

# 切除不能肝細胞癌に対するがん免疫療法の治療効果・不応性を予測するバイオマーカー探索に関する研究

名古屋市立大学大学院

医学研究科 消化器代謝内科学 病院助教

鈴木孝典

名古屋市立大学大学院

医学研究科 消化器代謝内科学 准教授

藤原圭

名古屋市立大学大学院

医学研究科 消化器代謝内科学 准教授

松浦健太郎

## 1. 研究の背景・目的

切除不能肝細胞癌 (unresectable hepatocellular carcinoma: u-HCC) に対する薬物療法として、2020 年 9 月に免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) であるアテゾリズマブ (抗 PD-L1 抗体) と血管新生阻害薬であるベバシズマブ (抗 VEGF 抗体) の併用療法、が承認され、一次薬物療法における標準的治療として使用されている。これらのがん免疫療法は奏功が得られれば、長期にわたり治療効果が持続する例が認められるが、国際共同第Ⅲ相試験における u-HCC に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法 (ATZ+BV) の奏効率は 27.3% (Finn RS, et al. The New England Journal of Medicine 382: 1894-905, 2020) と全体における奏効率は十分に高いとは言えない。また、がん免疫療法における問題点として、特有の免疫関連有害事象 (immune-related adverse events: irAE)、高額な治療費が挙げられる。したがって、がん免疫療法の有害事象、治療効果、さらに治療効果が得られた後に治療不応へ至ることを予測する有用なバイオマーカーの開発が切望されている。これまでの知見から、HCC においてがん免疫療法の効果が得られるかどうかは細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の腫瘍内への浸潤が重要とされている。しかしながら、CTL が腫瘍へ浸潤しているのは HCC 全体の約 30%であり

(Montironi C, et al. Gut 72:129-140, 2023)、これらにおいては、腫瘍内にリンパ球やその他の免疫細胞の浸潤、IFN- $\gamma$  の産生、腫瘍細胞あるいはマクロファージにおける PD-L1 の発現が多くみられ、ICI による治療効果が良好であると推測されている (Sia D, et al. Gastroenterology 153:812-26, 2017)。HCC に対するがん免疫療法の治療下ではサイトカイン/ケモカインや細胞外小胞 (extracellular vesicles: EVs) 中の microRNA (miRNA) をはじめとした核酸、タンパクが腫瘍免疫微小環境に影響を及ぼし、抗腫瘍効果に寄与していることが想定される。EVs は腫瘍微小環境における免疫細胞や線維芽細胞など種々の細胞間コミュニケーションの伝達ツールとしての役割を担っている。腫瘍細胞由来 EVs (tumor-derived EVs: tEVs) に含まれるタンパクや miRNA は免疫細胞を負に制御することで腫瘍増大を促進することが知られ、また、腫瘍周囲の様々な非腫瘍細胞も EVs を放出し、免疫応答に影響する。血液検査結果から簡便に算出できる末梢血好中球・リンパ球比 (neutrophil-to-lymphocyte ratio: NLR) は様々な癌腫における予後予測因子として用いられている。我々は、ATZ+BV 併用療法後の経時的な NLR の測定によって、ATZ+BV 併用療法 2 コース目開始時の NLR が治療効果に関連し、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間 (OS) を層別化することを報告した。さらに、治療開始後、奏功+部分奏功 (CR+PR) および病勢安定 (SD) が得られたそれぞれの症例において、後の病勢悪化 (PD) 時に NLR が上昇している傾向を見出した (Matoya S, and Suzuki T (co-first author), et al. Hepatology Research 53:511-521, 2023)。これらの結果から、免疫に関連するサイトカイン/ケモカインや EVs 中の miRNA などもがん免疫療法による治療反応性・病勢に従い変化していることが推察される。以上のような学術的背景、我々の先行検討から、サイトカイン/ケモカインや、EVs 中の miRNA の発現は治療効果の予後予測のみならず、治療不応にも関与をしているのではないかという問いを考え研究を開始するに至った。

## 2. 研究の対象ならびに方法

本研究の母体となる研究課題「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効果予測因子の検討」は、2021 年 8 月に名古屋市立大学医学系研究倫理審査委員会による承認を得た後 (管理番号: 60-21-0065)、8 つの共同研究施設それぞれにおいて倫理審査を受け承認済である。2024 年 1 月までに 140 例が登録され、うち約 50 例で経時的な保存血清を有している。本年は経時的な保存血清を用いて、アテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法導入時、加えて、導入後に治療効果を有していた症例においては治療効果を有していた時と、その後の病勢悪化時の保存血清から EVs を回収し miRNA の発現プロ

ファイルについて RNA-seq を用いて網羅的に解析する。結果から候補となる miRNA を得た後に、別検体を用いて qPCR や ddPCR で再現性を検証し、治療効果・不応性を予測するバイオマーカーの同定を行う。

EVs の回収に関しては、これまでに別の研究課題において、AGC Inc. が開発した新規の EVs 精製技術である多孔質ガラスを用いたスピンカラムを用いて効率的に血清中の EVs を精製・回収し、miRNA を抽出後、RNA-seq、qPCR による発現解析を行っており、これらの一連の解析手法については習熟している (Suzuki et al. Journal of Gastroenterology 2024 59(8):719-731.)。従って、本研究における EVs 中の miRNA 解析についても技術的にはすぐに着手可能である。そして、これまでに測定したアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法投与患者におけるサイトカイン/ケモカインの結果と、本年予定している網羅的な EVs 中の miRNA 発現データにおける相互的なネットワーク解析することで、腫瘍免疫機構の解明を目指す。

### 3. 研究結果

(1) 現在までに上述の方法にて切除不能肝細胞癌に対するテセントリク・アバスチンの効果があつた症例とそうでない症例の 2 群に分けて血清中の EVs を精製・回収し、miRNA を抽出後、RNA-seq による候補の同定を行った。現在は RNA-seq の結果有望であると判断した miRNA に絞って qPCR による発現解析を症例数を増やして行っている段階である。

(2) また臨床データを用いた解析においては後述のように様々なバイオマーカーを同定し論文化を行った。

### 4. 論文発表

本研究において下記のようにこれまでに検討し論文発表を行った。

・ **Suzuki T** (21 人中 1 番目) , Matsuura K, et al. Serum interleukin-6 levels at the start of the second course of atezolizumab plus bevacizumab therapy predict therapeutic efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma: A multicenter analysis. Journal of Gastroenterology and Hepatology 39:2158-2168:2024 (癌免疫療法であるアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法投与中の血清 IL-6 値が治療効果・予後予測に有用であることを報告。)

・ Kato D, **Suzuki T(co-first author)** (19 人中 2 番目) , Matsuura K, et al. Poor tolerability of lenvatinib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma after disease progression following first-line atezolizumab plus bevacizumab: A multicenter study. Oncology 2024, online

ahead of print(癌免疫療法であるアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法投与患者の次治療のレンバチニブ両方の忍容性が高齢者で劣ることを報告。)

・ **Suzuki T** (18 人中 1 番目) , et al . The effectiveness of Long-Term Continuation of Atezolizumab Plus Bevacizumab In Patients Who Receiving Systemic Chemotherapy For Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Study. Oncology. Online ahead of print. (癌免疫療法であるアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法の長期継続が全体の生存に寄与することを報告。)

**Suzuki T** (20 人中 1 番目) , et al . Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio at the Start of the Second Course of Durvalumab Plus Tremelimumab Therapy Predicts Therapeutic Efficacy In Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Analysis. Hepatology Research 2025. Online ahead of print. (癌免疫療法であるデュルバル・トレメリムマブ併用療法の早期治療効果で2コース開始時の好中球・リンパ球比が有用である報告。)