
Molecular Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma

Junji Furuse, Hiroshi Kitamura, Satoshi Hirokawa,
Atsuko Takasu, Fumio Nagashima

Department of Internal Medicine, Medical Oncology, Kyorin University School of Medicine

肝細胞癌の化学療法の進歩

肝細胞癌の全身化学療法の進歩と治療成績
—殺細胞性薬剤を中心に*古瀬 純司¹⁾ 北村 浩 廣川 智 高須 充子 長島 文夫

Key Word 肝細胞癌, 全身化学療法, 殺細胞性抗癌剤, フッ化ピリミジン薬, 白金製剤

要旨

肝細胞癌に対する全身化学療法として殺細胞性薬剤やインターフェロン(interferon), タモキシフェン(tamoxifen)など多くの薬剤が試みられてきた。しかしこれまでこれらの大規模な第III相試験により有用性が確認された治療法は確立していない。最近, 新規経口フッ化ピリミジン薬であるカペシタビン(capecitabine), S-1, 第3世代白金製剤であるオキサリプラチン(oxali-platin), 胆道・膵癌における基本的薬剤であるゲムシタビン(gemcitabine)を用いたレジメンによる臨床試験が多く行われ, 有用性が示唆されている。また大腸癌の標準治療であるFOLFOXがドキソルビシン(doxorubicin)に比べ有意に良好な治療成績を示し, 注目されてきている。今後, 分子標的薬との併用やソラフェニブ(sorafenib)耐性後での開発が期待される。

肝胆膵画像 2011; 13: 587-592

はじめに

肝細胞癌の治療選択において, 全身化学療法は肝外転移例や局所治療の実施が困難な症例に適応される。これまで従来からの殺細胞性抗癌剤による多くの臨床試験が行われてきたが, ある程度の腫瘍縮小効果は得られるものの生存期間の延長を証明できた治療法はみられず, 標準的治療法は確立してこなかった。そのような中, 新しい分子標的治療薬ソラ

フェニブ(sorafenib)を用いた大規模な比較試験により切除不能肝細胞癌患者の延命効果が確認され, 標準治療薬として位置付けられている。一方, 殺細胞性抗癌剤でも新規薬剤や新たな併用療法を用いた臨床試験が行われており, 今後の開発が期待されている。ここでは分子標的治療薬以外の抗癌剤を用いた全身化学療法について, 最近の臨床試験から治療成績と今後の動向を述べる。

これまでの全身化学療法による
治療成績

肝細胞癌患者を対象としたランダム化比較試験がいくつか行われている(表1)¹⁻⁸⁾。ドキソルビシン(doxorubicin)では無治療群に比べ有意に生存期間の延長が得られたが, 60例中15例(25%)に好中球減少や心毒性による致命的な合併症を認め, 標準治療としては認識されなかった¹⁾。タモキシフェン(tamoxifen)を用いた比較試験では生存期間の改善は認められないか, むしろ生存期間を短縮するような結果となっていた^{2,3)}。インターフェロン α (interferon- α ; IFN- α)も肝細胞癌に対する抗腫瘍効果が期待され, best supportive careとの比較試験が行われた。アジアでの試験では有用性が示唆されたものの⁴⁾, 欧州での試験ではnegativeに終わっており⁵⁾, その後大規模な試験は行われていない。一

* Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma

1) 杏林大学医学部 内科学腫瘍内科(〒181-8611 東京都三鷹市新川 6-20-2)

Junji FURUSE, Hiroshi KITAMURA, Satoru HIROKAWA, Atsuko TAKASU, Fumio NAGASHIMA: Division of Medical Oncology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo

表1 進行肝細胞癌における全身化学療法のランダム化比較試験

Agents	n	Response	Median OS	p-value	Author (year)
Doxorubicin	60	3.3%	10.6 wks	0.036	Lai (1988) ¹⁾
Best supportive care	46	—	7.5 wks		
Tamoxifen 120 mg	120	—	2.2 mo	0.011	Chow (2002) ²⁾
Tamoxifen 60 mg	74	—	2.1 mo		
Placebo	130	—	2.7 mo		
Tamoxifen 20 mg	210	—	4.8 mo	0.25	Barbare (2005) ³⁾
Control	210	—	4.0 mo		
Interferon- α	35	31.4%	2.6 mo	0.047	Lai (1993) ⁴⁾
Best supportive care	36	—	1.8 mo		
Interferon- α	30	6.7%	58 %*	0.14	Llovet (2000) ⁵⁾
Best supportive care	28	0	38 %*		
Doxorubicin	94	10.5%	6.83 mo	0.83	Yeo (2005) ⁶⁾
Cisplatin/interferon/ doxorubicin/fluorouracil (PIAF)	94	20.9%	8.67 mo		
Tegafur/uracil	28	17.8%	12.13 mo	<0.01	Ishikawa (2001) ⁷⁾
Control	20	—	6.2 mo		
FOLFOX	184	8.2%	6.4 mo	p=0.0425	Thongprasert
Doxorubicin	187	2.7%	4.97 mo		(2011) ⁸⁾

OS ; overall survival, FOLFOX ; fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin.

*1-year survival rate.

方, 多剤併用療法ではシスプラチン(cisplatin)/ドキシソルビシン/フルオロウラシル(fluorouracil)/IFN- α (PIAF)やフルオロウラシル/ミトキサントロン(mitoxantrone)/シスプラチン(FMP)などの第II相試験において良好な成績が報告されてきた^{9,10)}. 特にPIAFレジメンでは奏効率26%, 生存期間中央値8.9か月と良好な成績が得られ⁹⁾, ドキシソルビシンを対象としたPIAFレジメンの第III相試験が行われたが, 有意な生存期間の改善は示せなかった⁶⁾. わが国ではテガフル(tegafur)/ウラシル(uracil) (UFT)とコントロールとの比較試験が行われ, 17.8%の高い奏効率と有意な生存期間の延長が報告されたが, 小規模な試験であり, その後追試は行われていない⁷⁾. これらの状況から, 既存の抗癌剤による化学療法では全身治療としての効果を得ることは難しいと認識され, 2009年の肝臓診療ガイドラインでも, 科学的根拠に基づいて推奨される有効な薬剤やその組み合わせはないと記載されている¹¹⁾.

最近の臨床試験

最近, 殺細胞性抗癌剤でも新しい薬剤の開発が進

み, 新規フッ化ピリミジン薬であるカペシタビン(capecitabine)やテガフル/ギムラシル(gimeracil)やオテラシルポタシウム(oteracil potassium) (S-1), 第3世代の白金製剤であるオキサリプラチン(oxaliplatin)などが進行肝細胞癌を対象に単剤あるいは多剤併用療法として試みられている(表2)¹²⁻²³⁾.

ドキシソルビシン/シスプラチン/カペシタビン併用療法はドキシソルビシン60 mg/m², シスプラチン60 mg/m²を第1日目に投与, カペシタビン2,000 mg/m²/dayを2週内服後1週休薬, を繰り返すスケジュールである¹⁵⁾. PIAFレジメンとコンセプトはほとんど同じであり, 治療成績も同様の結果となっている(表2). PIAFレジメンが延命効果を示せなかったことをみると, 3剤, 4剤といたずらに薬剤を増やすことは有益ではないかもしれない.

カペシタビンは新しい経口フッ化ピリミジン薬として単剤あるいは白金製剤と併用で臨床試験が行われている. カペシタビン単独は2,000 mg/m²/dayを2週内服後1週休薬のスケジュールが用いられ, 併用療法でも同様の投与方法が用いられている. 単独治療の成績は奏効率11%, 無増悪期間中央値2.9か

表2 進行肝細胞癌に対する全身化学療法の第II相試験

Agents	n	Response	Median PFS/TTP	Median OS	Author (year)
Gemcitabine	30	0	2.1 mo	6.9 mo	Fuchs (2002) ¹²⁾
Capecitabine	37	11%	2.9 mo	10.1 mo	Patt (2004) ¹³⁾
Oxaliplatin	36	2.80%	2.0 mo	6.0 mo	Yen (2008) ¹⁴⁾
Doxorubicin/cis-platin/capecitabine	29	24%	3.7 mo	7.7 mo	Park (2006) ¹⁵⁾
Gemcitabine/oxaliplatin	34	18%	6.3 mo	11.5 mo	Louafi (2007) ¹⁶⁾
Capecitabine/oxaliplatin	50	7%	4.1 mo	9.3 mo	Boige (2007) ¹⁷⁾
Capecitabine/cis-platin	32	6.20%	2.0 mo	12.2 mo	Lee (2009) ¹⁸⁾
Tegafur/gimeracil/oteracil potassium (S-1)	23	21.70%	3.7 mo	15.6 mo	Furuse (2010) ¹⁹⁾
Gemcitabine/oxaliplatin/bevacizumab	30	20%	5.3 mo	9.6 mo	Zhu (2006) ²⁰⁾
Gemcitabine/oxaliplatin/cetuximab	45	20%	4.7 mo	9.5 mo	Asnacios (2008) ²¹⁾
Capecitabine/bevacizumab	45	9%	2.7 mo	5.9 mo	Hsu (2010) ²²⁾
Capecitabine/oxaliplatin/bevacizumab	40	20%	6.8 mo	9.8 mo	Sun (2011) ²³⁾

PFS; progression-free survival, TTP; time-to progression, OS; overall survival.

月とそれほど良好とはいえない¹³⁾。カペシタビン/オキサリプラチンはオキサリプラチン 130 mg/m²、カペシタビン/シスプラチンはシスプラチン 60 mg/m²をそれぞれ第1日目投与し、3週ごとに繰り返すレジメンである。主な grade 3/4 の毒性はカペシタビン/オキサリプラチンでは肝障害 16%、下痢 16%、血小板減少 12%、貧血 12%、神経毒性 6%、悪心・嘔吐 4%、好中球減少 4%、手足症候群 4%、口内炎 2%、カペシタビン/シスプラチンでは肝障害 12.9%、血小板減少 7.6%、好中球減少 4.3%、悪心 3.2%、口内炎 3.2%、黄疸 3.2%、と忍容性は得られている。治療成績については、単アームの第II相試験同士であり正確な比較は難しいが、無増悪期間の改善が示唆されている(表2)^{17,18)}。

ゲムシタビン(Gemcitabine)は胆道・膵癌での標準治療薬として汎用されている。肝細胞癌については単剤の第II相試験では奏効例は得られていない¹²⁾。オキサリプラチンも単独では奏効率 2.8%とそれほど有効性は示されていない¹⁴⁾。一方、ゲムシタビン/オキサリプラチン併用ではゲムシタビン

1,000 mg/m²を第1日目、オキサリプラチン 100 mg/m²を第2日目に投与し、隔週で繰り返す方法が取られ、奏効率 18%、無増悪生存期間 6.3 か月と最近のレジメンでは良好な成績が報告されている(表2)¹⁶⁾。主な grade 3/4 の毒性は、血小板減少 26%、好中球減少 24%、貧血 9%、神経毒性 9%と忍容性が得られている。

わが国では S-1 の第 I / II 相試験が行われ、用量規定毒性として食欲低下、皮疹が認められたものの、通常用量である 80 mg/m²/day が推奨用量とされている¹⁹⁾。第 II 相試験部分では 23 例中 5 例 (21.7%) で奏効が得られ、無増悪生存期間、全生存期間ともに単剤としては良好な成績が得られている(表2)¹⁹⁾。主な grade 3/4 の毒性は、血小板減少 17.4%、貧血 17.4%、リンパ球減少 13%、肝障害 17.4%、低アルブミン血症 8.7%、食欲低下 8.7%、疲労感 8.7%、などである。

最近、大腸癌の標準治療である FOLFOX4 レジメンとドキシソルビシンによるランダム化比較試験 (EACH 試験) がアジア諸国で実施され、その結果が

表3 進行肝細胞癌に対する現在実施中の殺細胞性抗癌剤を用いた臨床試験
—ClinicalTrial.govから

Agent	Phase	n	Primary endpoint	Country
Oxaliplatin/capecitabine/cetuximab	Phase II	25	Overall response rate	USA
Sorafenib/gemcitabine/cisplatin	Phase II	30	Safety	USA
Gemcitabine/docetaxel	Phase II	—	the six-month overall survival	USA
Irinotecan/capecitabine	Phase II	73	Overall response rate	Asia
Sorafenib	Phase III	480	Overall survival	USA
vs. sorafenib/doxorubicin				
Sorafenib	Phase II	78	Progression-free survival	France
vs. sorafenib/gemcitabine/oxaliplatin				

報告された¹⁰⁾。主要評価項目は全生存期間であり、371例が登録され、FOLFOX4群で有意な生存期間の延長が得られている(表1)。

今後の展望

肝細胞癌に対する化学療法は、切除不能例ではソラフェニブが標準治療薬として確立している。上記の殺細胞性薬剤を用いた治療法が今後どのように使われていくか、どのような効果が期待できるか、ソラフェニブと関連して考える必要がある。ソラフェニブの治療成績としては欧州中心のSHARP試験とアジア中心のAsia-Pacific試験があり、奏効率率は2~3%、無増悪期間中央値は2.8か月(Asia-Pacific試験)、5.5か月(SHARP試験)、全生存期間中央値は6.5か月(Asia-Pacific試験)、10.7か月(SHARP試験)と報告されている^{24,25)}。新しい治療法が1次治療として確立するには、ソラフェニブとの比較試験が必要となるが、これまで殺細胞性薬剤による治療とソラフェニブによる比較試験は行われていない。最近ドキシソルビシンに対し有用性が認められたFOLFOX4レジメンも奏効率8.2%、無増悪期間2.92か月、全生存期間6.4か月とアジアのソラフェニブの成績とほぼ同等であり¹⁰⁾、簡便性を考慮すると標準治療となるのは難しいかもしれない。そのほかの併用療法もアジア中心あるいは欧米中心で実施されたものか、患者背景などで成績は大きく異なり、単アームの第II相試験では症例数も少なく、評価は難しい。表2の成績をみる限り、フランスで実施さ

れたゲムシタビン/オキサリプラチンあるいはカペシタビン/オキサリプラチンが有望と考えられるが^{16,17)}、このまま標準的1次治療として位置付けられるには追試が必要である。

ソラフェニブ耐性後の治療も重要なターゲットであり、新しい分子標的薬によるプラセボコントロールのランダム化比較試験がいくつか実施されている。その中でS-1は単剤で良好な治療成績と忍容性が得られており、ソラフェニブ耐性後のプラセボを用いた大規模なランダム化比較試験が実施されている。S-1はわが国ですでに胃癌、大腸癌、膵癌、胆道癌などの消化器癌をはじめとして多くの癌種で適応が承認され、広く用いられている。肝細胞癌でも有用性が明らかになれば臨床で大きな役割が期待される。

殺細胞性薬剤と分子標的薬の併用療法が次に考えられる開発戦略である。これまでゲムシタビン/オキサリプラチン、カペシタビン、カペシタビン/オキサリプラチンと新生血管阻害薬ベバシズマブ(bevacizumab)との併用、あるいはゲムシタビン/オキサリプラチンと抗EGFR抗体薬セツキシマブ(cetuximab)の併用による第II相試験が行われている(表2)。しかし、今のところ上乗せ効果が確認された報告はみられていない。進行肝細胞癌に対する殺細胞性薬剤の臨床試験をClinicalTrial.govで検索すると、進行中のものは6試験得られた(表3)。殺細胞性薬剤だけのものよりセツキシマブやソラフェニブとの併用が多く試みられている。大規模な比較試験としては、ソラフェニブ単独とソラフェニブ/ドキシソル

ビシン併用の比較試験が米国の研究グループである Cancer and Leukemia Group B で実施されており、注目されている。

おわりに

肝外転移をはじめとする局所治療が困難な肝細胞癌に対する全身治療の確立が大きな課題となっていたが、分子標的薬ソラフェニブが現在、標準治療と位置付けられている。しかし、それほど腫瘍縮小効果が期待できない、副作用が多いなど克服すべき課題も少なくない。その中で、カペシタビン、S-1、オキサリプラチンなど新しい殺細胞性抗癌剤により、有用性が期待される結果も報告されてきている。これまで殺細胞性抗癌剤はエビデンスが乏しかったという反省を生かし、分子標的薬との併用やソラフェニブ後の適応など、目的に沿った質の高い臨床開発が必要と考えられる。

●文献

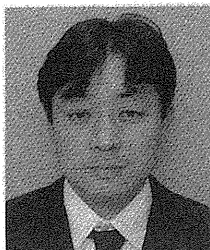
- Lai CL, Wu PC, Chan GC, et al. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer* 1988; 62: 479-483
- Chow PK, Tai BC, Tan CK, et al. High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: a multicenter randomized controlled trial. *Hepatology* 2002; 36: 1221-1226
- Barbare JC, Bouche O, Bonnetain F, et al. Randomized controlled trial of tamoxifen in advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4338-4346
- Lai CL, Lau JY, Wu PC, et al. Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1993; 17: 389-394
- Llovet JM, Sala M, Castells L, et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 54
- 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: 1532-1538
- 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: 452-459
- Thongprasert S, Qin S, Lim H, et al. Efficacy of oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4) versus doxorubicin in advanced HCC: Updates on the EACH study. 2011 Gastrointestinal Cancers Symposium. *J Clin Oncol* 2011; 29 (suppl 4; abstr 160)
- Leung TW, Patt YZ, Lau WY, et al. Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1676-1681
- 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: 756-762
- 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: 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン. 2009年版. 金原出版, 2009
- Fuchs CS, Clark JW, Ryan DP, et al. A phase II trial of gemcitabine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 3186-3191
- Patt YZ, Hassan MM, Aguayo A, et al. Oral capecitabine for the treatment of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and gallbladder carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 578-586
- Yen Y, Lim DW, Chung V, et al. Phase II study of oxaliplatin in patients with unresectable, metastatic, or recurrent hepatocellular cancer: a California Cancer Consortium Trial. *Am J Clin Oncol* 2008; 31: 317-322
- Park SH, Lee Y, Han SH, et al. Systemic chemotherapy with doxorubicin, cisplatin and capecitabine for metastatic hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 3
- Louafi S, Boige V, Ducreux M, et al. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): results of a phase II study. *Cancer* 2007; 109: 1384-1390
- Boige V, Raoul JL, Pignon JP, et al. Fédération Francophone de Cancérologie Digestive. Multicentre phase II trial of capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) in patients with advanced hepatocellular carcinoma: FFCD 03-03 trial. *Br J Cancer* 2007; 97: 862-867
- Lee JO, Lee KW, Oh DY, et al. Combination chemotherapy with capecitabine and cisplatin for patients with metastatic hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2009; 20: 1402-1407
- 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

- 20) Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, et al. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 1898-1903
- 21) Asnacios A, Fartoux L, Romano O, et al. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma : results of a multicenter phase 2 study. *Cancer* 2008 ; 112 : 2733-2739
- 22) Hsu CH, Yang TS, Hsu C, et al. Efficacy and tolerability of bevacizumab plus capecitabine as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2010 ; 102 : 981-986. Epub 2010
- 23) Sun W, Sohal D, Haller DG, et al. Phase 2 trial of bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin in treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2011. doi : 10.1002/cncr.25889. [Epub ahead of print]
- 24) Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 378-390
- 25) 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* 2009 ; 10 : 25-34

ソラフェニブの副作用対策 (手足症候群・下痢・高血圧など)

— チーム医療の有用性

Management of adverse events of sorafenib : Hand foot skin reaction, diarrhea, hypertension, etc.



池田 公史

Masafumi IKEDA

国立がん研究センター東病院肝胆腫瘍科

◎ソラフェニブには手足症候群、高血圧、下痢、肝機能障害、膵酵素の上昇などの特有の副作用がある。手足症候群は生命を脅かす副作用ではないが、患者の QOL(生活の質)を損ね、治療中止の一因となることがある。皮膚の保湿・角質処理などの予防策をとり、必要に応じて減量・休止などで対応し、治療を中止することなく、管理することが重要である。高血圧は高血圧の合併や既往のある患者に高率に発現しやすい。これらの患者ではとくに注意が必要で、適切に降圧薬を併用することで、治療を休止することなくコントロールすることも可能である。下痢もしばしば認める副作用であるが、脱水にならないように早めに止痢薬を併用することが重要である。このように最大限の治療効果を引き出すために、副作用を最小限に抑え、治療をできるだけ長期に継続することが重要である。この副作用マネージメントをコメディカルを含めたチーム医療として取り組むことによって、より良好なマネージメントが可能となり、有用である。



ソラフェニブ、副作用マネージメント、手足症候群、下痢、高血圧、チーム医療

ソラフェニブは、癌細胞の増殖に関与する RAF と癌周囲の血管新生に関与する VEGFR などに対するマルチキナーゼ阻害剤である。このソラフェニブは進行肝細胞癌患者を対象として、プラセボと比較した 2 つの第Ⅲ相試験(SHARP 試験¹⁾と Asia-Pacific 試験²⁾)で有意に良好な無増悪生存期間と生存期間を示したため、進行肝細胞癌に対する標準治療として位置づけられている。しかし、ソラフェニブには従来の細胞障害性抗癌剤と異なり手足症候群、高血圧、下痢、肝機能障害、膵酵素の上昇など、分子標的治療薬に特有の副作用があり、しばしば患者の生活の質(quality of life : QOL)を損ねることがあり、治療の休止や中止の一因となっている。

最小限の副作用で治療の継続性を高め、最大限

の治療効果を引き出すためにも、副作用マネージメントは非常に重要である。また、このような副作用を医師ひとりでマネージメントすることには

サイド
メモ

手足症候群

手足症候群は、Common Terminology Criteria for Adverse Event(CTCAE)version 3.0 では手足の皮膚反応として、CTCAE v4.0 では手掌・足底発赤知覚不全症候群として分類されている。英語でも hand-foot syndrome といわれたり hand-foot skin reaction といわれることもある。ソラフェニブによる手足症候群は、カベシタピンなどの細胞障害性抗癌剤で認めるものとは異なり、発赤や水疱形成を主体とし、疼痛を伴いやすい皮膚症状である。

表 1 手足症候群の発現頻度

著者	発表年	試験実施国	n	All Grade	Grade 3	備考
Llovet ら ¹⁾	2008	海外(欧米)	297	21%	8%	SHARP trial
Cheng ら ²⁾	2009	海外(アジア)	149	45.0%	10.7%	Asia Pacific trial
Abou-Alfa ら ⁴⁾	2006	海外(欧米)	137	30.7%	5.1%	phase II
Furuse ら ⁵⁾	2008	日本	27	44.4%	7.4%	phase I
Okita ら ⁶⁾	2010	日本と韓国	229	82.0%	35.0%	TACE 後 phase III
当院	2010	日本	60	73.3%	5.0%	後ろ向き検討

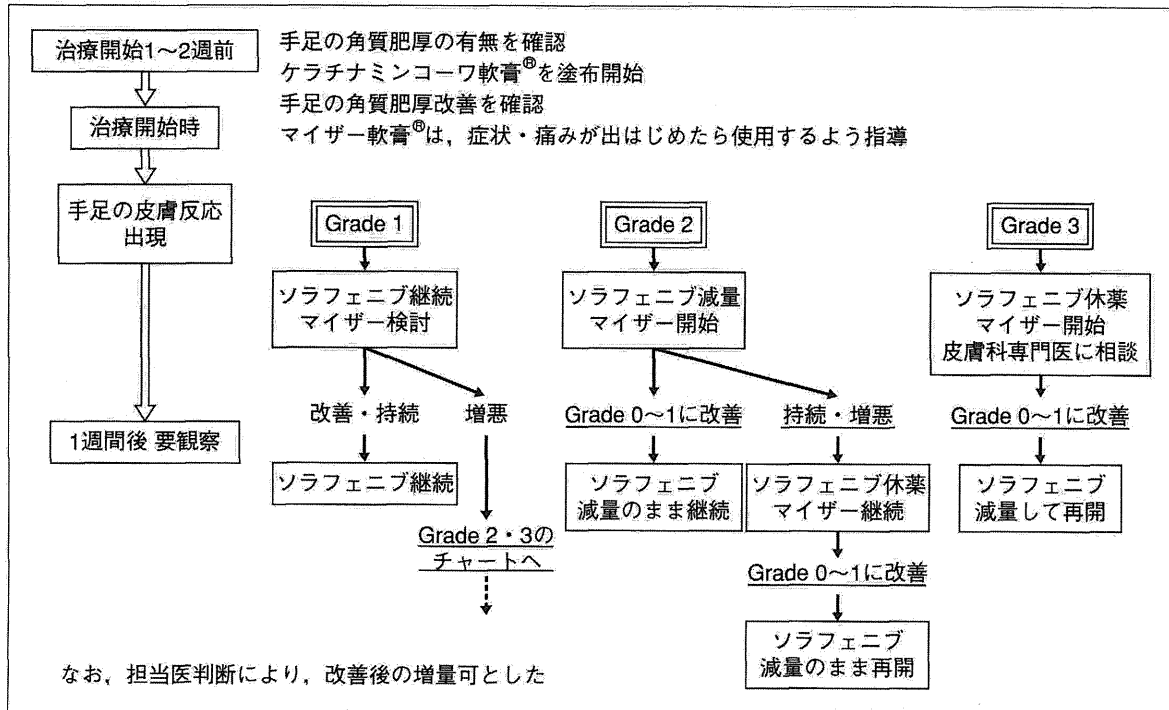


図 1 手足の皮膚反応フォローアップチャート

限界があり、チーム医療として患者の副作用マネジメントに取り組むことが有用である³⁾。本稿では手足症候群、下痢、高血圧などの副作用を中心に言及し、ソラフェニブの副作用マネジメントにおけるチーム医療の有用性について概説する。

手足症候群

手足症候群はソラフェニブで高頻度に認める副作用のひとつであり、直接生命を脅かすものではないが、その症状は患者の QOL を著しく悪化させることがある。

手足症候群の好発部位は、手の平や足裏の角化肥厚、皮膚硬結部位である。有害事象の grading は紅斑のみで、疼痛を伴わないわずかな皮膚の変

化または皮膚炎が Grade 1、疼痛を伴う皮膚の変化で日常生活に支障がない程度は Grade 2、疼痛を伴う高度な皮膚の変化で日常生活に支障をきたす場合を Grade 3 と判定する。これまでのおもな報告と当院での手足症候群の発現頻度を表 1 にまとめた。日本での手足症候群の発現頻度は海外に比較して高率に認めていた。その原因に関しては明らかでなく、今後解明すべき課題である。また、発現時期は SHARP 試験において投与開始後 4 週目までに 40 例(65%)、8 週目までに 13 例(21%)、12 週目までに 8 例(13%)が発現しており、手足皮膚反応の約 98% が 12 週目までに生じており、とくにその期間は慎重な管理が必要である。

手足症候群の原因として VEGFR, PDGFR, c-Kit の阻害による表皮やエクリン腺の障害が考え

表 2 高血圧の発現頻度

著者	発表年	試験実施国	n	All Grade	Grade 3	備考
Llovet ら ¹⁾	2008	海外(欧米)	297	5%	2%	SHARP trial
Cheng ら ²⁾	2009	海外(アジア)	149	18.8%	2.0%	Asia Pacific trial
Furuse ら ⁵⁾	2008	日本	27	18.5%	18.5%	phase I
Okita ら ⁶⁾	2010	日本と韓国	229	31.0%	15.0%	TACE 後 phase III
当院	2010	日本	60	41.7%	16.7%	後ろ向き検討

られているが、VEGFR, PDGFR, c-Kit 阻害のうち、どの阻害効果あるいはどの阻害効果の組合せが手足症候群にかかわっているのかは明らかにされておらず、また、エクリン汗腺障害と表皮障害の関係、血管障害やリンパ球浸潤との関係についても解明されていない。今後、分子基盤に基づいた病態の解明が必要である。

これまでのところ、手足症候群に対する標準的な治療法は確立していない。当院では海外で推奨されている対応を参考に、最善と思われる対処方法を検討し、当院における手足症候群の対処方法をまとめ、フォローアップチャート(図 1)を作成した。Grade 1 の手足皮膚反応が出現した場合、ソラフェニブの投与は継続し、それ以上の悪化を防ぐため、症状の出現した個所に、とくに念入りに 20% 尿素配合クリーム(ケラチナミン®)を塗布し、さらに予防を強化する。Grade 2 に増悪した場合は、まずソラフェニブを 1 段階の減量を行う。そして症状の出現した個所にステロイド軟膏(マイザー軟膏®)の使用を開始する。疼痛がある場合には非ステロイド性消炎鎮痛剤(ロキソプロフェン錠®)、痒みの出現時には第二世代ヒスタミン H1 拮抗薬(アレグラ錠®)服用で対処するように指導している。そして、1 週後に確認し、Grade 0~1 に改善すれば継続投与を行い、改善がみられない場合はいったん休薬する。休薬により Grade 0~1 に改善すれば減量のまま再開する。Grade 3 以上の症状出現時はいったん休薬し、皮膚科にコンサルトし、Grade 2 以下に改善したら減量のうえ、再開することとしている。

当院では最初の 1 カ月は週に 1 回、その後は 2 週に 1 回(必要に応じて週に 1 回)の外来での経過観察を行っている。しかし、それでも不十分で、患者が在宅中に症状が Grade 2 に悪化し、ステロイドの使用を開始しなければならないという場合

もあるので、薬剤師が電話で症状を確認し、フォローアップを行っている(テレフォンフォローアップ)。このように細かく管理することにより手足症候群は全 Grade では 73.3% と高率に認められたが、Grade 3 の手足症候群は 5% と低率に抑えることができた。さらには手足症候群が原因でソラフェニブの治療を中止した症例は現在のところ 1 例も認めていない。

このように手足症候群は症状が軽度なうちに予防・治療についての適切な対処を行うことで、重篤化を防ぐことができる。早期の対応により患者の QOL を悪化させず、ソラフェニブの投与を継続していくことが可能となる。そのためには医療従事者が手足症候群の管理や対処方法を熟知し、患者の手足の症状の十分な観察を行うとともに、患者へ症状や対処法について指導を十分に行い、患者自身が十分に理解してもらうことも必要である。

高血圧

進行肝細胞癌を対象としてこれまでに行われた臨床試験のおもな報告と当院での高血圧の発現頻度を表 2 に示す。日本人において高血圧の発現頻度は高い傾向があった。高血圧の発現時期は、SHARP 試験では投与開始から 4 週までに 50%、4~8 週までに 21%、8~12 週までに 7%、12~16 週までに 7% が発現しており、高血圧の約 85% が 16 週までに発現している。また、当院で行われた第 I 相試験の結果をサブグループ解析してみると、高血圧の合併や既往がある場合に高血圧が発現しやすいことが示され、血圧の変動幅も高血圧の合併や既往がある場合に有意に高くなることが判明した。

ソラフェニブによる高血圧の機序は十分に解明されていないが、主として VEGF 阻害作用が関与

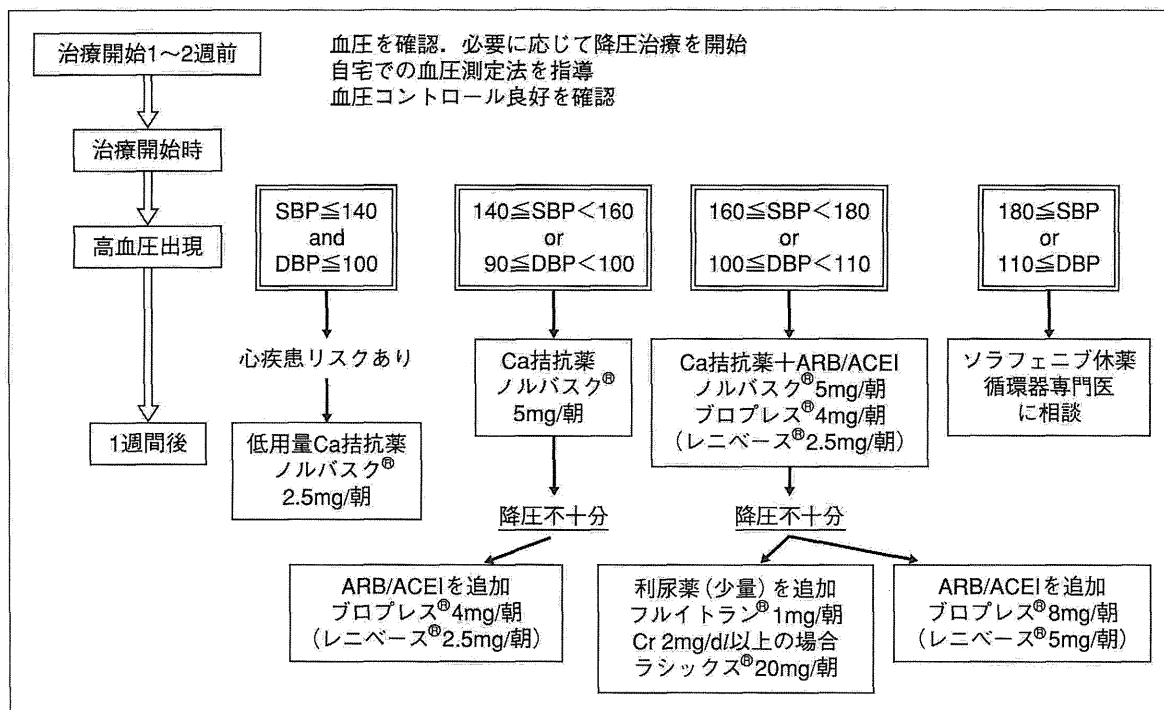


図 2 血圧フォローアップチャート

SBP：収縮期血圧，DBP：拡張期血圧，ARB：アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬，ACEI：アンジオテンシン変換酵素阻害薬。

していると考えられている。ソラフェニブの VEGF 阻害により血管内皮における内因性 NO 合成酵素活性低下を介した NO 合成低下と毛細血管密度の減少が起こり，末梢血管抵抗が増大するため，血圧が上昇する（血圧＝心拍出量×末梢血管抵抗）と考えられている。そのほかには，腎血管内皮細胞や有足突起での VEGF 発現低下から血栓性微小血管障害を起し，血圧上昇や蛋白尿につながる可能性も考えられている。

ソラフェニブによる高血圧に対する副作用対策は確立していないが，当院では日本高血圧学会の高血圧治療ガイドラインに準じて行っている。まず，ソラフェニブの治療開始前までに，収縮期血圧 140 mmHg 以下，拡張期血圧 90 mmHg 以下を目標にコントロールする。高血圧の危険性を説明し，自宅でも血圧測定を推奨し，治療日誌に記録してもらう。そして血圧が高値で，嘔気，頭痛や胸・背部痛，呼吸苦，めまいといった症状のいずれかが伴った場合，または症状が伴わなくても収縮期血圧が 160 mmHg 以上の場合，または拡張期血圧が 100 mmHg 以上の場合には，すぐに病院へ連絡するように指導する。外来受診時に，治療日

誌から自宅での血圧の変化を評価し，高血圧を認めた場合，血圧フォローアップチャート(図 2)に従って降圧治療を行う。降圧薬は単剤投与から開始することを基本とし，薬物相互作用などを考慮し，個々の患者の臨床状況に応じて降圧薬を選択する。血圧コントロール不良の場合には循環器専門医に相談しながら降圧療法を行い，ソラフェニブを継続する。このように，日頃の血圧管理の重要性を理解していただき，緊急時に適切な対応をすること，医療従事者が上手に降圧薬を使用して血圧をコントロールすることで，ソラフェニブの治療を安心して継続することが可能となる。

下痢

進行肝細胞癌に対するおもな報告と当院での下痢の発現頻度を表 3 に示す。下痢に関しては日本と海外はほぼ同程度で，全 Grade で 30~40%，Grade 3 以上は 8% 以下であった。また，下痢の発現時期は SHARP 試験で，投与開始から 24 週までにほとんどが発現していた。副作用対策としては，Grade 1~2 であれば，ソラフェニブの投与は継続しながら乳酸菌製剤やタンニン酸アルブミンなど

表 3 下痢の発現頻度

著者	発表年	試験実施国	n	All Grade	Grade 3	備考
Llovet ら ¹⁾	2008	海外(欧米)	297	39%	8%	SHARP trial
Cheng ら ²⁾	2009	海外(アジア)	149	25.5%	6.0%	Asia Pacific trial
Abou-Alfa ら ⁴⁾	2006	海外(欧米)	137	43.1%	8.0%	phase II
Furuse ら ⁵⁾	2008	日本	27	55.6%	3.7%	phase I
Okita ら ⁶⁾	2010	日本と韓国	229	31.0%	6.0%	TACE 後 phase III
当院	2010	日本	60	15.0%	0.0%	後ろ向き検討

の収斂薬, アドソルピンなどの吸着薬, ロペラミドなどの腸運動抑制薬で対応する。Grade 3 の下痢の場合は休業し, 輸液や上記の止痢薬を用いて, Grade 1~2 に改善するまで経過観察する。Grade 1~2 に改善したら1段階減量のうえ, 治療を再開する。

チーム医療の重要性

当院ではソラフェニブによる副作用をマネジメントする医療チームとして“チームネクサバール”を発足させた。チームネクサバールは, 医師, 薬剤師, 治験コーディネーター, 看護師から構成されるチームで, 月に2回勉強会を開催し, ソラフェニブの副作用に対する国立がん研究センター東病院としての方針を確立し, ソラフェニブの副作用をマネジメントするチーム医療として, 日々のソラフェニブ診療に取り組んでいる。

このチームネクサバールのなかで, 薬剤師や看護師は, ソラフェニブの服薬指導, 手足症候群の予防・ケア, 高血圧に対する対応, その他の副作用の管理などを説明し, ソラフェニブのアドヒアランスの確認や副作用をモニタリングし, 副作用の対処方法が十分できているかを確認し, 担当医へフィードバックする。また, 次回外来診察までの間に, 電話で患者の状態を確認し(テレフォンプォローアップ), 在宅でのソラフェニブのアドヒアランスや副作用モニタリングを行う。

このように, 薬剤師や看護師は医師の診療にかかわり, しっかりと副作用対策を施し, 最小限の副作用で治療の継続性を高め, 最大限の治療効果を引き出すことを目標として日々の診療に取り組

んでいる。当院では薬剤師や看護師のようなメディカルと医師がチーム医療を形成することで, 患者のアドヒアランスや副作用マネジメントが向上し, よりよい診療を施すことが可能となった。

おわりに

進行肝細胞癌に対するソラフェニブは標準治療として位置づけられているが, 患者のQOLを損なう副作用や治療の継続が困難となる副作用などがあり, これまでの抗癌剤とは異なるマネジメントが必要である。これらの副作用をマネジメントするうえで, チーム医療での対応は患者のアドヒアランスを向上させることから有用である。

文献

- 1) Llovet, J. M. et al. : Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **359** : 378-390, 2008.
- 2) Cheng, A. 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) Team Nexavar(編) : 肝細胞癌に対するソラフェニブ—国立がんセンター東病院のチーム医療。メディカルレビュー, 2010.
- 4) Abou-Alfa, G. K. et al. : Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **24** : 4293-4300, 2006.
- 5) Furuse, J. et al. : Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.*, **99** : 159-165, 2008.
- 6) Okita, K. et al. : Phase III study of sorafenib in patients in Japan and Korea with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) treated after transarterial chemoembolization (TACE). 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium Abstract No. LBA128.

総 説

多能性幹細胞から誘導した樹状細胞によるがん免疫療法

福島 聡^{*1,*2}, 尹 浩信^{*1}, 西村泰治^{*2}, 千住 寛^{*2}

Cancer immunotherapy by utilizing dendritic cells derived from pluripotent stem cells.

Satoshi FUKUSHIMA ^{*1,*2}, MD, PhD, Hironobu IHN ^{*1} MD, PhD.,
Yasuharu NISHIMURA ^{*2}, MD, PhD and Satoru SENJU ^{*2}, MD, PhDDepartment of Dermatology and Plastic Surgery^{*1}, Immunogenetics^{*2}, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

(Received March 28 2011)

summary

It was recently revealed that ES-cell like pluripotent stem cells, designated as iPS cells, can be generated from somatic cells. iPS cells could be used as not only a source of regeneration medicine, but also a source of cell vaccine. Pluripotent stem cells are characterized by pluripotency and infinite propagation capacity. Non-virus-mediated methods for gene transfer have been established. Genetic modification of pluripotent stem cells and subsequent in vitro differentiation to dendritic cells would be an attractive strategy. Here we describe the previous studies about cancer immunotherapy by utilizing dendritic cells derived from pluripotent stem cells.

Key words—cancer immunotherapy; dendritic cells; pluripotent stem cells; melanoma

抄 録

iPS細胞作製法の開発により、任意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。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、細胞治療に用いる樹状細胞(DC)を作製するための材料としても有用であると考えられる。多能性幹細胞は、無限増殖能を有し、遺伝子導入も容易であり、より強力な効果を有するDCを無限にin vitroで作成し治療に用いることができるようになる可能性を秘めている。これまでに行われてきた多能性幹細胞由来DCを用いたがん免疫療法の研究を概説し、今後の展望を述べる。

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。抗原特異的な免疫療法は、適切な癌抗原を標的とすることにより、抗癌剤よりも選択的に癌組織を攻撃できる可能性があり、副作用が少なく、かつ効果の高い治療法となる可能性を秘めている。これまでに様々な臨床研究が行われてきたが、抗体あるいはT細胞などのエフェクター細胞を移入する受動免疫と、ワクチンに基づく能動免疫とに大別される。癌細胞の細胞膜表面に発現する抗原を標的とした免疫療法としては、抗体療法が実用化されており、ある種の癌に対しては標準的な治療法の一つと

なっている。しかしながら、多くの癌抗原は、細胞質あるいは核内タンパク質であり、これらを標的とした免疫療法では抗原に対するT細胞応答を賦活化する必要がある。米国国立がん研究所で行われている腫瘍浸潤リンパ球を用いたT細胞移入療法は、その奏効率が72%と極めて有効であると報告されているが、こうした治療は限定された施設で、臨床研究として、かつ多額の資金を投入して行われていることであり、こういった治療が標準治療として日本でも行われるようになるとは考えにくい。ワクチン療法のなかでは、ペプチド、ウイルスベクター、腫瘍細胞自体を用いるものに比べて、樹状細胞(DC)を用いたワクチンの奏効率が最も高いと報告されているが、それでもその奏効率は十分であるとはいえない。つまり、より強い効果を持ち、かつ一般の病院でも広く、用いられるような癌ワクチンの開発が求められている。

これまでDC療法は、アフエレーシスにより採取

^{*1}熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野

^{*2}同免疫識別学分野

した末梢血単球から作成した DC を用いて行われてきた。その奏功率が上がらない理由のひとつとしては、すでに抗癌剤治療で骨髄抑制を来した末期癌患者からは治療に必要な量の、また安定したクオリティーの DC を準備するのが困難であること、抗原を負荷する方法としては遺伝子導入が望ましいにもかかわらず、ウイルスベクターを使用する必要があるため行えず、実際にはペプチドや自己腫瘍細胞などが用いられていることなどが挙げられる。これらの問題を解決するために、筆者らはこれまでに ES 細胞由来樹状細胞 (ES-DC: Embryonic Stem cell-derived Dendritic Cells) の研究を行ってきた²⁾。最近、iPS 細胞作製法の開発により、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。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 DC を作製するための材料としても非常に有用であると考えている。ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞は、無限増殖能を有し、遺伝子導入も電気穿孔法のみで施行できるため遺伝子改変が容易であり、より強力な効果を有する DC を無限に *in vitro* で作成し治療に用いることができるようになる可能性を秘めている。本稿では、これまでに行われてきた多能性幹細胞由来 DC を用いた免疫療法の研究を概説する。またその一例として、腫瘍抗原遺伝子を

導入したマウス ES-DC による抗腫瘍実験について紹介し、今後の展望を述べる。

マウス ES 細胞からの樹状細胞誘導

はじめに、マウス ES 細胞から樹状細胞を誘導する方法について述べる。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樹状細胞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 を作製する培養プロトコルを示す (図 1)。ES-DC は、MHC クラス II 分子を介した抗原提示機能と MLR 刺激活性を有していた。これをさらに TNF- α 、IL-4、および抗 CD40 刺激抗体の同時添加、あるいは LPS 等で刺激すると、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、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えている。

種々の遺伝子改変 ES-DC による抗腫瘍免疫の誘導

筆者らは、モデル腫瘍抗原として OVA (卵白アルブミン) 抗原を発現するマウス ES-DC を作製した²⁾。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

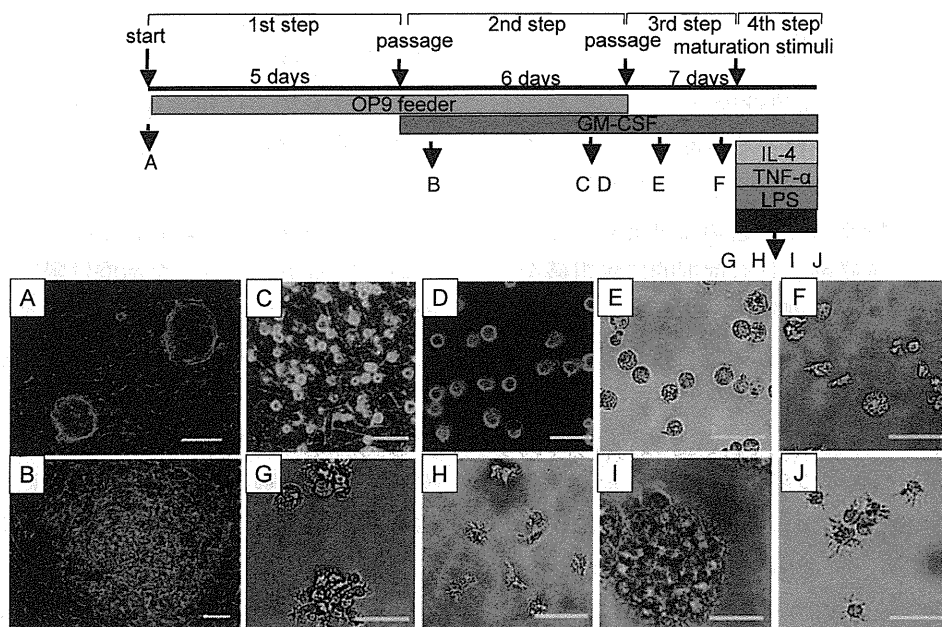


図 1 マウス ES-DC の誘導プロトコール

A に示す ES 細胞を、OP9 フィーダー細胞上にて培養すると血球系に分化したコロニーを形成してくる (B)、そこへ GM-CSF を培養液に添加すると次第に浮遊細胞となる (C, D, E, F)。さらに成熟刺激を加えると樹状突起を持つ DC へと分化する (G, H, I, J)。

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、マウスにこの樹状細胞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³⁾。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胞癌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⁴⁾。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⁵⁾。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 が抗原特異的な T 細胞と遭遇する効率を改善し、抗原を負荷した樹状細胞による免疫効果を向上させる試みも行った。生体に移入した 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。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 と各々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時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。特に SLC の共発現により、最も強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた³⁾。

将来の臨床応用を考えた際に、細胞ワクチンとレシピエントの HLA の不一致が問題となると考えられる。患者本人の iPS 細胞を樹立し、樹状細胞に分化誘導を行えば当然 HLA は一致するが、かなりの時間とコストがかかる。その問題を解決するためには、iPS バンクを構築し、各 HLA に対して iPS 細胞を樹立しておけばよいと考える。そうすれば必要に応じて樹状細胞へ分化誘導し、患者に投与することができる。しかし、その場合 HLA はドナーとレシピエントの間で完全には一致しないこともありうる。そこで、筆者らはアロジェニックな関係にあるマウスを用いて、MHC が完全には一致していなくても、一部 MHC をドナーとレシピエントが共有していれば、抗腫瘍免疫が成立することを示した⁶⁾。さらに汎用性のある細胞ワクチンを目指し、TAP や $\beta 2$ ミクログロブリンといった MHC クラス I 分子の発現に必要不可欠な分子をノックアウトした ES 細胞を用いた研究も行った。H-2K(b) を本来持つ 129 マウス ES 細胞の TAP や $\beta 2$ ミクログロブリンをノックアウトし H-2K(b) を細胞表面に発現しないように改変した。そこへ H-2K(d) 分子を遺伝子導入し、アロジェニックマウスである balb/c マウスでの腫瘍実験を行った。TAP や $\beta 2$ ミクログロブリンノックアウト ES-DC はノックアウトしていない ES-DC に比べて、有意にアロ環境下での生存が延長し、強力な免疫応答を導入した H-2K(d) 拘束性に誘導した⁷⁾。

複数の抗原を用いた ES-DC による抗腫瘍免疫

遺伝子改変 ES-DC による抗腫瘍免疫誘導の一例として、マウスのメラノーマを標的とした研究についてデータを示す。最初にメラノーマ抗原を発現するマウス ES-DC を 3 種類作成した (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 の 3 つの遺伝子をそれぞれ電気穿孔法で導入した。SPARC は筆者らが同定した分泌型新規癌抗原であるが、メラノーマに高発現し、その血清腫瘍マーカーとして有用である⁸⁾。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。gp100 については、メラノーマ担癌マウス個体に対して、mouse gp100 を免疫するよりも、human gp100 (hgp100) を免疫す

るほうが、より強い腫瘍免疫を誘導できることが知られているため、本研究では hgp100 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 DC に分化させ、それぞれの抗原の発現を RT-PCR、および FACS にて確認した。つぎに SPARC、

TRP2, hgp100 を発現したそれぞれの ES-DC を腹腔内注射し、マウス体内でメラノーマ抗原特異的 CTL が誘導できるか否か検討した。それぞれの ES-DC で一週間おきに二回免疫し、一週間後に脾臓細胞を回収し、in vitro でそれぞれの抗原と 5 日間培養した後に、Cr release assay で抗原特異的 CTL を検出した (図 3)。免疫する ES-DC ならびに標的細胞における抗原発現の有無により変化するデータを比較検討することにより、遺伝子改変 ES-DC により抗原特異的な CTL が誘導されたことが確認された⁹⁾。

次に転移モデルにおける抗腫瘍効果を検証した。腹膜播種や原発巣からのリンパ節転移などに対する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 を免疫したマウスでは、培養液のみを投与した陰性対照と比較して有意に腫瘍の増殖が抑制されたが、 1×10^4 個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 投与群との間に有意差は認められなかった。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、腫瘍は完全に拒絶された。つまり単

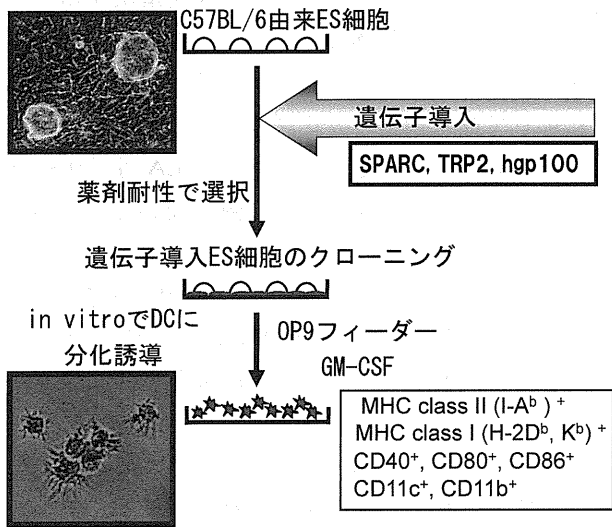


図 2 メラノーマ抗原遺伝子導入 ES-DC の作成法

C57BL/6 マウスの ES 細胞に、SPARC, TRP2, hgp100 の 3 つのメラノーマ関連抗原遺伝子に薬剤耐性遺伝子を連結して、それぞれ電気穿孔法で導入した。薬剤耐性を用いて 3 種類の ES 細胞をクローニングした。遺伝子を導入した ES 細胞より、樹状細胞表面マーカーを発現する ES-DC を分化誘導した。

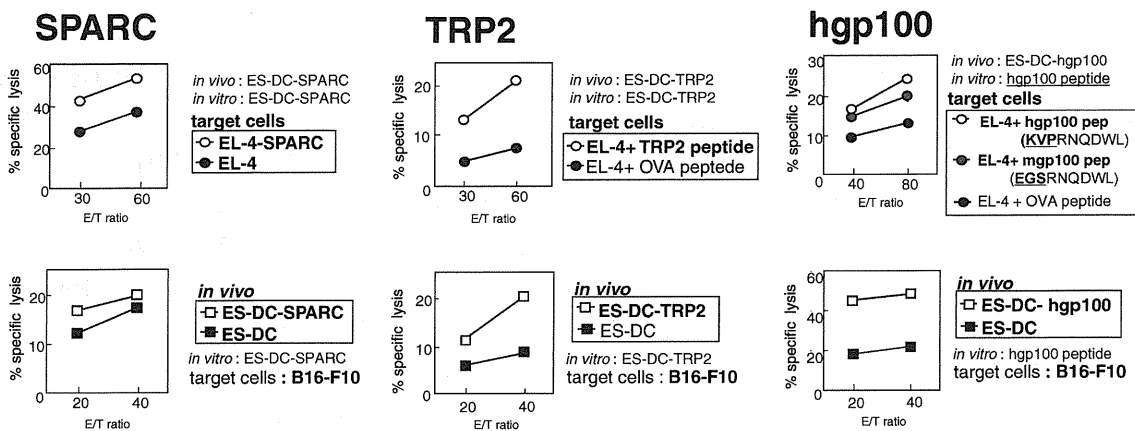
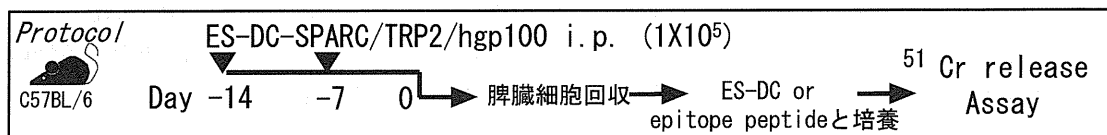


図 3 メラノーマ抗原遺伝子導入 ES-DC による抗原特異的 CTL の誘導

各 ES-DC を腹腔内に一週間おきに投与し、さらに一週間後に脾臓細胞を回収した。これを in vitro でそれぞれの抗原と 5 日間培養し、Cr 放出試験で抗原特異的 CTL を検出した。それぞれの in vivo での免疫方法、in vitro での培養法、および Cr 放出試験における標的細胞をそれぞれのグラフの下に示す。それぞれ抗原特異的に細胞傷害活性が誘導されている。

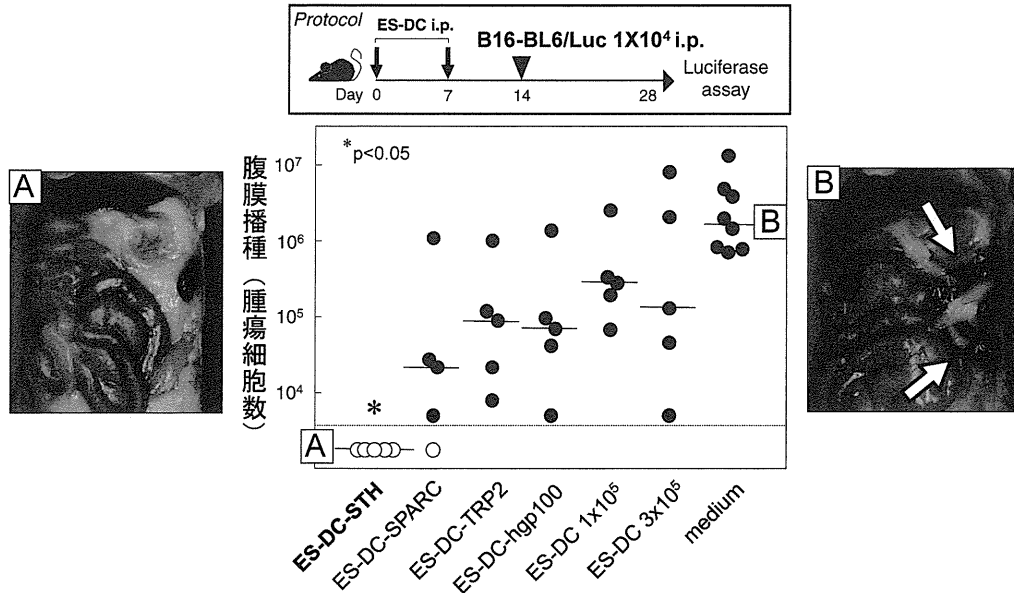


図4 複数のメラノーマ抗原標的ES-DCによる腹膜播種の予防効果

メラノーマ抗原発現ES-DCを二回免疫した後メラノーマを腹腔内に接種し、二週間後に腹膜播種した腫瘍細胞のルシフェラーゼ活性を用いて測定した。縦軸に腹膜播種した腫瘍細胞数、横軸に免疫したES-DCの種類を示す。3種類のメラノーマ抗原発現ES-DCを混合して免疫した群(ES-DC-STH:ES-DC-SPARC+TRP2+hgp100)では、腫瘍は完全に拒絶された。Aに腫瘍を完全に拒絶したマウス、Bに腹膜播種したマウスの代表例を示す。Bの矢印部に黒色を呈するメラノーマの転移巣が肉眼的に観察できる。

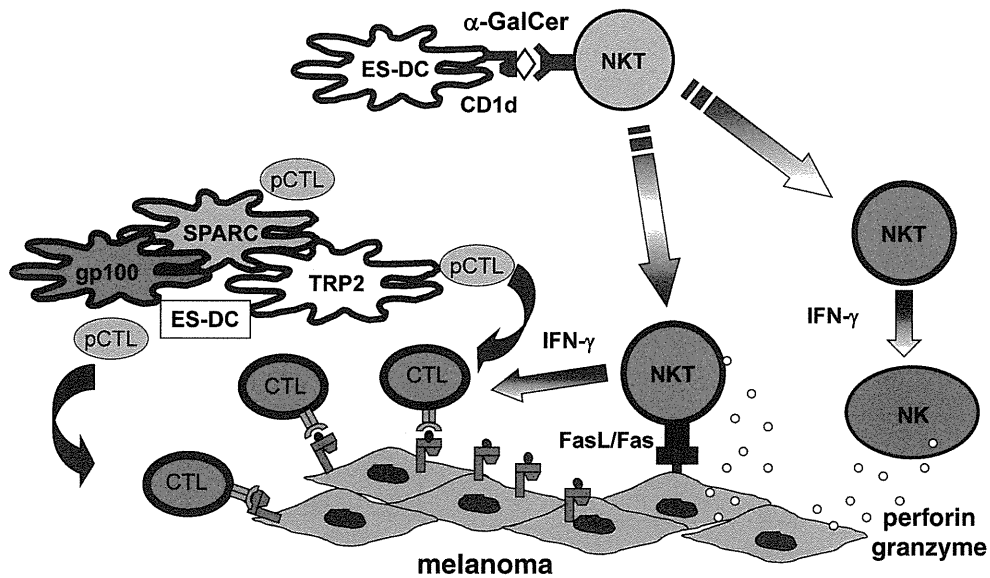


図5 メラノーマ抗原を発現し、 α -GalCerを負荷した樹状細胞によるT細胞、NKT細胞およびNK細胞の活性化に起因する腫瘍免疫誘導の相乗効果

各メラノーマ抗原を認識できるT細胞のプリカーサー(pCTL)には限りがある。複数のメラノーマ抗原を標的とすることにより、最終的に動員できるエフェクターの総数が増える。 α -GalCerはDCに発現するCD1dによって提示され、効率よくNKT細胞を活性化し腫瘍細胞を直接攻撃するだけでなく、IFN- γ を大量に産生して、エフェクターT細胞やNK細胞を活性化する。

一メラノーマ抗原の免疫と比較して、複数のメラノーマ抗原を標的とすることにより、より効果的に腫瘍の増殖を抑制できることが腹膜播種モデルで示された。図5に複数抗原を標的とした免疫療法のシエマを示す。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T細胞の総数は多くなり、より強い腫瘍免疫を誘導できると考えられる。

α-GalCer を負荷した DC，さらに強力な腫瘍免疫誘導をめざして

さらなる抗腫瘍効果の増強を期待して、α-GalCer を用いた。α-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-γ を大量に産生しエフェクター T 細胞および NK 細胞を活性化するため、これらの相乗効果が期待できる (図 5)。図 4 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 種類のメラノーマ抗原発現 ES-DC の免疫群と、抗原を発現しない ES-DC 投与群との間の抗腫瘍効果には有意差は認められなかった (図 6)。一方、α-GalCer を負荷した抗原を発現しない ES-DC の投与は部分的な効果を示した。さらに α-GalCer を負荷した 3 種類のメラノーマ抗原遺伝子導入 ES-DC の投与により、腫瘍は完全に拒絶された。つまり複数メラノーマ抗原標的 ES-DC と α-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、つぎにソケイリンパ節転移および、腹膜播種の治療モデルにおけるデータを示す (図 7)。腫瘍を footpad あるいは、腹腔内に接種した 3 日後、および 10 日後に各種の ES-DC を投与した。α-GalCer を負荷した 3 種類のメラノーマ抗原発現 ES-DC の投与により、

ソケイリンパ節転移および腹膜播種のいずれにおいても、有意に強い治療効果が観察された⁹⁾。

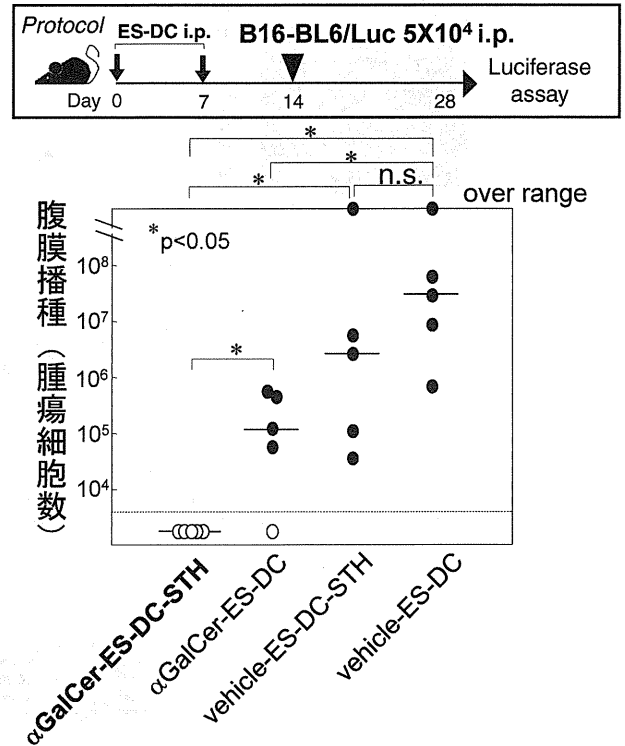


図 6 メラノーマ抗原遺伝子導入 ES-DC と α-GalCer の相乗効果

腹膜播種モデルで α-GalCer 負荷 ES-DC の効果を評価した。図 4 に比べて接種する腫瘍細胞数を 5 倍に増やしたが、α-GalCer を負荷した 3 種類のメラノーマ抗原発現 ES-DC の混合投与により、腫瘍は完全に拒絶された。

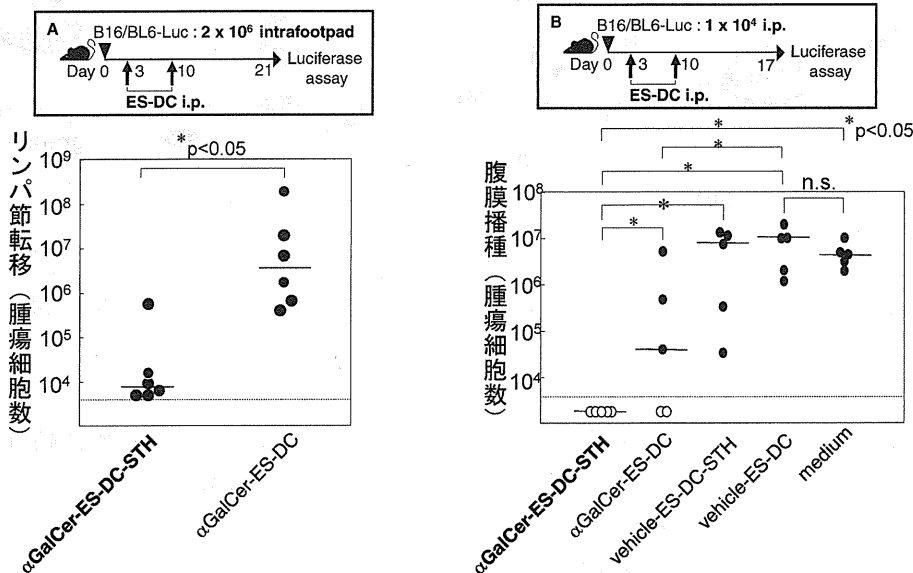


図 7 α-GalCer を負荷した複数抗原標的 ES-DC のソケイリンパ節転移(A)および腹膜播種(B)の治療モデルにおける効果
腫瘍を footpad あるいは腹腔内に接種した 3 日後および 10 日後に、各種 ES-DC を投与したところ、3 種類のメラノーマ関連抗原発現 ES-DC を混合投与した群において、著明な抗腫瘍効果が観察された。

ヒト ES-DC およびヒト iPS-DC の作成

将来ヒトへ応用することを目指し、ヒト ES 細胞でも同様に遺伝子改変 ES-DC が誘導できるかどうかを検討した。まずマウスの場合と同様にフィーダー細胞を用いた分化誘導を試みた。フィーダー細胞としては、ST2, PA6, OP9 を用いて検討したが、マウスの場合と同様に OP9 がもっとも優れていた。図 1 の各ステップにおける培養はマウスにくらべてやや長い期間が必要であったが、概ね同様の方法で樹状細胞が誘導された。また電気穿孔法での遺伝子導入、および導入した遺伝子特異的な免疫応答が確認できた¹⁰⁾。

近年開発された iPS 細胞テクノロジーによって、筆者らの多能性幹細胞由来樹状細胞による細胞ワクチン療法は急速に現実味を帯びてきた。iPS 細胞を用いれば、患者本人の体細胞を採取し、試験管で無限に樹状細胞へと分化誘導することが理論上可能である。この樹状細胞を癌患者の治療に使うことに関する倫理的な問題は、受精卵を破壊して作成する ES 細胞に比べればはるかに低いと考えられる。筆者らは最近、マウス iPS 細胞からも樹状細胞誘導が可能であり、抗原プロセッシング、抗原提示、T 細胞活性化、サイトカイン産生といった機能を有することを報告した¹¹⁾。マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞に比べて、分化誘導にやや時間を要するところがあったが、むしろ最終的に誘導できる樹状細胞の数は iPS 細胞の方が多かった。さらにマウス iPS 細胞についても抗原遺伝子の導入が可能であり、マウス体内において、導入抗原特異的な抗腫瘍効果を誘導できた。

今後の展望

今後は、ヒト iPS 細胞での研究を推進していくべきであろう^{12~14)}。現在の方法では樹状細胞の分化誘導にマウス由来のフィーダー細胞や血清成分を含んだ培養液を用いている。無フィーダー、無血清培養法の確立、またより低コスト、簡便な方法の開発が望まれる。全世界を挙げて iPS 細胞に関するテクノロジーが次々と開発されている現状、また一方では iPS バンク構想も動き始めている昨今の状況を鑑み、多能性幹細胞由来樹状細胞を用いて、癌患者を治療する日はそう遠くはないと考える。

文 献

- 1) Dudley, M. E. et al. : Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol.* **26** : 5233–5239, 2008.
- 2) Senju, S. et al. : Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood.* **101** : 3501–3508, 2003.
- 3) Matsuyoshi, H. 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* **172** : 776–786, 2004.
- 4) Nakatsura, T. et al. : Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* **306** : 16–25, 2003.
- 5) Motomura, Y. et al. : Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res* **66**, 2414–2422, 2006.
- 6) Fukuma, D. et al. : Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 5–13, 2005.
- 7) Matsunaga, Y. 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* **181**, 6635–6643, 2008.
- 8) Ikuta, Y. 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* **11**, 8079–8088, 2005.
- 9) Fukushima, S. et al. : Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunother* **32**, 219–231, 2009.
- 10) Senju, S. et al. : Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells*

- 25, 2720–2729, 2007.
- 11) Senju, S. et al. : Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**, 1021–1031, 2009.
 - 12) Senju, S. et al. : Pluripotent stem cell-derived dendritic cells for immunotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**, 1520–1527, 2010.
 - 13) Senju, S. et al. : Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int J Hematol*, 2010.
 - 14) Senju, S. et al. : Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Therapy* (in press)