

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner



# Individualisierte chirurgische Therapie des frühen hepatozellulären Karzinoms

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Chirurgie

vorgelegt von  
Dr. med. Markus Schoenberg

(2020)

## INHALTVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2. KLINISCHE TEILPROJEKTE</b> .....	<b>5</b>
1.1. Meta-Analyse der Resektion und Transplantation beim frühen hepatozellulären Karzinom .....	5
1.2. Entwicklung prädiktiver biologischer Resektionskriterien für Patienten mit einem frühen hepatozellulären Karzinom .....	6
1.3. Entwicklung und Validierung eines Machine-learning Algorithmus zur Prädiktion des frühen krankheitsfreien Überlebens von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom nach Leberresektion .....	8
1.4. Dynamische Selektionskriterien für die Lebertransplantation bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom außerhalb der Milan-Kriterien .....	9
<b>3. EXPERIMENTELLE TEILPROJEKTE</b> .....	<b>11</b>
1.5. Entwicklung einer zuverlässigen und reproduzierbaren Methode zur Quantifizierung Tumor infiltrierender Leukozyten.....	11
1.6. Die prädiktive Relevanz perivaskulärer Tumor infiltrierender Leukozyten im hepatozellulären Karzinom nach Leberresektion .....	12
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>15</b>
<b>5. LITERATUR</b> .....	<b>17</b>
<b>6. VERZEICHNIS DER ORIGINALARBEITEN</b> .....	<b>20</b>

## ABKÜRZUNGEN

American Association for the Study of Liver Disease	AASLD
Area under the Curve	AUC
Biological Resection Criteria	BRC
C-Reaktives Protein	CRP
Direct Acting Antivirals	DAA
krankheitsspezifisches Überleben (Disease Free Survival)	DFS
Überleben (Overall Survival)	OS
Hepatitis C	HCV
Hepatozelluläres Karzinom	HCC
Hoch Risiko	HR
Immunhistochemie	IHC
Intraclass-Correlation	ICC
Invasive Margin	IM
Kings Score	KS
Leberresektion	LR
Lebertransplantation	LT
Machine Learning	ML
Metastasiertes kolorektales Karzinom	mCRC
Milan-Kriterien ( $IN_{MC}$ , $OUT_{MC}$ )	MC
Münchener-Kriterien ( $IN_{MUC}$ , $OUT_{MUC}$ )	MUC
Model of Endstage Liver Disease	MELD
Modified Glasgow Prognostic Scale	mGPS
Niedrig Risiko	NR
Organ Procurement and Transplantation Network des United Network for Organ Sharing	OPTN/UNOS
Ovarialkarzinom	OvCa
Periduktales Pankreaskarzinom	PDAC
Perivaskuläres Scoring	PVS
Quantifikation des Tumor Immun-Stromas	QTIS
Radiofrequenzablation	RFA
Random Forest	RF
Recursive Feature Elimination	RFE
Selektive interne Strahlentherapie	SIRT
Tumor infiltrierenden Leukozyten	TIL
Transarterielle Chemoembolisation	TACE
Partielle Thromboplastinzeit	aPTT

## 1. EINLEITUNG

Weltweit erkranken mehr als 700 000 Menschen jährlich an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) (1). In der westlichen Welt liegt dem zum großen Teil die zunehmende Prävalenz der – aus der nichtalkoholischen Steatohepatitis resultierenden – Zirrhose zugrunde (2, 3). Die Bedeutung der Hepatitis C (HCV) virusassoziierten Zirrhose und die folgende Hepatocarcinogenese hingegen nimmt durch den sehr erfolgreichen Einsatz sogenannter Direct Acting Antivirals (DAAs) ab (4).

Bisher konnten für alle Stadien des HCC Therapieoptionen entwickelt werden: Neben der systemischen Therapie mit beispielsweise Sorafenib können lokal ablativ Verfahren wie die Radiofrequenzablation (RFA), transarterielle Chemoembolisation (TACE), stereotaktische Bestrahlung und die selektive interne Strahlentherapie (SIRT) das Wachstum des Tumors verlangsamen oder stoppen (5-7).

Kleine sehr frühe Tumoren (< 2 cm) können mit der RFA in kurativer Absicht ablatiert werden (5). Für größere und oligonoduläre und auf die Leber begrenzte HCC (frühe HCC) sind die Leberresektion (LR) und -transplantation (LT) die einzigen kurativen Optionen (8, 9). Generell sichert die Lebertransplantation eine nachhaltigere Rezidivfreiheit und trotz Immunsuppression bessere Überlebensraten (10).

Die Lebertransplantation kann jedoch aufgrund des Fehlens an geeigneten Organen (unter anderem Spendermangel) nur eingeschränkt und subsidiär angeboten werden. Somit müssen die Patienten identifiziert werden, die keinen zusätzlichen Nutzen von der Lebertransplantation haben und z.B. nach Leberresektion ein onkologisch zufriedenstellendes Ergebnis erzielen können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es HCC Patienten anhand prädiktiver, klinischer und experimenteller Surrogat-Parameter für die Tumorbiologie zu unterteilen. Hierdurch soll eine differenzierte Indikationsstellung zwischen Leberresektion und Transplantation des HCCs ermöglicht werden.

In den folgenden Abschnitten werden die für diese Habilitationsschrift relevanten Originalarbeiten systematisiert und thematisch zusammengefasst.

## 2. KLINISCHE TEILPROJEKTE

Ziel des klinischen Abschnittes dieser Habilitationsschrift ist es basierend auf einfach klinisch erhebbaren Parametern Patientengruppen mit einem besonders positiven sowie besonders negativem Outcome nach entweder Leberresektion oder Transplantation zu identifizieren. Hierzu führten wir zunächst eine systematische Literatursuche und Meta-Analyse aller Studien zur Lebertransplantation und Leberresektion beim HCC durch. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir retrospektiv alle Patienten, die zwischen 2007 und 2018 an der Klinik für Allgemein, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Klinikums Großhadern an der Ludwig-Maximilians Universität eine chirurgische Therapie (Resektion und Transplantation) aufgrund eines frühen HCCs erhielten. Hierbei konzentrierten wir uns auf die Prädiktion des krankheitsfreien Überlebens und dynamische prädiktive Marker der Tumorbiologie bei Lebertransplantationspatienten. Im Folgenden werden die einzelnen Originalarbeiten und ihre Ergebnisse im Detail zusammengefasst.

### 1.1. Meta-Analyse der Resektion und Transplantation beim frühen hepatozellulären Karzinom

#### **Resektion oder Transplantation beim frühen hepatozellulären Karzinom. Systematisches Review und Metaanalyse**

**Schoenberg M.B.\***, Bucher J.N.\*, Vater A., Bazhin A.V., Hao J., Guba M.O., Angele M.K., Werner J., Rentsch M.; (2017) Dtsch Arztebl Int; 114: DOI: 10.3238/arztebl.2017. IF 4.257  
\*equally contributed

In 20–30 % der chirurgisch behandelbaren HCC Patienten ergeben sich zwei Behandlungsoptionen, Leberresektion (LR) und Lebertransplantation (LT) (11).

Das Ziel der systematischen Literaturrecherche und Meta-Analyse war es das Überleben der LT und LR Patienten zu vergleichen. Des Weiteren strebten wir an eine Patientengruppe zu identifizieren, die bei einem frühen HCC mit einer LR vergleichbare Ergebnisse wie bei der LT erzielen können.

Insgesamt wurden 54 Studien mit zusammen 13794 Patienten in die Analyse aufgenommen (9). Es waren keine prospektiven Studien verfügbar.

Die eingeschlossenen Studien zeigten aufgrund ihres retrospektiven Charakters eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen signifikanten Bias (Selektionsbias sowie unvollständige Berichte) und eine sehr hohe Heterogenität (Nach 1 Jahr:  $I^2 = 47\%$ ,  $p < 0,001$ ; nach 3 Jahren:  $I^2 = 63\%$ ,  $p < 0,001$ ; nach 5 Jahren:  $I^2 = 70\%$ ,  $p < 0,001$ ). Die Mantel-Haenzel random-effects Meta-Analyse aller chirurgischen Fälle zeigte, dass die Lebertransplantation (LT) schon im

mittelfristigen Verlauf ein signifikant besseres gesamtes (overall survival, OS) sowie krankheitsspezifisches Überleben (disease free survival, DFS) zeigte (Nach 3 Jahren: OR 0,82 [0,68; 0,99];  $p = 0,04$ ) (9). Die Morbidität und Mortalität der LR war in dieser Gesamtkohorte signifikant geringer als nach LT. Diese Ergebnisse reflektierten die Unterschiede der Patienten, die entweder für die Leberresektion oder die Lebertransplantation geplant wurden. Um eine Vergleichbarkeit der Patienten zu schaffen wurde eine Subgruppe an Studien analysiert, die nur über Patienten mit einem frühen HCC berichteten. Die Einschlusskriterien waren: 1) Patienten ohne oder mit einer frühen Zirrhose (Maximum Child-Pugh B) wurden eingeschlossen. Studien, die Child-Pugh-C-Patienten untersuchten, wurden ausgeschlossen. 2) Studienpopulationen, die gemäß der Autoren der Studien präoperativ sowohl für eine LR als auch LT geeignet waren. 3) Patienten, die die Milan-Kriterien erfüllten.

Gemäß diesen Einschlusskriterien (für die Subgruppenanalyse) konnten 8 Publikationen, die über die Ergebnisse von 1389 Patienten berichteten, eingeschlossen werden. Durch die Angleichung der Patientengruppen konnte die Varianz zwischen den einzelnen Studien deutlich verbessert werden. In dieser Meta-Analyse erzielte die LT in unserer Mantel-Haenzel Metaanalyse erst nach 5 Jahren eine höhere Überlebensrate als die LR (OR: 0,60 [0,45; 0,78],  $p < 0,001$ ). Nach 1 und 3 Jahren zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied (Nach 1 Jahr: OR: 0,97 [0,63; 1,50];  $p = 0,89$ ; 3 Jahren: OR: 0,68 [0,41; 1,11];  $p = 0,13$ ). Zudem konnte kein signifikanter Unterschied in Morbidität und Mortalität festgestellt werden.

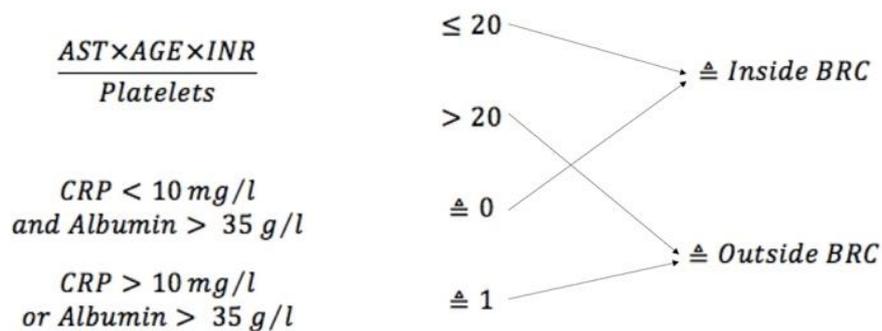
Diese Meta-Analyse stellte bis dato die größte systematische Analyse der in der Literatur verfügbaren Studien dar. Zudem erbrachte die Subgruppenanalyse neue Einblicke in die onkologischen Ergebnisse nach chirurgischer Therapie des HCCs. Wir schlossen aus dieser Analyse, dass Patienten, die reseziert werden können, dieser Therapie zugeführt werden sollten. In adäquat selektionierten Patienten ist diese Therapie sicher, verfügbar und kann mittelfristig onkologisch zufriedenstellende Ergebnisse erzielen. Des Weiteren schlossen wir aus dieser Arbeit, dass die Entwicklung weiterer Kriterien zur sicheren und onkologisch zufriedenstellenden Resektion notwendig sind (5, 9).

## 1.2. Entwicklung prädiktiver biologischer Resektionskriterien für Patienten mit einem frühen hepatozellulären Karzinom

### **Development of Novel Biological Resection Criteria for Safe and Oncologically Satisfying Resection of Hepatocellular Carcinoma**

**Schoenberg M.B.**, Anger H.J.W., Hao J., Vater A., Bucher J.N., Thomas M.N., Lauseker M., Rentsch M., Schiergens T.S., Angele M.K., Bazhin A.V., Werner J., Guba M.O.; (2018) Surg Oncol 27:663-673 IF 2.558

Um die oben erwähnte Forderung nach einfachen präoperativen prädiktiven Kriterien zu erfüllen, wurde eine retrospektive Analyse aller von Januar 2007 bis einschließlich Dezember 2015 chirurgisch behandelter HCCs durchgeführt. In den Überlebensanalysen zeigten sich neben operationsspezifischen prädiktiven Faktoren, immunologische Scores (z.B. modified Glasgow Prognostic Scale (mGPS)) und Leberfunktionsparameter (z.B. Kings-Score (KS)) als prädiktiv für HCC Rezidive (12-14). Tumor- und Leberbiologie wurden in die neu entwickelten Biological Resection Criteria (BRC) zusammengefasst. Diese Kriterien berechnen sich aus folgender Formel:



**Abbildung 1:** Formel zur Berechnung der Biological Resection Criteria (BRC)

Insgesamt wurden die Daten von 276 Patienten untersucht. Patienten, die reseziert wurden, waren signifikant älter, hatten jedoch eine bessere Leberfunktion. Durch die Kombination aus Leberfunktion und Tumorimmunologie konnte das krankheitsfreie Überleben der Patienten nach Resektion wegen eines HCC signifikant vorhergesagt werden. Nach 5 Jahren waren 73,6% [CI 54,8%, 85,5%] innerhalb der BRC (inBRC) Patienten noch am Leben. Im Vergleich zu einer Überlebensrate von 35,38% [CI 22,0%, 49,0%] der außerhalb der BRC (outBRC) Patienten, war dieser Unterschied hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigten die BRC einen hoch signifikant prädiktiven Wert für das gesamte (OS) sowie krankheitsfreie Überleben (DFS) (OS:  $p = 0,0176$ ; DFS:  $p = 0,005$ ). Interessanterweise zeigten Patienten, die inBRC reseziert wurden, ein ebenso gutes Gesamtüberleben wie transplantierte Patienten ( $p = 0,114$ ).

Aus dieser Studie schlossen wir, dass Patienten inBRC mit kurativer Absicht reseziert werden sollten. Patienten, die outBRC sind, sollten für die Transplantation evaluiert werden, da diese Gruppe, insbesondere bei einem Rezidiv, potentiell besonders von einer Transplantation profitiert.

Die Limitationen unserer Studie waren der retrospektive Charakter der Analyse und die fehlende Validierungskohorte für die BRC. Somit sind die BRC trotz vielversprechender Ergebnisse nur eingeschränkt klinisch anwendbar. Auf der anderen Seite ermöglicht der

unselektierte Patienteneinschluss der hier vorgelegten retrospektiven Analyse eine besonders hohe Validität der Daten. Basierend auf dieser retrospektiven Analyse strebten wir dennoch eine Verbesserung der Vorhersage des onkologischen Ergebnisses nach HCC Resektion an.

### 1.3. Entwicklung und Validierung eines Machine-learning Algorithmus zur Prädiktion des frühen krankheitsfreien Überlebens von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom nach Leberresektion

#### **A Novel Machine Learning Algorithm to Predict Disease Free Survival after Resection of Hepatocellular Carcinoma**

**Schoenberg M.B.**, Bucher J.N., Koch D., Börner N., Hesse S., De Toni E, Seidensticker M., Angele M.K., Klein C., Bazhin A.V., Werner J., Guba M.O.; (2020) Ann Trans Med Apr;8(7):434 DOI: 10.21037/atm.2020.04.16 IF 3.68

Wie oben erwähnt strebten wir an die Prädiktion des krankheitsfreien Überlebens von HCC Patienten anhand komplexerer selbst lernender Algorithmen zu verbessern. Unser Ziel war es, einen Machine Learning Algorithmus (ML) zu entwickeln und zu validieren, um vorherzusagen, welche Patienten durch eine Leberresektion ausreichend behandelt werden. 26 präoperativ verfügbare Routinelaborwerte zusammen mit klinisch-pathologischen Standardparametern (einschließlich des modifizierten Glasgow Prognostic Score (mGPS), des Kings Score (KS) und des Model of Endstage Liver Disease (MELD)) wurden von 181 Patienten erhoben, die sich von Januar 2007 bis März 2018 in unserer Einrichtung einer partiellen Leberresektion wegen eines HCCs bei kompensierter Zirrhose unterzogen. Diese Daten wurden mit Hilfe eines auf dem Random Forest (RF) basierenden Workflows analysiert. Dieser umfasste ein Preprocessing, sogenanntes Recursive Feature Elimination (RFE), Resampling, Training und Cross-Validation des RF-Modells. Als Testkohorte wurde eine Untergruppe von der Analyse unabhängig gehaltenen Patientendaten verwendet. Frühes krankheitsfreies Überleben wurde im Zeitrahmen von 2 Jahren beurteilt. Basierend auf der RF-Prädiktion konnten die Patienten des Testdatensatzes in hoch (HR) oder niedrig Risiko (NR) stratifiziert werden.

Die RFE-Analyse lieferte 6 relevante Prädiktoren: mGPS, aPTT, CRP, größte Tumorgroße, Anzahl der Läsionen und Alter zum Zeitpunkt der Operation. Nach Down-Sampling betrug der Vorhersagewert (AUC) unseres Modells 0,788 [CI 0,658-0,919] für das frühe krankheitsfreie Überleben. 16,7% der HR- und 74,2% der NR-Patienten überlebten 2 Jahre der Nachbeobachtung ( $p < 0,001$ ).

Unser RF-Modell, das ausschließlich auf klinischen Parametern basiert, erwies sich als ein leistungsfähiger Prädiktor für das krankheitsfreie Überleben. Verglichen mit dem BRC (siehe oben) konnte das neue Modell im kurzfristigen Follow-up beinahe alle Patienten mit einem Ereignis (Rezidiv oder Mortalität) vorhersagen. Aktuell existiert nur eine vergleichbare Studie, die sich ebenfalls komplexer Machine learning Algorithmen bedient hat. Hier gelang den Autoren unter Hinzunahme komplexer radiologischer Daten (Radiomics) eine AUC von 0.716 zur Vorhersage des kurzfristigen krankheitsfreien Überlebens (15). Die Ergebnisse, welche wir in dieser Untersuchung erzielen konnten, rechtfertigen eine multizentrische prospektive Studie zur Verbesserung des Modells. Zudem haben wir zur einfacheren Anwendung des Modells eine Online App entworfen, welche mit dem QR-Code in Abbildung 2 oder unter folgender Adresse abgerufen werden kann: [tiny.cc/hcc\\_model](https://tiny.cc/hcc_model).



**Abbildung 2:** QR-Code mit Verlinkung zur Online App des Machine learning Modells. **iOS:** Der Code kann nach Öffnen der Kamera-App gescannt und die URL abgerufen werden. **Android:** Einige Geräte erlauben das Scannen mittels der Kamera-App. In manchen Modellen muss ein spezieller QR Reader installiert werden.

#### 1.4. Dynamische Selektionskriterien für die Lebertransplantation bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom außerhalb der Milan-Kriterien

**Liver Transplantation for Extended Criteria Hepatocellular Carcinoma using Stable Response to Locoregional Therapy and Alpha-Fetoprotein as Selection Criteria**

**Schoenberg M.B.**, Anger H.J.W., Bucher J.N., Denk G., De Toni E, Seidensticker M., Andrassy J., Angele M.K., Werner J., Guba M.O.; (2020) Visc Med DOI:10.1159/000506752  
IF 2.00

Aktuell wird der Zugang zur LT mittels den sehr restriktiven Milan-Kriterien (MC) subsidiär geregelt. Es führt zum Ausschluss von Patienten, die ebenfalls von einer Lebertransplantation profitieren könnten. Eine sinnvolle Erweiterung der Transplantationskriterien des HCC um dynamische und größenunabhängige Variablen könnte die HCC Therapieallokation verbessern.

Nach unserem prospektiv festgelegten Algorithmus erhielten die  $OUT_{MC}$ -Patienten eine lokoregionale Therapie. Unsere dynamischen Auswahlkriterien für  $OUT_{MC}$ -Patienten erforderten ( $IN_{MUC}$  Gruppe): 1) Ansprechen auf die Behandlung über 2) mindestens sechs Monate und 3) AFP  $\leq 400$  ng/ml über den gesamten Auswertungszeitraum. Patienten mit  $IN_{MC}$ -Tumoren dienten als Kontroll- und interne Validierungskohorte.

31 von 170 Lebertransplantationskandidaten waren Kandidaten für die  $OUT_{MC}$  Transplantation. Von diesen mussten acht von der Warteliste genommen werden, da sie einen Progress während der Bridgingtherapie zeigten. Die restlichen 23 Patienten erfüllten die Auswahlkriterien und wurden transplantiert. Das 5-Jahres rezidivfreie Überleben der  $IN_{MUC}$  Patienten war höher als bei den  $OUT_{MC}IN_{MUC}$  Patienten (92,2% vs. 70,8%;  $p=0,026$ ). Das Gesamtüberleben zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,552$ ). Mit einer dynamischen Selektionskriterien der Transplantationskandidaten konnte in der internen Validierungskohorte ( $IN_{MC}$ -Patienten) ebenfalls ein Rezidiv vorhergesagt werden (C-Index: 0,896; CI 0,588-0,981,  $p=0,005$ ).

Die Schlussfolgerung dieser Arbeit war, dass die dynamische Auswahl von  $OUT_{MC}$ -HCCs durchführbar und organisierbar ist. Des Weiteren ermöglicht sie hervorragende Langzeitergebnisse und akzeptable Tumorrezidivraten, die mit denen von  $IN_{MC}$ -Patienten vergleichbar sind. Zusammen mit anderen Arbeiten zeigt diese Studie, dass dynamische Selektionskriterien basierend auf Therapieansprechen nach Bridging Therapie ein besseres Selektionskriterium darstellen, als die bloße Messung der Anzahl und Größe der Tumoren als Schnappschuss zum Zeitpunkt der Listung. Sogenannten Downstaging Konzepte haben bereits Einzug in die neuesten Richtlinien der AASLD (American Association for the Study of Liver Disease) gefunden. Somit werden in der OPTN/UNOS (Organ Procurement and Transplantation Network des United Network for Organ Sharing) Region neuerdings sogenannten Standard Exceptions Punkte auch an Patienten vergeben, die initial außerhalb Milan waren und deren Tumorlast nach Behandlung wieder innerhalb der Milan-Kriterien war. Zusätzlich muss das AFP unter 1000ng/ml liegen oder nach Behandlung unter 500 ng/ml gesunken sein.(16) Diese breite Anwendung von dynamischen Selektionskriterien validiert unsere Beobachtungen in unserer Untersuchung.

### 3. EXPERIMENTELLE TEILPROJEKTE

Wie oben beschrieben konnte gezeigt werden, dass die immunologische Antitumorreaktion einen signifikanten Einfluss auf das gesamte sowie krankheitsfreie Überleben nach der Leberresektion des HCCs hat. Diese Antitumorreaktion wird jedoch mittels des klinisch gemessenen und einfach errechneten mGPS (modified Glasgow Prognostic Scale) nur grob abgeschätzt. Eine Differenzierung welche Mechanismen der Tumorabwehr zur Bekämpfung des HCCs rekrutiert werden, kann mittels der Messung von simplen Surrogat-Parametern nicht ausreichend erfolgen. Hierzu müssen die immunaktivierenden und immunsuppressiven Mechanismen der tumorimmunologischen Reaktion genauer differenziert werden.

Eine der am häufigsten untersuchten Mechanismen der immunologischen Tumorabwehr ist die direkte zytotoxische Reaktion der Tumor infiltrierenden Leukozyten (TIL). Die Analyse von immunhistochemischen (IHC) Färbungen gegen Immunzellmarker ermöglicht die Differenzierung der Tumor infiltrierenden Leukozyten (TIL) der Tumorimmunabwehr. Mit dem sogenannte „Immunoscore“, welches die Art, Anzahl und Lokalisation der TILs quantifiziert, konnte eine sinnvolle und prädiktive Erweiterung des TNM-Klassifikationssystems eingeführt werden (17).

Inspiziert von diesen Ergebnissen wurden zahlreiche ähnliche Analysen in verschiedenen Entitäten durchgeführt (18-20). Jedoch herrscht trotz der großen Anzahl der zu diesem Thema publizierten Daten eine sehr hohe Heterogenität bezüglich der Quantifizierung der TILs (21). Im Fokus des experimentellen Teils der Habilitation stand erstens die Entwicklung eines Quantifizierungsalgorithmus des Tumor Immun-Stromas. Zweitens wendeten wir unseren neu entwickelten Algorithmus auf das hepatozelluläre Karzinom an, um eine Vorhersage des gesamten und krankheitsfreien Überlebens nach der Resektion zu ermöglichen.

#### 1.5. Entwicklung einer zuverlässigen und reproduzierbaren Methode zur Quantifizierung Tumor infiltrierender Leukozyten

##### **Development of a Reliable and Accurate Algorithm to Quantify the Tumor Immune Stroma (QTiS) across Tumor Types**

Miksch R.\*, Hao J.\*, **Schoenberg M.B.\***, Dötzer K., Schlüter F., Weniger M., Yin S., Ormanns S., D'Haese J., Guba M., Werner J., Mayer B., Bazhin A.V.; (2017) *Oncotarget*. 8(70):114935-114944. IF 5.168 \*equally contributed

Das Ziel dieses interdisziplinären Projektes war es eine einfache, reproduzierbare und günstige Methode zur Quantifizierung von TILs in verschiedenen Tumorentitäten zu entwickeln.

Ebenso wie die Quantifizierung von TILs war die Auswertung des Ki67-Index (Marker für Zellteilung) in neuroendokrinen Tumoren bei der klinischen Einführung noch nicht standardisiert. Um die Heterogenität zu verringern und die Ergebnisse in der Praxis zu vereinheitlichen, war es im Falle des Ki67-Index notwendig einfache, verfügbare und reproduzierbare Algorithmen zu entwickeln (22). Ebenso ist das Ziel der Standardisierung der Quantifizierung der TILs nicht nur klinisch wichtig, sondern auch um publizierte Ergebnisse einordnen und vergleichen zu können (22).

CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen wurden im HCC, periduktalen Pankreaskarzinomen (PDAC), metastasierten kolorektalen Karzinomen (mCRC) und Ovarialkarzinom (OvCa) mittels Immunohistochemie angefärbt (N=80). Ansammlungen an infiltrierenden Immunzellen wurden als Hot-Spots definiert. Die Identifikation von Hot-Spots wurde mittels 2 unabhängiger Untersucher, die für die klinischen und pathologischen Daten der Patienten verblindet waren, nachgewiesen. Zudem wurde die Genauigkeit der verschiedenen automatisierten Zählmethoden ermittelt.

Die Analyse zeigte, dass alle Tumorentitäten eine Immuninfiltration aufwiesen, obgleich die Anzahl der TILs stark variierte. Die Zuverlässigkeit der Hot-Spot Identifikation, gemessen an der intraclass-correlation (ICC) zwischen den Untersuchern, war sehr hoch (0,949 in mCRC, 0,843 in OvCa, 0,805 in HCC und 0,957 in PDAC). Die automatisierte ImageJ Quantifizierung mit subjektiver Einstellung des Grenzwertes zeigte die höchste Präzision bei der Auszählung der TILs in den histologischen Schnitten (ICC>0,900 in allen Tumorentitäten). Für Labore die Immunoscoring betreiben möchten, ist die ImageJ Software die kosteffizienteste Lösung, da Sie als Freeware im Internet erhältlich ist und auf allen gängigen Betriebssystemen installiert werden kann.

In dieser Studie etablierten wir einen zuverlässigen Algorithmus zur präzisen Quantifizierung des Tumor Immun-Stromas (QTiS Algorithmus). Dieser Algorithmus wurde in 4 Tumorentitäten getestet und ist in sowohl immunogenen als auch weniger immunogenen soliden Malignomen anwendbar (21). Seit der Publikation dieses Algorithmus, konnten wir unsere Methode entsprechend unseres Ziels in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem im HCC, validieren.

#### 1.6. Die prädiktive Relevanz perivaskulärer Tumor infiltrierender Leukozyten im hepatozellulären Karzinom nach Leberresektion

### **Perivascular Tumor Infiltrating Leukocyte Scoring for Prognosis of Resected Hepatocellular Carcinoma Patients**

**Schoenberg M.B.\***, Hao J.\*, Bucher J.N., Miksch R.C., Anger H.J.W., Mayer B., Mayerle J., Neumann J., Guba M.O., Werner J., Bazhin A.V.; (2018) *Cancers (Basel)* 18;10(10) IF 5.326 \*equally contributed

Nach Entwicklung des QTis Algorithmus wurde dieser zur differenzierteren Analyse der TILs im HCC von resezierten Patienten verwendet. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Analyse der Lokalisation der TILs gelegt.

In zuvor durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass im HCC, im Gegensatz zu anderen Entitäten wie dem kolorektalen Karzinom, der sogenannte invasive Rand (Englisch: invasive margin (IM)) eine untergeordnete Rolle als Grenze zwischen dem gesunden Immunsystem und dem erkrankten Gewebe spielt (23). Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen umschließt das HCC häufig in eine fibröse Kapsel. Auch scheint das Wachstum des HCC häufig eher expansiv als infiltrativ zu sein. Dies erschwert eine Infiltration von den invasiven Rändern aus deutlich. Zum anderen entsteht der größte Teil der HCCs in Zirrhose. Diese schafft eine immunsuppressive Umgebung im zirrhotischen Gewebe. Nicht nur verhindert dieser immunsuppressive Immungradient die Infiltration von TILs in das HCC, sondern wird auch für die Hepatocarcinogenese in der zirrhotischen Leber verantwortlich gemacht (24, 25).

Die größte Grenzfläche zum funktionierenden Immunsystem scheint das Geflecht an den intratumoralen Gefäßen zu sein (26). Zwar sind intratumorale Gefäße notwendig um Tumorstadium und Metastasierung zu ermöglichen, jedoch erlauben Gefäße im Gegensatz dazu auch eine Extravasation von Immunzellen zur Bekämpfung des HCCs (27).

Aus diesem Grund war das Ziel dieses klinisch experimentellen Projektes den Einfluss perivaskulär infiltrierender Leukozyten in resezierten HCC Patienten auf das krankheitsfreie Überleben zu untersuchen.

Hierfür wurden in einer retrospektiven Studie TILs in Paraffinschnitten von 60 in der Klinik für Allgemein, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Klinikums Großhadern resezierten HCC Patienten mittels immunohistochemischer Färbung gegen CD3, CD8, CD20 und CD66b gezählt. Wir verwendeten unseren QTis Algorithmus für die Zählung.

In der Analyse der Infiltrationsmuster zeigte sich die perivaskuläre Infiltration als die dominanteste Infiltrationsform im HCC. Mittels des perivaskulären Scorings (PVS) von CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD20<sup>+</sup> konnte das krankheitsfreie Überleben nach kurativer Resektion des HCCs vorhergesagt werden ( $p=0,006$ ). Nach strukturierter multivariater Analyse (s.o.) der Ergebnisse war der PVS signifikant prädiktiv für das rezidivfreie und gesamte Überleben ( $p<0,01$ )(28).

In dieser Studie führten wir die perivaskuläre Region als mögliche relevante Grenzfläche zwischen HCC und gesundem Immunsystem ein. Resezierte HCC Patienten profitieren

signifikant von einer hohen Infiltration von Immuneffektorzellen im perivaskulären Bereich. Dies unterstreicht die ambivalente Rolle der Neovaskularisation im HCC. Auf der einen Seite ermöglicht die Neovaskularisation den Tumorzellen, speziell Krebsstammzellen, vom Primärtumor aus Metastasen zu bilden. Auf der anderen Seite konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass die Neovaskularisation den Zugriff von Immuneffektorzellen auf das HCC ermöglicht. Die mannigfaltigen Mechanismen der Immunabwehr gegen das HCC und speziell die perivaskuläre Infiltration in Tumoren sollten in weiteren Studien näher untersucht werden, denn wie wir in unseren Untersuchungen zeigen konnten scheint nicht nur die Art der sondern auch der Ort der Immuninfiltration das Überleben der HCC Patienten relevant zu beeinflussen.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Das hepatozelluläre Karzinom ist der häufigste primäre maligne Lebertumor. Durch das aggressive Wachstumsverhalten, der Chemoresistenz und der zugrundeliegenden Leberzirrhose ist es gekennzeichnet durch eine hohe Letalität. Frühe HCCs können kurativ chirurgisch (Resektion oder Transplantation) behandelt werden. Tatsächlich ist das HCC die einzige solide Malignität, die entweder reseziert oder transplantiert werden kann. Die Überlebensraten nach der Transplantation sind verglichen mit der Leberresektion im kurzen sowie auch im Langzeit Follow-up besser. Die Lebertransplantation kann aber aufgrund des Spendermangels nicht jedem Patienten angeboten werden. Es bietet sich an eine Lebertransplantation nur in Patienten durchzuführen, die aufgrund schlechter Tumor- oder Leberbiologie hohe Rezidivraten nach der Resektion aufzeigen.

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift untersucht klinisch sowie auch experimentell verschiedene Prädiktoren zur Vorhersage von postoperativen Rezidiv- sowie Überlebensraten von HCC Patienten.

Im klinischen Teil der Habilitationsleistung verglichen wir zunächst mittels einer Meta-Analyse die Ergebnisse der Leberresektion mit denen der Lebertransplantation bei HCC. Anhand der Literatur konnten wir eine Subgruppe an Patienten identifizieren, die mit einer Leberresektion ähnlich gute Ergebnisse wie nach der Lebertransplantation erreichen konnten. Um diese Gruppe an Patienten näher zu untersuchen, führten wir eine retrospektive Analyse aller Patienten, die zwischen 2007 und 2018 an der Klinik für Allgemein, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Klinikums Großhadern an der Ludwig-Maximilians Universität wegen eines HCCs operiert wurden, durch.

In der ersten Analyse definierten wir sogenannte Biologische Resektionskriterien (BRC) um Patienten zu identifizieren, die mit onkologisch zufriedenstellenden Ergebnissen reseziert werden können. Das Überleben der Patienten innerhalb der BRC war vergleichbar mit denen die transplantiert wurden. Patienten, die außerhalb der BRC waren, hatten deutlich schlechtere Überlebensraten und sollten möglicherweise primär für die Transplantation evaluiert werden. Wie in dieser Arbeit auch gezeigt, beeinflusste die Leberfunktion und die Tumorbiologie insbesondere die frühen Rezidive, welche als sogenannte „true metastases“ innerhalb von 2 Jahren auftreten. Aus diesem Grund versuchten wir in der nächsten Arbeit das frühe krankheitsfreie Überleben noch besser vorherzusagen. Hierfür programmierten wir ein „Random Forest“ basiertes Machine learning Modell. Das Modell, welches auf einfachen klinischen und laborchemischen Parametern basierte, erreichte in der unabhängigen Testkohorte eine AUC von 0,788 [CI 0,658-0,919] für das frühe krankheitsfreie Überleben.

In einer weiteren Studie untersuchten wir unsere dynamischen Selektionskriterien für die Transplantation von HCC Patienten außerhalb der Milan-Kriterien. Diese basieren auf 1) Ansprechen auf die Behandlung über 2) mindestens sechs Monate und 3) AFP  $\leq$ 400 ng/ml

über den gesamten Auswertungszeitraum. Wir konnten zeigen, dass die Ergebnisse der Patienten innerhalb unserer Münchner Kriterien vergleichbare Überlebensraten wie Patienten innerhalb der Milan-Kriterien aufwiesen.

Darüber hinaus behandelt die Habilitationsschrift nicht nur klinisch chirurgische Themen, sondern auch experimentelle Arbeiten zum Thema der Prädiktion des krankheitsfreien Überlebens nach chirurgischer Therapie des HCCs. Das Ziel des experimentellen Teils war es Tumor infiltrierende Leukozyten standardisiert zu quantifizieren. Wir entwickelten hierfür zunächst einen zuverlässigen Algorithmus zur präzisen Quantifizierung des Tumor Immun-Stromas (QTiS Algorithmus). Dieser Algorithmus wurde in 4 Tumorentitäten getestet und ist in sowohl immunogenen als auch weniger immunogenen soliden Malignomen anwendbar.

In der nächsten Arbeit konnten wir dann unseren QTiS Algorithmus am resezierten HCC anwenden. So führten wir die perivaskuläre Region als mögliche relevante Grenzfläche zwischen HCC und gesundem Immunsystem ein. Resezierte HCC Patienten profitieren signifikant von einer hohen Infiltration von Immuneffektorzellen im perivaskulären Bereich.

Basierend auf den oben genannten Studien führen wir aktuell eine klinisch-experimentelle Studie durch, die den Immungradient zwischen den zirkulierenden Immunzellen (im peripheren Blut) und den TILs untersuchen. Die Messung einer Immunsignatur im peripheren Blut hat den Vorteil vor der Behandlung (Resektion) verfügbar zu sein und somit die Behandlung bzw. Nachbehandlung zu bestimmen. Wir erwarten in Zukunft durch diese Untersuchungen präoperativ messbare multidimensionale immunologische Profile zu identifizieren. Unter der Verwendung von, in unserer Gruppe bereits etablierten, Analysemethoden für multidimensionale Daten (z.B. Principal Component Analysis und t-stochastic neighbor embedding) und „Machine Learning“ wollen wir es ermöglichen die Therapieallokation aller an HCC erkrankten Patienten, die chirurgisch therapiert werden können, zu verbessern.

## 5. LITERATUR

1. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1118-27.
2. Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis*. 2007;11(1):191-207, x-xi.
3. Weiss J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(26):447-52.
4. Aleman S, Rahbin N, Weiland O, Davidsdottir L, Hedenstierna M, Rose N, et al. A risk for hepatocellular carcinoma persists long-term after sustained virologic response in patients with hepatitis C-associated liver cirrhosis. *Clin Infect Dis*. 2013;57(2):230-6.
5. Malek NP, Schmidt S, Huber P, Manns MP, Greten TF. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(7):101-6.
6. Malfertheiner P, Verslype C, Kolligs FT, Schutte K, Vandecaveye V, Paprottka PM, et al. The effectiveness of selective internal radiation therapy in challenging cases of liver-predominant unresectable hepatocellular carcinoma. *Future Oncol*. 2014;10(15 Suppl):17-27.
7. Schoenberg M, Khandoga A, Stintzing S, Trumm C, Schiergens TS, Angele M, et al. CyberKnife Radiosurgery - Value as an Adjunct to Surgical Treatment of HCC? *Cureus*. 2016;8(4):e591.
8. European Association For The Study Of The L, European Organisation For R, Treatment Of C. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(4):908-43.
9. Schoenberg M, Bucher J, Vater A, Bazhin A, Hao J, Guba M, et al. Resection or transplant in early hepatocellular carcinoma — a systematic review and meta-analysis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2017;114(31-32).
10. Vitale A, Farinati F, Pawlik TM, Frigo AC, Giannini EG, Napoli L, et al. The concept of therapeutic hierarchy for patients with hepatocellular carcinoma: A multicenter cohort study. *Liver Int*. 2019.
11. Bellavance EC, Lumpkins KM, Mentha G, Marques HP, Capussotti L, Pulitano C, et al. Surgical management of early-stage hepatocellular carcinoma: resection or transplantation? *J Gastrointest Surg*. 2008;12(10):1699-708.
12. Ni XC, Yi Y, Fu YP, He HW, Cai XY, Wang JX, et al. Prognostic Value of the Modified Glasgow Prognostic Score in Patients Undergoing Radical Surgery for Hepatocellular Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(36):e1486.
13. Pinato DJ, Karamanakis G, Ishizuka M, Smirne C, Pirisi M, Kubota K, et al. The Kings Score refines prognostic prediction in hepatocellular carcinoma: a novel application. *Liver Int*. 2015;35(11):2458-65.

14. Khandoga A, Drefs M, Schoenberg M, Schiergens T, Frenes K, Trumm C, et al. Differential significance of early surgical complications for acute and long-term recurrence-free survival following surgical resection of hepatocellular carcinoma: do comorbidities play a role? *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2017;29(9):1045-53.
15. Kim S, Shin J, Kim DY, Choi GH, Kim MJ, Choi JY. Radiomics on Gadoteric Acid-Enhanced Magnetic Resonance Imaging for Prediction of Postoperative Early and Late Recurrence of Single Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3847-55.
16. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;67(1):358-80.
17. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
18. Unitt E, Marshall A, Gelson W, Rushbrook SM, Davies S, Vowler SL, et al. Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Hepatol*. 2006;45(2):246-53.
19. Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, Marliot F, Haicheur N, Tosi AM, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1891-9.
20. Gabrielson A, Wu Y, Wang H, Jiang J, Kallakury B, Gatalica Z, et al. Intratumoral CD3 and CD8 T-cell Densities Associated with Relapse-Free Survival in HCC. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(5):419-30.
21. Miksch RC, Hao J, Schoenberg MB, Dotzer K, Schluter F, Weniger M, et al. Development of a reliable and accurate algorithm to quantify the tumor immune stroma (QTIS) across tumor types. *Oncotarget*. 2017;8(70):114935-44.
22. Reid MD, Bagci P, Ohike N, Saka B, Erbarut Seven I, Dursun N, et al. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies. *Mod Pathol*. 2016;29(1):93.
23. Sun C, Xu J, Song J, Liu C, Wang J, Weng C, et al. The predictive value of centre tumour CD8(+) T cells in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with Immunoscore. *Oncotarget*. 2015;6(34):35602-15.
24. Nakashima T, Kojiro M. Histological Growth Patterns of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatocellular Carcinoma: An Atlas of its Pathology*: Springer Japan; 1987. p. 81-104.

25. Wu TH, Yu MC, Chen TC, Lee CF, Chan KM, Wu TJ, et al. Encapsulation is a significant prognostic factor for better outcome in large hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2012;105(1):85-90.
26. Muto J, Shirabe K, Sugimachi K, Maehara Y. Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2015;45(1):1-9.
27. Bellone M, Calcinotto A. Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes. *Front Oncol.* 2013;3:231.
28. Schoenberg MB, Hao J, Bucher JN, Miksch RC, Anger HJW, Mayer B, et al. Perivascular Tumor-Infiltrating Leukocyte Scoring for Prognosis of Resected Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancers (Basel).* 2018;10(10).

## 6. VERZEICHNIS DER ORIGINALARBEITEN

Die schriftliche Habilitationsleistung besteht aus folgenden publizierten Originalarbeiten und kann über die entsprechenden Links abgerufen werden:

1. Schoenberg M.B., Anger H.J.W., Bucher J.N., Denk G., De Toni E, Seidensticker M., Andrassy J., Angele M.K., Werner J., Guba M.O.; Liver Transplantation for Extended Criteria Hepatocellular Carcinoma using Stable Response to Locoregional Therapy and Alpha-Fetoprotein as Selection Criteria (2020) *Visc Med* [DOI:10.1159/000506752](https://doi.org/10.1159/000506752) IF 2.00
2. Schoenberg M.B., Bucher J.N., Koch D., Börner N., Hesse S., De Toni E, Seidensticker M., Angele M.K., Klein C., Bazhin A.V., Werner J., Guba M.O.; A Novel Machine Learning Algorithm to Predict Disease Free Survival after Resection of Hepatocellular Carcinoma (2020) *Ann Trans Med Apr*;8(7):434 [DOI: 10.21037/atm.2020.04.16](https://doi.org/10.21037/atm.2020.04.16) IF 3.68
3. Schoenberg M.B.\*, Hao J.\*, Bucher J.N., Miksch R.C., Anger H.J.W., Mayer B., Mayerle J., Neumann J., Guba M.O., Werner J., Bazhin A.V.; Perivascular tumor infiltrating leukocyte scoring for prognosis of resected hepatocellular carcinoma Patients (2018) *Cancers (Basel)*. 2018 Oct 18;10(10) [DOI: 10.3390/cancers10100389](https://doi.org/10.3390/cancers10100389) IF 5.326 \*equally contributed
4. Schoenberg M.B., Anger H.J.W., Hao J., Vater A., Bucher J.N., Thomas M.N., Lauseker M., Rentsch M., Schiergens T.S., Angele M.K., Bazhin A.V., Werner J., Guba M.O.; Development of novel biological resection criteria for safe and oncologically T satisfying resection of hepatocellular carcinoma (2018) *Surg Oncol* 27:663-673 [DOI: 10.1016/j.suronc.2018.08.007](https://doi.org/10.1016/j.suronc.2018.08.007) IF 2.558
5. Miksch R.\*, Hao J.\*, Schoenberg M.B.\*, Dötzer K., Schlüter F., Weniger M., Yin S., Ormanns S., D'Haese J., Guba M., Werner J., Mayer B., Bazhin A.V.; Development of a reliable and accurate algorithm to quantify the tumor immune stroma (QTiS) across tumor types (2017) *Oncotarget*. 8(70):114935-114944. [DOI: 10.18632/oncotarget.22932](https://doi.org/10.18632/oncotarget.22932) IF 5.168 \*equally contributed
6. Schoenberg M.B.\*, Bucher J.N.\*, Vater A., Bazhin A.V., Hao J., Guba M.O., Angele M.K., Werner J., Rentsch M.; Resektion oder Transplantation beim frühen hepatozellulären Karzinom. Systematisches Review und Metaanalyse (2017) *Dtsch Arztebl Int*; 114: [DOI: 10.3238/arztebl.2017](https://doi.org/10.3238/arztebl.2017). IF 4.257 \*equally contributed

7. Schoenberg M.B., Khandoga A., Stintzing S., Trumm C., Schiergens T., Angele M., op den Winkel M., Werner J., Muacevic A., Rentsch M.; CyberKnife Radiosurgery – Value as an adjunct to surgical treatment of HCC? (2016) Cureus 8(4): e591. [DOI: 10.7759/cureus.591](https://doi.org/10.7759/cureus.591) IF NA