

ムの研究を行った。進行した肝硬変に出現するL-Cys / L-Glu不均衡は単球に酸化ストレスを与えTNF-alphaの産生を増加させた。実際の肝硬変患者においてもL-Cys / L-Glu比は単球のTNF-alpha、xCTと関係していることが明らかとなった。L-Cys / L-Glu不均衡により、肝硬変・肝がん患者では単球系細胞が正常な機能を果たせない可能性が示唆された。

ソラフェニブは進行肝がんに対する標準治療薬として汎用されているが、これまでの比較試験では、対象はChild-Pugh Aの肝機能良好な患者に限られており、肝機能不良例での安全性や有効性は確立していない。古瀬（分担者）は、肝機能低下例を含めた進行肝がん患者を対象として、安全性と有効性を検証する前向きの第II相試験を開始し、平成23年12月現在、52例（Child-Pugh A 40例、B12例）が登録された。

TS-1は5-FUの抗腫瘍活性を増強し、かつ副作用の軽減をはかった薬剤であり、大腸がん・肺がん・乳がんをはじめ様々ながん腫に対する適応を取得している。現在、肝がんに対して第III相試験が実施中である。

横須賀（分担者）は進行肝がん患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験を行った（UMIN-CTR 000002590）。併用試験の有害事象として、ソラフェニブ単剤と比較して、手足皮膚症候群、血小板減少、AST/ALT上昇の頻度が高い可能性が示唆された。S-1+Sorafenib併用療法の推奨用量はS-1 64 mg/m² /day(80%)、Sorafenib 400 mg

bid(100%)であった。抗腫瘍効果(RECIST)は15/19名がSDであった。第II相試験が可能と考えられた。

工藤（分担者）は上皮間葉移行（Epithelial-Mesenchymal transition 以下、EMT）関連分子に注目し、肝がんの予後との関連を検討した。肝がん切除症例（n=72）の臨床背景、EMT関連因子（CDH1, CDH2, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, TWIST, Vimentin, Fibronectin, DDR2, S100A4, TJP-1, FOXC2, SIX1, GSC）のmRNA発現レベルと肝がん術後のrecurrence-free survival（RFS）とoverall survival（OS）との関係を解析した。多変量解析において、RFSにおける独立規定因子はAFP（p=0.0002）とTWIST（p=0.004）の2因子であった。OSにおける独立規定因子はTNM stage（p=0.041）、組織型（p=0.013）、PIVKA-II（p=0.023）、TWIST（p=0.007）、TJP-1（p=0.029）の5因子であった。以上よりEMT関連因子が肝がんの予後と関連していることが示された。

佐田（分担者）は5-FUのプロドラッグであるS-1を用いたメトロノミック化学療法とEGFレセプターとVEGFレセプター-2のリン酸化を阻害する分子標的治療薬であるバンデタニブとの併用療法の抗腫瘍効果をマウス肝癌モデルを用いて検討した。メトロノミック化学療法は、副作用を生じない程度の少量の抗がん剤を中断することなく投与する治療法である。メトロノミックS-1療法は対照と比較して有意に腫瘍の増大を抑制し、さらに担癌マウスの生存期間を延長した。それらの抗腫瘍

効果はバンデタニブ併用でさらに増強した。副作用に関しては、最大投与量のS-1で通常の治療を施行した群では体重現象、骨髄抑制が認められたがメトロノミックS-1療法では、顕著な副作用は認められなかった。メトロノミック化学療法と分子標的治療薬の併用療法が進行肝がん治療の新たな治療法の一つとなることが期待された。

小尾（協力研究者）は進行肝がん症例にソラフェニブで治療した症例を詳細に検討した。またIFN+5FU動注649症例の成績を解析した。ソラフェニブを投与した全70例のMSTは6.8ヶ月、TTPは3.5ヶ月であった。治療開始後3ヶ月の画像評価を行えた56例中CR0例、PR3例、SD25例、PD28例であった。一方、IFN+5FU動注化学療法のMSTは9.4ヶ月であった。ソラフェニブとIFN+5FU動注化学療法のRCT(UMIN000002401)が進行中である。

今井（協力研究者）は肝がんに対してミリプラチンを用いたTACEを施行した症例のうち、治療1ヶ月後のCTまたはMRIにてTE4と判定された肝がん65例を対象に、3ヶ月毎にCTまたはMRIにて局所再発の有無を評価した。その結果、累積局所再発率は6ヶ月で27.1%、12ヶ月で57.5%であった。さらにミリプラチンを用いたTACEを5回以上施行した12例を対象に、1回目と5回目のTACE後の有害事象の発現を比較検討したところ、5回目のTACE後でも有害事象が初回投与時よりも増えることは無かった。ミリプラチンを用いたTACEでは、著効が得られた後の局所再発が少なからず認められたが、治療の反復についての

安全性は問題ないと考えられた。

宮山（協力研究者）は肝がんの栄養血管について解析し、umbilical fissure (UF) 近傍に存在する肝がんでは、S3に存在するものの28.6%がA4から供血され、S4のものでは42.9%がA3から供血されており、高頻度にcrossover blood supplyが認められることを報告した。また、新規抗癌剤であるミリプラチンを用いたTACEでは溶解状態に関わらず局所再発率が高く、血管障害が少なく安全性は高いものの、抗癌剤としての有用性については更なる検討が必要であると報告した。

D. 考察

ソラフェニブは肝がんに対する初の分子標的薬であり、これまでもSHARP試験やAsian-Pacific試験でも有効性が報告され、我が国においても2009年以来、2012年3月までに少なくとも1471例以上に使用された（ネクサバル副作用検討報告 バイエル薬品：市販後調査であり、施設間の診療レベルの違いによって副作用の発現頻度に違いが見られる可能性を含んでいる）。治療効果につき、未だ十分な解析は行われていないが、ソラフェニブが著効した症例や予後の改善が認められた症例も散見されている。一方で、本剤投与開始から、比較的早期に肝不全又は肝性脳症が発現した報告例があり、厚生労働省から注意喚起が行われている。本研究班では、独自の副作用調査票を作成し、肝がん治療における我が国を代表する分担研究者及び協力研究者の診療施設の協力を基に、昨年度「肝がんに対する新規抗癌剤使用に関する指針

2010 年度版」を発行した。本年度、解析症例数を増加し、ソラフェニブ投与症例 388 例の有効性と安全性に関する調査をまとめた。ソラフェニブの適応症例、至適投与方法、中止基準、副作用の内容・頻度、副作用対策、効果判定、治療予測因子などにつき、現時点で最も推奨される事柄についてガイドライン化した（「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2011 年度版」-添付資料参照-）。

ソラフェニブの減量投与に関しては、今回の班調査では、1 日 800mg で開始した群（800mg 開始群）と減量開始した群（減量開始群）の投薬経過を比較すると、減量した症例の割合（67% vs. 51%）、治療成功期間（1.9 ヶ月 vs. 2.2 ヶ月）、副作用中止の頻度（28% vs. 16%）はいずれも有意差を認めなかった。副作用に関しては、皮膚落屑、脱毛、食思不振が 800mg 開始群で多く認められた。治療効果については、800mg 開始群と減量開始群間に全生存期間、無増悪生存期間に有意差は認めなかった。従って、ソラフェニブの減量投与に関しては、副作用対策や合併症などのため減量開始することもあり得るが、現時点では 400mg のエビデンスが得られていないことから 1 日 800mg の標準投与が望まれる。

副作用としては Asian-Pacific 試験で見られたように、Hand - Foot - Syndrome（HFS）が高頻度であり、加えて消化器症状・高血圧が本研究班では多い傾向に見られる。注意すべきは肝予備能であり、ソラフェニブ治療開始時、治療開始 1 ヶ月後、治療終了時、治療終了 1 ヶ月後の Child-Pugh 分類の推移からソラフェニブ療法開

始 1 ヶ月後においても、肝予備能への影響を及ぼす可能性が示唆される。今回の班調査では腫瘍進展のない症例でも肝予備能の低下がみられている。

治療効果に関して、今回の班調査では、全体の奏効率（CR+PR）は 7%と既報に比してやや高く、腫瘍制御率（CR+PR+SD）は 49%であった。腫瘍制御が得られた症例と進行した症例の全生存期間中央値はそれぞれ 17.4 ヶ月、6.3 ヶ月であり、腫瘍制御が得られた症例の生存期間の延長が見られた。したがって、腫瘍制御が得られた症例では、副作用を考慮しながらも、出来るだけソラフェニブの投与を継続すべきと考えられる。

腫瘍制御と関連する因子として、今回の班調査では Performance Status が 0、最大腫瘍径が 30mm 未満、治療前 Alb 値が 3.5 g/dL 以上、AFP 値が 100 ng/mL 未満、PI VKA-II が 400mAU/mL 未満が挙げられた。更なる分子マーカー、遺伝子マーカーの同定が望まれる。

ミリプラチンは第 2 世代の白金製剤であり、リピオドールと懸濁して肝動脈塞栓療法に使用される新規抗がん剤である。本研究班ではソラフェニブに加え、ミリプラチンの有効性・安全性を解析した。本研究班では、分担研究者及び協力研究者の診療施設の協力を基に 1219 例の登録を得た。

今回の班調査では、1185 例中 991 例（83.6%）に塞栓物質が併用されており、TE3+TE4 で判定した抗腫瘍効果は、塞栓物質ありが（52%）と塞栓物質なし（33%）に比較し高かった。副作用に関しては塞栓物質併用例では、塞栓後症候群と

推測される発熱の頻度が高く、食欲不振が多かった。また臨床検査値では AST 上昇、ALT 上昇とアルブミン低下の頻度が高いものの、その他の副作用出現頻度に有意差は認めなかった。従ってミリプラチンと塞栓物質との併用については現在、その治療効果と副作用について全国臨床治験中であるが、塞栓物質を用いた方が治療効果が高く、副作用も現行の TACE に比べ特に重篤なものが無いことが推測される。反復投与に関しては、血管障害を来すことがなく安全に反復投与が可能であると考えられた。またリピオドール中での濃度変更、水溶性造影剤との混和、緩徐注入、注入油滴小型化などの投与方法の工夫に関しても今後の課題と考えられる。

治療効果と関連する因子として臨床病期でステージ I または II が挙げられた。また、長期予後に関しては今後の経過解析によるが、今回の班研究でミリプラチンを投与した症例で生存期間が解析可能であった 1193 例の検討ではミリプラチン投与後の 6 ヶ月生存率は 91.1%，1 年生存率は 78.8%であった。しかし、最近、エピルビシンとマイトマイシン C を用いた TACE とミリプラチンを用いた TAI と TACE を比較した検討では、ミリプラチンを用いた TACE でより局所再発が多かったという報告がされ、その原因としてミリプラチンの血管障害性が少ないために塞栓した肝動脈が数日で再開通するため十分な阻血壊死効果を発揮できないためではないかと考察されている。長期治療効果に関しては今後の解析が望まれる。（「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2011 年度版」-

添付資料参照-）。

本研究班の個別研究は、新規抗がん剤の薬効とがん分子生物学に根ざした新しい治療法に関する研究、がん免疫療法、新規抗がん剤を用いた臨床試験に大別される。

本多（代表者）は、非環式レチノイド及び BCAA の線維化抑制作用及び発がん抑制作用について NASH モデルマウスを用いて検証した。非環式レチノイドの肝発がん抑制機序として、線維化抑制作用及び脂肪肝抑制作用の寄与が示唆された。森脇（分担者）により非環式レチノイドと他の核内受容体を制御する薬剤や栄養・代謝異常を制御する薬剤との併用療法も検討され、今後適応拡大も含め、効果が期待される薬剤と言える。西口（分担者）は IFN の抗腫瘍効果としての血管新生抑制効果をマウスモデルにて検証し、遺伝子発現解析用いた解析を加えた。近年、がんの間質と腫瘍細胞増殖との関連について多くの報告があり、IFN が間質系、すなわち血管や線維化に働いていることを示した興味深い検討である。寺井（分担）は老化関連分子である SMP30/RGN がゼブラフィッシュ肝腫瘍モデルで発現が低下していることを報告した。老化関連分子の肝がんのマーカーとしての可能性が示唆される。山本（分担者）はソラフェニブ治療効果と肝がん症例血清の糖鎖及びサイトカインの検討を行い、有用なマーカーの存在を示した。今後の多数例での検証が望まれる。がん幹細胞に関する研究として金子（分担者）は二つのがん幹細胞マーカー EpCAM 及び CD90 陽性肝がんを比較し、腫瘍進展、転移、分子標的薬に対する感受性の違いを報告し、がん幹細胞マーカー

一による新たな治療選択の可能性を示した。

工藤（分担者）は EMT 関連分子と肝がんの予後について解析し、EMT 関連分子と転移、予後との関連を臨床サンプルを用いて明らかにした。汐田（分担者）は肝がん幹細胞で高発現する hTERT の発現制御に関わる遺伝子を同定するため、リボザイムライブラリーの作成を行い、細胞内で hTERT の活性を亢進させるリボザイムの候補を同定した。今後の遺伝子クローニングに期待が持たれる。池田（分担者）はミリプラチンの有効性・安全性の大規模データをまとめ、ガイドラインの作成に大きく貢献した。

がん免疫療法分野に関しては、廣石（分担者）は、肝がん治療後のがん抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の存在と予後との関連性を報告し、免疫療法の有用性を示唆した。竹原（分担者）は Bcl-xL の機能ドメインに特異的に結合する小分子 ABT-737 の肝がん細胞に対する抗腫瘍効果を前臨床モデルで検討した。恩地（分担者）は肝がんに対する WT1 ペプチドワクチンの安全性と有効性を評価し、中本（分担者）は亜鉛と樹状細胞の調整法について報告した。樹状細胞調製の改善により治療効果の改善が期待された。上野（分担者）はアミノ酸組成に注目し、CD14+単球のシグナル伝達、及び腫瘍細胞のシグナル伝達を制御する物質として、アミノ酸を含めた肝栄養関連物質が重要な役割を演じていることを示した。

新規抗がん剤を用いた臨床試験に関して古瀬（分担者）は肝機能低下群に対してのソラフェニブの有効性、安全性に関わる臨床試験を開始した。横須賀（分担者）は TS-1 とソラフェニブの併用療法の臨床試

験を推進した。佐田（分担者）メトロノミック化学療法と分子標的薬の併用の可能性についてマウス肝癌モデルを用いて検討した。

小尾（協力研究者）は進行肝がんにおけるソラフェニブの治療成績を詳細に検討し、IFN+5FU 動注化学療法の RCT(UMIN000002401)にて比較検討を行っている。

今井（協力研究者）は肝がんに対するミリプラチンを用いた TACE の有効性と安全性を検討し、反復投与の効果と安全性を示した。宮山（協力研究者）は肝がんに対するミリプラチンを用いた TACE の有効性と安全性を検討し、ミリプラチンを用いた TACE はエピルビシンとマイトマイシンを用いた TACE と比較し、局所再発率が有意に高いことを報告した。ミリプラチンの安全性は多くの施設で確認されたが、長期治療効果に関しては今後、多数施設での検証が必要とされる。

E. 結論

- 1) ソラフェニブ及びミリプラチンを中心とした新規抗がん剤の治療効果ならびに安全性調査を行った。「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2011 年度版」にまとめた。
- 2) 非環式レチノイドの肝線維化抑制作用、抗脂肪肝効果が示された。また非環式レチノイドと他の薬剤の併用療法の可能性が示唆された。
- 3) ソラフェニブ+IFN 併用による血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現

の基礎的検討がなされた。

- 4) 老化関連分子である SMP30/RGN の肝がんのマーカーとしての可能性が示唆された。
- 5) 肝がん幹細胞マーカーの違いにより、腫瘍進展、転移、分子標的薬効果が異なり、がん幹細胞マーカーによる新たな治療選択の可能性が示された
- 6) 肝がん局所療法後の腫瘍抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の存在は治療予後と関連することが示された。
- 7) Bcl-xL の機能ドメインに特異的に結合する小分子 ABT-737 の肝がん細胞に対する抗腫瘍効果を前臨床モデルで検討した。
- 8) ペプチドワクチンや樹状細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験が開始され、免疫学的効果及び安全性の評価がなされた。
- 9) 各種新規抗がん剤を用いた安全性、治療効果比較のための臨床試験が開始された。

3. その他

特になし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

新規抗がん剤の研究、およびがん幹細胞に対する治療法の開発

金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：我が国における肝細胞がんの多くはB型もしくはC型肝炎ウイルス感染を背景に発症し、早期発見を行いかつ根治的な治療が施されても経過で再発を繰り返し死に至る悪性度の高いがんである。近年正常組織と同様のがん組織においても幹細胞性を有する一部のがん細胞（がん幹細胞）が同定され、高い腫瘍増生能、抗がん剤抵抗性などがんの維持に必須な細胞集団であることが明らかにされつつある。これまで我々は肝幹細胞マーカーであるEpCAM陽性肝がん細胞が、がん幹細胞の特徴を有し抗がん剤抵抗性である事、正常胎児肝において肝芽細胞を肝細胞へと分化誘導するサイトカインとして知られるOncostatin M(OSM)が肝がん幹細胞の分化誘導療法に応用可能であり、EpCAM陽性肝がん幹細胞の5-FUに対する薬剤耐性が改善することを同定してきた。本年度において我々は、EpCAM以外のがん幹細胞としてCD90陽性細胞がEpCAM陽性細胞とは独立して存在すること、血管内皮様の遺伝子発現パターンを有すること、肝細胞がんの遠隔転移に寄与すること、EpCAM陽性細胞とCD90陽性細胞では核形が異なること、CD90陽性細胞はc-Kit陽性であり阻害剤であるimatinib mesylateに感受性を示すことを同定した。C-Kit阻害作用を有する薬剤は肝細胞がんの遠隔転移を阻害する可能性が示唆され、肝細胞がん治療における有力な分子標的であると考えられた。

A. 研究目的

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

スを用いた検討で強い腫瘍増生能力と自己複製能力、非対称性分裂能力を有していることが報告されている。興味深いことに、がん幹細胞は従来用いられている細胞障害性の抗がん剤や放射線に関して高い抵抗性を有し、がん治療後の再発への関与が示唆されている。

これまでにCD133、EpCAM、CD90、CD13など複数のがん幹細胞マーカーが肝がん幹細胞の同定に有用であることが報告されているが、それぞれのマーカーが個々の肝細胞がん組織においてどのように存

在しているか、それぞれの細胞に特徴的な遺伝子発現パターンや分子標的薬に対する感受性の違いなどは未だ明らかになっていない。本研究において我々はがん幹細胞マーカーであるEpCAMとCD90の発現様式について培養細胞、肝細胞がん外科切除標本を用いて解析を行い、遺伝子発現の特徴や薬剤感受性について検討を行った。

B. 研究方法

サンプル 臨床サンプルとして、金沢大学附属病院で1999年から2007年にかけて肝切除が行われた102例の肝細胞がんとその背景肝組織および生検が行われた18例の前がん病変、剖検で得られた11例の進行肝細胞がんを解析に用いた。培養細胞はHuH7、HuH1、Hep3B、HLE、HLF、SK-Hep-1細胞を用い、DMEM-10%FBS培地で培養した。また、12例の肝細胞がんの新鮮外科切除標本からEpCAM陽性もしくはCD90陽性細胞分画を分離し、免疫不全マウスへの移植実験に用いた。

免疫組織化学 ホルマリン固定標本を用いてCD90とEpCAMの発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット(DAKO)、抗CD90抗体(Stem Cell Technology)、抗EpCAM抗体VU1D9(Merck Chemicals)で免疫染色を施行した。また、Vector-red, Vector blue(Vector Laboratory Inc.)を用いて2重染色を行った。

フローサイトメーター 培養細胞および初代肝細胞がん細胞から単一細胞浮遊液を

作成後、抗EpCAM抗体(Ber-EP4、DAKO)、抗CD90抗体(Stem Cell Technology)、抗CD105抗体(Abcam)、抗VEGFR1抗体(EPITOMICS)および抗c-Kit抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc.)、FACSCaliburで解析を行った。

リアルタイムPCRおよびマイクロアレイ解析 各サンプルからのTotal RNAはTrizol(Invitrogen)を用いて回収し、PCR解析はABI 7900 Sequence Detection Systemを、マイクロアレイ解析はGeneChip(Affymetrix)を用いて行った。

(倫理面の配慮)

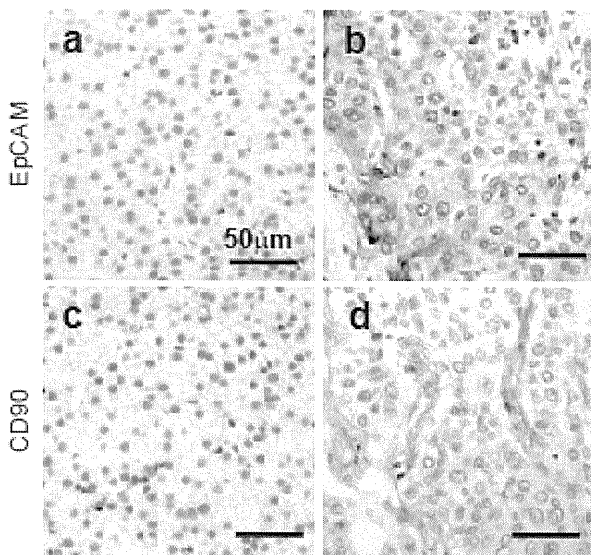
サンプルを提供する患者には、研究内容の説明及び研究協力への依頼につき説明文書を用いて説明し(①遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、②研究の目的・方法、③研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、④同意撤回及びサンプルの廃棄、⑤プライバシーの保護及び機密保持、⑥経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

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

C. 研究結果

肝細胞がんの前がん病変と考えられる dysplastic nodule 18 例について EpCAM と CD90 の発現を免疫組織化学で解析したところ、EpCAM、CD90 とともに前がん病変における発現は認められなかった (図 1)。一方肝細胞がん 102 例の解析では EpCAM 陽性細胞 (>5%)、CD90 陽性細胞 (>5%) が各 37 例、36 例に認められた (図 1)。興味深いことに EpCAM は上皮細胞の形態を有するがん細胞で発現が認められたが、CD90 は血管内皮もしくは線維芽細胞といった間葉系細胞の形態を有する細胞で発現が認められた。

図 1 免疫組織化学



EpCAM 染色 (a, b) CD90 染色 (c, d)
Dysplastic nodule (a, c) Hepatocellular carcinoma (b, d)

さらに剖検標本 11 例を加えて解析を行ったところ、TNM ステージが上がるにつれて EpCAM 陽性、CD90 陽性細胞の頻度は上昇した。また、EpCAM と CD90 が共発現している細胞は認められず (図 2)、ソート

した細胞を用いた遺伝子発現解析からは EpCAM 陽性細胞では AFP や KRT19 の遺伝子発現亢進が認められる一方、CD90 陽性細胞では間葉系マーカーである c-Kit の発現亢進が認められ、薬物代謝マーカーである CYP3A4 の発現は全く認められなかった (図 3)。

図 2 免疫組織化学 (2 重染色) および FACS 解析

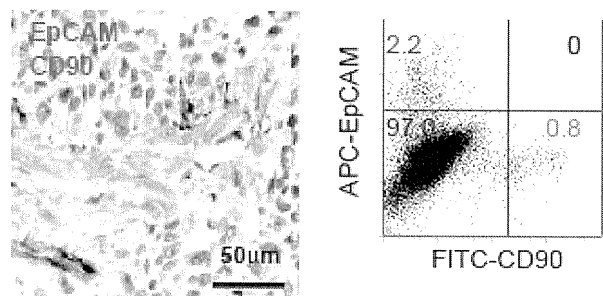
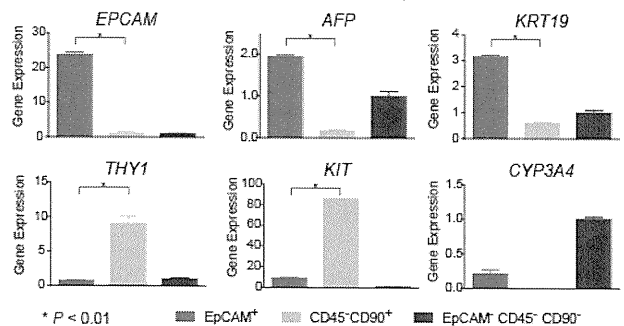


図 3 リアルタイム RT-PCR 解析



興味深いことに CD90 陽性細胞の存在は術後 2 年以内の肺転移や骨転移などの遠隔転移と統計学的に有意な相関を認めた (表 1)。

表 1

CSC marker (Positive: $\geq 5\%$)	Metastasis (Yes / No)	P-value
EpCAM ⁻	8 / 57	1.0
EpCAM ⁺	4 / 33	
CD90 ⁻	4 / 62	0.023
CD90 ⁺	8 / 28	
EpCAM ⁻ CD90 ⁻	2 / 45	0.014
EpCAM ⁺	2 / 17	
CD90 ⁺	6 / 12	
EpCAM ⁺ CD90 ⁺	2 / 16	

次に培養細胞におけるEpCAMとCD90の発現につき検討を行ったところ、EpCAM陽性細胞はHuH7, Hep3B, HuH1のみで、CD90陽性細胞はHLE, HLF, SK-Hep-1細胞でのみ認められた。EpCAM陽性細胞とCD90陽性細胞では遺伝子発現パターンは大きく異なり(図4)、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能力はEpCAM陽性細胞に強く認められた(図5)。

図4 マイクロアレイ解析

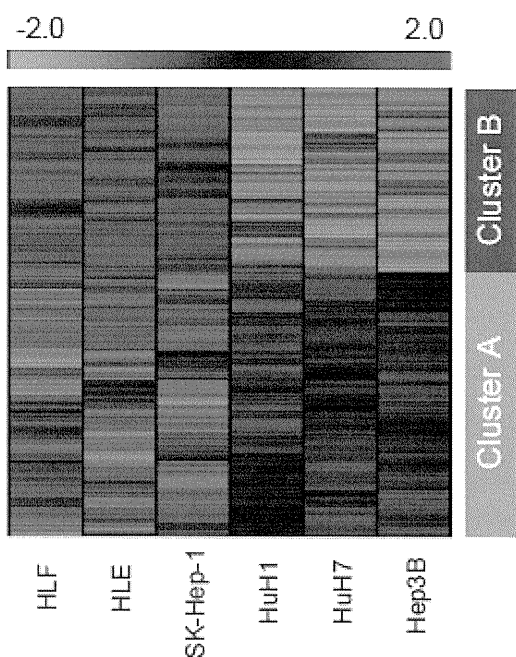
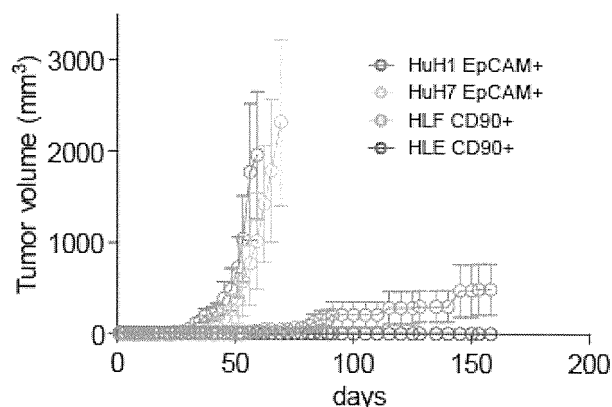
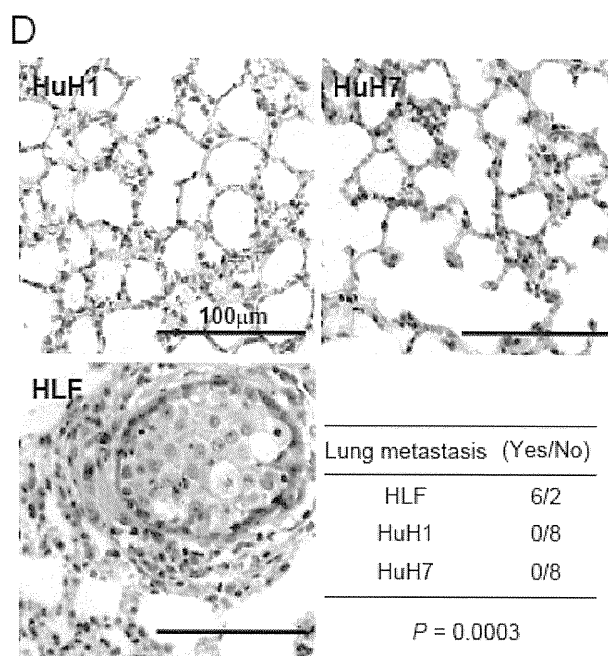


図5 免疫不全マウス移植モデル



興味深いことに、CD90陽性細胞は局所における腫瘍形成能力には劣るものの、転移能力が高く、統計学的に有意に肺転移が認められた(図6)

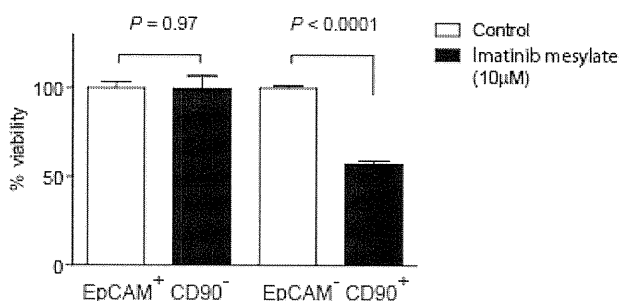
図6 H&E染色



CD90陽性細胞ではc-Kitの高い発現が認められたために、c-Kitシグナルを阻害するimatinib mesylateに対する薬剤感受性を評価したところ、EpCAM陽性細胞では全く感受性が認められず、CD90陽性細胞で

のみ約50%程度の細胞増殖抑制効果が認められた(図7)。

図7 細胞増殖試験



D. 考察

正常幹細胞が正常臓器の維持に重要な役割を果たしているのと同様に、がん幹細胞はがん組織の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。実際にEpCAM陽性肝細胞がんにおいてEpCAM陽性細胞は陰性細胞へと分化し、かつ陰性細胞の維持に必須であること、Oncostatin Mを5-FUと併用することでEpCAM陽性がん幹細胞の抗がん剤感受性を改善できることをこれまでに我々は報告してきた。一方EpCAM以外にも複数のマーカーががん幹細胞の同定重要であるという報告がなされているが、これらのマーカーが肝細胞がんでどのように発現しているのかはこれまでに不明であった。本研究から、肝細胞がんにおいてはEpCAM陽性細胞とCD90陽性細胞はそれぞれ独立して存在し、かつ遺伝子発現パターンや局所における腫瘍増殖能や転移能、分子標的薬に対する薬剤感受性が異なることが示された。すなわち従来のがん幹細胞仮説にある、特定の幹細胞マーカー陽性細胞を標的胃にするだけではがんの根治を目指すことの限界が示された。特にCD90陽性がん幹

細胞は肝細胞がんの遠隔転移に深く関わっている可能性があり、EpCAM陽性細胞を5-FU+Oncostatin M(Yamashita T., et al., Cancer Research 2010)で、CD90陽性細胞をimatinib mesylate(in submission)で抑制することにより、肝細胞がんの門脈浸潤および遠隔転移がコントロールされる可能性が示唆された。

E. 結論

肝細胞がんにおいては少なくとも2つの独立したがん幹細胞(EpCAM+, CD90+)が存在し、それぞれに異なる腫瘍形成能力、転移能力、遺伝子発現パターン、抗がん剤や分子標的薬に対する感受性を示した。これらの異なるがん幹細胞の制御により、肝細胞がんの抗がん剤や分子標的薬に対する応答性を変え、局所腫瘍進展や遠隔転移がコントロールされうる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Differentiation of Cancer Stem Cells. In Stanley Shostak (eds): "Cancer Stem Cells - The Cutting Edge" InTech pp337-350, 2011.
- 2) Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol Hepatol. 26(6):960-4, 2011.
- 3) Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, and Kaneko S. Identification of a

secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 129(7):1576-85, 2011.

- 4) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. Clin Exp Immunol. 163(2):165-77, 2011.

2. 学会発表

- 1) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Nio K, Hara Y, Wang XW, and Kaneko S. Distinct liver cancer stem cells defined by EpCAM and CD90 in human hepatocellular carcinoma. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2011, San Francisco, U.S.A., 2011.
- 2) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Cancer Stem Cells in Hepatocarcinogenesis. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference 2011, Jeju, Korea, 2011.
- 3) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞形質の多様性、日本臨床腫瘍学会総会、横浜、2011
- 4) 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の特徴に応じたテーラーメイド医療の検討、日本肝臓学会総会、東京、2011

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

樹状細胞を用いた肝がんの治療研究

中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 肝細胞がん（肝がん）の局所療法と併用して二次発がん（再発）を抑制する治療法として、肝動脈塞栓療法（TAE）と同時に樹状細胞を投与する安全性臨床研究を行った。OK-432刺激した樹状細胞を投与することによって、治療後12カ月以内の再発率は有意に低下したものの、長期予後に関しては満足のいく成績が得られなかった。そこで、抗腫瘍免疫のさらなる増強をめざした樹状細胞の調整法として、OK-432と同時に亜鉛（Zn）を用いる手法を検討した。両者を用いた刺激培養によって、所属リンパ節への移動能（CCR7）は低下したものの、樹状細胞の活性化（CD83、CD86）、貪食能、細胞障害活性が亢進することを見出した。これより、肝がん患者に対する新たな樹状細胞の調整法が示唆されるとともに、二次発がんに対して抗腫瘍免疫を賦活化する治療法に発展する可能性が示された。

A. 研究目的

肝細胞がん（肝がん）の局所制御と併用して二次発がんを抑制する治療法として、我々は樹状細胞（DC）を用いた抗腫瘍免疫療法の開発を進めてきた。これまでに肝動脈塞栓療法（TAE）と同時に免疫賦活物質OK-432で刺激した樹状細胞を投与する手法が二次発がんの制御能を発揮することを報告した。樹状細胞は末梢血単球から誘導して治療に用いるために、誘導調整法の違いが抗腫瘍免疫の賦活に深く関わってくる。そこで、新たな樹状細胞の調整法として、亜鉛（Zn）を用いる手法について検討した。

B. 研究方法

肝がん合併C型肝硬変患者 28 名から末

梢血単球を採取し、GMPグレードのGM-CSF、IL-4に加えてOK-432（0.1 KE/ml）を添加する群（OK-432群）、OK-432に加えて亜鉛（Polaprezinc 0.1mM）を添加する群（OK+Zn群）およびOK-432や亜鉛を添加しない群（IDC群）を比較した。細胞表面マーカー（CD83、CD86、CCR7）貪食能（FITC dextran uptake）、細胞障害活性（⁵¹Cr-release assay）について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従うとともに、実施機関の「医学部倫理審査委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサン

プル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

1) 細胞表面マーカーについて、DCの活性化を示すCD83、T細胞への補助刺激分子であるCD86の発現に関しては、IDC群と比べてOK-432群やOK+Zn群で亢進を認めたが、DCの遊走能を示すCCR7の発現は、OK+Zn群で低下傾向を示した。

2) DCの貪食能 (FITC dextran uptake) の評価について、OK-432群ではDCの活性化に伴い低下傾向を示したが、OK+Zn群では回復 (増加) を認めた。

3) DCの細胞障害活性 (^{51}Cr -release assay) について、IDC群と比べてOK-432群で亢進を認め、OK+Zn群ではさらに増強することが観察された。

D. 考察

肝がんに対するTAEと同時にOK-432刺激樹状細胞を投与する免疫治療によって、治療後12カ月以内の二次発がんを制御することを報告したが、さらに長期の治療効果をめざした免疫賦活能の高い細胞調整法について検討した。

これまで免疫賦活物質OK-432は主にToll-like receptor (TLR) シグナルを介して樹状細胞を刺激するものと考えられてきた。さらに、樹状細胞のTLRシグナル活性に対して生体内の微量元素である亜鉛が強く影響することが報告された (Nature Immunol. 7:971, 2006)。

そこで、本研究では亜鉛をOK-432と同時に用いる手法によって樹状細胞の活性化の変化について検討した。その結果、細胞

表面マーカー (CD83, CD86)、貪食能、細胞障害活性が亢進することを見出した。さらに、亜鉛をOK-432と同時に用いる手法を臨床応用することによって、抗腫瘍免疫を高める新たな治療となることが期待された。

E. 結論

OK-432と亜鉛を同時に用いる新たな樹状細胞の調整法が示唆されるとともに、肝がんの二次発がんに対して抗腫瘍免疫を賦活化する治療法に発展する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.

2) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 53: 1206-1216.

3) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E,

Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 128-140.

4) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011. 307: 165-173.

5) Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2011; 81: 281-290.

2. 学会発表

1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: Differential Dynamics of the NF-kappaB subunits RELA and RELB in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 1300A; 一般; poster: Nov. 8, 2011

2) Nakagawa H, Mizukoshi E, Arihara F, Kitahara M, Iida N, Takeshita Y, Kawaguchi K, Kitamura K, Nakamoto Y, Kaneko S: Antitumor effect of OK432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. **第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 1299A; 一般; poster: Nov. 8, 2011

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝細胞癌で高発現するWilms' tumor 1 gene (WT1)の役割および治療標的としての可能性について

恩地 森一 愛媛大学大学院先端病態制御内科学 教授

研究要旨：肝細胞癌でWT1 geneは高発現しており、肝細胞癌の発癌、腫瘍増大、再発に関わる。その機序を解析することを目的として研究した。その結果、WT1は肝細胞癌において抗アポトーシスに作用し、その作用にデスシグナルが関与していることが明らかとなった。また、WT1ペプチドを用いて肝癌患者を対象として免疫治療の臨床試験を行い、肝癌患者に対して安全性を確認した。また肝癌患者に治療3ヶ月で18例中4例に腫瘍進展がみられなかった。WT1は肝癌治療の治療標的となり得る遺伝子であり、今後さらに治療効果を上げるための工夫が必要と考えられる。

A. 研究目的

Wilms' tumor 1 gene (WT1)は、Wilms腫瘍の癌抑制遺伝子として同定されたが、さまざまな腫瘍で発癌遺伝子として報告され治療標的とされている。報告者らは、肝細胞癌でWT1が高発現し、肝細胞癌の発癌、腫瘍の増殖に関与することを報告した (Eur J Cancer, 44:600-8, 2008)。その機序について解明するため、複数のヒト肝細胞癌由来細胞株、ヒト肝癌組織を用いてWT1の肝癌における生理活性を検討した。また、WT1エピトープ蛋白を作成し肝癌患者を対象に第I/II相の医師主導臨床試験を行い、WT1が肝細胞癌の治療標的となり得るかを明らかにすることを研究の目的とした。

B. 研究方法

肝細胞癌細胞株に WT1 発現プラスミドお

よび siRNA を用いて WT1 発現の変化と肝細胞内癌関連蛋白との関連について解析した。PCR アレイで同定した遺伝子の mRNA、蛋白発現を real-time RT-PCR、Western Blot で同定した。アポトーシスアッセイ、臨床サンプルを用いた検討も行った。また、共同研究者である高知大学免疫学教室 宇高恵子教授が新規に開発した HLA-A*24:02, *02:01, *02:06 と高結合する WT1 ペプチドを GMP グレードで合成し、愛媛大学病院臨床倫理委員会の承認後、TACE を繰り返し施行している局所療法適応外の肝癌患者 18 例に投与して安全性、治療効果を評価した。

(倫理面への配慮)

対象患者からの検体採取、保存、データ解析、および WT1 ペプチドを用いた臨床試験については、愛媛大学医学部附属病院臨床倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

肝細胞癌株を用いた PCR アレイで、複数のアポトーシス関連遺伝子を同定した。アポトーシスアッセイにより WT1 は抗アポトーシス作用を有し、その作用にデスシグナルの関与が考えられた。これらの遺伝子群はヒト肝癌組織および非癌肝組織においても WT1 発現量により変化していた。WT1 ペプチドを用いた臨床試験では、注射部位の発赤 1 例(grade 1)、血圧上昇 1 例(grade 2)がみられたが、grade 3 以上の有害事象はみられなかった。治療後 3 ヶ月で 4 例に腫瘍進展がみられなかった (SD)。

D. 考察

肝癌で高発現する WT1 は抗アポトーシス作用をもつ。WT1 は、抗アポトーシス作用により、肝発癌、腫瘍進展に関わり、他の腫瘍と同様に肝細胞癌においても治療標的となり得る遺伝子であると考えられる。WT1 は肝線維化とともに発現が高くなることから、今回 TACE を繰り返し施行している肝癌患者を対象に WT1 ペプチドを用いた免疫治療の臨床試験を施行した。その結果、同治療は肝癌患者に対して安全に施行できることが確認できた。今後更に治療効果を上げるための投与方法、適応症例選択の工夫が必要であると考えられる。

E. 結論

WT1 は肝癌で抗アポトーシス作用を持ち、肝発癌、腫瘍進展に関わる。WT1 ペプチドを用いた免疫治療の臨床試験により、同治

療の安全性を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koizumi Y, Hirooka M, Kisaka Y, Konishi I, Abe M, Murakami H, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C by real-time tissue elastography: Establishment of the method for measurement. *Radiology* 258: 610-617, 2011.
- 2) Hirooka M, Koizumi Y, Hiasa Y, Abe M, Ikeda Y, Matsuura B, Onji M. Hepatic elasticity in patients with ascites: evaluation with real-time tissue elastography. *AJR Am J Roentgenol* 196: W766-771, 2011.
- 3) Shigematsu S, Fukuda S, Nakayama H, Inoue H, Hiasa Y, Onji M, Higashiyama S. ZNF689 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the down regulation of Bcl-2 family members. *Exp Cell Res* 317: 1851-1859, 2011.
- 4) Hirooka M, Ochi H, Koizumi Y, Kisaka Y, Abe M, Ikeda Y, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Splenic elasticity identified by real-time tissue elastography is a novel marker of portal hypertension. *Radiology* 261: 960-968, 2011.

2. 学会発表

- 1) 廣岡昌史、平岡淳、日浅陽一、越智裕紀、小泉洋平、木阪吉保、阿部雅則、熊木天児、松浦文三、道堯浩二郎、恩地森一。当科における非B非C型肝炎の臨床的特徴。第47回日本肝臓学会総会。東京。2011年

- 2) 重松秀一郎、日浅陽一、阿部雅則、恩地森一。肝細胞癌におけるZNF689のBclファミリーを介したアポトーシス抑制機序。第47回日本肝臓学会総会。東京。2011年
- 3) Shigematsu S, Hiasa Y, Fukuda S, Nakayama H, Onji M, Higashiyama S. ZNF689 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the down-regulation of Bcl-2 family members. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011.
- 4) 上杉和寛、廣岡昌史、日浅陽一。肝細胞癌で高発現し抗アポトーシス作用するWilms' tumor 1: 肝癌に対する治療標的の可能性。第15回日本肝臓学会大会。福岡。2011年

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発

汐田 剛史 鳥取大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：肝細胞癌（HCC）は、治療抵抗性の難治性固形癌である。さらに、HCCは再発率が極めて高いため、より効果の高い新規医薬品の開発が必要とされる。加えて、近年では腫瘍形成能や化学療法、放射線療法に対する抵抗性が極めて高い肝癌幹細胞が発癌、転移、再発に関わっており、癌治療において、この癌幹細胞の除去が必須であると推測される。そこで、我々はepithelial cell adhesion molecule (EpCAM)陽性肝癌幹細胞で発現が亢進しているhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)を肝癌幹細胞に対する治療標的として、shRNAレンチウイルスライブラリーによるhTERT発現制御遺伝子のスクリーニングを行った。

A. 研究目的

近年、他の癌腫同様に肝細胞癌においても、腫瘍形成能や治療抵抗性の極めて高い肝癌幹細胞の存在が報告されている。癌幹細胞は、その性質から発癌や術後再発、転移への関与が示唆されており、肝癌患者の予後改善のためには、癌幹細胞の除去は必要不可欠であると推測される。その為、本研究では、癌幹細胞に対する新規治療法開発のために、EpCAM陽性肝癌幹細胞で発現が亢進しているhTERT遺伝子の制御遺伝子の同定を目的とする。

B. 研究方法

スクリーニングには、H22年度までに本事業によって構築したhTERTプロモーターによる発現制御を受けるGFP発現プラスミドDNAを安定導入したHepG2細胞(HepG2/hTERTpro-EGFP)を用いた。また、

ゲノムワイドなファンクショナルスクリーニングを行うために、約5,000種のmRNAを標的とするshRNAレンチウイルスライブラリーを使用した。レンチウイルス感染後、フローサイトメトリー(FCM)によってウイルス感染陽性(RFP陽性)/GFP陰性細胞を回収し、96ウェルプレートに1細胞ずつ播種した。

(倫理面への配慮)

細胞を用いた実験系であるため、配慮の必要なし。

C. 研究結果

shRNAライブラリーを用いた遺伝子発現抑制によるファンクショナルスクリーニングを行うために、本研究ではH22年に構築した2種類のhTERTプロモーター制御性GFP発現HCC細胞株のうち、GFP蛍光強度のより強いHepG2/hTERTpro-EGFPを用いた。