



## Neoadjuvant Chemotherapy Increases PD-L1 Expression and CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Fukuoka, Eiji

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2020-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7734号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007734>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Neoadjuvant Chemotherapy Increases PD-L1 Expression and CD8<sup>+</sup> Tumor-infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

食道扁平上皮癌における術前化学療法による PD-L1 発現と CD8 肿瘍浸潤リンパ球の誘導

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

食道胃腸外科学

(指導教員：掛地 吉弘 教授)

福岡 英志

【背景】Stage II, III の食道癌では術前化学療法と手術が標準治療とされるが、JC0G9907 試験にて術前化学療法症例での 5 年生存率は 54.8% と未だ十分とは言えない。近年、免疫チェックポイント阻害剤がメラノーマ、非小細胞肺癌に臨床応用され、予後改善を目的に免疫チェックポイント阻害剤と術前化学療法との併用が検討されている。また、現在食道癌術前化学療法症例における PD-L1 発現やその予後との相関性の詳細は十分に解析されていない。

【目的】食道癌術前化学療法症例における PD-L1 発現を解析し予後との関係を明らかにする。

【対象と方法】2008 年から 2014 年の間に当院で術前化学療法 FP を施行した食道癌症例で①生検標本にて食道扁平上皮癌と診断②R0/R1 切除③5-fluorouracil+cisplatin (FP) 2 コースを完遂④生検標本及び手術標本を使用可能である全てを満たす 71 例のうち pathological CR 症例 3 例を除いた、69 例を対象とした。PD-L1 (腫瘍細胞と免疫細胞) 及び CD8 の免疫染色を生検標本と手術標本で行い、治療前後の発現の変化を解析し、これらの予後との関係を調べた。抗体は抗 PD-L1 抗体 (clone SP142; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) と抗 CD8 抗体 (clone SP57; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) を用いた。腫瘍細胞の PD-L1 発現の評価は PD-L1 陽性腫瘍細胞/全腫瘍細胞にて行い、TC<0<1%, ≤TC1<5%, 5%≤TC2<50%, TC3≥50% でスコア化した。免疫細胞の PD-L1 発現の評価は PD-L1 陽性免疫細胞/全免疫細胞にて行い、IC0<1%, 1%≤IC1<5%, 5%≤IC2<10%, TC3≥10% でスコア化した。CD8+腫瘍浸潤リンパ球の評価は免疫細胞の PD-L1 発現と同様に行なった。PD-L1 陽性は 5% 以上、CD8+腫瘍浸潤リンパ球陽性は 10% 以上とした。

【結果】患者の年齢の中央値は 68 歳 (44-82) で、87% (60/69) が男性であった。腫瘍細胞及び免疫細胞の PD-L1 発現と臨床病理学的因子を解析した。60 歳以上の症例にて腫瘍細胞の PD-L1 発現が有意に高かった ( $P=0.028$ )。一方、免疫細胞の PD-L1 発現と各臨床病理学的因子との相関は認めなかった。術前生検と術後標本の比較では、PD-L1+腫瘍細胞陽性率の有意な変化はなかったが、PD-L1+免疫細胞と CD8+腫瘍浸潤リンパ球の陽性率は有意に上昇していた ( $P=0.004, <0.001$ )。全生存の単変量解析では clinical T, clinical stage, pathological stage が予後予測因子であり ( $p=0.046, p=0.031$ , and  $p<0.001$ )、多変量解析では pathological stage のみが独立した予後予測因子であった ( $p<0.001$ )。同様に RFS においても clinical T, clinical stage, pathological stage が予後予測因子であり ( $p=0.021, p=0.038$ , and  $<0.001$ )、多変量解析では pathological stage のみが独立した予後予測因子であった ( $p<0.001$ )。よって、腫瘍細胞および免疫細胞の PD-L1 発現と CD8+腫瘍浸潤リンパ球は全生存および無再発生存の予後予測因子ではなかった。全例での解析では、PD-L1+腫瘍細胞、PD-L1+免疫細胞、CD8+腫瘍浸潤リンパ球と各々の予後との相関を認めなかった。pStage I + II では PD-L1+免疫細胞陽性例で有意に予後が良好であった ( $P=0.022, 0.033$ )。pStage III では PD-L1+腫瘍細胞、PD-L1+免疫細胞、CD8+腫瘍浸潤リンパ球と予後との相関を認めなかった。

【考察】本研究は食道扁平上皮癌術前化学療法 FP 2 コース完遂症例のみを対象としている点で新規性がある。前治療のない食道扁平上皮癌において腫瘍の PD-L1 発現は予後不良因子とされているが、一部では予後良好因子という逆の結果の報告もある。また、免疫細胞の PD-L1 発現と予後との関係に関する報

告は少ない。本研究での免疫細胞の PD-L1 発現が pStage I, II では予後良好であったが、pStage III では相関しなかったという結果は、pStage III では pStage I, II と異なる免疫抑制機構が働いていると推測される。

今回用いた PD-L1 抗体 (clone SP142) は抗 PD-L1 抗体治療薬であるアテゾリズマブのコンプリメンタリー診断薬である。非小細胞癌で腫瘍細胞が免疫細胞の PD-L1 強発現症例 (TC3 or IC3) がアテゾリズマブの効果があったという報告がある。本研究にて手術標本で TC3 か IC3 であった症例は 66.6% (46/69) であり、術前 FP 療法施行食道扁平上皮癌患者はアテゾリズマブの適応候補かもしれない。

本研究の問題点は生検標本と手術標本の整合性である。非小細胞肺癌にて生検標本の PD-L1 発現は手術標本より過少評価されるという報告がある。

【まとめ】食道癌術前化学療法症例では PD-L1+免疫細胞及び CD8+腫瘍浸潤リンパ球が増加しており、特徴的な腫瘍免疫微小環境の変化をもたらした。PD-L1+免疫細胞及び CD8+腫瘍浸潤リンパ球は予後と相関はしていなかった。術前化学療法と免疫チェックポイントの併用療法が予後改善につながる可能性があり、更なる検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2951 号	氏名	福岡 英志
------	------------	----	-------

論文題目 Title of Dissertation	Neoadjuvant Chemotherapy Increases PD-L1 Expression and CD8 <sup>+</sup> Tumor-infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma  食道扁平上皮癌における術前化学療法による PD-L1 発現と CD8 肿瘍浸潤リンパ球の誘導
----------------------------------	---

審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 福本 巧 副査 Vice-examiner 横井 元 副査 Vice-examiner 田中 行
------------------	--

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

【背景】Stage II, III の食道癌では術前化学療法と手術が標準治療とされるが、JCOG9907 試験にて術前化学療法症例での 5 年生存率は 54.8% とまだ十分とは言えない。近年、免疫チェックポイント阻害剤がメラノーマ、非小細胞肺癌に臨床応用され、予後改善を目的に免疫チェックポイント阻害剤と術前化学療法との併用が検討されている。また、現在食道癌術前化学療法症例における PD-L1 発現やその予後とその相関性の詳細は十分に解析されていない。

【目的】食道癌術前化学療法症例における PD-L1 発現を解析し予後との関係を明らかにする。

【対象と方法】2008 年から 2014 年の間に当院で術前化学療法 FP を施行した食道癌症例で①生検標本にて食道扁平上皮癌と診断②R0/R1 切除③5-fluorouracil+cisplatin(FP)2 コースを完遂④生検標本及び手術標本を使用可能である全てを満たす 71 例のうち pathological CR 症例 2 例を除いた、69 例を対象とした。PD-L1 (腫瘍細胞と免疫細胞) 及び CD8 の免疫染色を生検標本と手術標本で行い、治療前後の発現の変化を解析し、これらの予後との関係を調べた。抗体は抗 PD-L1 抗体 (clone SP142; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) と抗 CD8 抗体 (clone SP57; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) を用いた。腫瘍細胞の PD-L1 発現の評価は PD-L1 陽性腫瘍細胞/全腫瘍細胞にて行い、TC<0<1%, <TC1<5%, 5%<TC2<50%, TC3≥50% でスコア化した。免疫細胞の PD-L1 発現の評価は PD-L1 陽性免疫細胞/全免疫細胞にて行い、IC0<1%, 1%<IC1<5%, 5%< IC2<10%, TC3≥10% でスコア化した。CD8+腫瘍浸潤リンパ球の評価は免疫細胞の PD-L1 発現と同様に行った。PD-L1 陽性は 5% 以上、CD8+腫瘍浸潤リンパ球陽性は 10% 以上とした。

【結果】患者の年齢の中央値は 68 歳 (44-82) で、87% (60/69) が男性であった。腫瘍細胞及び免疫細胞の PD-L1 発現と臨床病理学的因子を解析した。60 歳以上の症例にて腫瘍細胞の PD-L1 発現が有意に高かった (P = 0.028)。一方、免疫細胞の PD-L1 発現と各臨床病理学的因子との相関は認めなかった。術前生検と術後標本の比較では、PD-L1+腫瘍細胞陽性率の有意な変化はなかったが、PD-L1+免疫細胞と CD8+腫瘍浸潤リンパ球の陽性率は有意に上昇していた (P = 0.004, <0.001)。全生存の単变量解析では clinical T, clinical stage, pathological stage が予後予測因子であり (p = 0.046, p = 0.031,

and  $p < 0.001$ )、多変量解析では pathological stage のみが独立した予後予測因子であった。同様に RFSにおいても clinicalT, clinical stage, pathological stage が予後予測因子であり ( $p = 0.021$ ,  $p = 0.038$ , and  $< 0.001$ )、多変量解析では pathological stage のみが独立した予後予測因子であった ( $p < 0.001$ )。よって、腫瘍細胞および免疫細胞の PD-L1 発現と CD8+腫瘍浸潤リンパ球は全生存および無再発生存の予後予測因子ではなかった。全例での解析では、PD-L1+腫瘍細胞、PD-L1+免疫細胞、CD8+腫瘍浸潤リンパ球と各々の予後との相関を認めなかった。pStage I + II では PD-L1+免疫細胞陽性例で有意に予後が良好であった ( $P = 0.022, 0.033$ )。pStage III では PD-L1+腫瘍細胞, PD-L1+免疫細胞, CD8+腫瘍浸潤リンパ球と予後との相関を認めなかった。

【考察】本研究は食道扁平上皮癌術前化学療法 FP 2 コース完遂症例のみを対象としている点で新規性がある。前治療のない食道扁平上皮癌において腫瘍の PD-L1 発現は予後不良因子とされているが、一部では予後良好因子という逆の結果の報告もある。また、免疫細胞の PD-L1 発現と予後との関係に関する報告は少ない。本研究での免疫細胞の PD-L1 発現が pStage I, II では予後良好であったが、pStage III では相関しなかったという結果は、pStage III では pStage I, II と異なる免疫抑制機構が働いていると推測される。

今回用いた PD-L1 抗体 (clone SP142) は抗 PD-L1 抗体治療薬であるアテゾリズマブのコンプリメンタリー診断薬である。非小細胞癌で腫瘍細胞か免疫細胞の PD-L1 強発現症例 (TC3 or IC3) がアテゾリズマブの効果があったという報告がある。本研究にて手術標本で TC3 か IC3 であった症例は 66.6% (46/69) であり、術前 FP 療法施行食道扁平上皮癌患者はアテゾリズマブの適応候補かもしれない。

本研究の問題点は生検標本と手術標本の整合性である。非小細胞肺癌にて生検標本の PD-L1 発現は手術標本より過少評価されるという報告がある。

【まとめ】食道癌術前化学療法症例では PD-L1+免疫細胞及び CD8+腫瘍浸潤リンパ球が増加しており、特徴的な腫瘍免疫微小環境の変化をもたらした。PD-L1+免疫細胞及び CD8+腫瘍浸潤リンパ球は予後と相関はしていなかった。術前化学療法と免疫チェックポイントの併用療法が予後改善につながる可能性があり、更なる検討が必要である。

本研究は食道癌術前化学療法症例の PD-L1 発現の変化と予後との相関について研究したものであるが、従来ほとんど検討されていなかった FP レジメンのみを対象とした重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。