



Title	腫瘍浸潤リンパ球の局在に注目した肝内胆管癌の臨床病理学的検討
Author(s)	旭, 火華
Description	配架番号 : 2501
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14039号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14039
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91658
Type	doctoral thesis
File Information	Yoh_Asahi.pdf



学位論文

腫瘍浸潤リンパ球の局在に注目した

肝内胆管癌の臨床病理学的検討

(Research on clinicopathological data including CD8+ T
cell distribution of intrahepatic cholangiocarcinoma)

2020年3月

北海道大学

旭 火華

学位論文

腫瘍浸潤リンパ球の局在に注目した

肝内胆管癌の臨床病理学的検討

(Research on clinicopathological data including CD8+ T
cell distribution of intrahepatic cholangiocarcinoma)

2020年3月

北海道大学

旭 火華

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	5 頁
緒言	6 頁
方法	9 頁
結果	17 頁
考察	27 頁
結論	31 頁
謝辞	33 頁
利益相反	34 頁
引用文献	35 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アクセプトされた。

1. Yoh Asahi, Kanako C Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Toshiya Kamiyama, Tatsuya Orimo, Shingo Shimada, Akihisa Nagatsu, Yuzuru Sakamoto, Hirofumi Kamachi, Nozomi Kobayashi, Moto Fukai, Akinobu Taketomi
Prognostic impact of CD8+ T cell distribution and its association with HLA class I expression in intrahepatic cholangiocarcinoma
Surgery Today に掲載予定

本研究については現段階では学会の発表を行っていない

要旨

【背景と目的】

肝内胆管癌の切除後再発率は 70%を超え、5 年生存率においては 30-40%程度と予後不良の疾患である。予後が不良である原因としては、切除可能率が低いことと、再発率が高いことがあるが、その他に手術以外に有効な治療法が存在しないことが挙げられる。これまで有効性が示された切除不能肝内胆管癌に対する化学療法はゲムシタビン+シスプラチンのみだが、その予後延長効果は必ずしも高くなく、さらにセカンドライン以後で有効性を示された全身薬物療法は存在しない。近年、新たな全身薬物療法として免疫チェックポイント阻害剤が開発された。実臨床の場でも様々な悪性腫瘍に対して PD-1/PD-L1 および CTLA-4 をターゲットとした薬剤の使用が開始され、肝内胆管癌においてもその効果が期待されている。腫瘍免疫において、エフェクターとして作用する CD8+T 細胞が腫瘍により抑制されているが、免疫チェックポイント阻害剤はこの抑制を解除することで CD8+T 細胞の抗腫瘍効果を活性化する。このように腫瘍免疫において重要な役割を持つ CD8+T 細胞であるが、肝内胆管癌における免疫チェックポイントと CD8+T 細胞の解析は十分に成されていない。よって、北海道大学病院 消化器外科 I における肝内胆管癌手術症例を対象として肝内胆管癌における免疫チェックポイントを担う分子と CD8+T 細胞の解析を行うこととした。

【対象と方法】

1997 年から 2013 年までの間に北海道大学病院 消化器外科 I にて手術を行った肝内胆管癌のうち、病理学的検討可能であった 69 症例を対象とし、その臨床病理学的データ（年齢、性別、背景肝、HBV/HCV の感染、CA19-9、腫瘍最大径、腫瘍個数、腫瘍分化度、リンパ節転移、肝切除方法、脈管浸潤、Stage、治癒度、OS）を後ろ向きに調査した。臨床病理学的項目をそれぞれの項目で 2 群に分類した。また、対象症例の代表的部位の病理検体にて免疫組織化学染色（CD8、Foxp3、CD163、PD-1、PD-L1、PD-L2、HLA class I）を行った。免疫組織化学的検討では、腫瘍の領域を外縁、内縁、中心の三領域に分類し、それぞれの領域で CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージ数を計測した。それぞれの領域の CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージについても ROC を用いて low 群と high 群に分類し、解析を行った。また、PD-1、PD-L1、PD-L2、HLA class I の発現についても low 群と high 群に分類し、解析を行った。

【結果】

臨床病理学的データの 2 群間の 5 年 OS の比較で有意差を認めた項目は、CA19-9 の $37 <$ 群と $37 \geq$ 群 ($p=0.0370$)、腫瘍個数の St 群と Mt 群 ($p < 0.0001$)、リンパ節転移の-群と+群 ($p=0.0253$)、脈管浸潤の-群と+群 ($p=0.0108$)、Stage の II or III 群と IV 群 ($p=0.0001$)、治癒度の A or B 群と C 群 ($p=0.0035$)であった。

各領域の細胞カウント数の low 群と high 群間の 5 年生 OS の比較では外縁の CD8+T 細胞で low 群 (24.7%) と high 群 (45.5%) 間に有意差をみとめた ($p=0.0103$)。その他の領域の CD8+T 細胞およびに全領域の Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージでは有意差を認めなかった。PD-L1、PD-1、HLA class I については high 群がそれぞれ 18 症例 (26.1%)、10 症例 (14.5%)、59 症例 (85.5%) であった。また、PD-L1、PD-1、HLA class I の low 群と high 群のそれぞれの 5 年 OS 間に有意差は認められなかった。腫瘍外縁領域における CD8+T 細胞 low 群では腫瘍径 5 cm 未満:5 cm 以上がそれぞれ 7 例、19 例で high 群ではそれぞれ 22 例、21 例 ($p=0.0481$)であった。腫瘍外縁領域における CD8+T 細胞 low 群では HLA class I の発現 low 群、high 群がそれぞれ 7 症例、19 症例で CD8+T 細胞 low 群では HLA class I の発現 low 群、high 群がそれぞれ 3 症例、40 症例 ($p=0.0341$) であった。PD-L2 については high 症例が 1 例のみであったため、他の解析からは除外した。

【考察】

臨床病理学的データの解析から本研究における対象症例の OS に関わる因子が CA19-9、腫瘍個数、リンパ節転移の有無、脈管浸潤の有無、Stage、治癒度であることが示された。これらの因子は肝内胆管癌において一般的に予後因子になると考えられており、本研究の対象が肝内胆管癌の研究の集団として適していることを示している。腫瘍三領域の CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージの中で外縁の CD8+T 細胞数のみが肝内胆管癌の OS に、正の相関を認めており、外縁の CD8+T 細胞が腫瘍の進展の抑制に関与している可能性が示された。

また、外縁領域の CD8+T 細胞数について、腫瘍径との間には負の相関を認め、CD8+T 細胞が腫瘍の進展を抑制し腫瘍の増大を妨げている可能性が考えられる。外縁領域の CD8+T 細胞数と HLA class I の発現との間には正の相関を認めた。腫瘍の HLA class I の発現が低下した結果 CD8+T 細胞数が少ないのか、CD8+T 細胞数が少ない結果 HLA class I の発現が低下しているのか、その両方なのかは解明されていない。PD-L1、HLA class I はそれぞれ単独では肝内胆管癌の予後とは相関していなかったが、これに関しては同様の報告が存在した。

【結論】

PD-L1、HLA class I はそれぞれ単独では肝内胆管癌の予後因子とはならなかった。肝内胆管癌において、腫瘍外縁の CD8+T 細胞数が予後因子となる可能性が示された。肝内胆管癌における腫瘍外縁の CD8+T 細胞数については HLA class I と正の相関を有し、腫瘍径とは負の相関を有することが示された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CT	computed tomography
ICC	intrahepatic cholangiocarcinoma
MMR	mismatch repair
MRI	magnetic resonance imaging
MSI-High	microsatellite instability-high
OS	overall survival
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed cell death 1 ligand 1
PD-L2	programmed cell death 1 ligand 2

緒言

肝内胆管癌は、肝細胞癌に次いで頻度が高い原発性肝癌として分類される (Khan et al. 2019; Kudo et al. 2016)。解剖学的には胆管肝内第二次分枝より末梢の胆管上皮から発生する悪性腫瘍と定義される。肝内胆管癌の頻度は世界的にも本邦においても増加傾向を示しているが、その原因は不明である (Ojima, 2010)。唯一の効果的な治療法は手術による腫瘍の摘出であるが、診断時点での切除可能な症例は 60%以下と少ない (Bektas et al. 2015; Weber et al. 2001)。更に、例え切除可能であったとしても切除後の再発率が 71-73.4% (Spolverato et al., 2016; Yoh et al., 2018; Zhang et al., 2018) と高く、術後の 5 年生存率は 31-42.2% (Bektas et al. 2015; Inoue et al. 2000; Orimo et al. 2018; Weber et al. 2001; DeOliveira et al. 2007) と予後不良である。再発率が高いため有効な術後補助化学療法の開発が望まれるが、現在のところ有効な術後補助療法の報告は存在しない。切除可能な症例が少ないことと、再発率が高いこと以外にも、手術以外の治療の選択肢が少ないことが肝内胆管癌の予後が不良な原因として挙げられる。現在、肝内胆管癌において、再発もしくは切除不能症例に対する全身薬物療法としてはゲムシタビンとシスプラチンの併用療法が標準療法とされている。これは II 相無作為試験である Advanced Biliary Cancer (ABC-02) トライアルにおいて中央生存期間がゲムシタビンとシスプラチン併用群が 11.7 ヶ月とゲムシタビン単剤群での 8.1 ヶ月と比較し延長を示したこと (Valle et al. 2010)、本邦で行われた II 相試験で中央生存期間がゲムシタビンとシスプラチン併用群で 11.2 ヶ月とゲムシタビン単剤 7.7 ヶ月と比較し延長を示したとの報告 (Okusaka et al. 2010) を根拠としている。しかし、数字から判断できるようにゲムシタビンとシスプラチンの併用療法の効果は長期間持続せず、予後の延長効果は限定的である。このようにファーストラインの全身化学療法の効果が不十分であることに加えて、有効なセカンドラインの化学療法の報告もなく、有効な分子標的薬の報告が存在しないことも (Bupathi et al. 2017) 肝内胆管癌の治療の選択肢が少ないことに影響を与えている。このように肝内胆管癌では新たな全身薬物療法が開発が望まれている状況となっており、近年使用が開始された免疫チェックポイント阻害剤の存在が注目されている。

腫瘍免疫においては、エフェクターとして抗腫瘍効果を発揮する CD8+T 細胞が腫瘍により抑制されている症例が存在することが報告されている。免疫チェックポイント阻害剤はこの CD8+T 細胞の抑制を解除し、CD8+T 細胞を活性化することにより抗腫瘍効果を発揮する。CD8+T 細胞が腫瘍領域に誘導される機序であるが、

まず無感作 T 細胞が骨髄で産生され、胸腺に移行し、胸腺でポジティブセレクションを通して CD8 を発現するに至る (Takada et al. 2015)。その後、CD8+T 細胞はリンパ節に輸送される。CD8+T 細胞は抗原提示細胞 (主に樹状細胞) から抗原を提示され、活性化し成熟された CD8+T 細胞となり、リンパ節を離れ標的組織へと移動し、標的組織が腫瘍であれば抗腫瘍効果を有するエフェクターとして作用する (Nolz, 2015)。肝内胆管癌において、腫瘍領域の CD8+T 細胞数と肝内胆管癌の予後との関連性は示されなかったが (Gu et al. 2012)、CD8+T 細胞数と予後の検証を行った報告は 1 件のみしか存在せず十分な検証は成されていないと考えられる。現在、免疫チェックポイント阻害剤の作用経路で最も深く研究されている経路の一つは PD-1 に関連する経路である。PD-1 のリガンドとしては PD-L1 (B7-H1, CD 274) (Freeman et al. 2000) と PD-L2 (B7-DC, CD273) (Latchman et al. 2001) が報告されており、前者が後者と比較し早い段階で報告されており、両者とも PD-1 を発現した T 細胞と結合することで T 細胞を抑制する。PD-1 は活性化 T 細胞以外にも、制御性 T 細胞、活性化 B 細胞、NK 細胞等に発現している。肝内胆管癌においては腫瘍領域の CD8+T 細胞数と PD-L1 の発現を比較した報告では CD8+T 細胞数と PD-L1 の発現には負の相関があるとの報告が 1 件存在する (Ye et al. 2009)。それとは逆に CD8+T 細胞数と PD-L1 の発現には関連がなかったとの報告も存在する (Sabbatino et al. 2016)。肝内胆管癌における CD8+T 細胞数と PD-L1 の発現についての報告はこの 2 件のみである。また、後者の報告では肝内胆管癌における CD8+T 細胞数と腫瘍の HLA class I の発現に正の関連があると報告されている (Sabbatino et al. 2016) が、肝内胆管癌における CD8+T 細胞数と HLA class I の発現についての報告はこの 1 件のみである。

肝内胆管癌における PD-L1 の発現については、17.7-30.9%に発現するとされているがその報告は少ない (Jing et al. 2019; Lu et al. 2019; Sabbatino et al. 2016; Zhu et al., 2018)。またその発現と肝内胆管癌の予後との関連については PD-L1 の発現症例で予後不良となるとの報告 (Gani et al. 2016; Lu et al. 2019)、予後良好となるとの報告 (Zhu et al. 2018)、更には予後と関連しないとの報告 (Jing et al. 2019) が存在し、一致した見解は得られていない。PD-L1 と CD8+T 細胞数の関連については PD-L1 の発現が腫瘍に浸潤した CD8+T 細胞と負の相関が存在したと報告されているが (Ye et al. 2009)、PD-L1 と CD8+T 細胞数の関連を示したとされる報告は 1 件のみである。2 種類存在する PD-1 のもう一方のリガンドである PD-L2 については、肝内胆管癌での発現を検討した報告は存在しない。

このように、肝内胆管癌における免疫チェックポイント阻害剤の効果が注目されて

いるにも関わらず、その際にエフェクターとなる CD8+T 細胞と肝内胆管癌との関係については十分な検討が成されていないのが現状である。当研究では肝内胆管癌の術後検体を用いて CD8 に加え、他の免疫担当細胞に発現する Foxp3、CD163、PD-1、さらには腫瘍細胞の PD-L1、PD-L2、HLA class I の免疫組織化学染色を行いその解析を行うことで CD8+T 細胞を含めた各種免疫担当細胞の分布および免疫チェックポイントを担う分子の発現と予後の関連について検討を行うことを目的とした。

方法

【症例】

1997年から2013年の間に当科では78症例の肝内胆管癌に対する肝切除を行った。そのうち、8例は手術検体の病理診断により混合性肝癌であったため除外した。残りの70例のうち、1例は保存された検体から研究にとって適切な検体が採取不能な状態であったため除外され、残りの69症例を対象とした。対象全体の臨床データを以下に示す。年齢の中央値は63歳(36-83)、性別は42例が男性、27例が女性であった。背景肝は正常肝が51例、その他(肝線維症、肝硬変、肝炎)の症例が18例であった。C型肝炎、B型肝炎に関しては18症例で少なくとも一方の現在の感染を含めた既往歴を認め、残りの51例では認めなかった。Carbohydrate antigen 19-9(CA19-9)に関しては4例で数値を確認できなかったが残りの65例での中央値が56 ng/ml(0-3612)、最大腫瘍径の中央値は5.3 cm(1.4-18.0)、腫瘍個数に関しては単発(St)が51例、多発(Mt)が18例であった。腫瘍の分化度はwellが10症例、modが30症例、porが29症例であった。リンパ節転移(pN)が1個以上認められた症例は29症例で、残りの40症例ではpNは認めなかった。肝切除については2区域切除(Hr2)以上の肝切除が58症例、残りの11症例でHr2未満の術式であった。脈管浸潤は15症例で認められ、54症例で認めなかった。肝内胆管癌の進行についてはStage Iが0症例、Stage IIが14症例、Stage IIIが16症例、Stage IVが39症例であった。手術による治癒度はAまたはBが48症例でCが21症例であった。各項目について、それぞれの項目内で2群への群分けを行った結果を表1に提示する。

表1 肝内胆管癌の臨床病理データ

項目	群	n
年齢	≤64	40
	65≤	29
性別	男性	42
	女性	27
背景肝	正常	51
	その他	18
HCV or/and HBV	-	51
	+	18

CA19-9 (U/ml)	<37	23
	37≤	41
	unknown	5
腫瘍径 (cm)	<5	29
	5≤	40
腫瘍個数	St	51
	Mt	18
腫瘍分化度	well or mod	40
	por	29
pN	-	40
	+	29
Liver resection	<Hr(2)	11
	Hr(2)≤	58
脈管浸潤	-	54
	+	15
Stage	2 or 3	30
	4	39
治癒度	A or B	48
	C	21

本研究は北海道大学病院倫理委員会に承認を得たプロトコールに基づき、過去の手術検体を用いることから、研究利用に対し包括同意を得た患者を対象とした。また、研究の遂行に当たり患者情報はすべて連結可能な状態で匿名化し、本研究の実施にあたっては医学系研究に関する倫理指針に従い、北海道大学病院の自主臨床研究倫理審査委員会の承諾を得た（承認番号: 015-0379）。

【周術期管理と手術方法】

術前、術後管理は以前の報告と同様に行われた（Kamiyama et al. 2010）。具体的には本研究の対象となる 69 症例の全症例が術前の精査で肝ダイナミック造影 CT 画像を施行している。ダイナミック造影 CT では動脈相、門脈相、平衡相の 3 相で腹部の撮像を行っているが、平衡相については更に胸部から骨盤までの撮像を行い、手術適応外となる遠隔転移等の存在を否定している。肝機能については採血、ICG 負荷試験 15 分値に加えて可能であれば Tc-GSA シンチグラフィー

(Kawamura et al. 2008) の結果から判断した。肝機能を評価後に Hokkaido University Algorithm for hepatic resection に従い、肝切除の術式を決定した。

肝切除については以前の報告と同様に行われた (Kamiyama et al. 2010) 。具体的には全身麻酔での手術とし、肝実質切離時には流入血遮断を連続 15 分以上、各血流遮断期間の間には 5 分以上の血流遮断解除の期間を設定した。肝実質切離時の器具は harmonic scalpel (Ethicon EndoSurgery, San Angelo, TX) 及びに/もしくは DS3.0 Dissecting Sealer (Medtronic, Minneapolis, MN) を使用した。術後経過観察目的の画像検査としては基本的には 3 ヶ月毎の造影 CT もしくは MRI 検査を行った。本研究における術後経過観察期間は術後 5 年間とした。69 症例中 7 症例が 5 年以内に経過観察から脱落したが、本研究にはこの 7 例も含めて検討した。

【免疫組織化学法】

手術検体のパラフィン包埋ブロックを 5 μ m に薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン化し水洗後に、EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (Dako, pH9.0) もしくは LOW pH (Dako, pH6.1) の溶液中を用いて抗原賦活化処理装置 (PTLink, Dako) を使用して 95°C で 20 分間加熱することで抗原を賦活化した。その後、Dako peroxidase blocking solution によりブロッキングを行い、各抗体 (表 2) を一定の濃度で、30 分間室温下で浸し、ポリマー法 (En vision flex system for mouse monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibody ; Dako, and simple stain system for goat polyclonal antibody; Nichirei, Tokyo, Japan) にて抗原を検出した。免疫組織化学染色には、自動免疫染色装置 (Autostainer plus, Dako) を使用した。

表 2 各種抗体の染色設定

抗体	メーカー	クローン	賦活化 (PT LINK)	希釈倍率
CD8	Dako	C8/144B	High pH	Ready To Use
FoxP3	abcam	236A/E7	High pH	100
CD163	Leica	10D6	High pH	500
PD-L1	CST 社	E1L3N	High pH	100
PD-L2	CST 社	D7U8C	High pH	50
PD-1	abcam	NAT105	High pH	100
HLA Class I	ホクドー	EMR8-5	Low pH	1000

【免疫組織化学的評価】

免疫組織化学的評価はパラフィン包埋ブロックより作製した whole section を対象とした。Whole section の選択については、肝内胆管癌腫瘍辺縁で腫瘍部と非病変部を共に含む代表的部位を選択した。鏡検による評価は患者臨床情報が不明の状態、病理専門医 1 名と共に評価を行った。顕微鏡は BZ-9000 (Keyence) を使用した。腫瘍領域を外縁、内縁、中心に三分類し、それぞれの部位から 3 箇所ずつ選択し CD8 陽性細胞、Foxp3 陽性細胞、CD163 陽性細胞の数をカウントし、各々の陽性数を合計した。一度、研究者(外科医)が細胞のカウントを行った後に別の研究者(病理専門医)がカウント数を確認し、問題があった場合に合同でカウントの修正を行った。1 箇所は顕微鏡の 400 倍視野に収まる 1 領域 (1 高倍率領域) とした。外縁領域は腫瘍と正常部位の境界に接する正常側の 1 高倍率領域と定義した。内縁領域は腫瘍と正常部位の境界に接する 1 高倍率領域の腫瘍側の範囲と定義した。中心領域は腫瘍内部で内縁領域を除外した 1 高倍率領域と定義した。細胞数をカウントする際は 1 高倍率領域でカウントを行った。PD-1、PD-L1、PD-L2、HLA class I については選択したパラフィン切片全体で評価を行った。PD-1 の評価に関しては腫瘍領域に PD-1 陽性細胞が存在する場合を PD-1 high、存在しない場合を low と定義した。PD-L1 と PD-L2 については肝内胆管癌の腫瘍細胞のうち 5%以上の細胞の細胞膜が染色される場合を high とし、染色される細胞が 5%未満の場合を low と定義した (Zhu et al. 2018)。HLA class I については肝内胆管癌の腫瘍細胞のうち 75%以上の細胞の細胞膜が染色される場合を high とし、染色される細胞が 75%未満の場合を low と定義した (Sabbatino et al. 2016)。PD-L2 陽性症例は 1 症例のみであったため、PD-L2 に関してはこの症例を図 1 として提示する。

各カテゴリーについて代表的な症例の画像を図 2 に示す。

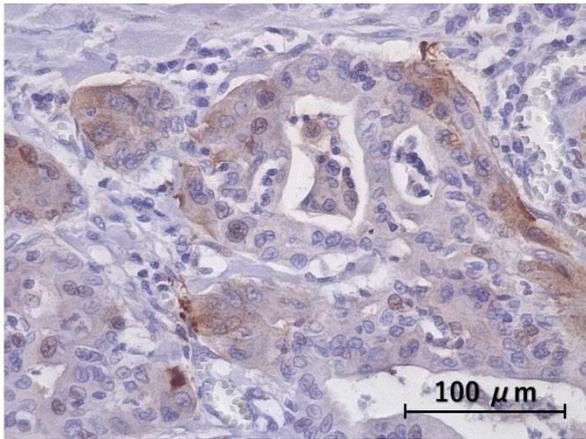


図 1:PD-L2 陽性症例の免疫組織化学所見
ICC において PD-L2 が陽性となる症例を認めた。

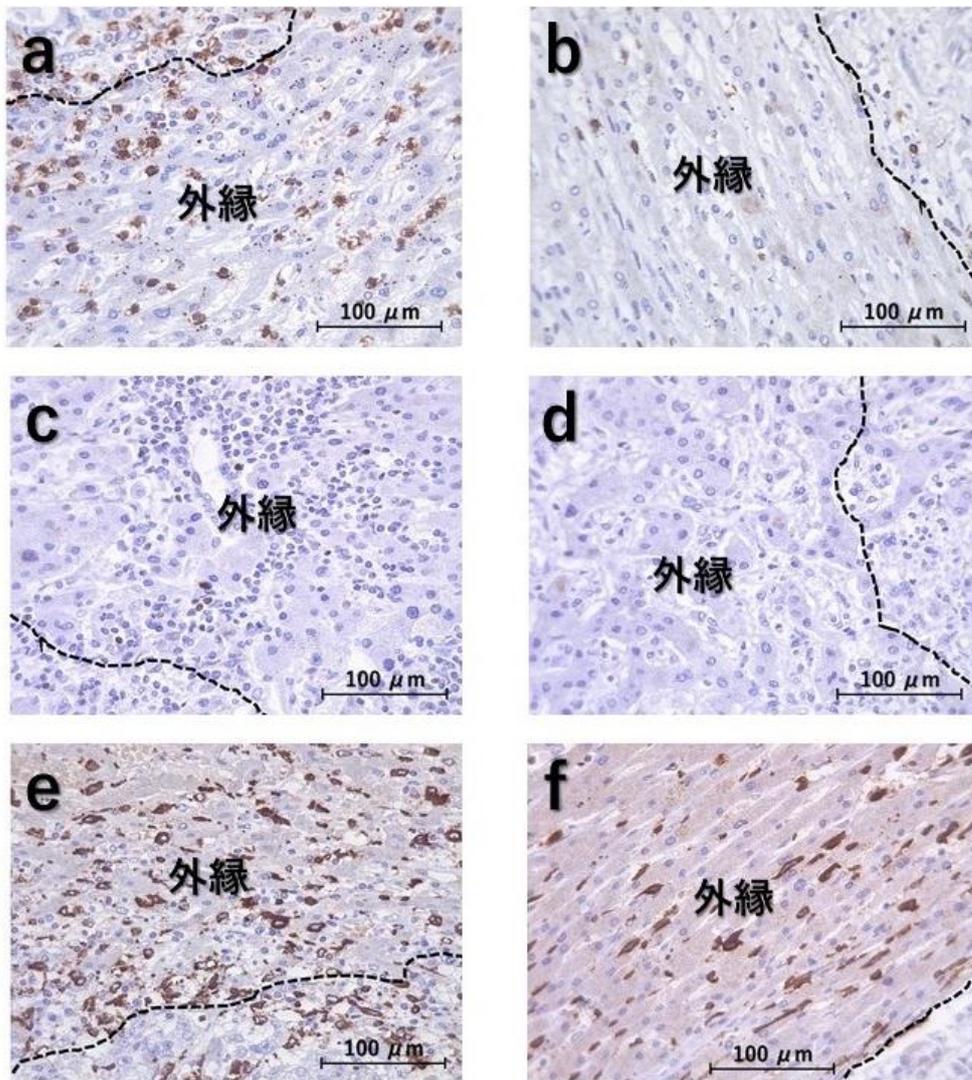


図 2: 各カテゴリーの免疫組織化学所見

免疫染色の画像所見。外縁領域における CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージおよび PD-1、PD-L1、HLA class I における high 群、low 群についてそれぞれの代表的な免疫組織化学所見を示す。a: CD8 染色。外縁領域 CD8+T 細胞 high。b: CD8 染色。外縁領域 CD8+T 細胞 low。c: Foxp3 染色。外縁領域 Foxp3+T 細胞 high。d: Foxp3 染色。外縁領域 Foxp3+T 細胞 low。e: CD163 染色。外縁領域 CD163+マクロファージ high。f: CD163 染色。外縁領域 CD163+マクロファージ low。

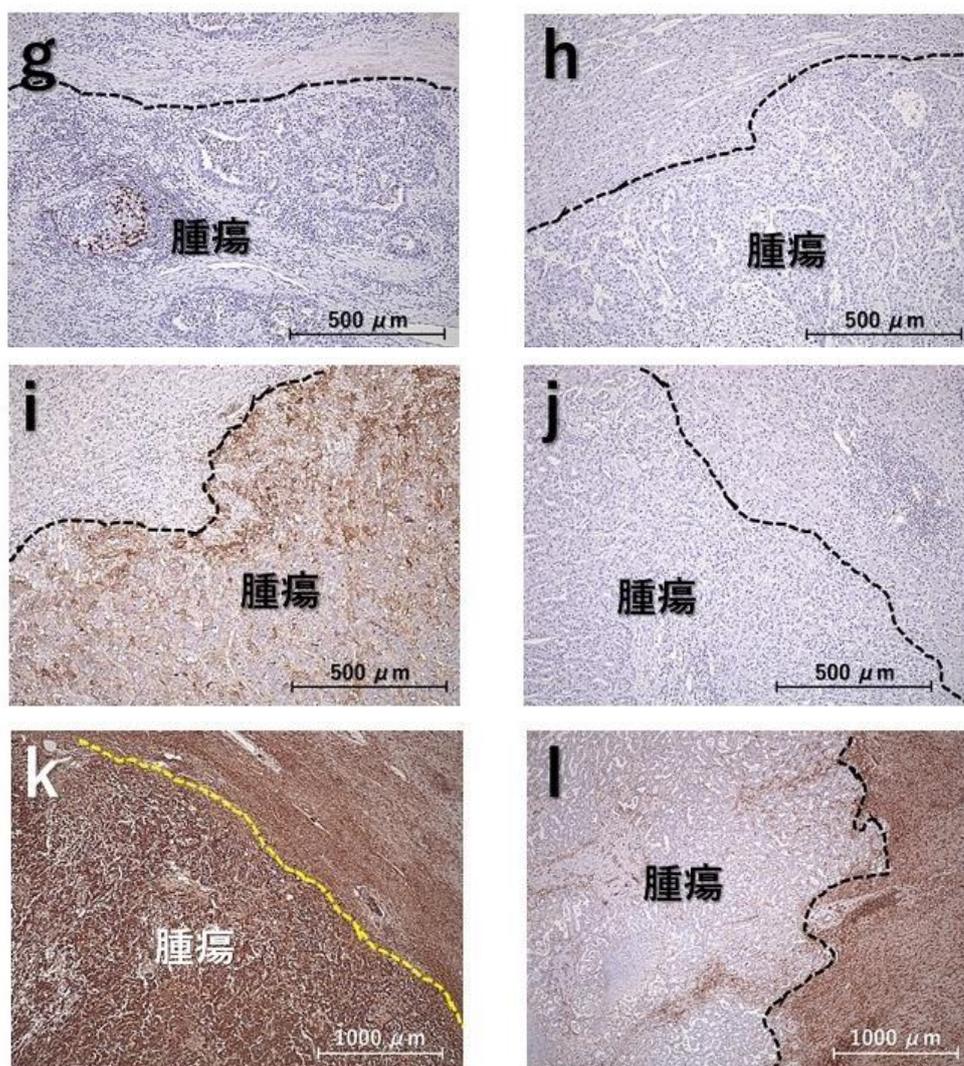


図 2 の続き

g:PD-1 染色。PD-1 high。h:PD-1 染色。PD-1 low。i:PD-L1 染色。PD-L1 high。j: PD-L1 染色。PD-L1 low。k:HLA class I 染色。HLA class I high。l:HLA class I 染色。HLA class I low。

【統計学的解析】

CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞と CD163+マクロファージのカウント数のカットオフ値を決定するために、ROC を用いた。連続変数である各細胞カウントと二区分変数である生死（5 年時点での生死）について ROC 解析を行った。症例の臨床病理データ及びに免疫組織化学結果の名目変数間の比較には Pearson の χ^2 二乗検定を用いた。カテゴリーの中に 5 以下の数字が含まれる場合には Fisher 検定を用い

た。症例の予後は、全生存率 (Overall survival; OS) を対象に検討を行った。単変量解析は Kaplan-Meier 法を用いた Wilcoxon 検定により行った。両側 P 値 0.05 未満を持って統計的有意差ありとした。すべての統計解析は JMP software (JMP Pro, version 14; SAS Institute Inc, Cary, NC) を用いて行った。

結果

【肝内胆管癌の臨床病理データの各項目の2群同士の5年生存率の比較】

臨床病理データの各項目について群分けされた2群のそれぞれの5年生存率を表3に示す。

表3: 臨床病理データの各項目内の2群間の5年 OS の比較

項目	群	n	5年 OS (%)	p
年齢	≤64	40	39.4 ± 8.0	0.6242
	65≤	29	33.9 ± 9.5	
性別	M	42	28.0 ± 7.4	0.0678
	F	27	48.4 ± 10.2	
背景肝	normal	51	40.9 ± 7.2	0.3276
	Others	18	26.3 ± 11.2	
HCV or/and HBV	-	51	41.2 ± 7.4	0.7897
	+	18	27.8 ± 10.6	
CA19-9 (U/ml)	<37	23	48.0 ± 10.9	0.0370
	37≤	41	34.1 ± 7.9	
腫瘍径 (cm)	<5 cm	29	53.3 ± 9.9	0.1450
	5 cm≤	40	28.7 ± 7.2	
腫瘍個数	St	51	6.3 ± 6.0	<0.0001
	Mt	18	48.5 ± 7.4	
腫瘍分化度	well or mod	40	33.4 ± 8.0	0.9946
	por	29	41.4 ± 9.5	
pN	-	40	50.9 ± 8.7	0.0253
	+	29	19.0 ± 7.6	
Liver resection	<Hr(2)	11	54.6 ± 15.0	0.0905
	Hr(2)≤	58	33.7 ± 6.7	
脈管浸潤	-	54	64.6 ± 12.8	0.0108
	+	15	29.1 ± 6.6	
Stage	2 or 3	30	62.7 ± 9.4	0.0001
	4	39	18.0 ± 6.5	
治癒度	A or B	48	44.9 ± 7.5	0.0035
	C	21	17.5 ± 9.1	

各項目の2群間の5年 OS の比較では有意差を認めた項目が CA19-9 ≥37

($p=0.0370$)、腫瘍個数 ($p<0.0001$)、pN ($p=0.0253$)、脈管浸潤 ($p=0.0108$)、Stage ($p=0.0001$)、治癒度 ($p=0.0035$)であった。その他の項目である年齢 ($p=0.6242$)、性別 ($p=0.0678$)、背景肝 ($p=0.3276$)、ウイルス性肝炎 ($p=0.7897$)、腫瘍最大径、腫瘍分化度、術式では5年 OS について 2 群間の比較による有意差は認めなかった (表 3)。図 3 に肝内胆管癌の各領域を画像で示した。各領域の定義については上述の通りである。CD8+T 細胞数の外縁領域のカウントは CD8+外縁と表記することとし、その他の細胞、その他の領域のカウントについてもこの表記に順じ表記することとする。CD8+外縁、CD8+内縁、CD8+中心のカウントはそれぞれ、 98.2 ± 62.6 、 101.0 ± 89.9 、 41.1 ± 54.1 であった。Foxp3+外縁、Foxp3+内縁、Foxp3+中心のカウントはそれぞれ 10.6 ± 13.6 、 18.9 ± 21.5 、 11.5 ± 15.7 であった。CD163+外縁、CD163+内縁、CD163+中心のカウントはそれぞれ 331.9 ± 91.9 、 194.6 ± 123.5 、 108.0 ± 106.8 であった (図 4)。

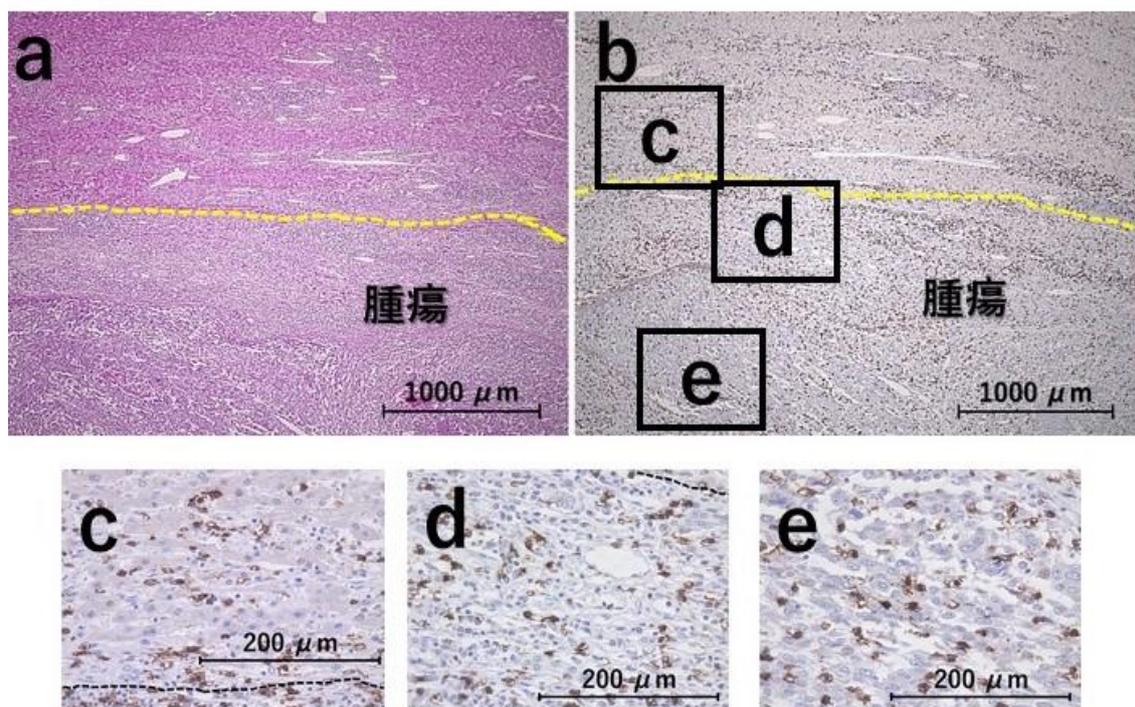


図 3 腫瘍領域の定義

外縁 high 群、内縁 high 群、中心 high 群に分類される症例の (a) HE 染色所見、(b) CD8 染色所見を示す。(c) 外縁領域は腫瘍と正常部位の境界に接し、顕微鏡の 400 倍視野に収まる非癌部側の範囲と定義した。(d) 内縁領域は腫瘍と正常部位の境界に接し、顕微鏡の 400 倍視野に収まる腫瘍側の範囲と定義した。中心領域 (e) は腫瘍内部で内縁領域を除外した領域。

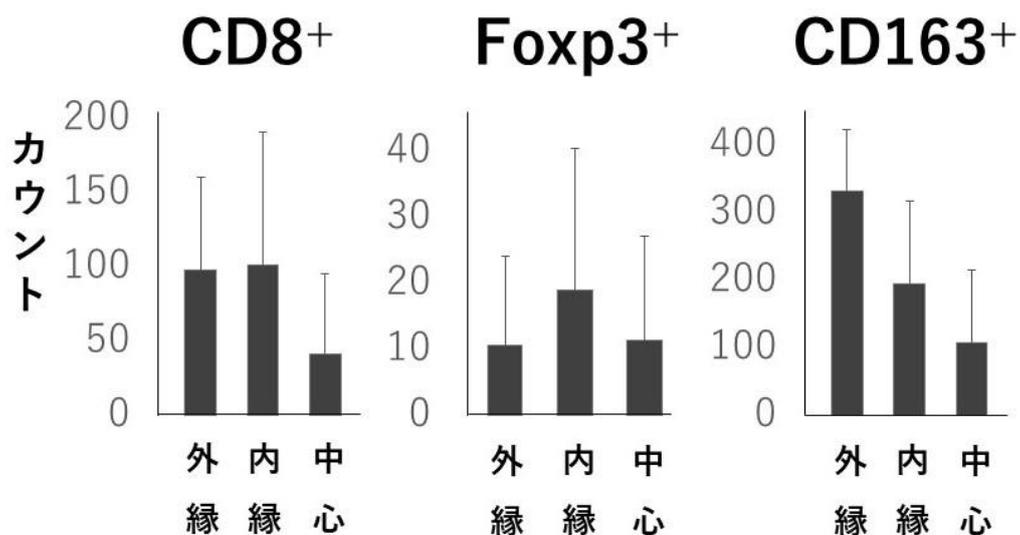


図 4 腫瘍領域毎の細胞カウント

各領域の CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージ数のカウント。エラーバーは標準偏差。

ROC (図 5) によって得られたカットオフ値により各カウントをカットオフ値以下のカウント数の low 群とカットオフ値より大きいカウント数の high 群に分類した。CD8+外縁の high 群については CD8+外縁 high 群と記載し、その他のカウントの high 群、low 群についても同様な記載を行うこととした。各群のカットオフ値は CD8+外縁は 66、CD8+内縁は 71、CD8+中心は 21、Foxp3+外縁は 9、Foxp3+内縁は 36、Foxp3+中心は 2、CD163+外縁は 391、CD163+内縁は 252、CD163+中心は 53 であった。各群の 5 年 OS を表 4 に示し、生存曲線を図 6 に示す。high 群と low 群の 5 年 OS に有意差を認めたのは CD8+外縁のみ ($p=0.0103$) で、他の細胞と部位の組み合わせでは有意差を認めなかった。

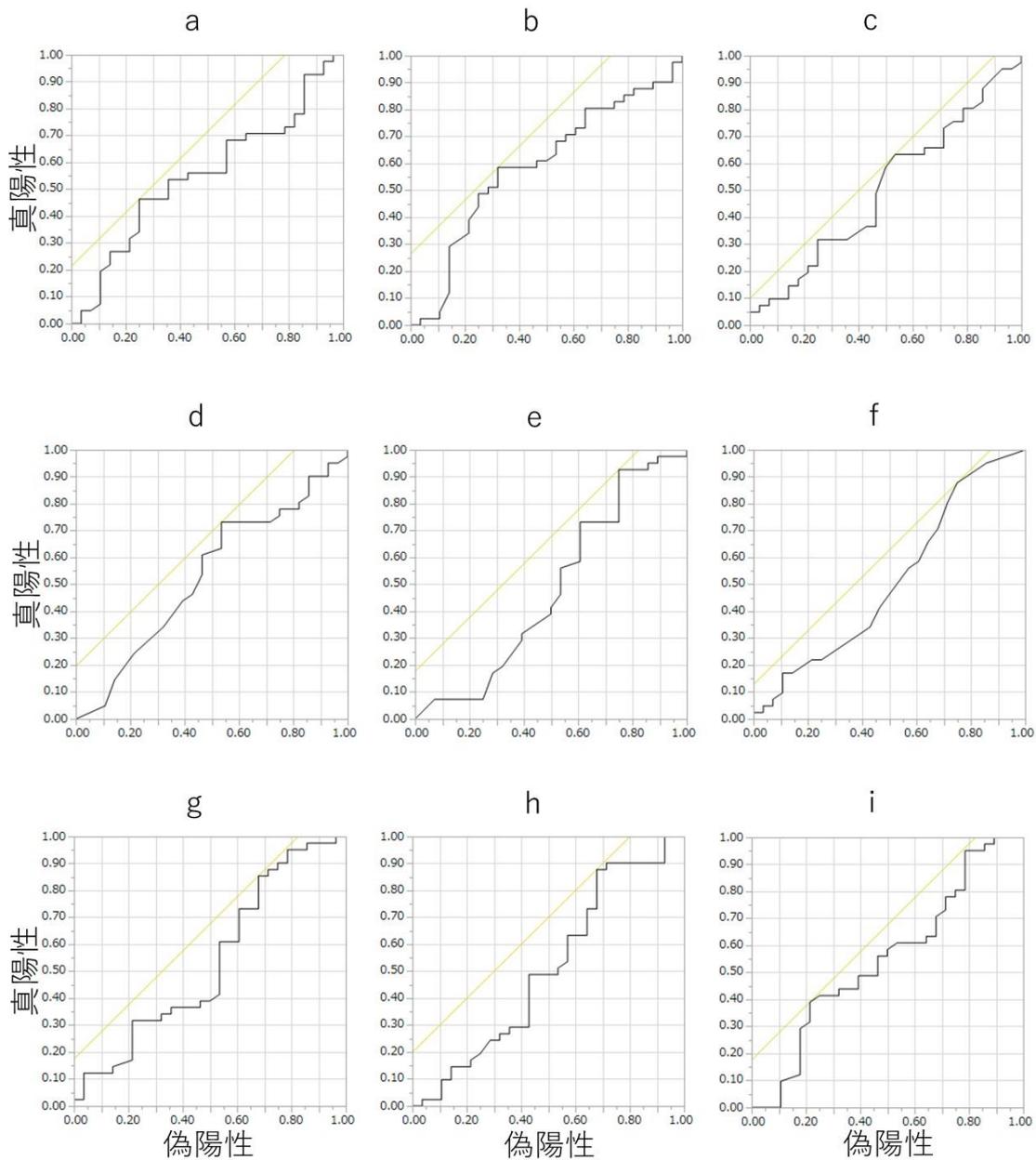


図 5 各細胞、各領域において細胞数カウントと生存群と、死亡群の ROC

各細胞、各領域において細胞数カウントと生存群と、死亡群の ROC 解析結果を示す。

(a) 腫瘍外縁 CD8+T 細胞、(b) 腫瘍内縁 CD8+T 細胞、(c) 腫瘍中心 CD8+T 細胞、(d) 腫瘍外縁 Foxp3+T 細胞、(e) 腫瘍内縁 Foxp3+T 細胞、(f) 腫瘍中心 Foxp3+T 細胞、(g) 腫瘍外縁 CD163+マクロファージ、(h) 腫瘍内縁 CD163+マクロファージ、(i) 腫瘍中心 CD163+マクロファージ。

表 4: CD8+T 細胞、Foxp3+T 細胞、CD163+マクロファージそれぞれの各領域における high 群、low 群の 5 年 OS の比較

		CD8+		
		n	5 年 OS (%)	p
外縁	low	26	24.7 + 8.6	0.0103 *
	high	43	45.5 + 8.1	
内縁	low	33	25.8 + 7.8	0.1849
	high	36	49.0 + 9.0	
中心	low	31	39.5 + 9.4	0.4199
	high	38	35.7 + 8.1	
		Foxp3+		
		n	5 年 OS (%)	p
外縁	low	48	30.1 + 7.1	0.4898
	high	21	52.4 + 10.9	
内縁	low	59	31.6 + 6.4	0.1480
	high	10	68.6 + 15.2	
中心	low	16	46.1 + 13.2	0.2904
	high	53	35.0 + 6.9	
		CD163+		
		n	5 年 OS (%)	p
外縁	low	54	33.6 + 6.7	0.4481
	high	15	52.7 + 14.4	
内縁	low	44	32.8 + 6.6	0.3494
	high	15	58.4 + 14.6	
中心	low	22	27.3 + 9.5	0.1145
	high	47	42.3 + 7.8	

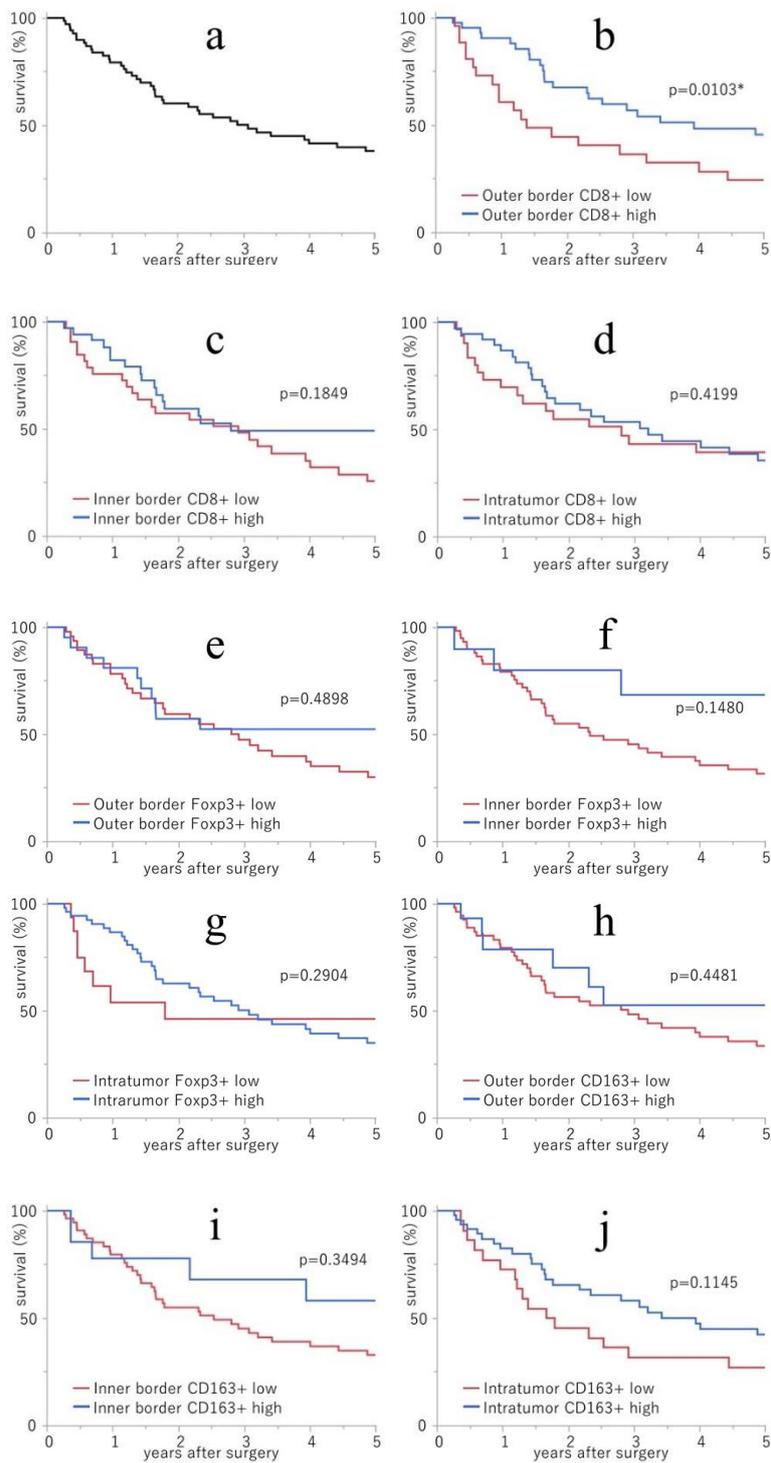


図 6

a 全 69 症例の 5 年 OS。

b-j 各細胞、各領域の high 群と low 群の生存曲線。CD8+外縁の high 群と low 群の間で有意差を認めた。

【PD-1、PD-L1、HLA class I の結果と5年 OS】

PD-L2 陽性症例は1症例のみであったため、5年 OS を含めデータの解析は行わなかった。PD-1、PD-L1、HLA class I について、それぞれの high 群、low 群と、5年 OS の関係を表 5 に示す。PD-1、PD-L1、HLA class I 全てで、発現の high 群と low 群との間には 5 年 OS に有意差は認めなかった。

表 5: 肝内胆管癌における PD-1、PD-L1、HLA class I 染色それぞれの high 群、low 群の 5 年 OS の比較

PD-1			
	n	5 年 OS (%)	p
high	18	35.7 ± 12.5	0.8553
low	51	37.5 ± 7.1	
PD-L1			
	n	5 年 OS (%)	p
high	10	50.0 ± 45.8	0.6851
low	59	34.7 ± 6.7	
HLA-class I			
	n	5 年 OS (%)	p
high	59	38.8 ± 6.8	0.8011
low	10	30.0 ± 14.5	

【CD8+外縁 low 群と CD8+外縁 high 群の比較】

CD8+外縁 low 群と CD8+外縁 high 群の5年生存率に有意差を認めたため、他の臨床病理学的データと免疫組織化学結果の比較も行った (表 6)。統計学的有意差を認めた項目は腫瘍径 (p=0.0481)と HLA class I (p=0.0341) (図 7)のみであった。他の項目は免疫染色の PD-1 と PD-L1 (p=0.2993)を含めて有意差を認めなかった。

表 6: CD8+外縁 low 群と CD8+外縁 high 群の比較

	n	CD8+外縁		P
		low	high	
年齢	<65	13	27	0.2969
	65≤	13	16	
性別	男性	16	26	0.9295
	女性	10	17	
背景肝	正常	19	32	0.9021
	その他	7	11	
HCV or/and HBV	-	21	30	0.4016
	+	5	13	
CA19-9(U/ml)	<37	7	16	0.3819
	37≤	17	24	
腫瘍径(cm)	<5	7	22	0.0481
	5≤	19	21	
腫瘍個数	St	17	34	0.2097
	Mt	9	9	
腫瘍分化度	well+mod	12	28	0.1225
	por	14	15	
pN	-	15	25	0.9709
	+	11	18	
術式	<Hr(2)	3	8	0.5160
	Hr(2)≤	23	35	
脈管浸潤	-	4	11	0.3802
	+	22	32	
Stage	2 or 3	9	21	0.2482
	4	17	22	
治癒度	A or B	19	29	0.6220
	C	7	14	
CD8+内縁	low	16	17	0.7620
	high	10	26	
CD8+中心	low	14	17	0.2468
	high	12	26	

Foxp3+外縁	low	20	28	0.3017
	high	6	15	
Foxp3+内縁	low	21	38	0.4856
	high	5	5	
Foxp3+中心	low	8	8	0.2460
	high	18	35	
CD163+外縁	low	22	32	0.3802
	high	4	11	
CD163+内縁	low	20	35	0.6544
	high	6	8	
CD163+中心	low	10	12	0.3620
	high	16	31	
PD-1	low	20	31	0.6579
	high	6	12	
PD-L1	low	24	35	0.2993
	high	2	8	
HLA-class1	low	7	3	0.0341
	high	19	40	

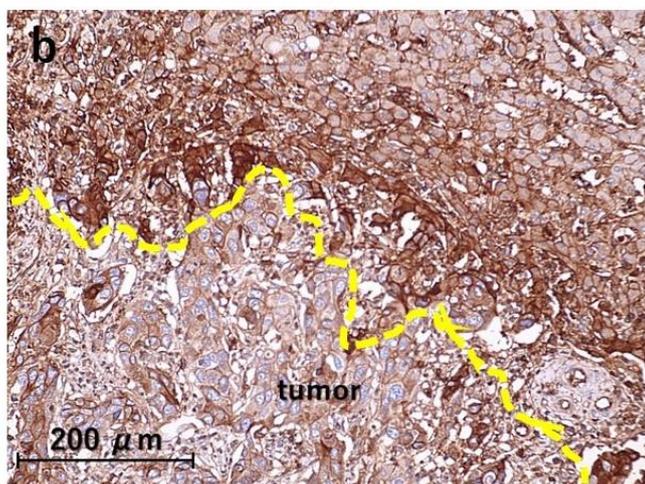
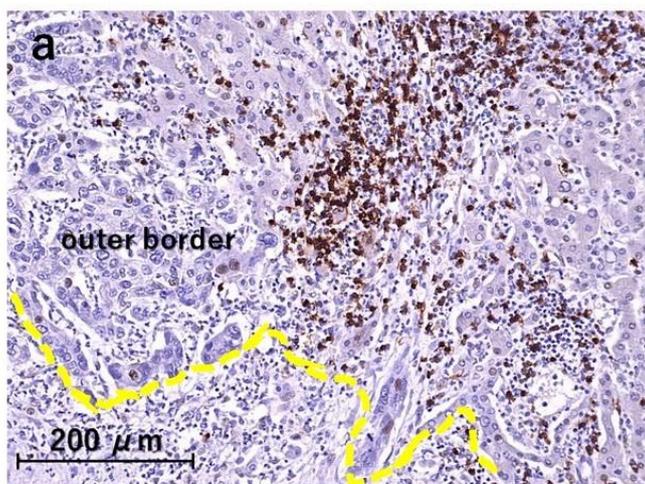


図 7 CD8+外縁 high、HLA class I high の代表症例

a: CD8+外縁 high の画像。

b: HLA class I high の画像。

考察

肝内胆管癌の予後は5年 OS が 30-40%と不良であるが、報告されている予後不良因子は CA19-9 高値、多発腫瘍、リンパ節転移の存在、脈管浸潤の存在、進行した Stage 等が存在する (de Jong et al. 2011; Farges et al. 2011; Jiang et al. 2011; Ribero et al. 2012; Wang et al. 2013)。これらは、今回の対象症例の背景に一致し、本研究の対象が肝内胆管癌の研究の集団として適している可能性が考えられた。一方で今回の報告と一致しない予後因子として 腫瘍径 (Mavros et al. 2014) が報告されているが、このように肝内胆管癌の予後に関連する因子は腫瘍の進行度に関連する項目が大部分を占める。肝内胆管癌の予防は現段階では困難であると考えられるため、肝内胆管癌の予後を改善するためには、その診断を早期に行うか、より効果的な治療方法が必要とされる。現在、肝内胆管癌における効果的な治療は手術のみであり、術前術後補助療法として確立されたレジメンは存在しない。手術不能もしくは再発時に化学療法のファーストラインとして使用されるゲムシタビン+シスプラチンは有効とされているが (Okusaka et al. 2010; Valle et al. 2010)、その効果は長期間持続せず、さらにセカンドライン以後に有効な化学療法の報告はなく、分子標的薬も有効な薬物の報告は存在していないのが現況である。こういった背景を受けて、近年開発された免疫チェックポイント阻害剤が注目されている (Blair et al. 2018)。免疫チェックポイント阻害剤は新たに開発された全身治療を目的とした薬剤で、悪性腫瘍によってもたらされている T 細胞 (主に CD8+T 細胞) の抑制を解除する機能を有しており、肝内胆管癌においても有効性が示された症例が報告されている (Sui et al. 2019)。また、いくつかの免疫チェックポイント阻害剤の使用について胆道癌を対象として臨床試験が行われており、結果が待たれる (Blair et al. 2018)。CD8+T 細胞は癌細胞を直接傷害する機能を有し、癌免疫の抗腫瘍効果において中心的役割を果たしていると考えられている。これまで、肝内胆管癌において免疫組織化学を用いた CD8+T 細胞数の報告においては、腫瘍に関連する領域を1箇所もしくは2箇所に分けて検討しているが、その分類法は一致していない上に厳密な定義付けもされていない場合がある。本研究ではより詳細な解析を行うために、腫瘍領域を3箇所に分類し、それぞれの領域に厳密な定義付けを行った。肝内胆管癌と CD8+T 細胞に関して、以前の報告では intratumor 領域と peritumor 領域の CD8+T 細胞と肝内胆管癌の予後との関連は示されなかった (Gu et al. 2012)。一方、本研究では腫瘍外縁の CD8+T 細胞数が肝内胆管癌の予後と正の関連を有し、腫瘍外縁の CD8+T 細胞が腫瘍の進展に対する抑制に関

与している可能性が示された。他の二領域の CD8+T 細胞数と全三領域の Foxp3+T 細胞数、CD163+マクロファージ数と肝内胆管癌の予後との間には関連性は示されなかった（表 4、図 6）。外縁の CD8+T 細胞のみで OS に有意差が検出された原因としては、CD8+T 細胞が腫瘍細胞と直接接することで T 細胞の機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。その他にも腫瘍の不均一性が T 細胞の分布に影響を及ぼしている可能性が考えられる。悪性黒色腫では 腫瘍の invasive margin の CD8+T 細胞数が予後と関連しており、同時に CD8+T 細胞数と免疫チェックポイント阻害剤による PD-1 阻害 の有効性との関連も認められた（Tumeh et al. 2014）。肝内胆管癌においては CD8+T 細胞数と免疫チェックポイント阻害剤の有効性との関連は報告されていないが、肝内胆管癌での免疫チェックポイント阻害剤の使用経験が世界的に少ないことが一因と考えられる。肝内胆管癌の免疫チェックポイント阻害剤の使用経験が少ない原因としては、現段階で肝内胆管癌に対して保険適応となっている免疫チェックポイント阻害剤がペムブロリズマブのみで、癌化学療法後に増悪した進行・再発の高頻度マイクロサテライト不安定性（microsatellite instability-high: MSI-High）な症例に限定されるためであると推察される。肝内胆管癌では MSI-high となる症例は約 10% であると考えられており（Silva et al. 2016）、その頻度は決して高くない。MSI とはミスマッチ修復（mismatch repair: MMR）機能が欠損している腫瘍細胞においてゲノムのなかに存在する塩基の繰り返し配列が正常細胞とは異なる反復回数を示す現象である。MMR 蛋白をコードする MMR 遺伝子（*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*）については肝内胆管癌では *MLH1* の変異が 25% で認められたとの報告されているが（Yang et al. 2005）、それ以外の報告が不十分であるため今後の報告が待たれる。ペムブロリズマブの固形癌に対する第 II 相試験 KEYNOTE-158 の最新の報告では胆道癌では客観的腫瘍縮小効果が 40.9% で認められ、MST が 24.9 ヶ月であった（Marabelle et al. 2020）。

肝内胆管癌における報告では Foxp3 陽性細胞ではほとんどの細胞が CD4+T 細胞であったと報告されており（Hasita et al. 2010）、本実験では Foxp3 陽性細胞をカウントすることで CD4+Foxp3+T 細胞の数をカウントしたとみなした。肝細胞癌においては Foxp3+T 細胞の数が予後と負の相関を有したと報告されている（Ding et al. 2018）。一方、肝内胆管癌においては Foxp3+T 細胞数は予後と相関しなかったと報告されており（Hasita et al. 2010）、本研究の結果と一致している。また、CD163+マクロファージについても同様に肝内胆管癌の予後との相関を認めなかったとの報告が成されており（Hasita et al. 2010）、本研究の結果と一致している。

PD-1/PD-L1 は Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) と並

び免疫チェックポイントの中で最も注目を集めている。PD-1 については 1992 年にアポトーシスを誘導された T 細胞での発現が京都大学から報告されている (Ishida et al. 1992) が、他にも活性化 T 細胞、制御性 T 細胞、活性化 B 細胞、NK 細胞等で発現しており、様々な PD-1 欠損マウスでの異なる自己免疫性疾患が確認されたことで、免疫抑制機能を有することが解明されている (Nishimura et al. 1999; Nishimura et al. 2001; Wang et al. 2005)。PD-1 の免疫抑制作用 は主に T 細胞の反応の後期で T 細胞を抑制することによって発揮される。一方 CTLA-4 は T 細胞への抗原提示に関連する段階で免疫に対し抑制的に働くと考えられている (Wu et al. 2019)。PD-L1 は肺、血管内皮、筋細胞、肝細胞、膵島、神経細胞、角化細胞、胎盤等でも発現が確認されており (Keir et al. 2008; Sharpe et al. 2007)、活性化 T 細胞から末梢組織を保護する作用を有するとされているが、悪性腫瘍で PD-L1 が発現した場合には腫瘍細胞を活性化 CD8+T 細胞から保護することになり、免疫システムから腫瘍が逃れる一因となる (Patel et al. 2015)。よって腎癌、尿路上皮癌等の悪性腫瘍では PD-L1 の発現が予後不良因子となる場合がある (Wang et al. 2017)。肝内胆管癌と肝外胆管癌の両者を含む胆道癌のメタアナリシスでは胆道癌の予後と PD-L1 の発現には相関性は認められなかった (Xu et al. 2019)。胆道癌の中で本研究の対象である肝内胆管癌に限ると、PD-L1 の発現は 17.7-30.9%で認められており、本研究の 14.5%と大差は認められない (Jing et al. 2019; Lu et al. 2019; Sabbatino et al. 2016; Zhu et al. 2018)。また、予後と PD-L1 発現の関連については 予後不良因子であるとの報告 (Gani et al. 2016; Lu et al. 2019)、予後良好因子であるとの報告 (Zhu et al. 2018)、または本研究の結果同様に予後と関連しないとの報告 (Jing et al. 2019) が存在し、今後さらなる報告が待たれる。

PD-1 のもう一方のリガンドである PD-L2 については活性化した樹状細胞、マクロファージ、腹膜 B1 細胞等での発現が確認されている (Zhong et al. 2007)。肝細胞癌 (Jung et al. 2017)、胃癌 (Gao et al. 2017)、大腸癌 (Wang et al. 2017) 等では PD-L2 の発現が確認されており、その発現の意義についての研究も報告されているが、肝内胆管癌での PD-L2 の発現はこれまで報告されていない。本研究では 1 例 (1.5%) の発現症例を認めるのみで、肝内胆管癌における PD-L2 の機能を検証するには至らなかった。本研究での頻度が真実であるとすればより大規模な症例数を有する研究での検討が必要となる。

腫瘍細胞において発現する HLA class I は腫瘍抗原由来ペプチドを免疫システムへ提示することで腫瘍免疫を賦活化し、CD8+T 細胞の活性化による抗腫瘍効果に関与する。肝内胆管癌において HLA class I が欠損する機序は解明されていな

いが、肝内胆管癌での HLA class I の欠損は報告されており (Zhao et al. 2016) 、同報告では HLA class I と腫瘍領域の CD8+T 細胞数に正の相関が示されている。本研究では腫瘍外縁領域の CD8+T 細胞数との関連が示されたが、この事象に関しては二通りの可能性が存在する。HLA class I の欠損により CD8+T 細胞の誘導が減少した可能性と、誘導される CD8+T 細胞が減少したことでインターフェロン γ の分泌が減少し HLA class I の発現が減弱した可能性である (Seliger. 2016) 。HLA class I の発現単独では肝内胆管癌の予後因子とはならないとの報告が存在するが (Zhao *et al.*, 2016) 、これは本研究の結果と一致する。また、外縁 CD8+T 細胞と腫瘍最大径が負の相関を認めたが、これまでの報告では肝内胆管癌の腫瘍径と CD8+T 細胞数との関連は認められていない (Ye et al. 2009) 。しかし、胃癌 (Li et al. 2019) 、肝細胞癌 (Xu et al. 2019) 等では本研究の結果と同様に CD8+T 細胞と腫瘍最大径が負の相関が認められたとの報告が存在し、今後の検討が必要である。

本研究のリミテーションとしては、研究デザインが後ろ向きであり、単施設研究であるため、選択バイアスが存在し得ることが挙げられる。また、症例数が 69 例と比較的少ないが、これは先にも述べた単施設研究であることが関与しており、それに加えて世界的に肝内胆管癌の症例数が多くないことが挙げられる。よって、症例数が 69 例であっても本研究で得られた結果は貴重な知見であると考えられる。

結論

- ・肝内胆管癌の外縁領域の CD8+T 細胞数が多いと、少ない場合と比較し予後良好であった。
- ・肝内胆管癌の内縁領域、中心領域の CD8+T 細胞数は予後と関連しなかった。
- ・肝内胆管癌の外縁領域の CD8+T 細胞数と腫瘍径に負の相関を有した。
- ・肝内胆管癌の外縁領域の CD8+T 細胞数は腫瘍の HLA class I の発現と正の相関を有した。
- ・肝内胆管癌の外縁領域の CD8+T 細胞数は腫瘍の PD-L1 の発現と関連しなかった。
- ・肝内胆管癌の腫瘍細胞の PD-L1、HLA class I それぞれの発現は予後と関連しなかった。
- ・PD-L2 陽性の肝内胆管癌を 1 例認めた。

肝内胆管癌において腫瘍の内縁領域、中心領域ではなく腫瘍外縁領域の CD8+T 細胞数が予後因子となる可能性が示された。肝内胆管癌における CD8+T 細胞と予後の関連についてはこれまでの報告が限られており、今後も新たな研究による検証が必要ではあるが、手術検体が存在すれば CD8 の染色は比較的容易に行うことが可能であり、簡便な予後予測因子となることが期待できる。他の予後因子として PD-L1、HLA class I についても今後新たな報告が待たれる。現段階では肝内胆管癌における免疫チェックポイント阻害剤の使用経験の報告は少ないが、有効性が示された症例も報告されており新たな治療オプションとして期待されている。一方で、免疫チェックポイント阻害剤使用に当たっては免疫関連副作用を含む副作用の可能性、医療費の増大といったデメリットも存在するため、その使用に当たっては事前に有効な症例群もしくは免疫関連副作用の高リスク群が抽出できる状態が望ましい。さらに今後は新たな分子をターゲットとしたより有効な免疫チェックポイント阻害剤の開発が進むことが期待されるが、そのためには免疫チェックポイント阻害剤がターゲットとしている CD8+T 細胞と CD8+T 細胞の機能に影響を及ぼす PD-1、PD-L1、HLA class I 等の機能の理解が進むことが必要となる可能性がある。本研究を受けて、肝内胆管癌における CD8+T 細胞について十分な症例数を含む報告が望まれるが、その妥当性を検証する際には本研究も判断材料のひとつとなる可能性がある。今後、肝内胆管癌における免疫チェックポイント阻害剤の有効性が示されれば、肝内胆管癌においても使用症例が増加することが見込まれ、臨床病

理データとの関連についてさらなる解析と検証が必要となると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究にご参加いただいた患者様およびそのご家族の方々に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の機会を与えてくださり、ご高閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 武富 紹信教授に深く感謝申し上げます。また、終始懇切なるご指導を賜りました北海道大学病院 臨床研究開発センター 畑中佳奈子特任講師、北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門 畑中豊特任准教授に心より感謝申し上げます。最後に、本研究にあたり様々な面でご協力いただいた教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Bektas, H., Yeyrek, C., Kleine, M., Vondran, F.W., Timrott, K., Schweitzer, N., Vogel, A., Jäger, M.D., Schrem, H., Klempnauer, J. et al.(2015). Surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe: a single center experience. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.*22, 131–137.
- Blair, A. B., Murphy, A.(2018) Immunotherapy as a treatment for biliary tract cancers: A review of approaches with an eye to the future. *Curr. Probl. Cancer.*42, 49–58.
- Bupathi, M., Ahn, D. H.,and Bekaii-Saab, T.(2017) Therapeutic options for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg. Nutr.*6, 91–100.
- 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.
- Ding, W., Xu, X., Qian, Y., Xue, W., Wang, Y., Du, J., Jin, L.,and Tan, Y.(2018) Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine.*9, e13301.
- Farges, O., Fuks, D., Boleslawski, E., Le, Treut, Y.P., Castaing, D., Laurent, A., Ducerf, C., Rivoire, M., Bachellier, P., Chiche, L.,et al.(2011) Influence of surgical margins on outcome in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study by the AFC-IHCC-2009 study group. *Ann. Surg.*254, 824–829; discussion 830.
- Freeman, G. J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C.,et al.(2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*192, 1027–1034.
- Gani, F., Gani, F., Nagarajan, N., Kim, Y., Zhu, Q., Luan, L., Bhajjee, F.,

- Anders, R.A., Pawlik, T.M.(2016) Program Death 1 Immune Checkpoint and Tumor Microenvironment: Implications for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*23, 2610–2617.
- Gao, Y., Li, S., Xu, D., Chen, S., Cai, Y., Jiang, W., Zhang, X., Sun, J., Wang, K., Chang, B.,et al.(2017) Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8(+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients with stage T1-4N+M0 gastric adenocarcinoma. *Chin. J. Cancer.*36, 61.
- Gu, F.M., Gao, Q., Shi, G.M., Zhang, X., Wang, J., Jiang, J.H., Wang, X.Y., Shi, Y.H., Ding, Z.B., Fan, J.,et al.(2012) Intratumoral IL-17+ cells and neutrophils show strong prognostic significance in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*19, 2506–2514.
- Hasita, H., Komohara, Y., Okabe, H., Masuda, T., Ohnishi, K., Lei, X.F., Beppu, T., Baba, H., Takeya, M.(2010) Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.*101, 1913–1919.
- Inoue, K., Makuuchi, M., Takayama, T., Torzilli, G., Yamamoto, J., Shimada, K., Kosuge, T., Yamasaki, S., Konishi, M., Kinoshita, T.,et al.(2000) Long-term survival and prognostic factors in the surgical treatment of mass-forming type cholangiocarcinoma. *Surgery.*127, 498–505.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T.(1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*11, 3887–3895.
- Jiang, W., Zeng, Z.C., Tang, Z.Y., Fan, J., Sun, H.C., Zhou, J., Zeng, M.S., Zhang, B.H., Ji, Y.,and Chen, Y.X.(2011) A prognostic scoring system based on clinical features of intrahepatic cholangiocarcinoma: the Fudan score. *Ann. Oncol.*22, 1644–1652.
- Jing, C.Y., Fu, Y.P., Yi, Y., Zhang, M.X., Zheng, S.S., Huang, J.L., Gan, W., Xu, X., Lin, J.J., Zhang, J. et al.(2019) HHLA2 in intrahepatic cholangiocarcinoma: an

immune checkpoint with prognostic significance and wider expression compared with PD-L1. *J. Immunother. Cancer.* 7, 77.

de, Jong, M. C., Nathan, H., Sotiropoulos, G.C., Paul, A., Alexandrescu, S., Marques, H., Pulitano, C., Barroso, E., Clary, B.M., Aldrighetti, L. et al.(2011) Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. *J. Clin. Oncol.* 29, 3140–3145.

Jung, H.I., Jeong, D., Ji, S., Ahn, T.S., Bae, S.H., Chin, S., Chung, J.C., Kim, H.C., Lee, M.S., Baek, M.J.(2017) Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res. Treat.*49, 246–254.

Kamiyama, T., Nakanishi, K., Yokoo, H., Kamachi, H., Tahara, M., Yamashita, K., Taniguchi, M., Shimamura, T., Matsushita, M., Todo, S.(2010) Perioperative management of hepatic resection toward zero mortality and morbidity: analysis of 793 consecutive cases in a single institution. *J. Am. Coll. Surg.*211, 443–449.

Kawamura, H., Kamiyama, T., Nakagawa, T., Nakanishi, K., Yokoo, H., Tahara, M., Kamachi, H., Toi, H., Matsushita, M., Todo, S.(2008) Preoperative evaluation of hepatic functional reserve by converted ICGR15 calculated from Tc-GSA scintigraphy. *J. Gastroenterol. Hepatol.*23, 1235–1241.

Keir, M. E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H.(2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*26, 677–704.

Khan, S. A., Tavorari, S., Brandi, G.(2019) Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int.*39, 19–31.

Kudo, M., Izumi, N., Ichida, T., Ku, Y., Kokudo, N., Sakamoto, M., Takayama, T., Nakashima, O., Matsui, O., Matsuyama, Y.(2016) Report of the 19th follow-up survey of primary liver cancer in Japan. *Hepatol. Res.*46, 372–390.

Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al.(2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*2, 261–268.

Li, F., Sun, Y., Huang, J., Xu, W., Liu, J., Yuan, Z. (2019) CD4/CD8 + T cells, DC subsets, Foxp3, and IDO expression are predictive indicators of gastric cancer prognosis. *Cancer Med.* doi: 10.1002/cam4.2596.

Lu, J.C., Zeng, H.Y., Sun, Q.M., Meng, Q.N., Huang, X.Y., Zhang, P.F., Yang, X., Peng, R., Gao, C., Wei, C.Y., et al.(2019) Distinct PD-L1/PD1 Profiles and Clinical Implications in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Patients with Different Risk Factors. *Theranostics*.9, 4678–4687.

Marabelle A., Le D.T., Ascierto P.A., Di Giacomo A.M., De Jesus-Acosta A., Delord J.P., Geva R., Gottfried M., Penel N., Hansen A.R., et al.(2020) Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J. Clin. Oncol.* 1, 1-10.

Mavros, M. N., Economopoulos, K.P., Alexiou, V.G., Pawlik, T.M., et al.(2014) Treatment and Prognosis for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg.* 149, 565–574.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T.(1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*.11, 141–151.

Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., et al.(2001) Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*.291, 319–322.

Nolz, J. C.(2015) Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization. *Cell. Mol. Life Sci.*72, 2461–2473.

Ojima, H.(2010) The recent epidemiology of cholangiocarcinoma. *Liver Cancer*.16, 13–17.

Okusaka, T., Nakachi, K., Fukutomi, A., Mizuno, N., Ohkawa, S., Funakoshi, A., Nagino, M., Kondo, S., Nagaoka, S., Funai, J., et al.(2010) Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative

multicentre study in Japan. *Br. J. Cancer*.103, 469–474.

Orimo, T., Kamiyama, T., Mitsuhashi, T., Kamachi, H., Yokoo, H., Wakayama, K., Shimada, S., Nagatsu, A., Taketomi, A.(2018) Impact of tumor localization on the outcomes of surgery for an intrahepatic cholangiocarcinoma. *J. Gastroenterol*.53, 1206–1215.

Patel, S. P., Kurzrock, R.(2015) PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther*.14, 847–856.

Ribero, D., Pinna, A.D., Guglielmi, A., Ponti, A., Nuzzo, G., Giulini, S.M., Aldrighetti, L., Calise, F., Gerunda, G.E., Tomatis, M.,et al.(2012) Surgical Approach for Long-term Survival of Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multi-institutional Analysis of 434 Patients. *Arch. Surg*.147(12), 1107–1113.

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.

Seliger, B.(2016) Molecular mechanisms of HLA class I-mediated immune evasion of human tumors and their role in resistance to immunotherapies. *HLA*.88, 213–220.

Sharpe, A. H., Wherry, E.J., Ahmed, R., Freeman, G.J.(2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol*.8, 239–245.

Silva, V.W., Askan G., Daniel T.D., Lowery M., Klimstra D.S., Abou-Alfa G.K., Shia J.(2016) Biliary carcinomas: pathology and the role of DNA mismatch repair deficiency. *Chin. Clin. Oncol*.5, 62.

Spolverato, G., Kim, Y., Alexandrescu, S., Marques, H.P., Lamelas, J., Aldrighetti, L., Clark, Gamblin, T., Maithel, S.K., Pulitano, C., Bauer, T.W.,et al.(2016) Management and Outcomes of Patients with Recurrent Intrahepatic

Cholangiocarcinoma Following Previous Curative-Intent Surgical Resection. *Ann. Surg. Oncol.*23, 235–243.

Sui, M., Li, Y., Wang, H., Luo, Y., Wan, T., Wang, X., Hu, B., Cheng, Y., Lv, X., Xin, X., et al.(2019) Two cases of intrahepatic cholangiocellular carcinoma with high insertion-deletion ratios that achieved a complete response following chemotherapy combined with PD-1 blockade. *J. Immunother. Cancer.*7, 125.

Takada, K., Takahama, Y.(2015) Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells. *Adv Immunol.*125, 87–110.

Tumeh, P. C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, Ve., et al.(2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.*515, 568–571.

Valle, J., Wasan, H., Palmer, D.H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S.P., et al.(2010) Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N. Engl. J. Med.*362, 1273–1281.

Wang, H., Yao, H., Li, C., Liang, L., Zhang, Y., Shi, H., Zhou, C., Chen, Y., Fang, J.Y., Xu, J.(2017) PD-L2 expression in colorectal cancer: Independent prognostic effect and targetability by deglycosylation. *Oncoimmunology.*6, e1327494.

Wang, J., Yoshida, T., Nakaki, F., Hiai, H., Okazaki, T., Honjo, T.(2005) Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*102, 11823–11828.

Wang, Q., Liu, F., Liu, L.(2017) Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore).*96, e6369.

Wang, Y., Li, J., Xia, Y., Gong, R., Wang, K., Yan, Z., Wan, X., Liu, G., Wu, D., Shi, L., et al.(2013) Prognostic nomogram for intrahepatic cholangiocarcinoma after partial hepatectomy. *J. Clin. Oncol.*31, 1188–1195.

Weber, S. M., Jarnagin, W.R., Klimstra, D., DeMatteo, R.P., Fong, Y., Blumgart, L.H.(2001) Intrahepatic cholangiocarcinoma: resectability, recurrence pattern, and outcomes. *J. Am. Coll. Surg.*193, 384–391.

Wu, X., Gu, Z., Chen, Y., Chen, B., Chen, W., Weng, L., Liu, X.(2019) Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*1, 661–674.

Xu, G., Sun, L., Li, Y., Xie, F., Zhou, X., Yang, H., Du, S., Xu, H., Mao, Y.(2019) The Clinicopathological and Prognostic Value of PD-L1 Expression in Cholangiocarcinoma: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.*9, 897.

Xu, X., Tan, Y., Qian, Y., Xue, W., Wang, Y., Du, J., Jin, L., Ding, W.(2019) Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*.98, e13923.

Yang B., House M.G., Guo M., Herman J.G., Clark D.P.(2005) Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod. Pathol.*18, 412-420.

Ye, Y., Zhou, L., Xie, X., Jiang, G., Xie, H., 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.

Yoh, T., Hatano, E., Seo, S., Okuda, Y., Fuji, H., Ikeno, Y., Taura, K., Yasuchika, K., Okajima, H., Kaido, T., et al.(2018) Long-Term Survival of Recurrent Intrahepatic Cholangiocarcinoma: The Impact and Selection of Repeat Surgery. *World J. Surg.*42, 1848–1856.

Zhang, X.F., Beal, E.W., Bagante, F., Chakedis, J., Weiss, M., Popescu, I., Marques, H.P., Aldrighetti, L., Maithel, S.K., Pulitano, C., Bauer, T.W., et al.(2018) Early versus late recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma after resection with curative intent. *Br. J. Surg.*105, 848–856.

Zhao, X., Guo, F., Li, Z., Jiang, P., Deng, X., Tian, F., Li, X., Wang, S.(2016)

Aberrant expression of B7-H4 correlates with poor prognosis and suppresses tumor-infiltration of CD8+ T lymphocytes in human cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.*36, 419–427.

Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C., Rothstein, T.L.(2007) PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur. J. Immunol.*37, 2405–2410.

Zhu, Y., Wang, X.Y., Zhang, Y., Xu, D., Dong, J., Zhang, Z., Yi, C.H., Jia, H.L., Yang, X.(2018) Programmed death ligand 1 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and its association with prognosis and CD8+ T-cell immune responses. *Cancer Manag. Res.*10, 4113–4123.