

Chaofan Fan

Dr.med.

Combining metformin with α -PD-1 antibody immunotherapy for non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma

Fach/ Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. Mathias Heikenwalder

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Leberkrebs und die vierthufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle weltweit (Brown et al., 2023). Mehr als die Hälfte der neu diagnostizierten HCC-Patienten (~ 60 %) befindet sich in einem fortgeschrittenen Stadium (Akarca et al., 2021, Llovet et al., 2021b). Systemische Therapien, darunter die Multi-Kinase-Inhibitoren Sorafenib und Lenvatinib, haben die Überlebenszeit von HCC-Patienten von 6-7 Monaten auf ~13,4 Monate verlängert. Im Jahr 2020 wurde gezeigt, dass die Kombination von Bevacizumab (α -VEGF-Antikörper) und Atezolizumab (α -PDL1-Antikörper) das Gesamtüberleben (67,2 % vs. 54,6 % nach 12 Monaten) bei HCC-Patienten im Vergleich zu Sorafenib verlängert (Finn et al., 2020a, Cheng et al., 2022). Es hat sich zur Erstlinientherapie für fortgeschrittenes HCC entwickelt. Allerdings wird die Ätiologie der Patienten vor der Behandlung nicht berücksichtigt. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) / nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist der am schnellsten wachsende Risikofaktor für HCC und wird Schätzungen zufolge bis 2030 weltweit der vorherrschende Risikofaktor für HCC sein (Gawrieh et al., 2019, Llovet et al., 2023). Im Jahr 2021 berichteten Pfister et al. erstmals, dass Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICIs) bei NAFLD/NASH-bedingtem HCC weniger wirksam sind als bei virusbedingtem HCC, und zwar sowohl in präklinischen Mausmodellen als auch bei menschlichen Patienten (Pfister et al., 2021). Daher werden dringend neue Ansätze zur Erhöhung der Ansprechraten und zur Verlängerung der Überlebensdauer bei NAFLD/NASH-bedingtem HCC benötigt.

Da Metformin stoffwechselregulierende Wirkungen hat, die den metabolischen Stress bei NASH/HCC reduzieren können, habe ich in dieser Studie Metformin mit einer ICI-Therapie

kombiniert, um die therapeutische Wirkung auf präklinische NASH-HCC-Mausmodelle zu untersuchen (Wolf et al., 2014, Pfister et al., 2021).

Zunächst fand ich heraus, dass das NAFLD/NASH-bedingte HCC ein erhöhtes Maß an Entzündung und metabolischer Reprogrammierung aufweist, indem ich Massen-RNA-Sequenzierung verwendete. Dann zeigte die Kombinationstherapie aus Metformin und α -PD-1-Antikörper im Vergleich zur α -PD-1-Antikörper-Monotherapie, IgG2a-Isotyp-Kontrolle oder Metformin plus IgG2a-Isotyp-Kontrolle eine große Wirkung auf die Kontrolle des Tumorwachstums bei NAFLD/NASH-bedingten HCC-Mäusen. Darüber hinaus konnte ich feststellen, dass Metformin das Körpergewicht und die Leberschäden bei Mäusen mit Tumoren systemisch reduzieren kann. Der Glukosetoleranztest der tumortragenden Mäuse zeigte jedoch keine Verbesserung in den mit Metformin behandelten Gruppen. Die histologische Analyse zeigte, dass Metformin den Schweregrad von NASH deutlich reduzierte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Metformin und α -PD-1-Antikörper das Tumorwachstum wirksam hemmen und das metabolische Syndrom in NAFLD/NASH-bezogenen HCC-Mäusen bis zu einem gewissen Grad systemisch reduzieren kann.

Um den Mechanismus von Metformin auf den Tumor zu klären, wurde eine Massen-RNA-Sequenzierung an den NAFLD/NASH-bezogenen HCC-Tumorgewebe durchgeführt. Die Kombinationsbehandlung von Metformin und α -PD-1-Antikörper hemmte die mit der Tumorentstehung verbundenen Signalwege im Vergleich zur α -PD-1-Antikörper-Monotherapie erheblich. Darüber hinaus wurden durch die Kombinationstherapie Verzweigungen von stoffwechselbezogenen Signalwegen verändert. Daher habe ich einen Metaboliten-Screen und einen Fettsäure-Screen an den Tumorgewebe durchgeführt. Entscheidend ist, dass die Kombinationstherapie die Anreicherung von Cholesterin und anderen Fettsäuren im Tumorgewebe deutlich reduziert. In einem In-vitro-Experiment mit T-Zellen habe ich festgestellt, dass Cholesterin und andere Fettsäuren, die durch Metformin reduziert werden, für T-Zellen toxisch sind. Der Anstieg dieser Fette kann die Apoptose der T-Zellen auslösen und die Vermehrung der T-Zellen hemmen. Anschließend wurde ein Experiment mit T-Zellen und Tumorzellen durchgeführt, um die Wirkung von Fettsäuren auf die Abtötungsfunktion von T-Zellen zu untersuchen. Die Zugabe von Fettsäuren in das Co-Kultursystem hemmte die T-Zellabtötungseffizienz in vitro erheblich. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Metformin den mit der Tumorentstehung verbundenen Signalweg direkt modulieren kann, um das

Tumorstadium zu regulieren. Andererseits ist Metformin in der Lage, die Anhäufung von Fettsäuren im Tumor zu verringern und dadurch indirekt die Funktion der Anti-Tumor-T-Zellen in der Mikroumgebung des Tumors zu verstärken.

Um die direkte Wirkung von Metformin auf Immunzellen, insbesondere die Anti-Tumor-CD8⁺-T-Zellen, zu bestimmen, wurden Einzelzell-RNA-Sequenzierung, Durchflusszytometrie und In-vitro-T-Zell-Erschöpfungsexperimente durchgeführt. Interessanterweise stellte ich fest, dass die Zugabe von Metformin zum α -PD-1-Antikörper nicht nur die Erschöpfung der CD8⁺ T-Zellen blockieren, sondern auch die neu infiltrierten Effektor-CD8⁺ T-Zellen in NAFLD/NASH-bedingtem HCC erhöhen konnte. Umgekehrt wurde der Anteil der auto-aggressiven CD8⁺ T-Zellen, die CXCR6 und PD1 exprimieren, durch Metformin reduziert. Funktionell modulierte die Kombinationstherapie aus Metformin und α -PD-1-Antikörper die Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen. So waren beispielsweise Gzma-exprimierende frühe Effektor-T-Zellen in HCC, die mit Metformin und α -PD-1-Antikörper behandelt wurden, erhöht. Darüber hinaus modulierte die Zugabe von Metformin die Erschöpfung der T-Zellen. Die erhöhte Expression von Foxo1 und Tcf1/7 von erschöpften CD8⁺ T-Zellen in den mit Metformin behandelten Gruppen wurde sowohl in vivo als auch in vitro festgestellt. Die terminal erschöpften T-Zellen aus der Kombinationstherapiegruppe wiesen sogar eine höhere Expression von Perforin (Prf1) auf, das eine wichtige Rolle beim Abtöten von Tumorzellen spielt.

Zusammenfassend habe ich festgestellt, dass die Kombination von Metformin und α -PD-1-Antikörper das Wachstum des NAFLD/NASH-bedingten HCC-Tumors deutlich hemmen bzw. kontrollieren kann. Mechanisch modulierte der Zusatz von Metformin direkt die Tumorentstehung und den Stoffwechsel von NAFLD/NASH-bedingtem HCC. Gleichzeitig schützte die Reduzierung der Fettsäuren durch Metformin die tumorinfiltrierenden T-Zellen vor ihrer toxischen Wirkung. Am wichtigsten ist, dass Metformin in der Lage ist, die Anti-Tumor-T-Zell-Antwort direkt zu modulieren, indem es die neu infiltrierenden Effektor-T-Zellen erhöht, die autoaggressiven T-Zellen reduziert, die stammähnlichen erschöpften T-Zellen erhält und die Anti-Tumor-Funktion der T-Zellen verbessert.