



Title	切除不能肝細胞癌におけるアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の治療効果予測因子についての検討
Author(s)	細田, 峻一
Description	配架番号 : 2849
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15915号
Issue Date	2024-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15915">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15915</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/92184">https://hdl.handle.net/2115/92184</a>
Type	doctoral thesis
File Information	HOSODA_Shunichi.pdf



学位論文

切除不能肝細胞癌における  
アテゾリズマブ＋ベバシズマブ併用療法の  
治療効果予測因子についての検討

(Study of predictors of response to  
atezolizumab plus bevacizumab treatment on  
unresectable hepatocellular carcinoma)

2024年3月

北海道大学

細田 峻一



学位論文

切除不能肝細胞癌における  
アテゾリズマブ＋ベバシズマブ併用療法の  
治療効果予測因子についての検討

(Study of predictors of response to  
atezolizumab plus bevacizumab treatment on  
unresectable hepatocellular carcinoma)

2024年3月

北海道大学

細田 峻一

## 目 次

発表論文目録及び学会発表目録 .....	1 頁
要旨 .....	2 頁
略語表 .....	5 頁
緒言 .....	7 頁
第一章 .....	10 頁
第二章 .....	38 頁
結論 .....	63 頁
謝辞 .....	64 頁
利益相反 .....	65 頁
引用文献 .....	66 頁

## 発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に掲載。

1. Shunichi Hosoda, Goki Suda, Takuya Sho, Koji Ogawa, Megumi Kimura, Zijian Yang, Sonoe Yoshida, Akinori Kubo, Yoshimasa Tokuchi, Takashi Kitagataya, Osamu Maehara, Shunsuke Ohnishi, Akihisa Nakamura, Ren Yamada, Masatsugu Ohara, Naoki Kawagishi, Mitsuteru Natsuizaka, Masato Nakai, Kenichi Morikawa, Ken Furuya, Masaru Baba, Yoshiya Yamamoto, Kazuharu Suzuki, Takaaki Izumi, Takashi Meguro, Katsumi Terashita, Jun Ito, Takuto Miyagishima, Naoya Sakamoto  
Low Baseline CXCL9 Predicts Early Progressive Disease in Unresectable HCC with Atezolizumab Plus Bevacizumab Treatment  
Liver Cancer, 12(2)・156-170, (2022)

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. Shunichi Hosoda, Goki Suda, Noya Sakamoto  
Exploring Predictors of Early PD with Atezolizumab + Bevacizumab Therapy for Unresectable Hepatocellular Carcinoma  
JDDW 2022 (Japan Digestive Disease week 2022) FUKUOKA  
2022年10月27日～30日・福岡
2. Shunichi Hosoda, Goki Suda, Noya Sakamoto  
Exploring Predictors of Early PD in Atezolizumab plus Bevacizumab Therapy for Unresectable Hepatocellular Carcinoma  
APASL (The Asian Pacific Association for the Study of the Liver ) 2023  
2023年2月15日～19日・Taiwan

## 要旨

### 【背景と目的】

肝細胞癌は癌関連死の主な原因の一つであり、全世界において罹患率が第6位、死亡率が第3位の癌である。肝細胞癌に対する治療には、癌の治療として一般的な外科的切除、化学療法、放射線療法の他に、穿刺局所療法、肝動脈化学塞栓療法、肝動注化学療法、肝移植といった肝細胞癌に特異的な治療法が確立されている。その中でも近年、全身化学療法の開発は目覚ましく、2020年に承認されたアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法は本邦のガイドラインにおいて切除不能肝細胞癌に対する全身化学療法の第一選択薬として使用される。また、一次治療におけるアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の代替治療、あるいは二次治療としてレンバチニブが推奨されている。

第Ⅲ相臨床試験である IMbrave150 試験では、アテゾリズマブ+ベバシズマブがソラフェニブに比べて全生存期間と無増悪生存期間を延長できることが明らかになったが、患者の 19.6% (71/326 例) に全く治療効果を認めない PD (progressive disease) 症例を認めている。RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) 1.1 による治療効果で層別化した IMbrave150 の解析では、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において最良の治療効果判定が PD となった患者の OS (overall survival) 中央値は、奏効した患者の OS 中央値よりも短い (6.8 カ月) ことが明らかにされている。したがって、切除不能肝細胞癌におけるアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた患者の早期 PD に関連する因子を明らかにすることは重要な課題とされる。

本研究ではアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた切除不能肝細胞癌の患者において、治療開始時の臨床因子、腫瘍遺伝子変異、サイトカインアレイの包括的解析により、早期 PD に関連する因子を明らかにすることを目的としている。さらに同定されたアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の早期 PD 予測因子である血清 CXCL (C-X-C motif chemokine ligand) 9 低値がレンバチニブ治療において良好な治療効果が得られる原因について検討した。レンバチニブの治療効果と関連する FGFR (fibroblast growth factor receptor) 4 と CXCL9 の関係を明らかにするため、基礎的実験を行った。

### 【対象・材料と方法】

2020年10月から2022年1月の期間で北海道大学病院を中心とした NORTE study group においてアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受け、臨床情報を有

し、治療開始時の血清が保存された切除不能肝細胞癌患者 68 例を対象とした。探索研究として 68 例の中で cfDNA (cell free DNA) が保存されていた早期 PD 症例 4 例と非早期 PD 症例 4 例で、ctDNA (circulation tumor DNA) の遺伝子変異解析、サイトカインアレイを行い、早期 PD と関連する因子を検討した。続いて残りの 60 例の治療開始時の血清を用いて探索研究で候補となった血中サイトカインを ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) にて測定解析し検証を行った。また、追加の検討として 2018 年 4 月から 2022 年 5 月の期間において、北海道大学病院および JCHO 北海道病院にてレンバチニブ治療を受け、臨床情報を有し、治療開始時の血清が保存されていた切除不能肝細胞癌患者 84 例を対象に、上記解析で明らかになった因子を測定解析し、レンバチニブに対する治療反応を解析した。

TCGA (the cancer genome atlas) のヒト肝細胞癌のデータベースを用いて、レンバチニブのターゲットとなる FGF シグナル関連分子と、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の早期 PD に関連する因子として同定された CXCL9 の発現を解析した。続いて、肝癌細胞株と肝細胞癌生検検体を用いて TCGA 解析で関連が認められた FGFR4 と CXCL9 の発現を解析した。その後、肝癌細胞株である Huh7 細胞の FGFR4 を siRNA (short interfering RNA) によりノックダウンした後に細胞の CXCL9 の発現を解析した。また、Huh7 細胞に FGFR4 阻害作用を有するレンバチニブを添加し、CXCL9 発現の変化、培養上清中 CXCL9 濃度の変化を解析した。2018 年 4 月から 2022 年 5 月の期間において北海道大学病院にてレンバチニブ治療を受けた切除不能肝細胞癌患者で治療開始時および、開始後 3 日目、7 日目の血清が保存されていた 10 例を対象とし血清 CXCL9 を測定し、レンバチニブ治療後の血清 CXCL9 の変化を解析した。

## 【結果】

8 例を対象とした ctDNA の遺伝子変異解析では早期 PD 群と非早期 PD 群の両群間で明らかに差のある遺伝子変異は認めなかった。一方で、サイトカインアレイでは早期 PD 群において CXCL9, CXCL5 が有意に低く、CCL (C-C motif chemokine ligand) 5 が有意に高い結果となった。それらを全コホートの 68 例のうち、探索コホートの 8 例を除く 60 例で検証した結果、血清 CXCL9 は早期 PD 群において有意に低値となった。CXCL9 のカットオフ値を 333 pg/ml と設定し、PFS (progression free survival) を検証したところ CXCL9 低値群で有意に短い結果となった。一方、レンバチニブ治療を受けた 84 例の血清 CXCL9 を測定し客観的奏効が得られた患者 (objective response, OR 群) と奏効が得られなかった患者 (非 OR 群) を比較した結果、OR 群で CXCL9 が低値となる結果となった。CXCL9 のカットオフ値を 308 pg/ml とし OS を検証した結果、CXCL9 低値群で延長する傾向を認めた。

TCGA データベースによる遺伝子発現の解析では CXCL9 の発現が低い群で、レンバチニブ治療効果良好との関連が報告されている FGFR4 の発現が有意に高かった。6 種類のヒト肝癌細胞株の FGFR4 と CXCL9 の発現を qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) にて測定したところ、FGFR4 と CXCL9 の発現に負の相関関係を認めた。2 例の肝細胞癌生検検体で FGFR4, CXCL9 の免疫染色を行った結果、血清 CXCL9 が比較的低値だった患者の検体 (CXCL9 低発現) は、血清 CXCL9 が高値だった患者の検体 (CXCL9 高発現) と比較し、高度の FGFR4 の発現を認めた。さらに siRNA を用いて Huh7 細胞の FGFR4 発現を抑制した結果、CXCL9 の発現が上昇した。また、Huh7 細胞にレンバチニブを添加すると CXCL9 の発現が上昇し、培養上清中の CXCL9 濃度の上昇を認めた。レンバチニブ治療を受けた 10 例の患者の血清 CXCL9 は治療開始 3 日目、7 日目で有意な変化は認めなかったが、OR 群 5 例と非 OR 群 5 例で血清 CXCL9 の変化を比較した結果、OR 群は非 OR 群と比較し、有意な血清 CXCL9 の上昇が確認された。

#### 【考察】

CXCL9 は細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を腫瘍内に誘導する重要なケモカインであり、その腫瘍内の発現は ICI (immune checkpoint inhibitors) 治療の効果予測因子として他癌種において近年報告されている。本研究では、切除不能肝細胞癌のアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において治療開始時の血清 CXCL9 低値が早期 PD を予測する因子となると考えられた。

血清 CXCL9 が低値の症例においてレンバチニブ治療で良好な治療効果を認めた要因を検討した結果、FGFR4 と CXCL9 が負の相関関係にあることを認めた。レンバチニブ治療の効果が得られやすい FGFR4 高発現の肝細胞癌では FGFR4 を介したシグナルが CXCL9 の発現を抑制することにより、血清 CXCL9 が低値となった可能性がある。

#### 【結論】

血清 CXCL9 低値は切除不能肝細胞癌におけるアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において早期 PD を予測する因子となる。血清 CXCL9 が低値の症例は、肝細胞癌中の FGFR4 が高発現であることが予想される為、レンバチニブがアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の代替治療となる可能性がある。

## 略語表

本文中及び図表に記載した略語は以下の通りである。

AFP	alpha-fetoprotein
ALBI	albumin-bilirubin
BCLC	barcelona clinic liver cancer
CCL	C-C motif chemokine ligand
cDNA	complementary DNA
cfDNA	cell free DNA
CH	chronic hepatitis
CI	confidence interval
CR	complete response
ctDNA	circulation tumor DNA
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DCP	des-gamma-carboxy prothrombin
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECOG PS	eastern cooperative oncology group performance status
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EHM	extrahepatic metastasis
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HGF	hepatocyte growth factor
HPD	hyperprogressive disease
HR	hazard ratio
ICI	immune checkpoint inhibitors
IFN- $\gamma$	interferon-gamma
I $\kappa$ B	I kappa B
IKK	I kappa B kinase

IL	inter leukin
LC	liver cirrhosis
LN	lymph node
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
mRNA	messenger RNA
NBNC	non- HBV non- HCV
NE	not estimated
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NGS	next generation sequencing
NLR	neutrophil to lymphocyte ratio
OR	objective response
OS	overall survival
PBS	phosphate buffered saline
PD	progressive disease
PD-1	programmed death receptor-1
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB
PD-L1	programmed death-ligand 1
PFS	progression free survival
PR	partial response
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
ROC	receiver operating characteristic
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
TCGA	the cancer genome atlas
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
TPM	transcripts per million
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

## 緒言

肝細胞癌は、癌関連死の主な原因の一つであり、全世界において罹患率が第6位、死亡率が第3位の癌である。本邦では年間およそ3万人が肝細胞癌により死亡している (Sung H et al, 2021; 厚生労働省, 2018)。一般的に、癌の治療には外科的切除、化学療法、放射線療法および免疫療法などが挙げられるが、肝細胞癌の治療には、これらに加え、穿刺局所療法、肝動脈化学塞栓療法、肝動注化学療法、肝移植といった肝細胞癌に特異的な治療法が確立され実践されてきた。

一方で、肝細胞癌の全身化学療法は、2000年代初頭まで他癌腫のように有効性が確立された治療法は存在しないため、肝動脈化学塞栓療法、肝動注化学療法に対し不適格・不応となった際の予後は不良であった。しかし近年、切除不能な肝細胞癌患者に対する全身化学療法の治療選択肢は飛躍的に進歩しており、2008年にマルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブが第一選択薬として承認されて以降 (Llovet et al, 2008)、様々な臨床試験が実施されている。2018年に同じくマルチキナーゼ阻害剤であるレンバチニブが承認され (Kudo et al, 2018)、レゴラフェニブ、カボザンチニブ、ラムシルマブに加え、2020年には VEGF (vascular endothelial growth factor) 阻害薬であるベバシズマブと免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) である抗 PD-L1 (programmed death-ligand 1) 抗体のアテゾリズマブの併用療法が切除不能肝細胞癌患者の全身療法として承認されている。さらに 2023年には抗 PD-L1 抗体であるデュルバルマブと抗 CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) 抗体のトレメリムマブの ICI 併用療法が保険適応で承認されている (肝癌診療ガイドライン作成委員会, 2021)。

2023年に改定された肝癌診療ガイドラインにおいて、切除不能肝細胞癌に対する全身化学療法としてアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法および、デュルバルマブ+トレメリムマブ併用療法は同列の第一選択の治療とされており、レンバチニブ、ソラフェニブは第一選択治療の代替、またはアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法やデュルバルマブ+トレメリムマブ併用療法が無効と判明した場合の第二選択療法として推奨されている (図1)。

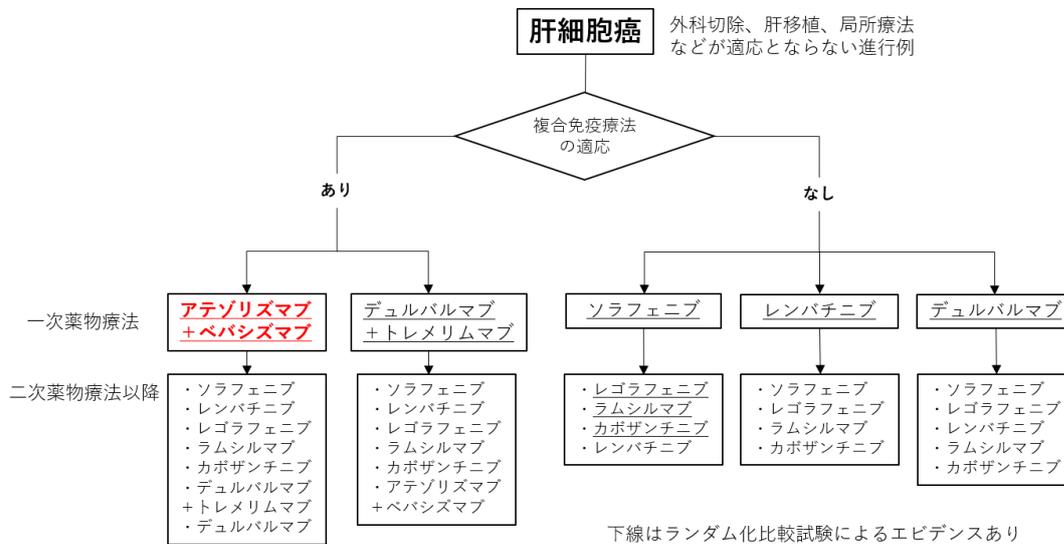


図 1. 肝細胞癌の薬物療法アルゴリズム (肝癌診療ガイドライン 2023 改定より引用)

IMbrave150 試験では、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法がソラフェニブに比べて全生存期間 (OS) と無増悪生存期間 (PFS) を統計学的に有意に延長できることが明らかになった (Finn et al, 2020)。しかしながら、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた患者の 19.6%に進行性病変 (PD) を認めている。さらに、北海道大学病院を中心とした NORTE study group のアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の治療成績の検討では、17.2% (10/58) に早期 PD (治療開始後 6 週の画像評価で PD) を認めている (Sho et al, 2021)。また、化学療法施行時の治療効果判定基準である RECIST 1.1 による治療効果で層別化した OS に関する IMbrave150 試験の解析では、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において最良治療効果が PD の患者の OS 中央値 (6.8 カ月) は、奏効した患者の OS 中央値 (NE not estimated) よりも顕著に短期であることが明らかになっている (Ducreux et al, 2021)。ICI により治療された患者の中には、治療開始後に腫瘍が急速に増大する Hyperprogressive disease (HPD) が肝癌を含めた様々な癌腫で報告されており (Chan, 2021)、早期 PD 症例にはこのような症例も含まれている。

したがって、切除不能肝細胞癌の治療において、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた患者において早期 PD に関連する因子を明らかにすること、ならびに代替療法の同定は肝細胞癌患者の予後を延長させるうえで、臨床的に重要な課題とされる。

また REFLECT 試験では、マルチキナーゼ阻害剤であるレンバチニブが従来の第一選択治療であるソラフェニブに対して、OS の非劣性および PFS、奏効率の優越性が示された (Kudo et al, 2018)。これを受けて 2018 年より本邦でレンバチニブが進

行肝細胞癌に対して承認されており、現在のガイドラインでは図 1 で示す通り、レンバチニブは二次治療以降の症例、または一次治療でアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法が不適となる症例で推奨されている。

本研究で申請者は肝細胞癌に対する第一選択治療であるアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における治療効果を予測する因子を解明すること、またアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の代替治療としてレンバチニブ治療が有用であるかを明らかにすることを目的に、検討を行った。

## 《第一章》

### 切除不能肝細胞癌における

### アテゾリズマブ＋ベバシズマブ併用療法の

### 早期 PD 予測因子の探索

## 緒言

2020年、抗PD-L1抗体と抗VEGF抗体であるアテゾリズマブ＋ベバシズマブ併用療法は第Ⅲ相臨床試験（IMbrave150試験）においてソラフェニブに対して有意な予後延長効果を示し（Finn et al, 2020）、本邦において切除不能肝細胞癌に対する全身化学療法の第一選択治療として承認された。

抗PD-L1抗体であるアテゾリズマブは腫瘍の免疫寛容を阻害するICIの一つである。PD-L1は腫瘍の細胞や一部の細胞表面に存在し、主に癌細胞による免疫逃避を可能にする役割を果たす。癌に対する免疫応答は①癌により放出された抗原が、②樹状細胞などの抗原提示細胞に貪食され、③幼弱なT細胞に対して抗原提示を行いT細胞が活性化され④活性化T細胞が腫瘍へ遊走後、⑤血管壁を介して腫瘍へ浸潤し、⑥T細胞上のT cell receptorにより癌表面にある抗原を認識し、⑦細胞障害が行われる、というサイクルによって形成される。PD-L1は免疫応答の過程においてT細胞のPD-1（programmed death receptor-1）と相互に作用し、T細胞の増殖、傷害機能を抑制し、免疫逃避を可能とする。抗PDL-1抗体であるアテゾリズマブは癌の表面上のPD-L1に結合することにより免疫寛容を阻害しT細胞の細胞障害を活性化させる働きがある（Chen and Mellman, 2013）（図2）。

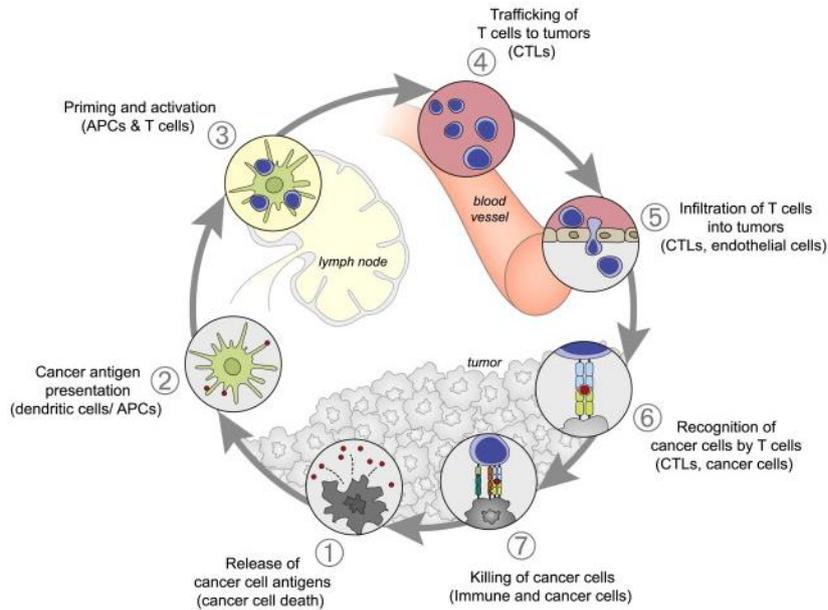


図 2. 癌と免疫のサイクル (Chen and Mellman, 2013 より引用)

ICI の治療効果を予測する因子の研究は多数の報告があり、肝細胞癌以外の癌種においては PD-L1 の発現、免疫細胞浸潤、IFN- $\gamma$  (interferon-gamma) などのサイトカインが ICI の治療反応性と関連することが報告されている (Nakamura, 2019) が、完全に予測できるバイオマーカーは未だ解明されていない。肝細胞癌に対する ICI の治療効果予測因子に関する研究として、細胞の恒常性維持や発がんに関与することが知られている  $\beta$ -catenin (*CTNNB1*) 遺伝子の変異を有する肝細胞癌患者は ICI 単剤療法で、予後が不良となることが報告されている (Harding et al, 2019)。また近年、非侵襲的なバイオマーカーとして開発が進んでいる cfDNA 中の ctDNA の遺伝子変異解析においても *CTNNB1* 変異が肝細胞癌に対する ICI 治療の予後不良因子として報告されている (Von Felden et al, 2020)。

さらに、*CTNNB1* 変異を含む肝細胞癌において樹状細胞を誘導する CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5) などのケモカインが抑制されることが報告されており (Ruiz de Galarreta, 2019)、免疫応答を促進することで治療効果が得られる ICI の反応性と関連すると考えられる。

これらの報告から、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の治療効果を予測する因子として遺伝子変異、サイトカインが有力な候補の一つとなりうると仮説をたて検討を行った。本研究では切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における治療効果予測因子を探索するため、臨床的因子の他、治療開始時の血清サイトカインおよび ctDNA の遺伝子変異を解析し、検討を行った。

# 方法

## 1. 研究種類・デザイン

多施設・後方視的研究

## 2. 対象となる患者

2020年10月から2022年1月の期間において北海道大学病院を中心とした NORTE study group の病院（北海道大学病院・市立札幌病院・北海道消化器科病院・JCHO 北海道病院・北海道医療センター・愛育病院・江別病院・苫小牧市立病院・北見赤十字病院・釧路労災病院）を通院された患者のうち以下の選択基準(1)を満たし、かつ除外基準(2)のいずれにも該当しない場合を適格とした。

### (1) 選択基準

- ①アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた切除不能肝細胞癌患者
- ②治療開始時の臨床情報および保存血清検体を有する患者
- ③本研究への参加についてインフォームドコンセントを行い自由意思による同意が得られた患者、直接の同意取得が困難であった場合は、包括的同意を取得しており、オプトアウトで研究の参加を拒否しなかった患者。

### (2) 除外基準

- ①臨床情報や保存血清が欠落している患者
- ②治療開始6週後のCT、MRIによる画像評価が欠落している患者
- ③本研究参加に同意が得られない患者

## 3. 検討項目と方法

本研究においては治療効果予測因子として候補となる ctDNA の遺伝子変異やサイトカインを探索コホートで解析し、検証コホートで評価した。

(1) 探索コホート

アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法開始時に適切に cfDNA サンプルを採取しえた 29 例の患者のうち、6 週後画像評価で瘍径の増加率と縮小率が最も高い患者を各 4 例選択し、早期 PD 群 4 症例と非早期 PD 群 4 症例で臨床情報、保存血清、cfDNA サンプルを用いてサイトカインと遺伝子変異を解析し比較検討を行った。

臨床情報は性別、年齢、背景肝、肝予備能の他に、腫瘍サイズ、個数、脈管浸潤の有無、腫瘍マーカーなどを収集した。

(2) 検証コホート

探索コホートの 8 例の患者を除外した 60 例で探索コホートの結果を評価した。その後、全体の 68 例で早期 PD を予測する因子の最適なカットオフ値を決定し、早期 PD 率、PFS の予測精度の検討を行った。

(3) 追加検証

2018 年 4 月から 2022 年 5 月の期間において北海道大学病院および JCHO 北海道病院でスクリーニングを行った切除不能肝細胞癌患者を対象に、上記解析で明らかになった治療効果予測因子による層別化を行いレンバチニブに対する治療反応を解析した。適切な臨床情報を有し、治療後 2-3 ヶ月ごとに治療効果が評価され、治療開始時の保存血清検体を有する患者を対象とした。

#### 4. 治療プロトコール

(1) アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法

切除不能肝細胞癌患者を対象に、アテゾリズマブ (1,200mg) + ベバシズマブ (15mg/kg) を 3 週毎に投与し、治療効果は治療開始 6 週後に評価された。許容できない有害事象、または PD が観察された場合は治療を中断または中止した。

(2) レンバチニブ

体重 60kg 未満の患者には 8mg のレンバチニブが 1 日 1 回経口投与、体重 60kg 以上の患者には 12mg が 1 日 1 回経口投与された。

## 5. 治療効果の評価

アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法開始時および治療開始 6 週後にダイナミック CT または MRI を実施し、RECIST 1.1 に従って治療反応を分類した。治療開始 6 週後に PD となった症例を早期 PD と定義した。レンパチニブ治療を受けた患者では、RECIST をベースに腫瘍壊死を効果判定に取り入れた modified RECIST (表 1) (Lencioni and Llovet, 2010) を用いて 2-3 カ月ごとに治療反応を評価した。

表 1. modified RECIST 分類

評価	定義
CR : Complete response	すべての標的病変において腫瘍内の造影効果が消失
PR : Partial response	ベースラインの標的病変の直径の合計を基準として、(動脈相における造影効果を伴う)標的病変の直径の合計が少なくとも30%減少
SD : Stable disease	PRにもPDにも該当しない症例
PD : Progressive disease	治療開始以降の(動脈相における造影効果を伴う)標的病変の直径和の最小値を基準として、(動脈相における造影効果を伴う)標的病変の直径の合計が少なくとも20%増加

## 6. 測定項目・測定方法

### (1) サイトカインアレイ解析

探索コホートにて対象とされた早期 PD 群 4 例、非早期 PD 群 4 例の患者の血清サンプルを用いて解析を行った。RayBio Human Cytokine Antibody Array G Series 3 (RayBiotech, Norcross, GA) を用いて 42 種のサイトカインを分析した。検討したサイトカインを以下に示す。

ENA-78 (CXCL5), G-CSF, GM-CSF, GRO alpha/beta/gamma, GRO alpha (CXCL1), I-309 (TCA-3/CCL1), IL-1 alpha (IL-1 F1), IL-1 beta (IL-1 F2), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12 p40/p70, IL-13, IL-15, IFN-gamma, MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3(MARC/CCL7), M-CSF, MDC (CCL22), MIG (CXCL9), MIP-1 delta

(CCL15), RANTES (CCL5), SCF, SDF-1 alpha (CXCL12 alpha), TARC (CCL17), TGF beta 1, TNF alpha, TNF beta (TNFSF1B), EGF, IGF-1, Angiogenin, Oncostatin M, Thrombopoietin (TPO), VEGF-A, PDGF-BB, Leptin

血清サンプルのシグナルを GenePix 4400A (Molecular Devices, San Jose, CA) を用いて計測し、Microarray Data Analysis Tool v3.2 (Filgen Inc., Nagoya, Japan) および Array-Pro Analyzer v4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) を用いて二重分析された。

正規化した信号強度を早期 PD 群と非早期 PD 群で比較した。

※アレイのシグナル強度の数値を正規化するために、1つのサブアレイを「reference array」として定義し、それに対して他のすべてのアレイを正規化した。正規化値は以下のように計算した。

$$X(Ny) = X(y) \times P1 / P(y)$$

P1 : reference array 上のポジティブコントロールのスポットの平均シグナル強度

P(y) : アレイ Y 上のポジティブコントロールのスポットの平均シグナル強度

X(y) : アレイ Y 上の特定の平均シグナル強度

X(Ny) : アレイ Y 上の特定のスポット X の正規化されたシグナル強度

## (2) 血清 CXCL9, CCL5, CXCL5, M-CSF, PDGF-BB の測定

保存された血清サンプルを用いて ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) を用いて、通常のプロトコールに従い血清中の CXCL9、CCL5、CXCL5、M-CSF、PDGF-BB の濃度を測定した。プレートリーダーには Spectra MAX™ iD3 (Molecular Devises, San Jose, USA) を使用し、450nm の吸光度を測定し補正用の波長を 540nm と設定した。

## (3) NGS (Next Generation Sequencing) による ctDNA 遺伝子変異解析 探索コホートにて対象とされた早期 PD 群 4 例、非早期 PD 群 4 例の患者の cfDNA サンプルにより解析された。

cfDNA の抽出は AVENIO ctDNA Analysis Kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて、血漿 4 mL から cfDNA を添付のプロトコールに従って抽

出した。標的遺伝子パネルおよびライブラリーの調製には、Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Assay および Tag Sequencing Barcode Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) が使用された。シーケンシングはおよびデータ解析は理研ジェネシス株式会社にて行われた。

ターゲットとした 50 個の肝細胞癌の関連遺伝子を以下に示す。

*AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, BRAF, CCND1, CCND2, CCND3, CDK4, CDK6, CHEK2, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, MYC, NRAS, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RAF1, RET, ROS1, SF3B1, SMAD4, SMO, TP53*

#### (4) 肝細胞癌生検検体の免疫染色による CXCL9, CD8 発現の解析

試薬および材料

抗ヒト CXCL9 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

抗ヒト CD8 抗体 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

方法

別標本で染色の条件を設定した後に、肝細胞癌の生検サンプルの免疫染色を施行 (株式会社モルフォテクノロジーに依頼)。各サンプルの切片上でランダムに 10 視野を写真撮影した (40 倍視野)。染色領域を腫瘍サンプルの全断面積から測定し、WinROOF デジタル画像解析装置を用いて百分率で表し比較した。

#### 7. 統計分析

カテゴリー変数の解析には  $\chi^2$  検定とフィッシャーの直接確率検定を使用し、連続変数の解析には Mann-Whitney の U 検定を使用した。最適なカットオフ値は、ROC (receiver operating characteristic) 曲線に基づき、Youden's index を最大化することにより決定した。PFS と OS の生存曲線は Kaplan-Meier 解析で算出し、log-rank 検定で比較した。すべての解析において  $p < 0.05$  を統計学的に有意と定義した。統計分析は Prism 7.03 (GraphPad Software) ソフトウェアパッケージを使用した。

## 8. 被験者を対象とした研究におけるインフォームドコンセント

本研究は「ヘルシンキ宣言（2013年10月改定）」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号）」を遵守して実施した。あらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会の承認及び病院の許可を得て行った（自主臨床研究番号：自020-0267および017-0521）。研究参加に対して書面による同意が得られた患者、直接の同意取得が困難であった場合は、包括同意を取得しており、オプトアウトで研究の参加を拒否しなかった患者を対象とした。

# 結果

## 1. 対象患者と患者背景

NORTE study group で2020年10月から2022年1月の期間でアテゾリズマブ＋ベバシズマブ併用療法を受けた症例のうち、臨床研究の参加に同意され、治療開始時の臨床情報、血清検体の保存を確認した患者は86例であった。そのうち十分な臨床情報や血清が不足している症例、または治療開始より6週後の画像評価が行われていない症例を除外した68例を対象とした。

68例及び、早期PD群、非早期PD群の患者背景を表2に示す。年齢中央値は72歳（range, 31-89歳）、性別は男性55例、女性13例であった。

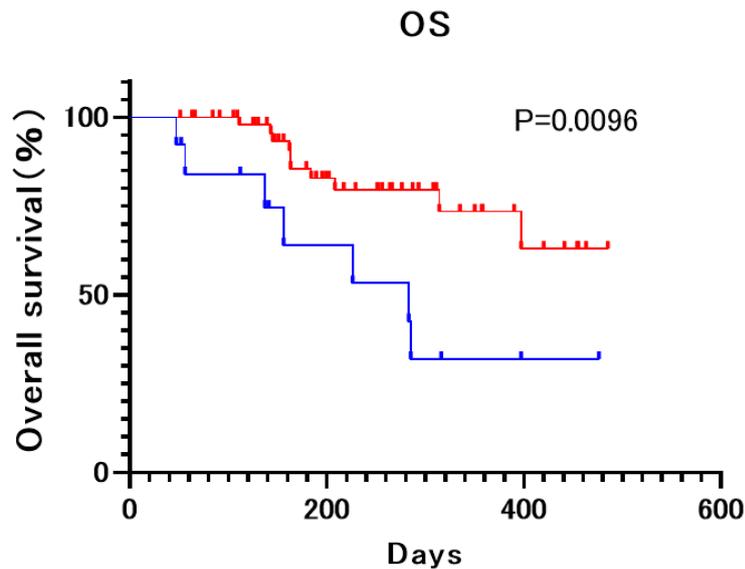
アテゾリズマブ＋ベバシズマブの併用療法を受けた患者の19.1%（13/68）に治療後6週目にPDが認められた。早期PD群、非早期PD群の患者背景に年齢や性別、背景肝など患者の因子の他、腫瘍マーカー、腫瘍の個数・サイズなどの腫瘍因子においても統計学的に有意差を認めなかった。また、HPDを予測する因子として報告されている好中球リンパ球比（neutrophil-lymphocyte ratio, NLR）（Chan, 2021）においても有意差を認めなかった。

68例の早期PD群と非早期PD群のOSの比較を図3に示す。早期PD症例は非早期PD症例と比較し、有意にOSが短かった（OS中央値：283.0日 vs NE、HR [hazard ratio]：3.32, 95%CI [confidence interval]：0.97-11.6, p = 0.0096）。

表 2. アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の治療開始時の患者背景

	All patients (n=68)	PD after 6 weeks (n=13)	Non PD after 6weeks (n=55)	p value
Age (year) †	72 (31–89)	75 (37–83)	70 (31–89)	0.85
Sex				
Male/Female	55/13	10/3	45/10	0.70
Etiology				
Viral hepatitis /NBNC	30/38	4/9	26/29	0.36
CH/ LC	33/35	9/4	24/31	0.13
ECOG PS				
0/1	54/14	10/3	44/11	> 0.99
NLR†	2.83 (0.83–16.69)	2.20 (0.83–7.52)	2.98 (0.98–16.69)	0.32
ALBI grade				
1/2a/2b	25/23/20	5/5/3	20/18/17	0.85
Child–Pugh Grade				
A/B	65/3	13/0	52/3	> 0.99
Child–Pugh Score				
5/6/7/8	38/27/1/2	9/4/0/0	29/23/1/2	0.67
AFP (ng/mL) †	111.8 (0.8–200000.0)	156.0 (2.4–15009.5)	80.1 (0.8–200000.0)	0.67
DCP (mAU/mL) †	887 (19–245000)	839 (25–110159)	1116 (19–245000)	0.59
Maximum intrahepatic tumor size (mm) †	32.0 (0–166.6)	21.6 (0–119)	36 (0–166.6)	0.39
More than 50% liver involvement	11	2	9	> 0.99
Diffuse type	10	1	9	0.67
Number of hepatic tumors				
0/1/Multiple	10/7/51	2/1/10	8/6/41	0.94
BCLC stage				
B/C	23/45	6/7	17/38	0.34
Up to seven in/out	23/45	4/9	19/36	> 0.99
Positive for Vp	13	3	10	0.70
Positive for LN metastasis	13	1	12	0.44
Positive for EHM	31	4	27	0.35
Naïve/recurrence	16/52	3/10	13/42	> 0.99

†Data are shown as median (range) values.



	— PD (n = 13)	— non-PD (n = 55)
OS, median, days	283.0	NE
HR(95%CI)	3.32 (0.97~11.6)	

PD : 早期PD群  
non-PD : 非早期PD群

**図 3.** 早期 PD 群と非早期 PD 群の OS (n = 68)

アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における早期 PD の有無で層別化した OS の Kaplan-Meier 曲線を示す。

## 2. アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた肝細胞癌患者における早期 PD 予測に関連するバイオマーカーの解析：探索コホート

治療開始時に cfDNA を採取した 29 症例の患者のうち、早期 PD に関連する因子を調べるために、治療開始 6 週後画像評価における腫瘍径の変化率に応じて、最も治療反応性が不良であった早期 PD 症例と最も治療反応性が良好であった非早期 PD 症例を各 4 例選択した。それぞれの患者背景を表 3 に示す。年齢の中央値は早期 PD 群と非早期 PD 群でそれぞれ 77 歳と 76 歳、性別は両群で等しく、男性 3 人、女性 1 人であった。

表 3. 早期 PD 症例と非早期 PD 症例の患者背景

	PD after 6 weeks (n=4)	Non PD after 6 weeks (n=4)
Age (years) †	77 (43–82)	76 (71–83)
Sex		
Male/Female	3/1	3/1
Etiology		
NBNC	4	3
HCV	0	1
ECOG PS		
0/1	4/0	2/2
ALBI grade		
1/2a/2b	1/2/1	3/0/1
Child–Pugh Grade		
A/B	4/0	4/0
Child–Pugh Score		
5/6	3/1	2/2
AFP (ng/mL) †	84.2 (5.9–15010.0)	10.1 (3.8–2945.4)
DCP (mAU/mL) †	941 (224–110159)	1098.5 (31–48348)
Maximum intrahepatic tumor size (mm) †	50.9 (15–81.3)	48.6 (27.3–59.1)
More than 50% liver involvement	1	0
Diffuse type	0	1
Number of hepatic tumors		
1/Multiple	0/4	1/3
BCLC stage		
B/C	1/3	1/3
Up to seven in/out	0/4	1/3
Positive for Vp	2	0
Positive for LN metastasis	1	1
Positive for EHM	1	3
Naïve/recurrence	2/2	0/4

†Data are shown as median (range) values.

前述の 8 例（早期 PD 4 例、非早期 PD 4 例）で治療開始時に採取した ctDNA を用いて NGS にて遺伝子変異解析を行った。8 例の amplicon coverage は 41198.33-62859.96 と十分であった。

図 4 に示すように、8 例のうち 6 例で変異が検出された。最も多い変異は *TP53* (5/8 例) であった。*CTNNB1* と *PDGFRA* はそれぞれ 1 例で検出された。早期 PD 4 例と非早期 PD 4 例での比較では ctDNA の遺伝子変異に明らかな差を認めず、前述した *CTNNB1* の変異は非早期 PD 症例の 1 例で認めたが、早期 PD 症例では認められなかった。

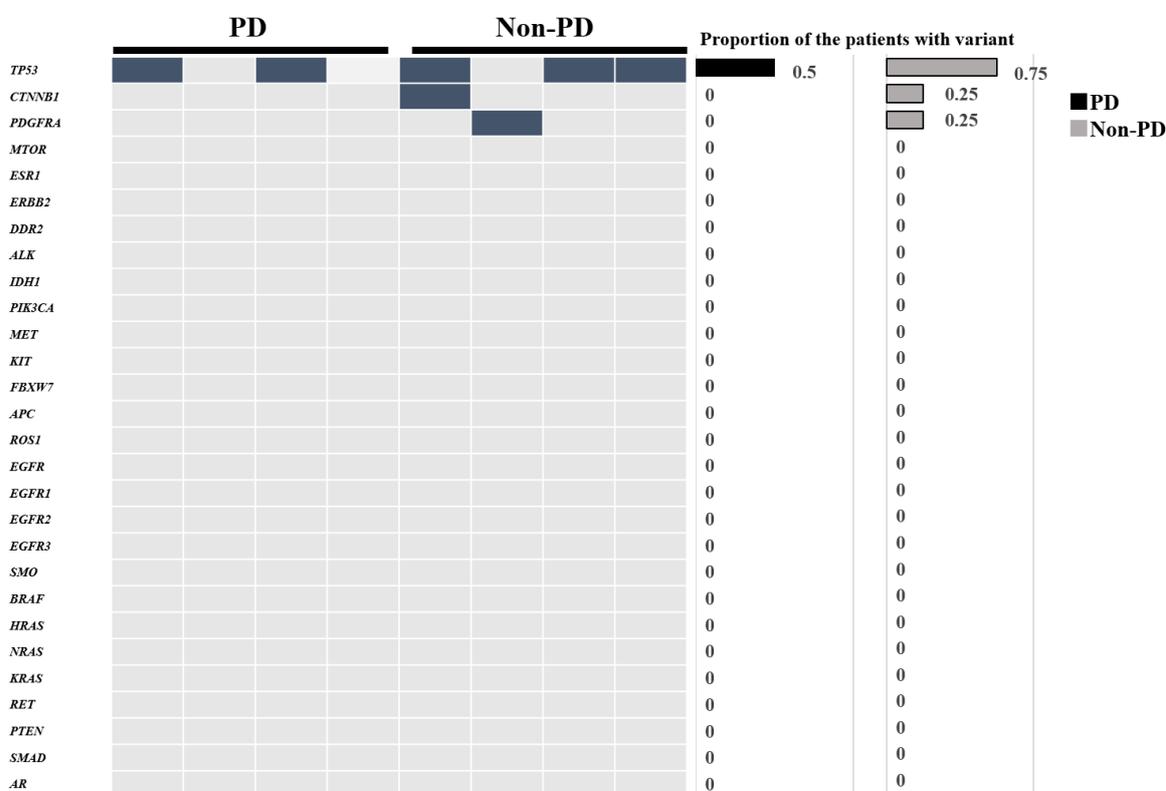


図 4. 早期 PD 症例と非早期 PD 症例における ctDNA の遺伝子変異の比較  
アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法後の早期 PD 症例と非早期 PD 症例、各 4 症例において、ctDNA における遺伝子変化を解析した。

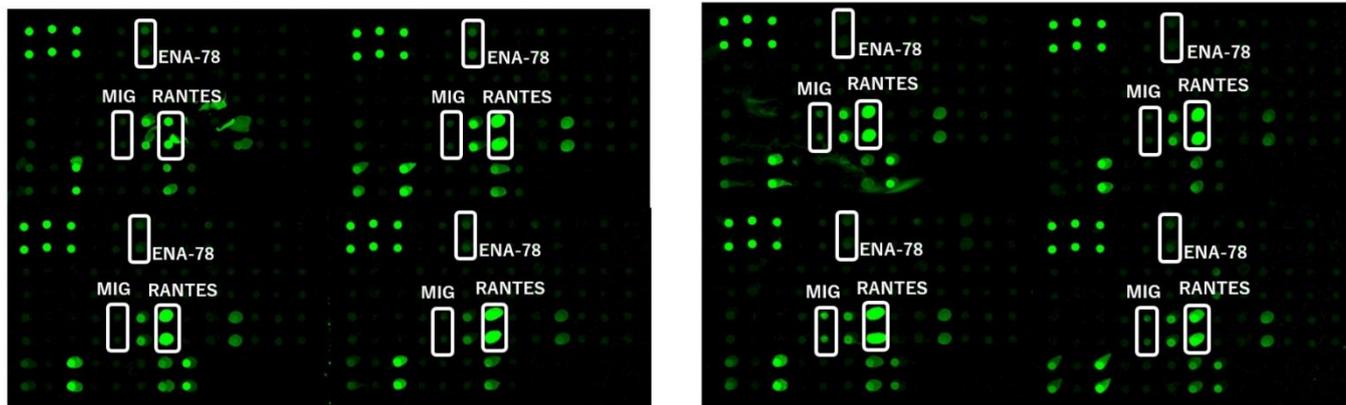
同 8 例の治療開始時の保存された血清を用いて RayBio Human Cytokine Antibody Array G Series 3 で早期 PD 4 例と非早期 PD 4 例で 42 種のサイトカインの解析を行った。その結果、図 5 に示した通り 42 種のサイトカインのうち、MIG (CXCL9), RANTES (CCL5), ENA-78 (CXCL5) が早期 PD 群と非早期 PD 群で有意な発現強度の差を認めた (それぞれ  $p = 0.03$ ,  $p = 0.04$ ,  $p = 0.04$ )。また、PDGF-BB

(platelet-derived growth factor-BB), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) においても、両群間で発現強度が異なる傾向を認めた (それぞれ  $p = 0.05$ ,  $p = 0.06$ )。

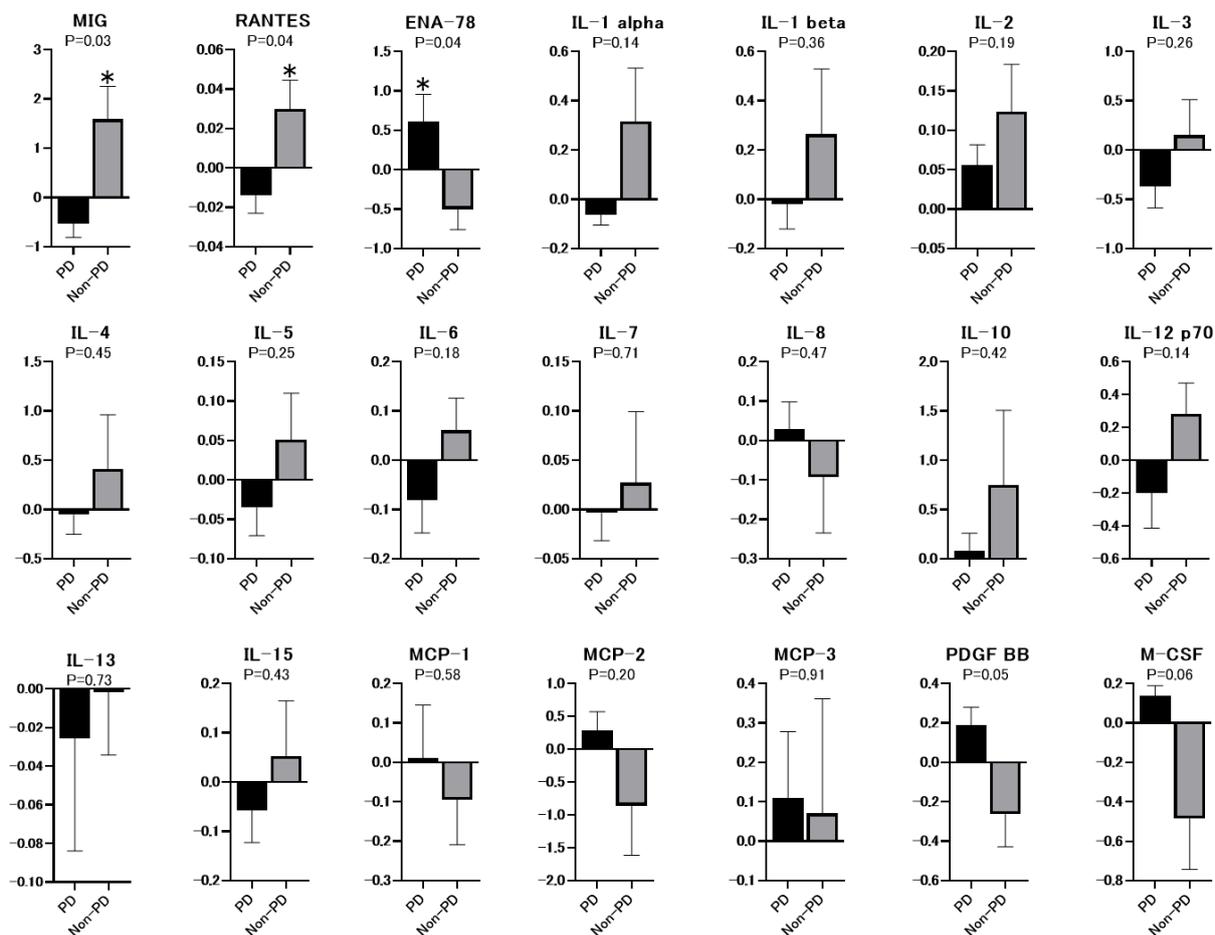
A.

早期 P D

非早期 P D



B.



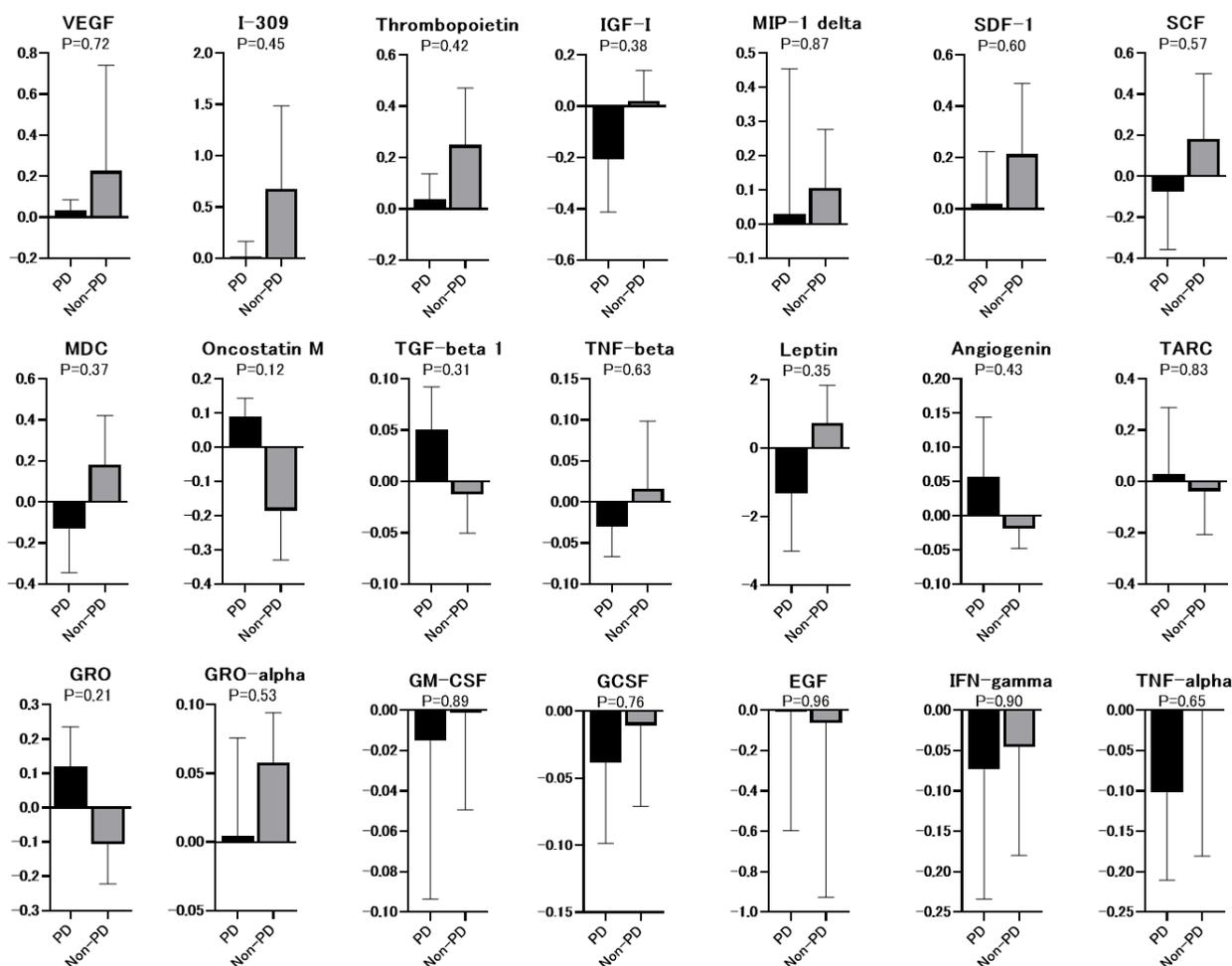


図 5. サイトカインアレイ (早期 PD 症例と非早期 PD 症例の比較)

- A. 早期 PD (n = 4) と非早期 PD (n = 4) のサンプルのサイトカインアレイ写真。  
 B. 正規化したアレイのシグナルを比較 (早期 PD 症例 vs 非早期 PD 症例)。シグナル強度は log<sub>2</sub> 比、標準偏差で示された。

### 3. 新規バイオマーカー候補 ; CXCL9, CCL5, CXCL5 の検証コホートの検討

探索コホートの検討で、切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法は治療開始時のケモカインである CXCL9, CCL5, CXCL5 が早期 PD を予測するバイオマーカー候補として同定された。この結果を探索コホートで選択された 8 例を全体コホートから除いた患者 60 例で検証した。

その結果、図 6 で示すように、早期 PD 群における血清 CXCL9 は、非早期 PD 群と比較し有意に低いことが確認された (p = 0.028)。一方で、CCL5 と CXCL5 には有意差は認めなかった (それぞれ p = 0.74, p = 0.15)。また探索コホートで、発現が異

なる傾向が認められた、M-CSF と PDGF-BB についても検証したが、図 7 で示すように M-CSF と PDGF-BB は早期 PD 群と非早期 PD 群で有意差を認めなかった（それぞれ  $p = 0.20$ ,  $p = 0.69$ ）。

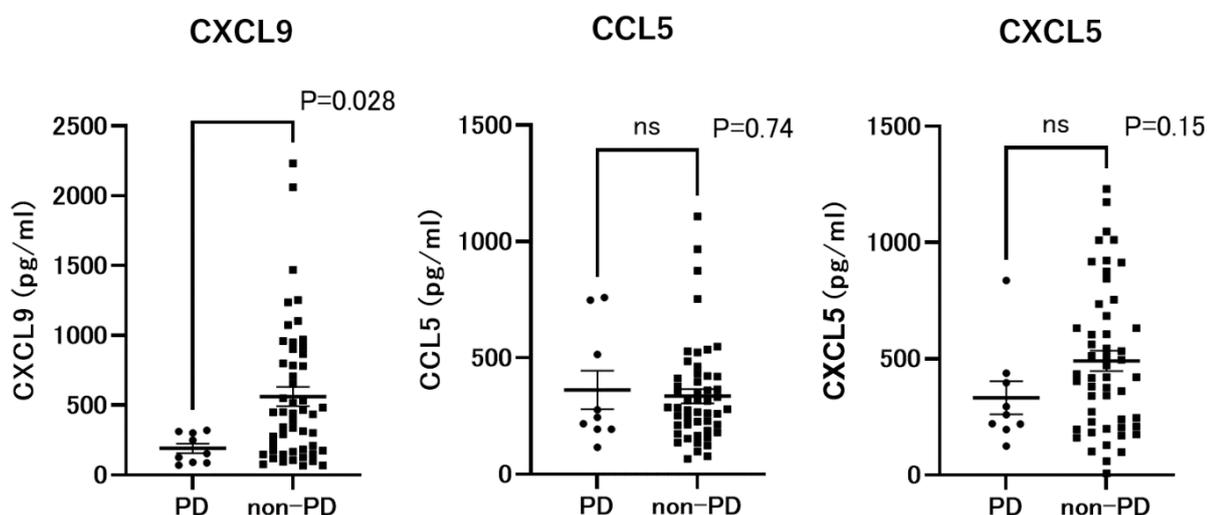


図 6. アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた早期 PD 症例と非早期 PD 症例のケモカイン (CXCL9, CCL5, CXCL5) の比較

全コホート 68 例から探索コホートの 8 例を除いた 60 例で、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法後の早期 PD 症例と非早期 PD 症例の治療開始時の血清 CXCL9, CCL5, CXCL5 を ELISA にて測定し比較した。

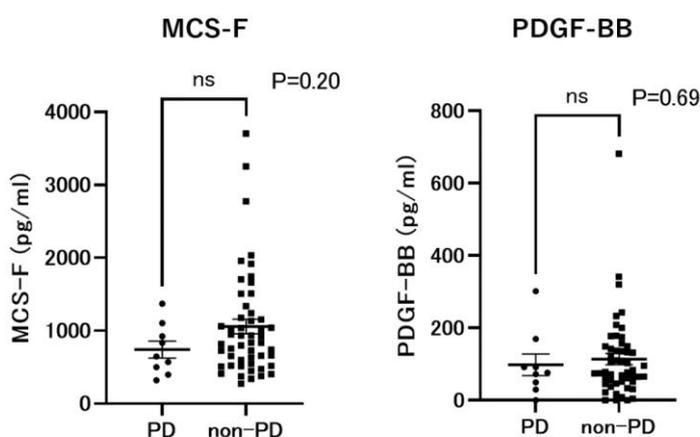


図 7. アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における早期 PD 症例と非早期 PD 症例の血清ケモカイン (MCS-F, PDGF-BB) の比較

60 例における、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における早期 PD 群と早期非 PD 群の治療開始時の血清 MCS-F と PDGF-BB 値を比較した。

続いて、治療開始時の血清 CXCL9 とアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法効果との関係を全体の 68 例で解析した。図 8 で示すように、血清 CXCL9 は早期 PD 群において、非早期 PD 群と比較して有意に低値であった ( $p = 0.0097$ )。また、客観的奏効 (OR；完全奏効 complete response, CR+部分奏効 partial response, PR) の有無では治療開始時の血清 CXCL9 に有意な差を認めなかった ( $p = 0.58$ )。

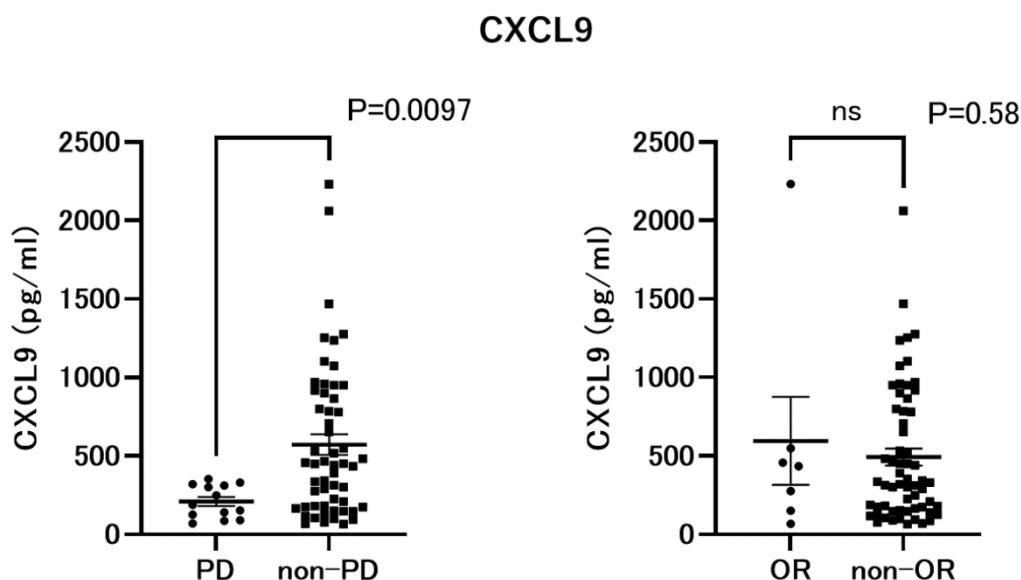


図 8. アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法開始時の血清 CXCL9  
全 68 例でアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法開始時の血清 CXCL9 を早期 PD と非早期 PD、および OR の有無で比較した。

ROC 曲線に基づき Youden index による最適な CXCL9 のカットオフ値を算出した結果、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法開始後の早期 PD を予測するカットオフ値は 333 pg/mL であった (感度 0.600、特異度 0.923；AUC = 0.75)。治療開始時の血清 CXCL9 低値 (333 pg/mL 未満) 症例では 35.3% (12/34 例) に早期 PD を認めた。一方、治療開始時血清 CXCL9 高値例では、早期 PD を認めたものは 2.9% (1/34 例) あり両群間に有意差を認めた (図 9； $p = 0.0012$ )。

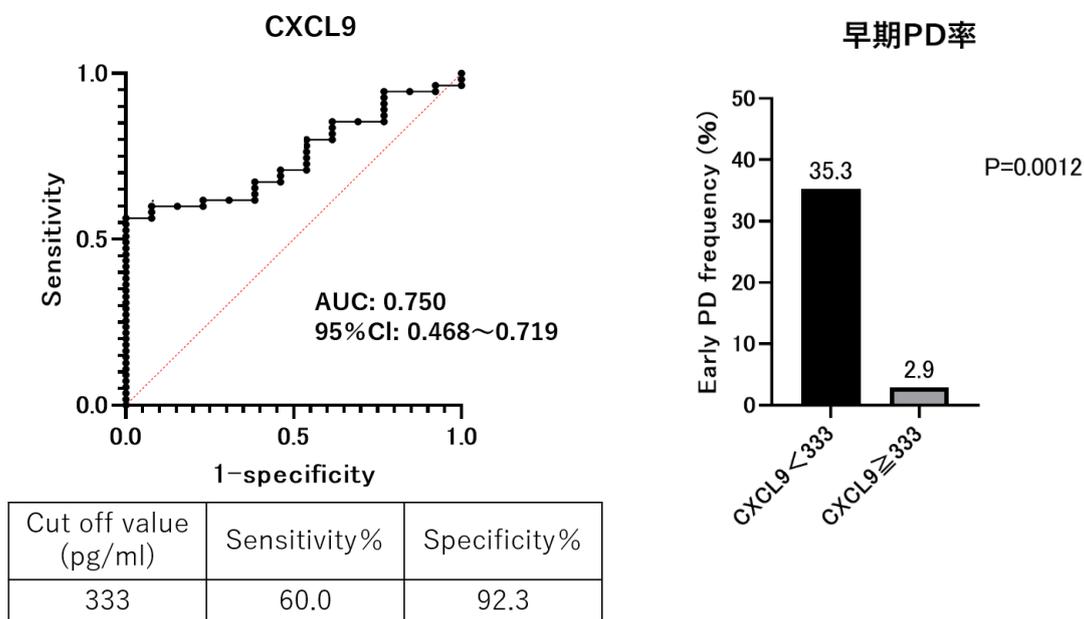


図 9. アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法後の早期 PD を予測する血清 CXCL9 のカットオフ値

ROC 曲線に基づき、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法後の早期 PD を予測するカットオフ値が規定された。治療開始時の血清 CXCL9 が 333 pg/mL 以上と 333 pg/mL 未満の症例におけるアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法後の早期 PD 率を比較した。

さらに、図 9 で算出したカットオフ値を用いて PFS と OS を比較した (図 10)。PFS は血清 CXCL9 が高い患者に比べて、血清 CXCL9 が低い患者で有意に短期間であった (PFS 中央値 : 126 日 vs 227 日、HR : 2.41, 95%CI : 1.22 - 4.80, p = 0.0084)。一方で、OS では有意な差は認めなかった (OS 中央値 : NE vs 397 日、HR : 1.16, 95%CI : 0.45 - 3.02, p = 0.25)。

:

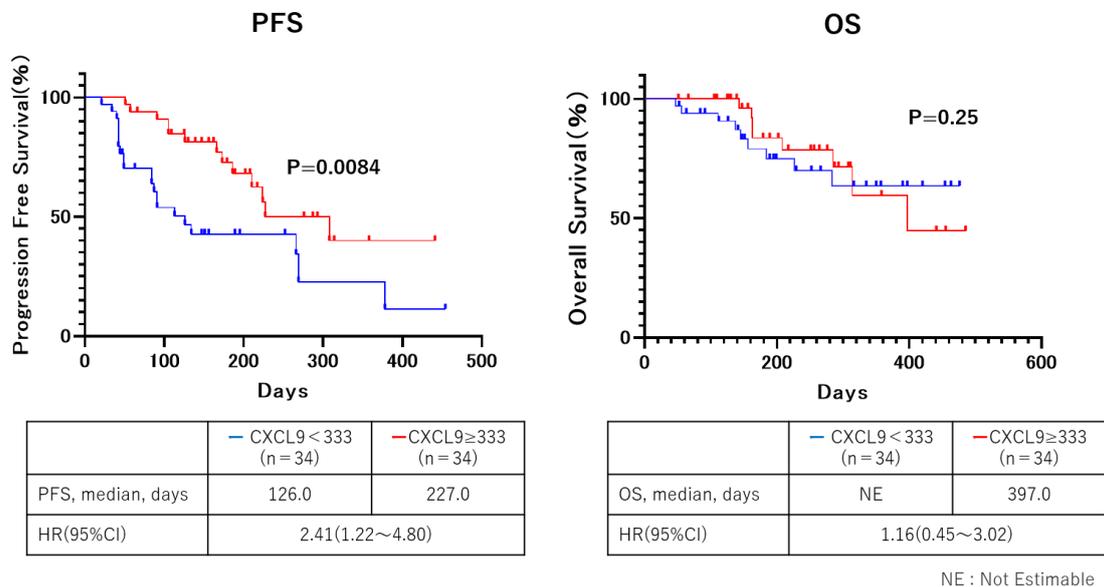


図 10. アテゾリズマブ+ベバシズマブ治療における血清 CXCL9 低値群と高値群の PFS と OS (n = 68) 治療開始時の血清 CXCL9 333 pg/mL で層別化した Kaplan-Meier 曲線。

続いて、血清 CXCL9 がカットオフ値よりも低値であった患者の特徴を検討した。68 症例の治療開始時の血清 CXCL9 低値 (333 pg/mL 未満) の症例と高値 (333 pg/mL 以上) の症例の患者背景の比較を表 4 に示す。血清 CXCL9 高値群と低値群の間に、年齢、性別、肝予備能、腫瘍因子など有意に差のある因子は認めなかった。

表 4. 血清 CXCL9 低値群と高値群の患者背景

	CXCL9 low (< 333 pg/mL) (n = 34)	CXCL9 high (≥ 333 pg/mL) (n = 34)	p value
Age (year) †	71.5 (31–84)	72.5 (47–89)	0.29
Sex			
Male/Female	28/6	27/7	> 0.99
Etiology			
Viral hepatitis /NBNC	13/21	17/17	0.46
CH/ LC	17/17	16/18	> 0.99
ECOG PS			
0/1	26/8	28/6	0.77
NLR†	2.82 (0.84–16.69)	2.84 (0.98–12.15)	0.69
ALBI grade			
1/2a/2b	12/11/11	13/12/9	0.87
Child–Pugh Grade			
A/B	33/1	32/2	> 0.99
Child–Pugh Score			
5/6/7/8	18/15/0/1	20/12/1/1	0.70
AFP (ng/mL) †	63.2 (1.8–57125.2)	182.8 (0.8–200000.0)	0.37
DCP (mAU/mL) †	887 (19–213066)	938 (21–245000)	0.31
Maximum intrahepatic tumor size (mm) †	24.6 (0–160.0)	48.5 (0–166.6)	0.06
More than 50% liver involvement	4	7	0.51
Diffuse type	2	8	0.08
Number of hepatic tumors			
0/1/Multiple	6/2/26	4/5/25	0.43
BCLC stage			
B/C	13/21	10/24	0.61
Up to seven in/out	13/21	10/24	0.61
Positive for Vp	8	5	0.54
Positive for LN metastasis	3	10	0.06
Positive for EHM	12	19	0.14
Naive/recurrence	9/25	7/27	0.78

†Data are shown as median (range) values.

#### 4. 治療開始時の血清 CXCL9 とレンバチニブ治療効果の検討

続いて上記解析で明らかになった切除不能肝細胞癌患者の治療効果予測因子の血清 CXCL9 とレンバチニブの治療効果について検討を行った。2018年4月から2022年5月の期間において北海道大学病院およびJCHO 北海道病院でレンバチニブ治療を受け、臨床研究の参加に同意され、治療開始時の臨床情報、血清検体の保存を確認した患者は94例であった。そのうち十分な臨床情報や血清が不足している症例、または治療開始より2-3か月後の画像評価が行われていない症例を除外した84例でレンバチニブの治療開始時の血清 CXCL9 値の解析を行った。全84例の患者背景を表5に示す。年齢中央値は71歳、男性75人、女性は9人であった。OR (CR+PR) を認めた症例は36例でORを認めなかった症例 (SD+PD) は48例であった。

表 5. レンバチニブ治療における治療開始時の患者背景

	Lenvatinib (n = 84)
Age (year) †	71 (37-88)
Sex	
Male/Female	75/9
Etiology	
Viral hepatitis/NBNC	40/44
Child-Pugh Grade	
A/B	64/20
Child-Pugh Score	
5/6/7/8/9	37/27/12/6/2
AFP (ng/mL) †	33.7 (1.2-449909.0)
DCP (mAU/mL) †	348 (12-436011)
Maximum intrahepatic tumor size (mm) †	35.5 (0-164)
Number of hepatic tumors	
0/1/Multiple	3/15/66
BCLC stage	
B/C	32/52
Treatment response	
CR + PR/SD + PD	36/48

†Data are shown as median (range) values.

ELISAにて治療開始時の血清 CXCL9 を測定し、最良治療効果による比較を行った。その結果、図 11 で示す通り、最良治療効果が PD であった症例と、非 PD であった症例で有意な差を認めなかったが ( $p = 0.75$ )、OR を示した症例は示さなかった症例と比較し血清 CXCL9 は有意に低値であった ( $p = 0.015$ )。

### CXCL9

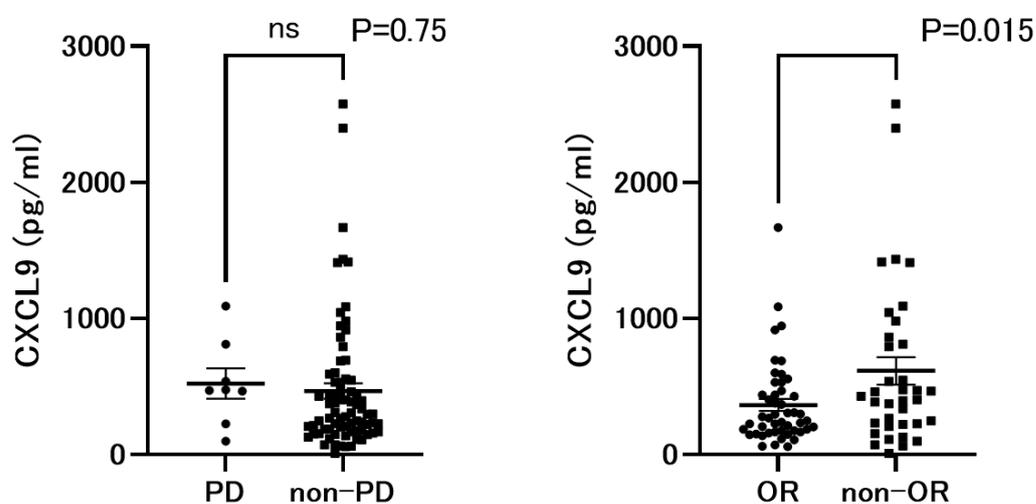


図 11. レンバチニブ治療開始時の血清 CXCL9 値

治療開始時の血清 CXCL9 をレンバチニブの治療反応が PD, OR の有無で比較した。

さらに、治療開始時の血清 CXCL9 が低い患者 (333 pg/mL 未満) では、血清 CXCL9 が高い患者 (333 pg/mL 以上) と比較して、客観的奏効率 (OR ratio, ORR) が有意に高かった (図 12 ;  $p = 0.027$ )

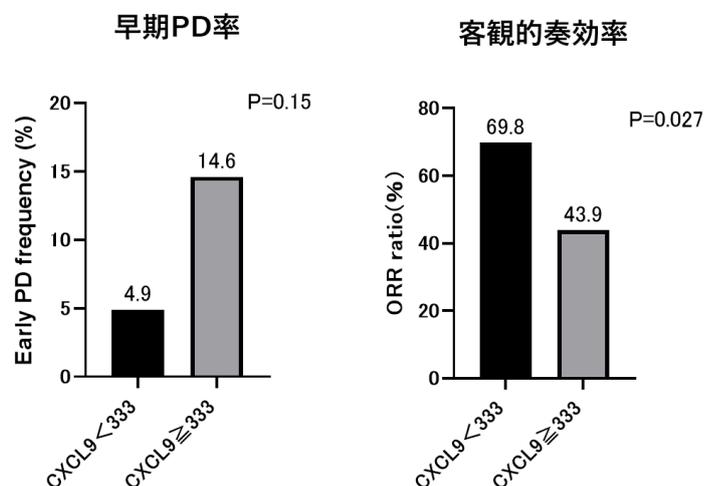


図 12. レンバチニブ治療における血清 CXCL9 による早期 PD 率、OR 率

治療開始時の血清 CXCL9 が 333 pg/mL 以上と 333 pg/mL 未満の患者間のレンバチニブに対する PD 率と ORR を比較した。

レンバチニブ治療を受けた患者の OR を予測するための最適なカットオフ値を求め、ROC 解析を用いて算出したところ、血清 CXCL9 の最適なカットオフ値は 308 pg/mL と設定された。治療開始時の血清 CXCL9 低値 (308 pg/mL 未満) の患者では、治療開始時の血清 CXCL9 高値の患者 (308 pg/mL 以上) に比べて OS が長い傾向を認めた (図 13 ; p = 0.096)。

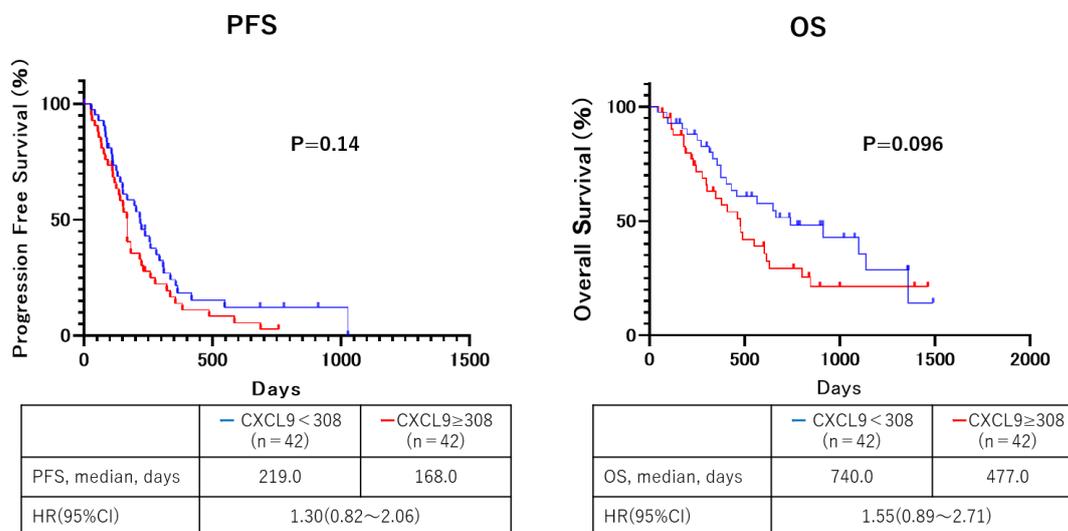


図 13. レンバチニブ治療における血清 CXCL9 低値群と高値群の PFS, OS (n = 84)

レンバチニブ治療開始時の血清 CXCL9 308 pg/mL で層別化した PFS と OS の Kaplan-Meier 曲線。

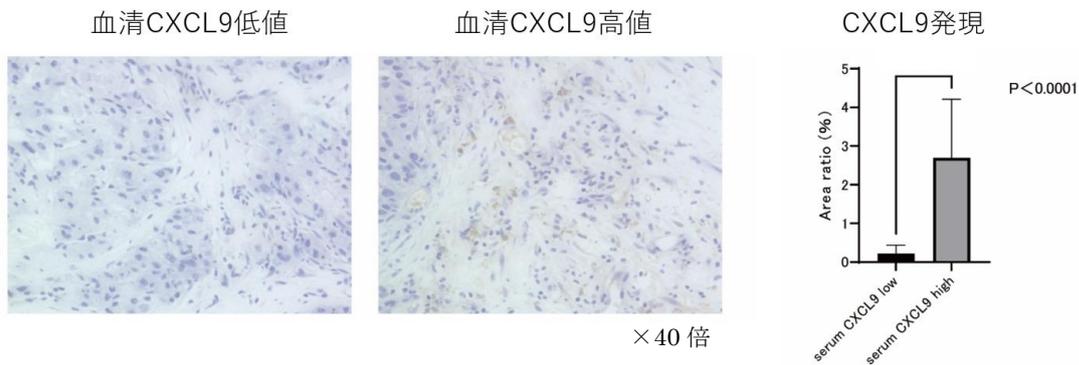
前述の結果より、リンパ球を誘導するケモカイン CXCL9 が切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における早期 PD と関連する因子であることが示唆された。しかしながら、血清 CXCL9 レベルと肝細胞癌の腫瘍内の微小環境を評価した報告はない。そこで申請者は、切除不能肝細胞癌患者の血清 CXCL9 と腫瘍の CXCL9 発現の解析を行った。

## 5. 血清 CXCL9 と腫瘍内 CXCL9 発現

北海道大学病院において治療開始前に肝細胞癌の針生検が行われ、標本および同時期の血清が保存されていた患者をスクリーニングしたところ 2 症例が該当した。この 2 症例の血清を用いて ELISA で血清 CXCL9 を測定したところ、1 例は治療開始時の血清 CXCL9 が高値 (1,087.4 pg/mL) であり、もう 1 例では血清 CXCL9 が比較的低値 (379.7 pg/mL) であった。保存されていた 2 例の検体を、抗ヒト CXCL9 抗体、及び抗ヒト CD8 抗体を用いて免疫染色 (それぞれ 50 倍希釈・室温 10 分、100 倍希釈・室温 60 分) し比較した。

代表的な免疫組織化学染色を図 14 に示す。肝細胞癌の生検検体における CXCL9 の発現は、血清 CXCL9 が比較的低い患者と比較して、血清 CXCL9 が高い患者でより高く認められた。さらに、肝細胞癌における CD8 の発現レベルも血清 CXCL9 が高い患者では血清 CXCL9 が比較的低い患者よりも有意に高かった。したがって、この 2 症例において肝細胞癌における CXCL9 および CD8 の発現と血清 CXCL9 は関連していた。

### CXCL9 免疫染色



### CD8 免疫染色

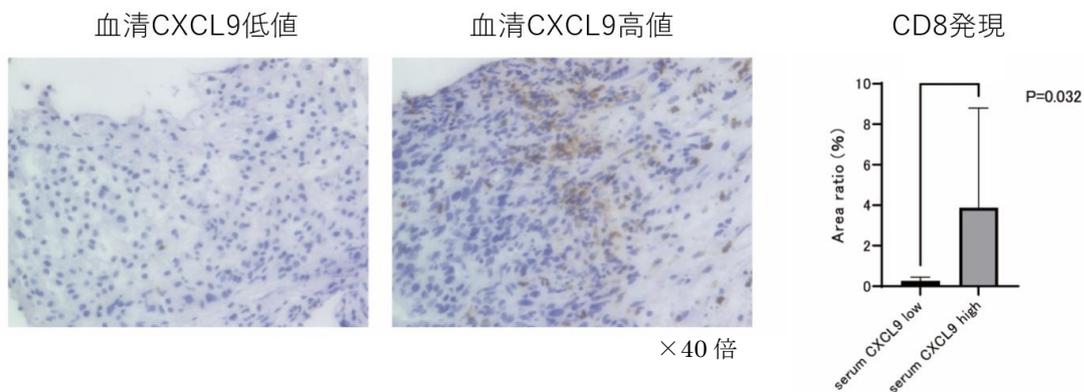


図 14. 血清 CXCL9 と肝細胞癌における CXCL9 と CD8 発現

腫瘍生検と血清サンプルを同時に採取した 2 症例が選択され、1 症例は治療開始時の血清 CXCL9 が高く (1087.4 pg/ml)、もう 1 症例は血清 CXCL9 が相対的に低値 (379.7 pg/ml) であった。

## 考察

本研究では、切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の早期 PD を予測する因子を検討するため、ctDNA の遺伝子変異および、治療開始時の血清サイトカインの解析を行った。

アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の早期 PD 症例と非早期 PD 症例における ctDNA の遺伝子変異に明らかな差を認めなかったが、サイトカインアレイでは、治療開始時の血清 CXCL9, CXCL5 および CCL5 が早期 PD 患者 4 症例と非早期 PD 患者 4 症例の間で有意に異なることが示された。検証コホートにおいてアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた 60 症例のデータを解析したところ、早期 PD 群は非早期 PD 群と比較し治療開始時の血清 CXCL9 が有意に低いことが再現され、さらに、血清 CXCL9 が低値の症例で PFS が有意に長くなることが示された。追加の検証では、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法とは対照的にレンパチニブ治療に OR を示した症例では OR を示さなかった症例と比べて治療開始時の血清 CXCL9 値が有意に低く、OS は治療開始時の血清 CXCL9 が高い症例と比較し、血清 CXCL9 値が低い症例で長い傾向であることが明らかになった。

前述の結果から血清 CXCL9 がアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の早期 PD に関連する有力な予測因子となりえる事が想定された。ROC 曲線に基づき早期 PD を予測するための血清 CXCL9 の最適なカットオフ値は 333 pg/mL に規定された。本研究では治療開始時の血清 CXCL9 値が低値である (< 333 pg/mL) 34 例のうち 12 例 (35.3%) が早期 PD を認め、治療開始時の血清 CXCL9 値が高い ( $\geq$  333 pg/mL) 34 例のうち 1 例 (2.9%) でのみ早期 PD を認めた。したがって、治療開始時の血清 CXCL9 値が低い患者では、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の初期には慎重な経過観察が求められる可能性がある。

最近、ICI 治療を受けた 1,000 人以上の患者の全エクソームデータとトランスクリプトームデータを解析したところ、クローン性腫瘍遺伝子変異量に加えて、CXCL9 の高発現が ICI 治療に対する良好な奏効と最も強い予測因子の一つであることが報告されている (Litchfield et al, 2021)。CXCL9 は腫瘍内の IFN $\gamma$  に反応したマクロファージ、樹状細胞、腫瘍などから産生され、細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を腫瘍内に誘導する重要なケモカインとされており (Gorbachev et al, 2007; Marcovecchio et al, 2021)、CXCL9 の高発現は、免疫

細胞浸潤の予測マーカーと報告されている (House et al, 2020)。同様に、Immune Class 分類における *inflamed hot tumor* の肝細胞癌では、CCL5, CXCL10, CXCL11, CXCL9 などのリンパ球走化性に関与するサイトカインが高発現する。したがって、組織内の CCL5, CXCL10, CXCL11, および CXCL9 の発現レベルが低い肝細胞癌は、腫瘍に浸潤する CD8 陽性 T 細胞および樹状細胞の発現レベルが低い *non-inflamed tumor* に分類される (Llovet et al, 2022; Montironi et al, 2022)。これまでに肝細胞癌における血清サイトカイン・ケモカインレベルと ICI の治療反応の関係性は明らかとされていなかった。本研究では血清 CXCL9 が切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法における早期 PD と関連することを報告した初めての報告となる。

また、卵巣腫瘍における CXCL9 発現は血清 CXCL9 レベルと有意な相関があったことが報告されている (Mlynska et al, 2019) が、肝細胞癌の CXCL9 発現が血清 CXCL9 レベルと相関があるか報告はされていない。そのため 2 例の肝細胞癌の針生検検体を免疫染色し比較したところ、腫瘍内の CXCL9 の発現は、血清 CXCL9 が高い患者でより高く認められた。さらに腫瘍内の CD8 の発現レベルも血清 CXCL9 が高い患者で有意に高いことを認めた。本検討では肝細胞癌における CXCL9 および CD8 の発現と血清 CXCL9 レベルは相関していたが、少数例の検討であり、今後、多数例での解析が必要と考える。

最近、腫瘍中の抗 VEGF 抗体が CXCL9, CXCL10, および CXCL11 レベルを増加させ、それによって、CXCL9, CXCL10, および CXCL11 の発現レベルが低い腫瘍であっても、腫瘍への CD8 陽性 T 細胞浸潤が増加し、肝細胞癌に対するベバシズマブとの併用免疫療法に対する反応が増加することが報告された (Iwai et al, 2021; Kudo, 2022)。また、抗 VEGF 抗体による血管新生阻害が低酸素環境を誘導し IFN- $\gamma$  が活性化され、CXCL9 の産生が誘導される、という報告もある (Ishikura et al, 2022)。しかしながら、今回の検討では血清 CXCL9 値が低い一部の患者が、抗 VEGF 抗体と ICI (アテゾリズマブ+ベバシズマブ) の併用療法に対して良好な反応を示さなかった理由については十分に明らかとはなっていない。想定される仮説としては、血清 CXCL9 値が低い一部の患者では腫瘍血管新生は VEGF だけでなく FGF (fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor) などの他の腫瘍血管新生因子にも依存しているため、抗 VEGF 抗体の低酸素による IFN- $\gamma$  を介した CXCL9 産生が不十分となった可能性があると考えられる。

アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を受けた PD 患者における OS 短縮の潜在的な原因の 1 つに HPD の可能性がある。過去の報告では抗 PD-1 抗体

で治療された肝細胞癌患者を対象に行われた研究で 12.7%に HPD を認め、予後が不良であったことが明らかにされている (Kim et al, 2021)。本研究では治療開始前の腫瘍の増殖率に関するデータが不足していたため HPD を同定することは困難であった。しかし、早期 PD 患者の 22.2%が治療開始後 6 週目に 50%以上の腫瘍径の拡大を示し、このような患者の転帰を予測することは臨床的に重要である。

また、探索コホートにおいて CCL5, CXCL5 は早期 PD に関連する予測因子として候補となったが、前述の通り Ruzi らは肝細胞癌では CCL5 の高発現が CD8 陽性 T 細胞の浸潤を誘導することが報告している (Ruiz de Galarreta et al, 2019)。さらに、治療開始時の CXCL5 が低いことは、進行期メラノーマにおける抗 PD-1 抗体の反応性の低さと関連していると報告がある (Fujimura et al, 2019)。60 人の患者を対象とした検証分析では、これらのケモカインは本研究では早期 PD の有無に有意差を示さなかったが、さらなる分析が必要と考える。

本章の研究にはいくつかの limitation がある。本研究は後方視的研究であり、対象患者数は比較的少なく、特に ctDNA の遺伝子変化について解析した患者数は少数であった。Harding らは、CTNNB1 変異を有する切除不能肝細胞癌患者において ICI 単剤療法の奏効率が低く予後不良であることを報告した (Harding et al, 2019)。そこで本研究にて ctDNA の遺伝子変化を解析したが、本研究の 8 例の解析では早期 PD 患者において ctDNA の有意な遺伝子変化は観察されなかった。抗 VEGF 抗体がこの結果に影響を与える可能性があるが、より大規模な患者コホートでの解析が必要であると考ええる。

また、早期 PD の予測する治療開始時の血清 CXCL9 は ROC の解析において AUC : 0.75 と有用性は高いとはいえ、これらの知見を解釈する際には考慮すべきである。

今後、本研究のさらなる検証のため、より大規模な調査が必要と考え、現在、全国の多施設で症例集積を行っている。

2020 年 10 月から 2022 年 9 月の期間において NORTE study group および北海道外の病院 (仙台厚生病院、武蔵野赤十字病院、東京医科歯科大学病院、横浜医療センター、山梨大学病院、長崎医療センター) にてアテゾリズマブ + ベバシズマブ併用療法を受け、臨床情報を有し、治療開始時の血清が保存されていた切除不能肝細胞癌患者 208 例を対象とした。治療開始時の血清を用いて ELISA で血清 CXCL9 を測定し、同様に早期 PD と関連があるか解析した。

現時点で集積された 208 例の治療開始時の血清 CXCL9 を測定し、早期 PD および OR の有無で比較した結果を図 15 に示す。前述の結果と同様に、早期 PD 群において有意に治療開始時の血清 CXCL9 の低値を認めた ( $p = 0.0206$ )。一方、奏効の有無で 2 群に有意差は認めなかった ( $p = 0.14$ )。

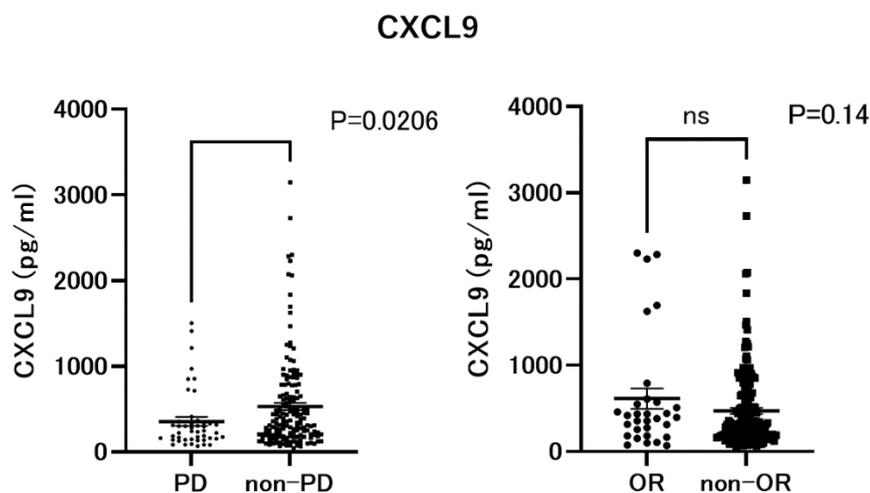


図 15. 治療開始時の血清 CXCL9 と早期 PD (全国多施設での検討)

アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法開始時の血清 CXCL9 と早期 PD、および OR の有無での比較。

この全国多施設の調査は症例集積中ではあるが、現時点の中間解析では前述の結果と同様に治療開始時の血清 CXCL9 は早期 PD 群で非早期 PD 群と比較し有意に低値となっている。今後、さらなる症例の集積を行うとともにサブグループ解析を行い CXCL9 と共に治療効果に影響を与える因子の同定や、今回の研究で評価ができなかった OS の検討は今後の課題である。

今検討の結論として切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において治療開始時の血清 CXCL9 低値は早期 PD を予測する因子となる可能性がある。

## 《第二章》

### CXCL9 低発現がレンバチニブ治療効果に

#### 与える影響の解析

#### 緒言

第一章では切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において治療開始時の血清 CXCL9 低値が早期 PD の予測因子となる可能性を提示した。一方で、申請者はレンバチニブ治療ではアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法とは逆に、治療開始時の血清 CXCL9 低値の症例では血清 CXCL9 高値症例と比較し良好な治療効果を得ることを明らかにした。

しかしながら、治療開始時の血清 CXCL9 低値症例において、何故レンバチニブの治療効果が良好であるかのメカニズムは全く解明されていない。

レンバチニブは VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor)-1, VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit, Ret のチロシンキナーゼ阻害作用を持つ他、FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PDGFR $\alpha$  (Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ) に対してチロシンキナーゼ阻害作用を持つ。特に肝細胞癌に対するレンバチニブの作用機序として FGFR 阻害作用が重要と考えられている (Matsuki et al, 2018)。FGFR は、FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 のサブタイプを有する一回膜貫通型チロシンキナーゼ受容体である。リガンドである FGF (fibroblast growth factor) はヒトにおいて現在 22 種が知られ、血管形成、創傷修復の調整を含む、生体生物における多くの生理学的役割を担っている。癌においては腫瘍血管新生、増殖、悪性形質転換にかかわることが知られている (Beenken and Mohammadi, 2009)。肝細胞癌では FGF19/FGFR4 が高発現し、オートクリンループを形成することが腫瘍増殖の一因とされており (Raja et al, 2019)、肝細胞癌において FGFR4 の高発現がレンバチニブの治療効果と関連があることが報告されている (Yamauchi et al, 2020; Shigesawa et al, 2021)。

第二章では、第一章で生じた血清 CXCL9 が低値の切除不能肝細胞癌患者でレンバチニブが良好な治療効果を認めるメカニズムを、レンバチニブの主な治療ターゲットとなる FGF シグナルと CXCL9 発現との関連を中心に検討する事を目的とした。

# 方法

## 1. 検討項目と方法

### (1) : TCGA データベースによる遺伝子解析

TCGA のデータベース (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) から「Human HCC」遺伝子の発現データを入手し、FGFR4 を含む FGFR, FGF 発現と CXCL9 遺伝子発現を TPM (transcripts per million) 値に変換し遺伝子発現の相関について解析した。

### (2) : 細胞培養

#### 2-1 肝癌細胞株

Huh7 細胞、JHH2 細胞、JHH4 細胞、JHH6 細胞、HepG2 細胞、Huh1 細胞を使用した。Huh7 細胞は下記の手順に従って培養、継代した。それ以外の肝細胞癌株は研究室で RNA を抽出後逆転写され、冷凍保存されていた cDNA (complementary DNA) を使用した。

#### 2-2 試薬および材料

1× Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Waltham, USA)  
fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)  
100 mU/ml PenicillinG, 100µg/ml Streptomycin (Gibco, Waltham, USA)  
phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 (1×) (Gibco, Waltham, USA)  
0.25% Trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (FUJI FILM, Tokyo, Japan)

Huh7 細胞は DMEM に 10%FBS、ペニシリン G 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を添加した培地で培養した。

#### 2-3 細胞培養条件

Huh7 細胞は DMEM (10%FBS, Penicillin Streptomycin 1×) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。2-3 日おきに培地を交換し、細胞が 80~90% コンフルエントになった際に継代した。継代の手順は PBS で洗浄後に 0.25% Trypsin-EDTA (37°C, 10 分) で処理して細胞を剥がし、遠心分離 (300 ×g, 3 分) 後、上清を除去し、沈殿した細胞を DMEM に再懸濁して新しい培養皿に播種した。

### (3) : qRT-PCR

#### 3-1 試薬および材料

RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA)

UltraPure Distilled Water (Life Technologies, Waltham, USA)

Prime Script™ RT Master Mix (Takara, Kusatsu, Japan)

THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)

#### 3-2 実験操作 (RNA 抽出-遺伝子発現解析)

細胞の RNA 抽出は PBS で細胞を洗浄後に RNeasy® Mini Kit を用いて添付のプロトコールに従って行った。RNA 濃度測定は分光光度計 (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix) を用いて行った。cDNA の合成は Prime Script™ RT Master Mix を用いて添付のプロトコールに従って行った。逆転写反応は 37°C で 15 分 incubate した後に、85°C で 10 秒反応させた。合成した cDNA は H<sub>2</sub>O を加えて希釈した (最終濃度 : 約 1.67 ng/μl)。qRT-PCR は、THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix を試薬として用い、装置およびソフトウェアは Quant Studio 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) と Quant Studio™ Design & Analysis Software ver 1.51 (同) を用いた。

具体的な PCR の条件は下表に記した。遺伝子発現レベルの解析は GAPDH を内因性コントロールとして用いて、comparative threshold cycle (ddCt) method で計算した。なお、使用した primer の一覧を下記に記した。

qRT-PCR の反応液		反応条件	
SYBR qPCR Mix	10 μl	95°C	20sec
Forward primer (10 μM)	0.6 μl	95°C	1sec
Reverse primer (10 μM)	0.6 μl	60°C	20sec
cDNA 希釈液	8.8 μl		
Total 20 μl			40cycle

#### 使用した Primer 一覧

	Foward	Reverse
GAPDH	5'-GGATTTGGTTCGTATTGGG-3'	5'-GGAAGATGGTGATGGATT-3'
CXCL9	5'-CCAGTAGTGAAAGGGTCGC-3'	5'-AGGGCTTGGGCAAATTGTT-3'
FGFR4	5'-GGGCAGCATCCGCTATAACT-3'	5'-TGCACATAGGGGAAACCGTC-3'

#### (4) : 免疫染色

##### 4-1 試薬および材料

抗ヒト CXCL9 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

抗ヒト FGFR4 抗体 (Proteintech Group, Rosemont, USA)

##### 4-2 方法

株式会社モルフォテクノロジーにて上記の抗体および肝細胞癌の生検サンプルを用いて、別標本で免疫染色の条件設定した後に、生検サンプルの免疫染色を行った。

#### (5) : siRNA による FGFR4 ノックダウン

##### 5-1 試薬および材料

siFGFR4 (Qiagen, Valencia, USA)

negative control siRNA (Qiagen, Valencia, USA)

Lipofectamine™ RNAi Max Reagents (Life Technologies, Waltham, USA)

##### 5-2 方法

Huh7 細胞  $3 \times 10^5$ /well を 6 ウェルプレートに播種し、DMEM で一晚培養後に siRNA (siFGFR4) を投与した。siRNA は Lipofectamine™ RNAi Max Reagents を用いて、製造元の手順に従って導入した。また、コントロールとして negative control siRNA を使用した。

#### (6) : 肝細胞癌株に対するレンバチニブ添加

##### 6-1 試薬および材料

Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)

##### 6-2 方法

Huh7 細胞  $3 \times 10^5$ /well を 6 ウェルプレートに播種し、DMEM で培養し、後述の操作を行った。

- ①レンバチニブ (2  $\mu$ M)、コントロールとして DMSO (0.1 %) で 3 ウェルずつ処理を行い、72 時間後に細胞を回収し CXCL9 の発現レベルを qRT-PCR で分析しレンバチニブ投与群とコントロール群で比較を行った。

②レンバチニブまたは DMSO を添加した Huh7 の培養上清を添加直後、添加後 24 時間、48 時間、および 72 時間で 100 $\mu$ l ずつ回収し、ELISA kit を用いて CXCL9 濃度の変化を分析した。

(7) : 切除不能肝細胞癌患者におけるレンバチニブ治療後の血清 CXCL9 測定

7-1 対象となる患者

2018 年 4 月から 2022 年 5 月にかけて、北海道大学病院においてレンバチニブ治療開始時、治療後 3 日目、7 日目に血清が保存されており、研究参加に同意されている症例を対象とした。

7-2 方法

治療開始時、投与後 3 日目、7 日目の保存血清を ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) を用いて血清中の CXCL9 濃度を測定しレンバチニブ投与開始後の血清 CXCL9 の変化を検討した。

(8) : NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

8-1 試薬および材料

Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega, Madison, USA)

Lipofectamine™ LTX Reagents with PLUS™ Reagents (Life Technologies, Waltham, USA)

Luciferase plasmid DNA with 25 ng of Renilla pGL4.74 [hRluc/TK] vector (Promega, Madison, USA)

Luciferase reporter gene luc2P (pGL4.32 [luc2P/NF- $\kappa$ BRE/Hygro], (Promega, Madison, USA)

8-2 方法

Huh7 細胞  $1 \times 10^5$ /well を 24 ウェルプレートに播種し、翌日に Internal control としての Renilla pGL4.74 vector 25 ng と luciferase reporter gene luc2P を組み込んだ NF- $\kappa$ B response element を含む plasmid DNA 500 ng をトランスフェクションした。トランスフェクションには Lipofectamine™ LTX によるリポフェクション法を添付のプロトコールに従って行った。

トランスフェクションの 24 時間後に培地を交換、Dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む試薬を 5 ウェルずつ添加し、一定時間培養を行った後にアッセイを行った。アッセイ時には Lysis Buffer (PLB) を 100 $\mu$ l 加え、室温で 15 分間振盪した。ルミノメーター用のエッペンチューブを用意し、25  $\mu$ l の Luciferase Assay Reagent II (LARII) をあらかじめ分注しておき、ここに

PLBにて溶解した細胞溶解液を 5  $\mu$ l 加え GloMax 20/20 Luminometer (Promega, Madison, USA)にて測定 (ルシフェラーゼシグナル)を行った。さらに、このチューブに 25  $\mu$ l の Stop & Glo Reagent を加え、2 回目の測定 (レニーラシグナル)を行い、以後、それぞれの細胞溶解試料に対し、同様の操作を行って測定した。(ルシフェラーゼシグナル)/(レニーラシグナル)をそれぞれの試料の値とし、コントロールの試料を 1 として比を取り、相対化したデータをグラフとして表した。

(9) : 薬剤による NF- $\kappa$ B 活性化、抑制化による CXCL9 の変化

#### 9-1 試薬および材料

Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

TPCA 1, IkappaB kinase inhibitor (abcam : ab145522)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), PKC activator (abcam : ab120297)

#### 9-2 方法

Huh7 細胞  $1 \times 10^5$ /well を 24 ウェルプレートに播種し DMEM で一晩培養後、NF- $\kappa$ B・Renila のベクターをトランスフェクションした。24 時間経過後にネガティブコントロールとして DMSO (0.1 %) を処理し、NF- $\kappa$ B インヒビターである TPCA1 (2  $\mu$ M)、アクティベーターである PMA (0.5  $\mu$ M) を 5 ウェルずつ処理、24 時間経過したところでアッセイを行い NF- $\kappa$ B 活性を測定した。

Huh7 細胞  $5 \times 10^5$ /well を 12 ウェルプレートに播種させ、DMEM で一晩培養後、コントロールとして DMSO (0.1 %)、NF- $\kappa$ B インヒビターとして TPCA1 (2  $\mu$ M) を、NF- $\kappa$ B アクティベーターとして PMA (0.5  $\mu$ M) を 3 ウェルずつ処理し、3 時間および 24 時間を経過したところで細胞を回収し、qRT-PCR にて CXCL9 発現の測定を行った。

(10) : レンバチニブ添加による NF- $\kappa$ B 活性の変化

#### 10-1 試薬および材料

Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### 10-2 方法

Huh7 細胞  $1 \times 10^5$ /well を 24 ウェルプレートに播種し、DMEM で一晩培養後、Renilla・NF- $\kappa$ B の plasmid DNA をトランスフェクションした。24 時間経過後にレンバチニブ (2  $\mu$ M) およびコントロールとして DMSO (0.1 %) を 5

ウェルずつ処理し、24 時間経過したところでルシフェラーゼレポーターアッセイを行い NF-κB 活性を測定した。

#### (11) : FGF19 添加による NF-κB 活性の変化

##### 11-1 試薬および材料

Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Recombinant Human FGF-19 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)

##### 11-2 方法

Huh7 細胞  $1 \times 10^5$ /well を 24 ウェルプレートに播種し、DMEM で一晩培養後、Renilla・NF-κB の plasmid DNA をトランスフェクションした。24 時間経過後に FGF-19 (50 ng/ml, 100 ng/ml) および DMSO (0.1 %) を 5 ウェルずつ処理し、24 時間経過後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行い NF-κB 活性を測定した。

#### (12) : TNFα と FGF19 添加による NF-κB 活性の変化

##### 12-1 試薬および材料

Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Recombinant Human TNF-alpha (RSD)

Recombinant Human FGF-19 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)

##### 12-2 方法

Huh7 細胞  $1 \times 10^5$ /well を 24 ウェルプレートに播種し、DMEM で一晩培養後、Renilla・NF-κB の plasmid DNA をトランスフェクションした。24 時間経過後に TNFα (0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) およびコントロールとして DMSO (0.1 %) を 5 ウェルずつ処理し、3 時間および 24 時間経過後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行い NF-κB 活性を測定した。

Huh7 細胞  $1 \times 10^5$ /well を 24 ウェルプレートに播種し、DMEM で一晩培養後、Renilla・NF-κB の plasmid DNA をトランスフェクションした。24 時間経過後に TNFα (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml)+FGF19 (50 ng/ml), TNFα (10 ng/ml)+FGF19 (100 ng/ml), TNFα (10 ng/ml)+FGF19 (200 ng/ml)、および DMSO (0.1 %) を 5 ウェルずつ処理し、24 時間経過後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行い NF-κB 活性を測定した。

## 2. 統計分析

連続変数の解析には Mann-Whitney の U 検定、対応のある連続変数の解析には paired t-test、多群間の比較には one-way ANOVA を実施した。相関分析にはピアソンの積率相関係数を用いて解析した。すべての解析において  $p < 0.05$  を統計学的に有意と定義した。統計分析は Prism 7.03 (GraphPad Software) ソフトウェアパッケージを使用した。

## 3. 被験者を対象とした研究におけるインフォームドコンセント

本研究は「ヘルシンキ宣言 (2013 年 10 月改定)」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」を遵守して実施した。あらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会の承認及び病院の許可を得て行った (自主臨床研究番号: 017-0521)。研究参加に対して書面による同意が得られた患者、直接の同意取得が困難であった場合は、包括同意を取得しており、オプトアウトで研究の参加を拒否しなかった患者を対象とした。

# 結果

## 1. TCGA データベースによる遺伝子解析

TCGA のデータベースより「Human HCC」遺伝子の発現データを合計 405 レコード入手した。FGFR, FGF 発現と CXCL9 発現を TPM 値に変換し、その発現の相関を解析した。その結果、図 16 に示すように CXCL9 高発現群 ( $TPM \geq 60$ ) は低発現群 ( $TPM < 60$ ) と比較し、FGFR4 の発現が有意に低いことが明らかとなった ( $p = 0.038$ )。

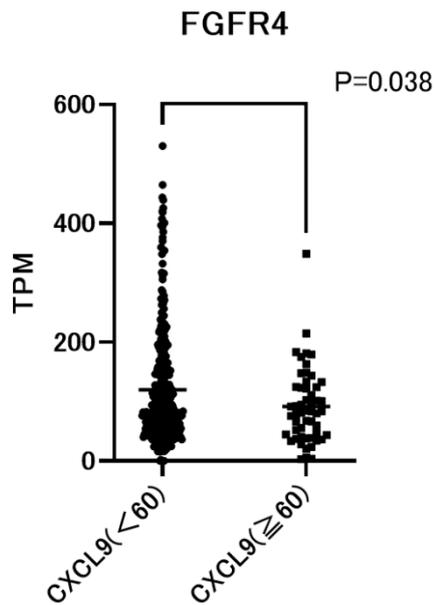


図 16. ヒト肝細胞癌における CXCL9 と FGFR4 発現の解析

TCGA データベースから、ヒト HCC の遺伝子発現データを入力し、データを TPM 値に変換した。CXCL9 高発現群 (TPM  $\geq 60$ ) と低発現群 (TPM  $< 60$ ) に分類し、CXCL9 と FGFR4 発現量を解析した。

肝細胞癌において FGFR4 の高発現がレンバチニブの治療効果良好と関連することが報告されている (Yamauchi et al, 2020)。その為、この CXCL9 発現が低い患者で FGFR4 発現が高値となるこの結果が、CXCL9 発現が低い肝細胞癌患者においてレンバチニブ治療が良好な反応性を示す原因となると考え、この仮説を検証するため、さらに検討を行った。

## 2. 肝細胞癌における CXCL9 と FGFR4 の発現

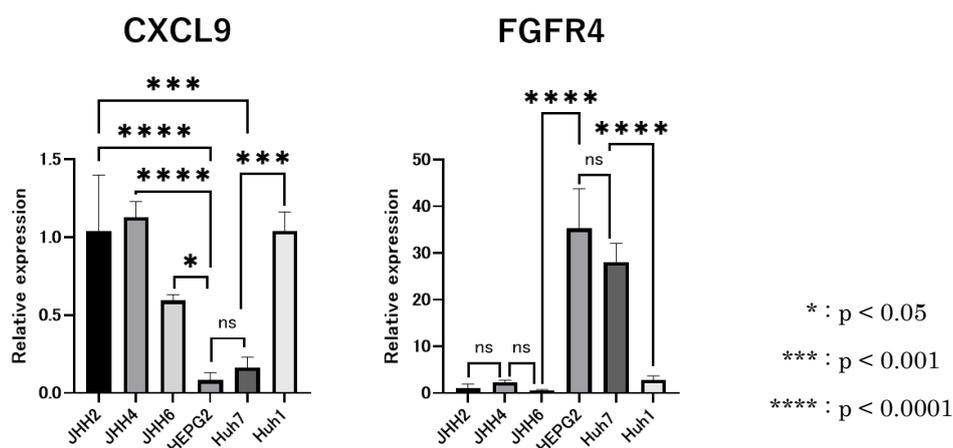
前述での TCGA の解析で認められた FGFR4 と CXCL9 の発現の関係を肝細胞癌株、肝細胞生検検体を用いて検討した。肝細胞癌の細胞株で qRT-PCR を行うと共に、腫瘍生検の検体を免疫染色により、FGFR4 と CXCL9 の発現を確認した。

### (1) ヒト肝癌細胞株における CXCL9 と FGFR4 遺伝子発現関連の検討

JHH2 細胞、JHH4 細胞、JHH6 細胞、HepG2 細胞、Huh1 細胞、Huh7 細胞の肝癌細胞株において、CXCL9 と FGFR4 発現を qRT-PCR にて測定 (内在性コントロールには GAPDH を選択) し、CXCL9、FGFR4 の発現比をピアソンの積率相関係数で解析した。

JHH2 を基準とした各肝癌細胞株の CXCL9 および FGFR4 の発現比を図 17A に示した。CXCL9 の発現は HepG2 と Huh7 細胞で低値、FGFR4 の発現は HepG2 と Huh7 細胞以外の細胞株で低値を示し、有意な差を認めた。これらの発現比を解析したところ図 17B で示す通り、両者の発現には強い負の相関を認めた ( $R^2 = 0.8041$ ,  $p = 0.0155$ )。

A.



B.

### CXCL9とFGFR4の相関

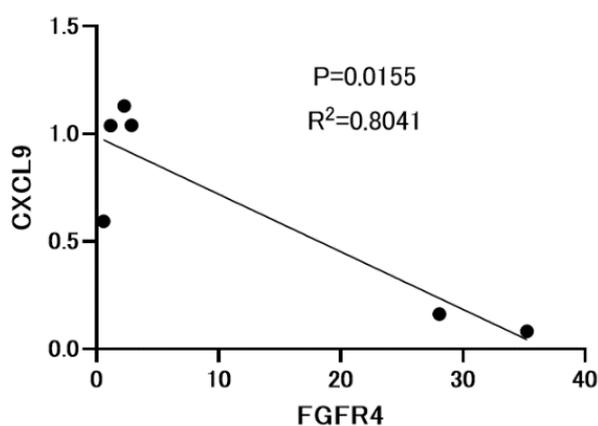


図 17. ヒト肝癌細胞株の CXCL9 と FGFR4 の発現

A. ヒト肝癌細胞株 (JHH2 細胞、JHH4 細胞、JHH6 細胞、HepG2 細胞、Huh1 細胞、Huh7 細胞) における CXCL9 と FGFR4 の発現レベルを qRT-PCR にて解析した。

B. 各ヒト肝癌細胞株における CXCL9 と FGFR4 の発現レベルを解析した。

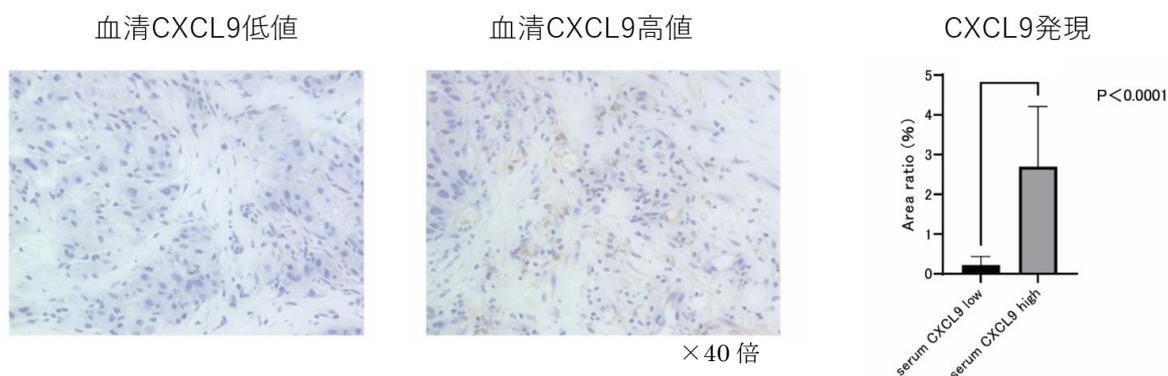
## (2) 肝細胞癌の生検検体の FGFR4 免疫染色

第一章で CXCL9、CD8 の免疫染色を実施した 2 症例を用いて FGFR4 と CXCL9 の発現について検討した。第一章では治療開始時の血清 CXCL9 が高い (1087.4pg/ml) 症例では、肝腫瘍内 CXCL9 の発現は高く、治療開始時の血清 CXCL9 が比較的低い (379.7pg/ml) 症例では CXCL9 の発現が低いことを明らかにした (図 14)。

これらの 2 症例の肝癌組織を用いて、抗ヒト CXCL9 抗体、抗ヒト FGFR4 抗体にて免疫染色 (それぞれ 50 倍希釈・室温 10 分、100 倍希釈・4℃一晩) し、比較を行った。各サンプルの切片上のランダムに 10 視野を写真撮影し(40 倍視野)、染色領域を腫瘍サンプルの全断面積から測定し、WinROOF デジタル画像解析装置を用いて百分率で表し比較した。

肝細胞癌の生検標本をヒト抗 FGFR4 抗体にて免疫染色した。代表的な写真を図 18 に示す。各サンプルの FGFR4 の発現は、血清 CXCL9 低値 (CXCL9 の発現が低い) 症例では血清 CXCL9 高値 (CXCL9 の発現が高い) 症例と比較し FGFR4 の発現が有意に高かった ( $p = 0.0197$ )。

## CXCL9 免疫染色



## FGFR4 免疫染色

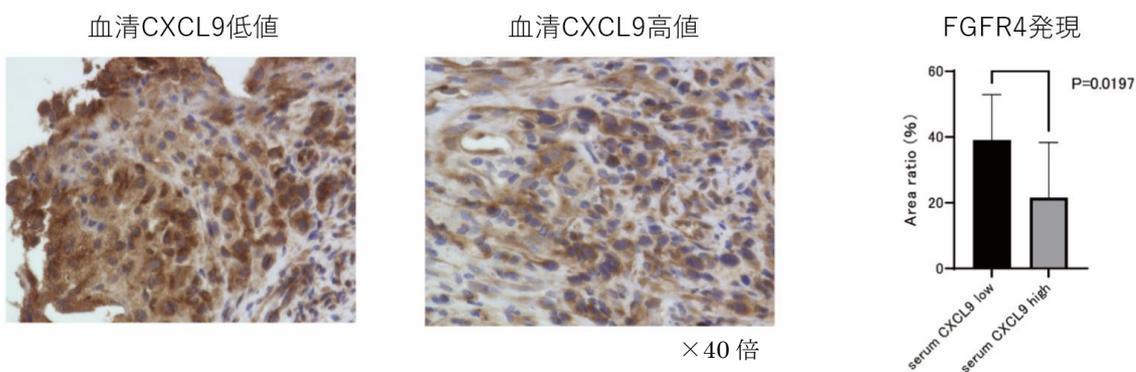


図 18. CXCL9 と FGFR4 の肝細胞癌における発現

腫瘍生検と血清サンプルを同時に採取した 2 症例を抗ヒト CXCL9 抗体、FGFR4 抗体で染色した。

### 3. FGFR4 ノックダウンによる CXCL9 の変化

前述の TCGA の解析および、ヒト肝癌細胞株の解析、肝細胞癌検体の免疫染色により FGFR4 と CXCL9 の発現には負の相関があることが示唆された。続いて肝細胞癌に対して FGFR4 をノックダウンすることにより CXCL9 の発現が変化するか検討した。特定の mRNA (messenger RNA) を分解させることで発現を抑制させる siRNA を用いて Huh7 細胞の FGFR4 のノックダウンを行った。

Huh7 細胞  $3 \times 10^5$ /well を 6 ウェルプレートに播種し、DMEM で一晚培養後に siRNA を Lipofectamine™ RNAi Max Reagents を用いてトランスフェクションした。siRNA トランスフェクション 48 時間後に細胞を回収し FGFR4

および CXCL9 の発現を qRT-PCR で分析し、siFGFR4 投与群と negative control siRNA 投与群の 2 群間で比較した。

siFGFR4 を投与した細胞はコントロールと比較して FGFR4 の発現が有意に低下 (図 19A ;  $p = 0.0042$ ) しており、FGFR4 をノックダウンした Huh7 細胞は CXCL9 の発現が有意に上昇することを認めた (図 19B ;  $p = 0.003$ )。

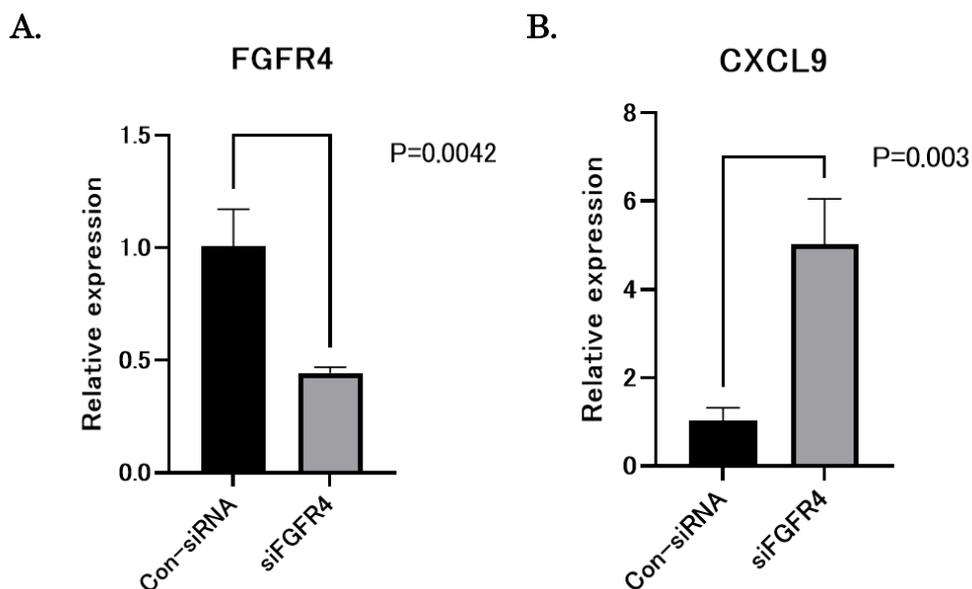


図 19. siRNA による FGFR4 のノックダウンと CXCL9 の発現変化

Huh7 細胞に発現する FGFR4 を siFGFR4 によってノックダウンし、negative control siRNA をコントロールとして FGFR4 および CXCL9 の発現レベルを qRT-PCR にて測定した。

#### 4. 肝細胞癌株に対するレンバチニブ添加

続いて、肝細胞癌株において FGFR4 を介するシグナル伝達を強く抑制するレンバチニブが、細胞内の CXCL9 の発現レベルおよび培養上清中の CXCL9 濃度に及ぼす影響を検討した。

Huh7 細胞  $3 \times 10^5$ /well を 6 ウェルプレートに播種し、DMEM で培養しレンバチニブ添加 72 時間後に細胞を回収し、レンバチニブ投与群とコントロール群で比較を行った。またレンバチニブ添加後の培養上清を添加直後、添加後 24 時間、48 時間、および 72 時間で CXCL9 濃度の変化を解析した。

レンバチニブを添加した Huh7 細胞はコントロールの細胞と比較し CXCL9 発現が上昇した (図 20A ;  $p < 0.0001$ )。また培養上清中の CXCL9 濃度は刺激開始後 48 時間、72 時間の培養上清においてレンバチニブが添加された Huh7 細胞はコントロールと比較し有意な CXCL9 の濃度上昇を認めた (図 20B ;  $p = 0.0044$ 、 $p = 0.0026$ )。

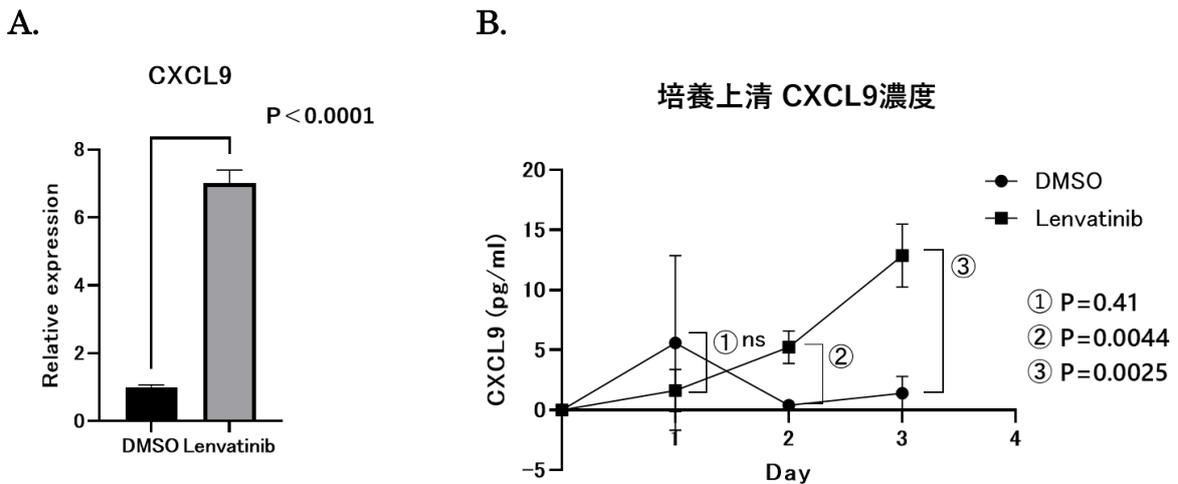


図 20. Huh7 細胞に対するレンバチニブ添加

A. Huh7 細胞をレンバチニブまたは DMSO を添加し、72 時間後に細胞を回収し CXCL9 の発現レベルを qRT-PCR で分析した。

B. レンバチニブまたは DMSO を添加した Huh7 の培養上清を添加時、添加後 24 時間、48 時間、および 72 時間後で回収し、培養上清中の CXCL9 濃度の変化を分析した。

## 5. 切除不能肝細胞癌患者におけるレンバチニブ治療後の血清 CXCL9

前述の結果から FGFR4 のシグナルは CXCL9 発現に抑制的に働き、レンバチニブは FGFR4 をブロックすることにより CXCL9 発現を正に制御しうる可能性が考えられた。そこで実際に切除不能肝細胞癌の患者においてレンバチニブ投与後に血清 CXCL9 の増加を認めるか検討した。

患者背景を表 6 に示す。症例は全 10 例でレンバチニブに対する OR (CR+PR) が得られた患者は 5 例、OR が得られなかった (SD+PD) 患者は 5 例であった。

全 10 例のレンバチニブ投与後の血清 CXCL9 の変化を図 21A に示す。血清 CXCL9 における治療開始時と治療開始後の比較では治療開始後 3 日目、7 日目いずれも有意な変化は認めなかった。

一方で、OR を認めた患者と OR を認めなかった患者で 7 日目での血清 CXCL9 の変化を比較した。その結果、治療開始時の血清 CXCL9 に有意差はなく、7 日目の血清 CXCL9 の変化率に有意差を認め、レンバチニブ治療後 OR を認めた患者は血清 CXCL9 の上昇値が有意に高かった (図 21B ; p = 0.0298)。

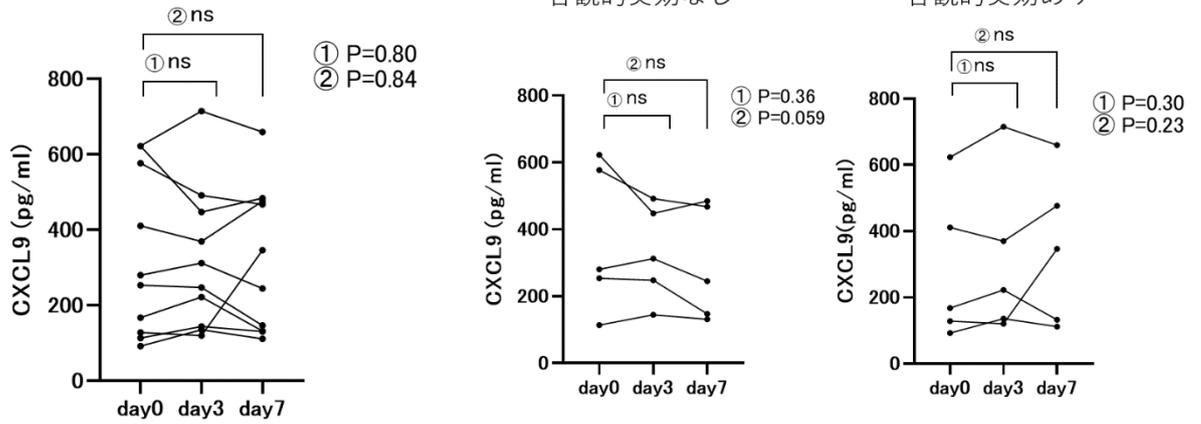
表 6. レンバチニブ治療 3・7 日目の血清が保存されていた 10 例の患者背景

	<b>All patients (n=10)</b>
Age (year) †	76(62-88)
Sex	
Male/Female	10/0
Etiology	
HBV/HCV/NBNC	3/2/5
Child-Pugh Grade	
A/B	7/3
AFP (ng/mL) †	17.7(2.0-229.5)
DCP (mAU/mL) †	193(13-195319)
Maximum intrahepatic tumor size (mm) †	31.5(18-164)
Number of hepatic tumors	
1/Multiple	2/8
BCLC stage	
B/C	4/6
Treatment response	
CR + PR/SD + PD	5/5

†Data are shown as median (range) values.

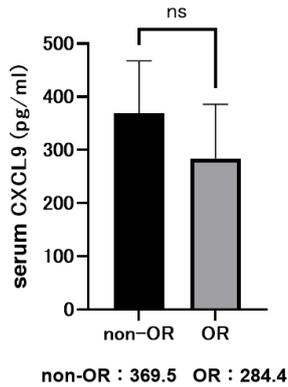
A.

レンバチニブ治療後  
血清CXCL9変化



B.

治療開始時の血清CXCL9



Delta CXCL9

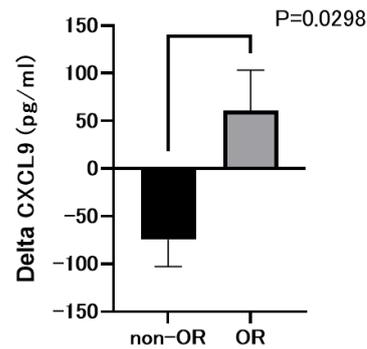


図 21. レンバチニブ投与時の血清 CXCL9 の変化

A. 切除不能肝細胞癌に対してレンバチニブ治療を行った 10 例の血清 CXCL9 の変化。

B. レンバチニブに対して OR を認めた症例と OR を認めなかった症例で血清 CXCL9 の変化を比較した。[Delta CXCL9 = (治療開始 7 日目の血清 CXCL9 値) - (治療開始時の血清 CXCL9 値)]

1-5 の解析により FGFR4 のシグナルと CXCL9 の発現には負の相関関係があることが示唆された。しかし、そのメカニズムについては解明されていない。

CXCL9 の転写活性には、IFN- $\gamma$  シグナルに加え、TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha) シグナルにより活性化される NF- $\kappa$ B の活性も共に必要であることが明らかにされている (Hiroi and Ohmori, 2003)。また、Drafahl らは、ヒト前立腺癌由来の DU145 細胞とヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞において TNF $\alpha$  により活性化された NF- $\kappa$ B シグナルが FGFR4 のシグナル伝達により負に制御されたことを報告している (Drafahl et al, 2010)。そこで、申請者は肝細胞癌においても FGFR4 のシグナルが NF- $\kappa$ B シグナル活性に対し抑制的に作用し、CXCL9 の発現を抑制するとの仮説をたてて、さらなる検討を行った。

## 6.肝細胞癌における NF- $\kappa$ B シグナル活性の変化と CXCL9 発現の変化

FGFR4 シグナルは NF- $\kappa$ B シグナルを負に制御することで CXCL9 の発現を抑制しているとの仮説を立て、検討を行った。NF- $\kappa$ B のシグナル活性をルシフェラーゼレポーターアッセイで測定し、NF- $\kappa$ B および FGFR4 のシグナルを活性化または阻害することで CXCL9 の発現に変化が認められるか検討を行った。

### 6-1. 薬剤による NF- $\kappa$ B 活性化、抑制化による CXCL9 の変化

肝細胞癌株 Huh7 細胞に NF- $\kappa$ B インヒビターである TPCA1、アクティベーターである PMA を添加し、Huh7 細胞の NF- $\kappa$ B 活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにて NF- $\kappa$ B 活性の変化、および qRT-PCR にて CXCL9 の変化を解析した。

図 22 で示すように TPCA1 を添加した Huh7 細胞はコントロールと比較し NF- $\kappa$ B 活性は大きく低下していた ( $p < 0.0001$ )。一方で、PMA を添加した Huh7 細胞は NF- $\kappa$ B 活性の有意な上昇を認めた ( $p < 0.0001$ )。また、図 23 で示す通り、NF- $\kappa$ B インヒビターである TPCA1 投与により有意な CXCL9 の発現が低下を認めた。また、NF- $\kappa$ B アクティベーターである PMA は有意に CXCL9 の発現を上昇させた。

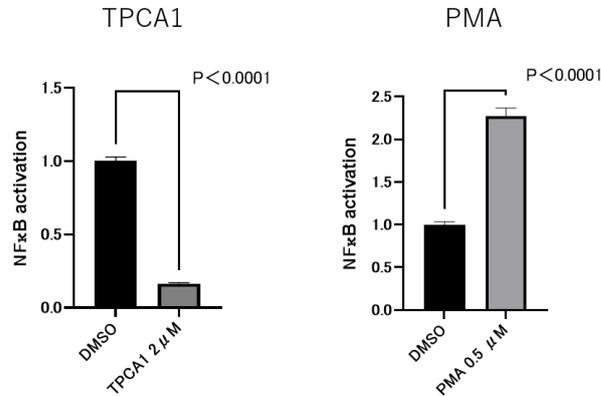


図 22. 肝細胞癌における NF-κB インヒビター、アクティベーター添加による NF-κB 活性の変化  
 TPCA1 により 24 時間刺激を受けた Huh7 細胞の NF-κB 活性を検討した。

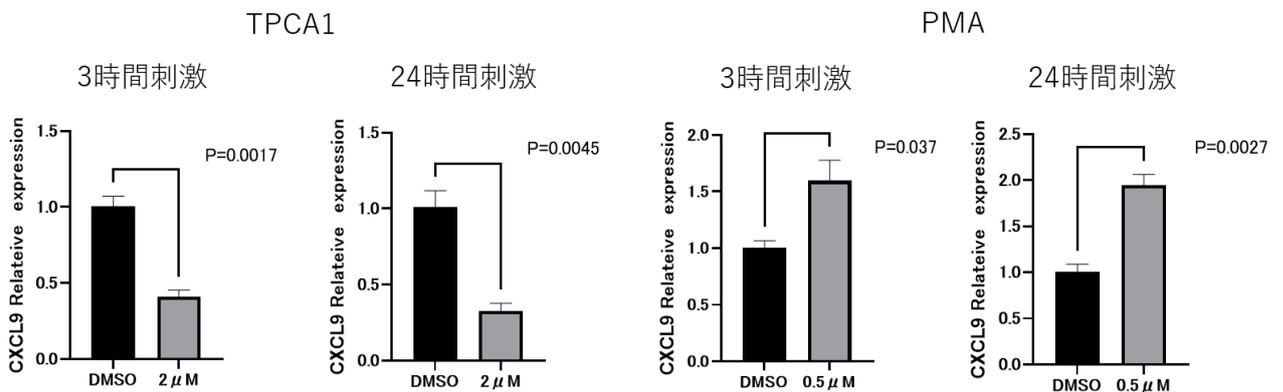


図 23. 肝細胞癌における NF-κB インヒビター、アクティベーター添加による CXCL9 発現レベルの変化  
 Huh7 細胞に DMSO, TPCA1, PMA で処理し、3 時間および 24 時間経過後、細胞を回収し qRT-PCR にて CXCL9 の発現を測定した。

### 6-2. レンバチニブ添加による NF-κB 活性の変化

上記の結果で、肝細胞癌における CXCL9 の発現は NF-κB 活性により変化することが示された。そこで、FGFR4 シグナルをブロックするレンバチニブによる NF-κB 活性の変化を解析した。Huh7 細胞にレンバチニブを添加した後に NF-κB の活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにて測定した。

図 24 で示す通り、レンバチニブを投与した Huh7 細胞はコントロールと比較して有意に NF- $\kappa$ B の活性が上昇していることを認めた ( $p = 0.0076$ )。

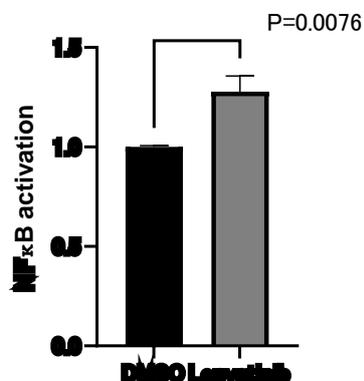


図 24. Huh7 細胞のレンバチニブ添加による NF- $\kappa$ B 活性の変化

Huh7 細胞に Renilla・NF- $\kappa$ B の plasmid DNA をトランスフェクションし、24 時間経過後に DMSO、レンバチニブを添加した。24 時間後にアッセイを行い NF- $\kappa$ B 活性を解析した。

### 6-3. FGF19 添加による NF- $\kappa$ B 活性の変化

前述の実験により FGFR4 をブロックするレンバチニブの添加は CXCL9 の発現、培養上清濃度の上昇だけでなく、NF- $\kappa$ B のシグナルを活性化することを明らかにした、続いて、FGFR4 のリガンドである FGF19 の添加による NF- $\kappa$ B 活性の変化を解析した。

①Huh7 細胞に対して FGF19 添加した後に、NF- $\kappa$ B 活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにて測定した。

Huh7 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、に FGF-19 (50 ng/ml, 100 ng/ml) および DMSO (0.1 %) を処理し、24 時間経過後にアッセイを行った。FGF19 の濃度、刺激時間は Drafaehl らの報告 (Drafaehl et al, 2010) を参考にして決定した。

図 25 で示す通り、FGF19 単体による添加では 50 ng/ml, 100 ng/ml 共に NF- $\kappa$ B 活性の変化を認めなかった ( $p = 0.75$ ,  $p = 0.07$ )。

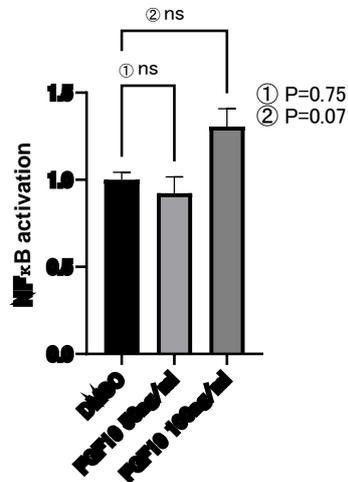


図 25. Huh7 細胞の FGF19 添加による NF-κB 活性の変化

Huh7 細胞に Renilla・NF-κB の plasmid DNA をトランスフェクションし、24 時間経過後に FGF-19 および DMSO を添加し、24 時間経過したところでアッセイを行い NF-κB 活性を解析した。

続いて Drafaahl らの報告 (Drafaahl et al, 2010) を参照し、TNFα により活性化した NF-κB 活性が FGF19 により抑制されるか検証した。

②最適な TNFα の濃度、刺激時間を決定するため Huh7 細胞に TNFα の濃度、刺激時間を複数処理し、NF-κB 活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにて測定した。

Huh7 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、TNFα (0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) およびコントロールとして DMSO (0.1 %) を処理し、3 時間および 24 時間経過後にアッセイを行った。

図 26 で示す通り、TNFα 添加後 3 時間では、いずれの濃度においても NF-κB 活性の上昇を認めなかった。一方で、TNFα 添加後 24 時間では 5 ng/ml, 10 ng/ml の濃度において NF-κB 活性の有意な上昇を認めた ( $p = 0.0019$ ,  $p = 0.0003$ )。

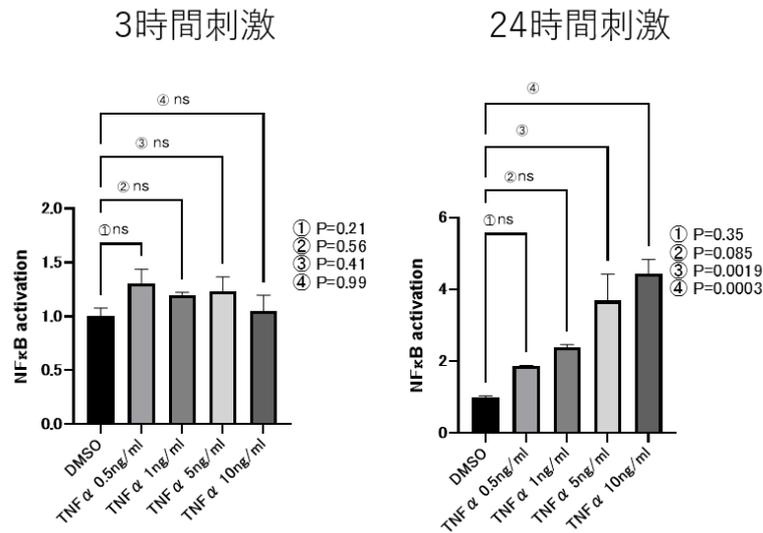


図 26. Huh7 細胞の TNF $\alpha$  添加による NF- $\kappa$ B 活性の変化

Huh7 細胞に Renilla・NF- $\kappa$ B の plasmid DNA をトランスフェクションし、24 時間経過後に TNF $\alpha$  および DMSO を添加し、3 時間および 24 時間経過後にアッセイを行い NF- $\kappa$ B 活性を解析した。

③続いて TNF $\alpha$  により活性化した NF- $\kappa$ B が FGF19 により抑制されるかを解析した。Huh7 細胞に TNF $\alpha$  および FGF19 の添加を行い NF- $\kappa$ B 活性の変化をルシフェラーゼレポーターアッセイにて解析した。

Huh7 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、TNF $\alpha$  (10 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml)+FGF19 (50 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml)+FGF19 (100 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml)+FGF19 (200 ng/ml)、および DMSO (0.1 %) を処理し、24 時間経過後にアッセイを行った。

図 27 で示す通り、TNF $\alpha$  添加により上昇した NF- $\kappa$ B 活性 ( $p < 0.0001$ ) は FGF19 100 ng/ml, 200 ng/ml の添加により抑制をされることを確認した ( $p = 0.022$ ,  $p = 0.0028$ )。

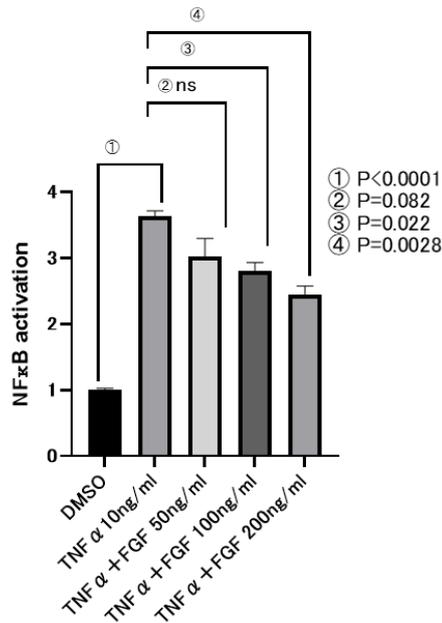


図 27. Huh7 細胞の TNF $\alpha$ +FGF19 添加による NF- $\kappa$ B 活性の変化  
 Huh7 細胞に Renilla・NF- $\kappa$ B の plasmid DNA をトランスフェクションし、24 時間経過後に DMSO, TNF $\alpha$  および TNF $\alpha$ +FGF19 を添加し、24 時間経過後にアッセイを行い NF- $\kappa$ B 活性を解析した。

## 考察

第一章において血清 CXCL9 が低い切除不能肝細胞癌の患者でレンバチニブが良好な奏効を認めた原因を明らかにするため、CXCL9 の発現とレンバチニブの治療ターゲットとなる分子に何らかの関連があり、レンバチニブがそのシグナル伝達経路を抑制している可能性があるとして仮説を立て検討を行った。まず、TCGA のヒト肝細胞癌の遺伝子データベースの解析で FGFR4 と CXCL9 の発現に負の関係性があることが認められた。肝細胞癌において FGFR4 の高発現がレンバチニブの治療効果良好と関連することが報告されている (Yamauchi et al, 2020) ため、さらなる検討を行った。ヒト肝癌細胞株と肝細胞癌の針生検検体の検討においても、同様に FGFR4 と CXCL9 の発現は負の相関関係を認めた。そこで、FGFR4 と CXCL9 の発現に直接的な関連があるかを検討するため、Huh7 細胞の FGFR4 を siRNA でノックダウンし、CXCL9 の発現レベルの変化を解析した。その結果、FGFR4 をノックダウンす

ることで細胞の CXCL9 発現が増加することが確認され、FGFR4 の発現と CXCL9 の発現に直接的な関連があることが明らかになった。

また、FGFR4 シグナルを強く阻害するレンバチニブを Huh7 細胞に添加した結果、細胞内の CXCL9 の発現が上昇し、培養上清中の CXCL9 濃度上昇が認められた。そこで臨床検体を用いた検討として切除不能肝細胞癌患者 10 例を対象にレンバチニブ投与開始後から血清 CXCL9 の変化を解析したところ、OR を認めた症例で、OR を認めなかった症例と比較し有意な血清 CXCL9 の上昇が確認された。以上の結果より、切除不能肝細胞癌の血清 CXCL9 低値症例において、レンバチニブの治療反応性良好の指標となる FGFR4 が高発現している事が、レンバチニブ治療に対する良好な治療反応性と関連していると想定された。

Yamauchi らは、肝細胞癌において FGFR4 の高発現がレンバチニブの治療効果良好と関連する事を報告している (Yamauchi et al, 2020) が、今回の結果からレンバチニブが奏効を示しやすい FGFR4 高発現の肝細胞癌患者ではリンパ球の腫瘍内遊走を促す CXCL9 が負に制御されており、免疫活性が低くなっている可能性が想定された。このことは、第一章において血清 CXCL9 が低い症例においてアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法で早期 PD を認めやすく、レンバチニブ治療で良好な治療効果が得られた原因となる可能性が考慮された。しかし、FGFR4 のシグナルが CXCL9 発現を抑制する機序については未だ十分に明らかになっていない。そこで、申請者はさらなる検討を行った。

CXCL9 の転写活性には IFN- $\gamma$  シグナルに加え、TNF $\alpha$  シグナルにより活性化される NF- $\kappa$ B の活性も共に必要であることが明らかにされている (Hiroi and Ohmori, 2003)。

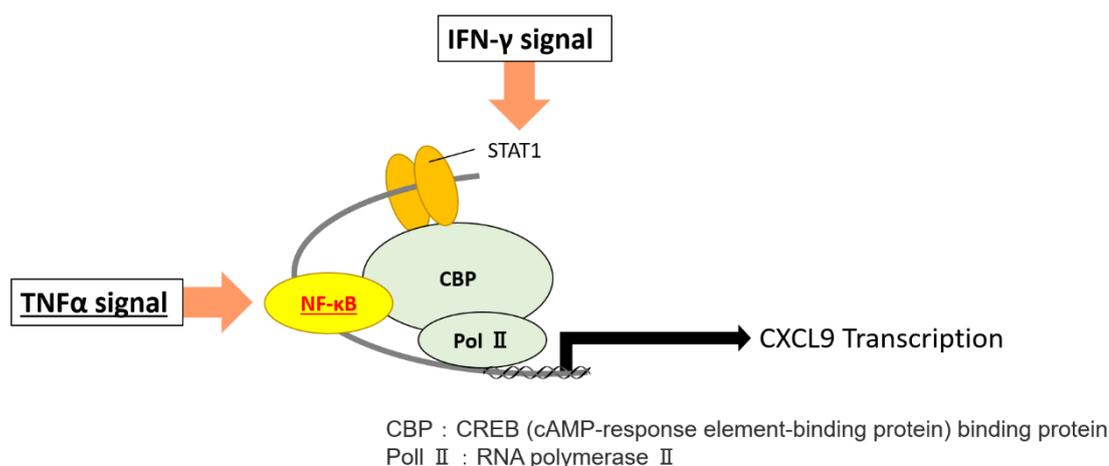


図 28. CXCL9 の転写活性 (Hiroi and Ohmori, 2005 より引用)

NF- $\kappa$ B は Rel ファミリーに属する p65 (Rel-A), p50, p52, c-Rel および Rel-B から構成される転写因子である (Chen, 2005)。NF- $\kappa$ B のホモまたはヘテロ二量体は核内に移行することによって様々な細胞が活性化、増殖、成熟する際に重要な種々の遺伝子の転写を促す。TNF $\alpha$  を含む様々な内因性の傷害関連分子によって NF- $\kappa$ B 経路を経てマクロファージが活性化し、TNF $\alpha$ 、IL (interleukin) -1、IL-6、IL-12 などの遺伝子の転写が NF- $\kappa$ B に依存して起こり、これらの炎症性サイトカインを放出するとされる (Lawrence et al, 2005)。普段 NF- $\kappa$ B は I $\kappa$ B (I kappa B) に結合する形で不活化されているが、TNF $\alpha$  シグナルなどにより誘導された IKK (I kappa B kinase) 複合体が活性化されることで I $\kappa$ B のリン酸化、ユビキチン化を引き起こし I $\kappa$ B が NF- $\kappa$ B から外れ、NF- $\kappa$ B の活性化が起こるとされる (Hiroi and Ohmori, 2005) (図 29)。

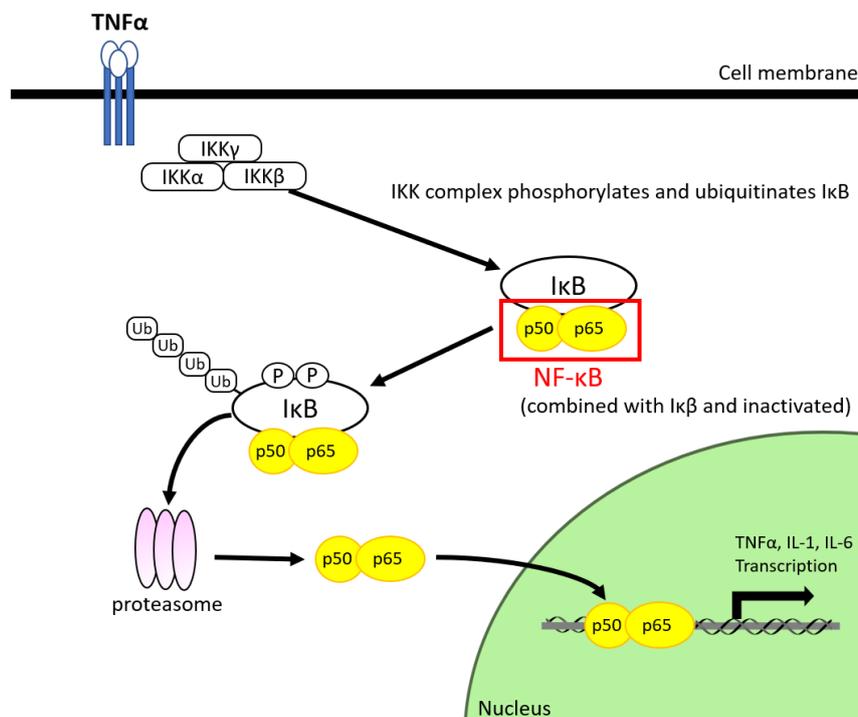


図 29. TNF $\alpha$  シグナルによる NF- $\kappa$ B 活性 (Hiroi and Ohmori, 2005 より引用)

過去に Drafaahl ら (Drafaahl et al, 2010) は、ヒト前立腺癌由来の DU145 細胞、胎児腎細胞由来の HEK293 細胞において FGFR4 シグナルが IKK をチロシンリン酸化し、TNF $\alpha$  により活性化された NF- $\kappa$ B を抑制することを報告している。

そこで、肝細胞癌株である Huh7 細胞においても FGFR4 シグナルが NF-κB シグナルを負に制御し、CXCL9 の発現を抑制していると仮説をたて、追加の検証を行った。

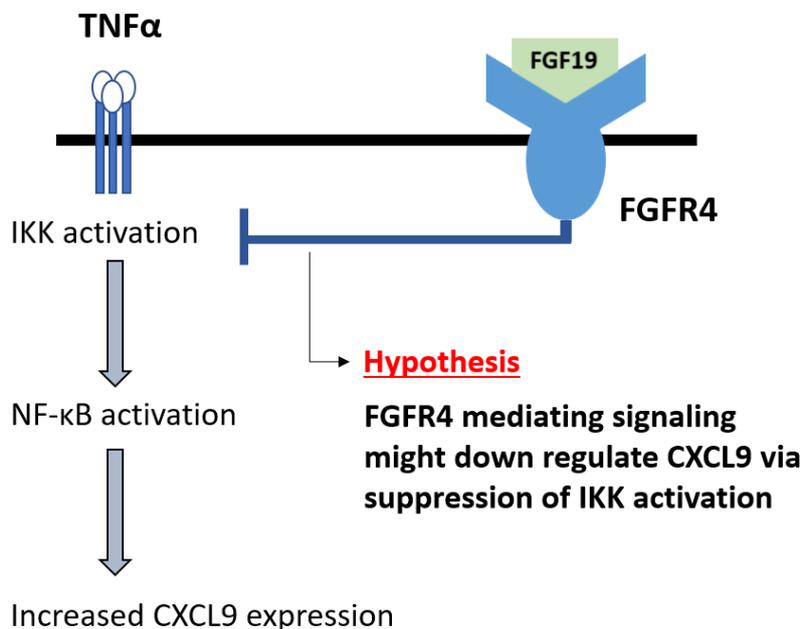


図 30. FGFR4 シグナルが NF-κB を介し CXCL9 発現を抑制する (仮説)

まず Huh7 細胞に対して、NF-κB 活性を変化させる薬剤を添加し、CXCL9 発現に変化を認めるかを検討した。その結果、NF-κB の活性化は CXCL9 の発現を上昇させ、NF-κB の抑制は CXCL9 の発現を低下させた。これらの結果は、DU145 細胞、HEK293 細胞における既報の通り肝細胞癌においても CXCL9 の発現は NF-κB の活性により一部が制御されることを示している。続いて FGFR4 のシグナルが NF-κB を抑制的に働くかを検討した。FGFR1-4 をブロックするレンバチニブを Huh7 細胞に添加した結果、NF-κB の活性は有意に上昇することを認めた。続いて FGFR4 のリガンドである FGF19 を投与した結果、FGF19 単体では NF-κB 活性を変化させることはなかったが、TNFα により活性化された NF-κB 活性は FGF19 の添加により抑制を受けた。

これらの結果より FGF19 により活性化された FGFR4 のシグナルは NF-κB に抑制的に働き、CXCL9 の発現を低下させた可能性が考えられた。

一方で今後は、他肝癌細胞株を用いた validation 等を含めさらなる検討が必要となると考えられた。

## 結論

①本研究において、以下の知見が得られた。

- ・切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において、治療開始時の血清 CXCL9 低値は早期 PD の予測因子となる。
- ・CXCL9 は腫瘍へ CD8 陽性 T 細胞を誘導するケモカインとされ、肝癌に対しても免疫チェックポイント阻害剤の反応性を規定する事が考えられた。
- ・一方で、切除不能肝細胞癌に対するレンバチニブ治療においては、治療開始時の血清 CXCL9 低値症例ではアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法とは逆に、良好な奏効が得られた。
- ・メカニズム解析により、レンバチニブ治療の奏効と関連する FGFR4 を介したシグナルが CXCL9 の発現を抑制する事を明らかにした。

②新知見の意義

本研究の新知見から、切除不能肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法において、治療開始時の血清 CXCL9 低値症例では治療開始後早期において病状が悪化する可能性があり、慎重な経過観察が求められる。またアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法の代替治療としてはレンバチニブが有用となる可能性を示した。

③新知見からの今後の研究の展開

本研究に含まれる患者数・観察期間は比較的限定されており、結果のさらなる検討のため、全国の多施設から症例を集積し大規模な解析を現在行っている。

④今後の課題

第一章において *CTNNB1* の変異が ICI 治療の予後不良因子となる既報に基づき ctDNA の遺伝子変化を解析したが、8 例の検討では早期 PD 症例に有意な遺伝子変化は観察されなかった。より多くの症例数での遺伝子解析は今後の課題となる。第二章において FGFR4 のシグナルが CXCL9 の発現を抑制するメカニズムについては現在も検討中である。今後、ウェスタンブロットでの検証や、FGFR4 のノックアウト、FGFR4 を特異的に阻害する薬剤を用いたさらなる検討が必要と考える。

## 謝 辞

先ず、本研究にご協力頂いた全ての患者様とそのご家族に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究に対する心構えや信念、実験方法、データ解釈、論文作成など、様々な面において御指導・御援助頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室講師 須田剛生先生には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

また、臨床における技術指導にご尽力頂きました北海道大学病院消化器内科肝臓グループの諸先生方、および検体の採取にご協力頂きましたNORTE study groupおよび全国多施設の先生方に、心より深く感謝申し上げます。

2024年3月

細田 峻一

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Beenken A, and Mohammadi, M (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 235-253.

Chan SL (2021) Hyperprogression in hepatocellular carcinoma: Illusion or reality? *J Hepatol* 74, 269-271.

Chen DS, and Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1-10.

Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7, 758-765.

Drafahl KA, McAndrew CW, Meyer AN, Haas M, and Donoghue DJ (2010) The receptor tyrosine kinase FGFR4 negatively regulates NF-kappaB signaling. *PLoS One* 5, e14412.

Ducreux M, Zhu AX, Cheng AL, Galle PR, Ikeda M, Nicholas A (2021) IMbrave150: Exploratory analysis to examine the association between treatment response and overall survival (OS) in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) treated with atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) versus sorafenib (sor). *Journal of Clinical Oncology* 39(15\_suppl):4071-1.

Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, et al (2020) Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 382, 1894-1905.

Fujimura T, Sato Y, Tanita K, Lyu C, Kambayashi Y, Amagai R, Otsuka A, Fujisawa Y, Yoshino K, Matsushita S, et al (2019) Association of Baseline Serum Levels of CXCL5 With the Efficacy of Nivolumab in Advanced Melanoma. *Front Med (Lausanne)* 6, 86.

Gorbachev AV, Kobayashi H, Kudo D, Tannenbaum CS, Finke JH, Shu S, Farber JM, and Fairchild RL (2007) CXC chemokine ligand 9/monokine induced by IFN-gamma production by tumor cells is critical for T cell-mediated suppression of cutaneous tumors. *J Immunol* 178, 2278-2286.

Harding JJ, Nandakumar S, Armenia J, Khalil DN, Albano M, Ly M, Shia J, Hechtman JF, Kundra R, et al (2019) Prospective Genotyping of Hepatocellular Carcinoma: Clinical Implications of Next-Generation Sequencing for Matching Patients to Targeted and Immune Therapies. *Clin Cancer Res* 25, 2116-2126.

Hiroi M, and Ohmori Y (2003) The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *J Biol Chem* 278, 651-660.

Hiroi M, and Ohmori Y (2005) Transcriptional Synergism between NF- $\kappa$ B and STAT1. *J. Oral Biosci* 47(3), 230-242.

House IG, Savas P, Lai J, Chen AXY, Oliver AJ, Teo ZL, Todd KL, Henderson MA, Giuffrida L, Petley EV, et al (2020) Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade. *Clin Cancer Res* 26, 487-504.

Ishikura N, Sugimoto M, Yorozu K, Kurasawa M, and Kondoh O (2022). Anti-VEGF antibody triggers the effect of anti-PD-L1 antibody in PD-L1(low) and immune desert-like mouse tumors. *Oncol Rep*, 47.

Iwai T, Sugimoto M, Patil NS, Bower D, Suzuki M, Kato C, Yorozu K, Kurasawa M, Shames DS, and Kondoh O, et al (2021) Both T cell priming in lymph node and CXCR3-dependent migration are the key events for predicting the response of atezolizumab. *Sci Rep* 11, 13912.

Kim CG, Kim C, Yoon SE, Kim KH, Choi SJ, Kang B, Kim HR, Park SH, Shin EC, Kim YY, et al (2021) Hyperprogressive disease during PD-1

blockade in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 74, 350-359.

Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park JW, Han G, Jassem J, et al (2018) Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 391, 1163-1173.

Kudo M (2022) Combination Immunotherapy with Anti-PD-1/PD-L1 Antibody plus Anti-VEGF Antibody May Promote Cytotoxic T Lymphocyte Infiltration in Hepatocellular Carcinoma, Including in the Noninflamed Subclass. *Liver Cancer* 11, 185-191.

Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, and Karin M (2005) IKK $\alpha$  limits macrophage NF- $\kappa$ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138-1143.

Lencioni R, and Llovet JM (2010) Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 30, 52-60.

Litchfield K, Reading JL, Puttick C, Thakkar K, Abbosh C, Bentham R, Watkins TBK, Rosenthal R, Biswas D, Rowan A (2021) Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell* 184, 596-614 e14.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, et al (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359, 378-390.

Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, Maini MK, Mazzaferro V, Pinato DJ, Pikarsky E, Zhu AX, and Finn RS (2022) Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 19, 151-172.

Marcovecchio PM, Thomas G, and Salek-Ardakani S (2021) CXCL9-expressing tumor-associated macrophages: new players in the fight against cancer. *J Immunother Cancer*, 9.

Matsuki M, Hoshi T, Yamamoto Y, Ikemori-Kawada M, Minoshima Y, Funahashi Y, and Matsui J (2018) Lenvatinib inhibits angiogenesis and tumor fibroblast growth factor signaling pathways in human hepatocellular carcinoma models. *Cancer Med* 7, 2641-2653.

Mlynska A, Salciuniene G, Zilionyte K, Garberyste S, Strioga M, Intaite B, Barakauskiene A, Lazzari G, Dobrovolskiene N, Krasko J A, et al (2019) Chemokine profiling in serum from patients with ovarian cancer reveals candidate biomarkers for recurrence and immune infiltration. *Oncol Rep* 41, 1238-1252.

Montironi C, Castet F, Haber PK, Pinyol R, Torres-Martin M, Torrens L, Mesropian A, Wang H, Puigvehi M, and Maeda M (2023) Inflamed and non-inflamed classes of HCC: a revised immunogenomic classification. *Gut* 72, 129-140.

Nakamura Y (2019) Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Tumor Response and Adverse Events. *Front Med (Lausanne)* 6, 119.

Raja A, Park I, Haq F, and Ahn SM (2019) FGF19- FGFR4 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cells* 8, 536.

Rimassa L, Finn RS and Sangro B (2023) Combination immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 79, 506-515.

Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sanchez P, Lindblad KE, Maier B, Sia D, Puigvehi M, Miguela V, Casanova-Acebes M, Dhainaut M, et al (2019) beta-Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Discov* 9, 1124-1141.

Shigesawa T, Suda G, Kimura M, Shimazaki T, Maehara O, Yamada R, Kitagataya T, Suzuki K, Nakamura A, Sakamoto N, et al (2020) Tumor Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Level Predicts the Efficacy of Lenvatinib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clin Transl Gastroenterol* 11, e00179.

Shigesawa T, Maehara O, Suda G, Natsuizaka M, Kimura M, Shimazaki T, Yamamoto K, Yamada R, Kitagataya T, Sakamoto N, et al (2021) Lenvatinib suppresses cancer stem-like cells in HCC by inhibiting FGFR1-3 signaling, but not FGFR4 signaling. *Carcinogenesis* 42, 58-69.

Sho T, Suda G, Ogawa K, Kimura M, Kubo A, Tokuchi Y, Kitagataya T, Maehara O, Ohnishi S, Shigesawa T, Sakamoto N, et al (2021) Early response and safety of atezolizumab plus bevacizumab for unresectable hepatocellular carcinoma in patients who do not meet IMbrave150 eligibility criteria. *Hepatol Res* 51, 979-989.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, and Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209-249.

Von Felden J, Craig AJ, Garcia-Lezana T, Labgaa I, Haber PK, D'Avola D, Asgharpour A, Dieterich D, Bonaccorso A, Torres-Martin M, et al (2021) Mutations in circulating tumor DNA predict primary resistance to systemic therapies in advanced hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 40, 140-151.

Yamauchi M, Ono A, Ishikawa A, Kodama K, Uchikawa S, Hatooka H, Zhang P, Teraoka Y, Morio K, Fujino H, et al (2020) Tumor Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Level Predicts the Efficacy of Lenvatinib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clin Transl Gastroenterol* 11, e00179.

厚生労働省（統計・情報政策担当）（2018年）平成30年 我が国の人口動態，平成28年までの動向。In 厚生労働省，<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/81-1a2.pdf>（2023年10月1日参照）

日本肝臓学会（2021年）肝癌診療ガイドライン 2021年版 薬物療法アルゴリズム 2023年変更。In 一般社団法人 日本肝臓学会，[https://www.jsh.or.jp/lib/files/medical/guidelines/jsh\\_guidelines/medical/guideline\\_jp\\_2021\\_cq39\\_algorithm.pdf](https://www.jsh.or.jp/lib/files/medical/guidelines/jsh_guidelines/medical/guideline_jp_2021_cq39_algorithm.pdf)（2023年10月1日参照）