

HCV 関連 HCC に対する heat-shock
protein 70 messenger RNA 導入樹状
細胞療法を用いた第 1 相臨床試験

氏名 前田 祥成

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成 27 年 1 月

目次

1. 要旨	1
2. 背景	1
3. 目的	3
4. 方法	3
5. 結果	6
6. 考察	8
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	10

1. 要旨

背景：我々はC型肝炎関連HCCにおいてHSP70が過剰発現していることをプロテオミクス、免疫組織学的染色にて確認しこれまでに報告してきた。これはHSP70がHCC治療における分子標的になりうることを示唆している。

方法：12人のHCV関連HCC患者を第I相臨床試験に登録した。エレクトロポレーションによりHSP70mRNAが導入された樹状細胞(HSP70-DCs)を皮内注射で患者に投与した。3週間ごとに3回治療を行った。HSP70-DCsの細胞数は 1×10^7 cellsを最小とし、 2×10^7 cells、 3×10^7 cellsを最大投与量とした。免疫学的評価を行った。

結果： 3×10^7 cellsの細胞数において発生したgrade III肝膿瘍を除いてgrade III/IVの有害事象は認められなかった。このため 3×10^7 cellsが適切な量か確認するため3人の患者を追加した。最終的に 3×10^7 cellsを推奨投与量と判断した。効果判定としては、完全奏効(CR)を2例に安定(SD)を5例に認め、5例は進行(PD)であった。CRが得られた2例はそれぞれ44カ月、33か月間無再発であった。

Case12の免疫組織学的染色ではCD8陽性T細胞とgranzyme Bの腫瘍内浸潤を認め、これは免疫担当細胞が細胞障害活性を有するCTLであることを示している。

考察：この研究はHSP70-DCs療法がHCV関連HCC患者に安全かつ有用であることを示しており、さらなる臨床試験を考慮すべきであることを示した。

2. 背景

肝細胞癌は世界的に最も一般的な致命的悪性腫瘍の一つであり、年間約60万人が死亡している¹。B型肝炎ウイルス(HBV)またはC型肝炎ウイルス(HCV)の慢性感染はHCCの最も明確なリスクファクターである²。日本においては、HCC症例の約80%が慢性HCV感染に起因する^{3,4}。近

年、患者管理が進歩しているにも関わらず、HCC 患者の根治手術後 5 年生存率は 26%~50%と低い⁵。多くの研究にも関わらず、HCC は肝臓だけでなく遠隔臓器にも頻繁に転移する傾向があるため、予後改善は乏しい⁶⁻¹⁰。さらに、HCV 関連 HCC 患者は通常肝機能障害を有するため、潜在的に肝障害を来す化学療法は制限される。したがって、有害事象の少ない新規治療が検討されるべきである。

HCC は免疫原性であることが示されており、T 細胞ベースの免疫療法は有望視されている^{11,12}。HCC 特異的免疫応答の活性化は腫瘍関連抗原 (TAA) を標的とすることで実現可能である。免疫療法の開発に成功するためには分子標的や TAA を見つけることが重要である。我々はプロテオミクスにより、熱ショック蛋白 (HSP) 70 family が HCV 関連 HCC の腫瘍内に正常肝組織に比して高発現していること¹³、免疫組織学的染色 (IHS) により HCC の 92% に HSP70 が過剰発現していること¹⁴を報告してきた。これらは HSP70 が HCV 関連 HCC の標的分子となりうることを示唆している。

腫瘍特異的または腫瘍関連抗原により誘導された樹状細胞 (DCs) は免疫応答を誘導することが示されている。特定抗原の DNA または RNA を導入された DCs は抗原提示の延長をもたらし、高親和性の腫瘍反応性 CTL 応答を生み出すことができる¹⁵。これは特異的 TAA をコードした RNA を導入された DCs は複数のエピトープに対する強力な抗原および腫瘍特異的 T 細胞を誘導することを示している¹⁶。エレクトロポレーションはヒト DCs を形質移入するための最も効率的な手法である¹⁷。これらの報告は HSP-mRNA を導入された DCs が HCC 治療に有用でありうることを示唆している。

そこで、我々は HCV 関連切除不能、再発 HCC 患者に対しエレクトロポレーションにより HSP70 の mRNA を導入した DCs (HSP70-DCs) を使用した第 1 相試験を行った。

3. 目的

HCV 関連切除不能再発 HCC 患者に対し HSP70-DCs を使用した第 I 相試験を行い、本療法の安全性を検討すること。また、臨床評価、免疫学的評価を行い、有効性、免疫応答を検討すること。

4. 方法

4-1. 研究デザイン

これは HCV 関連切除不能再発 HCC に対し、HSP70-DCs を用いた免疫療法の単施設第 I 相試験である。患者は 2007 年から 2011 年にかけて山口大学大学院消化器・腫瘍外科学（第 II 外科）で治療された。Primary endpoint は安全性、実現可能性、および毒性を評価することとし、Secondary endpoint は免疫応答を調べることとした。臨床反応は Response Evaluation Criteria in Solid Tumors guideline version 1.1 (RECIST) に従って評価した。安定した患者を適格とし、HSP70-DCs は 3 週間ごとに 3 回皮内投与した。HSP70-DCs は 3 段階の dose escalation 法として、各々 1×10^7 cells、 2×10^7 cells、 3×10^7 cells を投与した。有害事象は Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 (CTCAE) に従って評価した。各々の投与前、間、30 分後まで患者を観察し vital signs を測定した。Grade 3 または 4 の有害事象が生じた場合は 3 例の患者を追加することとした。Grade 3 または 4 の有害事象が 3 人中 2 人または 6 人中 4 人に認められた場合は用量漸増を中止することとした。

臨床評価および computed tomography (CT) による画像評価は治療前と 3 回目の治療前、最終投与 1 か月後に行った。

4-2. 患者

2007 年から 2011 年の期間に 12 人の HCV 関連切除不能再発 HCC 患者が登録された。これらの患者の臨床病理学的特徴は Table 2a、2b に記載している。端的には 56 歳から 82 歳（男性：10、女性：2）、Eastern

Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS) 0-1 であった。

4-3. 適格基準

同プロトコルは山口大学医学部のヒト治験審査委員会 (IRB) で承認されている。全患者から書面による同意書が得られた。適格患者は 20 歳以上の進行再発 HCC で、切除、ラジオ波焼灼 (RFA) または経動脈化学塞栓療法 (TACE) から 1 か月以上経過した症例とした。

4-4. HSP70-DCs の準備

末梢血単核球 (PBMCs) は COBE Spectra Apheresis System (COBE BCT, Inc., Lakewood, CO) を用いて 3 週間ごとに採取した。3000ml の血液から採取した PBMCs を Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて密度勾配遠心分離により濃縮した。PBMCs を無血性 AIM-V 培地 (Gibco, Paisley, Scotland) で 37°C、5%CO₂ の環境下で 45 分培養した。プラスチック接着細胞を 800 単位/ml のマクロファー激因子 (G-CSF) (Osteogenetics GmbH, Wurzburg, Germany)、および 500 単位/ml のインターロイキン-4 (IL-4) (Osteogenetics GmbH) を含む AIM-V 培地で培養した。6 日目に誘導された未成熟 DCs を 300 単位/ml の腫瘍壊死因子 α (TNF- α) を含む AIM-V 培地中で培養した。培養物についてはエンドトキシン、マイコプラズマ、細菌汚染についてチェックしている。

10 日目に成熟 DCs を採取し、 2×10^6 cells/400 \cdot L に調整した後、10 μ g の HSP70mRNA と混合した後 500 μ s、400V でエレクトロポレーション (Harvard Apparatus, Holliston, MA) した。DCs は 3 回洗浄の後生食で 2ml に希釈し、患者鼠径部に皮内投与した。

4-5. 成熟化の確認

未成熟 DCs および HSP70-DCs をモノクローナル抗体で染色し flow cytometry (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) で解析した。すべての抗原は Coulter Immunology (Hialeah,

FL)製で、CD80 (B7-1)、CD83 (HB-15)、CD14 (B1)、HLA-ABC、HLADR (I2)、CD86 (B7-2)、CD40 について測定した。

4-6. Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot)

エフェクター細胞としての PBMCs (2×10^5 cells) と刺激細胞として HSP70 mRNA をエレクトロポレーションした PBMCs、またはネガティブコントロールとしてエレクトロポレーションのみ行った PBMCs を 18-20 時間共培養し、インターフェロン γ (IFN- γ) 発現を ELISpot にて (Mabtech, Cincinnati, OH) 測定した。スポット数の測定には Eliphoto Scan (Minerva Tech, Tokyo, Japan) を使用した。

4-7. flow cytometry

患者 PBMCs を治療前、治療 1 回後、2 回後、3 回目の治療後 1 か月の時期に flow cytometry を用いて測定した。使用した抗原は抗-CD3, -CD56, -CD57, and -NKG2D (Coulter Immunology) であった。また CD107a および IFN- γ の細胞内染色も抗-CD3, CD8, CD56 and CD107a (BD Biosciences) 抗体および IFN- γ -PE (BD Biosciences) 抗体を用い、flow cytometer を行った。

4-8. 免疫組織学的染色

EnVision+キット (Dako, Carpinteria, CA) を用いて、抗-Hsp70 mAb, 抗-HLA Class 1 ABC mAb, 抗-CD8 mAb, 抗-granzyme B mAb, 抗-CD56 mAb (Abcam, Cambridge, UK) 染色を行った。

4-9. 臨床評価

病歴、理学所見、CT または MRI による画像診断、血液生化学検査から毒性および治療効果を診断した。腫瘍マーカーは α -fetoprotein (AFP) および vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II) を測定した。毒性評価は CTCAE に、効果判定は RECIST に従い評価した。

4-10. 統計解析

$P < 0.05$ を有意とみなし、標準誤差 (SE) を提示した。解析には Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を使

用した。

5. 結果

5-1. DCs の成熟化

誘導 6 日目との未成熟 DCs と 9 日目の成熟 DCs の表面マーカーを Table 1 に示した。CD80、CD83、CD86 陽性細胞は成熟 DCs で著明に増加していた ($P < 0.001$)。HLA-Class II 発現は増加しており ($P < 0.05$)、HLA-Class I 発現に差を認めなかった。

5-2. 有害事象

HSP70-DCs 療法を施行された 12 人のうち、5 人に有害事象を認めた (Table 2b)。樹状細胞数 1×10^7 および 2×10^7 では grade3, 4 毒性を認めなかった。 3×10^7 の細胞量において grade3 肝膿瘍を認め、3 例の症例を追加した。肝膿瘍は抗生剤投与で軽快した。本症例に投与した DCs は汚染がないことを再度確認した。また、膿瘍は腫瘍とは別部位に発生しており、腫瘍崩壊による膿瘍形成の可能性は低いと考えられた。

5-3. 効果判定

Table 2b に腫瘍マーカーと CT または MRI による画像評価を示す。2 人が CR、5 人が SD、残る 5 人が PD であった。2 人の CR 症例は治療後 3 年以上に渡り他治療を要さず、無再発であった。CR 症例の詳細を以下に記す。

Case 1 : 69 歳女性。HCC に対し肝部分切除術を施行された 8 か月後に肝 S8 に 20mm 大の HCC 再発を認めた。AFP は 9.2 ng/mL (正常値: <20)、PIVKA II は 143 mAU/mL (正常値: <40) であった。治療 1 か月後にこれら腫瘍マーカーの値は正常値となり、MRI で腫瘍消失を確認した。その後 51 か月間無再発生存中である。

Case 4 : 59 歳男性。S5、S8 の HCC に対し部分切除術、S8HCC に対し RFA を施行した。RFA が不完全焼灼であったため、手術より 1 か月後から

本療法を行った。CT 上腫瘍は治療 1 か月後に縮小を認め、3 か月後に消失した (Figure 1b)。腫瘍マーカーは AFP が 199.1 から 94.4 ng/mL に減少しさらに 10 か月後に正常値となった。その後 37 か月間、他治療を要さず無再発生存中である。

5-4. ELISpot

IFN- γ ELISpot により活性化免疫細胞を測定した。スポット数は治療前 0.3 ± 0.3 、1 回後 10.3 ± 5.1 、2 回後 9.3 ± 4.3 、治療終了後 1 か月 9.0 ± 6.3 であった (Figure 2a)。IFN- γ の活性は治療により増強していることが示唆されたが、CTL や NK 細胞といったどの免疫細胞が活性化しているのかは不明であった。

5-5. Flow cytometry

活性化した免疫担当細胞を同定するためフローサイトメトリーを行った。それぞれの免疫細胞の分布を Figure 2b に示した。具体的には有効症例 (CR+SD) において CD4+/FoxP3 陽性 T 細胞が多い傾向を示した。NK 細胞 (CD3-/CD56+) は有効症例において PD 症例より多かった。NKG2D 陽性 NK 細胞数は有効症例では増加する傾向を示したが、PD 症例では不変であった。活性化 NK 細胞と考えられる CD57 陽性 NK 細胞も同様の傾向を認めた。しかしながらいずれも統計学的有意差は認めなかった。次に我々は本治療によりどの免疫細胞が活性化したかを確認しようと考えた。ELISpot で spot 数の増加を認め、効果判定 SD であった case12 の IFN- γ と CA107a 染色を行った。INF- γ と CD107a の発現は CTL および NK 細胞の両方で認められ、CTL はより高度に発現していた (Figure3)。

5-6. 免疫組織学的染色

Case12 は免疫療法後に肝部分切除術を施行した。切除標本の腫瘍部で HSP70 と HLA-class1 の発現を認めた。また、腫瘍内において CD8 陽性細胞およびグランザイム B 陽性細胞が広範に浸潤しており、CD56 陽性細胞はわずかであった。このことから本療法における主要な免疫細胞は CTL であると考えられた。

6. 考察

切除と焼灼は HCC に対する主要な治療法であるが、いまだ再発は一般的であり、患者死亡の主たる要因である¹⁸。生存率を改善するため、有効な補助化学療法が望まれる。しかしながら、補助化学療法の明確な利点はいまだ証明されていない¹⁹。

我々は 12 人の HCV 関連切除不能再発 HCC 患者に対し HSP70-DCs を使用して第 1 相試験を行った。すべての患者は予定通り治療可能で、1 例の grade3 肝膿瘍を除いて重大な有害事象は認めなかった。12 人中 7 人は CR または SD であり、本療法の有効性を示唆している。また驚くべきことに 2 人の CR 患者は 3 年以上にわたり無再発であった。

HCV 関連 HCC 患者は通常肝障害を有しており、化学療法の肝障害性から有害事象の少ない新規治療法が考慮されるべきである。免疫療法は正常組織に影響を与えず、抗腫瘍効果を示す大きな可能性を秘めている。Xie らは 6 報の HCC に対する免疫療法のメタ解析を行い、サイトカイン誘導キラー細胞やリンホカイン活性化キラー細胞は HCC 切除後の再発を減少できるが、生存は改善しないと結論づけている²⁰。Palmer らは HCC 患者における腫瘍細胞株の溶解物 (HepG2) でパルスした DCs を用いた免疫療法を報告し、25 例中 PR1 例、SD6 例であったと報告した²¹。他の固形癌と比較して、HCC に対する免疫療法の成功率は低く、より効果的な治療法が確立される必要がある。

我々は、プロテオーム解析を用いて、正常肝組織に比較して HCC 組織内で HSP70 が過剰発現していることを発見した¹³。理論的に HSP70 過剰発現はストレスにより誘導されることが想定され、癌細胞はストレスの多い環境にさらされている。実際に、HSP70 の発現上昇はヒト癌細胞で報告されている²²。初期 HCC は HSP70 を過剰発現しているとの報告があり²³、我々もまた、免疫組織学的染色により HCV 関連 HCC の 92% に HSP70 が発現していることを報告した¹⁴。最近、HSP70 は腫瘍の

免疫原性を増大させ、CTL 応答を誘導することが可能な内因性危険シグナルとして機能することが明らかになり、腫瘍免疫学的に注目を集めている。また、HSP70 はマウスモデルで自然免疫を活性化することが奉公されている^{24,25}。HSP70 は MHCclass I および II を介して抗原提示細胞に結合し TAA を提示することができる。これメカニズムが抗腫瘍細胞障害性およびヘルパーT細胞活性化をもたらす^{26,27}。これらの報告を踏まえ、我々は HSP70 を HCV 関連 HCC 治療の標的とすることにした。

Zhang らは AFP-mRNA を導入された DCs が AFP 特異的 T 細胞応答を誘発することを報告した²⁸。Gilboa らは mRNA を導入することが他の抗原導入法に比較してより優れていると報告した²⁹。これらの知見は mRNA を導入する我々の研究を支持している。

HSP70-DCs は HCC 治療において強力な免疫刺激因子である。実際に本療法により CR を得た 2 症例は 3 年以上にわたり無再発であった。しかしながら、この正確なメカニズムは不明なままである。免疫学的分析は HSP70-DCs により治療を受けた患者の PBMC は HSP70 特異的反応を有することを示している。ELISpot は免疫細胞がこの治療により活性化されていることを示した。Flow cytometry では、有効症例で T-reg が多く、NK 細胞、NKG2D 陽性 NK 細胞、活性化 NK 細胞数も多いことから本療法は自然免疫を活性化していることを示唆している。次に我々は ELISpot で活性化が示された case12 について IFN- γ と CD107a を評価した。CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 、CD107a 発現は CTL が細胞障害活性を有していることを示した。これらは 12 例のうちわずか 1 例の傾向であるが、ELISpot や flow cytometry の結果を合わせて、本療法の免疫反応は主として CTL が、副次的に NK 細胞が担っていると考察した。さらに、免疫組織学的染色でこの症例において HSP70 と HLA-class 1 が発現していること、腫瘍内に CD8 陽性細胞とグランザイム B 陽性細胞が広く浸潤し、NK 細胞がわずかであったことから腫瘍局所での反応が裏

付けられた。

7. 結語

第1相試験の結果に基づいて、HSP70-DCs療法は安全かつ有用であり、免疫学的検討により本療法が獲得免疫を誘導することを確認した。今後、治癒切除後HCCを対象とした術後補助療法の設定で第II相試験を行う予定である。

8. 謝辞

本研究を遂行するに当たり直接指導いただきました消化器・腫瘍外科学 助教 吉村清博士に感謝いたします。本研究遂行に当たりご指導、ご助言を頂きました消化器・腫瘍外科学 岡正朗教授（現 山口大学学長）に深謝いたします。

9. 参考文献

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians. 55: 74-108.
2. Thorgeirsson SS, Grisham JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Nature genetics. 31: 339-46. doi: 10.1038/ng0802-339
3. Ohishi W, Kitamoto M, Aikata H et al. (2003) Impact of aging on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection in Japan. Scandinavian journal of gastroenterology. 38: 894-900.
4. Ikai I, Arii S, Ichida T et al. (2005) Report of the 16th follow-up survey of primary liver cancer. Hepatology research : the official journal of the Japan Society of

- Hepatology. 32: 163-72. doi:
10.1016/j.hepres.2005.04.005
5. Thomas MB, Abbruzzese JL (2005) Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23: 8093-108. doi:
10.1200/JCO.2004.00.1537
 6. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 362: 1907-17. doi:
10.1016/S0140-6736(03)14964-1
 7. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H et al. (2003) Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet*. 361: 923-9. doi:
10.1016/S0140-6736(03)12775-4
 8. Iizuka N, Hamamoto Y, Oka M (2004) Predicting individual outcomes in hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 364: 1837-9. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17455-2
 9. Itoh Y, Ohkubo K, Iuchi H, Michitaka K, Horiike N, Onji M (2002) Chronological changes of causes of death and distant metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*. 9: 331-5.
 10. Yang Y, Nagano H, Ota H et al. (2007) Patterns and clinicopathologic features of extrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery*. 141: 196-202. doi: 10.1016/j.surg.2006.06.033
 11. Unitt E, Marshall A, Gelson W, Rushbrook SM, Davies S, Vowler SL, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ (2006)

- Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Journal of hepatology*. 45: 246-53. doi: 10.1016/j.jhep.2005.12.027
12. Takayama T, Sekine T, Makuuchi M et al. (2000) Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet*. 356: 802-7. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02654-4
 13. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K (2003) Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 3: 2487-93. doi: 10.1002/pmic.200300621
 14. Yoshida S, Hazama S, Tokuno K, Sakamoto K, Takashima M, Tamesa T, Torigoe T, Sato N, Oka M (2009) Concomitant overexpression of heat-shock protein 70 and HLA class-I in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Anticancer research*. 29: 539-44.
 15. Liao X, Li Y, Bonini C, Nair S, Gilboa E, Greenberg PD, Yee C (2004) Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 9: 757-64. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.02.011
 16. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E (1996) Dendritic

- cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 184: 465-72.
17. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*. 98: 49-56.
 18. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J et al. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 45: 228-47. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026
 19. Tan A, Aucejo F, Kim R (2010) Is there a role for adjuvant treatment after hepatic resection for hepatocellular carcinoma? *Oncology*. 78: 161-71. doi: 10.1159/000315577
 20. Xie F, Zhang X, Li H, Zheng T, Xu F, Shen R, Yan L, Yang J, He J (2012) Adoptive immunotherapy in postoperative hepatocellular carcinoma: a systemic review. *PloS one*. 7: e42879. doi: 10.1371/journal.pone.0042879
 21. Palmer DH, Midgley RS, Mirza N et al. (2009) A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 49: 124-32. doi: 10.1002/hep.22626
 22. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C (1992) Unusual expression and localization of heat-shock proteins in

- human tumor cells. *International journal of cancer*.
Journal international du cancer. 51: 613-9.
23. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S (2003) Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 37: 198-207. doi: 10.1053/jhep.2003.50022
24. Elsner L, Muppala V, Gehrman M et al. (2007) The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands. *Journal of immunology*. 179: 5523-33.
25. Takemoto S, Nishikawa M, Guan X, Ohno Y, Yata T, Takakura Y (2010) Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes by heat shock protein 70 fusion proteins harboring both CD8(+) T cell and CD4(+) T cell epitopes. *Molecular pharmaceutics*. 7: 1715-23. doi: 10.1021/mp1001069
26. Ciocca DR, Cayado-Gutierrez N, Maccioni M, Cuello-Carrion FD (2012) Heat shock proteins (HSPs) based anti-cancer vaccines. *Current molecular medicine*. 12: 1183-97.
27. Calderwood SK, Theriault JR, Gong J (2005) Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *European journal of immunology*. 35: 2518-27. doi: 10.1002/eji.200535002
28. Zhang HM, Zhang LW, Ren J, Fan L, Si XM, Liu WC (2006) Induction of alpha-fetoprotein-specific CD4- and CD8-mediated T-cell response using RNA-transfected dendritic cells. *Cellular immunology*. 239: 144-50. doi: 10.1016/j.cellimm.2006.05.004

29. Gilboa E, Vieweg J (2004) Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunological reviews*. 199: 251-63. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00139.x

Table1. 樹状細胞成熟化マーカー

	IM-DCs	M-DCs	p	GeoMean (IM-DCs/M-DCs)
CD80	22.5±4.2	86.8±3.2	<0.01	7.18/80.6
CD86	60.9±3.7	94.1±1.2	<0.01	56.0/93.8
CD83	3.3±1.1	68.1±4.6	<0.01	3.33/68.1
CD40	91.1±3.4	98.7±0.6	<0.05	87.6/98.6
CD14	12.0±2.9	2.9±1.5	<0.01	4.79/0.94
Class II	89.6±2.4	95.3±1.1	<0.05	88.3/95.1
Class I	98.5±0.4	99.2±0.2	n.s.	98.5/99.2

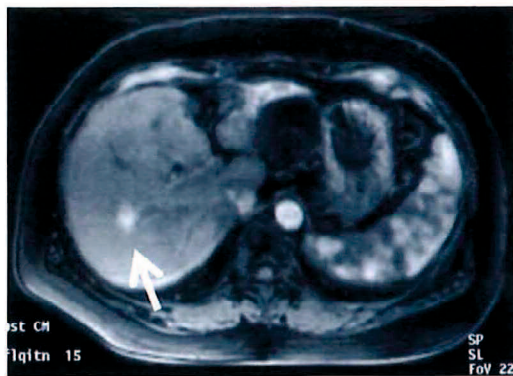
Table 2a 患者背景

Case	Age	Sex	Child-pugh	Tumor number	Tumor size (mm)	Stage (UICC)	Prior treatment
1	69	F	A(6)	1	20	1	Operation
2	82	M	A(6)	3	26	2	Operation
3	78	M	B(7)	3	42	2	TAI
4	59	M	B(7)	1	14	1	Operation
5	65	M	B(7)	1	9	1	Operation
6	73	M	A(6)	1	17	1	Operation, RFA, TAI, radiation
7	75	M	B(9)	8	32	2	Operation
8	64	M	B(8)	1	17	1	Operation, RFA
9	61	M	B(9)	2	29	4	Operation, TAI
10	72	M	A(5)	2	20	2	Operation
11	82	M	A(6)	2	22	2	Operation, RFA
12	56	F	A(6)	1	13	1	non

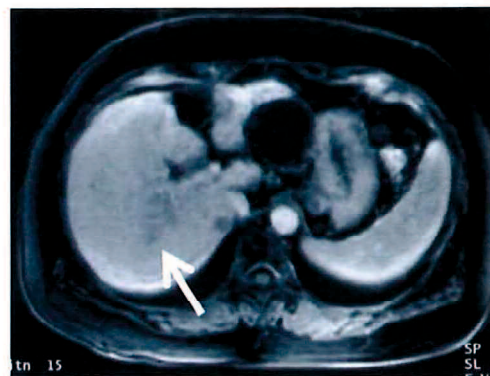
Table 2b 臨床成績

Case	No. of DCs [#] (× 10 ⁷ cells)	PIVKA2 (pre/post)	AFP (pre/post)	Adverse events	RECIST	Survive(Time)
1	1	143/18	9.2/3.2	G2;hyperglycemia	CR	Alive (54.2M)
2	1	43/30	60/82.1	G2;ALP increase	PD(NL [*])	Dead (17.9M)
3	1	71/947	17.2/2.3	G1;ALP/AST increase	PD	Dead (27.7M)
4	2	440/32	134.9/134.3	G2;ALP/AST increase	PR→CR	Alive (43.2M)
5	2	26/34	1.3/1.2	Non	PD	Alive (40.2M)
6	2	13/14	13.9/20.2	Non	SD	Alive (37.2M)
7	3	484/1234	5.8/6.7	G3;Liver abscess	PD(NL [*])	Dead (4.1M)
8	3	18/23	38.9/24.1	Non	SD	Dead (5.3M)
9	3	44/165	6.2/10.6	Non	PD(NL [*])	Dead (7.0M)
10	3	16/24	21.2/22.6	Non	SD	Alive (22.7M)
11	3	663/24	1.7/1.8	Non	SD	Dead (7.3M)
12	3	22/37	42.5/124.1	Non	SD	Alive (16.6M)

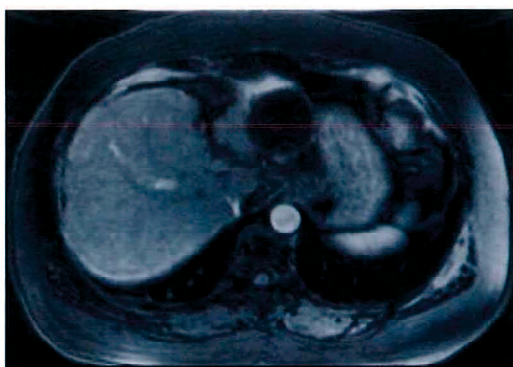
Figure 1a



Pre



After 1M

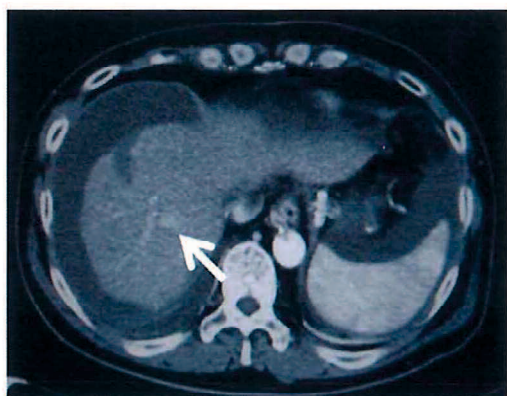


After 1Y

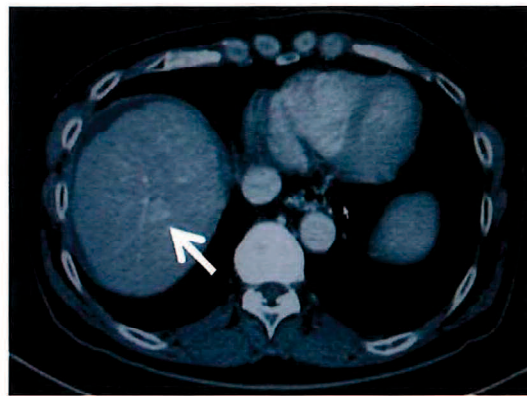
case1 の MRI 経時的変化

Dynamic EOB-MRI の早期相を示している。左上（治療前）では早期濃染像を認めるが、右上（治療1か月後）では早期濃染像が消失している。左下（治療後1年）でも早期濃染像は消失したままである。

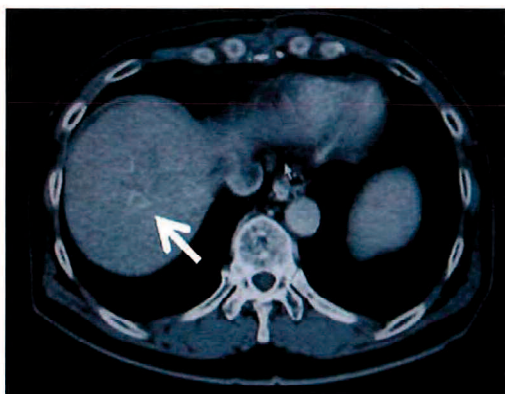
Figure 1b



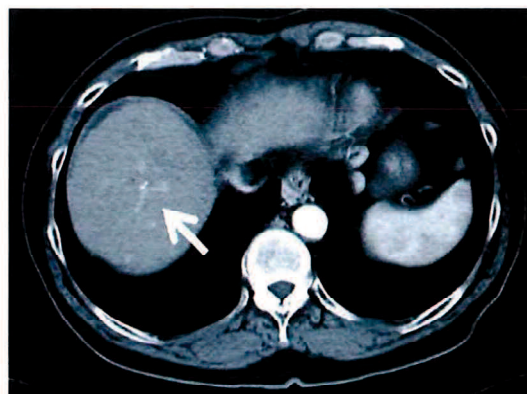
Pre



After 1M



After 3M

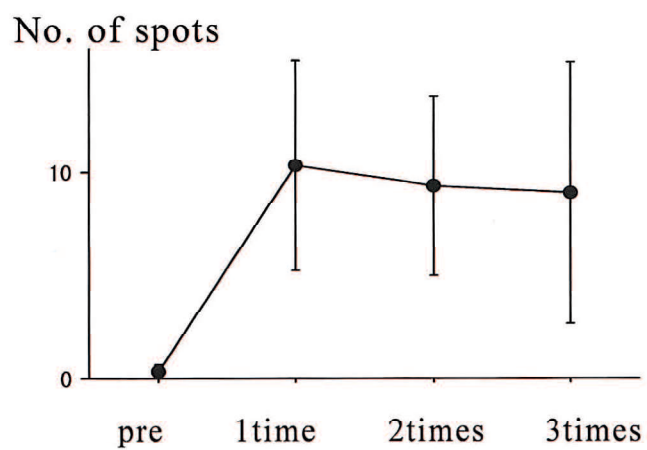


After 2Y

case 4 の CT 経時的変化

Dynamic CT の早期相を示している。左上（治療前）では肝 S8 に 20mm 大の早期濃染像を認めるが、右上（治療 1 か月後）は明らかに縮小している。左下（治療 3 か月後）に早期濃染像は消失し、右下（治療 2 年後）でも早期濃染像は消失したままである。

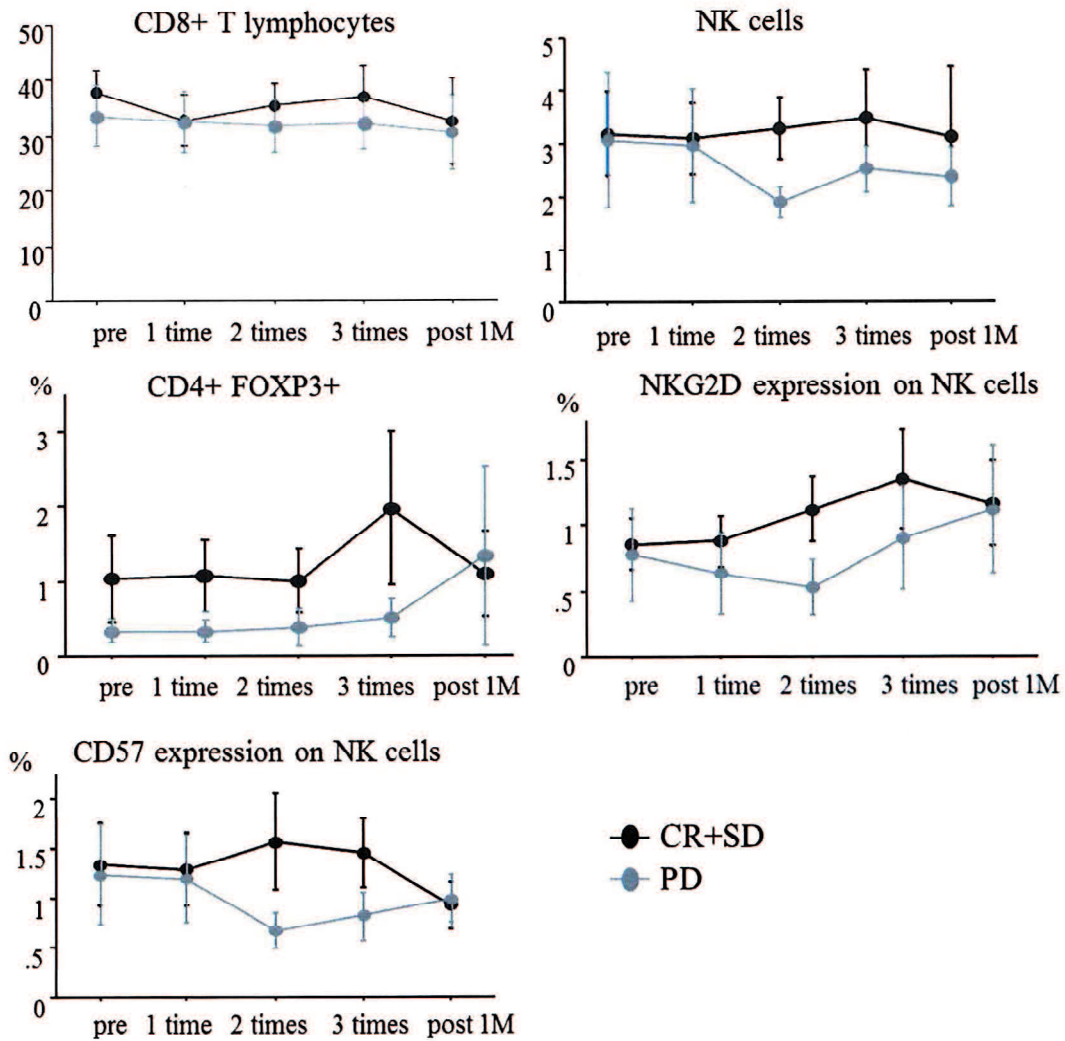
Figure 2a



ELISpot assay

HSP70 特異的 spot 数を経時的変化で示している。治療 1 回後より spot 数は増加し、2 回目以降も維持している。

Figure 2b

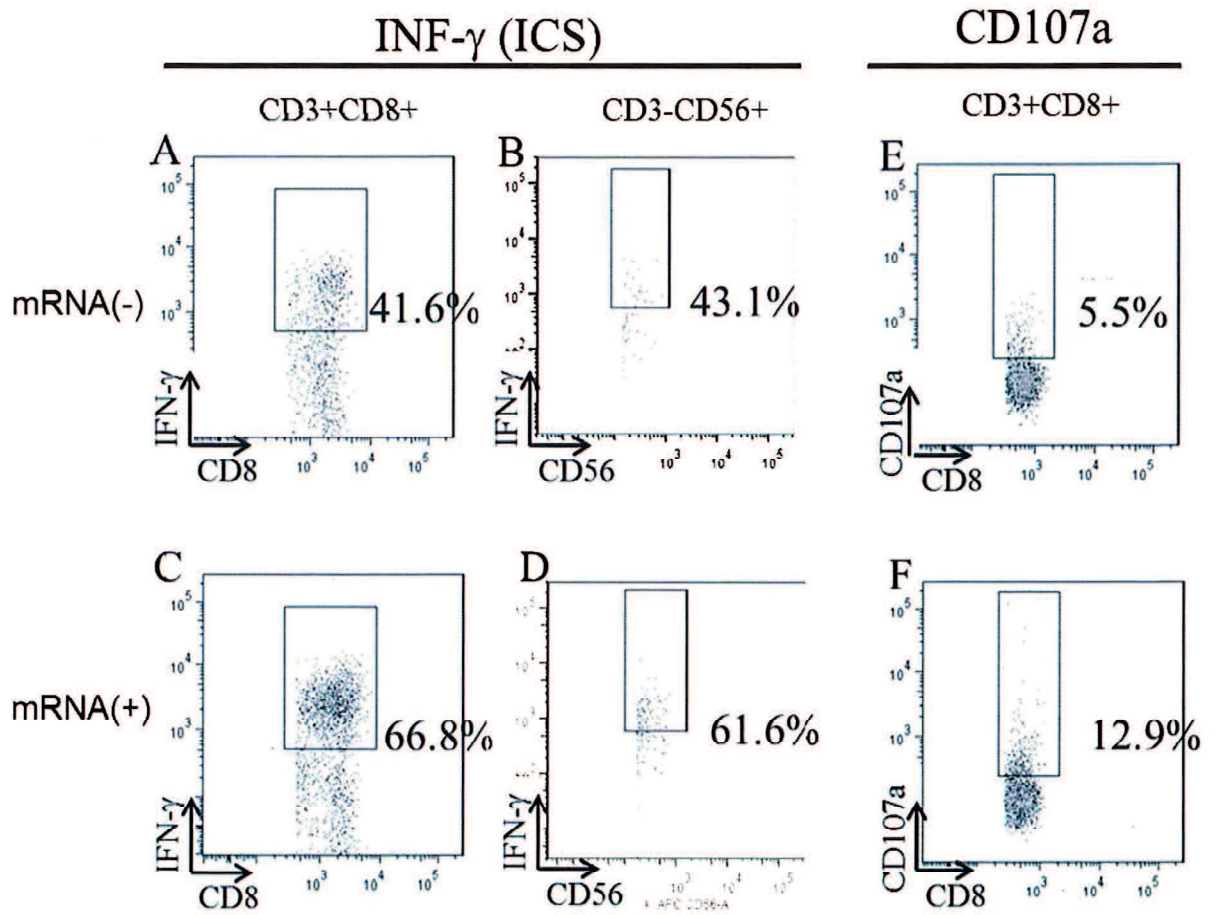


flow cytometry

CD8 陽性 T 細胞数、NK 細胞数、CD4 陽性 FOXP3 陽性細胞数 (T-reg)、NKG2D 発現 NK 細胞数、CD57 陽性 NK 細胞数 (活性化 NK 細胞) の経時的変化を示している。有効症例 (CR+SD) を黒で、PD 症例を灰で表している。

経過を通じて T-reg は有効症例で多い傾向、NK 細胞、NKG2D 発現 NK 細胞、活性化 NK 細胞は有効症例において治療に応じて増加している傾向を示している。いずれも統計学的有意差は認めていない。

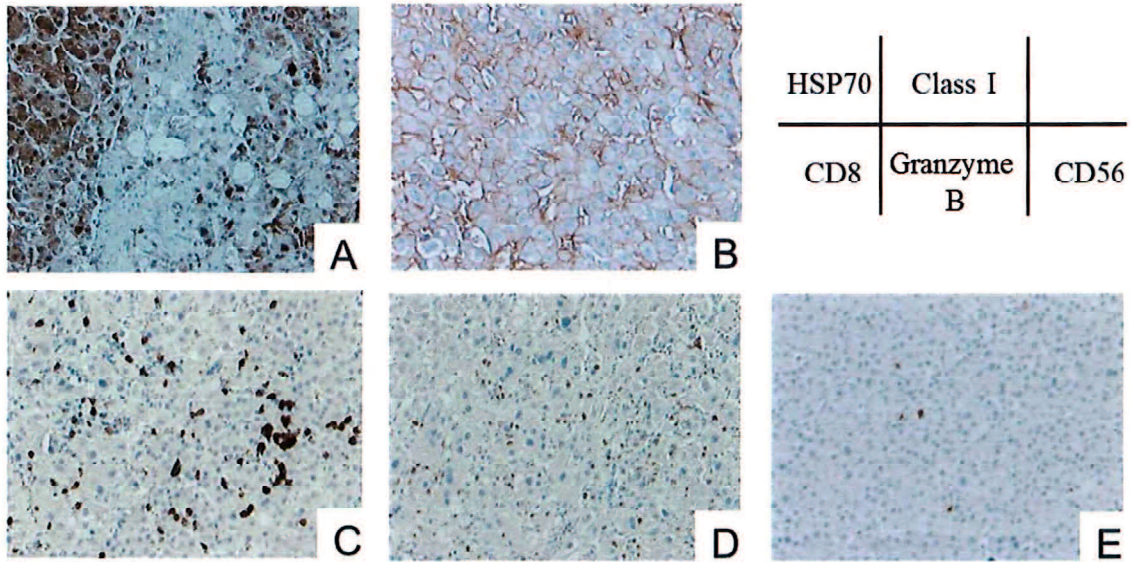
Figure 3



case12 の IFN- γ 、CD107a 発現

上段は mRNA 導入を行っていない PBMC (コントロール)。下段は HSP70mRNA を導入した PBMC。IFN- γ 発現は CD8 陽性細胞において 41.6%が 66.8%、CD56 陽性細胞で 43.1%が 61.6%といずれもコントロールに比して増加しており、細胞の絶対数としては CD56 陽性細胞より CD8 が明らかに多い。CD8 陽性細胞上の CD107a もコントロール 5.5%に対して 12.9%と多く、CD8 が細胞障害活性を有することを示している。

Figure 4



case12 の免疫組織学的染色

Case12 の HSP70、HLA-class 1、CD8、グランザイム B、CD56 染色を示している。切除標本の腫瘍部は HSP70、HLA-class 1 とともに発現しており、CD8 陽性細胞、グランザイム B 陽性細胞が腫瘍内に広く浸潤している。一方 CD56 陽性細胞は腫瘍内に認めるものの少数であった。