

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07953

研究課題名（和文）肝癌幹細胞の維持・免疫寛容機構の解明と治療最適化の検討

研究課題名（英文）Elucidation of Maintenance and Immune Tolerance Mechanisms in hepatocellular carcinoma Stem Cells and Optimization of Therapeutic Approaches

研究代表者

庄 拓也（Sho, Takuya）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50581104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、肝癌治療の多施設共同臨床研究を行い臨床検体を取得しつつ、肝癌の難治性の一因として肝癌幹細胞（CSC）が関与するとの仮説で、肝癌幹細胞の研究を行った。FGFシグナルの中で特に肝癌CSC維持にFGFR1-3シグナルが重要であることを明らかにした。更に、肝癌の腫瘍免疫寛容機構を検討し、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の治療抵抗性と関連する分子としてCXCL9を同定し報告した。CXCL9の発現はFGFR4の発現と負の相関がある事、その機構としてFGFR4を介したNF- $\kappa$ Bへの影響が関連する事を報告した。これら知見は現在主流の肝癌に対するICIを含む治療の最適化の基盤となる知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌幹細胞を主軸とした基礎研究とともに肝癌治療の多施設共同臨床研究を行い基礎的、臨床的な視点で治療最適化の検討を行った。現在肝癌に対する治療の主軸となる、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の治療抵抗性と関連する分子としてCXCL9を同定し報告した。CXCL9の発現はFGFR4の発現と負の相関がある事、その機構としてFGFR4を介したNF- $\kappa$ Bへの影響が関連する事を報告した。CXCL9は分泌蛋白で、あり腫瘍環境におけるCXCL9発現を血清のバイオマーカーとして同定可能である事も明らかにした。これらは、ICI治療を行う際の簡易的な指標となりえるもので肝癌治療最適化の基盤的な知見となる。

研究成果の概要（英文）：The principal investigators conducted a multi-center collaborative clinical study on liver cancer treatment, obtaining clinical specimens and researching liver cancer stem cells (CSCs) under the hypothesis that CSCs contribute to the refractory nature of liver cancer. They clarified that FGFR1-3 signaling, particularly within the FGF signaling pathway, is crucial for maintaining liver cancer CSCs. Furthermore, they investigated the tumor immune tolerance mechanisms in liver cancer and identified CXCL9 as a molecule associated with therapeutic resistance to immune checkpoint inhibitors (ICIs). They reported that CXCL9 expression is negatively correlated with FGFR4 expression and that this relationship is linked to FGFR4-mediated effects on NF- $\kappa$ B. These findings provide fundamental insights for optimizing current mainstream treatments for liver cancer, including ICIs.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌 癌幹細胞 免疫チェックポイント阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

世界における肝がん死亡数は年間約 80 万人で、がん関連死亡原因の第 2 位と公衆衛生上、大きな問題となる。近年の肝臓に対する治療の進歩にも関わらず、非切除進行肝臓癌の予後は未だに不良である。癌幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、癌組織を再構築させる能力を維持する細胞と考えられている。癌再発には、抗癌剤抵抗性の癌幹細胞が関与し、抗癌剤治療にても残存した癌幹細胞が再び腫瘍構成細胞を供給し腫瘍再発を来すと考えられる。そのため癌幹細胞は、腫瘍の再発転移、抗がん剤治療に関して非常に重要な役割を担い、重要な治療標的となる。近年、各臓器癌に癌幹細胞の存在とその表面マーカーが同定され、肝細胞癌でも癌幹細胞 (CSCs) の存在を研究代表者らを含め複数のグループが報告している (文献 2.4)。研究代表者らは、CD44<sup>high</sup>/CD133<sup>high</sup> 発現細胞が肝臓癌における高い腫瘍形成能、抗がん剤耐性など CSCs の特徴を有する事を明らかにし、肝臓癌幹細胞の維持に転写因子の KLF5 が重要な役割を担っている事を明らかにした。更に KLF5 を恒常発現する肝臓癌細胞株 (KLF5KR 細胞株) を樹立し、多数の CSCs がその細胞株では存在する事を明らかにした。長らく肝細胞癌に対し、唯一の全身化学療法であった multikinase 阻害剤 (TKI) の sorafenib に加え、TKI である lenvatinib が REFLECT 試験で、sorafenib に対する overall survival の非劣勢、progression free survival (PFS) の有意な延長を示した。研究代表者らは、症例背景が多岐にわたる実臨床においても、lenvatinib の進行肝臓癌に対する有効性を報告してきた。しかしながら、sorafenib に比して lenvatinib が treatment response が良好、PFS 延長させる機序は不明であった。我々は、sorafenib と lenvatinib の肝臓癌 CSCs に対する作用の違いがその原因の一つであるとの仮説を立て、検討を行った。すなわち、sorafenib, Lenvatinib の KLF5KR 細胞株への作用の違いを in vitro, in vivo xenotransplantation model での検討を行い、その機序を検討し 1) sorafenib, Lenvatinib, 殺細胞抗がん剤; 5-FU のうち、lenvatinib のみが強く肝臓癌 CSCs 抑制効果を有する事が、in vitro, in vivo xenotransplantation model の検討で明らかになった。その機序の一旦に FGF を介した経路が関与する可能性を報告した。

近年、この CSCs が、腫瘍免疫寛容機構を有している可能性が報告されつつあるが肝臓癌 CSCs の腫瘍免疫寛容機構の詳細は未知である。また、2020 年 10 月、免疫チェックポイント阻害剤であるアテゾリズマブと抗 VEGF 抗体薬であるアバスタチンが IMbrave150 試験の結果をうけ認可された。しかしこれらの薬剤の肝臓癌 CSCs に対する効果・耐性化機構も十分には明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) そこで、研究代表者グループがこれまでに明らかにした知見を進展させ肝臓癌・肝臓癌幹細胞の腫瘍免疫寛容機構を明らかにし肝臓癌・肝臓癌幹細胞をターゲットとした免疫チェックポイント阻害剤治療最適化を検討する。これら知見より、未だ難治性・致死率の高い肝臓癌の予後改善へと貢献しうる最適な治療法開発の萌芽とする事を目的とする。

### 3 . 研究の方法

(1)研究代表者らが明らかにした、肝癌幹細胞維持に重要な KLF5 を恒常発現する肝癌細胞株(KLF5KR 細胞株)を樹立し、同細胞を用いて in vitro, in vivo xenograft モデルを用いて CSCs の維持に重要な FGF シグナルを詳細に検討する。

(2)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 例を検討。探索研究として 68 例の中で cfDNA 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 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 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。

(3)TCGA 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、肝癌細胞癌株である Huh7 細胞の FGFR4 を siRNA 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。

### 4 . 研究成果

(1)研究代表者らは、CD44<sup>high</sup>/CD133<sup>high</sup> 発現細胞が肝がんにおける高い腫瘍形成能、抗がん剤耐性など CSCs の特徴を有する事を明らかにし、肝癌幹細胞の維持に転写因子の KLF5 が重要な役割を担っている事を明らかにした。更に KLF5 を恒常発現する肝癌細胞株(KLF5KR 細胞株)を樹立し、多数の CSCs がその細胞株では存在する事を明らかにした。

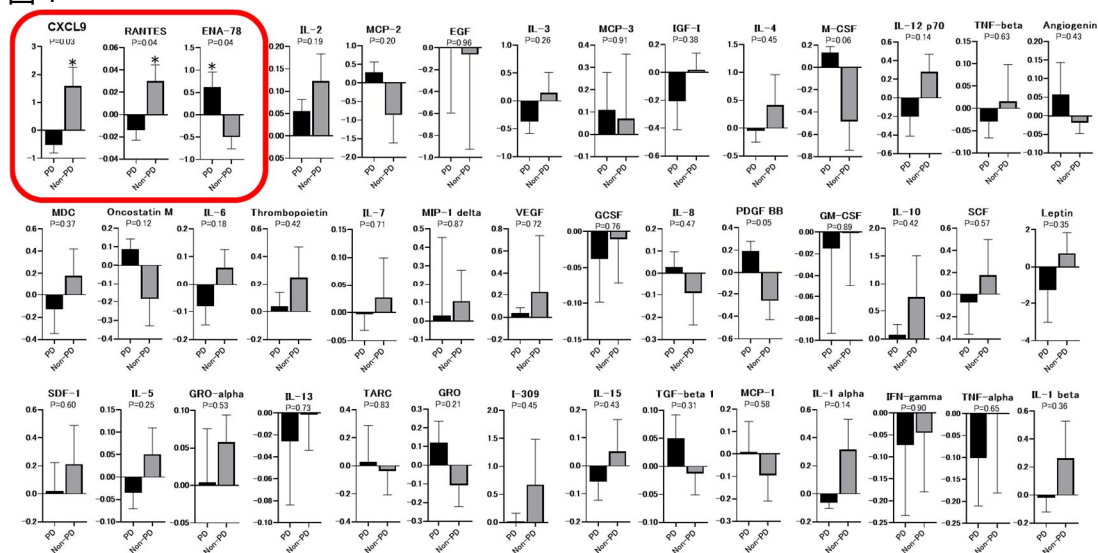
長らく肝細胞癌に対し、唯一の全身化学療法であった multikinase 阻害剤 (TKI) の sorafenib に加え、TKI である lenvatinib が REFLECT 試験で、sorafenib に対する overall survival の非劣勢、progression free survival (PFS)の有意な延長を示した。研究代表者らは、症例背景が多岐にわたる実臨床においても、lenvatinib の進行肝癌に対する有効性を報告してきた(文献 1)。しかしながら、sorafenib に比して lenvatinib が treatment response が良好、PFS 延長させる機序は不明であった。

我々は、sorafenib と lenvatinib の肝癌 CSCs に対する作用の違いがその原因の一つであるとの仮説を立て、検討を行った。すなわち、sorafenib, Lenvatinib の KLF5KR 細胞株への作用の違いを in vitro, in vivo xenotransplantation model での検討を行い、その機序を検討

し 1) sorafenib, Lenvatinib, 殺細胞抗がん剤; 5-FU のうち、lenvatinib のみが強く肝がん CSCs 抑制効果を有する事が、in vitro, in vivo xenotransplantation model の検討で明らかになった。その詳細な機序を検討し、FGFR4 を介したシグナルではなく FGFR1-3 を介したシグナルが肝癌 CSCs の維持に重要となる事を明らかにした。

(2) 研究代表者は、現在、肝がんに対する標準治療である抗 PD-1 抗体薬、VEGF-A 阻害剤併用療法であるアテゾリズマブ・ベバシツマブ併用療法の治療不応と関連する因子を検索し、

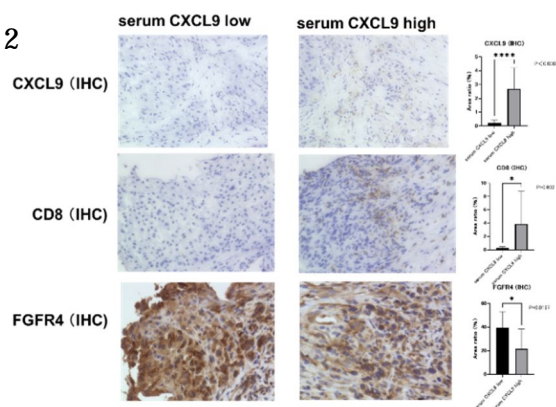
図 1 血清 CXCL-9 値低値が治療不応と関与する事を明らかにした。(図 1)



血清中の CXCL9 は、細胞障害性 T 細胞 (CD8 陽性 T 細胞) を腫瘍内にリクルートする上で重要なケモカインである事が報告されている。そこで、腫瘍生検が行われた症例で免疫染色を行うと血清 CXCL9 低値例では腫瘍内の CXCL9 発現は有意に低く、CXCL-9 発現低発現 HCC では CD8T 細胞の浸潤が有意に低く Immune Cold の状態だった。(図 2)

すなわち、血清 CXCL9 値により HCC の腫瘍免疫状態を予測できる可能性が示唆された。しかしながら、その詳細な機構は未だ十分に明らかとなっていない。ICI 治療前に CXCL9 低値例において、CXCL9 を上昇させ腫瘍免疫を活性化し ICI 治療応答性を改善する方法が明らかになれば肝癌に対する ICI 治療反応性が飛躍的に改善しうる。

図 2



(3) 他方で、肝癌に対する multikinase 阻害剤 (TKI) で

ある lenvatinib 治療では、アテゾリズマブ・ベバシツマブ併用療法とは全く逆に、血清 CXCL9 低値で治療効果が良好であった。その機序を明らかにする為に行った予備的な検討では、CTGA データベースでの検討では CXCL9 発現の低い肝癌では FGFR4 の発現が上昇していた。更に多種の肝癌 cell line で検討を行うと、CXCL9 と FGFR4 の発現は逆相関をしている事、siRNA で FGFR4 を slicing すると CXCL9 が上昇する事、FGFR4 阻害剤であるレンバチニブを投与すると CXCL9 が上昇する事を明らかにした。(Hosoda, Sho, et al., Liver Cancer 2023)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Rimini Margherita, Sho Takuya et al.,	4. 巻 149
2. 論文標題 Survival outcomes from atezolizumab plus bevacizumab versus Lenvatinib in Child Pugh B unresectable hepatocellular carcinoma patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 7565 ~ 7577.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-023-04678-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokuchi Yoshimasa, Sho Takuya et al.,	4. 巻 53
2. 論文標題 Hepatitis C virus eradication by direct acting antivirals causes a simultaneous increase in the prevalence of fatty liver and hyper low density lipoprotein cholesterolemia without an increase in body weight	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 595 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rimini Margherita, Sho Takuya et al.,	4. 巻 18
2. 論文標題 Real-World Data for Atezolizumab Plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma: How Does Adherence to the IMbrave150 Trial Inclusion Criteria Impact Prognosis?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Targeted Oncology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11523-023-00953-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sho Takuya et al.,	4. 巻 14
2. 論文標題 Efficacy and Effect on Liver Functional Reserve of Atezolizumab and Bevacizumab for Unresectable Hepatocellular Carcinoma in Patients Who Do Not Meet Eligibility Criteria of IMbrave150	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3938 ~ 3938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14163938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Sonoe, Sho Takuya et al.,	4. 巻 52
2. 論文標題 Overestimated renal function in patients with liver cirrhosis predicts poor prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 603 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokuchi Yoshimasa, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya	4. 巻 28
2. 論文標題 Changes in the estimated renal function after hepatitis C virus eradication with direct acting antiviral agents: Impact of changes in skeletal muscle mass	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 755 ~ 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.13484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Yamada Ren, Tokuchi Yoshimasa, Kubo Akinori, Kitagataya Takashi, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Ohara Masatsugu, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 11
2. 論文標題 Baseline elevated serum angiopoietin-2 predicts long-term non-regression of liver fibrosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88632-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maehara Osamu, Suda Goki, Natsuzaka Mitsuteru, Shigesawa Taku, Kanbe Gouki, Kimura Megumi, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Nakai Masato, Sho Takuya, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohashi Shinya, Kagawa Shingo, Kinugasa Hideaki, Naganuma Seiji, Okubo Naoto, Ohnishi Shunsuke, Takeda Hiroshi, Sakamoto Naoya	4. 巻 22
2. 論文標題 FGFR2 maintains cancer cell differentiation via AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Biology & Therapy	6. 最初と最後の頁 372 ~ 380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384047.2021.1939638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sho Takuya, Suda Goki, et al.,	4. 巻 51
2. 論文標題 Early response and safety of atezolizumab plus bevacizumab for unresectable hepatocellular carcinoma in patients who do not meet IMbrave150 eligibility criteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 979 ~ 989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Akinori, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuizaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohnishi Shunsuke, Sakamoto Naoya	4. 巻 13
2. 論文標題 Characteristics and Lenvatinib Treatment Response of Unresectable Hepatocellular Carcinoma with Iso-High Intensity in the Hepatobiliary Phase of EOB-MRI	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3633 ~ 3633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13143633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sho Takuya, Morikawa Kenichi, Kubo Akinori, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Kimura Mugumi, Nakai Masato, Suda Goki, Natsuizaka Mitsuteru, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya	4. 巻 13
2. 論文標題 Prospect of lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in the new era of systemic chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Gastrointestinal Oncology	6. 最初と最後の頁 2076 ~ 2087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4251/wjgo.v13.i12.2076	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 直哉  (Sakamoto Naoya)  (10334418)	北海道大学・医学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	須田 剛生  (Suda Goki)  (20447460)	北海道大学・大学病院・特任助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関