

博士論文

胸腺上皮腫瘍における PD-L1 の発現とその臨床的意義

勝屋 友幾

目次

要旨	3
序文	4
1. 胸腺上皮腫瘍の概説	4
2. 胸腺上皮腫瘍に対する治療	9
3. 抗 PD-1 抗体薬による治療開発	12
方法	16
1. 胸腺上皮腫瘍の手術施行検体を用いた腫瘍細胞の PD-L1 発現および腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の検討	16
2. 胸腺上皮腫瘍の化学療法施行症例の検体を用いた PD-L1 発現の検討	21
3. 統計学的手法	22
4. 倫理委員会の承認	22
結果	23
1. 抗 PD-L1 抗体のヒト肺胞上皮癌由来細胞 A549 での validation	23
2. 胸腺上皮腫瘍 手術施行検体での検討	24
3. 胸腺上皮腫瘍 化学療法施行例での検討	35
考察	41
1. 本研究結果の総括	41
2. 胸腺上皮腫瘍の PD-L1 発現に関する他研究との比較	41
3. PD-L1 発現の不均一性の原因	42
4. バイオマーカーとしての PD-L1	47
5. 本研究の成果	48
謝辞	49
引用文献	50

要旨

腫瘍細胞の PD-L1 発現は、免疫チェックポイント阻害薬の抗 PD-1 抗体薬、抗 PD-L1 抗体薬の治療効果と関連する。胸腺上皮腫瘍(胸腺腫および胸腺癌)は有効な治療法の少ない希少がんであり、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果は不明である。本研究では、後方視的に 139 例(101 例の胸腺腫、38 例の胸腺癌)の手術切除検体を用いて抗 PD-L1 抗体(clone E1L3N)による免疫組織化学染色を行い、胸腺腫の 22%、胸腺癌の 70%が PD-L1 陽性(H-score、カットオフ値 1%)であった。PD-L1 発現と予後の関連は明らかでなかった。また化学療法施行例では、その前後での PD-L1 発現の変化を検討できた胸腺腫 6 例で、PD-L1 発現が増加する傾向が見られた。本研究成果は、切除不能・再発胸腺癌に対する抗 PD-1 抗体薬 nivolumab の第 II 相試験につながった。

序文

1. 胸腺上皮腫瘍の概説

1-1. 胸腺上皮腫瘍の疫学

胸腺は未熟な T 細胞が成熟する場であり、外側の皮質と内側の髓質から構成される。骨髓で産生された T 前駆細胞はまず皮質に移入し、胸腺皮質上皮細胞からの刺激により T 細胞受容体遺伝子再構成を開始し、CD4+CD8+胸腺細胞となる。胸腺皮質上皮細胞に提示された自己ペプチド-MHC 複合体との相互作用によるポジティブセレクションを受けた後、CD4+CD8-または CD4-CD8+細胞へ分化する。髓質へ移動し、胸腺髓質上皮細胞や樹状細胞との相互作用によるネガティブセレクションを受け、中枢性自己寛容を確立した成熟 T 細胞が産生される。胸腺は思春期までをピークにして加齢により退縮するが、老年期でも T 細胞分化支持能が完全に消失するわけではない。

胸腺腫と胸腺癌は、胸腺上皮腫瘍と総称されるが、病理組織学的所見、遺伝子プロファイル、臨床像が異なる疾患である。2004 年の WHO 分類において、胸腺上皮腫瘍は胸腺腫 (Type A、AB、B1、B2、B3) と胸腺癌 (Type C) に大別された。WHO 分類は 2015 年にさらに詳細な組織型分類へと改訂され、胸腺癌に含まれていた胸腺内分泌腫瘍は胸腺癌で別分類となった。本邦の 2016 年の胸腺上皮腫瘍による死亡数は 431 例(がんの統計 2016) [1]、国外も含めた発生頻度は 10 万人年あたり 0.15~0.32 人[2-

4] (胸腺癌はそのうち 10~15%) と希少だが、成人の縦隔腫瘍の 35~50% を占める。胸腺上皮腫瘍の外科治療症例を対象とした本邦のデータベースによると、1991~2010 年の 20 年間に 3033 例が登録され、男性が 47%、手術時平均年齢は 57 歳 (範囲 13~88 歳)、胸腺腫 83% (Type A 7%, AB 23%, B1 20%, B2 22%, B3 11%)、胸腺癌 13% で、予後因子は WHO 分類、正岡病期、術後の癌遺残度であった [5, 6]。5 年生存割合は、胸腺腫全体で 94.4%、胸腺癌全体で 50.5%、病期別では、I 期 100%、II 期 98.4%、III 期 88.7%、IVA 期 70.6%、IVB 期 52.8% であった [7]。胸腺癌では完全切除例の 5 年生存割合は 67%、不完全切除例は 30%、外科切除困難例は 24% であった [7]。胸腺腫では原病死は 50% に過ぎず、20% は重症筋無力症により死亡する [8]。胸腺腫の 1/3 が自己免疫疾患を合併し (重症筋無力症の合併 20~45%、赤芽球癆の合併 3~5%、低 γ グロブリン血症 5% など)、それによる全身症状を契機に診断されることがある。無症状で、胸部レントゲン写真により偶然発見されることも多い。重症筋無力症は Type B での合併が多く、無症状でも血清抗アセチルコリン受容体抗体陽性例は陰性例に比べてその後の発症リスクが高い (23% vs 4%) [9]。一方、胸腺癌は自己免疫疾患を合併することは稀で、腫瘍が増大するまで無症状であることが多く、診断時には 75% が局所進行もしくは、胸膜播種や遠隔転移を有する。腫瘍増大に伴う局所症状には、前胸部痛、咳嗽、呼吸困難などがある。

1-2. 胸腺上皮腫瘍の病期分類

病理組織学的分類は WHO 分類(第 4 版)が用いられる(表 1-1)。胸腺腫の types は、被膜や線維性隔壁の有無、未熟リンパ球の浸潤などによって細分化され、悪性度が異なる(表 1-2)。本邦では、胸腺癌のうち、扁平上皮癌が 90%を占める。病期分類は、胸腺腫・胸腺癌に対して正岡分類が広く用いられるが、本来は胸腺腫の予後との相関に基づく分類である。正岡古賀分類は、治療方針が異なるため、II 期を細分化したものである(表 2)。

表 1-1 胸腺上皮性腫瘍の WHO 分類(第 4 版)[10]

Thymoma	Type A, including atypical variant	
	Type AB	
	Type B1	
	Type B2	
	Type B3	
	Micronodular thymoma with lymphoid stroma	
	Metaplastic thymoma	
	Other rare thymomas	Microscopic thymoma
		Sclerosing thymoma
Lipofibroadenoma		
Thymic carcinoma (Type C)	Squamous cell carcinoma	
	Basaloid carcinoma	
	Mucoepidermoid carcinoma	
	Lymphoepithelioma-like carcinoma	
	Clear cell carcinoma	
	Sarcomatoid carcinoma	
	Adenocarcinoma	Papillary adenocarcinoma
		Thymic carcinoma with adenoid cystic carcinoma-like features
		Mucinous adenocarcinoma
		Adenocarcinoma, NOS
	NUT carcinoma	
	Undifferentiated carcinoma	
	Other rare thymic carcinomas	Adenosquamous carcinoma
		Hepatoid carcinoma
		Thymic carcinoma, NOS
Thymic neuroendocrine tumors*	Carcinoid tumors	Typical carcinoid
		Atypical cartinoid
	Large cell neuroendocrine carcinoma	Combined large cell neuroendocrine carcinoma
	Small cell carcinoma	Combined small cell carcinoma
Combined thymic carcinomas		

*胸腺神経内分泌腫瘍は、WHO 第4版(2015年)では胸腺癌から独立した項目として分類されているが、第3版(2004年)では胸腺癌に含まれている。そのため、本研究では、胸腺癌症例の中に神経内分泌腫瘍が含まれる。

表 1-2 胸腺上皮性腫瘍の WHO 分類(第4版)の形態的特徴

WHO 分類		悪性度	未熟リンパ球
胸腺腫	Type A	+	+
	Type AB	二相性	
	Type B1	++	++++
	Type B2	+++	+++
	Type B3	++++	++
胸腺癌(Type C)	扁平上皮癌など	+++++	-(成熟リンパ球のみ)
その他	神経内分泌腫瘍(カルチノイドなど)		

表 2 正岡分類、正岡古賀分類[11]

正岡分類		正岡-古賀分類	
病期	診断規準	病期	診断規準
I	肉眼的に完全に被包され、顕微鏡的にも被膜への浸潤を認めない	I	完全に被膜に覆われている 被膜浸潤しているが貫通していない
II	周囲の脂肪織または縦隔胸膜への肉眼的浸潤、または被膜への顕微鏡的浸潤	IIa	顕微鏡的に被膜を超える浸潤
		IIb	胸腺あるいは周囲脂肪織への肉眼的浸潤 縦隔胸膜や心膜に接してはいるが浸潤していない
III	隣接臓器への肉眼的浸潤:心膜、大血管、肺などへの浸潤	III	隣接臓器への浸潤:縦隔胸膜、心嚢、臓側胸膜 あるいは肺、横隔神経、迷走神経、大血管への浸潤
IVa	胸膜または心膜播種	IVa	胸膜または心膜播種
IVb	リンパ行性または血行性転移	IVb	リンパ節転移または遠隔転移

2. 胸腺上皮腫瘍に対する治療

2-1. 切除可能胸腺上皮腫瘍に対する治療

胸腺腫では、予後の改善と、自己免疫疾患の治療の観点から、完全切除が期待できるⅠ期、Ⅱ期だけでなく、肉眼的に周辺臓器(心嚢、肺、大血管)への浸潤を認めるⅢ期に対しても、可能な限り外科切除を行い、病期、Type、完全切除か否かによって、放射線療法や化学療法の併用や追加を行う[12]。周術期の集学的治療(Ⅱ～Ⅲ期の周術期治療、ⅣA期に対する外科治療)はエビデンスレベルの高い領域ではなく、各施設での内科、外科、放射線科によるコンセンサスが必要とされる。本邦の報告では、Ⅲ期の完全切除率は85%、Ⅳ期で42%であり、Ⅲ期の75%、Ⅳ期の71%で術後補助療法が行われた。術後補助療法として、Ⅲ期では多くが放射線療法、Ⅳ期では半数で化学療法が行われた[7]。5年無再発生存割合と5年生存割合はそれぞれ、Type A, ABで84%と84%、Type B1, B2で47%と50%、Type B3で58%と58%であった[6]。

胸腺癌では、予後改善を目的とした減量手術は推奨されず、Ⅲ期以降では、基本的に化学療法と放射線療法の併用または化学療法単独を行う。本邦の報告では、完全切除を行ったのは胸腺癌全体の51%であり、外科切除例の58%で術後補助療法が行われた[7]。5年無再発生存割合と5年生存割合はそれぞれ、22%と26%であった

[6]。

2-2. 切除不能胸腺上皮腫瘍に対する治療

外科切除や根治的放射線療法が困難な例、再発例に対しては、プラチナ併用レジメンによる化学療法を検討する。ただし、予後改善効果は明らかになっていないこと、無治療でも緩徐な経過をとる症例もあることから、胸腺腫、胸腺癌ともに本邦で保険適用となる化学療法は存在しない。前方視的試験(症例集積が困難な希少疾患であるため、すべて単群第 II 相試験)で一定の治療効果が認められる初回化学療法のレジメンは、胸腺腫では CAP 療法 (cisplatin + doxorubicin + cyclophosphamide) (N=30、奏効割合 [RR] 50%、病勢制御割合 [DCR] 83%、無増悪生存期間中央値 [mPFS] 12 ヶ月、全生存期間中央値 [mOS] 38 ヶ月) [13]、CODE 療法 (cisplatin + vincristine + doxorubicin + etoposide) (N=30、RR 59%、DCR 96%、mPFS 9.5 ヶ月、mOS 73 ヶ月) [14]、CDDP+ETP 療法 (cisplatin + etoposide) (N=16、RR 60%、DCR 94%、mPFS 26 ヶ月、mOS 52 ヶ月) [15]、CBDCA+PTX 療法 (carboplatin + paclitaxel) (N=21、RR 43%、DCR 90%、mPFS 17 ヶ月) [16, 17] で、胸腺癌では CBDCA+PTX 療法 (carboplatin + paclitaxel) (各々 N=23, 40、RR 22~36%、DCR 95%、mPFS 5~7.5 ヶ月、mOS 20 ヶ月) である[16, 17]。後方視的試験で胸腺腫および胸腺癌で良好な治療成績が報告されているレジメンには、ADOC 療法 (cisplatin + doxorubicin + vincristine + cyclophosphamide) (胸腺

腫：RR 92%、mPFS 12 ヶ月、mOS 15 ヶ月、胸腺癌：RR 75%、mPFS 8.4 ヶ月、mOS 19 ヶ月） [18, 19]がある。胸腺腫では、奏効割合の高さ（69% vs 38%）からアンスラサイクリン系レジメンである CAP 療法、CODE 療法が推奨される[20]。縦隔に放射線照射歴のある場合、心毒性リスクの点から、非アンスラサイクリン系レジメンも選択される。胸腺癌では、奏効割合とアンスラサイクリン系レジメンとの関連はないとされ（42% vs 41%） [20]、より毒性の低い CBDCA+PTX 療法が普及している。再発・増悪時は、初回化学療法で効果のあったレジメンの再投与（doxorubicin は、累積による心毒性リスクあり）や、二次化学療法を検討する。胸腺癌に対しては、比較的治療効果の高い sunitinib（胸腺腫：RR 6%、DCR 81%、mPFS 8.5 ヶ月、1 年生存率 86%、胸腺癌：RR 26%、DCR 91%、mPFS 7.2 ヶ月、1 年生存率 78%） [21]、S-1（胸腺癌：RR 35%、DCR 65%、mPFS 4.3 ヶ月、mOS 23 ヶ月） [22]が汎用されている。Sunitinib は、治療関連死 2.5%、有害事象関連治療中止 21%と毒性が強い [21]。

2-3. 分子生物学的解析に基づく治療

胸腺上皮腫瘍の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析については、いくつかの報告がある。胸腺癌の FFPE 検体を使用した 50 の遺伝子を対象としたターゲットシーケンスでは、13.5%（52 例中 7 例）に、*TP53*, *KRAS*, *FBXW7*, *NRAS* 遺伝子変異が認められたのみであり、いずれもがん治療において治療薬の開発に即時に繋がるような

遺伝子変異ではなかった [23]。胸腺上皮腫瘍 28 例の whole exon sequence では、胸腺腫では type A、type AB の 7~8 割に *GTF21* の遺伝子変異を認め、胸腺癌では *TP53*、*CYLD*、*CDKN2A* などのがん抑制遺伝子、*BAP1*、*PBRM1* などクロマチン修飾因子、*HRAS*、*KRAS* などの遺伝子変異が報告された。また遺伝子変異数は、胸腺腫では 18.4 個、胸腺癌では 43.5 個であった。全エクソームシーケンスなどで、体細胞変異(特に非同義置換)の頻度や数 (mutation burden) が多い癌腫では、免疫チェックポイント阻害薬の効果が高いことが知られている。High mutation burden の定義は研究によって異なるが、体細胞変異 243 個以上を high、100~242 個を medium、99 個以下を low とした研究や[24]、非同義置換変異 178 個以上を high、177 個以下を low とした研究で[25]、high mutation burden は抗 PD-1 阻害薬の効果予測因子と報告されている。胸腺上皮腫瘍は high tumor mutation burden とは考えられていない [26]。

3. 抗 PD-1 抗体薬による治療開発

がんの薬物療法として、細胞障害性抗がん薬、分子標的薬に続いて、近年免疫チェックポイント阻害薬が台頭し、悪性黒色腫[27, 28]、非小細胞肺癌[29-31]、腎細胞癌[32, 33]、ホジキンリンパ腫[34, 35]、頭頸部癌[36, 37]、胃癌[38]など多くの癌腫にわたって有効性を示している。免疫チェックポイント阻害薬は、腫瘍免疫の理論に基づいた治療法であり、腫瘍細胞が免疫機構から回避するために用いる経路(チェックポイントと

呼ばれる)を遮断することで、抗腫瘍効果を発揮する[39, 40]。臨床応用が最も進んでいるチェックポイントのひとつが PD-1・PD-L1 経路である。そもそも PD-L1 は様々な臓器(胎盤, 血管内皮, 筋肉, 肝細胞など)、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなどに発現しており、PD-1・PD-L1 経路を通じた共役シグナルを通じて、T 細胞に対して負の制御を与え、過剰な自己免疫反応を抑制する役割を持つ。正常胸腺組織では 90% (20 例中 18 例、うち小児 2 例中 2 例)の検体で PD-L1 発現が認められ、PD-L1 陽性細胞は小児では髄質、成人では皮質に偏在していたという報告がある[41]。一方、腫瘍細胞は PD-L1 を発現することで、T 細胞の PD-1 に結合して抑制性のシグナルを送り、がん免疫監視機構から逃避する。抗 PD-1 抗体薬および抗 PD-L1 抗体薬は、PD-1・PD-L1 経路の結合を阻害することで T 細胞への抑制シグナルを解除し、抗腫瘍効果を得る。各製薬会社による抗体製剤の開発が進められていたが、本研究開始時に臨床的有用性が示されていたのは、抗 PD-1 抗体薬(特に nivolumab)であった。

抗 PD-1 抗体薬の使用にあたり、腫瘍細胞の PD-L1 の発現は、治療効果を予測するバイオマーカーとして有用である。抗 PD-1 抗体薬 nivolumab の進行期固形腫瘍を対象とした第 I 相試験では、PD-L1 陰性例では治療効果が見られなかった(17 例中 0 例)のに対し、PD-L1 陽性例では 36% (25 例中 9 例)で治療効果が認められたことが根拠となった[40]。その後、第 II 相試験、第 III 相試験でも腫瘍細胞の PD-L1 の発現

と治療効果との関連が検討された。悪性黒色腫や非扁平上皮非小細胞肺癌では、腫瘍細胞の PD-L1 発現と抗 PD-1 抗体薬および抗 PD-L1 抗体薬と治療効果との関連が報告されており、メタ解析でも PD-L1 発現と固形腫瘍での奏効割合との相関が示されている (OR, 2.26; 95% 信頼区間 [CI], 1.85–2.75; $p < 0.001$) [42]。なお、腎細胞癌など、腫瘍細胞の PD-L1 発現と抗 PD-1 抗体薬 nivolumab の治療効果の関連が認められない腫瘍もある[32]。

抗 PD-1 抗体薬は、PD-1・PD-L1 経路の結合を阻害するため、CD8 陽性 T 細胞の PD-1 発現も、治療効果と関連することが予想される。PD-1 は腫瘍浸潤リンパ球、制御性 T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞、樹状細胞に発現している膜タンパクである[43]。非小細胞肺癌、悪性黒色腫での研究では、PD-1 陽性の CD8 陽性 T 細胞の存在が予後不良因子という報告があるが[44, 45]、PD-L1 と比較して詳細は明らかになっていない。正常胸腺組織では 55% (20 例中 11 例、うち小児 2 例中 0 例) の検体で PD-1 発現が認められ、PD-1 陽性細胞は髄質に偏在していたという報告がある[41]。

前述の通り、胸腺上皮腫瘍は有効な治療法の少ない希少疾患であり、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果は検討されていない。胸腺上皮腫瘍の PD-L1 発現に関する先行研究が 2 報あるが、Brown ら、Padda らによる研究は十分な症例数ではなく、さらに免疫組織染色で用いられた抗体 (各々 29E.2A3、clone15) は抗 PD-1 抗体薬および抗 PD-L1 抗体薬の治療効果との関連が不明瞭な抗体であるという問題点があった[46,

47]. 本研究では、胸腺上皮腫瘍における腫瘍細胞の PD-L1 の発現および胸腺癌での腫瘍浸潤免疫担当細胞の PD-1 の発現を、適切な抗体を用いた免疫組織染色で検討した。

方法

1. 胸腺上皮腫瘍の手術施行検体を用いた腫瘍細胞の PD-L1 発現および腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の検討

1-1. 抗 PD-L1 抗体の選択

免疫組織化学染色に用いる抗 PD-L1 抗体は、ウサギモノクローナル抗体の clone E1L3N (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を用いた。Clone 22C3、clone 28-8 は研究開始当時、抗 PD-1 抗体薬のコンパニオン診断薬、コンプリメンタリー診断薬としての開発が進められていたが、研究用試薬としては入手困難であった。市販の抗 PD-L1 抗体のうち、Cell Signaling Technology は抗体製造技術に定評のある会社であったため、本抗体を選択した。なお、本研究開始後に行われた米国 MD Anderson Cancer Center からの報告では、clone E1L3N による免疫組織染色は、ヒト扁桃腺組織、ヒト胎盤組織、*PD-L1* 遺伝子をトランスフェクションしたヒト胎児腎細胞 293 (HEK293 細胞) を positive control とし、HEK293 細胞を negative control として、validation されている[48]。

1-2. 抗 PD-L1 抗体 (clone E1L3N) のヒト肺胞上皮癌由来細胞 A549 での validation

ヒト肺胞上皮癌由来細胞である A549 細胞 (ATCC, Manassas, VA) を用いて、抗 PD-L1 抗体 (clone E1L3N) の validation を行った。A549 細胞は、10% 加熱不活化したウ

シ胎児血清と抗菌薬・抗真菌薬を加えた RPMI-1649 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に 37°C、5% 二酸化炭素の条件下に保存し、PD-L1-small-interfering RNA [siRNA] (s26548, Ambion, Austin, TX) または Allstars Negative Control siRNA (1027281, Qiagen, Hilden, Germany) を DharmaFECT 1 reagent (Thermo Scientific, San Jose, CA) を用いて、25 nM でトランスフェクションした。トランスフェクションの 3 日後、細胞を収集してセルブロック作成し、抗体との親和性を検討した。収集した細胞を 10 分間 2000 rpm 遠心分離し、ペレットをホルマリンで固定し、パラフィン包埋検体を作成した。抗 PD-L1 抗体での免疫組織化学染色の手順は、1-3 に後述する手術検体と同様に行った。

1-3. 手術検体での腫瘍細胞の PD-L1 発現および腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の評価

1-3-1. 標本の作製手順

1973 年から 2009 年の間に国立がん研究センター中央病院で手術を受けた胸腺上皮腫瘍の手術検体を使用した。

胸腺上皮腫瘍の組織内不均一性を考慮し、1 つのホルマリン固定パラフィン包埋組織検体の腫瘍中心部分からランダムに 2 か所のサンプリングを行い、直径 2 mm の tissue microarray (TMA) 用の検体とした。脱パラフィン化した 4 μm 厚の TMA 切片を用いて未染色標本を作製し、キシレン、次いでエタノールでインキュベートし、水で洗浄した。

抗原賦活化のため、標本を 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液で 10 分間、121°Cで煮沸し、水で洗浄後、3% ペルオキシダーゼでインキュベートし、再度水で洗浄後、緩衝液へ保存した。免疫組織化学染色は次の手順で行った。抗体希釈剤に SignalStain Antibody Diluent (#8112、Cell Signaling Technology、Danvers、MA)を使用し、一次抗体の抗 PD-L1 抗体(E1L3N、1:800)および抗 PD-1 抗体(NAT105、1:100;Abcam、Cambridge、UK)を結合させた。抗原可視化のため、ペルオキシダーゼでラベルした二次抗体(EnVision/HRP system、DAKO、Carpinteria、CA)で標識した。緩衝液で洗浄後、DAB 染色を行った。

1-3-2. 腫瘍細胞の PD-L1 発現および腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の評価方法

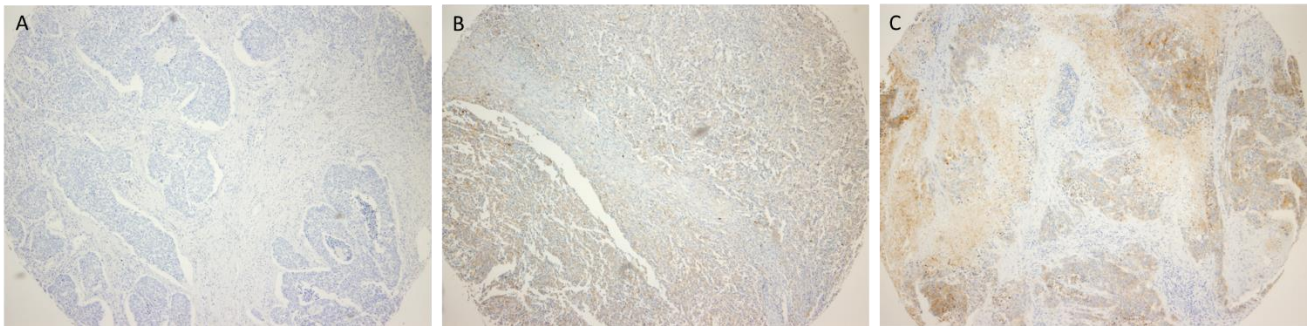
PD-L1 発現の評価は、2 人の観察者(YK, KT)が独立して行い、結果が異なった場合は、ディスカッションを行った。腫瘍細胞が形態学的に鑑別困難な場合は、HE 染色を参照した。なお、胸腺腫ではリンパ球成分が多く、腫瘍浸潤リンパ球との区別が困難であることから、腫瘍浸潤リンパ球での PD-1 発現の評価は、胸腺癌のみで行った。壊死領域は腫瘍面積に含まず、腫瘍面積の合計が TMA の面積の半分未満のものは、腫瘍細胞数が十分でないとして評価の対象から除外した。

腫瘍細胞の PD-L1 発現の評価は、一般的に細胞膜の染色割合のみ評価する方法と、細胞膜と細胞質の染色割合を評価する方法に大別されるが、clone E1L3N は半定量的評価が可能であるため[48]、乳癌の HER2 発現の評価等、実地臨床でも用いられ

ている H-score (0~300:腫瘍細胞の PD-L1 染色強度 [0~3:0 = 陰性、1 = 低度、2 = 中程度、3 = 高度] ×各染色強度の面積の腫瘍細胞面積における割合 [0~100]) を用いた[49-52]。非小細胞肺癌検体に対して clone E1L3N を用いて H-score で PD-L1 の発現を評価した報告では、カットオフ値を 1%、5%、50%としても PD-L1 陽性割合にほぼ変化がなかった[48]。そのため、本研究では、偽陰性のリスクを下げるため、PD-L1 は 1%以上 (H-score 3 点以上)を陽性とした(図 1)。

腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現についても、H-score で同様に評価し、カットオフ値を 1%とした。

図 1. H-score を用いた PD-L1 発現の評価例



A) H-score 0点 (染色強度0: 100%、染色強度1,2,3: 各0%): PD-L1陰性

B) H-score 70点 (染色強度0: 50%、染色強度1: 30%、染色強度2: 20%、染色強度3: 0%): PD-L1陽性

C) H-score 220点 (染色強度0: 20%、染色強度1: 0%、染色強度2: 20%、染色強度3: 60%): PD-L1陽性

(各TMAは直径2mm、抗体: 抗PD-L1抗体 E1L3N)

1-4. 腫瘍細胞の PD-L1 発現との関連因子の評価

PD-L1 発現と関連する因子は、患者背景(性別、年齢 [50 歳未満 vs 50 歳以上]、WHO 分類 [A, AB, B vs C]、正岡分類 [I、II 期 vs III、IV 期]、原発巣の最大径 [5 cm 未満 vs 5 cm 以上]、術前化学療法 [あり vs なし])の項目について検討した。PD-L1 陽性・陰性群での生存期間の比較を行い、生存期間は、手術日から死亡日または追跡から脱落した日のうち早い日までの期間とした。

1-5. 胸腺上皮腫瘍の予後予測因子の評価

予後予測因子の候補(性別、年齢、WHO 分類、正岡分類、原発巣の最大径、術後再発、切除断端、術前治療、術後治療、PD-L1 発現)と生存期間の関連について、多変量解析を行った[5, 6]。

2. 胸腺上皮腫瘍の化学療法施行症例の検体を用いた PD-L1 発現の検討

2-1. 腫瘍細胞の PD-L1 発現の評価

2000 年から 2014 年の間に国立がん研究センター中央病院で化学療法を受けた胸腺上皮腫瘍の生検検体および手術検体を使用した。4 μm の薄切標本を作製し、前述と同様の方法で腫瘍細胞の PD-L1 発現を評価した。

2-2. 化学療法前後での腫瘍細胞の PD-L1 発現の変化

化学療法の前後に検体を採取した例において、同一症例間での腫瘍細胞の PD-L1 発現の変化を評価した。

3. 統計学的手法

Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析は、単変量解析で p 値 < 0.1 、相関係数 < 0.7 となった因子に対して行い、有意水準は、両側 p 値 < 0.05 とした。初回化学療法の治療効果は RECIST ver 1.1 に準じて行った。生存期間は、手術施行症例では手術施行日、化学療法施行症例では化学療法開始日から死亡日または追跡から脱落した日のうち早い日までの期間とした。生存期間は Kaplan-Meier 曲線で近似し、ログランク試験で検定、両側 p 値 < 0.05 を統計的有意な差とした。以上の統計解析には、Stata version 13.0 (College Station, Texas) を用いた。

4. 倫理委員会の承認

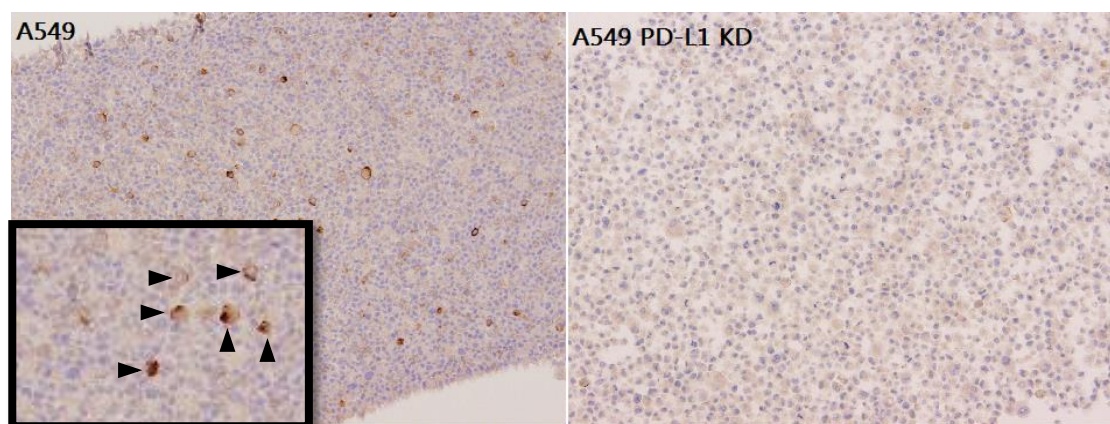
以上 1、2 の研究は、国立がん研究センター中央病院 倫理委員会 (2010-0077) の承認を得て施行された。

結果

1. 抗 PD-L1 抗体のヒト肺胞上皮癌由来細胞 A549 での validation

ヒト肺胞上皮癌(腺癌)由来細胞である A549 細胞と、*PD-L1* 遺伝子を si-RNA でノックダウンした A549-si-RNA-PD-L1 細胞で、それぞれ PD-L1 の発現を評価した。免疫組織化学染色で、A549 細胞では PD-L1 強陽性を示したが、A549-si-RNA-PD-L1 細胞では PD-L1 の発現が全く認められなかった(図 2)。この結果から、抗 PD-L1 抗体(clone E1L3N)を本研究で用いることの妥当性を確認した。

図 2. A549 細胞と A549-si-RNA-PD-L1 細胞での PD-L1 の発現



左 (positive control) : A549 細胞では PD-L1 陽性細胞が認められる。(弱拡大、黒枠内は強拡大、矢頭は PD-L1 陽性細胞)

右 (negative control) : *PD-L1* 遺伝子を si-RNA でノックダウンした A549-si-RNA-PD-L1 細胞では、PD-L1 陽性細胞は認められない。(弱拡大)

2. 胸腺上皮腫瘍 手術施行検体での検討

2-1. 患者背景

胸腺腫または胸腺癌に対して手術が行われたのは、141 例であった。患者背景は表 2 の通りである。62%が女性、年齢中央値は 58 歳、胸腺癌が 27%、70%が正岡分類 I・II 期で、10%が IV 期であった。術前化学療法を行ったのは 4%のみで、術後化学療法は 4%、術後放射線療法は 11%、術後化学放射線療法は 4%で行われた。72%で腫瘍の完全切除が行われた。

TMA 検体に含まれる腫瘍細胞数が少なく、評価に値しなかったため、2 例(29 歳女性 type B2、56 歳女性 type C)は除外し、免疫組織化学染色は 139 例で評価した。

表 2 手術施行例の患者背景

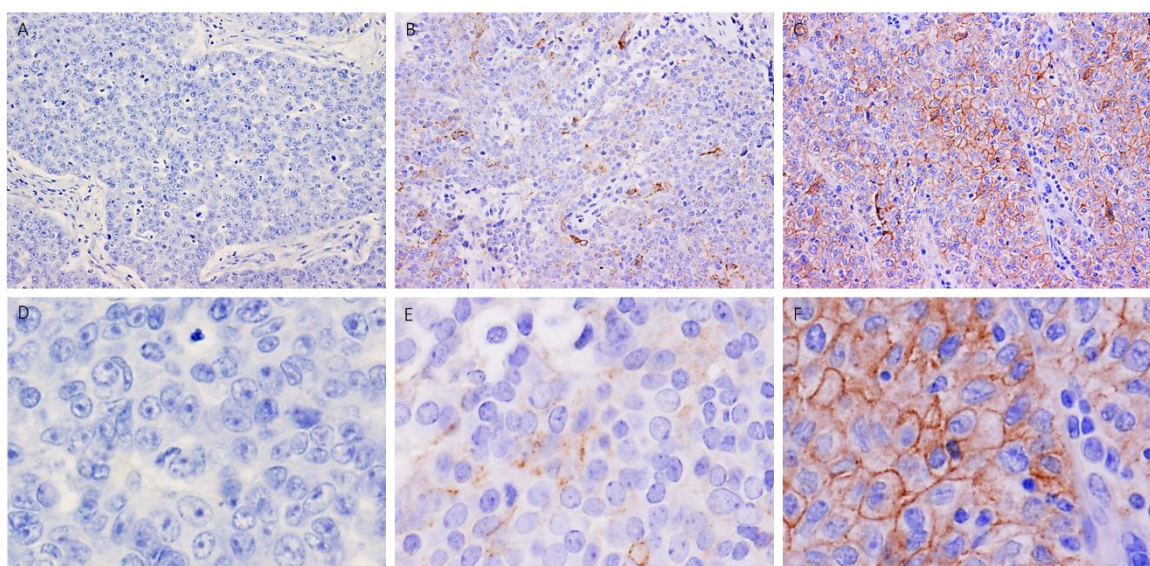
Variable		N=141	%
Sex	Male	53	38
	Female	88	62
Age years (mean, range)	58 (25-84)		
WHO classification	Type A	9	6
	Type AB	48	34
	Type B1	17	12
	Type B2	23	17
	Type B3	6	4
	Type C	38	27
Masaoka-Koga Stage	I	34	24
	II	64	46
	III	27	19
	IVa	9	6
	IVb	6	4
	Not available	1	1
Preoperative therapy	None	135	96
	Chemotherapy	6	4
Treatment after operation	None	114	81
	Chemotherapy	6	4
	Radiotherapy (50Gy)	15	11
	Chemoradiation	6	4
Resection margin status	R0	102	72
	R1, R2	32	23
	Not available	7	5

R0:腫瘍遺残なし、R1:顕微鏡的腫瘍遺残あり、R2:肉眼的腫瘍遺残あり

2-2. 胸腺上皮腫瘍細胞の PD-L1 発現

腫瘍細胞での、代表的な PD-L1 の免疫組織化学染色結果を図 3 に示す。PD-L1 の発現は腫瘍細胞の細胞膜と細胞質で認識されたが、腫瘍領域や間質に浸潤したリンパ球では、PD-L1 の発現は認めなかった。

図 3 胸腺上皮腫瘍細胞の PD-L1 発現



A, D) H-score 0点 (染色強度0: 100%、染色強度1,2,3: 各0%):PD-L1陰性

B, E) H-score 90点 (染色強度0: 60%、染色強度1: 0%、染色強度2: 30%、染色強度3: 10%):PD-L1陽性

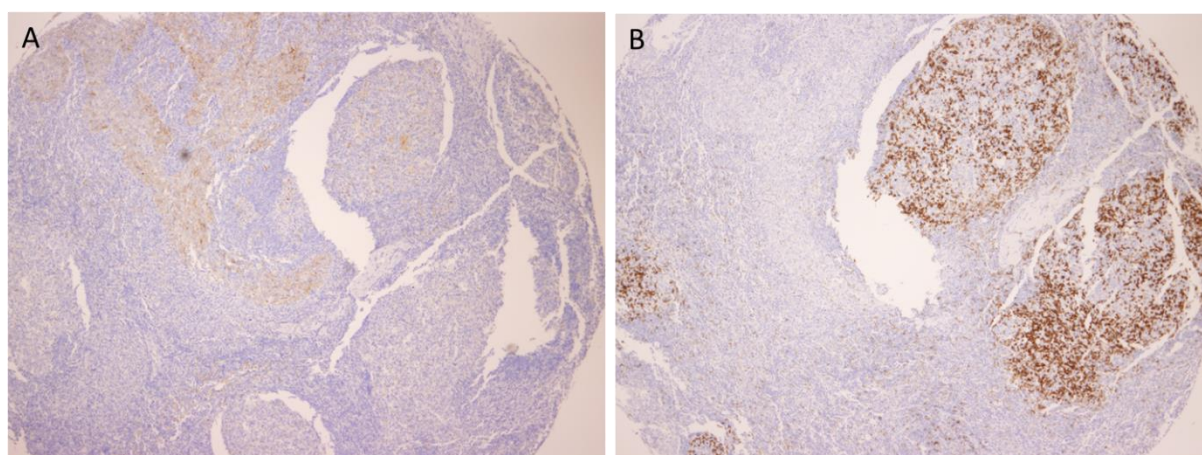
C, F) H-score 180点 (染色強度0: 40%、染色強度1: 0%、染色強度2: 0%、染色強度3: 60%):PD-L1陽性

(A, B, C:弱拡大、D, E, F:強拡大、抗体:抗 PD-L1 抗体 E1L3N)

2-3. 腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現

胸腺癌検体の代表的な PD-1 の免疫組織化学染色結果を図 4 に示す。PD-1 の発現は腫瘍細胞には認められなかった。腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 の発現は、部位によって不均一性が認められ、PD-L1 陽性腫瘍細胞と PD-1 陽性腫瘍浸潤リンパ球の発現部位には解離が見られた。PD-1 陽性例は、62% (37 例中 23 例) に認められた。

図 4 胸腺癌検体での PD-L1 および PD-1 発現



A) PD-L1陽性例 (抗体: 抗PD-L1抗体 E1L3N)

B) PD-1陽性例 (抗体: 抗PD-1抗体 NAT105)。

各TMAは直径2mm。

A)のPD-L1陽性腫瘍細胞とB)のPD-1陽性腫瘍浸潤リンパ球の発現部位には解離が見られる。

2-4. 患者背景・病理組織学的所見別の PD-L1 発現

各患者背景および病理所見別の PD-L1 陽性割合は表 3 の通りである。PD-L1 陽性例は、胸腺腫の 22% (102 例中 22 例)、胸腺癌の 70% (37 例中 26 例) に認められた。H-score の分布、5%、50% をカットオフ値とした場合の陽性割合は図 5 の通りである。H-score の平均値は胸腺腫で 6 (範囲 0-120)、胸腺癌で 41 (範囲 0-220) であった。胸腺腫のうち、type A, AB は type B1, B2, B3 と比較して PD-L1 陽性割合が低値であった。正岡分類での stage が進行するにつれて、PD-L1 陽性割合が上昇する傾向が見られたが、原発巣の大きさでは、PD-L1 陽性割合に一定の傾向は見られなかった。術前化学療法施行例では、67% が PD-L1 陽性であった。

図 5 胸腺上皮腫瘍の PD-L1 H score の分布

Cut off	1%		5%		50%	
	<3	≥3	<15	≥15	<150	≥150
TM (N=102)	22 (22%)	80	11 (11%)	91	0 (0%)	102
TC (N=37)	26 (70%)	11	20 (54%)	17	1 (3%)	36

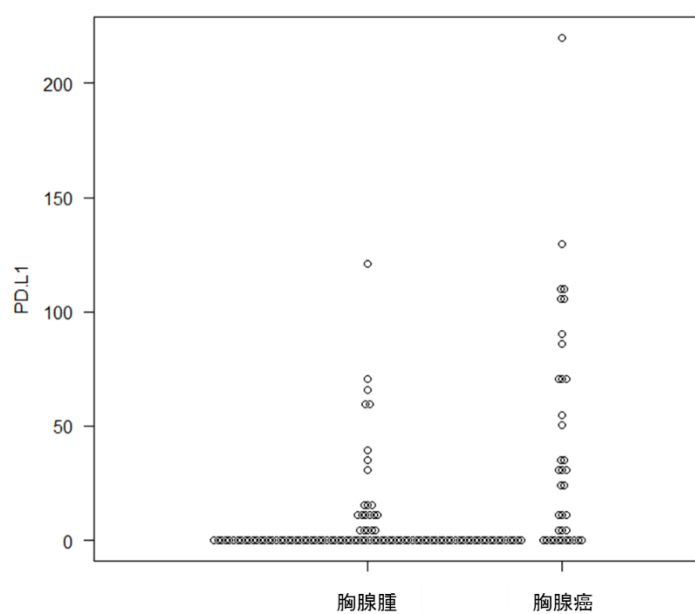


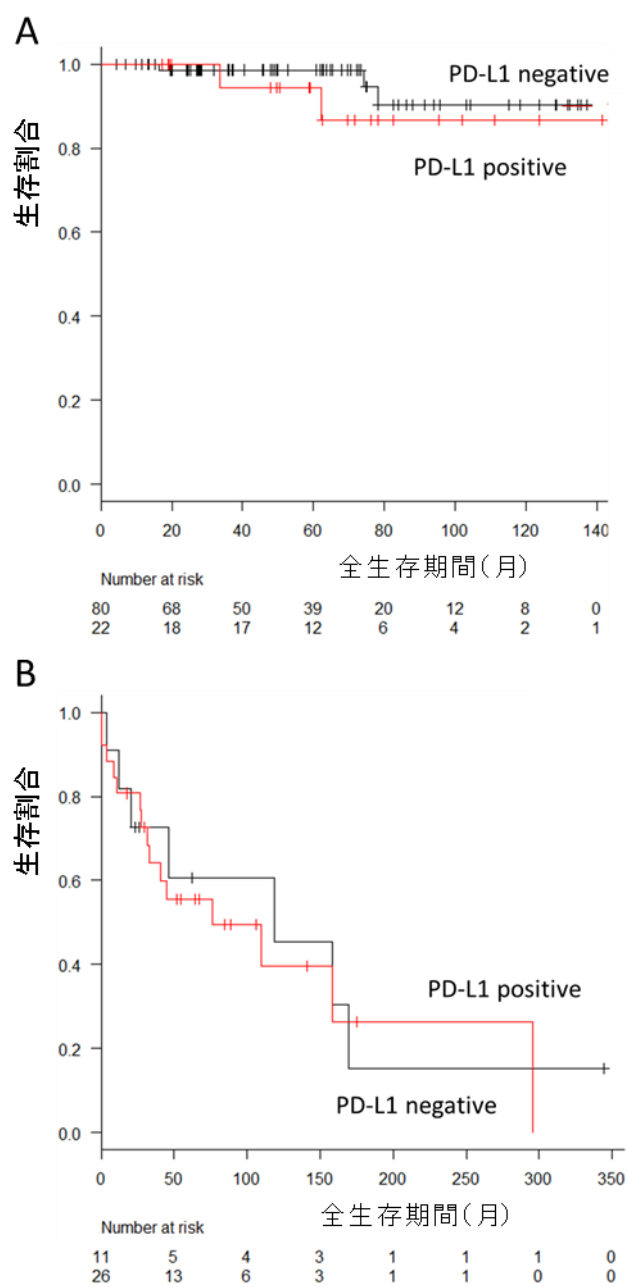
表 3 患者背景および病理所見と PD-L1 陽性割合

		PD-L1 positive (%)	N
Sex	Male	45	24/53
	Female	28	24/86
Age	≥ 50	31	33/105
	< 50	44	15/34
WHO classification			
Thymoma (Types A, AB, and B)		22	22/102
	Type A	22	2/9
	Type AB	8	4/48
	Type B1	35	6/17
	Type B2	36	8/22
	Type B3	33	2/6
Thymic carcinoma (Type C)		70	26/37
Masaoka Stage	Stage I	12	4/33
	Stage II	28	18/64
	Stage III	59	16/27
	Stage IVa	56	5/9
	Stage IVb	83	5/6
Primary tumor size (cm)	0 to 2	33	2/6
	>2 to 3	67	4/6
	>3 to 5	26	10/39
	>5 to 7	36	19/53
	>7	37	13/35
Preoperative therapy	None	33	44/133
	Chemotherapy	67	4/6

2-5. 胸腺上皮腫瘍の PD-L1 陽性/陰性群での生存期間

胸腺腫、胸腺癌の PD-L1 陽性・陰性別の生存曲線は図 6 の通りであった。胸腺腫では PD-L1 陽性群でやや予後不良の傾向が見られたが、有意差はなく(生存期間中央値はいずれも未到達、 $p = 0.408$)、胸腺癌でも 2 群間に有意差はなく($p = 0.836$)、PD-L1 陽性群での生存期間中央値は 76 ヶ月 (95%信頼区間 31 ヶ月-未到達)、PD-L1 陰性群では 119 ヶ月 (95%信頼区間 12-170 ヶ月)であった。

図 6 PD-L1 陽性群・陰性群での生存曲線



A) 胸腺腫;生存期間中央値はいずれも未到達、 $p = 0.408$

B) 胸腺癌;PD-L1 陽性群での生存期間中央値は 76 ヶ月 (95%信頼区間 31 ヶ月-未到達)、PD-L1 陰性群では 119 ヶ月 (95%信頼区間 12-170 ヶ月)、 $p = 0.836$

2-6. 胸腺上皮腫瘍の予後予測因子についての多変量解析

予後との関連因子についての多変量解析では、WHO 分類 [A, AB, B vs C] (HR, 5.63; 95% CI, 1.72–18.42; $p = 0.004$)、正岡分類 [I、II 期 vs III、IV 期] (HR, 6.72; 95% CI, 1.85–24.41; $p = 0.004$)、術前治療 [あり vs なし] (HR, 4.87; 95% CI, 1.38–17.17; $p = 0.014$) が有意な予後予測因子であった。PD-L1 陽性は、予後予測因子とはならなかった(表 4)。

表 4 予後予測因子の単変量・多変量解析

Variables		Univariable analysis			Multivariable analysis		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age	<50	1					
	≥50	0.97	0.38–2.44	0.959			
Sex	Female	1					
	Male	0.94	0.42–2.07	0.881			
Histologic type	Thymoma	1					
	Thymic carcinoma	9.61	3.53–26.17	0.000	5.63	1.72–18.42	0.004
Masaoka Staging	I–II	1					
	III–IVb	13.10	4.48–38.26	0.000	6.72	1.85–24.41	0.004
Tumor size	<5cm	1					
	≥5cm	1.41	0.58–3.38	0.441			
Recurrence	Recurrent free	1					
	Recurrent	4.00	1.80–8.90	0.001	0.79	0.30–2.06	0.637
Surgical resection	Complete (R0)	1					
	Incomplete (R1, R2)	2.01	0.56–7.15	0.277			
Preoperative therapy	No	1					
	Yes	7.00	2.33–21.02	0.001	4.87	1.38–17.17	0.014
Treatment after operation	No	1					
	Yes	4.96	2.19–11.19	0.000	0.81	0.32–2.09	0.677
PD-L1 expression	Negative	1					
	Positive	2.73	1.23–6.04	0.013	1.13	0.46–2.79	0.780

3. 胸腺上皮腫瘍 化学療法施行例での検討

3-1. 患者背景

胸腺腫または胸腺癌に対して化学療法が行われたのは、75 例であった。17 例の胸腺腫のうち、12 例の計 18 個の検体が入手可能であった。58 例の胸腺癌のうち、計 18 例の 18 個の検体が入手可能であった。30 名の患者背景は表 5 に示す通りである。

胸腺腫 12 例のうち、type B1 が 1 例、type B2 が 7 例、type B3 が 3 例、その他が 1 例であった。胸腺癌 18 例のうち、扁平上皮癌が 12 例、神経内分泌腫瘍が 2 例、腺癌が 1 例、その他が 3 例であった。胸腺腫のうち、2 例に赤芽球瘍、1 例に重症筋無力症、1 例にその他のミオパチーの合併を認めた。胸腺腫では全例で CODE 療法が施行され、胸腺癌では、18 例中 11 例で CBDCA+PTX、4 例で nedaplatin+PTX、各 1 例で CBDCA+gemcitabine、CDDP+ETP、nedaplatin が施行された。

表 5 化学療法施行例の患者背景

		N = 30	%
Sex	Male	15	50
	Female	15	50
Age (median [range])	57 [31-75]		
WHO Type	Thymoma	12	40
	B1	1	8
	B2	7	59
	B3	3	25
	Others	1	8
	Thymic carcinoma	18	60
	Sq	12	67
	NEC	2	11
	Ad	1	5
	Others	3	17
Masaoka Stage	III	2	6
	IVa	14	47
	IVb	9	30
	Relapse	5	17
Chemotherapy	Thymoma		
	CODE	12	40
	Thymic carcinoma		
	CBDCA+PTX	11	37
	Nedaplatin + PTX	4	13
	CBDCA+GEM	1	3
	CDDP+ETP	1	3
	Nedaplatin	1	3

Sq = squamous cell carcinoma, NEC = neuroendocrine carcinoma, Ad =

adenocarcinoma, CODE = cisplatin + vincristine + doxorubicin + etoposide, CBDCA =

carboplatin, PTX = paclitaxel, GEM = gemcitabine, CDDP = cisplatin, ETP = etoposide

3-2. 患者背景および病理所見と PD-L1 陽性割合

PD-L1 陽性例は胸腺腫の 67%、胸腺癌の 41% であり、H-score の平均値は胸腺腫で 51 (範囲 0-140)、胸腺腫で 40 (範囲 0-180) であった。

組織型別では、胸腺癌 17 例のうち、2 例の神経内分泌腫瘍、1 例の腺癌では、PD-L1 発現はすべて陰性 (H-score はすべて 0 点) であった。一方、12 例の扁平上皮癌では PD-L1 陽性例は 58%、H-score の平均値は 47 (範囲 0-180) であった。

検体採取手技別では、胸腺癌 17 例のうち、4 例の手術検体では、3 例が PD-L1 陽性であり、H-score の平均値は 98 (範囲 0-180) であったのに対し、13 例の生検検体では、4 例のみが PD-L1 陽性であり、平均値は 22 (範囲 0-150) であった。

3-3. 化学療法の治療効果

表 6 に示す通り、化学療法の奏効割合は、胸腺腫で 33% (9 例中 3 例が PR)、胸腺癌で 18% (17 例中 3 例が PR)、病勢制御割合は各々 100% (9 例中 6 例が SD)、76% (17 例中 13 例が SD) であった。奏効割合は、胸腺腫では PD-L1 陽性群で 50% (6 例中 3 例)、PD-L1 陰性群で 0% (3 例中 0 例) と異なる傾向が見られたが、胸腺癌では PD-L1 陽性群で 14% (7 例中 1 例)、20% (10 例中 2 例) と、胸腺腫と同様の傾向は見られなかった。

胸腺腫では、生存期間中央値は PD-L1 陽性群で 77.1 ヶ月 (95%CI 41.7 ヶ月–未到達)、PD-L1 陰性群で 58.5 ヶ月 (95%CI 34.5 ヶ月–未到達)であり、2 群間に有意な差は認めなかった ($p = 0.624$)。胸腺癌では、生存期間中央値は PD-L1 陽性群で 27.3 ヶ月 (95%CI 9.5 ヶ月–未到達)、陰性群で 47.7 ヶ月 (95%CI 2.1–69.1 ヶ月)であり、2 群間に有意な差は認めなかった ($p = 0.449$)。

表 6. PD-L1 陽性・陰性群での化学療法の治療効果

		Total	PD-L1		p
			+	-	
Thymoma	ORR	3/9 (33%)	3/6 (50%)	0/3 (0%)	0.624
	DCR	9/9 (100%)	6/6 (100%)	3/3 (100%)	
	mOS (months)		77.1 [41.7–NR]	58.5 [34.5–NR]	
Thymic carcinoma	ORR	3/17 (18%)	1/7 (14%)	2/10 (20%)	0.449
	DCR	13/17 (76%)	4/7 (71%)	9/10 (90%)	
	mOS (months)		27.3 [9.5–NR]	47.7 [2.1–69.1]	

NR:未到達

3-4. 化学療法前後での PD-L1 発現の変化

胸腺腫のうち 6 例で、化学療法前後の検体が得られた。化学療法前の H-score の平均値は 42 (範囲 0–130) であったが、化学療法後の H-score の平均値は 93 (範囲 25–180) であり、PD-L1 陽性割合は 67% から 100% に増加した (表 7)。

表 7 化学療法前後の PD-L1 発現の変化

WHO type	Before		After		治療効果
	H-score	+ / -	H-score	+ / -	
B2	10	+	60	+	PR
B3	30	+	45	+	PR
B2	0	-	25	+	SD
B3	0	-	130	+	SD
B2	80	+	180	+	SD
B2	130	+	115	+	SD

PR: 部分奏効、SD: 不変

+: PD-L1 陽性、-: PD-L1 陰性

考察

1. 本研究結果の総括

本研究により、①胸腺上皮腫瘍では、胸腺腫の 22%、胸腺癌の 70%が PD-L1 陽性 (H-score、カットオフ値 1%)であった、②腫瘍細胞の PD-L1 発現と予後との関連は認められなかった、③化学療法後に腫瘍細胞の PD-L1 発現が上昇する傾向が見られた、という結果が得られた。

2. 胸腺上皮腫瘍の PD-L1 発現に関する他研究との比較

胸腺上皮腫瘍の PD-L1 発現については、表 8 に示すような報告がある(前述の 2 報を除いて、すべて本研究の後に報告された研究である)。本研究と同様の PD-L1 発現評価方法を用いた研究では、胸腺腫 87 例の PD-L1 陽性割合は 18%、胸腺癌 20 例の PD-L1 陽性割合は 65%であり、本研究の再現性が得られている[53]。同研究では、WHO 分類 [A, AB, B vs C]、正岡分類 [I, II 期 vs III, IV 期]が PD-L1 陽性と統計学的有意に関連しており、多変量解析で WHO 分類が予後予測因子であったが、PD-L1 発現は予後予測因子ではないという結果も、本研究に矛盾しない[53]。一方で PD-L1 発現は予後不良という報告[46]と予後良好という報告[54, 55]も混在している。本研究では胸腺腫・胸腺癌でのサブグループ解析を行ったが、PD-L1 発現と予後との関連は不明瞭であった。また、各研究において、抗 PD-L1 抗体のクローン、陽性細胞の評価方法、カットオフ値などに統一見解はなく、胸腺上皮腫瘍では PD-L1 発現が認め

られるという結果には一貫性があるものの、発現割合にはばらつきが認められる[41, 46, 47, 54-57]。

3. PD-L1 発現の不均一性の原因

腫瘍細胞の PD-L1 発現に不均一性が生じる背景として、前述のように免疫組織化学染色に用いる抗 PD-L1 抗体クローンの違い、膜タンパクである PD-L1 の発現の時間的・空間的不均一性が挙げられる。

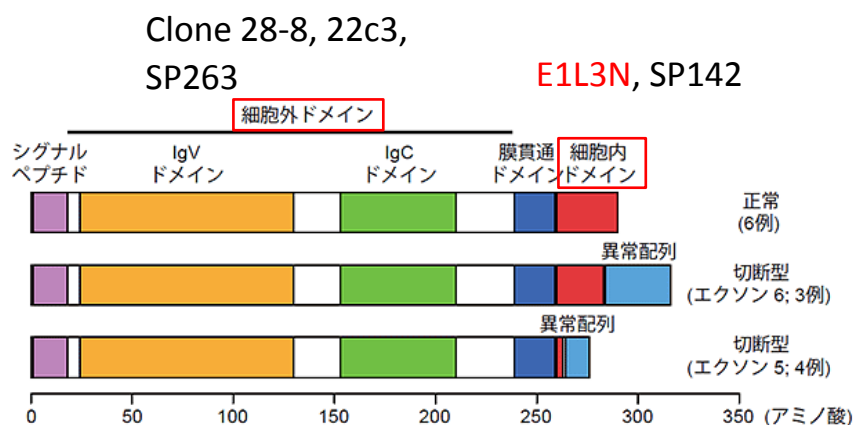
3-1. 抗 PD-L1 抗体クローンの違い

腫瘍細胞の PD-L1 発現は、腫瘍細胞が PD-1・PD-L1 経路を通じて免疫機構から回避していることの間接所見と考えられており、実地臨床においては抗 PD-1 抗体薬や抗 PD-L1 抗体薬の効果予測因子として研究されてきた。特定の薬物治療の効果を投薬前に予測するためのバイオマーカーとしての開発が進んだ免疫組織化学染色用の抗 PD-L1 抗体には、抗 PD-1 抗体薬の nivolumab に対する clone 28-8、抗 PD-1 抗体薬の pembrolizumab に対する clone 22C3、抗 PD-L1 抗体薬の atezolizumab に対する SP142、抗 PD-L1 抗体薬の duralumab に対する SP263 などがある。研究用試薬として市販されている抗体としては、本研究で用いた clone E1L3N などがある。

抗原である PD-L1 への親和性という点では、本研究で用いた clone E1L3N はウサギモノクローナル抗体であり、マウスクローナル抗体と比較して抗原に対する affinity が高いという特徴を持つ。

細胞膜に発現する PD-L1 タンパクのどのドメインを認識するかという点はクローンごとに違いがあり、染色結果や評価方法の相違につながる。Clone 28-8、clone 22c3、clone SP263 は PD-L1 の細胞外ドメインを認識し、clone E1L3N、clone SP142 は細胞内ドメインを認識する(図 7)。これらの抗体間の染色結果の一致率を測る研究も行われており、本研究で用いた clone E1L3N は臨床で用いられる clone 28-8、clone 22C3 とほぼ同一の染色結果が得られている[58, 59]。

図 7 各抗 PD-L1 抗体 clone ごとの結合部位の違い



3-2. PD-L1 発現の時間的不均一性

細胞膜タンパクである PD-L1 は、INF- γ により JAK1/JAK2-STATs-IRF1 経路を通じて発現が upregulate される動的なバイオマーカーであることが知られており、同一患者でも検体採取のタイミングによって結果が異なることがある(時間的不均一性)[60]。既報では、化学療法後の PD-L1 発現の変化については、治療後に PD-L1 発現が上昇するという報告、低下するという結果が混在している。EGFR 遺伝子変異陽性または ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌において、同一個体で治療前後に連続した生検を行ったところ、EGFR 遺伝子変異陽性群では PD-L1 陽性割合は 15%から 25%になり、22% (58 例中 13 例) で PD-L1 発現割合が変化した。一方 ALK 融合遺伝子群では PD-L1 陽性割合が 52%から 21%になり、25% (8 例中 2 例) で PD-L1 発現が変化したという報告がある[61]。別の EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌 18 例の検討では、gefitinib による治療後に PD-L1 発現が上昇し[62]、乳癌術前化学療法を施行した 58 例の検討では、化学療法後、PD-L1 発現(腫瘍細胞と腫瘍浸潤細胞)が減少した[63]。胸腺上皮腫瘍について検討した報告はないが、CODE 療法に含まれる doxorubicin が immunogenic cell death(殺細胞性抗癌薬による腫瘍細胞のアポトーシスであり、免疫細胞の集簇を伴うという特徴を持つ)を起こし、INF- γ 等のサイトカインを通じて PD-L1 の発現を増加させたと考えられる[64]。

3-3. PD-L1 発現の空間的不均一性

空間的不均一性により、同一個体内の異なる病巣間でも、同一病巣内でも、PD-L1 発現が異なることがある[61, 65]。正常胸腺細胞では、PD-L1 は T 細胞の成熟に必要な髄質で優位に発現しているが、腫瘍細胞ではその極性が失われるとされる[41]。同一病巣内での不均一性による影響を減らすため、本研究の手術症例では、検体の腫瘍

中心付近から2か所ランダムにTMA検体を作成した。また生検検体と手術検体の比較では、非小細胞肺癌の経気管支的肺生検検体と手術検体のPD-L1発現に優位な差はないという報告がある一方で[66]、生検検体は手術検体に比べ、PD-L1発現を過小評価しているという研究もある[67]。

表 8 胸腺上皮腫瘍の PD-L1 発現についての報告

Author	Ref	N	PD-L1 clone	PD-L1 expression	correlation with OS	Publication year
Brown et al.	[47]	26TM	29E. 2A3	66.7% (10/15 non-invasive thymomas)	NE	2003
				100% (11/11 invasive thymomas)		
		8TC		89% (7/8)		
Padda et al.	[46]	65TM	clone 15	68% (44/65)	PD-L1 high = worse prognosis	2015
		4TC		75% (3/4)		
Present study	[68]	102TM	E1L3N (H score, 1%)	22% (22/102)	no	2015
		37TC		70% (26/37)		
	[69]	12TM	E1L3N (H score, 1%)	67% (8/12)	NE	2016
		17TC		41% (7/17)		
Yokoyama et al.	[55]	82TM	EPR1161	54% (44/82)	no	2016
Yokoyama et al.	[57]	25TC	EPR1161	80% (20/25)	PD-L1 high = better prognosis	2016
Tiseo et al.	[53]	87TM	E1L3N (H score, 1%)	18% (16/87TM)	no	2017
		20TC		65% (13/20TC)		
Arbour et al.	[54]	12TM	E1L3N (M score)	92% (11/12TM)	PD-L1 high = better prognosis	2017
		11TC		36% (4/11TC)		
Marchevsky et al.	[41]	38TM	SP142 (>1%)	92% (35/38TM)	NE	2017
		8TC		50% (4/8TC)		
Weissferdt et al.	[56]	74TM	E1L3N (>5%)	64% (47/74TM)	no	2017
		26TC		54% (14/26TC)		

TM:胸腺腫、TC:胸腺癌、NE:評価せず

4. バイオマーカーとしての PD-L1

4-1. 本研究の限界

抗 PD-1 抗体薬および抗 PD-L1 抗体薬の治療効果が得られるためには、腫瘍細胞が PD-1・PD-L1 経路を通じて CD8 陽性 T 細胞による腫瘍免疫効果を抑制している必要がある。PD-L1 発現は、抗 PD-1 抗体薬および抗 PD-L1 抗体薬の治療効果の治療効果指標とされているが、これまで行われた複数の臨床試験において PD-L1 陽性でも治療効果が見られない例が少なからず存在する。その背景には、前述の抗体クローンや腫瘍細胞の PD-L1 発現の不均一性の他に、観察された PD-L1 が免疫機構からの回避に関与していない可能性が考えられる[29, 30]。Marchevsky らの報告の中で、胸腺上皮腫瘍では、PD-L1 陽性細胞と CD4、CD8 陽性細胞の発現部位との解離が見られるという記載があり[41]、本研究でも胸腺癌検体において、PD-L1 陽性腫瘍細胞と PD-1 陽性腫瘍浸潤リンパ球の発現部位にバラつきが認められる傾向があった。連続切片での評価や二重染色での評価は本研究も含めて行われておらず、特に腫瘍浸潤リンパ球は腫瘍細胞よりも評価者ごとの差異が出やすいため、今後検討すべき課題である。

4-2. 今後の研究の展望

従来の免疫組織化学染色 (DAB 法) では前述のような技術的な制約があるため、近年、細胞上の特定のタンパク質を定量的に検出できる HSTT (High Sensitive Tissue Testing) 法 (コニカミノルタ社) が開発されている。まだ研究段階であるが、膵管癌検体を用いて、各細胞を認識し、その表面に発現する CD8 や PD-L1 などのタンパクを検出し、画像上重ね合わせることにより、腫瘍細胞とその表面の PD-L1 の発現、および周囲に浸潤している CD8 陽性 T 細胞とその表面の PD-1 の発現などを 1 枚の画像上

で定量評価することにより、腫瘍微小環境を詳細に検討したという報告がある[70]。

本研究では、特に生検検体で評価不可能とした検体が多く認められた。免疫組織化学染色を行う場合、良質な検体が必要であるが、生検や手術の侵襲のリスクも看過できない問題である。そのため、安定した供給の得られる血液検体を使用した、circulating tumor cells 上の PD-L1 発現などのバイオマーカー研究も進められている[71]。

5. 本研究の成果

本研究で、胸腺上皮腫瘍細胞に PD-L1 発現を認めたことから、胸腺上皮腫瘍に対して抗 PD-1 抗体薬および抗 PD-L1 抗体薬が治療薬となりうる可能性が示唆された。これを受けて、平成 29 年度 日本医療研究開発機構研究費革新的がん医療実用化研究事業として、2016 年 7 月より、切除不能または再発胸腺癌を対象として、PD-1 に対するヒト型 IgG₄ モノクローナル抗体である nivolumab の第 II 相試験を開始した (UMIN000022007)。なお、胸腺腫は自己免疫疾患を効率に合併するため、免疫チェックポイント阻害薬である nivolumab は自己免疫疾患関連の有害事象のリスクが高いため、臨床試験の対象とはしなかった。臨床試験に附随する研究として、本研究で十分な検討ができなかった項目についても、nivolumab による臨床的な有効性・安全性のデータと合わせて、検討する予定である。

謝辞

本研究にあたり、多大なる御高配、御指導と御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科 器官病態内科学講座 呼吸器内科学 長瀬 隆英教授に深く感謝いたします。

結果 1 のデータは、国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野 藤田 雄先生より提供をいただき、感謝申し上げます。

また、本研究全般にわたり、直接の御指導、御鞭撻を頂きました、国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科 堀之内 秀仁先生、関西医科大学 病態検査学講座 蔦幸二教授、また、国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科 大江 裕一郎先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. 公益財団法人がん研究振興財団, *がんの統計 '16*. 2017.
2. Girard, N., E. Ruffini, A. Marx, C. Faivre-Finn, S. Peters, and E.G. Committee, Thymic epithelial tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2015. **26 Suppl 5**: p. v40-55.
3. de Jong, W.K., J.L. Blaauwgeers, M. Schaapveld, W. Timens, T.J. Klinkenberg, and H.J. Groen, Thymic epithelial tumours: a population-based study of the incidence, diagnostic procedures and therapy. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(1): p. 123-30.
4. Engels, E.A. and R.M. Pfeiffer, Malignant thymoma in the United States: demographic patterns in incidence and associations with subsequent malignancies. *Int J Cancer*, 2003. **105**(4): p. 546-51.
5. Rena, O., E. Papalia, G. Maggi, A. Oliaro, E. Ruffini, P. Filosso, M. Mancuso, D. Novero, and C. Casadio, World Health Organization histologic classification: an independent prognostic factor in resected thymomas. *Lung Cancer*, 2005. **50**(1): p. 59-66.
6. Kondo, K., K. Yoshizawa, M. Tsuyuguchi, S. Kimura, M. Sumitomo, J. Morita, T. Miyoshi, S. Sakiyama, K. Mukai, and Y. Monden, WHO histologic classification is a prognostic indicator in thymoma. *Ann Thorac Surg*, 2004. **77**(4): p. 1183-8.
7. Kondo, K. and Y. Monden, Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg*, 2003.

- 76(3)**: p. 878-84; discussion 884-5.
8. Huang, J., F.C. Detterbeck, Z. Wang, and P.J. Loehrer, Sr., Standard outcome measures for thymic malignancies. *J Thorac Oncol*, 2011. **6(7 Suppl 3)**: p. S1691-7.
 9. Nakajima, J., T. Murakawa, T. Fukami, A. Sano, S. Takamoto, and H. Ohtsu, Postthymectomy myasthenia gravis: relationship with thymoma and antiacetylcholine receptor antibody. *Ann Thorac Surg*, 2008. **86(3)**: p. 941-5.
 10. Marx, A., J.K. Chan, J.M. Coindre, F. Detterbeck, N. Girard, N.L. Harris, E.S. Jaffe, M.O. Kurrer, E.M. Marom, A.L. Moreira, K. Mukai, A. Orazi, and P. Strobel, The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes. *J Thorac Oncol*, 2015. **10(10)**: p. 1383-95.
 11. Koga, K., Y. Matsuno, M. Noguchi, K. Mukai, H. Asamura, T. Goya, and Y. Shimosato, A review of 79 thymomas: modification of staging system and reappraisal of conventional division into invasive and non-invasive thymoma. *Pathol Int*, 1994. **44(5)**: p. 359-67.
 12. Gilhus, N.E., Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*, 2016. **375(26)**: p. 2570-2581.
 13. Loehrer, P.J., Sr., K. Kim, S.C. Aisner, R. Livingston, L.H. Einhorn, D. Johnson, and R. Blum, Cisplatin plus doxorubicin plus cyclophosphamide in metastatic or recurrent thymoma: final results of an intergroup trial. The Eastern Cooperative Oncology Group,

- Southwest Oncology Group, and Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(6): p. 1164-8.
14. Kunitoh, H., T. Tamura, T. Shibata, K. Nakagawa, K. Takeda, Y. Nishiwaki, Y. Osaki, K. Noda, A. Yokoyama, and N. Saijo, A phase-II trial of dose-dense chemotherapy in patients with disseminated thymoma: report of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 9605). *Br J Cancer*, 2009. **101**(9): p. 1549-54.
 15. Giaccone, G., A. Ardizzoni, A. Kirkpatrick, M. Clerico, T. Sahmoud, and N. van Zandwijk, Cisplatin and etoposide combination chemotherapy for locally advanced or metastatic thymoma. A phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(3): p. 814-20.
 16. Hirai, F., T. Yamanaka, K. Taguchi, H. Daga, A. Ono, K. Tanaka, Y. Kogure, J. Shimizu, T. Kimura, J. Fukuoka, Y. Iwamoto, H. Sasaki, K. Takeda, T. Seto, Y. Ichinose, K. Nakagawa, Y. Nakanishi, and G. West Japan Oncology, A multicenter phase II study of carboplatin and paclitaxel for advanced thymic carcinoma: WJOG4207L. *Ann Oncol*, 2015. **26**(2): p. 363-8.
 17. Lemma, G.L., J.W. Lee, S.C. Aisner, C.J. Langer, W.J. Tester, D.H. Johnson, and P.J. Loehrer, Sr., Phase II study of carboplatin and paclitaxel in advanced thymoma and thymic carcinoma. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(15): p. 2060-5.
 18. Koizumi, T., Y. Takabayashi, S. Yamagishi, K. Tsushima, A.

- Takamizawa, A. Tsukadaira, H. Yamamoto, Y. Yamazaki, S. Yamaguchi, K. Fujimoto, K. Kubo, Y. Hirose, J. Hirayama, and H. Saegusa, Chemotherapy for advanced thymic carcinoma: clinical response to cisplatin, doxorubicin, vincristine, and cyclophosphamide (ADOC chemotherapy). *Am J Clin Oncol*, 2002. **25**(3): p. 266-8.
19. Fornasiero, A., O. Daniele, C. Ghiotto, M. Piazza, L. Fiore-Donati, F. Calabro, F. Rea, and M.V. Fiorentino, Chemotherapy for invasive thymoma. A 13-year experience. *Cancer*, 1991. **68**(1): p. 30-3.
 20. Okuma, Y., M. Saito, Y. Hosomi, T. Sakuyama, and T. Okamura, Key components of chemotherapy for thymic malignancies: a systematic review and pooled analysis for anthracycline-, carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015. **141**(2): p. 323-31.
 21. Thomas, A., A. Rajan, A. Berman, Y. Tomita, C. Brzezniak, M.J. Lee, S. Lee, A. Ling, A.J. Spittler, C.A. Carter, U. Guha, Y. Wang, E. Szabo, P. Meltzer, S.M. Steinberg, J.B. Trepel, P.J. Loehrer, and G. Giaccone, Sunitinib in patients with chemotherapy-refractory thymoma and thymic carcinoma: an open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(2): p. 177-86.
 22. Okuma, Y., Y. Hosomi, S. Miyamoto, M. Shibuya, T. Okamura, and T. Hishima, Correlation between S-1 treatment outcome and expression of biomarkers for refractory thymic carcinoma. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 156.
 23. Asao, T., Y. Fujiwara, K. Sunami, S. Kitahara, Y. Goto, S. Kanda, H.

- Horinouchi, H. Nokihara, N. Yamamoto, H. Ichikawa, T. Kohno, K. Tsuta, S. Watanabe, K. Takahashi, and Y. Ohe, Medical treatment involving investigational drugs and genetic profile of thymic carcinoma. *Lung Cancer*, 2016. **93**: p. 77-81.
24. Carbone, D.P., M. Reck, L. Paz-Ares, B. Creelan, L. Horn, M. Steins, E. Felip, M.M. van den Heuvel, T.E. Ciuleanu, F. Badin, N. Ready, T.J.N. Hiltermann, S. Nair, R. Juergens, S. Peters, E. Minenza, J.M. Wrangle, D. Rodriguez-Abreu, H. Borghaei, G.R. Blumenschein, Jr., L.C. Villaruz, L. Havel, J. Krejci, J. Corral Jaime, H. Chang, W.J. Geese, P. Bhagavatheeswaran, A.C. Chen, and M.A. Socinski, First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2017. **376**(25): p. 2415-2426.
25. Rizvi, N.A., M.D. Hellmann, A. Snyder, P. Kvistborg, V. Makarov, J.J. Havel, W. Lee, J. Yuan, P. Wong, T.S. Ho, M.L. Miller, N. Rekhtman, A.L. Moreira, F. Ibrahim, C. Bruggeman, B. Gasmi, R. Zappasodi, Y. Maeda, C. Sander, E.B. Garon, T. Merghoub, J.D. Wolchok, T.N. Schumacher, and T.A. Chan, Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
26. Petrini, I., P.S. Meltzer, I.K. Kim, M. Lucchi, K.S. Park, G. Fontanini, J. Gao, P.A. Zucali, F. Calabrese, A. Favaretto, F. Rea, J. Rodriguez-Canales, R.L. Walker, M. Pineda, Y.J. Zhu, C. Lau, K.J. Killian, S. Bilke, D. Voeller, S. Dakshnamurthy, Y. Wang, and G. Giaccone, A specific

- missense mutation in GTF2I occurs at high frequency in thymic epithelial tumors. *Nat Genet*, 2014. **46**(8): p. 844-9.
27. Robert, C., G.V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J.C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K.J. Savage, M.M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalcioiu, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I.M. Waxman, V. Atkinson, and P.A. Ascierto, Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 320-30.
28. Ribas, A., I. Puzanov, R. Dummer, D. Schadendorf, O. Hamid, C. Robert, F.S. Hodi, J. Schachter, A.C. Pavlick, K.D. Lewis, L.D. Cranmer, C.U. Blank, S.J. O'Day, P.A. Ascierto, A.K. Salama, K.A. Margolin, C. Loquai, T.K. Eigentler, T.C. Gangadhar, M.S. Carlino, S.S. Agarwala, S.J. Moschos, J.A. Sosman, S.M. Goldinger, R. Shapira-Frommer, R. Gonzalez, J.M. Kirkwood, J.D. Wolchok, A. Eggermont, X.N. Li, W. Zhou, A.M. Zernhelt, J. Lis, S. Ebbinghaus, S.P. Kang, and A. Daud, Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(8): p. 908-18.
29. Borghaei, H., L. Paz-Ares, L. Horn, D.R. Spigel, M. Steins, N.E. Ready, L.Q. Chow, E.E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhauf, O. Arrieta, M.A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D.E.

- Gerber, S.N. Gettinger, C.M. Rudin, N. Rizvi, L. Crino, G.R. Blumenschein, Jr., S.J. Antonia, C. Dorange, C.T. Harbison, F. Graf Finckenstein, and J.R. Brahmer, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2015. **373**(17): p. 1627-39.
30. Brahmer, J., K.L. Reckamp, P. Baas, L. Crino, W.E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E.E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Aren Frontera, L. Havel, M. Steins, M.C. Garassino, J.G. Aerts, M. Domine, L. Paz-Ares, M. Reck, C. Baudelet, C.T. Harbison, B. Lestini, and D.R. Spigel, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2015. **373**(2): p. 123-35.
31. Reck, M., D. Rodriguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Csoszi, A. Fulop, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M.A. Leiby, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J.R. Brahmer, and K.-. Investigators, Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2016. **375**(19): p. 1823-1833.
32. Motzer, R.J., B. Escudier, D.F. McDermott, S. George, H.J. Hammers, S. Srinivas, S.S. Tykodi, J.A. Sosman, G. Procopio, E.R. Plimack, D. Castellano, T.K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P. Bono, J. Wagstaff, T.C. Gauler, T. Ueda, Y. Tomita, F.A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J.S. Simon, L.A. Xu, I.M. Waxman, P. Sharma, and

- I. CheckMate, Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2015. **373**(19): p. 1803-13.
33. Plimack, E.R., J. Bellmunt, S. Gupta, R. Berger, L.Q. Chow, J. Juco, J. Lunceford, S. Saraf, R.F. Perini, and P.H. O'Donnell, Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(2): p. 212-220.
34. Ansell, S.M., A.M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E.C. Scott, M. Gutierrez, S.J. Schuster, M.M. Millenson, D. Cattray, G.J. Freeman, S.J. Rodig, B. Chapuy, A.H. Ligon, L. Zhu, J.F. Grosso, S.Y. Kim, J.M. Timmerman, M.A. Shipp, and P. Armand, PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 311-9.
35. Chen, R., P.L. Zinzani, M.A. Fanale, P. Armand, N.A. Johnson, P. Brice, J. Radford, V. Ribrag, D. Molin, T.P. Vassilakopoulos, A. Tomita, B. von Tresckow, M.A. Shipp, Y. Zhang, A.D. Ricart, A. Balakumaran, C.H. Moskowitz, and Keynote, Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(19): p. 2125-2132.
36. Ferris, R.L., G. Blumenschein, Jr., J. Fayette, J. Guigay, A.D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E.E. Vokes, C. Even, F. Worden, N.F. Saba, L.C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W.J. Geese, J. Kopit, J.W. Shaw, and M.L.

- Gillison, Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*, 2016. **375**(19): p. 1856-1867.
37. Seiwert, T., B. Burtness, J. Weiss, I. Gluck, J. Eder, S. Pai, M. Dolled-Filhart, K. Emancipator, K. Pathiraja, C. Gause, R. Iannone, H. Brown, J. Houp, J. Cheng, and L. Chow, A phase Ib study of MK-3475 in patients with human papillomavirus (HPV)-associated and non-HPV-associated head and neck (H/N) cancer. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(5S): p. abstr 6011.
38. Muro, K., H.C. Chung, V. Shankaran, R. Geva, D. Catenacci, S. Gupta, J.P. Eder, T. Golan, D.T. Le, B. Burtness, A.J. McRee, C.C. Lin, K. Pathiraja, J. Lunceford, K. Emancipator, J. Juco, M. Koshiji, and Y.J. Bang, Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(6): p. 717-726.
39. Brahmer, J.R., S.S. Tykodi, L.Q. Chow, W.J. Hwu, S.L. Topalian, P. Hwu, C.G. Drake, L.H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H.C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T.M. Salay, S. Alaparthi, J.F. Grosso, A.J. Korman, S.M. Parker, S. Agrawal, S.M. Goldberg, D.M. Pardoll, A. Gupta, and J.M. Wigginton, Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
40. Topalian, S.L., F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott, J.D. Powderly, R.D. Carvajal, J.A. Sosman, M.B. Atkins,

- P.D. Leming, D.R. Spigel, S.J. Antonia, L. Horn, C.G. Drake, D.M. Pardoll, L. Chen, W.H. Sharfman, R.A. Anders, J.M. Taube, T.L. McMiller, H. Xu, A.J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G.D. Kollia, A. Gupta, J.M. Wigginton, and M. Sznol, Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
41. Marchevsky, A.M. and A.E. Walt, PD-L1, PD-1, CD4, and CD8 expression in neoplastic and nonneoplastic thymus. *Hum Pathol*, 2017. **60**: p. 16-23.
42. Khunger, M., A.V. Hernandez, V. Pasupuleti, S. Rakshit, N.A. Pennell, J. Stevenson, S. Mukhopadhyay, K. Schalper, and V. Velcheti, Programmed Cell Death 1 (PD-1) Ligand (PD-L1) Expression in Solid Tumors As a Predictive Biomarker of Benefit From PD-1/PD-L1 Axis Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Precision Oncology*, 2017(1): p. 1-15.
43. He, J., Y. Hu, M. Hu, and B. Li, Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 13110.
44. Mazzaschi, G., D. Madeddu, A. Falco, G. Bocchialini, M. Goldoni, F. Sogni, G. Armani, C.A. Lagrasta, B. Lorusso, C. Mangiaracina, R. Vilella, C. Frati, R. Alfieri, L. Ampollini, M. Veneziani, E.M. Silini, A. Ardizzoni, K. Urbanek, F. Aversa, F. Quaini, and M. Tiseo, Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8(+) Tumor-Infiltrating Lymphocytes

- Confers an Immune-Privileged Tissue Microenvironment in NSCLC with a Prognostic and Predictive Value. *Clin Cancer Res*, 2017.
45. Jacquelot, N., M.P. Roberti, D.P. Enot, S. Rusakiewicz, N. Ternes, S. Jegou, D.M. Woods, A.L. Sodre, M. Hansen, Y. Meirou, M. Sade-Feldman, A. Burra, S.S. Kwek, C. Flament, M. Messaoudene, C.P.M. Duong, L. Chen, B.S. Kwon, A.C. Anderson, V.K. Kuchroo, B. Weide, F. Aubin, C. Borg, S. Dalle, O. Beatrix, M. Ayyoub, B. Balme, G. Tomasic, A.M. Di Giacomo, M. Maio, D. Schadendorf, I. Melero, B. Dreno, A. Khammari, R. Dummer, M. Levesque, Y. Koguchi, L. Fong, M. Lotem, M. Baniyash, H. Schmidt, I.M. Svane, G. Kroemer, A. Marabelle, S. Michiels, A. Cavalcanti, and M.J. Smyth, Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. 2017. **8**(1): p. 592.
46. Padda, S.K., J.W. Riess, E.J. Schwartz, L. Tian, H.E. Kohrt, J.W. Neal, R.B. West, and H.A. Wakelee, Diffuse high intensity PD-L1 staining in thymic epithelial tumors. *J Thorac Oncol*, 2015. **10**(3): p. 500-8.
47. Brown, J.A., D.M. Dorfman, F.R. Ma, E.L. Sullivan, O. Munoz, C.R. Wood, E.A. Greenfield, and G.J. Freeman, Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1257-66.
48. Parra, E.R., P. Villalobos, B. Mino, and J. Rodriguez-Canales, Comparison of Different Antibody Clones for Immunohistochemistry Detection of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) on Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2017.

49. McCarty, K.S., E. Szabo, J.L. Flowers, E.B. Cox, G.S. Leight, L. Miller, J. Konrath, J.T. Soper, D.A. Budwit, W.T. Creasman, H.F. Seigler, and K.S. McCarty, Use of a Monoclonal Anti-Estrogen Receptor Antibody in the Immunohistochemical Evaluation of Human Tumors. *Cancer Research*, 1986. **46**(8 Supplement): p. 4244s-4248s.
50. McCarty, K.S., Jr., L.S. Miller, E.B. Cox, J. Konrath, and K.S. McCarty, Sr., Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, 1985. **109**(8): p. 716-21.
51. Bhargava, R., J. Striebel, S. Beriwal, J.C. Flickinger, A. Onisko, G. Ahrendt, and D.J. Dabbs, Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*, 2009. **2**(5): p. 444-55.
52. Flanagan, M.B., D.J. Dabbs, A.M. Brufsky, S. Beriwal, and R. Bhargava, Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol*, 2008. **21**(10): p. 1255-61.
53. Tiseo, M., A. Damato, L. Longo, F. Barbieri, F. Bertolini, A. Stefani, M. Migaldi, L. Gnetti, R. Camisa, P. Bordi, S. Buti, and G. Rossi, Analysis of a panel of druggable gene mutations and of ALK and PD-L1 expression in a series of thymic epithelial tumors (TETs). *Lung Cancer*, 2017. **104**: p. 24-30.
54. Arbour, K.C., J. Naidoo, K.E. Steele, A. Ni, A.L. Moreira, N. Rekhtman,

- P.B. Robbins, J. Karakunnel, A. Rimner, J. Huang, G.J. Riely, and M.D. Hellmann, Expression of PD-L1 and other immunotherapeutic targets in thymic epithelial tumors. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0182665.
55. Yokoyama, S., H. Miyoshi, T. Nishi, T. Hashiguchi, M. Mitsuoka, S. Takamori, Y. Akagi, T. Kakuma, and K. Ohshima, Clinicopathologic and Prognostic Implications of Programmed Death Ligand 1 Expression in Thymoma. *Ann Thorac Surg*, 2016. **101**(4): p. 1361-9.
56. Weissferdt, A., J. Fujimoto, N. Kalhor, J. Rodriguez, R. Bassett, Wistuba, II, and C.A. Moran, Expression of PD-1 and PD-L1 in thymic epithelial neoplasms. *Mod Pathol*, 2017. **30**(6): p. 826-833.
57. Yokoyama, S., H. Miyoshi, K. Nakashima, J. Shimono, T. Hashiguchi, M. Mitsuoka, S. Takamori, Y. Akagi, and K. Ohshima, Prognostic Value of Programmed Death Ligand 1 and Programmed Death 1 Expression in Thymic Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(18): p. 4727-34.
58. Rimm, D.L., G. Han, J.M. Taube, E.S. Yi, J.A. Bridge, D.B. Flieder, R. Homer, W.W. West, H. Wu, A.C. Roden, J. Fujimoto, H. Yu, R. Anders, A. Kowalewski, C. Rivard, J. Rehman, C. Batenchuk, V. Burns, F.R. Hirsch, and Wistuba, II, A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(8): p. 1051-1058.
59. Hirsch, F.R., A. McElhinny, D. Stanforth, J. Ranger-Moore, M. Jansson, K. Kulangara, W. Richardson, P. Towne, D. Hanks, B. Vennapusa, A.

- Mistry, R. Kalamegham, S. Averbuch, J. Novotny, E. Rubin, K. Emancipator, I. McCaffery, J.A. Williams, J. Walker, J. Longshore, M.S. Tsao, and K.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**(2): p. 208-222.
60. Garcia-Diaz, A., D.S. Shin, B.H. Moreno, J. Saco, H. Escuin-Ordinas, G.A. Rodriguez, J.M. Zaretsky, L. Sun, W. Hugo, X. Wang, G. Parisi, C.P. Saus, D.Y. Torrejon, T.G. Graeber, B. Comin-Anduix, S. Hu-Lieskovan, R. Damoiseaux, R.S. Lo, and A. Ribas, Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*, 2017. **19**(6): p. 1189-1201.
61. Gainor, J.F., L.V. Sequist, A.T. Shaw, C.G. Azzoli, Z. Piotrowska, T. Huynh, L. Fulton, K. Schultz, A.N. Hata, J.A. Engelman, and M.M. Kenudson, Clinical correlation and frequency of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in EGFR-mutant and ALK-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**: p. abstr 8012.
62. Han, J.J., D.W. Kim, J. Koh, B. Keam, T.M. Kim, Y.K. Jeon, S.H. Lee, D.H. Chung, and D.S. Heo, Change in PD-L1 Expression After Acquiring Resistance to Gefitinib in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*, 2016. **17**(4): p. 263-270 e2.
63. Pelekanou, V., D.E. Carvajal-Hausdorf, M. Altan, B. Wasserman, C. Carvajal-Hausdorf, H. Wimberly, J. Brown, D. Lannin, L. Pusztai, and

- D.L. Rimm, Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. *Breast Cancer Res*, 2017. **19**(1): p. 91.
64. Pol, J., E. Vacchelli, F. Aranda, F. Castoldi, A. Eggermont, I. Cremer, C. Sautes-Fridman, J. Fucikova, J. Galon, R. Spisek, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi, Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(4): p. e1008866.
65. McLaughlin, J., G. Han, K.A. Schalper, D. Carvajal-Hausdorf, V. Pelekanou, J. Rehman, V. Velcheti, R. Herbst, P. LoRusso, and D.L. Rimm, Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(1): p. 46-54.
66. Kitazono, S., Y. Fujiwara, K. Tsuta, H. Utsumi, S. Kanda, H. Horinouchi, H. Nokihara, N. Yamamoto, S. Sasada, S. Watanabe, H. Asamura, T. Tamura, and Y. Ohe, Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*, 2015. **16**(5): p. 385-90.
67. Ilie, M., E. Long-Mira, C. Bence, C. Butori, S. Lassalle, L. Bouhlel, L. Fazzalari, K. Zahaf, S. Lalvee, K. Washetine, J. Mouroux, N. Venissac, M. Poudenx, J. Otto, J.C. Sabourin, C.H. Marquette, V. Hofman, and P. Hofman, Comparative study of the PD-L1 status between surgically

- resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol*, 2016. **27**(1): p. 147-53.
68. Katsuya, Y., Y. Fujita, H. Horinouchi, Y. Ohe, S. Watanabe, and K. Tsuta, Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma. *Lung Cancer*, 2015. **88**(2): p. 154-9.
69. Katsuya, Y., H. Horinouchi, T. Asao, S. Kitahara, Y. Goto, S. Kanda, Y. Fujiwara, H. Nokihara, N. Yamamoto, S. Watanabe, K. Tsuta, and Y. Ohe, Expression of programmed death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in thymic epithelial tumors: Impact on treatment efficacy and alteration in expression after chemotherapy. *Lung Cancer*, 2016. **99**: p. 4-10.
70. Yamaki, S., H. Yanagimoto, K. Tsuta, H. Ryota, and M. Kon, PD-L1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is a poor prognostic factor in patients with high CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes: highly sensitive detection using phosphor-integrated dot staining. *Int J Clin Oncol*, 2017. **22**(4): p. 726-733.
71. Strati, A., G. Koutsodontis, G. Papaxoinis, I. Angelidis, M. Zavridou, P. Economopoulou, I. Kotsantis, M. Avgeris, M. Mazel, C. Perisanidis, C. Sasaki, C. Alix-Panabieres, E. Lianidou, and A. Psyrri, Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*, 2017. **28**(8): p. 1923-1933.

