

頭頸部扁平上皮癌における  
血清抗 p53 抗体および血清 PD-L1 の  
血清バイオマーカーとしての有用性の検討

ひろかわ しょうたろう  
廣川 祥太郎

(耳鼻咽喉科学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

## 目 次

第 1 章 緒言	
1.1 研究の背景と意義	1 頁
1.2 研究目的	3 頁
第 2 章 口腔咽頭癌患者における血清抗 p53 抗体の意義に関する検討	
2.1 背景	4 頁
2.2 方法	5 頁
2.3 結果	7 頁
2.4 考察	11 頁
2.5 小括	15 頁
第 3 章 頭頸部扁平上皮癌の診断および予後バイオマーカーとしての血清 PD-L1 の意義に関する検討	
3.1 背景	16 頁
3.2 方法	17 頁
3.3 結果	21 頁
3.4 考察	25 頁
3.5 小括	30 頁
第 4 章 総括	31 頁
第 5 章 謝辞	32 頁
引用文献	33 頁
図表	42 頁

## 第1章 緒言

### 1.1 研究の背景と意義

頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC) は頭頸部領域に発生する悪性腫瘍の 90%以上を占め [1, 2]、長期的な飲酒・喫煙などの刺激による遺伝子異常を原因とする古典的 HNSCC と特定ウイルスの慢性持続感染による細胞不死化を原因とするウイルス関連 HNSCC に大別される。ウイルス関連 HNSCC のうち、中咽頭癌の一部はヒトパピローマウイルス (HPV) の粘膜持続感染を原因とする HPV 関連中咽頭癌であり、上咽頭癌はその大半がエプスタインバーウイルス (EBV) の感染が原因とされる。早期 HNSCC は経口的部分切除、放射線治療などの臓器温存・低侵襲治療で制御可能であるが、症状に乏しく発見が困難であるのが問題である。それに対して進行期 HNSCC は高度進行、転移例の予後は極めて不良であり、根治には手術・化学療法・放射線治療を組み合わせた高侵襲な集学的治療を要することから治療関連有害事象や後遺障害のため QOL が著しく障害される。そのため HNSCC 治療には根治性と機能温存のバランスを保った治療が必要であると同時に予後向上には早期発見・早期診断が重要であるため、精度やコスト面で優れた検査ツールの開発が必要である。

HNSCC 診断に用いられる検査として、咽喉頭内視鏡検査、画像検査 (CT、MRI、PET-CT)、血清腫瘍マーカーなどが臨床応用されている。咽喉頭内視鏡検査は頭頸部外科の外来診療においても広く普及している検査であり、近年では高解像度のリアルタイム画像および狭帯域光観察による高精度診断を用いることが可能で、早期表在性病変スクリーニングには最も有用性の高い検査である。しかし、内視鏡先端が粘膜に接触すると咽頭反射を惹起しやすいことから、

解剖学的に複雑な咽喉頭における腫瘍性病変の評価には一定の技術を要するのに加え、消化管内視鏡検査と比較すると操作性、画像解像度、光学的性能に劣るのが課題である。CT、MRI、PET-CT等の画像検査は、比較的簡便に評価が可能であり組み合わせることで病変局在診断、周囲臓器浸潤や遠隔転移の評価に適した検査である。しかし、粘膜表層に限局した早期表在性病変は診断不能であり、放射線被曝や高コストといった問題のため頻繁には評価できないことが欠点である。血清腫瘍マーカーは様々な悪性腫瘍において利用される検査であり、内視鏡検査や画像検査と比較すると採血のみで評価が可能であることから低侵襲、低コストであることが利点である [3]。しかし、従来から HNSCC に対して臨床応用されている血清腫瘍マーカーである SCC 抗原 (squamous cell antigen: SCC-Ag) や CYFRA21-1 (cytokeratin 19 fragment) は腫瘍から放出される抗原自体を血液中で検出するものであり、腫瘍量に比例して増加する傾向があるため、早期診断には十分な効力を発揮しない [4]。また、健常人でもしばしば上昇を認めて偽陽性が多くなることが問題である。

これらの問題を解決するため今回、HNSCC の診断や予後予測に応用可能な新たな血清バイオマーカーを検討することとした。次世代の血清バイオマーカーに求められる条件は、より腫瘍特異的な生体内物質で病状や治療効果を鋭敏に反映し、腫瘍量に依存せず早期病変でも高い精度で検出され予後や治療効果の予測が可能かつ短時間での検査可能な項目であると考えた。腫瘍特異的物質として、まず食道癌などの領域において診断、予後バイオマーカーとして既に応用されている変異型 p53 蛋白に対する自己抗体である血清抗 p53 抗体に注目した。また近年、がん免疫研究において注目されている免疫チェックポイント分子である PD-L1 が血清中でも検出され、バイオマーカーとして利用できる可能性があることに着目した。

## 1.2 研究目的

本研究の目的は、実際の HNSCC 患者の血液を解析することで、HNSCC 診療に有用性が高い可能性のある血清バイオマーカーの意義を検討することである。今回、候補となるマーカーとして①血清抗 p53 抗体、および②血清 PD-L1 の 2 項目について検討を行った。

## 第2章 口腔咽頭癌患者における血清抗 p53 抗体の意義に関する検討

### 2.1 背景

*TP53* 遺伝子は最も有名ながん抑制遺伝子のひとつであり、様々な悪性腫瘍において高頻度で変異を認める。HNSCC における *TP53* 遺伝子変異率は高く、腫瘍の悪性度や予後との関連が報告されている [5]。正常組織では p53 蛋白発現は適切に制御され自己免疫反応は生じないが、腫瘍では *TP53* 遺伝子変異により細胞質に変異型 p53 蛋白が過剰に蓄積する。その一部は MHC class I 分子上で抗原として提示され、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によって認識される。あるいは腫瘍細胞のアポトーシス・ネクローシスによって細胞外へ放出された変異型 p53 蛋白が樹状細胞に捕捉されて Th1、Th2 細胞へと抗原提示されるなどの経路で、変異型 p53 蛋白に対する IgG 自己抗体が誘導される。これは血清抗 p53 抗体 (s-p53-Ab) として多くの悪性腫瘍患者において血中で検出され [6-16]、食道癌・大腸癌・乳癌に対する腫瘍マーカーとして本邦で保険収載されている。特に食道癌においては早期病変から高い陽性率を示すことが知られており、早期診断と予後予測の両方に有用であることが示されている。前述のとおり古典的 HNSCC は長期間の飲酒や喫煙刺激が誘因でかつ *TP53* 遺伝子変異率が高いことから、食道癌と疾患背景、発癌機序が近似している。そのため、HNSCC においてもバイオマーカーとして s-p53-Ab が有用である可能性が考えられる。

また近年 HNSCC の中でも HPV 関連中咽頭癌が増加傾向にあるが、本腫瘍は *TP53* 遺伝子変異とは直接関連せず、また古典的 HNSCC と比較して治療反応性や予後が良好であることから、近年の HNSCC の診断・治療方針には大きなインパクトを与えている。HNSCC における s-p53-Ab の意義を検討した研究はいくつか存在するが [17-19]、ウイルスに関連した部位や発癌機序に注目して s-

p53-Ab を検討した研究は存在しない。よって今回評価する血清バイオマーカーとして s-p53-Ab について検討を行った。

## 2.2 方法

### 2.2.1 倫理的承認

本研究はヘルシンキ宣言ならびに「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って実施され、防衛医科大学校倫理委員会によって承認された（承認番号 1170、4350）。すべての患者および対照者には本研究に参加するための書面によるインフォームドコンセントを提供し、同意を得た。

### 2.2.2 患者および対照

2012年2月から2014年8月にかけて、防衛医科大学校病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科で新たに口腔咽頭癌と診断された71人の患者が本研究に登録された。患者群には男性57人（80.3%）と女性14人（19.7%）が含まれ、年齢の中央値は66歳（範囲36-83歳）であった。腫瘍の原発部位は以下の通りであった：口腔癌11人、上咽頭癌3人、中咽頭癌16人、下咽頭癌37人、原発不明頭頸部癌4人。中咽頭癌についてはHPV関連癌であるp16陽性中咽頭癌は7人、HPV非関連癌であるp16陰性中咽頭癌は9人であった。すべての患者の疾患はUnion for International Cancer Control (UICC)によるがん病期分類第8版に従って分類され、診断時の臨床病期はI期6人、II期9人、III期13人、IV期43人であった。健常ボランティアおよび頭頸部良性疾患で当施設を受診した合計117人も対照として研究に含まれた。対照群には男性54人（46.2%）と女性63人（53.8%）が含まれ、年齢の中央値は64歳（範囲14~80歳）であった。対照群には健常人

ボランティア 34 人 (29.1%)、頭頸部良性腫瘍 21 人 (18.0%)、頭頸部炎症性疾患 23 人 (19.8%)、ベル麻痺、突発性難聴、メニエール病などその他の良性疾患 39 人 (33.3%) が含まれた。患者群、対照群ともに、5 年以内の悪性疾患既往歴のある人および 12 か月以内に輸血、放射線療法、または化学療法を受けた人は除外された。

喫煙歴と飲酒歴は質問紙を用いて聴取し、喫煙量は pack year = ([1 日あたりの喫煙箱数]×[喫煙年数]) を用いて評価した。厚生労働省が示す日本人において適切なアルコール消費量はビール中ビン 1 本または日本酒 1 合に相当する約 20 g/日であることから、1 日あたりのアルコール平均消費量を聴取した飲酒習慣から計算し、20 g/日以上を飲酒量のカットオフ値とした。

### 2.2.3 血清 p53 抗体およびその他のバイオマーカーの血液試料分析

対象者から書面によるインフォームドコンセントを得た後、生化学検査用真空採血管を用いて約 5 mL の血液を採取した。続いて得られた試料を 5000 rpm で 5 分間遠心分離したのちに血清を収集し、アッセイを実施するまで-80°Cで保存した。s-p53-Ab の力価は、酵素免疫測定法 (ELISA; MESACUP anti-p53 Test; Medical and Biological Laboratories、名古屋、日本) を製造元のプロトコルに従って使用して評価した。キットの説明に従い、以降の分析では 1.3 U/mL のカットオフ値を使用した。

また、臨床使用されている従来の HNSCC 腫瘍マーカーである扁平上皮癌抗原 (SCC-Ag) とサイトケラチン 19 フラグメント (CYFRA21-1) について、対象の同じ血液サンプルから測定を行った。血清 SCC-Ag 濃度は、自動化学発光イムノアッセイアナライザー (ARCHITECT i2000;アボットジャパン、東京、日本) を使用して測定した。血清 CYFRA21-1 濃度は、完全自動化学発光イムノア



ッセイシステム (Lumipulse Presto; FUJIREBIO、東京、日本) を使用して評価した。71 人の患者のうち、SCC-Ag は 61 人の患者で分析され、CYFRA21-1 は 59 人の患者で分析された。対照群では 117 人すべてにおいて両方のマーカーが分析された。SCC-Ag と CYFRA21-1 のカットオフ値はそれぞれ当施設における基準である 1.5 ng/mL、3.5 ng/mL を用いた。

#### 2.2.4 統計解析

各バイオマーカーの測定値分布の比較にはマンホイットニーU 検定を使用した。2 群間の関連の検討にはピアソンのカイ二乗検定またはフィッシャーの直接確率検定を用いた。患者の全生存率 (overall survival rate: OS) と無再発生存率 (relapse-free survival rate: RFS) は、カプランマイヤー法を使用して計算し、2 群間の差はログランク検定を用いて比較した。統計分析は、JMP 統計パッケージバージョン 14 (SAS Institute、Cary、NC、USA) を使用した。統計解析は  $p < 0.05$  を統計学的に有意であると見なした。

### 2.3 結果

#### 2.3.1 全対象のバイオマーカー測定結果

患者群と対照群の特徴と各バイオマーカー測定結果を表 1 に示す。1.3 U/mL のカットオフ値を使用すると、患者群 71 人中 14 人 (19.7%) と対照群 117 人中 12 人 (10.3%) が s-p53-Ab 陽性であった (表 1 A)。s-p53-Ab の精度に関連する指標は、感度 19.7% (14/71)、特異度 89.7% (105/117)、偽陽性 10.3% (12/117)、偽陰性 80.3% (57/71)、陽性予測値 53.8% (14/26)、陰性予測値 64.8% (105/162) であった。SCC-Ag は、患者群 61 人中 22 人 (36.1%) および対照群 117 人中 25

人 (21.4%) で陽性であった (表 1 B)。SCC-Ag の精度に関連する指標は、感度 36.1% (22/61)、特異度 78.6% (92/117)、偽陽性 21.4% (25/117)、偽陰性 63.9% (39/61)、陽性予測値 46.8% (22/47)、陰性予測値 70.2% (92/131) であった。CYFRA21-1 は、患者群 59 人中 9 人 (15.2%) および対照群 117 人中 8 人 (6.8%) で陽性であった (表 1 C)。CYFRA21-1 の精度に関連する指標は、感度 15.2% (9/59)、特異度 93.2% (109/117)、偽陽性 6.8% (8/117)、偽陰性 84.8% (50/59)、陽性予測値 52.9% (9/17)、陰性予測値 68.6% (109/159) であった。

患者群と対照群の特徴と各バイオマーカー結果の関連を表 2 に示す。患者群において原発腫瘍部位別では、p16 陰性中咽頭癌 (9 人中 3 人、33.3%) および下咽頭癌 (37 人中 9 人、24.3%) が s-p53-Ab の陽性率が高く、次いで原発不明頭頸部癌 (4 人中 1 人、25.0%)、口腔癌 (11 人中 1 人、9.1%) の順であった。対照的に、上咽頭癌 (n = 3) および p16 陽性中咽頭癌 (n = 7) の患者は、すべて s-p53-Ab 陰性であった。発癌メカニズムの違いから、上咽頭癌と p16 陽性中咽頭癌を「ウイルス関連咽頭癌」に分類し、その他を「ウイルス非関連口腔咽頭癌」に分類した。ウイルス関連咽頭癌 (0%、10 人中 0 人) に比べ、ウイルス非関連口腔咽頭癌の s-p53-Ab 陽性率は 23.0% (61 人中 14 人) でより高い傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった ( $p=0.094$ )。SCC-Ag と CYFRA21-1 は、口腔癌を除くすべての原発部位で陽性患者を認めた。年齢、性別、喫煙量または飲酒量による s-p53-Ab 陽性率に有意差は認めなかったが、s-p53-Ab 陽性率はリンパ節転移陽性患者よりも N0 患者でより高い傾向にあった ( $p=0.070$ )。SCC-Ag、CYFRA21-1 は、ウイルス関連の有無、年齢、性別、喫煙量、飲酒量、T 分類、N 分類、臨床病期いずれとも相関を示さなかった (表 2)。対照群については SCC-Ag 陽性者が女性に比べ男性で有意に高率 (37.0%, 20/54 vs. 7.9%, 5/63) であった ( $p<0.001$ ) (表 2)。

### 2.3.2 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者における血清抗 p53 抗体の診断精度における意義

対照群 117 人とウイルス非関連口腔咽頭癌の 61 人の患者を合わせた 178 人で s-p53-Ab の診断精度を検討した (表 3)。s-p53-Ab の感度は 23.0% (14/61) であり、患者群での陽性率は対照群の 10.3% (12/117) に比べて有意に高かった ( $p = 0.027$ )。同様に、52 人の患者に対して測定された SCC-Ag および 50 人の患者に対して測定された CYFRA21-1 の陽性率は、対照群よりも患者群の方が高い傾向があったが、統計学的有意差は認めなかった (各  $p = 0.085$ 、 $p = 0.149$ ) (表 3 A-C)。さらに診断における各バイオマーカーの組み合わせの有用性を評価した (表 3 D-G)。いずれか二つのバイオマーカーがカットオフ値を超えた場合を陽性とした場合、s-p53-Ab と SCC-Ag の組み合わせが最も高い感度を示し (51.9%、 $p = 0.009$ )、従来のマーカーである SCC-Ag と CYFRA21-1 の組み合わせも高い感度を示した (44.0%、 $p = 0.028$ ) (表 3 D, E)。s-p53-Ab と CYFRA21-1 の組み合わせは、感度は 34.0%であったが特異度は 82.1% (96/117) と比較的高い水準であった (表 3 F)。3 つのマーカーのいずれかが陽性の場合、感度は 60.0%、特異度は 65.8%であり、有意差を示した ( $p = 0.003$ ) (表 3 G)。

ウイルス非関連口腔咽頭癌において、T1-2 患者と T3-4 患者での各バイオマーカーの感度は以下のとおりであった。s-p53-Ab は、T1-2 患者で 28.0% (7/25)、T3-4 患者で 19.4% (7/36)、SCC-Ag は、T1-2 患者で 30.0% (6/20)、T3-4 患者で 37.5% (12/32)、CYFRA21-1 は、T1-2 患者で 10.0% (2/20)、T3-4 患者で 16.7% (5/30) であった。s-p53-Ab は T1-2 患者でより陽性率が高い傾向にあったが、他の 2 マーカーは T3-4 患者でより高率の傾向にあった (図 1 A)。また、N0 と N1-3 患者では、各バイオマーカーの感度は以下のとおりであった。s-p53-Ab は

各々37.5% (6/16) と 17.8% (8/45)、SCC-Ag は各々23.1% (3/13) と 38.5% (15/39)、CYFRA21-1 は各々8.3% (1/12) と 15.8% (6/38) であった (図 1 B)。Stage I-II と III-IV の患者では、各バイオマーカーの感度は次のとおりであった。s-p53-Ab は各々30.0% (3/10) と 21.6% (11/51)、SCC-Ag は各々14.3% (1/7) と 37.8% (17/45)、CYFRA21-1 は各々0% (0/7) と 16.3% (7/43) であった (図 1 C)。

s-p53-Ab は他のマーカーに比べて N0、Stage I-II といったより早期の患者でより高い陽性率を示す傾向があった。従来のバイオマーカーと組み合わせることで、ウイルス非関連癌における s-p53-Ab の診断有用性がさらに増した。

### 2.3.3 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者における生活リスク因子とバイオマーカーの関係

ウイルス非関連口腔咽頭癌患者 61 人において、s-p53-Ab 陽性率と HNSCC の生活リスク因子との関連を評価した (表 4)。一般的に悪性腫瘍の危険因子は 20 pack year 以上の喫煙量と考えられているが、s-p53-Ab 陽性率は 20 pack year 以上の患者では 25% (9/36)、20 pack year 未満の患者では 20% (5/25) で、2 群間に統計学的有意差は認めなかった ( $p = 0.762$ )。一方、s-p53-Ab 陽性率は 40 pack year 以上の患者で 40% (8/20)、40 pack year 未満の患者で 15% (6/41) であり、2 群の陽性率に有意差を認めた ( $p = 0.049$ )。20 g/日を基準としてアルコール摂取量による s-p53-Ab 陽性率を比較すると、飲酒量の多い患者は 16% (6/37)、飲酒量の少ない患者は 33% (8/24) で、統計学的に有意差は認めなかった。ただし喫煙量とは異なり、飲酒量が少ない患者は飲酒量が多い患者よりも s-p53-Ab 陽性率が高い傾向があった ( $p = 0.135$ )。SCC-Ag と CYFRA21-1 について、40 pack year の喫煙量 (各  $p = 0.367$ 、 $p = 0.775$ ) と 20 g/日の飲酒量 (各  $p = 0.666$ 、

$p = 1.00$ ) で、いずれも陽性率に有意差は認めなかった (データ示さず)。

### 2.3.4 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者の予後予測因子としての血清抗 p53 抗体の価値

今回検討したウイルス非関連口腔咽頭癌患者 61 人の中で、根治的治療を完了したのは病期 I-II の 10 人と病期 III-IV の 46 人、合わせて 56 人である。これらの根治的治療を完了した 56 人の全生存率 (OS) と無再発生存率 (RFS) について Kaplan-Meier 法を使用して s-p53-Ab と予後の関係を検討した (図 2)。s-p53-Ab 陽性の患者群と陰性の患者群の 5 年 OS はそれぞれ 61.5% と 77.4% であり、統計学的有意差は認めなかった ( $p = 0.413$ )。同じく RFS はそれぞれ 46.2% と 50.4% で、統計学的有意差は認めなかった ( $p = 0.701$ )。s-p53-Ab の存在と予後との間に相関は認めなかった。

## 2.4 考察

本研究では、口腔咽頭扁平上皮癌患者の血清抗 p53 抗体価を測定し、血清バイオマーカーとしての価値を検討した。s-p53-Ab の陽性率は、p16 陰性中咽頭癌および下咽頭癌患者で特に高く、進行癌のみならず早期癌においても高い陽性率を示した。今回の検討で s-p53-Ab が比較的簡便かつ患者への侵襲が少ない、新しい血清バイオマーカーとして使用できることが示された。

変異型 p53 蛋白に対する自己抗体は、乳癌患者で最初に報告された [16]。2000 年代以降さまざまな抗 p53 自己抗体測定 ELISA キットが市販されており、多くの癌腫において研究されている。HNSCC 患者の血清抗 p53 抗体を測定した他研究においては約 16-24.7% の陽性率と報告されているが [17-19]、本研究では

全患者における s-p53-Ab 陽性率は 19.7%であり、他家報告と同等であった。さらに本研究においては発癌機序における差に注目し、特にウイルス関連発癌腫瘍と非ウイルス関連発癌腫瘍の間で s-p53-Ab 陽性率が異なる傾向があることを見出した。

古典的頭頸部癌の発癌機序は、「field cancerization」と関連していることが知られている。この現象は、一般的な発がん性因子に長期間さらされると、複数の組織や臓器にさまざまな遺伝子変異やエピジェネティックな異常が蓄積し、高頻度に癌細胞に変化する領域（cancerized field）が発生し、複数の領域に複数の発癌を来すことを指す [20]。古典的頭頸部癌である口腔癌、p16 陰性中咽頭癌および下咽頭癌については、長期の喫煙およびアルコール曝露に伴う遺伝学的異常の蓄積により癌化することが知られており、TP53 遺伝子変異はこれらの腫瘍において最も高頻度に認められる遺伝学的異常である [21-24]。食道扁平上皮癌は古典的頭頸部癌と同様に喫煙とアルコール曝露が危険因子であるが、s-p53-Ab は特に食道扁平上皮癌において高い陽性率を示すことが知られている [25-27]。頭頸部領域と食道は解剖学的に連続する領域であると同時に、同様の疾患疫学的発がん性因子を持つ点で共通点が多い。本研究において喫煙量の多い患者の s-p53-Ab 陽性率が高いことも、上記の考察を裏付けている。

p16 陽性中咽頭癌の発癌機序の特徴は、粘膜基底層の上皮細胞における HPV の持続感染を原因とした E6・E7 タンパク質の過剰発現にある [28]。E6、E7 はそれぞれ TP53、RB といったがん抑制遺伝子に対して抑制性に働き、p53 経路を媒介したアポトーシス反応、不死化の促進、および癌の進行に必要なエピジェネティックおよび遺伝子変化の蓄積を引き起こす [29]。上咽頭癌は咽頭粘膜に持続感染した EBV によって引き起こされる。EBV にコードされた latent membrane protein 1 (LMP1)、LMP2A、EBV nuclear antigen 1 などのタンパク質

は、細胞内シグナル伝達経路の調節不全を引き起こすことで癌化を促進する [30, 31]。すなわち、これらウイルス関連癌の発癌メカニズムは細胞内の *TP53* 遺伝子変異とは独立している。なお、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 研究において HPV 関連癌では *TP53* 変異が少数であったことが証明されている [24]。したがって、理論上ウイルス関連咽頭癌患者では変異型 p53 タンパク質に対する自己抗体は産生されず、本研究はそれを裏付ける結果を示した。

口腔咽頭癌の中でも p16 陽性中咽頭癌については比較的良好な予後を示すことが報告されており、その診断は腫瘍細胞内で代理マーカーである p16 タンパク質を証明することで可能である。また上咽頭癌については、EBV-DNA および抗ウイルス性カプシド抗原-IgA (VCA-IgA) 抗体価の上昇が診断と治療に應用されている。しかし、ウイルス非関連口腔咽頭癌については特定のバイオマーカーはまだ開発されておらず、さらにこれらはウイルス関連癌と比較すると治療抵抗性で予後不良である。

我が国においては、HNSCC 患者に対して従来から臨床応用される腫瘍マーカーとして SCC-Ag および CYFRA21-1 が存在する。Travassos らのシステマティックレビューでは、HNSCC 患者の 20~78% がカットオフ値よりも高い血清 SCC-Ag 値を示したと報告している [32]。また Wang らは 13 の研究におけるメタアナリシスから CYFRA21-1 の感度は 51% (95%信頼区間[CI]: 0.48-0.54)、特異度は 97% (95%CI: 0.95-0.98) と報告した [33]。両マーカーは診断補助に應用可能であるが、スクリーニング検査として単体で使用できるほどの高い感度は示さないとと言える。今回の結果からは、s-p53-Ab がウイルス非関連口腔咽頭癌の 50~61 人の患者と対照者 117 人を含む検討で SCC-Ag または CYFRA21-1 と同等もしくはより高い感度と特異度を示し、その精度は従来マーカーよりも高い傾向を示した (表 3)。さらに、T1-2、N0、病期 I-II のより早期病変を有す

る患者において従来マーカーよりも高い感度を示した。したがって、s-p53-Abは進行期だけでなく早期のウイルス非関連口腔咽頭癌患者の診断マーカーとして応用できる可能性が示唆された。また従来マーカーとは機序が異なる自己免疫反応を利用した血清バイオマーカーであることから、従来のマーカーと組み合わせることでより高い精度を得ることが可能と考えられた。

HNSCCにおける *TP53* の予後的価値については多くの研究が行われてきたが、研究方法と患者層の特徴が不均一であるため、一定の結論は得られていない。HNSCC 組織における *TP53* 変異は、外科的治療後の生存率低下と関連することが示されている [5]。 *TP53* 変異は s-p53-Ab の出現と相関していることから、s-p53-Ab も治療予後に関連している可能性が予想される。大腸癌や乳癌では s-p53-Ab 陽性患者の予後は不良であるとする研究が存在する [11-12] 一方、食道扁平上皮癌では予後との関連はないことを示した研究も存在している [13]。食道癌患者 1487 人を対象とした多施設研究において Suzuki らは、カットオフとして 9.82 U/mL を使用すると、s-p53-Ab 高力価群は低力価群よりも有意に OS が悪化したと報告している [26]。また Shimada らは食道癌患者の s-p53-Ab の周術期変化を報告しており、s-p53-Ab 力価は一般に手術治療後に減少するが、陽性患者の中でも手術後に血清陽性が維持されていた患者は、抗体陰転化を示した患者よりも予後不良であったと述べている [34]。HNSCC 患者における予後バイオマーカーとしての s-p53-Ab の有用性を検討するには、抗体価の手術前後の変化、長期的変化を含めた大規模な前向き研究が必要であるが、今回解析可能であった検体はいずれも治療前に採取された血清のみであり、追加検討が困難であることが課題である。

本研究の問題点は患者の総数であり、頭頸部各部位毎におけるバイオマーカーの意義を個別に検討するには解析患者数が不十分であった。悪性腫瘍全体に



占める HNSCC の罹患率は低く、また頭頸部のさまざまな部分で発生するため、細分化が困難であるのは避けられない課題である。ただし総数が少ないにもかかわらず、腫瘍発生の学的視点から原発巣毎に s-p53-Ab 陽性率に違いがあることを示せたことが本研究の価値であると考えられる。本研究で s-p53-Ab の HNSCC 診断バイオマーカーとしての有用性が示唆されたが、大規模な多施設共同研究における検討を経て将来の臨床応用が期待される。

## 2.5 小括

口腔咽頭癌患者における s-p53-Ab を評価した結果、発癌機序を基とした原発部位によって s-p53-Ab 陽性率が異なる傾向を認めた。ウイルス非関連口腔咽頭癌患者と対照群を合わせた検討では、s-p53-Ab の診断精度は従来マーカーと同程度もしくはより高い感度および特異度を示した。s-p53-Ab は他のマーカーに比べ特に早期病変においてより高い感度を示す傾向があった。また従来バイオマーカーと組み合わせることで、ウイルス非関連口腔咽頭癌における診断有用性はより高まった。s-p53-Ab 測定は、ウイルス非関連頭頸部悪性腫瘍診断における血清バイオマーカーとして役立つ可能性がある。

### 第3章 頭頸部扁平上皮癌の診断および予後バイオマーカーとしての 血清 PD-L1 の意義に関する検討

#### 3.1 背景

近年の腫瘍免疫における知見の進歩により、腫瘍免疫回避のメカニズムが明らかになってきた。programmed death-1 (PD-1) 経路は、免疫回避メカニズムの1つとして知られている。PD-1は免疫細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体であり、腫瘍細胞に発現してPD-1のリガンドとして作用するPD-L1またはPD-L2と結合することにより細胞傷害性T細胞応答を阻害し、腫瘍細胞が宿主免疫検出を回避する原因となる。PD-1/PD-L1経路に注目して開発された治療薬である抗PD-1抗体を代表とした免疫チェックポイント阻害薬

(immune checkpoint inhibitor: ICI) は、さまざまな悪性腫瘍に対して高い抗腫瘍効果を示し、臨床試験において生存率の大幅な改善を示したことから [35]、急速に治療適応が拡大している。また悪性黒色腫、腎細胞癌、非小細胞肺癌などのさまざまな腫瘍において、腫瘍組織でのPD-L1の過剰発現が生存率の低下や抗PD-1抗体療法の治療効果に関連していることが報告されている [36]。近年、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) においても新たな治療法としてICIの治療効果が注目されている [37, 38]。腫瘍組織でのPD-L1過剰発現はHNSCCでも治療効果に影響を与えると考えられているが、実臨床におけるその重要性は未だ不明である [39, 40]。

PD-L1は主に腫瘍細胞の表面に発現しているが、血清中においても微量に検出され、血清PD-L1 (sPD-L1) と呼ばれる。複数の研究においてsPD-L1値が対照の健常者よりも悪性腫瘍患者で有意に高く [41]、腫瘍の悪性度や予後にも関連していることが報告されている [42-54]。しかしHNSCC患者においてsPD-

L1 を検討した報告はほとんど存在していない。本研究では HNSCC 患者における sPD-L1 の意義を評価し、新規バイオマーカーとして応用できるかどうかを検討した。

## 3.2 方法

### 3.2.1 倫理的承認

本研究はヘルシンキ宣言ならびに「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って実施され、防衛医科大学校の倫理委員会によって承認された（承認番号 1153、4320）。すべての患者および対照者には本研究に参加するための書面によるインフォームドコンセントを提供し、同意を得た。

### 3.2.2 患者とコントロール

2012 年 2 月から 2014 年 8 月にかけて、防衛医科大学校病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科で新規に HNSCC と診断された 96 人の患者が研究に登録された。HNSCC 患者には男性 78 人（81.3%）と女性 18 人（18.8%）が含まれ、年齢の中央値は 68 歳（範囲 50～92 歳）であった。原発部位別の患者数は口腔癌 11 人、喉頭癌 29 人、中咽頭癌 17 人、下咽頭癌 39 人であった。中咽頭癌については p16 陽性を示す HPV 関連中咽頭癌が 8 人、p16 陰性を示す HPV 非関連中咽頭癌が 9 人であった。すべての患者の疾患は UICC 病期分類第 8 版に従って分類され、診断時の臨床病期は I 期 20 人、II 期 15 人、III 期 16 人、IV 期 45 人であった。観察期間の中央値は 63.5 ヶ月（範囲 2～91 ヶ月）であった。

対照として、健康ボランティアまたは頭頸部良性疾患で受診した 122 人が研究に登録された。対照群には男性 56 人（45.9%）と女性 66 人（54.1%）が含ま

れ、年齢の中央値は 61.5 歳（範囲 21～80 歳）であった。対照群の内訳は 35 人が健康ボランティア（28.7%）、23 人が頭頸部良性腫瘍（18.9%）、19 人が頭頸部炎症性疾患（15.6%）、45 人が鼻出血、顔面神経麻痺、突発性難聴、メニエール病などの他の良性疾患（36.9%）であった。

5 年以内に他の悪性疾患の既往、研究前 12 か月間に輸血、放射線療法、または化学療法を受けた個人は除外された。

### 3.2.3 血清 PD-L1 の血液サンプル分析

書面によるインフォームドコンセントを得た後、研究参加者から血液試料を収集した。続いて、試料を 5000 rpm で 5 分間遠心分離した。血清を収集し、解析が行われるまで -80°C で凍結保存した。sPD-L1 値は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for PD-L1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を製造元のプロトコルに従って使用して評価した。本 ELISA キットは、マイクロプレートに固着させたヒト B7-H1 特異的モノクローナル抗体を使用した定量的サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術を使用している。手順は以下の通りに実施した。(i) 96 ウェルプレート、すべての試薬および試料を製造元の指示に従って調製した。(ii) 100  $\mu$ L の標準液と試料を各ウェルに加え、水平軌道マイクロプレートシェーカー上で室温で 2 時間インキュベートした。(iii) 4 回吸引および洗浄後、100  $\mu$ L の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加し、シェーカー上で室温で 2 時間インキュベートした。(iv) 吸引と洗浄を 4 回反復した。(v) 基質溶液を各ウェルに加え、遮光して室温で 30 分間インキュベートした。(vi) 停止溶液を各ウェルに加え、ウェルの色を青から黄色に変化するのを確認した。(vii) 450 nm に設定されたマイクロプレートリーダーを使用して、各ウェルの光学密度を測定し、波長補正を 570 nm に設定した。(viii) sPD-L1

濃度は、4パラメーターロジスティック（4-PL）曲線をコンピューターソフトウェアで生成して計算した。

### 3.2.4 血清バイオマーカー分析

血清 PD-L1 値との関連を評価するために炎症マーカーとして、C 反応性タンパク質（CRP）、アルブミン、白血球数、好中球分画の割合を一次治療前に測定した。カットオフ値は、CRP 値は 0.3 mg/dL、アルブミン値は 3.5 g/dL、白血球数は 8000 /mm<sup>3</sup>、好中球分画割合は 70%とした。

また本邦において従来から臨床利用される HNSCC 腫瘍マーカーである SCC-Ag と CYFRA 21-1 を同じ血液試料から測定した。血清 SCC-Ag 濃度は、自動化学発光イムノアッセイアナライザー（ARCHITECT i2000;アボットジャパン）を使用して測定した。血清 CYFRA21-1 濃度は、完全自動化学発光イムノアッセイシステム（Lumipulse Presto; FUJIREBIO）を使用して測定した。SCC-Ag と CYFRA21-1 のカットオフ値は当施設における基準からそれぞれ 1.5 ng/mL と 3.5 ng/mL とした。

### 3.2.5 免疫組織化学染色

腫瘍組織における PD-L1 発現と血清 PD-L1 値を比較するために、外科的切除標本における免疫組織化学染色（IHC）を実施した。標本を 15%ホルマリンで 48 時間以上固定し、パラフィン包埋組織ブロックを作製した。これらのパラフィンブロックから作製した厚さ 4 μm の腫瘍切片を脱パラフィン後、10 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 6.0）を用いて 95°C で 15 分間、抗原賦活化処理を実施した。メタノール含 3%過酸化水素中で 10 分間インキュベートすることで内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。一次抗体は、抗 PD-L1 ウサギモノクロ

ーナル抗体 (ab205921、clone 28-8、1 : 200 希釈、Abcam、UK) を使用した。スライドを一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートし、VECTASTAIN Elite ABC kit (PK-6101; Vector Laboratories、Burlingame、CA) および ImmPACT DAB (SK-4105; Vector Laboratories) を使用して特異的反応を検出した。続いて、核をヘマトキシリン 3G (#8656; Sakura Finetek、Tokyo、Japan) で対比染色した。陽性対照切片は過去に病理診断に用いられた遺残から作成した扁桃組織切片を用い、陰性対照切片は一次抗体の代わりにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) とともにインキュベートして作製した。

組織 PD-L1 の免疫反応性は反応性の強度に関わらず腫瘍内の陽性細胞の割合に応じて定量的にスコアリングし [55]、染色陽性率 (陽性に染色された腫瘍細胞/すべての腫瘍細胞) によって、0 (<1%)、1 ( $\geq 1\%$ , <10%)、2 ( $\geq 10\%$ , <50%)、および 3 ( $\geq 50\%$ ) の 4 つに分類した。

### 3.2.6 統計分析

マンホイットニーU検定を使用して各バイオマーカーの測定値の分布の有意差を決定した。独立性の検定にはカイ二乗検定またはフィッシャーの直接確率検定を使用した。診断予測のための sPD-L1 のカットオフ値は、Youden index (感度 + 特異度 - 1) を最大化する値として receiver operatorating characteristic curve (ROC 曲線) を使用して算出した。患者の全生存率 (OS) と無再発生存率 (RFS) は Kaplan-Meier 法を使用して計算した。グループ間の予後はログランク検定を使用して比較した。ハザード比の推定には Cox 比例ハザードモデルを使用した。統計分析は JMP 統計パッケージバージョン 14 (SAS Institute) を使用して実行し、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であると見なした。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 HNSCC 患者と対照群の臨床的特徴

96 人の HNSCC 患者の臨床的特徴と sPD-L1 測定の結果を表 5 に、122 人の対照者の臨床的特徴と sPD-L1 測定の結果を表 6 に示す。ただし、HNSCC 患者において CRP は 94 人、アルブミンは 95 人、SCC-Ag は 81 人、CYFRA21-1 は 79 人についてのみ計測され、対照者で白血球数、好中球分画は 65 人、CRP は 63 人、アルブミンは 60 人についてのみ計測された。HNSCC 患者では、年齢、性別、炎症マーカー、T 分類、N 分類、および臨床病期の各パラメーターのサブグループ間で sPD-L1 の中央値に差はなかったが、CYFRA21-1 のみ陽性群が陰性群に比べて sPD-L1 中央値がより高い値を示した ( $p = 0.027$ ) (表 5)。対照群では、sPD-L1 値中央値は 65 歳以上 ( $p = 0.007$ )、および CRP 高値 ( $p = 0.046$ ) の群が 65 歳未満、CRP 低値の群に比べて有意に高かった。性別または血液学的炎症マーカーと sPD-L1 値との関連は認めなかった。

#### 3.3.2 HNSCC 患者と対照群における血清 PD-L1 値の比較

HNSCC 患者と対照群の比較で、HNSCC 患者は有意に高い sPD-L1 値を示した (図 3 A;  $p = 0.043$ )。頭頸部悪性腫瘍の診断について、ROC 曲線における曲線下面積 (AUC) は 0.580 であり、Youden index から得られた sPD-L1 のカットオフ値は 60.48 pg/mL であった (図 3 B)。60.48 pg/mL のカットオフ値を使用すると、対照群の 32 人と HNSCC 患者の 46 人がカットオフ値以上の sPD-L1 値を示した。HNSCC 患者における sPD-L1 の感度、特異度、および陽性予測値は、それぞれ 47.9% (46/96)、73.8% (90/122)、および 59.0% (46/78) であった。sPD-L1 高値は対照群と比べて HNSCC 患者において統計学的に有意に高率で認

められた ( $p = 0.001$ ) (表 7 A)。さらに対照群において 65 歳以上の対照者は 65 歳未満の対照者と比較して有意に高い sPD-L1 値を示した ( $p = 0.007$ ) が、HNSCC 患者においては 65 歳で区切った 2 群間で sPD-L1 値に有意差は認めなかった ( $p = 0.216$ ) (図 3 C)。診断精度について年齢層を 65 歳で区切った結果、感度・特異度はそれぞれ、若年層では 45.9% (17/37)、87.0% (60/69)、高齢層では 49.2% (29/59)、56.6% (30/53) であった。対照群と比較した患者群での sPD-L1 高値の割合は、若年層で有意に高率であったが ( $p = 0.001$ )、高齢層では差が認められなかった ( $p = 0.574$ ) (表 7 B, C)。

カットオフ値 60.48 pg/mL とした場合の sPD-L1 と臨床的因子との関連について解析を行ったが、T 分類、N 分類、臨床病期における腫瘍進行度との関連は認めず、その他年齢、性別、炎症マーカー、従来マーカーのいずれの変数とも統計学的に有意な関連は認めなかった (表 8)。

このように、HNSCC 患者と対照群との比較で HNSCC 患者は有意に sPD-L1 高値を示した。60.48 pg/mL のカットオフ値を使用した場合、sPD-L1 陽性率は対照群に比べて患者群で 1.8 倍の高率で陽性であり (47.9% vs. 26.2%) (表 7)、特に 65 歳未満の若年層では対照群に比べて患者群で 3.5 倍の高率で陽性となり (45.9% vs. 13.0%)、sPD-L1 測定が癌診断に有用であると思われた。sPD-L1 値は HNSCC 腫瘍の進行との相関は認めなかった。

### 3.3.3 HNSCC 患者における血清 PD-L1 と予後との関連

今回検討した HNSCC 患者 96 人の中で、根治的治療を完了したのは病期 I-II の 35 人と病期 III-IV の 56 人、合わせて 91 人である。根治的治療を受けた 91 人の HNSCC 患者における sPD-L1 と全生存率 (OS) との関連を検討した (図 4)。残りの 5 人の患者は、他院へ転院して治療されたか、まもなく緩和ケア



に移行し十分な観察期間が得られなかったため除外された。60.48 pg/mL の sPD-L1 カットオフ値を使用した場合、OS に有意差は認めなかった (図 4 A;  $p = 0.467$ )。しかし、HNSCC 患者における sPD-L1 の 75 パーセンタイル値である 71.2 pg/mL をカットオフ値として使用すると、OS は sPD-L1 の高い群で低下する傾向があった (図 4 B、 $p = 0.098$ )。さらに、腫瘍の進行度毎の OS を検討すると (表 9)、sPD-L1 高値は T1-2 ( $p = 0.002$ 、ハザード比 6.34、95%信頼区間 1.68-23.9)、Stage I-III ( $p = 0.010$ 、ハザード比 4.85、95%信頼区間 1.29-18.3) といった比較的早期の HNSCC 患者において有意な生存率悪化との関連を認め、リンパ節転移のない N0 症例で生存率が悪化する傾向を認めた ( $p = 0.060$ 、ハザード比 3.86、95%信頼区間 0.85-17.5)。

同様に根治的治療を受けた 91 人の HNSCC 患者を対象に、sPD-L1 と無再発生存率 (RFS) との関連を検討した (表 9)。カットオフ値を 71.2 pg/mL とした場合、sPD-L1 高値の場合に RFS は低下する傾向を認めたが、有意差は認めなかった ( $p = 0.083$ )。腫瘍の進行度毎の RFS を検討すると、sPD-L1 高値は T1-2 ( $p = 0.048$ 、ハザード比 3.06、95%信頼区間 0.95-9.87)、N0 ( $p = 0.025$ 、ハザード比 3.59、95%信頼区間 1.08-11.9) の比較的早期の HNSCC 患者において有意な生存率悪化との関連を認め、Stage I-III 患者で生存率が悪化する傾向を認めた ( $p = 0.054$ 、ハザード比 2.82、95%信頼区間 0.93-8.52)。

なお、カットオフ値を 71.2 pg/mL に設定した場合の全患者 96 人における sPD-L1 による診断精度は、感度 25.0% (24/96)、特異度 88.5% (108/122)、陽性予測値 63.2% (24/38) であった。

比較的早期の HNSCC で sPD-L1 高値の患者は予後不良であることが示され、sPD-L1 が HNSCC の予後予測因子である可能性が示唆された。

### 3.3.4 Stage I-III の HNSCC 患者における予後関連因子の単変量解析

Stage I-III の HNSCC 患者 (n = 51) における予後に関連する臨床的因子について、単変量解析を実施した。OS については、性別、年齢、白血球数、CRP、T 分類、リンパ節転移の有無とは有意な関連を認めず (表 10)、カットオフ値を 71.2 pg/mL とした場合、sPD-L1 高値のみが生存率悪化に関連する有意な因子であった ( $p = 0.010$ 、ハザード比 4.85、95%信頼区間 1.29-18.3)。また RFS では、CYFRA21-1 高値のみが生存率悪化に関連する因子 ( $p = 0.001$ 、ハザード比 7.37、95%信頼区間 1.82-29.8) であり、sPD-L1 高値は生存率悪化に關与する傾向を認めた ( $p = 0.054$ 、ハザード比 2.82、95%信頼区間 0.93-8.52) が、他の因子による予後の差異は認めなかった。

### 3.3.5 血清 PD-L1 値と組織 PD-L1 発現の関係、および予後との関連

本研究に登録された症例のうち、外科的に切除された 60 病変について腫瘍切片における組織 PD-L1 の評価を行った (図 5)。組織 PD-L1 陽性を示す腫瘍細胞の割合に応じてスコア別に分類すると、スコア 0 は 26 例、スコア 1 は 13 例、スコア 2 は 10 例、スコア 3 は 11 例であった。各組織 PD-L1 スコアと sPD-L1 値の中央値と範囲は、スコア 0 群で 53.99 pg/mL (範囲 40.01-94.08)、スコア 1 群で 62.79 pg/mL (範囲 36.00-97.04)、スコア 2 群で 55.23 pg/mL (範囲 42.25-86.88)、スコア 3 群で 56.48 pg/mL (範囲 36.65-111.78) であった。組織 PD-L1 スコアと sPD-L1 値の間に有意な相関は認めなかった ( $p = 0.739$ )。

組織 PD-L1 と sPD-L1 の予後への影響を検討した。組織 PD-L1 はスコア 0-1 とスコア 2-3 で群分けし、sPD-L1 値は、71.2 pg/mL のカットオフ値によって群分けした。Stage I-III 症例 (n = 29) では、組織 PD-L1 スコアにおいては OS と RFS に有意差は認めなかったが ( $p = 0.760$ 、 $0.708$ )、sPD-L1 が高い症例では

OS が有意に悪化し ( $p = 0.034$ 、ハザード比 4.84、95%信頼区間 0.97-24.2)、RFS が低下する傾向を認めた ( $p = 0.066$ 、ハザード比 3.10、95%信頼区間 0.87-11.1) (表 1 1 A)。Stage IV 症例 ( $n = 31$ ) では、組織 PD-L1 スコアが高い症例で OS が低下する傾向が認められた ( $p = 0.068$ 、ハザード比 4.03、95%信頼区間 0.80-20.3) 一方で、OS、RFS と sPD-L1 値の間に有意な関連は認めなかった (各々  $p = 0.880$ 、 $0.699$ ) (表 1 1 B)。

組織 PD-L1 と sPD-L1 の間に相関関係は認めなかった。sPD-L1 高値はより早期病変の患者の予後不良と関連し、組織 PD-L1 高発現は進行期病変患者の予後不良との関連が示唆された。

### 3.4 考察

本研究では、HNSCC 患者の血清 PD-L1 値を測定し、HNSCC 患者における新しい血清バイオマーカーとしての価値を評価した。我々のデータは、sPD-L1 値が HNSCC 患者の悪性診断および予後と関連していることを示した。この研究は、HNSCC の診断と予後予測において sPD-L1 の測定が簡便かつ迅速に評価可能であり、臨床的有用性を期待できるバイオマーカーとなり得る可能性を実証した最初の報告である。

PD-L1 は一般的に T、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなどのさまざまな免疫細胞で発現し、IFN- $\gamma$  の刺激により活性化しアップレギュレートされる [56]。ヒト PD-L1 の高発現はさまざまな腫瘍細胞株の細胞膜や固形腫瘍組織において認められる [57-59]。可溶性 PD-L1 は主に膜結合型 PD-L1 からのタンパク質分解切断によって生成されると考えられているほか [60]、PD-L1 発現細胞から活発に放出される細胞外小胞にも由来すると推測されている [61]。癌患者

における sPD-L1 の正確な起源は未だ不明であるが、sPD-L1 は腫瘍自体と宿主免疫系の両方の因子に由来する可能性がある [62]。sPD-L1 が腫瘍の進行と関連しているかどうかは議論の余地があるが [63, 64]、本研究では sPD-L1 は組織 PD-L1 発現や腫瘍進行度とは関連を認めなかった。また健常対照者と比較して HNSCC 患者で有意に sPD-L1 値が上昇していることから sPD-L1 が早期病変から検出可能で、また組織 PD-L1 発現とは独立した HNSCC のバイオマーカーとしても有用であることを示している。

今回の検討結果から、比較的若年層の集団において sPD-L1 の診断精度が高いことが示された。Chen らは ELISA によって健康なドナーの血清中 sPD-L1 の発現レベルを検出し、年齢と sPD-L1 の間の正の相関を報告した [41]。今回のデータは Chen らの研究を裏付けており、65 歳以上の対照群における sPD-L1 値は 65 歳未満よりも有意に高いことが示された。しかし、HNSCC 患者においては年齢による sPD-L1 値の違いは認めなかった。sPD-L1 値の加齢による上昇は、加齢に伴う低酸素に対する反応性の違いに関連している可能性がある。閉塞性睡眠時無呼吸 (OSA) に関する研究 [65]において全身性生体内反応としての sPD-L1 の年齢性変化が報告されている。重度の OSA によって誘発される断続的な低酸素症は、健康な被験者と比較して低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factors: HIF)の発現を増加させ、その結果、単球で発現する PD-L1 の増強および sPD-L1 値の上昇につながる。しかし、この現象は基本的に 55 歳未満の患者で発生し、高齢の患者は低酸素状態に対する HIF の感受性が低下し、健康な被験者と比較して PD-L1 を増加させる能力も低いことが示されている。この他、高齢者における sPD-L1 高値について説明がされている文献は見つからず、今後の研究が必要と考えられる。我々の結果は癌患者という特殊な全身状態における sPD-L1 変化をみたものであり OSA と同様の機序が当てはまるかは不明であ

る。固形癌の腫瘍微小環境における低酸素状態は、癌の特徴として広く受け入れられている。腫瘍微小環境の主要な構成要素の一つである癌関連線維芽細胞（cancer-associated fibroblasts: CAF）は、低酸素状態において HIF を介した調節によって腫瘍の進行や転移、免疫回避に関与していることが知られている [66]。そのため、HIF 感受性の高い若年患者の少なくとも一部では CAF に関連した癌免疫応回避が腫瘍局所において亢進の結果として sPD-L1 値上昇が認められた可能性がある。

sPD-L1 は生物学的活性を示し、さまざまな癌において T 細胞機能を阻害することが示されているため、sPD-L1 高値は予後不良因子となる可能性がある。胃癌、肺癌、腎細胞癌を対象としたメタアナリシスでは、腫瘍組織における PD-L1 高発現が、患者予後不良と有意に関連することが示されている [67-69]。一方、HNSCC を対象としたメタアナリシスでは組織 PD-L1 高発現と HNSCC 患者予後との間に有意な関連は未だ示されていない [70, 71]。頭頸部領域悪性腫瘍患者の sPD-L1 においては、いくつかの報告において sPD-L1 高値と生存率の間に負の相関関係があることが示されている。Lu らは ELISA を用いて上咽頭癌（NPC）患者の 249 人で血漿中の sPD-L1 を測定し、NPC 患者は健康な対照と比較して有意に sPD-L1 高値を示し、sPD-L1 高値患者が予後不良であることを報告した [72]。同じく Aghajani らは ELISA を用いて甲状腺乳頭癌（PTC）患者 101 人で sPD-L1 を測定し、PTC 患者は健康な対照と比較して有意に sPD-L1 高値を示し、sPD-L1 高値患者が予後不良であることを示した [64]。今回の単変量解析の結果でも sPD-L1 値の上昇は、特に早期の HNSCC 患者の予後不良と関連していることが示された。一方で組織 PD-L1 の高発現については、進行期 HNSCC の患者でのみ予後不良と関連していたのは興味深い結果であった。予後における PD-L1 発現の病期毎に相反する結果は非小細胞肺癌において報告さ

れており [73]、非小細胞肺癌患者のうち病期 I 期では術後再発率は PD-L1 発現が低い患者よりも PD-L1 発現が高い患者で有意に低かったが、病期 II・III A 期では逆に PD-L1 発現が高い患者で再発率が高い傾向を認めた。すなわち早期病変では腫瘍での PD-L1 高発現は抗腫瘍免疫応答誘導の結果を反映しており、良好な予後に関与していると推測される。一方、局所進行性病変では PD-L1 高発現は免疫チェックポイント経路を通じた腫瘍免疫逃避の活性化を反映し、腫瘍再発に関与している可能性がある。我々の結果から考察すると sPD-L1 はそれと関連した T 細胞機能阻害による腫瘍免疫逃避活性化を早期病変の段階から反映しており、早期病変の sPD-L1 高値患者において予後不良であった可能性が考えられる。一方で進行癌患者では腫瘍自体の浸潤や転移が生存率低下に大きく寄与しており、組織 PD-L1 高発現腫瘍の存在によって腫瘍免疫逃避がより活性化され結果的に極めて予後不良であったと考えられる。HNSCC 患者において組織・血清 PD-L1 評価の使い分けが予後予測に応用可能であれば将来的には有用な予後マーカーとして使用できる可能性がある。

本研究の問題点は、治療後血清サンプルが十分に確保できず、治療前後とそれ以降の sPD-L1 値を比較することができなかったことである。sPD-L1 は腫瘍の状態だけでなく全身免疫を反映して変化する可能性があり、同一患者における長期的な変化を確認することで治療効果確認や病変再発スクリーニング、さらには抗腫瘍免疫機能の変化に伴う治療反応性の評価など、臨床応用に向けた幅広い意義の検討が可能になると考えられる。

本研究の将来的な目標は、sPD-L1 と ICI の治療効果との関連を評価し、その治療効果予測因子としての意義を検討することにある。ICI の治療効果は宿主の抗腫瘍免疫機能や腫瘍の免疫チェックポイント分子発現に左右され、一定数の患者は治療抵抗性を示すことが課題である。ICI の一つである pembrolizumab

の治療効果は、組織 PD-L1 高発現 HNSCC においてより有効であることが示され [38]、ICI 導入前に組織 PD-L1 発現を評価することが望ましいとされている。しかし、腫瘍微小環境の変化により組織 PD-L1 発現は動的に変化する可能性がある。組織 PD-L1 発現の経時的変化を評価することは、より厳密な治療効果予測を行うために望ましいことではあるが、患者への侵襲の大きさを考慮すると現実的には困難である。そのため、sPD-L1 が ICI の治療効果予測因子として有用であることが示されれば低侵襲かつ反復した経時的評価が可能な治療効果予測バイオマーカーとして大きな価値を持つことが期待される。HNSCC に対する ICI は適応拡大されてまだ日が浅いため十分な評価は困難だが、本研究に参加した 96 人の HNSCC 患者のうち一人の患者が観察期間中に ICI 投与を受けていたため、参考として治療経過を提示する。この患者では下咽頭癌 T4aN2b Stage IVA に対する咽喉頭全摘手術後、切除不能肺転移に対する ICI として nivolumab が導入された。治療前 sPD-L1 値は 77.2 pg/mL と HNSCC 患者群のなかでも比較的高値を示していた。この患者では nivolumab が 2 週間毎に合計 13 回投与され、肺転移が確認されてから 20 ヶ月生存した。切除不能再発転移 HNSCC に対する従来治療の生存期間中央値が 6 ヶ月に満たない [37] ことを考慮すると、この患者においては nivolumab 投与が生存率改善に大きく寄与したと考えられる。Zhou らは、CTLA-4 または PD-1 阻害剤治療を受けた悪性黒色腫患者において、治療前 sPD-L1 高値が治療感受性悪化と関連していることを報告した [44]。彼らはまた、ICI 投与を受けた患者の予後予測に応用可能性のあるバイオマーカーとして、sPD-L1 の価値についても述べている。sPD-L1 は HNSCC の治療効果予測にも役立つ可能性があるが、HNSCC に対する ICI は、本邦では 2017 年から保険適応となったばかりであり、さらには切除不能再発転移癌に対する適応のみで一次治療としては使用できない。ただし、年々

さまざまな悪性腫瘍において ICI の適応は拡大しており、今後 HNSCC においても術前導入化学療法や化学放射線療法への併用など治療適応の拡大も期待されていることから、今後の研究で sPD-L1 との関連を含めた有用な知見が得られるものと期待される。

### 3.5 小括

血清 PD-L1 値は健常者もしくは良性疾患患者からなる対照群と比較して HNSCC 患者で有意に高く、その差は 65 歳未満の患者でより顕著であった。血清 PD-L1 は、早期 T1-2、N0、もしくは病期 I-III のより早期の HNSCC 患者における予後不良因子であり、診断と予後の両方におけるバイオマーカーへの応用が期待できる。



## 第4章 総括

HNSCC 診療における新規血清バイオマーカーとして、血清抗 p53 抗体および血清 PD-L1 の意義について検討を行った。臨床的に有用なバイオマーカーに求められる条件としては検査精度だけでなく、簡便性や低コストなどが挙げられる。今回検討した血清抗 p53 抗体および血清 PD-L1 は、いずれも患者から少量血液検体から抽出した血清を用いて ELISA という一般化された手法で行う比較的侵襲、低コスト、かつ短時間で解析が可能なバイオマーカーであるため、検査手法において大きなメリットを有する。血清抗 p53 抗体は特にウイルス非関連咽喉頭癌の診断精度において、血清 PD-L1 は HNSCC 患者の予後予測において一定の価値が示され、将来的な臨床応用の可能性は十分あり得ると考える。また、血清抗 p53 抗体は従来マーカーである SCC-Ag や CYFRA21-1 との同時測定が可能であり、組み合わせることにより検査精度の向上が期待できる。

免疫チェックポイント分子を介したがん免疫逃避メカニズムや、それを標的としたがん治療法である ICI についての研究は近年急速に進歩している。臨床的にも非常に高い効果が示されている一方で、その効果は抗腫瘍免疫に左右されることから、一定数患者の治療抵抗性を示すことが問題となりつつあり、その抵抗性を予測、評価する手法の開発が急務である。特に今回検討した sPD-L1 は一部の腫瘍において既に ICI 療法の治療効果予測との関連が示されており、HNSCC においてもその意義について検討が進めば、将来的にはより個別化、最適化された HNSCC 治療の実現に寄与することも可能と考える。

## 第5章 謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校病院 塩谷彰浩 病院長（前耳鼻咽喉科学講座教授）および細部にわたり直接研究のご指導を頂きました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 荒木幸仁 教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました北里大学耳鼻咽喉科学教室 山下拓 教授（前防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座准教授）、東邦大学大学院外科学講座一般・消化器外科学分野および臨床腫瘍学講座 島田英昭 教授、防衛医科大学校数学講座 中村好宏 教授、防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座教室員の皆様に深く感謝の意を表します。

## 付記

本研究の一部は AHNS 10th International Conference on Head and Neck Cancer (2021年7月、シカゴ、USA)および第46回日本頭頸部癌学会（2022年6月、奈良、日本）で発表した。

## 引用文献

1. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008;371(9625):1695-1709.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
3. Swiecicki PL, Brennan JR, Mierzwa M, Spector ME, Brenner JC. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Detection and Surveillance: Advances of Liquid Biomarkers. *Laryngoscope*. 2019;129(8):1836-1843.
4. Guerra EN, Rêgo DF, Elias ST, Coletta RD, Mezzomo LA, Gozal D, De Luca Canto G. Diagnostic accuracy of serum biomarkers for head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;101:93-118.
5. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. *TP53* mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007;357(25):2552-2561.
6. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Trédanel J, Legros Y, Cazals D, Hirsch A, Soussi T. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med*. 1995;1(7):701-702.
7. Trivers GE, Cawley HL, DeBenedetti VM, Hollstein M, Marion MJ, Bennett WP, Hoover ML, Prives CC, Tamburro CC, Harris CC. Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(18):1400-1407.
8. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Serum p53 antibodies in patients with oral lesions: correlation with p53/HSP70 complexes. *Int J Cancer*. 1997;74(6):609-613.
9. Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC, Lubin R, Delchier JC, Soussi T. Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut*. 1997;40(3):356-361.
10. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, Gaillard C, Marty M, Lane D, Calvo F, Soussi T. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res*. 1992;52(22):6380-6384.
11. Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, Tollenaar RA, Brand A, van de Velde CJ, Melief CJ. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1995;72(3):637-641.

12. Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating P53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet*. 1995;345(8950):621-622.
13. Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2000;89(8):1677-1683.
14. Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Imaseki H, Okazumi S, Takayama W, Iwasaki K, Makino H, Natsume T, Kouno T, Kondo S, Suzuki T, Ochiai T, Isono K. Clinical significance of serum p53 antibody detection on chemosensitivity assay in human colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1999;71(2):112-116.
15. Suppiah A, Greenman J. Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: systematic review and focus on colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19(29):4651-4670.
16. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 1982;30(4):403-408.
17. Bourhis J, Lubin R, Roche B, Koscielny S, Bosq J, Dubois I, Talbot M, Marandas P, Schwaab G, Wibault P, Luboinski B, Eschwege F, Soussi T. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(17):1228-1233.
18. Gottschlich S, Folz BJ, Goeroegh T, Lippert BM, Maass JD, Werner JA. A new prognostic indicator for head and neck cancer-p53 serum antibodies?. *Anticancer Res*. 1999;19(4A):2703-2705.
19. Yamazaki Y, Chiba I, Ishikawa M, Satoh C, Notani K, Ohiro Y, Totsuka Y, Mizuno S, Kitagawa Y. Serum p53 antibodies as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Odontology*. 2008;96(1):32-37.
20. Curtius K, Wright NA, Graham TA. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(1):19-32.
21. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):411-423.
22. Khariwala SS, Hatsukami D, Hecht SS. Tobacco carcinogen metabolites and DNA adducts as biomarkers in head and neck cancer: potential screening tools and prognostic indicators. *Head Neck*. 2012;34(3):441-447.
23. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma:

- Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):228-240.
24. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517(7536):576-582.
  25. Cawley HM, Meltzer SJ, De Benedetti VM, Hollstein MC, Muehlbauer KR, Liang L, Bennett WP, Souza RF, Greenwald BD, Cottrell J, Salabes A, Bartsch H, Trivers GE. Anti-p53 antibodies in patients with Barrett's esophagus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis. *Gastroenterology.* 1998;115(1):19-27.
  26. Suzuki T, Yajima S, Ishioka N, Nanami T, Oshima Y, Washizawa N, Funahashi K, Otsuka S, Nemoto T, Shimada H. Prognostic significance of high serum p53 antibody titers in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus.* 2018;15(4):294-300.
  27. Suzuki T, Yajima S, Okamura A, Yoshida N, Taniyama Y, Murakami K, Ohkura Y, Nakajima Y, Yagi K, Fukuda T, Ogawa R, Hoshino I, Kunisaki C, Narumiya K, Tsubosa Y, Yamada K, Shimada H. Clinical impact of preoperative serum p53 antibody titers in 1487 patients with surgically treated esophageal squamous cell carcinoma: a multi-institutional study. *Esophagus.* 2021;18(1):65-71.
  28. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):57-81.
  29. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer [published correction appears in *Nat Rev Cancer.* 2018 Oct;18(10):662]. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(5):269-282.
  30. Yin H, Qu J, Peng Q, Gan R. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Med Microbiol Immunol.* 2019;208(5):573-583.
  31. Richardo T, Prattapong P, Ngernsombat C, Wisetyaningsih N, Iizasa H, Yoshiyama H, Janvilisri T. Epstein-Barr virus mediated signaling in nasopharyngeal carcinoma carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):2441.
  32. Travassos DC, Fernandes D, Massucato EMS, Navarro CM, Bufalino A. Squamous cell carcinoma antigen as a prognostic marker and its correlation with clinicopathological features in head and neck squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(1):3-10.
  33. Wang YX, Hu D, Yan X. Diagnostic accuracy of Cyfra 21-1 for head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(17):2383-2389.

34. Shimada H, Shiratori T, Takeda A, Matsushita K, Okazumi S, Akutsu Y, Matsubara H, Nomura F, Ochiai T. Perioperative changes of serum p53 antibody titer is a predictor for survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg.* 2009;33(2):272-277.
35. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: Mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol.* 2017;8:561.
36. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):847-856.
37. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1856-1867.
38. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr, Psyrri A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D; KEYNOTE-048 Investigators. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study [correction. *Lancet.* 2020; 395 (10220):272, correction. *Lancet.* 2020; 395(10224):564]. *Lancet.* 2019;394(10212):1915-1928.
39. Lenouvel D, González-Moles MÁ, Ruiz-Ávila I, Gonzalez-Ruiz L, Gonzalez-Ruiz I, Ramos-García P. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 overexpression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncol.* 2020;106:104722.
40. Tang H, Zhou X, Ye Y, Zhou Y, Wu C, Xu Y. The different role of PD-L1 in head and neck squamous cell carcinomas: A meta-analysis. *Pathol Res Pract.* 2020;216(1):152768.
41. Chen Y, Wang Q, Shi B, Xu P, Hu Z, Bai L, Zhang X. Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1+ cell lines. *Cytokine.* 2011;56(2):231-238.
42. Wang L, Wang H, Chen H, Wang WD, Chen XQ, Geng QR, Xia ZJ, Lu Y.

- Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015;6(38):41228-41236.
43. Kruger S, Legenstein ML, Rösger V, Haas M, Modest DP, Westphalen CB, Ormanns S, Kirchner T, Heinemann V, Holdenrieder S, Boeck S. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(5):e1310358.
  44. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, Zhao F, Lee S, Liao X, Rodig S, Li J, Wu X, Butterfield LH, Piesche M, Manos MP, Eastman LM, Dranoff G, Freeman GJ, Hodi FS. Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(6):480-492.
  45. Chang B, Huang T, Wei H, Shen L, Zhu D, He W, Chen Q, Zhang H, Li Y, Huang R, Li W, Wu P. The correlation and prognostic value of serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(3):353-363.
  46. Akamine T, Takada K, Toyokawa G, Kinoshita F, Matsubara T, Kozuma Y, Haratake N, Takamori S, Hirai F, Tagawa T, Okamoto T, Yoneshima Y, Okamoto I, Shimokawa M, Oda Y, Nakanishi Y, Maehara Y. Association of preoperative serum CRP with PD-L1 expression in 508 patients with non-small cell lung cancer: A comprehensive analysis of systemic inflammatory markers. *Surg Oncol*. 2018;27(1):88-94.
  47. Ito M, Oshima Y, Yajima S, Suzuki T, Nanami T, Shiratori F, Funahashi K, Nemoto T, Shimada H. Is high serum programmed death ligand 1 level a risk factor for poor survival in patients with gastric cancer?. *Ann Gastroenterol Surg*. 2018;2(4):313-318.
  48. Kim HJ, Park S, Kim KJ, Seong J. Clinical significance of soluble programmed cell death ligand-1 (sPD-L1) in hepatocellular carcinoma patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2018;129(1):130-135.
  49. Tominaga T, Akiyoshi T, Yamamoto N, Taguchi S, Mori S, Nagasaki T, Fukunaga Y, Ueno M. Clinical significance of soluble programmed cell death-1 and soluble programmed cell death-ligand 1 in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212978.
  50. Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Narumi A,

- Ichikawa T, Ide S, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Araki T, Kusunoki M. Soluble PD-L1 expression in circulation as a predictive marker for recurrence and prognosis in gastric cancer: direct comparison of the clinical burden between tissue and serum PD-L1 expression. *Ann Surg Oncol*. 2019;26(3):876-883.
51. Park H, Bang JH, Nam AR, Eun Park J, Hua Jin M, Bang YJ, Oh DY. Prognostic implications of soluble programmed death-ligand 1 and its dynamics during chemotherapy in unresectable pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):11131.
52. Abu Hejleh T, Furqan M, Ballas Z, Clamon G. The clinical significance of soluble PD-1 and PD-L1 in lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;143:148-152.
53. Ito M, Yajima S, Suzuki T, Oshima Y, Nanami T, Sumazaki M, Shiratori F, Funahashi K, Tochigi N, Shimada H. High serum PD-L1 level is a poor prognostic biomarker in surgically treated esophageal cancer. *Cancer Med*. 2020;9(4):1321-1327.
54. Nagato T, Ohkuri T, Ohara K, Hirata Y, Kishibe K, Komabayashi Y, Ueda S, Takahara M, Kumai T, Ishibashi K, Kosaka A, Aoki N, Oikawa K, Uno Y, Akiyama N, Sado M, Takei H, Celis E, Harabuchi Y, Kobayashi H. Programmed death-ligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(7):877-890.
55. Koppel C, Schwellenbach H, Zielinski D, Eckstein S, Martin-Ortega M, D'Arrigo C, Schildhaus HU, Rüschoff J, Jasani B. Optimization and validation of PD-L1 immunohistochemistry staining protocols using the antibody clone 28-8 on different staining platforms. *Mod Pathol*. 2018;31(11):1630-1644.
56. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, 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*. 2000;192(7):1027-1034.
57. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-1034.
58. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, Honjo T.



- Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002;84(1):57-62.
59. Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol.* 2002;169(7):3581-3588.
  60. Bailly C, Thuru X, Quesnel B. Soluble programmed death ligand-1 (sPD-L1): A pool of circulating proteins implicated in health and diseases. *Cancers (Basel).* 2021;13(12):3034.
  61. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, Leonard JP. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation.* 2002;9(2):133-145.
  62. Aghajani MJ, Roberts TL, Yang T, McCafferty CE, Caixeiro NJ, DeSouza P, Niles N. Elevated levels of soluble PD-L1 are associated with reduced recurrence in papillary thyroid cancer. *Endocr Connect.* 2019;8(7):1040-1051.
  63. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
  64. Rossille D, Gressier M, Damotte D, Maucort-Boulch D, Pangault C, Semana G, Le Gouill S, Haioun C, Tarte K, Lamy T, Milpied N, Fest T; Groupe Ouest-Est des Leucémies et Autres Maladies du Sang. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia.* 2014;28(12):2367-2375.
  65. Cubillos-Zapata C, Balbás-García C, Avendaño-Ortiz J, Toledano V, Torres M, Almendros I, Casitas R, Zamarrón E, García-Sánchez A, Feliu J, Aguirre LA, Farre R, López-Collazo E, García-Río F. Age-dependent hypoxia-induced PD-L1 upregulation in patients with obstructive sleep apnoea. *Respirology.* 2019;24(7):684-692.
  66. Kim I, Choi S, Yoo S, Lee M, Kim IS. Cancer-associated fibroblasts in the hypoxic tumor microenvironment. *Cancers.* 2022; 14(14):3321.
  67. Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, Zhong X, Li X, Qian H, Wang X. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182692.
  68. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, Midha A, Walker J. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung*

- Cancer. 2017;112:200-215.
69. Shen M, Chen G, Xie Q, Li X, Xu H, Wang H, Zhao S. Association between PD-L1 expression and the prognosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Urol Int.* 2020;104(7-8):533-541.
  70. Yang WF, Wong MCM, Thomson PJ, Li KY, Su YX. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018;86:81-90.
  71. Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, Arena C, Pannone G, Mascitti M, Santarelli A, Lo Muzio L. High PD-L1 expression in the tumour cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: A meta-analysis of the literature. *Cell Prolif.* 2019;52(2):e12537.
  72. Lu T, Chen Y, Li J, Guo Q, Lin W, Zheng Y, Su Y, Zong J, Lin S, Ye Y, Pan J. High soluble programmed death-ligand 1 predicts poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2020;13:1757-1765.
  73. Teramoto K, Igarashi T, Kataoka Y, Ishida M, Hanaoka J, Sumimoto H, Daigo Y. Biphasic prognostic significance of PD-L1 expression status in patients with early- and locally advanced-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(4):1063-1074.

図表

表 1 全口腔咽頭癌患者と対照群における各バイオマーカーの測定結果比較

	<i>Biomarker</i>	<i>No. of cases (%)</i>		
		<i>All</i>	<i>Patient</i>	<i>Control</i>
A.	s-p53-Ab (U/mL)			
	≥ 1.30	26	14 (19.7)	12 (10.3)
	< 1.30	162	57 (80.3)	105 (89.7)
	Total	188	71 (100)	117 (100)
B.	SCC-Ag (ng/mL)			
	≥ 1.5	47	22 (36.1)	25 (21.4)
	< 1.5	131	39 (63.9)	92 (78.6)
	Total	178	61 (100)	117 (100)
C.	CYFRA21-1 (ng/mL)			
	≥ 3.5	17	9 (15.2)	8 (6.8)
	< 3.5	159	50 (84.8)	109 (93.2)
	Total	176	59 (100)	117 (100)

表 2 患者群と対照群の特徴と各バイオマーカーの測定結果

患者群		症例数 (%)								
		<i>s-p53-Ab (U/mL)</i>			<i>SCC-Ag (ng/mL)</i>			<i>CYFRA21-1 (ng/mL)</i>		
		<i>All</i>	$\geq 1.30$	<i>p*</i>	<i>All</i>	$\geq 1.5$	<i>p*</i>	<i>All</i>	$\geq 3.5$	<i>p*</i>
計	71	14 (19.7)		61	22 (36.1)		59	9 (15.2)		
性別										
男	57	13 (22.8)	0.274	48	18 (37.5)	0.753		7	1.00	
女	14	1 (7.1)		13	4 (30.8)			2		
年齢 (歳)										
< 65	28	6 (21.4)	0.770	26	10 (38.5)	0.792	25	2 (8.0)	0.278	
$\geq 65$	43	8 (18.6)		35	12 (34.3)		34	7 (20.6)		
原発部位										
舌・口腔	11	1 (9.1)		9	5 (55.6)		9	0 (0)		
上咽頭	3	0 (0)		3	1 (33.3)		3	1 (33.3)		
中咽頭 (p16+)	7	0 (0)		6	3 (50.0)		6	1 (16.7)		
中咽頭 (p16-)	9	3 (33.3)		8	3 (37.5)		8	2 (25.0)		
下咽頭	37	9 (24.3)		31	8 (25.8)		29	3 (10.3)		
原発不明	4	1 (25.0)		4	2 (50.0)		4	2 (50.0)		
T分類										
T1-2	32	7 (21.9)	0.768	26	8 (30.8)	0.591	26	3 (11.5)	0.718	
T3-4	39	7 (18.0)		35	14 (40.0)		33	6 (18.2)		
N分類										
N0	16	6 (37.5)	0.070	13	3 (23.1)	0.342	12	1 (8.3)	0.670	
N1-3	55	8 (14.6)		48	19 (39.6)		47	8 (17.0)		
M分類										
M0	69	13 (22.0)	0.358	59	20 (33.9)	0.126	57	8 (14.0)	0.284	
M1	2	1 (50.0)		2	2 (100)		2	1 (50.0)		
病期分類										
I-II	15	3 (20.0)	1.00	12	3 (25.0)	0.509	12	0 (0)	0.181	
III-IV	56	11 (19.6)		49	19 (38.8)		47	9 (19.2)		
喫煙量(Pack year)										
< 40	48	6 (12.5)	0.052	42	15 (35.7)	1.00	40	5 (12.5)	0.450	
$\geq 40$	23	8 (34.8)		19	7 (36.8)		19	4 (21.1)		
飲酒量(g/day)										
< 20	30	8 (26.7)	0.239	28	11 (39.3)	0.790	28	4 (14.3)	1.00	
$\geq 20$	41	6 (14.6)		33	11 (33.3)		31	5 (16.1)		

次項へ続く

		症例数 (%)								
		<i>s-p53-Ab (U/mL)</i>			<i>SCC-Ag (ng/mL)</i>			<i>CYFRA21-1 (ng/mL)</i>		
		<i>All</i>	$\geq 1.30$	<i>p</i> *	<i>All</i>	$\geq 1.5$	<i>p</i> *	<i>All</i>	$\geq 3.5$	<i>p</i> *
对照群	計	117	12 (10.3)		117	25 (21.4)		117	8 (6.8)	
	性別									
	男	54	5 (9.3)	0.771	54	20 (37.0)	< 0.001	54	5 (9.3)	0.468
	女	63	7 (11.1)		63	5 (7.9)		63	3 (4.8)	
	年齢 (歳)									
	< 65	61	8 (13.1)	0.363	61	13 (21.3)	1.00	61	2 (3.3)	0.150
	$\geq 65$	56	4 (7.1)		56	12 (21.4)		56	6 (10.7)	

\*: Fisher's exact test.

表3 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者における各バイオマーカー測定結果比較

<b>Biomarker</b>	<b>No. of cases (%)</b>			<b>p*</b>
	<b>All</b>	<b>Patient</b>	<b>Control</b>	
<b>A. s-p53-Ab (U/mL)</b>				
≥ 1.30	26	14 (23.0)	12 (10.3)	0.027
< 1.30	152	47 (77.0)	105 (89.7)	
Total	178	61 (100)	117 (100)	
<b>B SCC-Ag (ng/mL)</b>				
≥ 1.5	43	18 (34.6)	25 (21.4)	0.085
< 1.5	126	34 (65.4)	92 (78.6)	
Total	169	52 (100)	117 (100)	
<b>C CYFRA21-1 (ng/mL)</b>				
≥ 3.5	15	7 (14.0)	8 (6.8)	0.149
< 3.5	152	43 (86.0)	109 (93.2)	
Total	167	50 (100)	117 (100)	
<b>D P53 + SCC</b>				
P53 ≥ 1.30 or SCC ≥ 1.5	62	27 (51.9)	35 (29.9)	0.009
P53 < 1.30 and SCC < 1.5	107	25 (48.1)	82 (70.1)	
Total	169	52 (100)	117	
<b>E SCC + CYFRA</b>				
SCC ≥ 1.5 or CYFRA ≥ 3.5	52	22 (44.0)	30 (25.6)	0.028
SCC < 1.5 and CYFRA < 3.5	115	28 (56.0)	87 (74.4)	
Total	167	50 (100)	117 (100)	
<b>F P53 + CYFRA</b>				
P53 ≥ 1.30 or CYFRA ≥ 3.5	38	17 (34.0)	21 (18.0)	0.028
P53 < 1.30 and CYFRA < 3.5	129	33 (66.0)	96 (82.0)	
Total	167	50 (100)	117 (100)	
<b>G. Any one</b>				
P53 ≥ 1.30 or SCC ≥ 1.5 or CYFRA ≥ 3.5	70	30 (60.0)	40 (34.2)	0.003
P53 < 1.30 and SCC < 1.5 and CYFRA < 3.5	97	20 (40.0)	77 (65.8)	
Total	167	50 (100)	117 (100)	

CYFRA: CYFRA 21-1, P53: serum p53 antibody, SCC: SCC-Antigen. \*: Fisher's exact test.

表4 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者における生活リスク因子と sp53-Ab の関係

生活リスク因子		No. of cases (%)			p value *
		Total	s-p53-Ab $\geq$ 1.30 U/mL	s-p53-Ab < 1.30 U/mL	
喫煙量 (pack year)	< 20	25	5 (20.0)	20	0.762
	$\geq$ 20	36	9 (25.0)	27	
	< 40	41	6 (14.6)	35	<b>0.049</b>
	$\geq$ 40	20	8 (40.0)	12	
飲酒量 (g/day)	< 20	24	8 (33.3)	16	0.135
	$\geq$ 20	37	6 (16.2)	31	

\*: Fisher's exact test.

表 5 HNSCC 患者群の臨床的特徴と sPD-L1 値

変数	人数	sPD-L1 (pg/mL)		p value*
		中央値	(min-max)	
性別	男	78	59.53 (35.52-136.47)	} 0.329
	女	18	53.97 (36.04-101.44)	
年齢 (歳)	< 65	33	50.26 (36.00-101.44)	} 0.216
	≥ 65	63	60.71 (35.52-136.47)	
白血球数 (/μL)	< 8000	72	60.59 (35.52-136.47)	} 0.204
	≥ 8000	24	53.73 (36.04-90.95)	
好中球分画 (%)	< 70	66	58.48 (35.52-111.78)	} 0.950
	≥ 70	30	57.42 (36.65-136.47)	
CRP (mg/dL)**	≤ 0.3	67	56.48 (36.04-109.33)	} 0.212
	> 0.3	27	61.81 (35.52-136.47)	
Albumin (g/dL)**	< 3.5	7	75.07 (42.25-136.47)	} 0.051
	≥ 3.5	88	56.48 (35.52-111.78)	
SCC-Ag (ng/mL)**	< 1.5	55	60.71 (35.52-111.78)	} 0.800
	≥ 1.5	26	56.48 (36.65-136.47)	
CYFRA21-1 (ng/mL)**	< 3.5	70	55.81 (35.52-136.47)	} <b>0.027</b>
	≥ 3.5	9	70.65 (49.78-101.44)	
T 分類	Tis-2	47	53.99 (36.04-111.78)	} 0.156
	T3-4	49	61.86 (35.52-136.47)	
N 分類	N0-1	56	58.48 (36.00-136.47)	} 0.738
	N2-3	40	57.42 (35.52-101.44)	
臨床病期	I-II	35	54.55 (36.34-111.78)	} 0.310
	III-IV	61	60.81 (35.52-136.47)	

CRP: C-reactive protein, HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma. \* Mann-Whitney *U* test. \*\* 欠損値を含む。



表 6 対照群の臨床的特徴と sPD-L1 値

変数	人数	sPD-L1 (pg/mL)		p value*
		中央値 (min-max)		
性別	男	56	52.90 (34.10-125.98)	} 0.203
	女	66	52.41 (26.98-96.83)	
年齢 (歳)	< 65	66	50.32 (26.98-102.92)	} <b>0.007</b>
	≥ 65	56	57.14 (32.19-125.98)	
白血球数 (/μL)**	< 8000	51	53.00 (34.66-103.50)	} 0.587
	≥ 8000	14	52.68 (34.10-125.98)	
好中球分画 (%)**	< 70	53	52.81 (34.10-125.98)	} 0.478
	≥ 70	12	55.40 (34.66-102.92)	
CRP (mg/dL)**	≤ 0.3	54	52.38 (34.10-125.98)	} <b>0.046</b>
	> 0.3	9	60.62 (46.03-102.92)	
Albumin (g/dL)**	< 3.5	0		
	≥ 3.5	60	54.26 (34.10-125.98)	

CRP: C-reactive protein. \* Mann-Whitney *U* test. \*\* 欠損値を含む

表 7 患者群と対照群における sPD-L1 値の測定結果比較

	<i>No. of cases (%)</i>			<i>p value*</i>
	<i>All</i>	<i>Patient</i>	<i>Control</i>	
<b>A. 全例</b>				
sPD-L1 (pg/mL)				
≥ 60.48	78	46 (47.9)	32 (26.2)	0.001
< 60.48	140	50 (52.9)	90 (73.8)	
Total	218	96 (100)	122 (100)	
<b>B. 65 歳未満</b>				
sPD-L1 (pg/mL)				
≥ 60.48	26	17 (45.9)	9 (13.0)	0.001
< 60.48	86	20 (54.1)	60 (87.0)	
Total	106	37 (100)	69 (100)	
<b>C. 65 歳以上</b>				
sPD-L1 (pg/mL)				
≥ 60.48	52	29 (49.2)	23 (43.4)	0.574
< 60.48	60	30 (50.8)	30 (56.6)	
Total	112	59 (100)	53 (100)	

\*: Fisher's exact test.

表 8 HNSCC 患者 (n = 96) における sPD-L1 値と臨床的因子の関連

変数		総数	症例数 (%)		p value*
			sPD-L1 ≥ 60.48 pg/mL	sPD-L1 < 60.48 pg/mL	
性別	男	78	39 (50.0)	39	} 0.442
	女	18	7 (38.9)	11	
年齢 (歳)	< 65	33	14 (42.4)	19	} 0.521
	≥ 65	63	32 (51.0)	31	
白血球数 (/μL)	< 8000	72	36 (50.0)	36	} 0.638
	≥ 8000	24	10 (41.7)	14	
CRP (mg/dL)	≤ 0.3	67	31 (46.3)	36	} 0.655
	> 0.3	27	14 (51.9)	13	
T 分類	T1-2	47	19 (40.4)	28	} 0.160
	T3-4	49	27 (55.1)	22	
N 分類	N0	42	19 (45.2)	23	} 0.684
	N1-3	54	27 (50.0)	27	
臨床病期	Stage I-II	35	15 (42.9)	20	} 0.527
	Stage III-IV	61	31 (50.8)	30	
SCC-Ag (ng/mL)	< 1.5	55	28 (50.9)	27	} 0.487
	≥ 1.5	26	11 (42.3)	15	
CYFRA 21-1 (ng/mL)	< 3.5	70	32 (45.7)	38	} 0.300
	≥ 3.5	9	6 (66.7)	3	

CRP: C-reactive protein, HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma. \*: Fisher's exact test

表9 HNSCC患者(n=91)におけるsPD-L1と予後についての関連

変数	sPD-L1 (pg/mL)	人数	5y OS (%)	HR (95%CI)	p value *	5y RFS (%)	HR (95%CI)	p value *
全患者	< 71.2	68	84.5	1	0.098	64.0	1	0.083
	≥ 71.2	23	66.3	2.14 (0.85-5.38)		40.3	1.83 (0.91-3.66)	
T1-2	< 71.2	40	92.3	1	0.002	74.3	1	0.048
	≥ 71.2	7	42.9	6.34 (1.68-23.9)		42.9	3.06 (0.95-9.87)	
T3-4	< 71.2	28	72.5	1	0.699	49.3	1	0.798
	≥ 71.2	16	80.0	0.77 (0.20-2.91)		39.3	1.12 (0.47-2.67)	
N0	< 71.2	32	93.7	1	0.060	81.0	1	0.025
	≥ 71.2	10	64.3	3.86 (0.85-17.5)		40.0	3.59 (1.08-11.9)	
N1-3	< 71.2	36	75.7	1	0.571	48.3	1	0.765
	≥ 71.2	13	68.2	1.40 (0.43-4.57)		40.3	1.14 (0.48-2.73)	
Stage I-III	< 71.2	40	92.3	1	0.010	77.0	1	0.054
	≥ 71.2	11	57.7	4.85 (1.29-18.3)		53.0	2.82 (0.93-8.52)	
Stage IV	< 71.2	28	72.5	1	0.921	45.3	1	0.850
	≥ 71.2	12	75.0	0.93 (0.25-3.53)		33.0	1.09 (0.44-2.67)	

5y OS: 5-year overall survival rate, 5y RFS: 5-year relapse-free survival rate, CI:

confidence interval, HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma, HR: hazard

ratio. \*: Log-rank test.

表 1 0 Stage I-III の HNSCC 患者(n = 51)における予後関連因子についての単変  
量解析

変数	人数	5 y OS (%)	HR (95%CI)	p value *	5 y RFS (%)	HR (95%CI)	p value *
性別							
男	43	83.0		0.192	71.3	1	0.768
女	8	100.0			75.0	0.80 (0.18-3.58)	
年齢 (歳)							
< 65	14	78.6	1	0.896	71.4	1	0.838
≥ 65	37	88.4	0.91 (0.22-3.71)		71.7	0.89 (0.28-2.83)	
白血球数 (/μL)							
< 8000	43	85.3	1	0.584	68.8	1	0.313
≥ 8000	8	87.5	1.55 (0.32-7.49)		87.5	0.37 (0.05-2.81)	
CRP (mg/dL)							
≤ 0.3	38	86.1	1	0.910	72.7	1	0.597
> 0.3	12	82.5	1.10 (0.23-5.32)		64.8	1.36 (0.43-4.35)	
T 分類							
T1-2	40	87.4	1	0.758	74.5	1	0.501
T3	11	77.8	1.28 (0.26-6.22)		61.4	1.48 (0.46-4.74)	
N 分類							
N0	36	88.1	1	0.809	74.4	1	0.658
N1	15	80.0	1.19 (0.30-4.75)		66.0	1.28 (0.43-3.82)	
sPD-L1 (pg/mL)							
< 71.2	40	92.3	1	<b>0.010</b>	77.0	1	0.054
≥ 71.2	11	57.7	<b>4.85 (1.29-18.3)</b>		53.0	2.82 (0.93-8.52)	
SCC-Ag (ng/mL)							
< 1.5	29	92.6	1	0.126	78.7	1	0.435
≥ 1.5	13	75.5	3.68 (0.61-22.1)		68.4	1.65 (0.46-5.84)	
CYFRA 21-1 (ng/mL)							
< 3.5	37	88.5	1	0.226	80.0	1	<b>0.001</b>
≥ 3.5	4	66.7	3.56 (0.40-32.0)		25.0	<b>7.37 (1.82-29.8)</b>	

5y OS: 5-year overall survival rate, 5y RFS: 5-year relapse-free survival rate, CI: confidence interval, HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma, HR: hazard ratio. \*: Log-rank test.

表 1 1 組織 PD-L1 発現および血清 PD-L1 値と予後との関連

	人数	5 y OS (%)	HR (95%CI)	p value*	5 y RFS (%)	HR (95%CI)	p value*
A. Stage I-III (n=29)							
組織 PD-L1 score 0-1	16	92.9	1	0.760	67.7	1	0.708
組織 PD-L1 score 2-3	13	76.2	1.28 (0.26-6.36)		58.6	1.27 (0.37-4.38)	
sPD-L1 < 71.2 pg/mL	22	95.0	1	<b>0.034</b>	70.9	1	0.066
sPD-L1 ≥ 71.2 pg/mL	7	50.0	4.84 (0.97-24.2)		42.9	3.10 (0.87-11.1)	
B. Stage IV (n=31)							
組織 PD-L1 score 0-1	23	86.0	1	0.068	49.1	1	0.252
組織 PD-L1 score 2-3	8	44.4	4.03 (0.80-20.3)		37.5	1.82 (0.63-5.29)	
sPD-L1 < 71.2 pg/mL	21	74.5	1	0.880	51.4	1	0.699
sPD-L1 ≥ 71.2 pg/mL	10	85.7	0.88 (0.17-4.55)		33.8	1.22 (0.44-3.35)	

5y OS: 5-year overall survival rate, 5y RFS: 5-year relapse-free survival rate, CI:

confidence interval, HR: hazard ratio. \*: Log-rank test.

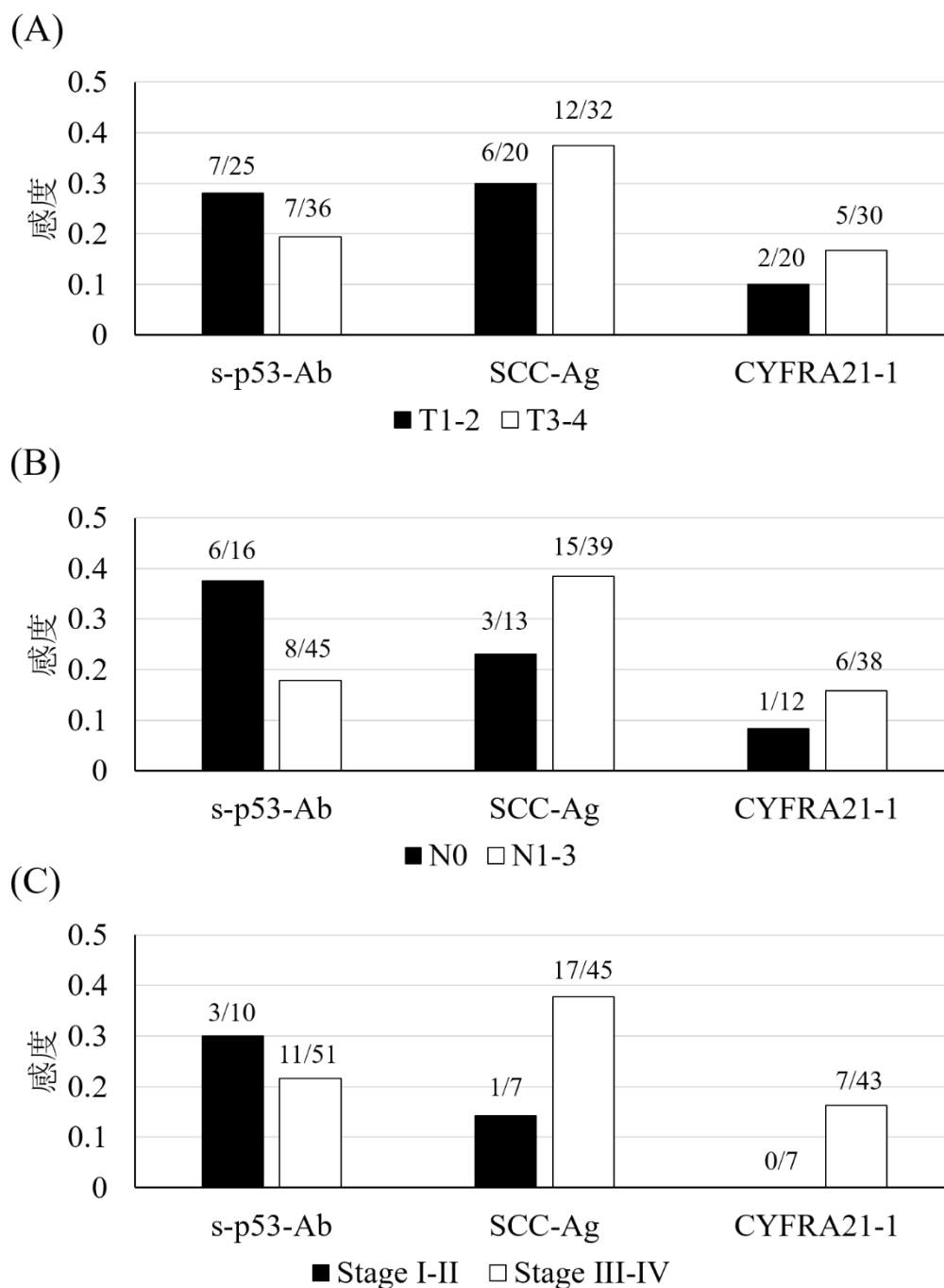


図1 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者における TN 分類と病期分類別のバイオマーカー感度。A : T 分類別。B : N 分類別。C : 臨床病期別。各バー上の数字は、各バイオマーカー陽性患者数/測定患者数を示す。s-p53-Ab は早期病変において感度が高い傾向を示した。

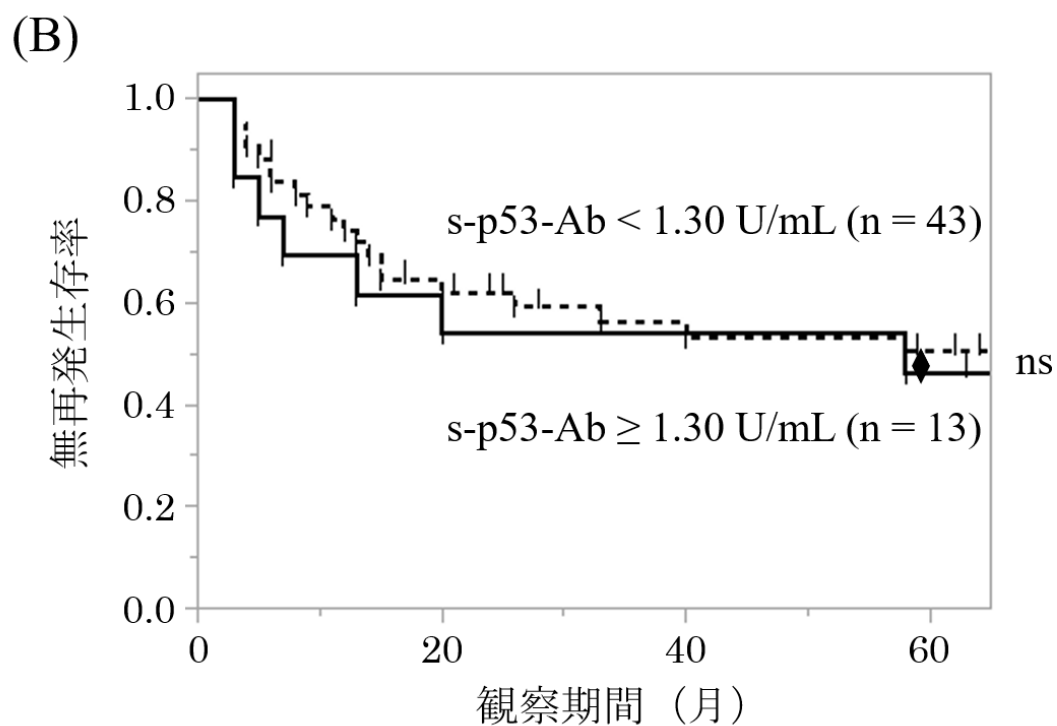
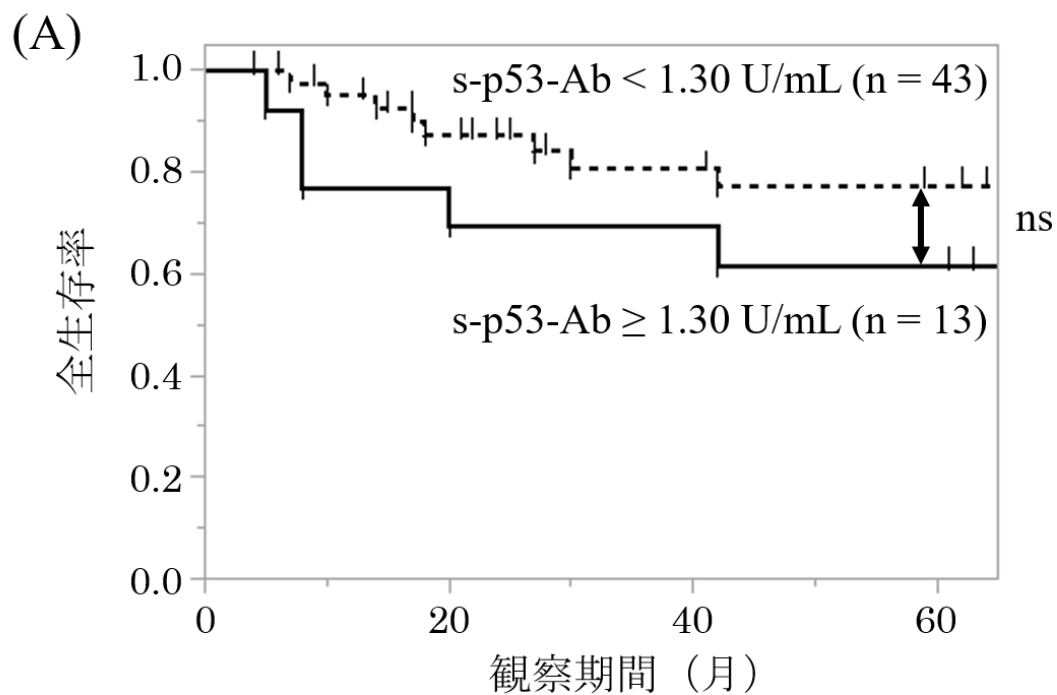


図2 ウイルス非関連口腔咽頭癌患者における s-p53-Ab と予後の関連。A: 全生存率。B: 無再発生存率。根治治療を受けた患者(n = 56)において、s-p53-Ab と予後の間に有意な関連は認めなかった。\*: Log-rank test. ns: not significant.



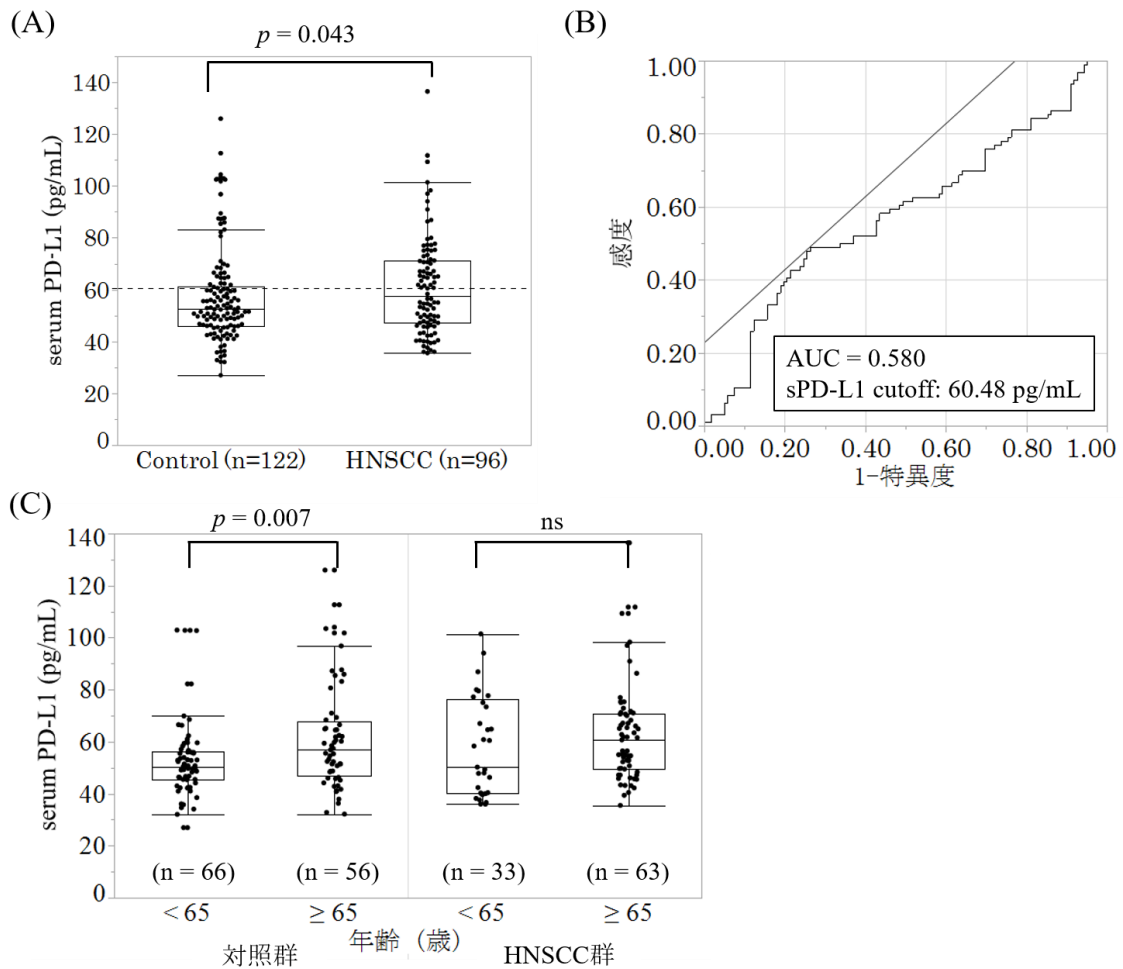
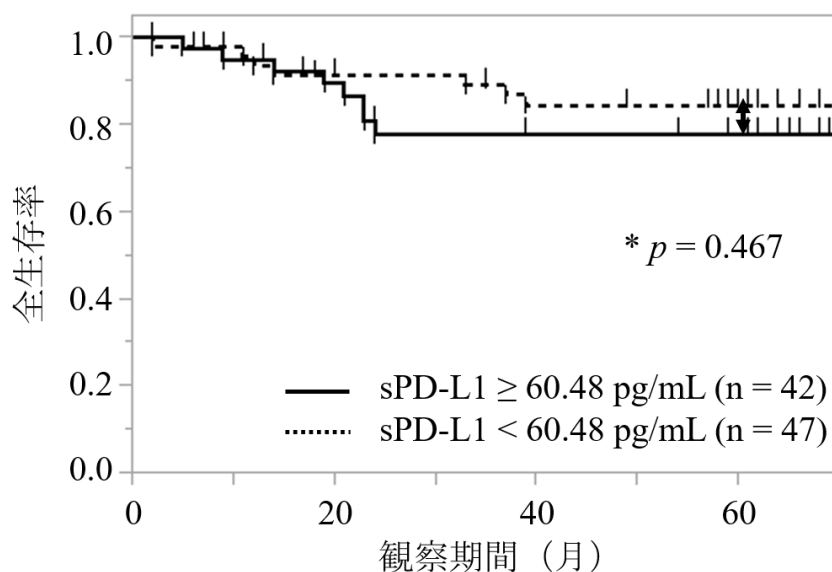


図3 A : 対照および HNSCC 患者における sPD-L1 値の分布比較。HNSCC 患者は対照と比較して有意に高い sPD-L1 値を示した ( $p = 0.043$ )。点線はカットオフ値である 60.48 pg/mL を示す。B : ROC 曲線による sPD-L1 カットオフ値の決定。AUC=0.5800。Youden index によりカットオフ値は 60.48 pg/mL と計算された。C : 65 歳で区分した場合の対照および HNSCC 患者における sPD-L1 値の分布比較。対照群において 65 歳以上の対照者は 65 歳未満の対照者と比較して有意に高い sPD-L1 値を示した ( $p = 0.007$ ) が、HNSCC 患者においては 65 歳で区切った 2 群間に有意差は認めなかった ( $p = 0.216$ )。AUC: area under the curve, ns: not significant.

(A) 全生存率 (cutoff: 60.48 pg/mL)



(B) 全生存率 (cutoff: 71.2 pg/mL)

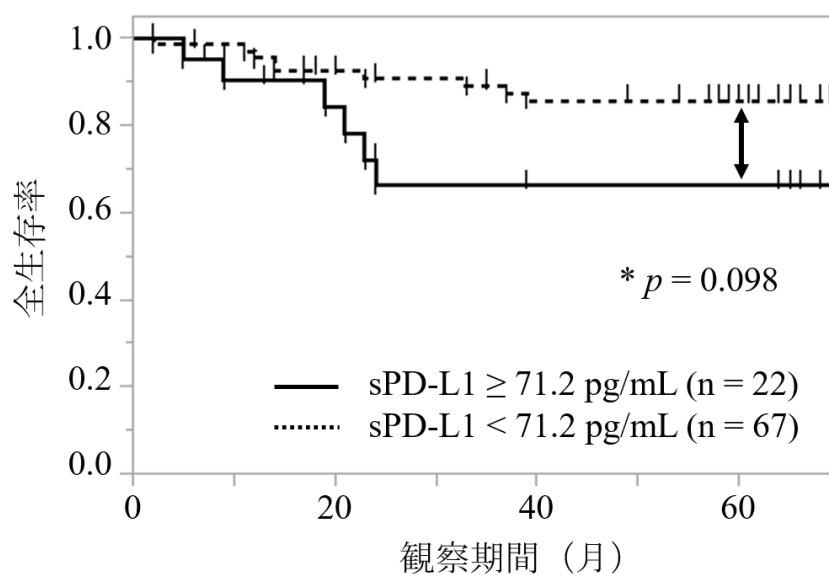


図4 根治的治療を受けた91人のHNSCC患者におけるsPD-L1と全生存率(OS)との関連。(A) sPD-L1カットオフ値を60.48 pg/mLとした場合、OSに有意差は認めなかった。(B) HNSCC患者におけるsPD-L1の75パーセンタイル値である71.2 pg/mLをカットオフ値として使用すると、OSはsPD-L1の高い群で低下する傾向を認めた。\*: Log-rank test.

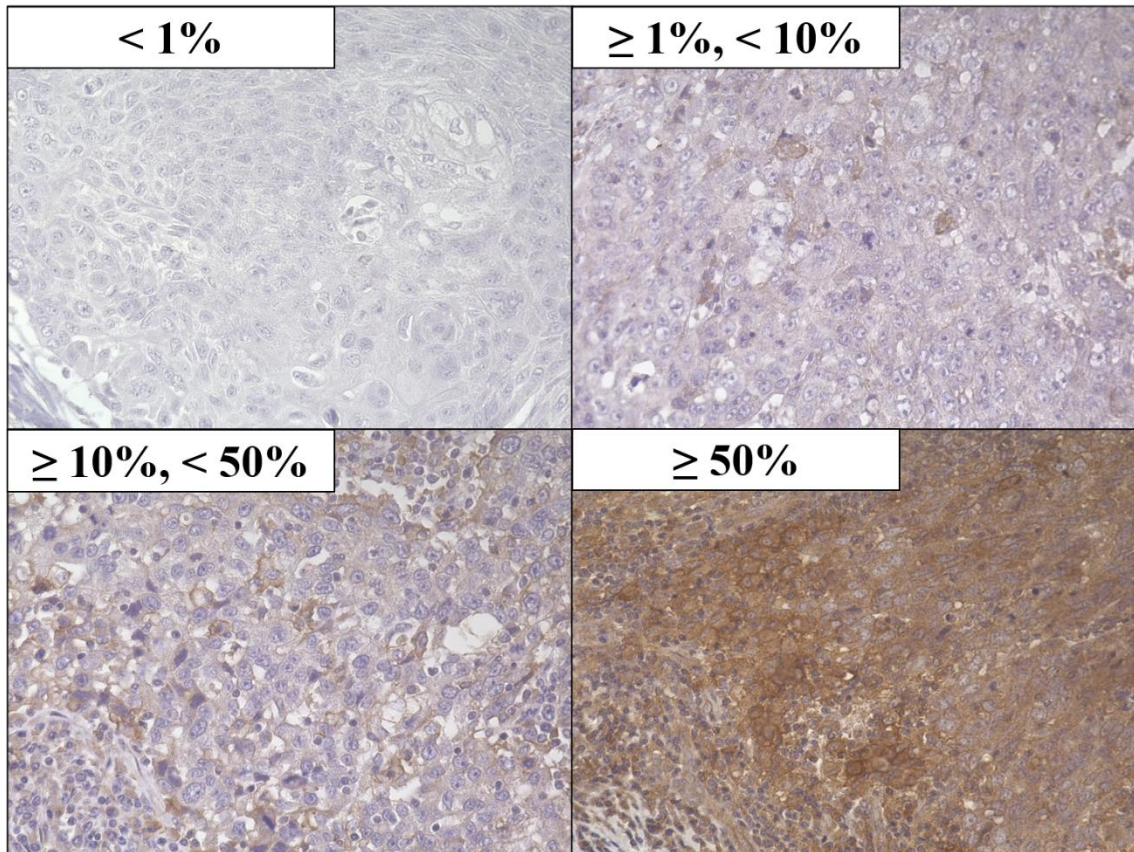


図5 外科的切除標本の PD-L1 免疫組織化学染色の代表画像。反応性の強度に関わらず、すべての腫瘍細胞数のうち PD-L1 陽性細胞数の割合で PD-L1 発現率を分類し、染色スコアを 0 (<1%)、1 (≥1%, <10%)、2 (≥10%, <50%)、および 3 (≥50%) の 4 つに分類した。