

2007年).

方法: 多施設共同での無作為割付け比較試験による第II相臨床試験(3種類のイピリムマブの投与量設定で3群間での比較検討が行われた).

結果: 10mg/kg (n=73), 3mg/kg (n=72) および 0.3mg/kg (n=72) を3週ごとに4回投与した. 10mg/kg 投与群では11.1%, 3mg/kg 投与群では4.2%, 0.3mg/kg 投与群では0%の奏効率が得られた. 自己免疫関連の有害事象のうちGrade 3~4の主要なものは自己免疫性腸炎であり, その発生率は, それぞれの群において15.4%, 0.28%, 0%の頻度であった. イピリムマブは用量依存性に効果が認められた. 10mg/kgでの第III相試験が予定されている.

10] Attia P, et al (J Clin Oncol. 2005; 23: 6043-53)⁸⁾

目的: 転移性メラノーマに対するgp100ペプチドワクチン併用CTLA-4モノクローナル抗体療法の抗腫瘍効果の評価.

対象: 米国NCIのHLA-A*0201陽性IV期メラノーマ患者56名.

方法: 前向き臨床研究.

結果: 56例に対して, イピリムマブ3mg/kgの3週毎投与もしくは2回目以降1mg/kgの投与が行われ, HLA-A*0201拘束性gp100ペプチド210Mおよび288Vの1mg投与が併用された. 肺, 肝, 脳, リンパ節, 皮下転移の縮小が認められ, CR2名, PR5名を含む7名(12.5%)に奏効した. 治療効果は4か月から34か月の持続が認められた.

4 根拠となった臨床研究の問題点と限界

米国NCIで行われている非骨髄破壊性/骨髄破壊性前処置とTILを用いたACTのコンビネーションは, そのきわめて優れた治療成績から, これまでの免疫療法の歴史のなかでも画期的な治療法といえる. しかしながら, こうした養子免疫療法においては, 各々の患者からTILを樹立, 培養し, 腫瘍特異性を確認する一連の過程に, 高い技術と大きな労力が必要とされ, かつ本邦では保険適応のないIL-2を併用するなど, 本邦での実現には高いハードルがあるといわざるを得ない.

5 (本邦の) 患者に適応する際の注意点

本邦での免疫療法は, ごく一部のがん橋渡し研究やがん拠点病院などの臨床試験を除き, その多くは民間のクリニックや研究所において自由診療として行われているのが現状である. そのため, 治療プロトコル, 細胞調整の適正化や免疫モニタリングの評価が十分行われていないことが懸念される. また, 上述のようにIL-2が本邦での保険適応でないことも大きな問題の1つである. ④で述べたように, TILを使った養子免疫療法の本邦での実現は困難であるが, TCR遺伝子導入末梢血リンパ球を用いたACTは本邦においても実現可能な方法であろう. また, CTLA4モノクローナル抗体療法に関しては, 本邦においても多施設共同での臨床試験が望まれる.

■文献■

- 1) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004; 10: 909-15.
- 2) Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2105-16.
- 3) Smith FO, Downey SG, Klapper JA, et al. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5610-8.
- 4) Sosman JA, Carrillo C, Urba WJ, et al. Three phase II cytokine working group trials of gp100 (210M) peptide plus high-dose interleukin-2 in patients with HLA-A2-positive advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2292-8.
- 5) Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21: 233-40.
- 6) Camacho LH, Antonia S, Sosman J, et al. Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1075-81.
- 7) Wolchok JD, Neyns B, Linette G, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 155-64.
- 8) Attia P, Phan GQ, Maker AV, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 6043-53.
- 9) Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol.* 2005; 12: 1005-16.
- 10) Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B, et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 6267-76.
- 11) Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, et al. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58: 1-14.
- 12) Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009; 114: 535-46.

〈木庭幸子〉

4. ペプチドワクチン療法

4.1 はじめに

もう治療がないと言われ、積極的治療が受けられなくなった進行がん患者の多くが民間療法や健康食品などに頼っている中で、免疫療法への期待や需要は大きい。あるいは、再発予防や予防法としての期待も高まっている。免疫療法はがんの第4の治療法と言われて久しいが、残念ながらまだ標準治療としては確立されていないのが現状である。適切な臨床試験と基礎研究の繰り返しによる科学的根拠に基づいたがん免疫療法の開発の必要がある。本稿では、特にペプチドワクチン療法についての現状について、我々の経験を中心に述べる。

4.2 がんの免疫療法について

がんの免疫療法の概念は既に19世紀からあった。医師たちはがん患者が細菌に感染すると、がんが小さくなる場合があることに気づいていた。そこから生まれたColey's vaccine (toxin)は、時にはがんの完全退縮を得たが、広くは受け入れられなかった。また、がんにはまれではあるが、自然退縮が起こる。これにはおそらく免疫も関与している。1967年ごろには、がん細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られたがん組織からがん細胞をばらばらにして、1万

個、10万個、100万個、1,000万個、1億個とその患者の皮下に移植した結果、進行がんの患者でも1万個は完全に拒絶され、10万個では時に移植が成立し、1億個ではほとんど移植が成立することがわかった。これらの研究結果は、がんに対する免疫の確かな存在と、一方ではその限界も示していると言える。

1991年にBoonらにより、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しうること科学的な根拠が与えられた。すなわち、がん化に関連して特異なタンパクが産生されると、これらに由来するペプチドが、HLAクラスI分子に結合して細胞の表面に発現し、CD8⁺細胞傷害性T細胞（キラーT細胞、CTL）がこれらを識別して活性化され、がん細胞を破壊するというメカニズムが存在する。現在までに、様々ながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、世界中で臨床試験が進められている。前立腺がんに対して「Provenge」という樹状細胞療法がFDAに承認され話題になったが、その他にもいくつかの第3相臨床試験での有効性も報告されている。一方では、最近子宮頸がんの予防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのはがんの再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法やがん発症予防法の開発も必要である。近い将来、ペプチドワクチンで

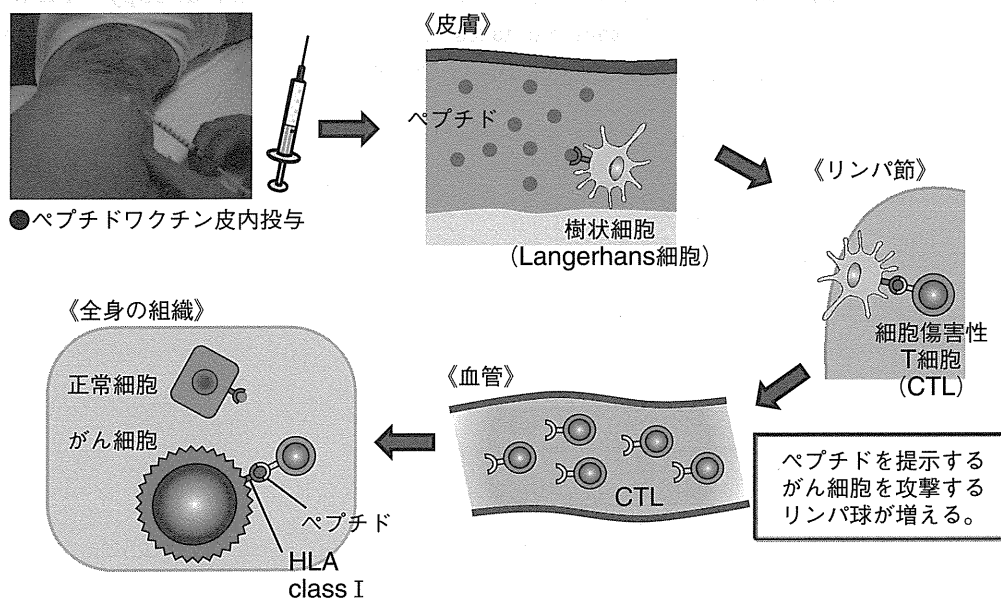


図1 ペプチドワクチン療法のメカニズムの概略

がんを予防する時代が来ることに期待したい。

4.2.1 ペプチドワクチン療法の proof of concept (POC)

ペプチドワクチン療法によりがん細胞を傷害するメカニズムを考えてみると、ペプチドをワクチンとして患者の皮内に注射すると、皮内のランゲルハンス細胞（樹状細胞）表面のHLAにペプチドが載り、その後リンパ節に移動して、リンパ節でペプチドを載せた樹状細胞によって刺激を受けたキラーT細胞（CTL）が活性化し、増え、血流に乗ってペプチドをHLA表面に提示しているがん細胞を攻撃するが、ペプチドを提示していない正常細胞は傷害しないという目で見ることのできない複雑な生体反応である（図1）。逆に言うと、ペプチドワクチンにより、血液中にペプチド特異的CTLが増加して、そのCTLが実際がんの組織の中に浸潤しない限りはがん細胞の傷害、すなわち臨床効果は起こりようがない。即ち、ペプチドワクチン投与後に血液中にペプチド特異的CTLが増えるかど

うか、さらにそのCTLが実際がんの組織の中に浸潤するかどうかを証明することこそが、本療法の“proof of concept (POC)”であり、それすら起こっていないならば臨床効果は起こるはずがない。

4.2.2 Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床第I相試験の概要

我々は進行肝細胞がん33例を対象に臨床第I相試験を実施した。1回の投与量を0.3, 1, 3, 10, 30mgの5段階とし、2週間おきに3回、左右の腋窩部、腹部および鼠径部の皮内にIFAと混ぜたエマルジョン製剤を、安全性を確認しながら用量を増して投与した。

33例中、注射時のその日のうちに消失する一過性の潮紅は27例（82%）に認められ、うち2例には一過性の異所性の皮疹、1例には一過性の広範の潮紅を認めた。発熱は37.5℃以上が8例で、うち38℃以上が4例にみられたがいずれも一過性で、解熱剤の使用を要しなかった。注射部の紅斑は33例全例に見られ、うち6例には軽度の搔痒があり、クロタミトン（オイ

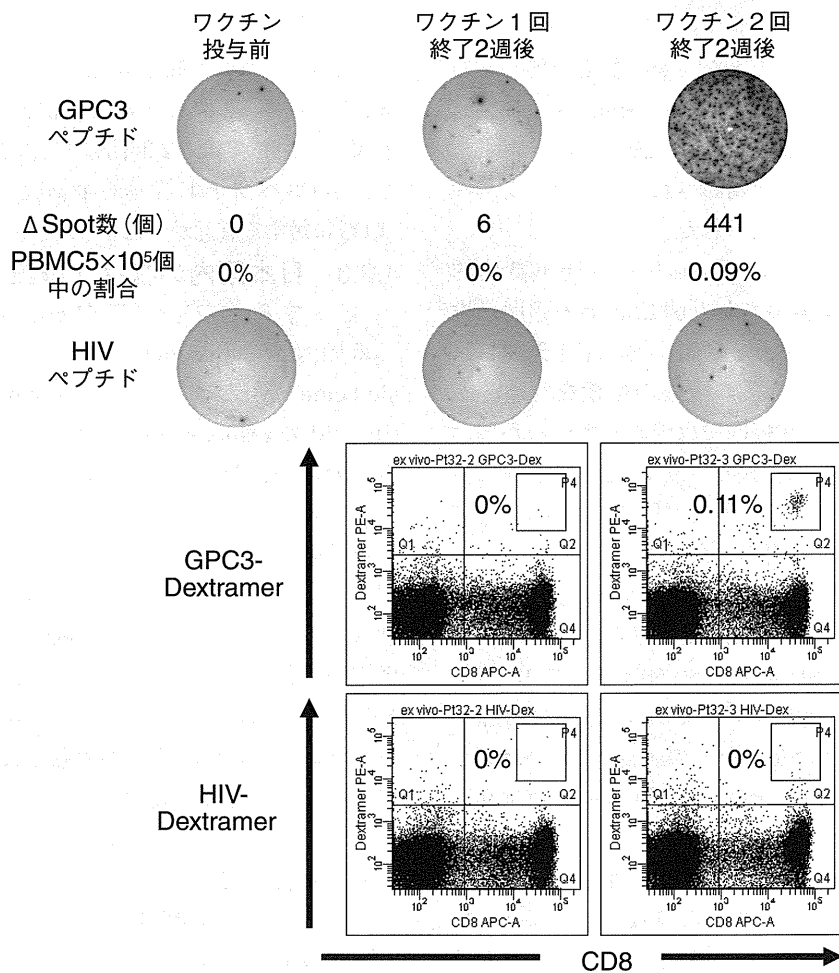


図2 ペプチドワクチン投与前後の末梢血中ペプチド特異的CTLの検出
わずか2回のペプチドワクチンで10⁹ものGPC3ペプチド特異的CTLが誘導された計算になる。

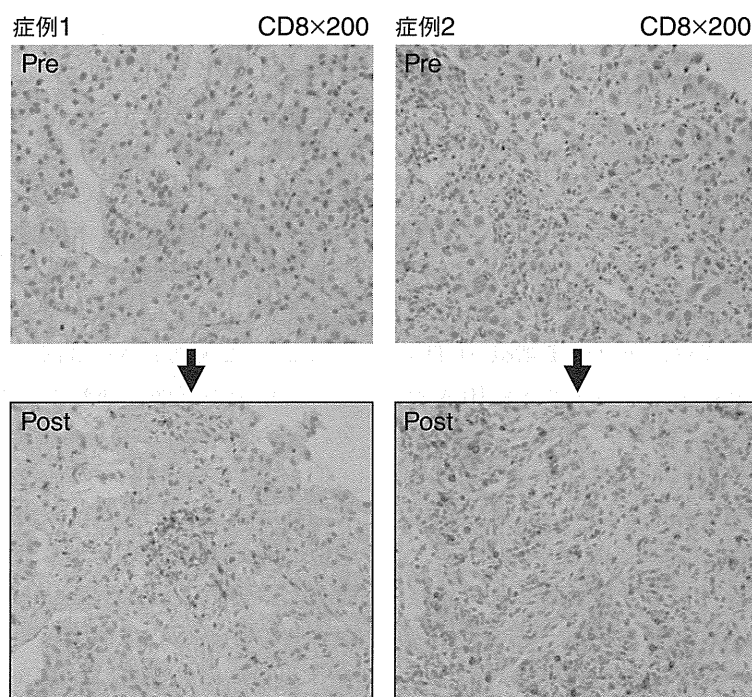


図3 ペプチドワクチン後の腫瘍内に CD8 陽性のキラー T 細胞が多数浸潤 (口絵参照)

ラックス) クリームを処方した。炎症反応を伴う疼痛や腫脹は認められなかった。また、Grade 3 の肝機能障害 (AST、ALT、T-Bil) を 4 例に認めたが、いずれもがんの増悪によるものと判断された。以上、安全性においては問題ないと考えられた。

33 例中 30 例 (91%) に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され (図 2)、その頻度は投与量依存性に増加しており、免疫学的反応も確認された¹⁾。7 例ではワクチン後の腫瘍の生検を行い、うち 5 例でワクチン前の腫瘍内には浸潤していなかった CD8 陽性のキラー T 細胞がワクチン後の腫瘍内に多数浸潤している像も観察できた (図 3)。本ペプチドワクチン療法の POC は得られたと考えている。

臨床効果については、3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の RECIST version 1.0 での評価では、33 例中 1 例が PR、18 例が SD (SD 以上 59.4%) で 13 例は PD、1 例は NE (評価できず) であり、5 例には腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小などの所見も認められた。TTP 中央値は 3.4 ヶ月、全生存期間 OS 中央値は 9 ヶ月であった。

全 33 例の GPC3 ペプチド特異的 CTL 活性と OS の分布図を検討すると、両者に有意な相関 ($p=0.031$) を認めた。さらに OS 中央値では、GPC3 ペプチド特異的 CTL 活性 50 以上群は 12.2 ヶ月、50 未満群は 8.4 ヶ月と有意な差 ($p=0.033$) を認めた。GPC3 ペプチド

特異的 CTL の最大頻度 50 以上 (N=15) または 50 未満 (N=18) の 2 群に分けて検討したところ、臨床背景因子に関しては、2 群間に有意差を認めるものはなく、GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の最大頻度 50 以上は OS に対する有意かつ独立した予後因子と考えられた。

4.2.3 日本国内の様々な施設からのがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告

米国 NCI の Rosenberg SA らは、2004 年の Nature Medicine にがんワクチンの Review として、440 例中 CR、PR の response rate はわずか 2.6% であったと報告した²⁾ が、そのことは 2009 年の米国癌学会でも議論になり、ペプチドワクチン単独では進行がんには劇的な効果はないかもしれないが、生存期間や無増悪期間の延長等の可能性はあり、再発予防にも有効な可能性はある、また様々な免疫抑制分子に対する抗体との併用などに期待が持てるとの意見も多かった。一方、最近日本国内の様々な施設からがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告も散見され、今後が期待されている。概要を表 1 に示す。

4.3 おわりに

がん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上重篤な有害事象は起こりえず、有効性さえ証明できれば標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらペプチドワクチン等の免疫療法に

表1 がんペプチドワクチン療法臨床試験の臨床効果の報告

報告施設	がんワクチンの種類	臨床効果	文献
NCI	がんワクチンの Review	440 例中の奏効率はわずか 2.6%	2
大阪大	WT1 ペプチド	骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、乳がん、肺がん、脳腫瘍などで有効例、GEM と併用で膀胱がんにも有効	3
札幌医大	サバイビン 2B ペプチド	進行大腸直腸がんで奏効例	4
久留米大	テーラーメイドがんペプチド	子宮頸がん、大腸がん、脳腫瘍、膀胱がん、前立腺がんでも有効	5
近畿大	CA9 ペプチド	腎がんでは複数の奏効例	6
山口大	KOC1、RNF43、TOMM34、VEGFR1、VEGFR2 の 5 種類のペプチド	大腸がんでは奏効例	7
山梨医大	TTK、LY6K (URLC10)、IMP-3 (KOC1) の 3 種類のペプチド	食道がんでは奏効例	8
岩手医大	MPHOSPH1、DEPDC1 のペプチド	膀胱がんでの抗腫瘍効果	9
和歌山医大	VEGFR2 ペプチド	GEM との併用で切除不能進行膀胱がんにも生存期間延長の期待	10
当院	GPC3 ペプチド	進行肝細胞がんでは奏効例	1

よりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考えられる。ペプチドワクチンはより安価に提供でき、一般の医療施設でもできる治療である。今後示される有効性によっては、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者の QOL の改善にとっても大きな役割を果たすものと考えられる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、今後次々とがんペプチドワクチン療法が薬として承認されることを期待したい。

文献

- 1) Yoshikawa T, et al: Cancer Sci **102**: 918-925, 2011
- 2) Rosenberg SA, et al: Nat Med. **10**: 909-15, 2004
- 3) Oka Y, et al: Curr Opin Immunol **20**: 211-20, 2008
- 4) Tsuruma T, et al: J Translational Med, 2004
<http://www.translational-medicine.com/content/2/1/19>
- 5) Yajima N, et al: Clin Cancer Res **11**: 5900-11, 2005
- 6) Uemura H, et al: Clin Cancer Res **12**: 1768-75, 2006
- 7) 裕 彰一ほか: Biotherapy **23** (2): 160-164, 2009
- 8) Kono K, et al: Cancer Sci **100**: 1502-1509, 2009
- 9) 小原 航ほか: 膀胱がん 新規腫瘍抗原を利用したワクチン療法、中村 祐輔 編: がんペプチドワクチン療法。中山書店、東京、p63-70, 2009
- 10) Miyazawa M, et al: Cancer Sci **101**: 433-439, 2009

(中面哲也)

※ ガンマナイフの原理と適応

Mガンマナイフは1968年にカロリンスカ大学の脳神経外科医レクセルにより開発された。半球状のドーム内に201個のコバルト60線源を配置させ、細いビームを多方向から集中させることで周囲正常組織への線量を抑えて病巣部を照射する。ヘルメットには201個のコバルト線源に対応する穴(4~18mm)があり、コバルト線源から発生するガンマ線を病巣部に集中的に大線量が照射される。開頭術を行うことなく低侵襲の治療が可能であり、通常は一回照射で治療が完了する。治療精度を保つ(誤差:0.5mm以下)ために定位ヘッドフレームを頭蓋骨にピン固定し、このフレームをヘルメットに固定し治療する。一つの焦点だけであれば球状の、また複数個の焦点を設定すると八頭状の不整形の線量分布を作ることが可能である。高い精度で照射をすることが重要であり、フレームを頭蓋骨に観血的にピン固定し治療誤差を最小限にとどめる。また、正確な病変の把握のために、CTやMRI画像などを組み合わせて慎重に標的を決めていく。

3cm以下の転移性腫瘍や良性腫瘍、血管性病変(脳動静脈奇形)などが適応となる。多数の脳転移病巣を有する症例でも技術的に治療は可能であるが臨床的意義は限られており適応決定には慎重な態度が必要である。本治療法は放射線を集中的に照射することであり、浸潤傾向の強い悪性星細胞腫などには不向きである。機械の構造上の制限から体幹部には応用できない。ガンマナイフは頭蓋内のさまざまな疾患に適応可能であるが、わが国では治療件数の約半数が転移性病変で占められている。

現在では、同様の原理を用いて通常の放射線治療器と専用の治具を組み合わせたシステムや、リニアック装置をロボットアームに搭載させ追尾システムと組み合わせたサイバーナイフなどのシステムでも定位放射線療法を行うことが可能となった。

(鹿間直人)

3) 免疫療法

悪性黒色腫 malignant melanoma (MM) は、免疫原性の高い腫瘍であるため、効率よく抗腫瘍免疫応答を誘導することにより腫瘍拒絶を期待できる(図39)。生体内での腫瘍拒絶に重要な免疫系細胞はCD8陽性の細胞傷害性T細胞(CTL)のほか、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞などがあり、CTLの標的となる腫瘍抗原が数多く同定されている。免疫療法は、能動免疫療法と受動免疫療法に分けられる(表13)。

a) 能動免疫療法

サイトカインや免疫賦活剤による免疫増強法や、腫瘍抗原を用いたワクチン、樹状細胞療法、腫瘍破壊によるワクチン療法などを行う。

(1) サイトカイン療法(生物療法)

MMは、インターフェロンなどのサイトカインに感受性がある。わが国で標準治療として行われているIFN- β については、術後補助療法の項(245頁)などを参照されたい。

免疫を増強する目的で、単独あるいは抗原特異的免疫療法や細胞移入などと併用してインターロイキン(IL)やGM-CSFが有用である。米国国立癌研究所(NCI)では、IL-2の大量投与(72万IU/kg、8時間毎)が行われている。進行期MMに対する本療法の奏効率は13%である¹⁾。このほか、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21などのサイトカイン、あるいはサイトカイン遺伝子投与が試験的に行われてきた。わが国ではこれらのサイトカインは保険適用ではなく、非常に高価であるため、標準治療化が難しい。IL-2投与と化学療法を連続して行う生物化学療法のレジメンも存在する。

(2) 抗原特異的免疫療法

MM患者から同定された腫瘍抗原として、gp-100やMART-1に代表されるメラノサイト特異的蛋白²⁾や、MAGEやNY-ESO-1などの癌精巢抗原のほか、過剰発現蛋白、癌特異的変異蛋白などが同定されており、これらの蛋白やペプチド、あるいは遺伝子を用いて、*in vivo*あるいは*in vitro*で抗原特異的免疫応答を誘導することによって、腫瘍拒絶をもたらす。腫瘍抗原の多くは、正常組織での発現が限られているため、副作用が少ない

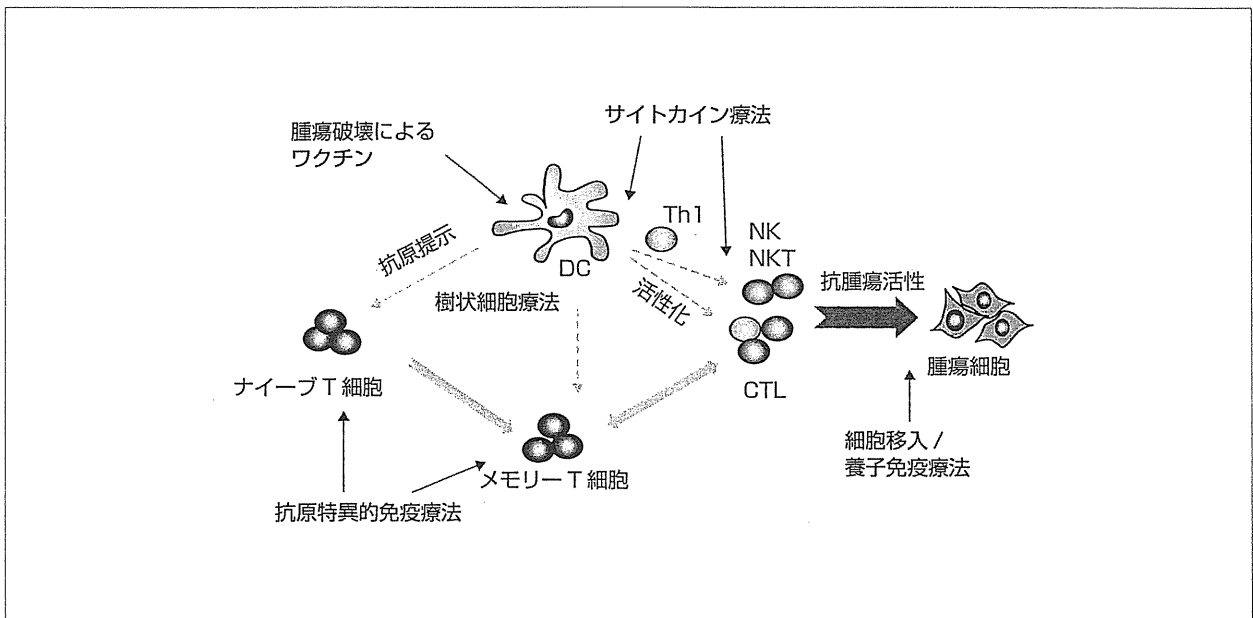


図39 抗腫瘍免疫応答と免疫療法

DC : dendritic cell, Th1 : T helper 1, NK : natural killer, NKT : natural killer T, CTL : cytotoxic T lymphocyte

表13 悪性黒色腫に対する免疫療法

能動免疫法
サイトカイン療法/生物療法
抗原特異的免疫療法
抗原ペプチド, 蛋白, DNA
樹状細胞療法
樹状細胞+抗原ペプチド, 蛋白, DNA
樹状細胞+自己腫瘍溶解物
腫瘍破壊によるワクチン療法
放射線, 温熱, 凍結, PDT (光線力学的療法)
など
修飾癌細胞ワクチン
免疫増強法
アジュバント
熱ショック蛋白
受動免疫法
細胞移入/養子免疫療法
腫瘍浸潤リンパ球
活性化リンパ球
TCR遺伝子導入リンパ球
ミニ移植

く、一般的な化学療法に比べて、患者のQOLを保つのに適している。しかし、ペプチドの場合、MHC拘束性のため、患者のHLAによっては適応にならない症例も存在する。これまでに、MHC親和性を高めた改変ペプチドも開発されて

いる。ペプチドは供給が簡便で安価であることや、誘導された免疫応答を確認する免疫モニタリングが容易であることが利点としてあげられるが、これまでの多数の臨床成績を総合すると、ペプチド投与単独では、*in vivo*で誘導される抗原特異的T細胞による免疫応答が比較的弱いため、腫瘍拒絶に至らないケースが多い。

わが国では、浜松医大において、表皮Langerhans細胞を抗原提示細胞として利用する経皮的ペプチド投与が臨床試験として行われた。この臨床試験においては、25例の進行期MM患者に対して、HLA-A*0201のMART-1と、A*2402のMAGE-2, -3, gp100, tyrosinaseの抗原ペプチドで経皮感作を行ったところ、一部の症例で腫瘍縮小および新規病変の抑制などの臨床効果が認められ、モニタリングでもCTLの誘導が確認できており、今後の展開が期待される³⁾。

抗原特異的免疫療法の課題としては、腫瘍細胞における抗原発現低下やMHC分子発現低下のほかに、抗原刺激による制御性T細胞の誘導があげられる。こうした問題を克服すべく、新たな標的抗原の探索にも力が注がれている。

(3) 樹状細胞療法

最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いて抗腫瘍免疫を誘導する。末梢血単球由来の樹状細胞を調製し、*in vitro*で黒色腫抗原やペプチドをパルスして、アジュバントなどととも、リンパ節や皮内～皮下に投与する。樹状細胞の調製は、プラスチック接着細胞やCD14細胞からIL-4やGM-CSFなどのサイトカイン存在下で行う。樹状細胞による抗原蛋白の取り込みや抗原ペプチドのプライミング、および樹状細胞の投与経路も詳細に検討され、最適化がなされている。およそ 10^7 個の樹状細胞を投与し、2～3週間ごとに繰り返す(コラム「樹状細胞療法の実際」参照)。これまで世界中で行われた626例の樹状細胞療法の治療成績のまとめによると、CR + PRは約9%、SDを含めると約30%であり、投与経路はリンパ節内投与と皮内、皮下投与の治療成績が静脈内投与のそれよりも優れており、ヘルパー抗原を併用をした群が併用しない群よりも優れていた。また免疫モニタリングでは、遅延型過敏反応よりもIFN- γ 産生細胞の数の上昇が臨床効果と相関していた⁴⁾。

(4) 腫瘍破壊によるワクチン療法

MMは皮膚・皮下転移が多い。皮膚転移巣など経皮的にアプローチしやすい病変に対して、放射線照射や凍結凝固、温熱負荷などの操作、光線力学的療法、ウイルスによる腫瘍溶解といった非侵襲的な腫瘍破壊により、腫瘍細胞内から腫瘍抗原の遊離を起こす。これらの操作単独、あるいは、これらの操作に加えて同部位に樹状細胞を注入することによって、*in vivo*腫瘍細胞由来蛋白を樹状細胞に取り込ませ、全身的な抗腫瘍免疫の誘導を目指して、わが国においても臨床試験が続いている。

b) 受動免疫療法

養子免疫療法(adoptive cell transfer: ACT)やミニ移植、リンパ球輸注などを行う。

細胞移入/養子免疫療法(adoptive cell transfer: ACT)

MMに対し1980年代から行われている手法であるが、近年、大きな展開をみせている。ACT

は、患者からアフエレーシスで取り出した末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を、IL-2などのサイトカイン存在下で培養、あるいは*in vitro*で抗原刺激を加えることにより、誘導される活性化リンパ球を患者体内に戻す。米国NCIでは、転移性黒色腫患者に対して、MART-1 A2ペプチド拘束性およびgp100 A2ペプチド拘束性T細胞レセプターを遺伝子導入した末梢血リンパ球を用いたACTを行っており、それぞれの奏効率は30%と19%である⁵⁾。

抗腫瘍免疫応答を抑制する免疫担当細胞の一つである制御性T細胞を減少させる目的で、Tregの前駆細胞となるリンパ球除去を行う方法が開発されており、ACTに併用できる。シクロホスファミドとフルダラビンなどの骨髄非破壊性免疫抑制前処置やdenileukin diftitox (ONTAK[®])の投与、あるいは全身放射線などの前処置を行ったうえで、大量のIL-2とともにTILを移入するACTにより再発MMに対し、49～79%というきわめて高い奏効率がえられている⁶⁾(コラム「免疫制御機構と克服への取り組み」参照)。

(木庭幸子)

(P257「4) 分子異常と分子標的治療」へ続く)

コラム

樹状細胞療法の実際

信州大学医学部附属病院輸血部 下平滋隆

進行期あるいは再発、予後不良のがん、肉腫、造血器悪性腫瘍に対する樹状細胞療法は、手術、抗がん薬、放射線療法に加え第4の治療として期待され、集学的ながん治療戦略として臨床研究がなされている。悪性黒色腫は免疫療法が有効な疾患であり、歴史的に最も研究が行われてきた。

樹状細胞療法には、1) 自己がん組織パルス樹状細胞療法、2) 人工抗原パルス樹状細胞療法、3) 局所樹状細胞療法があり、①自己腫瘍組織の有無、②人工抗原のマッチング、③局所投与可能

マイコプラズマの検定およびFACS分析による成熟樹状細胞の表面形質を確認する。

⑤人工抗原ペプチドパルス樹状細胞療法

凍結した腫瘍組織が保管されていない場合、HLA-DNAタイピングの結果により、WT1 (Wilms' tumor1, HLA-A*2402あるいはHLA-A*0201) ペプチドをパルスした樹状細胞療法を検討する。

2. 作製樹状細胞の投与と評価

- ① 原則、1コース5~7回として、2週毎に 1×10^7 個/回の樹状細胞を皮内接種する。この際、補助薬としてその近傍に1~5KEのOK-432を投与する。
- ② 免疫学的な効果・効能は、(WT1ペプチドを用いた患者では)WT1テトラマー解析、インターフェロン γ 産成能のELISpot解析、Th1/Th2バランスを投与前・後の比較により行う。
- ③ 治療効果としては、治療前・後の測定可能病変をCT, MRI, PETなど各種画像検査を用いてRECISTガイドラインに従い評価する。
- ④ 安全性の評価としては、有害反応評価基準(NCI-CTCAE-JCOG)/JSCOG和訳版に従うが、樹状細胞接種の局所では80%以上の例で発赤や硬結、2重発赤を認め、OK-432による発熱も半数にみられる。悪性黒色腫では皮膚の白斑が誘導される症例がある。

3. 樹状細胞療法の課題

悪性黒色腫における樹状細胞療法の有効性は30%と報告されているが、本療法による延命効果、QOLの改善について検討する必要がある⁴⁾。樹状細胞の作製法や投与法、併用療法はさまざまであり標準化が望まれる。WT1ペプチドの他、MAGE-A4/Survivinヘルパーペプチドを用いた樹状細胞療法の成果が期待される⁵⁾。

文献

- 1) Nagayama H et al : Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell

vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. Melanoma Research 13 : 521-530, 2003

- 2) Okamoto M et al : Mechanism of anticancer host response induced by OK-432, a streptococcal preparation, mediated by phagocytosis and Toll-like receptor 4 signaling. J Immunother 29 : 78-86, 2006
- 3) Figdor CG et al : Dendritic cell immunotherapy : mapping the way. Nat Med 10 : 475-480, 2004
- 4) Engell-Noerregaard L et al : Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma : assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. Cancer Immunol Immunother 58 : 1-14, 2009
- 5) Cheever MA et al : The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res 15 : 5323-5337, 2009



免疫制御機構と克服への取り組み

信州大学皮膚科 木庭幸子

がんの微小環境においては、がん細胞、間質細胞、免疫系細胞などが、単独あるいは相互作用によって、免疫抑制状態をつくりだすとともに、増殖因子や生理活性物質などを介して、発がん機転および腫瘍の増殖・転移に深くかかわる。なかでも、腫瘍特異的T細胞や樹状細胞の増殖・機能抑制の原因として、制御性T細胞(Treg)などの抑制的免疫細胞群による免疫制御が注目されている。Tregのほかに、免疫寛容誘導樹状細胞、骨髓由来抑制性細胞、腫瘍関連マクロファージなどが知られており、分子機序の解明が待たれる。

1. 制御性T細胞

CD4 + CD25^{high} foxP3 + のTregは、末梢免疫寛容に深くかかわり、自己免疫性疾患の発症においても主要な役割を果たす。GITR +, CTLA4 + などのフェノタイプを示し、悪性黒色腫(MM)においても、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の中に検出される¹⁾。また、抗原特異的免疫療法によって誘導されることも報告されている。

Tregは、腫瘍特異的T細胞の増殖・活性化を抑制し腫瘍拒絶を妨げるほか、抗原提示細胞の成熟化を阻害して抗原提示能を抑制し、ナイーブT細胞のアナジーを誘導するなどして、腫瘍局所あるいは全身における免疫回避をつかさどる。

2. 免疫寛容誘導樹状細胞

最も強力な抗原提示細胞として知られている樹状細胞は、さまざまな環境下で抑制的な機能をも発揮し、免疫寛容誘導樹状細胞 (tolerogenic dendritic cell : TDC) と呼ばれる。TDCは、サイトカインやCTLA-4, LFA-1などを介した免疫抑制機能を示し、抗原特異的T細胞の除去や、ナイーブT細胞のアナジーの誘導、Tregの誘導・増殖にかかわる。MMにおいては、センチネルリンパ節でplasmacytoid DCが高率に検出されることが報告されており、TDCとして機能している可能性がある²⁾。

3. 骨髄由来抑制性細胞

骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cell : MDSC) は、TNF α や TGF β , IL-6などにより、Immature myeloid cell (ImC) から誘導される。CD14 + Lin-HLA-DR-を示し、arginase, ROS, ONOO-, NOといった活性酸素を産生し、シグナル伝達阻害 (JAK3, STAT5) やMHC class-II発現抑制、リンパ球のアポトーシス誘導、抗原特異的T細胞抑制など抑制的な機能を示すことから、抗腫瘍免疫応答をも妨げていると推察される。

4. 腫瘍関連マクロファージ

腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM) は、腫瘍中に浸潤しているマクロファージのうち、腫瘍細胞やストローマが産生するM-CSF, CCL2, CCL5や、IL-6, IL-10によってリクルートされ維持されるM2タイプマクロファージである。TAMは、成長因子産生や血管増生の促進により、腫瘍の進展を助ける³⁾。現時点では、TAMに特異的な分子マーカーは存在しないが、MM組織中にも多数のCD68

陽性細胞が見出されることから、MMにおいてもTAMが局所的免疫抑制に関与している可能性が推察される。TAMは免疫系に対して、IL-10を介したT2 polarization, ナイーブT細胞アナジー誘導を行うほか、DCの成熟および活性化を抑制する。

5. 抑制的免疫細胞の制御

前述のような抑制的免疫細胞を制御することは、免疫療法のみならずMMの治療全体を考えるうえでもきわめて重要である。以下のような方法が報告されている。

1) リンパ球除去

Tregを減少させる目的で、Tregの前駆細胞となるリンパ球除去が行われる。骨髄非破壊性免疫抑制前処置やdenileukin diftitox (ONTAK[®]) の投与、あるいは全身放射線などの前処置と大量IL-2投与を組み合わせる養子免疫療法 (ACT) が開発されており、米国NCIにおいては、再発MMに対し、シクロホスファミドとフルダラビンによる前処置と高用量IL-2併用ACTを実施し、43例中4例のCRを含む21例 (49%) に奏効した。これに、200cGyの全身放射線照射 (TBI) の前処置を組み合わせることにより、TBI併用により25例中2例のCRを含む13例 (52%)、1,200cGyのTBI併用により25例中7例のCRを含む18例 (72%) に奏効し、しかもCRの13例のうち12例ではCR持続期間が18から75ヵ月、かつCRは現在進行形と、きわめて優れた効果を上げている⁴⁾

2) CTLA-4抗体療法

免疫寛容の誘導にかかわるCTLA-4をブロックするモノクローナル抗体 (ipilimumab) 療法の臨床試験が進められている。このうち、米国NCIでは、IV期のMMに対して、ipilimumabとgp100ペプチドのコンビネーションで12.5%、ipilimumabと高用量IL-2の併用で22%の奏効率が得られた⁵⁾。同じくtremelimumabを用いたCTLA-4抗体療法がテキサス大学MD Anderson癌センターやカリフォルニア大学などで行われて10~25%に奏効し、その効果は2年以上

持続していると報告されている^{6,7)}。

3) 今後の展望

抑制性免疫細胞群の分子機序の解明に合わせて、分子標的治療やRNA干渉による制御が可能になると期待される。化学療法薬や分子標的治療薬のなかには、スニチニブのようにTregやMDSCを抑制してTh1タイプの反応を増強する薬剤^{8,9)}や、ゲムシタピンのようにMDSCの増加を抑制する¹⁰⁾など、抑制的免疫細胞を制御する機能を持つ薬剤が報告されている。

文献

- 1) Wang HY et al : Tumor-specific human CD4 + regulatory T cells and their ligands : implications for immunotherapy. *Immunity* 20 : 107-118, 2004
- 2) Gerlini G et al : Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol* 125 : 184-193, 2007
- 3) Coffelt SB et al : Tumor-associated macrophages : effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1796 : 11-18, 2009
- 4) Rosenberg SA et al : Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 21 : 233-240, 2009
- 5) Ribas A : Anti-CTLA4 Antibody Clinical Trials in Melanoma. *Update Cancer Ther* 2 : 133-139, 2007
- 6) Camacho LH et al : Phase I / II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 27 : 1075-1081, 2009
- 7) Ribas A, et al : Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 15 : 6267-6276, 2009
- 8) Ko JS et al : Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 15 : 2148-2157, 2009
- 9) Finke JH et al : Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14 : 6674-6682, 2008
- 10) Suzuki E et al : Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1 + /CD11b + myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 11 : 6713-6721, 2005

⑤ 進行期悪性黒色腫の治療

4) 分子異常と分子標的治療

a) 悪性黒色腫の分子異常 (図40)

悪性黒色腫では癌遺伝子の NRAS, BRAF, KIT の変異や、癌抑制遺伝子 CDKN2A, PTEN の不活性化が認められ、また、cyclin D1, CDK4 などの細胞増殖に関与する遺伝子の増幅がみられる¹⁾。これらの変異のパターンは悪性黒色腫の病型により異なる。NRAS変異はすべての病型の悪性黒色腫の10~20%に認められる。BRAF遺伝子変異は表在拡大型黒色腫や結節型黒色腫の2/3程度と高頻度に見出され、これらの病型の黒色腫の特徴的な遺伝子異常である。BRAF変異の90%はコドン600のグルタミン酸をヴァリンに変えるV600E変異であり、Raf蛋白を恒常的に活性化してその下流のMEKおよびERKを活性化する。ERKは細胞質内で多くの標的分子をリン酸化するとともに、cyclin D1など細胞増殖を促進する蛋白の転写を活性化する。一方、肢端黒色腫、粘膜黒色腫、悪性黒子型黒色腫ではBRAF変異の頻度はむしろ少なく、KITの変異やcyclin D1, CDK4遺伝子の増幅がしばしば見出される。また、眼のぶどう膜に生じる悪性黒色腫にはグアニン結合蛋白αサブユニットqクラス(GNAQ)の変異が多いことが最近報告されている²⁾。なお、癌抑制遺伝子CDKN2A, PTENの不活性化に関しては、とくに悪性黒色腫の病型による差異は知られていない。このように、悪性黒色腫の分子異常はその病型により異なるので、それを考慮して分子標的治療の戦略を考える必要がある。

b) 悪性黒色腫の分子標的治療

(1) 海外における臨床試験の現況³⁾

現在、世界中でさまざまな分子標的薬が開発され臨床試験が行われているが、悪性黒色腫の治療薬として正式に認可されたものは未だない。腎癌や肝細胞癌にすでに用いられているraf阻害作用を有するソラフェニブは、最初にその効果が期待されて臨床試験が行われたが有効性が乏しく、その後に行われたカルボプラチンやパクリタキセルなどの抗がん薬との併用療法による第3相試験でも期待された効果は得られていない。その他に

Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer

HIROFUMI SHIRAKAWA^{1,3}, TOSHIMITSU KURONUMA¹, YOSHIKO NISHIMURA¹, TAKAHIRO HASEBE², MASAYUKI NAKANO⁴, NAOTO GOTOHDA³, SHINICHIRO TAKAHASHI³, TOSHIO NAKAGOHRI³, MASARU KONISHI³, NOBUAKI KOBAYASHI⁵, TAIRA KINOSHITA³ and TETSUYA NAKATSURA¹

¹Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, ²Pathology Division, Research Center for Innovative Oncology, ³Hepato-Biliary Pancreatic Surgery Division, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, 277-8577 Chiba; ⁴Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University Yachiyo Medical Center, 477-96 Owada-Shinden, Yachiyo, 276-8524 Chiba; ⁵Department of Organ Regulatory Surgery, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, 791-0295 Ehime, Japan

Received September 10, 2008; Accepted October 27, 2008

DOI: 10.3892/ijo_00000190

Abstract. Primary liver cancers are classified into three types based on their morphology and cytogenetic characteristics hepatocellular carcinoma (HCC), intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma (CHC). It is often difficult to distinguish these liver tumors. Glypican-3 (GPC3) is serological and histochemical marker of hepatocellular carcinoma. In order to separate these three types of liver cancers, we analyzed the GPC3 expression in 85 liver resection specimens, including 46 HCCs, 28 ICCs and 11 CHCs. GPC3 immunohistochemical staining was used to distinguish HCC from ICC by comparing with the conventional biomarker, α -fetoprotein (AFP). The immunostaining of GPC3 was identified in 78.3% (36/46) of HCCs, 60% (9/15) of well differentiated, 88.9% (16/18) of moderately differentiated and 84.6% (11/13) of poorly differentiated HCCs. It was negative in the ICCs. We confirmed that GPC3 expression is specific to HCC component (8/11, 72.7%) but few samples also showed weakly in ICC component (2/11, 18.2%) of CHC sections among 11 cases compared with HCC biomarkers including

AFP and hepatocytoma paraffin 1 (HepPar1), and ICC biomarkers cytokeratin (CK) 7 and CK19. Three cases in which the macroscopic features resembled ICC did not express GPC3 even in the pathological HCC component. Most (10/11, 91%) of the pathological cholangiocarcinoma components in CHC showed positive staining for CK7 and CK19. The results of this study suggest that GPC3 is a biomarker that is sensitive and specific to HCC component of CHC, and CK7 and CK19 are markers for pathological cholangiocarcinoma component of CHC.

Introduction

Liver cancer is one of the common malignancies that are rapidly increasing throughout the world. Primary liver cancers are classified into three types based on their morphology and cytogenetic characteristics, hepatocellular carcinoma (HCC), intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma (CHC). HCC is hepatocytoma-origin, and ICC is from the epithelium of the intrahepatic bile duct. CHC is a rare type of liver cancer with features of both hepatocellular and biliary differentiation (1-3). The pathological structure of CHC is composed of hepatocellular element showing bile production, an intercellular bile canaliculi or trabecular growth pattern and cholangiocellular component showing mucin production or gland formation.

Because of their rapid growth rate and the lack of accurate ways of diagnosis in the early stages, the prognosis and the survival rate for liver cancer patients remain poor. Currently, ultrasound sonography (US), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and histopathological examination for tumor biopsy are used for diagnosis. However, distinguishing the three different primary liver tumors is often a challenging task in diagnosis, for which immunohistochemical analysis for specific antigens is a helpful tool: α -fetoprotein (AFP) and hepatocytoma paraffin 1 (HepPar1) for HCC (4-8) and cytokeratin (CK) 7 and CK19 for ICC (9-11).

Correspondence to: Dr Tetsuya Nakatsura, Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8577, Japan
E-mail: tnakatsu@east.ncc.go.jp

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; CHC, combined hepatocellular and cholangiocarcinoma; GPC3, glypican-3; AFP, α -fetoprotein; HepPar1, hepatocytoma paraffin 1; CK, cytokeratin; CC, cholangiocarcinoma; cp, component

Key words: hepatocellular carcinoma, intrahepatic cholangiocarcinoma, combined hepatocellular and cholangiocarcinoma, glypican-3, CK7, CK19, immunohistochemical analysis

Glypican-3 (GPC3) was discovered as a potential serological and histochemical marker whose expression is specific for HCC (12-16). GPC3 belongs to glypican family that is a group of heparan sulfate proteoglycans linked to the outer surface of cell membrane through a glycosylphosphatidylinositol anchor (17). In mammals, six members of GPCs have been reported, GPC1 to GPC6. GPCs are released from the cell surface by a lipase called Notum to regulate the signaling of Wnts, Hedgehogs, fibroblast growth factors (FGFs) and bone morphogenetic proteins (BMPs) (18-25). Depending on the cellular context, their function can be stimulatory or inhibitory activity, or signaling. The expression of GPC3 is detected in placenta and fetal liver, but not in other normal organs. During hepatic carcinogenesis, GPC3 have been reported to reappear in HCC and to be released into serum (12,13,15,26). Its expression is also detected in melanoma (27-29). The functions of GPC3 in cancer cells are still unclear.

In this study, we examined whether immunohistochemical analysis for GPC3 can be used to distinguish HCC from ICC, if so, how effectively GPC3 can be detected, compared to other biomarkers that are conventionally used. We demonstrate that distinguishing HCC from ICC by detecting the expression of GPC3 enables more accurate diagnosis.

Materials and methods

Case selection. We selected 85 cases of liver tumors from the surgical pathology files from 1992 to 2006 of National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Chiba, Japan. The cases included 46 primary HCCs, 28 ICCs, and 11 CHCs that underwent hepatectomy. All identifiers were eliminated to protect patients' identities. Size of the tumor and any clinicopathologic factors (age, sex and grade of tumor) were matched between HCC and ICC. The 46 cases of HCCs occurred in 33 men and 13 women with a mean of age at 65.3 years (range, 44-80 years). HCC was subclassified into well (n=15), moderately (n=18), and poorly (n=13) differentiated types according to the World Health Organization classification criteria. The 28 cases of ICC consisted of 18 men and 10 women. Their mean age was 65.7 years (range, 51-82 years). All 28 resected cases of ICC were confirmed by hematoxylin-eosin (H.E.) staining.

The 11 cases of CHC included 7 men and 4 women with a mean age of 62.5 years (range, 47-76 years). All CHCs were pathologically confirmed after surgery.

Tissue samples. Liver tissue sections were retrieved from the files of the Department of Pathology in our institution. All liver specimens were prepared from surgically resected tumors and adjacent parenchyma. They were fixed in 10% formalin and paraffinized for routine histological examination.

Immunohistochemical staining procedure. Six-micrometer-thick sections were made from the paraffin-embedded blocks. Subsequently the sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through ethanol to water. Endogenous peroxidase activity was blocked using 3% H₂O₂ in methanol

for 20 min. For antigen retrieval, Sections were heated in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) with microwave for 15 min in a water bath at 95°C. Only for CK7 immunostaining, sections were digested by Proteinase K (DakoCytomation, Carpinteria, CA) for 5 min at room temperature. Slides were then allowed to cool down. The prediluted primary antibodies, monoclonal anti-GPC3 (dilution 1:300, 1G12; Biomosaics, Inc., Burlington, VT), anti-AFP (dilution 1:400, DakoCytomation), anti-HepPar1 (dilution 1:100, DakoCytomation), anti-CK7 (dilution 1:100, DakoCytomation), and CK19 (dilution 1:200, DakoCytomation) were added to cover each slide, and the slides were incubated for 2 h at room temperature. Slides were washed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS)/Tween for 5 min each. Mouse Envision Polymer (DakoCytomation) was used as a secondary antibody for 30 min at room temperature followed by washes in PBS/Tween 3 times for 5 min each. Diaminobenzidine chromagen (DakoCytomation) was added to each slide and incubated for 2 min. Slides were washed in distilled water, counterstained with hematoxylin and dehydrated in xylene. To analyze GPC3 expression, the immunohistochemical results were classified according to the number of positive cells as follows: -, negative (<10%); ±, weakly positive (10-30%); + positive (>30%). To validate the data in GPC3 as a marker for HCC, parallel staining for AFP of 46 cases were further analyzed. For 11 CHC cases, AFP, HepPar1, CK7 and CK19 were stained and compared with GPC3 staining pattern.

The slides were examined independently by 3 observers (Shirakawa H, Kuronuma T and Nakatsura T) and then collectively by 2 more pathologists (Hasebe T and Nakano M).

Statistical analysis. Differences in proportion were tested by the χ^2 test. Differences in the means of each subgroup were tested using the Student's t-test. P-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

GPC3 was present in 80% of HCC and negative in ICC. In order to examine the levels and pattern of GPC3 expression, 46 cases of HCC and 28 cases of ICC were immunohistochemically analyzed. GPC3 was detected in 36 cases (78%) of HCC (Fig. 1a), and no expression of GPC3 was found in any of the ICC patients (Fig. 1b). The GPC3 staining was diffused throughout (Fig. 1c) or localized in a granular pattern in the cytoplasm (Fig. 1d). In other cases, GPC3 was observed at the plasma membrane (Fig. 1e). Previously GPC3 is shown to bind to the cell membrane (16), however, those cases with membranous GPC3 had staining in the cytoplasm as well, but there was no case of GPC3 located only at the plasma membrane. When sensitivity of GPC3 was evaluated, 36 cases (78%) were positive for GPC3 when only 16 cases (35%; P<0.0001) were stained for AFP in HCC suggesting that GPC3 is more sensitive than AFP. Thus, GPC3 was confirmed to be specific and sensitive to HCC compared to AFP.

GPC3 expression increased in moderately and poorly differentiated HCC. In terms of GPC3 expression and tumor

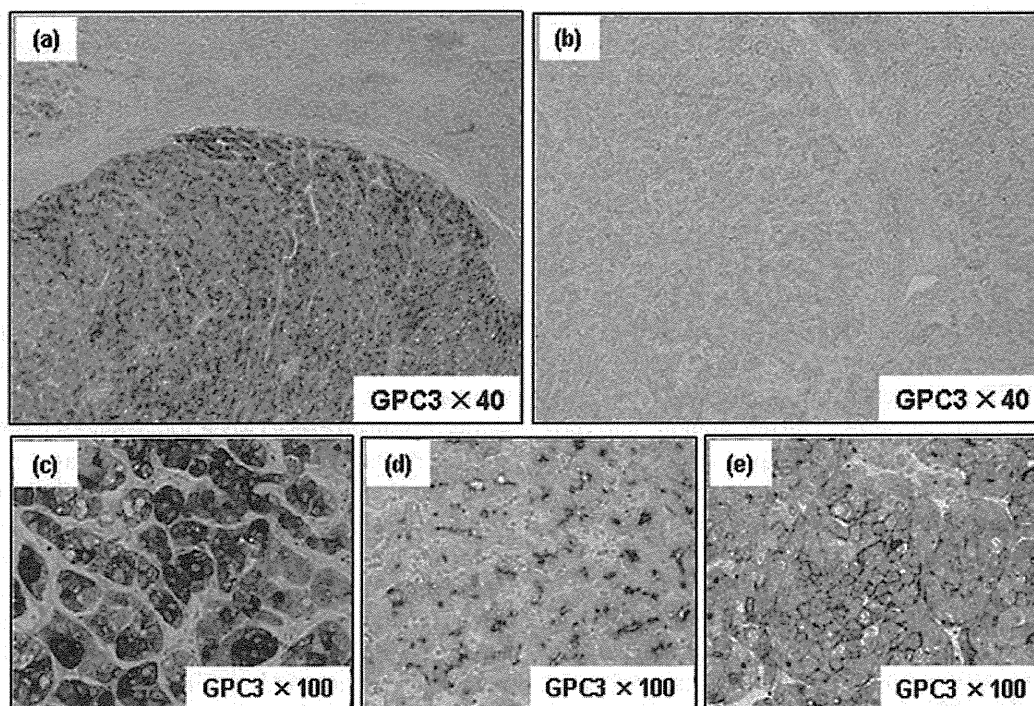


Figure 1. GPC3 expression was specific to HCC and absent in ICC. Immunohistochemical detection of GPC3 expression in HCC (a) and ICC (b) (magnification, x40). Immunostaining patterns of HCC: (c) diffuse in cytoplasm, granular in cytoplasm (d), and membranous (e).

Table I. Correlation of positive for GPC3 staining and tumor grade.

Grade of tumor	No. of case	HCC				positivity	ICC		P-value
		-	±	+	No. of case		GPC3 positivity		
Well-differentiated	15	6	5	4	9 (60%)	8	0 (0%)	<0.0001	
Moderately differentiated	18	2	4	12	16 (89%)	10	0 (0%)		
Poorly differentiated	13	2	5	6	11 (85%)	10	0 (0%)		
Total	46				36 (78%)	28	0 (0%)		

-, negative (<10%); ±, weakly positive (10-30%); +, positive (>30%).

differentiation level, GPC3 was expressed in 9 (60%) of 15 well differentiated, 16 (89%) of 18 moderately differentiated and in 11 (85%) of 13 poorly differentiated HCC (Table I). AFP was expressed in 3 (20%) of 15 well differentiated, 6 (33%) of 18 moderately differentiated and in 7 (54%) of 13 poorly differentiated HCC (data not shown). The expression level of GPC3 was lower in well differentiated HCC than in the other HCC grades, though the difference was not statistically significant (well- vs. moderately differentiated: $P=0.054$, well- vs. poorly differentiated: $P=0.150$). Thus, GPC3 expression is also a good indicator for malignancy levels.

GPC3 expression was observed specifically in pathological HCC component in CHC. There are discrepancies between

preoperative diagnosis and pathological findings for CHC patients. Diagnostic results and the expression of tumor markers of 11 CHC patients are summarized in Table II. Initial diagnosis was carried out by H.E. staining. Among these 11 patients, 7 patients (63.6%) were diagnosed as HCC and 3 (27.3%) were ICC. Only 1 patient (9%) of the 11 CHC was correctly diagnosed as CHC. To seek the possibility to use GPC3 immunostaining to detect HCC component (cp) in CHC, combination of antibodies against GPC3, AFP, HepPar1, CK7 and CK17 were used. In addition to AFP, HepPar1 is frequently used as marker for HCC (4-8) and CK 7 and CK19 for ICC (9-11).

Among 11 CHC cases, 4 cases preoperatively diagnosed as HCC were chosen to represent the collision and transitional type of CHCs based on the macroscopic features

Table II. Correlation of immunostaining varieties and pathological components of CHC.

Pt. no.	Preoperative diagnosis	Macroscopic diagnosis	Pathological hepatocellular carcinoma component					Pathological cholangiocarcinoma component				
			GPC3	AFP	HepPar1	CK7	CK19	GPC3	AFP	HepPar1	CK7	CK19
1	HCC	CHC	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2	HCC	HCC	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	HCC	HCC	+	-	+	-	-	±	-	-	+	+
4	CHC	HCC	+	+	+	-	-	±	-	-	+	+
5	HCC	CHC	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
6	HCC	CHC	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	ICC	CHC	±	-	-	±	+	-	-	-	+	+
8	HCC	HCC	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	Total ±		8/8	3/8	3/8	3/8	2/8	2/8	1/8	2/8	7/8	7/8
	positive rate (%)		100	38	38	38	25	25	13	25	88	88
9	ICC	ICC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10	HCC	ICC	-	-	-	+	±	-	-	-	+	+
11	ICC	ICC	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	Total ±		0/3	0/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3
	positive rate (%)		0	0	0	67	67	0	0	0	100	100

-, negative (<10%); ±, weakly positive (10-30%); +, positive (>30%); HCC, hepatocellular carcinoma; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; CHC, combined hepatocellular and cholangiocarcinoma; GPC3, glypican-3; AFP, α -fetoprotein; HepPar1, hepatocytoma-paraffin 1; CK, cytokeratin; CC, cholangiocarcinoma.

in cut surface. In Fig. 2, macroscopic observation and the immunostained histological sections are shown. These sections include 2 elements with pathological HCC cp forming bile production and trabecular growth pattern by eosinophilic staining and cholangiocarcinoma (CC) cp forming mucin production or gland formation by basophilic staining. Cases 1-8 were GPC3 positive, and cases 9-11 were negative for GPC3 in the HCC cp. Macroscopic, histological and immunohistochemical features of cases 2, 6, 8 and 10 are shown in Fig. 2a, b, c and d. Case 2 had greenish white and yellow nodules within the same tumor mass in the cut surface. HCC subtypes such as simple nodular and confluent multinodular type exist. Case 2 exhibited the features of HCC with multinodular type (Fig. 2a-i). Pathological diagnosis by H.E. staining revealed CHC pathologically (Fig. 2a-ii and -iii), which was so-called 'collision'-type tumor as reported by Goodman *et al* (30). A 'collision'-type tumor is coincidental occurrence of HCC and CC within the same tumor mass (31). GPC3 was positive (Fig. 2a-iv), but AFP and HepPar1 were not detected in HCC cp (Fig. 2a-v and -vi). Although HepPar1 is generally used as HCC marker, it was unexpectedly stained in CC region as well as CK7 and CK19 (Fig. 2a-vii and -viii).

Case 6 showed pale and lobulated phenotype in the cut surface macroscopically (Fig. 2b-i), and pathological diagnosis was also confirmed by H.E. staining (Fig. 2b-ii and -iii). This was so-called 'transitional' type tumor (30). A 'transitional' type tumor has an area of HCC that appears to transform into CC (31). GPC3 was stained in pathological

HCC cp (Fig. 2b-iv) where AFP was negative (Fig. 2b-v). The HCC region was surrounded by pathological CC cp with the staining for CK7 (Fig. 2b-vii). HepPar1 and CK19 were detected in the same region with CC cp (Fig. 2b-vi and -viii). HepPar1 stained the CC cp as in case 2. The immunoreactivity of CK19 was not consistent with that of CK7.

Case 8 was diagnosed as HCC similarly to cases 2 and 6, but mixed tumor masses with white and gray in the cut surface were observed (Fig. 2c-i and c-ii). Both GPC3 and AFP were positive in HCC cp (Fig. 2c-iv and -v). HepPar1 was stained in CC cp (Fig. 2c-vi). CK7 and CK19 were positive in CC cp (Fig. 2c-vii and -viii), especially CK19 was more specific for CC cp than CK7. These three cases (cases 2, 6 and 8) indicated that detecting GPC3 can compensate for AFP and enhance the ability to identify the presence of HCC cp in CHC.

Cases 9, 10 and 11 were negative for GPC3 expression in several tumors. Macroscopically, they had the features of ICC with irregular shaped, white solid tumor masses. As an example, case 10 is shown in Fig. 2d. Although case 10 was diagnosed as HCC preoperatively, it showed macroscopic features of ICC with the presence of abundant fibrous stroma and indistinct tumor margin (Fig. 2d-i). This case was later diagnosed as CHC based on the pathological examination (Fig. 2d-ii and d-iii). GPC3, AFP and HepPar1 were not detected in either HCC cp or CC cp (Fig. 2d-iv, -v, and -vi). CK7 was stained diffusely in the tumor (Fig. 2d-vii), and CK19 expression was more specific in CC cp than CK7 (Fig. 2d-viii). These 3 cases showed positive staining

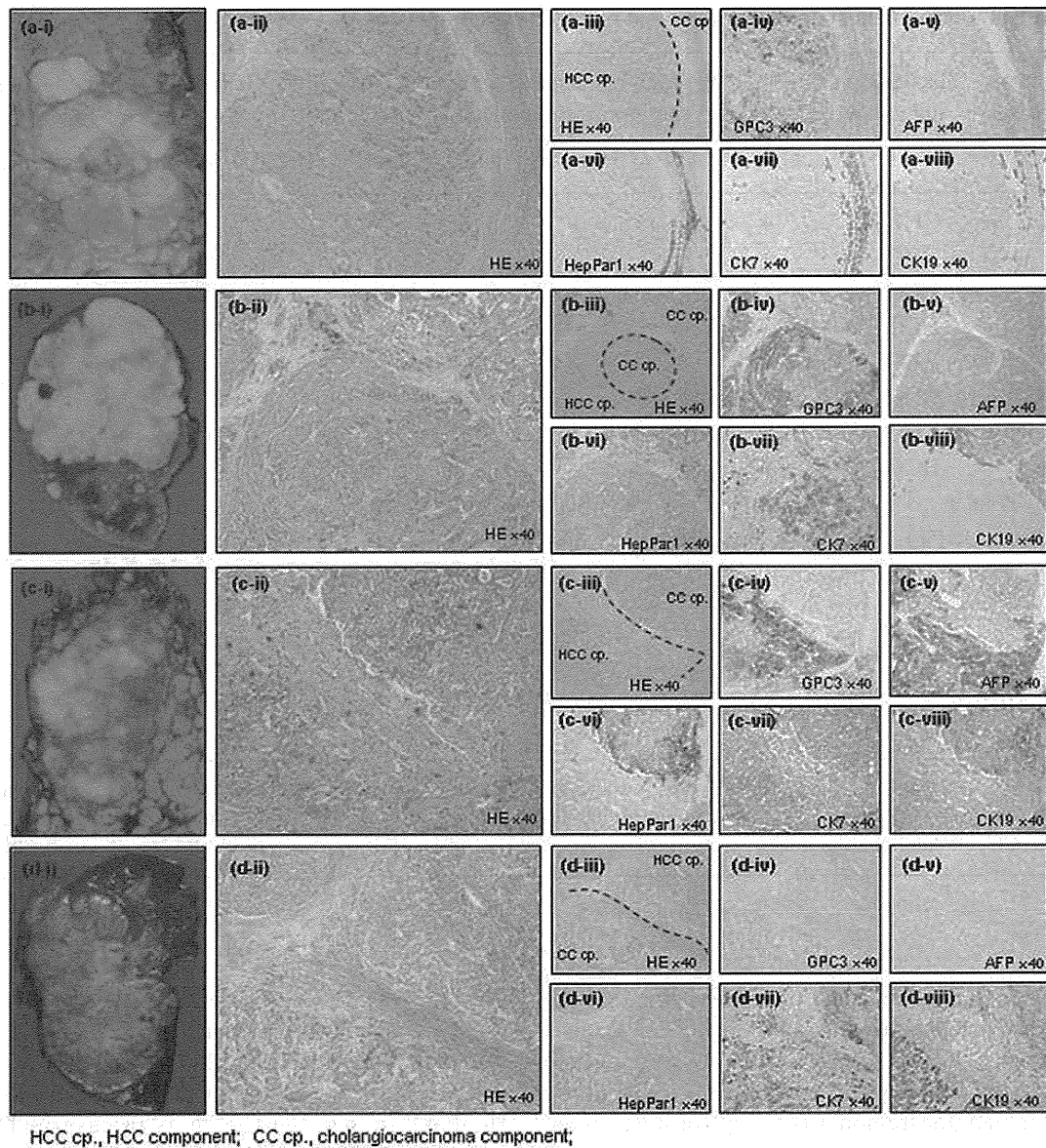


Figure 2. Macroscopic, histological and immunohistochemical features of four cases of CHC, a, case 2; b, case 6; c, case 8; d, case 10 in Table II. (a-i) Macroscopic feature in cut surface of case 2 tumor. (a-ii) The histological structure can be also divided into 2 types. HCC component showed expansive growth oppressing the cholangiocarcinoma component. (a-iii) Collision border between hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma component are indicated as dots. The tumor cells within mainly hepatocellular carcinoma component showed only expression of GPC3 (a-iv) without expression of AFP (a-v). In the opposite side, the glandular area with cholangiocarcinoma component shows HepPar1 (a-vi), CK7 (a-vii) and CK19 expression (a-viii). (b-i) Case 6 shows macroscopic CHC feature in tumor cut surface that was suspected out HCC preoperatively. (b-ii) The histological cholangiocarcinoma component forming trabeculae with columnar appearance was surrounded by HCC component forming hepatoid structure. (b-iii) A dotted line is a boundary of HCC in the H.E. staining. The tumor cells within transitional region were positive for GPC3 (b-iv), CK 7 (b-vii) and CK 19 (b-viii). The difference was recognized between hepatocellular carcinoma component and cholangiocarcinoma component because GPC3 positive area encircled the CK7 area. The expressions of AFP (b-v) and HepPar1 (b-vi) were not observed. (c-i) Though case 8 was also suspected to be HCC preoperatively, the macroscopic features showed atypical HCC with mixed white and gray and indistinct tumor border. (c-ii) The cholangiocarcinoma component was obviously composed of structural gland formation. (c-iii) Collision area was distinguished histopathologically by a dotted line. The tumor cells of HCC component showed not only GPC3 (c-iv) but also AFP expression (c-v). In the glandular area of cholangiocarcinoma component, HepPar1 was expressed (c-vi), but CK7 not at all (c-vii) and CK19 shows weak positive expression (c-viii). (d-i) Case 10 shows macroscopic ICC features in tumor cut surface that was suspected as HCC preoperatively. (d-ii) The histological structure can be divided into 2 types with cholangiocarcinoma component forming trabeculae with columnar appearance and HCC component forming hepatocellular structures. (d-iii) A dotted line is a boundary of HCC in the H.E. GPC3 (d-iv), AFP (d-v) and HepPar1 (d-vi) were not stained, but CK7 (d-vii) and CK19 (d-viii) stained the cholangiocarcinoma component.

for CK7 and CK19 in CC cp, but not AFP or HepPar1 in HCC cp. Therefore, accuracy of CHC diagnosis can be achieved by combination of multiple tumor markers in addition to morphological characteristics: GPC3 that is specific for pathological HCC cp of CHC, and CK7 and CK19 that are specific for pathological CC cp of CHC.

Discussion

The diagnosis for HCC, ICC and CHC has been routinely performed by histopathological examination. Additionally, diagnosis of HCC is done by supplementary immunohistochemical analysis for AFP and HepPar1. Until now, though

the sensitivity is limited, AFP has been regarded as the most useful marker for HCC (4,32-34). HepPar1 is also widely used for HCC to distinguish between primary HCC and ICC. However, both markers are limited for the ability to discriminate different levels of malignancy in HCC because its sensitivity drops substantially in poorly differentiated HCC, and it does not discriminate between benign and malignant liver cancers (35). As these biomarkers frequently results in misdiagnosis, in this study, we showed that GPC3 is more sensitive to detect HCC compared to AFP. Due to the fact that GPC3 was downregulated in ICC (36), GPC3 may help to separate HCC from ICC.

CHC is the least common primary cancer of the liver but followed by an aggressive growth, it tends to metastasize to many organs leading to significantly poorer prognosis than HCC and ICC (31,37,38). Correct diagnosis leads to both appropriate treatment and better outcome for the patients. Nishie, *et al* reported that one third (nine of 27 cases) of patients with CHC were correctly diagnosed by enhanced computed tomography (39). In our study, only one of the 11 (9.1%) patients with CHC was correctly diagnosed before operation without fine needle aspiration biopsy. The difficulty to pathologically distinguish CHC from HCC and ICC comes from glandular or pseudoglandular structures in HCC and solid or trabecular patterns in CC (37,38). We believe that combination with histopathological examination with GPC3 immunostaining and radiological examination can bring an accurate diagnosis and improved clinical therapies for the patients leading to a better prognosis.

We showed that the immunostaining for GPC3 is specific for HCC patients and not detected in ICC patients. This confirmed that detecting GPC3 may improve the method to diagnose CHC. Of the 11 cases of CHC, 8 displayed GPC3 expression in restricted area of HCC cp. We demonstrated that immunohistochemical staining of GPC3 in liver tumor helps to recognize the pathological HCC cp more precisely. GPC3 expression was observed with high frequency in the HCC cp compared with AFP and HepPar1. HepPar1 was unexpectedly stained in CC cp, but this has been observed previously as well (7,40). This could be due to a transition from HCC to ICC where HepPar1 is one of the molecules that is downregulated at later stages in the process. CK7 and CK19 have been already reported as good markers of biliary epithelial differentiation (41). These were highly expressed in pathological CC cp (10/11, 91%) in CHC. The positive immunoreactivity of CK19 was more distinct than that of CK7 whose staining was weaker. Our immunohistochemical data disclosed that GPC3 can be a better marker specific for HCC leading to a better confirmation for HCC component of CHC as well as for HCC. Moreover, it provided evidence of the biologic behavior of such combined tumors, which are phenotypically and genetically leaning toward either ICC with predominant biliary differentiation or HCC with hepatocellular differentiation (42,43).

Employing multiple tumor markers may also allow the accurate diagnosis of CHC containing both hepatocellular and biliary differentiation. Concerning sensitivity and specificity, the combination of GPC3 for HCC cp and CK19 for ICC cp seems to be useful in the diagnosis of liver cancer.

For CHC, GPC3 positive/CK19 negative profile suggests HCC, GPC3 positive/CK19 positive indicates CHC, and GPC3 negative/CK19 positive essentially rules out HCC and suggests the possibility of CC or CHC.

We developed a new anti-cancer immunotherapy with GPC3 as a target (44-47), and the phase I clinical trial of GPC3-derived peptide vaccination for advanced HCC is now on going. Because this new immunotherapy is not indicated for ICC, immunohistochemical staining of GPC3 is a useful method to select eligible patients. Furthermore, if CHC would be justified as a target of our immunotherapy in future, immunohistochemical analysis for GPC3 expression is indispensable for the process of patient selection.

GPC3 is expressed in the group of cells that are AFP-positive and/or CK7/19-positive in injured livers with activation of oval cell compartment; an indication for liver repair and regeneration (48). In addition, CK7, CK19 and AFP are frequently expressed in biliary epithelial cells (49,50) and in immature fetal hepatoblasts (51,52). Liver progenitor cells originate from the canal of Hering, lined by both hepatocytes and biliary ductular epithelial cells (53). It is not clear whether GPC3 is expressed in hepatic embryonic progenitor cells or cancer stem cells, but GPC3 may be a marker for hepatic progenitor/stem cells. In CHC cases of 2, 3 and 4, GPC3, CK7 and CK19 coincided in the regions of HCC and CC. Although HCC and ICC are two different kinds of primary liver malignancies arising from different cell types as hepatocytes and cholangiocytes, co-localization of GPC3 and CK7/19 suggest that the CHC is originated from progenitor or oval cell. In addition, case 6 showed an HCC lesion with GPC3 positive immunostaining surrounded by CC (Fig. 2b). This finding suggests that GPC3-positive HCC tumor cells are derived from GPC3-negative CC mass. Moreover, we predict from the fact that GPC3 is expressed in embryonic liver and downregulated after birth in normal liver but reappears in cancer is due to its regulatory role in proliferative and dedifferentiated cells, like cancer cells that acquired a progenitor- or cancer stem cell-like characteristics.

In summary, we confirmed that GPC3 is a marker sensitive and specific for HCC, but not ICC. Moreover, we revealed that GPC3 was expressed specifically in the HCC cp in the CHC. Therefore, GPC3 is a molecule that is significant not only in clinical but also biological field. It is clinically an important biomarker that can be used for accurate diagnosis leading to a better treatment and prognosis. Also, biologically, it may be an indicator for the identity and the origin of the cancer cells.

Acknowledgments

This study was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants for Research on Hepatitis from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan, and a grant-in-aid for the Third-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Foundation for Promotion of Cancer Research in Japan, Japan Research Foundation for Clinical Pharmacology and Research Resident Fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research, Japan (H.S.). We thank Dr Chinatsu Kojima (Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division,

Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East) for technical assistance.

References

- Aoki K, Takayasu K, Kawano T, *et al*: Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features and computed tomographic findings. *Hepatology* 18: 1090-1095, 1993.
- Ng IO, Shek TW and Nicholls J and Ma LT: Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a clinicopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 13: 34-40, 1998.
- Liu CL, Fan ST, Lo CM, *et al*: Hepatic resection for combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Arch Surg* 138: 86-90, 2003.
- Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T and Kloppel G: The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology* 14: 503-513, 1989.
- Wennerberg AE, Nalesnik MA and Coleman WB: Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 143: 1050-1054, 1993.
- Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J and Nalesnik MA: Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. *Mod Pathol* 10: 686-692, 1997.
- Leong AS, Sormunen RT, Tsui WM and Liew CT: Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumours and metastatic carcinoma. *Histopathology* 33: 318-324, 1998.
- Lau SK, Prakash S, Geller SA and Alsabeh R: Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Human Pathol* 33: 1175-1181, 2002.
- Maeda T, Kajiyama K, Adachi E, Takenaka K, Sugimachi K and Tsuneyoshi M: The expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in primary and metastatic carcinomas of the liver. *Mod Pathol* 9: 901-909, 1996.
- Sasaki A, Kawano K, Aramaki M, Nakashima K, Yoshida T and Kitano S: Immunohistochemical expression of cytokeratins in intrahepatic cholangiocarcinoma and metastatic adenocarcinoma of the liver. *J Surg Oncol* 70: 103-108, 1999.
- Shimonishi T, Miyazaki K and Nakanuma Y: Cytokeratin profile relates to histological subtypes and intrahepatic location of intrahepatic cholangiocarcinoma and primary sites of metastatic adenocarcinoma of liver. *Histopathology* 37: 55-63, 2000.
- Capurro M, Wanless IR, Sherman M, *et al*: Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 125: 89-97, 2003.
- Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, *et al*: Glypican-3, over-expressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 16-25, 2003.
- Sung YK, Hwang SY, Park MK, *et al*: Glypican-3 is over-expressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 94: 259-262, 2003.
- Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, *et al*: Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 64: 2418-2423, 2004.
- Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, *et al*: The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 18: 1591-1598, 2005.
- Filmus J: The contribution of *in vivo* manipulation of gene expression to the understanding of the function of glypicans. *Glycoconj J* 19: 319-323, 2002.
- De Cat B, Muylersmans SY, Coomans C, *et al*: Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling and gastrulation movements. *J Cell Biol* 163: 625-635, 2003.
- Capurro MI, Shi W, Sandal S and Filmus J: Processing by convertases is not required for glypican-3-induced stimulation of hepatocellular carcinoma growth. *J Biol Chem* 280: 41201-41206, 2005.
- Capurro MI, Xiang YY, Lobe C and Filmus J: Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 65: 6245-6254, 2005.
- Song HH, Shi W, Xiang YY and Filmus J: The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling. *J Biol Chem* 280: 2116-2125, 2005.
- Varma RR, Hector SM, Clark K, Greco WR, Hawthorn L and Pendyala L: Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep* 14: 925-932, 2005.
- Filmus J, Capurro M and Rast J: Glypicans. *Genome Biol* 9: 224, 2008.
- Stigliano I, Puricelli L, Filmus J, Sogayar MC, Bal de Kier Joffe E and Peters MG: Glypican-3 regulates migration, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. *Breast Cancer Res Treat (In press)*.
- Torisy Y, Watanabe A, Nonaka A, *et al*: Human homolog of NOTUM, overexpressed in hepatocellular carcinoma, is regulated transcriptionally by beta-catenin/TCF. *Cancer Sci* 99: 1139-1146, 2008.
- Jia HL, Ye QH, Qin LX, *et al*: Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 1133-1139, 2007.
- Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, *et al*: Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 10: 6612-6621, 2004.
- 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* 11: 8079-8088, 2005.
- Nakatsura T and Nishimura Y: Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19: 71-77, 2005.
- Goodman ZD, Ishak KG, Langloss JM, Sesterhenn IA and Rabin L: Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a histologic and immunohistochemical study. *Cancer* 55: 124-135, 1985.
- Kassahun WT and Hauss J: Management of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Int J Clin Pract (In press)*.
- Taketa K: Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology. *Hepatology* 12: 1420-1432, 1990.
- Tangkijvanich P, Tosukhowong P, Bunyongyod P, *et al*: Alpha-L-fucosidase as a serum marker of hepatocellular carcinoma in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30: 110-114, 1999.
- Filmus J and Capurro M: Glypican-3 and alphafetoprotein as diagnostic tests for hepatocellular carcinoma. *Mol Diagn* 8: 207-212, 2004.
- Wee A: Fine needle aspiration biopsy of the liver: algorithmic approach and current issues in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cytojournal* 2: 7, 2005.
- Man XB, Tang L, Zhang BH, *et al*: Upregulation of Glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma but downregulation in cholangiocarcinoma indicates its differential diagnosis value in primary liver cancers. *Liver Int* 25: 962-966, 2005.
- Tickoo SK, Zee SY, Obiekwe S, *et al*: Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a histopathologic, immunohistochemical, and *in situ* hybridization study. *Am J Surg Pathol* 26: 989-997, 2002.
- Yano Y, Yamamoto J, Kosuge T, *et al*: Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: a clinicopathologic study of 26 resected cases. *Jpn J Clin Oncol* 33: 283-287, 2003.
- Nishie A, Yoshimitsu K, Asayama Y, *et al*: Detection of combined hepatocellular and cholangiocarcinomas on enhanced CT: comparison with histologic findings. *AJR* 184: 1157-1162, 2005.
- Chu PG, Ishizawa S, Wu E and Weiss LM: Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol* 26: 978-988, 2002.
- Zhang F, Chen XP, Zhang W, *et al*: Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence. *Histopathology* 52: 224-232, 2008.
- Taguchi J, Nakashima O, Tanaka M, Hisaka T, Takazawa T and Kojiro M: A clinicopathological study on combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 758-764, 1996.
- Wu PC, Fang JW, Lau VK, Lai CL, Lo CK and Lau JY: Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications. *Am J Pathol* 149: 1167-1175, 1996.

44. Nakatsura T, Komori H, Kubo T, *et al*: Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* 10: 8630-8640, 2004.
45. Komori H, Nakatsura T, Senju S, *et al*: Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 2689-2697, 2006.
46. 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* 66: 2414-2422, 2006.
47. Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, *et al*: HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: preclinical study using mice. *Int J Oncol* 32: 985-990, 2008.
48. Grozdanov PN, Yovchev MI and Dabeva MD: The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells. *Lab Invest* 86: 1272-1284, 2006.
49. Durnez A, Verslype C, Nevens F, *et al*: The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma: a possible progenitor cell origin. *Histopathology* 49: 138-151, 2006.
50. Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, *et al*: Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 47: 1544-1556, 2008.
51. Fausto N and Campbell JS: The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120: 117-130, 2003.
52. Libbrecht L: Hepatic progenitor cells in human liver tumor development. *World J Gastroenterol* 12: 6261-6265, 2006.
53. Alison MR, Vig P, Russo F, *et al*: Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 37: 1-21, 2004.