

のエピトープを、結合予測スコアが高い順に選択し、免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。また陽性コントロールとしてサイトメガロウイルス由来のペプチドを1種類と、すでにこれまでにCTLエピトープとして報告されているHBV由来のペプチドを4種類作製した。また、これらのペプチドとヒトリンパ球を用いて、ペプチドに反応しインターフェロンガンマを産生するCTLを検出するための、ELISPOTアッセイシステムを構築した。

これまでに18例のHBV感染患者末梢血リンパ球の解析を終了しており、93種類のHBV由来ペプチドのうち32種類において、少なくとも1人以上の患者において陽性反応を認めた。また少なくとも1つのペプチドに陽性反応が出た患者は18人中11人であり、このうち10人が、核酸アナログ製剤による治療を行っている患者であった。

D. 考察

今回確立したHBV由来ペプチドと患者末梢血リンパ球を用いたELISPOTアッセイ法にて、HBV由来CTLエピトープを同定できる可能性が高まった。またエピトープスクリーニングには現在核酸アナログ製剤によりB型肝炎の治療を行っている症例のサンプルが適していることが示唆された。

E. 結論

cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の解明とcccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発に必要なHBV由来CTLエピトープのスクリーニング法を確立した。

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
上田啓次	HHV-8	新居志郎	病原細菌・ウイルス図鑑	北海道大学出版会			編集中
池田裕明、 珠玖 洋	遺伝子治療・免疫療法	門脇孝、永井良三	カラー版内科学	西村書店	東京、日本	2012	304-308

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita T, (金子)	Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.	Hepatology	-	-	(in press)
Mizukoshi E, (金子)	Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	-	-	(in press)
Mizuno H, (金子)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma.	Liver Int	32(7)	1146-1155	2012
Mizukoshi E, (金子)	Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma.	Liver Int	32(10)	1516-1526	2012
Okada H, (金子)	Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development.	Cancer Res	72(17)	4459-4471	2012
Kitao A, (金子)	Hypervascular hepatocellular carcinoma: correlation between biologic features and signal intensity on gadoxetic acid-enhanced MR images.	Radiology	265(3)	780-789	2012
Oishi N, (金子)	Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma.	Hepatology	56(5)	1792-1803	2012

Shugo H, (金子、中本)	Nucleostemin in injury-induced liver regeneration.	Stem Cells Dev	21(16)	3044-3054	2012
Okazaki A, (今村)	Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse	Hepatology	56(2)	555-566	2012
Ohsaki E, (上田)	Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency.	Frontiers in Virology	3	7-19	2012
Nakano K, (上田)	Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.	Virology	425(2)	95-102	2012
Ueda K.	For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.	Frontiers in Virology	3	1-2	2012
Ueda K.	Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic insults are evaded.	J.Blood and Lymph	2	3	2012
Ueda K, (上田)	Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for identification of the HBV receptor and investigation of HBV infectivity.	Biochem Biophys Res Comm	-	-	(in press)
Ueda K.	Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?	Medical Microbiology and Diagnosis	-	-	(submitted)
Noma S, (上田)	Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7.	Neuroscience Res	73	115-121	2012
上田啓次	B型肝炎のウイルス学	化学療法の領域	48	125-133	2012
上田啓次	遺伝子挿入HBVを用いた感染リセプターの探索	肝胆膵	65	601-609	2012
Matsuda H, (中本)	Clinical relevance and sequence analysis of the Helicobacter pylori dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks.	Immuno-Gastroenterology	1(2)	127-135	2012

Marukawa Y, (中本)	Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma.	Cancer Gene Ther	19(5)	312-319	2012
Qu W, (橋本)	Genome-wide genetic variations are highly correlated with proximal DNA methylation patterns.	Genome Res	22	1419-1425	2012
NE Salem, (小原恭子)	Genomic polymorphisms in 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase promoter sequences.	Microbiol Immunol	-	-	(in press)
S Sekiguchi, (小原恭子)	Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver.	Pros One	7(12)	e51656	2012
K Tsukiyama-Kohara.	Role of Oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus.	Int J Mol Sci	13	15271-15278	2012
K Inoue, (小原恭子)	Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1.	Biochem Biophys Res Com	30(428)	494-499	2012
Saito M, (小原恭子)	Hepatitis C virus promotes expression of the 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1.	J Med Virol	84 (5)	733-746	2012
Kasama Y, (小原恭子)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3.	Virus Research	163	405-409	2012
Ishikawa T.	Immunoregulation of hepatitis B virus infection -rationale and clinical application-.	Nagoya J Med Sci	74	217-232	2012
Ohtaki H, (石川)	High susceptibility to lipopolysaccharide-induced lethal shock in encephalomyocarditis virus-infected mice.	Sci Rep	2	1-8	2012
Hayashi K, (石川)	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	8	438-444	2012

Yoshio S, (考藤)	Human BDCA3+ dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus.	Hepatology	-	-	(in press)
Kakita N, (考藤)	Comparative analyses of regulatory T cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: a crucial role of CD25(-) FOXP3(-) T cells.	Int J Cancer	131	2573-2583	2012
Kanto T, (考藤)	Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol	47	169-178	2012
Nawa T, (考藤)	Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway.	Virology	432	452-459	2012
Nishijima N, (高橋)	Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing.	PLoS One	7(4)	e35052	2012
Takahashi K, (高橋)	Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response.	Gastroenterology	142(1)	178-180	2012
Murayama A, (加藤)	A subclone of HuH-7 with enhanced intracellular hepatitis C virus production and evasion of virus related-cell cycle arrest.	PLoS One	7(12)	e52697	2012
Ozawa T, (村口)	A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity.	PLoS One	7	e52383	2012
Sun X, (村口)	Unbiased analysis of TCR α/β chains at the single-cell level in human CD8 ⁺ T-cell subsets.	PLoS One	7	e40386	2012
Ozawa T, (村口)	The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C β antibody.	Biochem Biophys Res Commun	422	245-249	2012
Okamoto S, (池田)	A promising vector for TCR gene therapy: Differential effect of siRNA, 2A peptide, and disulfide bond on the introduced TCR expression.	Mol Ther - Nucleic Acids	-	-	(in press)
Soga N, (池田)	Limited expression of cancer-testis antigen in renal cell carcinoma patients.	Mol Clin Oncol	1	326-330	2013

Shirakura Y, (池田)	T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/ γc^{null} mice.	Cancer Sci	103(1)	17-25	2012
Noguchi T, (池田)	Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy.	Cancer Res	72(7)	1672-1682	2012
Jounai N, (石井)	Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination.	Front Cell Infect Microbiol	2	168	2012
Tetsutani K, (石井)	Adjuvants in influenza vaccines.	Vaccine	30(52)	7658-7661	2012
Desmet CJ, (石井)	Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination.	Nat Rev Immunol	12(7)	479-491	2012
Fumihiko Y, (小原)	Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication.	J Med Virol	-	-	(in press)
Makoto S, (小原)	Hepatitis C virus induces overexpression of 3β -hydroxysterol $\Delta 24$ -reductase through Sp1.	J Med Virol	84	733-746	2012
Yuichi H, (小原)	Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis.	PLoS Pathog	8(8)	e1002860	2012
Kazuaki I, (小原)	Impairment of interferon regulatory factor-1 β activation by hepatitis C virus core protein basic region 1.	Biochem Biophys Res Commun	428(4)	494-499	2012
Satoshi S, (小原)	Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver.	PLoS One	7(12)	e51656	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

EGFR 遺伝子変異細胞への有効性などが該当する。

標的分子と主な分子標的療法

EGFR：EGFR は膜貫通型チロシンキナーゼで、固形癌において最も科学的背景のある癌遺伝子の一つである。小分子化合物のゲフィチニブとエルロチニブは、非小細胞肺癌に使用され、EGFR 遺伝子変異例には第一選択となる。癌細胞の EGFR キナーゼ活性を阻害することにより抗腫瘍効果が得られる。モノクローナル抗体のセツキシマブとパニツムマブは EGFR シグナルを阻害し、大腸癌で適応となっている。KRAS 遺伝子変異例には効果がないことから、KRAS 野生型例への使用が推奨されている。

HER2：HER2 は EGFR ファミリーの膜貫通型チロシンキナーゼで、主要な癌遺伝子の一つである。ヒト化モノクローナル抗体のトラスツマブは、HER2 陽性乳癌へ使用される。最近 HER2 陽性胃癌に対しても承認された。HER2 陽性の層別化は、免疫染色によって行われる。ラパチニブは小分子化合物で、HER2 陽性が確認された手術不能乳癌、または HER2 陽性が確認された再発乳癌が適応である。乳癌ではカペシタビンとの併用療法を行う。

VEGFRs, FGFRs (線維芽細胞増殖因子受容体 (fibroblast growth factor receptor)), **PDGFRs** など：ソラフェニブは、血管新生シグナル伝達 (VEGFR, PDGFR) を阻害するマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害薬である。その主作用から一般的には血管新生阻害薬に属するが、本薬剤に特徴的な RAF 阻害活性もあわせ持っており、癌細胞に対する腫瘍増殖シグナル伝達系に対しても阻害活性を示す。根治切除不能または転移性の腎細胞癌、切除不能な肝細胞癌が適応である。スニチニブはマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害薬に分類され、腎癌とイマチニブ抵抗性の GIST に承認されている。

mTOR：mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害薬であるエベロリムスおよびテムシロリムスは、根治切除不能または転移性の腎細胞癌への治療薬として承認された。

KIT, BCR-ABL, PDGFR など：イマチニブは、BCR-ABL, KIT, PDGFR などのキナーゼに対して阻害活性を示す。慢性骨髄性白血病と GIST に対して承認されている。ダサチニブはイマチニブと比較して BCR-ABL に対するキナーゼ阻害活性が高い。慢性骨髄性白血病、および再発または難治性のフィラデルフィア (Ph) 染色体陽性急性リンパ性白血病に承認されている。

プロテアソーム：ボルテゾミブは癌細胞のプロテアソームを阻害することにより、その増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する。また、転写因子である nuclear factor κ B (NF- κ B) の活性化阻害およびインターロイキン 6 (IL-6) などのサイトカインの分泌を抑制し、骨髄腫細胞の増殖を抑制する。多発性骨髄腫に適応がある。

VEGF：ベバシズマブは、VEGF に対するモノクローナル中和抗体で血管新生阻害効果を示す。治癒切除が不可能な進行・再発の大腸癌および非小細胞肺癌が適応で、大腸癌では FOLFOX 療法や FOLFIRI 療法などの 3 剤併用療法に上乗せすることで有用性が示されている。

CD20：リツキシマブは、細胞表面抗原の CD20 に対するキメラ型モノクローナル抗体で、CD20 陽性の B 細胞性非 Hodgkin (ホジキン) リンパ腫に対して承認されている。

CD33：ゲムツズマブは、再発または難治性の CD33 陽性急性骨髄性白血病に対して承認されている。

【荒尾 徳三・西尾 和人】

参考文献

- 1) 西尾和人ほか編：がんの分子標的と治療薬事典、p234-241、羊土社、2010

15 遺伝子治療・免疫療法

遺伝子治療・免疫療法の位置づけ

腫瘍に対する治療法として、現在その有効性が確立されたものには手術療法、化学療法、放射線療法がある。これらは近年さらに発展を続けているが、いまだ予後不良の腫瘍疾患も多く、また副作用をはじめとする生活の質 (QOL) の問題も残っている。

そこで、新規治療法として大きく期待されるものの中に遺伝子治療・免疫療法がある。その多くがいまだ開発の段階にあり、臨床効果の確立には今後の開発経過を待たねばならないが、2010年4月に米国初の治療用癌ワクチン Provenge[®] が前立腺癌治療薬として、2011年3月には抗 CTLA4 抗体 Yelvoy[®] が転移性メラノーマの治療薬として米国食品医薬品局 (FDA) に承認された。癌の免疫的治療薬、続いて遺伝子治療が今後さらに医療の現場に登場すると期待される。

遺伝子治療の動向

現在までの遺伝子治療はすべて試験的医療の段階である。1990年9月に ADA (アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase)) 欠損症の患者に対する ADA 遺伝子の補充療法が世界初の遺伝子治療として実施された。2011年11月時点の全世界における遺伝子治療プロトコルは1,714件を数え¹⁾、そのなかで1,107件が腫瘍を対象としている。

遺伝子治療全体のなかで米国が65%を、ヨーロッパが29%、日本は1.1%を占める。第I相試験が60.7%、第II相試験が34.8%であり、第III相試験に達するものが4.3%ある。米国では p53 遺伝子のアデノウイルスベクターが、また EU において HSV-*tk* 遺伝子を持つアデノウイルスベクターが腫瘍の遺伝子治療用医薬品として申請中である。中国では p53 遺伝子を持つアデノウイルスベクター、腫瘍溶解性アデノウイルスが中国国内のみで承認されているが、その有効性に関するデータの公開はかぎられている。

わが国においてはいまだ承認にいたったものはない。表 15-1 にわが国における腫瘍の遺伝子治療臨床研究を示す。

腫瘍に対する遺伝子治療戦略

癌抑制遺伝子導入

代表的なものに p53 癌抑制遺伝子があげられる。p53 癌抑制遺伝子は約 50% のヒト悪性腫瘍において機能喪失が認められる。米国テキサス州立大学 MD アンダーソンがんセンターでは非小細胞性肺癌を対象に 1998 年 4 月からヒト正常 p53 発現アデノウイルスベクター (Ad5CMV-p53、

表 15-1 日本における腫瘍に対する遺伝子治療臨床研究

疾患	遺伝子	ベクター	投与方法	承認年	施設
腎細胞癌	GM-CSF	レトロウイルス	X線照射腎癌細胞(体外)	1998	東京大学
非小細胞性肺癌	p53	アデノウイルス	腫瘍内	1998	岡山大学
乳癌	多剤耐性遺伝子(MDR1)	レトロウイルス	骨髓幹細胞(体外)	2000	癌研究会付属病院
食道癌	p53	アデノウイルス	腫瘍内	2000	千葉大学
悪性グリオーマ	IFN-β	リボソーム	腫瘍内	2000	名古屋大学
非小細胞性肺癌	p53	アデノウイルス	腫瘍内	2000	東京慈恵会医科大学
非小細胞性肺癌	p53	アデノウイルス	腫瘍内	2000	東北大学
非小細胞性肺癌	p53	アデノウイルス	腫瘍内	2000	東京医科大学
前立腺癌	HSV-tk	アデノウイルス	腫瘍内	2000	岡山大学
白血病	HSV-tk	レトロウイルス	末梢性T細胞(体外)	2002	筑波大学
神経芽腫	IL-2, リンホトキシン	アデノウイルス	腫瘍内	2002	東京大学
前立腺癌	HSV-tk	アデノウイルス	腫瘍内	2003	神戸大学
進行期悪性黒色腫	IFN-β	リボソーム	腫瘍内	2003	信州大学
前立腺癌	HSV-tk	アデノウイルス	腫瘍内	2007	北里大学
再発性白血病(GVHD防止)	HSV-tk/deltaLNGFR	レトロウイルス	ドナー末梢血単核球(体外)	2007	国立がんセンター
前立腺癌	IL-12	アデノウイルス	腫瘍内	2008	岡山大学
造血器悪性腫瘍	HSV-tk	レトロウイルス	末梢性T細胞(体外)	2009	国立がんセンター
進行性膠芽腫	腫瘍溶解性ヘルペスウイルス G47Δ		腫瘍内	2009	東京大学
腎細胞癌	IFN-β	リボソーム	腫瘍内	2009	京都府立医科大学
食道癌	腫瘍抗原特異的 TCR	レトロウイルス	末梢性T細胞(体外)	2009	三重大学

GVHD: 移植片対宿主病

アドベキシン(Advexin[®])の局所投与と局所放射線療法の併用治療の第Ⅱ相試験を開始し、63%の患者に50%以上の腫瘍縮小がみられた。岡山大学医学部附属病院(現岡山大学病院)を中心とした多施設共同研究として1999年からAdvexin[®]の第Ⅰ相試験が行われた。Advexin[®]は頭頸部癌に対しても米国で第Ⅱ相試験が終了し、2000年には米国、カナダ、およびヨーロッパにおいて第Ⅲ相試験が行われている。

自殺遺伝子導入

代表的なものに単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子を腫瘍細胞に導入し、ヘルペス治療薬ガンシクロビル(GCV)をプロドラッグとして投与方法がある。HSV-tk発現腫瘍細胞ではGCVがリン酸化され、その代謝産物のDNAポリメラーゼ阻害活性により腫瘍細胞が死滅する。悪性グリオーマ、前立腺癌、悪性胸膜腫、白血病などの治療が試みられており、わが国では前立腺癌と白血病に対する第Ⅰ相試験が行われている。

腫瘍溶解性ウイルス

感染細胞を破壊して増殖するウイルスの性質を利用する試みである。腫瘍細胞に選択的なウイルス増殖を起こし、正常細胞への傷害性を最小限に抑える工夫が必要である。いくつかの遺伝子を欠損したヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポリオウイルスなどが腫瘍選択的な増殖を示し、これらを用いた方法が試みられている。

腫瘍選択性の機序として、腫瘍のINF(インターフェロン)感受性低下、細胞増殖亢進、p53欠損などとの関連が示唆されているが、正確な機序の解明は今後の検討が必要である。また、腫瘍細胞で強く発現しているテロメラーゼなどの遺伝子のプロモーターによりウイルスの増殖に必要な遺伝子の発現を制御する腫瘍溶解性ウイルスの開発も試みられている。わが国では東京大学において脳腫瘍に対する

変異型ヘルペスウイルスを用いた臨床試験が行われている。

遺伝子免疫療法

腫瘍に対する免疫療法の一法として、遺伝子治療の形態をとるものもさまざまに試みられている。これらは生体内の抗腫瘍免疫応答を誘導/強化することをめざすものであるが、その際の標的候補として種々のサイトカイン(インターロイキン2(IL-2)、IL-4、L-12、INF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)など)、共刺激分子(CD80、CD86、CD40、4-1BBなど)やそのリガンド(CD28、CD40L)、抑制性刺激受容体(PD-1、PD-L1など)、接着分子(細胞間接着分子1(ICAM-1)、リンパ球機能関連抗原1(LFA-1)、CD2)などが検討されている。これらの遺伝子を生体内に直接投与方法や、腫瘍への遺伝子発現をめざす方法、遺伝子導入樹状細胞や遺伝子導入腫瘍細胞をワクチンとして接種する方法などが考案されている。また、近年免疫療法の一つとして細胞療法が注目されているが、輸注する免疫担当細胞を遺伝子改変してより有効性を高める方法も試みられている。

これまで精力的に臨床研究が行われたものとして、GM-CSF遺伝子を導入した前立腺癌細胞株を用いた腫瘍ワクチン(GVAX)があるが、第Ⅲ相試験で有意な効果を示せていない。サイトカイン遺伝子の直接投与方法としては、TNFαを発現する非増殖型アデノウイルスベクター(TNFerade)の局所投与を用いた膀胱癌、直腸癌、転移性メラノーマ、頭頸部癌などに対する各種臨床試験や、INF-β遺伝子をリボソームに封入し脳腫瘍やメラノーマに投与する臨床試験などが国内外で行われている。腫瘍に特異的に反応する受容体遺伝子を導入して腫瘍反応性を付与した自己T細胞を輸注する治療法も試みられている。

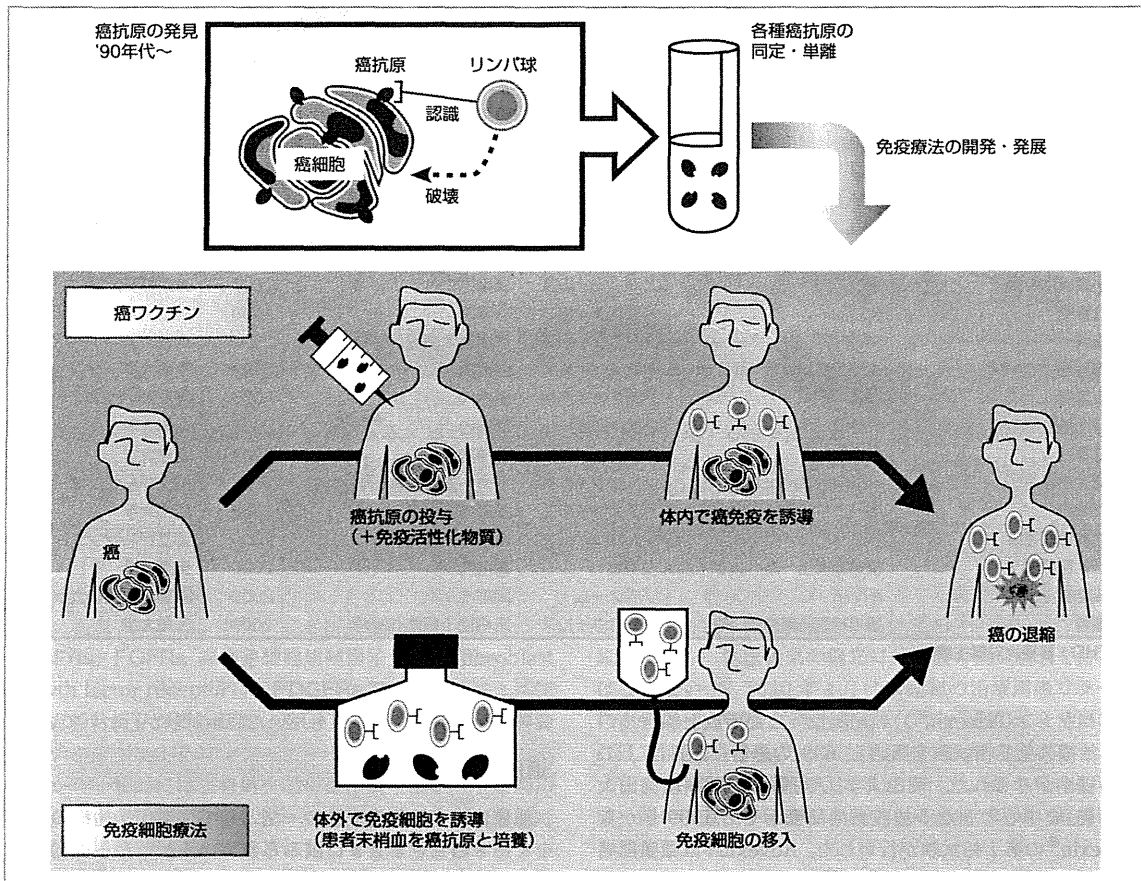


図 15-1 癌抗原の同定を利用した癌免疫療法

免疫療法の動向

腫瘍免疫学の歴史を考えると、画期的な一歩として1990年代のBoonら²⁾の仕事にはじまる、CD8陽性(CD8⁺)T細胞が認識する腫瘍抗原の同定があげられる。以降、同定された腫瘍抗原を用いた免疫療法の開発が続けられている(図15-1)。

一つのアプローチは、同定された抗原を生体にワクチンとして投与する癌ワクチン療法である。腫瘍抗原の同定を利用した一つのアプローチとして、特異的免疫細胞の輸注療法が開発されている。腫瘍抗原反応性の免疫細胞を体外で大量に誘導、調整した後に癌患者に輸注する方法である。図15-2に示すように、癌抗原発見以前の免疫療法はいわゆる非特異的な免疫の活性化に焦点がおかれていた。現在ではこれらの活性化物質はTLR(Toll様受容体)リガンドに代表される病原体関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMP)を刺激する物質としてアジュバントとして見直されつつあるものを含む。

腫瘍抗原の発見以降、特異的免疫療法の開発が加速化している。前述したようにサイトカインや共刺激分子などを用いた免疫増強をめざす方法や、免疫抑制性シグナルをブロックする抗体療法(抗CTLA4抗体Yelvoy[®])など全身性の免疫応答を操作する方法も同時に開発されているが、腫瘍抗原の発見はこれらの効果を腫瘍特異的免疫応答により評価することを可能にしつつある。

腫瘍に対する免疫療法戦略

癌ワクチン

ワクチンに用いる抗原として、8~15個のアミノ酸から成り立つ抗原ペプチド、それら抗原ペプチドを多数含む抗原蛋白質、支配遺伝子DNAやmRNAなどが試みられている。

実用化という観点では、Provenge[®]が前立腺癌を対象として2010年にFDAに承認された。このワクチンは前立腺癌抗原PAP(前立腺性酸性ホスファターゼ)とGM-CSFの融合蛋白質を、*ex vivo*で患者末梢血から調整した樹状細胞を含む細胞群に取り込ませてワクチンとして投与するものである。DCVax-Brain[®]は、患者の腫瘍溶解物で感作した樹状細胞をワクチンとして用い、脳腫瘍を対象に2007年にスイスで承認された。Oncophage[®]は、患者腫瘍組織より熱ショック蛋白(HSP)を精製し、ワクチンとして投与するものである。HSPはシャペロンとして腫瘍細胞に由来する多種類のペプチドを結合している。2008年に腎臓癌を対象にロシアで承認され、その後EUでも承認された。このほかにも国際的にはMAGE-A3抗原蛋白質を構成成分とするものなどいくつかの癌ワクチンが後期臨床試験に入っている。

治療用ワクチンとは別に予防的癌ワクチンも開発されている。多くのウイルスや細菌などのヒト発癌への関与が指

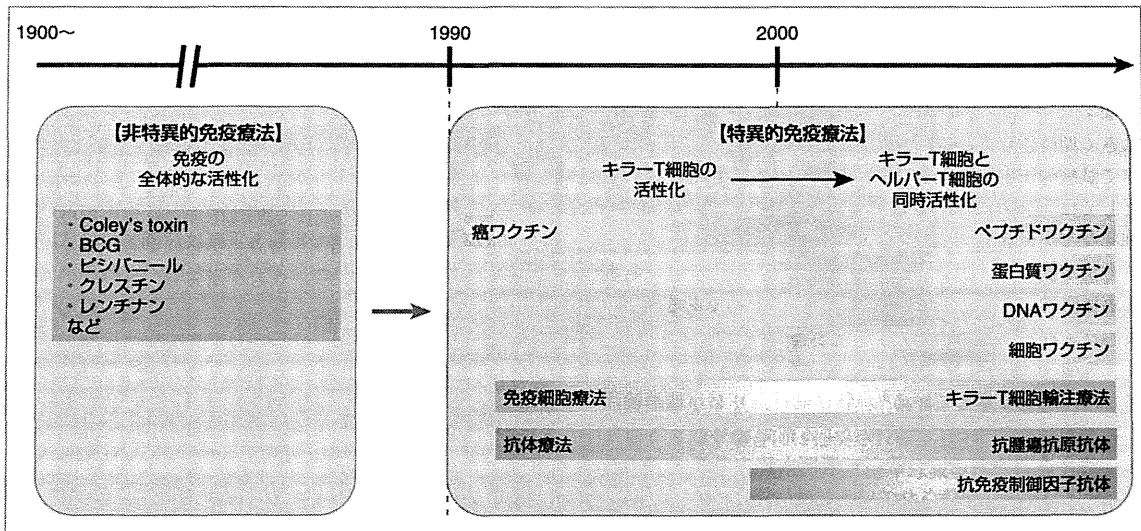


図 15-2 癌免疫療法の歴史

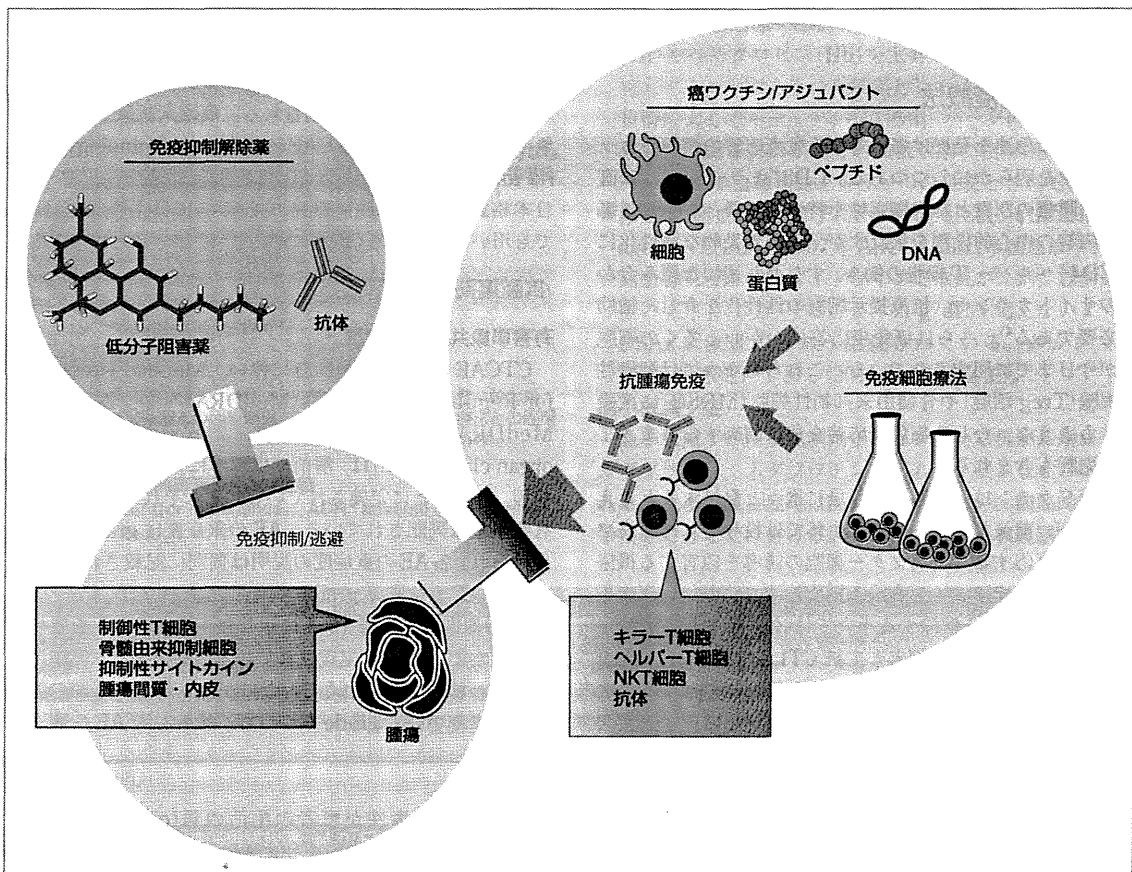


図 15-3 複合的癌免疫療法

摘されている。代表的なものに子宮頸癌などの発症にかかわるヒトパピローマウイルス(HPV)があげられる。HPV由来蛋白質を用いたワクチン(Gardasil®〈ガーダシル〉およびCervarix®〈サーバリックス〉)が開発され、子宮頸癌予防用にすでに臨床利用されている。

細胞療法

腫瘍の細胞療法は大きく2つの異なったアプローチの開発が試みられてきた。一つ目は、腫瘍抗原をさまざまなかたちで樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞に提示させワクチンとして用いる方法である。前述したように癌ワクチ

ンの範疇にも入るものであり、一部承認されたものも含め幅広い開発が続いている。

二つ目のアプローチは、腫瘍免疫応答にかかわるさまざまなエフェクター細胞を輸注する方法である。この方法は大きく期待されているが、いまだ承認されたものはなくすべて試験的治療法の段階である。自然免疫系に近い細胞群としては、ナチュラルキラー(NK)細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などを患者末梢血から調整し、培養後に大量に輸注する方法が試みられている。獲得免疫に関する細胞群である腫瘍反応性のT細胞を輸注する方法は魅力的である。腫瘍浸潤リンパ球より腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を体外で調整・増殖させて輸注する試みは早期臨床試験の段階ではあるが臨床効果を示している³⁾。特に最近、リンパ球の輸注前に患者に化学療法や放射線による前処置を行う方法では、進行性悪性黒色腫の患者で著明な臨床効果が示唆され、今後の開発が期待されている。輸注T細胞に腫瘍反応性のT細胞受容体遺伝子や、抗体とCD3分子細胞内シグナルドメインの融合受容体(キメラ抗原受容体)遺伝子を導入する方法は、短期間に大量の腫瘍反応性T細胞を調整可能とし、T細胞輸注療法の適応疾患を拡大する方法として期待される。

複合的癌免疫療法

免疫学の急速な発展は癌に対する免疫応答の複雑なネットワークを明らかにしつつある。CD8⁺キラーT細胞は直接的な腫瘍の認識と細胞傷害性を持つ細胞群として抗腫瘍免疫応答の中心的役割を果たすが、その効果的な活性化にはCD4⁺ヘルパーT細胞の働き、すなわち適切な組み合わせのサイトカインや、抗原提示細胞の活性化を介した補助が必要である⁴⁾。さらに癌免疫応答にかかわる多くの細胞群が今日までに同定されている。これらのなかには制御性T細胞(Treg細胞)や骨髄由来抑制性細胞(MDSC)に代表されるような、むしろ癌免疫応答を負に制御するさまざまな細胞群も含まれる⁵⁾。

腫瘍ワクチンは今後医療の現場に次々と登場すると考えられるが、前述したように担癌生体では投与された腫瘍ワクチンに反応するエフェクター細胞の誘導を阻害する機序が存在する。癌ワクチン療法、細胞輸注療法と、腫瘍の免疫抑制/逃避機構を解除する手立て(抗体、低分子阻害薬、サイトカインなど。一例として抗CTLA4抗体は免疫抑制機構を解除することが期待される)を組み合わせる複合的癌免疫療法の戦略(図15-3)が今後の有効な癌免疫療法の開発には不可欠であると考えられる。

【池田 裕明・珠玖 洋】

参考文献

- 1) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide(WILEY):<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
- 2) Boon T et al : Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208, 2006
- 3) Rosenberg SA et al : Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2: 233-240, 2009
- 4) Williams MA et al : Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25:171-192, 2007
- 5) Schreiber RD et al : Cancer immunoediting: integrating immunity's role in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570, 2011

16 抗腫瘍薬の毒性評価と対策

はじめに

抗がん剤、分子標的治療薬の進歩により、癌治療の奏効率、生存期間は向上している。標準的治療を継続し治療効果を高めるためにも薬物の毒性を正確に評価し対処することが必要である。

抗腫瘍薬の毒性評価

毒性の定義

抗腫瘍薬の毒性は、薬物有害反応(adverse drug reaction: ADR)と同義語であり、有害反応(adverse events: AE)のうち医薬品との因果関係が否定できないものを示す。抗腫瘍効果の主作用に対する副作用の意味で、患者に副作用という用語で説明されることもある(図16-1)。

抗腫瘍薬の毒性評価の必要性

抗腫瘍薬の毒性の程度(grade)は次回の抗腫瘍薬を減量、中止するかを判断する指標となる。また毒性対策が有効かどうかの評価にも使用される。癌臨床試験での有害事象の評価方法であるCTCAE(common terminology criteria for adverse events)v4.0(有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG)版)が、臨床でも用いられている(表16-1)。

抗腫瘍薬の毒性評価方法

有害事象共通用語規準

CTCAEはv4.0への改訂に伴い、Medical Dictionary for Regulatory Activities(MedDRA)へ完全準拠した。MedDRAの最上位の階層である器官別大分類(system organ class: SOC)は、解剖や生理学に基づく臓器・器官、病因、目的ごとに定義されている。それぞれのSOC内で、有害事象は列記されている。AEの重症度はgrade 1~5に分けられ、各AEの重症度の説明は個別に記載されている。一部のAEでは高いgradeが該当しない。CTCAE grade 1~5の原則定義を表16-1に示した。治療的介入を要するかどうかでgradeが定義されている有害事象は、実際になが行われたかではなく、なにながされるべきかの医学的判断に基づいてgradeをつける。抜粋したAEを表16-2に示す。

QOL

抗腫瘍薬の毒性が患者の生活の質(quality of life: QOL)にどのような影響を与えているのか、治癒しない癌患者にとっては治療を継続するかどうか重要な評価項目となる。しかし、ほとんどの抗腫瘍薬の開発過程ではQOLは毒性指標となっていない。QOLに関する質問票はいくつかあるが、抗腫瘍薬との関係を客観的に評価することは困難である。

Discrete Nature of EpCAM⁺ and CD90⁺ Cancer Stem Cells in Human Hepatocellular Carcinoma

Taro Yamashita,¹ Masao Honda,¹ Yasunari Nakamoto,¹ Masayo Baba,¹ Kouki Nio,¹ Yasumasa Hara,¹ Sha Sha Zeng,¹ Takehiro Hayashi,¹ Mitsumasa Kondo,¹ Hajime Takatori,¹ Tatsuya Yamashita,¹ Eishiro Mizukoshi,¹ Hiroko Ikeda,¹ Yoh Zen,¹ Hiroyuki Takamura,¹ Xin Wei Wang,² and Shuichi Kaneko¹

Recent evidence suggests that hepatocellular carcinoma (HCC) is organized by a subset of cells with stem cell features (cancer stem cells; CSCs). CSCs are considered a pivotal target for the eradication of cancer, and liver CSCs have been identified by the use of various stem cell markers. However, little information is known about the expression patterns and characteristics of marker-positive CSCs, hampering the development of personalized CSC-targeted therapy. Here, we show that CSC markers EpCAM and CD90 are independently expressed in liver cancer. In primary HCC, EpCAM⁺ and CD90⁺ cells resided distinctively, and gene-expression analysis of sorted cells suggested that EpCAM⁺ cells had features of epithelial cells, whereas CD90⁺ cells had those of vascular endothelial cells. Clinicopathological analysis indicated that the presence of EpCAM⁺ cells was associated with poorly differentiated morphology and high serum alpha-fetoprotein (AFP), whereas the presence of CD90⁺ cells was associated with a high incidence of distant organ metastasis. Serial xenotransplantation of EpCAM⁺/CD90⁺ cells from primary HCCs in immunodeficient mice revealed rapid growth of EpCAM⁺ cells in the subcutaneous lesion and a highly metastatic capacity of CD90⁺ cells in the lung. In cell lines, CD90⁺ cells showed abundant expression of c-Kit and *in vitro* chemosensitivity to imatinib mesylate. Furthermore, CD90⁺ cells enhanced the motility of EpCAM⁺ cells when cocultured *in vitro* through the activation of transforming growth factor beta (TGF- β) signaling, whereas imatinib mesylate suppressed *TGFB1* expression in CD90⁺ cells as well as CD90⁺ cell-induced motility of EpCAM⁺ cells. **Conclusion:** Our data suggest the discrete nature and potential interaction of EpCAM⁺ and CD90⁺ CSCs with specific gene-expression patterns and chemosensitivity to molecular targeted therapy. The presence of distinct CSCs may determine the clinical outcome of HCC. (HEPATOLOGY 2012;00:000–000)

The cancer stem cell (CSC) hypothesis, which suggests that a subset of cells bearing stem-cell-like features is indispensable for tumor development, has recently been put forward subsequent to advances in molecular and stem cell biology. Liver cancer, including hepatocellular carcinoma

(HCC), is a leading cause of cancer death worldwide.¹ Recent studies have shown the existence of CSCs in liver cancer cell lines and primary HCC specimens using various stem cell markers.^{2–7} Independently, we have identified novel HCC subtypes defined by the hepatic stem/progenitor cell markers,

Abbreviations: 5-FU, fluorouracil; Abs, antibodies; AFP, alpha-fetoprotein; CK-19, cytokeratin-19; CSC, cancer stem cell; DN, dysplastic nodules; EMT, epithelial mesenchymal transition; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; FACS, fluorescent-activated cell sorting; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HSCs, hepatic stem cells; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; IR, immunoreactivity; MDS, multidimensional scaling; NBNC, non-B, non-C hepatitis; NOD/SCID, nonobese diabetic, severe combined immunodeficient; NT, nontumor; OV-1, ovalbumin 1; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; SC, subcutaneous; *Smad3*, Mothers against decapentaplegic homolog 3; TECs, tumor epithelial cells; TGF- β , transforming growth factor beta; T/N, tumor/nontumor; VECs, vascular endothelial cells; VM, vasculogenic mimicry; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

From the ¹Liver Center, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Ishikawa, Japan; and ²Laboratory of Human Carcinogenesis, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD.

Received July 9, 2012; revised October 22, 2012; accepted November 6, 2012.

This study was supported by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (23590967), a grant from the Japanese Society of Gastroenterology, a grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, and a grant from the National Cancer Center Research and Development Fund (23-B-5) of Japan. X.W.W. is supported by the Intramural Research Program of the Center for Cancer Research, U.S. National Cancer Institute.

epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and alpha-fetoprotein (AFP), which correlate with distinct gene-expression signatures and prognosis.^{8,9} EpCAM⁺ HCC cells isolated from primary HCC and cell lines show CSC features, including tumorigenicity, invasiveness, and resistance to fluorouracil (5-FU).¹⁰ Similarly, other groups have shown that CD133⁺, CD90⁺, and CD13⁺ HCC cells are also CSCs, and that EpCAM, CD90, and CD133 are the only markers confirmed to enrich CSCs from primary HCCs thus far.^{3-5,10}

Although EpCAM⁺, CD90⁺, and CD133⁺ cells show CSC features, such as high tumorigenicity, an invasive nature, and resistance to chemo- and radiation therapy, it remains unclear whether these cells represent an identical HCC population and whether they share similar or distinct characteristics. In this study, we used fluorescent-activated cell sorting (FACS), microarray, and immunohistochemistry (IHC) techniques to investigate the expression patterns of the representative liver CSC markers CD133, CD90, and EpCAM in a total of 340 HCC cases and 7 cases of mesenchymal liver tumors. We further explored gene- and protein-expression patterns as well as tumorigenic capacity of sorted cells isolated from 15 primary HCCs and 7 liver cancer cell lines in an attempt to identify the molecular portraits of each cell type.

Materials and Methods

Clinical Specimens. HCC samples were obtained with informed consent from patients who had undergone radical resection at the Liver Center in Kanazawa University Hospital (Kanazawa, Japan), and tissue acquisition procedures were approved by the ethics committee of Kanazawa University. A total of 102 formalin-fixed and paraffin-embedded HCC samples, obtained from 2001 to 2007, were used for IHC analyses. Fifteen fresh HCC samples were obtained between 2008 and 2012 from surgically resected specimens and an autopsy specimen and were used immediately to prepare single-cell suspensions and xenotransplantation (Table 1). Seven hepatic stromal tumors (three cavernous hemangioma, two hemangioendothelioma, and two angiomyolipoma) were formalin fixed and paraffin embedded and used for IHC analyses.

Table 1. Clinicopathological Characteristics of HCC Cases Used for Xenotransplantation

ID	Age/ Sex	Etiology	Tumor Size (cm)	Histological Grade	AFP (ng/mL)	DCP (IU/mL)
P1	77/M	Alcohol	12.0	Moderate	198	322
P2	61/F	NBNC	11.0	Moderate	12	3,291
P3	66/M	NBNC	2.2	Moderate	13	45
P4	65/M	HCV	4.2	Poor	13,700	25,977
P5	52/M	HBV	6.0	Moderate	29,830	1,177
P6	60/M	HCV	2.7	Poor	249	185
P7	79/F	HBV	4.0	Poor	46,410	384
P8	77/F	NBNC	5.5	Moderate	17,590	562
P9	71/M	Alcohol	7.0	Poor	3,814	607
P10	51/M	HBV	2.2	Well	<10	21
P11	71/M	Alcohol	2.1	Well	<10	11
P12	60/M	HBV	10.8	Poor	323	2,359
P13	66/M	HCV	2.8	Moderate	11	29
P14	71/M	HCV	7.2	Moderate	235,700	375,080
P15	75/M	HBV	5.5	Poor	<10	97

Abbreviation: DCP, des-gamma-carboxy prothrombin.

Additional details of experimental procedures are available in the Supporting Information.

Results

EpCAM, CD133, and CD90 Expression in HCC. We first evaluated the frequencies of three representative CSC markers (EpCAM⁺, CD90⁺, and CD133⁺ cells) in 12 fresh primary HCC cases surgically resected by FACS (representative data shown in Fig. 1A). Clinicopathological characteristics of primary HCC cases are shown in Table 1. We noted that frequency of EpCAM⁺, CD90⁺, and CD133⁺ cells varied between individuals. Abundant CD90⁺ (7.0%), but almost no EpCAM⁺, cells (0.06%, comparable to the isotype control) were detected in P2, whereas few CD90⁺ (0.6%), but abundant EpCAM⁺, cells (17.5%) were detected in P4. Very small populations of EpCAM⁺ (0.09%), CD90⁺ (0.04%), and CD133⁺ cells (0.05%) were found in P12, but they were almost nonexistent in P8, except for CD90⁺ cells (0.08%) (Fig. 1A). We further evaluated the expression of EpCAM, CD90, and CD133 in xenografts obtained from surgically resected samples (P13 and P15) and an autopsy sample (P14). As a whole, compared to the isotype control, 7 of 15 HCCs contained definite EpCAM⁺ cells (46.7%), whereas only 3 HCCs

Address reprint requests to: Taro Yamashita, M.D., Ph.D., Department of General Medicine, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takara-Machi, Kanazawa, Ishikawa 920-8641, Japan. E-mail: taroy@m-kanazawa.jp; fax: +81-76-234-4250.

Copyright © 2012 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.26168

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

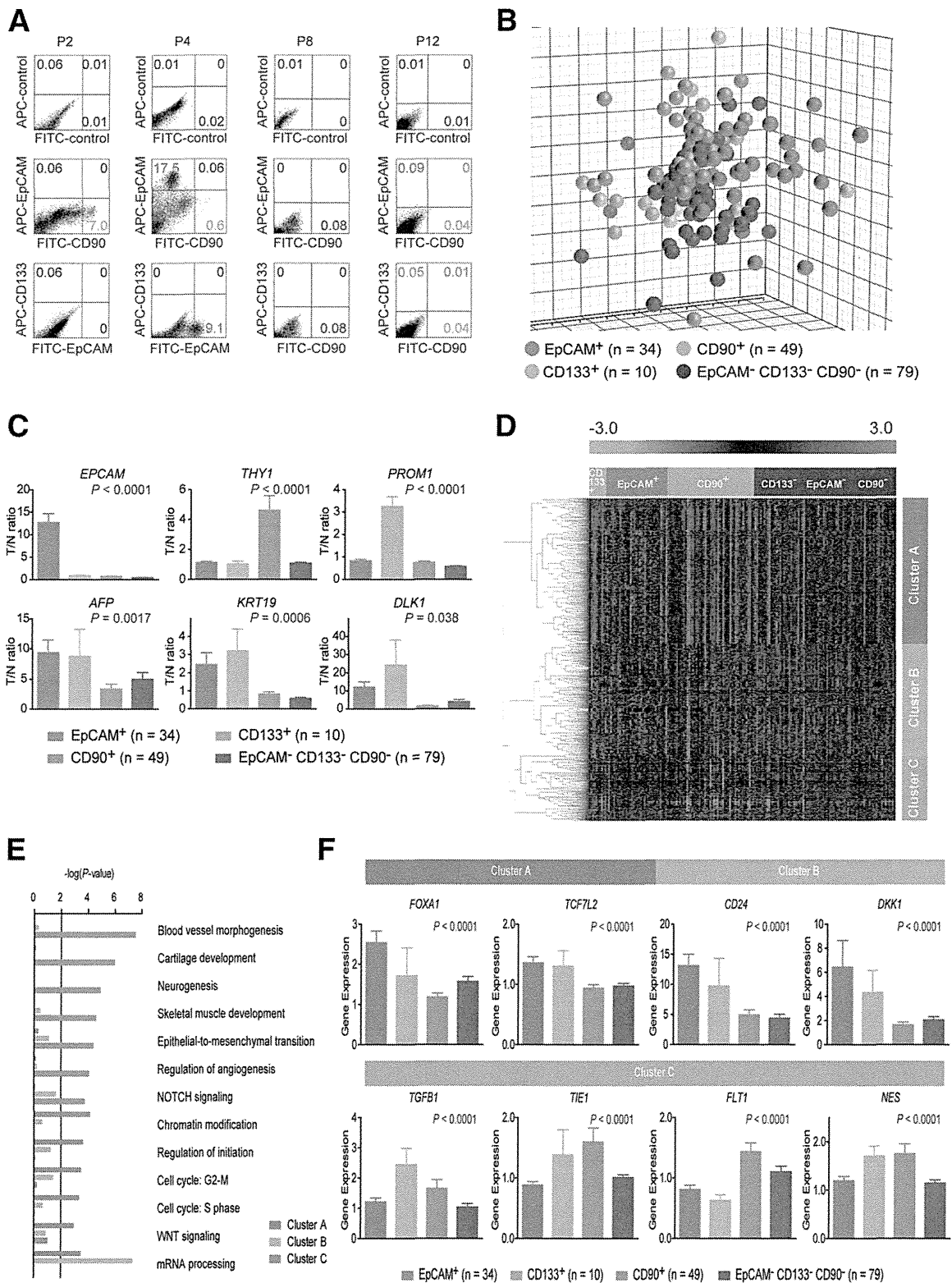


Fig. 1. Gene-expression profiles of CSC marker-positive HCCs. (A) FACS analysis of primary HCCs stained with fluorescent-labeled Abs against EpCAM, CD90, or CD133. (B) Multidimensional scaling analysis of 172 HCC cases characterized by the expression patterns of EpCAM, CD133, and CD90. Red, EpCAM⁺ CD90⁻ CD133⁻ (n = 34); orange, EpCAM⁻ CD90⁻ CD133⁺ (n = 10); light blue, EpCAM⁻ CD90⁺ CD133⁻ (n = 49); blue, EpCAM⁻ CD90⁻ CD133⁻ (n = 79). HCC specimens were clustered in specific groups with statistical significance ($P < 0.001$). (C) Expression patterns of well-known hepatic stem/progenitor markers in each HCC subtype, as analyzed by microarray. Red bar, EpCAM⁺; orange bar, CD133⁺; light blue bar, CD90⁺; blue bar, EpCAM⁻ CD90⁻ CD133⁻. (D) Hierarchical cluster analysis based on 1,561 EpCAM/CD90/CD133-coregulated genes in 172 HCC cases. Each cell in the matrix represents the expression level of a gene in an individual sample. Red and green cells depict high and low expression levels, respectively, as indicated by the scale bar. (E) Pathway analysis of EpCAM/CD90/CD133-coregulated genes. Canonical signaling pathways activated in cluster A (red bar), cluster B (orange bar), or cluster C (light blue bar) with statistical significance ($P < 0.01$) are shown. (F) Expression patterns of representative genes differentially expressed in EpCAM/CD90/CD133 HCC subtypes. Red bar, EpCAM⁺; orange bar, CD133⁺; light blue bar, CD90⁺; blue bar, EpCAM⁻ CD133⁻ CD90⁻.

Table 2. Tumorigenic Capacity of Unsorted, EpCAM⁺, EpCAM⁻, CD90⁺, and CD90⁻ Cells From Primary HCCs and Xenografts

Sample	CD133 (%)	CD90 (%)	EpCAM (%)	Cell Surface Marker	Number of Cells	Tumor Formation	
						2M	3M
P1	0	3.1	0	Unsorted	1 × 10 ⁷	0/5	0/5
				CD90 ⁺	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
P2	0.06	7.0	0.06	Unsorted	1 × 10 ⁷	0/5	0/5
				CD90 ⁺	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
P3	0	1.3	0	Unsorted	1 × 10 ⁶	0/2	0/2
				CD90 ⁺	1 × 10 ⁴	0/4	0/4
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁴	0/4	0/4
P4	0	0.6	17.5	Unsorted	1 × 10 ⁶	3/4	4/4
				EpCAM ⁺	1 × 10 ³	0/3	2/3
					1 × 10 ⁴	3/4	4/4
					1 × 10 ⁵	3/3	3/3
				CD90 ⁺	1 × 10 ³	0/3	0/3
					1 × 10 ⁴	0/4	0/4
					1 × 10 ⁵	0/3	0/3
				EpCAM ⁻	1 × 10 ³	0/3	0/3
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁴	0/4	0/4
					1 × 10 ⁵	0/3	0/3
P5	0	0.8	29.7	Unsorted	1 × 10 ⁶	0/5	0/5
				EpCAM ⁺	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
				CD90 ⁺	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
				EpCAM ⁻	1 × 10 ⁵	0/5	0/5
P6	0	0.7	0	Unsorted	1 × 10 ⁶	0/2	0/2
				CD90 ⁺	1 × 10 ⁴	0/4	0/4
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁴	0/4	0/4
P7	1.38	4.5	4.4	Unsorted	1 × 10 ⁶	2/2	2/2
				EpCAM ⁺	2 × 10 ²	0/3	0/3
					1 × 10 ³	0/3	1/3
					1 × 10 ⁴	2/4	4/4
				CD90 ⁺	2 × 10 ²	0/3	0/3
					1 × 10 ³	0/3	0/3
					1 × 10 ⁴	0/4	0/4
P8	0	0.08	0	Unsorted	1 × 10 ⁴	0/3	0/3
				CD90 ⁺	1 × 10 ⁵	0/4	0/4
				CD90 ⁻	1 × 10 ³	0/3	0/3
					1 × 10 ⁵	0/3	0/3
					1 × 10 ⁵	0/4	0/4
P9	0	0.26	0	Unsorted	1 × 10 ⁵	0/4	0/4
				CD90 ⁺	1 × 10 ³	0/3	0/3
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁵	0/3	0/3
P10	0	0.78	0	Unsorted	1 × 10 ⁴	0/4	0/4
				CD90 ⁺	1 × 10 ³	0/3	0/3
				CD90 ⁻	1 × 10 ⁴	0/3	0/3
P11	0	0.1	1.54	Unsorted	5 × 10 ⁴	0/2	0/2
				EpCAM ⁺	1 × 10 ³	0/3	0/3
				CD90 ⁺	1 × 10 ³	0/3	0/3
				EpCAM ⁻	1 × 10 ⁴	0/3	0/3
P12	0.06	0.05	0.09	Unsorted	1 × 10 ⁵	0/3	3/3
				CD90 ⁺	1 × 10 ³	0/4	1/4
				CD90 ⁻	1 × 10 ³	0/4	1/4
					1 × 10 ⁴	0/3	3/3

(Continued)

TABLE 2. (Continued)

Sample	CD133 (%)	CD90 (%)	EpCAM (%)	Cell Surface Marker	Number of Cells	Tumor Formation	
						2M	3M
P13	0	0.03	67.7	EpCAM ⁺	5 × 10 ⁵	4/4	NA
					5 × 10 ⁴	3/3	NA
				EpCAM ⁻	5 × 10 ³	3/3	NA
					5 × 10 ⁵	0/4	NA
					5 × 10 ⁴	0/3	NA
P14	24.0	0.06	3.1	EpCAM ⁺	5 × 10 ³	4/5	NA
				EpCAM ⁻	5 × 10 ³	2/5	NA
				CD90 ⁺	5 × 10 ⁴	3/4	NA
P15	0	2.45	0	CD90 ⁺	5 × 10 ³	1/3	NA
					5 × 10 ²	1/3	NA
					5 × 10 ⁴	2/4	NA
					5 × 10 ³	1/3	NA
					5 × 10 ²	0/3	NA

NA, not available.

contained definite CD133⁺ cells (20%) (Table 2). CD90⁺ cells were detected at variable frequencies in all 15 HCCs analyzed.

To explore the status of these CSC marker-positive cells in HCC in a large cohort, we utilized oligo-DNA microarray data from 238 HCC cases (GEO accession no.: GSE5975) to evaluate the expression of *EPCAM* (encoding EpCAM and CD326), *THY1* (encoding CD90), and *PROM1* (encoding CD133) in whole HCC tissues and nontumor (NT) tissues. Because previous studies demonstrated that CD133⁺ and CD90⁺ cells were detected at low frequency (~13.6% by CD133 staining and ~6.2% by CD90 staining) in HCC, but were almost nonexistent in NT liver (4, 5),^{4,5} we utilized tumor/nontumor (T/N) gene-expression ratios to detect the existence of marker-positive CSCs in tumor. Accordingly, we showed that a 2-fold cutoff of T/N ratios of *EPCAM* successfully stratifies HCC samples with EpCAM⁺ liver CSCs.^{9,10}

A total of 95 (39.9%), 110 (46.2%), and 31 (13.0%) of the 238 HCC cases were thus regarded as EpCAM⁺, CD90⁺, and CD133⁺ HCCs (T/N ratios: ≥2.0), respectively. As observed in the FACS data described above, we detected coexpression of EpCAM and CD90 in 45 HCCs (18.9%), EpCAM and CD133 in five HCCs (2%), CD90 and CD133 in five HCCs (2%), and EpCAM, CD90, and CD133 in 11 HCCs (4.6%). To clarify the characteristics of gene-expression signatures specific to stem cell marker expression status, we selected 172 HCC cases expressing a single CSC marker (34 EpCAM⁺ CD90⁻ CD133⁻, 49 EpCAM⁻ CD90⁺ CD133⁻, and 10 EpCAM⁻ CD90⁻ CD133⁺) or all marker-negative HCCs (79 EpCAM⁻ CD90⁻ CD133⁻). A class-comparison analysis with

univariate F tests and a global permutation test ($\times 10,000$) yielded a total of 1,561 differentially expressed genes. Multidimensional scaling (MDS) analysis using this gene set indicated that HCC specimens were clustered in specific groups with statistical significance ($P < 0.001$). Close examination of MDS plots revealed three major HCC subtype clusters: all marker-negative HCCs (blue spheres); EpCAM single-positive HCCs (red spheres); and CD90 single-positive HCCs (light blue spheres). CD133⁺ HCCs (orange spheres) were rare, relatively scattered, and not clustered (Fig. 1B).

We examined the expression of representative hepatic stem/progenitor cell markers *AFP*, *KRT19*, and *DLK1* in HCCs with regard to the gene-expression status of each CSC marker (Fig. 1C). All three markers were up-regulated in EpCAM⁺ and CD133⁺ HCCs, compared with all marker-negative HCCs, consistent with previous findings.^{10,11} However, we found no significant overexpression of *AFP*, *KRT19*, and *DLK1* in CD90⁺ and all marker-negative HCCs.

Hierarchical cluster analyses revealed three main gene clusters that were up-regulated in EpCAM⁺ HCCs (cluster A, 706 genes), EpCAM⁺ or CD133⁺ HCCs (cluster B, 530 genes), and CD90⁺ or CD133⁺ HCCs (cluster C, 325 genes) (Fig. 1D). Pathway analysis indicated that the enriched genes in cluster A (red bar) were associated with chromatin modification, cell-cycle regulation, and Wnt/ β -catenin signaling (Fig. 1E). Genes associated with messenger RNA processing were enriched in clusters A (red bar) and B (orange bar). Surprisingly, genes in cluster C were significantly associated with pathways involved in blood-vessel morphogenesis, angiogenesis, neurogenesis, and epithelial mesenchymal transition (EMT) (light blue bar). Close examination of genes in each cluster suggested that known hepatic transcription factors (*FOXA1*), Wnt regulators (*TCF7L2* and *DKK1*), and a hepatic stem cell marker (*CD24*) were dominantly up-regulated in EpCAM⁺ and CD133⁺ HCCs (Fig. 1F). By contrast, genes associated with blood-vessel morphogenesis (*TIE1* and *FLT1*), EMT (*TGFBI*), and neurogenesis (*NES*) were activated dominantly in CD90⁺ HCCs and CD133⁺ HCCs.

CD90⁺ HCC Cells Share Features With Mesenchymal Vascular Endothelial Cells. Because CD133⁺ HCCs were relatively rare and constituted only 13% (microarray cohort) to 20% (FACS cohort) of all HCC samples analyzed, we focused on the characterization of EpCAM and CD90. To clarify the cell identity of EpCAM⁺ or CD90⁺ cells in primary HCCs, we performed IHC analysis of 18 needle-biopsy

specimens of premalignant dysplastic nodules (DNs), 102 surgically resected HCCs, and corresponding NT liver tissues. When examining the expression of EpCAM and CD90 in cirrhotic liver tissue by double-color IHC analysis, we found that EpCAM⁺ cells and CD90⁺ cells were distinctively located and not colocalized (Supporting Fig. 1A). Immunoreactivity (IR) to anti-CD90 antibodies (Abs) was detected in vascular endothelial cells (VECs), inflammatory cells, fibroblasts, and neurons, but not in hepatocytes or cholangiocytes, in the cirrhotic liver (Supporting Fig. 1B, panels a,b). IR to anti-EpCAM Abs was detected in hepatic progenitors adjacent to the periportal area and bile duct epithelial cells in liver cirrhosis (Supporting Fig. 1B, panels c,d).

IR to anti-EpCAM Abs was detected in 37 of 102 surgically resected HCCs (Fig. 2A, panel b), but not in 18 DNs (Fig. 2A, panel a). By contrast, no tumor epithelial cells (TECs) showing IR to anti-CD90 Abs were found in any of the 18 DNs or 102 HCCs examined (Fig. 2A, panels c,d). However, we identified CD90⁺ cells that were morphologically similar to VECs or fibroblasts within the tumor nodule in 37 of the 102 surgically resected HCC tissues ($\geq 5\%$ positive staining in a given area). IR to anti-CD90 Abs was also detected in hepatic mesenchymal tumors (Supporting Fig. 1C, panels a-c), indicating that CD90 is also a marker of liver stromal tumors.

Double-color IHC and immunofluorescence (IF) analysis confirmed the distinct expression of EpCAM and CD90 in HCC (Fig. 2B), consistent with the FACS data (Fig. 1A). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis of sorted EpCAM⁺, CD90⁺, and EpCAM⁻ CD90⁻ cells after CD45⁺ cell depletion indicated that the hepatic stem/progenitor markers, *AFP* and *KRT19*, were up-regulated in EpCAM⁺ cells (red bar), whereas the mesenchymal markers, *KIT* and *FLT1*, were up-regulated in CD90⁺ cells (orange bar), compared with EpCAM⁻ CD90⁻ cells (blue bar) (Fig. 2C). The hepatocyte marker, *CYP3A4*, was down-regulated in EpCAM⁺ cells and not detected in CD90⁺ cells, compared with EpCAM⁻ CD90⁻ cells. *POU5F1* and *BMI1* were equally up-regulated in both EpCAM⁺ and CD90⁺ cells, compared with EpCAM⁻ CD90⁻ cells.

EpCAM and CD90 were independently and distinctively expressed in different cellular lineages, so we evaluated the staining of EpCAM and CD90 separately and analyzed the clinicopathological characteristics of surgically resected HCC cases. HCCs were regarded marker positive if $\geq 5\%$ positive staining was detected in a given area. The existence of EpCAM⁺

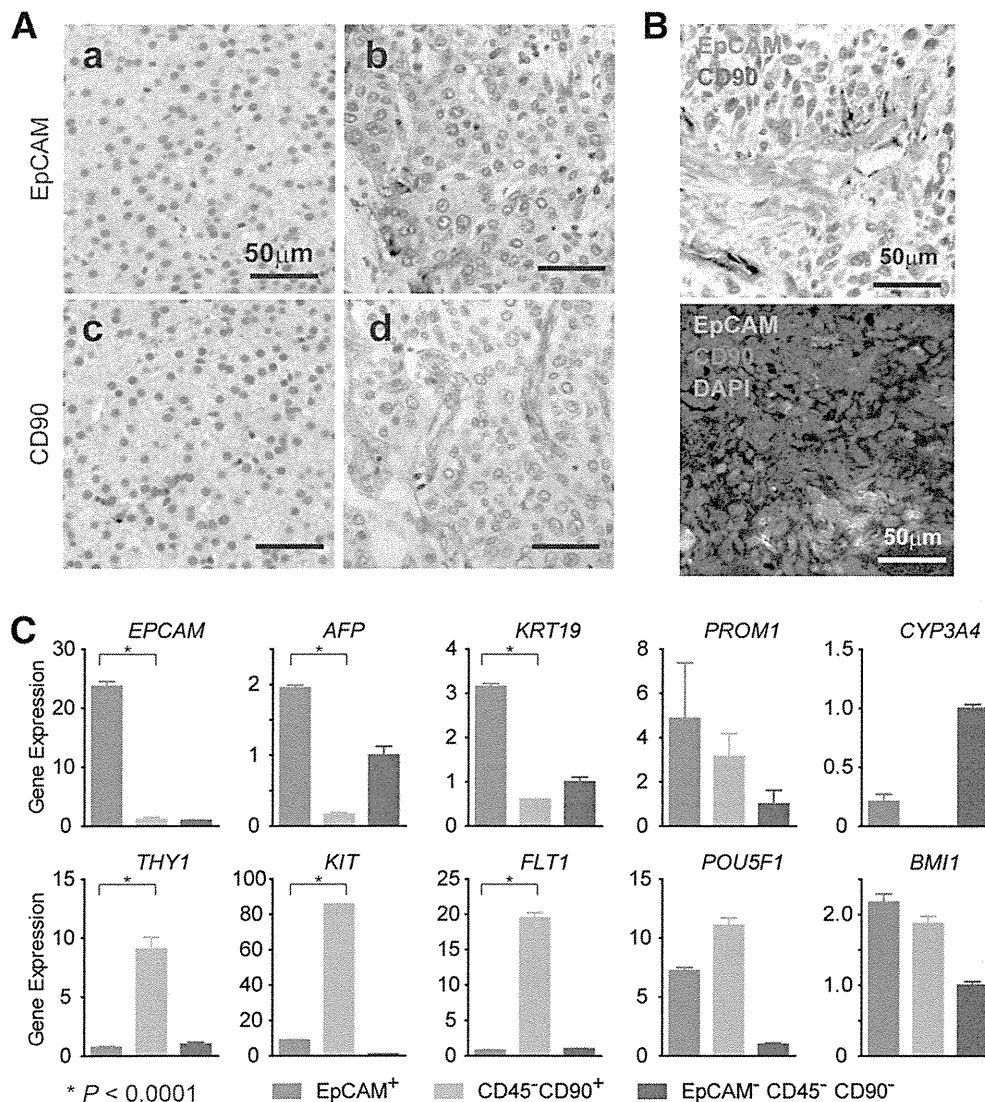


Fig. 2. Distinct EpCAM⁺ and CD90⁺ cell populations in HCC. (A) Representative images of EpCAM and CD90 staining in dysplastic nodule (panels a,c) and HCC (panels b,d) by IHC analysis (scale bar, 50 μ m). EpCAM (panels a,b) and CD90 (panels c,d) immunostaining is depicted. (B) Upper panel: representative images of EpCAM (red) and CD90 (brown) double staining in HCC by IHC (scale bar, 50 μ m). Lower panel: representative images of EpCAM (green) and CD90 (red) staining with 4'6-diamidino-phenylindole (DAPI) (blue) in HCC by IF (scale bar, 50 μ m). (C) qPCR analysis of sorted EpCAM⁺ (red bar), CD90⁺ (orange bar), or EpCAM⁻CD90⁻ (blue bar) derived from a representative primary HCC. Experiments were performed in triplicate, and data are shown as mean \pm standard error of the mean.

cells ($\geq 5\%$) was characterized by poorly differentiated morphology and high serum AFP values with a tendency for portal vein invasion, whereas the existence of CD90⁺ cells ($\geq 5\%$) was associated with poorly differentiated morphology and a tendency for large tumor size (Supporting Tables 2 and 3). Notably, the existence of CD90⁺ cells was associated with a high incidence of distant organ metastasis, including lung, bone, and adrenal gland, within 2 years after surgery, whereas EpCAM⁺ cell abundance appeared unrelated to distant organ metastasis.

We evaluated the characteristics of EpCAM⁺ or CD90⁺ cells in seven representative HCC cell lines. Morphologically, all EpCAM⁺ cell lines (HuH1, HuH7, and Hep3B) showed a polygonal, epithelial cell shape, whereas three of four CD90⁺ cell lines (HLE, HLF, and SK-Hep-1) showed a spindle cell shape (Fig. 3A). EpCAM⁺ cells were detected in 11.5%, 57.7%, and 99.6% of sorted HuH1, HuH7,

and Hep3B cells, respectively. A small CD90⁺ cell population (0.66%) was observed in PLC/PRL/5, whereas 91.3%, 10.8%, and 59.0% of CD90⁺ cells were detected in HLE, HLF, and SK-Hep-1, respectively. Compared with primary HCCs, only EpCAM⁺ or CD90⁺ cells were detected in liver cancer cell lines under normal culture conditions (Fig. 3B), suggesting that these cell lines contain a relatively pure cell population most likely obtained by clonal selection through the establishment process.

A class-comparison analysis with univariate t tests and a global permutation test ($\times 10,000$) of microarray data yielded two main gene clusters up-regulated in EpCAM⁺ cell lines (HuH1, HuH7, and Hep3B) (cluster I, 524 genes) or in CD90⁺ cell lines (HLE, HLF, and SK-Hep-1) (cluster II, 366 genes) (Fig. 3C). PLC/PRL/5 showed intermediate gene-expression patterns between EpCAM⁺ and CD90⁺ cell lines using this gene set. Pathway analysis indicated that the genes

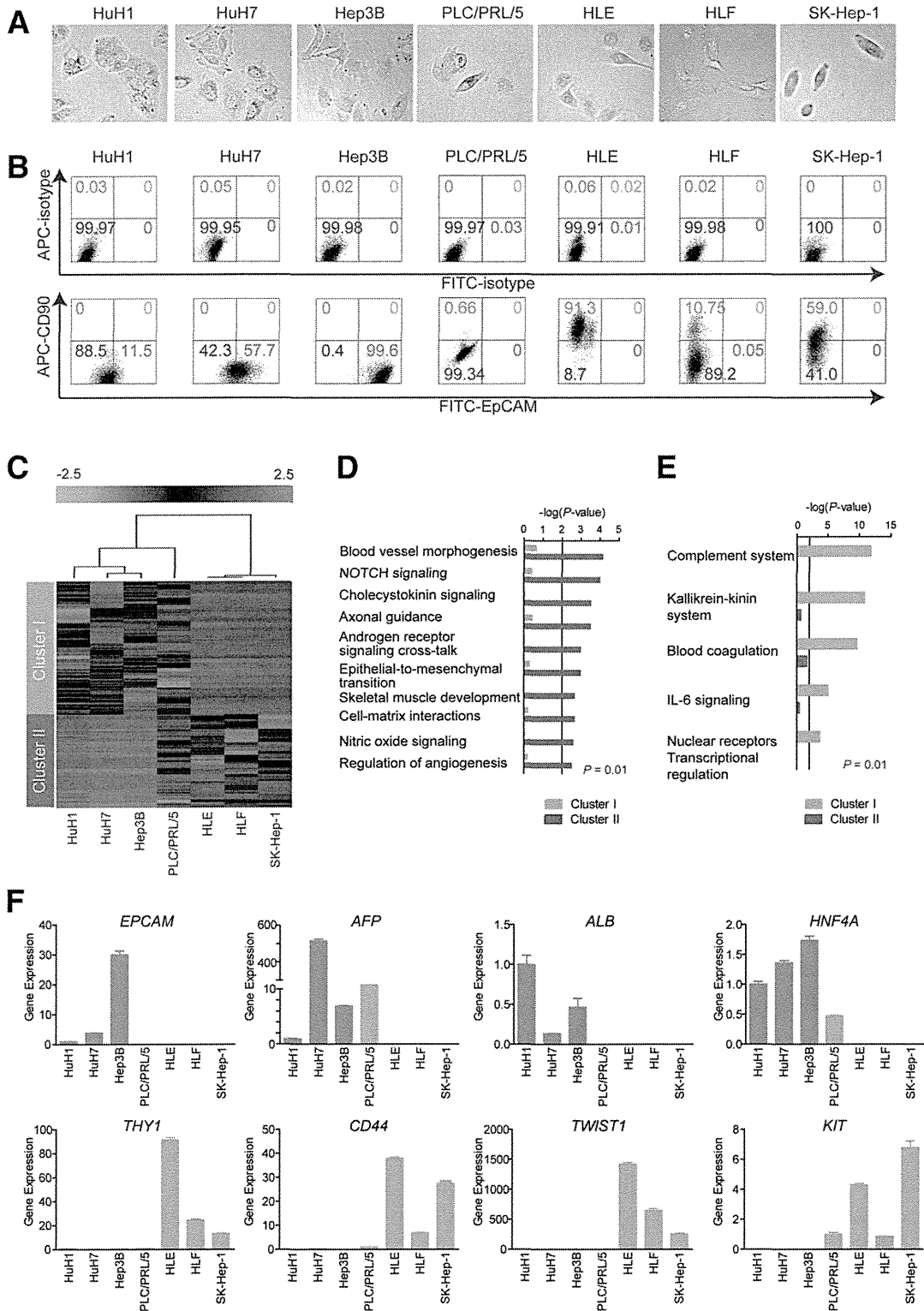


Fig. 3. Characteristics of HCC cell lines defined by EpCAM and CD90. (A) Representative photomicrographs of EpCAM⁺CD90⁻ and EpCAM⁻CD90⁺ HCC cell lines. (B) Representative FACS data of EpCAM⁺CD90⁻ and EpCAM⁻CD90⁺ HCC cell lines stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-EpCAM and APC-CD90 Abs. (C) Heat-map images of seven HCC cell lines based on 890 EpCAM/CD90-coregulated genes. Each cell in the matrix represents the expression level of a gene in an individual sample. Red and green cells depict high and low expression levels, respectively, as indicated by the scale bar. (D and E) Pathway analysis of EpCAM/CD90-coregulated genes. Canonical signaling pathways activated in cluster I (orange bar) or II (blue bar) with statistical significance ($P < 0.01$) are shown. (F) qPCR of representative differentially expressed genes identified by microarray analysis (C) in seven HCC cell lines.