

- intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by combination of suicide gene therapy and monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* 2010; 12: 1002-1013.
- 10) Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. *Oncogene* 2010; 29: 2228-2237.
- 11) Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 2009; 183: 3053-3063.
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
- 3) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; **第61回American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010
- 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, Kaneko S: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; **International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa “Cancer and Host Response” (Satellite Symposium of 14th International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan)**: Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010
- 5) 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: #1725; Immunological factors associated with prolonged recurrence-free survival following transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; **第60回American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)**

Annual Meeting (Boston, Massachusetts):

Hepatology 50 (4, Suppl.) 1103A; 一般;
poster: Nov. 3, 2009

- 6) Kitahara M, Nakamoto Y, Mizukoshi E,
Kaneko S: #1236; Effective antitumor
immune responses of OK432-stimulated
monocyte-derived dendritic cells in patients
with hepatocellular carcinoma.; **第 60 回
American Association for the Study of
Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting
(Boston, Massachusetts):** Hepatology 50 (4,
Suppl.) 878A; 一般; poster: Nov. 1, 2009

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

- 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 愛媛大学大学院先端病態制御内科 教授

研究要旨：肝細胞癌に対する免疫療法の開発を目指して、1) 腫瘍抗原パルス樹状細胞ワクチン、2) Wilms' tumor 1 (WT1) ペプチドワクチンを用いた臨床試験を行った。いずれの臨床試験においてもGrade 3以上の有害事象はみられず、安全性が確認された。また、一部の症例では臨床効果も確認された。今後は、更に治療効果を上げるための投与法、適応症例選択の工夫が必要であると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌の予後は依然として良好とは言えず、ほとんどの症例で再発が重要な予後因子となっている。再発肝癌は既存の治療法でコントロールすることは困難であり、それを補完するような他の治療法が求められている。このような視点から癌免疫療法に期待が高まっている。今回、肝細胞癌患者に対する免疫療法の安全性と有用性を探索、評価することを目的に臨床試験を行った。

B. 研究方法

1) TACE を繰り返し施行している局所療法適応外の肝細胞癌患者に対して腫瘍抗原パルス樹状細胞(DC)を用いた免疫療法の臨床試験を行った。

アフエレーシスを用いて末梢血単核球を採取し、サイトカイン誘導下に DC を誘導した。肝細胞癌に高頻度に発現する GMP グ

レードで作成した3種類の腫瘍抗原タンパクをパルスした。TACE を施行した後に腫瘍抗原パルス DC を2週間毎に4回投与した。TACE を追加した後、腫瘍抗原パルス DC を2週毎にさらに2回投与して評価を行った。

2) 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。また、HLA-A*24:02, A*02:01, A*02:06 と高結合する WT1 ペプチドを GMP グレードで合成し、TACE を繰り返し施行している局所療法適応外の肝細胞癌患者に投与して安全性、治療効果を評価した。

(倫理面への配慮)

当該臨床試験は、愛媛大学医学部附属病院倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1) 腫瘍抗原パルス樹状細胞を用いた免疫

療法：5例を対象に行った。grade 3以上の有害事象はみられなかった。臨床効果は1例でSDが得られた。また、治療中には全例において治療前に比べて腫瘍抗原タンパクに対する特異的免疫応答の誘導がみられた。

2) 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ていた。WT1ペプチドを用いた臨床試験を18例に施行し、grade 3以上の有害事象はみられなかった。臨床効果は4例でSDが得られた。

D. 考察

今回、進行肝細胞癌症例を対象に、腫瘍抗原パルス樹状細胞、WT1ペプチドワクチンの2つの免疫療法の臨床試験を行った。両治療法とも安全性が確認されるとともに、一部の症例では治療効果も確認できた。今後は、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

肝細胞癌患者に対して腫瘍抗原パルス樹状細胞、WT1ペプチドワクチンの2つの免疫療法の臨床試験を行い、安全性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirooka M, Kisaka Y, Uesugi K, Koizumi Y, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Virtual puncture line of radiofrequency ablation for

hepatocellular carcinoma of the caudate lobe. *Am J Roentgenol* 193: W149-151, 2009.

2) Hirooka M, Koizumi Y, Kisaka Y, Abe M, Murakami H, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Mass reduction by radiofrequency ablation before hepatic arterial infusion chemotherapy improved prognosis for patients with huge hepatocellular carcinoma and portal vein thrombus. *Am J Roentgenol* 194: W221-226, 2010.

3) Yoshida O, Akbar SMF, Chen S, Miyake T, Abe M, Murakami H, Hiasa Y, Onji M. Regulatory natural killer cells in murine liver and their immunosuppressive capacity. *Liver Int* 30: 906-912, 2010.

4) 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.

5) Akbar SMF, Furukawa S, Horiike N, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 18: 408-414, 2011.

6) Chen S, Akbar SMF, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Immune suppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol* 166:134-142, 2011.

7) 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.

- 8) 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

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

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。また、肝癌幹細胞とされるepithelial cell adhesion molecule（EpCAM）陽性細胞分画では、癌細胞と比較してhuman telomerase reverse transcriptase（hTERT）が高発現していることが報告されており、癌幹細胞が極めて高い細胞老化回避能を有していることが示唆されている。そこで、我々はこのhTERTが肝癌幹細胞における治療標的として有用であると考え、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システム構築し、スクリーニングを行った。

A. 研究目的

近年、肝細胞癌においても、腫瘍形成能や治療抵抗性が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、多臓器への転移に関与していることが示唆されており、生存期間との関係性も報告されている。そのため、癌患者の予後改善のためには、この癌幹細胞の除去が重要な課題であると推測される。そこで、本研究では、HCCにおける癌幹細胞として報告されているEpCAM陽性癌幹細胞で、発現が亢進しているhTERT遺伝子に注目し、hTERT制御遺伝子の同定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

スクリーニングに用いる細胞株を選択す

るために HCC 細胞株における hTERT mRNA、タンパク発現を Real time RT-PCR 法、Western blot 法、免疫染色法を用いて確認した。また、スクリーニングの指標として hTERT 発現依存的な GFP 蛍光を用いるために、hTERT 遺伝子プロモーター配列を含む上流約 5 kbp の配列を導入した GFP 発現プラスミド DNA を構築し、これを肝癌細胞株に安定導入した。さらに、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、スクリーニングには約 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）による解析にもとづいて、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

スクリーニングに使用する肝癌細胞株を選択する為に、Real-time RT-PCR 法、Western blot、免疫染色によって肝癌細胞株における hTERT mRNA、タンパク発現を確認した。その結果、hTERT 発現は PLC/PRF/5 細胞で最も低く、HepG2 細胞で最も高いことが明らかとなった。次に、hTERT プロモーター制御性 GFP 発現プラスミド DNA を作成する為に、hTERT 遺伝子上流 5 kbp を pEGFP-1 プラスミドへ導入することでプラスミド DNA (phTERTpro-EGFP) を構築し、これを前述の 2 細胞株へ導入することで安定発現細胞株を樹立した。樹立したクローンの GFP 蛍光を観察した結果、PLC/PRF/5 の GFP 蛍光と比較して HepG2 ではより強い GFP 蛍光が観察された。また、hTERT 遺伝子を発現していない正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にこのプラスミド DNA を導入した結果、EGFP 蛍光は観察されなかった。このことから、細胞内において phTERTpro-EGFP は正常に機能していることが示唆された。次に、樹立した細胞株のうち、HepG2 細胞を使用してスクリーニングを行った。shRNA レンチウイルスライブラリー感染後に抗生物質 G418 によるセレクションを行った。セレクション後に細胞を回収し、FCM による解析を行った。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 2000 個をシングルセルソーティングによって 96 ウェルプレートに播種して観察したところ、GFP 陽性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。これらの細胞は、現在コンディションメEDIUM下で培養中であり、今後、細胞からゲノム DNA を回収し、shRNA 配列の解析後に hTERT 発現促進遺伝子の同定を行う予定である。

D. 考察

hTERT 発現制御については、これまで多数の研究が行われており、複数の発現促進遺伝子 (c-Myc, HIF1/2- α) や発現抑制遺伝子 (p53, TGF- β , Ssmad 3) が報告されている。しかし、これらの因子は未だ臨床応用されていない。また、hTERT 遺伝子が多数の因子による発現制御を受けている可能性も考えられる。これらのことから、新規 hTERT 制御遺伝子の同定が必要であると推測される。

今回のスクリーニングにおいて 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、これらのクローンを解析し、hTERT 発現制御遺伝子を同定されると期待される。また、今回のスクリーニングに使用した shRNA ライブラリーは、前述の MYC や HIF1- α を標的として含んでいる為、新規遺伝子のみでなく、これら既存の遺伝子がノックダウンされたクローンも含んでいる可能性が考えられる。また、GFP 蛍光陰性細胞の培養過程において、こ

これらの細胞は GFP 陽性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。今後、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 発現は変動させずに GFP 蛍光のみが変化する実験系を構築でき、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、hTERT プロモーター制御性 GFP 蛍光レポータープラスミドを構築し、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た。さらに、hTERT 高発現肝癌細胞株 HepG2/hTERT_{pro}-EGFP におけるスクリーニングを行い、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：肝細胞癌に対するソラフェニブ単剤療法の効果は限定的であり，さらなる治療効果の改善が望まれている．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．一方，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

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現在，

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, Sorafenib 400 mg bid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) Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka

O. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol*. 2010 Jan;52(1):72-8.

- 5) 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.
 - 6) Nakamoto S, Kanda T, Yonemitsu Y, Arai M, Fujiwara K, Fukai K, Kanai F, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis C amino acid substitutions 70 and 91 in the core coding region by real-time amplification refractory mutation system reverse transcription-polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(7):872-7.
 - 7) Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Lett*. 2009 Dec 28;286(2):145-53.
 - 8) Fujimoto T, Tomizawa M, Yokosuka O. SiRNA of frizzled-9 suppresses proliferation and motility of hepatoma cells. *Int J Oncol*. 2009 Oct;35(4):861-6.
- ### 2. 学会発表
- 1) Ogasawara S, Ooka 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 回日本肝癌分子標的治療研究会, 2011. 下関 (第 3 回日本肝癌分子標的治療研究会抄録集 p60)
- 4) 小笠原定久, 金井文彦, 鳥谷部武志, 篠崎勇介, 大岡美彦, 岡部真一郎, 吉川正治, 横須賀収. 当科にてソラフェニブにより肝機能障害を認めた 3 例. 第 1 回日本肝癌分子標的治療研究会, 2010, 神戸. (第 1 回日本肝癌分子標的治療研究会抄録集 p76)
- 5) 小笠原定久, 金井文彦, 佐藤新平, 小尾俊太郎, 山口武人, 畔元亮作, 水本英明, 森本直樹, 平田信人, 鳥谷部武志, 篠崎勇介, 大岡美彦, 三方林太郎, 岡部真一郎, 吉川正治, 横須賀収. 進行肝細胞癌におけるソラフェニブに関する多施設調査研究. 第 1 回日本肝癌分子標的治療研究会, 2010, 神戸. (第 1 回日本肝癌分子標的治療研究会抄録集 p77)
- 6) 大岡美彦, 金井文彦, 小笠原定久, 鳥谷部武志, 篠崎勇介, 多田基久, 千葉哲博, 岡部真一郎, 吉川正治, 横須賀収.

進行肝細胞癌を対象とした TS-1+ソラフェニブ併用療法の第 I 相試験. 第 1 回日本肝癌分子標的治療研究会, 2010, 神戸. (第 1 回日本肝癌分子標的治療研究会抄録集 p81)

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 山口大学大学院消化器病態内科学 准教授

研究要旨： Maidは細胞の分化、増殖に関与する分子であり、Maidノックアウトマウスで肝発癌が認められることから、肝発癌に関与していることが考えられる。またTGF-betaのシグナルを抑制することが知られている。Maid KOマウスを作製し四塩化炭素投与したところ、細胞増殖性の亢進、線維化の亢進が認められた。また大量スクリーニングが可能な魚類においてMaidの解析を行い、Maidは細胞の分化、増殖に関与し、肝癌抑制に関与することがわかった。Maidを制御することで肝発がんの予防ができる可能性が考えられる。さらに老化に関わるSMP30/RGNを行った。 mRNAの発現は老化に伴って低下し部分肝切除後肝および急性障害肝でSMP30/RGNの発現が低下した。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。

A. 研究目的

我々はこれまでにHuman Homologue of Maid (HHM)が、肝臓特異的な遺伝子発現制御、ヒト肝前癌性病変のマーカーになりうることにについて報告している。またHHMが発癌制御に関与していること、TGF-betaの調節に関与していることが考えられることから、HHMを用いた発癌制御、線維化抑制を検討する。また癌抑制と細胞老化について着目し、老化関連分子であるSMP30の解析も行った。

B. 研究方法

Maid ノックアウトマウスを作製し、四塩化炭素を腹腔内投与して評価した。魚類ではDENを含む水で飼育し、細胞増殖性を評価した。

(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

DEN 処理により得られたゼブラフィッシュ肝で Maid は癌前癌性病変で発現が増加し、HCC などの癌では発現が低下していた。Maid を過剰発現させたトランスジェニックメダカを DEN 処理したところ、BrdU 陽性細胞数が少なかった。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、Ki67 陽性細胞の増加、EpCAM 陽性細胞は減少が認められた。一方 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

D. 考察

Maid は肝発癌制御に関与していると考えられており、四塩化炭素投与で細胞増殖性が亢進していること、メダカでの Maid の過剰発現で細胞増殖性の低下がみられることから Maid は細胞増殖抑制に働くことが考えられる。DEN 処理で得られた肝組織でも Foci では発現が高く、HCC などの癌部では発現が低いことが免疫組織染色で確認できたことから発癌制御に関わっていると考えられる。また HHM は細胆管癌でも HHM 陽性の細胞の存在を確認しており、HHM は肝臓における幹細胞、癌幹細胞の発生を制御している可能性が示唆される。また SMP30/RGN は老化、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。

E. 結論

Maid シグナルは線維化と肝前駆細胞の増殖の両方に関与する重要なシグナルである。SMP30 は老化、急性肝障害、肝再生および肝発癌に関与する分子である。

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
- 3) Terai S. Fish model leads to new findings in liver disease. *Hepatology Res* 40:111-113, 2010

2. 学会発表

- 1) 藤澤浩一、寺井崇二、山本直樹、佐伯一成、高見太郎、坂井田功 ゼブラフィッシュ Maid は肝腫瘍のマーカー分子である 第46回日本肝臓学会総会 山形 2010年
- 2) 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).
- 3) 山本直樹、寺井崇二、坂井田功 骨髄由来肝幹細胞の肝硬変修復時における様々な動態と微細構造解析 第9回日本再生医療学会総会 広島 2010年
- 4) Terai Shuji, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao. Disruption of Maid accelerates liver fibrosis and cell proliferation in CCl4 induced cirrhosis mice. AASLD Liver meeting 2010 (Boston) 2010年
- 5) 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)

6) 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

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 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： NKT細胞を活性化する α -GalCerは肝臓内樹状細胞の抗原提示能と獲得免疫誘導能を増強した。 α -GalCerの投与は肝臓内の腫瘍に対して強いp53特異的な細胞障害活性を誘導した。ソラフェニブは腫瘍特異的にMcl-1の発現を抑制したが、同時にBcl-xL阻害剤であるのABT-737を投与することにより、アポトーシスが誘導され、強力な抗腫瘍効果が誘導された。肝がん治療にはアポトーシスを標的とした殺細胞的な抗腫瘍治療法の開発とともに、自然免疫を介した獲得免疫応答の誘導戦略の双方が重要であることが示された。

共同研究者

巽 智秀 大阪大学消化器内科学

疋田隼人 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

肝臓内を構成しているリンパ球は、他臓器に比較してNKT細胞やNK細胞といった先天免疫細胞の比率が高く、これら先天免疫細胞を活性化することで、肝内微小肝癌の転移を抑制することが期待される。 α -galactosylceramide (α -GalCer)の生体への投与は、樹状細胞に取り込まれNKT細胞を活性化し、引き続いてNK細胞の活性化がおこり先天免疫が活性化されるが、獲得免疫の誘導に関して詳細は不明である。より強力な先天免疫の活性化とそれに続く獲得免疫の誘導を目指して、本研究では α -GalCerによる肝がん治療後の獲得免疫メカニズムを検討した。

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検討した。

B. 研究方法

BALB/c マウスにおいて p53 抗原を発現する CMS4 細胞による肝腫瘍あるいは脾腫瘍を作成した。 α -GalCer にてこれらの腫瘍の治療後 14 日目に単離した脾臓の CD8 陽性 T 細胞を用いて、p53 抗原由来ペプチド特異的 CTL の誘導を IFN γ ELISPOT 法にて検討した。また肝・脾腫瘍治療後 14 日目に CMS4 細胞を右背部の皮下に再移植し、

その腫瘍径を経時的に測定することで、CMS4 腫瘍特異的獲得免疫の誘導を評価した。

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

α -GalCer による治療の結果、CMS4 肝腫瘍治療後の方が CMS4 脾腫瘍治療後に比して、より強い p53 特異的 CTL が誘導された。CMS4 皮下腫瘍再移植実験においても、CMS4 肝腫瘍治療後の方が CMS4 脾腫瘍治療後に比して、皮下腫瘍の増大が抑制される傾向にあった。 α -GalCer 投与により肝 DC 数は有意に増加し、特に CD11b(+)CD8(-) である conventional DC の増加を認めた。一方脾 DC では有意な変化は認められなかった。抗原提示関連分子の発現は肝 DC 及び脾 DC いずれも α -GalCer 投与により有意に増加し、両者に有意な差は認められなかった。肝 DC では IL-12、TNF α などの Th1 系サイトカインの著明な産生を認めたが、脾 DC ではこれらの産生は低かった。MLR においても α -GalCer 投与後の肝 DC の

方が脾 DC に比して抗原提示能が高かった。また p53 ペプチド-DC ワクチンの結果、肝 DC は脾 DC に比して有意に高い抗原特異的な CTL 誘導能を示した。

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

α -GalCer 投与により、脾 DC に比して肝 DC はより効率良く活性化し、強い抗原提示能や獲得免疫誘導能を呈した。さらに引き続いて肝獲得免疫も効率良く誘導されることが明らかとなった。以上の結果は α -GalCer を用いた癌免疫治療が肝腫瘍に対して有効である可能性を示唆するもので

あった。

Bcl-xL と Mc1-1 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 Mc1-1 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

本研究結果は、NKT 細胞を介した肝がんに対する癌免疫誘導の詳細なメカニズムの一端を明らかにするとともに、ABT-737 がソラフェニブによる抗腫瘍効果を増強することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Yamamoto M, Ohkawa K, Miyagi T, Hayashi N. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment **Journal of Hepatology** **50: 1155-1162, 2009.**
- 2) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer chemotherapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research** **69: 8050-8057, 2009.**
- 3) Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Mochizuki K, Yakushijin T, Kurashige N, Inoue Y, Igura T, Imanaka K, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Effect of interferon- α 2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. **Hepatology Research** **39: 432-438, 2009.**
- 4) Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural Killer cell is a major producer of interferon γ that is critical for the IL-12-induced antitumor effect in mice **Cancer Immunology, Immunotherapy** **59: 453-463, 2010.**
- 5) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology** **52: 1310-1321, 2010.**
- 6) 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.**

7) 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.**

8) 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

1) 第96回日本消化器病学会総会 2010年4月22日（木）～24日（金）新潟県民会館、新潟市民芸術文化会館、新潟市音楽文化会館、朱鷺メッセ シンポジウム5：消化器癌に対する分子標的治療の現状 S5-7 肝細胞癌におけるBcl-xL及びMcl-1をターゲットとした分子標的治療 疋田隼人、竹原徹郎、林 紀夫

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の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。結果、Child-Pugh A 40例、Child-Pugh 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（但し、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、又は拳児を希望する
- (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。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 ヶ月、3 ヶ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 ヶ月、生存期間中央値 3.0 ヶ月、1 例で食道静脈瘤出血による肝不全死を認めた。

D. 考察