

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790781

研究課題名(和文)新規ケモカイン製剤の免疫賦活効果による肝癌の再発抑制効果をめざした免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of secondary prevention for hepatocellular carcinoma by enhancement of anti-tumor immunity stimulated by chemokine agents.

研究代表者

荒井 邦明(Arai, Kuniaki)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：50436838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝細胞癌に対するラジオ波焼灼療法(RFA)と併用する樹状細胞(DC)療法の際にケモカイン製剤を投与することにより抗腫瘍免疫を増強し、二次発がんを抑制する治療法を開発することを目標とする。C型慢性肝炎患者由来のDCの細胞免疫学的特徴を解明し、種々の刺激誘導法を検討したところ、OK-432添加刺激が抗原提示能、免疫賦活作用を著明に向上させたことが明らかになった。この刺激誘導培養法を用いたDCをRFA施行時に経皮的に癌組織へ注入する安全性臨床試験を開始した。OK-432添加刺激を加えたDC併用RFAは有意に無再発生存期間を延長することが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is development of secondary prevention for hepatocellular carcinoma (HCC) by enhancement of anti-tumor immunity stimulated by chemokine agents in radiofrequency ablation (RFA) therapy with dendritic cell (DC) injection into HCC. We analyzed cellular immune response of DC and various method of introduction of DC. We revealed that stimulation of OK-432 enhances antigen presentation activity and immunopotentiative action. We started clinical trial of OK-432 stimulated DC injection into HCC after RFA therapy. Progression free survival in the group treated with RFA + OK432 stimulated DC transfer was much better.

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：抗腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

### 【肝がん治療における免疫療法の必要性】

肝細胞がん(肝がん)は早期病変に対して現行の治療法を駆使しても3年以内に約70%が再発(二次発がん)するという予後不良の悪性疾患である。そして、がんに対する標準治療の限界を打破する手法としてこれまで多くの免疫療法が試みられてきた(Adv. Cancer Res. 99:363,2008; Immunity 29:372,2008)。

### 【樹状細胞治療の開発における問題点】

我々は肝がんに対する内科的局所治療[肝動脈塞栓療法(TAE)、経皮的ラジオ波焼灼療法(RFA)]と併用して樹状細胞を投与する免疫療法を独自に開発し(金沢大学医学倫理委員会承認#187,226)、安全性について確認した(Nakamoto et al.; Clin. Exp. Immunol. 147:296,2007)。また再発率の改善傾向も認められたが満足のいくものではなかった。

## 2. 研究の目的

1. の背景に基づいて、肝がんに対するRFAと併用する樹状細胞治療の際にケモカイン製剤を投与することによって抗腫瘍免疫を増強し二次発がんを制御する治療法を開発する。

1) 肝がん患者における至適な樹状細胞の誘導法(ex vivo)を確立する。

2) 肝がんモデル(in vivo)でのケモカイン製剤の併用に関する前臨床試験を施行する。

3) 肝がん患者を対象とした臨床研究として、内科的局所治療RFAの際に1)~2)で確立した手法を用いることによって、安全性、免疫誘導能を観察する。

## 3. 研究の方法

(1) 樹状細胞の誘導培養法(ex vivo)の検討

・肝がん患者および健常者から得られる樹状細胞の表面マーカー、機能的特徴に関して比較検討する。具体的には、末梢血単核球から得られたCD14(+)接着細胞を分離して、GM-CSF、IL-4を含む培養液中で7日間培養する。誘導培養の過程で、以下の刺激を用いる。これらはすべてGMPグレードの試薬、手技において施行する。

(a) GM-CSF (100 ng/ml)、IL-4 (50 ng/ml) (CellGenix社)のみ。

(b) aに加えて、IL-1 (10ng/ml)、IL-6 (100ng/ml)、TNF (20ng/ml) (CellGenix社)を添加する。

(c) bに加えて、PGE2 (≈1000ng/ml) (KAKEN社)を添加する。

(d) aに加えて、OK-432 (≈2.5 KE/ml) (Roche社)を添加する。

(e) a-dにおいて、亜鉛濃度を变化する(Nature Immunol. 7:971,2006、Zeria社)・誘導されたCD14(-)HLA-DR(+)樹状細胞分画に対して、以下の項目を検討する。

(A) 細胞表面マーカー: CD14,HLA-DR,lin1,CD80,CD83,CD86,CD123,CCR7 抗体を用いてフローサイトメトリー法にて検出する(FACS Calibur; BD社)。

(B) サイトカイン、ケモカイン産生: スパ<sup>o</sup>ンジョンアレイにて定量(Bio-PlexTM; BIO-RAD社)。

(C) 抗原取込み(貪食)能: FITC-dextran (Polyscience社)を用いて検出する。

(D) 異系リンパ球混合培養試験(MLR): 他人のリンパ球と混合した際の増殖反応を[3H]thymidine (PerkinElmer社)で標識することによって評価する。

・健常者と比較して、肝がん患者において、a) - e)の誘導培養法においてA) - D)の解析で機能的に高い活性化を示す方法を確立する。

(2) 肝がん再発モデルにおけるケモカイン製剤の前臨床試験(in vivo)

・肝がんモデルにおいてがん組織(皮下、肝内)へのラジオ波焼灼療法(RFA)とともに、樹状細胞、ケモカインMIP-1/CCL3製剤(ECI301, Clin. Cancer Res. 14:1159,2008、ECI社と共同研究契約済)を投与して抗腫瘍免疫、再発抑制効果を観察する。肝がん再発マウスモデルはすでに確立しており(Tsuchiyama, Nakamoto et al.; J. Immunol. 178:574,2007)、皮下または肝内(経門脈的)に形成した肝がん結節(BNL, MM45T, Hepa1-6株)を以下の方法で治療した後に、再度肝がん細胞株(再発腫瘍)を移植して経過を観察する。

(a) 肝がん結節にRFA(RITA社)を施行後に、マウス樹状細胞(CD11c+)を投与する。

(b) aに加えて、ケモカイン製剤を全身性(静脈内、腹腔内)に投与する。

(c) a, bを併用する。

・治療後に、移植した再発腫瘍に対する抗腫瘍免疫、再発抑制効果を評価する。

(A) 再発腫瘍径の経時的変化および免疫組織学的検討(細胞表面マーカー: CD4,CD8,AGM1,F4/80,Mac-1,CD45R,CD11c,CD31; PharMingen社)

(B) 末梢血、脾細胞に由来するNK、NKT、Tリンパ球、樹状細胞の抗腫瘍免疫能:

B-1. サイトカイン産生: フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン定量(FACS Calibur; BD社)、ELISPOT法(Mabtech社)、スパ<sup>o</sup>ンジョンアレイ法(Bio-PlexTM)

B-2. 細胞障害アッセイ: 肝がん細胞を標的とした<sup>51</sup>Cr release assay

(C) 体重、活動性の観察

・a) - c)において投与量・回数・期間を工夫することによって、A), B)での高い活性を示し、C)において副反応、有害事象が最小となる方法、至適量を確立する。

(3) 肝がん患者を対象とした安全性臨床研究

・ケモカイン製剤を用いた新規治療法の開発

過程として、本研究期間内においては安全性臨床試験として開始する。

(1)~(2)で確立した方法、至適量に基づいて、経皮的ラジオ波焼灼療法(RFA)と併用する樹状細胞治療の際にケモカイン製剤(ECI301; GMPグレード)を投与する。実施に際しては、本学医学倫理委員会の承認を得て行う。単独投与における安全性は、樹状細胞が臨床研究(Nakamoto et al.; Clin. Exp. Immunol. 147:296, 2007 および倫理委員会承認 # 187, 226)、ケモカイン製剤が米国FDAにおける臨床試験において確立している。

・対象: 肝癌診療ガイドライン(2005年版)においてRFAの適応となる肝がん症例

・投与方法: RFA時に、樹状細胞は経皮的にがん組織へ、ケモカイン製剤は全身性(経静脈的)に投与する。

・投与量: 1/100量3例、1/10量3例、至適量10例(ドーズエスカレーション)

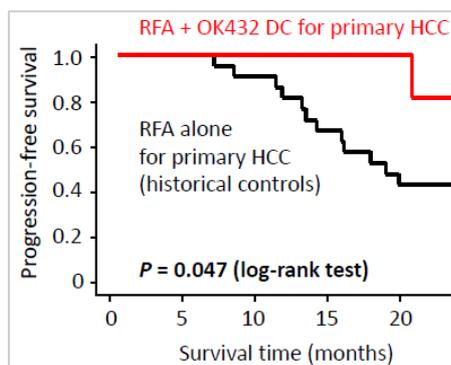
主要エンドポイントとして投与後の副反応、有害事象を観察する(NCI CTC Scale)。また、肝がんの再発は定期的画像診断(dynamic造影CT, MRI)、免疫誘導能の検討は末梢血リンパ球を用いて(1)(2)の手法にて解析する。

#### 4. 研究成果

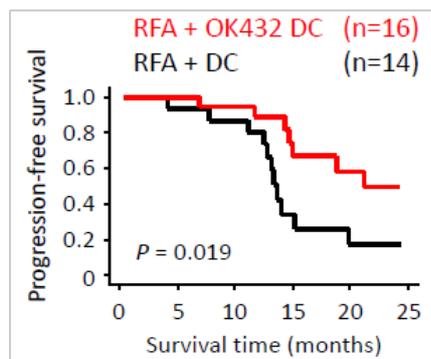
抗腫瘍免疫を向上させる目的で、C型慢性肝疾患患者由来DCの細胞免疫学的特徴を解明し、種々の刺激誘導法の有用性について検討した。DCの誘導は、肝細胞癌患者16例、C型慢性肝疾患患者12例、非感染者16例の末梢血単核球から接着細胞を分離しGMPグレードのGM-CSF、IL-4を含む培地中で5日間培養した。末梢血から得られた接着単核球の多くはCD14陽性の単球の特徴を示していたが、GM-CSF、IL-4刺激5日後にはCD14陰性、Lin陰性、HLA-DR陽性の特徴を示す未熟DCが誘導された。得られたDCに対して、TNF、IL-6、IL-1、PGE2、OK-432等の免疫賦活物質を添加して更に2日間培養した際の生細胞率、成熟度、遊走能、貪食能、サイトカイン産生、異系リンパ球混合培養試験の変化を1)非添加群(GM-CSF、IL-4のみ)、2)OK-432添加群、3)TNF、IL-6、IL-1添加群、4)TNF、IL-6、IL-1、PGE2添加群の4群において比較した。肝癌患者由来の未刺激DCでは、非感染者と比較し、生細胞率は低下していたが、DCサブセットにおけるCD11c陽性のミエロイドDCの割合、成熟度を示すCD83およびCD86の発現、遊走能に關与するCCR7の発現は増加( $p<0.05$ ) FITC標識されたデキストランを用いた貪食能も高い傾向にあった。肝癌患者由来DCのOK-432添加群では、他群と比較し、CCR7の発現、Th1タイプのサイトカイン産生(IL-12、IFN、TNF、RANTES、IL-1、VEGF)、リンパ球刺激能が増加していた( $p<0.01$ )。

以上より各種調整法の特徴が明らかとなり、OK-432添加刺激は抗原提示能、免疫賦活

作用を著明に向上させたことから、C型関連肝癌患者に適する樹状細胞調整法が示され新たな免疫治療の開発に寄与する可能性があり、この刺激誘導培養法を用いた樹状細胞をRFA施行時に経皮的にがん組織へ注入する安全性臨床試験を開始した。16例のRFAを施行したC型関連肝癌患者に対して、この誘導培養法を用いた樹状細胞を経皮的にがん組織へ注入する安全性臨床試験を行った。有害事象としてgrade2以下の発熱を75%に認めしたがRFA自体に伴う副作用であり、重篤な有害事象は認めなかった。以前に当院でRFAを施行した初発肝細胞癌症例と比較し、OK-432添加刺激を加えたDC併用RFA初発肝細胞癌治療症例は、有意に無再発生存期間を延長( $p=0.047$ )した。



またOK-432添加刺激を加えずに誘導したDC併用治療群14例と比較し、OK-432添加刺激を加えたDC併用治療群は有意に無再発生存期間を延長( $p=0.019$ )することが示された。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計20件)

1. Arai K, Yamashita T, Kaneko S. Liver cancer: progress in diagnosis and treatments. Topics: IV. Progress in guideline on liver cancer; 3. Guideline of surveillance]. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2014 Jan 10;103(1):37-43. 査読なし

2. Yamashita T, Arai K, Kaneko S. Liver cancer: progress in diagnosis and treatments. Topics: VI. Progress in treatments of liver cancer; 5. Chemotherapy. Nihon Naika Gakkai Zasshi.

2014 Jan 10;103(1):102-9. 査読なし  
3. Terashima T, Arai K (他 10 名, 3 番目) Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. *Hepatol Res.* 2013 Oct 31. doi: 10.1111/hepr.12266. [Epub ahead of print] 査読あり  
4. Takamura H, Arai K (他 27 名, 21 番目) Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by  $\alpha$ -SMA-positive cancer-associated fibroblasts. *Oncol Rep.* 2013 Oct;30(4):1561-74. doi: 10.3892/or.2013.2616. 査読あり  
5. 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一, 進行肝臓癌治療 Q69. わが国のソラフェニブ治療の実態と治療成績はどのくらいですか?, 肝臓診療 Q&A Page277-280(2013.10) 査読なし  
6. Arihara F, Arai K (他 6 名, 5 番目) Increase in CD14+HLA-DR<sup>-</sup>/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 Aug;62(8):1421-30. doi: 10.1007/s00262-013-1447-1. 査読あり  
7. Honda M, Arai K (他 7 名, 4 番目) Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Apr 15;13:191. doi: 10.1186/1471-2407-13-191. 査読あり  
8. Hodo Y, Arai K (他 12 名, 5 番目) Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res.* 2013 Apr 1;19(7):1827-37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1641. 査読あり  
9. Mizukoshi E, Arai K (他 8 名, 3 番目) Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013 Apr;57(4):1448-57. doi: 10.1002/hep.26153. 査読あり  
10. 荒井邦明, 山下竜也, 金子周一, 【肝細胞癌のすべて 2012】肝がんの治療アルゴリズム 海外 (APASL, EASL/EORTC, AASLD) の診療ガイドライン, 肝・胆・膵 65 巻 6 号 Page1199-1204(2012.12) 査読なし  
11. 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一, 【肝細胞癌のすべて 2012】治療方別の治療効果判定の実際 肝動注化学療法 肝・胆・膵 65 巻 6 号 Page1364-1369(2012.12) 査読なし  
12. Mizukoshi E, Arai K (他 4 名, 3 番目) Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune

responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2012 Nov;32(10):1516-26. doi: 10.1111/j.1478-3231.2012.02853.x. 査読あり  
13. 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一, 【肝・胆・膵腫瘍の薬物療法-最近の進歩】肝がんソラフェニブの新たな展開 (適応承認後明らかになってきた治療成績、課題、新たな臨床試験など), 腫瘍内科 9 巻 6 号 Page641-650(2012.06) 査読なし  
14. 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一, 【肝胆膵悪性腫瘍に対する分子標的療法の近未来的展望】肝細胞癌 Sorafenib, 肝・胆・膵 64 巻 5 号 Page645-655(2012.05) 査読なし  
15. Yamashita T, Arai K (他 9 名, 2 番目) 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 Nov 30;81(5-6):281-290. doi: 10.1159/000334439. 査読あり  
16. Sunagozaka H, Arai K (他 7 名, 6 番目) Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2011 Oct 1;129(7):1576-85. doi: 10.1002/ijc.25830. 査読あり  
17. 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一, 【肝細胞癌の化学療法-分子標的療法の進歩と効果判定】各論 肝細胞癌の化学療法の進歩 肝細胞癌の動注化学療法の進歩と治療成績, 肝胆膵画像 (1882-5087)13 巻 6 号 Page602-607(2011.09) 査読なし  
18. Takata Y, Arai K (他 11 名, 8 番目) Frequency of CD45RO<sup>+</sup> subset in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>(high)</sup> regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011 Aug 28;307(2):165-73. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.029. 査読あり  
19. 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一, 【肝細胞がん診療の進歩:Up-To-Date】治療 肝細胞がんに対する肝動注化学療法の位置づけ, 最新医学 (0370-8241) 66 巻 8 号 Page 1804-1810(2011.08) 査読なし  
20. Mizukoshi E, Arai K (他 8 名, 3 番目) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011 Apr;53(4):1206-16. doi: 10.1002/hep.24149. 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

1. T Terashima, T Yamashita, N Takata, H Nakagawa, K Arai, T Kagaya, E Mizukoshi, M Hondo, S Kaneko. The impact of post-progression survival on overall survival of patients with advanced

hepatocellular carcinoma treated by sorafenib therapy. AASLD2013 2094 2013/11/5 Washington DC, USA

2. H Sunagozaka, T Yamashita, N Oishi, T Hayashi, H Takatori, T Shimakami, K Kitamura, K Arai, T Kagaya, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, M Hondo, S Kaneko. Serum Dickkopf-1 as a biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma with stem cell features. AASLD2013 1792 2013/11/5 Washington DC, USA

3. E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, K Fushimi, H Nakagawa, K Yamada, K Kaji, M Kitahara, S Kaneko. Phase I Trial of Alpha-Fetoprotein-Derived Peptides in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. AASLD2013 251 2013/11/5 Washington DC, USA

4. M Kitahara, E Mizukoshi, K Kaji, K Yamada, H Nakagawa, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, S Kaneko. Therapeutic Efficacy and Safety of OK432-Stimulated Monocyte-Derived Dendritic Cell Injection into Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency Ablation. AASLD2013 1265 2013/11/4 Washington DC, USA

5. K Kaji, E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, K Fushimi, H Nakagawa, K Yamada, M Kitahara, S Kaneko. Cellular immune responses for human homologue of Prp24p-derived peptides in patients with Hepatocellular Carcinoma. AASLD2013 1262 2013/11/4 Washington DC, USA

6. K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. Assessment of the therapeutic response of hepatocellular carcinoma treated with radiofrequency ablation : comparison of contrast-enhanced ultrasonography and computed tomography. WFUMB 2013 PA03-004 2013/05/2-5 Sao Paulo, Brazil

7. K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. Contrast-enhanced ultrasonography for evaluating treatment of sorafenib in hepatocellular carcinoma. WFUMB 2013 PA03-003 2013/05/2-5 Sao Paulo, Brazil

8. K Arai, S Kaneko, T Yamashita, K Ikeda, J Furuse, M Kudo, The Study Group on New Liver Cancer Therapies (NLCT) in Japan. Efficacy and safety of miriplatin for hepatocellular carcinoma : a multi center retrospective study in Japan. AASLD 2012 P-539 2012/11/10 Boston, USA

9. E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, K Fushimi, S Kaneko. A phase I study of vaccination with human telomerase reverse transcriptase-derived peptide in patients with hepatocellular carcinoma. AASLD2012 2012/11/10 Boston,

USA

10. T Yamashita, T Terashima, K Arai, H Sunagozaka, E Mizukoshi, A Sakai, M Honda, S Kaneko. Efficacy and safety of hepatic arterial infusion chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. AASLD2012 2012/11/9 Boston, USA

11. F Arihara, E Mizukoshi, M Kitahara, Y Takada, K Arai, T Yamashita, Y Nakamoto, S Kaneko. Increase of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma and its impact for prognosis of patients. AASLD2011 2011/11/8 San Francisco, USA

12. T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, K Nio, Y Hara, X W. Wong, S Kaneko. Distinct Liver Cancer Stem Cells defined by EpCAM and CD90 in Human Hepatocellular Carcinoma. AASLD2011 2011/11/7 San Francisco, USA

13. E Mizukoshi, F Arihara, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, T Ueda, T Kagaya, T Yamashita, S Kaneko. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. AASLD2011 2011/11/8 San Francisco, USA

〔図書〕(計1件)

1. 荒井邦明, 金子周一, 肝腫瘍, 臨床病態学(ヌーヴェルヒロカワ) Page151-157 (2013.03)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒井 邦明 (ARAI KUNIAKI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号: 50436838

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし