

# 口腔扁平上皮癌における programmed cell death 1 シグナル関連分子の発現と機能に関する研究

丸瀬, 靖之

<https://doi.org/10.15017/1654799>

---

出版情報：九州大学, 2015, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

口腔扁平上皮癌における **programmed cell death 1** シグナル  
関連分子の発現と機能に関する研究

Expression and functions of programmed cell death 1 signal-related  
molecules in oral squamous cell carcinoma

2016年3月

九州大学大学院歯学府  
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

丸瀬 靖之

指導教員

九州大学大学院歯学研究院  
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は以下の学術雑誌に投稿中である。

**Significant association of increased PD-L1 and PD-1  
expression with nodal metastasis and poor prognosis in  
oral squamous cell carcinoma**

Yasuyuki Maruse, Shintaro Kawano, Teppei Jinno, Ryota Matsubara, Yuichi Goto,  
Naoki Kaneko, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Masafumi Moriyama, Takeshi  
Toyoshima, Ryoji Kitamura, Hideaki Tanaka, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, and  
Seiji Nakamura

Submitted to *Scientific Reports*

## 略 語 一 覧

- AKT:** serine/threonine protein kinase
- CCRT:** concurrent chemoradiotherapy (化学療法・放射線治療同時併用療法)
- CD:** cluster of differentiation (分化抗原群)
- CD25:** alpha chain of the interleukin-2 receptor (IL-2 受容体  $\alpha$  鎖)
- cDNA:** complementary DNA (相補的 DNA)
- CTL:** cytotoxic T lymphocyte (細胞傷害性 T リンパ球)
- CTLA-4:** cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (細胞傷害性 T リンパ球抗原 4)
- DAB:** 3,3'-diaminobenzidine (3,3'-ジアミノベンジジン)
- DEPC:** diethyl pyrocarbonate (ジエチルピロカーボネート)
- DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium
- DNA:** deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
- dNTP:** deoxyribonucleotide triphosphate
- EGFR:** epidermal growth factor receptor (上皮成長因子受容体)
- EMT:** epithelial-mesenchymal transition (上皮間葉転換)
- FBS:** fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
- GAPDH:** glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** hydrogen peroxide (過酸化水素水)
- HE:** hematoxylin and eosin (ヘマトキシリン-エオジン)
- HLA:** human leukocyte antigen (ヒト白血球抗原)
- HPV:** human papilloma virus (ヒト乳頭腫ウイルス)
- HRP:** horseradish peroxidase (西洋わさびペルオキシダーゼ)
- Ig:** immunoglobulin (免疫グロブリン)
- INF- $\gamma$ :** interferon- $\gamma$  (インターフェロン  $\gamma$ )
- mRNA:** messenger ribonucleic acid
- OR:** odds ratio (オッズ比)
- OSCC:** oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)



**PBS:** phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

**PCR:** polymerase chain reaction

**PDK2:** 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-2

**PD-L1:** programmed cell death ligand 1

**PD-1:** programmed cell death 1

**PFA:** paraformaldehyde (パラホルムアルデヒド)

**PI3K:** phosphoinositide 3-kinase

**P/S:** penicillin/streptomycin (ペニシリンおよびストレプトマイシン)

**PTEN:** phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10

**rhPD-1 protein:** recombinant human programmed cell death 1 protein

**RNA:** ribonucleic acid (リボ核酸)

**RT-PCR:** reverse transcription polymerase chain reaction

**TBS:** tris-buffered saline (トリス緩衝食塩水)

**TLR:** Toll-like receptor (Toll 様受容体)

**TGF- $\beta$ :** transforming growth factor- $\beta$  (トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ )

**TIL:** tumor-infiltrating lymphocyte (腫瘍浸潤リンパ球)

**Treg:** regulatory T cell (制御性 T 細胞)

**WST-8:** 2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2, 4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt (水溶性テトラゾリウム塩)

**95% CI:** 95% confidence interval (95%信頼区間)

## 目 次

要旨	6
緒言	9
材料および方法	14
結果	25
<b>研究 1. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の免疫組織化学的検討</b>	25
1-1. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 および T リンパ球活性化抗原 CD25 の発現様式	
1-2. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と臨床病理学的所見との関連	
1-3. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と CD25 発現との関連	
1-4. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と予後との関連	
<b>研究 2. recombinant human PD-1 protein (rhPD-1) 添加が OSCC 細胞の増殖、遊走能および浸潤能に与える影響に関する研究—</b>	37
2-1. OSCC 細胞株における <i>PD-L1</i> の発現	
2-2. rhPD-1 添加が OSCC 細胞の増殖に及ぼす影響	
2-3. rhPD-1 添加が OSCC 細胞の遊走能に及ぼす影響	
2-4. rhPD-1 添加が OSCC 細胞の浸潤能に及ぼす影響	
考察	46
謝辞	54
参考文献	55

## 要 旨

一般に、がん細胞は宿主の免疫監視機構から巧妙に逃避し、体内で生存および増殖していると考えられている。近年、そのメカニズムの一つとして、がん細胞に発現している programmed cell death ligand 1 (PD-L1) が活性化 T 細胞の細胞膜上に発現する programmed cell death 1 (PD-1) を介し、T 細胞の免疫応答を抑制することが明らかになってきた。この PD-L1/PD-1 経路を阻害する抗 PD-1 抗体は、T 細胞の免疫応答抑制を解除し、宿主のがん細胞に対する免疫応答を増強することが明らかとなっており、悪性黒色腫などのいくつかのがんにおいて有用性が報告されている。このように、PD-L1 から PD-1 へのシグナルが T 細胞の免疫応答を抑制することが示唆される一方、PD-1 からのシグナルが PD-L1 を介してがん細胞に与える影響や、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) における PD-L1/PD-1 の発現については不明である。本研究では、OSCC における PD-L1/PD-1 の発現と臨床病理学的所見との関連を検索するとともに、PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞の増殖、遊走能および浸潤能へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 研究 1. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の免疫組織化学的検討

本研究では、OSCC 患者 97 名より採取した生検標本を用いて、PD-L1 と PD-1 の発現を免疫組織化学的染色法により解析した。PD-L1 は、浸潤先端部の腫瘍細胞における PD-L1 陽性細胞率を算出し、陽性細胞率が 5%以上を陽性群、5%未満を陰性群とした。PD-1 は、浸潤先端部周囲間質中の炎症性細胞のうち、陽性細胞率が 30%以上を高発現群、30%未満を低発現群と

した。これらの発現様式から、症例を A 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 低発現、B 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 高発現、もしくは PD-L1 陽性かつ PD-1 低発現、C 群: PD-L1 陽性かつ PD-1 高発現、の 3 群に分け、臨床病理学的所見との関連について統計学的に解析した。また、PD-L1/PD-1 シグナルによる T リンパ球の免疫応答抑制を評価するために、同部位における T リンパ球活性化抗原 alpha chain of the interleukin-2 receptor (cluster of differentiation 25:CD25) 陽性細胞率を算出した。さらに、疾患特異的累積 5 年生存率を算出し、予後との関連について検討を行った。

全症例のうち、A 群 18 名 (18.6%)、B 群 36 名 (37.1%) および C 群 43 名 (44.3%) であった。OSCC 生検組織において、PD-L1 は癌巣外側や腫瘍浸潤先端部の癌細胞の細胞膜に強く発現していた。また、PD-1 高発現群では浸潤先端部周囲の炎症性細胞に発現を認めた。臨床病理学的所見との関連において、C 群は A 群と比較して、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。さらに、頸部リンパ節転移の有無に関して多変量解析を行ったところ、PD-L1/PD-1 の高発現は OSCC の頸部リンパ節転移に影響を与える唯一の独立した因子であった。CD25 陽性率は、A および B 群と比較して、C 群で有意に低かった。さらに、疾患特異的累積 5 年生存率は A 群が 94.4%、B 群が 80.5%、C 群が 66.8%であり、C 群は A 群と比較して有意に生存率が低く、予後が不良であった。

## **研究 2. recombinant human PD-1 protein (rhPD-1) 添加が OSCC 細胞の増殖、遊走能および浸潤能に与える影響に関する研究**

5種類のOSCC細胞株（HSC-2、HSC-3、SAS、SQUU-A、SQUU-B）におけるPD-L1の発現をRT-PCR法、real-time PCR法にて解析した。その結果、*PD-L1*はSAS細胞とHSC-3細胞で発現が強く、HSC-2細胞で最も発現が弱かった。

次に、PD-1からのシグナルがOSCC細胞株の増殖、遊走能および浸潤能に及ぼす影響を調べるために、rhPD-1（0.1, 1.0, 5.0, 10.0 µg/ml）を細胞培養上清に添加しそれぞれ解析を行った。まず、増殖への影響を調べるために2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2, 4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt（WST-8）assayにて検討したところ、PD-L1の発現が強かったSAS細胞およびHSC-3細胞において、rhPD-1添加により濃度依存的に細胞増殖率の上昇を認めた。その他の細胞では細胞増殖率に変化は認められなかった。

また、細胞遊走能および浸潤能に及ぼす影響を調べるために、SAS細胞を用いて、trans-well migration assay および trans-well invasion assay にて、それぞれ解析を行った。その結果、rhPD-1添加により濃度依存的に遊走細胞数および浸潤細胞率が増加していた。また、rhPD-1 1.0 µg/ml とともに、抗PD-L1抗体（0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 µg/ml）を培養上清に添加したところ、抗PD-L1抗体の濃度依存的に遊走細胞数および浸潤細胞率の減少を認めた。

以上の結果より、OSCCにおいてPD-L1/PD-1経路は宿主の免疫監視機構からの逃避に関与するだけでなく、PD-1からPD-L1へのシグナルによりOSCC細胞の増殖や浸潤・遊走能を亢進することにより癌の進展に寄与している可能性が示唆された。

## 緒 言

口腔がんは世界で 11 番目に多い悪性腫瘍とされており、中でも口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）は、口腔がんの 90%以上を占めている（1-3）。現在、OSCC 局所進展例に対しては手術療法、放射線療法および化学療法といった三者併用療法を行うことで、その 5 年生存率は 80%を超えるようになってきた（4-6）。しかしながら、局所再発や遠隔転移により手術療法の適応外となり、予後不良の転帰を辿る症例は依然として少なくない。手術療法による癌の制御が不可能になった場合、現時点では治療法として放射線療法や化学療法が単独もしくは併用して行われるが、重篤な血液毒性、肝機能・腎機能障害および放射線性顎骨骨髄炎などの有害事象が生じうる可能性があり、治療を完遂したとしても見合うだけの最終的な治療効果が得られないことがほとんどである（7-10）。このような現状の中、近年、がんに対する新たな第 4 の治療戦略として、腫瘍免疫療法が脚光を浴びつつある。

がん細胞と宿主免疫との関係については、1960 年代に Burnet が、がん細胞の発生過程でそのほとんどが宿主免疫により監視され、排除されているという「がん免疫監視機構（immunological surveillance）」を提唱した（11）。しかしながら、がんの発生・形成過程では、マクロファージなどが中心となる炎症を基盤にもつがんも多く、むしろこれら自然免疫系は、がんの増殖・浸潤や血管新生の促進により、がんを進展させていると考えられている。その後、2002 年に Dunn らが、この免疫監視が存在するにもかかわらず、がんが増殖し、顕在化してくるメカニズムについて「がん免疫監視機構」を包含した「がん免疫編集機構

(cancer immunoediting)」の存在を示した(12)。これによると、がん細胞は抗免疫原性腫瘍抗原の消失や human leukocyte antigen (HLA) などの抗原提示分子の異常による免疫抵抗性の獲得、さらに transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) などの免疫抑制物質の発現や分泌、免疫抑制性細胞の誘導などを介して、宿主免疫の監視から逃れる様々な機能を獲得した「がん免疫逃避」状態となることが示されている。このがん免疫逃避に関わる因子の中でも、特に中心的役割を担う経路として、cluster of differentiation (CD) 80 または CD86/cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) 経路、および programmed cell death ligand 1 (PD-L1) /programmed cell death 1 (PD-1) 経路が注目されている。

CTLA-4 は、1987 年に Burnet らにより同定され、促進性補助シグナル CD80 または CD86/CD28 経路によって活性化した T 細胞に対して CD28 と競合的に結合することで、T 細胞の免疫活性の収束や過剰な T 細胞免疫応答の抑制に関わる重要な因子であることが示されている(13)。その後、1996 年に Allison らがマウスを用いた実験にて、CTLA-4 に対する阻害抗体投与により腫瘍が排除されることを示した(14-16)。一方で、CTLA-4 ノックアウトマウスは、全身性の自己免疫疾患により生後 2 か月で死亡することから、ヒトに対しても CTLA-4 阻害により自己免疫疾患が生じる可能性が示唆された。これらの基礎研究を背景に、1999 年より抗 CTLA-4 抗体 ipilimumab の臨床試験が開始された。ipilimumab は、完全ヒト型抗 CTLA-4 immunoglobulin (Ig) G1 型抗体であり、2010 年に治療歴のある切除不能 stage III、IV の悪性黒色腫患者 676 例を対象とした第 III 相試験にて 1 年生存率を 46% 改善した (ペプチドワクチン投与群: 平均 6.4 か月、ipilimumab 投与群: 平均 10.0 か月) (17)。この結果は、悪性黒色腫において

初めて既存治療と比較して全生存期間を有意に延長させることができた報告として注目された。さらに 2011 年 3 月、米国にて切除不能または転移性悪性黒色腫への適応が承認されて以降、日本を含めて世界 40 か国以上で承認を受けている。しかし、頭頸部癌における CTLA-4 の発現や機能および ipilimumab の有用性に関しては、現在のところ不明なままである。

一方、PD-1 (CD279) 分子は、CD28 ファミリーに属する免疫抑制性補助シグナル受容体であり、1992 年に Honjo らによって、T 細胞の細胞死刺激により発現が誘導される I 型膜タンパク質をコードする遺伝子として単離・同定された (18)。その後、PD-1 は活性化した T 細胞、B 細胞および骨髄系細胞に発現し、そのリガンドとの結合により、抗原特異的に T 細胞活性を抑制することから、末梢性免疫寛容やその破綻からくる自己免疫疾患のみならず、移植免疫や後天性免疫不全症候群、そしてがんによる免疫抑制と多岐にわたり中心的役割を担う分子であることが示されている (19)。

PD-1 のリガンドには、免疫補助シグナル B7 ファミリーに属する PD-L1 (CD274、B7-H1) と PD-L2 (CD273、B7-H2) が認められている。PD-L1 と PD-L2 は、抗原提示細胞上に発現して重度に糖修飾を受けているタンパク質で、Ig スーパーファミリーに属している。これらの分子は、Ig 可変領域 (V-set)、Ig 定常領域 (C-set) の 2 つの Ig 様ドメインからなる細胞外ドメインと、膜貫通領域および細胞内領域からなる膜貫通型糖タンパク質である (20-23)。このうち、PD-L1 は抗原提示細胞 (樹状細胞) のほか血管、心筋、肺および胎盤などに幅広く発現しているが (24)、PD-L2 は樹状細胞にのみ発現している (25)。また、PD-L1/PD-1 経路は自己への免疫反応や炎症反応を鎮静化することから、CD80



またはCD86/CTLA-4経路とともに免疫系の恒常性の維持に関わっているとされている(26)。CTLA-4分子は主にリンパ節で抗原情報を持つ樹状細胞からT細胞へ抗原提示する際に、活性化したT細胞にのみ発現し、この生理的リガンドであるCD80またはCD86と結合することでT細胞機能の抑制に働くといわれている。また、CTLA-4のCD80およびCD86との親和性は、同一のリガンドを共有しT細胞機能の活性化に働くといわれているCD28よりも数十倍高いため、CD28シグナルを拮抗的に阻害することでも免疫応答を抑制しているといわれている(27)。

このCTLA-4経路に対して、PD-L1/PD-1経路は主に末梢組織で働き、標的細胞(がん細胞や異物)への免疫抑制に関わっているとされている(28-30)。すなわち、PD-1による免疫抑制は活性化されたエフェクターT細胞で重点的に作用すると同時に、このリガンドであるPD-L1が多くのがん細胞で発現が認められており、PD-L1/PD-1経路は腫瘍に対するT細胞応答において重要な免疫抑制機構であるとされている。これまでにPD-1ノックアウトマウスにおける悪性黒色腫細胞の腫瘍増殖抑制やPD-L1/PD-1経路阻害抗体による腫瘍抑制効果などが示されている(31、32)。一方、臨床検体を用いた検討において腎細胞がん、悪性黒色腫、食道がんなどの多くのがん細胞がPD-L1を高発現しており、PD-L1高発現症例は予後不良であるとする報告が多い(33-42)。これらの報告から、PD-L1/PD-1経路はがん免疫逃避機構の中心的因子のひとつであるとともに、同経路を標的とした抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体が新たながん治療薬の候補として期待されるようになってきている(18)。2012年に報告された非小細胞肺がん、悪性黒色腫、および腎細胞がんの計296例を対象としたヒト抗PD-1モノクロー

ナル抗体 nivolumab を用いた第 I 相試験の奏効率はそれぞれ 18%、28%、27%と良好な結果であった。その他多くの臨床試験の結果から、2014 年に nivolumab は悪性黒色腫に対して日米で薬事承認され、2015 年 3 月に肺扁平上皮癌に対して米国で薬事承認されている (43-49) 。しかしながら、OSCC における PD-L1 および PD-1 の発現や機能に関する報告はほとんど認められない。

そこで本研究では、まず OSCC における PD-L1 および PD-1 の発現の有無と腫瘍特性および予後との関連を検討するために、OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 発現と臨床病理学的所見との関連について検索した。さらに、PD-L1/PD-1 の発現と宿主免疫応答との関連を明らかにするために T リンパ球活性化抗原である alpha chain of the interleukin-2 receptor (CD25) の発現についても検索した。

また、PD-L1/PD-1 経路が腫瘍に対する T 細胞応答において重要な免疫抑制機構であるとの報告は数多く見受けられる一方、PD-L1 が膜貫通型タンパクであることから、PD-1 から PD-L1 へのシグナルも存在することがわかっており、これについて、いくつかの報告がなされている (50、51) 。しかしながら、PD-1 からのシグナルが腫瘍細胞へ与える影響に関する研究は渉猟し得た限りでは認められない。そこで、実験 2 では、PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞へ与える影響を明らかにするために、OSCC 細胞株における *PD-L1* の発現を検索するとともに、recombinant human PD-1 protein (rhPD-1) の添加が OSCC 細胞の増殖、遊走能および浸潤能に対して与える影響について検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 対象患者

2006年4月から2010年12月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、病理組織学的にOSCCと診断された97名（男性70名、女性27名、平均年齢64.3±13.6歳〈19～89歳〉）を対象とした（表1）。

表 1 OSCC 患者 97 例の内訳

	症例数	(%)
<b>性別</b>		
男性	70	(72.2)
女性	27	(27.8)
<b>原発部位</b>		
舌	45	(46.4)
歯肉	37	(38.1)
口底	9	(9.3)
頬粘膜	6	(6.2)
<b>臨床病期 (Stage 分類)</b>		
I	22	(22.7)
II	32	(33.0)
III	8	(8.2)
IV	25	(25.8)
<b>組織学的悪性度</b>		
分化度 (WHO 分類)		
grade 1	62	(63.9)
grade 2	35	(36.1)
grade 3	0	(0.0)
浸潤様式による分類		
grade 1	1	(1.0)
grade 2	13	(13.4)
grade 3	57	(58.8)
grade 4C	20	(20.6)
grade 4D	6	(6.2)

## 2. 生検組織の病理組織学的診断

OSCC の組織学的悪性度分類として、grade 分類（WHO 分類）と山本・小浜の分類（YK 分類）を用いた（52、53）。grade 分類により、腫瘍細胞の分化度に応じて grade 1（高分化型）、grade 2（中分化型）、および grade 3（低分化型）に分けた。また、YK 分類により、腫瘍宿主境界部における浸潤様式に応じて grade 1、grade 2、grade 3、grade 4C、および grade 4D に分類した。

YK 分類の基準を以下に示す: grade 1: 腫瘍と宿主の境界が明瞭である。grade 2: 境界線にやや乱れがある。grade 3: 境界線は不明瞭で大小の癌胞巣が散在している。grade 4C: 境界線は不明瞭で小さな癌胞巣が索状に浸潤している。grade 4D: 境界線は不明瞭で癌は胞巣を作らず、び漫性に浸潤している。

さらに、腫瘍周囲の間質反応の指標として Anneroth's grading classification を用い、間質反応を marked、moderate、mild・none に分類した（54）。

Anneroth's grading classification の基準を以下に示す: marked: 腫瘍周囲の炎症性細胞浸潤が著明である。moderate: 腫瘍周囲の炎症性細胞浸潤が中程度である。mild・none: 腫瘍周囲の炎症性細胞浸潤がほとんど、もしくは全く認められない。

### 3. 免疫組織化学的染色法

OSCC 患者より採取した生検および切除標本は、直ちに 4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) に 24~48 時間浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。回転式マイクロトーム RM2145 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) にて 4  $\mu$ m の切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin and eosin: HE) 染色および免疫組織化学的染色に用いた。作製したパラフィン切片をキシレンに 20 分間、さらに 100%、95%、85%、75%エタノールの順にそれぞれ各 5 分間浸漬させ、脱パラフィン処理および水和処理を行った。切片を精製水にて水和したのちに、Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて抗原賦活化処理 (121°C、10 分間) を行った。30 分間室温で放冷したのち、切片をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS; 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) ) にて洗浄した。この後、内因性ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 除去のため、3%過酸化水素水 (hydrogen peroxide: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を室温で 30 分間反応させた。再度、PBS で洗浄したのち、抗体の非特異的吸着を防ぐために 10%ヤギ正常血清 (ヒストファインブロッキング試薬 II: Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を 30 分間反応させた。一次抗体 (表 2) は 4°C で一晩反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体に HRP 標識抗マウスおよびウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Nichirei Bioscience) を用い、室温で 1 時間反応させた。PBS にて洗浄後、ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine: DAB) (Nichirei Bioscience) にて可視化し、ヘマトキシリン (Mayer's hemalum solution: Millipore, Massachusetts, USA) を用いて対比染色を行った。その後、切片を 75%、85%、95%、100%エタノールに各 5 分間、キ

シレンに 10 分間浸漬させ、脱水、透徹処理を行い、malinol mounting medium (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) を用いて封入した。陰性対照として、一次抗体の代わりに PBS を用いた。観察には、オールインワン顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE, Osaka, Japan) を使用した。一次抗体として抗 PD-L1 および抗 PD-1 抗体を使用した切片については、ビオチンフリータイラマイドシグナル増幅システム (Dako) を用いて検出を行った。

また、切片中の腫瘍浸潤先端部より  $0.5 \text{ mm}^2$  の範囲を無作為に 3 か所選択して、DAB にて標識された PD-L1 陽性腫瘍細胞数を計測し、それらを同範囲に含まれる全腫瘍細胞数で除して百分率で表したものを PD-L1 陽性細胞率として算出した。算出した陽性細胞率が 5%以上を陽性群、5%未満を陰性群とした。また、PD-1 に関して浸潤先端部周囲間質中の炎症性細胞のうち、PD-1 発現を認めるものを PD-1 陽性細胞として計測した。それらの総数を同範囲に含まれる全炎症性細胞数で除して百分率で表したものを PD-1 陽性細胞率として算出した。PD-1 陽性細胞率が 30%以上を高発現群、30%未満を低発現群とした。全症例を A 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 低発現、B 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 高発現、もしくは PD-L1 陽性かつ PD-1 低発現、および C 群: PD-L1 陽性かつ PD-1 高発現の 3 群に分け、臨床病理組織学的所見との関連について統計学的に解析した。また、PD-L1/PD-1 経路による免疫応答抑制を評価するため、切片中の腫瘍浸潤先端部より  $0.5 \text{ mm}^2$  の範囲を無作為に 3 か所選択して、T リンパ球活性化抗原 CD25 陽性炎症性細胞数を計測し、それらを同範囲に含まれる全炎症性細胞数で除して百分率で表したものを CD25 陽性細胞率として算出した。さらに、PD-L1/PD-1 の発現様式と予後との関連性について検討するために、Kaplan-Meier

法を用いて生存曲線を作成し、疾患特異的累積5年生存率を算出した。

表2 免疫組織化学的染色に使用した一次抗体

抗体 (clone 名, 製造会社, 所在地)	用途	希釈倍率
monoclonal rabbit anti-human PD-L1 antibody (E1L3N, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)	IHC	1: 200
monoclonal mouse anti-human PD-1 antibody (NAT105, abcam, Cambridge, UK)	IHC	1: 200
monoclonal rabbit anti-human alpha chain of the interleukin 2 receptor antibody (EPR6452, abcam)	IHC	1: 250

IHC: immunohistochemistry

#### 4. 細胞培養

本研究では、OSCC 細胞株である HSC-2 (高分化型口底癌由来)、HSC-3 (低分化型舌癌由来)、SAS (低分化型舌癌由来)、SQUU-A (高分化型舌癌由来: 低転移株)、SQUU-B (高分化型舌癌由来: 高転移株) ならびに HaCaT (ヒト正常角化上皮由来) を用いた。培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F12 (Life Technologies, California, USA) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Life Technologies)、100 unit/ml のペニシリンおよびストレプトマイシン (penicillin/streptomycin: P/S, Life Technologies) を添加したものをを用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で細胞培養を行った。



## 5. RNA (ribonucleic acid) の抽出および相補的 DNA (complementary deoxyribonucleic acid: cDNA) の合成

RNA の抽出は acid guanidinium-phenol-chloroform 法を用いた。まず、培養皿上の細胞に TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies) を加え、セルスクレーパーにて破碎した。その後、これらに 0.2 ml の chloroform (Nacalai tesque) を加えて攪拌し、4°C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った後、RNA を含む水層を採取した。これに 0.5 ml の isopropanol (Nacalai tesque) を加えて攪拌後、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去後に得られた RNA ペレットを 75% ethanol (Nacalai tesque) にて洗浄した。さらに、4°C、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、再沈殿させたペレットを乾燥させ、50  $\mu$ l の 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水 (Nacalai tesque) にて溶解した。その後、吸光度計 NANO DROP 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) にて total RNA の濃度を測定した。

cDNA の合成には、DEPC 処理水に約 2.0  $\mu$ g の total RNA、20 unit/ml RNase inhibitor (Roche Diagnostics, Basel, Swiss) を 1.0  $\mu$ l、100 mM Tris-HCl (pH 8.8) 、500 mM KCl および 0.8% Nonidet P40 を含む 10 $\times$  Taq DNA polymerase buffer (Bio Basic, Markham, Canada) を 2.0  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> (Bio Basic) を 4.0  $\mu$ l、2.0 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) mix (Toyobo, Osaka, Japan) を 2.0  $\mu$ l、50  $\mu$ M random hexamers (Roche Diagnosis) を 1.0  $\mu$ l、50 unit/ml MuLV Reverse Transcriptase (Roche Diagnosis) を 1.0  $\mu$ l 加えて、合計 20.0  $\mu$ l とし、42°C で 15 分間インキュベートした。その後、99°C で 5 分間加温して酵素を失活させ、4°C にて 5 分間冷却し、これを messenger RNA (mRNA) の発現解析に用いた。

## 6. reverse transcription (RT)–polymerase chain reaction (PCR) および real-time

### PCR による mRNA の発現解析

RT-PCR は滅菌水に template DNA を 50 ng、10×Taq DNA polymerase buffer を 1.25  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 0.25  $\mu$ l、5 unit/ml Taq DNA polymerase を 0.1  $\mu$ l、2.0 mM dNTPmix を 0.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5  $\mu$ l 加えて全反応量を 12.5  $\mu$ l とした。反応条件は、熱変性は 94°C で 1 サイクル目が 3 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 60°C で 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とした。

real-time PCR は Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master MiX (Agilent Technologies, California, USA) を用いて行った。滅菌水に Master Mix を 10  $\mu$ l、template DNA を 9 ng、20  $\mu$ M センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5  $\mu$ l 加え、全反応量を 20  $\mu$ l とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 10 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 60°C で 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。また、mRNA 発現量を定量化するためにハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて補正し、 $\Delta \Delta C_t$  法により相対的発現量を算出した。なお、得られた PCR 産物を 2.0%アガロースゲル (Nacalai Tesque) 上で電気泳動を行い、臭化エチジウム溶液 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を用いて染色し、紫外線により可視化した。今回解析を行った遺伝子の各プライマー配列および PCR 産物の断片サイズ (表 3) を示す。

表 3 RT-PCR のプライマーと PCR 産物の断片サイズ

mRNA	PCR 産物のサイズ(bp)	プライマーの塩基配列	
<i>PD-L1</i>	282	forward	5'-TATGGTGGTGCCGACTACAA-3'
		reverse	5'-TGGCTCCCAGAATTACCAAG-3'
<i>GAPDH</i>	104	forward	5'-ATCAGCAATGCCTCCTGCAC-3'
		reverse	5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'

## 7. 細胞増殖実験

96 well プレートに  $4.0 \times 10^3$  / well の OSCC 細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 48 時間培養後、無血清の DMEM/F12 に培地交換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下でさらに 6 時間培養後、rhPD-1 (R&D systems, Minneapolis, U.S.A) (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 µg/ml) を添加した。添加 48 時間後の生細胞数を Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を用いて計測した。各 well に水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8; 2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2, 4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt) を 10 µl ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下に 2 時間呈色反応を行った。その後、WST-8 が細胞内脱水酵素により還元されて生じた水溶性ホルマザン色素を吸光マイクロプレートリーダー (Multiskan FC; Thermo Scientific) にて測定した (測定波長: 450 nm、参照波長: 620 nm)。なお、今回行った Cell Count Reagent SF による計測では、生細胞数と生成する水溶性ホルマザンの量が直線的比例関係にあることを確認した。また、細胞増殖率は rhPD-1 非添加群の細胞増殖率を 1.0 として算出した。

## 8. trans-well migration assay および trans-well invasion assay

PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞の遊走および浸潤に与える影響を検討するため、Falcon Cell Culture Insert (CORNING, New York, U.S.A) 、 Biocoat™ Matrigel™ invasion chamber (CORNING) および 24 well companion plate (CORNING) を用いて、trans-well migration assay および trans-well invasion assay を行った。細胞は、SAS 細胞を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 70%コンフルエントまで培養した後、無血清の DMEM/F12 に培地交換し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下でさらに 6 時間培養したものをを用いた。底面に細胞の移動が可能な 8 μm のポアが空いたインサート内へ、rhPD-1 (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μg/ml) を添加した無血清培地で懸濁した 8.0×10<sup>3</sup>/well の SAS 細胞を播種し、プレート内へは血清添加培地を入れることで細胞の遊走を促した。これを 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下に 24 時間培養後、インサート下面を 4% PFA にて固定し、HE 染色した後に、遊走細胞数を計測した。また、別のインサートには浸潤細胞のみインサート下面に移動するように、Matrigel™ をコーティングし、同様の方法で、浸潤細胞数を計測した。遊走能に関しては 0.5 mm<sup>2</sup> の範囲を無作為に 3 か所選択して、遊走細胞数の平均値を用いて解析を行った。また、浸潤能に関しては同様に浸潤細胞数を計測し、これを rhPD-1 無添加群の遊走細胞数の平均値で除したものを百分率で表したものを浸潤細胞率として解析した。さらに、PD-L1/PD-1 経路の阻害剤投与による遊走能および浸潤能への影響を検討するために、インサート内へ rhPD-1 1.0 μg/ml および PD-L1 中和抗体 (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μg/ml) を添加した無血清培地により懸濁した 8.0×10<sup>3</sup>/well の SAS 細胞を播種し、同様に解析を行った。

## 9. 統計学的解析

統計処理には  $\chi^2$  検定、logistic 回帰分析、Spearman の順位相関分析、Mann-Whitney  $U$  検定、および Dunnett 検定を用いた。また、生存分析は Kaplan-Meier 法を用いて解析を行い、統計処理には log-rank 検定を用いた。なお、統計ソフトとして JMP software version 11 (SAS Institute, North Carolina, USA) を使用し、 $p < 0.05$  の場合を統計学的に有意差ありとした。

## 結 果

### 研究 1. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の免疫組織学的検討

#### 1-1. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 および T リンパ球活性化抗原 CD25 の発現様式

本研究では、まず OSCC 生検標本における PD-L1 の発現を検索するために免疫組織化学的染色を行った。隣接口腔粘膜上皮において、PD-L1 はほとんど発現を認めなかった。一方、OSCC における PD-L1 陽性細胞率は様々であり、PD-L1 陰性群は 34 例 (35.1%)、PD-L1 陽性群は 63 例 (64.9%) であった。PD-L1 陽性群では癌巣外側や腫瘍浸潤先端部の癌細胞の細胞膜に強く発現していた (図 1)。

PD-1 は、隣接口腔粘膜上皮においてほとんどが認められなかった。一方、OSCC における PD-1 の発現も様々であり、PD-1 低発現群は 37 例 (38.1%)、PD-1 高発現群は 60 例 (61.9%) であった。PD-1 低発現群において、PD-1 は癌巣周囲の炎症性細胞にわずかに発現を認めた。また、PD-1 高発現群では腫瘍浸潤先端部周囲および腫瘍癌巣内の炎症性細胞の細胞膜に強く発現していた (図 2)。

次に、PD-L1/PD-1 経路による免疫応答抑制を評価するために、T リンパ球活性化抗原である CD25 の発現についても免疫組織化学的染色を行った。隣接口腔粘膜上皮では上皮直下の間質中に少数の CD25 発現細胞が認められた。一方、

OSCCにおいて、高発現している症例では腫瘍浸潤先端部周囲および腫瘍胞巣内の炎症性細胞の細胞膜に強く発現を認めた（図3）。

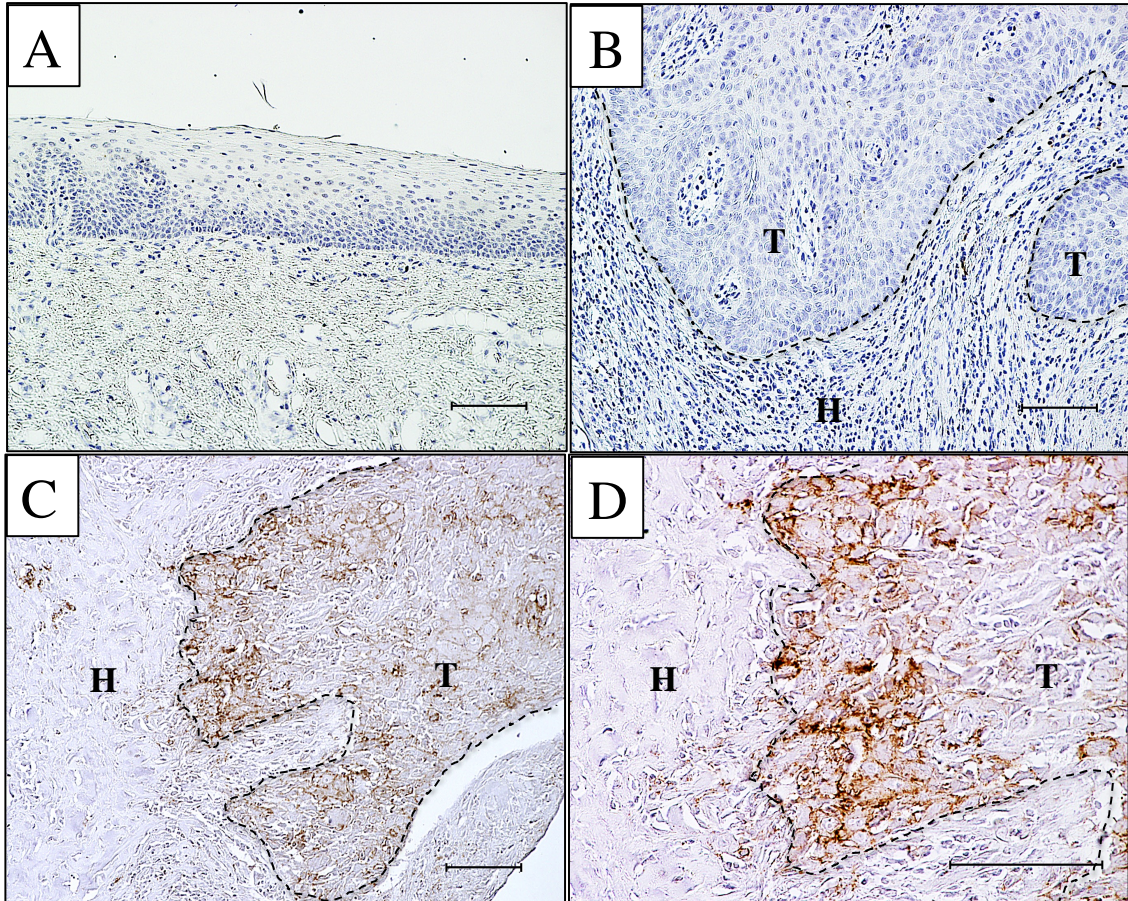


図1 OSCC生検標本におけるPD-L1の発現様式（免疫組織化学的染色法）

（A: 隣接口腔粘膜上皮 B: 陰性例 C: 陽性例 D: 陽性例<強拡大>）

（A、B、C: ×200倍、D: ×400倍）

（A）PD-L1はほとんど発現を認めない。（B）PD-L1は癌胞巣周囲の間質細胞にわずかに発現を認めるが、癌細胞にはほとんど認められない。（C、D）癌胞巣外側や腫瘍浸潤先端部の癌細胞の細胞膜にPD-L1の強い発現を認める。点線は腫瘍細胞と間質の境界部を示しており、Tは腫瘍胞巣、Hは間質を示している。scale bars: 100 μm。



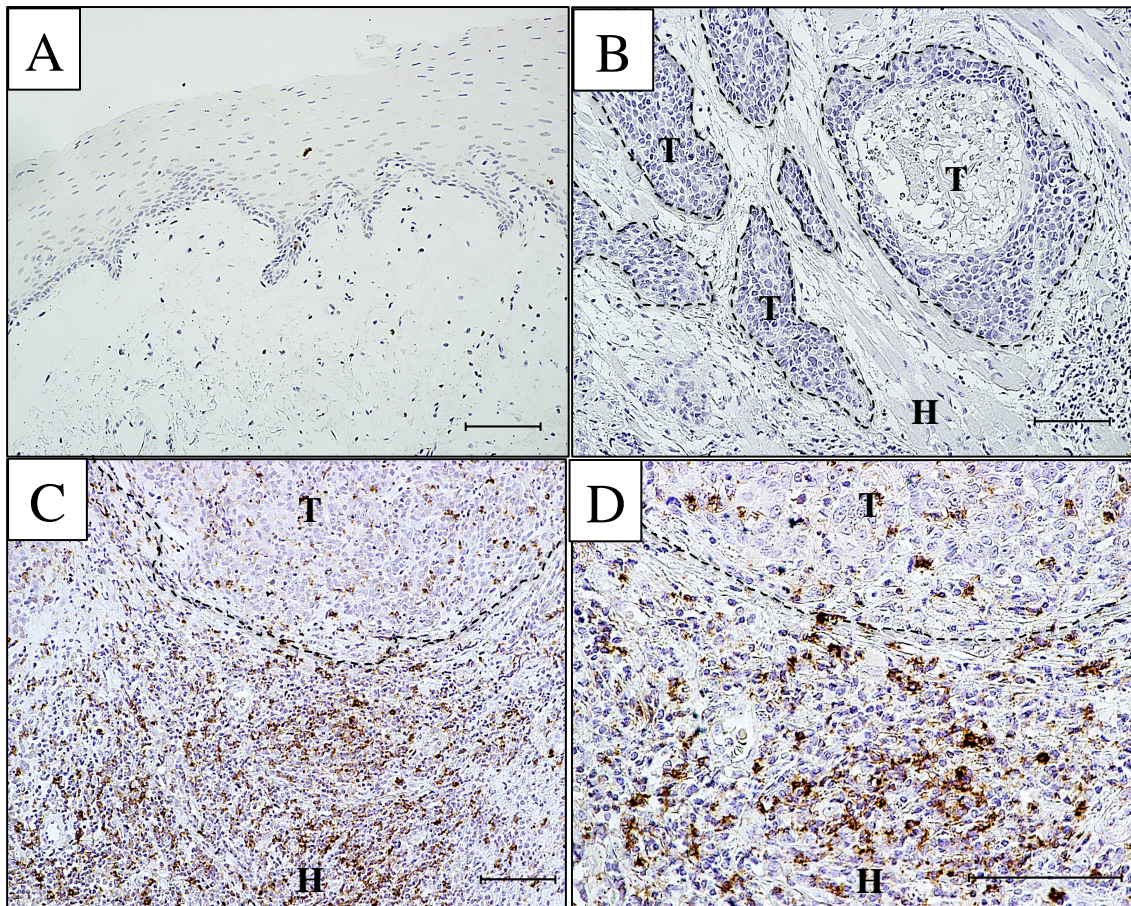


図 2 OSCC 生検標本における PD-1 の発現様式 (免疫組織化学的染色法)

(A: 隣接口腔粘膜上皮 B: 低発現例 C: 高発現例 D: 高発現例<強拡大>)

(A、B、C: ×200 倍、D: ×400 倍)

(A) PD-1 の発現はほとんど認められない。(B) PD-1 は癌胞巣周囲の炎症性細胞にわずかに発現を認める。(C、D) 腫瘍浸潤先端部周囲および腫瘍胞巣内の炎症性細胞の細胞膜に強く発現している。点線は腫瘍細胞と間質の境界部を示しており、T は腫瘍胞巣、H は間質を示している。scale bars: 100 μm。



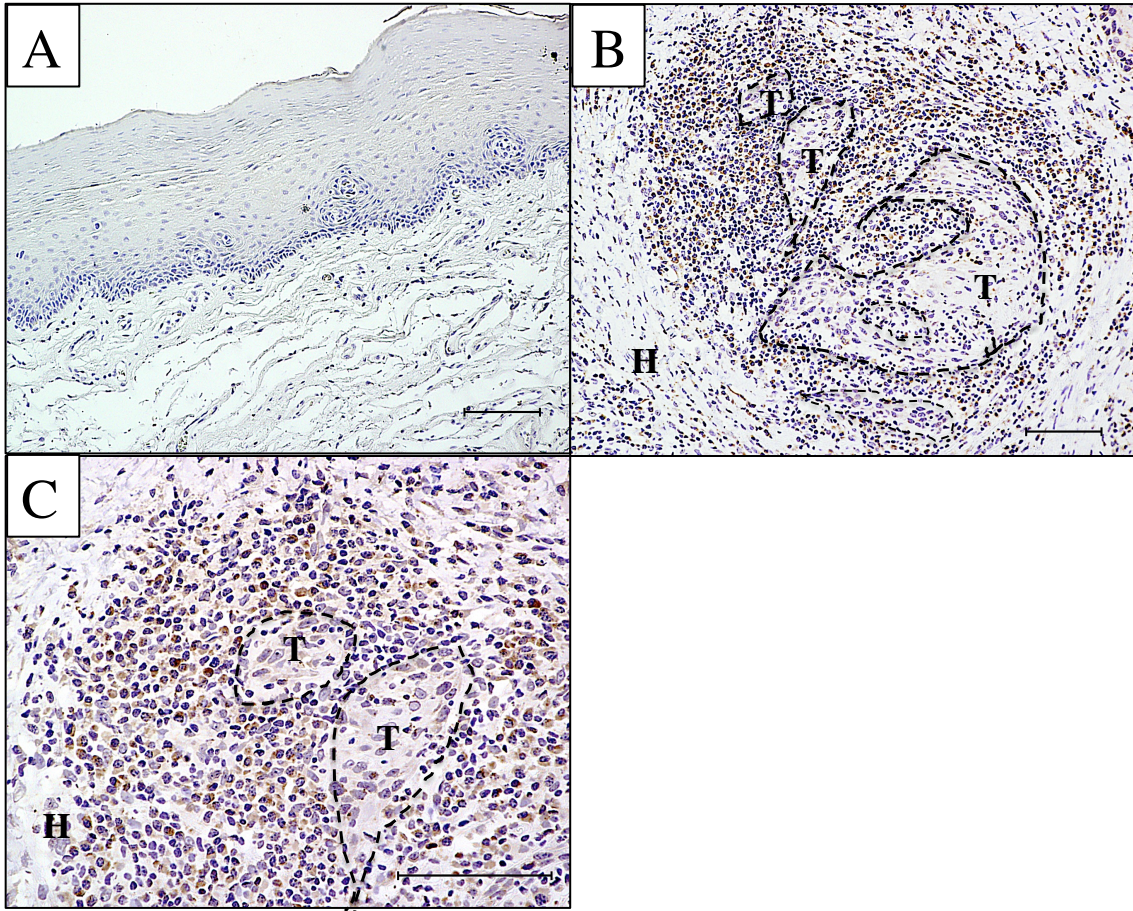


図3 OSCC 生検標本における CD25 の発現様式(免疫組織化学的染色法)

(A: 隣接口腔粘膜上皮 B: 陽性群 C: 陽性群<強拡大>)

(A、B: ×200 倍、C: ×400 倍)

(A) 上皮直下の間質中に CD25 の発現をわずかに認める。(B、C) 腫瘍浸潤先端部周囲および腫瘍胞巣内へ浸潤している炎症性細胞の細胞膜に CD25 が強く発現している。点線は腫瘍細胞と間質の境界部を示しており、T は腫瘍胞巣、H は間質を示している。scale bars: 100 μm。

## 1-2. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現様式と臨床病理学的所見との関連

OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現様式と臨床病理学的所見との関連について検討した。全症例を A 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 低発現、B 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 高発現、もしくは PD-L1 陽性かつ PD-1 低発現、および C 群: PD-L1 陽性かつ PD-1 高発現の 3 群に分け (図 4)、統計学的に解析した。その結果、C 群は A 群と比較して頸部リンパ節転移と遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。一方、性別、部位、臨床病期分類、T 分類、局所再発、分化度 (WHO 分類)、浸潤様式 (YK 分類)、および間質反応 (Anneroth 分類) に関しては、各群間に有意差は認められなかった (表 4)。また、頸部リンパ節転移の危険因子を検索するために、性別、部位、分化度、浸潤様式、間質反応および PD-L1/PD-1 発現を検討項目として単変量および多変量解析を行った。その結果、PD-L1/PD-1 の発現のみが、統計学的有意差を認め、OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の高発現が頸部リンパ節転移の独立した危険因子として抽出された (表 5)。



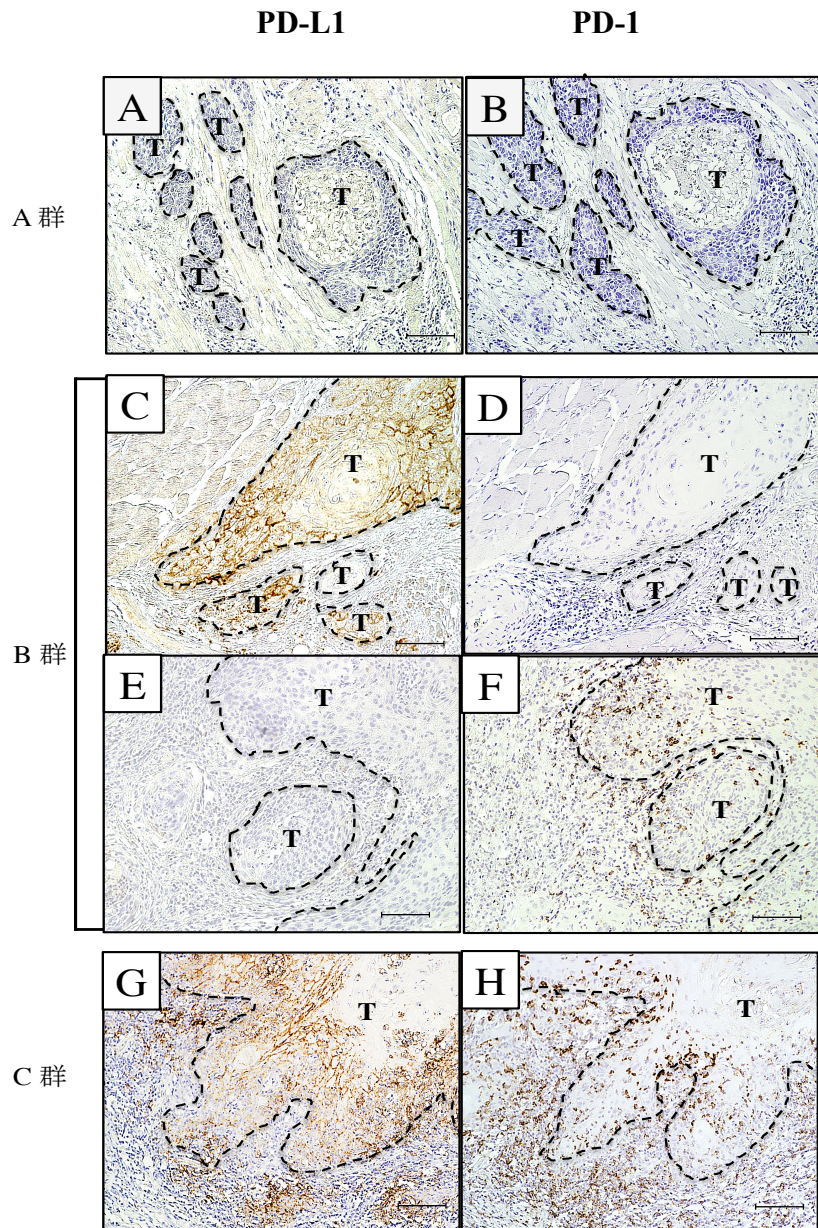


図 4 OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現様式（免疫組織化学的染色法）（×200 倍）

A 群; (A) PD-L1 陰性/ (B) PD-1 低発現、B 群; (C) PD-L1 陽性/ (D) PD-1 低発現、または (E) PD-L1 陰性/ (F) PD-1 高発現、C 群; (G) PD-L1 陽性/ (H) PD-1 高発現、を示す。点線は腫瘍細胞と間質の境界部を、T は腫瘍胞巣を示している。scale bars: 100  $\mu$ m。

表 4 OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 発現と

臨床病理組織学的所見との関連

	症例数 (%)	PD-L1/PD-1			p-value
		A群	B群	C群	
<b>性別</b>					
男性	70(72.2)	14	26	30	N. S.
女性	27(27.8)	4	10	13	
<b>原発部位</b>					
舌	45(46.4)	10	19	16	N. S.
歯肉	37(38.1)	6	14	17	
口底	9(9.3)	1	3	5	
頬粘膜	6(6.2)	1	0	5	
<b>臨床発育様式</b>					
表在型、外向型	21(21.6)	6	8	7	N. S.
内向型	76(78.4)	12	28	36	
<b>浸潤様式 (YK分類)</b>					
grade 1, 2, 3	71(73.2)	14	26	31	N. S.
grade 4C, 4D	26(26.8)	4	10	12	
<b>分化度 (WHO分類)</b>					
grade 1	62(63.9)	11	22	29	N. S.
grade 2, 3	35(36.1)	7	14	14	
<b>間質反応</b>					
mild・none	29(29.9)	6	16	7	N. S.
moderate	54(55.7)	11	15	28	
marked	14(14.4)	1	5	8	
<b>T 分類</b>					
T1, T2	64(66.0)	13	26	25	N. S.
T3, T4	33(34.0)	5	10	18	
<b>頸部リンパ節転移</b>					
有	42(43.3)	4	16	22	A vs C
無	55(56.7)	14	20	21	p<0.05
<b>臨床病期分類</b>					
Stage I, II	54(55.7)	11	22	21	N. S.
Stage III, IV	43(44.3)	7	14	22	
<b>局所再発</b>					
有	15(15.5)	1	6	8	N. S.
無	82(84.5)	17	30	35	
<b>遠隔転移</b>					
有	13(13.4)	0	5	8	A vs C
無	84(86.6)	18	31	35	p<0.05

$\chi^2$  検定; N.S.: not significant

表 5 OSCC の頸部リンパ節転移に影響を与える

臨床病理組織学的因子の解析

	頸部リンパ節転移		単変量解析		多変量解析	
	有	無	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
<b>性別</b>						
男性	33	37	Reference	-	Reference	-
女性	9	18	0.56 (0.21-1.39)	0.215	0.56 (0.19-1.55)	0.268
<b>原発部位</b>						
舌	20	25	Reference	-	Reference	-
歯肉	15	22	0.85 (0.35-2.06)	0.720	0.90 (0.31-2.55)	0.835
口底	4	5	1.00 (0.22-4.26)	1.000	0.74 (0.13-3.95)	0.727
頬粘膜	3	3	1.25 (0.21-7.40)	0.798	1.04 (0.14-7.76)	0.967
<b>臨床発育様式</b>						
表在型	4	4	Reference	-	Reference	-
外向型	5	8	0.63 (0.10-3.77)	0.604	0.67 (0.09-5.06)	0.698
内向型	33	43	0.77 (0.17-3.46)	0.722	0.67 (0.13-3.43)	0.619
<b>浸潤様式</b>						
grade 1, 2, 3	27	44	Reference	-	Reference	-
grade 4C, 4D	15	11	2.22 (0.90-5.66)	0.084	1.78 (0.56-5.82)	0.330
<b>分化度</b>						
grade 1	23	39	Reference	-	Reference	-
grade 2, 3	19	16	2.01 (0.87-4.72)	0.101	1.78 (0.63-4.89)	0.284
<b>間質反応</b>						
mild・none	11	18	Reference	-	Reference	-
moderate	24	30	1.31 (0.52-3.36)	0.566	1.25 (0.43-3.74)	0.684
marked	7	7	1.64 (0.45-6.07)	0.454	1.64 (0.39-7.00)	0.619
<b>PD-L1/PD-1</b>						
A 群	4	14	Reference	-	Reference	-
B 群	16	20	2.80 (0.82-11.40)	0.103	3.04 (0.84-13.10)	0.093
C 群	22	21	3.67 (1.11-14.59)	0.033	3.99 (1.10-17.26)	0.035

logistic 回帰分析; OR: odds ratio (オッズ比)、

95% CI: 95% confidence interval (95%信頼区間)

### 1-3. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と T リンパ球活性化抗原 CD25 発現との関連

OSCC における PD-L1/PD-1 シグナルが、活性化 T 細胞に与える影響を評価するために、PD-L1/PD-1 の発現様式と腫瘍浸潤先端部における CD25 陽性細胞率との関連について統計学的に解析した。PD-L1 および PD-1 の発現率が高くなるにつれ、CD25 の陽性率が低くなっており、PD-L1 および PD-1 陽性率と CD25 陽性率の間にはそれぞれ弱い負の相関 (PD-L1/CD25:  $r = -0.2563$ ,  $p = 0.0113$ , PD-1/CD25:  $r = -0.3029$ ,  $p = 0.0026$ ) が認められた (Spearman の順位相関分析) (図 5A, B)。また、C 群 (25.6%) は A 群 (61.5%) および B 群 (55.8%) と比較して CD25 発現細胞の割合が有意に低かった (Mann-Whitney  $U$  検定;  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) (図 5C)。

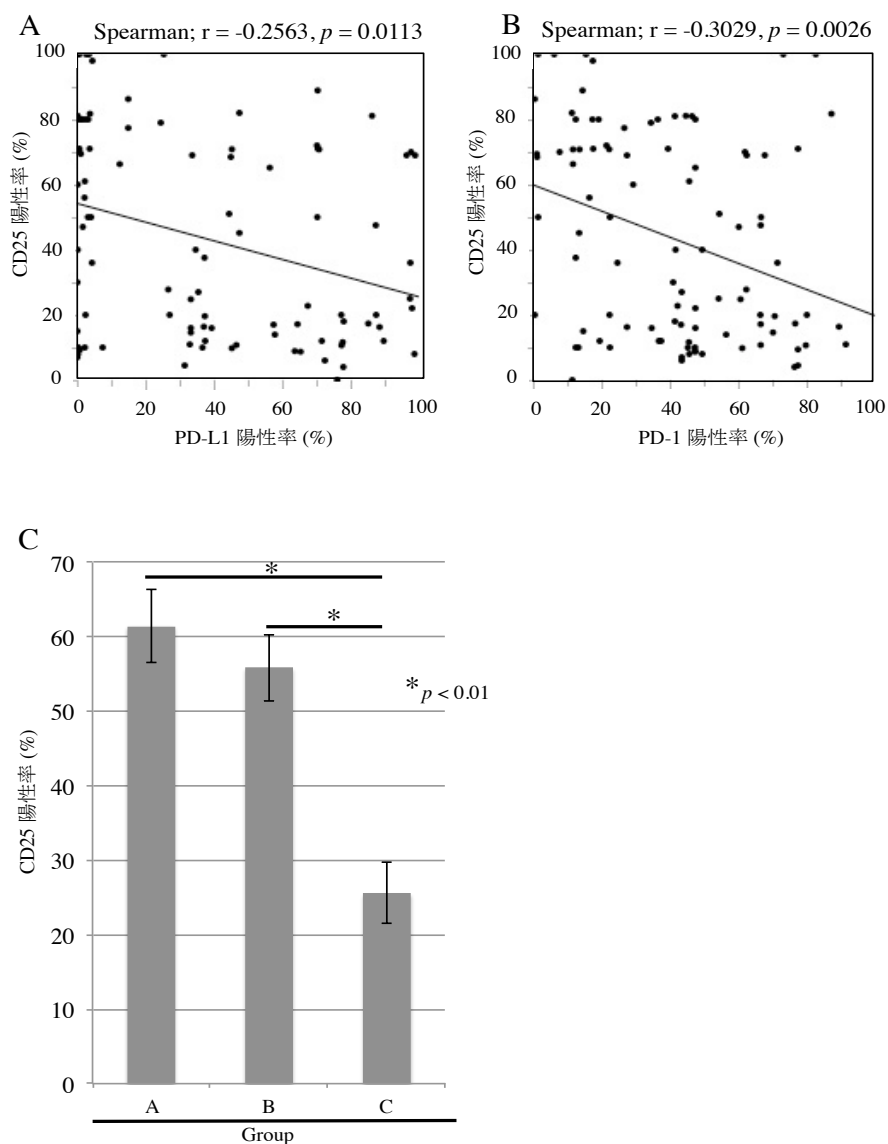


図5 OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と CD25 発現との関連

(A、B) PD-L1 および PD-1 陽性率と CD25 陽性率の間には、それぞれ負の相関を認める。なお、統計処理には Spearman の順位相関分析を用いている。(C) 腫瘍浸潤先端部における CD25 陽性細胞率は、A 群および B 群と比較して、C 群で有意に低くなっている。なお、統計処理には Mann-Whitney  $U$  検定を用いた (\* $p < 0.01$ )。

#### 1-4. OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と予後との関連

OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と OSCC 患者の予後との関連を検討するため、Kaplan-Meier 法を用いて生存分析を行った。その結果、PD-L1 陽性群と陰性群における疾患特異的累積 5 年生存率は、それぞれ 69.2%、91.0%であり、PD-L1 陰性群と比較して、陽性群は有意に転帰が不良であった (log-rank 検定;  $*p < 0.05$ ) (図 6A)。また、PD-1 高発現群と低発現群における疾患特異的累積 5 年生存率はそれぞれ 71.3%、86.7%であり、PD-1 高発現群で生存率が低かったものの、これら 2 群間に統計学的有意差は認められなかった (図 6B)。さらに、A 群、B 群、および C 群における疾患特異的累積 5 年生存率はそれぞれ 94.4%、80.5%、および 66.8%であり、C 群は A 群と比較して、有意に生存率が低く、不幸な転帰を辿った症例が多かった。(log-rank 検定;  $*p < 0.05$ ) (図 6C)。



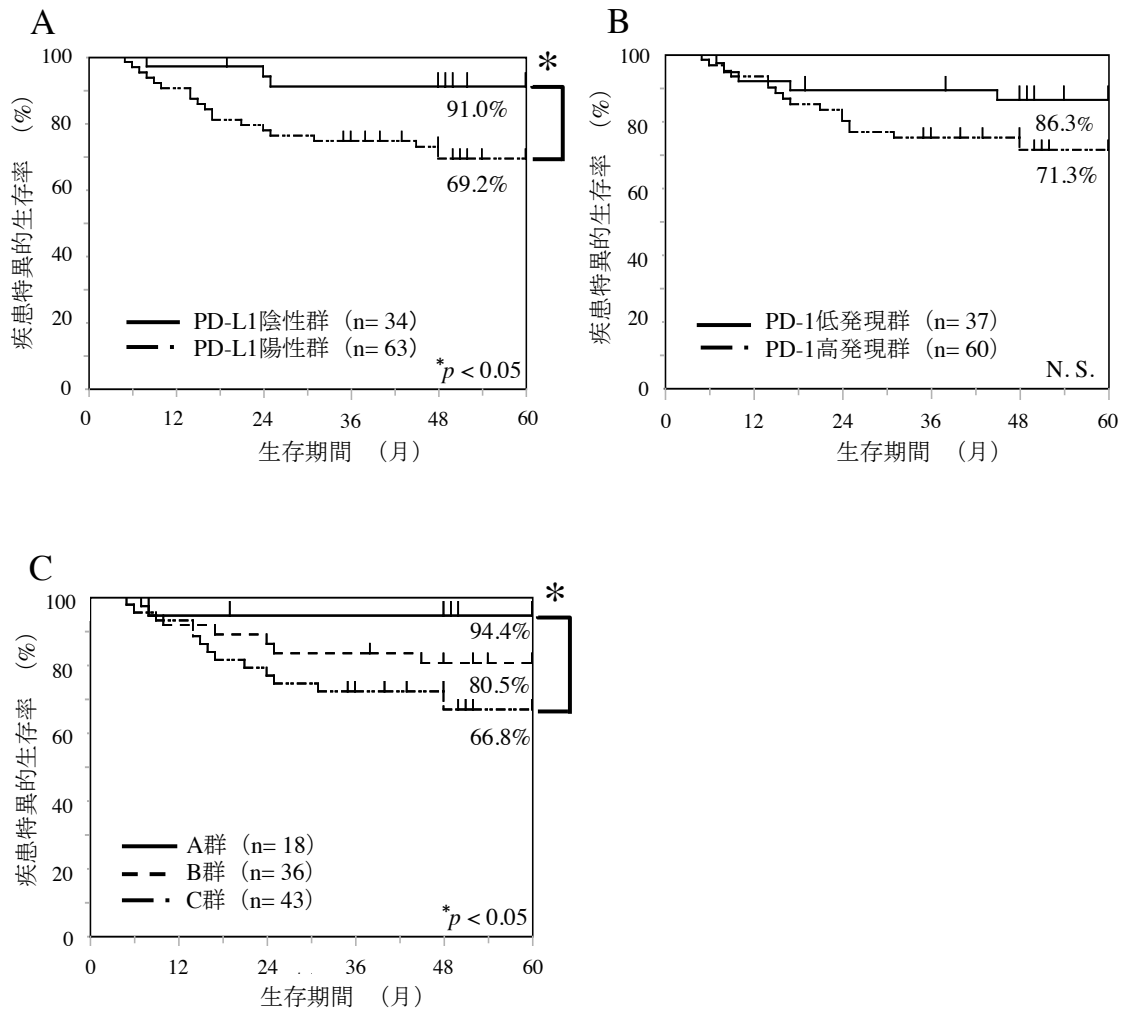


図 6 疾患特異的累積 5 年生存率

(A) PD-L1 陽性群は陰性群と比較して、有意に転帰が不良である。(B) PD-1 発現による生存率への影響に統計学的有意差は認められない。(C) PD-L1/PD-1 高発現群は PD-L1/PD-1 低発現群と比較して、有意に生存率が低い。なお、統計処理には log-rank 検定を用いた (*p* < 0.05, N. S.: not significant)。

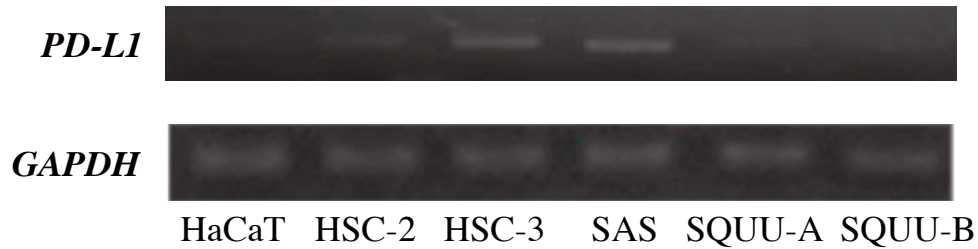
## 研究 2

### rhPD-1 添加が OSCC 細胞の増殖、遊走能および浸潤能に与える影響に関する研究

#### 2-1. OSCC 細胞株における *PD-L1* の発現

OSCC 細胞株 (HSC-2、HSC-3、SAS、SQUU-A、SQUU-B) およびヒト正常角化上皮細胞株 (HaCaT) を用いて、*PD-L1* の発現を RT-PCR 法および real-time PCR 法にて検索した。real-time PCR 法における *PD-L1* の発現量は、HaCaT 細胞の発現量を 1.0 として相対的発現量を算出した。*PD-L1* の発現は、SAS 細胞および HSC-3 細胞で発現が強かった (図 7A)。また、SAS 細胞および HSC-3 細胞では、HaCaT 細胞と比較して、*PD-L1* の相対発現量がそれぞれ 3.55 倍および 2.85 倍と有意に多かった。(Mann-Whitney *U* 検定; \* $p < 0.05$ ) (図 7B)。

A



B

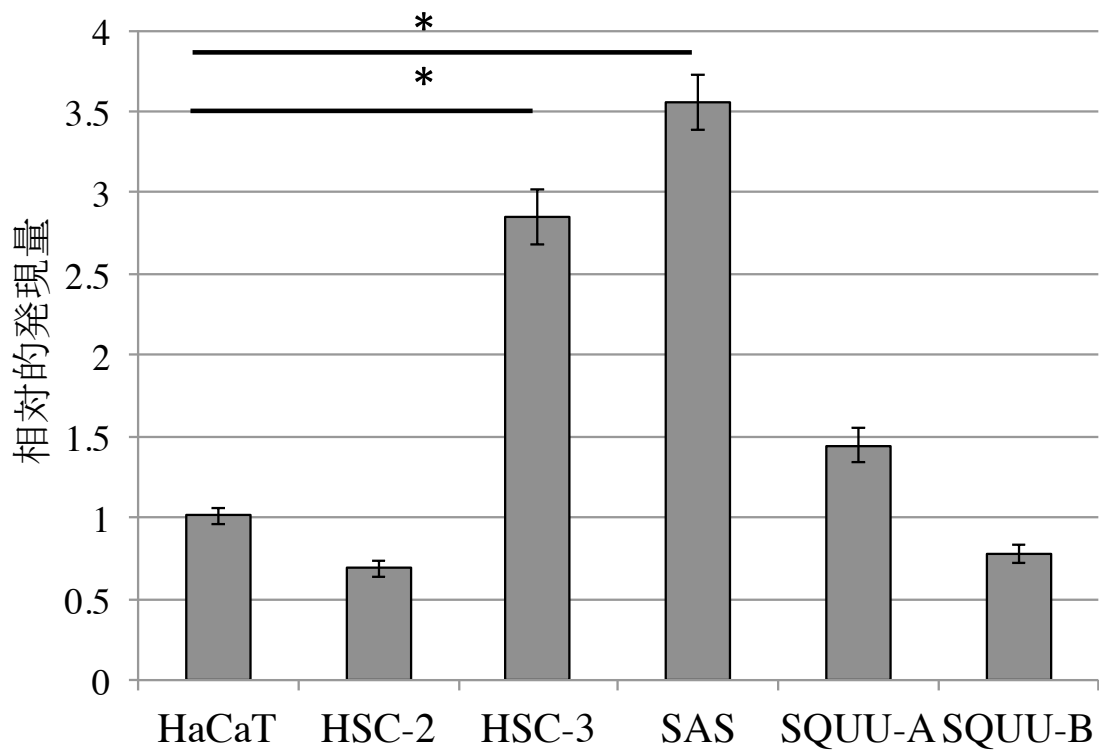


図 7 OSCC 細胞株と HaCaT 細胞における *PD-L1* の発現

*PD-L1* の発現を RT-PCR 法 (A) および real-time PCR 法 (B) を用いて検索した。(A) *PD-L1* は SAS 細胞および HSC-3 細胞で強い発現を認める。(B) *PD-L1* 相対発現量は HaCaT 細胞での発現量を 1.0 とすると、SAS 細胞では 3.55 倍および HSC-3 細胞では 2.85 倍と有意に多い ( $n=3$ )。なお、統計処理には Mann-Whitney  $U$  検定を用いた ( $*p < 0.05$ )。

## 2-2. rhPD-1 添加が OSCC 細胞の増殖に及ぼす影響

次に、PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞の増殖に及ぼす影響について検討を行った。rhPD-1 無添加群の細胞増殖率を 1.0 として、添加群の細胞増殖率を算出した。*PD-L1* の発現が強かった SAS 細胞および HSC-3 細胞において、rhPD-1 添加により濃度依存的に細胞増殖が促進されていた (Dunnett 検定; \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ) (図 8)。

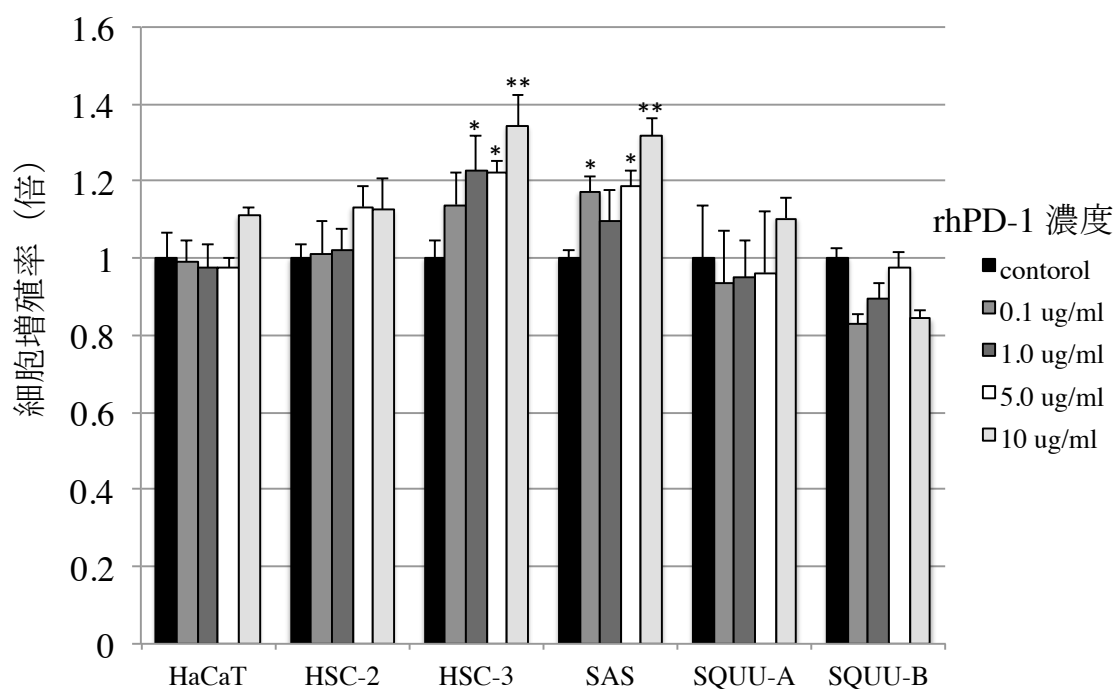


図 8 rhPD-1 添加が OSCC 細胞の増殖に与える影響

*PD-L1* の発現が強かった SAS 細胞および HSC-3 細胞において、rhPD-1 添加により濃度依存的に細胞増殖が促進されている。なお、rhPD-1 無添加群の細胞増殖率を 1.0 として、添加群の細胞増殖率を算出している (n=3)。統計処理には Dunnett 検定を用いた (\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ )。

### 2-3. rhPD-1 添加が OSCC 細胞の遊走能に及ぼす影響

PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞の遊走能に及ぼす影響を調べるために、*PD-L1* の発現が強かった SAS 細胞に rhPD-1 を添加して、trans-well migration assay を行った。rhPD-1 無添加群と比較して、添加群では rhPD-1 の濃度依存的に遊走細胞数が増加していた (Dunnett 検定;  $*p < 0.01$ ) (図 9)。

また、PD-L1 の中和抗体である抗 PD-L1 抗体の添加による PD-L1/PD-1 シグナルの阻害が、SAS 細胞の遊走に及ぼす影響についても検討を行った。SAS 細胞に rhPD-1 1.0  $\mu\text{g/ml}$  を添加した群を control 群とした。control 群と比較して、抗 PD-L1 抗体添加群では、抗 PD-L1 抗体の濃度依存的に遊走細胞数の減少を認めた。(Dunnett 検定;  $*p < 0.01$ ) (図 10)。

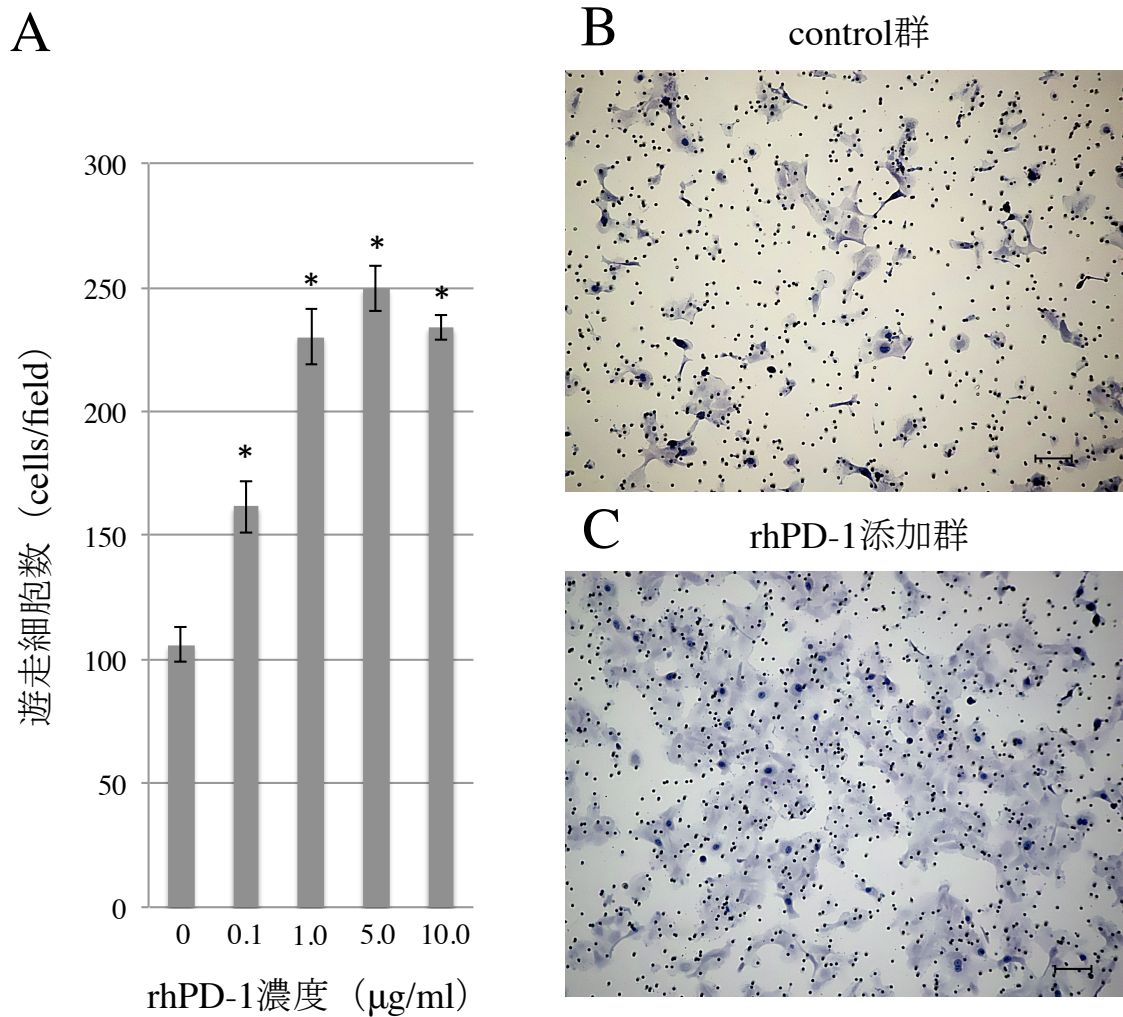
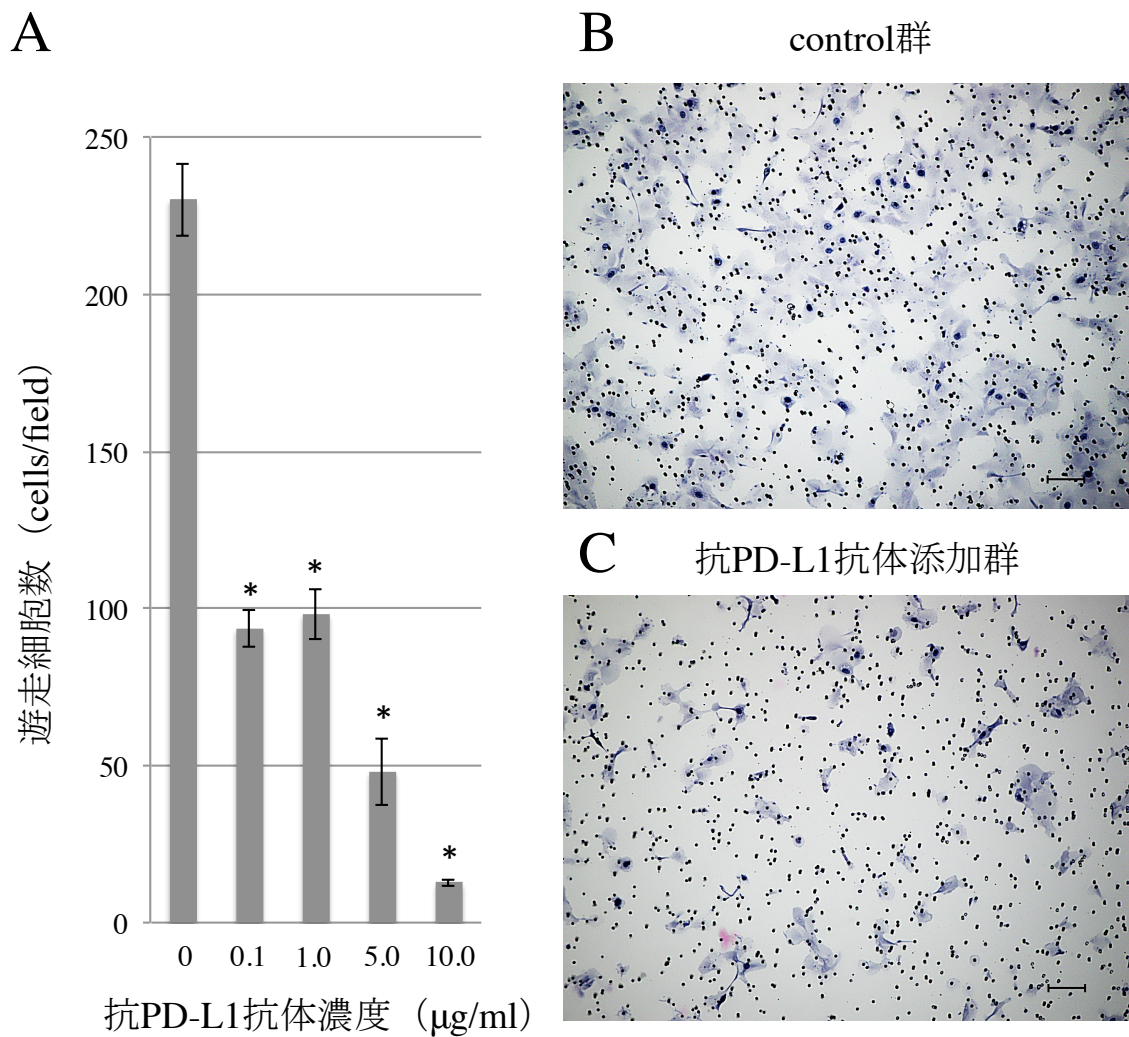


図9 rhPD-1添加がOSCC細胞の遊走能に及ぼす影響

(A) SAS細胞において、rhPD-1無添加群(control群)と比較して、添加群ではrhPD-1の濃度依存的に遊走細胞数が有意に増加している(n=3)。なお、統計処理にはDunnett検定を用いた(\* $p < 0.01$ )。(B)はrhPD-1無添加群(control群)の遊走細胞のHE染色像を示す。(C)はrhPD-1添加群(10.0 µg/ml)の遊走細胞のHE染色像を示す。なお、細胞質を伴っているものを遊走細胞として計測に用いた。scale bars: 100 µm。



**図 10 PD-L1/PD-1 シグナル阻害が OSCC 細胞の遊走能に及ぼす影響**

(A) SAS 細胞において、rhPD-1 1.0 μg 添加群 (control 群) と比較して、抗 PD-L1 抗体添加群では、抗 PD-L1 抗体の濃度依存的に遊走細胞数が有意に減少している (n=3)。なお、統計処理には Dunnett 検定を用いた (\* $p < 0.01$ )。 (B) は抗 PD-L1 抗体無添加群 (control 群) の遊走細胞の HE 染色像を示す。 (C) は抗 PD-L1 抗体添加 (5.0 μg/ml) 群の遊走細胞の HE 染色像を示す。なお、細胞質を伴っているものを遊走細胞として計測に用いた。 scale bars: 100 μm。

#### 2-4. rhPD-1 添加が OSCC 細胞の浸潤能に及ぼす影響

実験 2-3 と同様に、SAS 細胞を用いて、trans-well invasion assay にて rhPD-1 が OSCC 細胞の浸潤能に及ぼす影響について検討を行った。rhPD-1 無添加群と比較して、添加群では rhPD-1 の濃度依存的に浸潤細胞率が有意に高くなっていた (Dunnett 検定;  $*p < 0.01$ ) (図 11)。

また、実験 2-3 と同様に、抗 PD-L1 抗体の添加による PD-L1/PD-1 シグナルの阻害が SAS 細胞の浸潤に及ぼす影響について検討を行った。SAS 細胞に rhPD-1 1.0  $\mu\text{g/ml}$  を添加した群を control 群とした。control 群と比較して抗 PD-L1 抗体添加群では、抗 PD-L1 抗体の濃度が高くなるにつれて浸潤細胞率が低下した (Dunnett 検定;  $*p < 0.01$ ) (図 12)。



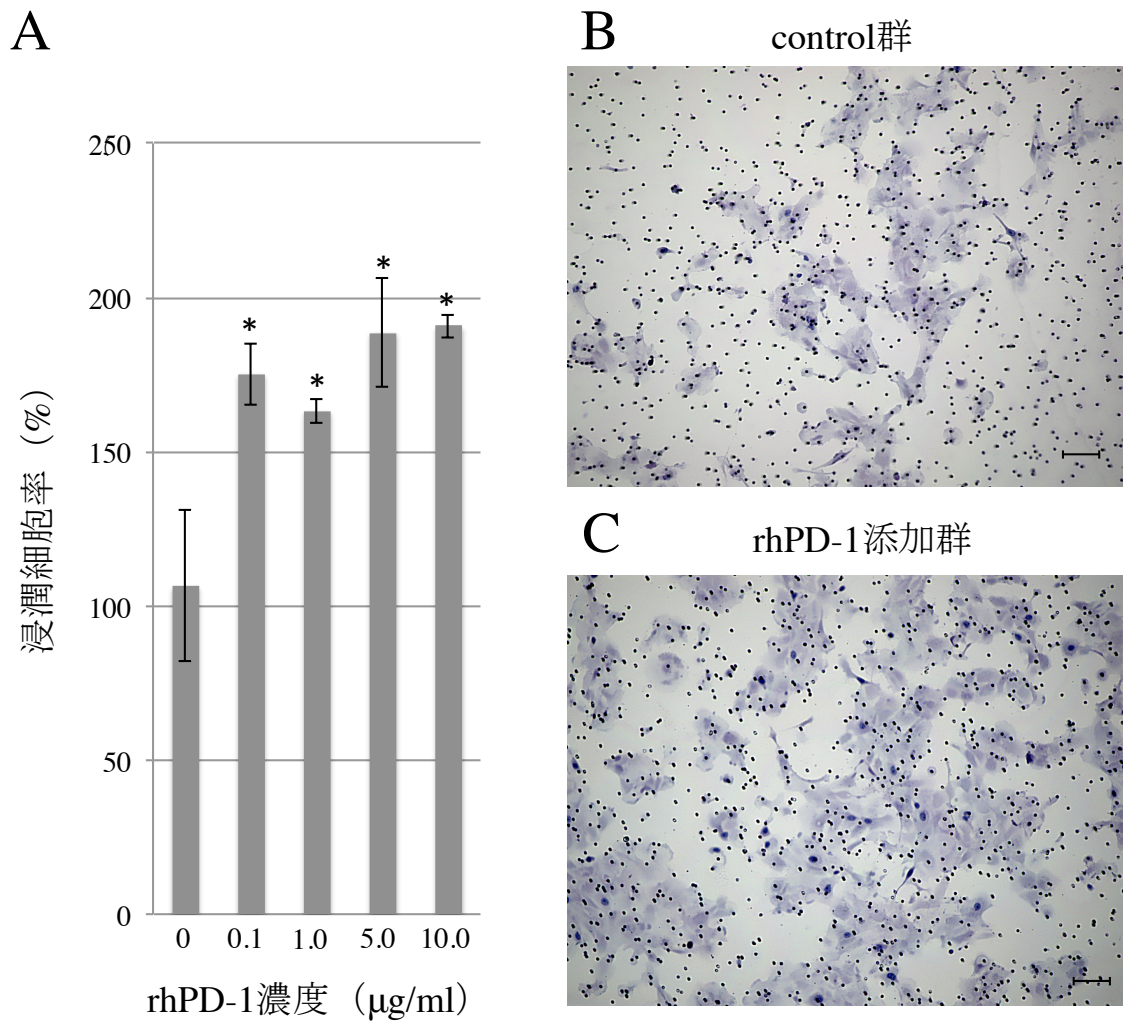


図 11 rhPD-1 添加が OSCC 細胞の浸潤能に及ぼす影響

(A) SAS 細胞において、rhPD-1 無添加群 (control 群) と比較して、添加群では rhPD-1 添加により濃度依存的に浸潤細胞率が高くなっている (n=3)。なお、統計処理には Dunnett 検定を用いた ( $*p < 0.01$ )。 (B) は rhPD-1 無添加群 (control 群) の浸潤細胞の HE 染色像、 (C) は rhPD-1 添加群 (10.0 µg/ml) の浸潤細胞の HE 染色像を示す。なお、細胞質を伴っているものを浸潤細胞として計測に用いている。 scale bars: 100 µm。

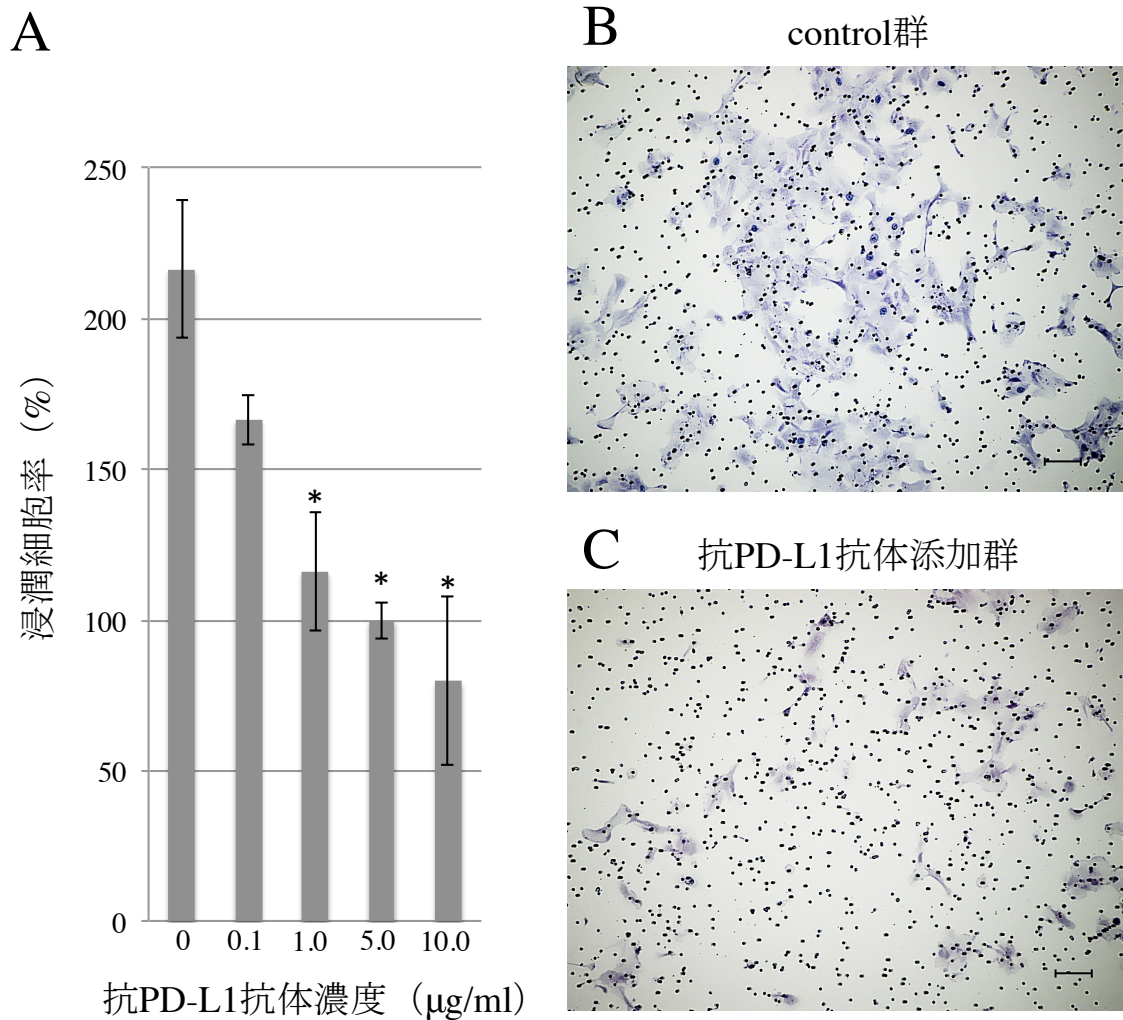


図 12 PD-L1/PD-1 シグナル阻害が OSCC 細胞の浸潤能に及ぼす影響

(A) SAS 細胞において、rhPD-1 1.0 μg 添加群 (control 群) と比較して、抗 PD-L1 抗体添加により濃度依存的に浸潤細胞率が低下している (n=3)。なお、統計処理には Dunnett 検定を用いた (\* $p < 0.01$ )。 (B) は抗 PD-L1 抗体無添加群 (control 群) の浸潤細胞の HE 染色像、(C) は抗 PD-L1 抗体添加 (10.0 μg/ml) 群の浸潤細胞の HE 染色像を示す。なお、細胞質を伴っているものを浸潤細胞として計測に用いた。 scale bars: 100 μm。

## 考 察

現在、OSCC に対しては、手術療法を主体とした治療が行われている。特に、頸部リンパ節転移を伴うような局所進行 OSCC 症例に対しては、局所領域の制御率をより向上させるために、術前補助療法として抗癌剤を用いた化学療法や、これに放射線療法を併用した放射線化学療法が行われ、その後に根治的切除がなされることが多い(4-6)。また、手術療法においても再建外科の進歩により、さらに広範囲の切除が可能となってきた。当科においても局所進行 OSCC 症例に対し、術前補助療法として 5-fluorouracil 系抗癌剤と放射線外照射による化学・放射線同時併用療法 (concurrent chemoradiotherapy: CCRT) を行ったのち、手術療法を行うことで 5 年生存率が 80% を超え、良好な成績が得られている (55)。しかしながら、このような集学的治療により局所領域を制御しえても、結果的に遠隔転移により不幸な転帰を辿る患者も少なくない (7-10)。そのような背景の中、近年、分子標的薬を用いた新たな治療法が注目され、臨床応用されている。

現在、頭頸部癌においては、epidermal growth factor receptor (EGFR) に対するヒト・マウスキメラ型モノクローナル抗体 cetuximab が、切除不能または再発・遠隔転移頭頸部癌症例において用いられており、その治療効果が数多く報告されている (56-64)。その一方で、cetuximab 投与による infusion reaction や間質性肺炎などの重篤な有害事象の報告もあり、さまざまな問題点が顕在化している。本研究で用いた抗 PD-L1 抗体や抗 PD-1 抗体も、悪性黒色腫患者におい

て、すでに臨床応用されており、その有用性を示唆する報告が多い(44-47)。がん細胞が、PD-L1/PD-1 シグナルを介して宿主の免疫監視機構から逃避していると考えられるなら、細胞の種類に関係なく、OSCC においても抗 PD-L1 抗体や抗 PD-1 抗体が有効であると推察される。しかしながら、OSCC を含む頭頸部癌において、PD-L1/PD-1 シグナルの発現および機能について調べた研究は極めて少なく、そのほとんどが腫瘍組織における PD-L1 の発現のみを評価したものである(65-69)。腫瘍微小環境における PD-L1/PD-1 シグナルの役割を正確に評価するためには、そのレセプターである PD-1 の発現も同時に観察する必要があると考えられる。そこで本研究では、OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現を検索するとともに、臨床病理学的所見および予後との関連について検討を行った。

まず PD-L1 の発現について検討したところ、全対象患者 97 例中 PD-L1 陽性症例は 67 例(64.9%)であった。これは、Chen らの報告の 63.7%とほぼ同様の結果であったが、他の報告では、43.6%から 87.0%まで様々であった(65-67)。また、PD-1 の発現についても同様に検索を行ったところ、高発現していた症例は 60 例(61.9%)であり、これは Badoual らの 49.2%よりやや高い結果となった(70)。このような発現率の差が生じる要因として、これらの報告では OSCC のみならず咽頭・喉頭癌も含まれており、腫瘍発生母地による発現量の差異、あるいは使用した抗体や染色条件の相違などが反映しているものと考えられた。

次に、OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現様式と臨床病理組織学的所見との関連について検討を行った。本研究では、症例を A 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 低発現、B 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 高発現、もしくは PD-L1 陽性かつ PD-1

低発現、および C 群: PD-L1 陽性かつ PD-1 高発現の 3 群に分けて解析を行った。その結果、A 群は C 群と比較して頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。さらに、頸部リンパ節転移の危険因子を検索するために多変量解析を行ったところ、本研究では PD-L1/PD-1 の発現様式が、頸部リンパ節転移に関して独立した危険因子となり得ることが示された。Cho らは、45 例の OSCC 患者の検討において、PD-L1 高発現症例は高分化型よりも中分化型の頻度が有意に高いことを報告している (67)。しかしながら、本研究においても同様に検討したところ、結果は示していないが、PD-L1 の発現と分化度との関連は認められなかった。また Upko らは、中咽頭癌患者 181 例において PD-L1 の発現を検討したところ、human papilloma virus (HPV) 陽性症例のなかで PD-L1 高発現群は、低発現群と比較して、遠隔転移の発生頻度が高かった (OR = 4.37、 $p = 0.06$ ) と報告している (68)。さらに、PD-1 の発現と臨床病理学的所見との関連について、Badoual ら (70) は、HPV 陽性中咽頭 SCC 患者において、PD-1 陽性かつ CD4 陽性の腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL) 数、CD4 または CD8 陽性 T 細胞数が多い症例は、これらの数が少ない症例と比較して予後が良好であると述べている。また、これとは対照的に、上咽頭がん患者 46 例の組織を使用した PD-1 発現に関する検討では、CD8 陽性 TIL における PD-1 高発現が局所再発率と有意に相関していると述べられている (71)。このように、頭頸部癌における PD-L1/PD-1 の発現と臨床病理学的所見との関連についての統一した見解は得られていない。これは、先に述べた使用した抗体や染色条件の相違に加え、PD-L1 と PD-1 いずれか一方のみの発現で評価していることが原因であると考えられる。本研究では、PD-L1 と PD-1 の両者の発現を

検索しており、これらがともに高発現している症例は、頸部リンパ節転移や遠隔転移の発生率が有意に高いことを示した。この結果は癌が進展する際に OSCC 細胞が宿主の免疫機構から逃避するために PD-L1/PD-1 シグナルを利用している可能性を示唆している。また本研究では、宿主と腫瘍細胞の免疫応答の最前線である腫瘍浸潤先端部に着目して PD-L1/PD-1 の発現を検索しており、PD-1 を発現している T 細胞の subset や TIL、HPV 感染との関連については検討していない。今後、これらについても詳細な検討を行う必要があると考えられた。

さらに本研究では、癌周囲の微小環境において PD-L1/PD-1 シグナルにより T リンパ球の活性化が抑制されているかを調べるために、T リンパ球活性化抗原 CD25 の発現を免疫組織化学的染色法により検索した。その結果、腫瘍浸潤先端部における CD25 陽性率は、PD-L1 および PD-1 陽性率とそれぞれ負の相関が認められた。また、PD-L1/PD-1 高発現群である C 群は、A 群および B 群と比較して有意に CD25 陽性細胞率の低下を認めたことから、OSCC の浸潤先端部では、PD-L1/PD-1 シグナルにより腫瘍に対する免疫応答が抑制されている可能性が示唆された。CD25 は活性化 T 細胞、活性化 B 細胞、樹状細胞および骨髄性細胞でも発現が認められ、特異的ではないものの活性化 T 細胞の有用なマーカーとして広く用いられている (72)。その一方、CD25 は腫瘍に対する宿主の免疫応答を抑制するとされている制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) のマーカーの 1 つとしても用いられており、CD25 の発現と Treg との関連性についても、今後さらなる検討が必要であると考えられた (73、74)。

次に、OSCC 患者の予後と PD-L1/PD-1 の発現様式との関連について検索したところ、PD-L1 陽性群は陰性群と比較して生存率が有意に低かった。一方、PD-1

高発現群と低発現群との間では、生存率に統計学的有意差は認められなかった。さらに、PD-L1/PD-1 の発現様式で分類したところ、PD-L1/PD-1 高発現群である C 群は、低発現群の A 群と比較して有意に生存率が低く、不幸な転帰を辿る症例が多かった。これらの結果より、PD-L1/PD-1 の高発現が OSCC 患者の予後予測に有用であるとともに、浸潤先端部周囲間質中の PD-1 の発現よりも、腫瘍細胞における PD-L1 の発現の有無が患者予後により強く関連することが示唆された。Lin らは、喫煙者もしくは男性 OSCC 患者においてではあるが、腫瘍細胞における PD-L1 の高発現が患者の予後不良と相関すると報告しており、われわれの結果と類似していた (66)。一方、Cho らは、PD-L1 低発現群と比較して高発現群は生存率が低いものの有意差は認められなかったと報告しており、Ukpo らの中咽頭癌に関する報告においても、PD-L1 発現と全生存率および疾患特異的生存率に関連は認められなかったとしている (67, 68)。このように、PD-L1/PD-1 の発現と予後との関連についての異なる結果は、頭頸部癌だけでなく他の固形癌においても散見され、腫瘍の多様性や使用する抗体の相違、および評価基準に統一性がないことが要因と考えられる。このディスクレパンシーを解消するためには、PD-L1/PD-1 の発現に関する染色法および評価法を統一するとともに、より大規模な研究が必要であると考えられる。

実験 2 では、5 種類の OSCC 細胞株を用いて、*PD-L1* の発現、および rhPD-1 が OSCC の増殖、遊走能および浸潤能に及ぼす影響について解析を行った。まず、*PD-L1* の発現を検索したところ、全ての OSCC 細胞株において発現を認め、特に SAS 細胞および HSC-3 細胞において強く発現していた。最近の研究では、Toll-like receptor (TLR) や interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) が関与する経路の活性化により

PD-L1 の発現が上昇することが示唆されている (75-77)。中でも、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt 経路を抑制的に制御している phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) の抑制が PD-L1 の発現上昇に関与していることが種々のがんにおいて報告されている (78-80)。また、INF- $\gamma$  は癌細胞周囲の炎症性細胞から分泌されており、微小環境下での癌細胞とその周囲の炎症性細胞との相互作用により PD-L1 の発現が制御されている可能性も考えられる。

さらに興味深いことに、本研究において高転移能を有する SQUU-B 細胞は PD-L1 を発現しているものの、他の細胞株と比較すると発現量が少なかった。Tsushima からも OSCC 高転移株 HSC-4 における PD-L1 の発現は、低転移株 HSC-3 よりも弱かったと報告しており、本研究の結果と同様であった (81)。我々のこれまでの研究により、SQUU-B 細胞は、癌細胞の浸潤・転移に重要な上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が誘導された細胞形質を有していることが分かっている (82-86)。癌が転移を起こすメカニズムとして、①EMT による高転移能の獲得によるもの、または②PD-L1/PD-1 シグナルを利用した宿主の免疫監視機構からの逃避によるもの等が考えられるが、EMT 形質を有する高転移株 SQUU-B 細胞では PD-L1 の発現が低いことから、一見すると①と②は全く異なるメカニズムのように思われる。だが、これらが一連の流れの中で起きている可能性も否定できない。すなわち、PD-L1 が膜貫通型タンパクであり、細胞内ドメインを有していることから、PD-1 からのシグナルが PD-L1 を発現している癌細胞に伝達することにより EMT が誘導され、その結果として PD-L1 の発現減弱が生じている可能性がある。そこで本研究では、rhPD-1 を用い、PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞の増殖、遊走能、および浸潤能に与える



影響について、さらに解析を行った。

まず、OSCC 細胞株の増殖に関して検討を行ったところ、*PD-L1* の発現が強かった SAS 細胞および HSC-3 細胞において、rhPD-1 の濃度依存的に細胞増殖率が増加した。Tsushima ら (81) は、マウス OSCC 細胞株 NR-S1 に INF- $\gamma$  を作用させ、PD-L1 を高発現させた細胞株を異所性移植すると、PD-L1 高発現株では低発現株と比較して有意に腫瘍径の増大を認めたと報告しており、われわれの結果を裏付けるものであった。

次に、rhPD-1 添加による OSCC 細胞株の遊走能および浸潤能への影響に関して、*PD-L1* の発現が強かった SAS 細胞を用いて検討した。その結果、rhPD-1 の濃度依存的に遊走細胞数および浸潤細胞率の有意な増加を認めた。また、rhPD-1 1.0 ug/ml 添加とともに抗 PD-L1 抗体を添加したところ、上記の効果が減弱した。このことから、PD-1 からのシグナルが OSCC 細胞の遊走能および浸潤能の亢進に関与している可能性が示された。

本研究により、PD-L1/PD-1 シグナルは、宿主の免疫監視機構からの逃避のみならず、OSCC の増殖、遊走、および浸潤にも関与し、癌の進展に寄与していることが明らかとなった。しかしながら、PD-L1/PD-1 シグナルがどのような分子メカニズムによって OSCC の増殖・浸潤・転移に関わっているかについては不明な点が多い。また、最近の研究では、PD-L1 を過剰発現させたヒト正常上皮細胞において、E-cadherin の発現減弱と EMT 関連転写因子 Twist および Slug の発現上昇を認めたことが示されている (87、88)。今後、PD-L1/PD-1 シグナルと OSCC の増殖・浸潤・転移との関連を明らかにするためには、EMT の分子機構を含めたさらなる詳細な解析が必要であると推察される。さらに、これらの

解析により、PD-L1/PD-1 シグナルによる OSCC の進展のメカニズムが明らかになった暁には、抗 PD-L1 抗体や抗 PD-1 抗体を用いた OSCC に対する腫瘍免疫療法が臨床応用され、新規治療薬として患者の予後をさらに向上させる一助となり得るものと考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、このような研究の機会を与えて頂きましたとともに終始御懇篤なる御指導を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野 中村誠司 教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導、御校閲を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野 川野真太郎 講師に深謝致します。また、常に研究の協力ならびに励ましの言葉を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の教室員の皆様に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

1. Japan Society for Head and Neck Cancer Registry Committee: Report of Head and neck cancer registry of Japan: Clinical statistics of registered patients 2012. *Japanese Journal of Head and Neck Cancer* 40: 15-32, 2014.
2. Carvalho AL, Nishimoto IN, *et al*: Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 114: 806-16, 2005.
3. Warnakulasuriya S: Global epidemiology of oral oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45: 309-16, 2009.
4. Gorsky M, Epstein JB, *et al*: Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98(5): 546-52, 2004.
5. Jan JC, Hsu WH, Liu SA, *et al*: Prognostic factors in patients with buccal squamous cell carcinoma: 10-year experience. *J Oral Maxillofac Surg* 69(2): 396-404, 2011.
6. Sasaki M, Aoki T, *et al*: Postoperative follow-up strategy in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 69(6): e105-11, 2011.
7. Pignon JP, Bourhis J, *et al*: Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 355(9208): 949-55, 2000.
8. Bernier J, Dommenege C, *et al*: Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350(19):1945-52, 2004.
9. Winkvist E, Oliver T, *et al*: Postoperative chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review with

- meta-analysis. *Head Neck* 29(1):38-46, 2007.
10. Cooper JS, Pajak TF, *et al*: Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350(19):1937-44, 2004.
  11. Burnet MF: The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27, 1970.
  12. Dunn GP, Bruce AT, *et al*: Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11): 991-8, 2002.
  13. Brunet JF, Denizot F, *et al*: A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature* 328: 267-70, 1987.
  14. Krummel MF, Allison JP: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182(2): 459-65, 1995.
  15. Leach DR, Krummel MF, *et al*: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271: 1734-6, 1996.
  16. Thompson CB, Allison JP: The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7: 445-50, 1997.
  17. Hodi FS, O'Day SJ, *et al*: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Eng J Med* 363(8): 711-23, 2010.
  18. Ishida Y, Agata Y, *et al*: Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11(11): 3887-95, 1992.
  19. Keir ME, Butte MJ, *et al*: PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704, 2008.
  20. Freeman GJ, Long AJ, *et al*: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192: 1027-34, 2000.

21. Dong H, Zhu G, *et al*: B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5: 1365-9, 1999.
22. Latchman Y, Wood CR, *et al*: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2: 261-8, 2001.
23. Tseng SY, Otsuji M, *et al*: B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193: 839-46, 2001.
24. Dong H, Strome SE, *et al*: Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8: 793-800, 2002.
25. Yamazaki T, Akiba H, *et al*: Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169: 5538-45, 2002.
26. Liang L, Sha WC: The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses. *Curr Opin Immunol* 14: 384-90, 2002.
27. Lanzavecchia A, Sallusto F: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263-6, 2001.
28. Keir ME, Freeman GJ, *et al*: PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol* 179(8): 5064-70, 2007.
29. Heath WR, Belz GT, *et al*: Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199: 9-26, 2004.
30. Greenwald RJ, Freeman GJ, *et al*: The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23: 515-48, 2005.
31. Iwai Y, Ishida M, *et al*: Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(19): 12293-7, 2002.
32. Okazaki T, Honjo T: PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 19(7): 813-24, 2007.

33. Benedet JL, Bender H, *et al*: FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 70:209-62, 2000.
34. Clemente CG, Mihm MC Jr, *et al*: Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77: 1303-10, 1996.
35. Jass JR: Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 39: 585-9, 1986.
36. Naito Y, Saito K, *et al*: CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58:3491-4, 1998.
37. Schumacher K, Haensch W, *et al*: Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 61:3932-6, 2001.
38. Nakano O, Sato M, *et al*: Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61: 5132-6, 2001.
39. Wintterle S, Schreiner B, *et al*: Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 63: 7462-7, 2003.
40. Konishi J, Yamazaki K, *et al*: B7-H1 expression on non-small cell lung cancers and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 10: 5094-100, 2004
41. Thompson RH, Gillett MD, *et al*: Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17174-9, 2004.
42. Hamanishi J, Mandai M, *et al*: Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian

- cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(9): 3360-5, 2007.
43. Calabro L, Morra A, *et al*: Efficacy and safety of an intensified schedule of tremelimumab for chemotherapy-resistant malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Respir Med* 3(4): 301-9, 2015.
  44. Topalian SL, Hodi FS, *et al*: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366(26): 2443-54, 2012.
  45. Brahmer JR, Drake CG, *et al*: Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28(19): 3167-75, 2010.
  46. Brahmer JR, Tykodi SS, *et al*: Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26): 2455-65, 2012.
  47. Wolchok JD, Kluger H, *et al*: Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369(2): 122-33, 2013.
  48. Hamid O, Robert C, *et al*: Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369(2): 134-44, 2013.
  49. Powles T, Eder JP, *et al*: MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515(7528): 558-62, 2014.
  50. Ruishu D, Kaniel C, *et al*: B7H1/CD80 Interaction Augments PD-1-Dependent T Cell Apoptosis and Ameliorates Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol* 194: 560-74, 2015.
  51. Kuipers H, Muskens F, *et al*: Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Eur J Immunol* 36(9): 2472-82, 2006.
  52. Sobin LH: TNM Classification of Malignant Tumors. Wiley-Liss, Inc 2002.
  53. Yamamoto E, Kohama G, *et al*: Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and



- clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51(12): 2175-80, 1983.
54. Anneroth G, Batsakis J, *et al*: Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 95: 229-49, 1987.
55. Kawano S, Zheng YQ, *et al*: Clinicopathological evaluation of preoperative chemoradiotherapy with S-1 for locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*: In press.
56. Sihver W, Pietzsch J, *et al*: Radiolabeled cetuximab conjugates for EGFR targeted cancer diagnostics and therapy. *Pharmaceuticals* 7: 311-38, 2014.
57. Olayioye MA, Neve RM, *et al*: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19: 3159-67, 2000.
58. de Bono JS, Rowinsky EK: The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med* 8: S19-26, 2002.
59. Carpenter G: Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 56: 881-914, 1987.
60. Salomon DS, Brandt R, *et al*: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232, 1995.
61. Wells A: EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 637-43, 1999.
62. Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37: S3-8, 2001.
63. Wikstrand CJ, Hale LP, *et al*: Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 55: 3140-8, 1995.
64. Herbst RS, Langer CJ: Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and

- neck cancers. *Semin Oncol* 29: 27-36, 2002.
65. Chen J, Feng Y, *et al*: Interferon-gamma-induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway. *Immunobiology* 217: 385–93, 2012.
66. Lin YM, Sung WW, *et al*: High PD-L1 expression correlates with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PloS One* 10(11): e0142656, 2015.
67. Cho YA, Yoon HJ, *et al*. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 47:1148-53, 2011.
68. Ukpo OC, Thorstad WL, *et al*: B7-H1 expression model for immune evasion in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 7(2): 113-21, 2013.
69. Ritprajak P, Azuma M: Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 51: 221-8 (2015).
70. Badoual C, Hans S, *et al*: PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are favorable prognostic biomarker in HPV-associated head & neck cancer. *Cancer Res* 73(1): 128-38, 2013.
71. Hsu MC, Hsiao JR, *et al*: Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol* 10: 1393-403, 2010.
72. Poulton TA, Gallagher A, *et al*: Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation. *Immunology* 64: 419-25, 1988.
73. Hori S, Nomura T, *et al*: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 (5609): 1057–61, 2003.
74. Shimizu J, Yamazaki S, *et al*: Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>

- CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163: 5211-8, 1999.
75. Liu J, Hamrouni A, *et al*: Plasma cells from multiple myeloma patients express B7–H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110: 296-304, 2007.
76. Qian Y, Deng J, *et al*: TLR4 signaling induces B7–H1 expression through MAPK pathways in bladder cancer cells. *Cancer Invest* 26: 816-21, 2008.
77. Ghebeh H, Tulbah A, *et al*: Expression of B7–H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int J Cancer* 121: 751-8, 2007.
78. Parsa AT, Waldron JS, *et al*: Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7–H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 13: 84-8, 2007.
79. Zhu J, Chen L, *et al*: MiR-20b, -21, and -130b inhibit PTEN expression resulting in B7–H1 over-expression in advanced colorectal cancer. *Hum Immunol* 75: 348-53, 2014.
80. Suzuki A, Itami S, *et al*: Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res* 63: 674-81, 2003.
81. Tsushima F, Tanaka K, *et al*: Predominant expression of B7–H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42: 268-74, 2006.
82. Morifuji M, Taniguchi S, *et al*: Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability. *Am J Pathol* 156: 1317-26, 2000.
83. Matsubara R, Kawano S, *et al*: Increased  $\Delta$ Np63 expression is predictive of malignant transformation in oral epithelial dysplasia and poor prognosis in oral

- squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 39(6): 1391-9, 2011.
84. Goto Y, Kawano S, *et al*: Possible involvement of  $\Delta$ Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype. *Clin Exp Metastasis* 31(3): 293-306, 2014.
85. Tanaka H, Toyoshima T, *et al*: Apoptotic function of tumor-associated antigen RCAS1 in oral squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 12: 112, 2014.
86. Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, *et al*: The SQUU-B cell line spreads its metastatic properties to nonmetastatic clone SQUU-A from the same patient through exosomes. *J Oral Biosci*: In press.
87. Bolos V, Peinado H, *et al*: The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116: 499–511, 2003.
88. Kang Y, Massague J: Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118: 277-9, 2004.