予定である。

E. 結論

ソラフェニブの大規模な臨床試験ではChild-Pugh Bの肝機能低下例での安全性と有効性は検証されていない。今後本研究により、Child-Pugh Bを含めた症例での有用性を明らかにすることで、一般臨床での適正使用の確立に大きな貢献ができるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 古瀬純司. Poster Discussion Session #4026 TACE とソラフェニブの併用は、中等度進行期肝細胞癌のアジア人患者で安全かつ有効. 新薬と臨床 59:306-307, 2010.
- 2) Yeo W, Chen PJ, Furuse J, et al: Eastern Asian expert panel opinion: designing clinical trials of molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma. BMC Cancer 2010;10:620.
- 3) Furuse J, Okusaka T, Kaneko S, et al: Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 2010;101:2606-2611.

- 4) Kudo M, Han KH, Kokudo N, Cheng AL, Choi BI, Furuse J, et al: Liver Cancer Working Group report. Jpn J Clin Oncol 2010;40 Suppl 1:i19-27.
- 5) Kudo M, Kubo S, Takayasu K, Sakamoto M, Tanaka M, Ikai I, Furuse J, et al: Response Evaluation Criteria in Cancer of the Liver (RECICL) proposed by the Liver Cancer Study Group of Japan (2009 Revised Version). Hepatol Res 2010;40:686-692.
- 6) Chen PJ, Furuse J, Han KH, et al: Issues and controversies of hepatocellular carcinoma-targeted therapy clinical trials in Asia: experts' opinion. Liver Int 2010;30:1427-1438
- 7) Sato K, Sato T, Furuse J, et al: A conundrum for randomized controlled trials: experience from a small hepatocellular carcinoma trial. Jpn J Clin Oncol 2010;40:949-953.
- 6月11日
- 4) 古瀬純司. 教育講演. 肝・胆道・膵癌の標準治療－化学療法の位置づけ. 19回日本癌病態治療研究会, 東京, 2010年7月1日
- 5) 古瀬純司. 肝細胞がんにおける分子標的治療の新たな展開. 第48回日本癌治療学会学術集会, 京都市, 2010年10月28日
- 6) 古瀬純司. 肝・胆道・膵がんにおける分子標的治療. 第43回日本内科学会中国地方会生涯教育講演会, 岡山市, 2010年11月14日
- 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

2. 学会発表

- 1) 鈴木英一郎, 古瀬純司, 長島文夫. 消化器がん化学療法における Oncologic emergency の検討. 第107回日本内科学会講演会, 東京, 2010年4月9日
- 2) 古瀬純司. 肝細胞癌に対するソラフェニブのエビデンスと適正使用. 第22回日本肝胆膵外科学会学術集会, 仙台市, 2010年5月28日
- 3) 古瀬純司. 特別講演. 肝細胞癌に対する分子標的治療のエビデンスと最新の話. 第16回旭川肝がん研究会日本医師会生涯教育講座, 旭川市, 2010年

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

肝硬変・肝癌患者の免疫機構に關与する遊離アミノ酸の研究

上野 義之 東北大学大学院医学系研究科・消化器病態学 准教授

研究要旨：肝硬変・肝癌患者では各種免疫細胞の機能低下が知られている。我々は肝硬変で出現するアミノ酸不均衡が樹状細胞機能を低下させることを近年報告した。この事実は肝癌に対する樹状細胞療法の治療効果を低下させている原因の一つと考えられる。これまでの研究過程において「肝硬変患者の血漿中アミノ酸と一致した無血清培地」を独自に作成することで個々の遊離アミノ酸の免疫細胞に対する作用を解析することが可能となった。今回、樹状細胞を含めた単球系細胞に対する基本アミノ酸20種類の作用を解析することを目的とした。

A. 研究目的

昨年度までの結果として、20種類のアミノ酸の中でL-Cystine (L-Cys) が進行した肝硬変患者の血漿TNF- α , 末梢血中単球数に正の相関があり、in vitroにおいてもCD14+単球からのTNF- α の産生を濃度依存性に高めることを報告した。今回更にその現象およびメカニズムを解析することを目的とした。

B. 研究方法

肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度に一致した無血清培地 (ACM) 中の L-Cys の濃度を様々に変更し、健常人・肝硬変・肝癌患者の CD14+単球・樹状細胞の機能（表現型、サイトカイン産生能、リンパ球刺激能など）を解析する。更に、L-Cys / L-Glutamate (L-Glu) 交換輸送体 xCT についても研究をすすめる。

（倫理面への配慮）

当研究は既に、肝硬変・肝癌患者からの臨床検体を使用する点について東北大学医学部倫理委員会から既に承認を受けている。（2009-209, 2009-535）

C. 研究結果

単球系細胞株である THP-1 の細胞内・外の L-Cys / L-Glu の移動を HPLC で測定したところ ACM 中の L-Cys 濃度を高めることで細胞内の L-Cys が増加し L-Glu の細胞外への流出が増加した。このアミノ酸移動は LPS 刺激時の CD14+単球でも同様であった。xCT は単球系細胞のみに発現しており T-cell 系には発現していなかった。xCT 交換輸送を阻害すると CD14+単球からの TNF- α 産生は抑制された。

D. 考察

近年、血漿中の L-Cys の増加は酸化ストレスの一つの要素となることが知られてきている。非代償性肝硬変で出現する L-Cys の増加が CD14+単球に酸化ストレスを与え TNF- α の産生を高めている可能性が考えられる。今後、酸化ストレスマーカーの測定および実際の肝硬変患者の CD14+単球を用いた検討を進める。

E. 結論

進行した肝硬変に出現する L-Cys / L-Glu 不均衡は単球の xCT を介した L-Cys / L-Glu 交換輸送を促進し TNF- α をはじめとした炎症性サイトカインの産生を増加させる。この事は進行した肝硬変・肝癌患者では単球系細胞が正常な機能を果たせない一つの原因と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno Y, Ambrosini YM, Moritoki Y, Ridgway WM, Gershwin ME. Murine models of autoimmune cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:274-9.
- 2) Obara N, Fukushima K, Ueno Y, Wakui Y, Kimura O, Tamai K, Kakazu E, Inoue J, Kondo Y, Ogawa N, Sato K, Tsuduki T, Ishida K, Shimosegawa T. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *J Hepatol* 2010;53:326-334.
- 3) Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y,

Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, Shimosegawa T. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis* 2010;202:202-13.

- 4) Glaser S, Wang M, Ueno Y, Venter J, Wang K, Chen H, Alpini G, Holterman A. Differential transcriptional characteristics of small and large biliary epithelial cells derived from small and large bile ducts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G769-77.
- 5) Glaser S, Lam IP, Franchitto A, Gaudio E, Onori P, Chow BK, Wise C, Kopriva S, Venter J, White M, Ueno Y, Dostal D, Carpino G, Mancinelli R, Butler W, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Alpini G. Knockout of secretin receptor reduces large cholangiocyte hyperplasia in mice with extrahepatic cholestasis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 2010;52:204-14.
- 6) Woo K, Sathe M, Kresge C, Esser V, Ueno Y, Venter J, Glaser SS, Alpini G, Feranchak AP. Adenosine triphosphate release and purinergic (P2) receptor-mediated secretion in small and large mouse cholangiocytes. *Hepatology* 2010;52:1819-28.

2. 学会発表

- 1) 上野義之、L-CystineはLPS刺激時の単球からのTNF- α 産生を高め、非代償性

肝硬変の腎機能低下に關与する。
JDDW2010/横浜

G. 知的所有權の出願・取得狀況

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

肝癌における細胞性免疫応答の検討

広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨：肝細胞癌において高頻度に発現するMAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原に対する腫瘍特異性T細胞応答と患者の臨床経過との関連を検討し、肝癌に対する免疫応答が臨床経過に及ぼす影響を考察した。3種の腫瘍抗原由来の合成ペプチドに対する患者末梢CD8陽性細胞のIFN- γ 産生能をELISpot法で評価し、肝癌治療経過中の免疫応答を検討した。肝癌治療前後で癌抗原ペプチドに対し強い免疫応答を示した症例がみられたが、免疫応答がみられても治療後も癌が残存している場合は予後不良であった。治療の前後で免疫応答がみられるペプチドはほとんど異なっており、肝癌治療が患者の免疫応答に影響を与えることが示唆された。肝癌が再発し治療が効きにくくなってくると、免疫応答が減弱する例がみられた。特定の肝癌特異的細胞障害性T細胞応答が、肝癌再発を抑制できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞癌は局所療法や集学的治療の発展により、制御可能な症例が増加してはいるがまだ治療困難な症例も多く、副作用が少なくかつ効果的な新規治療の開発が急務である。その点で免疫療法が期待されているが、これまでには優れた治療効果を示すものは報告されていない。本研究は、肝細胞癌において高頻度に発現するMAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原に対する腫瘍特異性T細胞応答と患者の臨床経過との関連を検討し、肝癌に対する免疫応答が臨床経過に及ぼす影響を考察することで、将来的な肝癌免疫治療の確立を目指すことを目的に行った。

B. 研究方法

MAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原、それぞれの全長を網羅し、10アミノ酸ずつオーバーラップする20アミノ酸のペプチドを作成した。27例の肝癌患者を対象に、3種の腫瘍抗原由来の合成ペプチドに対する患者末梢CD8陽性細胞のIFN- γ 産生能を、ELISpot法で評価した。そして、腫瘍抗原特異的免疫応答と臨床経過とを比較検討した。

（倫理面への配慮）

昭和大学倫理委員会に研究実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、研究実施の承認を得た。肝癌患者に研究内容を説明し、研究への参加同意書を書面で取得した。

C. 研究結果

- 腫瘍抗原ペプチドに対し強い免疫応答を示した症例は、治療前 22%、治療後 33%だった。
- CD8 陽性細胞が反応する癌抗原ペプチドには、治療前後で差異がみられた。
- 肝癌多発例や治療が不完全な症例では、腫瘍抗原特異的 IFN- γ 産生がみられても予後は不良であった。
- 肝癌治療後無再発期間は腫瘍抗原特異的免疫応答が強くみられ、肝癌が再発を繰り返すようになると、免疫応答が減弱する症例がみられた。

D. 考察

昨年度の研究により、肝癌局所治療後に癌抗原に対し強く免疫応答が認められる症例では、再発までの期間が長いことがわかった。本年度の研究により、症例によっては、腫瘍特異的免疫応答が肝癌再発を抑制することも示唆され、免疫応答を増強させるような治療の有効性が考えられた。また、ペプチドワクチン免疫療法を行う際には、個々に適切なペプチドを選択することが重要であると考えられた。

E. 結論

- 肝癌局所治療が免疫応答に影響を及ぼしていることが示唆された。
- ある特定の腫瘍特異的 CTL が肝癌再発を抑制する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T,

Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. Strong CD8+ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 2010; 45 (4): 451-458.

- 2) Shimozuma Y, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M. Reactivation of Epstein-Barr virus in B cells of patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 2010; 82 (12): 2064-2072.

- 3) Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. Cyclooxygenase-2 gene promoter haplotypes affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatol Res*, 2010; 40 (12):1219-26.

2. 学会発表

- 1) 大森里紗、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、土肥弘義、広石和正、井廻道夫. 肝癌における HLA 拘束性 Glypican -3 エピトープの同定. 第 96 回日本消化器病学会総会. 新潟. 2010.
- 2) 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. C 型慢性肝炎患者における B 細胞異常関連マーカーと抗ウイルス療法反応性との関連. 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 3) 下間祐、伊藤敬義、井口桃子、打越学、

- 宮下みゆき、広石和正、井廻道夫。HCV 感染が惹起する B 細胞における EBV 再活性化。第 46 回日本肝臓学会総会。山形。2010。
- 4) 坂木理、牧野鈴子、広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、大森里紗、上田久美子、井廻道夫。自己免疫性肝疾患における病態と COX-2 及び osteopontin 遺伝子プロモーター領域多型との関連性の解析。第 46 回日本肝臓学会総会。山形。2010。
- 5) 江口潤一、広石和正、土肥弘義、石井成明、平出綾子、坂木理、大森里紗、馬場俊之、松村卓哉、魚住祥二郎、井廻道夫。消化器癌における IL-4 と CpG 併用による抗腫瘍効果と作用機序の検討。第 52 回日本消化器病学会大会。横浜。2010。
- 6) 広石和正、江口潤一、井廻道夫。肝細胞癌患者における癌抗原特異的細胞性免疫応答。第 14 回日本肝臓学会大会。横浜。2010。
- 7) Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Hiroishi K, Imawari M. B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon-resistant phenotype. The Liver Meeting 2010, The 61st Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. Boston. 2010.
- 8) 石井成明、広石和正、井廻道夫。HCV 感染における特異的 T 細胞免疫応答の検討。第 38 回日本肝臓学会東部会。東京。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

インターフェロン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

西口 修平 兵庫医科大学内科学肝胆膵科 教授

研究要旨：インターフェロン（IFN） α/β は抗ウイルス作用に加えて抗腫瘍効果を有しており、われわれは肝癌局所治療後のIFN治療が、有意に再発を抑制することを報告している。昨年IFNの肝癌に対する抗腫瘍効果として推定されている2つの機序、すなわち癌細胞の増殖抑制作用と血管新生抑制作用について検討した。その結果、IFNは血管内皮細胞と肝癌細胞いずれに対しても増殖抑制効果とアポトーシス誘導能を有するが、IFNの抗腫瘍効果の機序として血管新生抑制を含む間質への作用が重要であることが示唆された。

本年度はマウス担癌モデルに対し、血管新生を主要なターゲットとする分子標的薬 SorafenibとIFNを単独あるいは併用投与してその抗腫瘍効果を検討した。SorafenibとIFNはいずれも単剤投与でも腫瘍壊死効果を示したが、両者の併用投与によってその効果は増強された。また組織学的検討からは両薬剤ともに血管新生の抑制効果を示したが、両者の併用でその効果が増強されることも判明した。以上の結果から、SorafenibとIFNの併用療法は抗腫瘍効果が増強され、より有効性の高い治療となる可能性が示唆された。

共同研究者

榎本平之 兵庫医科大学肝胆膵科 講師

下村壯治 兵庫医科大学肝胆膵科 准教授

辻村 亨 兵庫医科大学分子病理部門 教授

A. 研究目的

癌組織の形成・増大には癌細胞の増殖のみならず周囲組織との相互作用が必要であり、特に血管新生の誘導は重要と考えられている。インターフェロン（IFN） α/β は抗ウイルス作用に加えて抗腫瘍効果を有しており、肝細胞癌においても抗癌剤との併

用や根治治療後の再発予防における有効性が報告されている。

IFNの抗腫瘍効果の機序には癌細胞の増殖抑制作用と血管新生抑制作用が考えられているが、昨年度われわれはIFNの肝癌に対する抗腫瘍効果に関して *in vitro*および *in vivo*で検討を行い、血管新生抑制作用がより重要であることを報告した。

昨年度の検討結果で肝癌に対するIFNの抗腫瘍効果における血管新生抑制の重要性が示されたため、本年度は血管新生を主要なターゲットとする分子標的薬

(Sorafenib) と IFN との併用による抗腫瘍効果増強の可能性について検討を行った。

B. 研究方法

ヒト肝癌細胞株 Hep3B を SCID マウス皮下に移植することで形成される腫瘍に対して、移植 5 週間から 2 週間連続で Sorafenib (経口投与) あるいは IFN (腫瘍近傍へ注入) を単剤であるいは併用投与して、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を比較した。なお本研究は兵庫医科大学の動物実験委員会の承認を受けて行われている。また本研究の遂行にあたってはヘルシンキ宣言を遵守した。

C. 研究結果

肝癌由来 Hep3B 細胞を培養し、SCID マウスの皮下に移植して腫瘍を形成させ、移植 5 週間から 2 週間連続で Sorafenib と IFN を単剤あるいは併用投与を行った。投与終了時点で①対象群、②Sorafenib 投与群、③IFN 投与群、④Sorafenib + IFN 併用投与群、これら 4 群間では腫瘍サイズには有意な差は認められなかった (図1)。

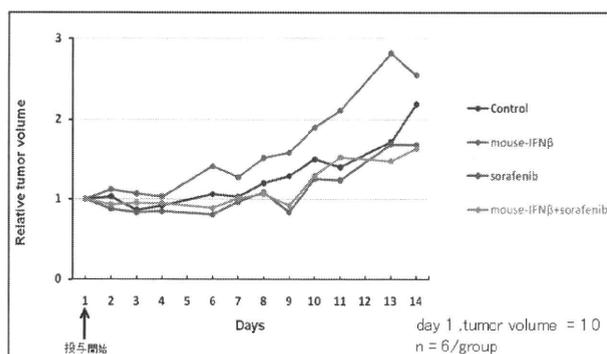


図1 Sorafenib およびIFN投与の腫瘍サイズへ及ぼす効果

しかしながらパラフィン切片を薄切し、HE染色を行ったところ、①対照群に比して②Sorafenib投与群、あるいは③IFN投与群では腫瘍内の壊死範囲が広く認められ、④Sorafenib + IFN併用投与群では更に著明であった (図2)。

また顕微鏡観察によって壊死領域を定量化することで、Sorafenib, IFN単剤投与群に比してSorafenib + IFN併用投与群でのより強い腫瘍壊死効果が確認された (図3)。

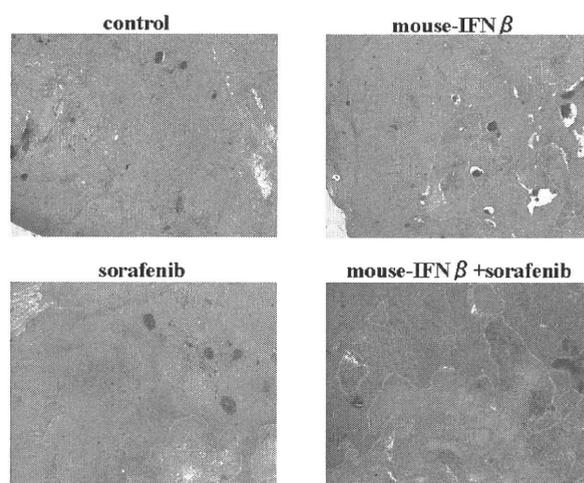


図2 Sorafenib およびIFNによる腫瘍壊死効果

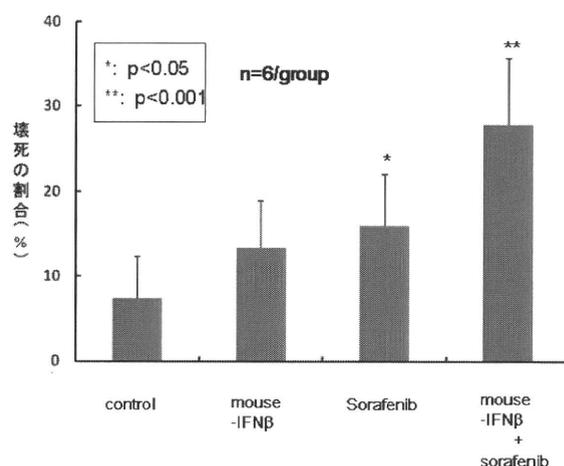


図3 Sorafenib とIFNの腫瘍壊死効果の定量的評価