

博士論文

胃・食道神経内分泌癌における治療標的分子発現の検討

山下 智

胃・食道神経内分泌癌における治療標的分子発現の検討

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教員：瀬戸 泰之教授

申請者：山下 智

目次

要旨.....	4
第一部 胃神経内分泌癌における治療標的分子の検討.....	5
1-1. 背景.....	5
1-2. 対象と方法.....	13
1-3. 結果.....	23
1-4. 考察.....	29
表・図.....	38
第二部 食道神経内分泌癌における治療標的分子の検討.....	51
2-1. 背景.....	51
2-2. 対象と方法.....	56
2-3. 結果.....	59
2-4. 考察.....	65
表・図.....	75
結語.....	87
利益相反.....	88
謝辞.....	89
引用文献.....	90

要旨

胃・食道の神経内分泌癌（NEC）は稀で予後不良、治療標的は未確立である。胃 25 例、食道 15 例の NEC の治療標的探索のため PD-L1（Combined positive score (CPS)で定量的に評価）、HER2（胃のみ）、HLA class I、MMR 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。

胃は 18 例(72%)で PD-L1 CPS \geq 1 を示し、HER2 は全例陰性、HLA-Class I 発現保持は 21 例(84%)、MMR 蛋白欠損は 4 例(16%)であった。食道の PD-L1 は CPS \geq 1 が 9 例(60%)、CPS \geq 10 が 5 例(33%)、HLA-Class I 発現保持が 10 例(67%)、MMR 蛋白欠損は認めなかった。胃・食道 NEC には PD-L1 陽性、HLA-Class I 発現保持症例が多く、免疫チェックポイント阻害薬やがんワクチンが有効な可能性が示唆された。

第一部 胃神経内分泌癌における治療標的分子の検討

1-1. 背景

胃神経内分泌癌（neuroendocrine carcinoma, NEC）は稀な組織型で、全切除胃癌の 0.4～0.64%である（1,2）。胃の NEC は悪性度が高く、しばしば進行期で発見されることが多いため、治療は化学療法が主体となることが多い（3）。胃 NEC に対して、現在プラチナ併用療法を含む小細胞肺癌の治療ガイドラインが適応されているが、依然として予後不良であり、有効な分子標的療法の確立が急がれている（4-6）。

現在の胃癌に対する分子標的療法は、HER2 を標的としたモノクローナル抗体療法と PD-1/PD-L1 経路を標的とした免疫チェックポイント阻害薬があり、それぞれ標的となる分子を発現する胃癌の患者に有効であり広く用いられている。抗 HER2 薬のトラスツズマブは HER2 陽性胃癌患者に対する有効性は確立されているが（7）、胃 NEC 患者 51 名を対象とした先行研究ではいずれも HER2 陽性はなかったと報告された（8）。したがって、抗 HER2 療法は胃 NEC 患者に対する有効な治療法ではない可能性が示唆されるが、これまでそれを追試する研究は存在しなかった。

PD-L1 陽性の胃・食道胃接合部腺癌に対して NCCN ガイドラインでは、抗 PD-1 抗体のペムブロリズマブを 2 次・3 次治療として推奨している（9）。しかし現在まで胃 NEC

についての報告は数少なく、消化管 NEC における PD-L1 発現を調べた研究に少数例含まれるのみで (10, 11)、胃 NEC 患者における PD-L1 発現とペムブロリズマブの有効性は未だ十分に検討されていない。最近、Yang らにより胃 NEC における PD-L1 発現を評価した研究が報告された (12)。胃 NEC43 例中 21 例 (48.8%) が高 PD-L1 発現であり、これらの症例では低 PD-L1 発現群と比較して全生存期間が有意に短かった。但しこの研究内の PD-L1 の発現評価方法は、PD-L1 陽性腫瘍細胞の比率 (範囲 0~3) と PD-L1 染色強度 (範囲 0~3) の四段階評価の積として定義された独自のスコアリング法で評価されていた。

腫瘍細胞の PD-L1 発現は、肺癌における PD-L1/PD-1 阻害療法の適応判定において広く用いられているバイオマーカーである (13-15)。腫瘍微小環境内の免疫細胞における PD-L1 発現も腫瘍細胞の発現と同様に、免疫チェックポイント阻害薬に対する応答に関連していると考えられている。近年、PD-L1 発現の評価方法として combined positive score (CPS) が開発された。これは免疫細胞と腫瘍細胞上の PD-L1 発現を総合的に評価する新しいスコアリング法である。PD-L1 陽性腫瘍細胞の割合のみに基づく tumor proportion score (TPS) などの別のスコアリング法よりも、胃癌患者のペムブロリズマブに対する有効性の予測に優れていることが報告された (16, 17)。Kulangara K らは KEYNOTE-059 試

験において、胃癌・食道胃接合部癌 257 例対象とした研究で PD-L1 を CPS と TPS を用いて比較評価し有用性を検証した。奏効率に関しては PD-L1 CPS \geq 1 が 16.2% (257 例中 148 例)、CPS $<$ 1 が 6.4% (オッズ比 2.8)、一方 TPS \geq 1 が 15.6% (257 人中 32 人)、TPS $<$ 1 が 11.6% (オッズ比 1.4)。ペムブロリズマブに対する奏効率は CPS と有意に関連した (P=0.002) が、TPS とは有意な関連は認められなかった (P=0.22)。よって、CPS は TPS よりもペムブロリズマブ反応予測バイオマーカーとして有用であることが確認され、胃癌の PD-L1 評価法について CPS の有用性と TPS に対する優位性が確認された (17)。

また、Yamashita K らは熊本大学の胃癌患者 191 例を対象に PD-L1 評価を CPS と TPS で比較し、日本人で後ろ向きに検討を行った。PD-L1 陽性は TPS \geq 1 が 39 例 (20.4%)、CPS \geq 1 が 137 例 (71.7%) に検出され、CPS で PD-L1 陽性は、OS (P<0.01) (RFS) (P=0.01) が有意に短く、TPS は、OS と RFS は同等であった結果から、日本人胃癌においても PD-L1 CPS の評価法は、予後バイオマーカーとして TPS より有用であることが確認された (18)。PD-L1 の CPS は、腫瘍微小環境における PD-L1 陽性細胞 (腫瘍細胞、マクロファージ、リンパ球) の総数を腫瘍細胞総数で割った比率を 100 倍したものと定義される。2017 年 9 月に米国 FDA は、PD-L1 の CPS が 1 以上の PD-L1 陽性を示す再発・局所進行・転移性胃癌患者の治療薬としてペムブロリズマブを承認した (19)。しかし、こ

れまでに胃 NEC 症例における CPS を用いた PD-L1 発現を評価した研究は存在しなかった。

HLA-class I 遺伝子 (HLA-A、B、C) は、全有核細胞表面に発現する HLA-class I 分子 (細胞膜貫通糖タンパク質) をコードし、CD8 陽性 T 細胞に細胞内ペプチドを提示する。

HLA 遺伝子が位置する染色体 6p21.3 がヘテロ接合性喪失 (LOH) すると HLA の発現低下を招き、腫瘍免疫の回避につながる (20)。本邦の胃癌 141 例を対象にした先行研究では、HLA-class I 陽性は 63% に認められ、T 因子と負の相関を認め、HLA-class I 陽性かつ制御性 T 細胞浸潤少数群が予後良好と報告された (21)。また、腫瘍抗原に対して細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応を誘導するがんペプチドワクチンの治療標的としても、HLA-class I は重要と考えられている。単独または化学療法や免疫チェックポイント阻害薬との併用など、ペプチドワクチンの臨床試験が複数、胃癌に対して行われている (22, 23)。

HLA-class I 陰性腫瘍細胞においては、T 細胞が腫瘍細胞を抗原認識・傷害できず CTL の反応が誘導できないため、PD-1/PD-L1 阻害剤をはじめとする T 細胞ベースの免疫療法が効きにくいことが知られており、いかにこれを克服するかが今後の課題となっている (24)。

免疫チェックポイント治療の適応を探る上で、腫瘍免疫微小環境における腫瘍組織浸

潤リンパ球（TIL）の役割も近年重要視されている。浸潤腫瘍縁の TIL 密度が、免疫チェックポイント阻害薬応答を予測する可能性が報告されている（25）。エフェクター/細胞傷害性（CD3+・CD8+）、メモリー（CD45RO+）T 細胞、制御性（FOXP3+）Treg 細胞は宿主免疫応答の指標と考えられ、免疫療法の有効性との関連が示唆されている（26）。また最近の研究では、TIL と PD-L1 発現の有無に基づいて腫瘍免疫微小環境（tumor immune microenvironment, TIME）を分類することが最適な免疫療法戦略を決定するために重要な可能性が示されている（27, 28）。T 細胞ベースの免疫療法の効果を腫瘍組織の TIL の存在／不在と、PD-L1 発現の有無で 4 分類し予後予測や治療計画に役立てることが提唱された。4 分類における各タイプの特徴は以下の通りである。タイプ I（TIL の存在をともなう PD-L1 陽性、適応免疫耐性を誘発）、タイプ II（TIL を伴わない PD-L1 陰性、免疫無視の状態）、タイプ III（TIL を伴わない PD-L1 陽性、PD-L1 発現が内因性に誘導された状態）、タイプ IV（TIL を伴う PD-L1 陰性、免疫寛容に PD-L1 以外の抑制経路が働いている）。各タイプの治療戦略としては以下のように考えられている。タイプ I 群：PD-L1 の結合によって無効にされた TIL を有しているため、単剤 PD-1/PD-L1 阻害剤が有効である可能性が最も高い。タイプ II 群：既存の TIL がないことを考えると、単剤によるチェックポイントの遮断はおそらく有益でない可能性が高い。このような状況では、抗

CTLA-4 で T 細胞を賦活化し腫瘍内に取り込み、腫瘍内に浸潤した TIL が PD-L1 発現を誘導した場合に備え PD-1/PD-L1 経路も遮断する、抗 CTLA-4 と抗 PD-1 の併用が有望である可能性がある。タイプ III 群：PD-L1 陽性のみを抗 PD-1 療法/抗 PD-L1 療法に対する応答予測因子と見なすことはできない。腫瘍に TIL がないと、PD-1/PD-L1 を阻害しても腫瘍細胞に対する T 細胞応答につながる可能性は低い。したがって、タイプ II と同様に、リンパ球を腫瘍細胞に動員する治療が有効な可能性がある。タイプ IV 群：TIL の機能抑制に PD-1/PD-L1 経路の寄与は少ないため、TIL を抑制する他の経路を治療標的とする必要がある。

ミスマッチ修復蛋白(mismatch-repair protein, MMR) (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 の 4 種) は DNA 複製エラーの修復遺伝子として知られる。各遺伝子の変異や *MLH1* 遺伝子の DNA メチル化による発現低下を示す腫瘍はマイクロサテライト不安定性腫瘍と呼ばれ、多量の遺伝子変異が腫瘍ゲノム内に蓄積している。マイクロサテライト不安定性腫瘍は変異蛋白(腫瘍抗原)が多く免疫チェックポイント治療が効きやすいと考えられており、原発臓器の種類を問わず、マイクロサテライト不安定性を示す固形癌には免疫チェックポイント阻害薬が用いられている。先行研究において胃 NEC における MMR 異常の頻度は 11%と報告されている (29)。*MLH1* メチル化を伴う大腸癌においては *BRAF* 遺伝子変異

が高頻度に認められる (30)。しかし、*MLHI* メチル化のある胃癌では *BRAF* 遺伝子変異は稀とされ、*BRAF* 遺伝子変異を認めた報告例もごく僅かである (31,32)。さらに MSI と *BRAF* 変異を調べた先行研究では、*BRAF* 変異を認めたのは MSS 胃癌 124 例中 1 例のみ、MSI 胃癌 37 例においては皆無であり、*BRAF* 変異は胃癌発生には関与していないことが示唆されている (33)。胃 NEC で *BRAF* 変異が認められるかどうかについての報告は未だない。

NEC の発癌や分子的特徴については、徐々に解明されつつあるがその希少性からまだ NEC の遺伝子変異プロファイルへの理解は不完全である (34)。胃 NEC 成分と胃腺癌成分にはゲノム異常の類似性が報告され、ヘテロ接合性の損失 (LOH) や複数の遺伝子座および TP53、APC、RB 遺伝子などの主要な癌遺伝子における変異を共有することが分かっている。これらの結果から胃 NEC-腺癌混合腫瘍において 2 つの成分が共通の起源を持ち、発癌の過程で別の組織型へ分化する可能性が示唆される (35)。

胃・食道 NEC の全ゲノム解析では胃腺癌や食道扁平上皮癌と比較し体細胞変異率が有意に高いと報告されている (36, 37)。胃 NEC においては、NEC に変異した 557 遺伝子のうち、40 遺伝子 (7.2%) が NEC と胃腺癌の両方に変異していたのに対し、517 遺伝子 (92.8%) は NEC のみに変異を認めていた。そのうち TP53 が 62-100% と最も高頻度な

変異遺伝子とされ、他にも RB1 (Retinoblastoma 1) や SMAD4、PIK3CA、KRAS を含む代表的な変異遺伝子が報告された (36)。胃 NEC にのみ変異が認められた遺伝子のうち約 40%(CPLX2、MYT1、SLC36A4、HIP1、PROX1 等)は神経系との関連が報告されており、その他、神経関連遺伝子 (TSHZ3, SEMA5A,TPH2,SDK1, PLXNA1) やがん関連遺伝子 (SYNE1、TSHZ3、LRP1B、MECOM) が含まれていた (36)。これらの知見から、胃 NEC は腺癌を発生母地として更なる遺伝子変異が加わって発生するものと思われる。なお NEC で最も高頻度に変異が認められる p53 や Rb を標的とした治療に関しては、以前から広範囲に臨床研究が行われてきたが、NEC で最も頻度の多い肺小細胞癌では有効性を示せず標的治療の確立には至っていない (38)。

本研究では、分子標的治療の可能性を探るために、胃 NEC 症例における HER2 と PD-L1、HLA-class I、ミスマッチ修復蛋白の発現プロファイルを調べた。また、NEC で発癌経路にかかわる共通因子として高頻度に遺伝子異常が報告されている p53 と retinoblastoma protein (Rb) の発現についても評価した (39-42)。

1-2. 対象と方法

症例

本研究は、2002 年 1 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日までの間に、東京大学医学部附属病院胃食道外科で治癒的胃切除を受けた胃 NEC 患者を対象とした後ろ向き研究である。

本研究では、東京大学医学部附属病院の病理アーカイブから同定された胃 NEC 患者 25 例を対象とした。本研究では、NEC を WHO 分類に従って、神経内分泌分化の形態学的特徴である充実性、シート状または柵状の発育パターンを示し、免疫組織化学的に synaptophysin または chromogranin A 陽性が認められる分化不良癌と定義した (3)。NEC は、N/C 比が高くクロマチンに富み細胞質が乏しい腫瘍細胞からなる小細胞型 NEC と、核小体が目立つ大型核と中程度の細胞質を持つ大細胞型 NEC に分類した。また、本研究では、NEC と腺癌の成分がそれぞれ腫瘍の 30%以上を占める混合腺神経内分泌癌 (mixed adenoneuroendocrine carcinoma, MANEC) も対象とした (3)。ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックは、東京大学医学部附属病院病理部のアーカイブから入手した。ヘマトキシリン・エオシン (haematoxylin and eosin, HE) 染色と免疫組織化学のために組織ブロックから厚さ 3 μ m の切片を作成し、HER2 評価のための in-situ ハイブリダイゼーション (ISH) には厚さ 4 μ m の切片を作成した。

臨床病理学的因子は年齢、性別、腫瘍の大きさ、腫瘍の位置、Borrmann 分類による肉眼型、TNM 分類、転帰をカルテから収集した。病理学的因子として、浸潤の深さ、組織型（小細胞・大細胞型）、腺癌成分の有無、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移を評価した。今回のコホートでは、術前に免疫チェックポイント阻害薬による治療を受けた患者はいなかった。本研究はヘルシンキ宣言に則って行われ、研究計画は東京大学医学部の倫理委員会で承認されている（承認番号 G3521）。

免疫組織化学と ISH

免疫組織化学は、ベンタナ BenchMark ULTRA プラットフォーム (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、プロトコールに従って実施した。一次抗体は以下を使用した。ウサギモノクローナル抗 PD-L1 (クローン SP263、prediluted; Roche)、ウサギモノクローナル抗 HER2 (クローン 4B5、prediluted; Roche)、マウスモノクローナル抗 p53 (クローン DO7、希釈 1:50; Novocastra, Newcastle upon Tyne、英国)、マウスモノクローナル抗 Rb (クローン G3-245、希釈 1:200 ; BD Pharmingen, San Diego, CA、米国)、マウスモノクローナル抗 MLH1 (クローン ES05、希釈 1:50 ; Leica, Wetzlar、ドイツ)、マウスモノクローナル抗 MSH2 (クローン FE11、希釈 1:50 ; Dako、Glostrup、デンマーク)、マウスモノクローナル抗 MSH6 (クローン EPR3945、希釈 1:500 ; Abcam、ケンブリッジ、英国)、マウスモノクローナル抗 Ki-67 (クローン 1:100 ; Dako、Glostrup、デンマーク)。

ノクローナル抗 PMS2 (クローン A16-4、prediluted; Roche)、マウスモノクローナル抗 HLA class I-A, B, C (クローン EMR8-5、希釈 1:1500、ホクドー、日本)。

PD-L1 の CPS を用いた評価法は、Kulangara らによって最初に提唱された (16,17)。CPS は全 PD-L1 陽性細胞 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ) の数を腫瘍細胞の総数で割ったものに 100 を乗じたスコアとして定義された。CPS の最大値は 100 とし、計算上 100 を超える場合は、100 とする。PD-L1 陽性細胞が不均一に分布し陽性細胞率の高い領域が複数箇所にもたがる場合には、陽性細胞が存在する代表的な異なる 4 視野を選択し、倍率 200 倍で撮影された画像から計算された結果を平均した値を、最終的に CPS とした。

FDA によって承認された胃癌患者のペムブロリズマブ治療適応の基準に基づいて、CPS が 1 以上の症例を PD-L1 陽性と定義し、PD-L1 CPS が 1 未満の症例を PD-L1 陰性と定義した (19)。また TPS については、Kulangara K らの方法に基づいて測定した。具体的には腫瘍細胞最低 100 個以上のうち細胞膜に PD-L1 が陽性となる腫瘍細胞の割合(%) を TPS とした (17)。

HER2 の免疫組織化学は、米国臨床腫瘍学会ガイドラインに従い、0、1+、2+、3+のスコアで評価した (43)。スコアが 2+の症例では、米国臨床腫瘍学会ガイドライン (43) に従って、ベンタナ INFORM HER2 Dual-Color ISH キット (Roche) を使用して、*HER2*

の Dual Color in situ Hybridization 法 (DISH) を実施し、*HER2* の増幅度を評価した。*HER2* 陽性判定は前述の ASCO のガイドラインに従い、*HER2* スコアが 3+、または *HER2* スコアが 2+ の症例で DISH を施行して *HER2*/CEN17 比が 2.0 以上を *HER2* 増幅ありとした。

腺癌成分合併症例では、腺癌成分と NEC 成分の両方を *HER2* 評価した。

P53 の評価は、びまん性で強い核内発現を有する症例 (90% 以上の腫瘍細胞が陽性) と完全に陰性の症例 (陽性腫瘍細胞 0%) は変異型 *p53* パターンと定義した。一方、腫瘍病巣内に *p53* 陽性細胞および *p53* 陰性細胞が混在している症例は野生型 *p53* パターンと定義した。*Rb* の評価は、背景の間質中のリンパ球や線維芽細胞などの内部陽性コントロールの存在下で腫瘍細胞における *Rb* の核を評価し、*Rb* が完全に消失した症例 (陽性腫瘍細胞 0%) を陰性と定義し、*Rb* 発現が保持された症例を陽性と分類した。

MMR 蛋白については、全ての腫瘍細胞の核における発現が完全に消失した場合を *MMR* 蛋白欠損とみなした。

HLA-Class I 染色の評価は、背景の正常上皮や浸潤リンパ球、マクロファージ、間質中の線維芽細胞、血管内皮細胞などの内部陽性コントロールの存在下で、腫瘍細胞における発現を以下の 2 段階で分類した。*HLA-Class I* 発現保持は先行研究に基づいて、腫瘍細胞の 50% 以上での高発現を示す症例とし、*HLA-Class I* 発現異常は高発現を示す腫瘍細胞

が 50%未満で、過半数の細胞に発現減弱または完全消失を認めた症例と定義した(44,45)。

免疫組織化学的評価は 2 人の観察者（山下智と阿部浩幸）によって独立して行われ、両者の判断の不一致があった場合は、多頭式顕微鏡を用いてスライドを再評価し、最終的な判断を行った。

MLH1 のメチル化解析

MMR 蛋白発現消失が認められた症例を対象に、*MLH1* プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化状態をメチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) を用いて解析した。

まず QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて、腫瘍および対応する正常組織の FFPE 切片からゲノム DNA を抽出した。

DNA (1mg) を、プロトコールに従って、EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN)を用いて、重亜硫酸ナトリウムで化学的に塩基を修飾した。*MLH1* 遺伝子プロモーターの CpG 島のメチル化状態を評価するためのメチル化特異的 PCR (MSP) は、先行報告を参考にして行った (46)。用いたプライマー配列は

メチル化特異プライマーが 5'-AACGAATTAATAGGAAGAGCGGAT-AGCG-3' (sense)及び 5'-CGTCCCTCCCTAAAACGACTACTACCC-3' (anti-sense)、非メチル化特異プライマー

が 5'-TAAAAATGAATTAATAGGAAGAGTGGATAGTG-3' (sense)及び 5'-AATCTCTTCATCCTCCCTAAAACA-3' (antisense)である。

反応は、100 ng のバイサルファイト修飾 DNA、2 ml の 10×PCR バッファー、0.2 mM の各 dNTP 混合物、0.2 mM の各プライマー、1 U の AmpliTaq Gold DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を含む総容量 20 ml で行った。反応混合物を 95°Cで 10 分間変性し、次いで 38 サイクル(95°Cで 30 秒、メチル特異的反応では 62°Cで 30 秒、非メチル特異的反応では 57°Cで 30 秒、72°Cで 30 秒)の増幅を行い、次いで 72°Cで 10 分間の最終延長を行った。陰性対照として正常サンプルからの DNA を用いた。陽性コントロールはヒト胃癌細胞株 MKN-74 から抽出した DNA を SssI methylase (New England BioLabs, MA, USA)で処理した DNA を用いた。

***BRAF* 遺伝子変異解析**

MMR 蛋白発現消失が認められた症例を対象に、*BRAF* V600 の変異状態を、先行研究の記載を参考として、Sanger sequence 法により解析した (47)。

プライマー配列は以下の通りであった：

5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATGA-3' (forward);

5'-CCACAAAATGGATCCAGACAAC-3' (reverse);

5'-GAAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTA-3' (sequencing).

腫瘍サンプルおよび対応する正常組織サンプルからの DNA を分析した。反応は、100 ng の DNA、2 ml の 10×PCR バッファー、0.2 mM の各 dNTP 混合物、0.2 mM の各プライマー、1 U の AmpliTaq Gold DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific)を含む総容量 20 ml で行った。反応混合物を 95℃で 10 分間変性し、次いで増幅を 45 サイクル(95℃で 30 秒、58℃で 30 秒、72℃で 30 秒)行い、次いで 72℃で 10 分間最終延長した。キャピラリーゲル電気泳動、データ収集および配列解析は、株式会社ファスマック（日本、厚木市）に委託した。

MSI 解析

MMR 蛋白発現消失が認められた症例を対象に、前述の腫瘍サンプルおよび対応する正常組織サンプルから抽出した DNA を用いて、MSI 解析を QMVR 法にて解析した。Promega 社 The MSI Analysis System, Version 1.2 を用い、プロトコールに従ってがん細胞におけるマイクロサテライトの繰り返し回数の変化の有無を調べた。プライマー配列は以下の通りである：

マイクロサテライト領域マーカー（BAT-26、NR-21、BAT-25、MONO-27、NR-24）からなるマルチプレックス蛍光標識プライマー

BAT-26：GenBank:U41210、標識：FL

NR-21 : GenBank:XM_033393、標識 : JOE

BAT-25 : GenBank:L04143、標識 : JOE

MONO-27 : GenBank:AC007684、標識 : JOE

NR-24 : GenBank:X60152、標識 : TMR

その他

Penta-C : GenBank:AL138752、標識 : TMR

Penta-D : GenBank:AC000014、標識 : FL

上記の 5 つのモノヌクレオチドリピート (BAT-26、NR-21、BAT-25、MONO-27、NR-24) を含む合計 7 つのマーカー (他、Penta-C、Penta-D) の共増幅のための蛍光標識プライマーを用いて、検体から抽出した DNA に上記プライマーを加えて PCR 増幅を行い、それぞれのマイクロサテライト領域を増幅した。PCR 増幅産物を DNA シーケンサーにてキャピラリー電気泳動を行うと、DNA のサイズに応じて分離され、その増幅量に応じたピークを検出した。DNA は、POP-4®ポリマーを用い ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer を用いて増幅・分析した。キャピラリーを用いて、正常サンプルと試験サンプルの対立遺伝子パターンを比較し、マイクロサテライトマーカーが 40%以上変化した場合を MSI-H と判定した。モノヌクレオチドリピートマーカーの変化が 40%未満の検体は、非 MSI-

H に分類した。

腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TILs)の評価

TIL は、国際免疫腫瘍バイオマーカーワーキンググループ (International Immunology Oncology Biomarker Working Group) によって提案された方法に従って、腫瘍全体の間質 TILs (stromal TILs (sTILs)) および腫瘍浸潤縁 TILs (peritumoral TILs) で評価した (48, 49)。具体的には、腫瘍全体の間質 (sTILs) または浸潤縁 (幅 1mm) (peritumoral TILs) における腫瘍浸潤リンパ球が占める面積の割合を、HE 染色スライドを用いて、顕微鏡下の観察により 10%刻みに半定量的に評価した。2 人の観察者 (山下智と阿部浩幸) がそれぞれ独立して sTILs と peritumoral TILs を評価した。両者の判断の不一致があった場合は、多頭式顕微鏡を用いてスライドを再評価し、最終的な判断を行った。中央値をカットオフ値として使用し、TIL が多い腫瘍と少ない腫瘍の 2 群に分けた。

PD-L1 と TILs による腫瘍免疫微小環境 (tumor immune microenvironment, TIME) の分類

先行研究に基づき、TILs と PD-L1 発現の有無に基づいて腫瘍免疫微小環境 (TIME) を分類した (27, 28)。T 細胞ベースの免疫療法の効果を腫瘍組織の TILs の存在／不在と、PD-L1 結合によってリンパ球が無効化されているかを 4 分類し各タイプを以下のように

定義した。タイプ I (TIL 高値、PD-L1 CPS \geq 1 陽性)、タイプ II (TIL 低値、PD-L1 CPS<1 陰性)、タイプ III (TIL 低値 PD-L1 CPS \geq 1 陽性)、タイプ IV (TIL 高値 PD-L1 CPS<1 陰性)。

統計分析

統計解析には、JMP PRO 11 統計ソフトウェア (SAS、Marlow、英国) を使用した。カテゴリーデータは両側 Fisher 正確検定を用いて分析し、連続変数は Mann-Whitney U 検定を用いて分析した。生存データについて Kaplan-Meier 曲線をプロットし、一般化 Wilcoxon 順位和検定を用いて比較した。 P 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意と判定した。

1-3. 結果

患者の特徴

本研究で対象となった胃 NEC 患者 25 例の臨床病理学的特徴を表 1-1 にまとめた。コホートは男性 21 人 (84%)、女性 4 人 (16%) で、年齢中央値は 73 歳 (範囲 52~86 歳)。1 人の早期癌 (pT1) を除いて、すべての患者が進行癌 (pT2 以上) であった。9 人 (36%) の患者が肝臓 (n=4)、腹膜 (n=3)、リンパ節 (n=3) に再発した。10 人 (40%) の患者が外科的切除後に補助化学療法を受けた。全ての症例で、抗 PD-1 抗体治療は行われていなかった。1 例残胃癌症例が含まれたが、前回手術は良性疾患に対して胃切除術された症例 (14 歳時十二指腸潰瘍に対して胃切除と Billroth II 法再建) である。全生存期間中央値は 84.1 ヶ月 (範囲、5.2~131 ヶ月) であった。

組織学的には、10 例は NEC 成分のみで構成された純粋な NEC で、7 例は NEC 成分主体で構成されているが腫瘍全体の 30%未満に腺癌成分の合併を認めた。したがって、25 例中 17 例 (68%) が NEC に分類され、残りの 8 例 (32%) は NEC 成分と腺癌成分の両方が腫瘍全体の 30%以上を占める MANEC に分類された。NEC 成分の組織学的サブタイプについては、小細胞型が 15 例、大細胞型が 10 例であった。リンパ節転移は 16 例 (64%) に認められ、リンパ管侵襲は 17 例 (68%)、静脈侵襲は 21 例 (84%) に認めら

れた。

PD-L1 CPS・TPS と臨床病理学的因子との関連

図 1-1 は、全症例の臨床病理学的因子と PD-L1 CPS・TPS の関係を示す。PD-L1 CPS は範囲 0.25～100 で、中央値は 7.8。PD-L1 CPS は、 ≥ 1 （陽性）が 18 例（72%）、 < 1 （陰性）が 7 例（28%）。PD-L1 TPS は範囲 0～100、中央値は 0.85。PD-L1 TPS $\geq 1\%$ （陽性）は 10 例（40%）であった。なお、CPS ≥ 1 陽性であるにも関わらず TPS $< 1\%$ 陰性症例は 8 例存在し、この症例は免疫細胞により強く PD-L1 の発現を認めた。TPS は CPS より計測範囲が狭いため、PD-L1 CPS と TPS の比較において TPS の方が CPS を上回る症例を 3 例認めた。図 1-2 に代表的な PD-L1 CPS ≥ 1 陽性例、CPS < 1 陰性例を示す。

なお PD-L1 CPS が最も高かった症例（Case#1）では、ほぼ全ての腫瘍細胞で PD-L1 のびまん性発現が認められ、MMR 欠損（MLH1 と PMS2 の発現消失）が認められた（図 1-3）。本症例は、EBER（Epstein-Barr virus-encoded small RNA）-ISH は陰性であった。

表 1-2 は、PD-L1 CPS ≥ 1 の症例と PD-L1 CPS < 1 の症例の臨床病理学的因子の比較を示したものである。リンパ節転移は PD-L1 CPS < 1 の症例の方が PD-L1 CPS ≥ 1 の症例よりも頻度が高かった（ $P=0.027$ ）。他の因子については両群間で有意差は認められなかった。生存解析では、統計的有意差はなかったが、PD-L1 CPS ≥ 1 の症例の方が PD-L1 CPS

<1 の症例よりも全生存期間が長い傾向にあった（生存期間中央値 131 vs 46 ヶ月 $P = 0.17$ ）（図 1-4）。

腺癌-NEC 混合例 15 例で PD-L1 発現強度を NEC 成分と腺癌成分で比較すると、8 例（53%）で同程度、5 例（33%）で腺癌成分が NEC 成分より PD-L1 発現が強く、2 例（13%）では NEC 成分の方が強く発現していた。

HER2 評価

Pure NEC 症例および腺癌-NEC 混合例の NEC 成分では、免疫組織化学的に全例 HER2 陰性であった。腺癌-NEC 混合 15 例中 6 例（40%）で腺癌成分のみ HER2 陽性であった。その内訳は 4 例で免疫組織化学的にスコア 3+（*Case #8, 9, 13, 21*）、免疫組織化学的にスコア 2+を認めた 3 例（*Case#14, 17, 23*）に対して DISH を施行し 2 例（*Case#14, 23*）に *HER2* 遺伝子の増幅を認めた（*HER2/CEN17* 比 4.13、2.01）。また、DISH を施行した 3 例（*Case#14, 17, 23*）において、同一切片内で NEC 成分が観察可能であったので、NEC 成分に対して *HER2* 遺伝子増幅の評価を施行した。*Case#14* において NEC 成分の *HER2* 遺伝子の増幅を認めた（*HER2/CEN17* 比：NEC 成分 2.34、腺癌成分 4.13 増幅有り）。*Case#17, 23* の NEC 成分においては、*HER2* 遺伝子の増幅は認めなかった。（*HER2/CEN17* 比：NEC 成分 1.19 腺癌成分 1.88、NEC 成分 1.31 腺癌成分 2.01）

Rb と p53 の免疫組織化学

変異型 p53 パターン（びまん性の強陽性または完全な消失）は 17 例（68%）、Rb 発現の完全消失は 9 例（36%）に認められた。Rb は腫瘍細胞核において完全消失または発現保持かの 2 パターンであった。腫瘍内で不均一な陽性像（発現保持された領域と発現が完全に消失した領域が混在する像）は認められなかった。p53 と Rb の発現パターンには有意な相関は認められなかった（ $P=0.43$ ）。また p53 と Rb の発現パターンは、PD-L1 CPS や他の臨床病理学的因子との関連は認めなかった。腺癌-NEC 混合例で腺癌成分と NEC 成分を比較すると、15 例中 12 例（80%）では p53 と Rb いずれも同じ発現パターンを示した（p53：変異型 9 例／野生型 5 例で同一パターン、Rb：欠損 4 例／発現保持 9 例で同一パターン）。2 例（13%）では Rb 発現が NEC 成分のみで消失し腺癌成分では保持されていた。1 例（7%）では p53 が NEC 成分と腺癌成分の一部で変異パターン（完全消失）を示したが、腺癌成分の他の部分では野生型パターンを示した。図 1-5 では代表的な Rb と p53 の発現異常パターンを示した症例を示す（Case#7）。

MMR 欠損腫瘍

MMR 欠損は 25 例中 4 例（16%）で認め、NEC3 例と MANEC1 例であった。4 例全てで MLH1 と PMS2 発現の完全な消失を認めたが、MSH2 と MSH6 発現は保持されていた。

た。4 例中 3 例は PD-L1 陽性 ($CPS \geq 1$)、1 例は PD-L1 陰性 ($CPS < 1$) であった。リンチ症候群を疑う既往歴や家族歴はいずれにも認めなかった。メチル化特異的 PCR (MSP) により、4 例中 3 例 (*Case #1, 13, 23*) で *MLH1* プロモーターの異常なメチル化を認めた (図 1-6)。MSI 解析にて 4 例中 3 例 (*Case #1, 6, 23*) で MSI-High が認められた (図 1-1)。 *BRAF* V600E 変異は 4 例全てに認めなかった (図 1-7)。

TIL と PD-L1 発現

sTILs と PD-L1 CPS との間に有意な関連はなかったが、高い peritumoral TIL と PD-L1 $CPS \geq 1$ が有意に相関した ($P < 0.001$) (表 1-2)。小細胞型と大細胞型の間では、sTILs および peritumoral TILs に有意な差はなかった。

HLA-Class I の発現

HLA-Class I の発現は 21 例 (84%) で保持されていた。HLA-Class I の発現異常は 4 例 (16%) に認められた。発現異常は、腫瘍組織内で不均一性 (intratumoral heterogeneity) が認められ、その内訳は一部の NEC 成分の腫瘍細胞が陰性化から発現減弱している症例が 3 例、NEC 成分の腫瘍部分の大部分が陰性化していた症例が 1 例認めた。図 1-8 では代表的な HLA-Class I の発現保持パターンと発現異常パターン (発現減弱) を示した症例を示す (*Case#1* と *Case#16*)。

PD-L1 CPS \geq 1 の陽性症例 18 例中 16 例(88%)に HLA-Class I が発現保持されていた。

HLA-Class I 発現の NEC と腺癌成分の発現比較では、腺癌合併例の全 15 例中 8 例(53%)

で同等、5 例 (33%) で NEC 成分の方が高発現、2 例 (13%) で腺癌成分の方が高発現

を示した。HLA class I 発現異常とその他の臨床病理学的因子との関連は認められなかつ

た(表 1-3)。

1-4. 考察

本研究は胃 NEC において CPS を用いて PD-L1 の発現を評価した初めての研究である。PD-L1 CPS が 1 以上の症例が比較的高い割合（72%）で存在することが確認され、PD-L1 が胃 NEC の治療標的となる可能性が示唆された。しかし、今回の研究では NEC 成分には HER2 が全く発現していないことから、HER2 は胃 NEC の治療標的になる可能性は低いことが示された。

PD-L1 免疫組織化学に基づくスコアリング方法については、腫瘍割合スコア（TPS, tumour proportion score すなわち陽性腫瘍細胞の割合）よりも PD-L1 CPS の方が、胃癌患者におけるペムブロリズマブに対する反応性を予測するための信頼性の高い方法と考えられている（17,50）。Kulangara 氏らは、再発・転移性胃癌または食道胃接合部癌患者を対象にペムブロリズマブ単独または化学療法との併用を評価する第 2 相試験 KEYNOTE-059 試験において、バイオマーカーとして PD-L1 CPS と TPS を比較し、ペムブロリズマブの奏効を予測する能力を評価した（17）。この研究では、PD-L1 CPS のカットオフを 1 とした場合、PD-L1 発現症例の割合は 57.6%であり、奏効率は上昇した（オッズ比、2.8）。一方で、TPS を 1%とした場合、PD-L1 発現症例の割合は 12.5%であり、奏効率の増加はわずかであった（オッズ比、1.4）。これらの結果から、PD-L1 免疫組織化学に基づく PD-

L1 CPS が 1 以上の患者における胃癌の 3rd line 治療として、ペムブロリズマブが FDA に承認された。

PD-L1 CPS が最も高かった 1 例 (*Case#1*) を含む 4 例 (16%) では MMR 発現の消失が認められた。先行研究では、NEC 2 例と MANEC 2 例を含む 36 例中 4 例 (11%) で胃の NEC のマイクロサテライト不安定性が報告されている (29)。マイクロサテライト不安定性を示す固形腫瘍は臓器を問わず免疫チェックポイント阻害剤の適応と考えられていることから、胃 NEC においてもマイクロサテライト不安定性の確認が免疫チェックポイント阻害薬の適応を判定するうえで重要と考えられる。なお本研究では 4 例の MMR 消失胃 NEC は全例で *BRAF* 変異が無く、3 例で *MLH1* プロモーターのメチル化が確認され、3 例に MSI-High が確認された。これらの結果は、マイクロサテライト不安定性を有する胃癌ではプロモーターのメチル化による *MLH1* のサイレンシングが高頻度に認められる一方、*BRAF* 変異が非常にまれであることという過去の報告と一致している(31)。MMR 蛋白発現消失と *MLH1* プロモーターメチル化及び MSI 解析結果の不一致について以下に考察する。免疫組織化学的に dMMR は 4 例 (全例 *MLH1*、*PMS2* 発現消失、*MSH2*、*MSH6* 発現保持) 認められ、3 例 *MLH1* プロモーターのメチル化を認め、MSI は 3 例認められたが、*Case#6* と *#13* の結果が解離した。*Case#6* は *MLH1* プロモーターのメチル化が検出

されなかったが、MSI-H が確認された。原因として *MLH1* の遺伝子異常や *MLH1* プロモーターの MSP 解析箇所以外の部位のメチル化の可能性が考えられた。Lynch 症候群関連がんでは *MLH1* のプロモーターのメチル化はみられないため Lynch 症候群関連がんの可能性も考えられる（但し本例に Lynch 症候群を疑わせる家族歴や既往歴は無かった）。

Case#13 は *MLH1* のプロモーターメチル化が検出されたが、MSS の結果であった。*MLH1* 発現消失と *MLH1* のプロモーターメチル化が認められるのに、MSS になってしまった理由については、MSH2/MSH6 が補完した可能性や、塩基の長さの変化が少ない、腫瘍細胞比率が低い等の理由でフラグメント解析が偽陰性となってしまった可能性が考えられた。

また、MMR 蛋白発現消失した 4 例の組織型に関して、小細胞型 3 例、大細胞型 1 例と小細胞型の方が多かった。しかし、胃 NEC36 例を含む消化管 NEC の MSI に関する先行研究では MSI 消化管 NEC11 例中 6 例（54%）が大細胞型であった（29）。本邦からの最近報告された胃の NEC13 例に関する全ゲノムシーケンシングによる MSI 解析の研究結果では、1 例に MSI-High を認めたが、その組織型は大細胞型であった（34）。ゆえに MSI-High を呈する胃 NEC における組織学的特徴に関しては現時点では不明である。

HER2 に関しては、MANEC 症例 15 例中 6 例(40%)で腺癌成分のみで HER2 陽性を示した。現在の胃癌における HER2 検査のガイドライン(43)によると、生検サンプルに含

まれる腫瘍細胞集塊が1つ以上、または外科的切除組織切片に含まれる腫瘍細胞の10%以上が免疫組織化学的にスコア3+、またはスコア2+で *HER2* 遺伝子増幅が認められれば、*HER2* 陽性と判断される。たとえ腺癌成分のみが *HER2* 陽性を示す場合でも、胃 NEC 患者、特に腺癌-NEC 混合型症例では、転移病変が腺癌成分よりも NEC 成分で構成されている場合が多いため、抗 *HER2* 療法が無効な可能性が高いと推測され、抗 *HER2* 薬の使用には慎重になるべきと考えられる (51)。本研究でも、リンパ節転移陽性16例における転移巣の組織型を検討すると、10例(62.5%)に NEC 成分の転移を認め、4例(25%)が NEC 成分・腺癌成分の混在型、2例(12.5%)が腺癌成分のみであり、多くのリンパ節転移成分に NEC が含まれていた。リンパ節転移陽性16例中8例が原発巣 Pure NEC、8例原発巣に腺癌合併であった。原発巣が Pure NEC であった症例8例中8例全例(100%)リンパ節転移成分も NEC であった。原発巣に腺癌成分が合併している8例中4例(50%)で原発巣の腺癌成分が *HER2* 陽性だった症例を認めた。その4例のリンパ節転移巣の成分の内訳は、腺癌・NEC 成分混在が2例、腺癌成分のみが1例、NEC 成分のみが1例であった。原発巣が *HER2* 陽性かつリンパ節転移巣に腺癌成分を認める3例のリンパ節転移巣に対して、免疫組織化学的に *HER2* の検索を行った。結果は3例中1例のリンパ節転移巣の腺癌成分で *HER2* スコア3+のリンパ節転移巣を1個(1/3)認めた。その他の腺

癌成分や混合型、NEC 成分のリンパ節転移巣はいずれも HER2 スコア 0 であり、免疫組織化学的に HER2 蛋白の過剰発現は認められなかった。よってまとめると、腺癌合併 NEC15 例中 8 例 (53%) にリンパ節転移を認め、4 例 (27%) が原発巣の腺癌成分に HER2 陽性をみとめ、その中の 1 例 (7%) の 3 個中 1 個のリンパ節転移巣の腺癌成分に HER2 陽性が認められた。HER2 陽性腺癌合併胃 NEC の転移巣には HER2 陽性腺癌成分の転移が稀に認められるが、大半の転移巣は HER2 陰性であることを確認した。また、免疫組織化学的に NEC 成分では全例 HER2 蛋白の過剰発現は認められなかったが、腺癌成分で免疫組織化学的にスコア 2+を認め DISH を施行した 3 例において、NEC 成分の *HER2* 遺伝子増幅の有無の検討を行ったところ、1 例に *HER2* 遺伝子の増幅が認められた (Case#14、*HER2*/CEN17 比 : NEC 成分 2.34 、腺癌成分 4.13)。 *HER2* 遺伝子増幅がある腺癌を合併する NEC では、*HER2* 遺伝子増幅があっても蛋白の発現は抑制される可能性が考えられた。

HLA-Class I は CD8 陽性 T 細胞への抗原提示の役割を果たす働きがあることが知られている。HLA の発現が低下すると、免疫逃避的な腫瘍表現型を呈することが知られ、胃癌の 63%で HLA class I の発現が低下していることが先行研究で報告されている (20,21)。胃癌では HLA-A*24:02 ハプロタイプをターゲットとした OTSGC-A24 ワクチンが開発

され、化学療法や免疫チェックポイント阻害剤との併用療法が臨床試験で検討されている (22, 52)。また T 細胞ベースの免疫治療である PD-1/PD-L1 経路阻害剤は HLA-Class I 陰性腫瘍細胞には効きにくいことが報告されている (24)。よって、PD-L1 CPS \geq 1 の陽性症例であっても、HLA-Class I 陰性症例は、T 細胞免疫による抗腫瘍効果が期待できない可能性が考えられる。したがって HLA-Class I 発現状態も併せて考慮すると、本研究において PD-1/PD-L1 経路阻害剤単独で抗腫瘍活性を期待できるのは、PD-L1 CPS \geq 1 かつ HLA-Class I 発現が保持された 16 症例 (64%) と考えられる。現在、T 細胞を介した免疫療法が効きにくい HLA-Class I 陰性腫瘍を対象に、ナチュラルキラー細胞チェックポイント阻害剤が開発され臨床応用が検討されている (24)。

TILs に関しては、先行報告では、腫瘍浸潤リンパ球の病理形態学的特徴として腫瘍周囲反応、ネスト内反応、リンパ様反応、間質反応の 4 形態が報告されている。この中で腫瘍周囲反応である腫瘍浸潤縁の TIL (peritumoral TIL) の密度は、免疫チェックポイント阻害剤応答を予測する可能性が報告されている (25)。本研究の胃 NEC においては、高い peritumoral TIL と PD-L1 CPS \geq 1 が有意に相関していた ($P < 0.001$)。胃 NEC の結果に PD-L1 と TILs による TIME 分類 (27, 28) を外挿すると、PD-L1 陽性 (CPS \geq 1) 症例 18 例において、peritumoral TIL 高値との組み合わせ (TIME 分類 Type1) は 14 例 (78%) に

見られた。一方で、CPS<1 の PD-L1 陰性症例 7 例においては、peritumoral TIL は全例で低値であった (TIME 分類 Type2)。つまり、胃 NEC においては、PD-L1 陽性群において、TIME 分類 Type1 が多く、PD-L1 の結合によって無効にされた TIL を有した腫瘍が多いと考えられ、PD-1/PD-L1 阻害剤単独療法が有効である可能性が高いと考えられる。また、PD-L1 陰性群は全例が TIME 分類 Type2 であり、TIL を伴わない PD-L1 陰性、つまり免疫無視状態であることが考えられる。既存の TIL がいないため、T 細胞性免疫を賦活化し腫瘍内にリンパ球を取り込む必要がある。幸いにして HLA-Class I は PD-L1 陰性症例 7 例中 5 例 (71%) に発現が保持されているため、がんペプチドワクチンによる細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応を誘導する上乗せ効果が期待できる可能性が示唆された。また、抗 CTLA-4 抗体併用で T 細胞を賦活化し腫瘍内に取り込む治療戦略も考えられる。

本研究の問題点の一つは症例数が少ないことであるが、胃 NEC の希少性を考慮すると単一施設症例シリーズとしては必ずしも小規模ではなく、一定の意義ある結果と考えられる。また NEC で PD-L1 発現が高頻度であることを示したが、これは必ずしも PD-L1/PD-1 遮断療法が奏功することを意味するものではない。例えば肺 NEC (小細胞癌) においては、PD-L1 の発現によらずに抗 PD-L1 抗体が抗腫瘍効果を発揮することが報告されている (53)。CPS の抗 PD-1 抗体効果予測への有効性はあくまで胃及び食道胃接合部の腺

癌に対して示されたものであり、本当に PD-L1 CPS 陽性の胃 NEC に抗 PD-1 薬が有効であるか否かは、胃 NEC 患者を登録した臨床試験で検証される必要がある。

また本研究では PD-L1 免疫組織化学に SP263 抗体クローンを使用した。FDA で承認されたペムブロリズマブによる治療選択のためのコンパニオン診断テストである、PD-L1 CPS の有用性を検証した臨床試験で使用された 22C3 pharmDx アッセイ (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA) を本研究では用いてない (17, 19)。しかし、22C3 抗体と SP263 抗体の双方とも PD-L1 スコアリングにおいて高い一致性を示しており、2 つのアッセイは互換性があることが示唆されている (54-56)。実際、最近の研究では、379 例の胃癌患者を対象に 22C3 抗体と SP263 抗体の両方を用いて PD-L1 免疫組織化学を行い、2 つの抗体間の PD-L1 CPS がよく一致することが報告されている。CPS カットオフを 1 とした場合、22C3 抗体では 219 例 (57.8%)、SP263 抗体では 231 例 (60.9%) が PD-L1 陽性であった (50)。したがって、22C3 抗体を使用したとしても、SP263 抗体を用いた本研究と概ね一致する結果が得られた可能性が高いと考えられる。

以上の内容をまとめると、胃 NEC において PD-L1 陽性 ($CPS \geq 1$) が 72% の症例に認められ、PD-L1 陽性かつ HLA-Class I 発現が保持された症例も 64% を占めた。PD-1/PD-L1 経路は胃 NEC に対する有効な治療標的として期待された。HLA-Class I の発現が保た

れた 84%にはがんペプチドワクチンが有効な治療選択肢として期待される。一方、HER2

発現は NEC 成分には全く認められず、有効な治療標的にはなりにくいと考えられる。

表 1-1. 胃神経内分泌癌 25 例の臨床病理学的因子

因子		All patients (n = 25)
年齢 (歳)		52–86 (中央値, 73)
性別	男性	21 (84%)
	女性	4 (16%)
腫瘍サイズ(mm)		15–145 (中央値, 49)
肉眼型	Type 0-IIa (表面隆起型)	1 (4%)
	Type 1	3 (12%)
	Type 2	12 (48%)
	Type 3	9 (36%)
	Type 4	0 (0%)
部位	上部	8 (32%)
	中部	7 (28%)
	下部	9 (36%)
	残胃	1 (4%)
pT stage	pT1	1 (4%)
	pT2–4	24 (96%)
pN stage	pN0	9 (36%)
	pN1–3	16 (64%)
pTNM Stage	I–II	16 (64%)
	III–IV	9 (36%)
リンパ管侵襲	なし	8 (32%)
	あり	17 (68%)
静脈侵襲	なし	4 (16%)
	あり	21 (84%)
組織型	NEC	17 (68%)
	MANEC	8 (32%)
NEC 成分の亜分類	大細胞型	10 (40%)
	小細胞型	15 (60%)
間質 TILs (sTILs) (%)		1–70 (中央値, 30)
	≥ 30%	15 (60%)
	< 30%	10 (40%)
腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoural TILs) (%)		20–80 (中央値, 50)
	≥ 50%	14 (56%)
	< 50%	11 (44%)

MMR 蛋白	欠失	4 (16%)
	保持	21 (84%)
転帰	原病死	8 (32%)
	他病死	5 (20%)
	有病生存	1 (4%)
	無病生存	11 (44%)
再発	なし	16 (64%)
	あり	9 (36%)

CPS, combined positive score; NEC, neuroendocrine carcinoma 神経内分泌癌; MANEC, mixed adenoneuroendocrine carcinoma 混合型腺神経内分泌癌; TILs, tumour-infiltrating lymphocytes 腫瘍浸潤リンパ球; MMR, mismatch repair ミスマッチ修復

表 1-2. 胃 NEC25 例の PD-L1 CPS ≥ 1 または < 1 の臨床病理学的因子の比較

臨床病理学的因子		CPS ≥ 1 (n = 18)	CPS < 1 (n = 7)	p value
年齢 (歳)		52–83 (中央値, 72)	52–86 (中央値, 77)	0.24
性別	男性	14 (78%)	7 (100%)	0.29
	女性	4 (22%)	0 (0%)	
腫瘍サイズ(mm)		15–145 (中央値, 58)	23–105 (中央値, 42)	0.63
pT stage	pT1	1 (6%)	0 (0%)	1
	pT2–4	17 (94%)	7 (100%)	
pN stage	pN0	9 (50%)	0 (0%)	0.027
	pN1–3	9 (50%)	7 (100%)	
pTNM stage	Stage I, II	12 (67%)	4 (57%)	0.67
	Stage III, IV	6 (33%)	3 (43%)	
組織型	NEC	11 (61%)	6 (86%)	0.36
	MANEC	7 (39%)	1 (14%)	
NEC 成分の亜分類	大細胞型	7 (39%)	3 (43%)	1
	小細胞型	11 (61%)	4 (57%)	
リンパ管侵襲	なし	8 (44%)	0 (0%)	0.057
	あり	10 (56%)	7 (100%)	
静脈侵襲	なし	4 (22%)	0 (0%)	0.29
	あり	14 (78%)	7 (100%)	
p53	野生型	7 (39%)	1 (14%)	0.36
	変異型	11 (61%)	6 (86%)	
Rb	欠損	5 (28%)	4 (57%)	0.205
	発現保持	13 (72%)	3 (43%)	
間質 TILs (sTILs)	$\geq 30\%$	13 (72%)	2 (29%)	0.075
	$< 30\%$	5 (28%)	5 (71%)	
腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoural TILs)	$\geq 50\%$	14 (78%)	0 (0%)	0.0007
	$< 50\%$	4 (22%)	7 (100%)	
MMR 蛋白	欠失	3 (17%)	1 (14%)	1
	保持	15 (83%)	6 (86%)	

CPS, combined positive score; NEC, neuroendocrine carcinoma 神経内分泌癌; MANEC, mixed adenoneuroendocrine carcinoma 混合型腺神経内分泌癌; TILs, tumour-infiltrating lymphocytes 腫瘍浸潤リンパ球; MMR, mismatch repair ミスマッチ修復

表 1-3. 胃 NEC25 例の HLA-Class I 発現による臨床病理学的因子の比較

臨床病理学的因子		HLA-Class I		<i>p</i> value
		Loss (n = 4)	Retained (n = 21)	
年齢 (歳)	範囲 (中央値)	52-75 (65)	52-86 (75)	0.095
性別	男性	3 (12%)	18 (72%)	0.53
	女性	1 (4%)	3 (12%)	
腫瘍径 (mm)	範囲 (中央値)	28-105 (73)	15-145 (49)	0.39
pT stage	pT1	0 (0%)	1 (4%)	1
	pT2-4	4 (16%)	20 (80%)	
pN stage	pN0	2 (8%)	7 (28%)	0.6
	pN1-3	2 (8%)	14 (56%)	
pTNM stage	Stage I, II	2 (8%)	14 (56%)	0.6
	Stage III, IV	2 (8%)	7 (28%)	
組織型	NEC	3 (12%)	14 (56%)	1
	MANEC	1 (4%)	7 (28%)	
NEC 成分の亜分類	大細胞型	1 (4%)	9 (36%)	0.63
	小細胞型	3 (12%)	12 (48%)	
リンパ管侵襲	なし	1 (4%)	7 (28%)	1
	あり	3 (12%)	14 (56%)	
静脈侵襲	なし	1 (4%)	3 (12%)	0.53
	あり	3 (12%)	18 (72%)	
p53	野生型	1 (4%)	7 (28%)	1
	変異型	3 (12%)	14 (56%)	
Rb	欠損	2 (8%)	7 (28%)	0.6
	保持	2 (8%)	14 (56%)	
sTILs	範囲 (中央値)	10-40 (30)	1-70 (30)	0.91
	≥ 30% (高値)	3 (12%)	12 (48%)	0.63
	< 30% (低値)	1 (4%)	9 (36%)	
peri-tumoural TILs	範囲 (中央値)	20-70 (50)	20-80 (50)	0.91
	≥ 50% (高値)	2 (8%)	12 (48%)	1

	< 50% (低値)	2 (8%)	9 (36%)	
MMR 蛋白	欠失	0 (0%)	4 (16%)	1
	保持	4 (16%)	17 (68%)	
PD-L1	CPS ≥ 1 陽性	2 (8%)	16 (64%)	0.55
	CPS < 1 陰性	2 (8%)	5 (20%)	

CPS, combined positive score; NEC, neuroendocrine carcinoma 神経内分泌癌; MANEC, mixed adenoneuroendocrine carcinoma 混合型腺神経内分泌癌; sTILs, stromal tumour-infiltrating lymphocytes 間質腫瘍組織浸潤リンパ球; MMR, mismatch repair ミスマッチ修復タンパク

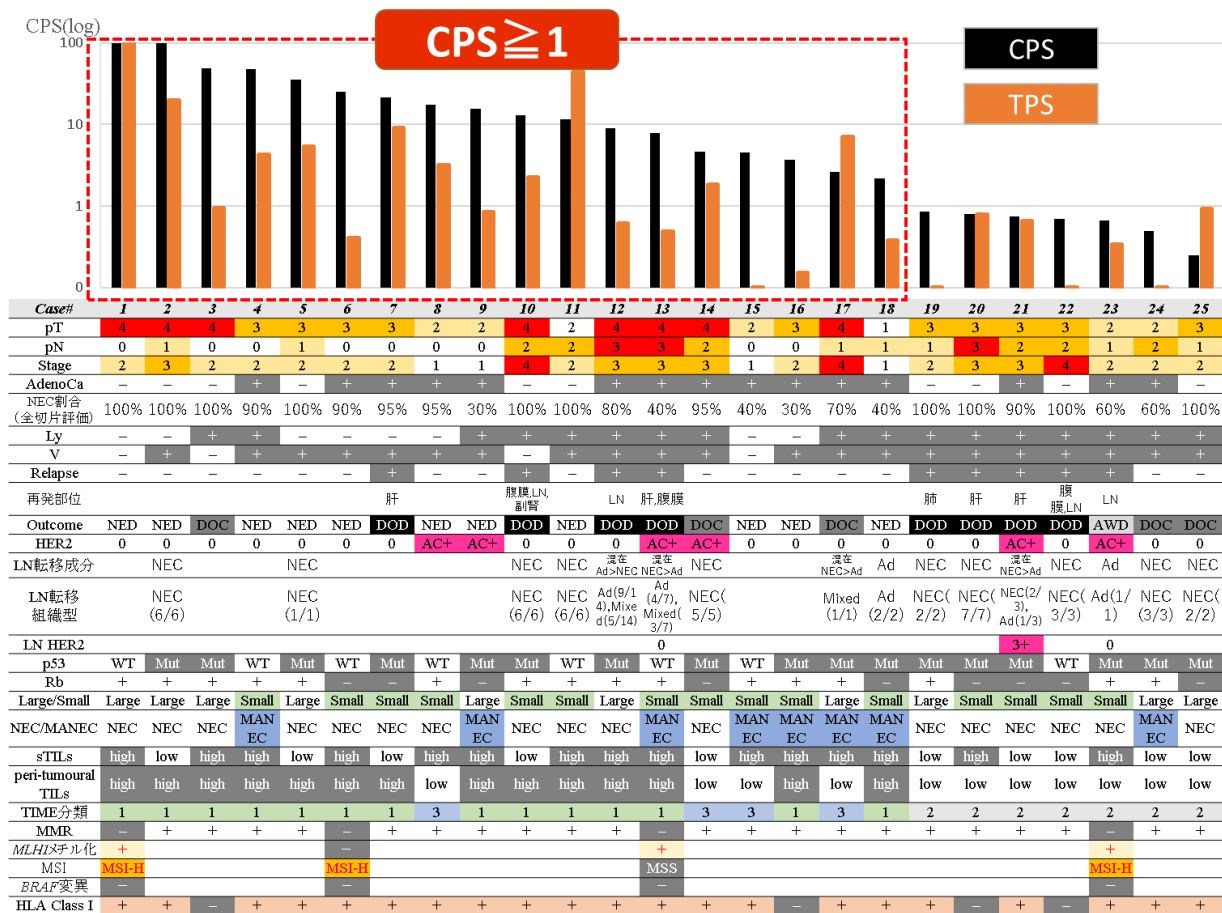


図 1-1.25 例の胃神経内分泌癌の PD-L1 CPS と臨床病理学的因子

略語：AC±, 腺癌成分のみで HER2 陽性； AdenoCa, 腺癌成分の有無； AWD, Alive

with disease 有病生存； DOC, dead of other causes 他病死； DOD, dead of disease 原病

死； Large, 大細胞型； LN, リンパ節； Ly, リンパ管侵襲； MANEC, 混合腺神

経内分泌癌； Mut, 変異型パターン； NEC, 神経内分泌癌； NED, Alive with no evidence

of disease 無病生存； Small, 小細胞型； V, 静脈侵襲； WT, 野生型パターン

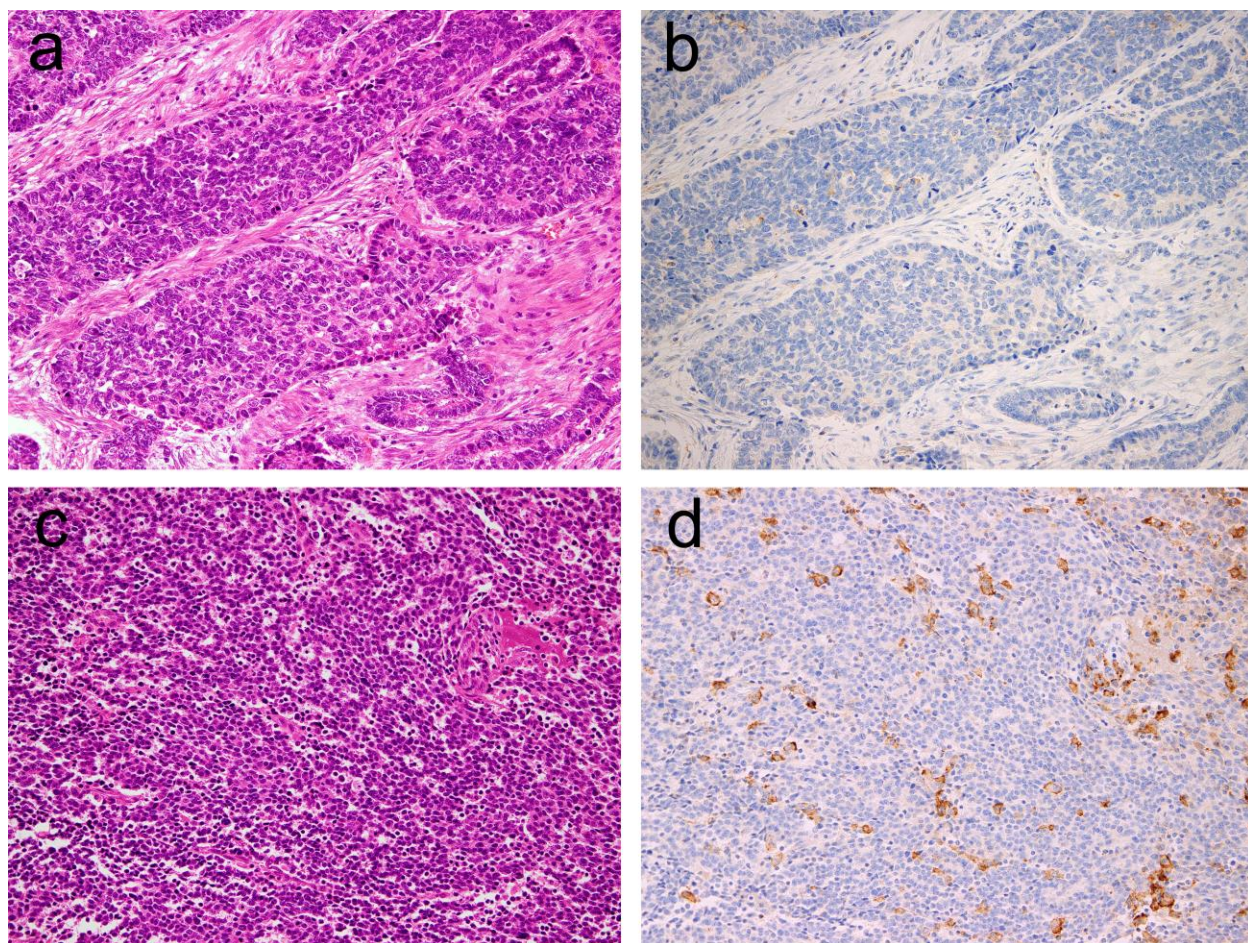


図 1-2. 胃神経内分泌癌における PD-L1 の免疫組織化学

(a, b) PD-L1 CPS<1 の代表的症例。大細胞型神経内分泌癌。充実性でロゼット状の形態を示す。PD-L1 陽性細胞はごく少数である。(c, d) PD-L1 CPS \geq 1 の代表的症例。小細胞型神経内分泌癌。充実性シート状に N/C 比の高い腫瘍細胞を認める。PD-L1 発現細胞が多数存在する。PD-L1 を発現する細胞は、この症例では腫瘍間質の免疫細胞であった。(a, c) HE 染色。(b, d) PD-L1 免疫組織化学。

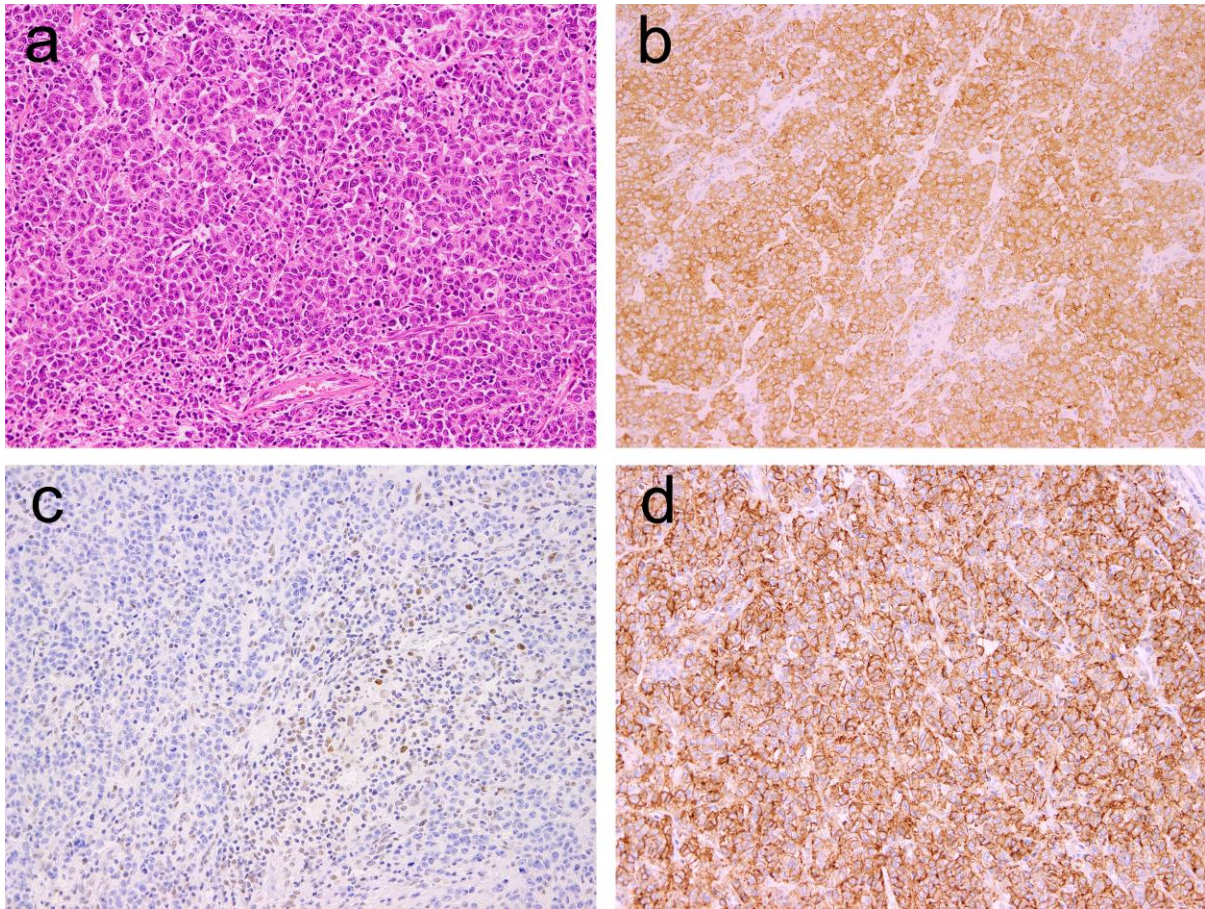


図 1-3. MLH1 発現消失を示す PD-L1 びまん性陽性の CPS 最高値症例 (Case#1)

この腫瘍は大細胞神経内分泌癌の典型的な形態を示し、リンパ球浸潤を伴う充実性シート状索状構造を形成する大型の細胞で構成されている。synaptophysin がびまん性に陽性である。腫瘍細胞は MLH1 発現の完全な消失を示した。内部コントロールである間質の非腫瘍性細胞が陽性に染色される。ほぼ全ての腫瘍細胞において、PD-L1 はびまん性で強陽性である。(a) HE 染色。(b) synaptophysin 免疫組織化学。(c) MLH1 免疫組織化学。(d) PD-L1 免疫組織化学。

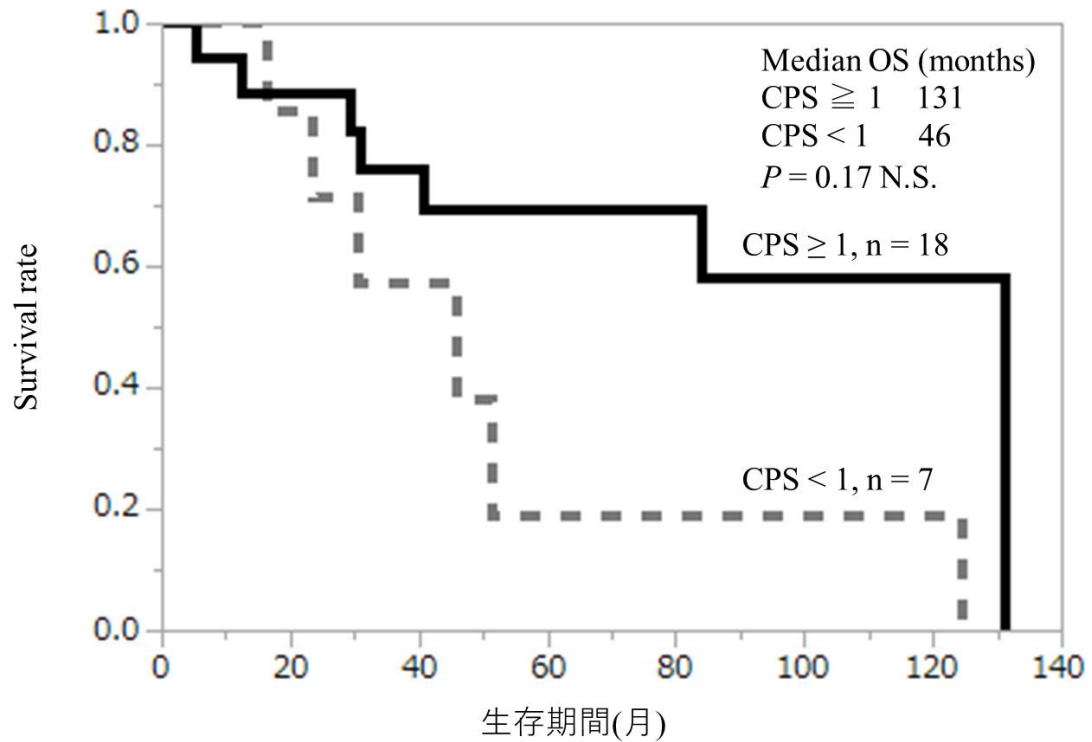


図 1-4.胃 NEC 手術 25 例の PD-L1 CPS ≥ 1 またはそれ未満での生存分析

PD-L1 CPS ≥ 1 の症例と PD-L1 CPS<1 の二群に分けて生存解析を施行した。統計的有意差は認めなかったが、PD-L1 CPS ≥ 1 の症例の方が PD-L1 CPS<1 の症例よりも全生存期間が長い傾向にあった（生存期間中央値 131 vs 46 ヶ月 $P = 0.17$ N.S.）。

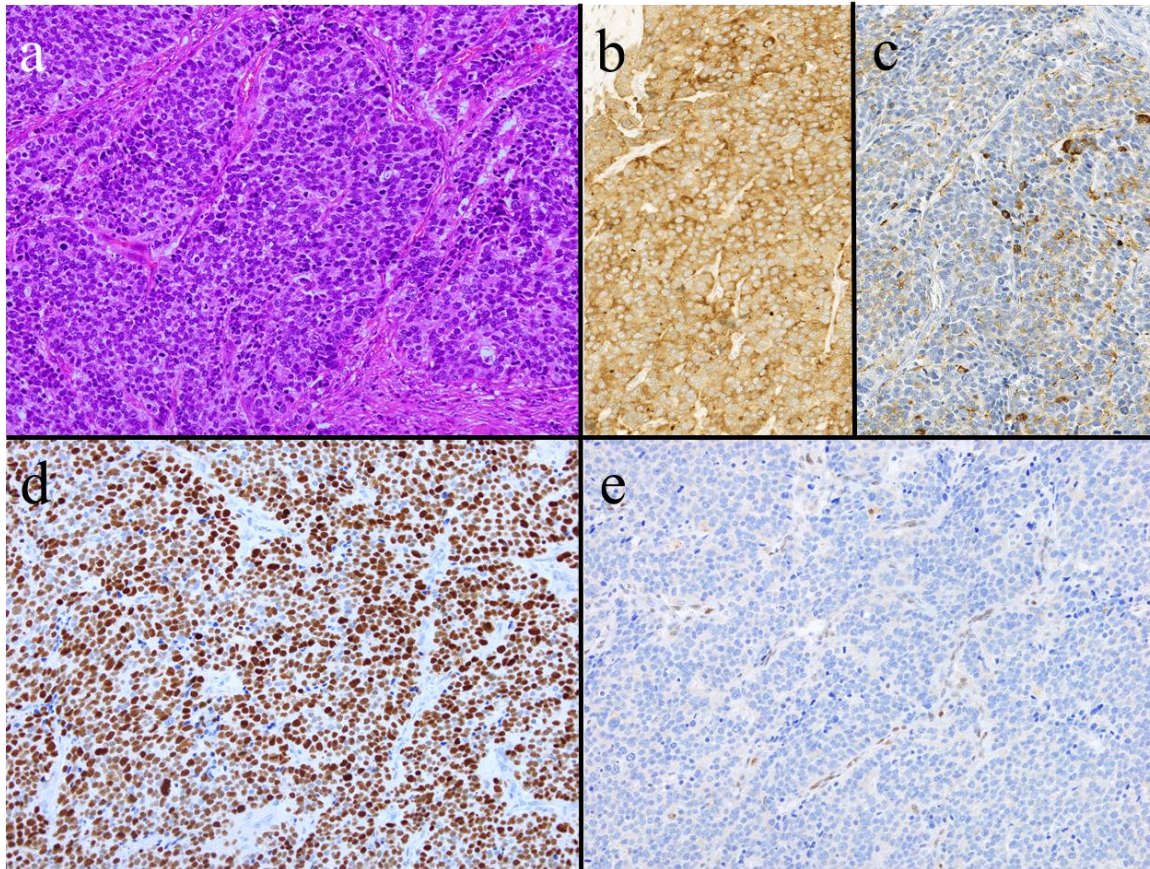
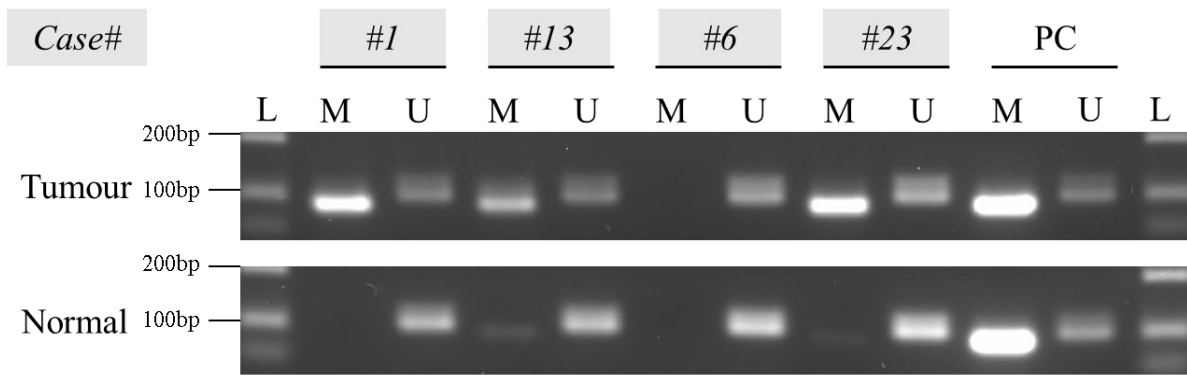


図 1-5. p53 と Rb の発現異常パターンを示す代表例（#Case7）

この腫瘍は小細胞神経内分泌癌の形態を示し、充実性構造を形成する小型の細胞で構成されている。synaptophysin びまん性陽性、chromogranin A 一部陽性を示す。また p53 はびまん性陽性(変異型パターン)、Rb の発現は消失している(Rb は腫瘍内の毛細血管内皮細胞(内部コントロール)に陽性が確認される)。(a)HE 染色。(b) synaptophysin 免疫組織化学。(c) chromogranin A 免疫組織化学。(d)p53 免疫組織化学。(e)Rb 免疫組織化学。



M: Methylated
 U: Unmethylated
 L: 100bp ladder
 PC: positive control

図 1-6. *MLH1* プロモーターのメチル化特異的 PCR の結果

メチル化 (M) または非メチル化 (U) 対立遺伝子を実異的に増幅するプライマーを用いた *MLH1* MSP アッセイの結果。症例番号 # 1、# 13、# 23は、それぞれの DNA サンプルにおいて *MLH1* 遺伝子プロモーターのメチル化が示された。# 6のみ、*MLH1* 遺伝子のメチル化は認められなかった。

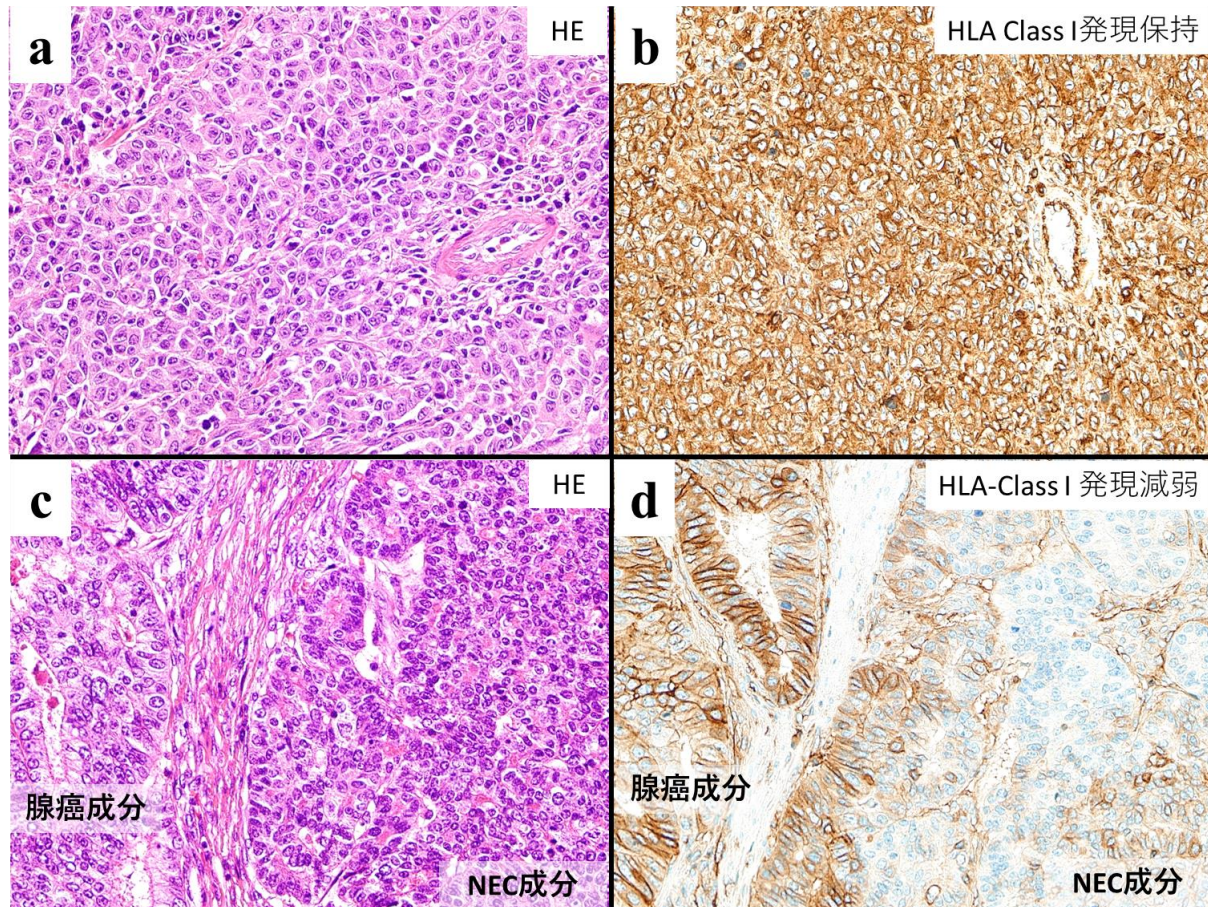


図 1-8. HLA-Class I 発現保持パターンと発現異常パターンの代表例

(a, b) HLA-Class I 発現保持パターンの代表的症例 (#Case1)。大細胞型神経内分泌癌。充実性シート状索状構造を形成する大型の細胞で構成されている。(c, d) HLA-Class I 発現異常パターンの代表的症例 (#Case16)。小細胞型神経内分泌癌。HLA-Class I は合併する腺癌成分で発現保持されているが、NEC 成分で発現減弱している。(a, c) HE 染色。(b, d) HLA-Class I 免疫組織化学。

第二部 食道神経内分泌癌における免疫治療関連分子発現の検討

2-1. 背景

食道の神経内分泌癌（neuroendocrine carcinoma, NEC）は稀な組織型で、全食道悪性腫瘍の 0.4～2%である（57-59）。食道 NEC は浸潤性が高く、遠隔臓器およびリンパ節への転移を伴うことが多い（60）。これらの予後は総じて不良であり、有効な治療戦略は確立されていない。特に外科的切除を受けた症例では予後が扁平上皮癌と比べて不良であり（61）、手術適応も補助療法の重要性も確立されていない。日本神経内分泌腫瘍研究会が最近編集した膵・消化管神経内分泌腫瘍（GEP-NEN）診療ガイドライン 2019 年は、消化管 NEC の治療戦略を再検討し、それらの浸潤性と治療の難しさについても強調している（62）。食道 NEC の治療は胃 NEC と同様に、現在プラチナ併用療法を含む小細胞肺癌の治療ガイドラインが適用されているが、依然として予後不良であり、有効な分子標的療法の確立が急がれている（4-6）。

食道扁平上皮癌に対して PD-1/PD-L1 経路を標的とした免疫チェックポイント阻害薬が近年承認され、多くの臨床試験が施行されている（63）。第 III 相 KEYNOTE-181 試験において、ペムブロリズマブは高 PD-L1 発現（CPS \geq 10）食道扁平上皮癌の 2nd line 標準治療として確立し（64）、米国 FDA は抗 PD-1 抗体のペムブロリズマブ単剤療法を 2019

年7月に承認し、2020年8月には日本でも適応追加承認を受けた。食道扁平上皮癌においても胃癌と同様、PD-L1 陽性腫瘍細胞の割合のみに基づく tumor proportion score (TPS) などの別のスコアリング法よりも、CPS がペムブロリズマブ有効性の予測マーカーとして優れていることが報告されている (64, 65)。なお PD-L1 の予後マーカーとしての意義はいまだ議論の余地がある。先行研究で最大のものは熊本大学の食道扁平上皮癌 305 例を対象とした研究で、PD-L1 発現症例は予後不良と報告された (66)。一方、他の2つの研究では PD-L1 発現症例が良好予後と報告された (67, 68)。

上記のように食道扁平上皮癌における PD-L1 に関する知見は蓄積されつつあるが、食道 NEC についての報告はその希少性から数少なく、消化管 NEC における PD-L1 発現を調べた研究に少数例含まれるのみで (10,11)、食道 NEC 患者における PD-L1 発現を CPS で評価した報告や、ペムブロリズマブの有効性を検証した報告は未だない。

HLA-class I 遺伝子 (HLA-A、B、C) は、全有核細胞表面に発現するタンパク質をコードし、CD8 陽性 T 細胞に細胞内ペプチドを提示する。本邦の食道扁平上皮癌 90 例を対象にした先行研究では、HLA-class I 陽性 (Cut off 値：腫瘍細胞の 50%以上での高発現を示す症例) は 38.9%に認められ、HLA-class I の高発現と高 PD-L1 発現の組み合わせは食道扁平上皮癌患者において独立した予後不良因子と報告されている (45, 69)。また、腫

瘍抗原に対して細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応を誘導するがんペプチドワクチンの治療標的としても、HLA-class I は重要と考えられている。食道扁平上皮癌においても、過剰発現するがん抗原に由来する HLA-A24 結合ペプチドを用いたがんワクチンの臨床試験が報告されている。食道扁平上皮癌に対するがんワクチンの代表的な報告には TTK プロテインキナーゼ（TTK）、リンパ球抗原-6 複合体遺伝子座 K（LY6K）、インスリン様成長因子-II mRNA 結合タンパク質-3（IMP3）三者の HLA-A24 結合ペプチドを用いたがんワクチンの臨床試験やコレステロール含有疎水化プルラン（CHP）-NY-ESO-1 ワクチン接種の臨床試験が報告されている。（70, 71）。近年、国立がん研究センター中央病院の食道外科の大幸らが中心となって食道扁平上皮癌で過剰発現する 5 つのがん抗原（DEPDC1、MPHOSPH1、URLC10、CDCA1、KOC1）に由来する HLA-A*24:02 ペプチドワクチン S-588410 を用いた食道扁平上皮癌 15 例の第 I・II 相臨床試験の結果が報告された。それによると、CTL 腫瘍免疫応答を全例で誘導し、CD8+、PD-1+、PD-L1+細胞の密度増加が報告された。がんワクチンにより PD-L1 発現が誘導されることから、抗 PD-(L)1 抗体とがんワクチンの組み合わせが治療法として有望視されている（72）。以上のようにがんペプチドワクチンは単独または化学療法や免疫チェックポイント阻害薬との併用など、臨床試験が複数、食道扁平上皮癌に対して検討されている。また、HLA-class I 陰性腫瘍細胞に

においては、T 細胞が腫瘍細胞を抗原認識・傷害できず CTL の反応が誘導できないため、PD-1/PD-L1 阻害剤をはじめとする T 細胞ベースの免疫療法が効きにくいことが知られており、いかにこれを克服するかが今後の課題となっている (24)。なお、食道 NEC において HLA-Class I を評価した報告は調べた限り未だ存在しない。

免疫チェックポイント治療の適応を検討するうえで、腫瘍組織浸潤リンパ球(TIL)やマイクログリット不安定性も重要である。食道扁平上皮癌の先行研究でも TIL (CD8+、FOXP3+リンパ球) の局在と患者転帰との関連が報告されている (73,74)。また食道扁平上皮癌患者 305 名における先行研究では、PD-L1 発現と TIL 状態に基づいて腫瘍免疫微小環境(TIME)を 4 分類することで免疫療法応答予測マーカー及び予後因子としての意義が報告された (66)。一方、食道扁平上皮癌における MMR 異常の頻度は 2%未満と稀であることが報告されているが (75)、食道 NEC における TIL やマイクログリット不安定性を検討した報告は殆どない。

食道 NEC55 例の先行研究では、主に小細胞型 NEC において *TP53* と *Rb* の不活化変異が高頻度で認められ、発癌への関与が報告されている (76,77)。また 73 例の先行研究で食道扁平上皮癌 (squamous cell carcinomas, SCC) では p53 変異型で Rb 発現が消失していると予後不良と報告された (78)。食道 NEC と Rb の関係については、食道 NEC10 例

の p16 と Rb 発現を調査した先行研究によると、p16-RB 経路の変化を示唆する Rb のびまん性喪失と p16 のびまん性過剰発現の組み合わせが、全ての食道 NEC に認められた (79)。食道 NEC のがんゲノム異常に関する全ゲノム解析の報告では高頻度に変異が認められる遺伝子が 8 つ同定された。うち 5 つ (TP53, RB1, NOTCH1, FAT1, FBXW7) は以前から指摘されていた変異で、TP53, RB1, NOTCH1 などは肺小細胞癌と共通のゲノム異常である。他の 3 つ (PDE3A, PTPRM, CBLN2) はこれまで食道扁平上皮癌で指摘されたことが無く、新たに同定された遺伝子変異である。なお突然変異スペクトルと体細胞 CNV プロファイルの点では、食道小細胞癌は肺小細胞癌よりも食道扁平上皮癌や頭頸部扁平上皮癌に類似しており、食道細胞由来の小細胞癌は肺細胞由来の小細胞癌とは異なる生物学的背景を持っていることが示唆された (80)。

以上のように食道扁平上皮癌では腫瘍免疫応答を考えるうえで、様々なバイオマーカーが取り上げられ、腫瘍免疫微小環境の包括的な評価が重要視されている。本研究では、食道 NEC に対する免疫治療の可能性を探るために、食道 NEC 症例における PD-L1 と HLA-classI、ミスマッチ修復蛋白、TILs の発現プロファイルを調べ、発現異常の頻度とその臨床病理学的意義を検討した。また、食道 NEC で高頻度に遺伝子異常が報告されている p53 と retinoblastoma protein (Rb) の発現についても評価した。

2-2. 対象と方法

症例

本研究は、2004 年 1 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日までの間に、東京大学医学部附属病院で診断・治療を受けた食道 NEC 患者を対象とした後ろ向き研究である。東京大学医学部附属病院の病理アーカイブから同定された食道 NEC 患者 15 例を対象とした（6 例は切除検体＋術前生検の両方、8 例は生検検体のみ、1 例は手術検体のみ NEC 成分を評価可能であった）。本研究では、NEC を WHO 分類に従って、神経内分泌分化の形態学的・免疫組織化学的特徴(しばしば壊死を伴う充実性、ロゼット状または柵状配列パターン、免疫組織化学的に synaptophysin もしくは chromogranin A が陽性)を示す分化不良癌と定義した (77)。食道 NEC 成分のサブタイプは以下小細胞型と大細胞型の二つに分類した。小細胞型 NEC (SCNEC) は、N/C 比が高く、細胞質が好塩基性かつ少量で、核小体を伴わない微細クロマチンを含む核を持つ小・中型の細胞を特徴とする。大細胞 NEC (LCNEC) は、核小体が目立つ大型卵形核を持つ中・大型の細胞で、比較的豊富な好塩基性細胞質を有する。また、本研究では、NEC と扁平上皮癌の成分から構成される混合神経内分泌-非神経内分泌腫瘍 (mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm, MiNEN) も対象とした (77)。

ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックは、東京大学医学部附属病院病理部のアーカイブから入手した。手術前の生検検体及び外科的切除検体の両方を対象としたが、いずれか片方しか入手できなかった症例(生検で診断後、手術には至らなかった症例や、術前生検には扁平上皮癌成分しか含まれず、外科的切除検体で NEC 成分の存在が判明した症例)については生検・手術のうち入手可能な片方のみの組織ブロックを使用した。ヘマトキシリン・エオシン (haematoxylin and eosin, HE) 染色と免疫組織化学のために組織ブロックから厚さ 3 μ m の切片を作成した。

臨床病理学的因子は年齢、性別、腫瘍の大きさ、腫瘍の位置、Borrmann 分類による肉眼型、TNM 分類、転帰をカルテから収集した。生存期間に関しては、診断日または初回治療開始日から死亡もしくは最終生存確認日までの期間と定義した。病理学的因子として、浸潤の深さ、組織型（小細胞・大細胞型）、扁平上皮癌（SCC）成分の有無、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移を評価した。今回のコホートでは、術前に免疫チェックポイント阻害薬による治療を受けた患者はいなかった。本研究はヘルシンキ宣言に則って行われ、研究計画は東京大学倫理委員会で承認された（承認番号 G3521）。

免疫組織化学

免疫組織化学は、ベンタナ BenchMark ULTRA プラットフォーム（Roche, Basel,

Switzerland) を用いて、メーカーのプロトコールに従って実施した。使用した一次抗体、及びそれぞれの評価方法は第一部 1-2 で示したものと同様である。但し食道扁平上皮癌に対する抗 HER2 抗体治療は一般的でないため、HER2 免疫組織化学は施行していない。

腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TILs) の評価

TIL は、第一部 1-2 で示したのと同様に、国際免疫腫瘍バイオマーカーワーキンググループ (International Immuno-Oncology Biomarker Working Group) によって提案された方法に従って、腫瘍全体の間質 TILs (stromal TILs (sTILs)) および腫瘍浸潤縁 TILs (peritumoral TILs) で評価した (48, 49)。なお生検組織、手術組織の両方の検体が存在する症例においては、両方とも評価し最高値を採用した。生検検体のみしか組織検体がない症例においては、peri-tumoral TILs の評価はできないため sTILs のみを評価した。MiNEN 症例では NEC と SCC (扁平上皮癌成分) に分けて評価した。

統計分析

統計解析には、JMP PRO 11 統計ソフトウェア (SAS、Marlow、英国) を使用した。カテゴリーデータは両側 Fisher 正確検定を用いて分析し、連続変数は Mann-Whitney U 検定を用いて分析した。生存データについて Kaplan-Meier 曲線をプロットし、一般化 Wilcoxon 順位和検定を用いて比較した。P 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意と判定した。

2-3. 結果

患者の特徴

本研究で対象となった食道 NEC 患者 15 例（6 例は切除検体＋術前生検の両方、8 例は生検検体のみ、1 例は手術検体のみ評価可能）の臨床病理学的特徴を表 2-1 にまとめた。

コホートは男性 11 人（73%）、女性 4 人（27%）で、年齢中央値は 68 歳（範囲 46～82 歳）。早期癌（T1）4 人（27%）、進行癌（T2 以上）11 人（73%）であった。治療の内訳は、手術療法が 7 人（47%）、化学療法 3 人（20%）、化学放射線療法 3 人（20%）、緩和的放射線照射 1 人（7%）、Best supportive care（BSC）1 人（7%）であった。4 人（27%）が初回治療時より遠隔転移を有し、その内訳は肝臓（n=3）、肺（n=2）、脳（n=1）であった。手術症例 7 例のうち 3 例が外科的切除前に術前化学療法を施行され、1 例が外科的切除後に補助化学療法を施行された。手術例全例で術後再発を認め、初回再発部位の内訳はリンパ節（n=5）、肝臓（n=2）、縦隔播種（n=2）、腹膜播種（n=1）、肺（n=1）、皮下転移（n=1）であった。術後再発例の治療は化学療法が 4 例、化学放射線療法 1 例、BSC 2 例であった。全ての症例で、抗 PD-1 抗体治療は行われていなかった。全生存期間中央値は 14.7 ヶ月（範囲、0.5～195.7 ヶ月）、手術症例の再発までの期間である無再発生存期間中央値は 9.7 ヶ月（範囲、2.6～20.9 ヶ月）であった。

組織学的には、10 例は NEC 成分のみで構成された Pure NEC で、5 例は NEC 成分主体で構成されているが腫瘍に扁平上皮癌成分の合併を認めた MiNEN であった。

NEC 成分の組織学的サブタイプについては、15 例すべてが小細胞型であり、大細胞型が 0 例であった。リンパ節転移は全 15 例中 8 例（53%）に認められた。手術 7 例中の内訳で見るとリンパ節転移は 2 例（29%）、リンパ管侵襲は 5 例（71%）、静脈侵襲は 5 例（71%）に認められた。

PD-L1 CPS・TPS と臨床病理学的因子との関連

図 2-1 は食道 NEC 全症例の臨床病理学的因子と PD-L1 CPS・TPS の関係を示す。NEC 成分の PD-L1 CPS は範囲 0.029～55.81 で、中央値は 1.50 であった。PD-L1 CPS \geq 1 は 15 例中 9 例（60%）、CPS \geq 10（陽性）が 5 例（33%）、TPS \geq 1%（陽性）は 5 例（33%）に認められた。なお、食道 NEC では各成分の TPS が CPS を上回ることにはなかった。PD-L1 陽性細胞の種類を確認したところ、6 例（40%）では腫瘍細胞と免疫細胞の両方に PD-L1 発現が存在していた（図 2-2）。

表 2-2 は、PD-L1 CPS のカットオフ値 1 以上と 10 以上で陽性と陰性を分けて、臨床病理学的因子の比較を示したものである。CPS カットオフ値 1 の場合、PD-L1 陽性の頻度は MiNEN において NEC よりも高かった（ $P=0.044$ ）。他の因子については両群間で有意

差は認められなかった。PD-L1 CPS のカットオフ値 10 の場合、臨床病理学的因子に有意な関連は認められなかった。

生存解析では、PD-L1 CPS ≥ 1 (陽性) の症例群が PD-L1 CPS < 1 (陰性) の症例群よりも全生存期間が、長く統計的有意差を認めた。(生存期間中央値 24.1 vs 9.95 ヶ月 $P=0.044$) (図 2-3)。

MiNEN5 例全て、NEC 成分において PD-L1 CPS ≥ 1 を認めた。PD-L1 CPS 値を NEC 成分と扁平上皮癌成分で比較すると、4 例 (80%) で扁平上皮癌成分の方が CPS は高く、1 例 (20%) で NEC 成分の方が高かった。

Rb と p53 の免疫組織化学

変異型 p53 パターン (びまん性の強陽性または完全な消失) は 12 例 (80%)、Rb 発現の完全消失は 13 例 (86%) であり、発現異常が高頻度に認められた。Rb 消失と若年に有意な相関を認めた (中央値 67 歳 vs 81 歳、 $P=0.033$)。その他の臨床病理学的因子と p53 や Rb の発現パターンとの関連は認めなかった (表 2-3)。Rb 免疫組織化学と p53 免疫組織化学の一例を図 2-4 に示す。

扁平上皮癌成分と NEC 成分が混在している MiNEN 症例 5 例で扁平上皮癌成分と NEC 成分を比較すると、5 例中 4 例 (80%) では p53 と Rb いずれも同じ発現パターンを示し

た。1 例（20%）で、Rb 発現が NEC 成分のみで消失し扁平上皮癌成分では保持されていた。なお、p53 は NEC 成分と扁平上皮癌成分で全て同一の変異パターン（過剰発現）を示した。

ミスマッチ修復蛋白発現

ミスマッチ修復蛋白(MLH1, PMS2, MSH2, MSH6)の発現は 15 例全例で保たれていた。

腫瘍組織浸潤リンパ球 TILs の評価

NEC 成分の sTILs は手術検体と生検検体を合わせて評価した結果、範囲 10-60%（中央値 20%）であった。中央値(20%)を越える sTILs 高値が 7 例（47%）、sTILs 低値が 8 例（53%）であった。MiNEN5 例の扁平上皮癌成分の sTILs は範囲 10-60%（中央値 30%）であった。手術検体 7 例中 NEC 成分の peritumoral TILs は範囲 10-50%（中央値 30）、扁平上皮癌成分の peritumoral TILs は範囲 30-60 % (中央値 35)であった。NEC 成分と扁平上皮癌成分の間で sTILs を比較すると、3 例で扁平上皮癌の方が多く、1 例で同等であり、sTILs は扁平上皮癌成分の方が高い傾向があった。

TILs と PD-L1 CPS との間に有意な関連は認めなかったが、sTIL と PD-L1 の陽性との組み合わせで、CPS \geq 10 かつ sTIL 高値（TIME 分類の Type1）が 3 例、CPS<1 かつ sTIL

低値（TIME 分類の Type2）が 4 例認められた。生存解析では sTIL と peritumoral TILs の高値低値での分類で生存期間に有意な差は見られなかった。

HLA-Class I の発現

HLA-Class I の発現は 10 例（67%）で保持されていた。HLA-Class I の発現異常は 5 例（33%）に認められた。同一症例内で生検検体と手術検体の間で HLA-Class I の発現の差は認めなかった。

PD-L1 陽性と HLA-Class I 発現保持の組み合わせは、CPS \geq 1 の 9 例中 6 例（67%）、そのうち 5 例中 4 例（80%）では CPS \geq 10 が認められた。

HLA-Class I 発現の NEC と扁平上皮癌成分の発現比較では、MiNEN5 例中 3 例（60%）で NEC 成分のみで発現減弱、1 例（20%）で扁平上皮癌成分の方が発現減弱、1 例で同程度の発現を示した。扁平上皮癌成分での HLA-Class I の発現は保持されているが NEC 成分のみに明瞭に発現消失している症例を図 2-5 に示した。

臨床病理学的相関は、HLA-Class I の発現減弱症例で N 因子($P=0.026$)、TNM Stage($P=0.044$)が有意に高く、間質のリンパ球浸潤（sTILs）が低かった($P=0.017$)。その他の臨床病理学的因子との関連は認められなかった。（表 2-3）

生存解析では、食道 NEC15 例における HLA-Class I 発現保持群(10/15 例、67%)は陰性群と比較し生存期間に有意差を認めなかった (15.9 ヶ月 vs 10.4 ヶ月 $P=0.34$)。

2-4. 考察

本研究は食道 NEC において CPS を用いて PD-L1 の発現を評価した初めての研究である。PD-L1 CPS が 1 以上の症例が 60%、CPS が 10 以上の症例が 33%と比較的高い割合で存在することが確認された。CPS \geq 10 は食道扁平上皮癌におけるペムブロリズマブの治療適応であり、食道 NEC においても PD-L1 が治療標的となり得ることが示唆された。

また、食道 NEC において CPS 1 以上の群は 1 未満の群と比べてより長い生存期間を示した。食道 NEC において CPS \geq 1 が予後予測マーカーとしての有用な可能性が示された。

PD-L1 免疫組織化学に基づく評価スコアリング方法については、KEYNOTE-181 試験の結果から、PD-L1 CPS による定量的評価法が、食道扁平上皮癌患者におけるペムブロリズマブに対する反応性を予測するための信頼性の高い方法と考えられている (17, 64)。

また生検検体・手術検体の間での CPS の違いについて言及された報告はないが、本研究では CPS \geq 10 は手術検体で 57%、生検で 7%のみ、CPS \geq 1 は生検で 43%、手術で 85%に認められ、生検と手術検体の間で乖離がみられる症例もあった。手術検体においては同一切片内で PD-L1 発現に不均一性が認められており、サンプリングされる場所によっては PD-L1 の発現が乏しいことも稀ではないこと、小細胞癌組織は生検の際に挫滅しやすい

く、免疫組織化学の染色性が低下すること等が、手術検体より生検検体の方が CPS の値が低くなる傾向が見られた理由と考えられた。

また MiNEN 症例 5 例中 5 例全例で、扁平上皮癌成分の CPS が 10 以上であった。NEC 成分との比較でも 4 例 (80%) で CPS が扁平上皮癌成分の方が上回っていた。また、HLA-Class I 発現の比較においても、MiNEN 5 例中 3 例 (60%) で NEC 成分のみで発現減弱を認めて、扁平上皮癌成分での HLA-Class I の発現は保持されていることが分かった。

KEYNOTE-180 試験において、食道扁平上皮癌患者が占める割合は 52.1% で、CPS ≥ 10 は 47.9% と高頻度に報告され、食道扁平上皮癌は食道腺癌よりも比較的 CPS が高い患者の割合が多く、PD-1 阻害剤に対して感受性が高いことが示唆されている (65)。肺癌や子宮頸癌においても、同様に扁平上皮癌の方が腺癌より PD-L1 の発現が高いことが報告されている (81, 82)。扁平上皮癌の方が PD-L1 発現の高い理由はよく分かっていないが、扁平上皮癌では喫煙による炎症に伴い PD-L1 発現が誘導されること、突然変異負荷が高いためにネオアンチゲンの発現から腫瘍免疫を惹起しやすい傾向があること等が考えられる。扁平上皮癌は腫瘍免疫に高い感受性を示す一方、NEC へと分化の段階が低くなる過程において免疫逃避的機序が働く可能性が示唆される。MiNEN において PD-1/PD-L1 経路阻害剤の適応を決定する際には、扁平上皮癌成分だけでなく NEC 成分でも CPS を

評価し、ペムブロリズマブを含む免疫チェックポイント阻害薬の適応について慎重に検討すべきと考えられる。

HLA-Class I に関しては、全 15 例中 10 例 (67%) に発現保持を認めた。CPS \geq 1 と HLA-Class I 発現保持の組み合わせは食道 NEC9 例中 6 例 (67%) に認められた。HLA-Class I の A-24 が治療標的となり、がんワクチン併用によって腫瘍免疫応答を誘導したさらなる抗腫瘍効果の上乗せが期待されることが考えられる (72)。また、CPS<1 の抗 PD-1/PD-L1 阻害薬が効きにくいと考えられる食道 NEC6 例中 4 例 (67%) に HLA-Class I の発現保持が認められており、PD-L1 陰性症例においても HLA-A-24 を標的としたがんペプチドワクチンによる免疫治療の可能性は残されていると考えられる (72)。

また T 細胞ベースの免疫治療である PD-1/PD-L1 経路阻害剤は、HLA-I 陰性腫瘍細胞には有効でないと考えられている (24)。よって、本研究において PD-1/PD-L1 経路阻害薬単独で抗腫瘍活性を期待できるのは、PD-L1 CPS \geq 10 かつ HLA-Class I 発現の保たれた 4 例 (27%) であると考えられる。現在、HLA-Class I 陰性腫瘍を標的に、ナチュラルキラー細胞チェックポイント阻害剤が開発され食道扁平上皮癌への臨床応用が検討されている (24, 83)。

PD-L1 陽性と TIL の浸潤に基づいた TIME 分類について、食道扁平上皮癌の先行研究では予後に影響を与える免疫療法応答予測マーカーとしての役割が示唆されている (66, 84)。PD-L1 CPS の陽性のカットオフ値に関しては、食道扁平上皮癌においては KEYNOTE-181 試験により $CPS \geq 10$ が確立している (64)。しかし、食道 NEC の PD-L1 陽性に関する基準についてはまだ報告がなく、PD-L1 の陽性のカットオフ値を $CPS \geq 10$ とするか $CPS \geq 1$ では定まっていない。また TIL に関しても、本研究では国際免疫腫瘍バイオマーカーワーキンググループ (International Immuno-Oncology Biomarker Working Group) によって提案された方法に従って評価を行い (48, 49)、カットオフの基準として中央値を用いたが、これも明確に定まった基準ではない。先行研究では、腫瘍浸潤縁における TIL (peri-tumoral TILs) を、不在、軽度、中等度、または強度の 4 段階に半定量スコア化して、中等度および強度を陽性とし見なしていた (66)。本研究においても TIME 分類 (27, 28, 84) を外挿し図 2-1 に示しているが、PD-L1 陽性症例 ($CPS \geq 10$) 5 例中 3 例 (60%) が TIL 高値であり、TIME 分類タイプ 1 (PD-L1 陽性かつ TIL 陽性) であった。TIME 分類タイプ 1 は Hot tumor と呼ばれ、PD-L1 が豊富に存在することで TIL による腫瘍免疫を抑制している状態と考えられ、PD-1/PD-L1 阻害剤単独療法が有効な可能性が最も高いと考えられる。また、PD-L1 陽性症例 ($CPS \geq 10$) 5 例中に TIL 低値が 2 例 (40%)

含まれていた。これはタイプ3に分類され、Tリンパ球浸潤を伴わない Cold tumor と呼ばれ、T細胞性免疫に由来する PD-1/PD-L1 阻害剤単独では奏功の期待が薄いため、リンパ球のいない Cold の状態から Hot の状態へ転換させるためリンパ球動員療法の併用が考えられている。幸いにして PD-L1 陽性症例 TIL 低値の2例のうち、1例は HLA-Class I の発現が保持されており、がんペプチドワクチン療法の選択肢は考えられる。一方、PD-L1 陰性群 (CPS<1) の6症例にも sTILs 低値の TIME 分類タイプ2が4例 (67%) 含まれていた。TIL を伴わない PD-L1 陰性腫瘍は免疫無視の状態と考えられ、腫瘍細胞に対する T 細胞応答につながる可能性が低いと考えられている。したがって、リンパ球を腫瘍細胞に動員する必要がある、T 細胞を賦活化し腫瘍内に取り込みを誘導するがんワクチンや抗 CTLA-4 抗体等を抗 PD-1 抗体と併用することが有望である可能性が考えられる。幸いにしてタイプ2に分類された sTILs 低値4例中、HLA-Class I の発現保持は2例 (50%) 保たれており、これらの症例にはがんワクチンが有効である可能性がある。また、PD-L1 陰性腫瘍のなかで TIL 高値を伴っているタイプ4症例は6例中2例 (33%) あり、腫瘍免疫回避において PD-1/PD-L1 以外の経路が関与していると考えられる。よって、PD-1/PD-L1 経路以外の他の免疫チェックポイント阻害薬を検討すべきで、新たな治療標的の探索が望まれる (84)。

本研究の TIME 分類に用いたのは、腫瘍浸潤縁の TIL (peri-tumoral TILs) ではなく、間質の腫瘍浸潤リンパ球 (sTILs) である。なぜなら、本研究の限界として、対象とする食道 NEC の 15 例中 8 例は非手術例であり生検検体のみで診断されており、腫瘍浸潤縁の TIL の評価が困難だったためである。生検における sTILs、すなわち生検で採取される腫瘍表在組織や腫瘍-正常組織境界部の TIL が腫瘍先進部の TILs を反映するのか議論の余地があるが、生検組織では peri-tumoral TILs を評価できないため、sTILs を用いている。

以上、PD-L1 と TILs の評価基準が食道 NEC において定まっていない問題はあるが、本研究で明らかとなった食道 NEC の腫瘍微小環境の特徴は、選択すべき免疫治療戦略を検討するのに役立つと考えられる。

なお本研究では、癌腫の種別を問わずベンブロリズマブの適応とされるマイクロサテライト不安定性(MMR 蛋白発現の欠失)は認められなかった。先行研究では、食道扁平上皮癌におけるマイクロサテライト不安定性の報告は 2%未満とされており (75)、本研究の結果とも合致する内容である。

本研究の問題点は、食道 NEC の希少性ゆえに検討した症例数が少ないことである。また NEC で PD-L1 発現が高頻度であることが分かったが、これは必ずしも PD-L1/PD-1 阻害療法が奏功することを意味するものではない。本当に食道 NEC に抗 PD-1 薬が有効で

あるか否かは、食道 NEC 患者を登録した臨床試験で前向きに検証する必要がある。また本研究では PD-L1 免疫組織化学に SP263 抗体クローンを使用した。FDA で承認されたペムブロリズマブによる治療選択のためのコンパニオン診断テストである、PD-L1 CPS の有意性を検証した臨床試験で使用された 22C3 pharmDx アッセイ (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA) を本研究では用いてない (17, 19)。但し、食道扁平上皮癌患者を対象とした 22C3 抗体と SP263 抗体の両方を用いた PD-L1 免疫組織化学の染色性を比較した試験は存在しないものの、胃癌では 22C3 抗体と SP263 抗体の双方とも PD-L1 スコアリングにおいて高い一致性を示しており、2 つのアッセイは互換性があることが示唆されている (54-56)。

食道の扁平上皮癌 (SCC) 合併 NEC (MiNEN) 症例 5 例と腺癌合併胃 NEC でそれぞれの標的分子 (①PD-L1、②HLA-Class I、③TILs、④Rb-p53、⑤HER2) の発現状況を以下に比較考察する。①PD-L1 CPS は、食道 MiNEN 例において、4 例 (80%) で SCC 成分が CPS は上回り SCC 成分全例 CPS10 以上であった。よって NEC 成分より SCC 成分の方がより PD-L1 高感受性が示唆された。一方、腺癌合併胃 NEC では、PD-L1 発現強度を NEC 成分と腺癌成分で比較すると半数以上は同等の結果であった。8 例 (53%) 同程度、5 例 (33%) で腺癌成分 > NEC 成分、2 例 (13%) で NEC 成分 > 腺癌成分であった。②

HLA-Class I 発現は、食道 MiNEN3 例（60%）で NEC 成分のみで HLA-Class I 発現減弱を認め、SCC 成分は HLA-Class I 発現保持されていた。よって、食道 MiNEN の NEC 成分はより免疫逃避的機序が示唆された。一方、腺癌合併胃 NEC では、HLA-Class I 発現状況は NEC と腺癌成分でほぼ同等であった。腺癌合併例の全 15 例中 8 例（53%）で同等、5 例（33%）で NEC 成分の方が高発現、2 例（13%）で腺癌成分の方が高発現を示した。

③sTILs の比較では、食道 MiNEN 3 例（60%）で扁平上皮癌の方が TIL の割合は多く、1 例で同等であった。よって、sTIL も扁平上皮癌成分の方が高い傾向があった。一方、腺癌合併胃 NEC では、sTILs もほぼ同等で、1 例のみ腺癌成分と比べ NEC 成分の方が sTILs の低下を認めたが、他 14 例では同等であった。④NEC 発癌に関与する Rb と p53 は、食道 MiNEN5 例で扁平上皮癌成分と NEC 成分を比較すると同等で、5 例中 4 例（80%）では p53 と Rb いずれも同じ発現パターンを示した。1 例（20%）で、Rb 発現が NEC 成分のみで消失し扁平上皮癌成分では保持されていたものを認めた。なお、p53 は NEC 成分と扁平上皮癌成分で全て同一の変異パターン（過剰発現）を示していた。腺癌合併胃 NEC でも同様に、腺癌成分と NEC 成分の比較はほぼ同等であった。15 例中 12 例（80%）では p53 と Rb いずれも同じ発現パターンを示した。Rb は 2 例（13%）で Rb 発現が NEC 成分のみで消失し腺癌成分では保持されていた。p53 は 1 例（7%）で NEC 成分と腺癌

成分の一部で変異パターン（完全消失）を示したが、腺癌成分の他の部分では野生型パターンを示した。⑤HER2 においては、胃の腺癌合併成分で HER2 陽性を認めていたとしても、NEC 成分では全く HER2 陽性を認められなかった。また、リンパ節転移成分の検索でも胃の腺癌転移成分で HER2 陽性を認めることは僅かで、その他大半の転移成分では HER2 陰性であった。以上をまとめると、食道 MiNEN と胃の腺癌合併 NEC を比較すると、食道 NEC 成分において、PD-L1 発現と HLA-Class I 発現減弱を認め TILs も少ない割合であることから、より免疫逃避的特性があると考えられる。ゆえに、NEC 成分に対する PD-1/PD-L1 経路阻害薬の適応決定には、腫瘍免疫微小環境（TIME）における治療標的分子とその発生由来臓器の特性をよく評価し特徴を把握したうえで、たとえ合併する他の腫瘍成分で高い治療標的分子発現がみられていたとしても、免疫チェックポイント阻害薬の適応と治療戦略について慎重に検討すべきと考えられる。

以上の内容をまとめると、食道 NEC において PD-L1 陽性は、CPS \geq 1 が 60%、CPS \geq 10 が 33%の症例に認められ、PD-L1 陽性と HLA-Class I 発現保持の組み合わせは 40%に認められた。PD-1/PD-L1 経路は有効な治療標的として期待された。MiNEN 症例においては、60%で NEC 成分のみで HLA-Class I の発現減弱を認められ、80%で扁平上皮癌成分の CPS が上回っていた。よって MiNEN 症例において、たとえ扁平上皮癌成分の CPS

が高くとも、PD-1/PD-L1 経路阻害剤の適応を決定する際は慎重に判断することが求められる。HLA-Class I の発現保持は 67%に認められ、がんペプチドワクチンも食道 NEC の治療選択肢として期待される。

表 2-1. 食道 NEC の臨床病理学的因子

因子		全症例 (n = 15)
年齢 (歳)	範囲 (中央値)	46-82 (68)
性別	男性	11 (73%)
	女性	4 (27%)
肉眼型	Type 0-Ip (表在隆起型有茎性)	1 (7%)
	Type 0-IIa (表面隆起型)	2 (13%)
	Type 0-IIc (表面陥凹型)	1 (7%)
	Type 1	0 (0%)
	Type 2	11 (73%)
	Type 3	0 (0%)
	Type 4	0 (0%)
部位	胸部上部	1 (7%)
	胸部中部	7 (47%)
	胸部下部	5 (33%)
	腹部食道	2 (13%)
cT Stage	cT1	4 (27%)
	cT2-4	11 (73%)
cN Stage	cN0	7 (47%)
	cN1-3	8 (53%)
cM Stage	cM0	11 (73%)
	cM1	4 (27%)
cTNM Stage	cIA	4 (27%)
	cIB	2 (13%)
	cIIA	1 (7%)
	cIIB	0 (0%)
	cIIIA	1 (7%)
	cIIIB	1 (7%)
	cIIIC	2 (13%)
	cIV	4 (27%)

I		6 (40%)
II-IV		9 (60%)
リンパ管侵襲	なし	2 (29%)
	あり	5 (71%)

静脈侵襲	なし	2 (29%)
	あり	5 (71%)
組織型	NEC	10 (67%)
	MinEN	5 (33%)
NEC 成分の亜分類	大細胞型	0 (0%)
	小細胞型	15 (100%)
p53	野生型	3 (20%)
	変異型	12 (80%)
Rb	欠損	13 (87%)
	発現保持	2 (13%)
HLA-Class I	陰性	5 (33%)
	発現保持	10 (67%)
NEC 成分の間質 TILs (sTILs)	範囲 (中央値)	10-60 (20)
	>20%(高値)	7 (47%)
	≤20%(低値)	8 (53%)
SCC 成分の間質 TILs (sTILs)	範囲 (中央値)	10-60 (30)
	≥30%(高値)	3 (60%)
	<30%(低値)	2 (40%)
手術検体の NEC 成分の腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoral TILs)	範囲 (中央値)	10-50 (30)
	≥30% (高値)	4 (57%)
	<30% (低値)	3 (43%)
手術検体の SCC 成分の腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoral TILs)	範囲 (中央値)	30-60 (35)
	≥35% (高値)	2 (50%)
	<35% (低値)	2 (50%)
MMR 蛋白	欠失	0 (0%)
	保持	15 (100%)
NEC 成分の PD-L1	CPS 範囲 (中央値)	0.029-55.81 (1.50)
	CPS≥1	9 (60%)
	CPS<1	6 (40%)
	CPS≥10	5 (33%)
	CPS<10	10 (66%)

SCC 成分の PD-L1	CPS 範囲 (中央値)	11.74-100 (82.51)
	CPS \geq 10	5 (100%)
	CPS<10	0 (0%)
初回治療	手術単独	3 (20%)
	術前化学療法+手術	3 (20%)
	手術+術後化学療法	1 (7%)
	化学療法単独	3 (20%)
	同時性化学放射線療法(CCRT)	2 (13%)
	異時性化学放射線療法(SCRT)	1 (7%)
	緩和的放射線照射	1 (7%)
	Best Supportive Care	1 (7%)
転帰	原病死	13 (87%)
	無病生存	2 (13%)
術後再発		7 (100%)
全生存期間 (月)	範囲 (中央値)	0.5-195.5 (14.7)
無再発生存期間 (月)	範囲 (中央値)	2.6-20.9 (9.7)
生存期間 (月)	手術単独	13-33.3 (15.6)
	術前化学療法+手術	6.1-42.1 (14.7)
	手術+術後化学療法	24.1
	化学療法単独	0.5-10.4 (6)
	同時性化学放射線療法(CCRT)	171.5-195.5 (179.1)
	異時性化学放射線療法(SCRT)	9.5
	緩和的放射線照射	16.2
	Best Supportive Care	5.2
初回治療奏功	完全奏功, CR	2 (22%)
	部分奏功, PR	2 (22%)
	安定, SD	1 (11%)
	進行, PD	4 (44%)
	奏効率 (CR+PR)	44%
	病勢コントロール率 (CR+PR+SD)	55%

NEC, 神経内分泌癌; MiNEN, 混合神経内分泌-非神経内分泌腫瘍; TILs, 腫瘍浸潤リンパ球; MMR, ミスマッチ修復; SCC, 扁平上皮癌

表 2-2. 食道 NEC の PD-L1 CPS による臨床病理学的因子の比較

臨床病理学的因子		CPS \geq 1 (n=9)	CPS<1 (n=6)	P value	CPS \geq 10 (n=5)	CPS<10 (n=10)	P value
年齢 (歳)	範囲 (中央値)	46-82 (67)	55-79 (70)	0.55	46-82 (68)	53-79 (67.5)	0.95
性別	男性	7 (47%)	4 (27%)	1	4 (27%)	7 (47%)	1
	女性	2 (13%)	2 (13%)		1 (7%)	3 (20%)	
cT Stage	cT1	3 (20%)	1 (7%)	0.6	3 (20%)	1 (7%)	0.077
	cT2-4	6 (40%)	5 (33%)		2 (13%)	9 (60%)	
cN Stage	cN0	5 (33%)	2 (13%)	0.61	4 (27%)	3 (20%)	0.12
	cN1-3	4 (27%)	4 (27%)		1 (7%)	7 (47%)	
cM Stage	cM0	8 (53%)	3 (20%)	0.24	5 (33%)	6 (40%)	0.23
	cM1	1 (7%)	3 (20%)		0 (0%)	4 (27%)	
cTNM Stage	Stage I	4 (27%)	2 (13%)	1	4 (27%)	2 (13%)	0.089
	Stage II-IV	5 (33%)	4 (27%)		1 (7%)	8 (53%)	
組織型	NEC	4 (27%)	6 (40%)	0.044	2 (13%)	8 (53%)	0.25
	MiNEN	5 (33%)	0 (0%)		3 (20%)	2 (13%)	
p53	野生型	1 (7%)	2 (13%)	0.53	0 (0%)	3 (20%)	0.51
	変異型	8 (53%)	4 (27%)		5 (33%)	7 (47%)	
Rb	欠損	8 (53%)	5 (33%)	1	4 (27%)	9 (60%)	1
	保持	1 (7%)	1 (7%)		1 (7%)	1 (7%)	
HLA-Class I	陰性	3 (20%)	2 (13%)	1	1 (7%)	4 (27%)	0.6
	発現保持	6 (40%)	4 (27%)		4 (27%)	6 (60%)	
NEC 成分の間質 TILs (sTILs)	範囲 (中央値)	10-60 (30)	10-40 (20)	0.51	10-60 (30)	10-60 (20)	0.57
中央値区分	>20%(高値)	5 (33%)	2 (13%)	0.61	3 (20%)	4 (27%)	0.61
	\leq 20%(低値)	4 (27%)	4 (27%)		2 (13%)	6 (40%)	
SCC 成分の間質 TILs (sTILs)	範囲 (中央値)	10-60 (30)	-	-	10-60 (30)	20-30 (25)	1
	\geq 30%(高値)	3 (60%)	0 (0%)	-	2 (40%)	1 (20%)	1
	<30%(低値)	2 (40%)	0 (0%)	-	1 (20%)	1 (20%)	-
手術検体の NEC 成 分の腫瘍浸潤縁	範囲 (中央値)	10-50 (30)	10	0.31	10-50 (30)	10-40 (25)	1

TILs (peri-tumoral TILs)							
中央値区分	≥30% (高値)	4 (57%)	0 (0%)	0.43	3 (43%)	1 (14%)	1
	<30% (低値)	2 (29%)	1 (14%)		2 (29%)	1 (14%)	
手術検体の SCC 成分の腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoral TILs)							
範囲 (中央値)		30-60 (35)	-	-	30-60 (40)	30	0.64
中央値区分	≥35% (高値)	2 (50%)	0 (0%)	-	2 (50%)	0 (0%)	1
	<35% (低値)	2 (50%)	0 (0%)		1 (25%)	1 (25%)	
MMR 蛋白	欠失	0 (0%)	0 (0%)	-	0 (0%)	0 (0%)	-
	保持	9 (60%)	6 (40%)		9 (60%)	6 (40%)	

CPS, combined positive score; NEC, 神経内分泌癌; MiNEN, 混合神経内分泌-非神経内分泌腫瘍; TILs, 腫瘍浸潤リンパ球; MMR, ミスマッチ修復; SCC, 扁平上皮癌

表 2-3. 食道 NEC の各因子による臨床病理学的因子の比較

臨床病理学的因子		HLA-Class I			Rb			p53		
		陰性	保持	P value	欠損	保持	P value	野生型	変異型	P value
		(n = 5)	(n = 10)		(n = 13)	(n = 2)		(n = 3)	(n = 12)	
年齢 (歳)	範囲 (中央値)	66-82 (73)	46-79 (67.5)	0.2	46-75 (67)	79-82 (80.5)	0.033	53-79 (68)	46-82 (67.5)	1
性別	男性	2 (13%)	9 (60%)	0.077	9 (60%)	2 (13%)	1	3 (20%)	8 (53%)	0.52
	女性	3 (20%)	1 (7%)		4 (27%)	0 (0%)		0 (0%)	4 (27%)	
cT stage	cT1	0 (0%)	4 (27%)	0.23	4 (27%)	0 (0%)	1	1 (7%)	3 (20%)	1
	cT2-4	5 (33%)	6 (40%)		9 (60%)	2 (13%)		2 (13%)	9 (60%)	
cN stage	cN0	0 (0%)	7 (47%)	0.026	7 (47%)	0 (0%)	0.47	1 (7%)	6 (40%)	1
	cN1-3	5 (33%)	3 (20%)		6 (40%)	2 (13%)		2 (13%)	6 (40%)	
cM Stage	cM0	4 (27%)	7 (47%)	1	10 (67%)	1 (7%)	0.48	1 (7%)	10 (67%)	0.15
	cM1	1 (7%)	3 (20%)		3 (20%)	1 (7%)		2 (13%)	2 (13%)	
cTNM stage	Stage I	0 (0%)	6 (40%)	0.044	6 (40%)	0 (0%)	0.49	1 (7%)	5 (33%)	1
	Stage II-IV	5 (33%)	4 (27%)		7 (47%)	2 (13%)		2 (13%)	7 (47%)	
組織型	NEC	2 (13%)	8 (53%)	0.25	9 (60%)	1 (7%)	1	3 (20%)	7 (47%)	0.51
	MinEN	3 (20%)	2 (13%)		4 (27%)	1 (7%)		0 (0%)	5 (33%)	
p53	野生型	0 (0%)	3 (20%)	0.51	2 (13%)	1 (7%)	0.37			
	変異型	5 (33%)	7 (47%)		11 (73%)	1 (7%)				
Rb	欠損	4 (27%)	9 (60%)	1				2 (13%)	11 (73%)	0.37
	保持	1 (7%)	1 (7%)					1 (6%)	1 (7%)	
NEC 成分の間質 TILs (sTILs)	範囲 (中央値)	10-20 (10)	10-60 (35)	0.017	10-60 (20)	10-40 (25)	0.86	10-40 (30)	10-60 (20)	1
中央値区分	>20%(高値)	0 (0%)	7 (47%)	0.026	6 (40%)	1 (7%)	1	2 (13%)	5 (33%)	0.57

	≤20%(低 値)	5 (33%)	3 (20%)		7 (47%)	1 (7%)		1 (7%)	7 (47%)	
SCC 成分の間質 TILs (sTILs)	範囲 (中 央値)	20-30 (30)	10-60 (35)	1	10-60 (25)	30	1	-	10-60 (30)	-
中央値区分	≥30%(高 値)	2 (40%)	1 (20%)	1	2 (40%)	1 (20%)	1	0 (0%)	3 (60%)	-
	<30%(低 値)	1 (20%)	1 (20%)		2 (40%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (40%)	
手術検体の NEC										
成分の腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoral TILs)	範囲 (中 央値)	30-40 (35)	10-50 (20)	0.43	10-50 (25)	30	1	10	10-50 (30)	0.31
中央値区分	≥30% (高 値)	2 (29%)	2 (29%)	0.43	3 (43%)	1 (14%)	1	0 (0%)	4 (57%)	0.43
	<30% (低 値)	0 (0%)	3 (43%)		3 (43%)	0 (0%)		1 (14%)	2 (29%)	
手術検体の SCC										
成分の腫瘍浸潤縁 TILs (peri-tumoral TILs)	範囲 (中 央値)	30-60 (45)	30-40 (35)	1	30-40 (30)	60	0.35	-	30-60 (35)	-
中央値区分	≥35% (高 値)	1 (25%)	1 (25%)	1	1 (25%)	1 (25%)	1	-	2 (50%)	-
	<35% (低 値)	1 (25%)	1 (25%)		2 (50%)	0 (0%)		-	2 (50%)	
MMR 蛋白	欠失	0 (0%)	0 (0%)	-	0 (0%)	0 (0%)	-	0 (0%)	0 (0%)	-
	保持	5 (33%)	10 (67%)		13 (87%)	2 (13%)		3 (20%)	12 (80%)	
NEC 成分の PD- L1	範囲 (中 央値)	0.098- 12.12 (1.28)	0.029- 55.81 (2.51)	0.67	0.029- 55.81 (1.50)	0.12- 12.11 (6.12)	0.93	0.11- 3.52 (0.12)	0.029- 55.81 (3.82)	0.28
	CPS ≥ 1	3 (20%)	6 (40%)	1	8 (53%)	1 (7%)	1	1 (7%)	8 (53%)	0.53
	CPS < 1	2 (13%)	4 (27%)		5 (33%)	1 (7%)		2 (13%)	4 (27%)	
	CPS ≥ 10	1 (7%)	4 (27%)	0.6	9 (60%)	1 (7%)	1	0 (0%)	5 (33%)	0.51
	CPS < 10	4 (27%)	6 (40%)		4 (27%)	1 (7%)		3 (20%)	7 (47%)	
SCC 成分の PD- L1	範囲 (中 央値)	29.52- 100 (82.51)	11.74- 100 (55.87)	1	11.74- 100 (64.76)	82.51	1	-	11.74- 100 (82.51)	-

CPS, combined positive score; NEC, 神経内分泌癌; MiNEN, 混合神経内分泌-非神経内分泌腫瘍; TILs, 腫瘍浸潤リンパ球; MMR, ミスマッチ修復; SCC, 扁平上皮癌

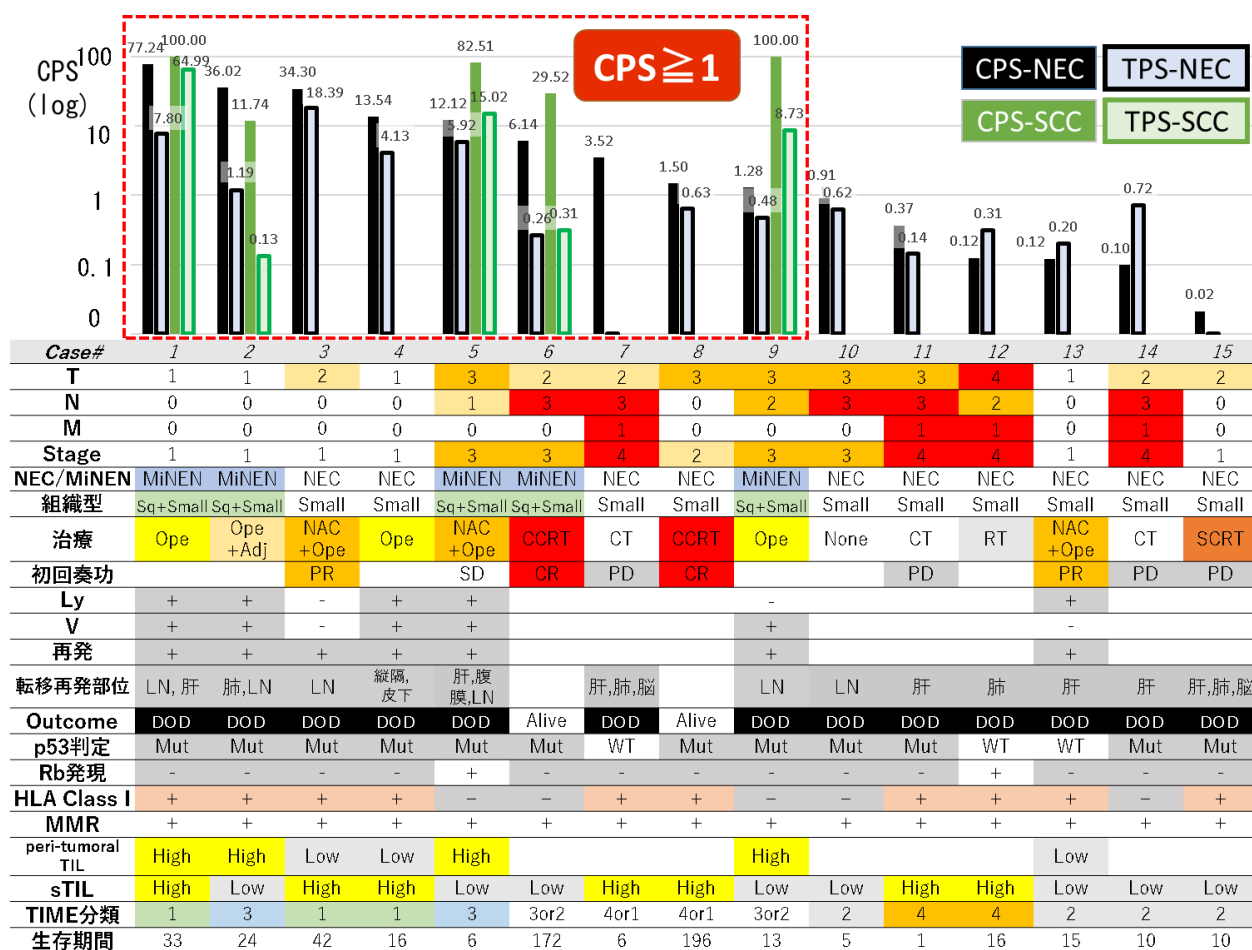


図 2-1. 食道 NEC の CPS と臨床病理学的因子

略語： Adj, adjuvant chemotherapy 術補補助化学療法； Alive, alive with no evidence of disease 無病生存； CCRT, concurrent chemoradiotherapy 同時性化学放射線療法； CT, chemotherapy 化学療法； CR, complete response 完全奏功； DOD, dead of disease 原病死； LN, リンパ節； Ly, リンパ管侵襲； MinEN, mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm 混合神経内分泌-非神経内分泌腫瘍； Mut, 変異型パターン； NAC, neoadjuvant chemotherapy 術前化学療法； NEC, neuroendocrine carcinoma 神経内分泌癌； Ope, 手術； PD, progressive disease 病勢進行； peri-tumoral TIL, 腫瘍浸潤縁リンパ球； PR, partial response 部分奏功； RT, radiation therapy (palliative) 緩和的放射線照射； SCRT, sequential chemoradiotherapy 異時性化学放射線療法； SD, stable disease 病勢安定； Small, 小細胞型； Sq, squamous cell carcinoma 扁平上皮癌； sTIL, stromal Tumor-Infiltrating Lymphocyte 間質腫瘍浸潤リンパ球； TIME, tumor immune microenvironment 腫瘍免疫微小環境； V, 静脈侵襲； WT, 野生型パターン

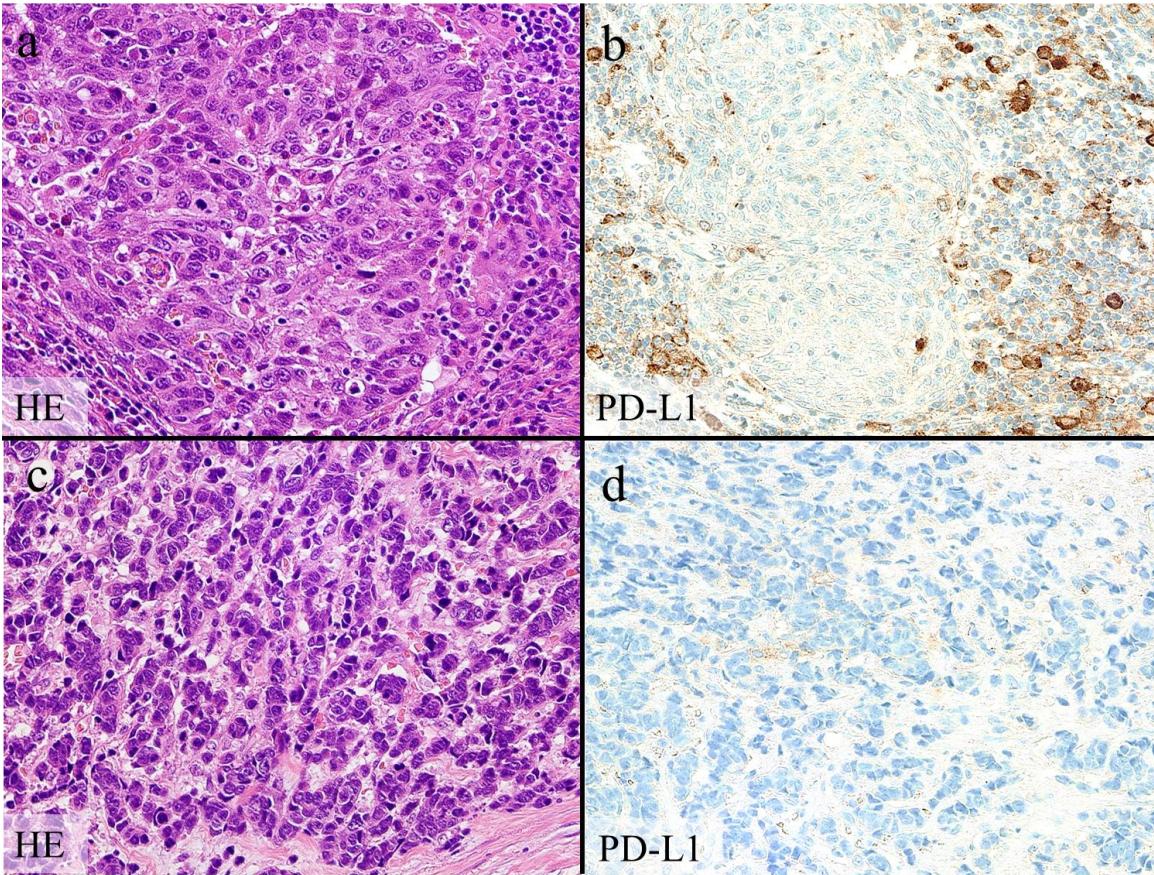


図 2-2. 食道神経内分泌癌における PD-L1 の免疫組織化学

(a, b) PD-L1 CPS ≥ 10 の代表的症例 (Case#1)。小細胞型神経内分泌癌。充実性の形態を示す。多数のリンパ球浸潤を認める。多数の免疫細胞及び一部の腫瘍細胞で PD-L1 陽性である。(a) HE 染色。(b) PD-L1 免疫組織化学。

(c, d) PD-L1 CPS < 1 の代表的症例 (Case#13)。小細胞型神経内分泌癌。索状に N/C 比の高い腫瘍細胞を認める。リンパ球浸潤は比較的少ない。PD-L1 発現細胞がごく少数存在する。PD-L1 を発現する細胞は、この症例では腫瘍間質の免疫細胞であった。(c) HE 染色。(d) PD-L1 免疫組織化学。

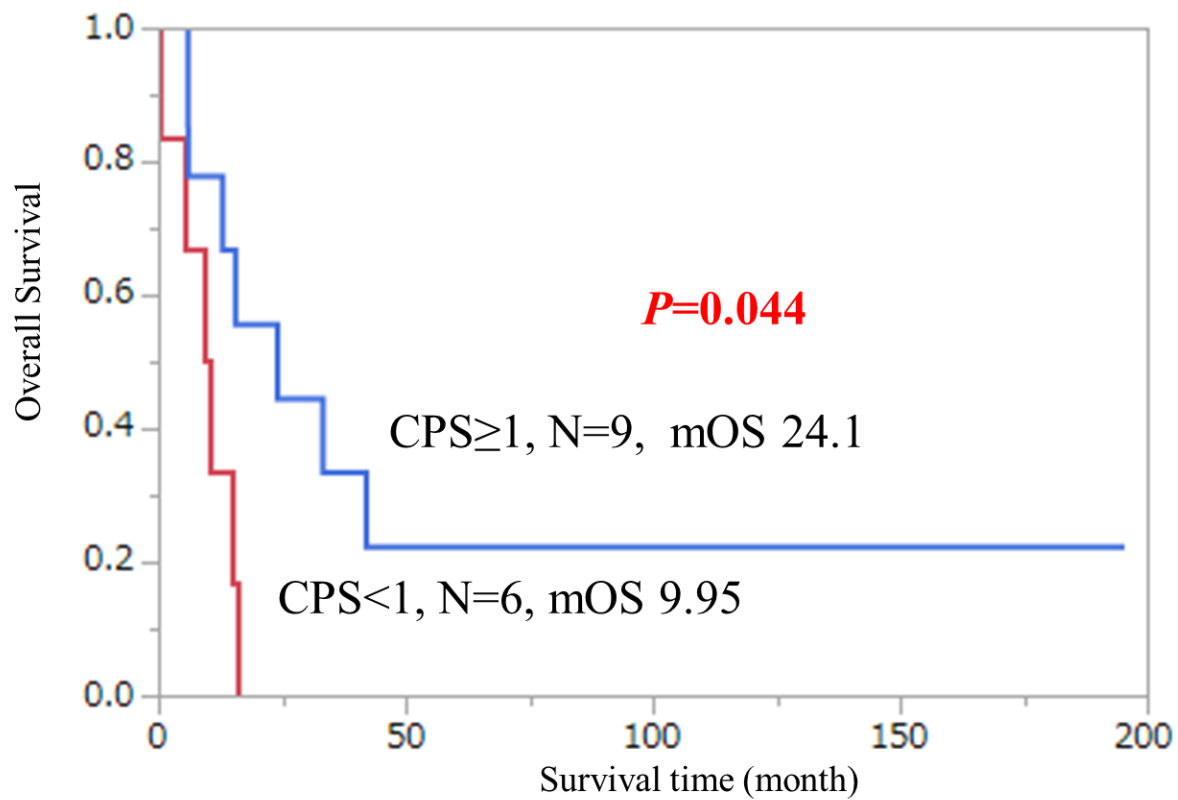


図 2-3. 食道 NEC15 例の CPS による生存曲線

食道 NEC15 例を CPS \geq 1 の群と CPS<1 の群で比較したところ、CPS \geq 1 の群の方が有意に生存期間は長かった (24.1 ヶ月 vs 9.95 ヶ月、 $P=0.044$)。

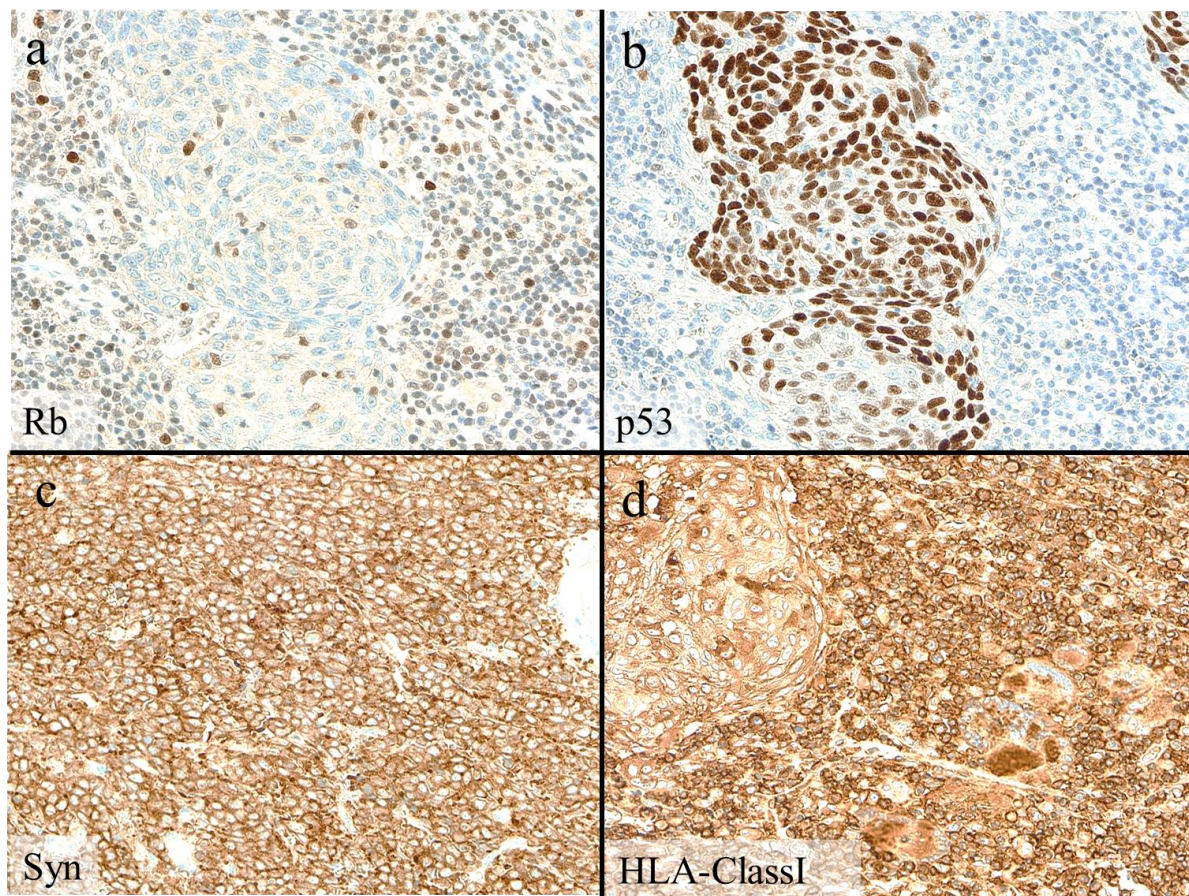


図 2-4. p53 及び Rb の免疫組織化学

図 2-2(a, b)で提示したのと同じ症例。Rb 発現は消失し、p53 はびまん性陽性で過剰発現を示す(変異型パターン)。synaptophysin はびまん性陽性、HLA-Class I も陽性を示した。(a) Rb 免疫組織化学 (b) p53 免疫組織化学。(c) synaptophysin 免疫組織化学。(d) HLA-Class I 免疫組織化学。

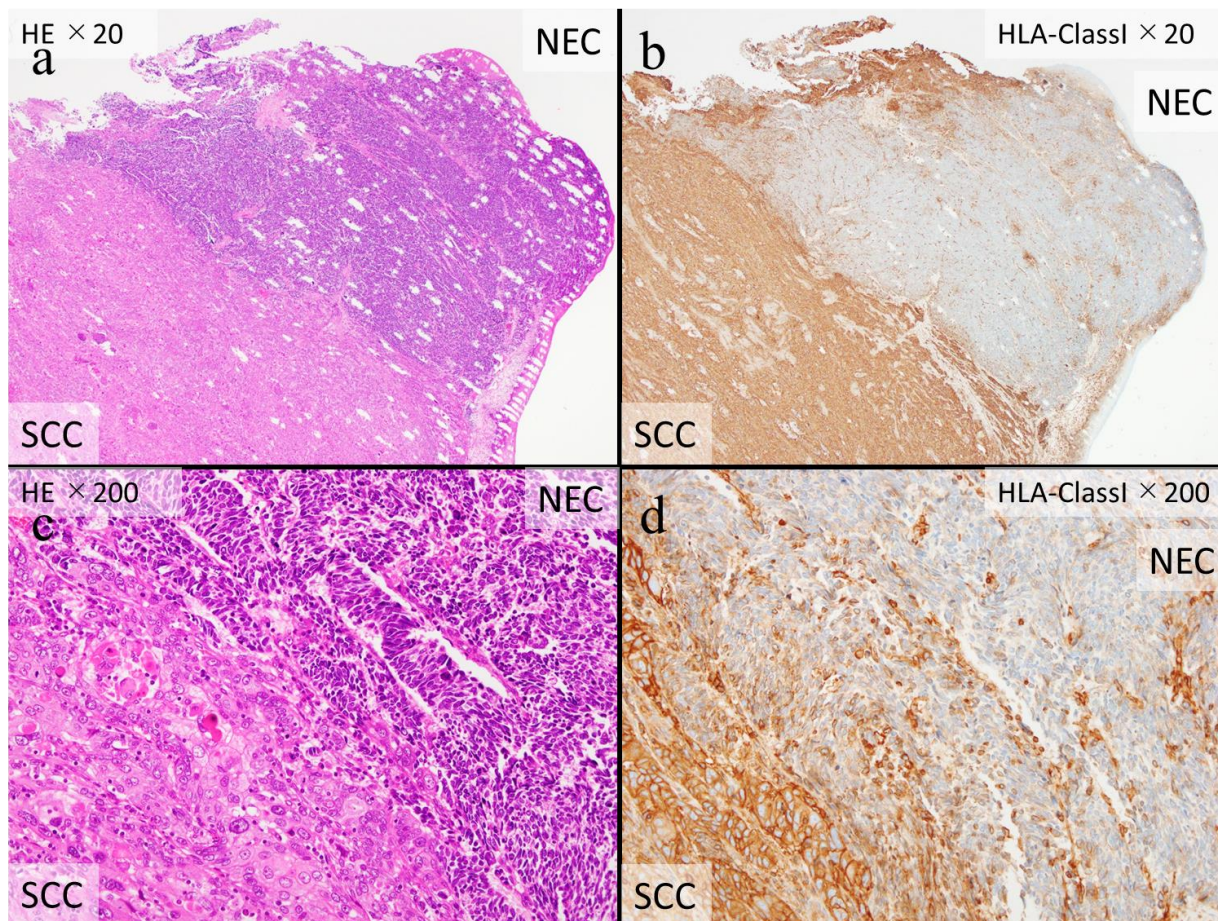


図 2-5. HLA-Class I 免疫組織化学

MiNEN の一例。食道扁平上皮癌成分（SCC）では HLA-Class I の発現が保たれているが、NEC 部分では HLA-Class I の発現減弱が見られる。(a, c) HE 染色、(c, d) HLA-Class I 免疫組織化学。

結語

本研究では胃及び食道 NEC における治療標的分子を探るため、PD-L1、HLA-Class I 及び HER2(胃のみ)の発現を免疫組織化学的に検討した。胃 NEC における HER2 の発現は乏しく、NEC の治療標的分子としての意義は乏しいと考えられた。一方で PD-L1 や HLA-Class I の発現は胃 NEC や食道 NEC で高頻度に認められ、免疫チェックポイント阻害薬やがんワクチン等のがん免疫治療が、有望な治療選択肢と考えられた。

本当に食道や胃の NEC に対しがん免疫治療が有効か否かは臨床試験による検証を待たなくてはならないが、予後不良なサブタイプとして知られる NEC に対し有望な治療法として、がん免疫療法に関する研究の進展が、今後も期待される。

利益相反

著者らは、この研究に関連した利益相反はない。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻病理学講座，人体病理学・病理診断学分野 牛久哲男教授ならびに消化管外科学 瀬戸泰之教授，山下裕玄講師に深い感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始直接のご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻病理学講座 阿部浩幸講師に誠に感謝申し上げます。

標本収集や作製、実験操作にご協力いただきました、人体病理学・病理診断学分野の国田朱子助教、佐久間慶氏、山村はるみ氏、村田みなと氏、竹下 貴三子氏ならびに医学部附属病院病理部金子伸行副臨床検査技師長はじめ病理部の皆様のご支援に深く感謝いたします。

また，本研究は日本学術振興会の助成を受けました[科研費補助金番号 18K06983（牛久哲男）、18K07012（阿部浩幸）]。

参考文献

1. Michihiro Ishida, Shigeki Sekine, Takeo Fukagawa, Masaki Ohashi, Shinji Morita, Hirokazu Taniguchi, Hitoshi Katai, Hitoshi Tsuda, Ryoji Kushima. Neuroendocrine carcinoma of the stomach: morphologic and immunohistochemical characteristics and prognosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 2013; **37**; 949–959.
2. Takeshi Kubota, Shigekazu Ohyama, Naoki Hiki, Souya Nunobe, Noriko Yamamoto, Toshiharu Yamaguchi. Endocrine carcinoma of the stomach: clinicopathological analysis of 27 surgically treated cases in a single institute. *Gastric Cancer* 2012; **15**; 323–330.
3. La Rosa S, Rindi G, Solcia E, Tang LH. Gastric neuroendocrine neoplasms. In WHO Classification of Tumours Editorial Board eds. *World Health Organization classification of tumours. Digestive system tumours*, 5th edn. Lyon: IARC Press, 2019; 104–109.
4. Garcia-Carbonero R, Sorbye H, Baudin E, Raymond E, Wiedenmann B, Niederle B, Sedlackova E, Toumpanakis C, Anlauf M, Cwikla J.B, Caplin M, O'Toole D, Perren A, all other Vienna Consensus Conference participants. ENETS consensus guidelines for high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and neuroendocrine carcinomas. *Neuroendocrinology* 2016; **103**; 186–194.
5. Olatunji B Alese, Renjian Jiang, Walid Shaib, Christina Wu, Mehmet Akce, Madhusmita Behera, Bassel F El-Rayes. High-grade gastrointestinal neuroendocrine carcinoma management and outcomes: a national cancer database study. *Oncologist* 2019; **24**; 911–920.
6. Gregory P Kalemkerian, Billy W Loo, Wallace Akerley, Albert Attia, Michael Bassetti, Yanis Boumber, Roy Decker, M Chris Dobelbower, Afshin Dowlati, Robert J Downey, Charles Florsheim, Apar Kishor P Ganti, John C Grecula, Matthew A Gubens, Christine L

- Hann, James A Hayman, Rebecca Suk Heist, Marianna Koczywas, Robert E Merritt, Nisha Mohindra, Julian Molina, Cesar A Moran, Daniel Morgensztern, Saraswati Pokharel, David C Portnoy, Deborah Rhodes, Chad Rusthoven, Jacob Sands, Rafael Santana-Davila, Charles C Williams, Karin G Hoffmann, Miranda Hughes. NCCN guidelines insights: small cell lung cancer, Version 2.2018. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2018; **16**; 1171–1182.
7. Yung-Jue Bang, Eric Van Cutsem, Andrea Feyereislova, Hyun C Chung, Lin Shen, Akira Sawaki, Florian Lordick, Atsushi Ohtsu, Yasushi Omuro, Taroh Satoh, Giuseppe Aprile, Evgeny Kulikov, Julie Hill, Michaela Lehle, Josef Rüschoff, Yoon-Koo Kang, ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; **376**; 687–697.
 8. Michihiro Ishida, Shigeki Sekine, Hirokazu Taniguchi, Takeo Fukagawa, Hitoshi Katai, Ryoji Kushima. Consistent absence of HER2 expression, regardless of HER2 amplification status, in neuroendocrine carcinomas of the stomach. *Histopathology* 2014; **64**; 1027–1031.
 9. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Esophageal and esophagogastric junction cancers. Version 2.2018. Available at: www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx (accessed 30 April 2020).
 10. Jordan A Roberts, Raul S Gonzalez, Satya Das, Jordan Berlin, Chanjuan Shi. Expression of PD-1 and PD-L1 in poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the digestive system: a potential target for anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Hum. Pathol.* 2017; **70**; 49–54.
 11. Seung Tae Kim, Sang Yun Ha, Sujin Lee, Soomin Ahn, Jeeyun Lee, Se Hoon Park, Joon Oh Park, Ho Yeong Lim, Won Ki Kang, Kyoung-Mee Kim, Young Suk Park. The impact of PD-L1 expression in patients with metastatic GEP-NETs. *J. Cancer* 2016; **7**; 484–489.
 12. Min-Wei Yang, Xue-Liang Fu, Yong-Sheng Jiang, Xiao-Jing Chen, Ling-Ye Tao, Jian-Yu

- Yang, Yan-Miao Huo, Wei Liu, Jun-Feng Zhang, Pei-Feng Liu, Qiang Liu, Rong Hua, Zhi-Gang Zhang, Yong-Wei Sun, and De-Jun Liu. Clinical significance of programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in gastric neuroendocrine carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 2019; **25**; 1684–1696.
13. Edward B Garon, Naiyer A Rizvi, Rina Hui, Natasha Leighl, Ani S Balmanoukian, Joseph Paul Eder, Amita Patnaik, Charu Aggarwal, Matthew Gubens, Leora Horn, Enric Carcereny, Myung-Ju Ahn, Enriqueta Felip, Jong-Seok Lee, Matthew D Hellmann, Omid Hamid, Jonathan W Goldman, Jean-Charles Soria, Marisa Dolled-Filhart, Ruth Z Rutledge, Jin Zhang, Jared K Lunceford, Reshma Rangwala, Gregory M Lubiniecki, Charlotte Roach, Kenneth Emancipator, Leena Gandhi, KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015; **372**; 2018–2028.
 14. Roy S. Herbst, Jean-Charles Soria, Marcin Kowanetz, Gregg D. Fine, Omid Hamid, Michael S. Gordon, Jeffery A. Sosman, David F. McDermott, John D. Powderly, Scott N. Gettinger, Holbrook E. K. Kohrt, Leora Horn, Donald P. Lawrence, Sandra Rost, Maya Leabman, Yuanyuan Xiao, Ahmad Mokatrín, Hartmut Koeppen, Priti S. Hegde, Ira Mellman, Daniel S. Chen & F. Stephen Hodi. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; **515**; 563–567.
 15. Martin Reck, Delvys Rodríguez-Abreu, Andrew G Robinson, Rina Hui, Tibor Csőszi, Andrea Fülöp, Maya Gottfried, Nir Peled, Ali Tafreshi, Sinead Cuffe, Mary O'Brien, Suman Rao, Katsuyuki Hotta, Melanie A Leiby, Gregory M Lubiniecki, Yue Shentu, Reshma Rangwala, Julie R Brahmer, KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016; **375**; 1823–1833.
 16. Kohei Shitara, Mustafa Özgüroğlu, Yung-Jue Bang, Maria Di Bartolomeo, Mario Mandalà,

- Min-Hee Ryu, Lorenzo Fornaro, Tomasz Olesiński, Christian Caglevic, Hyun C Chung, Kei Muro, Eray Goekkurt, Wasat Mansoor, Raymond S McDermott, Einat Shacham-Shmueli, Xinqun Chen, Carlos Mayo , S Peter Kang, Atsushi Ohtsu, Charles S Fuchs, KEYNOTE-061 investigators. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2018; **392**; 123–133.
17. Karina Kulangara, Nancy Zhang, Ellie Corigliano, Lindsay Guerrero, Stephanie Waldroup, Dipeshkumar Jaiswal, Malinka Jansson Ms, Supriya Shah, Debra Hanks, Jiangdian Wang, Jared Lunceford, Mary J Savage, Jonathan Juco, Kenneth Emancipator. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019; **143**; 330–337.
 18. Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Nagai Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Komohara Y, Ajani JA, Baba H. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2020 Jan; **23**(1); 95-104.
 19. Lola Fashoyin-Aje, Martha Donoghue, Huanyu Chen, Kun He, Janaki Veeraraghavan, Kirsten B Goldberg, Patricia Keegan, Amy E McKee, Richard Pazdur. FDA approval summary: pembrolizumab for recurrent locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma expressing PD-L1. *Oncologist*. 2019; **24**; 103–109.
 20. X C Wang, J Q Zhang, Y Q Shen, F Q Miao, W Xie. Loss of heterozygosity at 6p21.3 underlying HLA class I downregulation in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006; **25**;

115-9.

21. Sumiya Ishigami, Takaaki Arigami, Yoshikazu Uenosono, Masataka Matsumoto, Hiroshi Okumura, Yasuto Uchikado, Yoshiaki Kita, Yuka Nishizono, Kosei Maemura, Yuko Kijima, Akihiro Nakajo, Tetsuhiro Owaki, Shinichi Ueno, Shuichi Hokita, Shoji Natsugoe. Cancerous HLA class I expression and regulatory T cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; **61**; 1663-9.
22. Raghav Sundar, Sun Young Rha, Hiroki Yamaue, Masahiro Katsuda, Koji Kono, Hyo Song Kim, Chan Kim, Kousaku Mimura, Ley-Fang Kua, Wei Peng Yong. A phase I/Ib study of OTSGC-A24 combined peptide vaccine in advanced gastric cancer. *BMC Cancer.* 2018; **18**; 332.
23. Raghav Sundar, Chee Cheng Ean, Yong Wei Peng. Preliminary results of the daVinci study: OTSGC-A24 vaccine + nivolumab in metastatic gastric cancer (Phase I study preliminary report. National Univ. Health System, Singapore). *Gastric Cancer.* 2020; **92**; 315.
24. Paola Minetto, Fabio Guolo, Silvia Pesce, Marco Greppi, Valentina Obino, Elisa Ferretti, Simona Sivori, Carlo Genova, Roberto Massimo Lemoli, Emanuela Marcenaro. Harnessing NK cells for cancer treatment. *Front Immunol.* 2019; **10**; 2836.
25. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016; **17**; e542-51.
26. Katsuhiko Nosho, Yoshifumi Baba, Noriko Tanaka, Kaori Shima, Marika Hayashi, Jeffrey A Meyerhardt, Edward Giovannucci, Glenn Dranoff, Charles S Fuchs, Shuji Ogino. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010; **222**; 350-366.
27. Michele W L Teng, Shin Foong Ngiow, Antoni Ribas, Mark J Smyth. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Can Res.* 2015; **75**; 2139-45.

28. Mark J Smyth, Shin Foong Ngiow, Antoni Ribas, Michele W L Teng. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; **13**; 143-158.
29. Nora Sahnane, Daniela Furlan, Matilde Monti, Chiara Romualdi, Alessandro Vanoli, Emanuela Vicari, Enrico Solcia, Carlo Capella, Fausto Sessa, Stefano La Rosa. Microsatellite unstable gastrointestinal neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. *Endocr. Relat. Cancer* 2015; **22**; 35–45.
30. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*. 2015 Jun; **89**(6); 899-921.
31. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014; **513**; 202–209.
32. Sabry D, Ahmed R, Abdalla S, Fathy W, Eldemery A, Elamir A. Braf, Kras and Helicobacter pylori epigenetic changes-associated chronic gastritis in Egyptian patients with and without gastric cancer. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016 Jun; **32**(6); 92.
33. Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espín E, Armengol M, Yamamoto H, Hamelin R, Seruca R, Schwartz S Jr. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene*. 2003 Dec 11; **22**(57); 9192-6.
34. Ishida S, Akita M, Fujikura K, Komatsu M, Sawada R, Matsumoto H, Saegusa J, Itoh T, Kakeji Y, Zen Y. Neuroendocrine carcinoma and mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm of the stomach: a clinicopathological and exome sequencing study. *Hum Pathol*. 2021 Jan 20; **110**; 1-10.
35. Chen J, Wang A, Ji K, Bu Z, Ji J. Comparison of overall survival of gastric neoplasms containing neuroendocrine carcinoma components with gastric adenocarcinoma: a propensity score matching study. *BMC Cancer*. 2020 Aug 18; **20**(1); 777.

36. Makuuchi R, Terashima M, Kusuhara M, Nakajima T, Serizawa M, Hatakeyama K, Ohshima K, Urakami K, Yamaguchi K. Comprehensive analysis of gene mutation and expression profiles in neuroendocrine carcinomas of the stomach. *Biomed Res.* 2017; **38**(1); 19-27.
37. Wang F, Liu DB, Zhao Q, Chen G, Liu XM, Wang YN, Su H, Qin YR, He YF, Zou QF, Liu YH, Lin YE, Liu ZX, Bei JX, Xu RH. The genomic landscape of small cell carcinoma of the esophagus. *Cell Res.* 2018 Jul; **28**(7); 771-774.
38. Ragavan M, Das M. Systemic Therapy of Extensive Stage Small Cell Lung Cancer in the Era of Immunotherapy. *Curr Treat Options Oncol.* 2020 Jun 29; **21**(8); 64.
39. Lydia Meder, Katharina König, Luka Ozretić, Anne M Schultheis, Frank Ueckerth, Carsten P Ade , Kerstin Albus, Diana Boehm, Ursula Rommerscheidt-Fuss, Alexandra Florin, Theresa Buhl, Wolfgang Hartmann, Jürgen Wolf, Sabine Merkelbach-Bruse, Martin Eilers, Sven Perner, Lukas C Heukamp, Reinhard Buettner. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int. J. Cancer* 2016; **138**; 927–938.
40. Hsueh-Li Tan, Akshay Sood, Hameed A Rahimi, Wenle Wang, Nilesh Gupta, Jessica Hicks, Stacy Mosier, Christopher D Gocke, Jonathan I Epstein, George J Netto, Wennuan Liu, William B Isaacs, Angelo M De Marzo, Tamara L Lotan. Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2014; **20**; 890–903.
41. Daniel M Girardi, Andrea C B Silva, Juliana Florinda M Rêgo, Renata A Coudry, Rachel P Riechelmann. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 2017; **56**; 28–35.
42. Koichiro Fujimasa, Nobuyuki Ohike, Tomoko Norose, Tomohide Isobe, Kazuo Kikuchi,

- Koji Otsuka, Masahiko Murakami, Masafumi Takimoto. Frequent and specific involvement of changes of the p16-RB pathway in esophageal neuroendocrine carcinoma. *Anticancer Res.* 2019; **39**; 1927–1934.
43. Angela N Bartley, Mary Kay Washington, Carol Colasacco, Christina B Ventura, Nofisat Ismaila, Al B Benson 3rd, Alfredo Carrato, Margaret L Gulley, Dhanpat Jain, Sanjay Kakar, Helen J Mackay, Catherine Streutker, Laura Tang, Megan Troxell, Jaffer A Ajani. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 2017; **35**; 446–464.
 44. Ishigami S, Natsugoe S, Nakajo A, Arigami T, Kitazono M, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Sasaki K, Aikou T. HLA-class I expression in gastric cancer. *J Surg Oncol.* 2008; **97**; 605-8.
 45. Zhang X, Lin A, Zhang JG, Bao WG, Xu DP, Ruan YY, Yan WH. Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2013; **132**; 82-9.
 46. W M Grady, A Rajput, J D Lutterbaugh, S D Markowitz. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res.* 2001; **61**; 900–2.
 47. Chung-Liang Ho, Robert J Kurman, Reiko Dehari, Tian-Li Wang, Ie-Ming Shih. Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. *Cancer Res.* 2004; **64**; 6915–8.
 48. Shona Hendry, Roberto Salgado, Thomas Gevaert, Prudence A Russell, Tom John, Bibhusal Thapa, Michael Christie, Koen van de Vijver, M V Estrada, Paula I Gonzalez-Ericsson, Melinda Sanders, Benjamin Solomon, Cinzia Solinas, Gert G G M Van den Eynden, Yves

Allory, Matthias Preusser, Johannes Hainfellner, Giancarlo Pruneri, Andrea Vingiani, Sandra Demaria, Fraser Symmans, Paolo Nuciforo, Laura Comerma, E A Thompson, Sunil Lakhani, Seong-Rim Kim, Stuart Schnitt, Cecile Colpaert, Christos Sotiriou, Stefan J Scherer, Michail Ignatiadis, Sunil Badve, Robert H Pierce, Giuseppe Viale, Nicolas Sirtaine, Frederique Penault-Llorca, Tomohagu Sugie, Susan Fineberg, Soonmyung Paik, Ashok Srinivasan, Andrea Richardson, Yihong Wang, Ewa Chmielik, Jane Brock, Douglas B Johnson, Justin Balko, Stephan Wienert, Veerle Bossuyt, Stefan Michiels, Nils Ternes, Nicole Burchardi, Stephen J Luen, Peter Savas, Frederick Klauschen, Peter H Watson, Brad H Nelson, Carmen Criscitiello, Sandra O'Toole, Denis Larsimont, Roland de Wind, Giuseppe Curigliano, Fabrice André, Magali Lacroix-Triki, Mark van de Vijver, Federico Rojo, Giuseppe Floris, Shahinaz Bedri, Joseph Sparano, David Rimm, Torsten Nielsen, Zuzana Kos, Stephen Hewitt, Baljit Singh, Gelareh Farshid, Sibylle Loibl, Kimberly H Allison, Nadine Tung, Sylvia Adams, Karen Willard-Gallo, Hugo M Horlings, Leena Gandhi, Andre Moreira, Fred Hirsch, Maria V Dieci, Maria Urbanowicz, Iva Brcic, Konstanty Korski, Fabien Gaire, Hartmut Koeppen, Amy Lo, Jennifer Giltane, Marlon C Rebelatto, Keith E Steele, Jiping Zha, Kenneth Emancipator, Jonathan W Juco, Carsten Denkert, Jorge Reis-Filho, Sherene Loi, Stephen B Fox. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv. Anat. Pathol.* 2017; **24**; 235–251.

49. Shona Hendry, Roberto Salgado, Thomas Gevaert, Prudence A Russell, Tom John, Bibhusal Thapa, Michael Christie, Koen van de Vijver, M V Estrada, Paula I Gonzalez-Ericsson,

Melinda Sanders, Benjamin Solomon, Cinzia Solinas, Gert G G M Van den Eynden, Yves Allory, Matthias Preusser, Johannes Hainfellner, Giancarlo Pruneri, Andrea Vingiani, Sandra Demaria, Fraser Symmans, Paolo Nuciforo, Laura Comerma, E A Thompson, Sunil Lakhani, Seong-Rim Kim, Stuart Schnitt, Cecile Colpaert, Christos Sotiriou, Stefan J Scherer, Michail Ignatiadis, Sunil Badve, Robert H Pierce, Giuseppe Viale, Nicolas Sirtaine, Frederique Penault-Llorca, Tomohagu Sugie, Susan Fineberg, Soonmyung Paik, Ashok Srinivasan, Andrea Richardson, Yihong Wang, Ewa Chmielik, Jane Brock, Douglas B Johnson, Justin Balko, Stephan Wienert, Veerle Bossuyt, Stefan Michiels, Nils Ternes, Nicole Burchardi, Stephen J Luen, Peter Savas, Frederick Klauschen, Peter H Watson, Brad H Nelson, Carmen Criscitiello, Sandra O'Toole, Denis Larsimont, Roland de Wind, Giuseppe Curigliano, Fabrice André, Magali Lacroix-Triki, Mark van de Vijver, Federico Rojo, Giuseppe Floris, Shahinaz Bedri, Joseph Sparano, David Rimm, Torsten Nielsen, Zuzana Kos, Stephen Hewitt, Baljit Singh, Gelareh Farshid, Sibylle Loibl, Kimberly H Allison, Nadine Tung, Sylvia Adams, Karen Willard-Gallo, Hugo M Horlings, Leena Gandhi, Andre Moreira, Fred Hirsch, Maria V Dieci, Maria Urbanowicz, Iva Brcic, Konstanty Korski, Fabien Gaire, Hartmut Koeppen, Amy Lo, Jennifer Giltane, Marlon C Rebelatto, Keith E Steele, Jiping Zha, Kenneth Emancipator, Jonathan W Juco, Carsten Denkert, Jorge Reis-Filho, Sherene Loi, Stephen B Fox. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv. Anat. Pathol.* 2017; **24**; 311–335.

50. Yujun Park, Jiwon Koh, Hee Young Na, Yoonjin Kwak, Keun-Wook Lee, Sang-Hoon Ahn, Do Joong Park, Hyung-Ho Kim, Hye Seung Lee. PD-L1 testing in gastric cancer by the combined positive score of the 22C3 PharmDx and SP263 assay with clinically relevant cut-offs. *Cancer Res. Treat.* 2020; **52**; 661–670.
51. Simona Gurzu, Annamaria Fetyko, Tivadar Bara, Laura Baniias, Vlad Olimpiu Butiurca, Tivadar Bara Jr, Vlad Tudorache, Ioan Jung. Gastrointestinal mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC): an immunohistochemistry study of 13 microsatellite stable cases. *Pathol. Res. Pract.* 2019; **215**; 152697.
52. Toru Masuzawa, Yoshiyuki Fujiwara, Kaoru Okada, Ayumu Nakamura, Shuji Takiguchi, Kiyokazu Nakajima, Hiroshi Miyata, Makoto Yamasaki, Yukinori Kurokawa, Ryuji Osawa, Kazuyoshi Takeda, Koji Yoshida, Takuya Tsunoda, Yusuke Nakamura, Masaki Mori, Yuichiro Doki. Phase I/II study of S-1 plus cisplatin combined with peptide vaccines for human vascular endothelial growth factor receptor 1 and 2 in patients with advanced gastric cancer. *Int J Oncol.* 2012; **41**; 1297-304.
53. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, Huemer F, Losonczy G, Johnson ML, Nishio M, Reck M, Mok T, Lam S, Shames DS, Liu J, Ding B, Lopez-Chavez A, Kabbinar F, Lin W, Sandler A, Liu SV; IMpower133 Study Group. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Dec 6; **379**(23); 2220-2229.
54. Ilya Tsimafeyeu, Evgeny Imyanitov, Larisa Zavalishina, Grigory Raskin, Patrisia Povilaitite, Nikita Savelov, Ekaterina Kharitonova, Alexey Rummyantsev, Inna Pugach, Yulia Andreeva, Alexey Petrov, Georgy Frank, Sergei Tjulandin. Agreement between PDL1 immunohistochemistry assays and polymerase chain reaction in non-small cell lung cancer: CLOVER comparison study. *Sci. Rep.* 2020; **10**; 3928.

55. J Adam, N Le Stang, I Rouquette, A Cazes, C Badoual, H Pinot-Roussel, L Tixier, C Danel, F Damiola, D Damotte, F Penault-Llorca, S Lantuéjoul. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2018; **29**; 953–958.
56. Fred R Hirsch, Abigail McElhinny, Dave Stanforth, James Ranger-Moore, Malinka Jansson, Karina Kulangara, William Richardson, Penny Towne, Debra Hanks, Bharathi Vennapusa, Amita Mistry, Rasika Kalamegham, Steve Averbuch, James Novotny, Eric Rubin, Kenneth Emancipator, Ian McCaffery, J Andrew Williams, Jill Walker, John Longshore, Ming Sound Tsao, Keith M Kerr. PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the blueprint PD-L1 IHC assay comparison project. *J. Thorac. Oncol.* 2017; **12**; 208–222.
57. Qin Huang, Hongyan Wu, Ling Nie, Jiong Shi, Abraham Lebenthal, Jieyu Chen, Qi Sun, Jun Yang, Lily Huang, Qing Ye. Primary high-grade neuroendocrine carcinoma of the esophagus: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 42 resection cases. *Am J Surg Pathol.* 2013; **37**; 467–83.
58. Moshim Kukar, Adrienne Groman, Usha Malhotra, Graham W Warren, Paul Bogner, Chukwumere E Nwogu, Todd L Demmy, Sai Yendamuri. Small Cell Carcinoma of the Esophagus: A SEER Database Analysis. *Ann Surg Oncol.* 2013; **20**; 4239-44.
59. Yun JP, Zhang MF, Hou JH, Tian QH, Fu J, Liang XM, Wu QL, Rong TH. Primary small cell carcinoma of the esophagus: clinicopathological and immunohistochemical features of 21 cases. *BMC Cancer.* 2007; **7**; 38.
60. Akinori Egashira, Masaru Morita, Reiko Kumagai, Ken-Ichi Taguchi, Masanobu Ueda, Shohei Yamaguchi, Manabu Yamamoto, Kazuhito Minami, Yasuharu Ikeda, Yasushi Toh. Neuroendocrine carcinoma of the esophagus: clinicopathological and immunohistochemical features of 14 cases. *PLoS ONE.* 2017; **12**; e0173501.

61. Wen Cai, Weiting Ge, Ying Yuan, Kefeng Ding, Yinuo Tan, Dehao Wu, Hanguang Hu. A 10-year population-based study of the differences between NECs and carcinomas of the esophagus in terms of clinicopathology and survival. *J Cancer*. 2019; **10**; 1520–1527.
62. Japan Neuroendocrine Tumor Society. Clinical practice guidelines for gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NEN) .2019, Kanehara & Co., Ltd, Tokyo (in Japanese)
63. Ruidi Jiao, Hui Luo, Wenbo Xu, Hong Ge. Immune checkpoint inhibitors in esophageal squamous cell carcinoma: progress and opportunities. *OncoTargets Ther*. 2019; **12**; 6023-6032.
64. Takashi Kojima, Manish A Shah, Kei Muro, Eric Francois, Antoine Adenis, Chih-Hung Hsu, Toshihiko Doi, Toshikazu Moriwaki, Sung-Bae Kim, Se-Hoon Lee, Jaafar Bennouna, Ken Kato, Lin Shen, Peter Enzinger, Shu-Kui Qin, Paula Ferreira, Jia Chen, Gustavo Giotto, Christelle de la Fouchardiere, Helene Senellart, Raed Al-Rajabi, Florian Lordick, Ruixue Wang, Shailaja Suryawanshi, Pooja Bhagia, S Peter Kang, Jean-Philippe Metges, KEYNOTE-181 Investigators. Randomized Phase III KEYNOTE-181 Study of Pembrolizumab Versus Chemotherapy in Advanced Esophageal Cancer. *J Clin Oncol*. 2020; JCO2001888. doi: 10.1200/JCO.20.01888. Online ahead of print.
65. Manish A Shah, Takashi Kojima, Daniel Hochhauser, Peter Enzinger, Judith Raimbourg, Antoine Hollebecque, Florian Lordick, Sung-Bae Kim, Masahiro Tajika, Heung Tae Kim, A Craig Lockhart, Hendrik-Tobias Arkenau, Farid El-Hajbi, Mukul Gupta, Per Pfeiffer, Qi Liu, Jared Lunceford, S Peter Kang, Pooja Bhagia, Ken Kato. Efficacy and safety of pembrolizumab for heavily pretreated patients with advanced, metastatic adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the esophagus: the phase 2 KEYNOTE-180 study. *JAMA Oncol*. 2019; **5**; 546-550.
66. Taisuke Yagi, Yoshifumi Baba, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yuji Miyamoto,

- Naoya Yoshida, Masayuki Watanabe, Hideo Baba. PD-L1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and clinical outcome in patients with surgically resected esophageal cancer. *Ann Surg.* 2019; **269**; 471-478.
67. Kaiyan Chen, Guoping Cheng, Fanrong Zhang, Nan Zhang, Dan Li, Jiaoyue Jin, Junzhou Wu, Lisha Ying, Weimin Mao, Dan Su. Prognostic significance of programmed death-1 and programmed death-ligand 1 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016; **7**; 30772-30780.
 68. Akiyuki Wakita, Satoru Motoyama, Hiroshi Nanjo, Yusuke Sato, Kei Yoshino, Tomohiko Sasaki, Yuta Kawakita, Jiajia Liu, Kazuhiro Imai, Hajime Saito, Yoshihiro Minamiya. PD-L1 expression is a prognostic factor in patients with thoracic esophageal cancer treated without adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res.* 2017; **37**; 1433-1441.
 69. Shuhei Ito, Shinji Okano, Masaru Morita, Hiroshi Saeki, Satoshi Tsutsumi, Hiroshi Tsukihara, Yuichiro Nakashima, Koji Ando, Yu Imamura, Kippei Ohgaki, Eiji Oki, Hiroyuki Kitao, Koshi Mimori, Yoshihiko Machara. Expression of PD-L1 and HLA class I in esophageal squamous cell carcinoma: prognostic factors for patient outcome. *Ann Surg Oncol.* 2016; **23**; 508-515.
 70. Kosaku Mimura, Leo Yamada, Daisuke Ujiie, Suguru Hayase, Takeshi Tada, Hiroyuki Hanayama, Aung Kyi Thar Min, Masahiko Shibata, Tomoyuki Momma, Zenichiro Saze, Shinji Ohki, Koji Kono. Immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: a review. *Fukushima J Med Sci.* 2018; **64**; 46-53.
 71. Ryohei Kawabata, Hisashi Wada, Midori Isobe, Takashi Saika, Shuichiro Sato, Akiko Uenaka, Hiroshi Miyata, Takushi Yasuda, Yuichiro Doki, Yuji Noguchi, Hiromi Kumon, Kazuhide Tsuji, Keiji Iwatsuki, Hiroshi Shiku, Gerd Ritter, Roger Murphy, Eric Hoffman, Lloyd J Old, Morito Monden, Eiichi Nakayama. Antibody response against NY-ESO-1 in

- CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer*. 2007; **120**; 2178-2184.
72. H Daiko, T Marafioti, T Fujiwara, Y Shirakawa, T Nakatsura, K Kato, I Puccio, T Hikichi, S Yoshimura, T Nakagawa, M Furukawa, K Stoeber, M Nagira, N Ide, T Kojima. Exploratory open-label clinical study to determine the S-588410 cancer peptide vaccine-induced tumor-infiltrating lymphocytes and changes in the tumor microenvironment in esophageal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020; **69**; 2247-2257.
 73. K Schumacher, W Haensch, C Röefzaad, P M Schlag. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Can Res*. 2001; **61**; 3932-3936.
 74. Xiao Zheng, Xing Song, Yingjie Shao, Bin Xu, Wenwei Hu, Qi Zhou, Lujun Chen, Dachuan Zhang, Changping Wu, Jingting Jiang. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in esophagus cancer: a meta-analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018; **45**; 720-732.
 75. Russell Bonneville, Melanie A Krook, Esko A Kautto, Jharna Miya, Michele R Wing, Hui-Zi Chen, Julie W Reeser, Lianbo Yu, Sameek Roychowdhury. Landscape of microsatellite instability across 39 cancer types. *JCO Precis Oncol*. 2017; **2017**; 1-15.
 76. Feng Wang, Dong-Bing Liu, Qi Zhao, Gang Chen, Xin-Ming Liu, Ying-Nan Wang, Hong Su, Yan-Ru Qin, Yi-Fu He, Qing-Feng Zou, Yan-Hui Liu, You-En Lin, Ze-Xian Liu, Jin-Xin Bei, Rui-Hua Xu. The genomic landscape of small cell carcinoma of the esophagus. *Cell Res*. 2018; **28**; 771-4.
 77. Scoazec JY, Rindi G. Oesophageal neuroendocrine neoplasms. In WHO Classification of Tumours Editorial Board eds. *World Health Organization classification of tumours. Digestive system tumours, 5th edn*. Lyon: IARC Press, 2019; 56–58.
 78. N Hashimoto, M Tachibana, D K Dhar, H Yoshimura, N Nagasue. Expression of p53 and RB proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathologic characteristics. *Ann Surg Oncol*. 1999; **6**; 489-94.

79. Koichiro Fujimasa, Nobuyuki Ohike, Tomoko Norose, Tomohide Isobe, Kazuo Kikuchi, Koji Otsuka, Masahiko Murakami, Masafumi Takimoto. Frequent and Specific Involvement of Changes of the p16-RB Pathway in Esophageal Neuroendocrine Carcinoma. *Anticancer Res.* 2019; **39**; 1927-1934.
80. Wang F, Liu DB, Zhao Q, Chen G, Liu XM, Wang YN, Su H, Qin YR, He YF, Zou QF, Liu YH, Lin YE, Liu ZX, Bei JX, Xu RH. The genomic landscape of small cell carcinoma of the esophagus. *Cell Res.* 2018 Jul; **28**(7); 771-774.
81. Chen Q, Fu YY, Yue QN, Wu Q, Tang Y, Wang WY, Wang YS, Jiang LL. Distribution of PD-L1 expression and its relationship with clinicopathological variables: an audit from 1071 cases of surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019 Mar 1; **12**(3); 774-786. eCollection 2019.
82. Saglam O, Conejo-Garcia J. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in advanced cervical cancer. *Integr Cancer Sci Ther.* 2018; **5**(2); 10.15761/ICST.1000272.
83. Kee Siang Lim, Kosaku Mimura, Ley-Fang Kua, Kensuke Shiraishi, Koji Kono. Implication of highly cytotoxic natural killer cells for esophageal squamous cell carcinoma treatment. *J Immunother.* 2018; **41**; 261-273.
84. Yoshifumi Baba, Daichi Nomoto, Kazuo Okadome, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba. Tumor immune microenvironment and immune checkpoint inhibitors in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2020; **111**; 3132–3141.

略語集

略語：AC+, 腺癌成分のみで HER2 陽性； AdenoCa, 腺癌成分の有無； Adj, adjuvant chemotherapy 術補補助化学療法； Alive, alive with no evidence of disease 無病生存； AWD, Alive with disease 有病生存； CCRT, concurrent chemoradiotherapy 同時性化学放射線療法； CPS, combined positive score； CR, complete response 完全奏功； CT, chemotherapy 化学療法； DOC, dead of other causes 他病死； DOD, dead of disease 原病死； Large, 大細胞型； LN, リンパ節； Ly, リンパ管侵襲； MANEC, 混合腺神経内分泌癌； MinEN, mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm 混合神経内分泌-非神経内分泌腫瘍； Mut, 変異型パターン； NAC, neoadjuvant chemotherapy 術前化学療法； NEC, neuroendocrine carcinoma 神経内分泌癌； NED, Alive with no evidence of disease 無病生存； Ope, 手術； PD, progressive disease 病勢進行； PD-L1, programmed death ligand 1； peri-tumoral TIL, 腫瘍浸潤縁リンパ球； PR, partial response 部分奏功； Rb, retinoblastoma protein； RT, radiation therapy (palliative) 緩和的放射線照射； SCRT, sequential chemoradiotherapy 異時性化学放射線療法； SD, stable disease 病勢安定； Small, 小細胞型； Sq, squamous cell carcinoma 扁平上皮癌； sTIL, stromal Tumor-Infiltrating Lymphocyte 間質腫瘍浸潤リンパ球； TIME, tumor immune microenvironment 腫瘍免疫微小環境； V, 静脈侵襲； WT, 野生型パターン