



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝外胆管癌の局所免疫環境におけるprogrammed cell death ligand 1(PD-L1)発現の意義と臨床病理学的因子との関連性の検討
Author(s)	上野, 峰
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14263号
Issue Date	2020-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14263
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79423
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Ueno.pdf



学 位 論 文

肝外胆管癌の局所免疫環境における **programmed cell death ligand 1 (PD-L1)**発
現の意義と臨床病理学的因子との関連性の検討

(Studies on **programmed cell death ligand 1 (PD-L1)** expression in immunological microenvironment
and its association with clinicopathological factors in extrahepatic cholangiocarcinoma)

2020 年 9 月

北 海 道 大 学

上野 峰

学 位 論 文

肝外胆管癌の局所免疫環境における **programmed cell death ligand 1 (PD-L1)**発

現の意義と臨床病理学的因子との関連性の検討

(Studies on **programmed cell death ligand 1 (PD-L1)** expression in immunological microenvironment

and its association with clinicopathological factors in extrahepatic cholangiocarcinoma)

2020 年 9 月

北 海 道 大 学

上野 峰

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	5 頁
方法	12 頁
結果	17 頁
考察	33 頁
総括および結論	37 頁
謝辞	39 頁
利益相反	40 頁
引用文献	41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Takashi Ueno, Takahiro Tsuchikawa, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Yoshitsugu Nakanishi, Takehiro Noji, Toru Nakamura, Keisuke Okamura, Yoshihiro Matsuno, Satoshi Hirano

Prognostic impact of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression and its association with epithelial-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma
Oncotarget, 9:20034-20047, 2018

本研究の一部は以下の学会に発表した.

2. Takashi Ueno, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka¹, Takahiro Tsuchikawa, Keisuke Okamura, Yoshihiro Matsuno, Satoshi Hirano

Prognostic significance of PD-L1 expression in extrahepatic cholangiocarcinoma.
2017 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, March 4-10, 2017, San Antonio, Texas, United States.

【要旨】

【背景と目的】

肝外胆管癌（extrahepatic cholangiocarcinoma ; eCCA）は、根治切除後でも再発が多いため、治療成績向上のために集学的治療の開発が必要である．近年免疫チェックポイント阻害剤（immune checkpoint inhibitor; ICI）の多くの癌種に対する治療効果が注目されており、特に腫瘍免疫を抑制する免疫チェックポイント分子として、programmed cell death ligand 1（PD-L1）発現が予後に与える影響について検討されている．eCCAにおいては、この腫瘍免疫を抑制する PD-L1 発現が予後に与える影響について検討した報告は少ない．

最近の研究では、上皮系細胞が間葉系細胞に形質転換するプロセスである epithelial-mesenchymal transition（EMT）が、腫瘍細胞における PD-L1 発現や腫瘍微小環境における腫瘍浸潤性リンパ球（Tumor-infiltrating lymphocytes : TILs）の抑制に関連していることが報告されている．しかし eCCA では腫瘍細胞における PD-L1 発現や TILs に関する検討が少なく、腫瘍細胞における PD-L1 発現と EMT との関連については未だ報告がない．

今回、eCCA における腫瘍細胞の PD-L1 発現が予後に及ぼす影響を検討し、さらに PD-L1 と TILs や EMT との関連性を検討することを目的とした．

【対象と方法】

対象は 1995 年から 2006 年までに北海道大学病院消化器外科 II で根治的切除され、eCCA と診断した 117 症例である．組織マイクロアレイを作製し、免疫組織化学染色を行った．1 次抗体は PD-L1, CD4, CD8, Foxp3, E-cadherin, N-cadherin, vimentin, ZEB1, ZEB2, SNAIL, TWIST を使用した．これらの免疫組織化学染色結果を含めた臨床病理学的因子と予後との関連を検討した．

【結果】

腫瘍細胞における PD-L1 発現や TILs と EMT との関連を検討すると、CD4 と CD8 陽性 T リンパ球の高浸潤群は、いずれも腫瘍細胞の SNAIL の発現が少なかった（それぞれ $P=0.016$, $P=0.022$ ）．腫瘍細胞における PD-L1 高発現群は、腫瘍細胞における E-cadherin の発現が少なく（ $P=0.001$ ）、N-cadherin, vimentin, ZEB1 の発現が多かった（それぞれ $P=0.044$, $P<0.001$, $P=0.036$ ）．

臨床病理学的因子と全生存率の関連を検討すると、多変量解析において、CD4 陽性 T リンパ球低浸潤（HR = 0.61; 95%CI = 0.38-1.00; $P = 0.049$ ）、PD-L1 高発現（HR =

4.27; 95%CI = 1.82-9.39 ; P = 0.001), N-cadherin 高発現 (HR = 2.20; 95%CI = 1.18-3.92; P = 0.015) が独立した予後不良因子であった。

【考察】

今回の検討では、eCCA において腫瘍細胞における PD-L1 高発現と腫瘍微小環境における CD4 陽性 T リンパ球の低浸潤は、多変量解析で独立した予後不良因子であることが示された。eCCA においては腫瘍細胞の PD-L1 発現と予後との関連性の検討は少なく、一定の見解が得られていないが、使用抗体・評価方法・カットオフ値を詳細に検討することで、腫瘍細胞における PD-L1 発現が予後不良因子であることが示された。

本検討では、eCCA において腫瘍細胞の PD-L1 発現が、EMT における間葉表現型の蛋白発現と関連していることが初めて示された。eCCA においては腫瘍細胞における PD-L1 発現が EMT により調節され、予後に影響を与えている可能性が示唆された。

【結論】

eCCA において腫瘍細胞における PD-L1 発現と腫瘍微小環境における CD4 陽性 T リンパ球の浸潤が独立した予後因子であった。さらに、腫瘍細胞における PD-L1 の高発現は間葉表現型と関連していることを示した。今回の知見は、eCCA における予後予測だけでなく、ICI の治療効果を予測するバイオマーカーとして有効な可能性がある。

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである.

eCCA:	extrahepatic cholangiocarcinoma
EMT:	epithelial-mesenchymal transition
FFPE:	formalin-fixed, paraffin-embedded
iCCA:	intrahepatic cholangiocarcinoma
ICI:	immune checkpoint inhibitor
PD-1:	programmed death 1
PD-L1:	programmed cell death ligand 1
TILs:	Tumor-infiltrating lymphocytes
TMA:	tissue microarray
Treg:	regulatory T cell

【緒言】

胆管癌は、胆管上皮から生じる上皮系の悪性腫瘍であり、大きく肝内胆管癌（Intrahepatic cholangiocarcinoma; iCCA）と肝外胆管癌（Extrahepatic cholangiocarcinoma; eCCA）に分類される。さらに eCCA は肝門部胆管癌と遠位胆管癌に分類される。eCCA の発生率は 1～2 人/100,000 人/年と稀な疾患の一つである (DeOliveira et al., 2007; Lazaridis and Gores, 2005)。eCCA の大部分は腺癌であり、特に高分化から中分化型腺癌が多い (Blechacz et al., 2011)。腺癌の腫瘍細胞はムチンを含有し、浸潤部では通常豊富な線維性間質を伴う。また神経周囲浸潤やリンパ節転移を来しやすい。eCCA の根治的治療は外科的切除であるが、根治切除後でも再発が多く、5 年生存率は 20～40% と予後不良な疾患である (DeOliveira et al., 2007; van der Gaag et al., 2012)。治療成績向上のためには外科的切除以外の治療も含めた集学的治療の開発が必要である (Kato et al., 2015; Okusaka et al., 2006; Penz et al., 2001; Raderer et al., 1999)。

近年、腫瘍微小環境において、免疫系が腫瘍増殖の制御に重要な役割を果たしていることが注目されている。CD4 や CD8 陽性の T リンパ球などの腫瘍浸潤性リンパ球（Tumor-infiltrating lymphocytes; TILs）は、宿主免疫反応において重要な役割を果たしている。胆道癌を含むいくつかの癌腫において、腫瘍微小環境における CD4 や CD8 陽性の TILs は、予後良好因子として報告されている (Fukunaga et al., 2004; Galon et al., 2006; Goeppert et al., 2013; Mahmoud et al., 2011; Waldner et al., 2006; Zhang et al., 2003)。これらの TILs の働きにより、宿主は腫瘍細胞を排除していく。これを「elimination phase」という (Figure.1)。次第に腫瘍細胞は宿主の免疫系に耐えられるようになる「equilibrium phase」に移行していく (Figure.1)。さらに「escape phase」になると、宿主の免疫系を抑制する細胞が出現してくるようになる (Mittal et al., 2014) (Figure.1)。

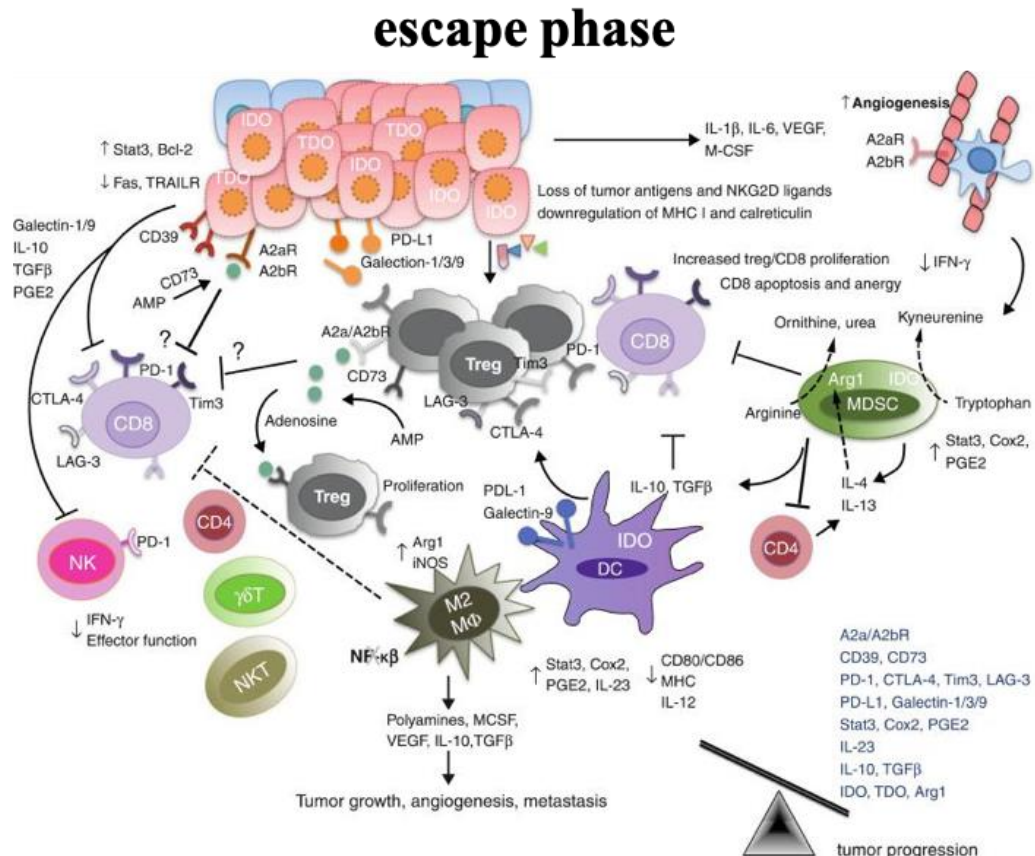


Figure.1 腫瘍微小環境における腫瘍免疫環境の変化

elimination phase では、TILs により腫瘍細胞が排除される。

次に、equilibrium phase では、腫瘍細胞が腫瘍免疫に対して耐性を持つ。

さらに、escape phase では、免疫系を抑制する腫瘍細胞が出現する。

(Mittal, D. *et al.* 2014. Curr. Opin. Immunol より引用)

近年、この免疫抑制の中でも、腫瘍細胞に発現する programmed death ligand 1 (PD-L1) が注目されている。PD-L1 と CD8 陽性の TILs に発現する programmed death 1 (PD-1) 受容体の相互作用は、CD8 陽性 TILs による細胞傷害性免疫反応を調節・抑制すると報告されている(Dong *et al.*, 2002) (Figure.2)。現在、PD-L1 と PD-1 の相互作用を阻害する免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor; ICI) は悪性黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌などの幅広い固形癌、ホジキンリンパ腫などの血液疾患で持続的な治療効果が報告されている(Topalian *et al.*, 2015)。しかし、これらの抗腫瘍効果も限られた症例においてのみであり、治療効果を予測するバイオマーカーの同定が不可欠である。腫瘍細胞における PD-L1 の発現は、様々な癌腫において

予後不良因子として報告されているが、予後だけではなく、ICI による治療効果を予測するバイオマーカーとして検討されている(Konishi et al., 2004; Sabbatino et al., 2016; Takada et al., 2016). しかし、PD-L1 陰性症例であっても ICI の治療効果が認められるという報告もあり、腫瘍細胞における PD-L1 発現だけではなく、腫瘍微小環境にある他の因子も含めた総合的な検討が必要である。また、PD-L1 を検出する抗体の種類や最適なカットオフ値も定見がなく、標準化に向けた検討が必要である。

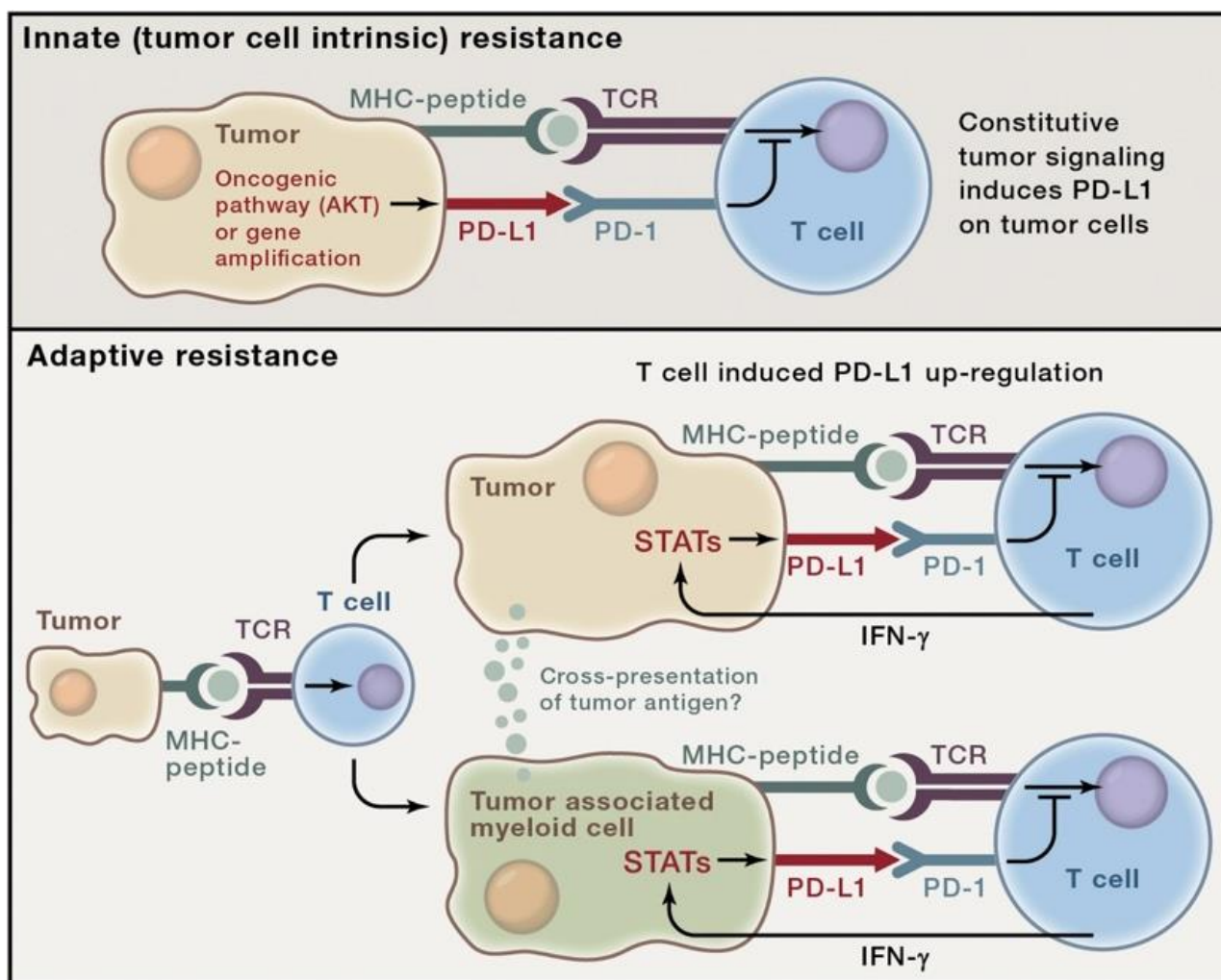


Figure.2 PD-L1 による細胞傷害性免疫の抑制メカニズム

PD-L1 と PD-1 との相互作用は、CD8 陽性 TILs による細胞傷害性免疫反応を調節・抑制する。

(Dong, H. et al. 2002. Nat. Med より引用)

腫瘍細胞における PD-L1 発現のメカニズムとして、2つの機序が報告されている。第1のメカニズムは、ホジキンリンパ腫に見られるような遺伝子異常により促進される PD-L1 の発現である (Green et al., 2010)。第2のメカニズムは、 $\text{INF-}\gamma$ のような炎症性シグナルにより誘導される PD-L1 の発現である (Pardoll, 2012)。さらに最近の研究では、これらの2つの発現機序に加えて、上皮系細胞が間葉系細胞に形質転換するプロセスである上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition ; EMT) が、PD-L1 の発現に関連していることが報告されている。EMT とは本来上皮細胞由来であるがん細胞が間葉系形質を獲得し、浸潤能、転移能を獲得する現象である。さらに、この EMT は腫瘍細胞における PD-L1 発現だけでなく、CD4 や CD8 陽性の TILs の抑制にも関連することが報告されている (Alsuliman et al., 2015; Chen et al., 2014; Kim et al., 2016a; Kudo-Saito et al., 2009; Thiery et al., 2009; Zlobec et al., 2007)。腫瘍細胞における PD-L1 発現機序を検討することは、PD-L1 を阻害する ICI の治療効果を予測する潜在的なバイオマーカーの検索に繋がる。Chen ら (Chen et al., 2014) は PD-L1 が間葉系表現型の転写因子である ZEB1 の下流の標的蛋白であると報告しており (Figure.3)、間葉表現型が ICI の治療対象群である可能性を示唆している。

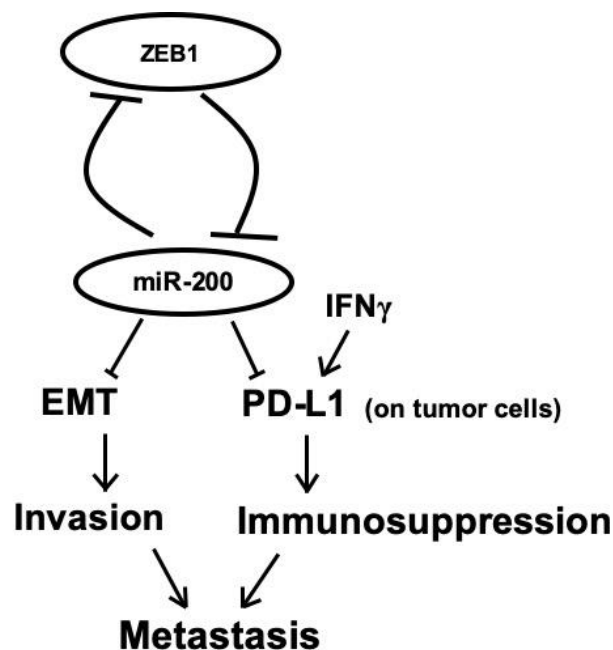


Figure.3 EMT と PD-L1 発現との関係

間葉系表現型の転写因子である ZEB1 の下流の標的蛋白に腫瘍細胞における PD-L1 を認める。

(Chen, L. et al. 2014. Nat. Commun より引用)

eCCA に関しては腫瘍細胞における PD-L1 発現の報告自体が少なく、特に腫瘍細胞における PD-L1 発現と予後との関連性の検討では一定の見解が得られていない (Fontugne et al., 2017; Kim et al., 2018; Lim et al., 2015; Ma et al., 2017; Sangkhamanon et al., 2017; Sato et al., 2017; Tamai et al., 2014; Walter et al., 2017) (Table.1). これまでの eCCA における PD-L1 発現の予後検討の問題点として、検討症例が小規模である点や、TILs などの因子を含めた多変量解析ではなく、腫瘍細胞における PD-L1 発現だけの単変量の解析である点である。さらに使用されている抗体も様々であり、評価方法やカットオフ値を含めた検討もされていない。よって過去の報告のような小規模で単変量解析のみの検討ではなく、大規模なデータベースを用いた TILs を含んだ腫瘍微小環境を構成する様々な因子を含めた多変量解析による予後解析が必要である。さらに腫瘍細胞における PD-L1 に対して使用する抗体の種類や評価方法の標準化も必要である。

他癌腫においては腫瘍細胞における PD-L1 の発現機序として EMT が注目されているが、eCCA ではこれらの関連性を検討した報告はない。eCCA における EMT については N-cadherin や vimentin といった間葉系タンパク質を発現する間葉性表現型が予後不良因子となることが報告されている (Nitta et al., 2014; Thiery et al., 2009; Xu et al., 2015). eCCA においても腫瘍細胞における PD-L1 発現機序の 1 つとして EMT が関与しているかを検討するために、腫瘍細胞における PD-L1 発現と EMT との関連性を検討することは重要である。

本研究の目的は、eCCA において、腫瘍微小環境における TILs などの因子を含めて、腫瘍細胞における PD-L1 が予後に与える影響を検討することである。さらに、腫瘍細胞における PD-L1 などの腫瘍免疫と EMT の関連性も検討した。

Table.1 過去の eCCA における PD-L1 の免疫組織化学染色を用いた検討

報告者	報告年	症例数	モノクローナル 抗体	評価方法
Tamai K	2014	91	ab58810	染色強度で分類 (±/++)
Lim Y J	2015	83	E1L3N	H-score が 5 以上
Ma K	2017	70	ab174838	staining-intensity-distribution が 2 以上
Fontugne J	2017	41(ICC が 33)	E1L3N	陽性細胞が 5%以上
Walter D	2017	69	E1L3N	H-score が 3 以上
Sato Y	2017	45(ICC が 23)	28-8	陽性細胞が 5%以上
Sangkhamanon S	2017	13(ICC が 32)	5H1	陽性細胞が 1%以上
Kim R	2018	44	5H1	陽性細胞が 1%以上

報告者	症例数	内容	問題点
Tamai K	91	PD-L1はがん幹細胞関連表現型を抑制する	免疫染色評価方法の再現性がない. 多変量解析なし.
Lim Y J	83	PD-1発現/CD8陽性TILs比の高値群は 予後不良因子である	全例で術前に化学放射線療法が 施行されている. 症例数が少ない.
Ma K	70	PD-L1高発現は予後不良因子である	TILsを含めた多変量解析ではない.
Fontugne J	41(ICCが33)	PD-L1高発現群とTILs高浸潤群とは関連する	症例数が少なく, ICCも混在. 予後検討がない.
Walter D	69	PD-L1高発現群かつTILs低浸潤群は 予後不良である	症例数が少ない. TILsを含めた多変量解析ではない.
Sato Y	45(ICCが23)	職業性胆管癌症例はPD-L1高発現し, TILsの浸潤も高い	症例数が少なく, ICCも混在. 予後検討がない.
Sangkhamanon S	13(ICCが32)	PD-L1発現はStageIV症例・好中球/リンパ球比 高値群と関連する	症例数が少なく, ICCも混在. 多変量解析がない.
Kim R	44	CD8陽性CD45陽性TILs高値群は 予後良好因子である	症例数が少ない.

【方法】

対象症例

1995 年 1 月から 2006 年 11 月までに北海道大学病院消化器外科 II で根治的切除され、術後に eCCA と病理学的に診断された 122 例を対象に検討を行った。これらの症例で組織マイクロアレイ (tissue microarray ; TMA) を作成し、免疫組織化学染色を行って検討を行った。このうち腫瘍組織が極少量で解析が不十分であった 5 症例を除外した。病変の主座により eCCA を肝門部領域胆管癌 (perihilar) と遠位胆管癌 (distal) の 2 つの群に分類した(DeOliveira et al., 2007)。全ての腫瘍は、the Union for International Cancer Control (UICC) の 7th TNM classification system に従って Stage を分類した(Sobin LH, 2009)。本研究は、Hokkaido University Institutional Review Board (承認番号 : 015-0501) の承認を得た。本研究では、手術前に「将来的に医学研究に用いる目的で保管し使用すること」を文章で同意 (包括同意) した患者の検体のみを使用した。

TMA

TMA ブロックは、直径 2.0mm の針を有する組織マイクロアレイヤ (JF-4; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) を用いて、腫瘍の代表部位 2 か所 (腫瘍の先進部 ; invasive front of the tumor と中心部 ; bulk of the tumor) および対照として非腫瘍性の胆管上皮の 1 か所を打ち抜いた。完成したアレイブロックは厚さ 4 μ m で切片化した。

使用抗体

今回使用した 1 次抗体は Table.2 に示した。腫瘍免疫に関連する CD4, CD8, Foxp3 陽性 TILs の抗体としては、それぞれ SP35 (Ventana, Basel, Switzerland), SP57 (Ventana, Basel, Switzerland), PCH101 (eBioscience, Frankfurt, Germany) を使用した。eCCA では、腫瘍細胞における PD-L1 発現に関する検討は少なく、PD-L1 の 1 次抗体の種類は一定の評価が得られていない。そのため今回 PD-L1 に関しては、臨床的に使用可能な SP142 (SPRING BIOSCIENCE, Pleasanton, CA, USA), E1L3N (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) の 2 種類のモノクローナル抗体を使用した。EMT 関連蛋白の上皮系マーカーである E-cadherin は 4A2C7 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、間葉系マーカーである N-cadherin, vimentin はそれぞれ 6G11 (Dako, Carpinteria, CA, USA), V9 (Ventana, Basel, Switzerland) を使用した。さらに今回 EMT の転写因子として、ZEB1, ZEB2, SNAIL, TWIST を検討し、それぞれ 416A7H10 (GenWay, San Diego, CA, USA), PAb (rabbit) (Novus Biological, Littleton,

CO, USA), PAb (goat) (Abcam, Burlingame, CA, USA), Twist2C1a (Abcam, Burlingame, CA, USA) の抗体を用いた. 1 次抗体は希釈液 (Dako Real Antibody Diluent) を用いて指定倍率に希釈した.

Table.2 免疫組織化学染色で使用した 1 次抗体

抗原	クローン	メーカー	希釈	バッファー	染色部位
CD4	SP35	Ventana	1:1	Tris-EDTA	細胞膜
CD8	SP57	Ventana	1:1	Tris-EDTA	細胞膜
Foxp3	PCH101	eBioscience	1:100	Tris-EDTA	細胞膜
PD-L1	SP142	SPRING BIOSCIENCE	1:100	Tris-EDTA	細胞膜
PD-L1	E1L3N	Cell Signaling	1:50	Tris-EDTA	細胞膜
E-cadherin	4A2C7	Invitrogen	1:1	Tris-EDTA	細胞膜
N-cadherin	6G11	Dako	1:50	Tris-EDTA	細胞膜
Vimentin	V9	Ventana	1:1	Tris-EDTA	細胞質
ZEB1	416A7H10	GenWay	1:20	Tris-EDTA	核
ZEB2	PAb (rabbit)	Novus Biological	1:400	Tris-EDTA	細胞膜
SNAIL	PAb (goat)	Abcam	1:500	Tris-EDTA	核
TWIST	Twist2C1a	Abcam	1:20	Tris-EDTA	核

染色方法

組織切片を脱パラフィン剤としてキシレンを 2 つ用意し, 5 分間ずつ浸漬させて脱パラフィンを行なった. 次に 100%エタノール 3 分間を 2 回, 95%エタノール 3 分間浸漬し, 80%エタノールに 10 回上下して再水和させた. 熱誘導抗原の賦活化は, 65°C に加温した PT LINK (Dako) を用いて, 高 pH の抗原賦活化バッファー (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) で行った. 過酸化水素処理は, Peroxdase Blocking Reagent #SM801 を組織上に載せて 5 分間静置した. Table.2 に示した 1 次抗体を組織に載せ, シェイカーを使用して 30 分揺らした. これらの切片を HRP 標識ポリマー (EnVision FLEX HPB #SM802) をのせ, 30 分シェイカーで揺らして可視化した. 免疫染色された切片をヘマトキシリンで 10 秒上下浸漬させて対比染色した. 封入には 2 つの 95%エタノール中で 2 回脱水し, 100%エタノールに 5 分浸漬させ, 3 つのキシレンに 10 回上下して洗浄した.

免疫組織化学染色の評価方法

本研究で使用したホルマリン固定、パラフィン包埋（formalin-fixed, paraffin-embedded ; FFPE）組織標本の抗原性については、vimentin 染色により確認された（Figure.4）。

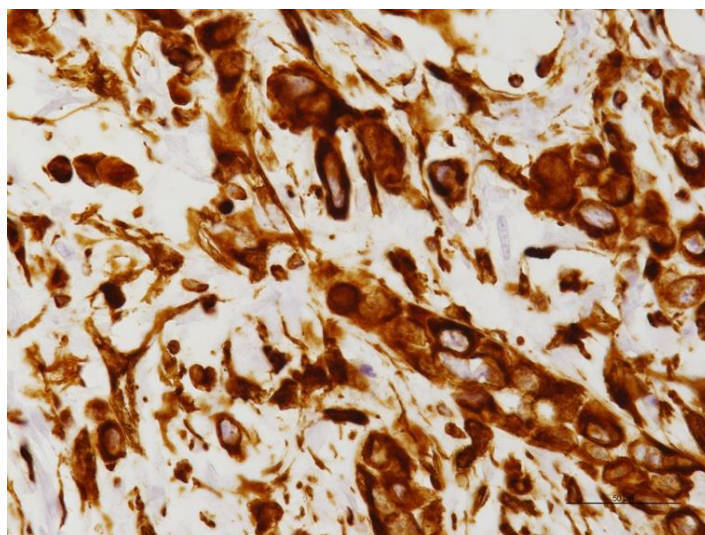


Figure.4 vimentin を使用した FFPE 検体における抗原性の確認

CD4, CD8, Foxp3 の陽性 T リンパ数については、腫瘍先進部と中心部におけるそれぞれの 4 か所の強視野で染色されたリンパ球数を計測した(Sabbatino et al., 2016). eCCA においては PD-L1 の 1 次抗体の種類や評価方法は確立していない. よってまずは他癌種において検討されているように全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合を計測する方法を用いた(Kim et al., 2016b; Takada et al., 2016; Uruga et al., 2016). この検討の際には染色強度については検討していない. さらに, 近年報告されている H-score という半定量的な評価方法も加えて検討した(Katsuya et al., 2015; Nitta et al., 2014). H-score とは, 腫瘍細胞のうち染色された陽性細胞率 (0-100%) と染色強度 (0, none; 1, weak; 2, moderate; 3, intense) の積として計算したもので, 0 から 300 で半定量的に評価したものである. これら染色された陽性細胞率と染色強度は腫瘍先進部と中心部の 2 か所の TMA コアの平均で分析した. PD-L1 の免疫組織化学染色の染色条件については, 既に非小細胞肺癌の臨床検体の染色で確立された免疫組織化学染色の方法に従って評価した. positive control については, 各スライド上に認める PD-L1 陽性マクロファージを内因性の positive control として利用した (Figure.5) (Igarashi et al., 2016). EMT 関連蛋白については, PD-L1 と同様に H-score を用いて検

討した．これらの免疫組織化学染色の評価は症例の臨床情報を盲検化した 2 人によって行われた (Takashi Ueno, Tomoko Mitsuhashi)．

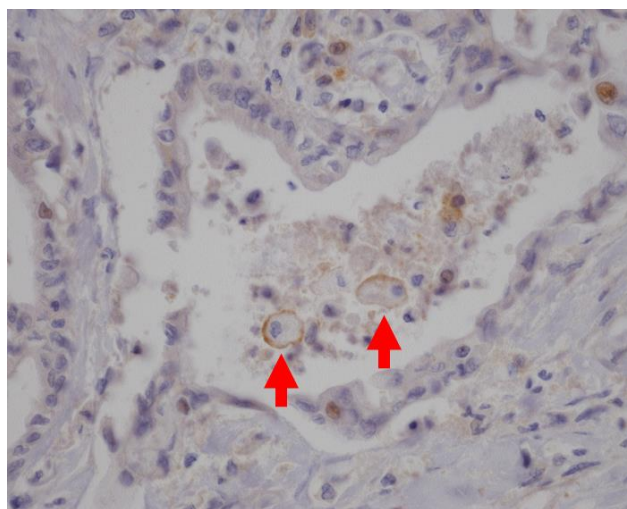


Figure.5 Positive control としての PD-L1 陽性マクロファージ

1 次抗体陽性判断におけるカットオフ値の設定

CD4, CD8, Foxp3 陽性 TILs のカットオフ値は, ROC 曲線を使用することで設定した(Nitta et al., 2014). つまりこれらの免疫組織化学染色で得られた連続変数と, 生存期間中央値時点での生死で分けた二変数の名義変数を検討することで ROC 曲線を描き, 最適なカットオフ値を設定した. TILs の多寡が予後に及ぼす影響を検討するために, 得られたカットオフ値でそれぞれ単変量解析と多変量解析による予後因子の検討を行なった. 多変量解析では単変量解析で全生存率に $P < 0.05$ の有意差が得られた患者背景因子を含めて検討した.

全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合におけるカットオフ値は過去の他癌種における報告を参考にして, 1%, 5%, 10%, 50% の 4 種類のカットオフ値を用いた (Kim et al., 2016b; Takada et al., 2016; Uruga et al., 2016). また, PD-L1 発現を H-score で評価した際のカットオフ値は TILs と同様に ROC 曲線を用いて設定した. これらのカットオフ値を 2 種類のモノクローナル抗体でそれぞれ設定し, 計 10 種類のカットオフ値を検討した. 10 種類のカットオフ値で PD-L1 発現が予後に与える影響を検討するために, それぞれ単変量解析と多変量解析による予後因子の検討を行い評価した. 多変量解析では単変量解析で全生存率に $P < 0.05$ の有意差が得られた因子を含めて検討した.

EMT 関連蛋白発現の H-score も TILs の検討と同様に ROC 曲線を用いてカットオフ値を設定した.

統計解析

名義変数同士の二変量の解析には Pearson Chi-squared 法を用いて、CD4、CD8、Fop3 陽性 TILs、PD-L1 発現、EMT 関連蛋白発現と臨床病理学的因子の関連を分析した。全生存率は Kaplan-Meier 法を用いて分析し、ログランク検定を用いて比較検討した。全生存率は、手術日から死亡日または最終受診日/フォローアップ月までとして検討した。多変量解析は Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて行った。有意性の閾値は $P < 0.05$ とした。多変量解析においては単変量解析で $P < 0.05$ となった因子を解析に含めて検討した。全ての統計分析は、JMP for Windows version 12.0 software package (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

【結果】

対象症例の患者背景

術後に eCCA と病理診断され、腫瘍量が十分で評価可能であった 117 症例を対象とした。対象症例の年齢中央値は 71 (44-87) 歳であった。術後 follow 期間の中央値は 27 (0-189) ヶ月であり、観察期間中に 98 症例 (84%) の死亡を確認した。再発部位の内訳は、肝転移再発が 31 症例 (26%)、癌性腹膜炎が 27 症例 (23%)、局所再発が 21 症例 (18%)、リンパ節転移再発が 15 症例 (13%) であった (重複あり)。死亡症例は 98 症例 (84%) であり、原病死が 78 症例 (67%)、他病死が 19 症例 (16%)、在院死が 1 例 (1%) であった。全ての症例で術前治療は施行していない。Table.3 に症例の臨床病理学因子を含めた患者背景を示した。

1 次抗体陽性判断のカットオフ値

各 1 次抗体の免疫組織化学染色の評価により得られた連続変数に関しては、それぞれ ROC 曲線を描き、最適なカットオフ値を設定した (Table.4)。この結果、CD4, CD8, Foxp3 陽性 TILs の腫瘍先進部のカットオフ値はそれぞれ 33/4 強視野, 42/4 強視野, 97/4 強視野となり、腫瘍中心部のカットオフ値はそれぞれ 41/4 強視野, 42/4 強視野, 5/4 強視野となった。また、PD-L1 発現を 2 種類のモノクローナル抗体である SP142 と E1L3N の H-score のカットオフ値はそれぞれ 11 と 6 となった。EMT 関連蛋白である E-cadherin, N-cadherin, vimentin, ZEB1, ZEB2, SNAIL, TWIST の H-score のカットオフ値はそれぞれ 120, 9, 60, 165, 30, 75, 55 となった。

Table.3 対象症例の患者背景

		n	%
性別	男性	93	79
年齢, 歳	≥71	59	50
腫瘍径, cm	≥3	29	25
局在	肝門部領域	70	60
	遠位	47	40
組織型	pap	12	10
	well	22	19
	mod	59	50
	por	24	21
動脈浸潤	陽性	5	4.3
門脈浸潤	陽性	24	21
リンパ管浸潤	陽性	82	70
静脈浸潤	陽性	75	64
神経周囲浸潤	陽性	102	87
pT	1	49	42
	2	14	12
	3	34	29
	4	20	17
pN	陰性	63	54
	陽性	54	46
pM	0	115	98
	1	2	1.7
pStage	I	44	38
	II	19	16
	III	33	28
	IV	21	18

Table.4 1 次抗体陽性判断のカットオフ値

抗原	クローン	評価方法	カットオフ値
CD4	SP35	腫瘍先進部での 4 強視野における CD4 陽性リンパ球数	33 個
CD4	SP35	腫瘍中心部での 4 強視野における CD4 陽性リンパ球数	41 個
CD8	SP57	腫瘍先進部での 4 強視野における CD8 陽性リンパ球数	42 個
CD8	SP57	腫瘍中心部での 4 強視野における CD8 陽性リンパ球数	42 個
Foxp3	PCH101	腫瘍先進部での 4 強視野における Foxp3 陽性リンパ球数	97 個
Foxp3	PCH101	腫瘍中心部での 4 強視野における Foxp3 陽性リンパ球数	5 個
PD-L1	SP142	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	1%
PD-L1	SP142	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	5%
PD-L1	SP142	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	10%
PD-L1	SP142	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	50%
PD-L1	SP142	H-score	11
PD-L1	E1L3N	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	1%
PD-L1	E1L3N	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	5%
PD-L1	E1L3N	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	10%
PD-L1	E1L3N	全腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞の割合	50%
PD-L1	E1L3N	H-score	6
E-cadherin	4A2C7	H-score	120
N-cadherin	6G11	H-score	9
Vimentin	V9	H-score	60
ZEB1	416A7H10	H-score	165
ZEB2	PAb (rabbit)	H-score	30
SNAIL	PAb (goat)	H-score	75
TWIST	Twist2C1a	H-score	55

TILs の細胞数と臨床病理学的因子との関連性

今回、TILs の免疫組織化学染色の評価として、腫瘍先進部と腫瘍中心部のそれぞれにおける CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球の数を計測した (Figure.6, Table.5). CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球の陽性細胞数に関して、腫瘍先進部と腫瘍中心部における陽性細胞数の差異は認めなかった. 腫瘍先進部と腫瘍中心部における CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球と全生存率との関連について検討すると、単変量解析では CD4 陽性の高浸潤症例群が予後良好因子であった. さらに、多変量解析では患者背景因子で全生存率に有意差が得られた組織型、静脈侵襲、TNM 分類の因子を含めて検討した. その結果、腫瘍先進部における CD4 陽性 T リンパ球の高浸潤症例群が独立した予後良好因子であることが示された (Table.6). このことは、腫瘍先進部での CD4 陽性 T リンパ球数の評価の方が、腫瘍中心部における CD4 陽性 T リンパ球数の評価よりもより予後を反映していることを示唆している. 以下の検討においては、予後検討において臨床的意義があると考えられる腫瘍先進部での CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球数で検討を行った (それぞれカットオフ値は 4 強視野で 33 個, 42 個, 97 個). 腫瘍先進部における CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球の数は、それぞれ 4 強視野で 2-384 個 (中央値 77 個; 四分位範囲, 32-136 個), 1-212 個 (中央値 52 個; 四分位範囲 26-97 個), 0-465 個 (中央値 9 個; 四分位範囲 2-21 個) であった. 腫瘍先進部における CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球数と臨床病理学的因子との関連については、CD4 陽性 T リンパ球の高浸潤症例群は、組織型が高分化の症例が多く ($P=0.028$), リンパ節転移が陰性である症例と関連していた ($P=0.009$). また、CD8 陽性 T リンパ球の高浸潤症例群は、リンパ節転移が陰性である症例と関連していた ($P=0.046$).

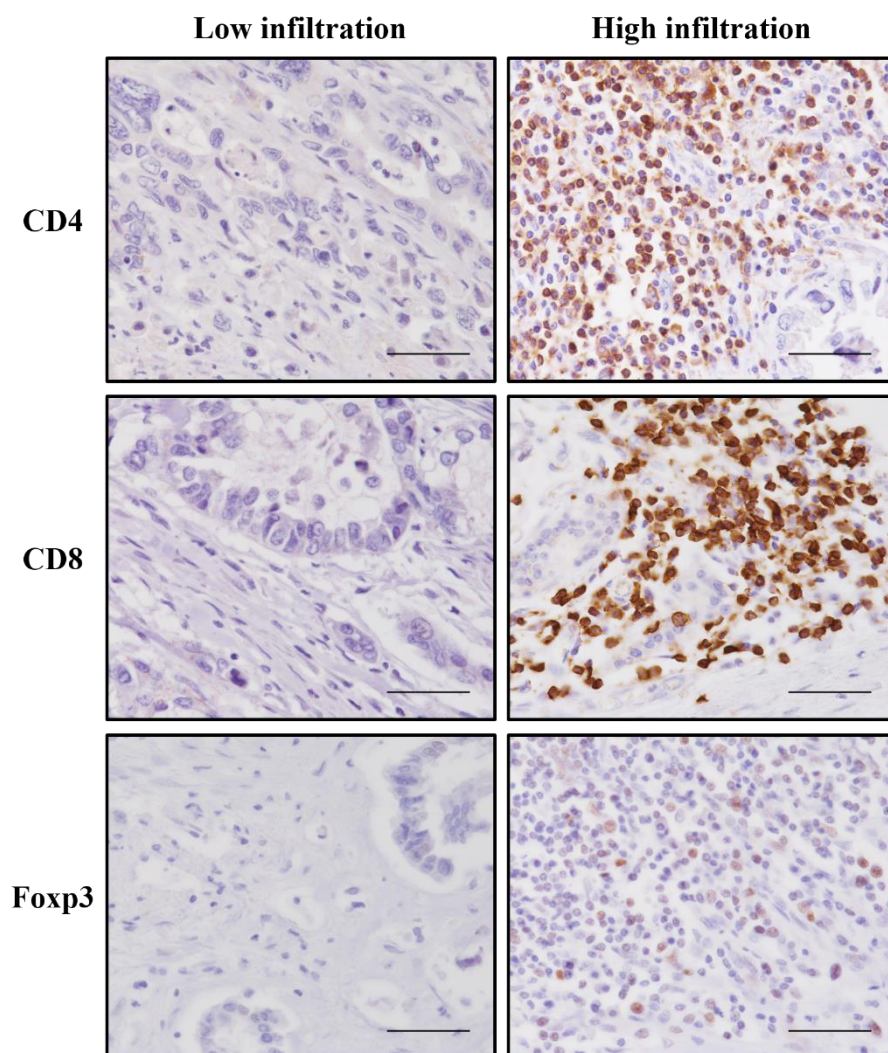


Figure.6 TILs の代表的免疫組織化学染色像
 CD4, CD8, Foxp3 陽性 TILs の低浸潤と高浸潤切片を示した。
 (それぞれ別の症例, スケール長は 50 μ m)

Table.5 腫瘍先進部と腫瘍中心部における CD4, CD8, Foxp3 陽性 TILs の比較

	腫瘍先進部			腫瘍中心部			<i>p</i> 値
	中央値	範囲	四分位範囲	中央値	範囲	四分位範囲	
CD4+ TILs	77	2 - 384	32 - 136	59	2 - 246	33 - 100	0.15
CD8+ TILs	52	1 - 212	26 - 97	55	2 - 210	28 - 93	0.94
Foxp3+ TILs	9	0 - 465	2 - 21	9	0 - 145	4 - 18	0.62

Table.6 腫瘍先進部と腫瘍中心部での CD4, CD8, Foxp3 陽性 TILs と全生存率との関連.

多変量解析には全生存率における単変量解析で有意差が得られた組織型, 静脈侵襲, TNM 分類の因子を含めて検討した.

		単変量解析	多変量解析	
		p 値	ハザード比 (95%CI)	p 値
CD4 陽性 T リンパ球	腫瘍先進部	0.009	0.61 (0.38-1.00)	0.049
	腫瘍中心部	0.049	0.92 (0.59-1.46)	0.73
CD8 陽性 T リンパ球	腫瘍先進部	0.18		
	腫瘍中心部	0.059		
Foxp3 陽性 T リンパ球	腫瘍先進部	0.10		
	腫瘍中心部	0.055		

腫瘍細胞における PD-L1 発現の免疫組織化学染色検討

今回, 腫瘍細胞における PD-L1 発現に関して, 2 種類のモノクローナル抗体である SP142 と E1L3N (Figure.7) を使用した. SP142 は, 42 症例 (36%) で PD-L1 陽性細胞を確認したが, 75 症例 (64%) では PD-L1 発現を認めなかった (Figure.8A).

SP142 での腫瘍細胞における PD-L1 発現を H-score で分析したところ, 0-140 の範囲であった (中央値 0 ; 四分位範囲 0-1.5) (Figure.8B). 一方で E1L3N は, 53 症例 (45%) で PD-L1 陽性細胞を確認したが, 64 症例 (55%) では PD-L1 発現を認めなかった (Figure.8C). E1L3N での腫瘍細胞における PD-L1 発現の H-score は, 0-195 の範囲 (中央値 0 ; 四分位範囲 0-5) であった (Figure.8D).

PD-L1 発現のカットオフ値に関しては, 全腫瘍細胞中の PD-L1 陽性腫瘍細胞の割合による 4 種類のカットオフ値 (1%, 5%, 10%, 50%) と PD-L1 発現の H-score を ROC 曲線で計測したカットオフ値 (SP142 が 11, E1L3N が 6) を設定した. これらの 10 種類のカットオフ値により PD-L1 発現を分類し, 予後に影響を与えるかどうかを検討するために, それぞれのカットオフ値で全生存率の単変量解析と多変量解析を行った. 多変量解析では全生存率に有意差が得られた組織型, 静脈侵襲, TNM 分類, CD4 陽性 T リンパ球浸潤, E-cadherin 発現, N-cadherin 発現, vimentin 発現といった因子を含めて検討した. その結果 SP142 の抗体を使用し, H-score で ROC 曲線

を用いて設定したカットオフ値が、他のカットオフ値よりも最も予後を反映した (Table.7). よって、以下の検討において腫瘍細胞の PD-L1 発現に関する分析は、より臨床的に意義のあると考える SP142 の H-score=11 をカットオフ値と設定し、検討を行った.

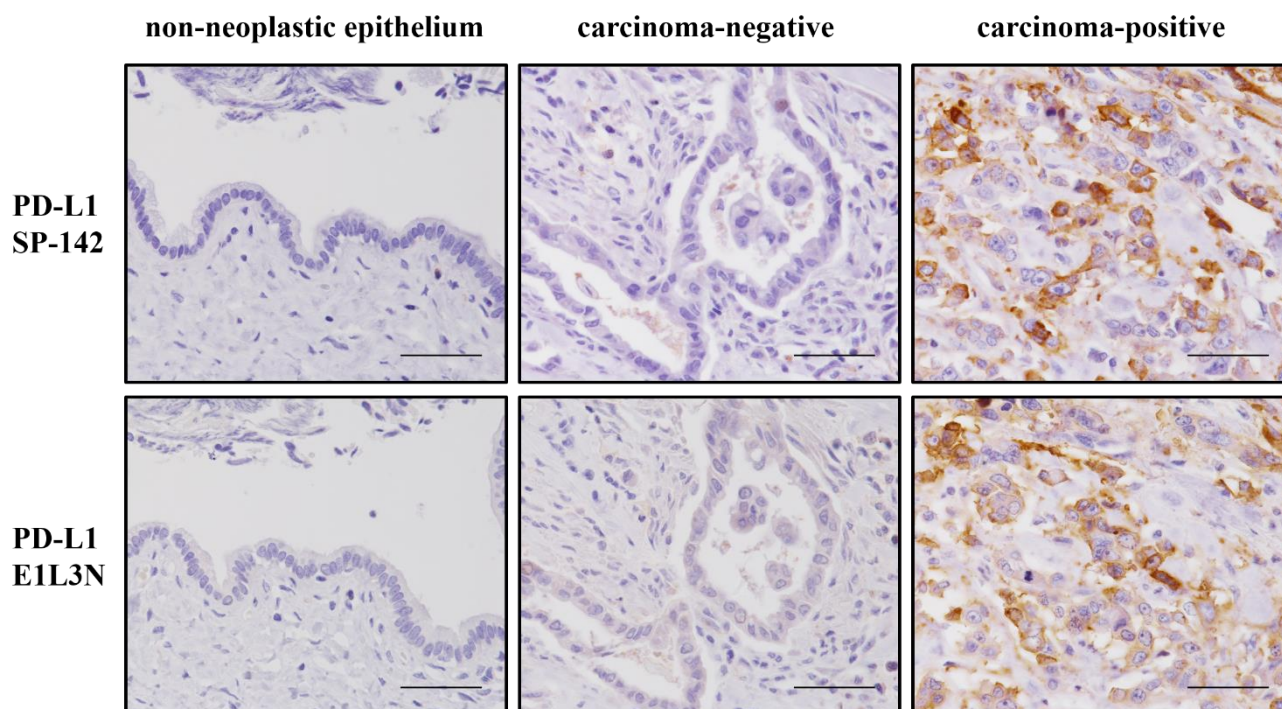
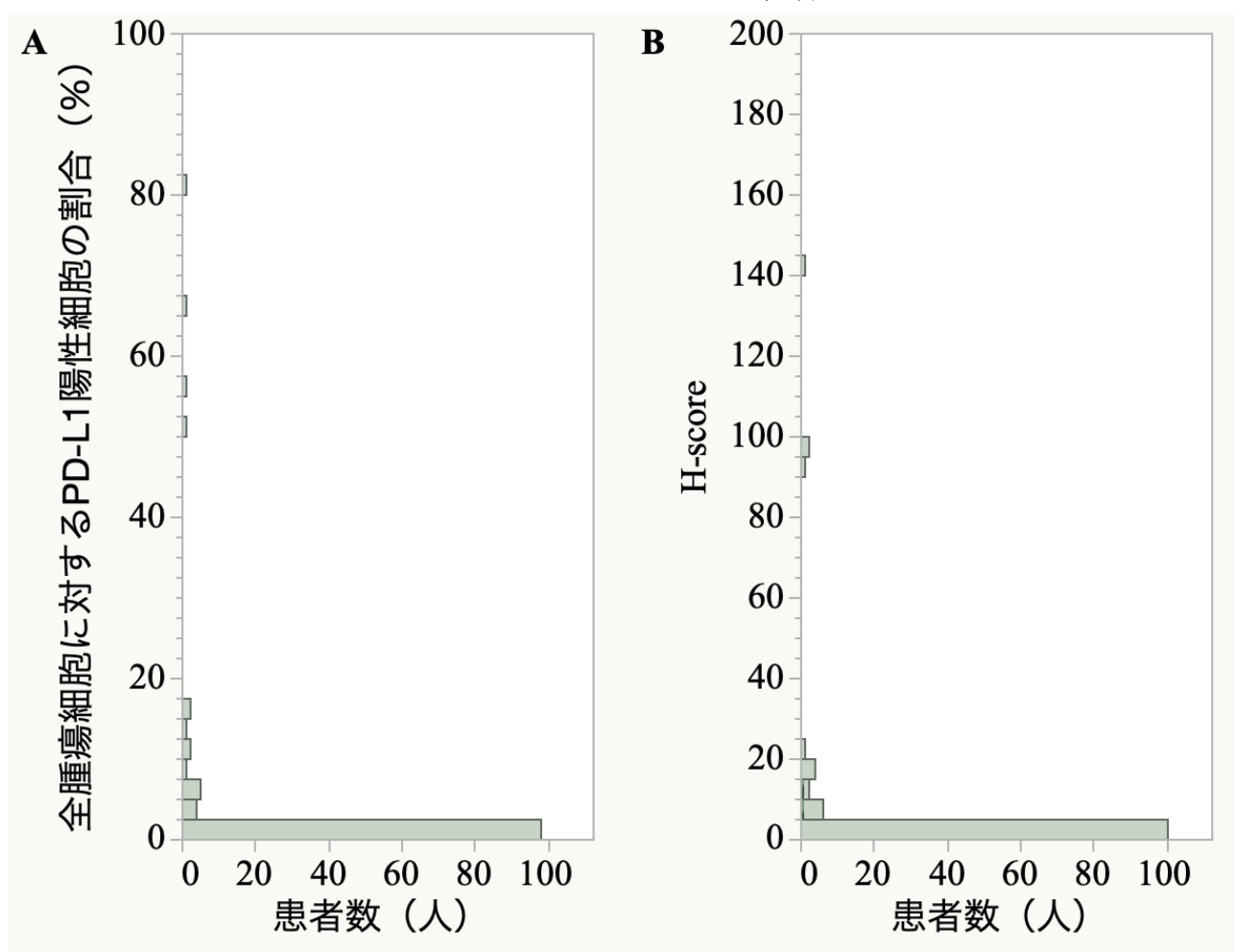


Figure.7 SP142 と E1L3N を用いた腫瘍細胞における PD-L1 の代表的免疫組織化学染色像

2 種類のモノクローナル抗体である SP142 と E1L3N を使用した際の、非腫瘍性上皮の陰性像、腫瘍細胞の陰性像と陽性像を示した.

(陽性像と陰性像は同じ症例、スケール長は 50 μ m)

SP142モノクローナル抗体



E1L3Nモノクローナル抗体

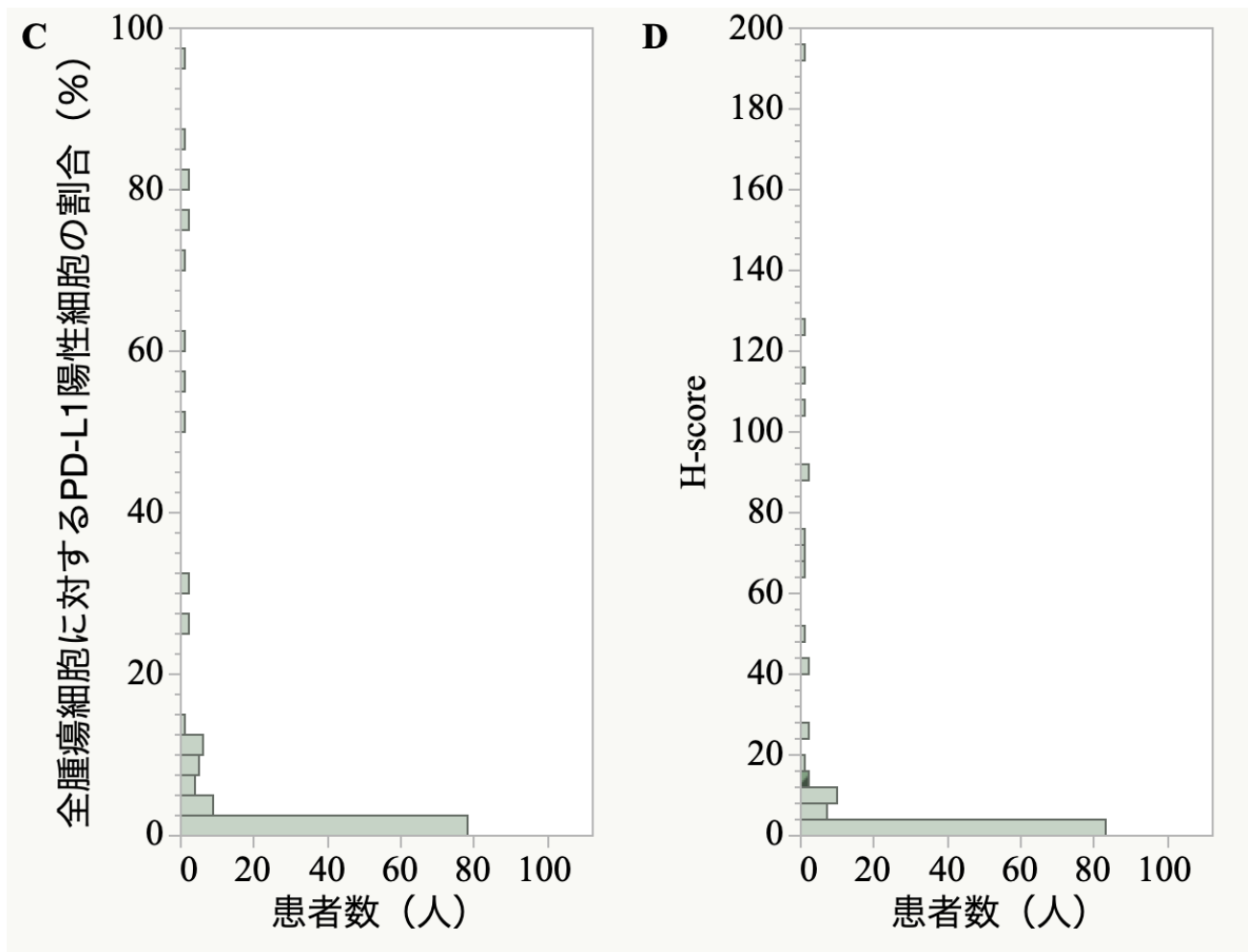


Figure.8 腫瘍細胞における PD-L1 発現の免疫組織化学染色の評価.
 SP142 と E1L3N を使用し，全腫瘍細胞中の陽性腫瘍細胞の割合と H-score を評価したところ，SP142 では 36%で陽性像を示し (A)，H-score は 0-140 の範囲であった (B)．一方 E1L3N では 45%で陽性像を示し (C)，H-score は 0-195 の範囲であった (D)．

Table.7 腫瘍細胞における PD-L1 発現の最適な評価方法についての検討.

	単変量解析	多変量解析	
	<i>p</i> 値	ハザード比(95%CI)	<i>p</i> 値
SP142			
発現割合=1%	0.47		
発現割合=5%	0.45		
発現割合=10%	<0.001	3.78 (1.57-8.35)	0.004
発現割合=50%	<0.001	3.55 (1.00-9.75)	0.050
H-score=11	<0.001	4.62 (1.82-9.39)	0.001
E1L3N			
発現割合=1%	0.44		
発現割合=5%	0.91		
発現割合=10%	0.27		
発現割合=50%	0.012	1.48 (0.54-3.64)	0.43
H-score=6	0.29		

腫瘍細胞における PD-L1 発現と TILs を含む臨床病理学的因子との関連

腫瘍細胞における PD-L1 発現と TILs を含む臨床病理学的因子との関連を Table.8 に示した. 腫瘍細胞における PD-L1 高発現群は, 組織学的に低分化な群と関連性を認めた ($P=0.034$). しかし, 腫瘍細胞における PD-L1 発現は, CD4, CD8, Foxp3 陽性 T リンパ球の浸潤と関連していなかった.

Table.8 腫瘍細胞における PD-L1 発現と TILs を含む臨床病理学的因子との関連

		PD-L1 発現		
		高値群 (n=10)	低値群(n=107)	p 値
性別	男性	9 (90%)	84 (79%)	0.39
年齢, 歳	≥71	5 (50%)	54 (50%)	0.98
腫瘍径, cm	≥3	3 (30%)	26 (24%)	0.69
局在	肝門部	4 (40%)	66 (62%)	0.18
	遠位	6 (60%)	41 (38%)	
組織型	pap+well	0 (0.0%)	34 (32%)	0.034
	mod+por	10 (100%)	73 (68%)	
動脈浸潤	陽性	1 (10%)	4 (3.7%)	0.35
門脈浸潤	陽性	2 (20%)	22 (21%)	0.97
リンパ管浸潤	陽性	8 (80%)	74 (69%)	0.47
静脈浸潤	陽性	5 (50%)	70 (65%)	0.33
神経周囲浸潤	陽性	9 (90%)	93 (87%)	0.78
pT	1+2	6 (60%)	57 (53%)	0.68
	3+4	4 (40%)	50 (47%)	
pN	0	4 (40%)	59 (55%)	0.36
	1	6 (60%)	48 (45%)	
pM	0	10 (100%)	105 (98%)	0.66
	1	0 (0.0%)	2 (1.9%)	
pStage	I + II	4 (40%)	59 (55%)	0.36
	III + IV	6 (60%)	48 (45%)	
CD4 陽性 T リンパ球浸潤	高浸潤	7 (70%)	80 (75%)	0.74
CD8 陽性 T リンパ球浸潤	高浸潤	6 (60%)	66 (62%)	0.92
Foxp3 陽性 T リンパ球浸潤	高浸潤	1 (10%)	4 (3.7%)	0.35

TILs や腫瘍細胞における PD-L1 と EMT との関連

腫瘍細胞の EMT 関連蛋白の代表的な染色像を Figure.9 に示した. TILs や腫瘍細胞における PD-L1 と EMT との関連を Table.9 に示した. CD4 と CD8 陽性 T リンパ球の高浸潤群は, いずれも SNAIL の低発現群と関連していた (それぞれ $P=0.016$, $P=0.022$). 一方, Foxp3 陽性 T リンパ球の高浸潤群は vimentin の高発現群と関連していた ($P=0.006$). 腫瘍細胞における PD-L1 の高発現群は, E-cadherin の低発現群 ($P=0.001$), N-cadherin の高発現群 ($P=0.044$), vimentin の高発現群 ($P<0.001$) および ZEB1 の高発現群と有意に関連していた ($P=0.036$).

TILs, 腫瘍細胞における PD-L1 発現, EMT を含む臨床病理学的因子と全生存率との関連

TILs, 腫瘍細胞における PD-L1 発現, EMT を含む臨床病理学的因子と全生存率の関連を検討した (Table.10). 全生存率のログランク検定による単変量解析では, 病理組織学的分類 ($P=0.032$), T 分類 ($P=0.031$), N 分類 ($P=0.001$), M 分類 ($P=0.001$), CD4 陽性 T リンパ球の浸潤 ($P=0.009$), PD-L1 発現 ($P<0.001$), E-cadherin ($P=0.033$), N-cadherin ($P=0.002$), vimentin ($P=0.024$) が有意な予後規定因子であった. Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析は, CD4 陽性 T リンパ球の低浸潤 ($HR = 0.61$; $95\%CI = 0.38-1.00$; $P = 0.049$), PD-L1 の高発現 ($HR = 4.27$; $95\%CI = 1.82-9.39$; $P = 0.001$), N-cadherin 高発現 ($HR = 2.20$; $95\%CI = 1.18-3.92$; $P = 0.015$) が独立した予後不良因子であった.

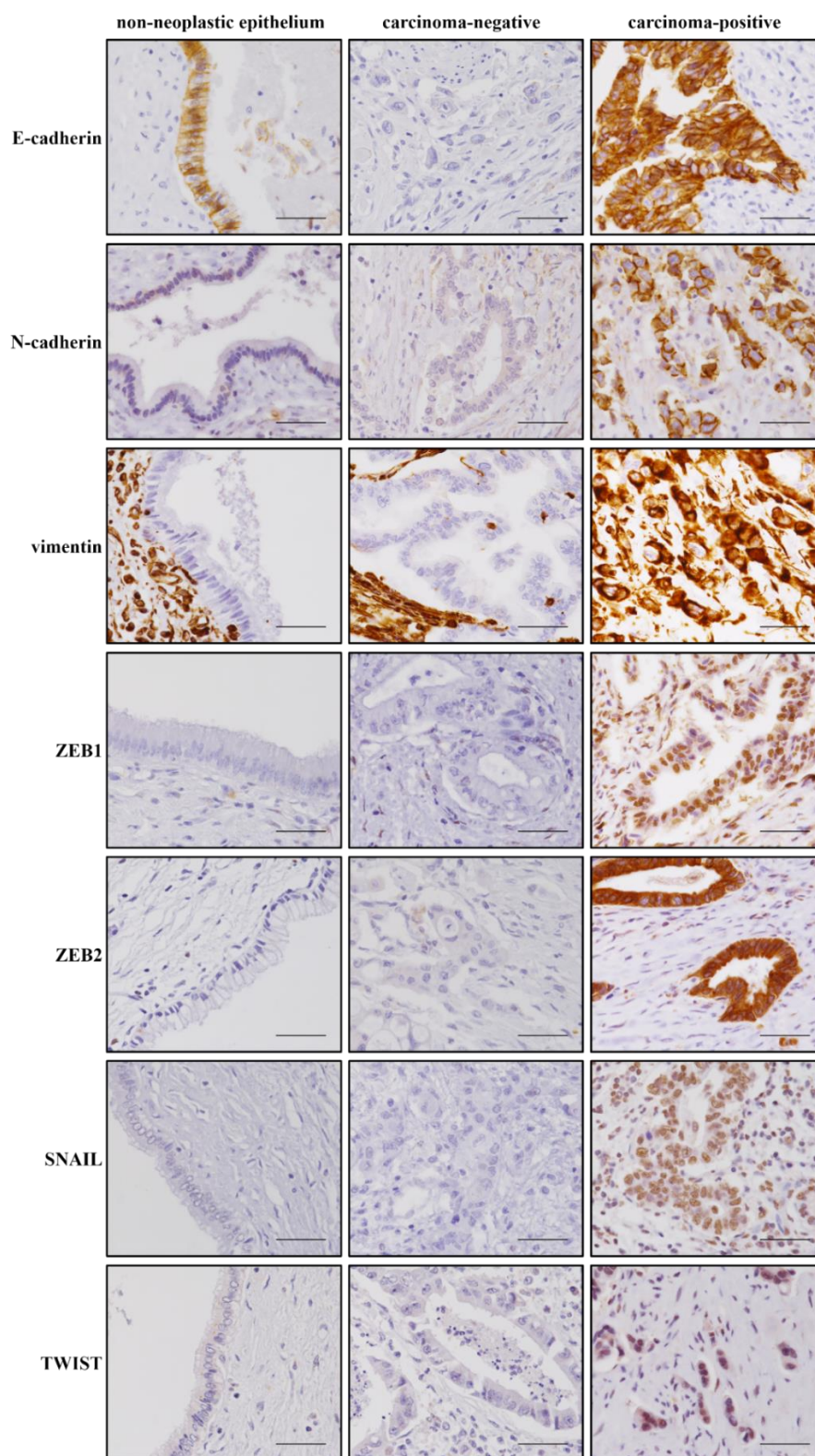


Figure.9 EMT 関連蛋白の代表的免疫組織化学染色像

E-cadherin, N-cadherin, vimentin, ZEB1, ZEB2, SNAIL, TWIST の非腫瘍上皮の染色像, 腫瘍細胞の陰性像と陽性像を示した (それぞれ異なる症例, スケール長は $50\mu\text{m}$).

Table.9 EMT と TILs や腫瘍細胞における PD-L1 発現との関連

		CD4 陽性 T リンパ球浸潤			CD8 陽性 T リンパ球浸潤		
		高浸潤	低浸潤	<i>p</i> 値	High 高浸潤	低浸潤	<i>p</i> 値
		(n=87)	(n=30)		(n=45)	(n=72)	
E-cadherin	高値	47 (54%)	12 (40%)	0.19	39 (54%)	20 (44%)	0.31
N-cadherin	高値	14 (16%)	6 (20%)	0.62	10 (14%)	10 (22%)	0.24
Vimentin	高値	6 (6.9%)	3 (10%)	0.58	6 (8.3%)	3 (6.7%)	0.74
ZEB1	高値	26 (30%)	10 (33%)	0.72	22 (31%)	14 (31%)	0.95
ZEB2	高値	53 (61%)	21 (70%)	0.37	48 (67%)	26 (58%)	0.33
SNAIL	高値	33 (38%)	19 (63%)	0.016	26 (36%)	26 (58%)	0.022
TWIST	高値	3 (3.5%)	1 (3.3%)	0.98	2 (2.8%)	2 (4.4%)	0.63

		Foxp3 陽性 T リンパ球浸潤			PD-L1 発現		
		高浸潤	低浸潤	<i>p</i> 値	高値	低値	<i>p</i> 値
		(n=5)	(n=112)		(n=10)	(n=107)	
E-cadherin	高値	1 (20%)	58 (52%)	0.16	0 (0.0%)	59 (55%)	0.001
N-cadherin	高値	2 (40%)	18 (16%)	0.16	4 (40%)	16 (15%)	0.044
Vimentin	高値	2 (40%)	7 (6.3%)	0.006	5 (50%)	4 (3.7%)	<0.001
ZEB1	高値	2 (40%)	34 (30%)	0.65	6 (60%)	30 (28%)	0.036
ZEB2	高値	2 (40%)	72 (64%)	0.27	6 (60%)	68 (64%)	0.82
SNAIL	高値	4 (80%)	48 (43%)	0.10	6 (60%)	46 (43%)	0.30
TWIST	高値	0 (0.0%)	4 (3.6%)	0.67	0 (0.0%)	4 (3.7%)	0.53

Table.10 TILs, 臨床病理学的因子と全生存率との関連

			生存率 (%)		単変量 解析	多変量解析		
			n	3 年 生存率	5 年 生存率	p 値	ハザード比(95%CI)	p 値
性別	男性	93	42	31	0.49			
	女性	24	33	17				
年齢, 歳	<71	58	39	25	0.57			
	≥71	59	42	32				
腫瘍径, cm	<3	88	42	32	0.10			
	≥3	29	36	18				
局在	肝門部	70	49	31	0.13			
	遠位	47	28	24				
組織型	pap + well	34	62	41	0.32	1.07 (0.66-1.78)		0.78
	mod + por	83	32	24				
動脈浸潤	陰性	112	42	30	0.89			
	陽性	5	20	20				
門脈浸潤	陰性	93	44	32	0.14			
	陽性	24	29	13				
リンパ管浸潤	陰性	35	51	31	0.57			
	陽性	82	36	27				
静脈浸潤	陰性	42	57	43	0.024	1.49 (0.94-2.39)		0.087
	陽性	75	31	20				
神経周囲浸潤	陰性	15	47	27	0.49			
	陽性	102	40	29				
pT	1+2	63	49	36	0.031	1.50 (0.96-2.33)		0.076
	3+4	54	30	19				
pN	0	63	54	38	0.001	1.49 (0.93-2.38)		0.099
	1	54	25	17				
pM	0	115	42	30	0.001	4.62 (0.66-20.0)		0.11
	1	2	0	0				
CD4 陽性 T リンパ球浸潤	低浸潤	30	14	14	0.009	0.61 (0.38-1.00)		0.049
	高浸潤	87	49	33				

CD8 陽性 T リンパ球浸潤	低浸潤	45	30	21	0.18		
	高浸潤	72	47	33			
Foxp3 陽性 T リンパ球浸潤	低浸潤	112	42	30	0.10		
	高浸潤	5	0	0			
PD-L1 発現	低値	107	45	32	<0.001	4.27 (1.82-9.39)	0.001
	高値	10	0	0			
E-cadherin 発現	低値	58	32	19	0.033	0.71 (0.45-1.12)	0.14
	高値	59	49	37			
N-cadherin 発現	低値	97	47	32	0.002	2.20 (1.18-3.92)	0.015
	高値	20	10	10			
Vimentin 発現	低値	108	44	31	0.024	0.80 (0.30-1.93)	0.63
	高値	9	11	11			

【考察】

近年、癌治療において外科的治療、化学療法、放射線療法に加えて、免疫療法が注目されている。中でも ICI は悪性黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌を対象とした検討で 18~28%の奏効率と長期にわたる腫瘍縮小例が報告されている(Topalian et al., 2012)。しかし、これらの固形癌患者においては ICI の治療効果は限定的であり、治療効果を予測するバイオマーカーとして、PD-L1, PD-1, CTLA-4 などの免疫チェックポイント分子が検討されている(Goeppert et al., 2013; Lim et al., 2017; Teng et al., 2015)。Le ら(Le et al., 2015)は胆管癌もミスマッチ修復不全に起因する体細胞変異を有しており、ICI の治療効果が高いことを報告している。近年これらの因子に加えて、腫瘍細胞における PD-L1 発現と TILs とのバランスが、ICI に対する治療効果に重要であることが報告されている(Teng et al., 2015)。また、EMT も腫瘍細胞における PD-L1 の発現を調節しているため、間葉表現型が ICI 奏効のバイオマーカーである可能性が示唆されている。しかし、eCCA に関しては腫瘍細胞における PD-L1 発現に関する検討自体が少ない。

今回、まず eCCA の外科的切除標本で、腫瘍細胞における PD-L1 発現の免疫組織化学的分析を行い、その 1 次抗体、評価方法、カットオフ値の検討を行った。次に、TILs, EMT 関連蛋白発現を含めた腫瘍細胞における PD-L1 発現と予後との関連性を検討した。さらに、EMT が腫瘍細胞における PD-L1 発現と関連性があるかどうかを検討した。

いくつかの癌腫において腫瘍細胞における PD-L1 発現は、予後不良因子であると報告されている(Konishi et al., 2004; Sabbatino et al., 2016; Takada et al., 2016)。しかし、eCCA では腫瘍細胞における PD-L1 発現と予後との関連性を検討した報告は少なく、使用している抗体、評価方法、カットオフ値は様々である(Lim et al., 2017; Tamai et al., 2014)。今回、腫瘍細胞における PD-L1 の免疫組織化学染色の 1 次抗体、評価方法、カットオフ値を検討するために、自施設における大規模なデータベースで、臨床的に使用可能な 2 種類のモノクローナル抗体と、それぞれ 5 種類ずつのカットオフ値を用いて、腫瘍細胞における PD-L1 の発現と予後との関連性を検討した。その結果、モノクローナル抗体は SP142 を使用し、H-score を用いた評価方法で、ROC 曲線を用いて設定したカットオフ値が、最も予後を反映していた。

今回の検討から、eCCA においても他癌種と同様に腫瘍細胞における PD-L1 の高発現は SP142 を使用し H-score による評価では予後不良因子であることが示された。今回使用した SP142 と E1L3N は類似した染色パターンを示したが、E1L3N においてはいずれのカットオフ値を使用した場合でも多変量解析にて高発現群と低発現群との間で予後に有意差を認めなかった。Mahoney ら(Mahoney et al., 2015)は PD-L1 に対する

抗体の感度が高いほど、PD-L1 を用いた細胞膜の染色の評価は不正確となる可能性を指摘している。今回、SP142 と比較すると E1L3N の陽性細胞数と H score はいずれも高く、E1L3N は SP142 よりも PD-L1 に対する抗体の感度が高い可能性が考えられた。PD-L1 の細胞膜への感度の差により、SP142 は E1L3N よりも細胞膜への染色を正確に評価でき、より予後を反映した結果が得られた可能性がある。

今回の検討では、eCCA における CD4 陽性 T リンパ球の高浸潤は独立した予後良好因子であることが示された。CD4 陽性 T リンパ球は、抗原提示、共刺激、T 細胞ホーミング、T 細胞の活性化、エフェクター機能、記憶構築といった働きを有しており、CD8 陽性 T リンパ球よりも腫瘍制御に関連する免疫系を誘導するとされている (Melssen and Slingluff, 2017; Song et al., 2014)。過去の報告においても、CD4 陽性 T リンパ球浸潤は予後良好因子とされており (Fukunaga et al., 2004; Galon et al., 2006; Goeppert et al., 2013; Mahmoud et al., 2011; Waldner et al., 2006; Zhang et al., 2003)、今回の検討においても腫瘍細胞における PD-L1 発現を含めた多変量解析により同様の結果が示された。CD4 陽性 T リンパ球に関して、Tran らはネオ抗原 (mutated ERBB2IP) に特異的な CD4 陽性 T リンパ球の輸注により長期にわたり転移性胆管癌に対して著効を呈し、腫瘍進行後でも再治療により腫瘍を再度縮小させたことを報告した (Tran et al., 2014)。eCCA においても CD4 陽性 T リンパ球の低浸潤症例は予後不良であることから、このような治療の対象群としての可能性が示唆された。

今回の検討では、eCCA の腫瘍細胞の PD-L1 発現と TILs には関連性を認めなかった。一方で、iCCA では、CD8 陽性 T リンパ球の浸潤と PD-L1 の発現とは逆相関を示し、この結果は、腫瘍細胞の PD-L1 発現が CD8 陽性 T リンパ球浸潤の抑制調節因子として作用しているという仮説を支持している (Ye et al., 2009)。eCCA と iCCA は临床上、胆道癌として一緒に言及されることが多いが、TILs の観点からは、eCCA と iCCA との間に腫瘍免疫系に差異があると報告されている (Goeppert et al., 2013)。今回の検討においても同様に、eCCA と iCCA の腫瘍微小環境における TILs の働きが異なることが示唆された。

以上のように、eCCA の腫瘍微小環境において腫瘍細胞における PD-L1 発現と TILs は、予後予測のバイオマーカーとして重要な役割を果たしていることが示された。Teng ら (Teng et al., 2015) は腫瘍細胞における PD-L1 発現と TILs の多寡に基づいて 4 群に分類し、このバランスが ICI の治療効果を予測するのに重要であることを報告している。腫瘍免疫に関連する腫瘍微小環境の因子は他にも様々あり、Sabbatino ら (Sabbatino et al., 2016) は腫瘍細胞の HLA class I の発現にも注目し、iCCA において HLA class I の高発現群は予後良好であったことを報告している。また、Goeppert ら (Goeppert et al., 2015) も胆道癌において、HLA class I 高発現群は全生存率が高く、

HLA class I 発現と TILs は関連することを報告している．これらの報告から，PD-L1 発現の予後検討の際には，腫瘍細胞の PD-L1 発現だけに注目するのではなく，腫瘍微小環境における様々な因子を含めた総合的な検討が必要である．

今回の検討では，腫瘍細胞における PD-L1 発現は，間葉表現型を反映する E-cadherin の低発現，N-cadherin と vimentin の高発現と関連しており，さらに EMT を誘導する ZEB1 という転写因子の高発現と関連していた．一般的に腫瘍細胞における PD-L1 の発現メカニズムは 2 つあるとされる．1 つ目は遺伝子の置換や変異により PD-L1 が強制的に発現する状態であり，2 つ目は腫瘍内の活性化 T 細胞から産生される INF などの炎症性シグナルにより PD-L1 が発現する状態である (Green et al., 2010; Pardoll, 2012)．近年，これらのメカニズムに加えて，EMT が腫瘍細胞における PD-L1 の発現に関与している可能性が報告されている (Chen et al., 2014)．EMT は腫瘍の移動や浸潤に関与するだけでなく，免疫抑制にも関与している (Thiery et al., 2009)．EMT による PD-L1 発現の機序として，Chen ら (Chen et al., 2014) は PD-L1 は間葉系表現型の転写因子である ZEB1 の下流の標的蛋白であると報告している．また，EMT により誘導される腫瘍細胞における PD-L1 発現のシグナル伝達経路としては，PI3K/Akt が重要な経路であると報告されている (Alsuliman et al., 2015; Mutlu et al., 2016)．さらに胆道癌の全エキソームおよびトランスクリプトームシーケンスによる検討では，PI3K をコードする PIK3CA などの高頻度の突然変異を有するサブグループが，PD-L1 を含む免疫チェックポイント分子の発現と相関していることを示されている (Nakamura et al., 2015)．これらの報告では，間葉表現型の症例群が ICI の有用な治療対象になり得ると示唆している (Alsuliman et al., 2015; Kim et al., 2016a; Mak et al., 2016; Ock et al., 2016; Shimoji et al., 2016)．本検討において，検索し得る限りでは，eCCA における腫瘍細胞の PD-L1 発現と EMT との関連性が初めて示された．今回の検討から，eCCA においても腫瘍細胞における PD-L1 発現が EMT により調節されている可能性が示唆された．また，腫瘍細胞における PD-L1 の発現だけではなく，TILs も EMT の転写因子である SNAIL の発現と関連していた．SNAIL は腫瘍浸潤の促進だけでなく，免疫抑制性サイトカイン・調節性 T 細胞 (regulatory T cells ; Treg)・樹状細胞の障害，細胞傷害性 T リンパ球耐性などの免疫抑制を介して癌転移を促進するとされている (Kudo-Saito et al., 2009)．今回，eCCA でも腫瘍局所環境の TILs が EMT により調整される可能性があることが示唆された．

今後の研究課題としては，TMA による免疫組織化学染色の評価が，腫瘍が heterogeneity のために全体の評価を反映していない可能性である．今回腫瘍浸潤部における CD4 陽性 TILs は腫瘍中心部における TILs よりも生存率と有意に関連していることが示された．肺癌と乳癌の報告では，間質への CD4 陽性 T 細胞の高浸潤が癌

細胞巢への T 細胞の浸潤よりも良好な予後を示した．間質における CD4 陽性 TILs は IL-2 などのサイトカインを分泌し樹状細胞を含む抗原提示細胞を活性化させることにより，腫瘍免疫の開始と維持に重要であると報告している (Matsumoto et al., 2016; Wakabayashi et al., 2003)．これらの報告は TILs の検討の際には，浸潤の局在により，臨床的意義が異なることを示している．この問題も含めて組織の *heterogeneity* を解決するためには *whole section* を用いたさらなる検討を行うべきである．また，本研究では腫瘍細胞の PD-L1 発現と TILs との関連に焦点を当てたが，腫瘍細胞における HLA class I の発現や TILs の PD-1 や CTLA-4 などの発現については検討していない．腫瘍微小環境における評価を行う際には様々な因子のバランスも重要であり，他の免疫チェックポイント分子の発現も含めた総合的な研究が必要である．また，今回予後検討を行い，予後不良群に対する治療介入の可能性を検討したが，実際に腫瘍細胞における PD-L1 発現や間葉表現型が ICI の治療予測のバイオマーカーとなりうるかは，今後大規模な臨床試験によりエビデンスの確立が望まれる．

【総括および結論】

①本研究から得られた新知見

- ・腫瘍細胞における PD-L1 発現の免疫組織化学染色の検討では，モノクローナル抗体は SP142 を使用し，H-score を用いた評価方法で，ROC 曲線を用いて設定したカットオフ値が，最も予後を反映していた．
- ・全生存率の多変量解析では，腫瘍細胞における PD-L1 高発現群や CD4 陽性 TILs 低浸潤群は予後不良因子であった．
- ・腫瘍細胞における PD-L1 高発現は，間葉表現型の E-cadherin の低発現，N-cadherin と vimentin の高発現と関連していた．また PD-L1 高発現は EMT を誘導する ZEB1 という転写因子の高発現とも関連していた．

②新知見の意義

これまでの eCCA における PD-L1 発現の免疫組織化学染色に関する検討では，使用する抗体，評価方法，カットオフ値が様々であり，一定していなかった．本検討の結果は eCCA における PD-L1 の免疫組織化学染色の標準化へ向けて重要な知見である．

他癌腫においては腫瘍細胞の PD-L1 高発現群は予後不良因子として報告されていることが多いが，eCCA においては PD-L1 発現と予後との関連は一定の見解が得られていない．eCCA における腫瘍微小環境は，腫瘍細胞における PD-L1 の発現，TILs といった複雑なバランスから構成される．SP142 を使用し H-score による評価を行い，これらの因子を含めた多変量解析を行い，腫瘍細胞における PD-L1 高発現は，eCCA における独立した予後不良因子であることが示された．この知見は，eCCA においても腫瘍細胞における PD-L1 発現が予後を予測するバイオマーカーである可能性が示唆される結果であった．

他癌腫において EMT が PD-L1 発現機序に関与していると報告されている．今回 eCCA においても PD-L1 高発現と間葉表現型の蛋白の高発現と関連性が得られた．この知見は，eCCA においても間葉表現型が PD-L1 の発現機序に関連することを示唆するだけではなく，間葉表現型が ICI の効果予測のバイオマーカーになりうる可能性も示唆する結果であった．

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

今回，SP142 を使用し H-score による評価を行うことで，腫瘍細胞における PD-L1 発現は予後を予測するバイオマーカーであることが示唆された．さらに，腫瘍細胞の PD-L1 発現が ICI の効果を予測するバイオマーカーであるかどうかを検討するために

は、腫瘍細胞の PD-L1 発現と ICI の治療効果との関連性を検討する研究が必要である。また、間葉表現型である症例群が ICI の効果を予測するかどうかを検討するためには、腫瘍細胞における EMT の状態と ICI の治療効果との関連性を検討する研究が必要である。

④今後の課題

近年、多くの癌腫において ICI の臨床効果が確認され、適応が拡大している。しかし ICI の奏効率自体は限定的であり、治療効果を予測するバイオマーカーの探索が課題となっている。今回検討した TILs や EMT だけではなく、腫瘍微小環境に関わる多くの因子を総合的に検討していくことが重要である。

【謝辞】

本研究の機会を与えて頂いた，北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授，ならびに医学研究院 分子診断病理学教室 松野吉宏 教授に深く感謝致します．

また，本研究において直接ご指導頂いた北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 土川貴裕 講師，医学研究 分子診断病理学教室 三橋智子 准教授，ならびに北海道大学病院 コンパニオン診断研究部門 畑中 豊 特任講師に心から感謝申し上げます．

最後に，本研究を支えてくださった，消化器外科学教室Ⅱ，分子診断病理学教室，ならびに病理診断科・病理部の全ての皆様に心より御礼を申し上げます．

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はありません.

【引用文献】

- Alsuliman, A., Colak, D., Al-Harazi, O., Fitwi, H., Tulbah, A., Al-Tweigeri, T., Al-Alwan, M., and Ghebeh, H. (2015). Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol. Cancer* 14, 149.
- Blechacz, B., Komuta, M., Roskams, T., and Gores, G.J. (2011). Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 512-522.
- Chen, L., Gibbons, D.L., Goswami, S., Cortez, M.A., Ahn, Y.H., Byers, L.A., Zhang, X., Yi, X., Dwyer, D., Lin, W., *et al.* (2014). Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat. Commun.* 5, 5241.
- DeOliveira, M.L., Cunningham, S.C., Cameron, J.L., Kamangar, F., Winter, J.M., Lillemoe, K.D., Choti, M.A., Yeo, C.J., and Schulick, R.D. (2007). Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann. Surg.* 245, 755-762.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793-800.
- Fontugne, J., Augustin, J., Pujals, A., Compagnon, P., Rousseau, B., Luciani, A., Tournigand, C., Cherqui, D., Azoulay, D., Pawlotsky, J.M., *et al.* (2017). PD-L1 expression in perihilar and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 8, 24644-24651.
- Fukunaga, A., Miyamoto, M., Cho, Y., Murakami, S., Kawarada, Y., Oshikiri, T., Kato, K., Kurokawa, T., Suzuoki, M., Nakakubo, Y., *et al.* (2004). CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28, e26-31.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-

1964.

Goeppert, B., Frauenschuh, L., Zucknick, M., Roessler, S., Mehrabi, A., Hafezi, M., Stenzinger, A., Warth, A., Pathil, A., Renner, M., *et al.* (2015). Major histocompatibility complex class I expression impacts on patient survival and type and density of immune cells in biliary tract cancer. *Br. J. Cancer* *113*, 1343-1349.

Goeppert, B., Frauenschuh, L., Zucknick, M., Stenzinger, A., Andrulis, M., Klauschen, F., Joehrens, K., Warth, A., Renner, M., Mehrabi, A., *et al.* (2013). Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *Br. J. Cancer* *109*, 2665-2674.

Green, M.R., Monti, S., Rodig, S.J., Juszczynski, P., Currie, T., O'Donnell, E., Chapuy, B., Takeyama, K., Neuberg, D., Golub, T.R., *et al.* (2010). Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* *116*, 3268-3277.

Igarashi, T., Teramoto, K., Ishida, M., Hanaoka, J., and Daigo, Y. (2016). Scoring of PD-L1 expression intensity on pulmonary adenocarcinomas and the correlations with clinicopathological factors. *ESMO Open* *1*, e000083.

Kato, A., Shimizu, H., Ohtsuka, M., Yoshitomi, H., Furukawa, K., Takayashiki, T., Nakadai, E., Kishimoto, T., Nakatani, Y., Yoshidome, H., *et al.* (2015). Downsizing Chemotherapy for Initially Unresectable Locally Advanced Biliary Tract Cancer Patients Treated with Gemcitabine Plus Cisplatin Combination Therapy Followed by Radical Surgery. *Ann. Surg. Oncol.* *22 Suppl 3*, S1093-1099.

Katsuya, Y., Fujita, Y., Horinouchi, H., Ohe, Y., Watanabe, S., and Tsuta, K. (2015). Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma. *Lung Cancer* *88*, 154-159.

Kim, R., Coppola, D., Wang, E., Chang, Y.D., Kim, Y., Anaya, D., and Kim, D.W. (2018). Prognostic value of CD8CD45RO tumor infiltrating lymphocytes in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* *9*, 23366-23372.

Kim, S., Koh, J., Kim, M.Y., Kwon, D., Go, H., Kim, Y.A., Jeon, Y.K., and Chung, D.H. (2016a). PD-L1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung. *Hum. Pathol.* 58, 7-14.

Kim, W.Y., Jung, H.Y., Nam, S.J., Kim, T.M., Heo, D.S., Kim, C.W., and Jeon, Y.K. (2016b). Expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in advanced stage EBV-associated extranodal NK/T cell lymphoma is associated with better prognosis. *Virchows Archiv* 469, 581-590.

Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., and Nishimura, M. (2004). B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin. Cancer Res.* 10, 5094-5100.

Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., and Kawakami, Y. (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 15, 195-206.

Lazaridis, K.N., and Gores, G.J. (2005). Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 128, 1655-1667.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., *et al.* (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Eng. J. Med.* 372, 2509-2520.

Lim, Y.J., Koh, J., Kim, K., Chie, E.K., Kim, B., Lee, K.B., Jang, J.Y., Kim, S.W., Oh, D.Y., Bang, Y.J., *et al.* (2015). High ratio of programmed cell death protein 1 (PD-1)(+)/CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes identifies a poor prognostic subset of extrahepatic bile duct cancer undergoing surgery plus adjuvant chemoradiotherapy. *Radiother. Oncol.* 117, 165-170.

Lim, Y.J., Koh, J., Kim, K., Chie, E.K., Kim, S., Lee, K.B., Jang, J.Y., Kim, S.W., Oh, D.Y., and Bang, Y.J. (2017). Clinical Implications of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Expression on Tumor Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Extrahepatic Bile Duct Cancer Patients Undergoing Surgery Plus Adjuvant Chemoradiotherapy. *Target Oncol.* 12, 211-218.

Ma, K., Wei, X., Dong, D., Wu, Y., Geng, Q., and Li, E. (2017). PD-L1 and PD-1 expression correlate with prognosis in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol. Lett.* 14, 250-256.

Mahmoud, S.M., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1949-1955.

Mahoney, K.M., Sun, H., Liao, X., Hua, P., Callea, M., Greenfield, E.A., Hodi, F.S., Sharpe, A.H., Signoretti, S., Rodig, S.J., *et al.* (2015). PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells. *Cancer Immunol. Res.* 3, 1308-1315.

Mak, M.P., Tong, P., Diao, L., Cardnell, R.J., Gibbons, D.L., William, W.N., Skoulidis, F., Parra, E.R., Rodriguez-Canales, J., Wistuba, II, *et al.* (2016). A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin. Cancer Res.* 22, 609-620.

Matsumoto, H., Thike, A.A., Li, H., Yeong, J., Koo, S.L., Dent, R.A., Tan, P.H., and Iqbal, J. (2016). Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 156, 237-247.

Melssen, M., and Slingluff, C.L., Jr. (2017). Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 47, 85-92.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16-25.

Mutlu, M., Raza, U., Saatci, O., Eyupoglu, E., Yurdusev, E., and Sahin, O. (2016). miR-200c: a versatile watchdog in cancer progression, EMT, and drug resistance. *J. Mol. Med. (Berl)* 94, 629-644.

Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shirota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., *et al.* (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat. Genet.*

47, 1003-1010.

Nitta, T., Mitsuhashi, T., Hatanaka, Y., Miyamoto, M., Oba, K., Tsuchikawa, T., Suzuki, Y., Hatanaka, K.C., Hirano, S., and Matsuno, Y. (2014). Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition-related markers in extrahepatic cholangiocarcinoma: comprehensive immunohistochemical study using a tissue microarray. *Br. J. Cancer* *111*, 1363-1372.

Ock, C.Y., Kim, S., Keam, B., Kim, M., Kim, T.M., Kim, J.H., Jeon, Y.K., Lee, J.S., Kwon, S.K., Hah, J.H., *et al.* (2016). PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *7*, 15901-15914.

Okusaka, T., Ishii, H., Funakoshi, A., Yamao, K., Ohkawa, S., Saito, S., Saito, H., and Tsuyuguchi, T. (2006). Phase II study of single-agent gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *57*, 647-653.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252-264.

Penz, M., Kornek, G.V., Raderer, M., Ulrich-Pur, H., Fiebiger, W., Lenauer, A., Depisch, D., Krauss, G., Schneeweiss, B., and Scheithauer, W. (2001). Phase II trial of two-weekly gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Ann. Oncol.* *12*, 183-186.

Raderer, M., Hejna, M.H., Valencak, J.B., Kornek, G.V., Weinlander, G.S., Bareck, E., Lenauer, J., Brodowicz, T., Lang, F., and Scheithauer, W. (1999). Two consecutive phase II studies of 5-fluorouracil/leucovorin/mitomycin C and of gemcitabine in patients with advanced biliary cancer. *Oncology* *56*, 177-180.

Sabbatino, F., Villani, V., Yearley, J.H., Deshpande, V., Cai, L., Konstantinidis, I.T., Moon, C., Nota, S., Wang, Y., Al-Sukaini, A., *et al.* (2016). PD-L1 and HLA Class I Antigen Expression and Clinical Course of the Disease in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* *22*, 470-478.

Sangkhamanon, S., Jongpairat, P., Sookprasert, A., Wirasorn, K., Titapun, A., Pugkhem, A., Ungareevittaya, P., and Chindaprasirt, J. (2017). Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1)

Expression Associated with a High Neutrophil/Lymphocyte Ratio in Cholangiocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 18, 1671-1674.

Sato, Y., Kinoshita, M., Takemura, S., Tanaka, S., Hamano, G., Nakamori, S., Fujikawa, M., Sugawara, Y., Yamamoto, T., Arimoto, A., *et al.* (2017). The PD-1/PD-L1 axis may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. *Pathol. Int.* 67, 163-170.

Shimoji, M., Shimizu, S., Sato, K., Suda, K., Kobayashi, Y., Tomizawa, K., Takemoto, T., and Mitsudomi, T. (2016). Clinical and pathologic features of lung cancer expressing programmed cell death ligand 1 (PD-L1). *Lung cancer* 98, 69-75.

Sobin LH, G.M., Wittekind Ch (2009). *TNM Classification of Malignant Tumours* 7th edn. Wiley-Blackwell: Oxford, pp 122–128.

Song, L., Yang, M.C., Knoff, J., Wu, T.C., and Hung, C.F. (2014). Cancer immunotherapy employing an innovative strategy to enhance CD4⁺ T cell help in the tumor microenvironment. *PloS One* 9, e115711.

Takada, K., Okamoto, T., Shoji, F., Shimokawa, M., Akamine, T., Takamori, S., Katsura, M., Suzuki, Y., Fujishita, T., Toyokawa, G., *et al.* (2016). Clinical Significance of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Primary Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1879-1890.

Tamai, K., Nakamura, M., Mizuma, M., Mochizuki, M., Yokoyama, M., Endo, H., Yamaguchi, K., Nakagawa, T., Shiina, M., Unno, M., *et al.* (2014). Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 105, 667-674.

Teng, M.W., Ngiow, S.F., Ribas, A., and Smyth, M.J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 75, 2139-2145.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2015). Immune checkpoint blockade: a

common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell* 27, 450-461.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., *et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443-2454.

Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P.F., Lu, Y.C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Somerville, R.P., Hogan, K., Hinrichs, C.S., *et al.* (2014). Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 344, 641-645.

Uruga, H., Bozkurtlar, E., Huynh, T.G., Muzikansky, A., Goto, Y., Gomez-Caraballo, M., Hata, A.N., Gainor, J.F., Mark, E.J., Engelman, J.A., *et al.* (2016). Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases. *J. Thorac. Oncol.* 3, 458-466

van der Gaag, N.A., Kloek, J.J., de Bakker, J.K., Musters, B., Geskus, R.B., Busch, O.R., Bosma, A., Gouma, D.J., and van Gulik, T.M. (2012). Survival analysis and prognostic nomogram for patients undergoing resection of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Oncol.* 10, 2642-2649.

Wakabayashi, O., Yamazaki, K., Oizumi, S., Hommura, F., Kinoshita, I., Ogura, S., Dosaka-Akita, H., and Nishimura, M. (2003). CD4⁺ T cells in cancer stroma, not CD8⁺ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*, 94, 1003-1009.

Waldner, M., Schimanski, C.C., and Neurath, M.F. (2006). Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J. Gastroenterol.* 12, 7233-7238.

Walter, D., Herrmann, E., Schnitzbauer, A.A., Zeuzem, S., Hansmann, M.L., Peveling-Oberhag, J., and Hartmann, S. (2017). PD-L1 expression in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 71, 383-392.

Xu, W., Yang, Z., and Lu, N. (2015). A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adh. Migr.* 9, 317-324.

Ye, Y., Zhou, L., Xie, X., Jiang, G., Xie, H., and Zheng, S. (2009). Interaction of B7-H1 on intrahepatic cholangiocarcinoma cells with PD-1 on tumor-infiltrating T cells as a mechanism of immune evasion. *J. Surg. Oncol.* *100*, 500-504.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., *et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* *348*, 203-213.

Zlobec, I., Lugli, A., Baker, K., Roth, S., Minoo, P., Hayashi, S., Terracciano, L., and Jass, J.R. (2007). Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J. Pathol.* *212*, 260-268.