

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。

上野（分担者）は肝硬変患者の免疫細胞機能を改善または抑制する作用を有するアミノ酸を同定しその作用・メカニズムの研究を行った。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-CTR000002590）。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）はソラフェニブの治療効果に関連した分子マーカーについて検討した。また、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の前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した。単施設における結果は、51例中10例

が complete response (CR), 34 例が partial response (PR) であった。全症例の平均生存期間は33カ月であり、CR 10例とPRのうち追加治療で腫瘍が消失した21例の平均生存期間は39カ月であった。多変量解析の結果、予後に影響を及ぼす因子は治療効果であった。一方、多施設における検討では、52例中10例が complete response (CR), 29例が partial response (PR) であった。全症例の平均生存期間は810日であり、CR 10例とPRのうち追加治療で腫瘍が消失した14例の平均生存期間は1,080日であった。多変量解析にて治療効果と追加治療も含めて腫瘍が消失することが予後に関与する因子であることが明らかとなった。

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動注化学療法は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、新規抗がん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、抗がん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がん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 2010 及び 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 カ月 vs. 2.2 カ月）、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。

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 カ月、6.3 カ月であり、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。

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 カ月後、治療終了時、治療終了 1 カ月後の Child-Pugh 分類の推移からソラフェニブ療法開始 1 カ月後においても、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 カ月、6.3 カ月であり、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、エピルピ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 2010 及び 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 PDGF-C トランスジェニックマウスや 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（分担者）はMaidや老化関連分子であるSMP30/RGNの発現をゼブラフィッシュ肝腫瘍モデルやMaid K/0マウスで検討し、これらの分子の肝がんのマーカーとしての可能性を示した。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）はがん幹細胞マーカーによる新たな肝がん分類を行い、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た、がん幹細胞マーカーによる新たな治療選択の可能性を示した。また、がん幹細胞の分化誘導が抗がん剤の治療効果を上げる可能性を示した。

工藤（分担者）はソラフェニブ治療効果と関連する分子マーカーの探索や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）

は血液中の循環がん細胞（CTC）検出の有用性を示すと共に、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）は肝がんに対する樹状細胞ワクチン及び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）は樹状細胞とTACE併用療法の安全性と有効性について検討し、また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）は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の有効性を中規模のコホートにて検証した。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 2010 及び 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・がん関連分子である 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。また幹細胞の分化誘導による抗がん剤効果増強が示唆された。

- 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。

F. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

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

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に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。本研究において我々は、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見出した。更に我々は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。肝がん幹細胞は生物学的に多様な集団であり、それぞれ分子標的薬や抗がん剤、サイトカインに対する応答が異なることから、がん幹細胞を標的にしたテーラーメイド医療が肝細胞がん治療に有用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。その抗がん剤抵抗性のメカニズムとしては、DNAダメージ修復や細胞周期制御、抗アポトーシスシグナルとの関連が挙げられており、如何にしてがん幹細胞の抗がん剤感受性を高め

るかについて現在盛んに研究が行われている。

最近我々は肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いることで肝細胞がんを幹細胞タイプと肝細胞タイプに分類する方法を確立、発症年齢やWntシグナル活性の違い、肝切除後の予後など腫瘍としての特徴が大きく異なることを見出した。特にEpCAM陽性細胞は幹細胞タイプの肝細胞がんにおいてがん幹細胞の特徴を有し、抗がん剤抵抗性を呈することから、肝細胞がん治療における重要なターゲットと考えられる。現在、がん幹細胞の自己複製と非対称性分裂を調整するシグナル伝達系の解析は肝がん幹細胞分画を減少させ、抗がん剤感受性を高めるものとして注目されている。

Oncostatin M (OSM)はIL-6ファミリーに属するサイトカインで胎児肝ではCD45陽性造血細胞により産生され、正常肝臓器形成過程において肝芽細胞を肝細胞へ分化誘導させるサイトカインとして知られているが、肝細胞がんに及ぼす影響は不明である。

一方これまでに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、OSMがEpCAM陽性肝細胞がんに与える影響について検討を行った。さらに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、金沢大学付属病院で1999年から2007年にかけて肝切除が行われた107例の肝細胞がんおよび背景肝組織を解析に用いた。18例のながん病変、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OSMレセプター(OSMR)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OSMR抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗EpCAM抗体VU1D9(Merck Chemicals)、抗CD90抗体(Stem Cell Technology)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。

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.)、抗アルブミン抗体(Cell Signaling Technology)、抗CK19

抗体 (DAKO)、抗 AFP 抗体 (Nichirei Biosciences) および Cytofix/Cytoperm キット (BD Biosciences)、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。

(倫理面への配慮)

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ーにて一括管理し、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

慢性肝炎、肝硬変および肝細胞がん組織における OSMR の発現について免疫組織化

学を用いて解析を行ったところ、OSMR 陽性細胞は慢性肝炎組織ではほとんど認められないが肝硬変組織では門脈周囲の小肝細胞様細胞に発現が認められた (図 1 A、B) (Yamashita T., et al., Cancer Research 2010 から引用)。また、一部の肝細胞がんでは非がん部に比し強い発現が認められ (図 1 C)、特に間質への浸潤傾向の強い細胞で強い発現が認められた (図 1 D)。

図 1 A 慢性肝炎組織における OSMR 発現

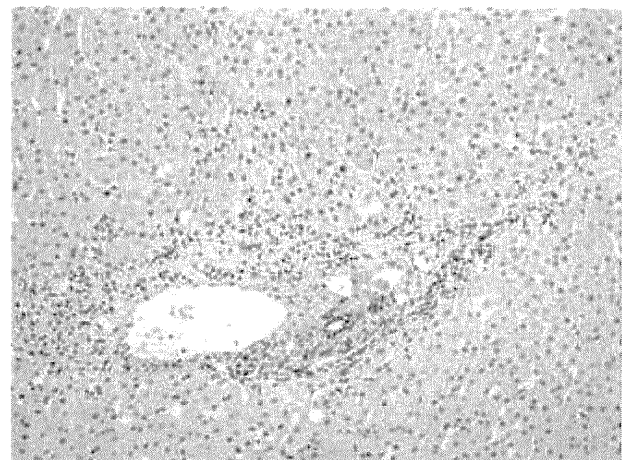


図 1 B 肝硬変組織における OSMR 発現

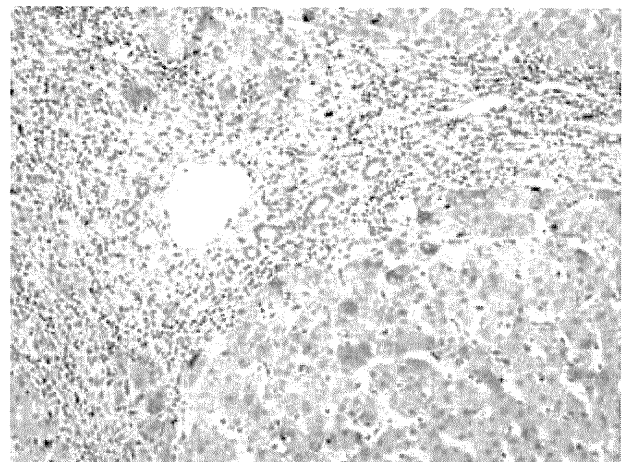


図 1C がん部と非がん部の境界領域

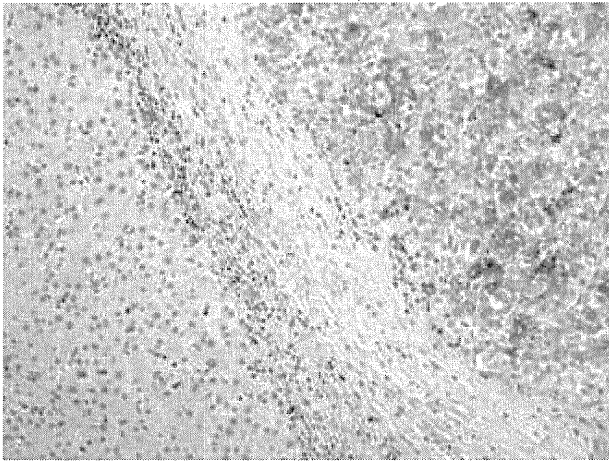
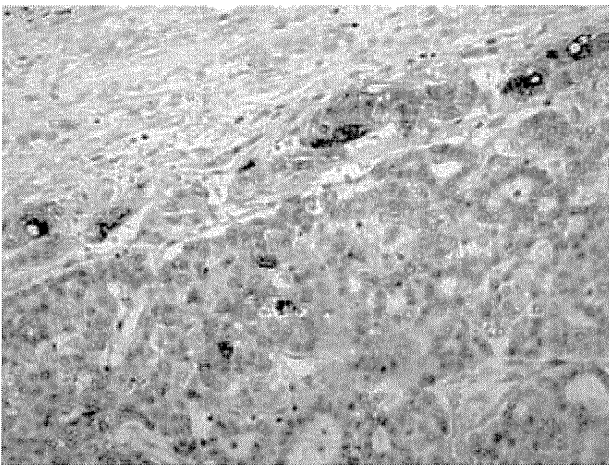


図 1D 間質に浸潤するがん細胞



107 例の肝細胞がん組織における EpCAM と OSMR の発現につき免疫組織化学で検討したところ、38 例が EpCAM 陽性、66 例が OSMR 陽性の肝細胞がんであった。EpCAM と OSMR の発現には統計的に有意な正の相関が認められ ($P = 0.024$)、かつ OSMR 陽性肝細胞がんは統計的に有意に血清 AFP の上昇 ($P = 0.009$) と組織学的な未分化性 ($P < 0.0001$) と相関した。

次いで、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、OSMR の下流のシグナル伝達因子である STAT3 のリン酸化

と 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 (図 2A, B) が認められた。

図 2A OSM 投与後の遺伝子発現変化

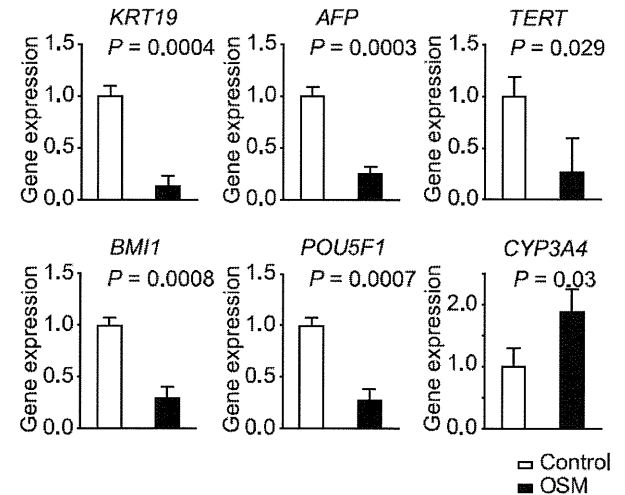
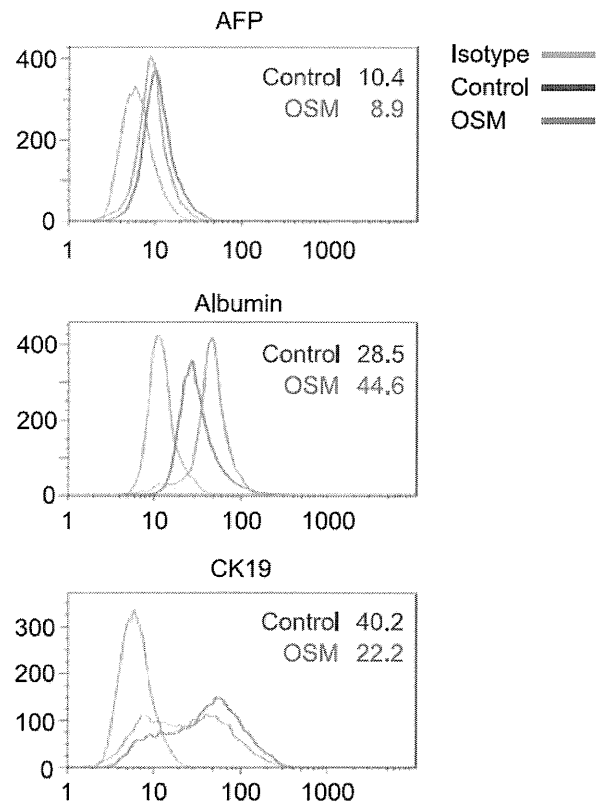
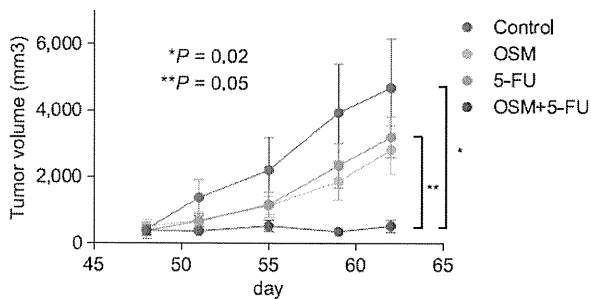


図 2B OSM 投与後の蛋白発現変化 (FACS)



OSM が EpCAM 陽性肝細胞がんの増殖に与える影響をコロニー形成や Ki-67 染色で検討を行ったところ、OSM 処理によりコロニーサイズや S 期の細胞数の増加が認められた。すなわち、OSM は細胞周期が比較的遅いがん幹細胞を dormant な状態から活性化させる一方、OSM 単独では抗腫瘍効果が限られている可能性が示唆された。そこで、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 3)。

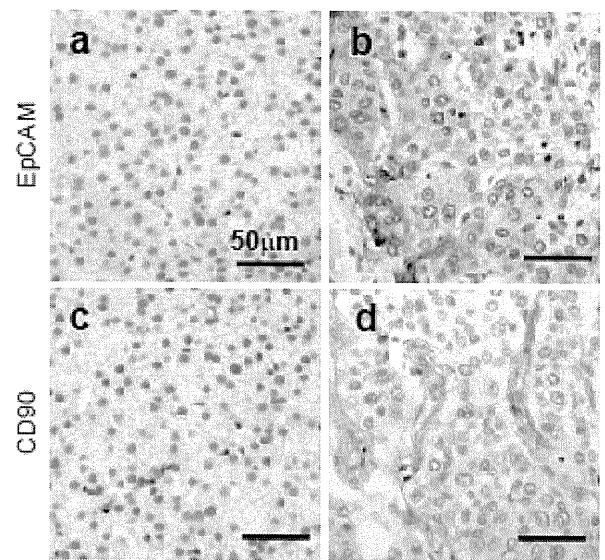
図 3 NOD/SCID マウス皮下移植モデルを用いた OSM と 5-FU 併用療法の抗腫瘍効果



一方 EpCAM 陽性細胞は肝細胞がんの約 35% 程度でしか認められないことから、我々は他のがん幹細胞マーカーの一つである CD90 の発現について検討を行った。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 4)。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 4 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 5)、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6)。

図5 免疫組織化学 (2重染色) および FACS 解析

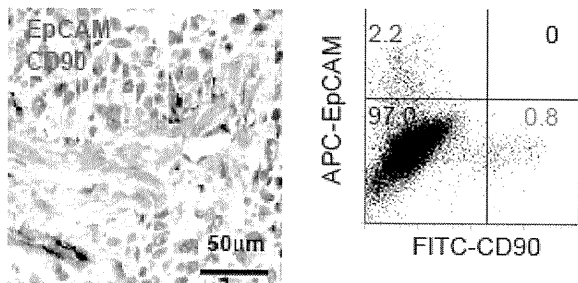
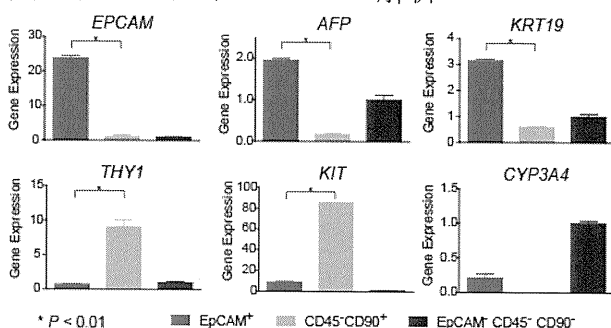


図6 リアルタイム RT-PCR 解析



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 | |
| EpCAM ⁺ | 4 / 33 | 1.0 |
| CD90 ⁻ | 4 / 62 | |
| CD90 ⁺ | 8 / 28 | 0.023 |
| EpCAM ⁻ CD90 ⁻ | 2 / 45 | |
| EpCAM ⁺ CD90 ⁻ | 2 / 17 | |
| EpCAM ⁻ CD90 ⁺ | 6 / 12 | |
| EpCAM ⁺ CD90 ⁺ | 2 / 16 | 0.014 |

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7)、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8)。

図7 マイクロアレイ解析

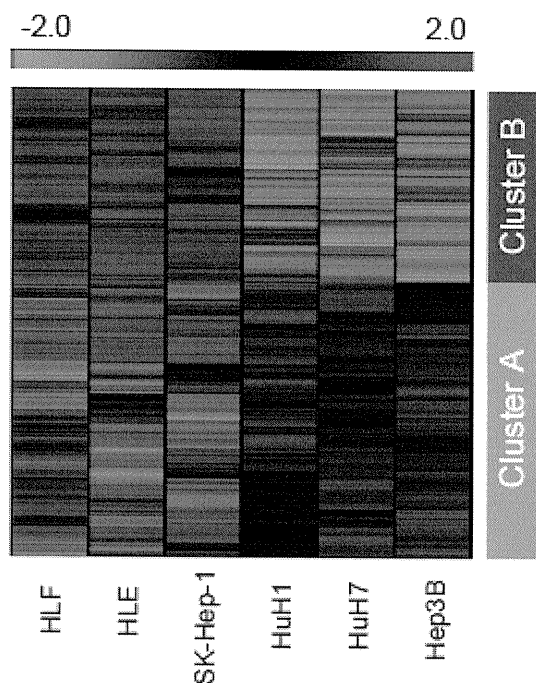
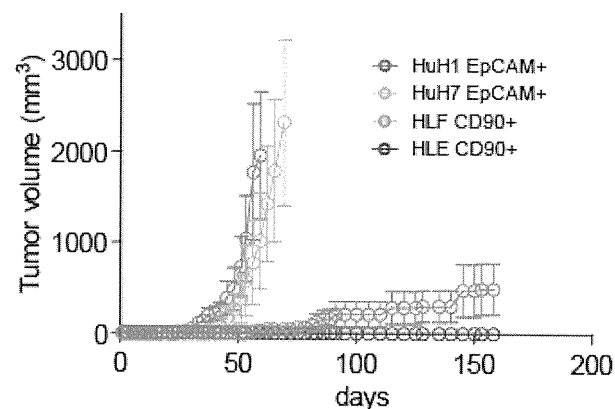


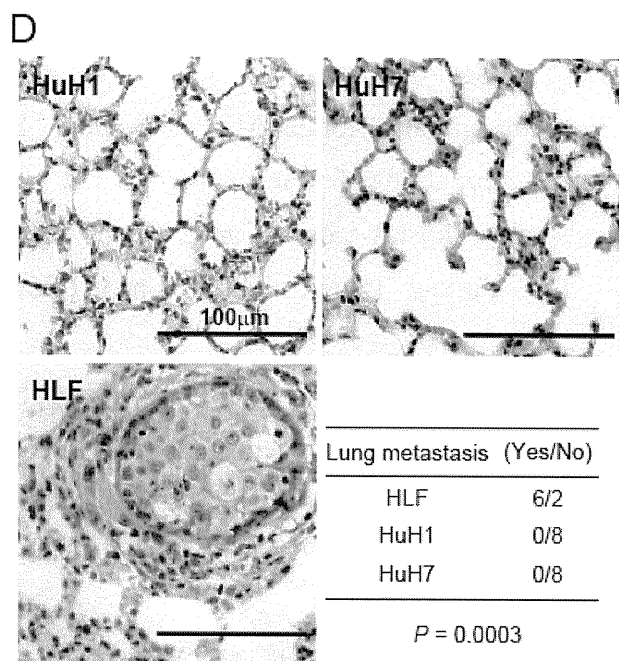
図8 免疫不全マウス移植モデル



興味深いことに、CD90陽性細胞は局所に

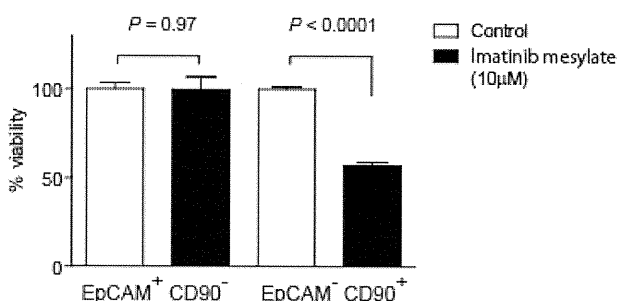
おける腫瘍形成能力には劣るものの、転移能力が高く、統計学的に有意に肺転移が認められた (図 9)

図 9 H&E 染色およびカイ2乗検定



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 10)。

図 10 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をこれまでに我々は報告してきた。一方 EpCAM 陽性細胞が 5-FU などの殺細胞性の抗がん剤に対して抵抗性を示すことも我々は明らかにしてきた。このような抗がん剤抵抗性を呈するがん幹細胞に対して、どのような治療ストラテジーを構築していくか、現在活発に議論されている。

OSM は OSMR を介して STAT3 のリン酸化と引き続くシグナル伝達系の活性化を起こすことが知られているが、IL-6 とは異なり OSM-OSMR 特異的な肝細胞系への分化誘導を起こすとされている。興味深いことに OSMR は幹細胞性の高いがん細胞で強発現しており、OSM に反応してより肝細胞系への分化誘導を行う一方、細胞周期はむしろ活性化し S 期の細胞数の増加が認められた。すなわち、がん幹細胞の分化誘導単独では S 期の細胞数の増加は起こるものの十分な抗腫瘍効果が得られない可能性がある。一方、OSM は dormant で抗がん剤抵抗性を示すがん幹細胞に対し細胞周期回転を上げることで S 期を標的とする殺細胞性抗がん剤の感受性を亢進させている可能性があり、OSM によるがん幹細胞の分化誘導と 5-FU による非がん幹細胞の殺細胞効果を組み合わせることにより、より有効な悪性度の高い肝細胞がんの治療に結びつく可能性が示唆された。

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+OSM 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

OSMR は幹細胞タイプの肝細胞がんにおける 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。一方 CD90 陽性肝がん幹細胞は EpCAM 陽性がん幹細胞とは独立して存在し、高い遠隔臓器転移能力と imatinib mesylate に対する感受性を示した。肝がん幹細胞は生物学的に多様な集団であり、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すことから、がん幹細胞の特徴に応じたテーラーメイド医療が肝細胞がん治療に重要であると考えられた。

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.
- 5) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells.

- In: Molecular Genetics of Liver Neoplasia. Springer pp301–317, 2010.
- 6) Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, and Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2010;95:217-23.
- 7) Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, and Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010;70:4687-97.
- 8) Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, and Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2010; 30(3): 438-46.
- 9) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2010; 126(9): 2164-74
- 10) Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, and Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49(4): 1098-112
- 11) Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, and Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology.* 2009; 136(3):1012-24
- 12) Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, and Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2009; 50(1):100-10.
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
- 5) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Signaling pathways responsible for self-renewal and differentiation in liver cancer stem cells. Japanese Cancer Association Annual Meeting 2010, Osaka, 2010.
- 6) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Heterogeneity and Hierarchy of Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2010, Boston, U.S.A., 2011.
- 7) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. American Association of Cancer Research 101st Annual Meeting 2010, Washington DC, U.S.A., 2010.
- 8) 山下太郎、本多政夫、金子周一 Oncostatin M を用いた幹細胞様肝癌の分化誘導療法の検討、日本肝臓学会総会、山形、2010年.
- 9) Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor initiating cells with stem/progenitor cell features. American Association of Cancer Research 100th Annual Meeting, Los Angeles, U.S.A. 2009.
- 10) 山下太郎、本多政夫、金子周一 ゲノミクスからみた肝細胞癌の幹細胞性とその診断、治療への応用、犬山シンポジウム、犬山、2009年
- 11) 山下太郎、本多政夫、金子周一 EpCAM を用いた肝細胞癌分類の確立、肝癌幹細胞の同定とその治療への応用、日本肝臓学会総会、神戸、2009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
特記事項なし

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）と同時に各種の樹状細胞〔1）未熟群、2）ペプチド刺激群、3）免疫賦活物質OK-432刺激群〕を投与する安全性臨床研究を行った。治療後12カ月以内の再発率は、OK-432刺激群において有意に低下した（Kaplan-Meier法： $P < 0.05$ ）。この治療効果について、Bio-Plex法などを用いた検討結果からTh1サイトカイン（IL-9, IL-15, $TNF\alpha$ ）の産生や骨髄由来抑制細胞（MDSC）の減弱作用によって二次発がんの抑制効果が発揮される可能性が示唆された。さらに、肝がん患者に対する樹状細胞を調整する手法の工夫として、OK-432と同時に亜鉛（Zn）を用いることによって、樹状細胞の活性化、貪食能が亢進することを見出した。これより、樹状細胞を用いた免疫治療が肝がんの二次発がん対策として寄与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）と同時に樹状細胞を投与する手法が安全に施行できることを報告した。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、調整法の異なる樹状細胞を用いた際の安全性臨床研究を行うとともに抗腫瘍免疫の反応性に関して検討した。

B. 研究方法

肝がん合併C型肝硬変症例に対して、TAEの際にそれぞれの調整法（未刺激、ペプチド、免疫賦活物質OK-432）によって刺激した樹状細胞を投与し、治療後にラジオ波焼灼療法（RFA）を追加した。誘導した樹状細胞の機能的な検討として、抗原取込能、サイトカイン産生、細胞障害活性を定量した。投与後の免疫賦活作用は、血清中サイトカイン濃度（Bio-Plex法）、CTL活性（ELISPOT法）によって評価した。また、樹状細胞の誘導法に関して、OK-432（0.1 KE/ml）に加えて亜鉛（Polaprezinc 0.1mM）を添加する手法を検討した。

（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) 樹状細胞の各種調整法においては、OK-432 刺激によって抗原取込能は低下したものの、著明な IL-12、IFN- γ 産生能を示し、肝がん細胞株 (Hep3B, PLC/PRF/5) に対する高い細胞障害活性を認めた。

2) 樹状細胞投与に関する臨床的安全性について、OK-432 群で発熱が多くみられる傾向にあったが、その他の重篤な副反応、有害事象は認めなかった。

3) 治療後 12 カ月以内の再発率に関して、OK-432 刺激樹状細胞を投与した群において有意に低下した (Kaplan-Meier 法: $P < 0.05$)。

4) 治療による血清サイトカイン濃度の推移は、OK-432 群において IL-9, IL-15, TNF- α の上昇を認めた。また、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) を反映する血清アルギナーゼ活性については、治療後の経過で低下傾向を示した。

5) OK-432 と亜鉛を同時に用いる樹状細胞の調整法によって、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した。

D. 考察

樹状細胞は、がん細胞を含めた標的細胞のアポトーシス (細胞死) を認識すると、

活性化してその標的に対する強い免疫反応を誘導することが知られている。本研究においては、TAE によって細胞死に陥った肝がん組織に樹状細胞を直接投与した。これより、標的であるがん細胞に対する抗腫瘍免疫反応を誘導する最適の微小環境を構築した。

治療に用いる樹状細胞の調整法に関しては、GMP グレードで利用できる多くの技術開発が進められており、本研究では代表的な方法としてペプチド刺激と免疫賦活物質 OK-432 を用いた。その結果、OK-432 刺激樹状細胞を投与することによって、治療後の無再発期間が延長し抗腫瘍効果が増強したものと考えられた。そして、抗腫瘍効果を誘導した免疫機構として、Th1 サイトカインや抑制性免疫細胞への作用によってワクチン効果を発揮した可能性が示唆された。

さらに、免疫賦活作用の高い樹状細胞の調整法として、亜鉛を OK-432 と同時に用いる手法について検討した。その結果、樹状細胞の活性化、貪食能が亢進することから、抗腫瘍免疫を高める新たな治療法となることが期待された。

E. 結論

肝がん合併 C 型肝硬変症例に対する TAE と併用して、免疫賦活物質によって刺激した樹状細胞を投与することは、二次発がんを抑制し抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。これより、樹状細胞を用いた免疫治療が肝がんの二次発がん対策として寄与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.
- 6) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 2164-2174.
- 7) Kawano M, Nishida H, Nakamoto Y, Tsumura H and Tsuchiya H: Cryoimmunologic antitumor effects enhanced by dendritic cells in osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2010; 468: 1373-1383.
- 8) Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res.* 2010; 70: 6556-6565.
- 9) Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of