

スクリーニング後に抗生物質 G418 によるセクション後、FCM によるシングルセルソーティングを行った。FCM 解析の結果、RFP 陽性/GFP 陰性細胞は約 0.05%存在しており、これらの細胞では hTERT 発現を促進的に制御している遺伝子がノックダウンされていることが推測された。これらの細胞を 96 ウェルプレートに播種し、観察したところ、他の細胞と比較して極めて細胞増殖が緩やかであることが明らかとなった。現在、これらの細胞をコンディションメディアウム下で培養中であり、今後、細胞からゲノム DNA を回収し、shRNA 配列を解析後、hTERT 発現促進遺伝子の同定を行う予定である。

D. 考察

今回のスクリーニングによって、GFP 蛍光が減弱しているクローンが複数樹立された。これは、hTERT 発現を促進している遺伝子が shRNA ライブラリーによって抑制された結果であると推測される。その為、これらのクローンを解析することで hTERT 発現制御遺伝子を同定できることが期待される。現在培養中の GFP 蛍光陰性細胞は他の細胞と比較して増殖速度が極めて遅いことが明らかとなった。これは、ヒト癌細胞における細胞増殖に対する hTERT の寄与が極めて高いことが原因であると推測される。より効率よくスクリーニングを実行するためには、細胞内の hTERT 発現制御システムから独立することで、shRNA ライブラリーによる影響を受けない hTERT 発現コンストラクトを導入する必要がある。これにより、細胞内の hTERT 発現は変えずに GFP 蛍光のみ

が変働する実験系が構築できる。この系を構築することでより効率的な制御遺伝子の探索が可能になると考えられる。

E. 結論

hTERT 制御遺伝子同定を行うために、shRNA レンチウイルスライブラリーを用いたファンクショナルスクリーニングシステムを構築し、hTERT 高発現肝癌細胞株 HepG2/hTERTpro-EGFP におけるスクリーニングを行った。これにより、複数の GFP 陰性細胞コロニーを得た。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験

横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科 教授

研究要旨：本邦でも、肝細胞癌に対するソラフェニブ単剤療法の成績が蓄積されてきたが、有効性は限定的であり、さらなる治療効果の改善が望まれている。昨年度に引き続き、本研究ではソラフェニブとTS-1の併用療法の至適投与量決定・安全性評価のための第I相試験を行った。

A. 研究目的

本邦でも切除不能肝細胞癌に対してソラフェニブが認可されたが、単剤での有効性は限定的であり、治療効果の改善が望まれている。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、大腸癌・肺癌・乳癌をはじめ様々な癌腫に対する適応を取得している。現在、肝細胞癌に対して第III相試験が実施中である。肝細胞癌に対しても、TS-1とソラフェニブと併用することで抗腫瘍効果が増強する可能性がある。我々は、TS-1とソラフェニブ併用療法の至適投与量決定・安全性評価のための第I相試験を実施した。

B. 研究方法

進行肝細胞癌患者に対するTS-1+ソラフェニブ併用療法の用量制限毒性の発現率を調べ、その最大耐用量および推奨用量を決定する。有効性はRECIST、安全性はCTCAE ver. 3.0を用いる（介入試験、非盲検、非対照、単一治療群、安全性・有効性、第I相試験、Dose escalation

study）。

（倫理面への配慮）

併用による安全性は確立しておらず、有害事象の発生には十分注意して試験を進める。当院のIRB承認された同意説明文書を用いて被験者に説明し文書同意を取得した。

C. 研究結果

19名が登録された。平均年齢62歳。男18名、女1名。HBsAg+8名、HCVAb+9名、HBsAg-かつHCVAb- 2名。BCLC stage C 12名、B 7名であった。Cohort 1で1/6 DLT出現（トランスアミラーゼ上昇）。Cohort 2および3でDLT認めず。Cohort 4の3/4でDLT出現（手足皮膚症候群2名、感染症1名）。Cohort 3に3名が追加され1名DLTを認めた（消化管出血）。最終的にCohort 3はDLT発現は1/6であった。抗腫瘍効果（RECIST）は15名がSDであった。

D. 考察

第I相試験を年度内に終了することができた。併用試験の有害事象は、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。有効性が期待できることから、決定された用量をもとに第 II 相試験を準備している。

E. 結論

進行肝細胞癌患者における 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chiba T, Suzuki E, Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Tanaka S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Iwama A, Yokosuka O. 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2011 Jun 29. doi: 10.1002/ijc.26264. [Epub ahead of print]
- 2) Ogasawara S, Kanai F, Obi S, Sato S, Yamaguchi T, Azemoto R, Mizumoto H, Koushima Y, Morimoto N, Hirata N, Toriyabe T, Shinozaki Y, Ooka Y, Mikata R, Chiba T, Okabe S, Imazeki F, Yoshikawa M, Yokosuka O. Safety and tolerance of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*. 2011 Sep;5(3):850-6.
- 3) Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the

Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res*. 2011 Jan;41(1):1-21.

- 4) Kanda T, Imazeki F, Yonemitsu Y, Mikami S, Takada N, Nishino T, Takashi M, Tsubota A, Kato K, Sugiura N, Tawada A, Wu S, Tanaka T, Nakamoto S, Mikata R, Tada M, Chiba T, Kurihara T, Arai M, Fujiwara K, Kanai F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis C virus in patients treated with peginterferon-alfa 2a plus ribavirin treatment by COBAS TaqMan HCV test. *J Viral Hepat*. 2011 Jul;18(7):e292-7.

2. 学会発表

- 1) Ogasawara S, Oooka Y, Chiba T, Kanai F, Yokosuka O. Phase I trial of S-1 combined with sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. 第9回日本臨床腫瘍学会, 2011, 横浜 (第9回日本臨床腫瘍学会抄録集 p351)
- 2) 大岡美彦, 金井文彦, 小笠原定久, 千葉哲博, 横須賀収. 進行肝細胞癌患者を対象としたS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験. 第47回日本肝癌研究会, 2011, 静岡 (第47回日本肝癌研究会抄録集 p304)
- 3) 大岡美彦, 金井文彦, 小笠原定久, 篠崎勇介, 千葉哲博, 横須賀収. 進行肝細胞癌患者を対象としたTS-1+ソラフェニブ併用療法の第I相試験. 第3回日本肝がん分子標的治療研究会, 2011. 下関 (第3回日本肝がん分子標的治療研究会抄録集 p60)

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

SMP30/RGNの肝発癌に関する関与についての基礎的検討

寺井 崇二 山口大学大学院消化器病態内科学 准教授

研究要旨：SMP30/RGNは老化や肝細胞増殖に関わることが知られていることから、肝発癌解析や大量スクリーニングが可能であるゼブラフィッシュのSMP30/RGNについて解析を行った。SMP30/RGN mRNAの発現は老化に伴って低下した。部分肝切除後および急性障害でSMP30/RGNの発現が低下した。さらにDEN処理によって得たFoci、HCC, Cholangio cellular carcinoma, Mixed tumorすべてに背景肝と比べ発現の低下が認められた。本研究で我々はSMP30/RGNが肝腫瘍および急性肝障害の有用なマーカーになることを示した。

A. 研究目的

Senescence marker protein 30 (SMP30)/ regucalcin (RGN) は、老化と共に発現が低下するEF hand motifを持たないCalcium-related proteinであり老化のみならず肝細胞増殖、ビタミンC合成などに関わることが知られている。ゼブラフィッシュは脊椎動物のもっともシンプルなモデルであり、マウスと比べて個体が小さく飼育コストがかからないことから、薬剤の大量スクリーニングに使うことができる。発がん剤を入れた水で飼育することでヒト癌と似た様々な腫瘍を作ることができ、得られた腫瘍がヒトと大変似ていることから、cancer model systemとして大きく期待されている。そこで本研究ではゼブラフィッシュのSMP30/RGNについて解析を行った。

B. 研究方法

ゼブラフィッシュ成魚 liver cell line

(ATCC CRL-2643) をGhoshらの方法で培養した。生後1年のゼブラフィッシュを200ppmのDENに2ヶ月間浸漬した。投与後水道水で4カ月生育させ癌を誘導した。抗体は抗SMP30/RGN抗体 (Shima)を使用した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

生後2ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、36ヶ月のゼブラフィッシュでのmRNAの発現は老化に伴って低下した。部分肝切除後1,2日目で約50%のmRNAの発現低下が見られた。Liver toxicantであるTAA投与後2日目の急性障害

肝でSMP30/RGNの発現が低下した。DEN処理によって得た Foci、HCC, Cholangiocarcinoma, Mixed tumorすべてに背景肝と比べ発現の低下が免疫組織染色で認められた。さらに肝培養細胞では肝細胞と比べてSMP30/RGNの発現が低下していた。哺乳類を用いたこれまでの報告で示唆されているように、SMP30/RGNは細胞増殖抑制能があり、増殖している肝細胞では発現が低下していた。

D. 考察

本研究で我々はSMP30/RGNが老化、肝腫瘍およびacute liver injuryの有用なバイオマーカーになることを示した。肝腫瘍で発現が高率に抑制されるため、SMP30/RGNはバイオマーカーとして用いて薬物スクリーニングを行うなどの応用が今後期待される。

E. 結論

本研究においてSMP30/RGNが老化、急性肝障害、肝再生および肝発癌に関与する分子であり、有用なマーカーとなりうることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujisawa K, Terai S, Hirose Y, Takami T, Yamamoto N, Sakaida I. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Oct 22;414(2):331-6.

2) 寺井 崇二, 坂井田 功 肝癌幹細胞を探る 分子消化器病学8(1) 33-44 2011

2. 学会発表

1) Fujisawa koichi, Terai Shuji, Yamamoto Naoki, Takami Taro, Sakaida Isao. SMP30/Regucalcin is a useful marker for liver tumor. The 16th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (ISHSR).

2) Shuji Terai. Human homologue of Maid (HHM) : An important regulator to control hepatocarcinogenesis and liver fibrosis. The 3rd JCA-AACR special joint conference (Invite) (March 2nd, 2011)

3) Shuji Terai. HHM(MAID) is a specific regulator to inhibit the generation of liver tumor and progression of liver fibrosis-from the study of CCl4 induced Maid KO mice and DEN exposure HHM TG medaka fish. The liver meeting 2011 (Sanfrancisco, November 8th, 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

Bcl-xL阻害剤ABT-737による肝がんの分子標的治療

竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：Bcl-xLは肝がんの40%で高発現しているアポトーシス抑制分子である。Bcl-xLの機能ドメインであるBH3 binding grooveに特異的に結合する小分子ABT-737の肝がん細胞に対する抗腫瘍効果を前臨床モデルで検討した。ABT-737は肝がん細胞株に対して高濃度でアポトーシスを誘導したが、ヌードマウスの皮下腫瘍モデルでは有意な腫瘍退縮効果を示さなかった。ABT-737の投与により肝がん細胞株のMcl-1の分解が遅延しMcl-1が蓄積することがこのアポトーシス耐性の原因であった。ソラフェニブはMcl-1の発現を転写レベルで腫瘍特異的に抑制した。肝がん細胞株にABT-737とソラフェニブを併用投与すると相乗的にアポトーシスが誘導された。ヌードマウスの皮下腫瘍モデルにおいて、ABT-737の投与はソラフェニブによる腫瘍退縮効果を増強した。

共同研究者

足田隼人 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

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

B. 研究方法

肝がん細胞株に ABT-737 あるいはソラフ

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

Huh7、Hep3B 肝がん細胞株は高濃度（8～16 μ M）の ABT-737 処理によりアポトーシスが誘導された。ABT-737（50 mg/kg）は Huh7 ゼノグラフトモデルに対しては有

意な腫瘍縮小効果を示さなかった。肝がん細胞株は ABT-737 の投与により Mcl-1 発現が増強した。この原因として mcl-1 mRNA の発現増強は認めなかったが、Mcl-1 の分解が遅延することがサイクロヘキサマイド添加実験により示された。Mcl-1 siRNA を投与し肝がん細胞株の Mcl-1 発現を低下させると、比較的低濃度の ABT-737 (4 μ M) により肝がん細胞株はアポトーシスをおこした。ソラフェニブは転写レベルで Mcl-1 の発現を腫瘍特異的に抑制した。ヌードマウスに Huh7 ゼノグラフトを作成し、ソラフェニブを投与し、Mcl-1 の発現を解析すると、腫瘍部では発現低下がみられたが、肝臓では発現に影響がみられなかった。Huh 7 ゼノグラフトモデルに ABT-737 とソラフェニブを投与すると、ソラフェニブ単独治療に比し有意に腫瘍増殖が抑制された。

D. 考察

Bcl-xL と Mcl-1 は肝がん細胞にアポトーシス耐性を付与する分子である。ソラフェニブは Mcl-1 の発現を腫瘍特異的に転写レベルで抑制するが、これだけではアポトーシスを誘導することはできない。同時にもう一つのアポトーシス耐性関連分子である Bcl-xL の機能を ABT-737 で阻害することにより、ソラフェニブの静細胞的な効果を殺細胞的な効果に変換することが可能であることが示された。

E. 結論

ABT-737 はソラフェニブによる抗腫瘍効果を増強した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** **52: 698-704, 2010.**

2) Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Sugiyama T, Aketa H, Sasakawa A, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. α -galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor. **Hepatol Res** **41: 30-38, 2011.**

3) Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. **Hepatology** **54: 240-251, 2011.**

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

古瀬 純司 杏林大学医学部内科学腫瘍内科 教授

研究要旨：進行肝細胞癌に対する全身化学療法として、マルチキナーゼ阻害剤ソラフェニブとプラセボによる第Ⅲ相試験が実施され、ソラフェニブ治療群で生存期間の改善が確認された。現在、ソラフェニブは進行肝細胞癌に対する標準治療薬として汎用されている。しかしこれまでの比較試験では、対象はChild-Pugh Aの肝機能良好な患者に限られており、肝機能不良例での安全性や有効性は確立していない。一般臨床では化学療法の適応となる中等度肝機能が低下したChild-Pugh Bの患者も少なくない。本研究では肝機能低下例を含めた進行肝細胞癌患者を対象として、安全性と有効性を検証する前向き第Ⅱ相試験を実施し、平成23年12月で登録を終了した。平成23年度は18例、最終的に52例（Child-Pugh A 40例、B12例）が登録された。

A. 研究目的

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

明らかにするため、前向き第Ⅱ相試験を実施する。

B. 研究方法

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

1) 主な適格規準

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

- (4)測定可能病変を有する
- (5)ECOG Performance Status 0-2
- (6)主要臓器の機能が保持されている。
- (7)肝機能がChild-Pugh scoreで5-8点
- (8)前治療から少なくとも4週間以上経過している
- (9)全身化学療法の治療歴を有さない
- (10)患者本人からの文書による同意
- (11)少なくとも8週以上の生存が期待できる

2) 除外規準

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

3) 治療方法

使用薬剤： ソラフェニブ

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

4) 評価項目2-1-1 有効性評価項目

- (1)主要評価項目： 無増悪期間
- (2)副次的評価項目： 奏効割合、全生存期間
- (3)安全性評価項目

有害事象の種類、発現頻度およびその重症度

(4)バイオマーカーの検討

末梢血、腫瘍組織の解析

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

平成22年4月より登録を開始し、平成23年12月で登録を終了した。平成22年度33例、平成23年度19例、最終的に19施設から52例が登録された。52例の患者背景は、年齢中央値69歳(52-79歳)、男性43例、女性9例、performance status 0 43例、1 9例、Child-Pugh A 40例(score 5点27例、6点13例)、B 12例である。評価のできた14例において、治療期間は中央値1.8ヵ月、3ヵ月以上継続できたのは5例(36%)であった。これまで報告された重篤な有害事象は、Grade 3肝障害3例(21%)、Grade 3手足皮膚反応、Grade 3骨髄抑制、咽頭浮腫、各1例(7%)を認めたが、肝障害の3例はいずれもChild-Pugh score 6点であった。また、Child-Pugh Bで解析できた6例では、治療期間中央値1.5ヵ月、生存期間中央値3.0ヵ月、1例で食道静脈瘤出血による肝不全死を認めた。

D. 考察

肝細胞癌の治療は一般に癌進行度と肝障害度に応じて治療選択が行われ、肝切除、

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

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

これまでの比較試験では、Child-Pugh Aの肝機能良好例のみを対象としており、肝機能低下例での安全性と有効性は確立していない。一般臨床において肝機能低下例も少なくなく、これらの患者におけるソラフェニブの安全性と有効性を明らかにすることが求められている。Child-Pugh Cの高度肝機能不良例は化学療法の適応はないことから、本研究ではChild-Pugh AとBの患者を対象に前向きな臨床試験を実施し、最終的に52例が登録された。SHARP試験などの臨床試験ではChild-Pugh Aが対象となっていたことから、ソラフェニブの適正使用の推奨がChild-Pugh Aとされており、登録された症例の多くがChild-Pugh Aであった。

しかし、Child-Pugh Bも12例登録され、その治療成績は貴重なデータとなるものと考えられる。

Child-Pugh Aのうち、score 5点と6点では6点の症例で肝障害が強く出ている傾向があり、注意が必要である。今後、追跡調査により、肝機能別の安全性や有効性を評価する予定である。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuse J, Nagashima F. Inhibitor of MEK1/2, selumetinib, for biliary tract cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5(5):579-81.
- 2) Ueno H, Okusaka T, Furuse J, Yamao K, Funakoshi A, Boku N, Ohkawa S, Yokosuka O, Tanaka K, Moriyasu F, Nakamori S, Sato T. Multicenter phase II study of gemcitabine and S-1 combination therapy (GS Therapy) in patients with metastatic pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41(8):953-8.
- 3) Kudo M, Imanaka K, Chida N, Nakachi K, Tak WY, Takayama T, Yoon JH, Hori T, Kumada H, Hayashi N, Kaneko S, Tsubouchi H, Suh DJ, Furuse J, Okusaka T, Tanaka K,

- Matsui O, Wada M, Yamaguchi I, Ohya T, Meinhardt G, Okita K. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2011;47(14):2117-27.
- 4) Iijima M, Fukino K, Adachi M, Tsukamoto T, Murai M, Naito S, Minami H, Furuse J, Akaza H. Sorafenib-associated hand-foot syndrome in Japanese patients. *J Dermatol* 2011;38(3):261-6.
- 5) Kindler HL, Ioka T, Richel DJ, Bennouna J, Létourneau R, Okusaka T, Funakoshi A, Furuse J, Park YS, Ohkawa S, Springett GM, Wasan HS, Trask PC, Bycott P, Ricart AD, Kim S, Van Cutsem E. Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12(3):256-62.
- 6) Okusaka T, Furuse J, Funakoshi A, Ioka T, Yamao K, Ohkawa S, Boku N, Komatsu Y, Nakamori S, Iguchi H, Ito T, Nakagawa K, Nakachi K. Phase II study of erlotinib plus gemcitabine in Japanese patients with unresectable pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2011;102(2):425-31.
- 7) Furuse J, Okusaka T, Bridgewater J, Taketsuna M, Wasan H, Koshiji M, Valle J. Lessons from the comparison of two randomized clinical trials using gemcitabine and cisplatin for advanced biliary tract cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;80(1):31-9.
- 8) Suzuki E, Furuse J, Ikeda M, Ishii H, Okusaka T, Nakachi K, Mitsunaga S, Ueno H, Morizane C. A phase I/II study of combined chemotherapy with mitoxantrone and uracil/tegafur for advanced hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41(3):328-33.
- 9) Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Nakachi K, Ishii H, Furuse J, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Komori H, Baba H, Fujiwara T, Nakatsura T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol*. 2012 Jan;40(1):63-70.
- 10) Morizane C, Okusaka T, Ueno H, Kondo S, Ikeda M, Furuse J, Shinichi O, Nakachi K, Mitsunaga S, Kojima Y, Suzuki E, Ueno M, Yamaguchi T. Phase I/II study of gemcitabine as a fixed dose rate infusion and S-1 combination therapy (FGS) in gemcitabine-refractory pancreatic cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Nov 26. [Epub ahead of print]
- 11) 古瀬純司, 北村浩, 廣川智, 高須充子, 長島文夫. 肝細胞がんに対する分子標的治療の現況. *最新医学* 66(8):89-94, 2011.
2. 学会発表
- 1) 古瀬純司, 廣川智, 北村浩, 高須充子, 長島文夫: 肝癌の薬物療法の現状と今後の展望. シンポジウム:肝癌治療の最前線.

第28回日本医学会総会第28回日本医学会
総会 学術講演. 2011年4月, 東京

2) Furuse J, Ikeda M: Controversies in the
treatment indication of TACE and sorafenib
for advanced HCC. ASCO/JSMO joint
symposium. 第9回日本臨床腫瘍学会学術
集会. 2011年7月21日, 横浜市

3) Furuse J, Sasaki Y, Okusaka T, Ikeda M,
Nagashima F, Sunakawa Y, Ueno H,
Nakachi K, Hashizume K, Ito Y. Phase I
study to assess the safety, tolerability and
pharmacokinetics of the multikinase inhibitor
regorafenib (BAY 73-4506) in Japanese
patients with advanced solid tumors.
European Society of Medical Oncology 36th
Annual Meeting (Abstract #1236), 2011年9
月26日, Stockholm.

4) 野村久祥、臼井浩明、吉田正、北村浩、
廣川智、高須充子、長島文夫、篠原高雄、
永井茂、古瀬純司. 高齢者におけるソラフ
ェニブ投与症例の臨床的検討. 口演. 第
49回日本癌治療学会学術集会. 2011年10
月28日, 名古屋市

5) 古瀬純司. 癌ペプチドワクチン療法ガイ
ダンス. Phase III臨床試験. 特別企画. 第
24回日本バイオセラピー学会学術集会総
会. 2011年12月2日, 和歌山市

6) 古瀬純司. がん分子標的治療の進歩. 分
子標的治療と保険診療の問題点 第141回
日本医学会シンポジウム. 2011年12月8日,
東京

2. 実用新案登録
なし

3. その他
特になし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

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

肝硬変・肝癌患者の免疫機構に關与する遊離アミノ酸の研究

上野 義之 東北大学大学院医学系研究科・消化器病態学 准教授
(山形大学医学部内科学第二講座 教授)

研究要旨：肝硬変・肝癌患者では各種免疫細胞の機能低下が知られている。これまで当科では「肝硬変患者の血漿中アミノ酸と一致した無血清培地」を独自に作成することにより、肝硬変患者で出現するアミノ酸不均衡が免疫細胞に対する作用を解析してきた。昨年度までの結果として、非代償性肝硬変患者に出現する血漿L-Cystine (L-Cys) / L-Glutamine (L-Glu)不均衡は、輸送体xCTを介してL-Cys / L-Glu交換輸送を促進し単球からのTNF-alphaの産生を増加させることをin vitroで明らかにした。本年度ではこのアミノ酸不均衡が、単球に酸化ストレスを与えているかどうか、そして実際の肝硬変患者のex vivoの単球ではどうなのかを研究した。

A. 研究目的

①非代用性肝硬変患者に出現する血漿L-Cys / L-Glu不均衡が単球に酸化ストレスを与えているかどうか

②実際の肝癌・肝硬変患者より採取した単球に関してこれまでのin vitroの結果と矛盾しないかどうか

以上を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

①健常人の血漿中アミノ酸濃度に一致した培地 (HCM)、肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度に一致した培地 (ACM)、ACM に更に L-Cys 濃度を増加させた培地 (ACM+Cys) 3つを用いて単球を培養し細胞内の還元・酸化型グルタチオンを測定した。

②実際の肝硬変患者より採取した CD14+

単球の TNF-alpha、xCT の mRNA を realtime PCR で測定し血漿中の L-Cys / L-Glu 比と比較統計した。更に血漿中の TNF-alpha と L-Cys / L-Glu 比の相関関係を調べた

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

①HCM 下で2時間前培養ののち HCM, ACM, ACM+Cys に培地交換したところ 30 分後の還元型 GSH が HCM > ACM > ACM+Cys の順で低下した。1 時間後、2 時間後でも同様の傾向であった。

②非代償性肝硬変患者 (Child-Phgh

grade B=10, C=6) から採取した単球の TNF- α , xCT の mRNA 発現は有意に健常人 < Child-B < Child C の順に発現が高値であった。更に、L-Cys / L-Glu 比を高値群 (≥ 1) と低値群 (< 1) で比較すると有意に高値群で単球中の mRNA が高かった。最後に肝硬変患者 (n=40) の血漿中の TNF- α と L-Cys / L-Glu 比に有意な正の相関関係を認めた。

D. 考察

前年度 in vitro において非代償性肝硬変で出現する L-Cys / L-Glu 不均衡が CD14+単球からの TNF- α 産生を高める報告をしたが、その理由の一つとして単球細胞内の還元型グルタチオンの低下による酸化ストレスが示唆される。非代償性肝硬変から採取した単球においても L-Cys / L-Glu 比が単球の TNF- α , xCT と関与していた。

E. 結論

進行した肝硬変に出現する L-Cys / L-Glu 不均衡は単球に酸化ストレスを与え TNF- α の産生を増加させる。更に実際の肝硬変患者においても L-Cys / L-Glu 比は単球の TNF- α , xCT と関係していることが明らかとなった。この事実は進行した肝硬変・肝癌患者では単球系細胞が正常な機能を果たせない一つの原因と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakazu E, Ueno Y, Kondo Y, Inoue J, Ninomiya M, Kimura O, Wakui Y, Fukushima K, Tamai K, and Shimosegawa T. Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor- α from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis. *PLoS one* 6: e23402, 2011.
- 2) Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, DiPette DJ, Onori P, and Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G297-305, 2011.
- 3) Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Niitsuma H, and Shimosegawa T. Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. *J Infect Dis* 204: 1017-1025, 2011.
- 4) 嘉数英二、上野義之、下瀬川徹 肝硬変に出現する血漿アミノ酸不均衡が免疫機構に与える影響 **肝胆膵** 63 (3): 375-382, .2011.

2. 学会発表

- 1) 上野義之 非代償性肝硬変で出現する L-Cystine / L-Glutamic acid不均衡はLPS刺激時の単球からのTNF- α 産生を高め、腎機能低下に関与する 第97回日本消化器病学会総会・東京

- 2) 上野義之 非代償性肝硬変に出現する
血漿中L-Cystine / L-Glutamate不均衡は交
換輸送体xCTを介してCD14+単球からの
炎症性サイトカイン産生を増加させる
第47回日本肝臓学会総会・東京
- 3) 上野義之 非代償性肝硬変に出現する
血漿 L-Cystine / L-Glutamate 不均衡は
CD14+単球内の還元型グルタチオンを低
下させ炎症性サイトカインを増加させる
JDDW2011 福岡

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝癌における細胞性免疫応答の検討

広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨：肝細胞癌において高頻度に発現するMAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原に対する腫瘍特異性T細胞応答と患者の臨床経過との関連を検討し、肝癌に対する免疫応答が臨床経過に及ぼす影響を考察した。肝癌に対する局所治療を行い残存病変が認められない場合、強く癌抗原特異的免疫応答がみられると肝癌再発までの期間が長いことがわかった。この結果より、肝癌局所治療後の免疫賦活療法の有効性が示唆され、応答のみられた癌抗原ワクチン投与の臨床応用が十分期待できるものと考えられた。そこで、肝細胞癌特異的CTLが認識する癌抗原エピトープの解析を行い、Glypican-3抗原内に、臨床経過に関連するHLA-B35拘束性の新規CTLエピトープを同定した。

A. 研究目的

肝細胞癌患者のほとんどが肝硬変あるいは線維化の進行した慢性肝炎を合併しているため、全身状態の悪化している症例をしばしば認める。そのため進行例においては集学的治療を十分に行うことができないことが多く、副作用の少ない有効な治療法の開発が急務である。そのような観点から免疫療法が注目されており様々な腫瘍抗原を標的とした免疫治療法が検討されている。本研究は将来的な免疫治療の確立のため、肝細胞癌に高頻度に発現するMAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原に対する癌抗原特異的免疫応答と臨床経過との関連を比較検討し、さらにHLA拘束性細胞傷害性T細胞が認識するエピトープの同定を試みた。

B. 研究方法

MAGE-1 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-

1 抗原、それぞれの全長を網羅し、10 アミノ酸ずつオーバーラップする 20 アミノ酸のペプチドを作成した。肝癌患者を対象に、3 種の腫瘍抗原由来の合成ペプチドに対する患者末梢 CD8 陽性細胞の IFN- γ 産生能を、ELISpot 法で評価した。そして、腫瘍抗原特異的免疫応答と臨床経過とを比較検討した。また、強い免疫応答を認めたペプチドをもとに、エピトープとなり得る 10-mer ペプチドを作製し、患者または HLA の一致した健常者の CD8 陽性細胞を利用して抗原エピトープの同定を試みた。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

肝細胞癌に対する局所治療を行い残存病変が認められない場合、強く癌抗原特異的免疫応答がみられると再発までの期間が長いことがわかった。しかし肝細胞癌が再発を繰り返すようになると、免疫応答が減弱する症例がみられた。強い免疫応答を認めた患者の末梢 CD8 陽性 T 細胞を利用して抗原エпитープの同定を試みたところ、Glypican-3 について HLA-B35 拘束性の新規抗原エピトープ GPC3₂₈₆₋₂₉₅ (MAGVVEIDKY) が存在することが確認された。

D. 考察

免疫応答と臨床経過との関連より、肝細胞癌局所治療が免疫応答に影響を及ぼしていることが示唆され、特定の癌特異的 CTL が再発を抑制する可能性が考えられた。このことは局所治療後の免疫賦活療法の有効性を示唆し、応答のみられた癌抗原ワクチン投与の臨床応用が十分期待できるものと考えられた。

E. 結論

肝細胞癌患者における癌抗原特異的免疫応答を検討し、免疫原性の高いと思われる Glypican-3 に対する HLA-B35 拘束性エピトープ GPC3₂₈₆₋₂₉₅ (MAGVVEIDKY) を同定した。今後、更に肝細胞癌特異的 CTL が認識する抗原エピトープの解析および同定が有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kajiwara A, Doi H, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Omori R, Hiroishi K, Imawari M. IL-4 and CpG therapy suppresses the outgrowth of tumors by activating tumor-specific Th1-Ttype immune responses. *Oncology Reports* (in press)
 - 2) Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H, Imawari M. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
 - 3) Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Kajiwara A, Imawari M. Efficacy and mechanism of Dendritic cell based immunotherapy in combination with Programmed cell death 1 blockade on murine hepatocellular carcinoma model. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
 - 2) Sasagawa A, Kajiwara A, Ohmori R, Ishii S, Eguchi J, Hiroishi K, Imawari M. Expression of inhibitory molecules on peripheral blood lymphocytes are up-regulated in autoimmune hepatitis. 61th Annual Meeting of the

- American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 3) Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi M, Miyashita M, Arai J, Hiroishi K, Imawari M. Fluctuation pattern of serum complement levels during pegylated interferon and ribavirin therapy is closely associated with the outcome in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 4) Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H, Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 5) 江口潤一、広石和正、井廻道夫. 消化器癌に対する免疫療法の検討. 第53回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011.
- 6) 大森里紗、江口潤一、梶原敦、土肥弘義、坂木理、平出綾子、石井成明 広石和正、井廻道夫. IFN- α と抗PD-1抗体を用いた消化器癌に対する免疫療法の検討. 第53回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011.
- 7) 平出綾子、広石和正、井廻道夫. 自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡. 2011.
- 8) 石井成明、広石和正、江口潤一、平出綾子、大森里紗、梶原敦、井廻道夫. マウス肝臓に対するサイトカイン遺伝子導入allogenic癌細胞による免疫療法. 第47回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 9) 宮下みゆき、伊藤敬義、坂木理、梶原敦、広石和正、小林万里子、熊田博光、井廻道夫. C型慢性肝炎活動性及び線維化へのCOX-2プロモーター領域(-1195G>A)遺伝子多型の関与. 第47回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 10) 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. PEG-IFN、リバビリン療法中の治療前血清補体値および治療中補体値動態による治療効果予測. 第47回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 11) 井口桃子、伊藤敬義、打越学、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. B型慢性肝炎患者におけるリンパ増殖性疾患関連マーカー異常. 第47回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 12) Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Berlin. 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