

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16332

研究課題名(和文) レンバチニブの肝癌免疫微小環境への影響についての検討

研究課題名(英文) A Study of the Effect of Lenvatinib on the Immune Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma

研究代表者

大野 敦司 (Atsushi, Ono)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：80774645

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)：肝癌同所移植マウスに対し、レンバチニブ(LEN)+抗PD-L1抗体、LEN単独、抗PD-L1抗体単独、またはVehicleの投与を行った。腫瘍浸潤リンパ球をFACSで解析した結果、CD8陽性T細胞は併用群で最も増加していたが、従来報告されている腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の減少は認めなかった。そこで、ヒト腫瘍生検検体において、LEN投与前後の免疫関連遺伝子発現を解析したところ、IFN 経路の活性化は認められるが、TAMはむしろ増加していることが推察された。また、IL8およびAng2の血中濃度はLENにより低下しており、これらの下方制御がLENによる免疫活性化機構の鍵である可能性が考察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レンバチニブ(LEN)は、肝細胞癌のがん免疫微小環境を、免疫チェックポイント阻害剤が奏効しやすい状態に誘導すると期待されているが、その機序については不明なことが多い。これまで腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の減少がその機序の一つとして提唱されていたが、本研究結果は、TAMの現象以外に重要な免疫調整メカニズムが存在することを示唆するものと考えられる。その機序として、IL8や、Ang2-Tie2 axisの抑制が考えられた。現在、in vivoでの機能解析を進めているところであるが、これらの結果は、LENと免疫チェックポイント阻害剤との併用の妥当性を示す結果と考察される。

研究成果の概要(英文)：Lenvatinib (LEN) plus anti-PD-L1 antibody, LEN alone, anti-PD-L1 antibody alone, or Vehicle was administered to an orthotopic transplanted mouse model of liver cancer. Fluorescence-activated cell sorting revealed that tumor-infiltrating CD8-positive T cell (CTL) were highest in the combination group. On the other hand, there was no decrease in tumor-associated macrophages (TAM), as previously reported. The decrease of tumor-associated macrophages (TAM), previously reported, was not observed in this study. Therefore, we profiled the expression of immune related genes in human tumor biopsy specimens before and after LEN administration by nCounter and revealed that infiltration of CTLs were increased but TAMs were increased in human specimens as well. And also we revealed that serum IL8 and Ang2 was significantly decreased after the initiation of LEN treatment, which were considered to be a key immune activating mechanisms of LEN.

研究分野：肝臓病

キーワード：肝細胞癌 レンバチニブ 腫瘍免疫微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

近年、血管新生阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤 (ICB) との併用が注目されている。切除不能進行肝癌 (以下、進行 HCC) においては、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) などの腫瘍血管新生あるいは腫瘍悪性化に關与する受容体型チロシンキナーゼ阻害剤であるレンバチニブと抗 PD-1 抗体ペンブロリズマブとの併用は、Phase Ib 試験で良好な結果が得られ<sup>1</sup>、現在 Phase III 試験が進行中である。レンバチニブが腫瘍免疫微小環境を ICB が奏功しやすい環境に調整していると考えられており、本併用療法には大きな期待が集まっている。血管新生阻害による腫瘍免疫への影響については以前より報告されているが、未だ解明されていない点が多い。

## 2. 研究の目的

臨床で既に抗 PD-1 抗体との併用の有用性が報告されているレンバチニブであるが、詳細な免疫調整のメカニズムについて不明な点が多い。このメカニズムを解明することは、将来的に、より強力な免疫療法の開発への橋渡しになると考え、本研究を計画した。

本研究では、in vivo でレンバチニブにより腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の動員が抑制される<sup>2</sup>、悪性黒色腫患者では Ang2 が TAM の動員を促し ICB 治療の耐性に關与している<sup>3</sup>、という 2 つの既報と、進行肝癌の自検例でレンバチニブの投与後、血中 Ang2 濃度が低下するという点から Ang2 に注目したが、これまでにレンバチニブの Ang2 を介した免疫調整に注目した報告はなく、独自性が高い点と考える。また、レンバチニブの影響について、腫瘍免疫微小環境を構成する個々の細胞で解析する点も本研究の特徴と考える。

## 3. 研究の方法

**皮下移植モデルの作製:** 10 週齡の C57BL6 の右背部皮下に  $5 \times 10^5$  個の Hep55.1c を 29G 針にて注入して作製した。腫瘍径を 3 日毎にノギスで計測し、治療開始 4 週目に解剖を行った。

**肝癌同所移植モデルの作製:** 肝左葉に  $5 \times 10^5$  個の Hep55.1c を 29G 針にて注入して同所移植モデルを作製した。治療開始 10 日目に解剖し、ダウンストリームの解析を行った。

**治療:** レンバチニブは生理食塩水に溶き、10mg/kg/day を強制給餌にて投与した。レンバチニブのコントロールには同量の生理食塩水を投与した。抗 PD-L1 抗体は anti-mouse PD-L1 (B7-H1) (Clone:10F.9G2) を用い、200  $\mu$ g/mouse x 3 日毎の腹腔内投与を行った。抗 PD-L1 抗体のコントロールには、rat IgG2b isotype control (Clone: 2A3) を使用した。

**Fluorescence-activated cell sorting (FACS) による腫瘍浸潤免疫細胞の解析:** 単細胞分離は、腫瘍浸潤免疫細胞は BD Horizon™ Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を用いて、脾臓細胞は結合組織を切り離した後、10 cc シリンジと 18 ゲージ注射針を用いた吸引・排出操作にて行う。BD Horizon™ Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent (BD Biosciences, CA) を用いて摘出した腫瘍から単細胞単離を行った後、MojoSort™ マウス CD45 Nanobeads (BioLegend, CA) を使用して CD45 陽性細胞のポジティブセレクションを行った。洗浄およびフィルターろ過の後、Mouse BD Fc Block (BD Biosciences, San Jose, CA) でブロッキングを行い、Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit による死細胞染色および以下の抗体での染色を行った。CD45 (30-F11)、CD11b (M1/70)、Ly6G (1A8)、Ly6C (HK1.4)、F4/80 (T45-2342)、CD3 $\epsilon$  (145-2C11)、CD4 (RM4-5)、CD8a (53-6.7)、CD25 (PC61)。

**ヒト HCC 組織における免疫関連遺伝子発現プロファイル解析:** レンパチニブ治療を行った進行肝癌患者 9 例の治療開始前後 (計 18 サンプル) の腫瘍生検 FFPE 検体から RNA を抽出し、nCounter (nanosttring) を用いて、免疫関連遺伝子を含む 770 遺伝子の発現プロファイルを行い、以下の解析を行った。**DEG (Differentially Expressed Genes) 解析:** GenePattern (<https://www.genepattern.org/>) の ComparativeMarkerSelection モジュールを用いて、治療前後に有意に変動している遺伝子を解析した。**GSEA (Gene set enrichment analysis):** GSEA ソフトウェアをウェブサイト (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) からダウンロードした Hallmark (h.all.v7.5.1) の遺伝子セットの、治療開始前後での隔たりを調べた。

**ヒト臨床検体におけるサイトカイン測定:** R and D 社のカスタムルミネックスパネルを用いて、レンパチニブ治療を行ったヒト血清 (51 症例 102 サンプル) 中の以下 20 種類のサイトカインを測定した: VEGFR2、IL8、Ang2、PDL1、VEGFR1、HGF、IL18、VEGF、CXCL10、CXCL9、FGF2、IL6、FGF13、IL10、CXCL11、IL4、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、FGF23、GranzymeB

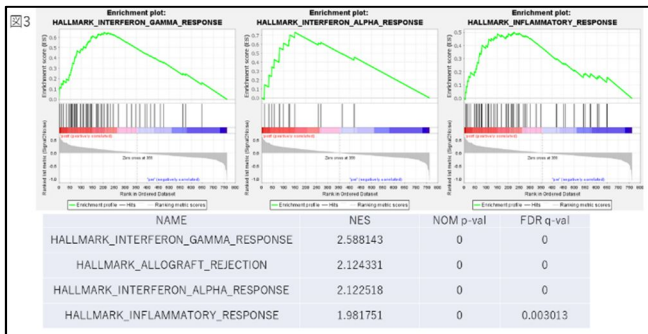
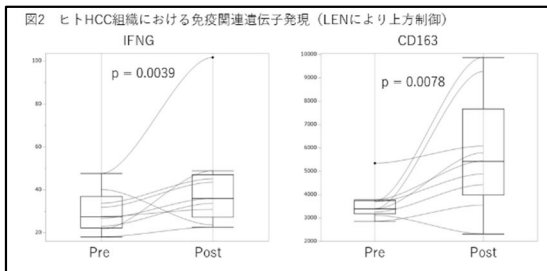
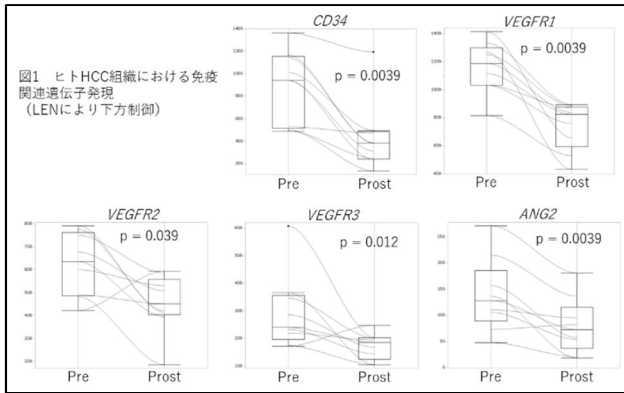
**肝細胞癌周囲の類洞様血管構造 (vessels that encapsulated tumor clusters; VETC) と微小環境の関連についての解析:** VETC は、HCC における予後不良因子として近年注目されているが、一方で、Fang J らは、VETC ではソラフェニブの奏効が得やすいと報告している<sup>4</sup>。ソラフェニブとレンパチニブは、VEGFR など多くの共通の治療標的を有しており、VETC とレンパチニブの奏効性にも関連がある可能性を考えた。また、VETC 陽性の HCC の特徴を明らかにすることも重要と考えた。そこで、以前、RNAseq および全ゲノム解析を行った肝切除例 65 例の肝癌 FFPE サンプルにおいて、CD34 の免疫染色を行い、染色パターンにより、VETC の有無を評価し、GSEA および ssGSEA を用いて、VETC 陽性 HCC の遺伝子発現プロファイルの特徴を調査した。

#### **4. 研究成果**

- I. レンパチニブは元来ヒトに対するチロシンキナーゼ阻害剤であるため、まずマウスモデルにおいて抗腫瘍効果を有することを確認する必要があると考えた。10 週齢の C57BL6 の右背部皮下に  $5 \times 10^5$  個の Hep55.1c を注射し、肝癌皮下マウスモデルを作成し、レンパチニブ (10mg/kg/day) または生理食塩水の経口投与を行い、ノギスで測定し、腫瘍サイズを算出した。レンパチニブ投与群で腫瘍の増大は抑制に抑制されたことから、レンパチニブは Hep55.1c を移植したシンジェニック肝癌モデルでも抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。一方で、皮下移植モデルの腫瘍を摘出したところ、切断面の肉眼所見上も中心部は壊死を来しており、抗 CD45 抗体でポジティブセレクションを行った腫瘍浸潤リンパ球の FACS での解析では、95% 以上の細胞が死細胞であり解析困難であった。
- II. 当初の予定通り、がん微小環境がより自然発生した HCC に近い同所移植モデルでの検討に進んだ。肝左葉に  $5 \times 10^5$  個の Hep55.1c を注射し、10 日後より、マウスを 4 群に振り分け、以下の治療を行った。レンパチニブ+抗 PDL1 抗体、レンパチニブ単独、抗 PD-L1 抗体単独、Vehicle。治療開始 10 日目に解剖し、肝臓表面からの腫瘍占拠面積を計測した。腫瘍増大抑制効果は、各単独投与群で同等、併用群で最も強かった。また、腫瘍内部の壊死もなく、FACS での腫瘍浸潤リンパ球の解析も可能であり、CD8 陽性 T 細胞のポピュレーションは併用群で最も高く、レンパチニブと抗 PD-L1 抗体のシナジー効果を裏付ける結果であった。一方で従来報告のあった、M2 マクロファージの減少<sup>2</sup>は観察されなかった。細胞株、マウスの系統、皮下移植と同所移植の違い等から、既報と異なる結果が得られた一因と考えた。そこで、当初の計画から方向修正し、

ヒト臨床検体で観察されるレンパチニブによるがん微小環境の変化について動物モデルで因果関係を確認することとした。

### III. ヒト HCC 組織における疫関連遺伝子発現プロファイル解析の結果、レンパチニブ開始

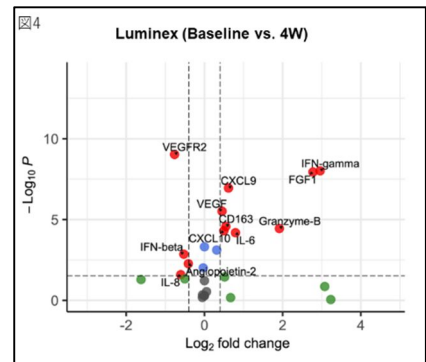


後に、血管内皮細胞で発現される CD34 や、VEGFRs、ANG2 の下方制御を認め、レンパチニブの作用機序の中心である血管新生阻害を反映しているものと考えた (図 1)。

一方で、IFN $\gamma$  の発現はレンパチニブ開始後に上方制御されており、(図 2)。GSEA でも、以下の遺伝子群が治療後のサンプルで上方制御されるトップ遺伝子群として同定された：INTERFERON GAMMA RESPONSE、ALLOGRAFT REJECTION INTERFERON ALPHA RESPONSE、INFLAMMATORY RESPONSE (図 3)。

これらのことから、レンパチニブの開始後に腫瘍に対する免疫応答が活性化していることが示唆されたが、一方で、M2 マクロファージのマーカーである CD163 も有意に増加(図 2)しており、免疫活性化の機序として TAM 減少以外の機序の存在が考えられた。

IV. 血中サイトカインの検討では、治療前に比較し、IFN $\gamma$ 、Granzyme B の血中濃度上昇を認め、腫瘍内の免疫活性化を反映しているものと考えられた。また、上記の組織での検討と同様に血中でも CD163 濃度の上昇、VEGFR2、Angiopoietin-2 の血中濃度は低下を認めた。これらの血中サイトカイン濃度の変化は、腫瘍内の環境の変化を反映しているものと考えられた (図 4)。これらの結果から、レンパチニブによる免疫微小環境調整機構のメカニズムとして、Ang2-Tie2 axis と VEGF-VEGFR axis の同時阻害が重要と考えた。この二つの経路の同時阻害による免疫環境への影響については他癌腫においていくつか報告されている<sup>5,6</sup>。

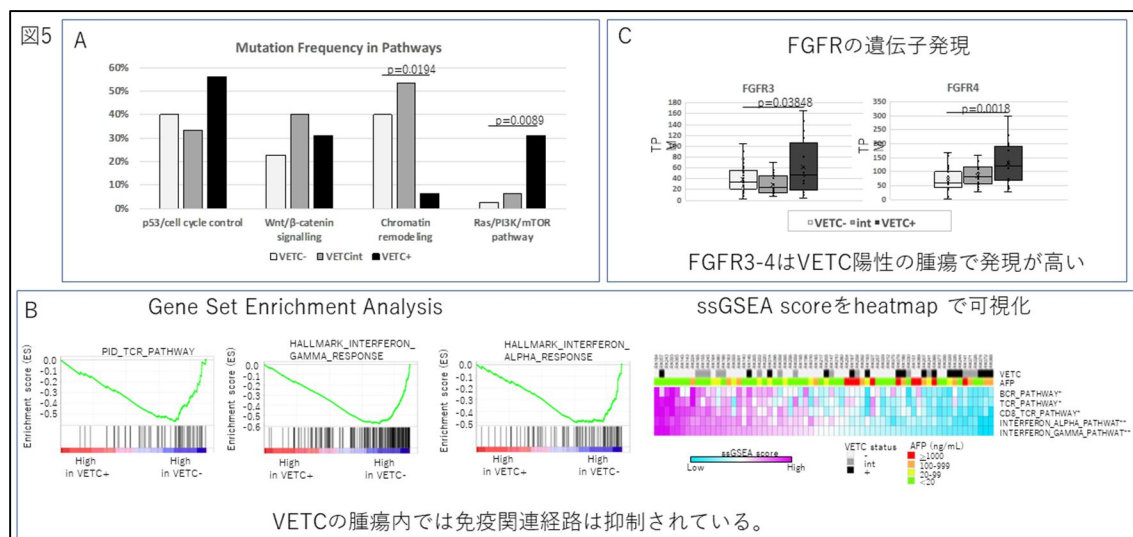


### V. VETC と微小環境の関連についての解析

66 例の手術例のうち、VETC 陽性は 16 症例、VETC 陰性 35 例、intermediate 15 例と判定された。術後のアウトカムを解析した結果、VETC 陽性群は有意に術後の全生存期間が短く、術後の遠隔転移が高率であった。これらは、既報の結果と矛盾しない結果であり、申請者らの施設での判定の妥当性を示す結果と考えた。次に全ゲノム解析の結果から、VETC 陽性群では、クロマチンリモデリング経路の変異が少なく、Ras/PI3K/mTOR 経路の変異が多いこ

とが明らかとなった。この結果は、腫瘍の増大とともに VETC のパターンが生じるのではなく、発癌時から VETC となる運命を有していることが示唆された (図 5A)。

また、GSEA、および ssGSEA の結果、VETC 群では IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、TCR 等の腫瘍免疫関連の遺伝子群の発現が抑制されていることが明らかとなった (図 5B)。一方で、レンパチニブの治療標的である FGFR3-4 の発現は VETC 群で高いことが明らかとなった (図 5C)。申請者らは、以前、FGFR4 の発現が高い症例でレンパチニブの奏効率が高いことを報告している<sup>7</sup>。このことから、VETC 群では免疫治療であるアテゾリズブ + ベバシズマブは奏効しにくい、レンパチニブは奏効しやすい可能性が示唆された。



## 参考文献

1. Finn RS, Ikeda M, Zhu AX, et al. Phase Ib Study of Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol* 2020;38:2960-2970.
2. Kato Y, Tabata K, Kimura T, et al. Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway. *PLoS One* 2019;14:e0212513.
3. Wu X, Giobbie-Hurder A, Liao X, et al. Angiopoietin-2 as a Biomarker and Target for Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Immunol Res* 2017;5:17-28.
4. Fang JH, Xu L, Shang LR, et al. Vessels That Encapsulate Tumor Clusters (VETC) Pattern Is a Predictor of Sorafenib Benefit in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2019;70:824-839.
5. Schmittnaegel M, Rigamonti N, Kadioglu E, et al. Dual angiopoietin-2 and VEGFA inhibition elicits antitumor immunity that is enhanced by PD-1 checkpoint blockade. *Sci Transl Med* 2017;9.
6. Peterson TE, Kirkpatrick ND, Huang Y, et al. Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:4470-5.
7. Yamauchi M, Ono A, Ishikawa A, et al. Tumor Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Level Predicts the Efficacy of Lenvatinib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clin Transl Gastroenterol* 2020;11:e00179.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M Yamauchi, A Ono, K Amioka, Y Fujii, S Uchikawa, H Fujino, T Nakahara, E Murakami, W Okamoto, T Kawaoka, D Miki, M Tsuge, M Imamura, CN Hayes, Y Kato, M Kimura, N Suzuki, H Aikata, K Chayama
2. 発表標題 Lenvatinib activates potential anti-tumor immunity by increasing infiltration of immune cells and interferon response in tumor microenvironment of advanced hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 ESMO World Congress on GI Cancer (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------