

博 士 論 文

肝細胞癌に対するレンバチニブ療法の
臨床効果に及ぼす *NOS3* 遺伝子多型の影響

2021 年 1 月

北里大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程 薬物治療学 I

東 信 太 朗

指導：厚 田 幸 一 郎 教授

略 語

AFP	Alpha-fetoprotein
ALBI	Albumin-bilirubin
BCLC	Barcelona clinic liver cancer
CI	Confidence interval
CR	Complete response
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECOG-PS	Eastern cooperative oncology group-Performance status
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
HCC	Hepatocellular carcinoma
HR	Hazard ratio
IQR	Interquartile range
JCOG	Japan clinical oncology group
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
OR	Odds ratio
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Progressive disease
PEM	Protein-energy malnutrition
PFS	Progression-free survival
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PR	Partial response
RPA1	Replication protein A1
SD	Stable disease
SMI	Skeletal muscle mass index
SNP	Single nucleotide polymorphism
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
gDNA	genomic Deoxyribonucleic acid
mOS	mean Overall survival
mPFS	mean Progression-free survival
mRECIST	modified Response evaluation criteria in solid tumors

目 次

I. 序論	1
1. 肝細胞癌の特徴と治療	3
2. NO と内皮型一酸化窒素合成酵素	5
3. NOS3 遺伝子と遺伝子多型	7
4. 肝細胞癌と NOS3 遺伝子多型	8
5. Lenvatinib	9
6. 線維芽細胞増殖因子受容体	10
7. 本研究の目的	13
II. 本論	15
第 1 章 臨床効果に対する NOS3 および FGFR 遺伝子多型の影響	17
1.1. 対象	17
1.2. 患者背景	17
1.3. 生存時間分析	21
1.4. 探索的評価項目	26
1.5. 単変量解析と多変量解析	36
1.6. 考察	39
1.7. 小活	42
第 2 章 有害事象に対する NOS3 遺伝子多型の影響	44
2.1. 有害事象の発現有無	44
2.2. 有害事象の重症度	44
2.3. 有害事象と治療期間	44
2.4. 考察	48
2.5. 小活	49
第 3 章 臨床効果に対する有害事象の影響	50
3.1. 有害事象と無増悪生存期間、全生存期間	50
3.2. 考察	61
3.3. 小活	62

III. 総括	65
第1章 臨床効果に対する <i>NOS3</i> および <i>FGFR</i> 遺伝子多型の影響	67
第2章 有害事象に対する <i>NOS3</i> 遺伝子多型の影響	68
第3章 臨床効果に対する有害事象の影響	68
IV. 方法	69
1. 倫理的事項	71
1.1. 研究対象者の人権に対する配慮	71
1.2. 研究対象者への説明	71
1.3. 個人情報の保護と研究対象者識別	71
1.4. 検体・試料の収集および取り扱い	72
2. 研究デザイン	72
3. 対象	72
3.1. 研究対象者	72
3.2. 患者選択基準	72
3.3. 治療計画と治療変更基準	73
4. 評価項目	74
4.1. 臨床効果に対する <i>NOS3</i> および <i>FGFR</i> 遺伝子多型の影響	74
4.2. 有害事象に対する <i>NOS3</i> 遺伝子多型の影響	74
4.3. 臨床効果に対する有害事象の影響	74
5. 効果判定とエンドポイントの定義	75
6. 実験材料	75
7. SNP ジェノタイピング解析	76
8. 統計解析	77
V. 謝辞	79
VI. 参考文献	83
VII. 学術論文	97
VIII. 論文要旨	115

I. 序論

1. 肝細胞癌の特徴と治療

本邦における原発性肝癌は、がん罹患数予測（2020 年）において第 7 位、がん死亡数予測（2020 年）において第 5 位の悪性新生物である。原発性肝癌のうち肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma; HCC）は 91.4%、肝内胆管癌は 6.0%、混合型肝癌（肝細胞癌と肝内胆管癌の混合型）は 1.0%を占める¹。肝細胞癌は肝臓の表面に生じる上皮性悪性腫瘍であり、肝内に種々の大きさ、多数の腫瘍を形成する。腫瘍は血管内に侵入して増殖・進展し、肝内外の門脈や肝静脈に腫瘍栓を形成する。世界的には、原発性肝癌の背景肝疾患として B 型慢性肝炎が最多であり、次に C 型慢性肝炎が続く。本邦を除くアジア諸国では B 型肝炎が、本邦やイタリア、スペインなどでは C 型肝炎が主な原因であり、地域によって発生原因は異なる^{2,3}。本邦では 1986 年の B 型肝炎母子感染防止事業の実施により、B 型肝炎ウイルスキャリア率は減少傾向であるが、B 型肝炎関連の肝癌の好発年齢は 50 歳以降であるため、罹患数は未だ高値を推移している。一方、C 型慢性肝炎からの発癌には、C 型肝炎ウイルス遺伝子による持続的な肝の壊死・炎症、肝線維化が関与している。経口直接作用型抗ウイルス薬によるインターフェロンフリー治療により、高齢者や線維化進展症例において持続的ウイルス陰性化が得られるようになった。そのため、C 型肝炎ウイルス駆除の発癌抑制により、C 型肝炎関連の肝癌は減少傾向を示している⁴。

近年では、非ウイルス性（非 B 非 C）のうち、約半数をアルコール性肝障害による発癌が占めている。メタボリックシンドロームの増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD）、中でも進行性の肝病態である非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis; NASH）からの発癌が急激に増加している⁵⁻⁷。NAFLD/NASH に伴う肝癌は、肥満、インスリン抵抗性・2 型糖尿病などの生活習慣病や、*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) rs738409*、*Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2) rs58542926* などの遺伝的背景により発症することが報告されている^{8,9}。

全国原発性肝癌追跡調査報告（2010–2011 年）の患者背景として、高齢化、女性の増加、非 B 非 C 肝癌の増加傾向が認められた。一方、肝細胞癌生存率の改善は著しく、B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、肝硬変（B 型肝硬変、C 型肝硬変）症例に対する肝癌サーベイランスシステムの普及、早期診断・治療法の進歩が予後の改善に寄与していることが示された¹。

肝癌の治療方針は、肝予備能の評価と腫瘍進展度を考慮し決定する。根治的治療が不可能な場合は、患者の生命予後と生活の質を保つことを勘案し治療法を決定する。肝予備能の評価には、血液検査等の値に応じた点数による、国際的な肝臓機能障害の重症度分類「Child-Pugh 分類」が広く使用されている。また、アルブミン、総ビリルビンのみを用いて統計学的に成立した肝予備能評価「アルブミン–ビリルビン (Albumin-bilirubin; ALBI) グレード」は、Child-Pugh 分類と比較して分子標的薬における予後予測に有用であることが報告されている^{10,11}。切除不能な肝細胞癌に対して肝動脈化学塞栓療法^{12,13}や穿刺局所療法¹⁴が施行されているが、それらの不応、不適例に対する治療方針として、全身薬物治療（分子標的薬、免疫療法）が大規模な臨床試験により有意な生存期間の延長を報告している^{15,16}。本邦では2009年にキナーゼ阻害剤の Sorafenib¹⁷、2017年に Regorafenib¹⁸、2018年に Lenvatinib^{19,20}、2019年にヒト型抗血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor; VEGF）受容体 2（VEGFR2）モノクローナル抗体の Ramucirumab²¹、2020年に抗 Programmed Death-Ligand 1 ヒト化モノクローナル抗体の Atezolizumab と抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体の Bevacizumab 併用療法²²、キナーゼ阻害剤の Cabozantinib²³が承認され、臨床現場で使用可能である（Table 1）。

Table 1. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma.

Name	Line	median OS	median PFS	Action mechanism
Sorafenib	1 st line	10.7 months	5.5 months	VEGFR, PDGFR, C-Raf, B-Raf, FLT-3, c-KIT
Lenvatinib	1 st line	13.6 months	7.4 months	VEGFR1-3, PDGFR α , FGFR1-4, KIT, RET
Atezolizumab + Bevacizumab	1 st line	> 17.0 months	6.8 months	anti-PD-L1, anti-VEGF
Regorafenib	2 nd line	10.6 months	3.1 months	VEGFR1-3, PDGFR, FGFR, TIE-2, KIT, RET, RAF-1, BRAF
Ramucirumab	2 nd line	8.5 months	2.8 months	VEGFR2 (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D)
Cabozantinib	2 nd line	10.2 months	5.2 months	VEGFR1-3, MET, AXL, RET, ROS1, TYRO3, MER, KIT, TRKB, FLT-3, TIE-2

FGFR fibroblast growth factor receptor, *FLT-3* FMS-like tyrosine kinase 3, *OS* overall survival, *PD-L1* programmed death-ligand 1, *PDGFR* platelet-derived growth factor receptor, *PFS* progression-free survival, *VEGFR* vascular endothelial growth factor receptor.

Lenvatinib は Sorafenib と同様に、二次治療として Atezolizumab + Bevacizumab 併用療法後、画像進行または副作用にて中止した Child-Pugh class A 症例に推奨される。国際共同第III相試験（IMbrave 150 試験）における Atezolizumab + Bevacizumab 併用療法は、一次治療薬 Sorafenib に対する全生存期間(Overall survival; OS)、無増悪生存期間(Progression-free survival; PFS)の優越性を証明し、奏効率、安全性、生活の質の大幅な改善を示した。この結果は、これまでの肝臓治療のパラダイムを大きく変え、二次治療薬としての Lenvatinib、Sorafenib の薬剤選択のためのバイオマーカー探索の重要性を示唆する。

2. NO と内皮型一酸化窒素合成酵素

一酸化窒素（Nitric oxide; NO）は一酸化窒素合成酵素（Nitric oxide synthase; NOS）によって合成される短寿命のラジカル種であり、生体内では主要なシグナル分子として多彩な生理活性を示す。NOS には異なるアイソフォームが存在し、神経型 NOS（Nitric oxide synthase 1; NOS1）²⁴、誘導型 NOS（Nitric oxide synthase 2; NOS2）²⁵、および内皮型 NOS（Nitric oxide synthase 3; NOS3）^{26,27} の 3 種類が知られている。これらの NOS はそれぞれ異なる遺伝子の

産物であるが、いずれのアイソフォームも C 末端には還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸、フラビンアデニンジヌクレオチド、フラビンモノヌクレオチド結合部位を持つ還元酵素ドメイン、N 末端にはヘム、L-アルギニン、テトラヒドロビオプテリン結合部位を持つオキシゲナーゼドメインが存在する。NOS3 の活性化には、同一のモノマーからなる二量体（ホモダイマー）の形成、機能ドメイン間に存在するカルモジュリン結合部位への Ca^{2+} /カルモジュリン結合と立体構造の変化、および還元酵素ドメインからオキシゲナーゼドメインへの電子移動が必要不可欠である。NO および L-シトルリンは、取り込まれた酸素分子、L-アルギニン、および補因子テトラヒドロビオプテリンにより生成される²⁸⁻³⁵。

腫瘍生物学における NO は、二項対立的な作用を示すことが報告されている。低濃度 NO はアポトーシスの抑制、血管新生の誘導・促進、腫瘍に対する宿主免疫反応の制限、および転移の促進による発がん促進作用を示す。一方、高濃度 NO は細胞毒性による殺腫瘍作用を示す³⁶⁻³⁸。特に、腫瘍微小環境下における NOS/NO 発現は、血管拡張作用による腫瘍血流の増加、血管透過性の亢進、および血管新生の促進において重要である^{39,40}。

VEGF は血管内皮細胞に特異的に作用する増殖因子であり、VEGF/VEGFR2 の活性化は NOS3 発現を上昇させ、NO 産生を介した VEGF 誘導性血管新生と血管内皮細胞の増殖、遊走を促進する^{41,42}。VEGF はマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（Mitogen-activated protein kinase; MAPK）シグナル伝達経路とホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（Phosphatidylinositol 3-kinase; PI3K）/Akt シグナル伝達経路を活性化し、腫瘍血管新生の促進および血管透過性の亢進において重要な役割を果たしている^{41,43-48}。一方、細胞膜上のカベオラの主要構成分子であるカベオリン 1 は、NOS3 と結合し NO 産生低下に伴う腫瘍血管新生阻害作用を示す⁴⁹。以上より、NOS/NO 経路は腫瘍血管新生における治療戦略の有望なターゲットになると考えられる。

3. NOS3 遺伝子と遺伝子多型

NOS3 遺伝子はヒトの 7 番染色体の長腕 (7q36.1) に位置し、NO の合成を制御する上で重要な役割を果たしている⁵⁰。*NOS3* 遺伝子のプロモーター領域には AP-1、NF-1、shear-stress response elements を含む転写因子結合部位が存在し、遺伝子の発現を制御している⁵¹。*NOS3* 遺伝子多型のうち、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) *rs2070744* (**Figure 1**)⁵²、*rs1799983*⁵³、およびイントロン 4 の反復配列多型⁵⁴⁻⁵⁶ は、*NOS3* 活性と NO 産生に影響を与えることが報告されている⁶³。*NOS3 rs2070744* の *C allele* 変異型は、*NOS3* 転写活性の低下と血清 NO 濃度の低下を示し、冠攣縮性狭心症や心筋梗塞と強く関連することが報告されている^{52,57-64}。*NOS3 rs2070744* の *C allele* 変異型による転写活性の低下は、一本鎖 Deoxyribonucleic acid (DNA) 結合タンパク質である Replication protein A (RPA) の 70 kDa サブユニット *RPA1* が、*C allele* の存在下で *NOS3* プロモーター領域に高い親和性で結合するためであると考えられている^{65,66}。*RPA1* は複数の悪性腫瘍の発生と進行に重要な役割を果たす癌遺伝子として同定されており、尿路上皮癌 (膀胱癌)⁶⁷ や食道癌⁶⁸ における臨床転帰の不良、大腸癌における化学療法感受性の低下⁶⁹ と関連することが報告されている。また、肝細胞癌における *RPA1* は、細胞増殖に必要不可欠な因子であるサイクリン依存性キナーゼ 4/サイクリン-D 経路を介した腫瘍細胞の増殖と臨床転帰の不良に関連することが報告されている⁷⁰。

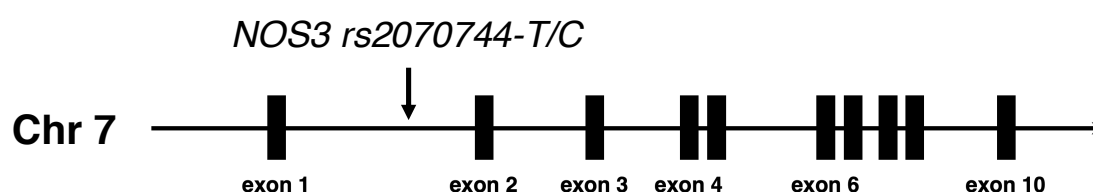


Figure 1. Gene map showing the exon/intron organization of *NOS3 rs2070744*. The exons are shown as numbered black boxes. *Chr* chromosome, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

4. 肝細胞癌と NOS3 遺伝子多型

固形腫瘍の成長に必要な栄養と酸素は、腫瘍周囲の血管網より供給されるが、腫瘍の増殖に伴い腫瘍微小環境下は低酸素状態となる。この低酸素状態は NO を介して VEGF の発現を誘導し、血管新生を促進する⁷¹。悪性黒色腫⁷²、口腔扁平上皮癌⁷³、大腸癌⁷⁴、および前立腺癌⁷⁵では、NOS3 発現が腫瘍血管新生に重要な役割を果たすことが報告されている。したがって、肝細胞癌における NOS3 発現量の変化は、腫瘍血管新生の調節を介した腫瘍増殖・転移に関与している可能性が示唆される。また、肝細胞癌患者は肝硬変患者および健常人と比較して血清 NO 濃度が有意に高く、さらに腫瘍組織の NOS3 発現量も多いことから、NOS/NO は感度、特異度の高い肝細胞癌の診断マーカーとして有用である^{76,77}。

先行研究⁷⁸において、NOS3 *rs2070744* は白人、NOS3 *rs1799983* は白人およびアジア人のがん罹患率と有意な関連が認められた。病気の種類に基づいてデータを分類した場合、NOS3 *rs2070744* と *rs1799983* は、前立腺癌、膀胱癌、および乳癌のリスクと有意な関連が認められた。イントロン 4 の反復配列多型は、中華人民共和国における肝細胞癌のリスクと関連しないことが示唆されたが、日本人の集団における NOS3 *rs2070744* と肝細胞癌のリスクに関する報告はなされていない⁷⁹。

近年、NOS3 *rs2070744* が肝細胞癌に対する Sorafenib 療法の臨床効果と有意に相関することが報告された。NOS3 *rs2070744* の Hetero type (ヘテロ ; TC) + Mutant type (変異型ホモ ; CC) 群 (TC+CC 群) は、Wild type (野生型ホモ ; TT) 群 (TT 群) と比較して PFS の有意な延長を示した (5.9 months vs 2.4 months; hazard ratio [HR] 0.43; 95% confidence interval [CI] 0.26–0.70; $p=0.0007$)。同様に、TC+CC 群は、TT 群と比較して OS の有意な延長を示した (15.7 months vs 8.6 months; HR 0.38; 95% CI 0.24–0.60; $p<0.0001$)。多変量解析の結果、NOS3 *rs2070744* (TC+CC 群 vs TT 群) は、PFS (HR 0.50; 95% CI 0.29–0.86; $p=0.0123$) および OS (HR 0.44; 95% CI 0.29–0.68; $p=0.0002$) の独立した予後因子であることが確認された⁸⁰。し

たがって、肝細胞癌における NOS/NO 発現量の変化は、腫瘍血管新生や血管透過性、腫瘍内間質圧を調節し、肝細胞癌の臨床効果に影響を及ぼす可能性が示唆されるが、その作用機序について一定の見解は得られていない。

5. Lenvatinib

Lenvatinib は、腫瘍血管新生、腫瘍増殖等に関与する、VEGFR1-3、血小板由来増殖因子受容体 α 、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor; FGF) 受容体 (FGFR) 1-4、KIT、RET 等の複数の受容体チロシンキナーゼ活性を阻害する経口マルチキナーゼ阻害薬である。Lenvatinib は、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた VEGF 誘導血管新生モデル (in vitro) において、VEGF および FGF 誘導血管新生の阻害作用を示した。さらに、Lenvatinib は他のキナーゼ阻害剤と比較して、受容体チロシンキナーゼへの高い選択性と親和性を示すため、強力な VEGFR、FGFR 阻害活性を有する新規分子標的薬である^{19,81,82}。

全身化学療法歴のない Child-Pugh class A の切除不能な肝細胞癌患者を対象とした国際共同第III相試験 (304 試験、REFLECT) において、Lenvatinib は Sorafenib に対する OS (HR 0.92; 95%CI 0.79–1.06) の非劣性が統計学的に検証された¹⁹。また、全体集団における PFS (HR 0.66; 95%CI 0.57–0.77; $p < 0.00001$)、modified Response evaluation criteria in solid tumors (mRECIST) を用いた主治医判定による客観的奏効率 (odds ratio [OR] 3.13; 95%CI 2.15–4.56; $p < 0.00001$)、および病勢コントロール率 (OR 2.05; 95%CI 1.54–2.71; $p < 0.00001$) は Sorafenib 群に対して統計学的に有意かつ臨床的に意義のある改善を示した。本邦は世界に先駆けて Lenvatinib の製造販売申請が行われたことで、海外と比較して治療経験が多く、エビデンスも蓄積されている。Lenvatinib は切除不能な肝細胞癌の二次治療薬として広く臨床使用されているが、科学的根拠の得られている治療効果・予後予測因子は未だ確立されていない。そ

のため、現代の日本において切除不能な肝細胞癌に対するバイオマーカー探索研究は、臨床的意義の高い研究であると考えられる。

6. 線維芽細胞増殖因子受容体

ヒトにおける FGF ファミリーは 22 種のリガンドで構成されており、4 つの膜貫通型チロシンキナーゼ受容体 (FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4) を介して作用する⁸³。FGF/FGFR シグナル伝達経路は、その下流 MAPK シグナル伝達経路を介した腫瘍細胞増殖・分化の促進、PI3K/Akt または Signal transduction and activator of transcription シグナル伝達経路を介した抗アポトーシス経路の活性化を制御する。また、間質細胞または腫瘍細胞から放出された FGF は、VEGF と無関係に腫瘍血管新生を再活性化するため、VEGFR2 阻害薬に対する抵抗性を示す。そのため、FGFR と VEGFR シグナル伝達経路を阻害する Lenvatinib は、腫瘍増殖と腫瘍血管新生の阻害を介して効果的に抗腫瘍効果を示している⁸⁴⁻⁸⁶。

肝細胞癌における FGFR2 は隣接する非腫瘍性組織と比較して肝細胞癌組織でのみ発現し、その過剰発現は門脈侵襲の増加と予後不良に関連することが報告されている^{87,88}。そのため、肝細胞癌における FGFR2 発現量の変化は、肝細胞癌患者の予後予測因子として有用である。*FGFR2* 遺伝子はヒトの 10 番染色体の長腕 (10q26.13) に位置し、その過剰発現は胃癌細胞の増殖・生存に重要な役割を果たしている (**Figure 2**)⁸⁹。FGFR2 シグナル伝達経路の制御異常は、腫瘍細胞の増殖・分化を促進する。そのため、*FGFR2* SNPs は化学療法の感受性や腫瘍増殖を調節する可能性が示唆される。*FGFR2 rs2981582* は *FGFR2* 遺伝子の転写を調節し、Sunitinib 療法における転移性淡明細胞型腎細胞癌患者の臨床転帰と関連することが報告されている^{90,91}。また、*FGFR2 rs2912791*、*rs2981429* は非小細胞肺癌患者の臨床転帰と有意に関連することが報告されている⁹²。FGFR シグナル伝達経路と乳癌の関連性を検討した全

ゲノム関連解析において、*FGFR2* SNPs は乳癌発症リスクの増加と相関することが明らかとなっている⁹³。

FGF19 は肝細胞癌組織で過剰発現しており、その FGF19/FGFR4 の阻害は肝細胞癌のアポトーシスを促進し腫瘍増殖を抑制する⁹⁴。これは、FGF19/FGFR4 シグナル伝達経路が、肝細胞癌の進行において重要な役割を果たすことを示唆している。近年、治療前の腫瘍生検サンプルにおける FGFR4 免疫組織染色が、Lenvatinib 療法における PFS の延長 (2.5 vs 5.5 months; $p = 0.01$) と客観的奏効率 (31% vs 81%; $p = 0.006$) を予測する有用な手法であることが示された⁹⁵。*FGFR4* 遺伝子の SNP である *FGFR4 rs351855* は、ヒトの 5 番染色体の長腕 (5q35.2) に位置し、*FGFR4* 遺伝子のエクソン 9 に位置する Transmembrane domain の Missense variant である (**Figure 2**)。*FGFR4 rs351855* の *T* allele 変異型は FGFR4 の安定性向上と持続的なシグナル伝達を示し、アジア人のがん感受性、乳癌、大腸癌、肺腺癌を含む複数の癌種における予後不良、および化学療法に対する抵抗性を促進する可能性がある^{83,96,97}。肝細胞癌では FGFR4 シグナル伝達経路を調節し、肝硬変を伴う肝細胞癌のリスク増加とアルファ-フェトプロテイン (Alpha-fetoprotein; AFP) 値の上昇に関連することが報告されている⁹⁸⁻¹⁰²。しかし、FGFR アイソタイプが肝細胞癌の増殖に果たす役割について、一定の見解は得られていない^{99,103,104}。そのため、臨床現場での汎用性が高く、侵襲性の少ない *FGFR* SNPs と臨床転帰の関連について検討が必要である。

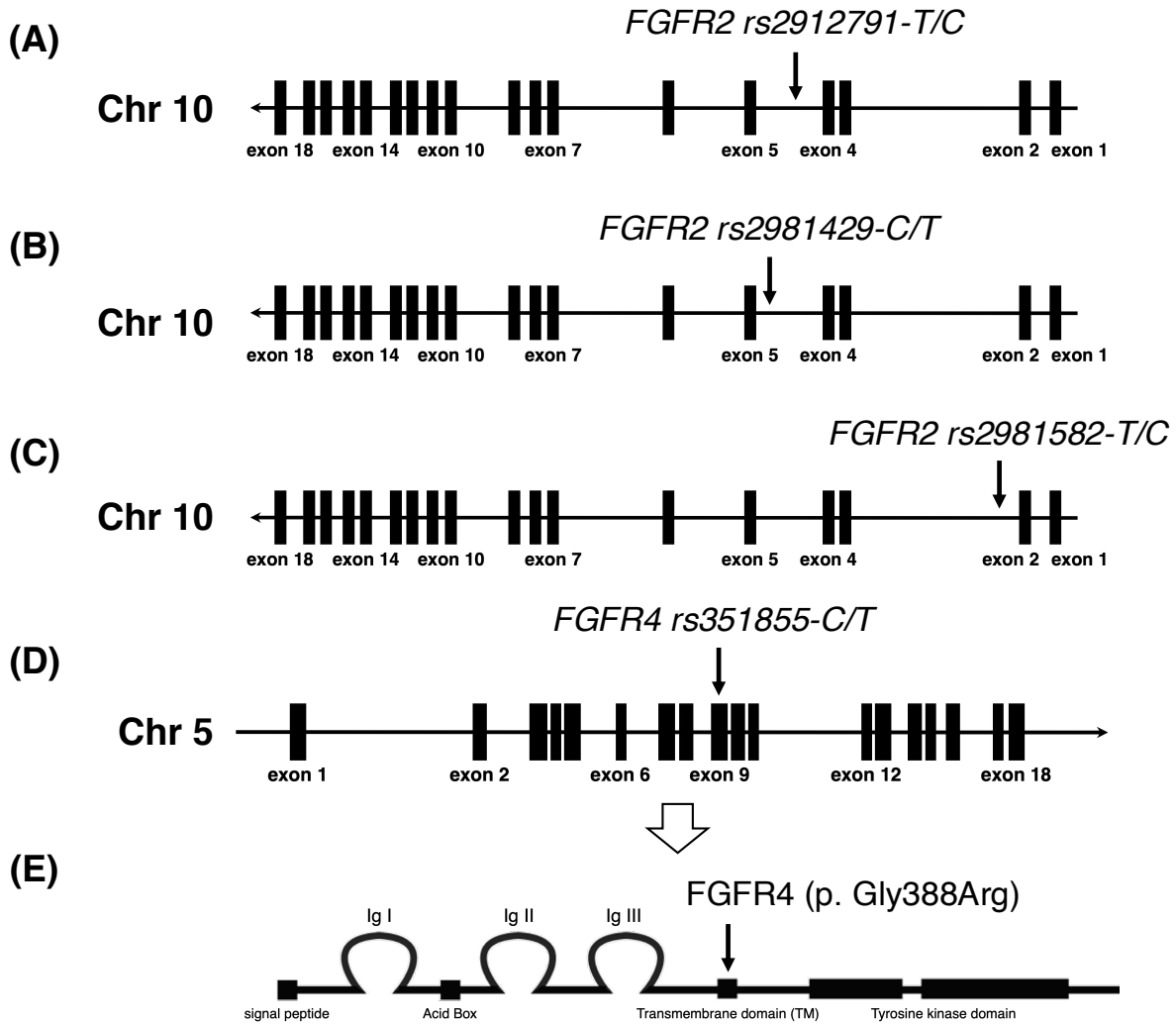


Figure 2. Gene map showing the exon/intron organization of (A) *FGFR2 rs2912791*, (B) *FGFR2 rs2981429*, (C) *FGFR2 rs2981582*, and (D) *FGFR4 rs351855*. (E) Protein structure of *FGFR4 rs351855*. The exons are shown as numbered black boxes. *Arg* arginine, *Chr* chromosome, *FGFR* fibroblast growth factor receptor, *Gly* glycine.

7. 本研究の目的

肝細胞癌は肝臓サーベイランスシステムの普及、早期診断・治療法の進歩にも関わらず、依然として死亡率の上位を占める。その理由は、使用可能な薬剤が肝細胞癌に対して反応不良となるケースが存在すること、肝外転移や脈管侵襲により腫瘍の切除が不可能である場合、根治的な治療が行えず、長期的な生存が望めないことが挙げられる。Lenvatinib は VEGFR を含む受容体チロシンキナーゼを阻害することで抗腫瘍効果を発揮するため、腫瘍血管新生に関与する *NOS3 rs2070744* は Lenvatinib の臨床効果の有用な予測因子となり得る。また、Lenvatinib は Sorafenib と比較して腫瘍血管新生や薬剤耐性に重要な役割を果たす FGFR に対する強力なキナーゼ阻害活性を有しているため、Lenvatinib と Sorafenib では *NOS3* 遺伝子多型の肝細胞癌に対する応答性に違いがある可能性がある（**Figure 3**）。そこで、*NOS3 rs2070744* の臨床応用に向けたバイオマーカー探索研究として、肝細胞癌に対する Lenvatinib 療法の臨床効果に及ぼす *NOS3 rs2070744* の影響について検討を行った。さらに、Lenvatinib 療法に伴う有害事象の発現状況から、がん領域における地域の包括的な医療提供体制の構築に向けた薬剤師の役割について検討を行った。

本論文の第 1 章では、切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の臨床効果（PFS、OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率）に対する *NOS3 rs2070744*、*FGFR SNPs* の影響について述べる。第 2 章では、有害事象の発現有無、重症度に対する *NOS3 rs2070744* の影響について述べる。第 3 章では、PFS、OS に対する有害事象の重症度、発現有無の影響について述べる。

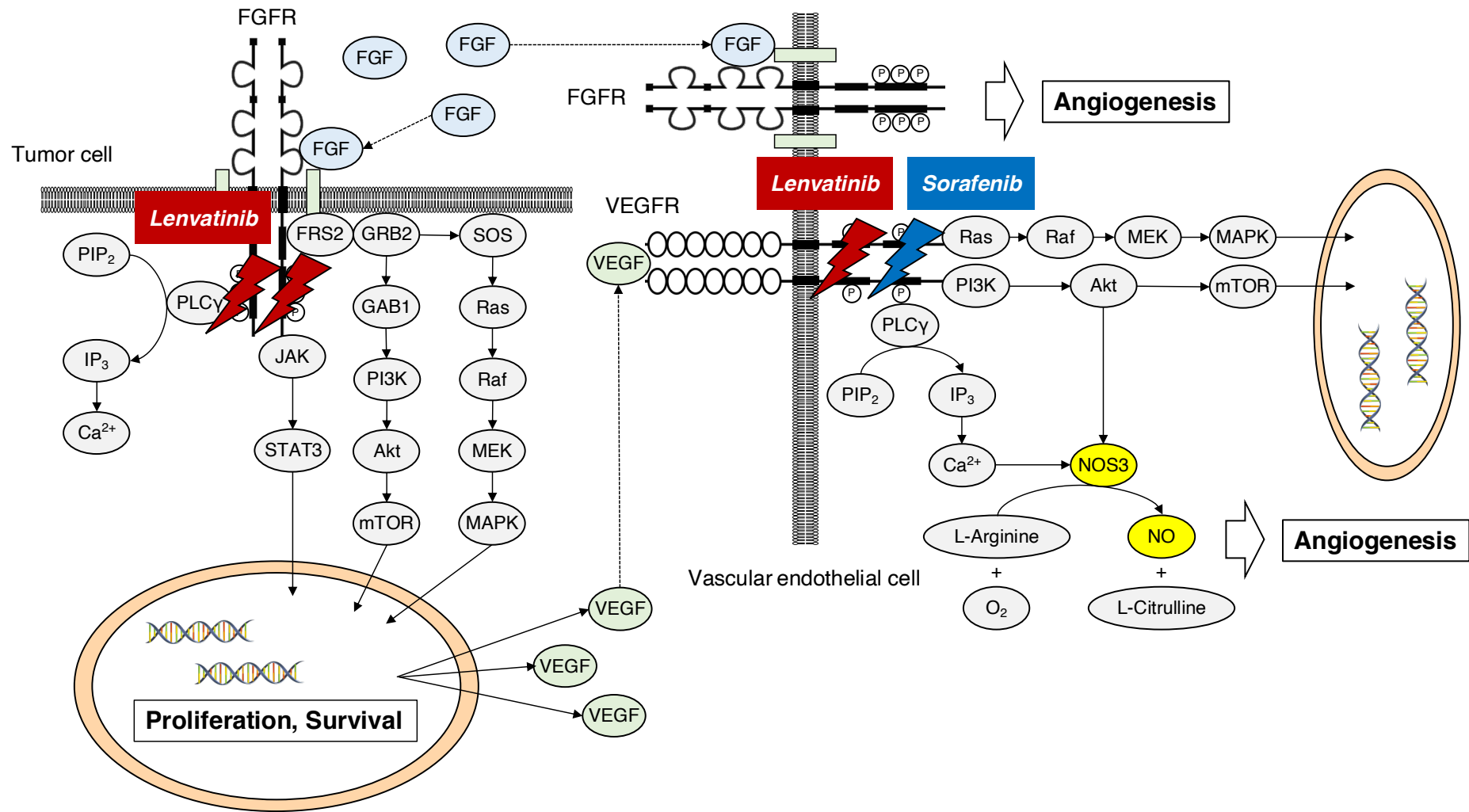


Figure 3. Targeting FGFR and VEGFR signaling in cancer. *FGFR* fibroblast growth factor receptor, *FRS2* fibroblast growth factor receptor substrate 2, *GRB2* growth factor receptor-bound protein 2, *IP₃* inositol triphosphate, *NO* nitric oxide, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *P* phosphorylation, *PIP₂* phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *PLCγ* phospholipase Cγ, *SOS* son of sevenless, *STAT3* signal transducer and activator of transcription 3, *VEGFR* vascular endothelial growth factor receptor.

II. 本論

第1章 臨床効果に対する *NOS3* および *FGFR* 遺伝子多型の影響

1.1. 対象

本研究に登録された 168 例のうち、適格基準をすべて満たし、除外基準のいずれにも該当しない全 100 例を解析対象症例とした。神奈川県内の Kitasato University Hospital（北里大学病院）、Yokohama City University Medical Center（横浜市立大学附属市民総合医療センター）、Shonan Kamakura General Hospital（湘南鎌倉総合病院）から関連する臨床データを収集した（**Figure 4**）。Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital（湘南藤沢徳洲会病院）の全ての症例は、本研究に含まれる基準を満たしていなかったため解析対象症例から除外された。フォローアップ期間中央値は、12.2（interquartile range [IQR] 5.7–17.7）months であった。

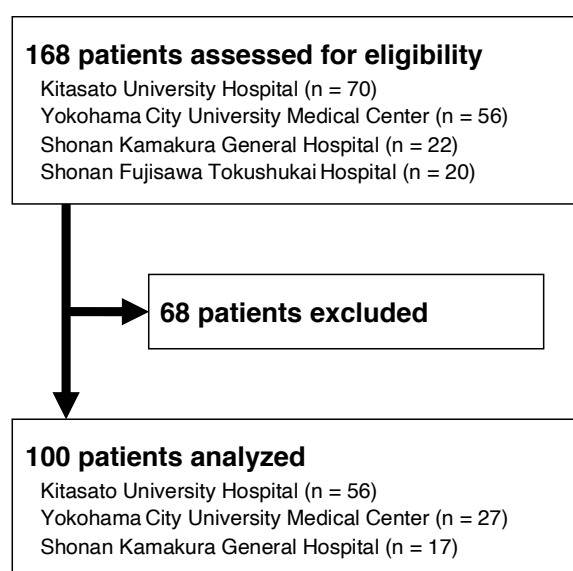


Figure 4. Trial profile of this study.

1.2. 患者背景

NOS3 rs2070744 の Wild type（野生型ホモ；TT）群（TT 群）、Hetero type（ヘテロ；TC）群（TC 群）、および Mutant type（変異型ホモ；CC）群（CC 群）の頻度は、それぞれ 76%、23%、および 1% であった（**Table 2**）。

Table 2. Genotype frequency at single nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	N (%)			
		Wild type	Hetero type	Mutant type	Hetero type + Mutant type
NOS3	rs2070744	TT (76)	TC (23)	CC (1)	TC + CC (24)

NOS3 nitric oxide synthase 3, SNP single nucleotide polymorphism.

NOS3 rs2070744 の Wild type 群 (TT 群) および Hetero type + Mutant type 群 (TC + CC 群) の頻度は、それぞれ 76% および 24% であった。Wild type、Hetero type、および Mutant type の割合は、「1,000 人ゲノムプロジェクト (東アジア)」における報告と同程度であり、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱は検出されなかった (Table 3)。

Table 3. Chromosome and biological effect of studied single-nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	Chr	Functional consequence	AA change	1000 Genomes (East Asian)		Activity
					Reference allele	Alternative allele	
NOS3	rs2070744	7	Intron variant	N/A	T = 0.8790	C = 0.1210	↓

AA amino acid, Chr chromosome, N/A not available, NOS3 nitric oxide synthase 3, SNP single-nucleotide polymorphism.

主な患者背景 (TT 群/TC + CC 群) は、年齢中央値が 73.0 歳/72.0 歳、男性が 71%/58%、体重 (≥ 60 kg) は 58%/63% であった。米国東海岸癌臨床試験グループによる Performance status (Eastern cooperative oncology group-Performance status; ECOG-PS) は、国際的な全身状態の指標として広く使用されており、患者の日常生活の制限の程度を示す。ECOG-PS 0 (Score 0 : 全く問題なく活動できる。発病前と同じ日常生活が制限なく行える。) は、93%/100% であった。Child-Pugh 分類における 3 段階 (A・B・C) のうち、軽度の Class A に該当する患者は 83%/83% であった。バルセロナ臨床肝癌 (Barcelona Clinic Liver Cancer; BCLC) 病期分類における Stage B (Intermediate stage) は 54%/58%、Macroscopic portal vein invasion, Extrahepatic spread, or both (肉眼的門脈侵襲及び/又は肝外転移) は 36%/42%、治療前の AFP 値 (≥ 200

ng/mL) は 32%/46%であった。Prothrombin time (プロトロンビン時間) は、TT 群と TC+CC 群で有意差が認められた。その他の臨床的特徴は、両群間に有意差は認められなかった (Table 4, 5)。

Table 4. Baseline clinical characteristics of laboratory data.

Characteristics	All (N = 100)	NOS3 rs2070744		p
		TT (n = 76)	TC + CC (n = 24)	
Hemoglobin (g/dL)	12.6 (11.5–14.0)	12.8 (11.8–14.0)	12.4 (11.4–14.8)	0.735
Platelets ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	13.9 (9.4–18.6)	14.5 (9.7–18.8)	10.9 (8.7–16.1)	0.152
Prothrombin time (%)	89.5 (75.0–100.0)	92.0 (77.0–101.0)	79.0 (71.0–94.0)	0.031
Serum albumin (g/dL)	3.9 (3.4–4.2)	3.9 (3.5–4.2)	3.7 (3.3–3.9)	0.102
Blood urea nitrogen (g/dL)	14.8 (11.7–19.2)	14.6 (11.7–19.2)	14.8 (11.8–18.8)	0.997
Serum creatinine (mg/dL)	0.83 (0.68–0.97)	0.83 (0.67–0.97)	0.83 (0.71–0.97)	0.450
Aspartate aminotransferase (IU/L)	36.0 (29.5–55.0)	36.0 (28.0–54.0)	38.5 (33.5–58.5)	0.166
Alanine aminotransferase (IU/L)	26.5 (18.0–41.0)	25.0 (17.0–40.0)	29.0 (22.0–42.5)	0.248
Total bilirubin (g/dL)	0.8 (0.6–1.2)	0.8 (0.6–1.1)	1.0 (0.6–1.3)	0.144
Ammonia ($\mu\text{g/dL}$)	36.5 (24.5–54.5)	36.0 (21.0–47.5)	48.5 (31.5–68.5)	0.075
Alpha-fetoprotein (ng/mL)	24.5 (5.0–836.5)	16.8 (4.5–633.0)	115.5 (8.5–1767.0)	0.153
AFP at baseline ≥ 200 ng/mL, n (%)	35 (35)	24 (32)	11 (46)	0.226
AFP at baseline ≥ 400 ng/mL, n (%)	31 (31)	22 (29)	9 (38)	0.455
PIVKA-II (mAU/mL)	392 (74–2200)	346 (74–2420)	672 (105–1489)	0.686
ALBI grade, n (%)				
Grade 1 (≤ -2.60)	44 (44)	36 (47)	8 (33)	
Grade 2 (> -2.60 to ≤ -1.39)	54 (54)	39 (51)	15 (63)	0.372
Grade 3 (> -1.39)	2 (2)	1 (1)	1 (4)	

AFP alpha-fetoprotein, ALBI albumin-bilirubin, NOS3 nitric oxide synthase 3, PIVKA-II protein induced by vitamin K absence or antagonist II.

Table 5. Baseline clinical characteristics.

Characteristics	All (N = 100)	NOS3 rs2070744		p
		TT (n = 76)	TC + CC (n = 24)	
Median age (IQR), years	72 (66–78)	73 (66–79)	72 (65–78)	0.625
Age ≥ 65 years, n (%)	76 (76)	58 (76)	18 (75)	1.000
Age ≥ 75 years, n (%)	43 (43)	35 (46)	8 (33)	0.347
Male sex, n (%)	68 (68)	54 (71)	14 (58)	0.316
Etiology of HCC, n (%)				
Hepatitis B	17 (17)	12 (16)	5 (21)	0.504
Hepatitis C	41 (41)	34 (45)	7 (29)	
Alcohol use	15 (15)	10 (13)	5 (21)	
Non-alcoholic steatohepatitis	21 (21)	14 (18)	7 (29)	
Others	7 (7)	6 (8)	1 (4)	
ECOG-PS, n (%)				
0	95 (95)	71 (93)	24 (100)	0.333
1	5 (5)	5 (7)	0	
Child-Pugh system, n (%)				
Class A5	61 (61)	46 (61)	15 (63)	0.984
Class A6	22 (22)	17 (22)	5 (21)	
Class B	17 (17)	13 (17)	4 (17)	
Bodyweight ≥ 60 kg, n (%)	59 (59)	44 (58)	15 (63)	0.813
Median BMI (IQR), kg/m²	23.0 (21.1–25.2)	22.9 (21.1–25.1)	23.2 (20.8–26.7)	0.663
BCLC staging system, n (%)				
Stage B (intermediate stage)	55 (55)	41 (54)	14 (58)	0.815
Stage C (advanced stage)	45 (45)	35 (46)	10 (42)	
Portal vein invasion, n (%)				
vp 0	72 (72)	53 (70)	19 (79)	0.673
vp 1/2	7 (7)	5 (7)	2 (8)	
vp 3	10 (10)	9 (12)	1 (4)	
vp 4	7 (7)	5 (7)	2 (8)	
MPVI present, n (%)	18 (18)	13 (17)	5 (21)	0.727
EHS present, n (%)	25 (25)	18 (24)	7 (29)	0.589
MPVI, EHS, or both, present, n (%)	37 (37)	27 (36)	10 (42)	0.303
Up-to-seven criteria, n (%)				
within	60 (60)	45 (59)	15 (63)	0.816
beyond	40 (40)	31 (41)	9 (38)	
Maximum tumor size > 5 cm, n (%)	28 (28)	22 (29)	6 (25)	0.799
Number of tumors, n (%)				
1	14 (14)	10 (13)	4 (17)	0.703
2	13 (13)	11 (14)	2 (8)	
≥ 3	69 (69)	52 (68)	17 (71)	
UICC-TNM staging system, n (%)				
I and II	25 (25)	18 (24)	7 (29)	0.597
III and IV	75 (75)	58 (76)	17 (71)	
Tumor liver occupying rate ≥ 50%, n (%)	6 (6)	4 (5)	2 (8)	0.628
Initial dose, n (%)				
12 mg	32 (32)	23 (30)	9 (38)	0.704
8 mg	49 (49)	39 (51)	10 (42)	
4 mg	19 (19)	14 (18)	5 (21)	
RDI at 56 days ≥ 80%, n (%)	44 (44)	31 (41)	13 (54)	0.328

AFP alpha-fetoprotein, *ALBI* albumin-bilirubin, *BCLC* barcelona clinic liver cancer, *BMI* body mass index, *ECOG-PS* eastern cooperative oncology group-performance status, *EHS* extrahepatic spread, *HCC* hepatocellular carcinoma, *IQR* interquartile range, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *PIVKA-II* protein induced by vitamin K absence or antagonist II, *MPVI* macroscopic portal vein invasion, *RDI* relative dose intensity, *UICC-TNM* union for international cancer control-tumor, nodes, metastasis.

1.3. 生存時間分析

1.3.1. 無増悪生存期間（主要評価項目）

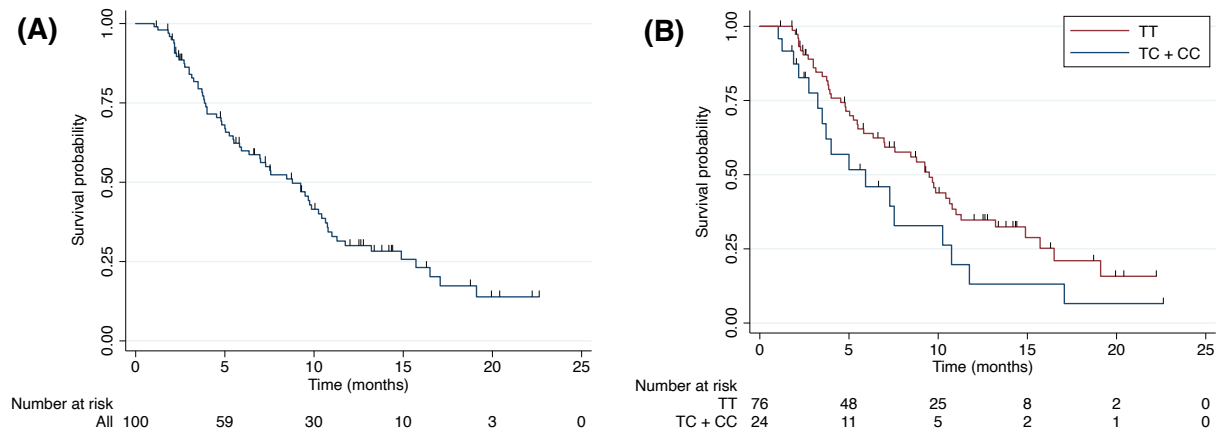
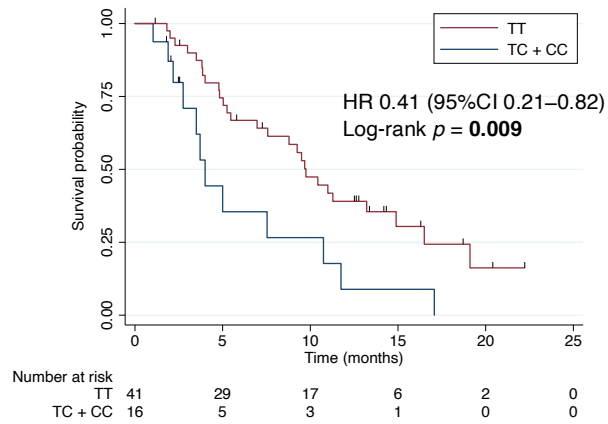
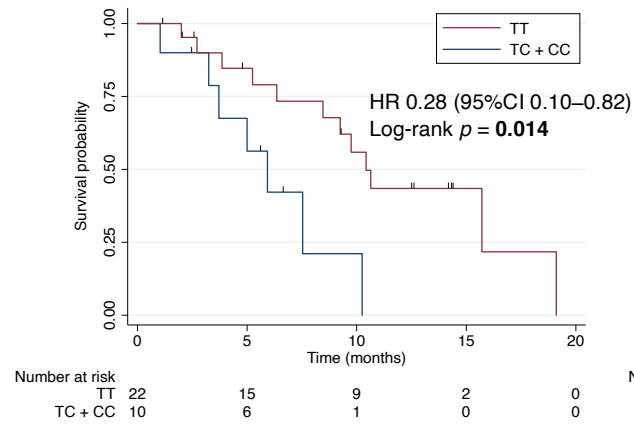
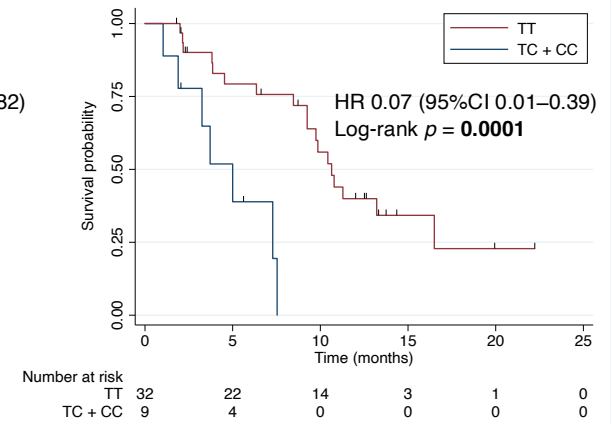
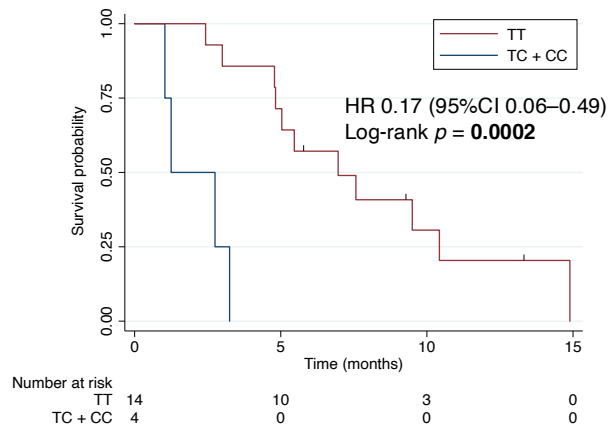
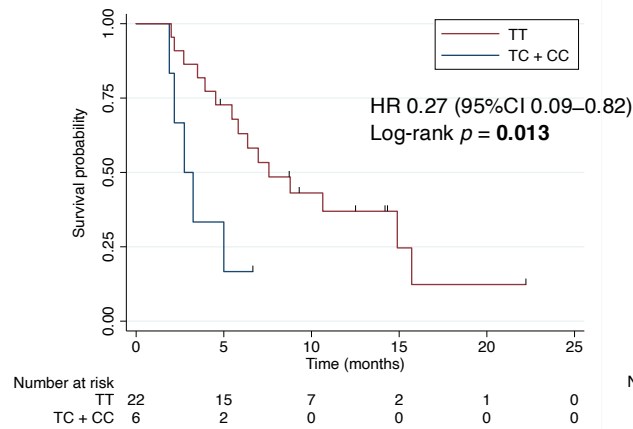
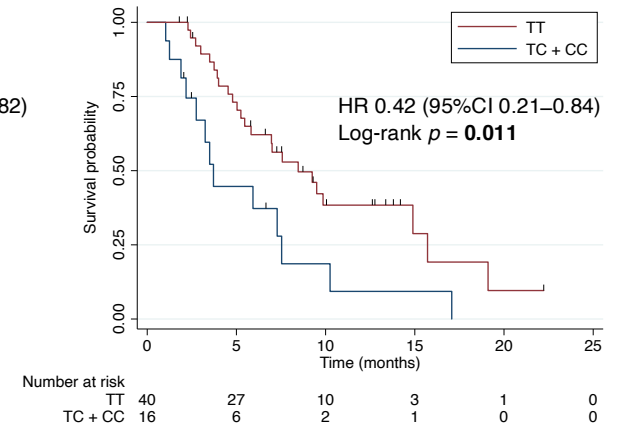


Figure 5. (A) Progression-free survival of all patients treated with Lenvatinib and (B) Effect of the *NOS3 rs2070744* on progression-free survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

解析対象症例（ $n = 100$ ）の無増悪生存期間平均値（mean Progression-free survival; mPFS）は 10.0（95%CI 8.5–11.5）months であった（**Figure 5A**）。*NOS3 rs2070744* の TT 群と TC + CC 群の mPFS はそれぞれ 10.6（95%CI 8.9–12.4）months、7.5（95%CI 4.8–10.2）months であった（**Figure 5B**）。両群間の mPFS に有意差は認められなかった（HR 0.60; 95%CI 0.34–1.05; $p = 0.069$ ）。*NOS3 rs2070744* は全体集団では有意差を示さなかったため、*NOS3 rs2070744* が良好な反応を示す集団を同定するサブグループ解析を行なった。その結果、Age (<75)、Female、Body weight (<60 kg)、Child-Pugh class B、Maximum tumor size（最大腫瘍径；>5 cm）、ALBI grade（アルブミン–ビリルビングレード；Grade ≥ 2 ）、Macroscopic portal vein invasion（肉眼的門脈侵襲；あり）、Previous therapy: RFA（前治療のラジオ波焼灼療法；なし）、Up-to-7 criteria（Up-to-seven 基準；基準外）の集団において、*NOS3 rs2070744* と PFS の間に有意差が認められた（**Figure 6**）。

Age (< 75)**Female****Body weight (< 60 kg)****Child-Pugh class B****Maximum tumor size (> 5 cm)****ALBI grade (Grade ≥ 2)**

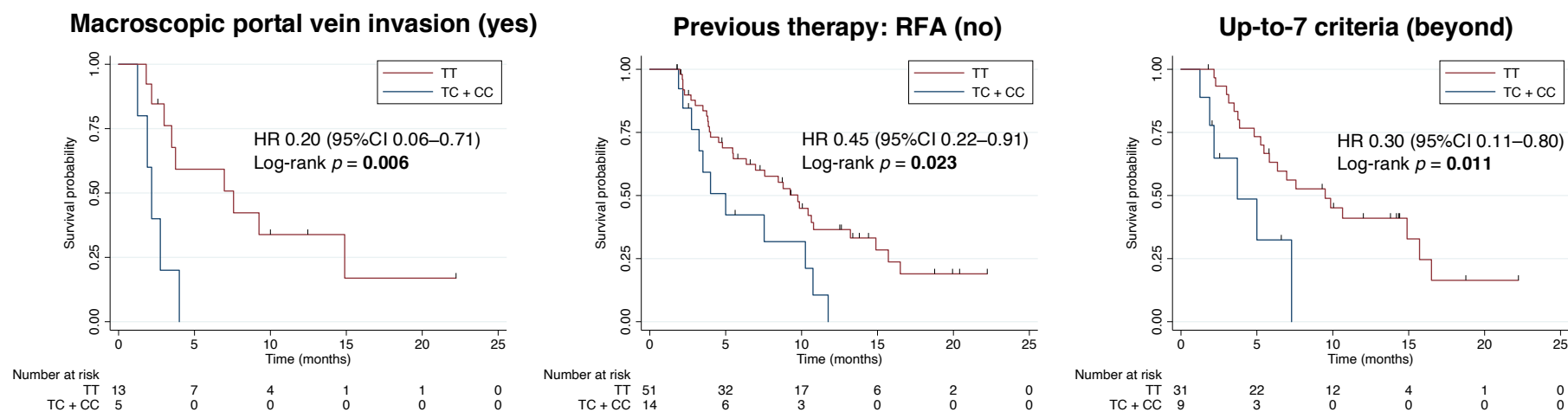


Figure 6. Effect of the *NOS3 rs2070744* on progression-free survival in the subgroup population. *ALBI* albumin-bilirubin, *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *RFA* radiofrequency ablation.

1.3.2. 全生存期間（副次評価項目）

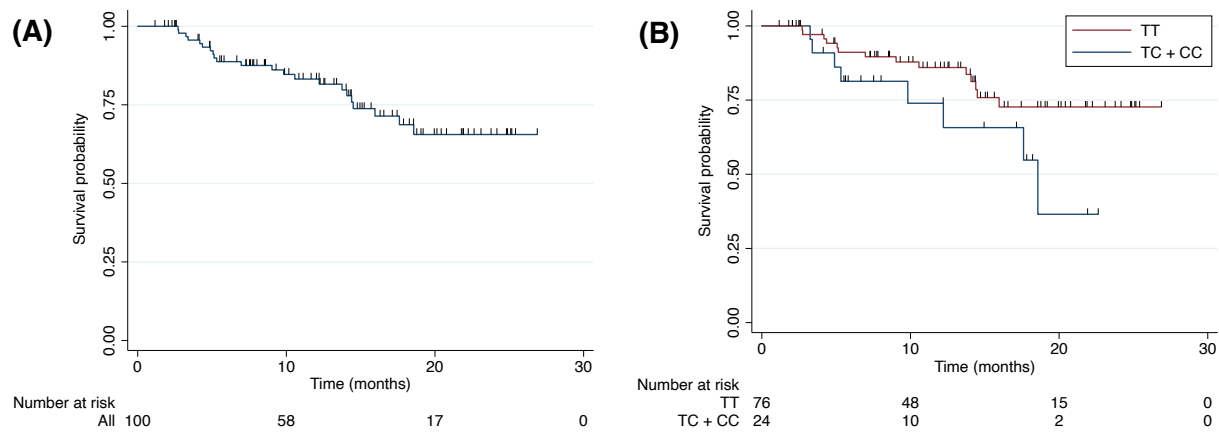


Figure 7. (A) Overall survival of all patients treated with Lenvatinib and (B) Effect of the *NOS3* rs2070744 on overall survival. CI confidence interval, HR hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

解析対象症例（ $n = 100$ ）の全生存期間平均値（mean Overall survival; mOS）は 21.3（95% CI 19.4–23.3）months であった（**Figure 7A**）。*NOS3* rs2070744 の TT 群と TC + CC 群の mOS はそれぞれ 22.3（95% CI 20.2–24.4）months、16.1（95% CI 12.7–19.4）months であった（**Figure 7B**）。両群間の mOS に有意差は認められなかった（HR 0.46; 95% CI 0.19–1.11; $p = 0.075$ ）。*NOS3* rs2070744 は全体集団では有意差を示さなかったため、*NOS3* rs2070744 が良好な反応を示す集団を同定するサブグループ解析を行なった。その結果、Maximum tumor size（最大腫瘍径； > 5 cm）、Tumor liver occupying rate（腫瘍占拠率； $< 50\%$ ）、Up-to-7 criteria（Up-to-seven 基準；基準外）の集団において、*NOS3* rs2070744 と OS の間に有意差が認められた（**Figure 8**）。

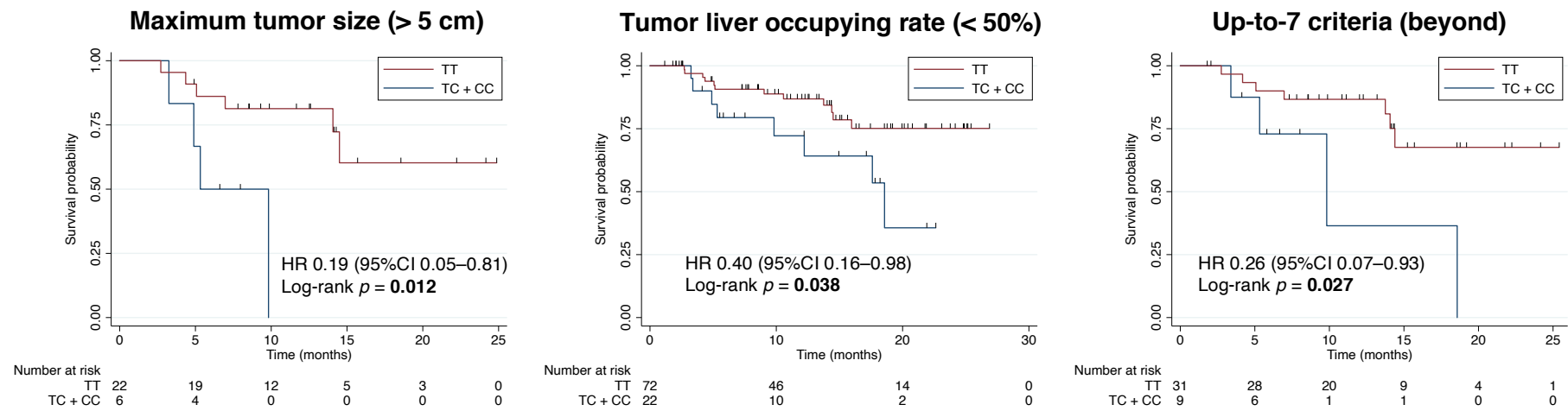


Figure 8. Effect of the *NOS3* rs2070744 on overall survival in the subgroup population. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

1.3.3. 奏効率（副次評価項目）

客観的奏効率（A）は *NOS3 rs2070744* の TT 群が 42%、TC + CC 群が 54%であった（OR 1.63; 95%CI 0.58–4.56; $p=0.351$ ）。病勢コントロール率（B）は、TT 群が 84%、TC + CC 群が 83%であった（OR 0.94; 95%CI 0.25–4.44; $p=1.000$ ）。両群間の客観的奏効率および病勢コントロール率に有意差は認められなかった（Figure 9）。

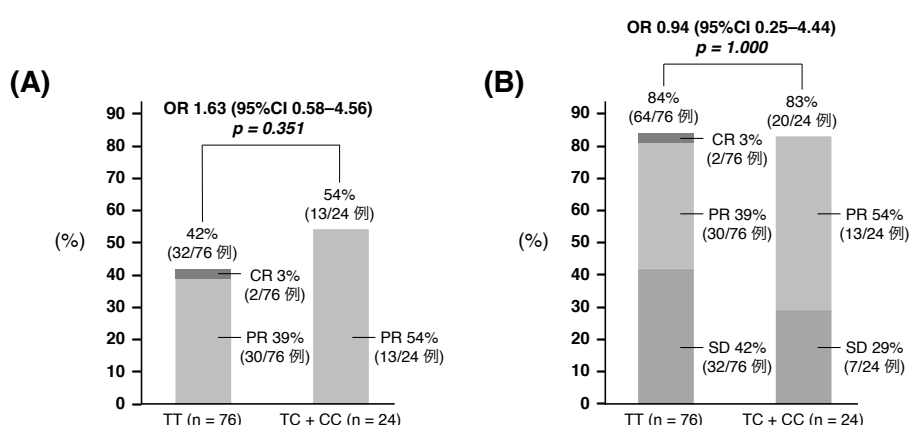


Figure 9. Effect of the *NOS3 rs2070744* on (A) Observed response rate and (B) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

1.4. 探索的評価項目

1.4.1. *FGFR* 遺伝子多型

Lenvatinib は VEGFR 阻害活性に加えて、がん細胞における腫瘍増殖・悪性化や腫瘍血管新生、薬剤耐性に重要な役割を果たす強力な *FGFR* 阻害活性を有する。そのため、Lenvatinib 療法の臨床効果に対する *FGFR SNPs* の影響を検討した。*FGFR4 rs351855* の Wild type（野生型ホモ；CC）群（CC 群）、Hetero type（ヘテロ；CT）群（CT 群）、および Mutant type（変異型ホモ；TT）群（TT 群）の頻度は、それぞれ 37%、47%、および 16%であった（Table 6）。

Table 6. Genotype frequency at single nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	N (%)			
		Wild type	Hetero type	Mutant type	Hetero type + Mutant type
FGFR2	rs2912791	TT (34)	CT (49)	CC (17)	CT + CC (66)
	rs2981429	CC (52)	CT (40)	TT (8)	CT + TT (48)
	rs2981582	TT (9)	CT (47)	CC (44)	CT + CC (91)
FGFR4	rs351855	CC (37)	CT (47)	TT (16)	CT + TT (63)

FGFR fibroblast growth factor receptor, *SNP* single nucleotide polymorphism.

FGFR4 rs351855 の Wild type 群 (CC 群) および Hetero type + Mutant type 群 (CT + TT 群) の頻度は、それぞれ 37% および 63% であった。全ての SNP における Wild type、Hetero type、および Mutant type の割合は、「1,000 人ゲノムプロジェクト (東アジア)」における報告と同程度であり、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱は検出されなかった (Table 7)。

Table 7. Chromosome and biological effect of studied single-nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	Chr	Functional consequence	AA change	1000 Genomes (East Asian)		Activity
					Reference allele	Alternative allele	
FGFR2	rs2912791	10	Intron variant	N/A	T = 0.5317	C = 0.4683	–
	rs2981429	10	Intron variant	N/A	C = 0.6706	T = 0.3294	–
	rs2981582	10	Intron variant	N/A	T = 0.3165	C = 0.6835	↓
FGFR4	rs351855	5	Missense variant	Gly388Arg	C = 0.5367	T = 0.4633	↑

AA amino acid, *Arg* arginine, *Chr* chromosome, *FGFR* fibroblast growth factor receptor, *Gly* glycine, *N/A* not available, *SNP* single-nucleotide polymorphism.

FGFR2 rs2912791 (Figure 10)、rs2981429 (Figure 11)、rs2981582 (Figure 12)、および *FGFR4* rs351855 (Figure 13) と、PFS、OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率の間に有意差は認められなかった (Table 8)。

Table 8. Effects of *FGFR* polymorphisms on progression-free survival and overall survival.

Variable	N	Progression-free survival			Overall survival		
		Mean months (95%CI)	HR (95%CI)	<i>p</i>	Mean months (95%CI)	HR (95%CI)	<i>p</i>
<i>FGFR2 rs2912791</i>							
CT + CC	66	10.4 (8.5–12.3)	1 (ref)	<i>0.490</i>	21.5 (19.1–23.8)	1 (ref)	<i>0.771</i>
TT	34	9.3 (6.8–11.8)	1.20 (0.72–1.99)		19.8 (16.6–22.9)	1.14 (0.48–2.71)	
<i>FGFR2 rs2981429</i>							
CT + TT	48	10.4 (8.2–12.5)	1 (ref)	<i>0.541</i>	21.5 (18.9–24.1)	1 (ref)	<i>0.742</i>
CC	52	9.5 (7.3–11.6)	1.17 (0.71–1.91)		19.9 (17.3–22.5)	1.15 (0.50–2.66)	
<i>FGFR2 rs2981582</i>							
CT + CC	91	10.0 (8.4–11.7)	1 (ref)	<i>0.817</i>	21.0 (19.0–23.1)	1 (ref)	<i>0.441</i>
TT	9	10.4 (7.4–13.4)	0.91 (0.39–2.11)		21.1 (15.5–26.6)	0.46 (0.06–3.45)	
<i>FGFR4 rs351855</i>							
CT + TT	63	10.3 (8.4–12.2)	1 (ref)	<i>0.552</i>	21.4 (19.0–23.8)	1 (ref)	<i>0.963</i>
CC	37	9.3 (6.9–11.7)	1.17 (0.70–1.94)		19.8 (16.9–22.6)	1.02 (0.43–2.44)	

CI confidence interval, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio.

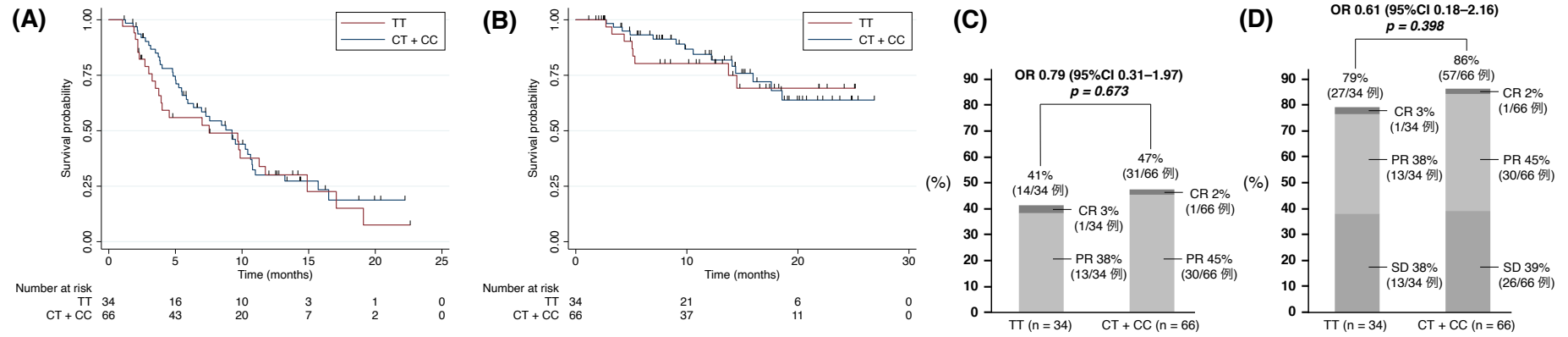


Figure 10. Effect of the *FGFR2* rs2912791 on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *HR* hazard ratio, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

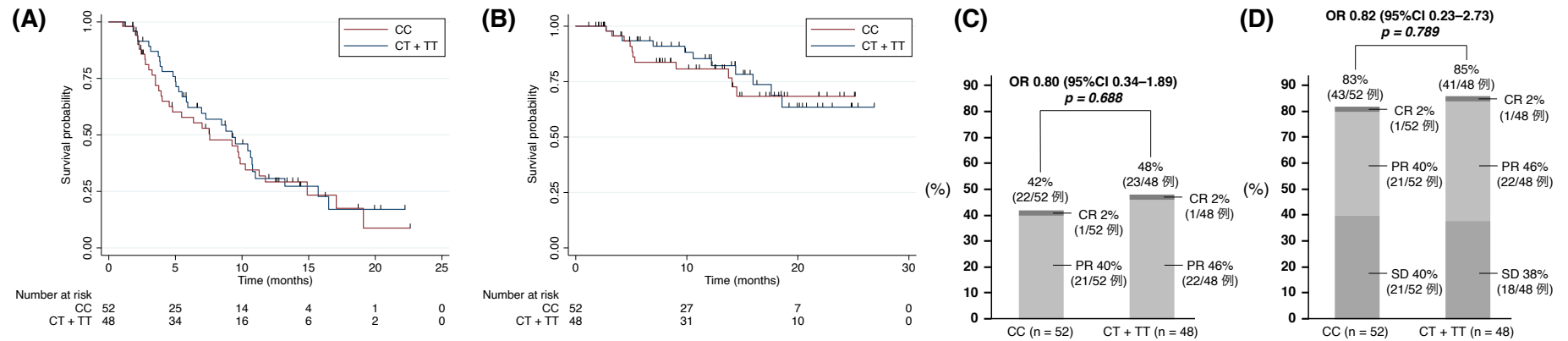


Figure 11. Effect of the *FGFR2* rs2981429 on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *HR* hazard ratio, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

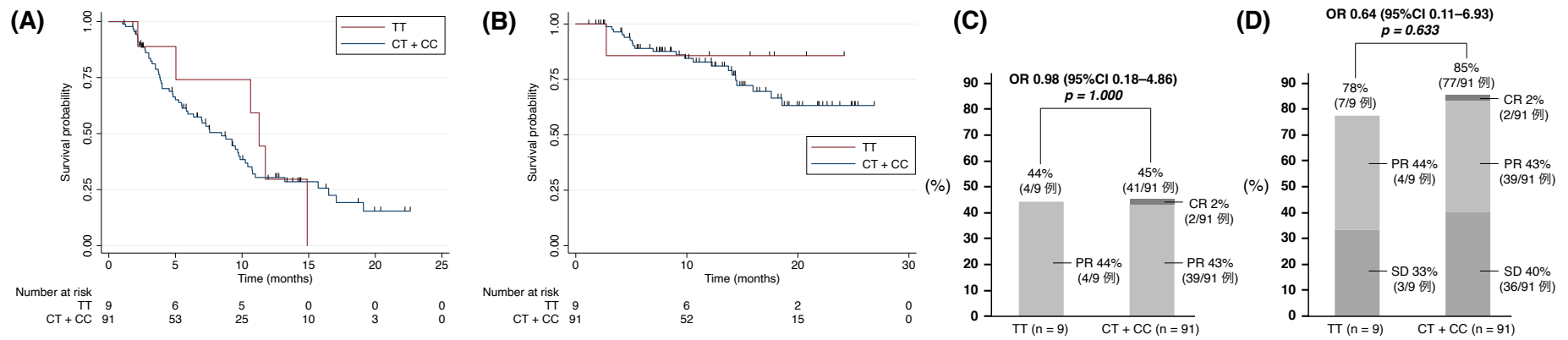


Figure 12. Effect of the *FGFR2* rs2981582 on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *HR* hazard ratio, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

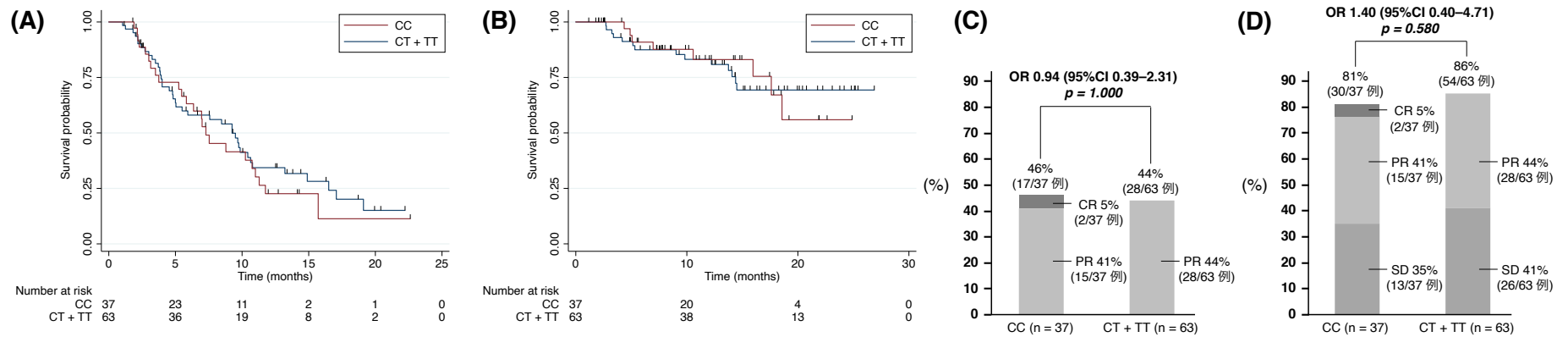


Figure 13. Effect of the *FGFR4* rs351855 on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

1.4.2. *NOS3 rs2070744* および *FGFR* 遺伝子多型の組み合わせ

肝細胞癌は多血性腫瘍であり、腫瘍血管新生に関与する NOS/NO は肝細胞癌における治療戦略として非常に有用である。また、がん細胞における FGF/FGFR の異常は、細胞増殖・分化の促進と腫瘍血管新生の調節に関与する。肝細胞癌の薬物療法は、VEGFR 阻害活性のみで十分な臨床効果を得ることは困難である。そのため、腫瘍血管新生と腫瘍増殖に関与する NOS3 と FGFR の作用を考慮することは、肝細胞癌の有望な治療戦略である。そこで、Lenvatinib 療法の臨床効果に対する *NOS3* および *FGFR* SNPs の組み合わせ (Hetero/Mutant type + Hetero/Mutant type vs Wild type + Wild type、またはどちらか一方が Wild type) の影響について検討した。

その結果、*NOS3 rs2070744* + *FGFR2 rs2912791* (**Figure 14**)、+ *rs2981429* (**Figure 15**)、および + *rs2981582* (**Figure 16**) では、PFS、客観的奏効率、および病勢コントロール率との間に臨床的な有意差は認められなかった (**Table 9**)。また、*NOS3 rs2070744* + *FGFR2* SNPs の組み合わせは、OS との間に有意差が認められた。*NOS3 rs2070744* および *FGFR4 rs351855* の組み合わせは、*NOS3 rs2070744* + *FGFR4 rs351855* の Hetero/Mutant type + Hetero/Mutant type 群 (TC/CC + CT/TT 群) が 13 例、Wild type + Wild type、またはどちらか一方が Wild type 群 (Others 群) が 87 例であった。TC/CC + CT/TT 群と Others 群の mPFS はそれぞれ 6.0 (95% CI 2.7–9.3) months、10.6 (95% CI 9.0–12.3) months であった (**Figure 17A**)。TC/CC + CT/TT 群は Others 群と比較して有意に短い mPFS を示した (HR 2.56; 95% CI 1.28–5.09; $p = 0.006$)。同様に、TC/CC + CT/TT 群と Others 群の mOS はそれぞれ 12.0 (95% CI 8.1–15.8) months、22.0 (95% CI 20.1–24.0) months であった (**Figure 17B**)。TC/CC + CT/TT 群は Others 群と比較して有意に短い mOS を示した (HR 3.36; 95% CI 1.21–9.29; $p = 0.013$)。客観的奏効率は TC/CC + CT/TT 群が 31%、Others 群が 47% であった (OR 0.50; 95% CI 0.10–1.97; $p = 0.373$)。病勢コントロール率は、TC/CC + CT/TT 群が 77%、Others 群が 85% であった (OR 0.59; 95%

CI 0.13–3.77; $p = 0.432$)。両群間の客観的奏効率および病勢コントロール率に有意差は認められなかった (**Figure 17C, D**)。

Table 9. Effect of the *NOS3 rs2070744* and *FGFR* polymorphisms combination pattern on progression-free survival and overall survival.

Variable	N	Progression-free survival			Overall survival		
		Mean months (95%CI)	HR (95%CI)	<i>p</i>	Mean months (95%CI)	HR (95%CI)	<i>p</i>
<i>NOS3 rs2070744 + FGFR2 rs2912791</i>							
Others	85	10.5 (8.8–12.2)	1 (ref)	0.046	22.2 (20.2–24.2)	1 (ref)	0.014
TC/CC + CT/CC	15	6.1 (4.3–7.9)	2.00 (1.00–4.01)		13.8 (10.5–17.1)	3.11 (1.20–8.06)	
<i>NOS3 rs2070744 + FGFR2 rs2981429</i>							
Others	89	10.3 (8.7–12.0)	1 (ref)	0.147	22.1 (20.1–24.1)	1 (ref)	0.016
TC/CC + CT/TT	11	6.2 (4.2–8.2)	1.80 (0.80–4.01)		13.7 (10.0–17.4)	3.24 (1.18–8.88)	
<i>NOS3 rs2070744 + FGFR2 rs2981582</i>							
Others	77	10.6 (8.9–12.4)	1 (ref)	0.049	22.4 (20.3–24.4)	1 (ref)	0.042
TC/CC + CT/CC	23	7.3 (4.4–10.1)	1.76 (1.00–3.12)		15.7 (12.3–19.2)	2.41 (1.01–5.76)	
<i>NOS3 rs2070744 + FGFR4 rs351855</i>							
Others	87	10.6 (9.0–12.3)	1 (ref)	0.006	22.0 (20.1–24.0)	1 (ref)	0.013
TC/CC + CT/TT	13	6.0 (2.7–9.3)	2.56 (1.28–5.09)		12.0 (8.1–15.8)	3.36 (1.21–9.29)	

CI confidence interval *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

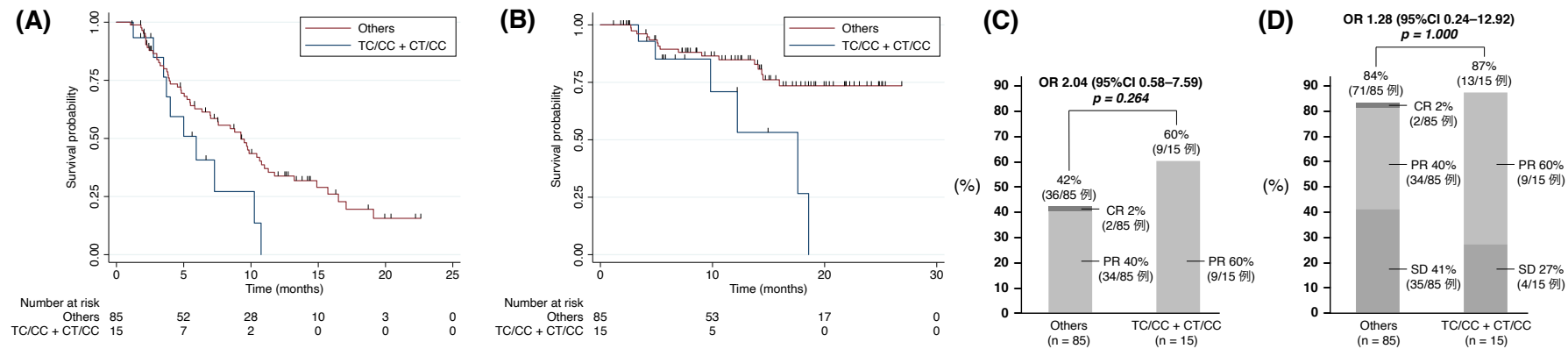


Figure 14. Effect of the *NOS3* rs2070744 and *FGFR2* rs2912791 combination pattern on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

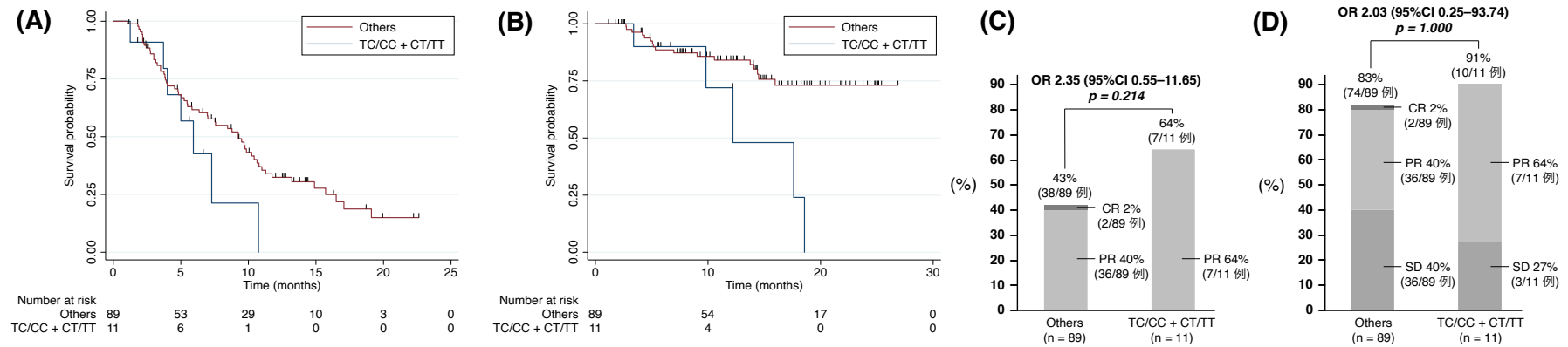


Figure 15. Effect of the *NOS3* rs2070744 and *FGFR2* rs2981429 combination pattern on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

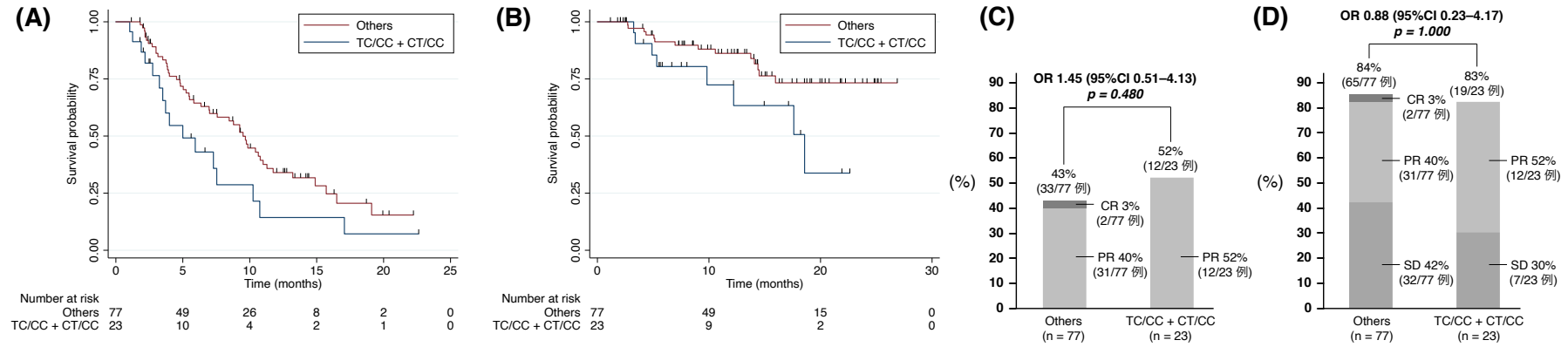


Figure 16. Effect of the *NOS3* rs2070744 and *FGFR2* rs2981582 combination pattern on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

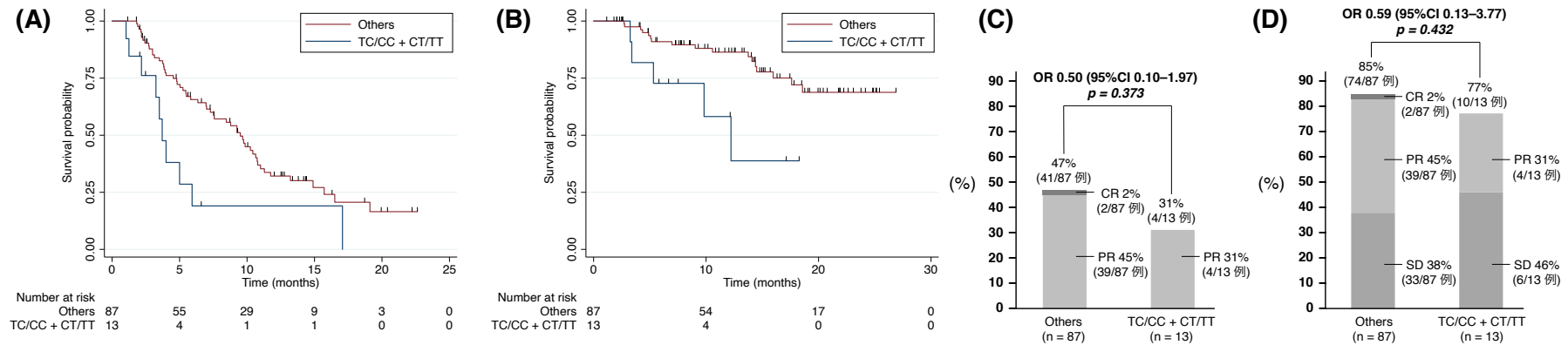


Figure 17. Effect of the *NOS3* rs2070744 and *FGFR4* rs351855 combination pattern on (A) Progression-free survival, (B) Overall survival, (C) Observed response rate, and (D) Disease control rate. *CI* confidence interval, *CR* complete response, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *PR* partial response, *SD* stable disease.

1.5. 単変量解析と多変量解析

Lenvatinib 療法の臨床効果に対する *NOS3* および *FGFR* SNPs の影響について検討するため、コックスの比例ハザードモデルを用いて PFS、OS と患者背景との関連性を評価した。

単変量解析の結果、Child-Pugh system (Class A vs Class B)、*NOS3 rs2070744 + FGFR4 rs351855* genotypes (Others vs TC/CC + CT/TT)、Subsequent therapy: Operative treatment (後治療の手術；有無)、Subsequent therapy: Radiation therapy (後治療の放射線治療；有無) が PFS と有意に関連していた。また、AFP (< 200 ng/mL vs ≥ 200 ng/mL)、AFP (< 400 ng/mL vs ≥ 400 ng/mL)、Child-Pugh system (Class A vs Class B)、Etiology of HCC: Alcohol use (アルコールの使用；有無)、Hepatic ascites (肝性腹水；有無)、Macroscopic portal vein invasion (肉眼的門脈侵襲；有無)、Maximum tumor size (最大腫瘍径；≤ 5 cm vs > 5 cm)、*NOS3 rs2070744 + FGFR2 rs2912791* genotypes (Others vs TC/CC + CT/CC)、*NOS3 rs2070744 + FGFR2 rs2981429* genotypes (Others vs TC/CC + CT/TT)、*NOS3 rs2070744 + FGFR2 rs2981582* genotypes (Others vs TC/CC + CT/CC)、*NOS3 rs2070744 + FGFR4 rs351855* genotypes (Others vs TC/CC + CT/TT)、Subsequent therapy: Best supportive care (後治療の最善の対症療法；有無)、Subsequent therapy: Molecularly targeted therapy (後治療の分子標的治療；有無)、Subsequent therapy: Operative treatment (後治療の手術；有無) が OS と有意に関連していた (Table 10)。

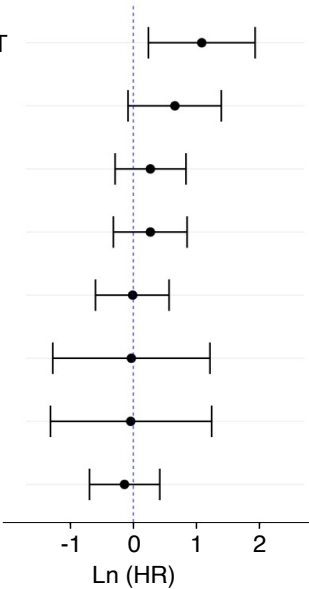
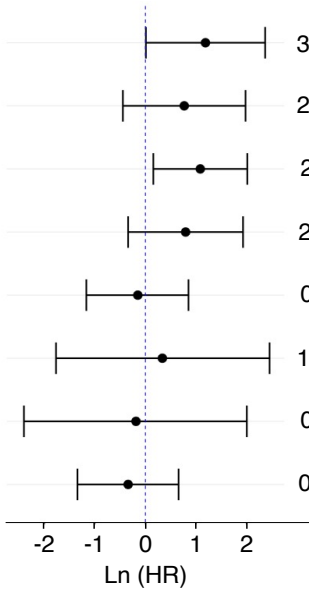
多変量解析に用いる変数は、欠損データの多い因子、単変量解析でアウトカムと関連があった因子、さらに医師との協議による医学的な意味を考慮し、選択した。その説明変数における多変量解析の結果、*NOS3 rs2070744 + FGFR4 rs351855* genotypes (Others vs TC/CC + CT/TT) は、PFS の最も独立した予測因子であった (HR 2.95; 95%CI 1.27–6.86; $p=0.012$)。また、*NOS3 rs2070744 + FGFR4 rs351855* genotypes (Others vs TC/CC + CT/TT)、および AFP (< 400 ng/mL vs ≥ 400 ng/mL) は OS の予測因子であった (Table 11)。

Table 10. Univariate analysis for baseline prognostic factors for progression-free survival and overall survival.

Variable	Category	Progression-free survival		Overall survival	
		HR (95%CI)	<i>p</i>	HR (95%CI)	<i>p</i>
AFP, ng/mL	< 200 vs ≥ 200	1.57 (0.95–2.60)	0.081	3.44 (1.47–8.08)	0.004
AFP, ng/mL	< 400 vs ≥ 400	1.50 (0.90–2.51)	0.119	3.12 (1.35–7.23)	0.008
ALBI grade	Grade 1 vs Grade ≥ 2	1.35 (0.82–2.22)	0.244	1.52 (0.64–3.60)	0.338
Age, years	< 65 vs ≥ 65	1.35 (0.76–2.41)	0.311	0.72 (0.29–1.77)	0.473
Age, years	< 75 vs ≥ 75	1.04 (0.62–1.72)	0.889	1.24 (0.53–2.93)	0.618
BCLC staging system	Stage B vs Stage C	0.99 (0.61–1.62)	0.975	1.55 (0.66–3.64)	0.314
BMI, kg/m ²	< 21 vs ≥ 21	1.39 (0.77–2.52)	0.279	2.08 (0.62–7.04)	0.238
Body weight, kg	< 60 vs ≥ 60	1.19 (0.72–1.97)	0.506	1.63 (0.67–4.02)	0.284
Child-Pugh system	Class A vs Class B	1.91 (1.06–3.44)	0.031	2.91 (1.22–6.95)	0.016
ECOG-PS	0 vs 1	0.79 (0.25–2.52)	0.685	N/A	N/A
Etiology of HCC: Non-alcoholic steatohepatitis	no vs yes	1.04 (0.57–1.88)	0.905	0.79 (0.27–2.33)	0.665
Etiology of HCC: Alcohol use	no vs yes	0.77 (0.37–1.63)	0.495	3.64 (1.45–9.16)	0.006
Etiology of HCC: Hepatitis B	no vs yes	1.64 (0.90–2.98)	0.106	0.68 (0.20–2.31)	0.542
Etiology of HCC: Hepatitis C	no vs yes	0.66 (0.39–1.12)	0.121	0.57 (0.22–1.46)	0.242
Extrahepatic spread present	no vs yes	0.67 (0.38–1.18)	0.163	0.87 (0.35–2.17)	0.768
<i>FGFR2</i> rs2912791 genotype	CT + CC vs TT	1.20 (0.72–1.99)	0.491	1.14 (0.48–2.71)	0.771
<i>FGFR2</i> rs2981429 genotype	CT + TT vs CC	1.17 (0.71–1.91)	0.542	1.15 (0.50–2.66)	0.742
<i>FGFR2</i> rs2981582 genotype	CT + CC vs TT	0.91 (0.39–2.11)	0.817	0.46 (0.06–3.45)	0.452
<i>FGFR4</i> rs351855 genotype	CT + TT vs CC	1.17 (0.70–1.94)	0.553	1.02 (0.43–2.44)	0.963
Hepatic ascites	no vs yes	1.60 (0.85–3.01)	0.146	4.40 (1.82–10.62)	0.001
Hepatic encephalopathy	no vs yes	1.70 (0.68–4.25)	0.258	1.77 (0.41–7.58)	0.443
Intrahepatic lesion	no vs yes	0.33 (0.10–1.09)	0.069	N/A	N/A
MPVI, EHS, or both, present	no vs yes	0.90 (0.55–1.50)	0.699	1.50 (0.65–3.49)	0.345
MPVI present	no vs yes	1.71 (0.93–3.14)	0.084	3.89 (1.60–9.49)	0.003
Maximum tumor size, cm	≤ 5 vs > 5	1.26 (0.74–2.14)	0.397	2.70 (1.15–6.33)	0.022
<i>NOS3</i> rs2070744 genotype	TC + CC vs TT	0.60 (0.34–1.05)	0.073	0.46 (0.19–1.11)	0.083
<i>NOS3</i> rs2070744 + <i>FGFR2</i> rs2912791 genotypes	Others vs TC/CC + CT/CC	2.00 (1.00–4.01)	0.051	3.11 (1.20–8.06)	0.020
<i>NOS3</i> rs2070744 + <i>FGFR2</i> rs2981429 genotypes	Others vs TC/CC + CT/TT	1.80 (0.80–4.01)	0.153	3.24 (1.18–8.88)	0.022
<i>NOS3</i> rs2070744 + <i>FGFR2</i> rs2981582 genotypes	Others vs TC/CC + CT/CC	1.76 (0.99–3.12)	0.052	2.41 (1.01–5.76)	0.048
<i>NOS3</i> rs2070744 + <i>FGFR4</i> rs351855 genotypes	Others vs TC/CC + CT/TT	2.56 (1.28–5.09)	0.008	3.36 (1.21–9.29)	0.020
Number of tumors	< 4 vs ≥ 4	0.91 (0.56–1.48)	0.701	1.26 (0.54–2.93)	0.588
PIVKA-II, mAU/mL	< 100 vs ≥ 100	1.00 (0.57–1.77)	0.988	1.22 (0.45–3.31)	0.696
Portal vein invasion	VP 0–3 vs VP ≥ 4	1.13 (0.45–2.85)	0.789	1.44 (0.33–6.24)	0.622
Previous therapy: Molecularly targeted therapy	no vs yes	1.16 (0.63–2.13)	0.643	1.83 (0.54–6.18)	0.333
Previous therapy: Operative treatment	no vs yes	1.07 (0.61–1.89)	0.807	1.26 (0.46–3.43)	0.647
Previous therapy: Others	no vs yes	1.70 (0.41–7.03)	0.460	N/A	N/A
Previous therapy: Radiation therapy	no vs yes	0.91 (0.43–1.90)	0.794	N/A	N/A
Previous therapy: Radiofrequency ablation	no vs yes	0.92 (0.55–1.56)	0.769	1.82 (0.67–4.94)	0.241
Previous therapy: Transcatheter treatment	no vs yes	1.04 (0.61–1.79)	0.873	1.63 (0.68–3.89)	0.272
RDI at 56 days, %	≥ 70 vs < 70	1.09 (0.65–1.82)	0.745	1.28 (0.53–3.10)	0.588
RDI at 56 days, %	≥ 75 vs < 75	1.06 (0.64–1.77)	0.818	1.09 (0.45–2.64)	0.847
RDI at 56 days, %	≥ 80 vs < 80	1.00 (0.60–1.66)	0.988	0.83 (0.34–2.01)	0.682
Sex	female vs male	1.10 (0.64–1.89)	0.722	2.09 (0.71–6.17)	0.184
Subsequent therapy: BSC	no vs yes	1.04 (0.57–1.91)	0.891	0.23 (0.09–0.64)	0.005
Subsequent therapy: Molecularly targeted therapy	no vs yes	1.14 (0.66–1.97)	0.642	3.64 (1.16–11.39)	0.027
Subsequent therapy: Operative treatment	no vs yes	0.11 (0.02–0.50)	0.005	0.14 (0.03–0.63)	0.010
Subsequent therapy: Others	no vs yes	3.98 (0.54–29.09)	0.174	N/A	N/A
Subsequent therapy: Radiation therapy	no vs yes	0.24 (0.08–0.70)	0.009	N/A	N/A
Subsequent therapy: Radiofrequency ablation	no vs yes	0.57 (0.08–4.19)	0.579	N/A	N/A
Subsequent therapy: Transcatheter treatment	no vs yes	0.94 (0.44–2.00)	0.870	3.05 (0.40–23.07)	0.281
Tumor liver occupying rate, %	< 50 vs ≥ 50	1.03 (0.37–2.87)	0.948	1.92 (0.45–8.26)	0.381
UICC-TNM staging system	I and II vs III and IV	0.96 (0.54–1.72)	0.899	1.19 (0.40–3.53)	0.750
Up-to-seven criteria	within vs beyond	1.02 (0.62–1.68)	0.945	1.68 (0.73–3.91)	0.224

AFP alpha-fetoprotein, *ALBI* albumin-bilirubin, *BCLC* barcelona clinic liver cancer, *BMI* body mass index, *BSC* best supportive care, *CI* confidence interval, *ECOG-PS* eastern cooperative oncology group-performance status, *EHS* extrahepatic spread, *FGFR* fibroblast growth factor receptor, *HCC* hepatocellular carcinoma, *HR* hazard ratio, *MPVI* macroscopic portal vein invasion, *N/A* not available, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *PIVKA-II* protein induced by vitamin K absence or antagonist II, *RDI* relative dose intensity, *UICC-TNM* union for international cancer control-tumor, nodes, metastasis.

Table 11. Multivariable analysis for baseline prognostic factors for progression-free survival and overall survival.

Variable	Category	Progression-free survival			Overall survival		
			HR (95%CI)	p		HR (95%CI)	p
<i>NOS3</i> rs2070744 + <i>FGFR4</i> rs351855	Others vs TC/CC + CT/TT		2.95 (1.27–6.86)	0.012		3.29 (1.01–10.74)	0.049
Child-Pugh system	Class A vs Class B		1.93 (0.92–4.02)	0.080		2.16 (0.64–7.28)	0.216
AFP, ng/mL	< 400 vs ≥ 400		1.31 (0.75–2.30)	0.340		2.97 (1.17–7.54)	0.022
Age, years	< 75 vs ≥ 75		1.31 (0.73–2.34)	0.371		2.22 (0.71–6.93)	0.170
ALBI grade	Grade 1 vs Grade ≥ 2		0.99 (0.55–1.76)	0.963		0.86 (0.31–2.35)	0.765
BCLC staging system	Stage B vs Stage C		0.97 (0.28–3.36)	0.965		1.40 (0.17–11.73)	0.759
MPVI, EHS, or both, present	no vs yes		0.96 (0.27–3.45)	0.952		0.83 (0.09–7.47)	0.867
RDI at 56 days, %	≥ 80 vs < 80		0.87 (0.50–1.52)	0.626		0.71 (0.26–1.93)	0.503

AFP alpha-fetoprotein, *ALBI* albumin-bilirubin, *BCLC* barcelona clinic liver cancer, *CI* confidence interval, *EHS* extrahepatic spread, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *MPVI* macroscopic portal vein invasion, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *RDI* relative dose intensity.

NOS3 rs2070744 および *FGFR4 rs351855* の組み合わせを 3 群に分けて比較した場合、*NOS3 rs2070744* + *FGFR4 rs351855* の Hetero/Mutant type + Hetero/Mutant type (TC/CC + CT/TT) 群は 13 例、Wild type + Wild type (TT + CC) 群は 26 例、その他 (Others) 群は 61 例であった。TC/CC + CT/TT 群、TT + CC 群、Others 群の mPFS は、それぞれ 6.0 (95%CI 2.8–9.3) months、8.5 (95%CI 6.3–10.6) months、11.3 (95%CI 9.3–13.3) months であった (**Figure 18A**)。3 群間の mPFS に有意差が認められた (HR 0.82; 95%CI 0.51–1.33; $p = 0.012$)。同様に、TC/CC + CT/TT 群、TT + CC 群、Others 群の mOS は、それぞれ 12.0 (95%CI 8.1–15.8) months、20.2 (95%CI 16.6–23.7) months、22.3 (95%CI 20.1–24.5) months であった (**Figure 18B**)。3 群間の mOS に有意差が認められた (HR 0.60; 95%CI 0.27–1.30; $p = 0.043$)。

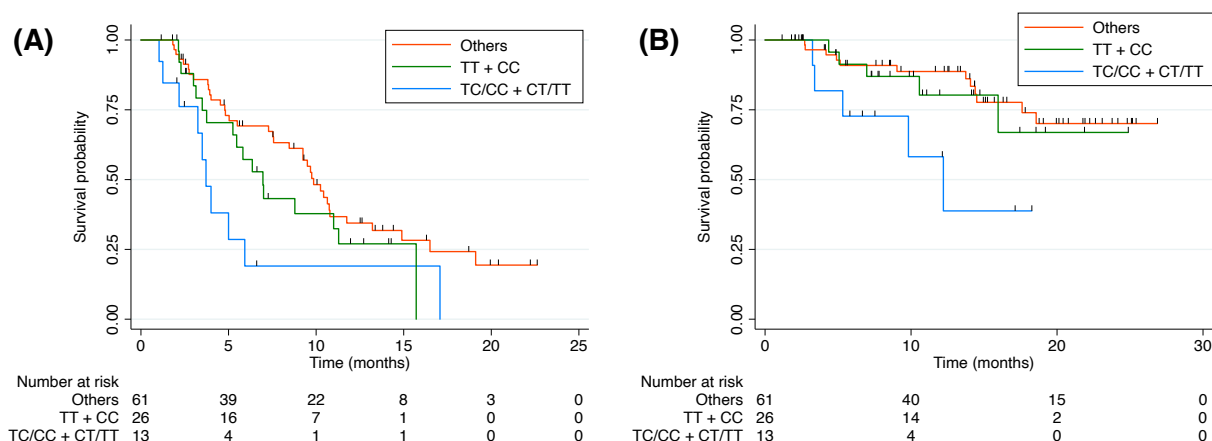


Figure 18. Effect of the *NOS3 rs2070744* and *FGFR4 rs351855* combination pattern (3 groups) on (A) Progression-free survival and (B) Overall survival. CI confidence interval, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, HR hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

1.6. 考察

本研究では、切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の臨床効果に対する *NOS3 rs2070744* の影響について検討した。過去の *NOS3* 遺伝子多型の有用性を調査した先行研究では、*NOS3 rs2070744* の Wild type 群 (TT 群) は、切除不能な肝細胞癌における Sorafenib 療法の予後不良と強く相関することが報告された⁸⁰。

NO は正常な肝血管抵抗と門脈圧の重要な調節因子であり、その産生は血流の増加、VEGF の上方制御によって増加する。肝硬変では NO 産生が増加する一方で、血流の増加に対応する能力が低下する。この肝微小循環における血管拡張機能の障害や病的血管新生の増加、内臓動脈での NO 過剰産生による血流の増加は、門脈圧亢進を誘導する重要な因子である¹⁰⁵。Sorafenib は VEGFR 阻害作用による微小血管密度の減少と腫瘍血管新生の抑制作用に加え、肝線維化の抑制、および門脈圧の低下を示す¹⁰⁶。一方、Lenvatinib は Sorafenib と比較して、門脈血行動態を反映するうっ血指数を有意に増加させ (-23.1% vs +16.2%)、門脈圧亢進症を悪化させたことから、*NOS3 rs2070744* における血管反応性に違いがある可能性が推測された¹⁰⁷⁻¹⁰⁹。その結果、*NOS3 rs2070744* の Hetero type + Mutant type (TC + CC) 群が統計学的な有意差は認めないものの予後不良を反映する傾向を認め、先行研究 Sorafenib 療法の結果と相反することを明らかにした。さらに、FGF シグナル伝達経路は、がん細胞における腫瘍増殖・悪性化や腫瘍血管新生、薬剤耐性において重要な役割を果たし、VEGFR 阻害薬への耐性メカニズムの根底にあると考えられている¹¹⁰。Lenvatinib は Sorafenib と比較して、FGF シグナル伝達経路の強力な阻害活性を有するため、*NOS3 rs2070744* および *FGFR SNPs* が、Lenvatinib 療法における臨床効果の有用な治療効果・予後予測因子となる可能性があるとは仮定した。*FGFR2 SNPs* は肝細胞癌患者の予後予測因子として有用であると考えられたが、Lenvatinib 療法の PFS、OS と有意な相関は認められなかった。しかし、*NOS3 rs2070744* および *FGFR4 rs351855* の組み合わせが、切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の PFS と OS に有意に関連していることを明らかにした。これは、*FGFR4 rs351855* の T allele 変異型が MAPK シグナル伝達経路を変化させず、FGFR4 のチロシンキナーゼドメインと無関係に細胞増殖を示すためと考えられる。この FGFR 阻害活性とは無関係に起こる腫瘍増殖は、

膜貫通セグメントの変化を介した Signal transduction and activator of transcription 3 の活性化が関与している^{97,111}。

肝細胞癌における FGF19/FGFR4 シグナル伝達経路の活性化は、細胞内の活性酸素種や NO の低下を介した Sorafenib の薬剤耐性に関与する。そのため、FGF19/FGFR4 阻害活性を有する Lenvatinib の臨床効果に対する *NOS3 rs2070744* の影響は、Sorafenib と相反する結果を示したと考えられる^{100,112,113}。また、NO は癌に対して低濃度 (≤ 500 nM) で発がん促進作用、高濃度 (> 500 nM) で細胞増殖抑制作用、細胞毒性作用の二項対立的な作用を示す¹¹⁴。既報告における NO 濃度・曝露時間は、ヒト腫瘍細胞においてアポトーシスなどの殺腫瘍効果を発揮するには不十分であり、腫瘍血管新生や転移を促進する発がん促進作用を示す可能性が示唆される¹¹⁵。また、近年の NOS/NO を用いた実験は *in vitro* で行われており、その作用は細胞の種類や酸化還元状態、細胞内濃度・曝露時間などの様々な要因に依存することから、NOS/NO による癌の予防・治療法の開発には、人を対象とした臨床研究による更なる検証が必要である。また、がんの発症メカニズムは非常に複雑なため、単一の遺伝子多型が癌の発症に大きく寄与する可能性は低いと考えられる。

近年、切除不能な肝細胞癌患者を対象とした Lenvatinib とヒト化抗ヒト Programmed death receptor-1 モノクローナル抗体 Pembrolizumab 併用療法の第Ib 相試験において、有望な有効性と管理可能な有害事象の結果が示された。これには、Lenvatinib における腫瘍血管新生阻害作用と腫瘍免疫抑制の解除の影響が考えられている¹¹⁶。腫瘍微小環境下では、NOS/NO シグナル伝達の低下によるナチュラル・キラー細胞と細胞障害性 T 細胞の機能低下¹¹⁷⁻¹¹⁹が報告されていることから、*NOS3 rs2070744* の *C allele* 変異型は腫瘍免疫の制御による予後の悪化を反映する可能性がある。

以上より、*NOS3 rs2070744* の *C allele* 変異型による腫瘍血管新生の調節と腫瘍免疫の制御、*FGFR4 rs351855* の *T allele* 変異型による腫瘍増殖の相互作用が、切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の予後悪化を有意に反映したと推察される。

本研究では、BCLC stage B の 55 例に対して Lenvatinib 療法を実施した。BCLC stage B (Intermediate stage) に対して推奨されている世界的な標準治療は肝動脈化学塞栓療法である。しかし、Up-to-seven 基準外、Child-Pugh class A の Intermediate stage 肝癌や、両葉多発結節などの肝動脈化学塞栓療法不適症例に対して、Lenvatinib の先行投与は高い奏効率と予後の延長を示すことが報告されている。これには、Lenvatinib 先行投与による低酸素誘導性 VEGF の制御と、腫瘍血管新生の正常化による肝動脈化学塞栓療法の塞栓効果増強の影響が考えられる¹²⁰。今後は、肝機能を温存しながら肝動脈化学塞栓療法に先行して Lenvatinib 療法を行うことを考慮すべきである^{15,16,121,122}。

本研究は、本邦における Intermediate stage 症例に対する Lenvatinib 療法のエビデンス蓄積と、肝動脈化学塞栓療法の治療効果に対する NOS/NO の影響への知見提供につながるものである。*NOS3 rs2070744* および *FGFR4 rs351855* を治療開始前のスクリーニングに使用するためには、NOS3/FGFR4 シグナル伝達経路の解明とバイオマーカーの臨床応用に向けた更なる検討が必要である。

1.7. 小活

切除不能な肝細胞癌に対する Lenvatinib 療法の PFS、OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率と *NOS3 rs2070744*、*FGFR SNPs* の関連性を検討した。*NOS3 rs2070744* は、PFS および OS を予測できる傾向があることを示した (Figure 5, 7)。*NOS3 rs2070744* は、客観的奏効率および病勢コントロール率と相関がないことを示した (Figure 9)。*NOS3 rs2070744* は、先行研究 Sorafenib 療法の PFS への影響と相反する結果を示した。*NOS3 rs2070744* は肝

細胞癌における Sorafenib 療法と Lenvatinib 療法の治療選択に有用であることを明らかにした。Lenvatinib は、VEGFR および FGFR チロシンキナーゼ活性を阻害することで抗腫瘍効果を発揮するため、*FGFR SNPs* の臨床効果との関連を検討した。*FGFR2 rs2912791*、*rs2981429*、*rs2981582*、および *FGFR4 rs351855* は PFS、OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率と相関がないことを示した (**Table 8, Figure 10–13**)。 *NOS3 rs2070744* と *FGFR2 rs2912791*、*rs2981429*、および *rs2981582* の組み合わせは、いずれも OS を予測できることを示した (**Table 9, Figure 14–16**)。 *NOS3 rs2070744* と *FGFR4 rs351855* の組み合わせは、PFS および OS を予測できることを示した (**Table 9, Figure 17**)。本研究は、切除不能な肝細胞癌における *NOS3/FGFR4* の腫瘍血管新生阻害効果および増殖抑制効果の重要性を示唆するとともに、*NOS3 rs2070744* および *FGFR4 rs351855* の組み合わせが、PFS の最も独立した予測因子であることを示した (**Table 10, 11**)。

以上のことから、*NOS3 rs2070744* および *FGFR4 rs351855* の組み合わせは、Lenvatinib 療法の予後予測に有用であることが明らかとなった。

第2章 有害事象に対する *NOS3* 遺伝子多型の影響

2.1. 有害事象の発現有無

NOS3 rs2070744 が肝細胞癌における Lenvatinib 療法の有害事象発現割合に与える影響を調査した。切除不能な肝細胞癌患者を対象にした本研究における有害事象は、全体集団 76 例 (76%)、*NOS3 rs2070744* の Wild type 群 (TT 群) 57 例 (75%)、Hetero type + Mutant type 群 (TC + CC 群) 19 例 (79%) に認められた (**Table 12**)。Lenvatinib による有害事象は、Anorexia (食欲減退) 59%、Fatigue (疲労) 55%、Palmar-plantar erythrodysesthesia (手掌・足底発赤知覚不全症候群) 47%、Abdominal pain (腹痛) 41%、Diarrhea (下痢) 41% が認められた。*NOS3 rs2070744* の TT 群と TC + CC 群の 2 群間における、有害事象の発現有無に相関は認められなかった。

2.2. 有害事象の重症度

本研究における有害事象のうち、Grade 1 は全体集団 67 例 (67%)、*NOS3 rs2070744* の TT 群 49 例 (64%)、TC + CC 群 18 例 (75%) に認められた (**Table 13**)。Grade 2 以上の有害事象は全体集団 69 例 (69%)、*NOS3 rs2070744* の TT 群 52 例 (68%)、TC + CC 群 17 例 (71%) に認められた。Grade 4 の有害事象は認められなかった。*NOS3 rs2070744* の TT 群と TC + CC 群の 2 群間における、Grade 2 以上の有害事象の発現に相関は認められなかった。

2.3. 有害事象と治療期間

Lenvatinib に関連した有害事象に伴う減量は 57%、中止は 46% に認められた。全体集団の有害事象による減量までの期間 (中央値) は、1.3 (IQR; 0.8–3.0) months であった。*NOS3 rs2070744* の TT 群および TC + CC 群の減量までの期間 (中央値) は、それぞれ 1.3 (IQR; 0.8–3.0) months、1.4 (IQR; 0.9–3.4) months であった。両群間に有意差は認められなかった (HR 0.84; 95%CI 0.43–1.64; $p = 0.627$)。全体集団の治療成功期間 (中央値) は、6.4 (IQR;

2.5–12.6) months であった。*NOS3 rs2070744* の TT 群および TC+CC 群の治療成功期間（中央値）は、それぞれ 6.9 (IQR; 2.5–12.9) months、5.6 (IQR; 2.4–9.0) months であった。両群間に有意差は認められなかった (HR 0.84; 95%CI 0.44–1.57; $p = 0.574$)。

Table 12. Treatment-related adverse events occurring in at least 30% of patients.

Adverse events	All (N = 100), n (%)	<i>NOS3</i> rs2070744		OR (95%CI)	<i>p</i>
		TT (n = 76), n (%)	TC + CC (n = 24), n (%)		
Any adverse event	76 (76)	57 (75)	19 (79)	0.79 (0.20–2.61)	0.789
Anorexia	59 (59)	43 (57)	16 (67)	0.65 (0.21–1.86)	0.478
Fatigue	55 (55)	40 (53)	15 (63)	0.67 (0.22–1.87)	0.483
PPE	47 (47)	32 (42)	15 (63)	0.44 (0.15–1.23)	0.102
Abdominal pain	41 (41)	29 (38)	12 (50)	0.62 (0.22–1.73)	0.346
Diarrhea	41 (41)	28 (37)	13 (54)	0.49 (0.18–1.38)	0.157
Dysgeusia	36 (36)	26 (34)	10 (42)	0.73 (0.26–2.11)	0.626
Edema	36 (36)	28 (37)	8 (33)	1.17 (0.41–3.57)	0.812
Anxiety	35 (35)	26 (34)	9 (38)	0.87 (0.31–2.57)	0.809
Hypertension	35 (35)	27 (36)	8 (33)	1.10 (0.38–3.38)	1.000

CI confidence interval, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.

Table 13. Treatment-related adverse events of varying degrees of severity occurring in at least 30% of patients.

Adverse events	All (N = 100), n (%)			NOS3 rs2070744						OR (95%CI)	
				TT (n = 76), n (%)			TC + CC (n = 24), n (%)			TT vs TC + CC (Grade ≥ 2)	p
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3		
Any adverse event	67 (67)	64 (64)	43 (43)	49 (64)	48 (63)	33 (43)	18 (75)	16 (67)	10 (42)	0.89 (0.28–2.65)	1.000
Anorexia	10 (10)	32 (32)	17 (17)	7 (9)	23 (30)	13 (17)	3 (13)	9 (38)	4 (17)	0.76 (0.27–2.11)	0.643
Fatigue	31 (31)	23 (23)	1 (1)	22 (29)	17 (22)	1 (1)	9 (38)	6 (25)	0	0.93 (0.29–3.31)	1.000
PPE	25 (25)	20 (20)	2 (2)	18 (24)	13 (17)	1 (1)	7 (29)	7 (29)	1 (4)	0.45 (0.15–1.48)	0.158
Abdominal pain	26 (26)	12 (12)	3 (3)	17 (22)	9 (12)	3 (4)	9 (38)	3 (13)	0	1.31 (0.31–7.91)	1.000
Diarrhea	24 (24)	13 (13)	4 (4)	18 (24)	7 (9)	3 (4)	6 (25)	6 (25)	1 (4)	0.37 (0.11–1.33)	0.115
Dysgeusia	29 (29)	7 (7)	0	20 (26)	6 (8)	0	9 (38)	1 (4)	0	1.97 (0.22–94.55)	1.000
Edema	24 (24)	10 (10)	2 (2)	20 (26)	7 (9)	1 (1)	4 (17)	3 (13)	1 (4)	0.59 (0.14–2.97)	0.475
Anxiety	28 (28)	4 (4)	3 (3)	20 (26)	3 (4)	3 (4)	8 (33)	1 (4)	0	1.97 (0.22–94.55)	1.000
Hypertension	15 (15)	13 (13)	7 (7)	11 (14)	10 (13)	6 (8)	4 (17)	3 (13)	1 (4)	1.33 (0.37–6.11)	0.775

CI confidence interval, G1 grade 1, G2 grade 2, G3 grade 3, NOS3 nitric oxide synthase 3, OR odds ratio, PPE palmar-plantar erythrodysesthesia.

2.4. 考察

切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の有害事象発現割合(日本人の発現割合)は、全体集団で 93.9% (100.0%) であることが報告されている。発現割合の高い有害事象は、高血圧 39.7% (49.4%)、下痢 30.0% (37.0%)、手掌・足底発赤知覚不全症候群 26.5% (51.9%)、食欲減退 25.6% (48.1%)、蛋白尿 23.9% (45.7%)、疲労 23.3% (14.8%)、および発声障害 21.8% (43.2%) であった。また、倦怠感 4.4% (18.5%)、味覚異常 4.0% (12.3%) であった^{19,20}。日本人と欧米人では有害事象の差があることに十分注意しなければならない。本研究より、実際の臨床現場における Lenvatinib 療法に伴う有害事象は、特に食欲減退 (59%)、疲労 (55%)、手掌・足底発赤知覚不全症候群 (47%)、腹痛 (41%)、下痢 (41%) であり、国際共同第Ⅲ相試験と比較して食欲減退、疲労が高頻度、高血圧が低頻度で認められた。

本研究では、*NOS3 rs2070744* の TT 群と TC+CC 群の 2 群間における、有害事象の発現有無に相関は認められなかった。先行研究では、転移性腎細胞癌の Sunitinib 療法における *VEGFA* と *NOS3* 遺伝子多型が、高血圧発現と関連することが報告された。VEGFR 阻害活性を示す Sorafenib や Lenvatinib は、NO バイオアベイラビリティを低下させ、血管収縮因子 Endothelin-1 の均衡を優位にすることで血管収縮と内皮機能障害を引き起こす¹²³⁻¹²⁷。そのため、VEGFR 阻害活性を有する分子標的薬では、高血圧が高頻度で出現する可能性がある。また、Grade 3 の高血圧は OS の予後予測因子であることが報告¹²⁸されているが、本研究における *NOS3 rs2070744* は、Grade 2 以上の有害事象発現に相関は認められなかった。これは、高血圧の客観的評価による降圧療法の早期開始と、現代の降圧薬開発による十分な血圧コントロールが可能となり、重症化を未然に予防できていると考えられる。

食欲減退、疲労は担がん患者が経験する一般的な症状であり、様々な要因を伴う主観的な症状である。日本人の神経質で生真面目な性格は、食欲減退、疲労の重症化に関与していると考えられる。疲労の症状が辛い場合には無理をしないことを事前に説明し、重症化する前

に休薬、減量を検討することが重要である。Lenvatinib に関連した有害事象による減量までの期間と治療成功期間の調査から、有害事象の発現は治療期間に影響を与えないようである。

先行研究²⁰より、Lenvatinib 開始時に高血圧を合併していた症例では、高血圧を合併しない症例と比較して高頻度に Grade 3 以上の高血圧関連の副作用が認められたことから、Lenvatinib 療法開始前と治療中の高血圧の適正な管理が求められる。NOS3 遺伝子多型は高血圧の重症例を特定し、降圧療法の早期開始と患者の生活の質の向上に役立つ可能性があるが、NOS3 と高血圧発現の関連性、予後予測因子としての有用性を示すには、今後の更なる検証が必要である。

2.5. 小活

切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の有害事象発現有無、重症度に対する NOS3 遺伝子多型の影響について検討を行った。Lenvatinib 療法における主な有害事象は、Anorexia（食欲減退）59%、Fatigue（疲労）55%、Palmar-plantar erythrodysesthesia（手掌・足底発赤知覚不全症候群）47%、Abdominal pain（腹痛）41%、Diarrhea（下痢）41%であることを示した（Table 12）。NOS3 rs2070744 の TT 群と TC+CC 群の 2 群間は、有害事象の発現有無、Grade 2 以上の有害事象発現と関連しないことを示した（Table 12, 13）。有害事象の発現は、Lenvatinib 減量までの期間と治療成功期間に影響を与えないことを示した。

以上のことから、Lenvatinib 療法において重症化しやすい有害事象を把握することができ、薬剤師による適正な薬物療法の管理が重要であることを明らかにした。また、遺伝子解析研究により、有害事象発現を予測するバイオマーカーの探索、および有害事象発現メカニズムの解明が課題となることを明らかにした。

第3章 臨床効果に対する有害事象の影響

3.1. 有害事象と無増悪生存期間、全生存期間

Lenvatinib 療法の PFS、OS に対する有害事象（重症度）の影響について検討した（Figure 19,20）。Grade 2 または 3 の Hypertension（高血圧）を発症した（Grade ≥ 2 ）群（ $n=20$ ）と Grade 1 の高血圧を発症した（Grade 1）群（ $n=15$ ）の mPFS は、それぞれ 10.9（95%CI 7.5–14.2）months、5.5（95%CI 3.1–7.8）months であった。Grade ≥ 2 群は Grade 1 群と比較して有意に長い mPFS を示した（HR 0.37; 95%CI 0.17–0.83; $p=0.012$ ）。mOS は、それぞれ 22.7（95%CI 19.1–26.3）months、16.6（95%CI 11.3–21.9）months であった。両群間に有意差は認められなかった（HR 0.38; 95%CI 0.11–1.36; $p=0.123$ ）。

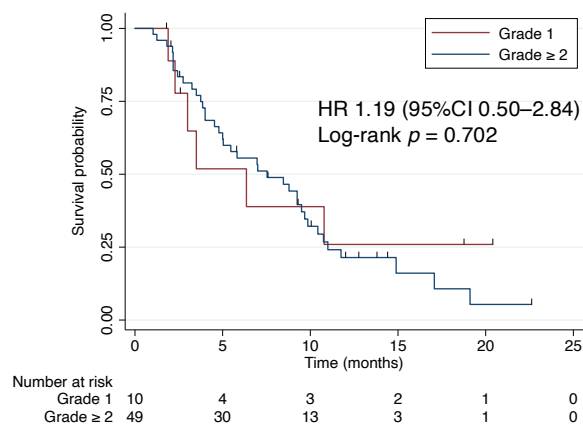
その他の Anorexia（食欲減退）、Fatigue（疲労）、Palmar-plantar erythrodysesthesia（手掌・足底発赤知覚不全症候群）、Abdominal pain（腹痛）、Diarrhea（下痢）、Dysgeusia（味覚異常）、Edema（浮腫）、Anxiety（不安）では、有害事象の重症度と PFS、OS に相関は認められなかった。

Lenvatinib 療法の PFS、OS に対する有害事象（発現有無）の影響について検討した（Figure 21,22）。Fatigue（疲労）の発現有無（yes 群 vs no 群）による mPFS は、それぞれ 8.2（95%CI 6.5–9.8）months、12.5（95%CI 9.9–15.2）months であり、疲労の発現は有意に短い mPFS を示した（HR 2.07; 95%CI 1.22–3.51; $p=0.006$ ）。Abdominal pain（腹痛）の発現有無（yes 群 vs no 群）による mPFS は、それぞれ 8.1（95%CI 6.2–10.1）months、11.6（95%CI 9.3–13.8）months であり、腹痛の発現は有意に短い mPFS を示した（HR 1.78; 95%CI 1.09–2.90; $p=0.020$ ）。Diarrhea（下痢）の発現有無（yes 群 vs no 群）による mPFS は、それぞれ 8.2（95%CI 6.2–10.2）months、11.3（95%CI 9.2–13.4）months であり、下痢の発現は有意に短い mPFS を示した（HR 1.65; 95%CI 1.01–2.71; $p=0.044$ ）。Dysgeusia（味覚異常）の発現有無（yes 群 vs no 群）による mPFS は、それぞれ 7.3（95%CI 5.8–8.8）months、11.6（95%CI 9.4–13.7）months

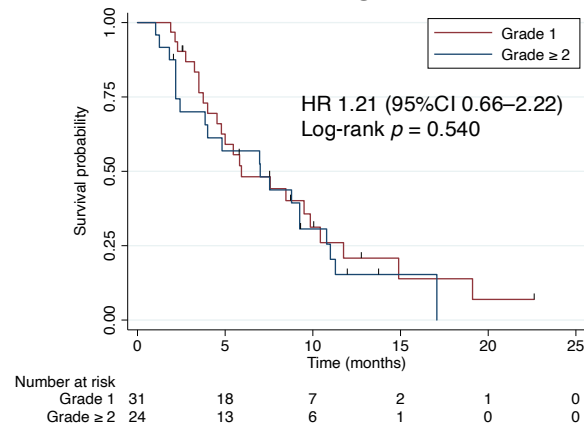
であり、味覚異常の発現は有意に短い mPFS を示した (HR 1.95; 95%CI 1.17–3.24; $p = 0.009$)。Anxiety (不安) の発現有無 (yes 群 vs no 群) による mPFS は、それぞれ 7.6 (95%CI 5.8–9.5) months、11.6 (95%CI 9.4–13.7) months であり、不安の発現は有意に短い mPFS を示した (HR 1.92; 95%CI 1.17–3.15; $p = 0.008$)。その他の Anorexia (食欲減退)、Palmar-plantar erythrodysesthesia (手掌・足底発赤知覚不全症候群)、Edema (浮腫)、Hypertension (高血圧) では、有害事象の発現有無と PFS に相関は認められなかった。

Fatigue (疲労) の発現有無 (yes 群 vs no 群) による mOS は、それぞれ 19.7 (95%CI 17.0–22.4) months、22.3 (95%CI 20.2–24.5) months であり、疲労の発現は有意に短い mOS を示した (HR 2.72; 95%CI 1.00–7.39; $p = 0.041$)。その他の Anorexia (食欲減退)、Palmar-plantar erythrodysesthesia (手掌・足底発赤知覚不全症候群)、Abdominal pain (腹痛)、Diarrhea (下痢)、Dysgeusia (味覚異常)、Edema (浮腫)、Anxiety (不安)、Hypertension (高血圧) では、有害事象の発現有無と OS に相関は認められなかった。

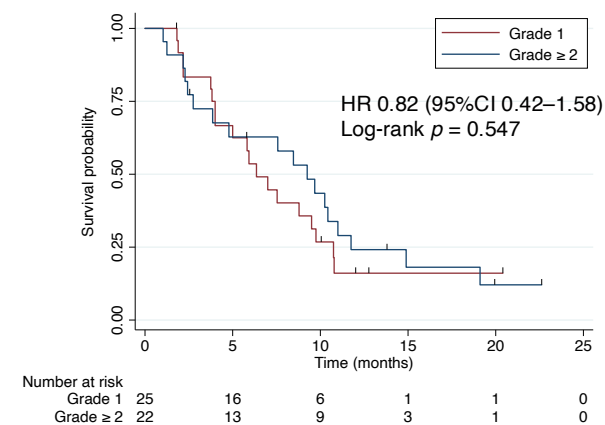
Anorexia



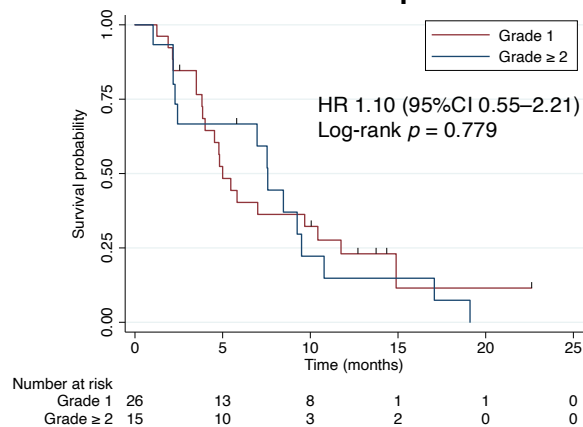
Fatigue



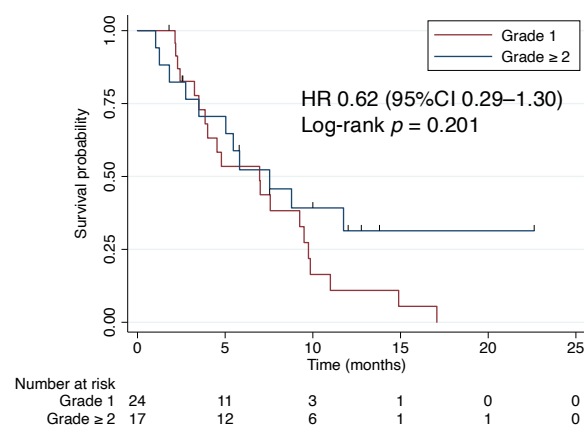
PPE



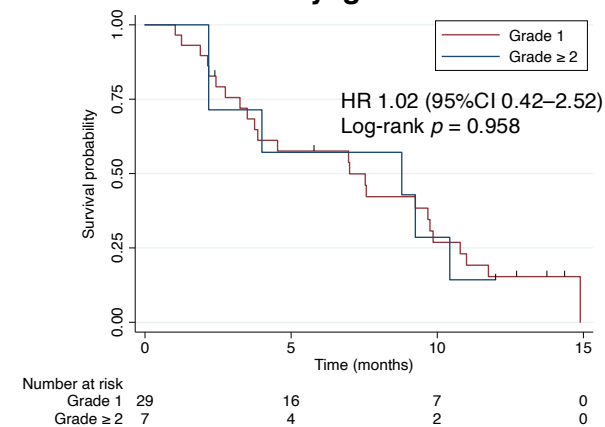
Abdominal pain



Diarrhea



Dysgeusia



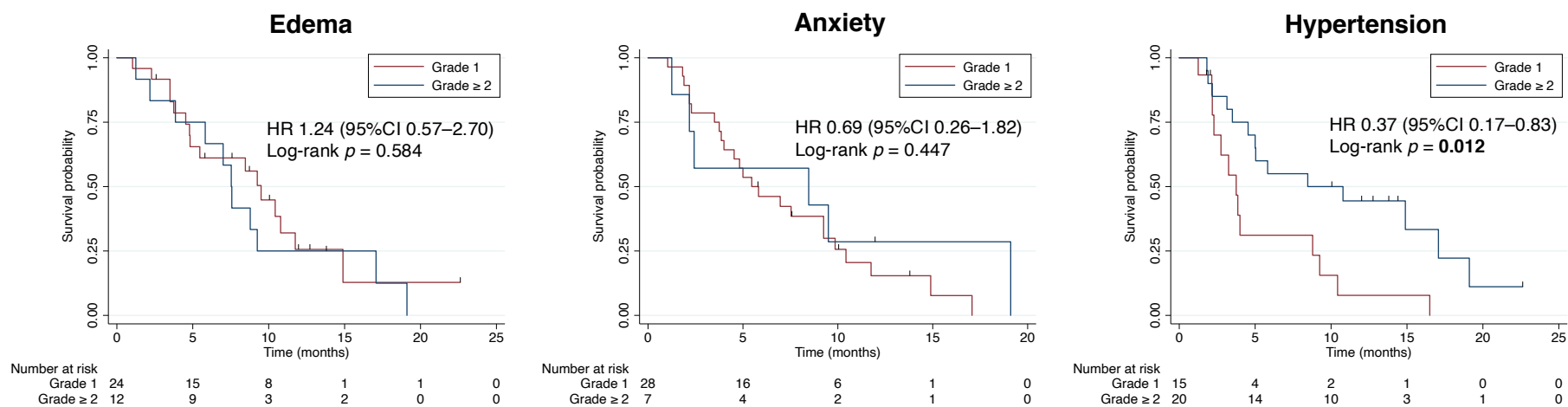
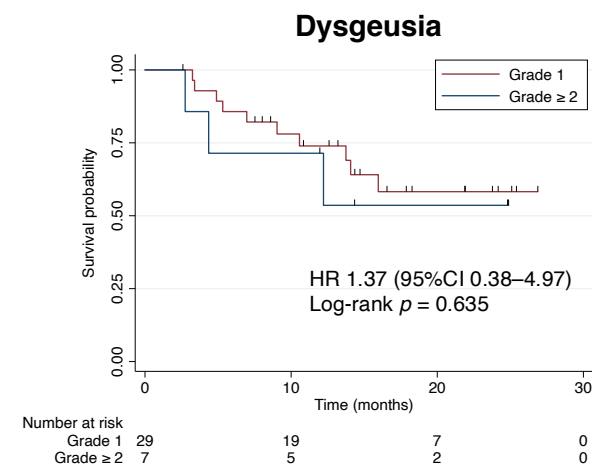
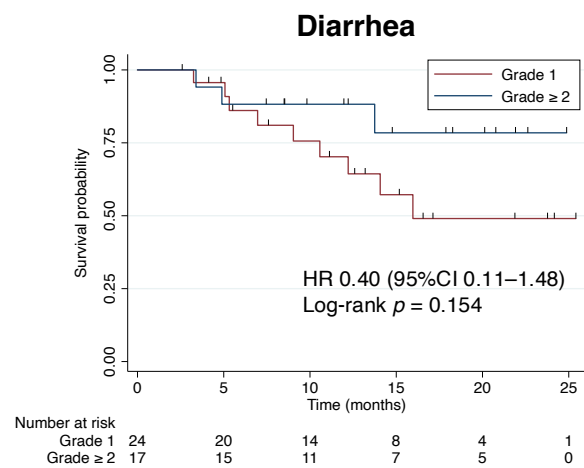
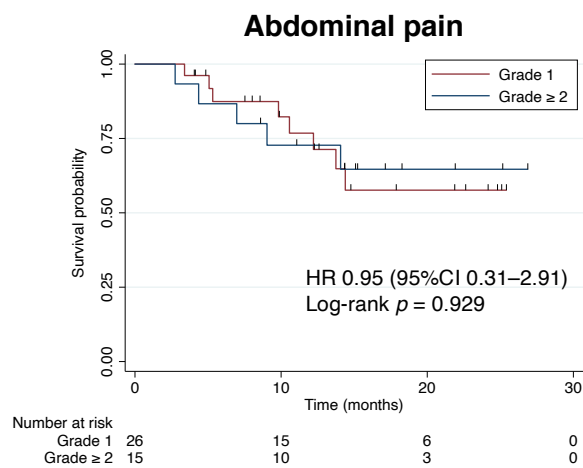
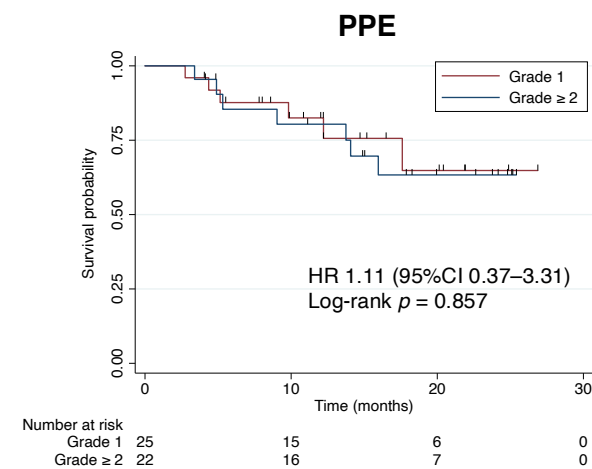
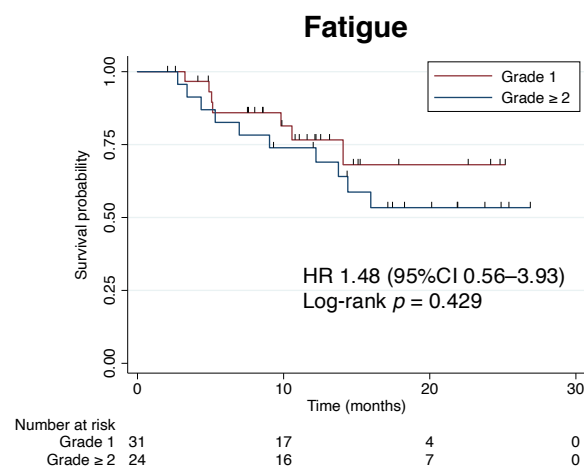
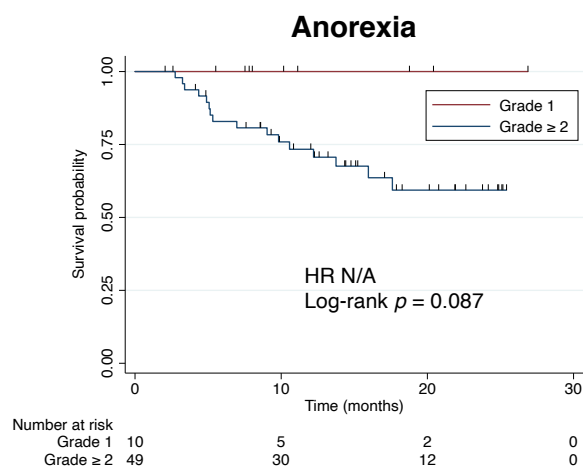


Figure 19. Effect of severity of adverse events on progression-free survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.



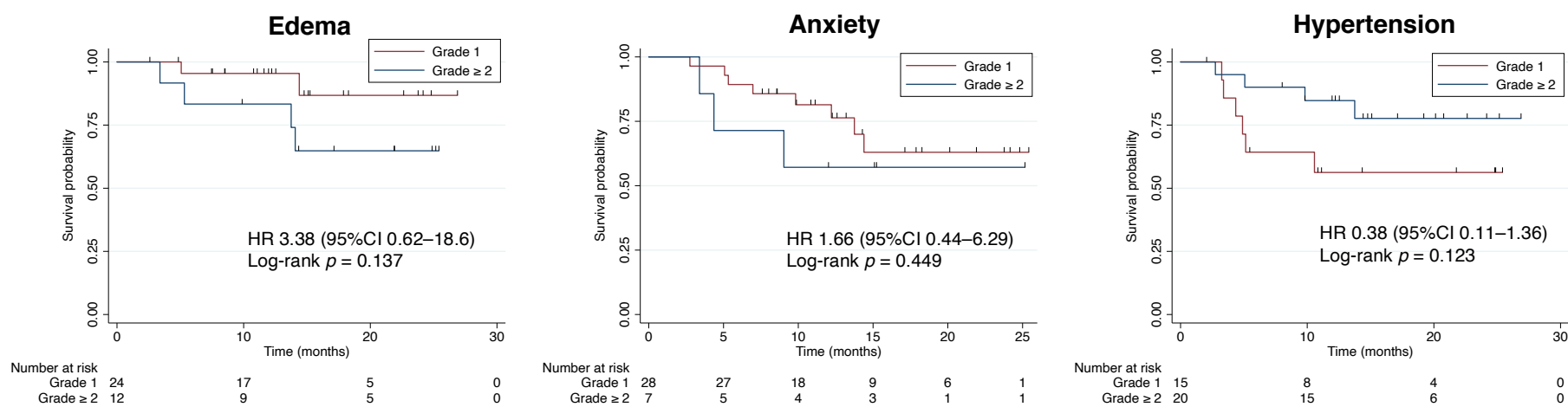
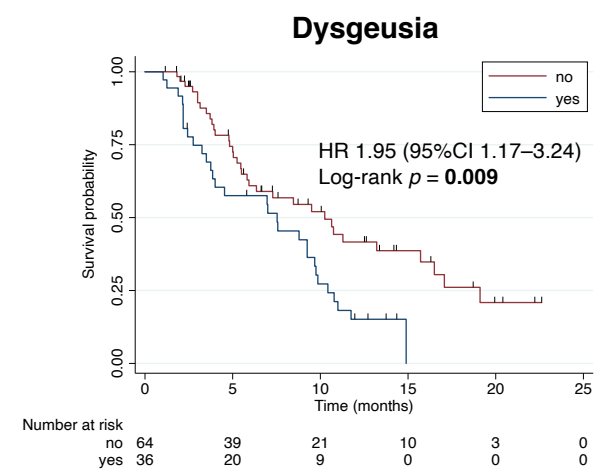
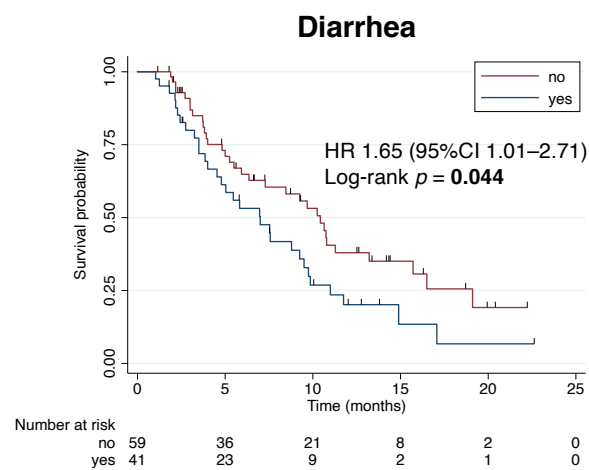
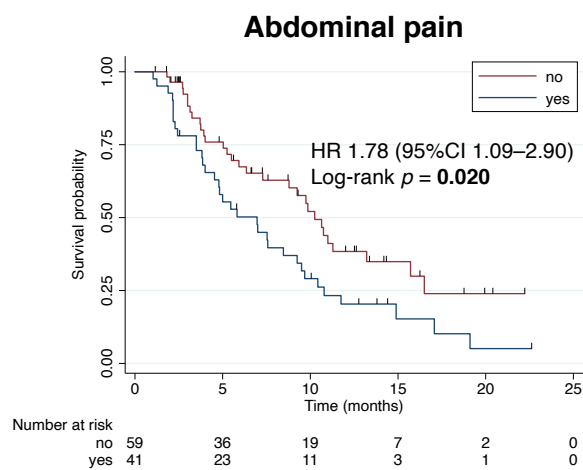
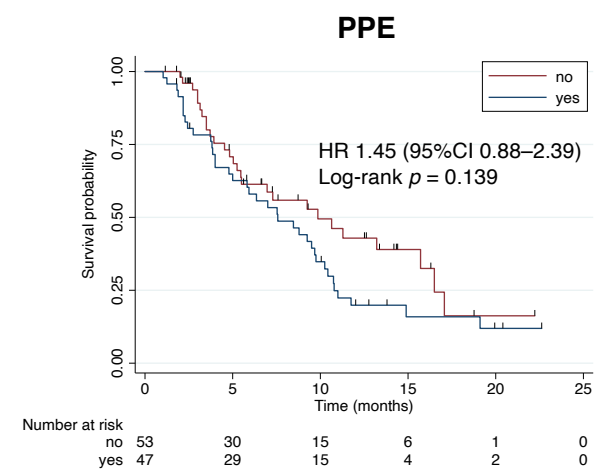
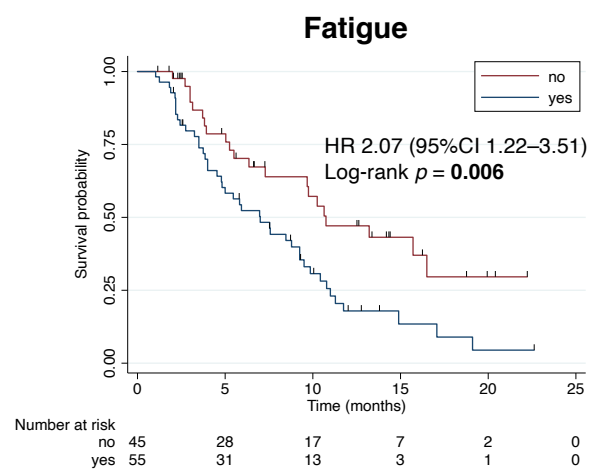
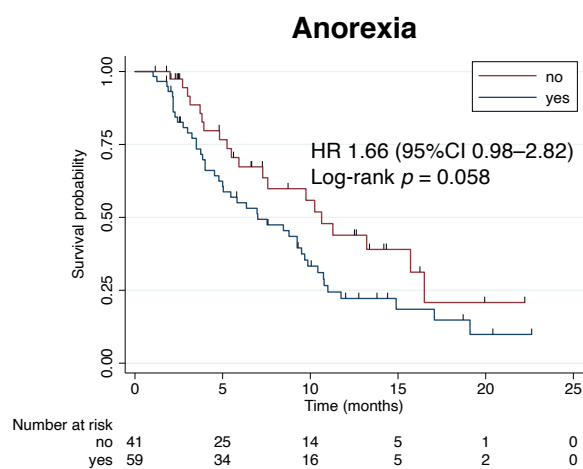


Figure 20. Effect of severity of adverse events on overall survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *N/A* not available, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.



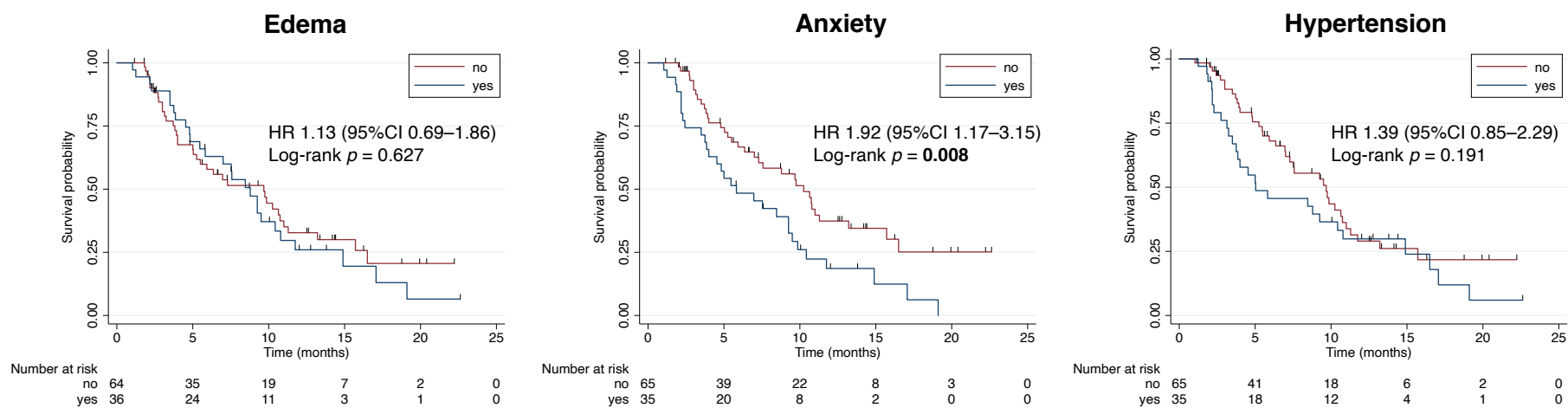
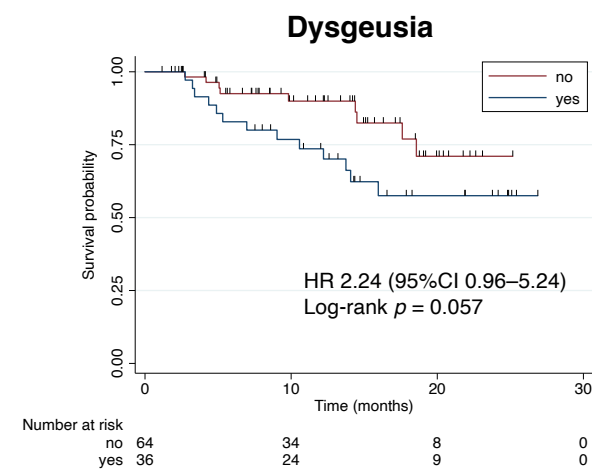
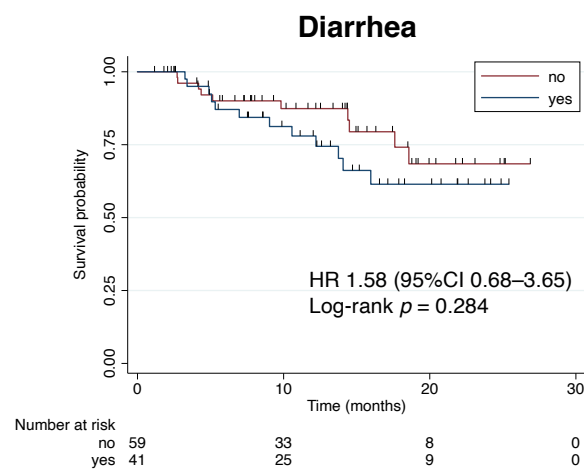
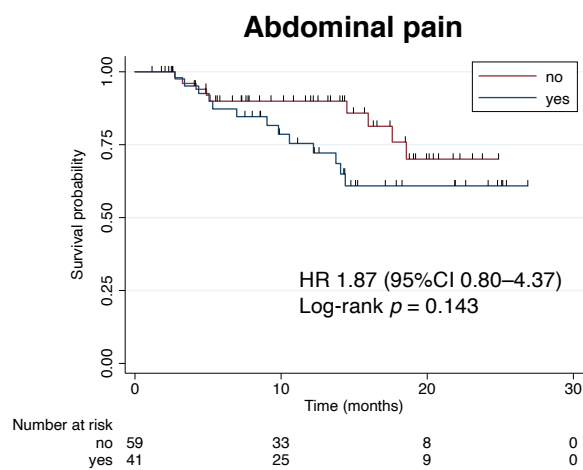
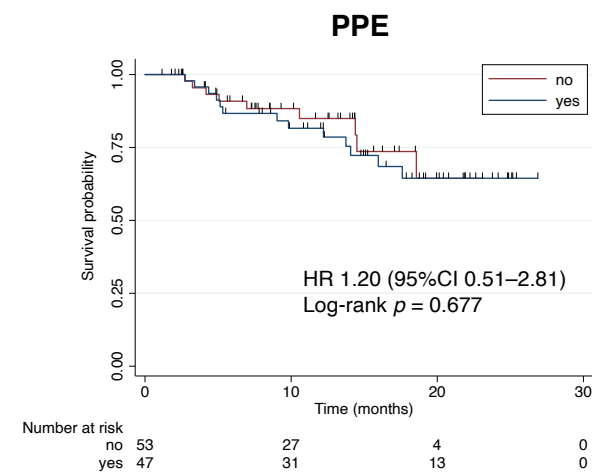
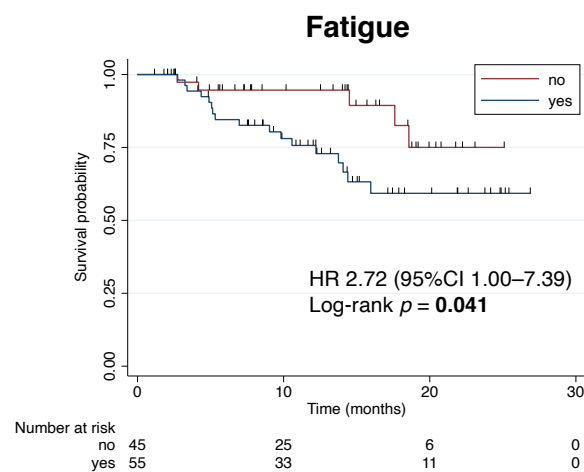
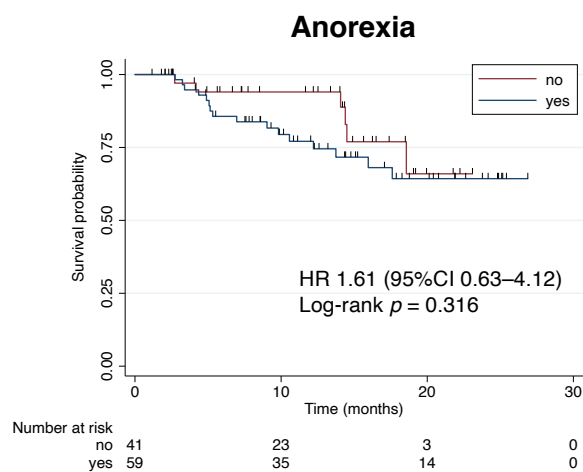


Figure 21. Effect of adverse events on progression-free survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.



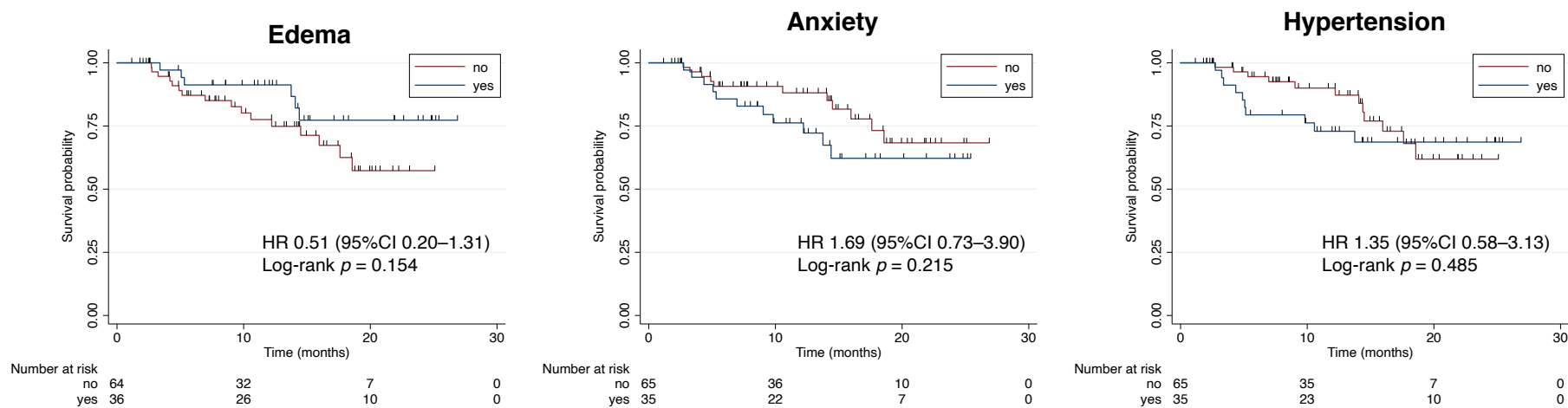


Figure 22. Effect of adverse events on overall survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.

有害事象の発現は PFS、OS に影響を与える可能性が考えられた。そこで、臨床効果に対する複数の有害事象発現有無の影響について検討した。

Palmar-plantar erythrodysesthesia（手掌・足底発赤知覚不全症候群）または Diarrhea（下痢）の少なくとも一つを発現した（yes）群（ $n=59$ ）と、発現なし（no）群（ $n=41$ ）の mPFS は、それぞれ 8.5 (95%CI 6.8–10.2) months、12.7 (95%CI 9.8–15.5) months であった（**Figure 23A**）。手掌・足底発赤知覚不全症候群または下痢の少なくとも一つの発現は、発現なしと比較して有意に短い mPFS を示した（HR 2.04; 95%CI 1.17–3.57; $p=0.010$ ）。mOS は、それぞれ 20.4 (95%CI 17.8–22.9) months、20.1 (95%CI 17.9–22.4) months であった（**Figure 23B**）。両群間に有意差は認められなかった（HR 1.94; 95%CI 0.71–5.25; $p=0.187$ ）。

Anorexia（食欲減退）、Fatigue（疲労）、または Anxiety（不安）の少なくともいずれか一つを発現した（yes）群（ $n=64$ ）と、発現なし（no）群（ $n=36$ ）の mPFS は、それぞれ 8.9 (95%CI 7.2–10.6) months、12.4 (95%CI 9.4–15.3) months であった（**Figure 24A**）。食欲減退、疲労、または不安の少なくともいずれか一つの発現は、発現なしと比較して有意に短い mPFS を示した（HR 1.83; 95%CI 1.03–3.22; $p=0.035$ ）。mOS は、それぞれ 20.4 (95%CI 18.0–22.8) months、20.5 (95%CI 18.2–22.8) months であった（**Figure 24B**）。両群間に有意差は認められなかった（HR 2.13; 95%CI 0.72–6.29; $p=0.163$ ）。

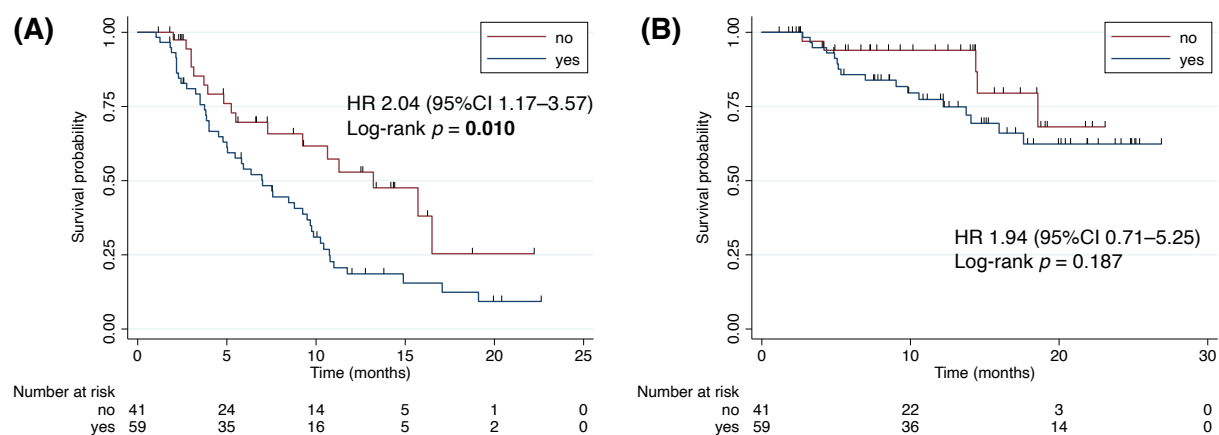


Figure 23. Effect of palmar-plantar erythrodysesthesia and/or diarrhea on (A) Progression-free survival and (B) Overall survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio.

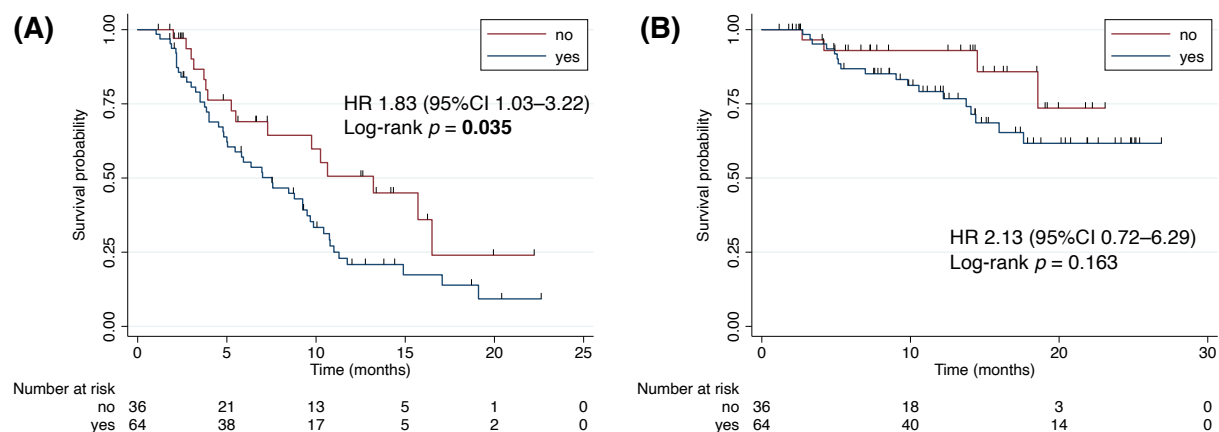


Figure 24. Effect of anorexia and/or fatigue and/or anxiety on (A) Progression-free survival and (B) Overall survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio.

3.2. 考察

本研究では、Grade 2 以上の高血圧を発現した症例は、Grade 1 の高血圧を発現した症例と比較して PFS の有意な延長を示した。我々の知見は、先行研究¹²⁹⁻¹³¹と同様に Lenvatinib 療法における高血圧の重症度が有用な予後予測因子となり得ることを示している。疲労は PFS と OS の有意な予後予測因子、下痢、不安は PFS の有意な予後予測因子となることが示された。手掌・足底発赤知覚不全症候群は、Sorafenib や Lenvatinib の良好な治療効果予測因子であることが報告^{132,133}されているが、本研究では生存期間との有意な相関は示さなかった。

疲労は食欲減退、体重減少を伴う場合があり、薬剤だけではなく肝硬変、肝癌、甲状腺機能低下などが原因となる場合もある。

肝臓は栄養素の代謝および貯蔵に中心的な役割を果たしており、肝機能の低下した肝硬変、肝癌ではタンパク質-エネルギー低栄養（Protein-energy malnutrition; PEM）が出現する。肝癌は他の固形がんと比較して高齢者の罹患が多いことから、Body mass index の低下に伴う疲労や食欲減退¹³⁴、PEM や骨格筋量指数（Skeletal muscle mass index; SMI）の低下に伴うサルコペニア、フレイル^{135,136}には注意が必要である。

Lenvatinib では、体表面積で補正した実投与量を高く保つことで生存期間の延長が望める¹³⁷。しかし、定常状態の Area under the curve の増加は、食欲減退の発現を増加させることが報告されていることから、治療効果を低下させる可能性のある長期間の休薬や減量、中止を避けて、病態に応じた速やかな用量調整が求められる。また、SMI の低下は OS と Time to treatment failure の悪化、重篤な有害事象の発現と有意に関連することが報告¹³⁸されていることから、栄養療法や運動療法などの非薬物療法についても早期介入できる体制の構築が必要である。これらには、服薬情報提供書（トレーシングレポート）を活用した病院・薬局の連携と薬剤師による服薬前の十分な説明、有害事象の定期的なモニタリングを介した適正な薬物療法の管理が求められる。

3.3. 小活

切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の PFS、OS に対する有害事象の重症度、発現有無の影響について検討を行った。Grade 2 以上の Hypertension（高血圧）は Grade 1 のそれと比較して、PFS の有意な延長と関連し、OS と関連しないことを示した（Figure 19, 20）。

Fatigue（疲労）の発現は PFS と OS の有意な短縮を示し、Abdominal pain（腹痛）、Diarrhea（下痢）、Dysgeusia（味覚異常）、Anxiety（不安）の発現は PFS の有意な短縮を示した（Figure

21,22)。Palmar-plantar erythrodysesthesia（手掌・足底発赤知覚不全症候群）または Diarrhea（下痢）の少なくとも一つの発現は、PFS の有意な短縮を示した（**Figure 23**）。Anorexia（食欲減退）、Fatigue（疲労）、または Anxiety（不安）の少なくともいずれか一つの発現は、PFS の有意な短縮を示した（**Figure 24**）。

以上のことから、Lenvatinib 療法における有害事象の適正な管理の必要性、および有害事象の発現が Lenvatinib 療法の予後予測に利用可能であることを明らかにした。

III. 総括

近年、切除不能な肝細胞癌に対する生存の延長を目的に、腫瘍細胞増殖と腫瘍血管新生を制御する作用機序をもつ薬剤の使用が急速に増加している。しかし、薬物療法に対して反応不良となるケースが存在するため十分な長期的生存が望めず、薬剤の変更による医療費の増加が課題であった。今後は、切除不能な肝細胞癌に対する一次治療及び二次治療において最も有効な薬剤の選択、予後の延長、および医療費の削減が求められる。そのような背景の中、本研究では経口マルチキナーゼ阻害薬の一つである Lenvatinib の適正使用に向けたバイオマーカー探索研究を行い、以下の成果を得た。

第1章 臨床効果に対する *NOS3* および *FGFR* 遺伝子多型の影響

NOS3 rs2070744 は切除不能な肝細胞癌に対する Lenvatinib 療法の臨床効果に影響を与える可能性が示された。これは、Sorafenib 療法の臨床効果への影響と相反することが明らかとなり、*NOS3 rs2070744* が肝細胞癌に対する治療選択のバイオマーカーとして有用である可能性を見出した。

肝細胞癌に対して使用される分子標的薬は、腫瘍の細胞増殖および血管新生に対するマルチキナーゼ阻害活性を有するため、各作用機序の *SNPs* が臨床効果に与える影響は異なる可能性が推測された。そのため、*NOS3 rs2070744* および *FGFR SNPs* について検討することで、Lenvatinib 療法の臨床効果を予測することが可能になると考えた。*FGFR2 rs2912791*、*rs2981429*、*rs2981582*、および *FGFR4 rs351855* は PFS、OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率と相関を示さないことを明らかにした。そして、*NOS3 rs2070744* と *FGFR4 rs351855* の組み合わせは、PFS の最も独立した予測因子であることを明らかにした。

本研究の成果は、肝細胞癌の *NOS3/FGFR4* における腫瘍血管新生阻害効果および増殖抑制効果の重要性を示唆するとともに、今後の大規模なバイオマーカー探索研究の実現と臨床応用に向けた基礎的検討に貢献する。

第2章 有害事象に対する NOS3 遺伝子多型の影響

切除不能な肝細胞癌に対する Lenvatinib 療法を施行した日本人の集団 100 例における、実際の臨床現場での有害事象の発現頻度を明らかにした。さらに、NOS3 rs2070744 の TT 群と TC + CC 群の 2 群間は、有害事象の発現有無、Grade 2 以上の有害事象発現と関連しないことを明らかにした。

本研究の成果は、Lenvatinib 療法において重症化しやすい有害事象を把握することで、薬剤師による有害事象の適正な管理が可能となる。さらに、今後の有害事象発現メカニズムの解明を目指した、遺伝子解析研究の基礎的検討に貢献する。

第3章 臨床効果に対する有害事象の影響

高血圧の重症度は Lenvatinib 療法の PFS と関連することから、適切な降圧薬の併用による血圧コントロールが必要であることを示した。手掌・足底発赤知覚不全症候群または下痢の少なくとも一つの発現は、PFS を予測できることを明らかにした。食欲減退、疲労、または不安の少なくともいずれか一つの発現は、PFS を予測できることを明らかにした。食欲減退、疲労が高頻度で認められたことから、定期的なモニタリングと早期介入が課題として示された。これには、薬剤師による病院・薬局を含めた地域と他職種間の連携強化、薬物療法および日常生活における生活指導を含めた非薬物療法の十分な指導が必要である。

本研究の成果は、切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の生存期間延長への薬剤師介入の重要性を示唆するとともに、今後の地域包括ケアシステムの実現へ向けた多職種協働における薬剤師業務の展開に貢献する。

IV. 方法

1. 倫理的事項

1.1. 研究対象者の人権に対する配慮

本研究に関係するすべての研究者は「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理原則、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って本研究を実施した。本研究は、大学病院医療情報ネットワークに登録した（UMIN000036625）。北里大学医学部・病院倫理委員会 ヒトゲノム研究審査委員会（承認番号：KMEOG18-16）、公立大学法人横浜市立大学 ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会（承認番号：A190725004）、徳洲会グループ共同倫理審査委員会（承認番号：TGE01429-024）の承認を得て行なった。

1.2. 研究対象者への説明

研究責任医師、研究分担医師は、医療機関の承認が得られた説明文書を研究対象者本人に渡し、研究についてのリスクとベネフィットについて詳しく説明した。本研究への参加について文書によりインフォームド・コンセントを行なった。説明の方法と内容、受けた同意の内容を診療録に記載した。

1.3. 個人情報の保護と研究対象者識別

研究実施に係る情報を取り扱う際は、あらかじめ研究対象者の個人情報とは無関係の番号（研究対象者識別コード）を付して連結可能匿名化として管理し、研究対象者の秘密保護に十分配慮した。研究対象者識別コード表は、個人情報管理者が厳重に保管した。また、研究代表者等が本研究で得られた情報を公表する際には、研究対象者を特定できる情報を含まないようにした。

1.4. 検体・試料の収集および取り扱い

当院にて研究対象者より採取した血液サンプルを、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有試験管に添加した。ラベル部分に研究対象者 ID、氏名を記載した。血液サンプルから genomic DNA (gDNA) を抽出し、研究対象者識別コードを記載したサンプルチューブで凍結保存 (-30℃) した。評価が終了した試料は、北里大学医学部消化器内科学に保管した。他施設で取得された血液 (5 mL) と情報は、各施設にて連結可能匿名化し、郵送にて北里大学へ収集した。

2. 研究デザイン

神奈川県にある北里大学病院、横浜市立大学附属市民総合医療センター、湘南藤沢徳洲会病院、湘南鎌倉総合病院の 4 施設を対象に、多施設共同後ろ向き研究を実施した。

3. 対象

3.1. 研究対象者

肝細胞癌と診断され、切除不能と判断された進行期で、2018 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 2 月 28 日に Lenvatinib 療法を開始した症例とした。

3.2. 患者選択基準

以下の適格基準をすべて満たし、除外基準のいずれにも該当しない患者を登録適格例とした。

3.2.1. 適格基準

- (1) 過去の経過、血液検査及び画像診断で肝細胞癌と判断された症例
- (2) 切除不能な進行・再発症例

- (3) 年齢 20 歳以上の症例
- (4) ECOG-PS 0 または 1 の症例
- (5) 十分な臓器機能を有する症例
- (6) 本研究参加について研究対象者本人から文書で同意が得られている症例

3.2.2. 除外基準

- (1) 研究責任医師等が本研究の対象として不適当と判断した症例
- (2) 試料（血液及びこれらから抽出した DNA 等）を収集できない症例
- (3) Lenvatinib 投与後 14 日以内に治療を中止した症例
- (4) 重度の肝機能障害（Child-Pugh class C）、末期腎臓病、難治性腹水を有する症例

3.3. 治療計画と治療変更基準

Lenvatinib は脈管侵襲または肝外転移のある BCLC stage C（Advanced stage）症例、肝動脈化学塞栓療法に適さない、または抵抗性のある症例に推奨された。BCLC stage B（Intermediate stage）症例には、主治医の判断で Lenvatinib が推奨された。

リスク因子（Child-Pugh class B、食道・胃静脈瘤、前治療による重症な有害事象など）のない症例では、Lenvatinib の推奨用量を体重に基づいて決定した。体重 60 kg 以上の症例では 12 mg/day、体重 60 kg 未満の症例では 8 mg/day とした。リスク因子を有する症例では、主治医の判断により初回投与量からの減量が認められた。Lenvatinib 投与後は、治療効果判定または重篤な有害事象の発生状況に応じて用量を調節した。治療は病勢進行、忍容できない毒性発現、または患者の治療継続拒否まで継続した。

4. 評価項目

4.1. 臨床効果に対する *NOS3* および *FGFR* 遺伝子多型の影響

切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の臨床効果に対する *NOS3 rs2070744* の影響について検討した。主要評価項目は *NOS3 rs2070744* の Wild type 群 (TT 群) と Hetero type + Mutant type 群 (TC + CC 群) の 2 群間における PFS とした。副次評価項目は *NOS3 rs2070744* の TT 群と TC + CC 群の 2 群間における OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率とした。さらに、肝細胞癌における腫瘍増殖・悪性化や腫瘍血管新生、薬剤耐性などに重要な役割を果たしている、*FGFR* 遺伝子多型の臨床効果への影響を検討した。探索的評価項目は *FGFR2 rs2912791*、*rs2981429*、*rs2981582*、および *FGFR4 rs351855* における、PFS、OS、客観的奏効率、および病勢コントロール率とした。

4.2. 有害事象に対する *NOS3* 遺伝子多型の影響

切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の有害事象発現有無、重症度に対する *NOS3 rs2070744* の影響について検討した。安全性評価項目は、*NOS3 rs2070744* の Wild type 群 (TT 群) と Hetero type + Mutant type 群 (TC + CC 群) の 2 群間における、有害事象の発現有無、Grade 2 以上の重症度とした。全解析対象症例を分母とし、各々の有害事象について最悪 Grade の頻度を群別に求めた。また、有害事象による減量までの期間、治療成功期間を求めた。

4.3. 臨床効果に対する有害事象の影響

切除不能な肝細胞癌における Lenvatinib 療法の臨床効果に対する有害事象の重症度、発現有無の影響について検討した。安全性評価項目は、有害事象の重症度 (Grade 1 vs Grade \geq 2) の 2 群間における PFS、OS、および発現有無 (yes vs no) の 2 群間における PFS、OS とした。

5. 効果判定とエンドポイントの定義

PFS は登録日を起算日とし、増悪と判断された日、またはあらゆる原因による死亡日のうち早い方までの期間とした。OS は登録日を起算日とし、あらゆる原因による死亡日までの期間とした。標的病変はコンピューター断層撮影法、または核磁気共鳴映像法のいずれかを用いて放射線科医師が画像化し、主治医が評価した。肝細胞癌の腫瘍縮小効果判定は、腫瘍の血流変化を考慮した固形がんの治療効果判定のための mRECIST¹³⁹ に従って定義した。完全奏効 (Complete response; CR) は全ての標的病変の腫瘍濃染の消失と定義した。部分奏効 (Partial response; PR) はベースライン径和に比して、標的病変の viable lesion の径和が 30% 以上減少と定義した。進行 (Progressive disease; PD) は経過中の最小の径和に比して、標的病変の viable lesion 径和が 20% 以上増加と定義した。安定 (Stable disease; SD) は経過中の最小の径和に比して、PR に相当する縮小がなく PD に相当する増大がないと定義した。

客観的奏効率は、解析対象症例のうち CR または PR が確認された症例の割合と定義した。病勢コントロール率は、CR、PR、または SD が確認された症例の割合と定義した。データが不足して評価できない症例は、解析から除外した。

有害事象は、日本臨床腫瘍研究グループ (Japan clinical oncology group; JCOG) による「有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG 版」に従って定義した。

6. 実験材料

全血から gDNA を抽出する MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Product No. 03730964001)、および SNP ジェノタイピング解析を行う FastStart Essential DNA Probes Master kit (Product No. 06402682001) は、Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) より購入した。TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Catalog No. 4351379) は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した。

7. SNP ジェノタイピング解析

全血 400 μ L から gDNA 100 μ L の生成には、北里大学医学部消化器内科学研究室の全自動核酸精製装置 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) と MagNA Pure Compact 用の専用試薬 MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用した。

LightCycler[®] 96/Nano 用のホットスタート型リアルタイム PCR 反応ミックス FastStart Essential DNA Probes Master kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 、および TaqMan[®] プローブ & プライマーセット TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、Master Mix (2 \times conc.) 10 μ L、Primer-probe mix (10 \times conc.) 2 μ L、および Water (Polymerase chain reaction; PCR grade) 6 μ L を穏やかにピペティングして混合し、1 サンプルあたり全量 18 μ L のミクスチャーを調製した。ミクスチャー 18 μ L を LightCycler[®] 8-Tube Strips (Catalog No. 06612601001) に分注し、gDNA sample 2 μ L を混合した。作業はすべて氷上で行った。LightCycler[®] 8-Tube Strips をプレート専用遠心機 PlateSpin II (Kubota Corporation, Tokyo, Japan) で遠心 (2400 rpm, 10 sec) し、SNP ジェノタイピング解析を行った。

NOS3 rs2070744 (Assay ID: C__15903863_10) のジェノタイプは、北里大学医学部消化器内科学研究室のリアルタイム PCR 装置 LightCycler[®] 96 System software version 1.1.0.1320 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用して、VIC (Victoria) および FAM (Fluorescein) の蛍光強度から Endpoint Genotyping により解析した。PCR 反応条件は、95°C, 10 min の Pre-incubation を行った後、95°C, 10 sec–60°C, 30 sec の 2-Step Amplification を 40 cycle 行った。各ジェノタイプは Wild type、Hetero type、および Mutant type に分類した。また、*FGFR2 rs2912791* (C__16166432_10) 、*rs2981429* (C__2917349_10) 、*rs2981582* (C__2917302_10) 、および *FGFR4 rs351855* (C__3166614_10) も同様に解析を行なった。

使用方法は Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) のプロトコルの指示に従った。

8. 統計解析

データは中央値と IQR (25 パーセンタイルと 75 パーセンタイル) を用いて示した。生存時間分析における生存期間は、平均値と 95%CI を用いて示した。群間比較における 2 群間の間隔変数、順序変数は、マン-ホイットニーの U 検定を用いた。2 群間の名義変数はフィッシャーの正確検定、2 群間以上はカイ 2 乗検定を用いた。両側検定と両側の P 値を用い、0.05 未満の P 値は統計学的有意を示すと考えられた。生存時間分析では、分布が時間に依存した 2 群間以上の比較は、カプラン-マイヤー法で各群における死亡 (イベント) に至るまでの時間を示し、ログランク検定で死亡 (イベント) に至るまでの時間のグループ間の違いを検定した。

単変量、多変量解析では、コックスの比例ハザードモデルで死亡 (イベント) が起こるまでの時間に関連する要因を分析し、HR とその 95%CI を求めた。多変量解析に用いる変数は、欠損データの多い因子、単変量解析でアウトカムと関連があった因子、さらに医師との協議による医学的な意味を考慮し、*NOS3 rs2070744 + FGFR4 rs351855* (Others vs TC/CC + CT/TT)、Child-Pugh system (Class A vs Class B)、AFP (< 400 vs \geq 400)、Age (< 75 vs \geq 75)、ALBI grade (アルブミン-ビリルビングレード; Grade 1 vs Grade \geq 2)、BCLC staging system (Stage B vs Stage C)、Macroscopic portal vein invasion, Extrahepatic spread, or both (肉眼的門脈侵襲及び/又は肝外転移; yes vs no)、Relative dose intensity at 56 days (56 日間の相対用量強度; \geq 80% vs < 80%) を選択した。統計学的検討は、Stata/MP 15.1 for Mac (StataCorp, College Station, TX, USA) を用いた。

V. 謝辭

本研究において全面的に御支援下さいました、北里大学薬学部薬物治療学I 厚田 幸一郎教授に深甚なる謝意を表します。本研究を行うにあたり、北里大学医学部消化器内科学で研究を行う機会を与えて下さいました、北里大学医学部消化器内科学 日高 央 診療教授に深甚なる謝意を表します。本研究において直接の熱意ある御教授を賜りました北里大学医学部消化器内科学 魚嶋 晴紀 講師、学校法人北里研究所 渋谷 明隆 常任理事、中沢内科医院 中澤 貴秀 医師、北里大学医学部消化器内科学 窪田 幸介 診療講師、同 和田 尚久 助教、同 Shao Xue 先生、並びに御協力を賜りました横浜市立大学附属市民総合医療センター 沼田 和司 診療教授、同 中馬 誠 准教授、横浜市立大学附属病院 前田 慎 主任教授、同 近藤 正晃 准教授、湘南鎌倉総合病院 賀古 眞 消化器病センター顧問、湘南藤沢徳洲会病院 岩渕 省吾 肝胆膵・消化器病センター長に謹んで御礼申し上げます。本研究の実験面で数々の有益な御教示を賜りました北里大学医学部消化器内科学 竹内 敦子 様、同 堀尾 加寿恵 様に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、北里大学薬学部薬剤学教室で研究を行う機会を与えて下さり、数々の御指導を賜りました北里大学薬学部薬剤学教室 伊藤 智夫 教授、同 藤原 亮一 前講師、同 奈良輪 知也 講師、同 高野 修平 助教に深く感謝致します。

本論文の審査を快く引き受けて下さいました北里大学薬学部衛生化学教室 今井 浩孝 教授、同 生化学教室 奥脇 暢 教授、同 保険薬局学 吉山 友二 教授に深く感謝致します。

最後に、研究室での生活の中で数々の助言、援助をして下さいました北里大学薬学部薬物治療学I、および同 薬剤学教室の大学院生・卒業研究生の皆様、並びに私の研究生生活を経済的、精神的に支えてくれた家族に深く感謝致します。

2021 年 1 月 6 日
東 信太郎

VI. 参考文献

- 1 Kudo, M. 第 21 回 全国原発性肝癌追跡調査報告 (2010～2011) . *Kanzo* **61**, 645-691, doi:10.2957/kanzo.61.645 (2020).
- 2 El-Serag, H. B. *et al.* Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557-2576, doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061 (2007).
- 3 El-Serag, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **142**, 1264-1273 e1261, doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061 (2012).
- 4 Tateishi, R. *et al.* A nationwide survey on non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: 2011-2015 update. *J Gastroenterol* **54**, 367-376, doi:10.1007/s00535-018-1532-5 (2019).
- 5 Morgan, T. R. *et al.* Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, S87-96, doi:10.1053/j.gastro.2004.09.020 (2004).
- 6 Kanwal, F. *et al.* Trends in the Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a United States Cohort of Veterans. *Clin Gastroenterol Hepatol* **14**, 301-308 e301-302, doi:10.1016/j.cgh.2015.08.010 (2016).
- 7 Tsilidis, K. K. *et al.* Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ* **350**, g7607, doi:10.1136/bmj.g7607 (2015).
- 8 Akuta, N. *et al.* Relationships between Genetic Variations of PNPLA3, TM6SF2 and Histological Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Japan. *Gut Liver* **10**, 437-445, doi:10.5009/gnl15163 (2016).
- 9 Raksayot, M. *et al.* Independent and additive effects of PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms on the development of non-B, non-C hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **54**, 427-436, doi:10.1007/s00535-018-01533-x (2019).
- 10 Hiraoka, A. *et al.* Hepatic Function during Repeated TACE Procedures and Prognosis after Introducing Sorafenib in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Multicenter Analysis. *Dig Dis* **35**, 602-610, doi:10.1159/000480256 (2017).
- 11 Johnson, P. J. *et al.* Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol* **33**, 550-558, doi:10.1200/JCO.2014.57.9151 (2015).
- 12 European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **69**, 182-236, doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019 (2018).
- 13 Chen, L. T. *et al.* Pan-Asian adapted ESMO Clinical Practice Guidelines for the management of patients with intermediate and advanced/relapsed hepatocellular carcinoma: a TOS-ESMO initiative endorsed by CSCO, ISMPO, JSMO, KSMO, MOS and SSO. *Ann Oncol* **31**, 334-351, doi:10.1016/j.annonc.2019.12.001 (2020).
- 14 Murakami, T. *et al.* Percutaneous radiofrequency ablation and transcatheter arterial chemoembolization for hypervascular hepatocellular carcinoma: rate and risk factors for local recurrence. *Cardiovasc Intervent Radiol* **30**, 696-704, doi:10.1007/s00270-007-9003-z (2007).

- 15 Kudo, M. *et al.* Lenvatinib as an Initial Treatment in Patients with Intermediate-Stage Hepatocellular Carcinoma Beyond Up-To-Seven Criteria and Child-Pugh A Liver Function: A Proof-Of-Concept Study. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11081084 (2019).
- 16 Kudo, M. A New Treatment Option for Intermediate-Stage Hepatocellular Carcinoma with High Tumor Burden: Initial Lenvatinib Therapy with Subsequent Selective TACE. *Liver Cancer* **8**, 299-311, doi:10.1159/000502905 (2019).
- 17 Llovet, J. M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**, 378-390, doi:10.1056/NEJMoa0708857 (2008).
- 18 Bruix, J. *et al.* Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **389**, 56-66, doi:10.1016/s0140-6736(16)32453-9 (2017).
- 19 Kudo, M. *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet* **391**, 1163-1173, doi:10.1016/s0140-6736(18)30207-1 (2018).
- 20 Yamashita, T. *et al.* REFLECT-a phase 3 trial comparing efficacy and safety of lenvatinib to sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: an analysis of Japanese subset. *J Gastroenterol* **55**, 113-122, doi:10.1007/s00535-019-01642-1 (2020).
- 21 Zhu, A. X. *et al.* Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **20**, 282-296, doi:10.1016/s1470-2045(18)30937-9 (2019).
- 22 Finn, R. S. *et al.* Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **382**, 1894-1905, doi:10.1056/NEJMoa1915745 (2020).
- 23 Abou-Alfa, G. K. *et al.* Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **379**, 54-63, doi:10.1056/NEJMoa1717002 (2018).
- 24 Snyder, S. H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* **257**, 494-496, doi:10.1126/science.1353273 (1992).
- 25 Nathan, C. *et al.* Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**, 13725-13728 (1994).
- 26 Stamler, J. S. *et al.* S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 444-448, doi:10.1073/pnas.89.1.444 (1992).
- 27 Lamas, S. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6348-6352, doi:10.1073/pnas.89.14.6348 (1992).
- 28 Craig, D. H. *et al.* Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock. *J Biol Chem* **277**, 33987-33994, doi:10.1074/jbc.M203118200 (2002).

- 29 Fleming, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch* **459**, 793-806, doi:10.1007/s00424-009-0767-7 (2010).
- 30 Qian, J. *et al.* Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol* **4**, 347, doi:10.3389/fphys.2013.00347 (2013).
- 31 Alderton, W. K. *et al.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615, doi:10.1042/0264-6021:3570593 (2001).
- 32 Panda, K. *et al.* Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* **277**, 31020-31030, doi:10.1074/jbc.M203749200 (2002).
- 33 Hurshman, A. R. *et al.* Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry* **41**, 3439-3456, doi:10.1021/bi012002h (2002).
- 34 Verhaar, M. C. *et al.* Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart* **90**, 494-495, doi:10.1136/hrt.2003.029405 (2004).
- 35 Luiking, Y. C. *et al.* Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E1177-1189, doi:10.1152/ajpendo.00284.2012 (2012).
- 36 Mocellin, S. *et al.* Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev* **27**, 317-352, doi:10.1002/med.20092 (2007).
- 37 Kamm, A. *et al.* Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. *Nitric Oxide* **93**, 102-114, doi:10.1016/j.niox.2019.09.005 (2019).
- 38 Choudhari, S. K. *et al.* Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* **11**, 118, doi:10.1186/1477-7819-11-118 (2013).
- 39 Denninger, J. W. *et al.* Guanylate cyclase and the $\cdot\text{NO}$ /cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1411**, 334-350, doi:10.1016/s0005-2728(99)00024-9 (1999).
- 40 Ziche, M. *et al.* Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* **50**, 139-148, doi:10.1023/a:1006431309841 (2000).
- 41 Kroll, J. *et al.* VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 743-746, doi:10.1006/bbrc.1998.9719 (1998).
- 42 Wu, Q. *et al.* Mathematical Model Predicts Effective Strategies to Inhibit VEGF-eNOS Signaling. *J Clin Med* **9**, doi:10.3390/jcm9051255 (2020).
- 43 Fukumura, D. *et al.* Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2604-2609, doi:10.1073/pnas.041359198 (2001).
- 44 Carmeliet, P. *et al.* Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257, doi:10.1038/35025220 (2000).

- 45 Namba, T. *et al.* Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation* **108**, 2250-2257, doi:10.1161/01.CIR.0000093190.53478.78 (2003).
- 46 Oliveira, C. J. R. *et al.* Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* **35**, 381-396, doi:10.1016/s0891-5849(03)00311-3 (2003).
- 47 Lopez-Rivera, E. *et al.* Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3685-3690, doi:10.1073/pnas.0408217102 (2005).
- 48 Kawasaki, K. *et al.* Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* **23**, 5726-5737, doi:10.1128/mcb.23.16.5726-5737.2003 (2003).
- 49 Brouet, A. *et al.* Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *FASEB J* **19**, 602-604, doi:10.1096/fj.04-2682fje (2005).
- 50 Kumar, R. *et al.* A meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene T786C polymorphism as a risk factor for acute chest syndrome in sickle cell disease. *Meta Gene* **27**, doi:10.1016/j.mgene.2020.100827 (2021).
- 51 Li, H. *et al.* Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* **7**, 132-147, doi:10.1016/s1089-8603(02)00127-1 (2002).
- 52 Nakayama, M. *et al.* T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* **99**, 2864-2870, doi:10.1161/01.cir.99.22.2864 (1999).
- 53 Joshi, M. S. *et al.* Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J* **21**, 2655-2663, doi:10.1096/fj.06-7088com (2007).
- 54 Katkam, S. K. *et al.* Impact of eNOS 27-bp VNTR (4b/a) gene polymorphism with the risk of Systemic Lupus Erythematosus in south Indian subjects. *Gene* **658**, 105-112, doi:10.1016/j.gene.2018.03.021 (2018).
- 55 Munshi, A. *et al.* VNTR polymorphism in intron 4 of the eNOS gene and the risk of ischemic stroke in a South Indian population. *Brain Res Bull* **82**, 247-250, doi:10.1016/j.brainresbull.2010.05.008 (2010).
- 56 Sinici, I. *et al.* Intron 4 VNTR polymorphism of eNOS gene is protective for cardiac syndrome X. *J Investig Med* **58**, 23-27, doi:10.2310/JIM.0b013e3181c6197f (2010).
- 57 Elakkad, A. M. *et al.* T-786C variation in the promoter sequence of human eNOS gene markedly influences its expression level. *Drug Discov Ther* **11**, 193-197, doi:10.5582/ddt.2016.01083 (2017).

- 58 Wang, J. *et al.* Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, e1-4, doi:10.1161/01.atv.0000016248.51577.1f (2002).
- 59 Doshi, A. A. *et al.* A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium. *J Card Fail* **16**, 314-319, doi:10.1016/j.cardfail.2009.12.013 (2010).
- 60 Mahmoodi, K. *et al.* Assessment of the role of plasma nitric oxide levels, T-786C genetic polymorphism, and gene expression levels of endothelial nitric oxide synthase in the development of coronary artery disease. *J Res Med Sci* **22**, 34, doi:10.4103/1735-1995.202144 (2017).
- 61 Nagassaki, S. *et al.* eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. *Thromb Res* **115**, 375-379, doi:10.1016/j.thromres.2004.09.003 (2005).
- 62 Senthil, D. *et al.* Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol* **24**, 218-224, doi:10.1089/dna.2005.24.218 (2005).
- 63 Diler, S. B. *et al.* The T-786C, G894T, and intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in prostate cancer cases. *Russian Journal of Genetics* **52**, 220-225, doi:10.1134/s1022795416020022 (2016).
- 64 Safarinejad, M. R. *et al.* Effects of the T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. *Urol Oncol* **31**, 1132-1140, doi:10.1016/j.urolonc.2012.01.002 (2013).
- 65 Miyamoto, Y. *et al.* Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* **9**, 2629-2637, doi:10.1093/hmg/9.18.2629 (2000).
- 66 Oliveira-Paula, G. H. *et al.* Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide* **63**, 39-51, doi:10.1016/j.niox.2016.08.004 (2017).
- 67 Levidou, G. *et al.* Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma. *BJU Int* **108**, E59-65, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09828.x (2011).
- 68 Dahai, Y. *et al.* A relationship between replication protein A and occurrence and prognosis of esophageal carcinoma. *Cell Biochem Biophys* **67**, 175-180, doi:10.1007/s12013-013-9530-y (2013).
- 69 Li, S. *et al.* Genetic variants in RPA1 associated with the response to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer. *J Gastroenterol* **54**, 939-949, doi:10.1007/s00535-019-01571-z (2019).
- 70 Wang, J. *et al.* Oncogene RPA1 promotes proliferation of hepatocellular carcinoma via CDK4/Cyclin-D pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **498**, 424-430, doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.167 (2018).

- 71 Li, H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1-17, doi:10.1080/17474124.2021.1842732 (2020).
- 72 Tu, Y. T. *et al.* Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in human malignant melanoma and their relation to angiogenesis. *Clin Exp Dermatol* **31**, 413-418, doi:10.1111/j.1365-2230.2006.02123.x (2006).
- 73 Shang, Z. J. *et al.* Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression. *J Oral Pathol Med* **34**, 134-139, doi:10.1111/j.1600-0714.2004.00259.x (2005).
- 74 Yagihashi, N. *et al.* Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. *Virchows Arch* **436**, 109-114, doi:10.1007/pl00008208 (2000).
- 75 Yu, S. *et al.* Increased expression of activated endothelial nitric oxide synthase contributes to antiandrogen resistance in prostate cancer cells by suppressing androgen receptor transactivation. *Cancer Lett* **328**, 83-94, doi:10.1016/j.canlet.2012.09.006 (2013).
- 76 Zhang, X. *et al.* Nitric oxide inhibits autophagy and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **110**, 1054-1063, doi:10.1111/cas.13945 (2019).
- 77 El Moety, A. A. A. *et al.* Evaluation of nitric oxide as a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Alexandria Journal of Medicine* **47**, 31-35, doi:10.1016/j.ajme.2011.04.001 (2019).
- 78 Nan, J. *et al.* Effects of eNOS gene polymorphisms on individual susceptibility to cancer: A meta-analysis. *Nitric Oxide* **84**, 1-6, doi:10.1016/j.niox.2018.12.006 (2019).
- 79 Yuan, F. *et al.* Influence of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism on hepatocellular carcinoma risk in China. *DNA Cell Biol* **32**, 268-273, doi:10.1089/dna.2012.1910 (2013).
- 80 Casadei-Gardini, A. *et al.* Association of NOS3 and ANGPT2 Gene Polymorphisms with Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma Receiving Sorafenib: Results of the Multicenter Prospective INNOVATE Study. *Clin Cancer Res*, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3897 (2020).
- 81 Tsuruoka, A. *et al.* [Preclinical and clinical researches of lenvatinib mesylate (Lenvima capsule), a novel antitumor agent approved for thyroid cancer treatment]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **146**, 283-290, doi:10.1254/fpj.146.283 (2015).
- 82 Okamoto, K. *et al.* Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization. *ACS Med Chem Lett* **6**, 89-94, doi:10.1021/ml500394m (2015).
- 83 Turner, N. *et al.* Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 116-129, doi:10.1038/nrc2780 (2010).
- 84 Casanovas, O. *et al.* Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **8**, 299-309, doi:10.1016/j.ccr.2005.09.005 (2005).

- 85 Grose, R. *et al.* Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 179-186, doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.003 (2005).
- 86 Ingersoll, R. G. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations. *Cytogenet Cell Genet* **94**, 121-126, doi:10.1159/000048802 (2001).
- 87 Harimoto, N. *et al.* The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma. *Oncology* **78**, 361-368, doi:10.1159/000320463 (2010).
- 88 Lee, H. J. *et al.* Fibroblast growth factor receptor isotype expression and its association with overall survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol* **21**, 60-70, doi:10.3350/cmh.2015.21.1.60 (2015).
- 89 Kunii, K. *et al.* FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res* **68**, 2340-2348, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5229 (2008).
- 90 Meyer, K. B. *et al.* Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. *PLoS Biol* **6**, e108, doi:10.1371/journal.pbio.0060108 (2008).
- 91 Vanmechelen, M. *et al.* Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Polymorphism rs2981582 is Correlated With Progression-free Survival and Overall Survival in Patients With Metastatic Clear-cell Renal Cell Carcinoma Treated With Sunitinib. *Clin Genitourin Cancer* **17**, e235-e246, doi:10.1016/j.clgc.2018.11.002 (2019).
- 92 Dy, G. K. *et al.* A randomized phase II study of gemcitabine and carboplatin with or without cediranib as first-line therapy in advanced non-small-cell lung cancer: North Central Cancer Treatment Group Study N0528. *J Thorac Oncol* **8**, 79-88, doi:10.1097/JTO.0b013e318274a85d (2013).
- 93 Hunter, D. J. *et al.* A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* **39**, 870-874, doi:10.1038/ng2075 (2007).
- 94 Miura, S. *et al.* Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **12**, 56, doi:10.1186/1471-2407-12-56 (2012).
- 95 Yamauchi, M. *et al.* Tumor Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Level Predicts the Efficacy of Lenvatinib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clin Transl Gastroenterol* **11**, e00179, doi:10.14309/ctg.00000000000000179 (2020).
- 96 Xu, W. *et al.* FGFR4 transmembrane domain polymorphism and cancer risk: a meta-analysis including 8555 subjects. *Eur J Cancer* **46**, 3332-3338, doi:10.1016/j.ejca.2010.06.017 (2010).
- 97 Ye, Y. *et al.* FGFR4 Gly388Arg Polymorphism Affects the Progression of Gastric Cancer by Activating STAT3 Pathway to Induce Epithelial to Mesenchymal Transition. *Cancer Res Treat* **52**, 1162-1177, doi:10.4143/crt.2020.138 (2020).

- 98 Sheu, M. J. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 polymorphism is associated with liver cirrhosis in hepatocarcinoma. *PLoS One* **10**, e0122961, doi:10.1371/journal.pone.0122961 (2015).
- 99 Ho, H. K. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *J Hepatol* **50**, 118-127, doi:10.1016/j.jhep.2008.08.015 (2009).
- 100 Gao, L. *et al.* Implications of FGF19 on sorafenib-mediated nitric oxide production in hepatocellular carcinoma cells - a short report. *Cell Oncol (Dordr)* **41**, 85-91, doi:10.1007/s13402-017-0354-4 (2018).
- 101 Guagnano, V. *et al.* FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov* **2**, 1118-1133, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0210 (2012).
- 102 Lin, Z. Z. *et al.* Klotho-beta and fibroblast growth factor 19 expression correlates with early recurrence of resectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **39**, 1682-1691, doi:10.1111/liv.14055 (2019).
- 103 Gauglhofer, C. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4: a putative key driver for the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **35**, 2331-2338, doi:10.1093/carcin/bgu151 (2014).
- 104 Schmidt, B. *et al.* Molecular subclasses of hepatocellular carcinoma predict sensitivity to fibroblast growth factor receptor inhibition. *Int J Cancer* **138**, 1494-1505, doi:10.1002/ijc.29893 (2016).
- 105 McConnell, M. *et al.* Biology of portal hypertension. *Hepatol Int* **12**, 11-23, doi:10.1007/s12072-017-9826-x (2018).
- 106 Mejias, M. *et al.* Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* **49**, 1245-1256, doi:10.1002/hep.22758 (2009).
- 107 Ohya, K. *et al.* Early changes in ammonia levels and liver function in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated by lenvatinib therapy. *Sci Rep* **9**, 12101, doi:10.1038/s41598-019-48045-z (2019).
- 108 Hidaka, H. *et al.* Portal hemodynamic effects of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *J Gastroenterol* **47**, 1030-1035, doi:10.1007/s00535-012-0563-6 (2012).
- 109 Hidaka, H. *et al.* Portal hemodynamic effects of lenvatinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *Hepatol Res*, doi:10.1111/hepr.13531 (2020).
- 110 Hoshi, T. *et al.* Lenvatinib induces death of human hepatocellular carcinoma cells harboring an activated FGF signaling pathway through inhibition of FGFR-MAPK cascades. *Biochem Biophys Res Commun* **513**, 1-7, doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.015 (2019).

- 111 Ulaganathan, V. K. *et al.* Germline variant FGFR4 p.G388R exposes a membrane-proximal STAT3 binding site. *Nature* **528**, 570-574, doi:10.1038/nature16449 (2015).
- 112 Gao, L. *et al.* FGF19/FGFR4 signaling contributes to the resistance of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *J Exp Clin Cancer Res* **36**, 8, doi:10.1186/s13046-016-0478-9 (2017).
- 113 Gao, L. *et al.* Exploiting Plug-and-Play Electrochemical Biosensors to Determine the Role of FGF19 in Sorafenib-Mediated Superoxide and Nitric Oxide Production in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Methods Mol Biol* **2138**, 175-183, doi:10.1007/978-1-0716-0471-7_10 (2020).
- 114 Burke, A. J. *et al.* The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* **34**, 503-512, doi:10.1093/carcin/bgt034 (2013).
- 115 Lai, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation of furoxan-based nitric oxide-releasing derivatives of glycyrrhetic acid as anti-hepatocellular carcinoma agents. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 6416-6420, doi:10.1016/j.bmcl.2010.09.070 (2010).
- 116 Finn, R. S. *et al.* Phase Ib Study of Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol* **38**, 2960-2970, doi:10.1200/JCO.20.00808 (2020).
- 117 Taketomi, A. *et al.* Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* **83**, 58-63, doi:10.1002/(sici)1097-0142(19980701)83:1<58::Aid-cnrc8>3.0.Co;2-a (1998).
- 118 Fink, T. *et al.* Natural killer cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under in vivo oxygen conditions. *Scand J Immunol* **58**, 607-612, doi:10.1111/j.1365-3083.2003.01347.x (2003).
- 119 Siemens, D. R. *et al.* Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Cancer Res* **68**, 4746-4753, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0054 (2008).
- 120 Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58-62, doi:10.1126/science.1104819 (2005).
- 121 Kawamura, Y. *et al.* Pretreatment Heterogeneous Enhancement Pattern of Hepatocellular Carcinoma May Be a Useful New Predictor of Early Response to Lenvatinib and Overall Prognosis. *Liver Cancer* **9**, 275-292, doi:10.1159/000505190 (2020).
- 122 Kawamura, Y. *et al.* (18)F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Hepatocellular Carcinoma as a Useful Predictor of an Extremely Rapid Response to Lenvatinib. *Liver Cancer* **9**, 84-92, doi:10.1159/000503577 (2020).
- 123 Hamnvik, O. P. *et al.* Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer* **121**, 311-319, doi:10.1002/cncr.28972 (2015).
- 124 Bair, S. M. *et al.* Cardiovascular complications associated with novel angiogenesis inhibitors: emerging evidence and evolving perspectives. *Trends Cardiovasc Med* **23**, 104-113, doi:10.1016/j.tcm.2012.09.008 (2013).

- 125 Mitchell, J. A. *et al.* Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* **93**, 141-147, doi:10.1113/expphysiol.2007.038588 (2008).
- 126 Kappers, M. H. *et al.* Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension* **56**, 675-681, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149690 (2010).
- 127 Ancker, O. V. *et al.* The Adverse Effect of Hypertension in the Treatment of Thyroid Cancer with Multi-Kinase Inhibitors. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18030625 (2017).
- 128 Eechoute, K. *et al.* Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) predict sunitinib-induced hypertension. *Clin Pharmacol Ther* **92**, 503-510, doi:10.1038/clpt.2012.136 (2012).
- 129 Granito, A. *et al.* Prognostic significance of adverse events in patients with hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Therap Adv Gastroenterol* **9**, 240-249, doi:10.1177/1756283X15618129 (2016).
- 130 Li, Y. *et al.* Incidence and risk of sorafenib-induced hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **16**, 177-185, doi:10.1111/jch.12273 (2014).
- 131 Wu, S. *et al.* Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology* **9**, 117-123, doi:10.1016/s1470-2045(08)70003-2 (2008).
- 132 Shimose, S. *et al.* Clinical Significance of Adverse Events for Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma Treated with Lenvatinib: A Multicenter Retrospective Study. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12071867 (2020).
- 133 Ogawa, C. *et al.* Hand-Foot Syndrome and Post-Progression Treatment Are the Good Predictors of Better Survival in Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib: A Multicenter Study. *Oncology* **93 Suppl 1**, 113-119, doi:10.1159/000481241 (2017).
- 134 Hiraoka, A. *et al.* Prognostic factor of lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in real-world conditions-Multicenter analysis. *Cancer Med* **8**, 3719-3728, doi:10.1002/cam4.2241 (2019).
- 135 Hiraoka, A. *et al.* Sarcopenia and two types of presarcopenia in Japanese patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **28**, 940-947, doi:10.1097/MEG.0000000000000661 (2016).
- 136 Shachar, S. S. *et al.* Prognostic value of sarcopenia in adults with solid tumours: A meta-analysis and systematic review. *Eur J Cancer* **57**, 58-67, doi:10.1016/j.ejca.2015.12.030 (2016).
- 137 Eso, Y. *et al.* Dose Intensity/Body Surface Area Ratio is a Novel Marker Useful for Predicting Response to Lenvatinib against Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12010049 (2019).
- 138 Uojima, H. *et al.* Skeletal Muscle Mass Influences Tolerability and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma Patients Treated with Lenvatinib. *Liver Cancer* **9**, 193-206, doi:10.1159/000504604 (2020).

- 139 Lencioni, R. *et al.* Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* **30**, 52-60, doi:10.1055/s-0030-1247132 (2010).

VII. 學術論文



OPEN

Influence of NOS3 rs2070744 genotypes on hepatocellular carcinoma patients treated with lenvatinib

Shintaro Azuma^{1,2✉}, Haruki Uojima^{3,4}, Makoto Chuma⁵, Xue Shao³, Hisashi Hidaka³, Takahide Nakazawa^{3,6}, Masaaki Kondo⁷, Kazushi Numata⁵, Shogo Iwabuchi⁸, Makoto Kako⁴, Shin Maeda⁷, Wasaburo Koizumi³ & Koichiro Atsuda^{1,9}

We investigated whether or not nitric oxide synthase 3 (NOS3) rs2070744 genotypes can affect the response for lenvatinib treatment in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). We evaluated the relation of the NOS3 rs2070744 genotypes to the tumor response, progression-free survival (PFS), and overall survival (OS) as the response for lenvatinib. We also examined the association between fibroblast growth factor receptor (FGFR) gene polymorphisms, a potential feature of lenvatinib, and the response. There were no significant differences between the studies for either PFS or OS, even though patients with the TT genotype had a longer mean PFS (hazard ratio [HR] 0.60; $p = 0.069$) and mean OS (HR 0.46; $p = 0.075$) than those with the TC/CC genotypes. However, patients with a single-nucleotide polymorphism (SNP) combination pattern of the NOS3 rs2070744 TC/CC and FGFR4 rs351855 CT/TT genotypes had a significantly shorter mean PFS (HR 2.56; $p = 0.006$) and mean OS (HR 3.36; $p = 0.013$) than those with the other genotypes. The NOS3 rs2070744 genotypes did not influence the clinical response. However, the SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes may be helpful as treatment effect predictors and prognostic factors for HCC patients treated with lenvatinib.

Lenvatinib, a novel multikinase inhibitor, was found to be comparable to sorafenib in overall survival (OS) in unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) patients in a randomized phase III non-inferiority (REFLECT) trial^{1–5}. Therefore, it is now prescribed as the first-line therapy for advanced unresectable HCC. Compared with those for cancer-targeted treatments, the predictive factors for the response to lenvatinib, which target the micro-environment of the tumor, are unknown. The identification of such markers could improve the management of HCC by selecting the most effective therapeutic options available⁶. Some researchers have reported that a single-nucleotide polymorphism (SNP) of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) or the NOS3 gene influences the response to sorafenib in patients with HCC^{7,8}. The production of endogenous NO plays an essential role in carcinogenesis and tumor growth progression.

Three distinct genes, NOS1, NOS2, and NOS3, encode the NOS isoforms: the neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and eNOS, and the genetic variations present in genes encoding for NOS isoforms can affect NOS expression⁹. A point mutation of thymine to cytosine at the NOS3 T-786C polymorphism (rs2070744) results in

¹Department of Pharmacy, Kitasato University Hospital, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0375, Japan. ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan. ³Department of Gastroenterology, Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0374, Japan. ⁴Gastroenterology Medicine Center, Shonan Kamakura General Hospital, 1370-1 Okamoto, Kamakura, Kanagawa 247-8533, Japan. ⁵Gastroenterological Center, Yokohama City University Medical Center, 4-57 Urahane, Minami-ku, Yokohama, Kanagawa 232-0024, Japan. ⁶Nakazawa Internal Medicine Clinic, 4-14-18 Sagamidai, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0321, Japan. ⁷Department of Gastroenterology, Yokohama City University Hospital, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan. ⁸Hepato-Biliary-Pancreatic Center, Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital, 1-5-1 Tsujidokandai, Fujisawa, Kanagawa 251-0041, Japan. ⁹School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan. ✉email: shintaro@gazuma.org

the altered NOS protein levels and enzymatic activity^{10,11}. The previous study has reported a correlation between the NOS3 rs2070744 genotypes and the clinical response to sorafenib, which exerts antitumor effects by inhibiting vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), in patients with HCC¹².

Lenvatinib exerts antitumor effects by inhibiting receptor tyrosine kinases, including VEGFR⁵. The NOS3 rs2070744 genotypes may be useful predictors of the clinical response to lenvatinib. However, lenvatinib is a multiple receptor tyrosine kinase inhibitor targeting not only VEGFR but also fibroblast growth factor receptor (FGFR), platelet-derived growth factor receptor alpha, and KIT and RET proto-oncogenes. The potent activity against FGFR is a characteristic of lenvatinib, unlike sorafenib. Thus, there may be a difference in the responsiveness of NOS3 polymorphisms to HCC between lenvatinib and sorafenib. Therefore, we analyzed the role of the NOS3 polymorphism on HCC patients treated with lenvatinib.

Results

Enrolled patients. Of the 168 patients enrolled in this study, 68 (40.5%) patients were excluded (see Supplementary Fig. S1 online). Therefore, relevant clinical data were collected from 100 patients in three medical centers in Kanagawa: Kitasato University Hospital (n = 56), Yokohama City University Medical Center (n = 27), and Shonan Kamakura General Hospital (n = 17). All the patients from Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital were excluded from the study because they did not meet the inclusion criteria.

Correlation between the NOS3 rs2070744 genotypes and clinical characteristics. The demographic characteristics of patients are summarized in Table 1. The frequencies of TT, TC, and CC of the NOS3 rs2070744 genotypes were 76%, 23%, and 1%, respectively. The number of patients with the TT and TC/CC genotypes was 76 and 24, respectively. Comparing the clinical characteristics of patients with the TT genotype with those of patients with the TC/CC genotypes, there were no significant differences between the groups.

Effect of NOS3 rs2070744 on tumor response. Tumor response rates are summarized in Table 2. The confirmed objective response rates were 54% with the NOS3 rs2070744 TC/CC genotypes and 42% with the TT genotype (odds ratio [OR] 1.63; 95% confidence interval [CI] 0.58–4.56; $p = 0.351$). The disease control rate (objective response plus stable disease) was 83% with the TC/CC genotypes and 84% with the TT genotype (OR 0.94; 95% CI 0.25–4.44; $p = 1.000$).

Effect of NOS3 rs2070744 on PFS and OS. Figure 1 and Table 2 show the effect of the NOS3 rs2070744 genotypes on clinical outcomes. The mean progression-free survival (PFS) of all enrolled patients was 10.0 (95% CI 8.5–11.5) months. The mean PFS of the NOS3 rs2070744 TC/CC genotypes and the TT genotype was 7.5 (95% CI 4.8–10.2) months and 10.6 (95% CI 8.9–12.4) months, respectively. There were no significant differences between the PFS of the two groups (HR 0.60; 95% CI 0.34–1.05; $p = 0.069$). The mean OS of all enrolled patients was 21.3 (95% CI 19.4–23.3) months. The mean OS of the TC/CC genotypes and TT genotype was 16.1 (95% CI 12.7–19.4) months and 22.3 (95% CI 20.2–24.4) months, respectively. There were no significant differences between the OS of the two groups (HR 0.46; 95% CI 0.19–1.11; $p = 0.075$).

Effects of the FGFR gene polymorphisms on clinical response. Table 3 shows the effect of the *FGFR* gene polymorphisms on clinical outcomes. FGFR2 (rs2912791, rs2981429, rs2981582) and FGFR4 (rs351855) showed no significant differences in tumor response, PFS, or OS.

The SNP combination pattern and clinical outcomes. Figure 2 and Table 3 show the effect of FGFR alone and in combination with the NOS3 polymorphism on clinical outcomes. According to the effects of an SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes, patients with the NOS3 rs2070744 TC/CC and FGFR4 rs351855 CT/TT genotypes had a significantly shorter mean PFS of 6.0 (95% CI 2.7–9.3) months than did those with the other genotypes who had a mean PFS of 10.6 (95% CI 9.0–12.3) months (HR 2.56; 95% CI 1.28–5.09; $p = 0.006$). Similarly, patients with the TC/CC and CT/TT genotypes had a significantly shorter mean OS of 12.0 (95% CI 8.1–15.8) months than did those with the other genotypes who had a mean OS of 22.0 (95% CI 20.1–24.0) months (HR 3.36; 95% CI 1.21–9.29; $p = 0.013$).

Univariate and multivariate analysis of factors affecting the PFS and OS. We evaluated the relationship between the clinical response and the baseline clinical characteristics using a logistic regression model (see Supplementary Table S1 online). Table 4 provides the factors most associated with survival. In multivariate analysis adjusted for the Child–Pugh system (Class A vs. Class B), α -fetoprotein (< 400 vs. ≥ 400), age (< 75 vs. ≥ 75), albumin–bilirubin (ALBI) grade (Grade 1 vs. Grade ≥ 2), Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system (Stage B vs. Stage C), Macroscopic portal vein invasion, extrahepatic spread, or both, present (no vs. yes), and relative dose intensities at 56 days ($\geq 80\%$ vs. $< 80\%$). The SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 TC/CC and FGFR4 rs351855 CT/TT genotypes was significantly associated with both PFS (HR 2.95; 95% CI 1.27–6.86; $p = 0.012$) and OS (HR 3.29; 95% CI 1.01–10.74; $p = 0.049$), respectively.

Adverse event assessment. The most common adverse events among patients who received lenvatinib were anorexia (59%), fatigue (55%), palmar–plantar erythrodysesthesia (47%), abdominal pain (41%), and diarrhea (41%) (see Supplementary Table S2 online). Adverse events associated with lenvatinib forced dose reductions and discontinuation in 57% and 46% of the patients, respectively. The median time to the first dose reduction was 1.3 (interquartile range [IQR]; 0.8–3.0) months among the patients for whom the dose was reduced.

Characteristics	All (N = 100)	NOS3 rs2070744		p
		TT (n = 76)	TC/CC (n = 24)	
Median age (IQR), years	72 (66–78)	73 (66–79)	72 (65–78)	0.625
Age ≥ 65 years, n (%)	76 (76)	58 (76)	18 (75)	1.000
Age ≥ 75 years, n (%)	43 (43)	35 (46)	8 (33)	0.347
Male sex, n (%)	68 (68)	54 (71)	14 (58)	0.316
Etiology of HCC, n (%)				
Hepatitis B	17 (17)	12 (16)	5 (21)	0.504
Hepatitis C	41 (41)	34 (45)	7 (29)	
Alcohol use	15 (15)	10 (13)	5 (21)	
Non-alcoholic steatohepatitis	21 (21)	14 (18)	7 (29)	
Others	7 (7)	6 (8)	1 (4)	
ECOG-PS, n (%)				
0	95 (95)	71 (93)	24 (100)	0.333
1	5 (5)	5 (7)	0	
Child–Pugh system, n (%)				
Class A5	61 (61)	46 (61)	15 (63)	0.984
Class A6	22 (22)	17 (22)	5 (21)	
Class B	17 (17)	13 (17)	4 (17)	
Bodyweight ≥ 60 kg, n (%)	59 (59)	44 (58)	15 (63)	0.813
Median BMI (IQR), kg/m ²	23.0 (21.1–25.2)	22.9 (21.1–25.1)	23.2 (20.8–26.7)	0.663
BCLC staging system, n (%)				
Stage B (intermediate stage)	55 (55)	41 (54)	14 (58)	0.815
Stage C (advanced stage)	45 (45)	35 (46)	10 (42)	
Macroscopic PVI, extrahepatic spread, or both, present, n (%)	37 (37)	27 (36)	10 (42)	0.303
Up-to-seven criteria, n (%)				
within	60 (60)	45 (59)	15 (63)	0.816
beyond	40 (40)	31 (41)	9 (38)	
Maximum tumor size > 5 cm, n (%)	28 (28)	22 (29)	6 (25)	0.799
Number of tumors, n (%)				
1	14 (14)	10 (13)	4 (17)	0.703
2	13 (13)	11 (14)	2 (8)	
≥ 3	69 (69)	52 (68)	17 (71)	
UICC-TNM staging system, n (%)				
I and II	25 (25)	18 (24)	7 (29)	0.597
III and IV	75 (75)	58 (76)	17 (71)	
Tumor liver occupying rate ≥ 50%, n (%)	6 (6)	4 (5)	2 (8)	0.628
Initial dose, n (%)				
12 mg	32 (32)	23 (30)	9 (38)	0.704
8 mg	49 (49)	39 (51)	10 (42)	
4 mg	19 (19)	14 (18)	5 (21)	
RDI at 56 days ≥ 80%, n (%)	44 (44)	31 (41)	13 (54)	0.328
ALBI grade				
Grade 1 (≤ − 2.60)	44 (44)	36 (47)	8 (33)	0.372
Grade 2 (> − 2.60 to ≤ − 1.39)	54 (54)	39 (51)	15 (63)	
Grade 3 (> − 1.39)	2 (2)	1 (1)	1 (4)	
AFP at baseline ≥ 200 ng/mL, n (%)	35 (35)	24 (32)	11 (46)	0.226
AFP at baseline ≥ 400 ng/mL, n (%)	31 (31)	22 (29)	9 (38)	0.455
Median PIVKA- II (IQR), mAU/mL	392 (74–2200)	346 (74–2420)	672 (105–1489)	0.686

Table 1. Baseline clinical characteristics. *AFP* α-fetoprotein, *ALBI* albumin-bilirubin, *BCLC* Barcelona Clinic Liver Cancer, *BMI* body mass index, *ECOG-PS* Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status, *HCC* hepatocellular carcinoma, *IQR* interquartile range, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *PIVKA-II* protein induced by vitamin K absence or antagonist II, *PVI* portal vein invasion, *RDI* relative dose intensity.

due to adverse events. The median time to dose reduction of the NOS3 rs2070744 TT genotype and TC/CC genotypes was 1.3 (IQR; 0.8–3.0) months and 1.4 (IQR; 0.9–3.4) months, respectively. There were no significant

Variable	N	Tumor response						Progression-free survival			Overall survival		
		ORR, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	DCR, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	Mean months (95% CI)	HR (95% CI)	<i>p</i>	Mean months (95% CI)	HR (95% CI)	<i>p</i>
NOS3 rs2070744													
TC+CC	24	13 (54)	1.63 (0.58–4.56)	0.351	20 (83)	0.94 (0.25–4.44)	1.000	7.5 (4.8–10.2)	1 (ref)	0.069	16.1 (12.7–19.4)	1 (ref)	0.075
TT	76	32 (42)			64 (84)			10.6 (8.9–12.4)	0.60 (0.34–1.05)		22.3 (20.2–24.4)	0.46 (0.19–1.11)	

Table 2. Effect of the NOS3 rs2070744 on tumor response, progression-free survival, and overall survival. *CI* confidence interval, *DCR* disease control rate (objective response plus stable disease), *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *ORR* objective response rate (complete and partial response).

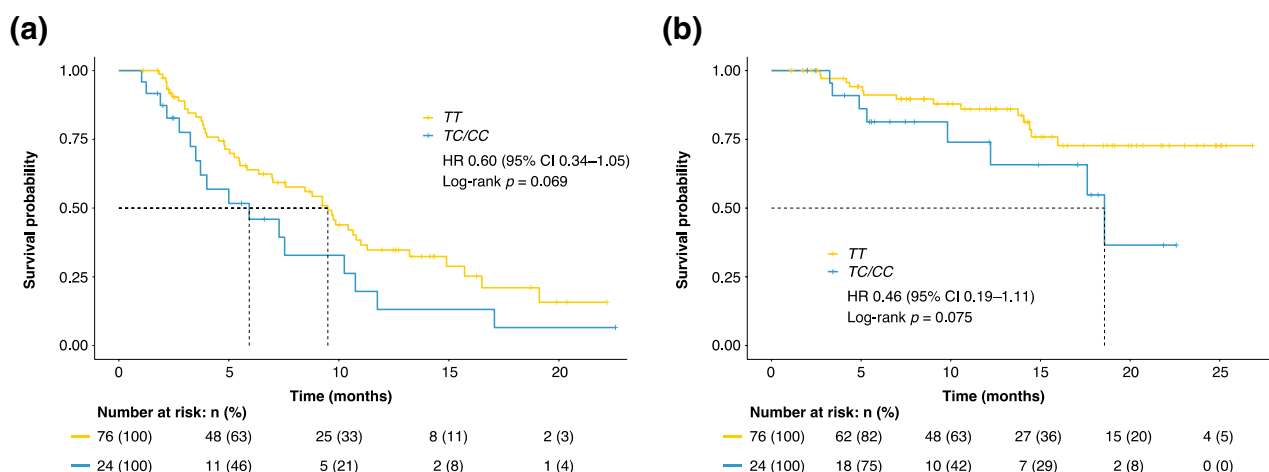


Figure 1. (a) Kaplan–Meier curves of PFS according to the NOS3 rs2070744 genotypes: TC/CC (blue line) vs. TT (yellow line). (b) Kaplan–Meier curves of OS according to the NOS3 rs2070744 genotypes: TC/CC (blue line) vs. TT (yellow line). *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OS* overall survival, *PFS* progression-free survival.

differences between the median time of the two groups ($p = 0.627$). Grade 3 adverse events occurred in 33 (43%) patients with the NOS3 rs2070744 TT genotype and 10 (42%) patients with the TC/CC genotypes. Grade 3 adverse events also occurred in 16 (43%) patients with the FGFR4 rs351855 CC genotype and 27 (43%) patients with the CT/TT genotypes. No grade 4 adverse events were observed. The median treatment duration was 6.4 (IQR; 2.5–12.6) months for the enrolled patients. The median treatment duration with the NOS3 rs2070744 TT genotype was longer than that with the TC/CC genotypes (6.9 [IQR; 2.5–12.9] months vs. 5.6 [IQR; 2.4–9.0] months, $p = 0.611$); however, the incidence rate of adverse events was similar.

Table 5 shows the impact on clinical outcomes of adverse events with an incidence rate of 30% or more. The mean PFS of the patients who developed grades 2 or 3 hypertension ($n = 20$) was significantly longer than that for those who developed grade 1 hypertension ($n = 15$) (10.9 [95% CI 7.5–14.2] months vs. 5.5 [95% CI 3.1–7.8] months; HR 0.37 [95% CI 0.17–0.83]; $p = 0.012$). There were no significant differences between the OS of the two groups (22.7 [95% CI 19.1–26.3] months vs. 16.6 [95% CI 11.3–21.9] months; HR 0.38 [95% CI 0.11–1.36]; $p = 0.123$). There were no correlations between the genetic polymorphisms, including those of the NOS3 gene, and the prevalence and severity of adverse events.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to report a correlation between the NOS3 rs2070744 genotypes and the clinical response to lenvatinib in patients with unresectable HCC. In a study investigating the utility of NOS3 SNPs, the NOS3 rs2070744 TT genotype was strongly associated with worse prognoses in patients with advanced HCC treated with sorafenib¹². However, the NOS3 rs2070744 TC/CC genotypes tended to correspond to a worse prognosis after the administration of lenvatinib, although there were no statistically significant differences. That is, there was a difference in the responsiveness of NOS3 polymorphisms to HCC between the administration of lenvatinib and sorafenib. This can be attributed to the fact that lenvatinib is a multiple receptor tyrosine kinase inhibitor targeting not only VEGFR but also FGFR.

HCC is a hypervascularized tumor. Tumor angiogenesis can be effectively suppressed by simultaneously suppressing both VEGFR and FGFR signals. Lenvatinib inhibits angiogenic factor-mediated pathways, including VEGF and FGF, resulting in a subsequent further reduction in NO production. Reduced production of NO, a vasodilator, induces contraction of hepatic stellate cells¹³. Moreover, it increases intrahepatic vascular resistance

Variable	N	Tumor response						Progression-free survival			Overall survival		
		ORR, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	DCR, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	Mean months (95% CI)	HR (95% CI)	<i>p</i>	Mean months (95% CI)	HR (95% CI)	<i>p</i>
FGFR2 rs2912791													
CT+CC	66	31 (47)	0.79 (0.31–1.97)	0.673	57 (86)	0.61 (0.18–2.16)	0.398	10.4 (8.5–12.3)	1 (ref)	0.490	21.5 (19.1–23.8)	1 (ref)	0.771
TT	34	14 (41)			27 (79)			9.3 (6.8–11.8)	1.20 (0.72–1.99)		19.8 (16.6–22.9)	1.14 (0.48–2.71)	
FGFR2 rs2981429													
CT+TT	48	23 (48)	0.80 (0.34–1.89)	0.688	41 (85)	0.82 (0.23–2.73)	0.789	10.4 (8.2–12.5)	1 (ref)	0.541	21.5 (18.9–24.1)	1 (ref)	0.742
CC	52	22 (42)			43 (83)			9.5 (7.3–11.6)	1.17 (0.71–1.91)		19.9 (17.3–22.5)	1.15 (0.50–2.66)	
FGFR2 rs2981582													
CT+CC	91	41 (45)	0.98 (0.18–4.86)	1.000	77 (85)	0.64 (0.11–6.93)	0.633	10.0 (8.4–11.7)	1 (ref)	0.817	21.0 (19.0–23.1)	1 (ref)	0.441
TT	9	4 (44)			7 (78)			10.4 (7.4–13.4)	0.91 (0.39–2.11)		21.1 (15.5–26.6)	0.46 (0.06–3.45)	
FGFR4 rs351855													
CT+TT	63	28 (44)	0.94 (0.39–2.31)	1.000	54 (86)	1.40 (0.40–4.71)	0.580	10.3 (8.4–12.2)	1 (ref)	0.552	21.4 (19.0–23.8)	1 (ref)	0.963
CC	37	17 (46)			30 (81)			9.3 (6.9–11.7)	1.17 (0.70–1.94)		19.8 (16.9–22.6)	1.02 (0.43–2.44)	
NOS3 rs2070744+FGFR4 rs351855													
Others	87	41 (47)	0.50 (0.10–1.97)	0.373	74 (85)	0.59 (0.13–3.77)	0.432	10.6 (9.0–12.3)	1 (ref)	0.006	22.0 (20.1–24.0)	1 (ref)	0.013
TC/CC+CT/TT	13	4 (31)			10 (77)			6.0 (2.7–9.3)	2.56 (1.28–5.09)		12.0 (8.1–15.8)	3.36 (1.21–9.29)	

Table 3. Effects of FGFR alone and in combination with NOS3 polymorphism on tumor response, progression-free survival, and overall survival. *CI* confidence interval, *DCR* disease control rate (objective response plus stable disease), *FGFR2* fibroblast growth factor receptor 2, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OR* odds ratio, *ORR* objective response rate (complete and partial response).

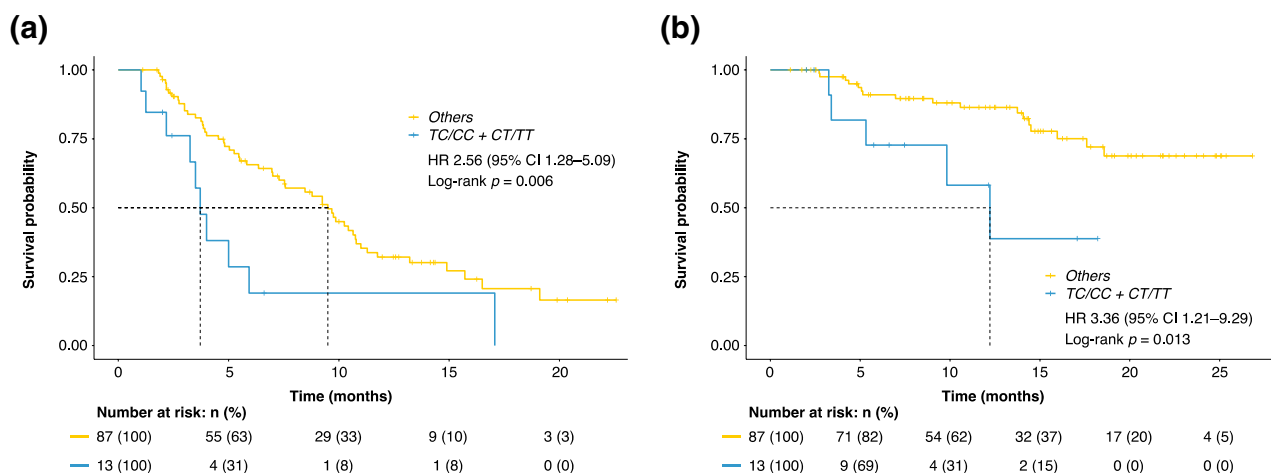


Figure 2. (a) Kaplan–Meier curves of PFS according to an SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855: TC/CC + CT/TT genotypes (blue line) vs. Others (yellow line). (b) Kaplan–Meier curves of OS according to an SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855: TC/CC + CT/TT genotypes (blue line) vs. Others (yellow line). *CI* confidence interval, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *OS* overall survival, *PFS* progression-free survival, *SNP* single-nucleotide polymorphism.

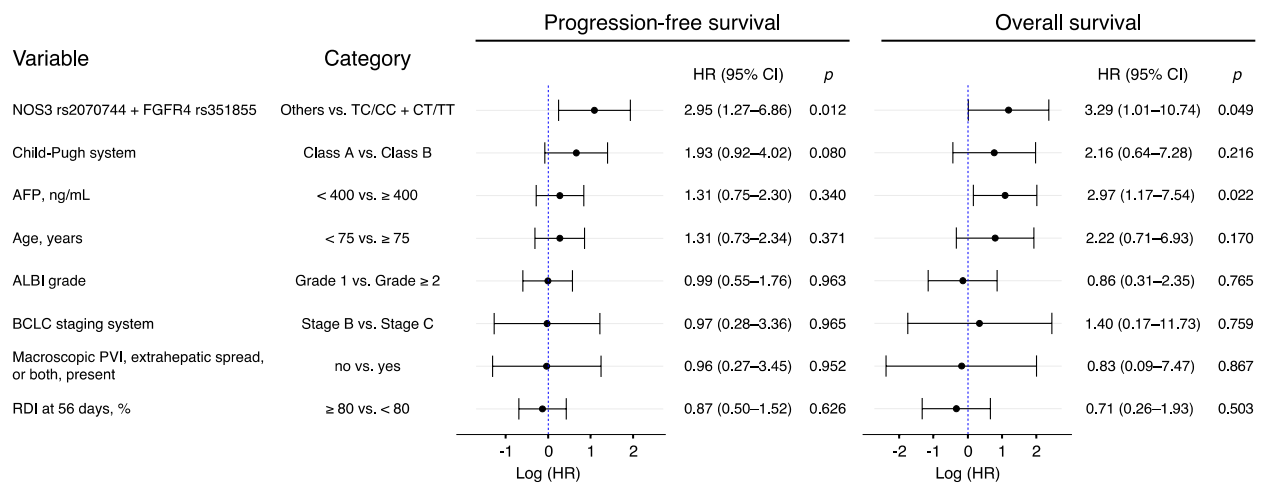


Table 4. Multivariable analysis for baseline prognostic factors for progression-free survival and overall survival. *AFP* α-fetoprotein, *ALBI* albumin-bilirubin, *BCLC* Barcelona Clinic Liver Cancer, *CI* confidence interval, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *PVI* portal vein invasion, *RDI* relative dose intensity.

Variable	N	Progression-free survival			Overall survival		
		Mean months (95% CI)	HR (95% CI)	p	Mean months (95% CI)	HR (95% CI)	p
Anorexia							
Grade 1	10	8.8 (3.7–13.9)	1 (ref)	0.702	26.8 (26.8–26.8)	N/A	0.087
Grade ≥ 2	49	8.7 (6.8–10.5)	1.19 (0.50–2.84)		18.8 (16.2–21.4)		
Fatigue							
Grade 1	31	8.6 (6.3–11.0)	1 (ref)	0.540	19.9 (16.6–23.2)	1 (ref)	0.429
Grade ≥ 2	24	7.6 (5.4–9.7)	1.21 (0.66–2.22)		18.6 (14.7–22.5)	1.48 (0.56–3.93)	
PPE							
Grade 1	25	8.3 (5.9–10.8)	1 (ref)	0.547	21.1 (17.3–25.0)	1 (ref)	0.857
Grade ≥ 2	22	9.5 (6.6–12.5)	0.82 (0.42–1.58)		19.7 (16.1–23.2)	1.11 (0.37–3.31)	
Abdominal pain							
Grade 1	26	8.3 (5.5–11.0)	1 (ref)	0.779	18.9 (15.3–22.4)	1 (ref)	0.929
Grade ≥ 2	15	7.8 (5.1–10.5)	1.10 (0.55–2.21)		20.1 (15.2–25.0)	0.95 (0.31–2.91)	
Diarrhea							
Grade 1	24	7.1 (5.3–8.9)	1 (ref)	0.201	17.5 (13.7–21.3)	1 (ref)	0.154
Grade ≥ 2	17	10.7 (6.5–14.9)	0.62 (0.29–1.30)		21.3 (17.7–24.9)	0.40 (0.11–1.48)	
Dysgeusia							
Grade 1	29	7.3 (5.6–9.0)	1 (ref)	0.958	19.6 (16.0–23.1)	1 (ref)	0.635
Grade ≥ 2	7	7.0 (4.2–9.8)	1.02 (0.42–2.52)		16.5 (9.3–23.7)	1.37 (0.38–4.97)	
Edema							
Grade 1	24	9.9 (6.9–12.8)	1 (ref)	0.584	24.8 (22.1–27.5)	1 (ref)	0.137
Grade ≥ 2	12	9.0 (5.7–12.2)	1.24 (0.57–2.70)		19.7 (15.1–24.4)	3.38 (0.62–18.6)	
Anxiety							
Grade 1	28	7.2 (5.4–9.1)	1 (ref)	0.447	19.6 (16.3–22.9)	1 (ref)	0.449
Grade ≥ 2	7	8.9 (3.6–14.1)	0.69 (0.26–1.82)		16.7 (9.5–24.0)	1.66 (0.44–6.29)	
Hypertension							
Grade 1	15	5.5 (3.1–7.8)	1 (ref)	0.012	16.6 (11.3–21.9)	1 (ref)	0.123
Grade ≥ 2	20	10.9 (7.5–14.2)	0.37 (0.17–0.83)		22.7 (19.1–26.3)	0.38 (0.11–1.36)	

Table 5. Effect of the adverse events on progression-free survival and overall survival. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio, *N/A* not available, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.

and decreases intrahepatic blood flow as well. This infers that the portal hemodynamic effects of lenvatinib are different from those of sorafenib. Lenvatinib significantly aggravates the Congestion index (-23.1% vs. $+16.2\%$), which reflects portal hemodynamics, and may exacerbate portal hypertension in patients with advanced HCC^{14,15}.

In the present study, we also revealed that an SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes was associated with PFS and OS. In another study, it was suggested that the FGFR4 Gly388Arg polymorphism (rs351855) resulted in the transmembrane domain missense mutation and may affect protein expression¹⁶. Mutations in the transmembrane domain of the tyrosine kinase receptor can alter the pathological phenotype or signal transduction of FGFR4¹⁷. Because FGFR4 has the highest expression of transcripts in the liver, FGFR4 rs351855 may regulate HCC signaling^{18–20}. Moreover, the FGFR4 rs351855 CT/TT genotypes sustained receptor activation and improved stability of the receptor more than did the CC genotype. This suggested influence on the response to chemotherapy in HCC patients treated with tyrosine kinase inhibitors^{21–24}.

The NOS3 rs2070744 TC/CC genotypes may reduce the promoter activity of the NOS3 gene compared to the TT genotype, resulting in reduced NO production^{25–27}. As is the case with the portal hemodynamic study^{14,15}, the effects of NO with the NOS3 rs2070744 when treated with lenvatinib may differ from the results of a previous study¹². Therefore, we presumed that the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes could be useful predictors of the clinical response to lenvatinib treatment. The results revealed that the SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes was helpful as treatment effect predictors and prognostic factors for HCC patients treated with lenvatinib. However, there was no significant difference in the objective response rate. The objective response rate can not always be used to directly evaluate the clinical benefit nor can it be comprehensively used to measure drug efficacy. More research is needed to validate whether or not this SNP combination pattern can be a potential biomarker for chemotherapy.

There have been cases reported correlating patients' clinical response to treatment with drug-related adverse events^{28–30}. In this study, patients who developed grades 2 or 3 hypertension during lenvatinib treatment had significantly longer PFS than those who developed grade 1 hypertension. Moreover, palmar-plantar erythrodysesthesia and diarrhea of grades 2 or 3 showed a prolonged PFS compared with grade 1. Previous studies have shown that patients who experienced hypertension and hand-foot skin reaction during lenvatinib treatment had significantly better outcomes than did those who did not develop these adverse events^{31,32}. Our findings indicate that hypertension can be a positive predictive marker of prognosis in patients receiving lenvatinib treatment. VEGFR inhibitors such as sorafenib and lenvatinib have been reported to cause endothelial dysfunction associated with reduced NO production and activation of endothelin-1, a potent vasoconstrictor^{33–37}. However, it is unclear why hypertension develops and why it is a marker of improved prognosis. On the other hand, grades 2 or 3 of anorexia and/or fatigue were poor prognostic factors for survival, although the differences were not significant. Anorexia was reported to be one of the common adverse events and was associated with time to discontinuation of lenvatinib treatment³². Anorexia and fatigue may be challenging conditions to alleviate and may affect the continuation of treatment and quality of daily life. The impact of genetic polymorphisms on the prevalence and severity of adverse events should be assessed, and the mechanisms underlying the occurrence of adverse events should be elucidated.

In this study, 55 (55%) patients were in the intermediate BCLC stage B and received systemic lenvatinib therapy. The global standard of care recommended for intermediate BCLC stage B is transcatheter arterial chemoembolization (TACE)^{38,39}. However, recent clinical studies have shown that lenvatinib treatment for patients with intermediate-stage HCC who present with beyond up-to-seven criteria and have Child–Pugh class A prolonged PFS and OS^{40,41}. Therefore, patients in this study with intermediate BCLC stage B and thus less likely to benefit from TACE were also treated with lenvatinib from the initial step at the discretion of their physicians. This study can help provide evidence for the importance of lenvatinib as a first-line treatment in patients with intermediate-stage HCC, who are very difficult to manage with TACE alone.

There were three limitations to this study. First, the selection bias for enrolled patients in this study cohort was undeniable because genomic DNA could not be obtained from all the patients receiving lenvatinib. Some patients, who had a short survival after lenvatinib treatment, could not be enrolled in this study. Therefore, individuals who had an inadequate response to lenvatinib were less likely to participate in the study. The median survival time of all the enrolled patients in this study was longer than that in the REFLECT trial with lenvatinib vs. sorafenib as a first-line treatment in 2018⁵. Moreover, the selection bias was correlated with the outcome. The multivariate analysis showed that an SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes was an independent factor of lenvatinib response, and a previous report showed that the factors significantly associated with poor OS included skeletal muscle mass index and ALBI grade⁴². Second, there was no control arm in the present study. Therefore, a clear distinction could not be made between the prognostic role of the NOS3 rs2070744 genotypes in patients treated with lenvatinib. Finally, the expression levels of NOS, which are crucial for NO synthesis, were not evaluated. Therefore, NOS expression and NO levels warrant further study and elucidation in patients with HCC.

In conclusion, the NOS3 rs2070744 genotypes did not influence the clinical response. However, we found that the SNP combination pattern of the NOS3 rs2070744 and FGFR4 rs351855 genotypes may be helpful as treatment effect predictors and prognostic factors for HCC patients treated with lenvatinib. Multicenter and prospective studies enrolling an appropriate number of patients will be required to confirm further the correlation of genetic polymorphisms with clinical outcomes and adverse events of lenvatinib.

Methods

Ethics. The Institutional Review Board (Ethics Committee) approved this study at all study the institutes involved, and the protocol of this study conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki. This study is registered in the University Hospital Medical Information Network (UMIN) Clinical Trials Registry (UMIN000036625).

The study was approved by the research ethics board at each participating center, and written informed consent was obtained from all participants. Patients were informed about the risk and benefits of the research and then chose to give their consent to participate.

Patients. This retrospective multicenter study was conducted in four medical institutions: Kitasato University Hospital, Yokohama City University Medical Center, Shonan Kamakura General Hospital, and Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital in Japan.

Eligible patients (age, ≥ 20 years) with advanced or unresectable HCC caused by chronic liver disease, the Eastern Cooperative Oncology Group-performance status of 1 or less, and adequate organ function were included in this study. We diagnosed HCC by blood tests and imaging modalities and histopathological analyses of biopsy specimens for patients with atypical imaging findings. Critical exclusion criteria included no genomic DNA extracted from whole blood, treatment of cases discontinued within 14 days, severe liver failure (Child–Pugh class C), refractory ascites, end-stage kidney disease, or malignancies other than HCC.

Treatment. Lenvatinib was recommended for patients with advanced BCLC stage C such as portal vein invasion, metastases to distant organs, and for those who were unsuitable and/or refractory to transcatheter arterial therapies. Patients with intermediate BCLC stage B also received systemic lenvatinib therapy at the discretion of their physicians. For patients without risk factors, the recommended dose of lenvatinib was based on body weight: 12 mg/day for patients with a body weight of 60 kg or more and 8 mg/day for patients with a body weight of less than 60 kg. Dose reduction from the initial dose was approved according to the attending physician's discretion for patients who had risk factors. After the administration of lenvatinib, the dose was changed based on the clinical response and/or the occurrence of severe adverse events. Treatment continued with progressive disease (PD) or until the occurrence of unmanageable adverse events.

Evaluation for treatment response. We defined tumor response according to the modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (mRECIST)⁴³. Tumor response was visualized by a radiologist using either dynamic computed tomography or dynamic magnetic resonance imaging techniques and was assessed by the attending physician. The target lesion in the mRECIST assessment was defined as the contrast-enhanced portion of the lesion in the arterial phase. For the mRECIST assessment, a complete response (CR) was defined as the disappearance of the target lesion. Partial response (PR) was defined as a reduction of at least 30% of the target lesion size compared to the baseline diameter. PD was defined as an increase of at least 20% of the target lesion size. Stable disease (SD) was defined as any case that does not qualify for either PR or PD.

Objective response was defined as the proportion of patients with the best overall response of confirmed CR or PR. Disease control was defined as the best tumor response of CR, PR, or SD. Patients with an unknown response because of missing data could not be evaluated and were therefore excluded from our analyses. We also recorded the best variation (maximal decrease or minimal increase) in the sum of the most significant lesion dimensions for each patient.

End-point measurement. To investigate whether or not the NOS3 rs2070744 genotypes can affect the response for lenvatinib treatment in patients with HCC, we examined the influence of the genotypes on the tumor response, PFS, OS, and adverse events. Furthermore, we investigated the impact of the *FGFR* gene on the response in HCC patients treated with lenvatinib. PFS and OS defined as the time from the first dose of lenvatinib to progression or death (for PFS) or death alone (for OS) according to mRECIST. Adverse event assessments were done according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 definitions.

Genomic DNA isolation. Blood samples from the follow-up patients were exclusively collected in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tubes. Genomic DNA was extracted from whole blood using an automated MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) with the MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) following the manufacturer's instructions.

TaqMan SNP genotyping assays. Genotypes for the NOS3 rs2070744 were determined using the TaqMan SNP Genotyping Assay kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Patients were classified as heterozygotic or homozygotic for each allele. They were categorized as the TT genotype (wild type homozygous mutant), the TC genotype (heterozygous mutant), and the CC genotype (homozygous mutant). As SNPs for the *FGFR* gene, *FGFR2* (rs2912791, rs2981429, rs2981582) and *FGFR4* (rs351855) were also determined. Chromosomes, positions, and biological effects of the SNPs studied can be found in the Supplementary Table S3 online.

The reaction consisted of 10 μ L Master Mix (2 \times conc.), 2 μ L of the Primer–probe mix (10 \times conc.), 6 μ L of Water (PCR grade), and 2 μ L of genomic DNA sample in a total reaction volume of 20 μ L using the FastStart Essential DNA Probes Master kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The 2-step amplification cycling conditions were: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s. VIC (victoria) and FAM (fluorescein) fluorescence data were analyzed under Endpoint Genotyping using LightCycler 96 System software version 1.1.0.1320 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Statistical analysis. We estimated that this study would require a total of 100 patients by considering loss to follow-up. Variables were examined using Fisher's exact test or the Chi-square test. The differences between the PFS and OS in the two groups were analyzed by the Kaplan–Meier method and the Log-rank test. Variables identified using the univariate analysis to be significantly associated with PFS and OS were entered into the Cox proportional hazards regression model for multivariate analysis. Univariate and multivariate analyses with logistic regression models were used to calculate the OR at 95% CI to assess the correlation between the response and the NOS3 rs2070744 genotypes for lenvatinib treatment. A two-sided *p* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. All analyses were performed using SPSS version 24.0 software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) by the Statista Corporation (Kyoto, Japan) and Stata/MP 15.1 for Mac (StataCorp, College Station, TX, USA).

Ethics approval. The study was conducted in accordance with the Institutional Review Board for Human Genome Research of the Kitasato University Medical Ethics Organization (KME0) (Approval Number: KME0 G18-16), the Ethical committee in human genome research of the Yokohama City University (Approval Number: A190725004), and the Tokushukai Group Ethics Committee of Shonan Kamakura General Hospital and Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital (Approval Number: TGE01429-024). The results/data/figures in this manuscript have not been published elsewhere, nor are they under consideration (from you or one of your Contributing Authors) by another publisher.

Consent for publication. The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

Consent to participate. The study was conducted following the Declaration of Helsinki and after obtaining approval of the institutional research ethics committee and written informed consent obtained from all participants.

Data availability

The technical appendix, statistical code, and dataset are available from the corresponding author.

Received: 9 July 2020; Accepted: 23 September 2020

Published online: 13 October 2020

References

- Kudo, M. Extremely high objective response rate of lenvatinib: its clinical relevance and changing the treatment paradigm in hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* **7**, 215–224. <https://doi.org/10.1159/000492533> (2018).
- Kudo, M. Proposal of primary endpoints for TACE combination trials with systemic therapy: lessons learned from 5 negative trials and the positive TACTICS trial. *Liver Cancer* **7**, 225–234. <https://doi.org/10.1159/000492535> (2018).
- Fornier, A., Reig, M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **391**, 1301–1314. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30010-2) (2018).
- Kudo, M. Lenvatinib may drastically change the treatment landscape of hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* **7**, 1–19. <https://doi.org/10.1159/000487148> (2018).
- Kudo, M. *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* **391**, 1163–1173. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30207-1) (2018).
- Chen, C. H. *et al.* Distinct role of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms from menopausal status in the patients with sporadic breast cancer in Taiwan. *Nitric Oxide* **72**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.009> (2018).
- Casadei Gardini, A. *et al.* eNOS polymorphisms and clinical outcome in advanced HCC patients receiving sorafenib: final results of the ePHAS study. *Oncotarget* **7**, 27988–27999. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8569> (2016).
- Marisi, G. *et al.* ANGPT2 and NOS3 polymorphisms and clinical outcome in advanced hepatocellular carcinoma patients receiving sorafenib. *Cancers (Basel)* <https://doi.org/10.3390/cancers11071023> (2019).
- Ziche, M. & Morbidelli, L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur. Cytokine Netw.* **20**, 164–170. <https://doi.org/10.1684/ecr.2009.0169> (2009).
- Diler, S. B. & Öden, A. The T-786C, G894T, and intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in prostate cancer cases. *Russ. J. Genet.* **52**, 220–225. <https://doi.org/10.1134/s1022795416020022> (2016).
- Safarinejad, M. R., Safarinejad, S., Shafiei, N. & Safarinejad, S. Effects of the T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. *Urol. Oncol.* **31**, 1132–1140. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.01.002> (2013).
- Casadei Gardini, A. *et al.* Association of NOS3 and ANGPT2 gene polymorphisms with survival in patients with hepatocellular carcinoma receiving sorafenib: results of the multicenter prospective INNOVATE study. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3897> (2020).
- Ohya, K. *et al.* Early changes in ammonia levels and liver function in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated by lenvatinib therapy. *Sci. Rep.* **9**, 12101. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48045-z> (2019).
- Hidaka, H. *et al.* Portal hemodynamic effects of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *J. Gastroenterol.* **47**, 1030–1035. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0563-6> (2012).
- Hidaka, H. *et al.* Portal hemodynamic effects of lenvatinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *Hepatol. Res.* <https://doi.org/10.1111/hepr.13531> (2020).
- Sheu, M. J. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 polymorphism is associated with liver cirrhosis in hepatocarcinoma. *PLoS ONE* **10**, e0122961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122961> (2015).
- Ma, Z. *et al.* Polymorphisms of fibroblast growth factor receptor 4 have association with the development of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia and the progression of prostate cancer in a Japanese population. *Int. J. Cancer* **123**, 2574–2579. <https://doi.org/10.1002/ijc.23578> (2008).
- Gao, L., Shay, C., Lv, F., Wang, X. & Teng, Y. Implications of FGF19 on sorafenib-mediated nitric oxide production in hepatocellular carcinoma cells: a short report. *Cell Oncol. (Dordr)* **41**, 85–91. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0354-4> (2018).
- Ho, H. K. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *J. Hepatol.* **50**, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.015> (2009).

20. Guagnano, V. *et al.* FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov.* **2**, 1118–1133. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0210> (2012).
21. Gao, L. *et al.* FGF19/FGFR4 signaling contributes to the resistance of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 8. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0478-9> (2017).
22. Tovar, V. *et al.* Tumour initiating cells and IGF/FGF signalling contribute to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Gut* **66**, 530–540. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309501> (2017).
23. Fang, H. M., Tian, G., Zhou, L. J., Zhou, H. Y. & Fang, Y. Z. FGFR4 genetic polymorphisms determine the chemotherapy response of Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 549–554. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.206> (2013).
24. Wang, J., Yu, W., Cai, Y., Ren, C. & Ittmann, M. M. Altered fibroblast growth factor receptor 4 stability promotes prostate cancer progression. *Neoplasia* **10**, 847–856. <https://doi.org/10.1593/neo.08450> (2008).
25. Nakayama, M. *et al.* T-786->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* **99**, 2864–2870. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.22.2864> (1999).
26. Nagasaki, S. *et al.* eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. *Thromb. Res.* **115**, 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.09.003> (2005).
27. Senthil, D. *et al.* Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol.* **24**, 218–224. <https://doi.org/10.1089/dna.2005.24.218> (2005).
28. Granito, A. *et al.* Prognostic significance of adverse events in patients with hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **9**, 240–249. <https://doi.org/10.1177/1756283X15618129> (2016).
29. Li, Y. *et al.* Incidence and risk of sorafenib-induced hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Hypertens (Greenwich)* **16**, 177–185. <https://doi.org/10.1111/jch.12273> (2014).
30. Wu, S., Chen, J. J., Kudelka, A., Lu, J. & Zhu, X. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* **9**, 117–123. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70003-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70003-2) (2008).
31. Shimose, S. *et al.* clinical significance of adverse events for patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with lenvatinib: a multicenter retrospective study. *Cancers (Basel)* <https://doi.org/10.3390/cancers12071867> (2020).
32. Hiraoka, A. *et al.* Prognostic factor of lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in real-world conditions—multicenter analysis. *Cancer Med.* **8**, 3719–3728. <https://doi.org/10.1002/cam4.2241> (2019).
33. Hamnvik, O. P. *et al.* Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer* **121**, 311–319. <https://doi.org/10.1002/cncr.28972> (2015).
34. Bair, S. M., Choueiri, T. K. & Moslehi, J. Cardiovascular complications associated with novel angiogenesis inhibitors: emerging evidence and evolving perspectives. *Trends Cardiovasc. Med.* **23**, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.09.008> (2013).
35. Mitchell, J. A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L. & Harrington, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol.* **93**, 141–147. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.038588> (2008).
36. Kappers, M. H. *et al.* Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension* **56**, 675–681. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149690> (2010).
37. Ancker, O. V., Wehland, M., Bauer, J., Infanger, M. & Grimm, D. The Adverse effect of hypertension in the treatment of thyroid cancer with multi-kinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms18030625> (2017).
38. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e. & European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **69**, 182–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019> (2018).
39. Chen, L. T. *et al.* Pan-Asian adapted ESMO clinical practice guidelines for the management of patients with intermediate and advanced/recurred hepatocellular carcinoma: a TOS-ESMO initiative endorsed by CSCO, ISMPO, JSMO, KSMO, MOS and SSO. *Ann. Oncol.* **31**, 334–351. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.12.001> (2020).
40. Kudo, M. *et al.* Lenvatinib as an initial treatment in patients with intermediate-stage hepatocellular carcinoma beyond up-to-seven criteria and child-pugh a liver function: a proof-of-concept study. *Cancers (Basel)* <https://doi.org/10.3390/cancers11081084> (2019).
41. Kudo, M. A new treatment option for intermediate-stage hepatocellular carcinoma with high tumor burden: initial lenvatinib therapy with subsequent selective TACE. *Liver Cancer* **8**, 299–311. <https://doi.org/10.1159/000502905> (2019).
42. Uojima, H. *et al.* Skeletal muscle mass influences tolerability and prognosis in hepatocellular carcinoma patients treated with lenvatinib. *Liver Cancer* **9**, 193–206. <https://doi.org/10.1159/000504604> (2020).
43. Lencioni, R. & Llovet, J. M. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin. Liver Dis.* **30**, 52–60. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247132> (2010).

Acknowledgements

We thank Robert E. Brandt, Founder, CEO, and CME, of MedEd Japan, for editing and formatting the manuscript.

Author contributions

S.A. was responsible for the concept and design, collection and assembly of data, and statistical analysis. H.U. and M.C. collected and assembled the data. H.H. and T.N. analyzed and interpreted the data. X.S., M.K., K.N., S.I., S.M., W.K., and K.A. contributed to data collection and critically reviewed the manuscript. M.K. was the general director of the study group. All authors read and gave final approval to the manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73930-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



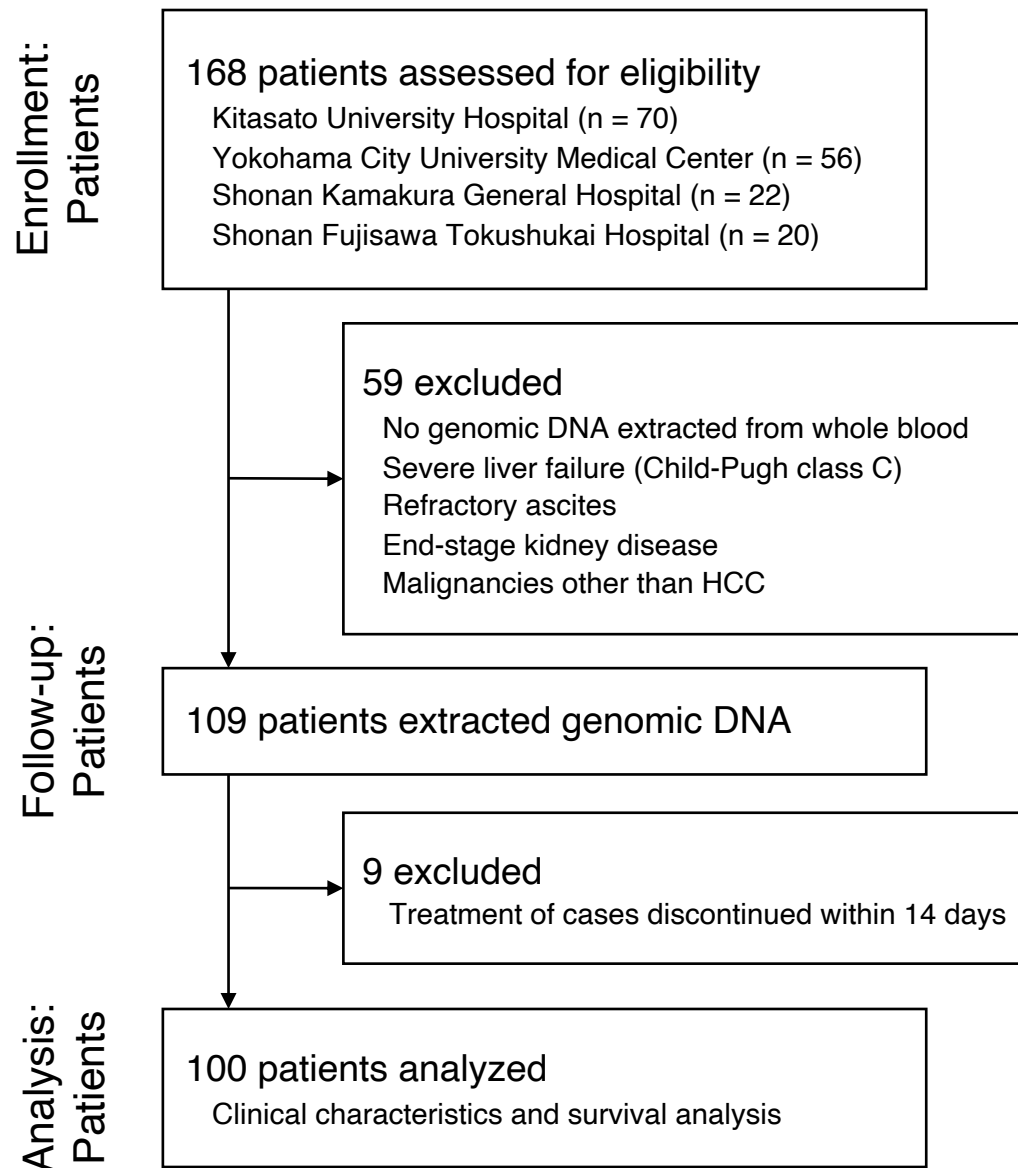
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Influence of NOS3 rs2070744 genotypes on hepatocellular carcinoma patients treated with lenvatinib

Shintaro Azuma,^{1, 2} Haruki Uojima,^{3, 4} Makoto Chuma,⁵ Xue Shao,³ Hisashi Hidaka,³
Takahide Nakazawa,^{3, 6} Masaaki Kondo,⁷ Kazushi Numata,⁵ Shogo Iwabuchi,⁸ Makoto
Kako,⁴ Shin Maeda,⁷ Wasaburo Koizumi,³ and Koichiro Atsuda^{1, 9}

1. Department of Pharmacy, Kitasato University Hospital, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa, 252-0375, Japan
2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan
3. Department of Gastroenterology, Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa, 252-0374, Japan
4. Gastroenterology Medicine Center, Shonan Kamakura General Hospital, 1370-1 Okamoto, Kamakura, Kanagawa, 247-8533, Japan
5. Gastroenterological Center, Yokohama City University Medical Center, 4-57 Urahane, Minami-ku, Yokohama, Kanagawa, 232-0024, Japan
6. Nakazawa Internal Medicine Clinic, 4-14-18 Sagamidai, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa, 252-0321, Japan
7. Department of Gastroenterology, Yokohama City University Hospital, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa, 236-0004, Japan
8. Hepato-Biliary-Pancreatic Center, Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital, 1-5-1 Tsujidokandai, Fujisawa, Kanagawa, 251-0041, Japan
9. School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan



Supplementary Figure S1. Trial profile

Supplementary Table S1. Univariate analysis for baseline prognostic factors for progression-free survival and overall survival

Variable	Category	Progression-free survival		Overall survival	
		HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
AFP, ng/mL	< 200 vs. ≥ 200	1.57 (0.95–2.60)	0.081	3.44 (1.47–8.08)	0.004
AFP, ng/mL	< 400 vs. ≥ 400	1.50 (0.90–2.51)	0.119	3.12 (1.35–7.23)	0.008
ALBI grade	Grade 1 vs. Grade ≥ 2	1.35 (0.82–2.22)	0.244	1.52 (0.64–3.60)	0.338
Age, years	< 65 vs. ≥ 65	1.35 (0.76–2.41)	0.311	0.72 (0.29–1.77)	0.473
Age, years	< 75 vs. ≥ 75	1.04 (0.62–1.72)	0.889	1.24 (0.53–2.93)	0.618
BCLC staging system	Stage B vs. Stage C	0.99 (0.61–1.62)	0.975	1.55 (0.66–3.64)	0.314
BMI, kg/m ²	< 21 vs. ≥ 21	1.39 (0.77–2.52)	0.279	2.08 (0.62–7.04)	0.238
Body weight, kg	< 60 vs. ≥ 60	1.19 (0.72–1.97)	0.506	1.63 (0.67–4.02)	0.284
Child-Pugh system	Class A vs. Class B	1.91 (1.06–3.44)	0.031	2.91 (1.22–6.95)	0.016
ECOG-PS	0 vs. 1	0.79 (0.25–2.52)	0.685	N/A	N/A
Etiology of HCC:					
Non-alcoholic steatohepatitis	no vs. yes	1.04 (0.57–1.88)	0.905	0.79 (0.27–2.33)	0.665
Etiology of HCC: Alcohol use	no vs. yes	0.77 (0.37–1.63)	0.495	3.64 (1.45–9.16)	0.006
Etiology of HCC: Hepatitis B	no vs. yes	1.64 (0.90–2.98)	0.106	0.68 (0.20–2.31)	0.542
Etiology of HCC: Hepatitis C	no vs. yes	0.66 (0.39–1.12)	0.121	0.57 (0.22–1.46)	0.242
Extrahepatic spread present	no vs. yes	0.67 (0.38–1.18)	0.163	0.87 (0.35–2.17)	0.768
FGFR4 rs351855 genotype	CT/TT vs. CC	1.17 (0.70–1.94)	0.553	1.02 (0.43–2.44)	0.963
Hepatic ascites	no vs. yes	1.60 (0.85–3.01)	0.146	4.40 (1.82–10.62)	0.001
Hepatic encephalopathy	no vs. yes	1.70 (0.68–4.25)	0.258	1.77 (0.41–7.58)	0.443
Intrahepatic lesion	no vs. yes	0.33 (0.10–1.09)	0.069	N/A	N/A
Macroscopic PVI, extrahepatic spread, or both, present	no vs. yes	0.90 (0.55–1.50)	0.699	1.50 (0.65–3.49)	0.345
Macroscopic PVI present	no vs. yes	1.71 (0.93–3.14)	0.084	3.89 (1.60–9.49)	0.003
Maximum tumor size, cm	≤ 5 vs. > 5	1.26 (0.74–2.14)	0.397	2.70 (1.15–6.33)	0.022
NOS3 rs2070744	Others				
+ FGFR4 rs351855 genotypes	vs. TC/CC + CT/TT	2.56 (1.28–5.09)	0.008	3.36 (1.21–9.29)	0.020
NOS3 rs2070744 genotype	TC/CC vs. TT	0.60 (0.34–1.05)	0.073	0.46 (0.19–1.11)	0.083
Number of tumors	< 4 vs. ≥ 4	0.91 (0.56–1.48)	0.701	1.26 (0.54–2.93)	0.588
PIVKA-II, mAU/mL	< 100 vs. ≥ 100	1.00 (0.57–1.77)	0.988	1.22 (0.45–3.31)	0.696
Portal vein invasion	VP 0–3 vs. VP ≥ 4	1.13 (0.45–2.85)	0.789	1.44 (0.33–6.24)	0.622
RDI at 56 days, %	≥ 70 vs. < 70	1.09 (0.65–1.82)	0.745	1.28 (0.53–3.10)	0.588
RDI at 56 days, %	≥ 75 vs. < 75	1.06 (0.64–1.77)	0.818	1.09 (0.45–2.64)	0.847
RDI at 56 days, %	≥ 80 vs. < 80	1.00 (0.60–1.66)	0.988	0.83 (0.34–2.01)	0.682
Sex	female vs. male	1.10 (0.64–1.89)	0.722	2.09 (0.71–6.17)	0.184
Tumor liver occupying rate, %	< 50 vs. ≥ 50	1.03 (0.37–2.87)	0.948	1.92 (0.45–8.26)	0.381
UICC-TNM staging system	I and II vs. III and IV	0.96 (0.54–1.72)	0.899	1.19 (0.40–3.53)	0.750
Up-to-seven criteria	within vs. beyond	1.02 (0.62–1.68)	0.945	1.68 (0.73–3.91)	0.224

AFP α-fetoprotein, ALBI albumin-bilirubin, BCLC Barcelona Clinic Liver Cancer, BMI body mass index, BSC best supportive care, CI confidence interval, ECOG-PS Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status, FGFR4 fibroblast growth factor receptor 4, HCC hepatocellular carcinoma, HR hazard ratio, N/A not available, NOS3 nitric oxide synthase 3, PIVKA-II protein induced by vitamin K absence or antagonist II, PVI portal vein invasion, RDI relative dose intensity, UICC-TNM Union for International Cancer Control-Tumor, Nodes, Metastasis.

Supplementary Table S2. Treatment-related adverse events occurring in either group

Adverse event, n (%)	N	All (N = 100)		<i>NOS3 rs2070744</i>				<i>FGFR4 rs351855</i>			
				TT (n = 76)		TC + CC (n = 24)		CC (n = 37)		CT + TT (n = 63)	
		Grade ≤ 2	Grade 3	Grade ≤ 2	Grade 3	Grade ≤ 2	Grade 3	Grade ≤ 2	Grade 3	Grade ≤ 2	Grade 3
Any adverse event	76	73 (96)	43 (57)	55 (72)	33 (43)	18 (75)	10 (42)	28 (76)	16 (43)	45 (71)	27 (43)
Anorexia	59	42 (71)	17 (29)	30 (39)	13 (17)	12 (50)	4 (17)	18 (49)	7 (19)	24 (38)	10 (16)
Fatigue	55	54 (98)	1 (2)	39 (51)	1 (1)	15 (63)	0	22 (59)	0	32 (48)	1 (2)
PPE	47	45 (96)	2 (4)	31 (41)	1 (1)	14 (58)	1 (4)	19 (51)	0	26 (32)	2 (3)
Abdominal pain	41	38 (93)	3 (7)	26 (34)	3 (4)	12 (50)	0	13 (35)	1 (3)	25 (40)	2 (3)
Diarrhea	41	37 (90)	4 (10)	25 (33)	3 (4)	12 (50)	1 (4)	15 (41)	3 (8)	22 (35)	1 (2)
Dysgeusia	36	36 (100)	0	26 (34)	0	10 (42)	0	13 (35)	0	23 (37)	0
Edema	36	34 (94)	2 (6)	27 (36)	1 (1)	7 (29)	1 (4)	13 (35)	0	21 (33)	2 (3)
Anxiety	35	32 (91)	3 (9)	23 (30)	3 (4)	9 (38)	0	9 (24)	2 (5)	23 (37)	1 (2)
Hypertension	35	28 (80)	7 (20)	21 (28)	6 (8)	7 (29)	1 (4)	12 (32)	3 (8)	16 (25)	4 (6)
Constipation	29	25 (86)	4 (14)	19 (25)	4 (5)	6 (25)	0	6 (16)	3 (8)	19 (30)	1 (2)
Nausea/vomiting	27	26 (96)	1 (4)	21 (28)	1 (1)	5 (21)	0	13 (35)	0	13 (21)	1 (2)
Palpitations	27	25 (93)	2 (7)	19 (25)	2 (3)	6 (25)	0	9 (24)	2 (5)	16 (25)	0
Rash	26	26 (100)	0	17 (22)	0	9 (38)	0	10 (27)	0	16 (25)	0
Mucositis oral	24	22 (92)	2 (8)	13 (17)	2 (3)	9 (38)	0	9 (24)	1 (3)	13 (21)	1 (2)
Proteinuria	20	13 (65)	7 (35)	9 (12)	6 (8)	4 (17)	1 (4)	7 (19)	1 (3)	6 (10)	6 (10)
Peripheral neuropathy	19	19 (100)	0	14 (18)	0	5 (21)	0	6 (16)	0	13 (21)	0
Nail change	13	13 (100)	0	11 (14)	0	2 (8)	0	3 (8)	0	10 (16)	0
Eye disorders	12	12 (100)	0	8 (11)	0	4 (17)	0	4 (11)	0	8 (13)	0
Hypothyroidism	11	11 (100)	0	9 (12)	0	2 (8)	0	2 (5)	0	9 (14)	0
Paronychia	7	7 (100)	0	6 (8)	0	1 (4)	0	0	0	7 (11)	0
Ascites	6	2 (33)	4 (67)	2 (3)	4 (5)	0	0	1 (3)	3 (8)	1 (2)	1 (2)
Fever	6	6 (100)	0	3 (4)	0	3 (13)	0	4 (11)	0	2 (3)	0
Platelet count decreased	6	4 (67)	2 (33)	3 (4)	2 (3)	1 (4)	0	0	0	4 (6)	2 (3)

FGFR4 fibroblast growth factor receptor 4, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *PPE* palmar-plantar erythrodysesthesia.

Supplementary Table S3. Chromosome, positions and biological effect of studied single-nucleotide polymorphisms

Gene	Gene name	SNP	TaqMan catalog number	Chr	Position	Functional consequence	Amino acid change
<i>NOS3</i>	Nitric oxide synthase 3	rs2070744	C_15903863_10	7	150992991	Intron variant	N/A
		rs2912791	C_16166432_10	10	121559447	Intron variant	N/A
<i>FGFR2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	rs2981429	C_2917349_10	10	121552460	Intron variant	N/A
		rs2981582	C_2917302_10	10	121592803	Intron variant	N/A
<i>FGFR4</i>	Fibroblast growth factor receptor 4	rs351855	C_3166614_10	5	177093242	Missense variant	Gly388Arg

Arg arginine, *Chr* chromosome, *Gly* glycine, *N/A* not available, *SNP* single-nucleotide polymorphism.

VIII. 論文要旨

学位論文内容要旨

氏名： 東 信太郎

題目：「肝細胞癌に対するレンバチニブ療法の臨床効果に及ぼす *NOS3* 遺伝子多型の影響」

【緒言】

レンバチニブは腫瘍血管新生と腫瘍増殖に関与する複数の受容体チロシンキナーゼ活性を阻害する経口マルチキナーゼ阻害薬である。切除不能な肝細胞癌の第一選択薬として臨床使用されているが、科学的根拠の得られている治療効果予測因子・予後因子は未だ確立されていない。

近年、肝細胞癌に対するソラフェニブ療法の臨床効果と内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial Nitric oxide synthase; eNOS) の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) である *NOS3 rs2070744* との間に有意な相関が認められた。NOS は L-アルギニンから一酸化窒素 (Nitric oxide; NO) の合成を触媒する酵素ファミリーである。NOS によって合成される NO は血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) の上方制御によって増加し、血管新生を促進させる可能性がある。これは腫瘍の増殖能力を高めるだけでなく、その浸潤性および転移能力をも高めるため、多血性腫瘍である肝細胞癌に対する薬物療法の治療効果に影響を与える可能性がある。レンバチニブはソラフェニブと比較して、腫瘍血管新生や薬剤耐性などに重要な役割を果たしている線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast growth factor receptor; FGFR) に対する強力なキナーゼ阻害活性を有するため、レンバチニブとソラフェニブの臨床効果に対する *NOS3* 遺伝子多型の影響は異なる可能性が考えられる。

今回、肝細胞癌に対するレンバチニブ療法の臨床効果に及ぼす *NOS3* 遺伝子多型の影響を調査し、バイオマーカーとしての *NOS3* 遺伝子多型の有用性を検証した。

【方法】

検討 1. *NOS3* および *FGFR* 遺伝子多型の頻度と臨床効果への影響

神奈川県にある北里大学病院、横浜市立大学附属市民総合医療センター、湘南鎌倉総合病院、湘南藤沢徳洲会病院の4施設を対象に、多施設共同後ろ向き研究を実施した。本研究は各施設の倫理委員会による承認を受け、研究対象者の全員から書面によるインフォームド・

コンセントを得て行った。

本研究の対象は肝細胞癌と診断され、切除不能と判断された進行期で、2018 年 4 月～2020 年 2 月の期間にレンバチニブ療法を施行した患者とした。研究責任医師等が本研究の対象として不適当と判断した患者、試料（血液及びこれらから抽出した DNA 等）を収集できない患者、レンバチニブ投与後 14 日以内に治療を中止した患者、重度の肝機能障害 (Child-Pugh class C)、末期腎臓病、難治性腹水を有する患者、または肝細胞癌以外の悪性腫瘍とした。

リスク因子 (Child-Pugh class B、食道・胃静脈瘤、前治療による重症な有害事象など) のない患者では、レンバチニブの推奨用量を体重に基づいて決定した。体重 60 kg 以上の患者では 12 mg/day、体重 60 kg 未満の患者では 8 mg/day とした。リスク因子を有する患者では、主治医の判断により初回投与量からの減量が認められた。レンバチニブ投与後は、治療効果判定または重篤な有害事象の発生状況に応じて用量を調節した。治療は病勢進行、忍容できない毒性発現または患者の治療継続拒否まで継続した。

NOS3 rs2070744 が肝細胞癌患者におけるレンバチニブ療法の無増悪生存期間平均値 (mean progression-free survival; mPFS)、全生存期間平均値 (mean overall survival; mOS)、客観的奏効率 (完全奏効 + 部分奏効の割合)、病勢コントロール率 (完全奏効 + 部分奏効 + 安定の割合) に与える影響を調査した。さらに、探索的に *FGFR2* (*rs2912791*、*rs2981429*、*rs2981582*)、*FGFR4 rs351855* の臨床効果への影響も検討した。遺伝子多型解析は、患者の全血より genomic DNA を抽出し、リアルタイム PCR 装置 (LightCycler®96 System) を用いて行った。肝細胞癌に対する腫瘍縮小効果判定は腫瘍の血流変化を考慮した modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors に従って定義した。

NOS3 及び *FGFR* 遺伝子多型における臨床効果への影響について検討するため、多変量解析を行った。多変量解析における説明変数は遺伝子多型、Child-Pugh 分類 (Class A vs. Class B)、Alpha-fetoprotein (< 400 vs. ≥ 400)、年齢 (< 75 vs. ≥ 75)、Albumin-bilirubin (ALBI) grade (Grade 1 vs. Grade ≥ 2)、Barcelona Clinic Liver Cancer 分類 (Stage B vs. Stage C)、肉眼的門脈侵襲及び/又は肝外転移 (no vs. yes)、相対用量強度 (≥ 80% vs. < 80%) を選択した。

検討 2. *NOS3* 遺伝子多型の有害事象への影響

NOS3 rs2070744 が肝細胞癌患者におけるレンバチニブ療法の有害事象発現割合に与える影響を調査した。有害事象の評価は Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 を用いた。全対象症例を分母とし、有害事象について各々の最悪の Grade の頻度を群別に求

めた。

【結果】

検討 1. *NOS3* および *FGFR* 遺伝子多型の頻度と臨床効果への影響

本研究では適格基準をすべて満たし、除外基準のいずれにも該当しない全 100 例を解析対象症例とした。フォローアップ期間中央値は 12.2 (interquartile range 5.7–17.7) months であった。*NOS3 rs2070744* TT 群は 76 例、TC + CC 群は 24 例であった。Prothrombin time (%) 以外の患者背景は両群間において有意差は認められなかった (Table 1)。

Table 1. Baseline clinical characteristics

Characteristics	All (N = 100)	<i>NOS3 rs2070744</i>		<i>p</i>
		TT (n = 76)	TC + CC (n = 24)	
Age ≥ 65 years, n (%)	76 (76)	58 (76)	18 (75)	1.000
Male sex, n (%)	68 (68)	54 (71)	14 (58)	0.316
ECOG-PS, n (%)				
0 / 1	95 (95) / 5 (5)	71 (93) / 5 (7)	24 (100) / 0	0.333
Child-Pugh system, n (%)				
Class A / Class B	83 (83) / 17 (17)	63 (83) / 13 (17)	20 (83) / 4 (17)	0.984
Bodyweight ≥ 60 kg, n (%)	59 (59)	44 (58)	15 (63)	0.813
BCLC staging system, n (%)				
Stage B / Stage C	55 (55) / 45 (45)	41 (54) / 35 (46)	14 (58) / 10 (42)	0.815
MPVI, EHS, or both, present, n (%)	37 (37)	27 (36)	10 (42)	0.303
Initial dose, n (%)				
12 mg / 8 mg / 4 mg	32 (32) / 49 (49) / 19 (19)	23 (30) / 39 (51) / 14 (18)	9 (38) / 10 (42) / 5 (21)	0.704
Platelets (×10 ⁴ /μL)	13.9 (9.4–18.6)	14.5 (9.7–18.8)	10.9 (8.7–16.1)	0.152
Prothrombin time (%)	89.5 (75.0–100.0)	92.0 (77.0–101.0)	79.0 (71.0–94.0)	0.031
Serum creatinine (mg/dL)	0.83 (0.68–0.97)	0.83 (0.67–0.97)	0.83 (0.71–0.97)	0.450
Aspartate aminotransferase (IU/L)	36.0 (29.5–55.0)	36.0 (28.0–54.0)	38.5 (33.5–58.5)	0.166
Alanine aminotransferase (IU/L)	26.5 (18.0–41.0)	25.0 (17.0–40.0)	29.0 (22.0–42.5)	0.248
Total bilirubin (g/dL)	0.8 (0.6–1.2)	0.8 (0.6–1.1)	1.0 (0.6–1.3)	0.144
Ammonia (μg/dL)	36.5 (24.5–54.5)	36.0 (21.0–47.5)	48.5 (31.5–68.5)	0.075
AFP at baseline ≥ 400 ng/mL, n (%)	31 (31)	22 (29)	9 (38)	0.455
Median PIVKA- II (IQR), mAU/mL	392 (74–2200)	346 (74–2420)	672 (105–1489)	0.686

AFP Alpha-fetoprotein, *BCLC* Barcelona Clinic Liver Cancer, *ECOG-PS* Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status, *EHS* extrahepatic spread, *IQR* interquartile range, *MPVI* macroscopic portal vein invasion, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *PIVKA-II* protein induced by vitamin K absence or antagonist II.

全体の mPFS は 10.0 (95%confidence interval [CI] 8.5–11.5) months であった。*NOS3 rs2070744* TT 群と TC + CC 群の mPFS はそれぞれ 10.6 (95%CI 8.9–12.4) months、7.5 (95%CI 4.8–10.2) months であった (Figure 1A)。両群間の mPFS に有意差は認められなかった (hazard ratio [HR] 0.60; 95%CI 0.34–1.05; *p* = 0.069)。全体の mOS は 21.3 (95%CI 19.4–23.3) months であった。

TT 群と TC + CC 群の mOS はそれぞれ 22.3 (95%CI 20.2–24.4) months、16.1 (95%CI 12.7–19.4) months であった (**Figure 1B**)。両群間の mOS に有意差は認められなかった (HR 0.46; 95%CI 0.19–1.11; $p = 0.075$)。客観的奏効率は *NOS3 rs2070744* TT 群が 42%、TC + CC 群が 54% であった (odds ratio [OR] 1.63; 95%CI 0.58–4.56; $p = 0.351$)。病勢コントロール率は、TT 群が 84%、TC + CC 群が 83% であった (OR 0.94; 95%CI 0.25–4.44; $p = 1.000$)。

また、*FGFR2* (*rs2912791*、*rs2981429*、*rs2981582*) および *FGFR4 rs351855* では、mPFS、mOS、客観的奏効率、病勢コントロール率に有意差は認められなかった。

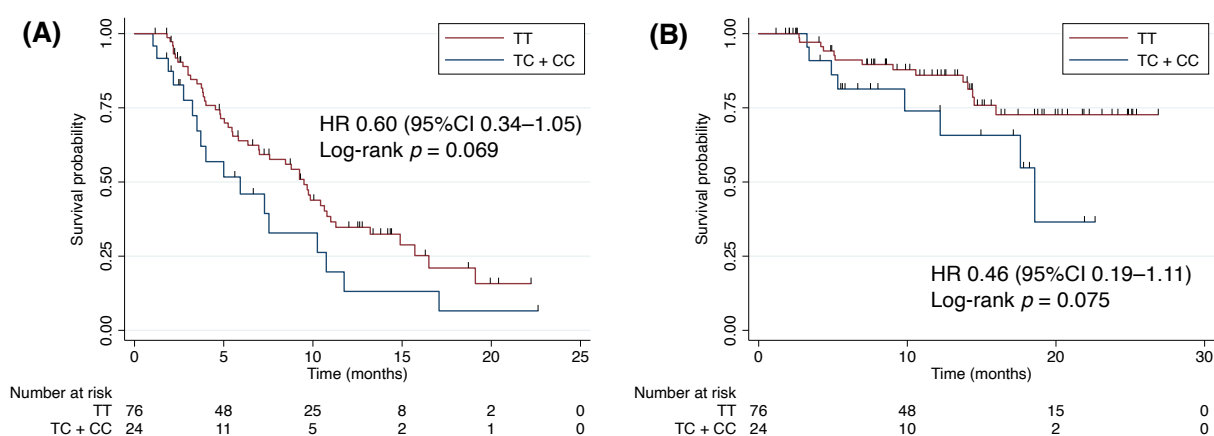


Figure 1. Effect of the *NOS3 rs2070744* on (A) Progression-free survival and (B) Overall survival. CI confidence interval, HR hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

NOS3 rs2070744 と *FGFR4 rs351855* の SNP を組み合わせた場合、*NOS3 rs2070744* TC + CC 遺伝子型と *FGFR4 rs351855* CT + TT 遺伝子型を有する (TC/CC + CT/TT) 群は 13 例、その他の遺伝子型を有する (Others) 群は 87 例であった。TC/CC + CT/TT 群と Others 群の mPFS はそれぞれ 6.0 (95%CI 2.7–9.3) months、10.6 (95%CI 9.0–12.3) months であった (**Figure 2A**)。TC/CC + CT/TT 群は Others 群と比較して有意に短い mPFS を示した (HR 2.56; 95%CI 1.28–5.09; $p = 0.006$)。同様に、TC/CC + CT/TT 群と Others 群の mOS はそれぞれ 12.0 (95%CI 8.1–15.8) months、22.0 (95%CI 20.1–24.0) months であった (**Figure 2B**)。TC/CC + CT/TT 群は Others 群と比較して有意に短い mOS を示した (HR 3.36; 95%CI 1.21–9.29; $p = 0.013$)。

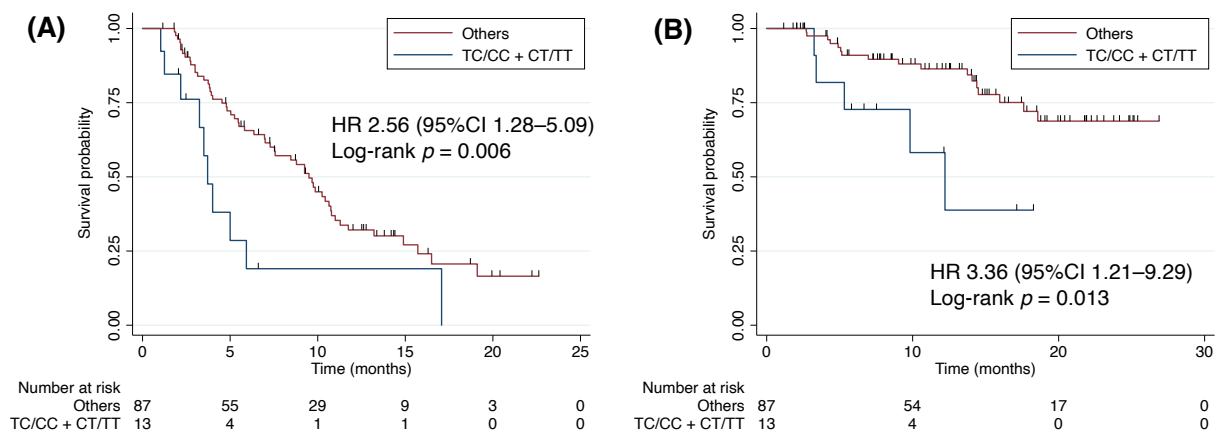


Figure 2. Effect of the *NOS3* *rs2070744* and *FGFR4* *rs351855* combination pattern on (A) Progression-free survival and (B) Overall survival. *CI* confidence interval, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *NOS3* nitric oxide synthase 3.

NOS3 および *FGFR4* の SNP を組み合わせた変数は、PFS (HR 2.95; 95%CI 1.27–6.86; $p = 0.012$)、OS (HR 3.29; 95%CI 1.01–10.74; $p = 0.049$) への寄与が有意に大きいことが示された (Table 2)。

Table 2. Multivariable analysis for baseline prognostic factors for progression-free survival and overall survival

Variable	Category	Progression-free survival			Overall survival		
		HR (95% CI)		p	HR (95% CI)		p
<i>NOS3</i> <i>rs2070744</i> + <i>FGFR4</i> <i>rs351855</i>	Others vs. TC/CC + CT/TT	2.95 (1.27–6.86)		0.012	3.29 (1.01–10.74)		0.049
Child-Pugh system	Class A vs. Class B	1.93 (0.92–4.02)		0.080	2.16 (0.64–7.28)		0.216
AFP, ng/mL	< 400 vs. ≥ 400	1.31 (0.75–2.30)		0.340	2.97 (1.17–7.54)		0.022
Age, years	< 75 vs. ≥ 75	1.31 (0.73–2.34)		0.371	2.22 (0.71–6.93)		0.170
ALBI grade	Grade 1 vs. Grade ≥ 2	0.99 (0.55–1.76)		0.963	0.86 (0.31–2.35)		0.765
BCLC staging system	Stage B vs. Stage C	0.97 (0.28–3.36)		0.965	1.40 (0.17–11.73)		0.759
MPVI, EHS, or both, present	no vs. yes	0.96 (0.27–3.45)		0.952	0.83 (0.09–7.47)		0.867
RDI at 56 days, %	≥ 80 vs. < 80	0.87 (0.50–1.52)		0.626	0.71 (0.26–1.93)		0.503

AFP alpha-fetoprotein, *ALBI* albumin-bilirubin, *BCLC* Barcelona Clinic Liver Cancer, *CI* confidence interval, *EHS* extrahepatic spread, *FGFR4* fibroblast growth factor receptor 4, *HR* hazard ratio, *MPVI* macroscopic portal vein invasion, *NOS3* nitric oxide synthase 3, *RDI* relative dose intensity.

検討 2. NOS3 遺伝子多型の有害事象への影響

レンバチニブ投与による有害事象は、食欲減退 (59%)、疲労 (55%)、手掌・足底発赤知覚不全症候群 (47%)、腹痛 (41%)、下痢 (41%) が認められた (Table 3)。グレード 3 の有害事象は、NOS3 rs2070744 TT 群に 33 例 (43%)、TC + CC 群に 10 例 (42%) 認められた。グレード 4 の有害事象は認められなかった。NOS3 rs2070744 と有害事象の頻度、重症度との間に相関は認められなかった。

Table 3. Treatment-related adverse events occurring in at least 30% of patients

Adverse event, n (%)	N	All (N = 100)		NOS3 rs2070744			
		Grade ≤ 2	Grade 3	TT (n = 76)		TC + CC (n = 24)	
				Grade ≤ 2	Grade 3	Grade ≤ 2	Grade 3
Any adverse event	76	73 (96)	43 (57)	55 (72)	33 (43)	18 (75)	10 (42)
Anorexia	59	42 (71)	17 (29)	30 (39)	13 (17)	12 (50)	4 (17)
Fatigue	55	54 (98)	1 (2)	39 (51)	1 (1)	15 (63)	0
PPE	47	45 (96)	2 (4)	31 (41)	1 (1)	14 (58)	1 (4)
Abdominal pain	41	38 (93)	3 (7)	26 (34)	3 (4)	12 (50)	0
Diarrhea	41	37 (90)	4 (10)	25 (33)	3 (4)	12 (50)	1 (4)
Dysgeusia	36	36 (100)	0	26 (34)	0	10 (42)	0
Edema	36	34 (94)	2 (6)	27 (36)	1 (1)	7 (29)	1 (4)
Anxiety	35	32 (91)	3 (9)	23 (30)	3 (4)	9 (38)	0
Hypertension	35	28 (80)	7 (20)	21 (28)	6 (8)	7 (29)	1 (4)

NOS3 nitric oxide synthase 3, PPE palmar-plantar erythrodysesthesia.

【考察】

本研究では、肝細胞癌に対するレンバチニブ療法の臨床効果における NOS3 rs2070744 の影響を検討した。過去の NOS3 遺伝子多型の有用性を調査した研究では、NOS3 rs2070744 の TT 群は、ソラフェニブで治療された切除不能な肝細胞癌患者の予後不良と強く関連することが報告されている。しかし、本研究では NOS3 rs2070744 の TC + CC 群が統計学的に有意差は認めないものの、レンバチニブ投与後の予後不良を反映する傾向を認めた。すなわち、レンバチニブとソラフェニブにおいて NOS3 遺伝子多型の肝細胞癌に対する臨床効果への影響は相反することが明らかとなった。これは、レンバチニブがソラフェニブにおける VEGF 受容体阻害に加えて、FGFR 阻害による血管新生阻害作用、腫瘍増殖・悪性化に関与するサルベージ経路の阻害作用を有し、血管拡張因子 NO の低下、肝内血管抵抗の増加、肝内血流量の減少を示すためと考えられる。

FGFR4 rs351855 は肝臓に高発現し、タンパク質発現に影響を与える SNP であるため、肝

細胞癌におけるシグナル伝達を変化させる可能性がある。その結果、*NOS3 rs2070744* と *FGFR4 rs351855* の SNP を組み合わせたパターンは、PFS と OS に関連していることが明らかとなった。しかし、そのメカニズムは未だ完全には解明されておらず、VEGF と FGF 経路間の複雑な相互作用による臨床効果への影響、獲得耐性への寄与について検証が必要である。

食欲減退はレンバチニブ療法における一般的な有害事象の一つであり、レンバチニブ投与中止までの期間と関連することが報告されている。食欲減退と疲労は緩和が困難な状態であり、治療の継続や生活の質に影響を及ぼす可能性がある。また、NO の低下、血管収縮因子エンドセリン-1 の活性化に伴う血管内皮機能障害は、レンバチニブにおける高血圧を引き起こす要因の一つであると考えられる。有害事象の頻度と重症度に及ぼす遺伝子多型の影響を検討し、有害事象の発症メカニズムを解明する必要がある。

本研究の限界は、臨床試験よりも良好な生存期間を示したことにより選択バイアスが存在すること、対照群を設定出来なかったこと、SNP 解析のみを行い NOS 活性測定、NO 測定を行わなかったことが挙げられる。

今回、*NOS3 rs2070744* は、レンバチニブ療法に対する臨床効果の有用な予測因子として同定されなかった。しかし、*NOS3 rs2070744* と *FGFR4 rs351855* の SNP の組み合わせが、レンバチニブ療法における予後予測の有用な指標となる可能性が示唆された。今後、本研究結果が肝細胞癌における適正な薬物療法の管理に貢献する一助となると確信している。

以上