

厚生労働省科学研究費(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書

C型肝炎における PEGIFN/Ribavirin 併用療法後の発癌に関連する  
臨床的背景因子の解析

研究分担者 片野義明 名古屋大学医学部附属病院消化器内科 講師

研究要旨:IFN 治療後においても発癌例はあり、発癌症例の特徴を解明することは、治療後のフォローアップの仕方を考えるうえで有用である。PEGIFN  $\alpha$ /Ribavirin (RBV) 併用療法を行った C 型慢性肝炎患者のうち、治療効果および発癌の有無につき追跡調査しえた 1395 例(男/女:733/662、1 型/2 型:888/507、平均年齢 53.6 歳)を対象とし、発癌症例と非発癌症例との背景因子を比較検討した。PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 0.6%、3 年 3.8%、5 年 5.4%であり、62 例で発癌が認められた。発癌に関与する最も大きな因子は年齢であり、その他治療終了後 ALT 値、治療前 Alb 値、血小板数が有意な因子であった。高齢者の PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法の治療効果は非高齢者に比し低い、SVR が得られると発癌率は低下し、病態が進行している症例より発癌抑制効果みられた。一方、SVR が得られても発癌に年齢の因子は大きく関与しており、高齢者、線維化進展例においてはよりきめ細かなフォローアップが必要である。

A.研究目的

PEGIFN  $\alpha$ /Ribavirin (RBV) 併用治療例における発癌に関与する背景因子を検討する。またウイルスが駆除できた (Sustained virologic response:SVR) としても発癌した症例の特徴を明らかにし、PEGIFN  $\alpha$ /RBV 治療後のフォローアップの仕方の検討する。

B.研究方法

2004 年 12 月から 2011 年 5 月の間に名古屋大学および関連施設において、PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法を施行し、治療効果および発癌の有無につき追跡調査しえた C 型慢性肝炎 1395 例(男/女:733/662、1 型/2 型:888/507、平均年齢

53.6 歳、観察期間中央値 47.7 ヶ月)を対象とし、発癌に関与する宿主因子およびウイルス因子を Cox 比例ハザードモデルおよび Kaplan-Meier を用いて解析した。65 歳以上の高齢者は男性 133 例、女性 132 例であった。

(倫理面の配慮)

検体は匿名化し、個人情報守秘については十分注意を払った。

C.研究結果

PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法の SVR 率は、全体で 58.1%であり、1 型、2 型はそれぞれ 47.2%、77.1%であった。

PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法後の発癌率は、1 年 0.6%、2 年 1.4%、3 年 3.7%、4 年

4.8%、5年5.9%であった。

62例で発癌が認められた。発癌例は非発癌例に比し、有意に男性が多く、年齢が高く、肝組織進展例が多く、1型が多く、血小板数が低く、Alb値が低く、ヒアルロン酸値が高く、非SVR例が多く、治療終了24週後のALT値が低かった。PEGIFN $\alpha$ /RBV併用療法の治療効果に大きく関与するIL28B遺伝子多型は有意差を認めなかった。また、1型においては、有意にCore70アミノ酸が変異している例が多かった。多変量解析では年齢が最も有意な因子であり、その他治療終了後ALT値、Alb値、血小板数が有意な因子であった。

高齢者の5年発癌率は14.7%で非高齢者例の3.1%に比し有意に高かった( $p < 0.0001$ )。高齢者におけるPEGIFN $\alpha$ /RBV併用療法のSVR率は、1型で32.6%、2型で61.9%であり、非高齢者の50.9%、80.1%に比し有意に低かった。PEGIFN/RBV併用療法の治療効果別5年発癌率は、SVR例で2.1%であったが、再燃例8.5%、無効例10.1%であり、再燃例と無効例には有意差はみられなかった。非高齢者における治療効果別5年発癌率はSVR例2.1%、再燃例4.9%、無効例5.2%であり、再燃例と無効例に有意差はなかったが、高齢者においては、SVR例で4.7%であったが、再燃例18.2%、無効例27.7%であり、再燃例と無効例にも有意差がみられた。高齢者において、病態が進行していると考えられる血小板数15万未満例の5年発癌率は、SVR例6.2%、再燃例22.9%、無効例38.8%で治療効果により有意に発癌が抑制された( $p = 0.0038$ )。また、治療終了後ALT値30未満例の発癌率は8.7%であったが30以上例は45.5%で有

意に発癌が抑制された( $p < 0.001$ )。

SVR例では15例に発癌が認められた。SVR例における発癌例と非発癌例の比較では、発癌例は有意に男性が多く、年齢が高く、線維化が進展しており、フェリチン値が高値であった。47例に発癌が認められた非SVR例においても、発癌例は男性の割合が高く、年齢が高く、線維化進展例が多かったが、他に血小板数、Alb値が低値であった。1型におけるCore70アミノ酸変異は、SVR例では有意差はなかったが、非SVR例では発癌例で変異型の比率が高かった。

#### D. 考察

今回PEGIFN $\alpha$ /RBV併用療法後の発癌に関して解析できたのは、PEGIFN $\alpha$ /RBV併用療法を行った患者のうち半数に満たないが、患者背景の各因子はほぼ同等であり、母集団を反映しているものと考えられる。

PEGIFN/RBV併用療法後でも、IFN治療歴のない患者と同様男性、高齢者、肝線維化進展例は発癌率が高い。

単変量解析では2型に比し1型で有意に発癌率が高かったが、PEGIFN $\alpha$ /RBV併用療法の治療効果別に検討するとSVR例、非SVR例ともgenotype間に差はなく、治療効果の影響によるところが大きいと考えられた。一方、1型におけるCore70アミノ酸変異に関しては、変異型は野生型に比しPEGIFN $\alpha$ /RBV併用療法の治療効果は有意に低い非SVR例における発癌例ではcore70アミノ酸変異例が多く、自然経過例と同様これらの症例はより発癌には注意を要すると思われた。

高齢者は非高齢者に比し、SVR率は低

値であり、また有意に累積発癌率が高かった。しかし、高齢者であっても SVR が得られると発癌率は低下した。血小板数低値例は線維化が進展していると考えられるが、SVR が得られると高齢者においてはより発癌率が低下した。また、全体では再燃例と無効例では発癌率に有意差が見られなかったが、高齢者においては再燃例でも無効例に比し発癌率は有意に抑制されていた。

SVR が得られやすいのは、年齢が低く、肝線維化が軽度で、血球数が多く、十分量の治療ができる患者であり、発癌抑制を考えると、早期に IFN 治療を考慮することが望ましいが、忍容性があれば高齢者でも PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法は試みるべきと考えられた。PEGIFN  $\alpha$ /RBV 治療後の経過については、今回は治療終了 24 週後の ALT 値で検討したが、ALT 値が低い方が発癌率は低く、再燃、無効例においても ALT 値を低く維持する必要がある。

一方、SVR が得られても発癌に年齢の因子は大きく関与しており、高齢者、線維化進展例においてはよりきめ細かなフォローアップが必要である。また、治療前の値ではあるがフェリチン値が高値であり、酸化ストレスの関与も示唆された。

## E. 結論

高齢者の SVR 率は低いが、SVR が得られると有意に発癌率は低下し、忍容性があれば高齢者でも PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法は試みるべきである。しかし、SVR 例でも高齢者、肝線維化進展例は発癌に十分注意する必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Hayashi K., Ishigami M., Itoh A., Hirooka Y., Nakano I., Ishikawa T., Toyoda K., Kumada T., Yamamoto K., Matsushita T., Kojima T., Takamatsu J., Goto H. Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. *J Med Virol.* 85.228-234.2013
- 2) Hayashi K., Katano Y., Kuzuya T., Tachi Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. *J Med Virol.* 84.438-444.2012.
- 3) Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y., Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J Med Virol.* 84.61-70.2012.

- 4) Ishizu Y, Katano Y, Honda T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Goto H. Clinical impact of HFE mutations in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 27.1112-1116.2012.
- 5) Yokozaki S, Katano Y, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Goto H. Mutations in two PKR-binding domains in chronic hepatitis C of genotype 3a and correlation with viral loads and interferon responsiveness. *J Med Virol.* 83.1727-1732.2011.
- 6) Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int.* 31.1359-1365.2011.
- 7) Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peg-interferon and ribavirin dose not induce a therapeutically resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the IL28B gene. *J Med Virol.* 83.1559-1564.2011.
- 8) Hayashi K, Katano Y, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b and correlation with response to pegylated-interferon- alpha 2b and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat.* 18.280-286.2011.
- 9) Ishigami M, Hayashi K, Katano Y, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Impact of early elevation of serum bilirubin during treatment with pegylated interferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 40.963-970.2010.
- 10) Toyoda H, Kumada T, Tada T, Arakawa T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H. Association between HCV amino acid substitutions and outcome of peginterferon and ribavirin combination therapy in HCV genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol Hepatol.* 25.1072-1078.2010.
- 11) Tachi Y, Katano Y, Honda T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Samejima Y, Goto H. Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and hepatic oxidative stress. *Liver Int.* 30.554-559.2010.

12) Honda T, Katano Y, Shimizu J, Ishizu Y, Doizaki M, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Efficacy of peginterferon- alfa 2b plus ribavirin in patients aged 65 years and older with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 30:527-537.2010.

## 2.学会発表

- 1) 石津洋二、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、葛谷貞二、館佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、中野功、後藤秀実:C型慢性肝炎患者に対するペグインターフェロン・リバビリン療法におけるHFE遺伝子変異の影響 第48回日本肝臓学会総会 総会 金沢 2012.6.
- 2) 館佳彦、片野義明、後藤秀実、中野聡、増田寛子、石津洋二、葛谷貞二、本多隆、林和彦、石上雅敏、小野幸矢、鮫島庸一:C型慢性肝炎患者における肝酸化ストレスの肝発癌に対しての関連性についての検討 第48回日本肝臓学会総会 総会 金沢 2012.6.
- 3) 本多隆、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、石津洋二、葛谷貞二、館佳彦、林和彦、石上雅敏、中野功、石川哲也、後藤秀実:C型肝炎線維化進展例におけるペグインターフェロン/リバビリン併用療法の発癌抑制効果 ワークショップ 23 C型肝炎硬変患者に対する治療の現状と展開 第48回日本肝臓学会総会 総会 金沢 2012.6.
- 4) Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Hayashi K., Ishigami M., Nakano I., Toyoda H., Kumada T., Yoshioka K., Goto H. Effect of combination therapy peginterferon alfa-2b and ribavirin on prevention of hepatocellular carcinoma in advanced chronic hepatitis C. The 63<sup>rd</sup> American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2012.11
- 5) Tachi Y., Goto H., Katano Y., Hayashi K. Hepatic oxidative stress is associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who received peg-interferon plus ribavirin combination therapy. The 63<sup>rd</sup> American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2012.11.
- 6) 片野義明、石上雅敏、後藤秀実:C型慢性肝炎に対する発癌を考慮した治療戦略 第16回日本肝臓学会大会 シンポジウム 2 C型肝炎治療の最前線 神戸 2012.10.
- 7) 本多隆、片野義明、後藤秀実:高齢者C型慢性肝炎におけるペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と発癌抑制効果 第16回日本肝臓学会大会 ワークショップ 2 高齢者のC型肝炎—どう扱うか? 神戸 2012.10.
- 8) 林和彦、片野義明、後藤秀実:IL28B、C型肝炎ウイルス変異を解析したC型慢性肝炎に対するペグインターフェロン $\alpha$  2b+リバビリン併用療法の治療効果における鉄調節因子ヘプシジンの役割について 第14回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション7 代謝異常(金

- 属代謝を含む)からみた C 型肝炎の病態解析 横浜 2010.10.
- 9) 小野幸矢、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、舘佳彦、岩田浩史、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、及部祐加子、藤田芳和、後藤秀実:透過型電子顕微鏡(TEM)で見た、C 型慢性肝炎の肝組織内の微量元素から考察した、金属代謝についての検討 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10.
- 10) 舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、後藤秀実、鮫島庸一:C 型慢性肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の有効性における治療前 CD4 陽性 T 細胞数の影響について 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10.
- 11) Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Nakano I, Goto H. Association between a single-nucleotide polymorphism of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. 61<sup>st</sup> The American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2010.11.
- 12) Honda T, Katano Y, Hayashi K., Ishigami M., Ito A., Hirooka Y., Goto H. Additional effect of ribavirin during peginterferon and ribavirin combination therapy in coagulation factor. DDW2011 American Association for the Study of Liver Diseases Chicago 2011.5
- 13) 林和彦、片野義明、中野功、石上雅敏、本多隆、舘佳彦、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、林寛子、豊田秀徳、熊田卓、浦野文博、吉岡健太郎、後藤秀実:C 型慢性肝炎における NS3 領域の変異についての検討 第 97 回日本消化器病学会総会 東京 2011.5
- 14) 舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、林寛子、後藤秀実、鮫島庸一:標準的 BMI を有する C 型慢性肝炎患者における肝脂肪化の PEG-IFN  $\alpha$  -2b、RBV 併用療法の治療効果への関連性についての検討 第 47 回日本肝臓学会総会 東京 2011.6
- 15) 石上雅敏、片野義明、後藤秀実: Genotype2、3 型高ウイルス症例における PEG-IFN+Ribavirin 併用療法における SVR に至らなかつた症例での要因の検討 第 47 回日本肝臓学会総会 東京 2011.6
- 16) 本多隆、片野義明、林寛子、及部祐加子、小野幸矢、石津洋二、清水潤一、土居崎正雄、舘佳彦、林和彦、石上雅敏、中野功、石川哲也、後藤秀実:ペグインターフェロン、リバビリン併用療法における凝固因子の検討 第 47 回日本肝臓学会総会 東京 2011.6
- 17) 石津洋二、及部祐加子、林寛子、小野幸矢、清水潤一、土居崎正雄、舘佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、片野義明、後藤秀実:高フェリチン血症を伴う慢性 C 型肝炎患者の臨床的特徴 第 47 回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

- 18) 石津洋二、片野義明、後藤秀実: C 型慢性肝炎患者における鉄過剰と HFE 遺伝子変異、hepcidin との関連性 第 15 回日本肝臓学会大会 シンポジウム 14 代謝性・遺伝性肝疾患研究の進歩 福岡 2011.10
- 19) 舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、葛谷貞二、土居崎正雄、石津洋二、及部祐加子、増田寛子、中野聡、後藤秀実: C 型慢性肝炎患者における IL28B 遺伝子多型及び Core70 アミノ酸置換の肝脂肪化への影響と PEG-IFN、RBV 併用療法への関連性 第 15 回日本肝臓学会大会 福岡 2011.10
- 20) 増田寛子、中野聡、及部祐加子、石津洋二、土居崎正雄、舘佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、片野義明、後藤秀実: C 型慢性肝炎のインターフェロン治療後著効例の発癌の検討 第 15 回日本肝臓学会大会 福岡 2011.10
- 21) 本多隆、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、小野幸矢、石津洋二、土居崎正雄、葛谷貞二、舘佳彦、林和彦、石上雅敏、中野功、石川哲也、後藤秀実: 高齢者 C 型慢性肝炎におけるペグインターフェロン/リバビリン併用療法の発癌抑制効果 第 53 回日本消化病学会大会 福岡 2011.10
- 22) Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Tachi Y., Hayashi K., Ishigami M., Nakano I., Goto H. Efficacy of combination therapy peginterferon alfa-2b and ribavirin on prevention of hepatocellular carcinoma in older patients with chronic hepatitis C. The 62<sup>nd</sup> American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco 2011.11
- 23) Hayashi K., Katano Y., Honda T., Ishigami M., Goto H., Toyoda H., Kumada T. Association between a single-nucleotide polymorphism of interleukin 28B and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. The 62<sup>nd</sup> American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco 2011.11
- 24) Tachi Y., Ishigami M., Hayashi K., Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Goto H. The substitutions in amino acid 70 in the hepatitis C virus genotype 1b core region correlate with liver steatosis and insulin resistance in non-obese patients with chronic hepatitis C. The 62<sup>nd</sup> American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco 2011.11
- 25) 片野義明、林和彦、後藤秀実: 1 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する新薬を考慮した治療戦略 第 39 回日本肝臓学会西部会 シンポジウム 1 テーラーメイド医療時代の C 型肝炎治療戦略 岡山 2011.12
- 26) 林和彦、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、石津洋二、葛谷貞二、舘佳彦、石上雅敏、中野功、豊田秀徳、熊田卓、後藤秀実: C 型慢性肝炎 (genotype2) に対するペグインターフェロン  $\alpha$  2b・リバビリン併用療法の効果

とインターフェロン感受性決定領域、IL28B について 第 39 回日本肝臓学会西部会 岡山 2011.12

- 27) 増田寛子、中野聡、及部祐加子、石津洋二、葛谷貞二、舘佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、片野義明、後藤秀実:C 型慢性肝炎のインターフェロン治療後の発癌の検討 第 39 回日本肝臓学会西部会 岡山 2011.12
- 28) 林和彦、片野義明、後藤秀実:IL28B、C 型肝炎ウイルス変異を解析した C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン  $\alpha$  2b+リバビリン併用療法の治療効果における鉄調節因子ヘプシジンの役割について 第 14 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション7 代謝異常(金属代謝を含む)からみた C 型肝炎の病態解析 横浜 2010.10
- 29) 小野幸矢、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、舘佳彦、岩田浩史、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、及部祐加子、藤田芳和、後藤秀実:透過型電子顕微鏡(TEM)で見た、C 型肝炎の肝組織内の微量元素から考察した、金属代謝についての検討 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10
- 30) 舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、後藤秀実、鮫島庸一:C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の有効性における治療前 CD4 陽性 T 細胞数の影響について 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10
- 31) Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Nakano I, Goto H. Association between a

single-nucleotide polymorphism of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. 61<sup>st</sup> The American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2010.11

#### H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
なし
- 2.実用新案登録  
なし
- 3.その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金（平成 22～24 年度肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

樹状細胞、サイトカイン、抗体を用いた肝癌・消化器癌に対する免疫治療の検討  
研究分担者 江口 潤一 昭和大学医学部消化器内科 助教

研究要旨

末期の肝癌・消化器癌患者では免疫機能が低下しているため、免疫療法で癌を治療するには、より効果的な抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。本研究では肝癌・消化器癌に対するサイトカイン療法、樹状細胞療法、抗体療法の併用についての検討を行った。IFN- $\alpha$  遺伝子導入したマウス消化器癌細胞株と抗 PD-1 抗体とを、野生株の皮下接種により予め皮下腫瘍を形成したマウスに投与したところ、既存の野生株腫瘍の増大が抑制され、相加的な抗腫瘍効果が認められた。マウス肝癌細胞株の皮下腫瘍モデルにおいては、樹状細胞療法に抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体療法を併用したところ、樹状細胞単独療法と比較して有意に高い抗腫瘍効果が得られることがわかった。いずれの併用療法もマウス腫瘍内には免疫細胞が多く浸潤しており、さらに腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが可能であった。サイトカイン療法、樹状細胞療法、抗体療法などの複数の治療を組み合わせる免疫療法はマウス肝癌・消化器癌に対して高い抗腫瘍効果を示すことが認められた。今後これらの併用療法の臨床への応用が期待できると考えられた。

A. 研究目的

末期肝癌・消化器癌では全身に及ぶ侵襲の強い副作用のため集学的治療を十分に行うことができない症例が多く、副作用が少なくかつ効果的な新規治療の開発が急務である。副作用の少ないとされる免疫療法は次世代の治療として期待されているが、一般的に肝癌・消化器癌は低免疫原性であり、進行癌患者では免疫機能も低下しているため、強力かつ有効な免疫を誘導する必要がある。このような観点から、我々は肝癌・消化器癌に対する

サイトカイン療法、樹状細胞療法、抗体療法の併用についての検討を行った。

今回我々は生体において活性化リンパ球を沈静化する負のシグナルの伝達に関与する PD-1 や TIM-3 を阻害する事により、従来の免疫療法であるサイトカイン療法や樹状細胞療法をより効果的にすることが可能であると考えた。本研究では強い抗腫瘍効果を持つサイトカイン療法と樹状細胞療法に抗 PD-1 療法または抗 TIM-3 療法を併用した免疫療法に対する評価を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

消化器癌のモデルについては消化器癌細胞株として、マウス大腸癌細胞株である MC38 を用いた。 *In vivo* の治療モデルとして、野生株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに、IFN- $\alpha$  を遺伝子導入したマウス消化器癌細胞株 (MC38-IFN $\alpha$ )  $3 \times 10^5$  cells と抗 PD-1 抗体 (250 $\mu$ g/mouse) とを治療目的に投与し、野生株腫瘍の大きさを測定した。また同治療モデルにおいて、野生株腫瘍内に浸潤している免疫細胞を免疫組織染色で観察した。さらに、MC38-IFN $\alpha$  と抗 PD-1 抗体で免役したマウスの脾細胞を用いて、<sup>51</sup>Cr-release 法で腫瘍特異的細胞傷害活性を測定した。

肝癌モデルについては肝癌細胞株として、マウス肝癌細胞株 BNL を用いた。まず、樹状細胞  $3 \times 10^6$  cells と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体 (250 $\mu$ g/mouse) とを癌予防目的に投与した後、 $2 \times 10^5$  cells の BNL をマウスに皮下接種して腫瘍発現の有無を観察した。次に治療モデルとして、 $2 \times 10^5$  cells の BNL を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに、樹状細胞  $3 \times 10^6$  cells と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体 (250 $\mu$ g/mouse) とを治療目的に投与した後、腫瘍の大きさを測定した。また、BNL に免役されたマウス脾細胞を *in-vitro* にて樹状細胞と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体にて刺激し、培養された脾細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析を行った。さらに、樹状

細胞と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体で免役したマウスの脾細胞を用いて、<sup>51</sup>Cr-release 法で腫瘍特異的細胞傷害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

昭和大学動物実験委員会に動物実験実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、実験実施の承認を得た。

## C. 研究結果

消化器癌のモデルでは MC38-IFN $\alpha$  と抗 PD-1 抗体を併用して治療することにより、IFN- $\alpha$  や抗 PD-1 抗体単独治療と比較し、野生株腫瘍の増大が有意に抑制された。IFN- $\alpha$  と抗 PD-1 抗体で治療したマウスの野生株腫瘍内には、CD4 および CD8 陽性細胞が多く浸潤していた。IFN- $\alpha$  と抗 PD-1 抗体で免役したマウスの脾細胞からは、他の治療群と比較して、より強力な腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが可能であった。

肝癌モデルにおいては、あらかじめ樹状細胞と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体をワクチン目的に投与したところ、樹状細胞と抗体併用投与群では樹状細胞や各抗体単独投与と比較して皮下腫瘍の発現が有意に抑制された。治療モデルでは樹状細胞と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体を併用して治療することにより、樹状細胞や各抗体単独治療と比較し、野生株腫瘍の増大が有意に抑制された。 *In-vitro* にて抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体で刺激した BNL 免疫マウスの脾細胞より

培養された CD4 および CD8 陽性細胞では 7AAD および Caspase8 の発現比率が低下しており、各抗体の投与がリンパ球のアポトーシスを阻害している事が証明された。さらに樹状細胞と抗 PD-1 抗体または抗 TIM-3 抗体で免疫したマウスの脾細胞からは、他の治療群と比較して、より強力な腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが可能であった。

#### D. 考察

細胞性免疫の活性化、MHC Class I 分子の発現増強、樹状細胞の成熟促進、細胞傷害性 T 細胞のアポトーシス抑制などの多彩な免疫賦活効果を示す IFN- $\alpha$  の抗腫瘍作用を抗 PD-1 抗体が増強することが明らかとなった。また、抗原提示細胞として生体内の免疫を誘導する樹状細胞の抗腫瘍作用を、抗 PD-1 抗体や抗 TIM-3 抗体が増強することも明らかとなった。これら免疫療法の併用が臨床応用に寄与する可能性があると考えられた。

#### E. 結論

サイトカイン療法、樹状細胞療法、抗体療法などの複数の治療を組み合わせる免疫療法はマウス肝癌・消化器癌に対して高い抗腫瘍効果を示すことが認められた。今後これらの併用療法は、臨床への応用も期待できると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Omori R, Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S,

Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Kajiwara A, Ito T, Kogo M, Imawari M. Effects of interferon- $\alpha$ -transduced tumor cell vaccines and blockade of programmed cell death-1 on the growth of established tumors. *Cancer Gene Therapy* 19(9): 637 - 43, 2012.

2) 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* 27(6): 1765 - 71, 2012.

3) Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. Strong CD8+ T-cell responses against tumor associated antigens prolong the recurrence free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology* 45 (4): 451 - 458, 2010

4) Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Imawari M. Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. *J Biomed Biotech* :263810, 2010

5) Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. Cyclooxygenase-2 gene

promoter haplotypes affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatology Research* 40 (12): 1219 - 26, 2010

## 2.学会発表

- 1) Miyashita M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Nozawa H, Shimazaki T, Morikawa K, Eguchi J, Imawari M. Abnormal activation of naïve B cells in patients with chronic hepatitis C. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. Boston. 2012.
- 2) 林栄一、下間祐、江口潤一、宮下みゆき、川島悠、森川賢一、馬場俊之、伊藤敬義. インターフェロン療法後SVR患者に発症し、原発巣治療後に骨・リンパ節転移再発、乳腺転移を認めた肝細胞癌の1例. 第39回日本肝臓学会東部会. 東京. 2012.
- 3) 大森里紗、江口潤一、広石和正、梶原敦、土肥弘義、坂木理、笹川綾子、石井成明、井廻道夫. IL-4 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54回日本消化器病学会大会. 神戸. 2012.
- 4) 江口潤一、広石和正、井廻道夫. 肝細胞癌における細胞性免疫応答の検討と細胞障害性 T 細胞エピトープの同定. 第48回日本肝臓学会総会. 金沢. 2012.
- 5) 打越学、伊藤敬義、馬場俊之、江口潤一、森川賢一、井廻道夫. 遷延する黄疸で発見され、肝生検で診断された肝アミロイドーシスの2例. 第48回日本肝臓学会総会. 金沢. 2012.
- 6) Ohmori R, Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Sasagawa A, Sakaki M, Doi H, Kajiwara A, Imawari M. Effects of Interferon- $\alpha$  transduced tumor cell vaccines and blockade of programmed cell death 1 on the growth of established tumors. AACR Annual Meeting 2012. Chicago. 2012.
- 7) Ishii S, Hiroishi K, Eguchi J, Sakaki M, Doi H, Ohmori R, Kajiwara A, Imawari M. Cytokine therapy by allogenic IFN-alpha expressing murine colorectal cancer cells suppresses outgrowth of established tumors in a murine hepatocellular carcinoma model. AACR Annual Meeting 2012. Chicago. 2012.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) 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- $\alpha$  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.
- 12) 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. マウス肝癌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.
- 13) 広石和正、江口潤一、井廻道夫. 肝細胞癌患者における癌抗原特異的細胞性免疫応答. 第14回日本肝臓学会大会. 横浜. 2010.
- 14) 江口潤一、広石和正、土肥弘義、石井成明、平出綾子、坂木理、大森里紗、馬場俊之、松村卓哉、魚住祥二郎、井廻道夫. 消化器癌におけるIL-4とCpG併用による抗腫瘍効果と作用機序の検討. 第52回日本消化器病学会大会. 横浜. 2010.
- 15) 坂木理、牧野鈴子、広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、大森里紗、上田久美子、井廻道夫. 自己免疫性肝疾患における病態とCOX-2及びosteopontin遺伝子プロモーター領域多型との関連性の解析. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 16) 大森里紗、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、土肥弘義、広石和正、井廻道夫. 肝癌におけるHLA拘束性Glypican-3エピトープの同定. 第96回日本消化器病学会総会. 新潟. 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得なし
  2. 実用新案登録なし
  3. その他

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

ウイルス性肝炎・肝がんにおける抗原特異的な免疫制御に関する研究

研究分担者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 独自に確立した世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。そこで、ELISPOT法などハイスループットな手法を用いて検討したところ、肝がん患者のうち77.4%にいずれかのペプチドに対する陽性反応を認めた。なかでもcyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERTに対する反応が高頻度に認められた。次に、GMPグレードのAFPペプチドワクチンを用いた肝がん臨床研究を実施し、NCI-CTCグレード3以上の有害事象が出現しないこと、病勢コントロール率45%の治療効果を示した。これより、肝がん患者における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに、ペプチドワクチンの安全性および有効性が示唆された。

#### A. 研究目的

肝がんの発がんや治療後の再発を制御する戦略として、腫瘍抗原特異的な免疫反応によって抗腫瘍効果を誘導する手法の有用性が示唆されている。我々は世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。そこで、抗原ペプチドに対するCTLの反応性をELISPOT法などハイスループットな手法を用いて検討した。さらに、GMPグレードのペプチドワクチンを作製して進行肝がん症例に対する臨床研究を実施した。

#### B. 研究方法

HLA-A24陽性の肝がん患者および対照としてC型慢性肝炎患者、健常者について検討した。14種類のがん抗原（ART1, ART4, Cyp-B, Lck, MAGE-A1, MAGE-A3, SART1, SART2, SART3, Her-2/neu, p53, MRP3, AFP, hTERT）におけるHLA-A24モチーフ拘束性の抗原ペプチド27個を用いて末梢血より細胞障害性Tリンパ球（CTL）を誘導し、肝がん細胞株に対する障害活性を測定した。また、ELISPOTアッセイによってCTLの割合を測定した。

臨床研究について、対象は標準的治療の効果が望めないと判断されるHLA-A24陽性の肝がん患者20例とした。患者の平均年齢72.5歳、男女比12:8、病因（C型/B型/他）13/3/4、がん臨床病期（III/IVa/IVb）11/2/7、肝予備能（Child-Pugh A/B）8/12、腫瘍マーカーAFP値2,095.5（136-96,220）であった。AFPペプチドワクチン

（GMPグレード）の投与は2週間隔で3回皮下注射（1コース）を行い、投与前、投与終了後4週目の末梢血を用いて免疫学的に検討した。主要評価項目として、有害事象の種類と発現頻度、免疫学的モニタリングによる特異的免疫反応の誘導を観察した。副次評価項目として、がん病変の縮小率、腫瘍マーカーの推移を検討した。

（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) 肝がん患者31名中24名（77.4%）において、27個のペプチドのいずれかにCTL反応を認めた。また、23個（85.2%）のペプチドがいずれかの患者に認識された。

2) 治療経過における検討では、27個のペプチドのうち16個（59.3%）に対するCTL反応が亢進した。

3) 治療経過に伴って増加したCTLの細胞免疫学的検討（naive/effector/memory）において、central memoryタイプ（CD45RA-CCR7+）であった。

4) CTL反応の誘導に抑制的に作用するCTLA-4分子に対する抗体を用いて阻害実験を行ったところ、11/25（44%）のCTL反応、7/13（54%）の肝がん患者において有意に亢進した。

5) CTLA-4抗体によるCTL反応の亢進は、サイトカインIL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$ の産生を伴っていた。

6) 臨床研究AFPワクチンの投与(20例)に伴う有害事象について、NCI-CTCグレード1(下腿浮腫1例、掻痒症4例、皮下硬結7例、発赤6例、下痢1例)、グレード2(発熱1例)を認め、グレード3以上の出現はなかった。

7) 治療効果について、CR 1例、SD 8例、PD 11例であり、病勢コントロール率45%(CR + SD: 9/20)であった。

8) 治療症例における免疫(CTL)反応は、5/20例(CR 1例、SD 3例、PD 1例)に出現したが、治療効果との有意な相関は確認されなかった。

9) CRを認めた1例の経過において、外科的肝切除、ラジオ波焼灼療法、肝動脈塞栓療法、化学療法といった一連の標準治療に抵抗性を示した後に、本ワクチン治療が実施された。その結果、本治療の施行後600日以上にわたってCR状態が維持されており、極めて高い有効性が示された症例と考えられた。

#### D. 考察

肝がんに対する特異的な免疫反応を同定することは、新規の標的治療の開発につながるものと考えられる。そこで、本研究ではまず新たな標的となる抗原ペプチドエピトープの同定について検討した。肝がん患者においてCTL陽性反応を高率に誘導するペプチドエピトープがスクリーニングされるとともに、治療経過によってこれらに対するCTLが誘導されることを観察した。さらに、CTLの特徴としてcentral memoryタイプを示したことから、ペプチドワクチンなどを用いて追加刺激することによって、抗腫瘍効果の高いエフェクター(effector memory / effector)に分化することが可能と考えられた。

最近の臨床研究において、がん治療におけるCTLA-4抗体の効果が報告されている。抗腫瘍免疫の誘導に抑制的なCTLA-4分子を阻害することによって有効な反応が得られるものと推測されている。そして本検討においても、CTLA-4抗体によってCTLの誘導性が亢進した。今後、抗原ペプチドを用いたワクチン開発において、CTLA-4抗体の併用は抗腫瘍効果を増強できる可能性が示唆された。

次に、臨床研究としてこれまで独自に同定してきた肝がんに対する新規の抗原エピトープの中で、AFPに由来するペプチドを用いて臨床的有用性を検討した。ペプチドワクチンの特長は、有害事象が少なく安全性が高いことが予想されており、本研究でもグレード3以上の事象が出現しない

ことが検証された。

治療効果に関して、ある程度の病勢コントロール率は得られたものの、多くがSDレベルに止まっていた。また、治療効果とCTL反応との関連性は明らかではなかった。これらの結果は本治療の開発における今後の課題であるが、抗原ペプチドの種類に関する検討や免疫賦活作用の高いアジュバントの併用などについて工夫することにより、抗腫瘍効果が発揮される可能性を示唆するものであると考えられた。

#### E. 結論

肝がん患者の病態における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに、ペプチドワクチンの臨床研究における有効性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the Helicobacter pylori dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 2012; 1: 127-135.
- 2) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 312-319.
- 3) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3044-3054.
- 4) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol. Res.* 2012; 42: 523-542.
- 5) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- $\alpha$  and Tumor Lysate Promote the Maturation

- of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. *PLoS One*. 2012; 7: e52926.
- 6) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012 (in press).
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of 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.
2. 学会発表
- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): *Hepatology* 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
  - 2) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. 第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): *Hepatology* 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.
  - 3) 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.
  - 4) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma and its impact for



- prognosis of patients. **第62回American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 1400A; 一般; poster: Nov. 8, 2011.
- 5) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFκB 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.
- 6) 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 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan):** Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

厚生労働省科学研究費  
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）  
分担研究報告書

肝細胞癌のオートファジー誘導と抗がん癌耐性に関する検討

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： C 型肝炎は肝線維化の進行とともに発癌のリスクが高くなることが知られており、肝がんは肝不全と並んで C 型肝炎患者の予後を規定する重要な因子である。しかし早期肝癌に対しては局所治療をはじめとした治療法の進歩により予後の改善が認められているものの、進行肝癌は未だ予後が厳しいのが現状である。近年進行肝癌において、ソラフェニブの投与による生存期間の延長が明らかにされ認可された。しかし実際に PR や CR を得られる症例は少ないのが現状であり、その治療効果の改善は重要な課題である。そこで我々は肝癌のソラフェニブ抵抗性の一因として、オートファジーの関与を検討した。肝癌細胞株にソラフェニブを添加したところ、オートファジー経路の活性化が認められた。ソラフェニブ添加下では肝癌細胞の mTORC1 活性が抑制されており、オートファジー亢進の一因と考えられた。またオートファジーを阻害するとソラフェニブの効果が増強され、ソラフェニブによって誘導されるオートファジーは肝癌の細胞死誘導を阻害すると考えられた。肝がんのソラフェニブ抵抗性のメカニズムの一つとしてオートファジーの関与が認められ、オートファジー阻害が治療のターゲットとなりうることを示された。また、最終年度には肝細胞アポトーシスを自然発症する遺伝子改変マウスを用いて、持続的な肝障害が酸化ストレスの誘導を介して発がんを引き起こすことを明らかにした。

共同研究者

疋田隼人 大阪大学消化器内科学

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

現在ソラフェニブは肝癌に対して認可されている唯一の分子標的治療薬であり、Raf キナーゼや VEGF 受容体チロシンキナーゼ

の抑制を介して、細胞増殖の抑制さらには血管新生の阻害に寄与するとされている。しかしその治療効果は未だ限定的であり、治療抵抗性の機序の解明は重要な課題の一つである。これまで我々はソラフェニブ抵抗性の機序に関してアポトーシスに着目し、研究を行ってきた。そして、Bcl-xL がソラフェニブ抵抗性の一因であるとともに、

Bcl-xL阻害薬であるABT-737の併用がソラフェニブの治療効果を増強すると報告した。本来オートファジーは、蛋白やオルガネラの代謝回転や飢餓状態におけるエネルギー供給に重要な役割を担う細胞内分解系の一つである。一方で、過剰な活性化により自己消化を起こし、その結果、細胞死を誘導するという役割も併せ持っているため、近年各種癌におけるオートファジーの役割が注目されている。肝癌においても、オートファジー関連遺伝子である BECN1 の発現量と予後との相関やオートファジーを介した TGF $\beta$  の増殖抑制効果など、オートファジーに関する報告が相次いでいる。しかしソラフェニブがオートファジーに与える影響については十分な解析はなされておらず、未だ明確ではない。そこで我々はソラフェニブのオートファジーに対する影響およびその役割を明確にするべく研究を開始した。

## B. 研究方法

肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブを添加し、オートファゴソーム蓄積の指標である LC3-II の経時的な変化をウェスタンブロット法にて検討した。またオートファジー経路の活性を評価するため、蛍光の変化によりオートファジーの進行をモニタリングできる mRFP-GFP-LC3 発現プラスミドを用いた解析を行った。オートファジー阻害実験では、オートファジーの誘導に必須の分子である ATG7 に対する siRNA を用いた実験とオートファゴソームの分解を阻害するクロロキンを用いた実験をそれぞれ行った。その際、肝癌細胞株の viability は WST 法を用い、アポトーシス経路の活性化については上清中の Caspase3/7 活性の測定により

評価を行った。また *in vivo* においてソラフェニブがオートファジーに与える影響を検討するためにヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いた検討を行った。

## C. 研究成果

肝癌細胞株 Huh7 の培養上清中にソラフェニブを添加し LC3-II の発現量をウェスタンブロット法にて検討したところ、ソラフェニブ添加 1 時間後より LC3-II が誘導され、24 時間後まで経時的に LC3-II の増加が認められた。続いて Huh7 に mRFP-GFP-LC3 を強制発現した後ソラフェニブを添加したところ、核周囲にオートファゴソームと考えられる黄色の点状構造物に混じって、赤色の点状構造物が誘導された。これはオートファジーの進行に伴い GFP のみが不活化し、結果蛍光シグナルが赤に変化した LC3-II の凝集と考えられ、オートファジーがオートライソゾームまで進行していることが示された。

次にソラフェニブがオートファジーを誘導する機序を解明するべくオートファジーの制御に重要な役割を果たすとされている mTOR シグナリングの活性について検討した。肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブを添加すると mTOR シグナリング関連分子である S6K および 4E-BP1 の経時的な脱リン酸化が認められた。S6K および 4E-BP1 は mTORC1 の基質として知られているが、mTORC1 より上流のシグナル伝達分子である Akt のリン酸化はソラフェニブ作用下において亢進していた。以上より、ソラフェニブは mTORC1 の活性を抑制していると考えられた。オートファジー関連分子である ATG7 分子や BECN1 分子の発現量につ

いても同様に検討を行ったが、ソラフェニブはこれらの発現に明らかな影響を与えなかった。

続いてソラフェニブ添加時に肝癌細胞株に誘導されるオートファジーの役割を検討するべく、オートファジー阻害実験を行った。まず ATG7 に対する siRNA を用いた阻害実験を行ったところ、siRNA によるオートファジーの阻害のみでは細胞の viability やアポトーシス誘導に明らかな影響を与えなかった。しかし siRNA によるオートファジーの阻害下でソラフェニブを添加するとソラフェニブ単独群に比してソラフェニブのアポトーシス誘導効果を有意に増強し、viability を有意に減少させた。続いてオートファジー阻害剤であるクロロキンを用いた阻害実験を行った。すると、クロロキンは濃度依存的にソラフェニブによるアポトーシス誘導作用を増強し、viability を減少させた。

In vivo におけるこれらの効果を検討するために、皮下腫瘍モデルを用いた検討を行った。ヌードマウスの背部に Huh7 皮下腫瘍を作成し、その皮下腫瘍が 1cm まで増大した時点でソラフェニブ投与群とコントロール群の 2 群に振り分け薬剤を 1 週間投与した。薬剤投与後、腫瘍部におけるオートファジーの活性をウェスタンブロット法により検討したところ、ソラフェニブ投与群において腫瘍部での LC3-II の発現が亢進しており、オートファジーが亢進しているものと考えられた。

続いて、この皮下腫瘍モデルにおいてオートファジー阻害剤クロロキンの併用がソラフェニブの抗腫瘍効果に与える影響を検討した。前述の実験と同様にヌードマウス

に Huh7 皮下腫瘍を作成し腫瘍径が 1cm になった時点で、ソラフェニブ単剤投与群とソラフェニブ/クロロキン併用投与群の 2 群に振り分け 1 週間の投薬を行った。結果、ソラフェニブ/クロロキン併用投与群においてはソラフェニブ単剤投与群と比して有意に腫瘍の増大が抑制された。

#### D. 考察と結論

今回ソラフェニブがオートファジー経路の活性化を誘導していること、またその機序としてソラフェニブによる mTORC1 活性の抑制が明らかとなった。またソラフェニブによって誘導されるオートファジーは癌細胞において細胞死回避機構として働いていると考えられ、in vitro/皮下腫瘍モデルいずれにおいてもオートファジー経路を阻害することによりソラフェニブの抗腫瘍効果を高めることができた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol.* 57: 92-100, 2012.
2. Kohga K, Tatsumi T, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Oze T, Aketa H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Interleukin-1 $\beta$  enhances