

2011-25015B (1/3)

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

肝がんの新規治療法に関する研究

平成21～23年度 総合研究報告書

1

研究代表者 本 多 政 夫

平成24 (2012) 年 3 月

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

肝がんの新規治療法に関する研究

平成21～23年度 総合研究報告書

1

研究代表者 本多 政夫

平成24（2012）年 3月

肝がんの新規治療法に関する研究

研究組織

研究代表者		
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系	教授
研究分担者		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
中本 安成	福井大学医学部第二内科	教授
恩地 森一	愛媛大学大学院医学系研究科先端病態制御内科	教授
汐田 剛史	鳥取大学大学院医学系研究科	教授
横須賀 收	千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学	教授
坂井田 功 (～平成22年度)	山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学	教授
寺井 崇二 (平成23年度)	山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学	准教授
林 紀夫 (平成21年度)	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	教授
竹原 徹郎 (平成22年度～)	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	教授
古瀬 純司	杏林大学医学部内科学腫瘍内科	教授
上野 義之	東北大学大学院医学研究科・消化器病態学 (山形大学医学部内科学第二講座)	准教授 (教授)
廣石 和正	昭和大学医学部消化器内科	准教授
西口 修平	兵庫医科大学内科学肝胆膵科	教授
工藤 正俊	近畿大学医学部消化器内科	教授
森脇 久隆	岐阜大学大学院医学系研究科消化器病態学	教授
山本 和秀	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
池田 健次	虎の門病院肝臓センター肝臓内科	部長
佐田 通夫	久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門	教授
小尾俊太郎 (平成22年度～)	財団法人佐々木研究所附属杏雲堂病院消化器・肝臓内科	科長
宮山 士朗 (平成22年度～)	福井県済生会病院放射線科	主任部長
今井 幸紀 (平成22年度～)	埼玉医科大学医学部消化器内科・肝臓内科	准教授

目 次

I. 総合研究報告

肝がんの新規治療法に関する研究

本多 政夫	-----	1
-------	-------	---

II. 分担研究報告

1. 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	-----	21
-------	-------	----

2. 樹状細胞を用いた肝がんの治療研究

中本 安成	-----	31
-------	-------	----

3. 1) 肝細胞癌に対する樹状細胞を用いた免疫療法の開発

2) 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	-----	36
-------	-------	----

4. 肝癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発

汐田 剛史	-----	39
-------	-------	----

5. 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	-----	42
-------	-------	----

6. 肝発癌におけるMaidおよびSMP30の関与についての検討

寺井 崇二	-----	45
-------	-------	----

7. 自然免疫とアポトーシスを介した肝がんの治療

竹原 徹郎	-----	48
-------	-------	----

8. 肝機能の低下した進行肝細胞癌患者における全身化学療法の安全性と有効性に関する研究		
古瀬 純司	-----	52
9. 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	-----	57
10. 肝癌における細胞性免疫応答の検討		
広石 和正	-----	60
11. インターフェロンによる血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現の基礎的検討		
西口 修平	-----	65
12. 新規抗がん剤の研究、および有効な症例の選択に関する研究		
1) 原発性肝癌における腫瘍細胞の分子生物学的特徴に関する研究		
2) 進行肝細胞癌に対するソラフェニブと低用量シスプラチン/フルオロウラシル肝動注療法の併用化学療法の第 I / II 相臨床試験		
工藤 正俊	-----	76
13. 非環式レチノイドを用いた併用肝発癌化学予防に関する研究		
森脇 久隆	-----	85
14. 新規抗がん剤の研究、および有効な症例の選択に関する研究		
山本 和秀	-----	90
15. 肝癌診療に関する新規診断技術と新規薬剤の治療成績の検討		
池田 健次	-----	103
16. 新規抗がん剤の研究、および併用療法の開発研究		
佐田 通夫	-----	109

17. 進行肝細胞がんの治療選択 —特に門脈腫瘍浸潤例を中心として— 小尾 俊太郎	-----	123
18. 肝細胞癌の経血管的画像診断・栄養血管・治療法に関する研究 宮山 士朗	-----	128
19. 肝細胞癌に対するミリプラチンを用いた肝動脈化学塞栓療法の有効性と安全性 に関する検討 今井 幸紀	-----	135
Ⅲ. 肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針	-----	139
Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	1
Ⅴ. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

I. 総合研究報告

肝がんの新規治療法に関する研究

研究代表者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

研究要旨：肝がんの治療成績・予後改善を目的として以下の研究を行った。全体研究としてソラフェニブ388例とミリプラチン1219例を対象として安全性ならびに治療効果の調査を行った「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針2010及び2011年度版」（添付資料参照）。個別研究としてPDGF-Cトランスジェニック肝線維化・発がんマウスやNASHモデルマウスを用いて非環式レチノイドの肝線維化抑制作用、脂肪肝抑制作用を示した（本多）。非環式レチノイドと他の薬剤の併用療法の可能性と肥満マウスに対する有効性を示した（森脇）。インターフェロン+ソラフェニブ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を行った（西口）。がん・老化関連分子であるMaid及びSMP30/RGNの肝がんのマーカーとしての可能性を示した（寺井）。肝がん症例の血清のサイトカイン及び糖鎖の網羅的解析を行った（山本）。肝がん幹細胞マーカーを指標とした新たな治療法の確立及び治療選択の可能性が示された（金子）。また肝がん幹細胞で高発現するテロメラーゼをターゲットとしたリボザイムを同定する基礎研究を行った（汐田）。EMT関連分子と肝がんの予後との関連を解析した（工藤）。ミリプラチンの有効性・安全性の解析を行った（池田、今井、宮山）。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を示した（廣石）。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（竹原）。樹状細胞を用いたがん及びペプチドワクチン免疫療法の臨床試験を開始し、樹状細胞調製法の改善を行った（中本、恩地）。またアミノ酸組成による単球活性化の違いを検討した（上野）。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を継続した（古瀬、横須賀、工藤、佐田、小尾）。これらの研究成果を基に、効果的な肝がん治療が選択され、治療成績の向上が期待できると考えられた。

A. 研究目的

肝がんはウイルス性慢性肝炎の病態のひとつである。インターフェロンをはじめとする治療によって肝がんの発症が抑えられ、肝切除およびラジオ波焼灼療法

の導入によって早期肝がんの治療成績が向上した。進行肝がんの治療は長らく良好な成績を上げられなかったが、分子および細胞生物学の進歩によって、治療成績は劇的に改善しつつある。分子標的薬

ソラフェニブが欧米の進行肝がん症例の生存期間を有意に延長し、我が国に於いても使用されるに至った。我が国において開発された非環式レチノイドの国内第II/III相臨床試験が終了した。さらに複数の有望な新規抗がん剤の臨床試験が進行している。しかし、これらの抗がん剤と従来の治療法との位置づけは不明であり、重篤な副作用も懸念される。

本研究班は、全体研究と研究者による個別研究から構成される。班全体の研究として、各研究者の施設における新規抗がん剤を含めた化学療法の結果をまとめる。これによって、新規化学療法の評価と適正な患者対象の選択や使用法、副作用の課題を研究する。また、研究期間内に、我が国の肝がん化学療法の治療指針を明確にする。

個別の研究として、新規抗がん剤研究および新規治療法開発研究を行う。非環式レチノイドをはじめとする新規治療薬の作用機序に関する研究、がん幹細胞を標的とする治療法の開発研究、免疫療法の条件の最適化を行う。また、新規抗がん剤を組み合わせた臨床試験を実施し、より有効な治療法の組み合わせを検討する。さらに、新規抗がん剤の治療効果を予測するバイオマーカーを探索し、有用性を解析する。これらの研究成果を取り入れ我が国における肝がん治療成績向上を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

研究は班全体で行う全体研究と、班員及び協力研究員が個別に行う個別研究より構

成される。

1. 全体研究（研究分担者及び協力研究員全員）

1) 新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査

ソラフェニブ及びミリプラチンに代表される新規抗がん剤の治療効果並びに安全性について調査を行う。

2) 多施設共同臨床試験

（ISHCC RCT/Cohort）

他施設共同臨床試験として以下の2つを予定する。

i) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法とソラフェニブ療法の無作為化比較試験」

Randomized control study comparing intra-hepatic arterial chemotherapy (IHAC) with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma (ISHCC-RCT)

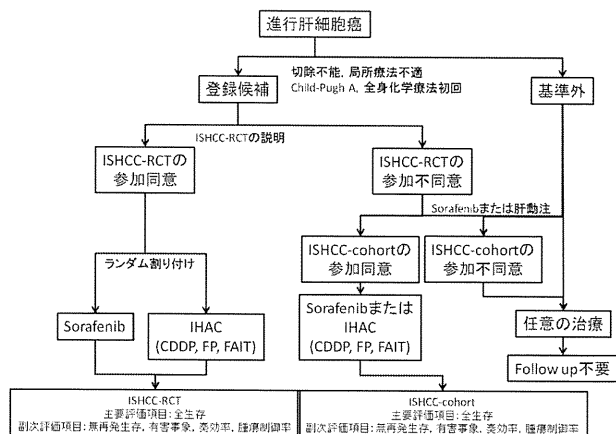
ii) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法とソラフェニブ療法の有効性に関する前向きコホート研究」

Efficacy of intra-hepatic arterial chemotherapy (IHAC) vs. sorafenib on advanced hepatocellular carcinoma; a prospective cohort study (ISHCC-cohort)

症例のエントリーの手順を図1に示す。ソラフェニブ療法の無作為化比較試験の同意が得られた症例においては、肝動注化学療法とソラフェニブ療法の何れかが無作為に割り当てられる。無作為化比較試験の同意が得られない症例に対しては、前向きコホート研究の説明を行い、同意が得られた場合、肝動注化学療法とソラフェニブ療法のいずれの治療が任意で選択され、治療が

遂行される。

図 1 多施設共同臨床試験 (ISHCC RCT/Cohort)



進行肝がん症例の生存・再発・有害事象に関するデータを収集・検討する。また、進行肝がんに対する抗がん剤適正使用のガイドラインを示す。

2. 個別研究

非環式レチノイドをはじめとする新規治療薬の作用機序に関する研究、がん幹細胞を標的とする治療法の開発研究、免疫療法の条件の最適化などを行う。また、新規抗がん剤の治療効果を予測するバイオマーカーを探索し、有用性を解析する。

平成 21-23 年度の個別研究の目的・方法を以下に略記する。

血小板由来増殖因子 (PDGF-C) トランスジェニックマウスや非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルを用いて、非環式レチノイドの肝発がん抑制機構を解明する (本多)。

非環式レチノイドと他の薬剤を組み合わせることにより、より効果的な肝発がん予防法を開発する (森脇)。

ソラフェニブと IFN を単独あるいは併用投与してその抗腫瘍効果の違いを検討する (西口)。

Maid KOマウス及びゼブラフィッシュを用いて、線維化・がん化・老化に関わる分子の発現を検討する (寺井)。

肝がん幹細胞に対する分化誘導、肝がん幹細胞マーカーの違いによる腫瘍増殖能、転移能、治療選択について検討する (金子)。

肝がん幹細胞に高発現する human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 遺伝子発現を制御する遺伝子を同定し、新規肝がん治療法を開発する (汐田)。

血清中網羅的糖鎖解析を行い、治療効果予測に応用可能な糖鎖関連分子を同定する (山本)。

ミリプラチンの肝がんに対する治療効果・副作用、有用性を多数例で検討する (池田)。

がん抗原に対する細胞性免疫応答と肝がん治療効果との関連を臨床的に検討する (廣石)。

Bcl-xL 抑制小分子である ABT-737 と Mcl-1 抑制作用を有するソラフェニブの併用効果を検討する (竹原)。

樹状細胞及び WT1 ペプチドを用いて肝がん患者を対象として免疫治療の臨床試験を行い、肝がん患者に対して安全性と有効性を確認する (恩地)。

樹状細胞を TACE 時に投与する安全性と治療効果及び、樹状細胞調整法について検討する (中本)。

肝硬変患者における血漿アミノ酸不均衡

と単球の酸化ストレスとの関連を肝硬変患者で検証する（上野）。

Child-Pugh B の肝機能低下例を含めた進行肝がん患者を対象として、ソラフェニブの安全性と有効性を検証する前向き第II相試験を実施する（古瀬）。

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相試験を行う（横須賀）。

肝がんの分子生物学的特徴を明らかにし、ソラフェニブの治療効果と関連する分子マーカーを同定する。また、上皮間葉移行に着目し予後関連因子を検索する（工藤）。

シスプラチンとリピオドール懸濁液および 5-FU を用いた肝動注化学療法（TACE）の門脈腫瘍塞栓を有する肝がん患者に対する有効性を前向きに検討する（佐田）。

多数例の進行肝がんにおけるソラフェニブの治療成績を検討して、これからの治療選択を検討する（小尾）。

肝がんに対するミリプラチンを用いた肝動脈化学塞栓療法（TACE）の有効性と安全性に関する検討を行う（今井）。

尾状葉の栄養血管の分岐パターンを明らかにする。ミリプラチンを用いた TACE の局所再発率を検討する（宮山）。

（倫理面の配慮）

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する。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従う。全体研究（新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査及び多施設共同臨床試験（ISHCC RCT/Cohort））に於いては金沢大学で作成された申請書類に基づき各実施機

関に於いて「倫理委員会」の審査体制のもとに行う。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連結可能匿名化する。

C. 研究結果

以下に本年度の全体研究と個別研究の研究結果を略記する。

1. 全体研究成果

1) 新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査

ソラフェニブ投与症例388例及びミリプラチン使用症例1219例の解析を行った。ソラフェニブ投与症例388例の内訳を示す（図2）。肝がんの成因因子はC型肝炎関連59%、B型肝炎関連21%であり、治療前肝機能はChild Aが70%以上を占めた（図2）。
図2

ソラフェニブ療法 臨床背景

	班調査 (n=388) (%)	開始時Child-Pugh	
		A (n=276) (%)	B (n=83) (%)
年齢（歳）			
中央値	71	71	69
範囲	33-89	33-89	41-85
≥75歳（%）	33	32	33
性別（%）			
男性	79	80	73
PS（%）			
0	87	89	80
1	12	11	16
2-3	1	<1	5
HCV抗体（%）			
陽性	59	57	64
HBs抗原（%）			
陽性	21	22	19

副次事項に関しては Hand-Foot-Syndrome（HFS）が49%と高頻度に認められ、次いで下痢35%、高血圧31%、食欲不振28%であった。800mg開始群では減量開始群と比較し食欲不振、皮疹・落屑・脱毛が高頻度に認められた（図3）。

図3

ソラフェニブ療法 副作用比較

副作用	班研究 (n=388)		出現日 中央値 (範囲)	開始量			
	全(%)	G3/4(%)		800mg開始群 (n=264)		減量開始群 (n=124)	
				全(%)	G3/4(%)	全(%)	G3/4(%)
手足皮膚反応	49	10	12 (1-571)	53	12	43	6
下痢	35	4	16 (1-159)	36	3	35	5
高血圧	31	10	10 (1-387)	31	11	30	9
食欲不振	28	4	24 (1-441)	31*	5	19	2
皮疹・落屑	24	3	13 (2-389)	29*	5*	13	0
疲労	22	2	24 (1-197)	23	2	19	2
脱毛	19	-	46 (7-138)	23*	-	10	-
悪心	9	1	13 (2-188)	10	1	5	0

*: p < 0.05

臨床検査値の変動評価はソラフェニブ治療中に最も変動の大きかった値とその検査日を調査した。そのためSHARP 試験や他の特定使用成績調査とは異なった頻度となった。血算値の異常、肝機能異常、電解質の異常が高頻度に認められた。

発生頻度においては800mg開始群と減量開始群と比較し有意差は認められなかった。

治療効果に関しては、CRが0.3%、PRが7%、SDが41%、PDが40%であり、奏効率は7%、腫瘍制御率は48%であった(図4)。

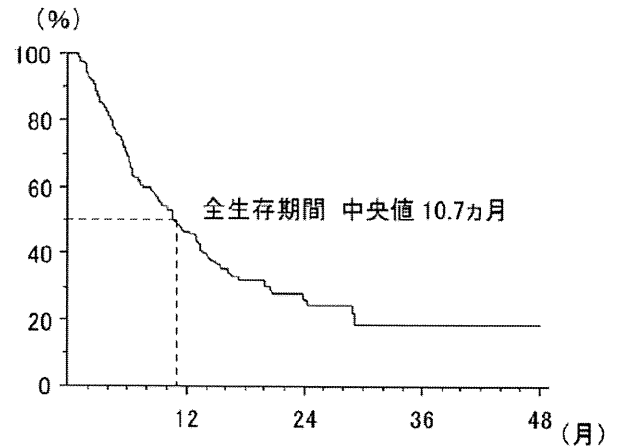
図4 治療効果

	班調査 (n=369) (%)	開始量	
		800mg開始 (n=257)	減量開始 (n=112)
		(%)	(%)
完全奏効	0.3	0.4	0
部分奏効	7	7	6
安定	41	42	39
増悪	40	40	40
奏効率	7	8	6
腫瘍制御率	49	50	46

全生存期間に関しては、本調査はRCTではなく評価困難であるが、無再発生存期間は中央値が10.7ヶ月であり、SHARP試験とほぼ遜色ない成績が得られた(図5)。

図5

全生存期間 無再発生存期間



腫瘍制御に関わる因子として、ECOG-PS=0、最大腫瘍径(30mm未満)、AFP値100(ng/ml)未満、治療前PIVKaII 400(mAU/mL)が有意に関連していた。ソラフェニブの適応、至適投与方法、副作用、治療予測因子につき「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」を新たに改訂した(添付資料参照)。

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可能である。当研究班では1219例の登録を得た(図6)。

図6

ミリプラチン投与 臨床背景

	班研究 (n=1219) %
年齢(歳)	
中央値	72
範囲	33-110
性別	
男性	64
Child-Pugh分類	
A	62
B	35
C	3
HBs抗原	
陽性	14.1
HCV抗体	
陽性	80.4

今回行った班調査では、ミリプラチン

の副作用として発熱を主とする「塞栓後症候群」が約90%の症例にみられたが、以前からミリプラチンに特徴的といわれていた二峰性発熱は2.6%と比較的少なかった。また、嘔気・嘔吐の頻度はそれぞれ22.5%、8.1%と、他の白金製剤に比べて頻度は低かった(図7)。血液学的副作用は、白血球減少21.6%、血小板減少35.2%、好中球減少19.5%であった。肝機能異常は高頻度であり、AST上昇は62.7%、ALT上昇は56.7%の症例にみられ、治療開始後200 IU/L超を示すグレード3以上の頻度は、それぞれ25.3%、12.1%であった。T-bil.上昇も42.1%にみられ、正常値上限の3倍を超すグレード3以上の上昇も3.3%にみられた。

図7

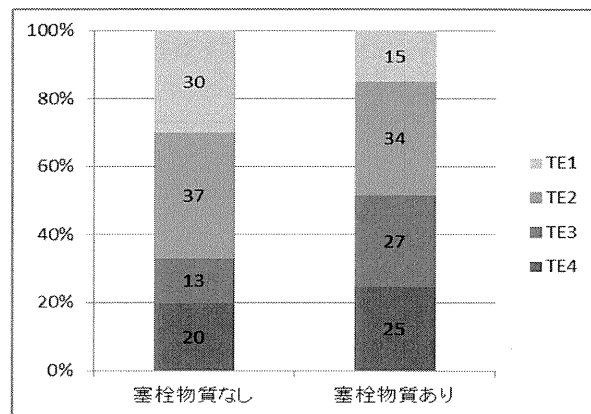
ミリプラチン 副作用

	研究班 (n=927) 全(%)
肝動脈塞栓症候群	
発熱	89.3
二峰性発熱	2.6
腹痛	20.7
悪心・嘔気	22.5
疲労	15.3
嘔吐	8.1
下痢	0.6
その他	
腹水	1.5
肝不全	0.5
胆嚢炎	0.5
感染	0.3
呼吸困難	0.2
Biloma	0.1
肝膿瘍	0.1

今回の班調査では、解析可能であった1185例中991例(83.6%)に塞栓物質が併用されていた。後ろ向き研究であり、塞栓物質併用例と未併用例の症例背景が異なるため単純な比較はできないが、TE3+TE4

で判定した抗腫瘍効果は、塞栓物質あり52%と塞栓物質なし33%に比較し高かった(図8)。

図8 抗腫瘍効果



ミリプラチン有効(TE3/4)達成に寄与する独立因子として、塞栓物質を併用すること、腫瘍個数が少ないこと、過去のTAEの既往が無いことが治療効果と関連した因子であった(図9)。

図9

ミリプラチン有効(TE3/4)達成に寄与する独立因子				
要因	カテゴリー	リスク比	95%信頼限界	p値
塞栓物質	なし	1		0.002
	あり	2.00	1.30-3.09	
腫瘍個数	単発	1		0.006
	多発	0.60	0.41-0.86	
	3個以下	1		
過去のTAE歴	なし	1		<0.001
	あり	0.46	0.33-0.67	

ロジスティックモデル

現在、ミリプラチンを用いたTACEの第III相試験が進行中であり、その結果が塞栓物質併用の有効性を検討するうえで参考になると思われる。

ミリプラチンの反復投与に関しては、血管障害(狭窄・閉塞・動脈-門脈シャントなどは)ほとんどみられず、また複数回投与にて増加した合併症はみられなかった。従って反復投与は安全に施行できると考えられた。初回投与が塞栓物質を用いないミリプラチンとリピオドールの肝動脈注入のみであった場合、先に示し

たように塞栓物質を用いたTACEがTAIに比較してより腫瘍効果が期待でき、副作用も通常のTACEと変わらないことより、ゼラチン粒などを用いたTACEを試みる価値があると考えられる。

ミリプラチンの投与濃度については、通常使用濃度であるミリプラチン60mgに対してリピオドール3mLで投与していた症例は68%、ミリプラチン60mgに対してリピオドール3.5mLと希釈して投与していた症例は28%、ミリプラチン105mgに対してリピオドール3mLと濃縮して投与していた症例は5%であった。至適投与量の設定、ミリプラチンとリピオドールの混和液の粘稠度の改善など、投与方法の工夫も今後の検討課題と考えられる。

ミリプラチンの長期の抗腫瘍効果持続・全生存率に関しては、まだ十分な成績が出ておらず、この点に関しても今後の課題である。

「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針2010年度及び2011年度版」
(添付資料参照) 詳しくまとめた。

2) 多施設共同臨床試験

(ISHCC RCT/Cohort)

i) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法とソラフェニブ療法の無作為化比較試験」

ii) 「進行肝がんに対する肝動注化学療法とソラフェニブ療法の有効性に関する前向きコホート研究」

金沢大学で作成した申請書に添って各施設の倫理委員会にて申請・承認を得て症例の蓄積を行った。

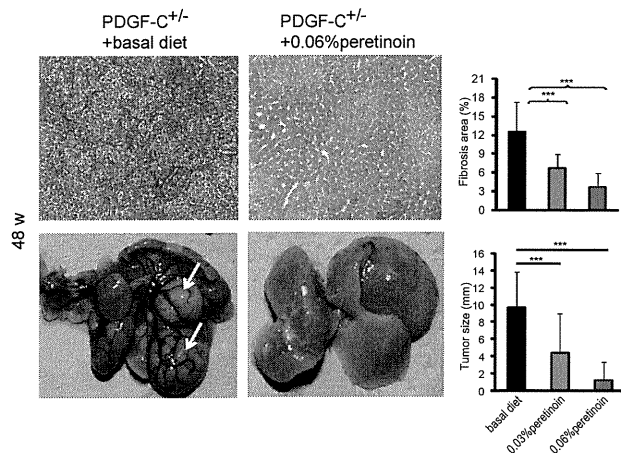
2. 個別研究成果

以下に本年度の個別研究の研究成果を列挙する。

非環式レチノイド (NIK-333、一般名 ; ペレチノイン) は武藤ら (N Engl J Med. 1996 Jun 13;334(24):1561-7.) により肝がんの再発を抑制する作用が報告されている。現在、国内第II/III相臨床試験「C型肝炎ウイルス陽性肝がんに対する再発抑制効果の検討」が終了している。国内第II/III相臨床試験ではChild-Pugh Aの症例においては、600mg投与がプラセボよりも有意に再発を抑制する結果が得られた。しかしながら、300mg投与群では治療効果が得られず、Primary endpointを達成できない結果となっている。今後、Child-Pugh Aの症例に限定して600mg投与とプラセボ投与の2群比較の新たなRCTが組まれる予定となっている。

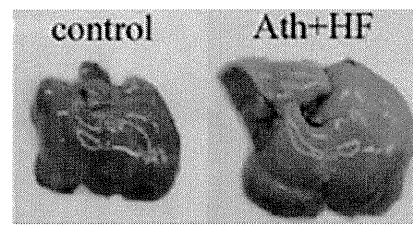
ペレチノインの作用機序に関してはこれまでに十分に明らかにされておらず、特に肝線維化抑制効果に関する検討は十分に行われていない。本多(研究代表者)は血小板由来増殖因子 (PDGF-C) トランスジェニックマウス (Tg) を用いて、ペレチノインの作用を解析した。PDGF-C-Tgは肝細胞特異的遺伝子であるアルブミンプロモーターの制御下にPDGF-Cを肝で過剰発現させたマウスであり、肝線維化、血管新生の増加に伴い、肝細胞の脂肪化を誘導し、やがて肝がんが発生するモデルで有り、線維化を経てから発がんする意味でヒトの肝がんの発症と似ているモデルである (図10)。

図10 PDGF-C-Tgの線維化・肝発がんとペレチノインによる抑制



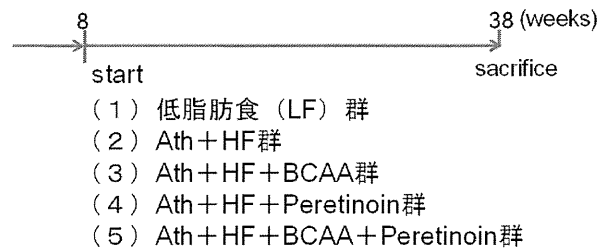
ペレチノインを生後4週から0.03%、0.06%濃度で餌に混じり投与を行ったところ、生後24週に於いて、肝線維化、脂肪化の顕著な抑制が認められた。また48週後ではコントロールPDGF-C-Tgでは高頻度に肝腫瘍の発生を認めたが、ペレチノイン投与群では有意に肝腫瘍形成が抑制されていた(図10)。ペレチノインはPDGFR- α/β の発現を抑制し、また血管内皮マーカーであるCD31/CD34の発現を抑制した。更に非アルコール性肝炎(NASH)モデルに対するペレチノインの効果を検討した。NASHモデルとして、動脈硬化高脂肪食(Ath+HF)を用いた。これまでにAth+HFモデルは肝細胞の脂肪化、バルーン化、線維化を促しNASHモデルに適していることを報告している(Matsuzawa et al, Hepatology, 2008)。このマウスは、やがて肝がんを発症することを見いだしている(Unpublished data)。Ath+HFモデルマウスにペレチノイン及びBCAAを投与し線維化、脂肪化の進展を検討した(図11)。

図11 Ath+HFモデルとペレチノイン投与



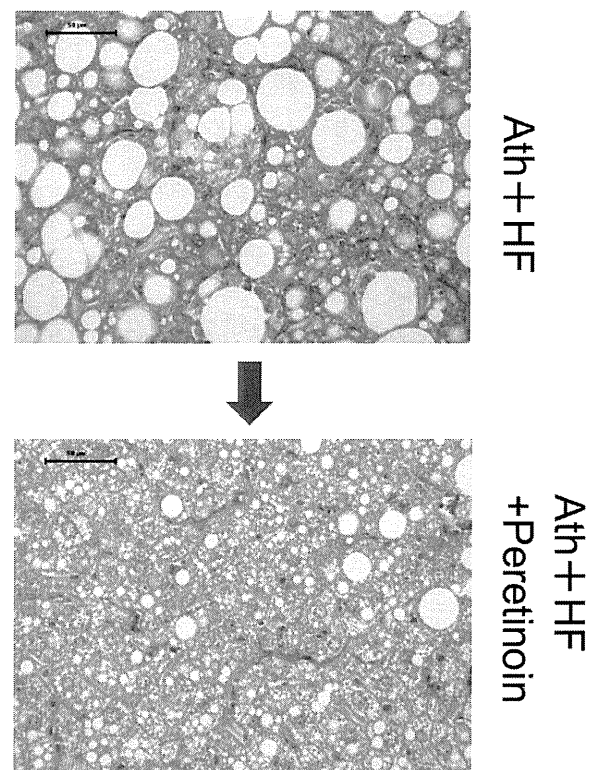
(Hepatology 2008)

Ath+HF : 動脈硬化高脂肪食
 CRF-1: 38.25%, cocoa butter 60%
 Cholesterol: 1.25%, cholate: 0.5%



ペレチノイン投与により脂肪化の改善、線維化の改善が認められた(図12)。また、BCAA投与により、より効果の増強が認められた。

図12 肝の線維化・脂肪化の改善



また、肝組織における、PDGFR- α/β の

発現低下、PDGF- β , -C及びTGF- β の発現低下も認められた。これらのペレチノインの抗線維化、抗脂肪化作用もペレチノイン発がん抑制作用の一端を担っていると考えられる。

レチノイドそれ自身は強い抗がん作用を持ち合わせておらず、進行肝がんの治療には適応できない可能性がある。森脇（分担者）はリン酸化RXR α を分子標的としRXR α の機能を回復する非環式レチノイドと作用機序(標的分子)の異なる薬剤を併用することで、相乗的に肝発がんを抑制する研究を行った。ペレチノインとHER2抗体 TrastuzumabやHDAC阻害剤のバルプロ酸及び受容体FXRの合成リガンド(GW4064)と併用することによって、RXR α 、Erk、Akt、Stat3蛋白のリン酸化が抑制されアポトーシスが誘導されること、また肝がん細胞の増殖が相乗的に抑制されることを明らかにした。さらにペレチノインは、肥満・糖尿病を発症する *db/db*マウスを用いたDEN誘導肝化学発がんモデルにおいて、Rasの活性化とRXR α 、Erk、Akt、JNK、Stat3蛋白のリン酸化を抑制し、インスリン感受性を改善させるとともに、マウスの肝発がんを抑制することを明らかにした。

西口（分担者）は肝がんに対するソラフェニブとIFN併用における抗腫瘍効果の機序を検討した。ヒト肝がん細胞株Hep3BをSCIDマウス皮下に移植することで形成される腫瘍に対して、移植5週後から2週間連続でソラフェニブ（経口投与）あるいはIFN（腫瘍近傍へ注入）を単剤、あるいは併用投与して、*in vivo*における腫瘍

増殖抑制効果を比較した。対照群に比してソラフェニブ投与群、あるいはIFN投与群では腫瘍内の壊死範囲が広く認められ、ソラフェニブ+IFN併用投与群では更に著明であった。腫瘍部を摘出してtotal RNAを抽出し、発現遺伝子の差異についてgene chipにて解析した。ソラフェニブ+IFN併用群では、ソラフェニブ単独投与群に比してアポトーシス関連遺伝子群の発現亢進が認められ、一方で細胞増殖関連遺伝子群やVEGFの血管新生関連遺伝子群の減弱が認められた。したがって*in vivo*のxenograftモデルに対する腫瘍間質・血管新生を標的としたIFNの作用は、アポトーシス誘導やVEGFシグナルの抑制というソラフェニブの作用機序を増強して抗腫瘍効果を高めることが考えられた。

坂井田（分担者）はゼブラフィッシュのMaidを単離し、その機能解析を行った。DEN処理により得られたゼブラフィッシュ肝でMaidは前がん病変で発現が増加し、肝がん部では発現が低下していた。Maid KOマウスを作製し四塩化炭素を投与したところ、肝線維化亢進が認められ、Maidは線維化抑制に関わっていることが示唆された。また、老化関連分子であるsenescence marker protein 30 (SMP30/RGN)の発現はゼブラフィッシュの老化に伴って低下し、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、肝がん部位、胆管がん部位、混合型肝がん部位すべてに背景肝と比べ発現の低下が認められた。以上より、SMP30/RGNは肝腫瘍および急性肝障害の有用なマーカーに

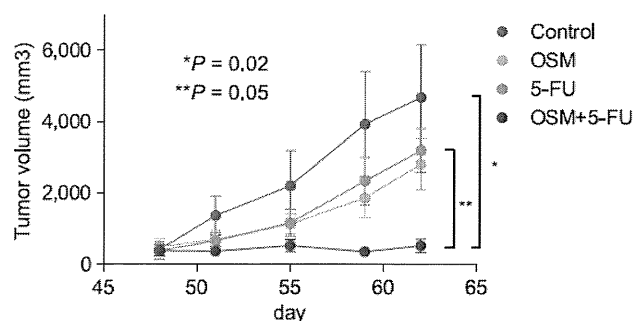
なることが示唆された。

山本（分担者）は進行肝がんに対するソラフェニブを含む新規抗がん剤や低用量シスプラチンがどのような症例に有効かということをはっきりさせるため、血液中の様々なサイトカインの測定や網羅的糖鎖解析を行った。血清サイトカイン値と治療効果との関係では、Angiopoietin-2, Follistatin, G-CSF, HGF, PDGF, VEGF がソラフェニブ投与後1か月の時点での判定で進行していた症例では高値を示していたものが多かった。網羅的糖鎖解析で肝がんと健常人の間に発現の差異が認められる糖鎖の存在は、以前より確認されていた。これら糖鎖の治療前の発現量をソラフェニブ治療後の非進行例と、進行例で検討したところ、これら2つのグループ間の発現量には差がなかった。これらの糖鎖を含めた50種類以上の糖鎖発現を、網羅的に解析した結果、5つの糖鎖の発現が、ソラフェニブ投与後1か月の時点での進行例では、高い結果が得られた。また、糖鎖発現と副作用の関連について、手足症候群等との関連を示唆させる所見が得られた。

金子（分担者）は幹細胞マーカーを用いた新たな肝がんの分類、治療選択の可能性、及び肝がん幹細胞の分化誘導療法の可能性について検討した。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るかにつき検討した。OSMR陽性AFP陽性EpCAM陽性肝がん培養細胞株であるHuH1、HuH7に対しOSMを

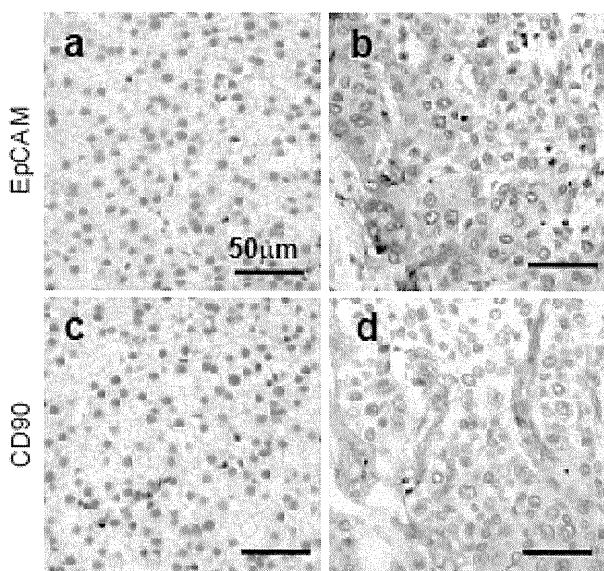
投与したところ、EpCAM陽性細胞の減少、肝幹細胞マーカーの遺伝子蛋白発現低下と肝細胞分化マーカーの遺伝子蛋白発現増加が認められた。OSMを殺細胞性抗がん剤の一つである5-FUと組み合わせ、抗腫瘍効果について免疫不全マウスへの皮下移植モデルで検討したところ、OSMや5-FUの単独投与に比べ、OSMと5-FUを同時投与した場合に最も強い抗腫瘍効果が認められた（図13）。OSMRは幹細胞タイプの肝がんにおけるEpCAM陽性がん幹細胞で強発現が認められ、OSMシグナル伝達系を介して肝細胞系への分化誘導と5-FUに対する感受性を亢進させ、がん幹細胞における抗がん剤抵抗性を克服する新規治療法の発展につながると考えられた。

図13 NOD/SCIDマウス皮下移植モデルを用いたOSMと5-FU併用療法の抗腫瘍効果



EpCAM以外のがん幹細胞としてCD90陽性細胞がEpCAM陽性細胞とは異なる特徴を有することを明らかにした。肝がん102例の解析において、EpCAM陽性細胞 (>5%)、CD90陽性細胞 (>5%) が各37例、36例に認められた。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14）。

図14 EpCAM及びCD90の免疫染色



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、ソートした細胞を用いた遺伝子発現解析からはRT-PCR解析にて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15)。

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(図16)。

図15 RTD-PCR

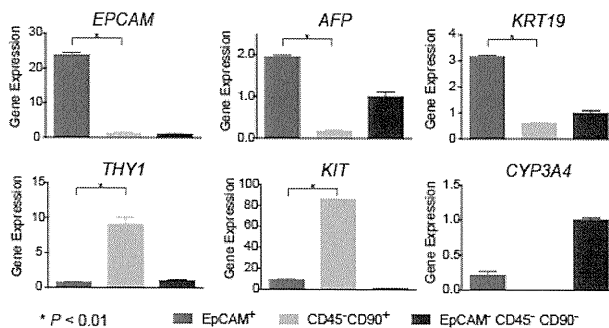


図16 臨床サンプルにおける幹細胞マーカーと遠隔転移

CSC marker (Positive: ≥ 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、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17)。

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18)。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19）。

図17 SCIDマウスにおける腫瘍増殖能

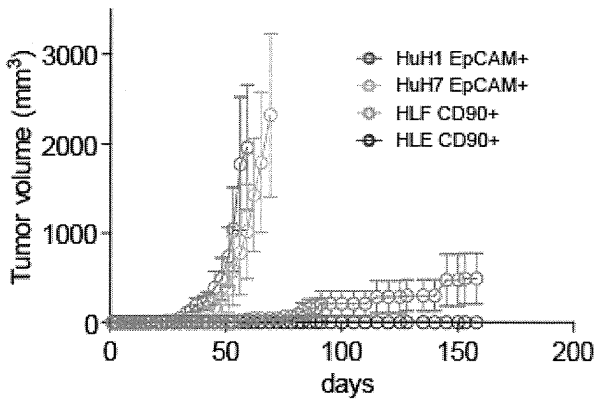


図18 SCIDマウスにおける肺転移巣

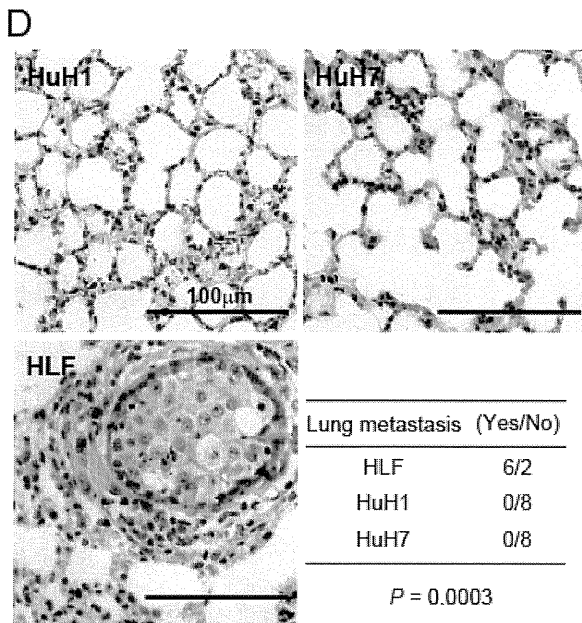
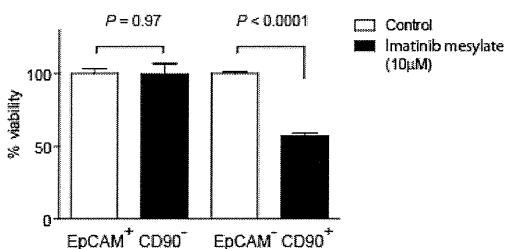


図19 EpCAM、CD90陽性細胞に対するImatinib効果



以上より、肝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有することを初めて明らかにした。これらの異なるがん幹細胞の制御により、肝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。

汐田（分担者）は肝がん幹細胞に高発現するhTERT遺伝子発現を制御する遺伝子を同定し、新規の肝がん治療法を開発するために、ランダムリボザイムライブラリーを用いたhTERT制御因子の同定を試みた。hTERT遺伝子上流5 kbpをpEGFP-1プラスミドへ導入し、hTERT依存的にEGFP発現の制御を受けるphTERTpro-EGFPを構築し、hTERTの発現の高いHepG2及びhTERTの発現の低いPLC/PRF/5に導入後、安定発現細胞株を樹立した。PLC/PRF/5にリボザイムライブラリーを導入しEGFP発現の増加するリボザイムを同定した。

池田（分担者）は肝がん患者における血液中の循環がん細胞（CTC）検出の有効性を検討した。CTCは4種類の抗体を用いて特異的に血液中のがん細胞を検出するセルサーチシステムにより行った。転移15例中CTC陽性は8例（53.3%）、陰性は7例（46.7%）であった。対照群の17例では全例CTC陰性であり、肝がん症例でのCTCの有用性を示した。また、肝がんに対する白金製剤ミリプラチンの治療効果・副作用とその有用性を検討した。対象は

2011年9月までに虎ノ門病院でミリプラチン動注療法を施行した肝切除・経皮的局所治療が行えない肝がん患者214例とした。動注治療3ヶ月後の効果判定ではTE4が23%、TE3が23%（奏効率46%）で、重大な副作用はなかった。ミリプラチンの投与方法について、両葉多発性肝がん片葉にミリプラチン動注のみ・残葉に塞栓併用を行った23例では、塞栓併用肝葉での奏効率が56%で動注のみ群の39%より有意に高かった。ミリプラチンのリピオドール中への濃縮使用（105mg/3ml）や緩徐間歇投与（3ml動注/20分）では奏効率の向上は得られなかった。ミリプラチンの反復投与で奏効率が向上し、大きな有害事象は見られず、安全な動注化学療法剤として使用可能であった。

廣石（分担者）は肝がん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、肝がんに対する免疫応答が臨床経過に及ぼす影響を考察した。治療経過において、強くがん抗原特異的免疫応答がみられる場合、肝がん再発までの期間が長いことが明らかとなった。肝がん特異的CTLが認識するがん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。

竹原（分担者）は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が蓄積していた。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、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。ソラフェニブとABT-737の併用により抗腫瘍効果が増強する可能性が示唆された。

恩地（分担者）は腫瘍抗原パルス樹状細胞ワクチン及びWT1ペプチドを用いて肝がん患者を対象として免疫治療の臨床試験を行った。肝がん患者に対して安全性を確認した。また肝がん患者に治療3ヶ月で18例中4例に腫瘍進展がみられず、WT1ペプチドの有用性が示唆された。

中本（分担者）は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、肝動脈塞栓療法と同時に樹状細胞を投与する安全性臨床研究を行った。また、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