

出國報告（出國類別：進修）

改善肝臟免疫抑制的腫瘤微環境以增 進肝癌免疫治療之療效

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：呂理駿

派赴國家：美國

出國期間：111年8月1日至112年7月31日

報告日期：112年9月11日

摘要

本次進修的實驗室是在加州大學聖地牙哥分校 (UCSD)，實驗室主持人為華裔的馮根生教授 (Dr. Gen-Sheng Feng)。馮教授的研究有幾個主軸，第一是調控各種致癌基因以研究其對肝癌小鼠模型腫瘤生長的影響；再來是 SHP2 相關的研究，SHP2 是第一個被發現的 oncogenic phosphatase；另外就是探討 polyIC (一雙股 RNA) 對先天免疫的刺激及其對腫瘤生長抑制的機制。馮教授的團隊近期發現肝內腫瘤模型比皮下腫瘤模型還難以治療，不過利用 polyIC 加上 anti-PD-L1 的免疫治療組合，可改善肝內免疫抑制的不利微環境，這正是我們團隊過去想要進一步研究的課題。SHP2 對肝腫瘤的生長，有正向也有反向影響，其在不同細胞間的表現和交互影響，也加深其作為抗癌治療標靶的複雜度和難度。今年我們最新發表的研究中，發現同時敲除肝細胞和 Kupffer cells 的 SHP2，反而使得肝腫瘤生長加劇。最後，Anti-PD-L1 加 anti-VEGF 的處方，為現今晚期肝癌的標準治療，我們在小鼠模型則顯示 Anti-PD-L1 加 polyIC 對肝內腫瘤療效比 Anti-PD-L1 加 anti-VEGF 來得好，其相關免疫機轉值得後續探究。

目次

目的.....	1
過程.....	2
心得.....	6
建議事項.....	7
參考文獻.....	8

目的

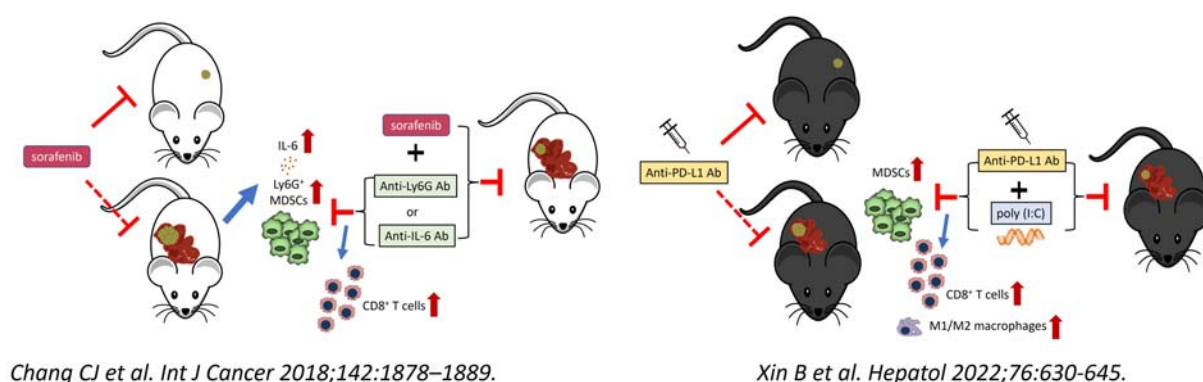
個人前幾年博士學位論文的主軸之一，為探究不同器官的腫瘤，對免疫治療反應的差異，我們發現肝內腫瘤相較於其他器官，如肺部轉移的腫瘤等，對免疫治療的療效比較差 (1)，過去我們的研究亦發現肝內骨髓抑制細胞 (MDSC) 的增加，是肝腫瘤治療效果不好的因素之一 (2)。本次進修的實驗室，位於加州大學聖地牙哥分校 (UCSD)，實驗室主持人是華裔的馮根生教授 (Dr. Gen-Sheng Feng)。Dr. Feng 是肝癌基礎研究的專家，過去主要專注的研究包括利用調控各種致癌基因，來觀察其對肝癌小鼠模型腫瘤生長的影响，他的團隊發現，敲除多種抗癌基因，如 MET, β -catenin 等，不但沒能抑制肝腫瘤生長，反而讓肝腫瘤生長加劇，因為敲除這些基因，也使得腫瘤微環境的其他細胞，如正常的肝細胞受到影響，造成腫瘤微環境發炎反應的增加，進而促使腫瘤生長 (3)。另一個例子是 SHP2 表現在腫瘤的正反影響，敲除 PTEN 會讓血癌生成增加，同時敲除 SHP2 則可抑制血癌生成；但是在肝癌模型則非如此，同時敲除 SHP2 和 PTEN，比單獨敲除其一，更會讓肝腫瘤自行生成 (4)，這樣的研究結果顯示肝腫瘤生成複雜之處和發展肝癌標靶藥物治療需要考量之處。

PolyIC (全名: polyinosinic-polycytidylic acid) 是一種雙股 RNA，常用來在 Mx1-Cre 系統做條件性基因敲除的引導，不過 Dr. Feng 的團隊發現 polyIC 本身即有抗腫瘤的效果，透過改善先天免疫，如增加 NK 細胞，M1 型巨噬細胞，及樹突狀細胞等，讓後天免疫如 CD8 T 細胞也增加，進而讓腫瘤生長被抑制 (5)。在 Dr. Feng 團隊一項最新的研究之中，發現皮下腫瘤，對單用免疫檢查點抑制劑 anti-PD-L1 或單用 polyIC 都有效，但是肝內的腫瘤模型，則需要合併 anti-PD-L1 和 polyIC 才比較有效 (6)，這和我之前博士班的研究發現有相同之處 (1, 2)。因此，對研究肝癌免疫治療有興趣的我，即選擇 Dr. Feng 的實驗室做為我出國進修的地方。

過程

Dr. Feng 的職缺是在 UCSD 的 Department of Molecular Biology, School of Biological Sciences 和 Department of Pathology and Moores Cancer Center, School of Medicine，不過以他 PhD 的背景，其研究屬於純基礎研究。在進實驗室的頭幾個月，除了跟一位博後學習細胞和分生實驗以外，也參與很多小鼠的動物實驗。利用空餘的時間，我也整合了兩邊過去針對不同器官腫瘤對免疫治療反應不同的研究結果，撰寫了一篇回顧性文章 (圖一) (7)。此外，跟我同期一起到 Dr. Feng 實驗室的德國訪問學者 Alex，則負責撰寫另一篇有關 SHP2 的回顧性文章，而我也一同幫忙收集資料，給予意見，和修飾文章，所以列名第二作者 (8)。

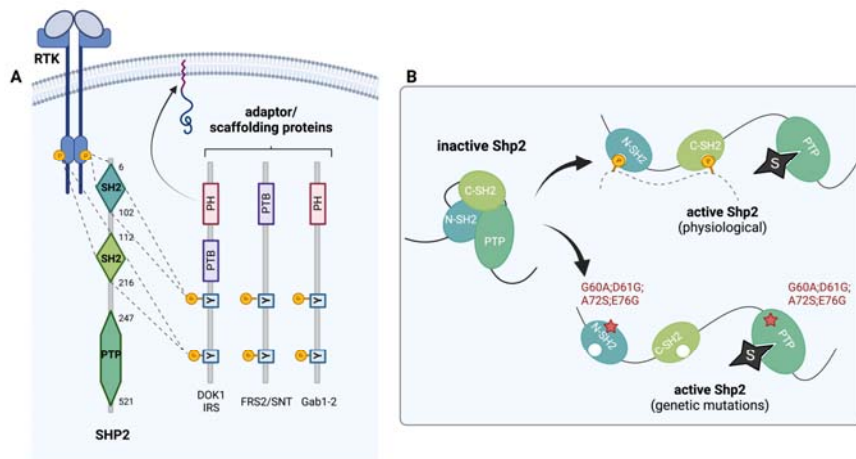
圖一 肝內腫瘤較皮下腫瘤難以治療的研究和可能機轉 (取自 J Cancer Res Pract 2023;10:45-9)。



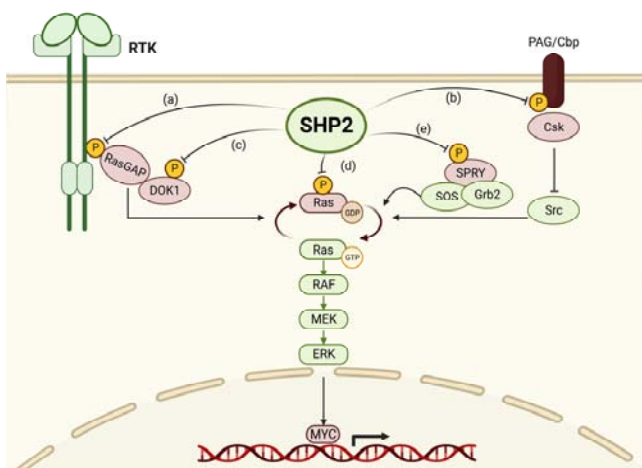
Dr. Feng 是 90 年代發現 SHP2 (一個 oncogenic phosphatase) 的研究者之一。SHP2 有兩個 SH2 (Src homology 2) domains 和一個 PTP (protein tyrosine phosphatase) domain，其 SH2 domains 會和 receptor tyrosine kinase 上的兩個磷酸化的酪胺酸殘基或是帶有兩個磷酸化的酪胺酸殘基的細胞質內蛋白結合，結合後便能活化 SHP2 以達到它去磷酸化的功能 (圖二)。SHP2 被認為是 MAPK 路徑要能完全活化的必要因子，SHP2 藉由去磷酸化來達到抑制 MAPK 路徑的負向調控因子 (圖

三)。臨床上目前有非常多的 SHP2 抑制劑在早期臨床試驗測試，主要是跟 KRAS 抑制劑併用在 KRAS 突變的癌別。不過，基於 SHP2 在肝癌上對腫瘤同時有正向及負向的角色，其藥物的發展結果還是值得關注 (8)。

圖二 SHP2 的結構，標的物，和活化方式 (取自 Complex roles of PTPN11/SHP2 in carcinogenesis and prospects of targeting SHP2 in cancer therapy. Annu Rev Cancer Biol 2023, accepted.)。



圖三 SHP2 調控 MAPK 路徑的可能機制 (取自 Complex roles of PTPN11/SHP2 in carcinogenesis and prospects of targeting SHP2 in cancer therapy. Annu Rev Cancer Biol 2023, accepted.)。

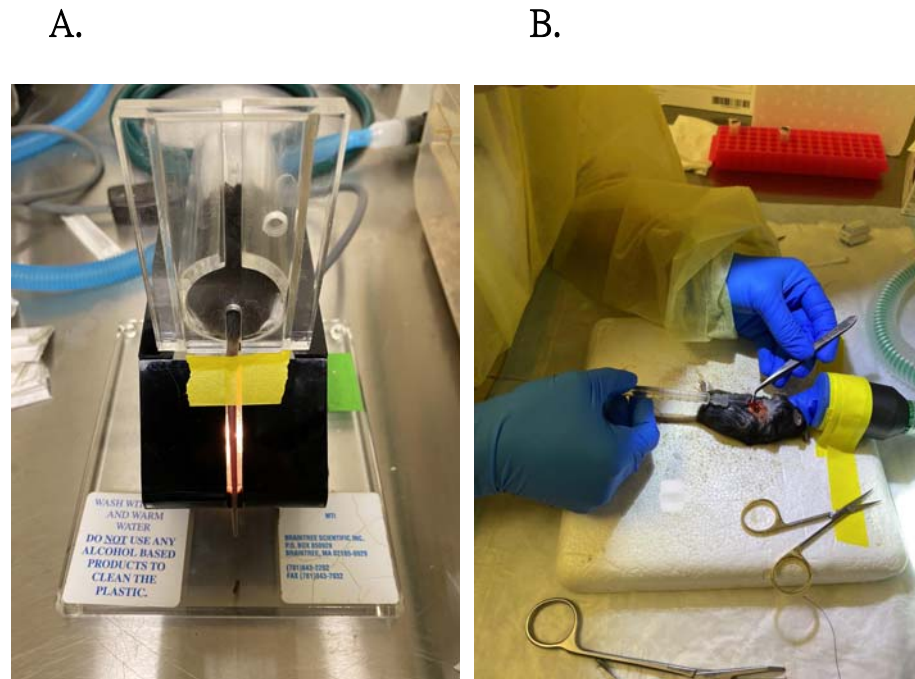


而我上半年主要參與的實驗計畫，是調控 SHP2 在肝細胞和肝內特異的巨噬細胞 Kupffer cells (KCs) 的表現，首先實驗發現，在 KCs 敲除 SHP2，會使得 KCs 整體的量下降，但是肝內非 KC 的巨噬細胞反而增加，推測是體循環的單核球進入肝內分化而成。若使用大腸癌細胞株 MC38 的肝轉移模型，發現 KCs 敲除 SHP2 的情況下，腫瘤惡化的會比野生型的來得厲害。過去我們知道敲除肝細胞的 SHP2，也會加重肝腫瘤生成，而本次研究利用小鼠尾靜脈注射帶有 Ras/Myc 致癌基因的質粒的原發性肝癌模型，進一步發現若同時敲除 KCs 和肝細胞的 SHP2，原發性肝腫瘤惡化的程度，會比單獨在 KCs 或肝細胞敲除 SHP2 來得嚴重。我們也發現非 KC 的巨噬細胞及 MDSC 等，在同時敲除 KCs 和肝細胞 SHP2 的肝臟內有增加的趨勢。而若是用 CCL2 (一髓性細胞的趨化因子) 的抑制劑，則可減少其非 KC 的巨噬細胞之聚集，且能進一步改善肝腫瘤的生成。相反的，若是用 clodronate liposome 移除所有的巨噬細胞，則會讓肝腫瘤明顯惡化。相關研究已於今年發表 (9)。

這一年主要學習小鼠動物實驗的模型，有由小鼠尾靜脈注射致癌基因質粒的原發性肝癌模型，及從小鼠脾臟注射 MC38 癌細胞的轉移性肝腫瘤模型。這兩種模型的建立，皆需要不斷的練習才能讓尾靜脈注射質粒和脾臟注射細胞的動作穩定施行，也才得以讓肝腫瘤穩定生成。下半年我參與的計畫也是利用這兩種動物模型 (圖四 A, B)。晚期肝癌目前臨床上的標準治療是 atezolizumab (anti-PD-L1) 加上 bevacizumab (anti-VEGF) 的處方，然而其療效仍然有限 (腫瘤反應率約 30%) (10)，如何改善肝臟內部不利的免疫抑制腫瘤微環境，是重要的研究課題。我們使用 anti-PD-L1 + polyIC 的治療組合，比上 anti-PD-L1 + anti-VEGF 的處方及對照組，發現在不同的動物模型中，anti-PD-L1 + polyIC 治療的組別在抑制腫瘤的生成的大小和數量，都顯著的比對照組 anti-PD-L1 + anti-VEGF 來得好 (圖五 A, B)。在初步的流式分析中，polyIC 組的肝內有較高比例的 CD8 T 細

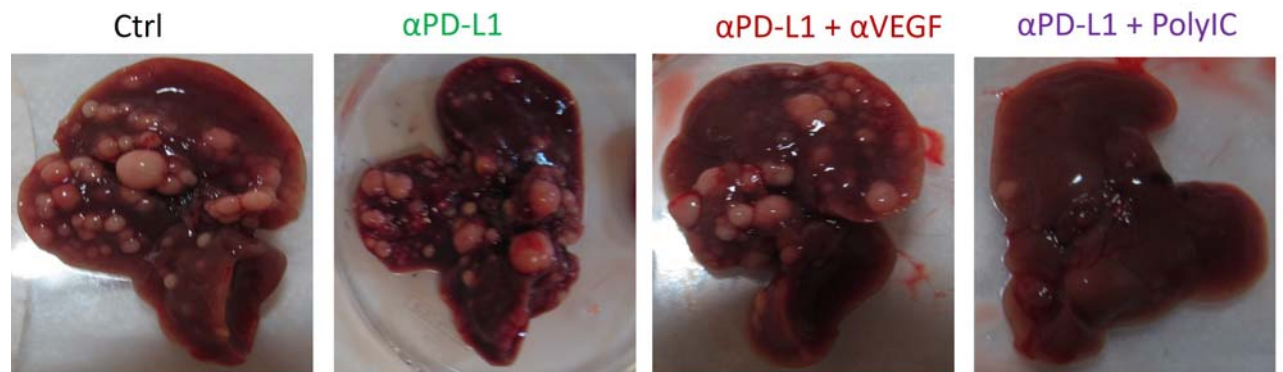
胞和表現 granzyme B 的 CD8 T 細胞。後續我們將繼續用完整的流式分析，多樣免疫螢光染色，及單細胞 RNA 定序來找尋可能的細胞和分子機制。

圖四 A. 小鼠尾靜脈注射時固定小鼠器具示意；B. 小鼠癌細胞脾臟注射手術中示意。

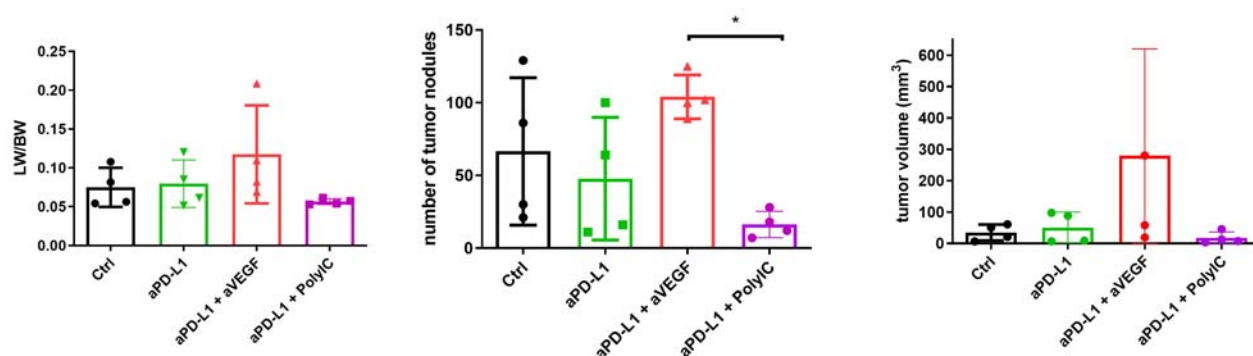


圖五 小鼠尾靜脈注射致癌基因 (Ras/Myc) 質粒的原發性肝癌模型。

A. 接受不同治療的肝腫瘤照片。



B. 不同組別中肝腫瘤的變化比較。



除了實驗室的 bench work、例行 meeting 和 journal club 以外，校內各項 seminar、lecture 及 conference 也是學習和吸收新知的好機會。UCSD 與附近的 Salk Institute, La Jolla Institute for Immunology 等學術機構有非常密切的交流和合作，我因此有機會參加地區性的 La Jolla Immunology Conference 及 Salk Cancer Symposium 等會議。而每年一月在舊金山舉辦的 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium，這次我也能就近飛去參加，省去從臺灣往返的舟車勞頓，因此這一年的學習可謂收穫滿滿，受益良多。

心得

過去在博士班期間，雖然也有做一些基礎分生研究，不過以一個醫師要能完全放下臨床工作，全心投入基礎研究，除非出國進修不然是很難辦到的。在此也要特別感謝科部的鼓勵和醫院的支持，讓我能以訪問學者的身分出國進修一年，這對我往後的研究絕對有關鍵的影響。

國外的研究環境跟臺灣相比，優勢在有很多鄰近的實驗室可討論直接合作的機會，各種基因轉殖鼠等取得方便，此外，聖地牙哥本身也是許多大生技公司的

所在地，購買各種試劑也十分迅速。不過我覺得研究成不成功的另一個重點還是問的問題是不是關鍵，研究的方向和重心是不是正確，有好的題目，加上好的研究環境和人才，加上足夠經費的支持，自然能有機會創造成功的研究成果。不過這幾年在美國做研究也越來越不容易，我去的上半年期間，加州大學各分校的博後和博士生等研究員的工會，正好在發動大罷工要求加薪，通貨膨脹造成研究員生活困難可以理解，不過問題是資方實驗室主持人等的經費也有限，美國 NIH 的 R01 grant 已經 20 年未調漲，要讓博後等人加薪，最終是實驗室經費不足，反倒是要讓一些博後走人離開。大罷工持續近兩週，期間很多實驗室空空如也，最終學校方部分妥協工會加薪的訴求，不過這也讓未來各實驗室越來越難經營。臺灣的研究環境和美國不同，雖然研究經費（如國科會計畫）普遍較低，但是 PI 的薪水不經由 grant 支出，對博士生的補助也沒有美國那麼高，不過相對而言也讓博士班的招生這幾年越來越困難，要怎麼改善臺灣研究的大環境，需要政府與學界一同思考面對。

對我個人而言，這一年的進修，除了讓我更了解美國一流大學基礎研究實驗室的運作，親身參與和學習實驗操作以外，在有共同研究課題和興趣的前提下，經由每一次實驗室的 meeting 討論，我也多能提供臨床方的見解，建立起未來相互合作的良好基礎，相信此次的訪問交流，對雙方都是十分正面有幫助的。

建議事項

一年的時間說長不長，說短也是很快就過去了。還是要再次感謝醫院和科部的支持，還有同事在這一年代班的辛勞。當然，針對進修研究的主題，若能持續第二年甚至第三年待在實驗室，應該會有更完整的結果呈現，不過後續經費的補助，家庭的因素的考量，只進修一年相信也是大部分訪問學者的選擇。雖然已返

國回院上班，但是希望能將這一年所學，結合到後續新的研究計畫當中，也希望能繼續保持與 Dr. Feng 實驗室的聯繫，在共同研究的目標下，互補互利，持續深化雙邊的合作，才不會辜負科部和院方的栽培。

參考文獻

1. Lu LC, Hsu C, Shao YY, et al. Differential organ-specific tumor response to immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 2019;8:480-490.
2. Chang CJ, Yang YH, Chiu CJ, et al. Targeting tumor-infiltrating Ly6G+ myeloid cells improves sorafenib efficacy in mouse orthotopic hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 2018;142:1878-1889.
3. Feng GS. Conflicting roles of molecules in hepatocarcinogenesis: paradigm or paradox. *Cancer Cell* 2012;21:150-154.
4. Luo X, Liao R, Hanley KL, et al. Dual Shp2 and Pten Deficiencies Promote Non-alcoholic Steatohepatitis and Genesis of Liver Tumor-Initiating Cells. *Cell Rep* 2016;17:2979-2993.
5. Lee J, Liao R, Wang G, et al. Preventive Inhibition of Liver Tumorigenesis by Systemic Activation of Innate Immune Functions. *Cell Rep* 2017;21:1870-1882.
6. Xin B, Yang M, Wu P, et al. Enhancing the therapeutic efficacy of programmed death ligand 1 antibody for metastasized liver cancer by overcoming hepatic immunotolerance in mice. *Hepatology* 2022;76:630-645.
7. Lu LC, Feng GS, Hsu CH. Unfavorable tumor responses to immunotherapy in the liver: lessons learned from clinical and preclinical studies. *J Cancer Res Pract* 2023;10:45-9.
8. Scheiter A, Lu LC, Gao LH, et al. Complex roles of PTPN11/SHP2 in carcinogenesis and prospects of targeting SHP2 in cancer therapy. *Annu Rev Cancer Biol* 2023,

accepted.

9. Du L, Ji Y, Xin B, et al. Shp2 Deficiency in Kupffer Cells and Hepatocytes Aggravates Hepatocarcinogenesis by Recruiting Non-Kupffer Macrophages. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2023;15:1351-1369.
10. Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2020;382:1894-1905.