

① 論文タイトル：胃癌患者の腹水中細胞における PD-L1 および PD-L2 測定
の liquid biopsy としての有用性の検討

著者：緑川裕紀¹⁾、鈴木悠介¹⁾、深川剛生¹⁾、田村純子¹⁾、笹島ゆう子²⁾、金城
信哉¹⁾、五十嵐裕一¹⁾、添田成美¹⁾、熊田宜真¹⁾、堀川昌宏¹⁾、清川貴志¹⁾

所属：1) 帝京大学医学部 外科学講座 上部消化管外科

2) 帝京大学医学部 病院病理部

キーワード：英語 5 語、対応する和語 5 語

Gastric cancer, prognosis, biomarker, liquid biopsy, Immune Checkpoint
Molecules

胃癌、予後、バイオマーカー、リキッドバイオプシー、免疫チェックポイント関
連分子

② 和文抄録

(背景・目的) 近年切除不能進行再発胃癌に対する新たな 3 次治療として免疫チェックポイント阻害剤(ニボルマブ)の適応が認可され癌組織の PD-L1 および PD-L2 の発現と臨床的因子の相関が注目されている。腹膜播種は胃壁から腹腔内に散布された癌細胞が腹膜に接着して発生すると考えられているが、分子生物学的メカニズムや腹腔内免疫応答も含め不明な点が多く、腹水中の細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現レベルの検討は殆ど行われておらず、胃癌での検討はない。今回の目的は、胃癌症例の腹腔内洗浄液中細胞の PD-L1 および PD-L2 mRNA 発現を検出し、臨床病理学的因子や予後との関連性を明らかにする。

(対象・方法) 2001-2019 年の胃癌症例 601 例を対象とした。解析の手順は①腹水を遠心分離し細胞成分を分離、②全 RNA の抽出、③逆転写、RT-PCR にて mRNA を抽出。内部コントロールは GAPDH を使用した。

(結果) 601 例は、男性/女性:403/198 例、平均年齢 69.5 歳、ステージは I/II/III/IV: 144/138/168/147 例。1) PD-L1, PD-L2 は各々 588、568 例について解析可能であり、腹膜播種陽性例の PD-L1 および PD-L2 発現の平均値及び中央値は、陰性症例より低値であった (PD-L1 は平均値 16.0・103.5、中央値 7.8・12.0。PD-L2 は平均値 18.8・91.2、中央値 8.1・24.7)。2) 根治手術が行われた 444 例で

は全生存・無再発生存率ともに PD-L2 高発現症例のほうが良好であった。

(結論) 腹膜播種陽性症例での腹水中の細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現はいずれも陰性症例に比べて低いことがわかった。PD-L2 高発現は根治手術症例における予後良好因子の可能性はある。

③ 本文

はじめに

胃癌は、世界で最も多くみられる悪性腫瘍の一つであり、癌関連死の 4 番目の主要な原因である¹⁾。日本および他の東アジア諸国で有病率の高い癌の 1 つでもある²⁾。早期胃癌患者の予後は根治的胃切除後も良好で、5 年生存率は約 97%を越えている³⁾。しかし進行胃癌は、診断や治療が進んでいるにもかかわらず、初期段階での診断率が低いこともあり、予後は依然として不良である⁴⁾。手術後に再発を生じることは少なくなく、再発形式としては腹膜播種が 50%と頻度が高く、腹膜播種を有する症例の 5 年生存率は 2%と極めて低い⁵⁾。胃癌の予後を改善するために再発リスクの高い胃癌患者に対してのスクリーニングのためのバイオマーカーを明らかにすることが必要となってくる。

胃癌症例において腹膜播種を疑う場合に診断目的に審査腹腔鏡を施行している。腹腔内洗浄細胞診は微小転移の検出、腹膜再発リスクを評価する方法として有用である。しかし、肉眼的な腹膜播種を認めても細胞診陰性となる症例(文

献 6 では 17.9%)や⁶⁾、細胞診陰性症例での腹膜播種再発もみられることもあり、

検出感度および特異度の点で難点となることがある。

近年、切除不能進行・再発胃癌に対する新たな 3 次治療として、免疫チェッ

クポイント阻害剤(抗 PD-1 抗体、ニボルマブ)の適応が認可された(胃癌治療

ガイドライン第 5 版⁷⁾)。作用機序は、リンパ球が発現する PD-1 と腫瘍が発

現する PD-L1 および PD-L2 の結合を、抗 PD-1 抗体でブロックすることによ

って、リンパ球が本来持つ抗腫瘍免疫作用を強化する、と考えられている

^{8,9)}。しかし、ニボルマブが腫瘍細胞の PD-L1 および PD-L2 発現に関わらず

保険適応になっているように、こういった症例に免疫チェックポイント阻害

剤の効果が現れるかを予想することは現時点では困難で、治療効果予想が可

能なバイオマーカーが必要とされている。PD-1、PD-L1、PD-L2 はそうした

腫瘍免疫に関与する因子であるが、その発現が免疫療法の効果予測につながる

だけではなく、予後自体に関連する可能性が指摘されている。癌組織や血漿

中の PD-L1 および PD-L2 の発現および臨床的因子との相関は、いくつかの

癌腫についての報告があるが、ステージ・予後との関連はまだ確定されていな

い^{10,11,12)}。PD-L2 については報告自体がまだ少ない状況である¹³⁾。当科では

昨年癌組織と血漿中における PD-L1 および PD-L2 の発現に関する報告をお

こなった(五十嵐裕一他、帝京医学雑誌 2020;43:19-29¹⁴⁾)。その研究では、

胃癌組織と血漿中の PD-L1 および PD-L2 の発現はステージ・予後とは関連が認められなかった。他の報告でもまだ定まっていない^{15,16,17)}。今回の研究では胃癌に多い腹膜播種をターゲットとして、胃癌患者の腹水を検討することにした。腹膜播種は、胃壁から腹腔内に散布された癌細胞が腹膜に接着して発生すると考えられているが、胃癌の転移様式の中でもっとも難治性と考えられており、その分子生物学的メカニズムも不明である。腹腔内での免疫応答も含め不明な点が多く、腹水中の PD-L1 および PD-L2 の測定はほとんど行われておらず¹⁸⁾、特に胃癌での検討はない。

今回の研究の目的は、胃癌症例の腹腔内洗浄液中細胞の PD-L1 および PD-L2 mRNA 発現を検出し、臨床病理学的因子や予後との関連性を明らかにすることである。 CQ1: PD-L1 および PD-L2 高発現症例が腹膜播種を起こしやすいのか？ CQ2: PD-L1 および PD-L2 発現が予後不良因子となるのか？

対象と方法

1) 症例

2001 年から 2019 年に帝京大学医学部附属病院上部消化管外科にて手術を施行した 601 症例の胃癌患者を対象とした。すべての患者は同院病理医によって病理組織学的に胃癌と診断された（胃癌取り扱い規約第 15 版¹⁹⁾に準じる）。

治療は胃癌診療ガイドラインに基づいて行われ、術後経過観察は 3 か月から半年おきに 5 年間施行された。Computed Tomography は 6 か月ごとに 5 年間まで施行され、再発は経過中の画像所見によって診断した。患者の予後情報は 2020 年 5 月の時点で確認した。

本研究は帝京大学倫理委員会承認（09-081-3）のもと、文書による同意の得られた患者を対象とした。これらの患者の臨床情報は電子カルテから集められた。

2) 方法

腹水採取は、開腹手術の場合、開腹直後に生理食塩水 100cc でダグラス窩を洗浄し回収。審査腹腔鏡の場合も同様に行った。腹水は洗浄細胞診検査(cytology)を病理部で行うが、一部を研究用に使用した。解析の手順は①腹水を遠心分離し細胞成分を分離、②全 RNA の抽出、③逆転写、RT-PCR にて mRNA を抽出。内部コントロールは GAPDH を使用した。

PCR 法（腹水サンプル）

・腹水サンプル

腹水検体は開腹時に生食 100 ml でダグラス窩を洗浄し採取した。半分は病理細胞診へ提出し、もう半分を RT-PCR アッセイに使用した。細胞成分を遠

心分離(1500rpm,5min)し回収した後、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific,USA) でサスペンションし、-80℃で保存した。

- total RNA 抽出

Total RNA は TRIzol Reagent の methods に従い抽出した、-80℃で保存した。NanoDrop (Thermo Fisher Scientific,USA) で核酸濃度と純度を確認し、A260/A280 比が十分であるものを実験に使用した。

- 逆転写

各サンプルの total RNA 100ng を鋳型とし、cDNA は Super Script II 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific, USA) と Oligo(dt)₁₂₋₁₈ primer (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて合成した。

- reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)法.

RT-PCR は Step One (Applied BioSystems,USA) を用いて行った。使用したプライマーは PD-L1 は TaqMan Gene Expression Assays Hs0112530_m1 (Thermo Fisher Scientific,USA)、PD-L2 は TaqMan Gene Expression Assays Hs01057777_m1 (Thermo Fisher Scientific,USA) である。PCR の条件は denature 95℃ 15sec、anneal/extend 60℃ 1min で 50cycle 行った。同じ cDNA サンプルの GAPDH (TaqMan Gene Expression Assays Hs03929097_g1, Thermo

Fisher Scientific,USA) を内部標準として PD-L1/GAPDH および PD-L2/GAPDH を算出した。

3) 解析

- ・腹膜播種の有無、洗浄細胞診陽性陰性について PD-L1 および PD-L2 発現を比較した。

- ・根治手術症例において、PD-L1 および PD-L2 高発現症例を抽出するために、症例を測定値順に 10 等分し、上位 10%PD-L1(46.9)および PD-L2(95.8)以上を高発現群とし、それ以下の症例(低発現群)と臨床病理因子との関連および生存率の比較を行った²⁰⁾。

4) 統計解析

PD-L1 および PD-L2 の発現量と臨床病理学的因子を解析する際には Student's t-test、chi-squared test を用いた。OS (overall survival: 全生存率) と RFS (relapse free survival: 無再発生存率) は Kaplan-Meier 法で解析し、log-rank test で評価した。生存分析では Cox 回帰分析法にて多変量解析を行った。統計解析は SPSS(version 23, 日本 IBM)を用いた。

結果

対象とした 601 例の内訳は、男性/女性：403/198 例、平均年齢 69.5 歳（33-92 歳）、病理学的ステージは I/II/III/IV：144/138/168/147 例であった。PD-L1、PD-L2 は各々 588、568 例について解析可能であり m RNA 定量（コピー数）を行って GAPDH との比（ $\times 10^5$ ）を算出した。

1) 腹膜播種の有無による PD-L1 および PD-L2 発現の平均値・中央値を表 1、に、データの分布について箱ひげ図を図 1 に示す。PD-L1 については、あり（82 例）・なし（504 例）：平均値 16.0・103.5、中央値 7.8・12.0 であった。PD-L2 については、あり（81 例）・なし（485 例）：平均値 20.3・92.6、中央値 12.0・24.8 であった。洗浄細胞診陽性/陰性では（表 2）、PD-L1 については、陽性（71 例）・陰性（483 例）：平均値 13.1・103.4、中央値 6.2・12.1 であった。PD-L2 については、あり（71 例）・なし（489 例）：平均値 18.8・91.2、中央値 8.1・24.7 であった。播種陽性・洗浄細胞診陽性のいずれの場合も、PD-L1 および PD-L2 は低発現であったが、データのばらつきが多く統計的有意差は認められなかった

2) ステージ IV および非治癒切除を除いた 444 例に根治手術が行われたが、術後再発の有無による PD-L1 および PD-L2 発現の平均値は、あり・なし：

98.1(126 例) ・ 125.7(306 例)(PD-L1)、36.4(119 例) ・ 126.5(298 例) (PD-L2)

となり、術後再発群のほうが PD-L1 および PD-L2 は低発現であった。

3) 根治手術症例における PD-L1 および PD-L2 高発現・低発現と臨床病理因子との関連 (表 3) : 単変量解析において有意差がみられた因子は、年齢(PD-L1、PD-L2 : いずれも高発現例の方が高年齢)、ステージ(PD-L2: ステージ I において PD-L2 が高発現)、深達度 (PD-L2 : 早期胃癌において PD-L2 が高発現) であった。

4) 生存分析 : PD-L1 および PD-L2 高発現・低発現に分け根治手術症例の生存比較を行った。PD-L1 の場合、5 年生存率(OS: overall survival)は高発現群、低発現群各々 75.4%(95%CI:60.1-90.7) 、 64.1%(95%CI:58.6-69.6) であった (log-rank: $p=0.363$) (図 2)。5 年無再発生存率(RFS: relapse free survival) は 69.2%(95%CI: 50.0-88.4) 、 65.5%(95%CI: 60.2-70.8)であった ($p=0.338$) (図 3)。PD-L2 の場合、5 年生存率は、79.9%(95%CI: 66.4-93.4) 、 63.6%(95%CI: 57.9-69.3) であった ($p=0.023$) (図 4)。5 年無再発生存率は、79.3%(95%CI: 65.2-93.4) 、 65.3% (95%CI: 59.8-70.8)であった ($p=0.025$) (図 5)。PD-L2 高発現群の OS が有意に良好であったため、ステージ別に検討すると、ステージ I と II では同様に高発現群の生存が良好であるが、有意差はなかった(図 6)。また OS について、PD-L1 および PD-L2 発現(高発現 vs. 低

発現)、ステージ (I,II vs. III)、組織型 (分化型 vs. 低分化型)、リンパ管侵襲
および静脈侵襲 (なし vs. あり)、年齢 (中央値 72 歳未満 vs. 以上) を従属
変数として多変量解析 (Cox 回帰分析) を行ったところ、PD-L1 および PD-
L2 の発現レベルはいずれも独立した予後因子ではなかった(表 4)。PD-L1、
PD-L2 高発現のカットオフ値については今回上位 10%値(decile)を採用した
が、各々の中央値 (PD-L1: 12.1、PD-L2: 25.5) をカットオフにした場合は、
OS、RFS における有意差は生じなかった。

結論

CQ1: 播種を生じていた (細胞診陽性だった) 症例では、腹水細胞の PD-L1 お
よび PD-L2 は低発現であった。CQ2: 腹水細胞の PD-L1 および PD-L2 高発
現は根治手術症例における予後不良因子ではない。むしろ PD-L2 高発現は予
後良好を示す因子の可能性がある。

考察

リキッドバイオプシー (liquid biopsy) は主に癌の領域で、内視鏡や針を使って
腫瘍組織を採取する従来の生検 (biopsy) に代えて、血液などの体液サンプルを
使って診断や治療効果予測を行う方法である。リキッドバイオプシーの解析対
象としては、血中循環腫瘍細胞(CTC: Circulating Tumor Cells)²¹⁾、もしくは癌

細胞に由来する DNA(ctDNA: circulating tumor DNA)がよく知られている。従来は微量癌細胞の存在を推測するものであったが²²⁾、CTC における特定の遺伝子発現や、遺伝子変異を解析することで、予後予測や治療薬の選択を行うための方法としても期待されている。

今回の研究は、胃癌患者の腹水をリキッドバイオプシーのサンプルとして、PD-L1 および PD-L2 の発現が腹膜播種あるいは腹腔内癌細胞の存在と関連があるか？根治手術が行われた症例で、腹膜播種再発を予想できる、細胞診検査よりも感度の高いバイオマーカーとなり得るか？という視点がスタートであった。

胃癌腹膜播種は腹腔内の遊離癌細胞が腹膜中皮細胞に生着して生じると考えられており、細胞診陰性でも、腹水中 CEA mRNA を定量することで播種再発につながる微量癌細胞の検出が高感度に可能とされている²³⁾。今回の検討では、明らかに癌細胞が腹水中に存在すると考えられる播種陽性・細胞診陽性症例でも PD-L1 および PD-L2 はむしろ低発現であったので、何らかの理由で腹水中の癌細胞の PD-L1 および PD-L2 発現が抑制されていると予想される。ただし、胃癌組織における PD-L1 陽性率は 30%程度と報告されているので²⁴⁾、必ずしも腹水中の癌細胞に PD-L1 が発現しているとも言い切れない。また腹水中には癌細胞だけではなく、マクロファージ、リンパ球、腹膜を形成する中皮細胞などが存在しているので、腹水中の癌細胞がほとんど存在しないと考えられるステ

ージ I 胃癌ではそういった癌細胞以外の正常細胞の PD-L1 および PD-L2 を検出しているものと考えられる²⁵⁾。とすると播種陽性・細胞診陽性例の腹水細胞の PD-L1 および PD-L2 発現が低下しているのは、上記の正常細胞の PD-L1 および PD-L2 発現も低下していることになり、T 細胞上の PD-1 結合を介した免疫抑制系が働いている可能性がある。その状況下で、抗 PD-1 抗体(ニボルマブ)が PD-L1 および PD-L2 と PD-1 の結合をブロックすることにより抗腫瘍効果が得られる、という想像が可能である。根治切除例の検討で PD-L2 高発現症例の予後が良好であったことの解釈は難しいが、免疫機能が維持されている状態を表しているのであれば、腹水中の PD-L2 高発現は根治手術が行われた胃癌患者の予後良好マーカーとなる可能性がある。

今回の研究では、腹水細胞中の PD-L1 および PD-L2 高発現が播種・再発と相関しないという結果が得られた。しかし、PD-L2 においては高発現が生存率は良くなるという結果となり、予後良好因子の可能性が考えられた。解析についての解釈は困難な面もあるが、600 例近い腹水サンプルの検討はこれまでにはみられなかった研究である。

この研究は、腹水についての preliminary な研究であるため、いくつかの限界がある。まず PD-L1 および PD-L2 発現を評価する方法としてペレットの mRNA 定量が妥当かどうかという点である。前述したように腹水中の癌細胞をターゲ

ットとした CEA mRNA 定量はすでに確立されているが、PD-L1 および PD-L2 の定量として適正であるかどうかは不明なため、今後他の方法による解析 (ELISA, フローサイトメトリー) も行う予定である。またがんに関する免疫調節機能は転写因子を含め、複数の因子が関与していると考えられており²⁶⁾、単に免疫チェックポイント関連分子の発現だけから臨床的な知見を得ることは困難な可能性がある。今後、実験系の整備を含めてさらなる研究が必要と考える。

④ 引用文献

1. Machlowska J., et al. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. Int J Mol Sci. 2020 Jun 4;21(11):4012.
2. Freddie Bray, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries A Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424.
3. Fan Feng, et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. BMC Cancer volume 17, Article number: 737 (2017)

4. Ziliang Jin, et al. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review) *Oncol Lett*. 2015 Apr; 9(4): 1502–1508.
5. Xiaodan Yao, et al. Molecular biology and immunology of gastric cancer peritoneal metastasis *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2020; 5: 57.
6. Fukagawa T., Katai H., Sasajima Y., et al. Significance of lavage cytology in advanced gastric cancer patients. *World J Surg* 2010; 34:563-8.
7. 日本胃癌学会編 胃癌治療ガイドライン第5版 2018年1月 金原出版
8. Kang YK, Boku N, Satoh T, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390: 2461-71.
9. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015; 161:

205-14.

10. Ito S, Fukagawa T, Noda M, et al. Prognostic Impact of Immune-Related Gene Expression in Preoperative Peripheral Blood from Gastric Cancer Patients. *Ann Surg Oncol*. 2018; 25: 3755-63
11. Ito M, Yajima S, Suzuki T, et al. High serum PD-L1 level is a poor prognostic biomarker in surgically treated esophageal cancer. *Cancer Med*. 2019 Dec 21. doi: 10.1002/cam4.2789. [Epub ahead of print]
12. Boffa DJ, Graf RP, Salazar MC, et al. Cellular Expression of PD-L1 in the Peripheral Blood of Lung Cancer Patients is Associated with Worse Survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017; 26:1139-45.
13. Zhang X., Yin X., Zhang H., et al. Differential expressions of PD-1, PD-L1 and PD-L2 between primary and metastatic sites in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2019 Apr 16; 19(1):360. doi: 10.1186/s12885-019-5578-4.
14. Y Igarashi, et al. 胃癌における血漿 PD-L1 および PD-L2 測定の臨床的意義 帝京医学雑誌 43(1):19-29(2020)
15. Changping Wu, et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its

- clinical significance *Acta Histochem* 2006;108(1):19-24
16. T. Shigemori, et al. 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. *Annals of Surgical Oncology* 26,876–883(2019)
17. S. Eto, et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection *Gastric Cancer* 19,466–471(2016)
18. Y. Imai, K. Hasegawa, H. Matsushita, et al. Expression of multiple immune checkpoint molecules on T cells in malignant ascites from epithelial ovarian carcinoma *Oncol Lett.* 2018 May;15(5): 6457-6468.
19. 日本胃癌学会編 胃癌取扱い規約第15版 2017年10月 金原出版
20. Urabe M., Yamashita H., Seto Y., et al. Non-linear association between long-term outcome and preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients undergoing curative resection for gastric cancer: a retrospective analysis of 1335 cases in a tetrachotomous manner. *Jap Journal Clinical Oncol* 2018, 48(4) 343–349.
21. Kosaka Y, Mimori K, Fukagawa T, et al. Clinical Significance of

- Molecular Detection of Matrix metalloproteinase-1 in Bone Marrow and Peripheral Blood in Patients with Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012; Suppl 3:430-7.
22. Mimori K, Fukagawa T, Kosaka Y, et al. A large-scale study of MT1-MMP as a marker for isolated tumor cells in peripheral blood and bone marrow in gastric cancer cases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 2934-42
23. Yamaguchi H, Satoh Y, Ishigami H, et al. Peritoneal Lavage CEA mRNA Levels Predict Conversion Gastrectomy Outcomes after Induction Chemotherapy with Intraperitoneal Paclitaxel in Gastric Cancer Patients with Peritoneal Metastasis. *Annals of Surg Oncol* 2017 ;24: 3345–3352.
24. Kim JY, Kim WG, Kwon CH, et.al Differences in immune contextures among different molecular subtypes of gastric cancer and their prognostic impact. *Gastric Cancer* 2019; 22: 1164-75.
25. Gong B., Kiyotani K., Sakata S., et al. Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer. *J Exp Med*. 2019;216(4):982-1000
26. Inaba K., Yashiro T., Hiroki I. et al. Dual Roles of PU.1 in the

Expression of PD-L2: Direct Transactivation with IRF4 and Indirect

Epigenetic Regulation. J Immunol July 1, 2020, ji1901008; DOI:

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901008>

⑤ 図の説明

図 1 腹膜播種有無による腹水中細胞の PD-L1 および PD-L2 発現分布

腹膜播種有無による腹水中細胞の PD-L1 および PD-L2 発現分布を箱ひげ図に示した。PD-L1、PD-L2 の mRNA 定量（コピー数）と GAPDH との比（ $\times 10^5$ ）を算出した。Y 軸は常用対数を用いた。

図 2 根治手術症例における腹水中細胞の PD-L1 発現による生存曲線（全生存率）

腹水中細胞の PD-L1 高発現群と低発現群の全生存率には有意差がなかった($p=0.363$)。

図 3 根治手術症例における腹水中細胞の PD-L1 発現による生存曲線（無再発生存率）

腹水中細胞の PD-L1 高発現群と低発現群の無再発生存率には有意差がなかった($p=0.368$)

図 4 根治手術症例における腹水中細胞の PD-L2 発現による生存曲線（全生

存率)

腹水中細胞の PD-L2 高発現群の方が低発現群よりも全生存率において良好であった($p=0.023$)。

図 5 根治手術症例における腹水中細胞の PD-L2 発現による生存曲線(無再発生存率)

腹水中細胞の PD-L2 高発現群の方が低発現群よりも無再発生存率において良好であった ($p=0.025$)。

図 6 根治手術症例における腹水中細胞の PD-L2 発現による生存曲線(全生存率):ステージ別

腹水中細胞の PD-L2 発現による全生存率を各ステージ別に解析すると、ステージ I と II では全体の解析と同様に高発現群の方が良好であったが、統計的な有意差はなかった。ステージ III では生存曲線も同等で、差は見られなかった。

⑥ 英文抄録

(Background)

Gastric cancer is one of most frequent malignancy in East Asia. Nivolumab has been used for metastatic gastric cancer in Japan from 2017 as an

immunotherapeutic agent. Nivolumab can block the binding between PD-1 of lymphocyte and PD-L1, PD-L2 of tumor cell. The expression of PD-L1, PD-L2 in the serum and tumor tissue of gastric cancer patients have been investigated in some reports, but its clinical significance is still obscure. Peritoneal dissemination is one of metastatic pattern for advanced gastric cancer, but the expression of PD-L1, PD-L2 in ascites has not been studied. The aim of this study is to clarify the clinical significance for PD-L1, PD-L2 expression in the ascites of gastric cancer patients.

(Methods)

A total of 610 gastric cancer patients between 2001-2019 were studied. The expression of PD-L1, PD-L2 in ascites were investigated by RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) method.

(Results) 1. The expression of PD-L1, PD-L2 was lower for the patients with peritoneal dissemination than without. 2. For the patients who underwent curative surgery, overall and relapse free survival of the patients with high PD-L1, PD-L2 expression was better than those with low expression.

(Conclusions) 1. In case of gastric cancer patients with peritoneal dissemination, the expression of PD-L1, PD-L2 in ascites was not high. 2.

The high expression of PD-L2 in ascites has a possibility of biomarker of better survival for the patients who undergo curative surgery.

⑦ 表：別添え

⑧ 図：別添え

図1 腹膜播種有無による腹水中細胞のPD-L1およびPD-L2発現分布

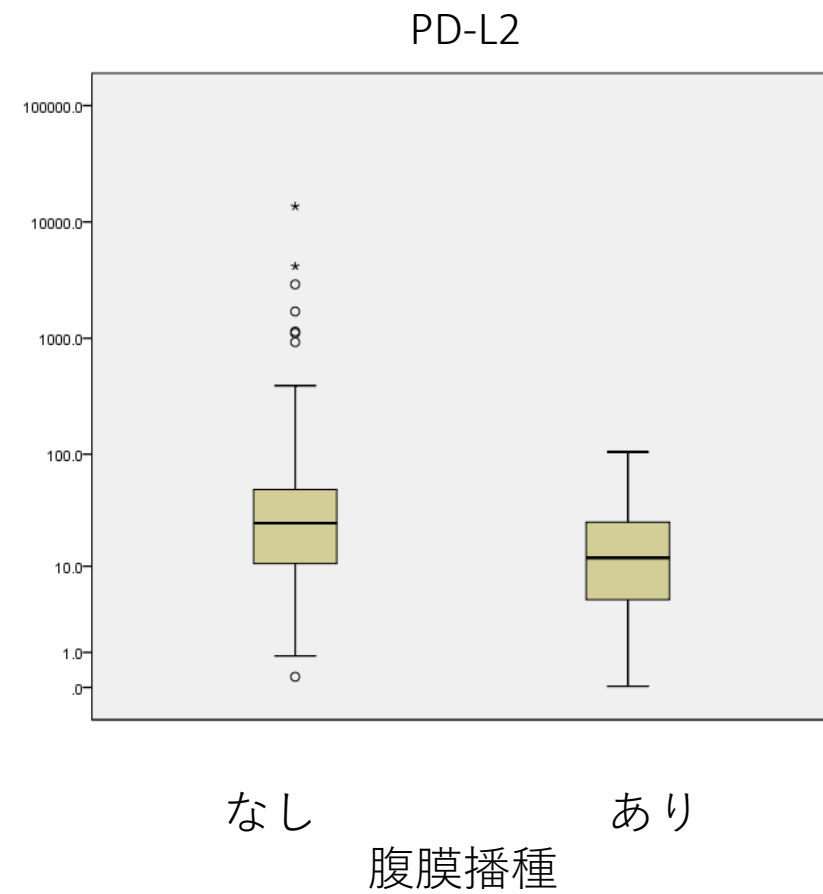
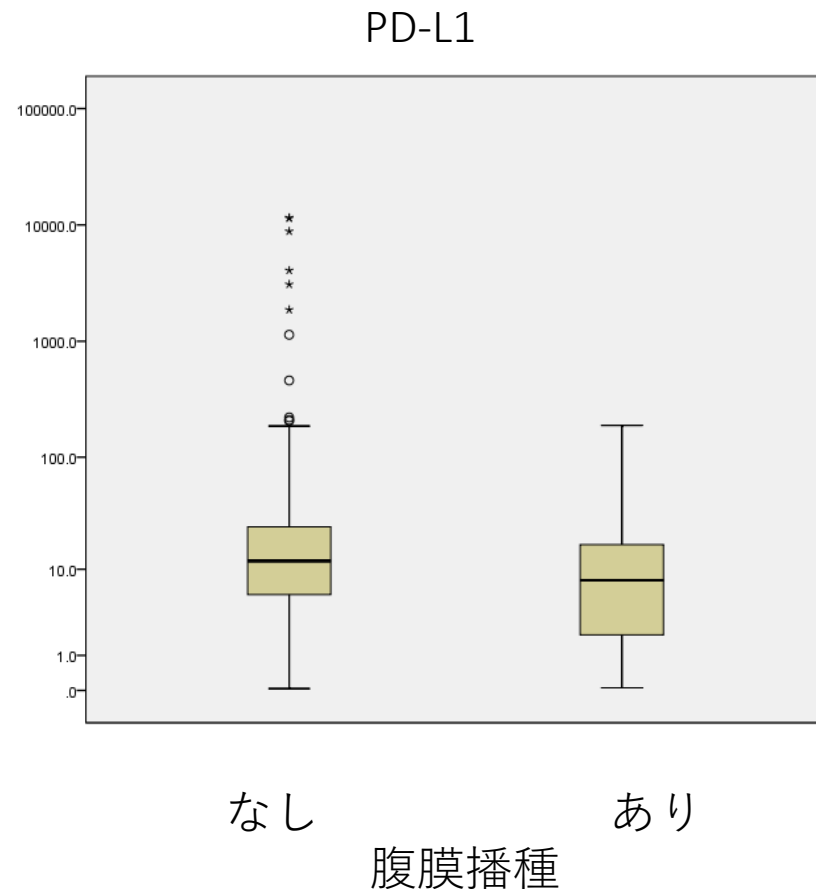


図2 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L1発現による生存曲線（全生存率）

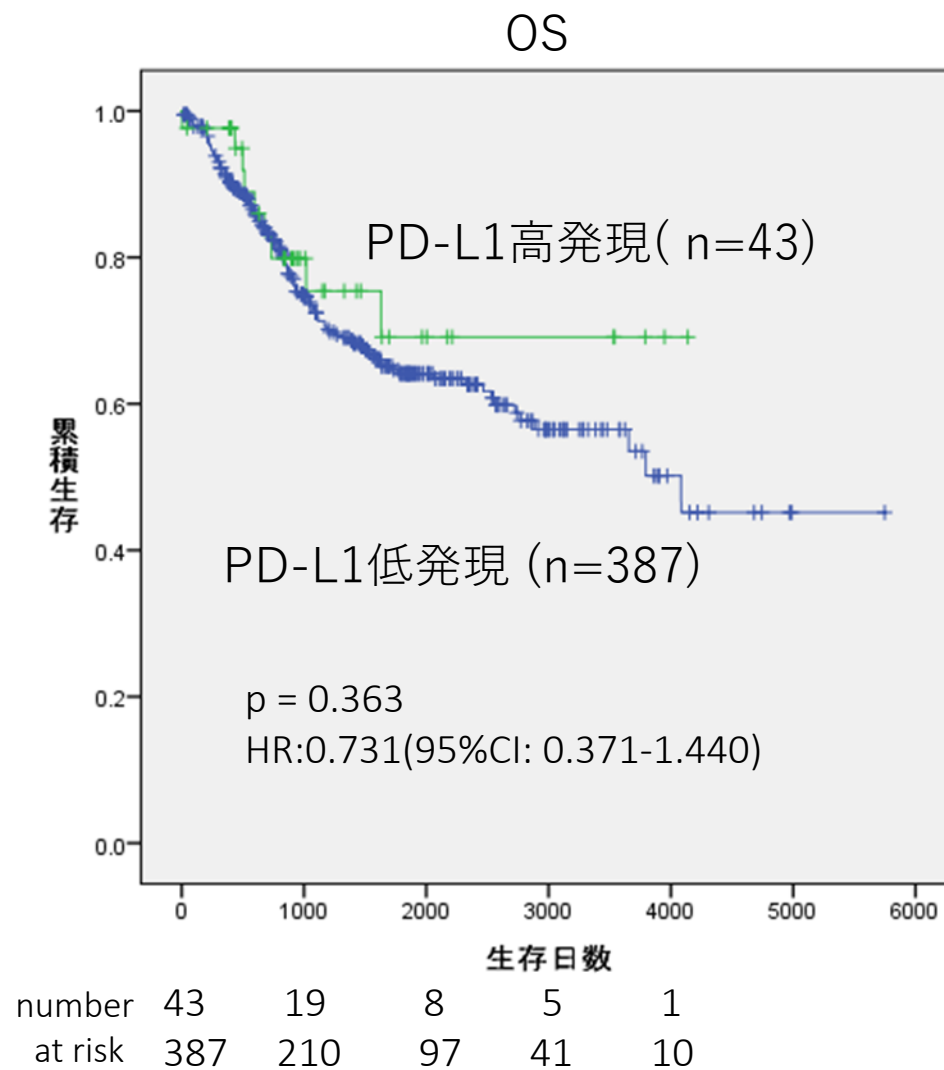


図3 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L1発現による生存曲線（無再発生存率）

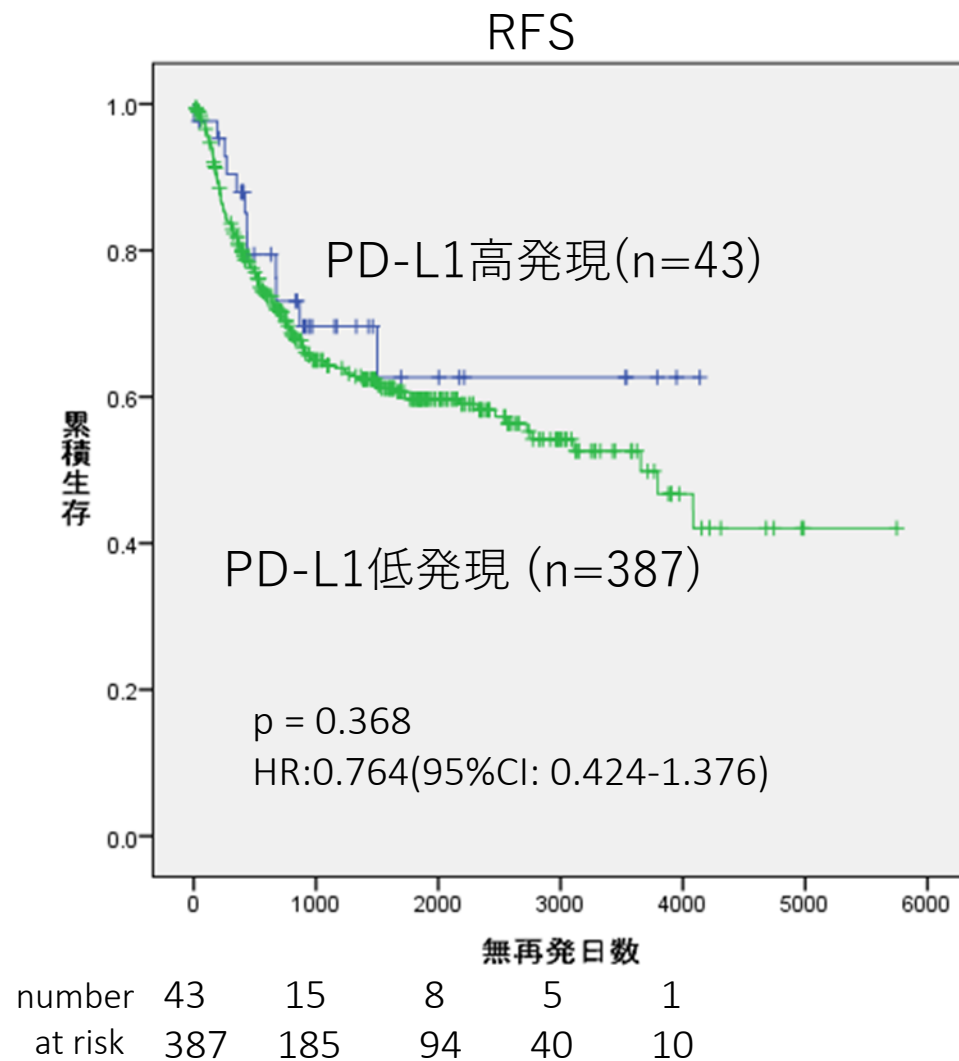
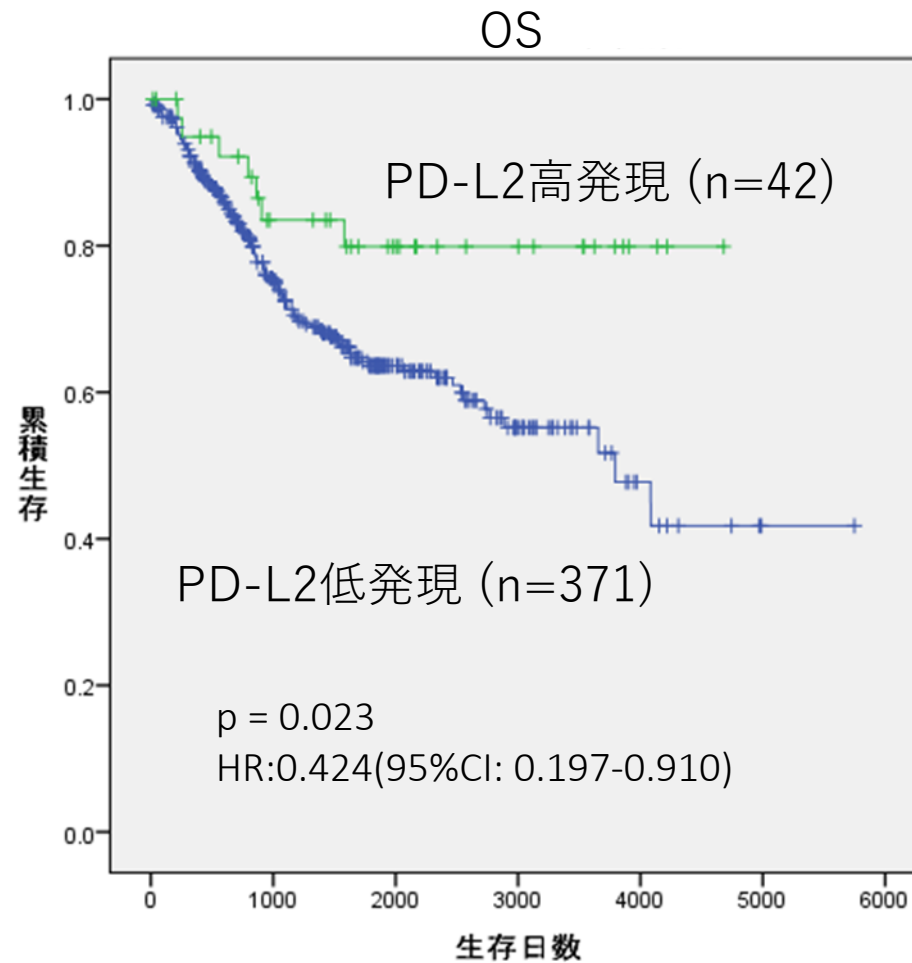


図4 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L2発現による生存曲線（全生存率）



number	42	26	17	11	3
at risk	371	201	89	35	8

図5 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L2発現による生存曲線（無再発生存率）

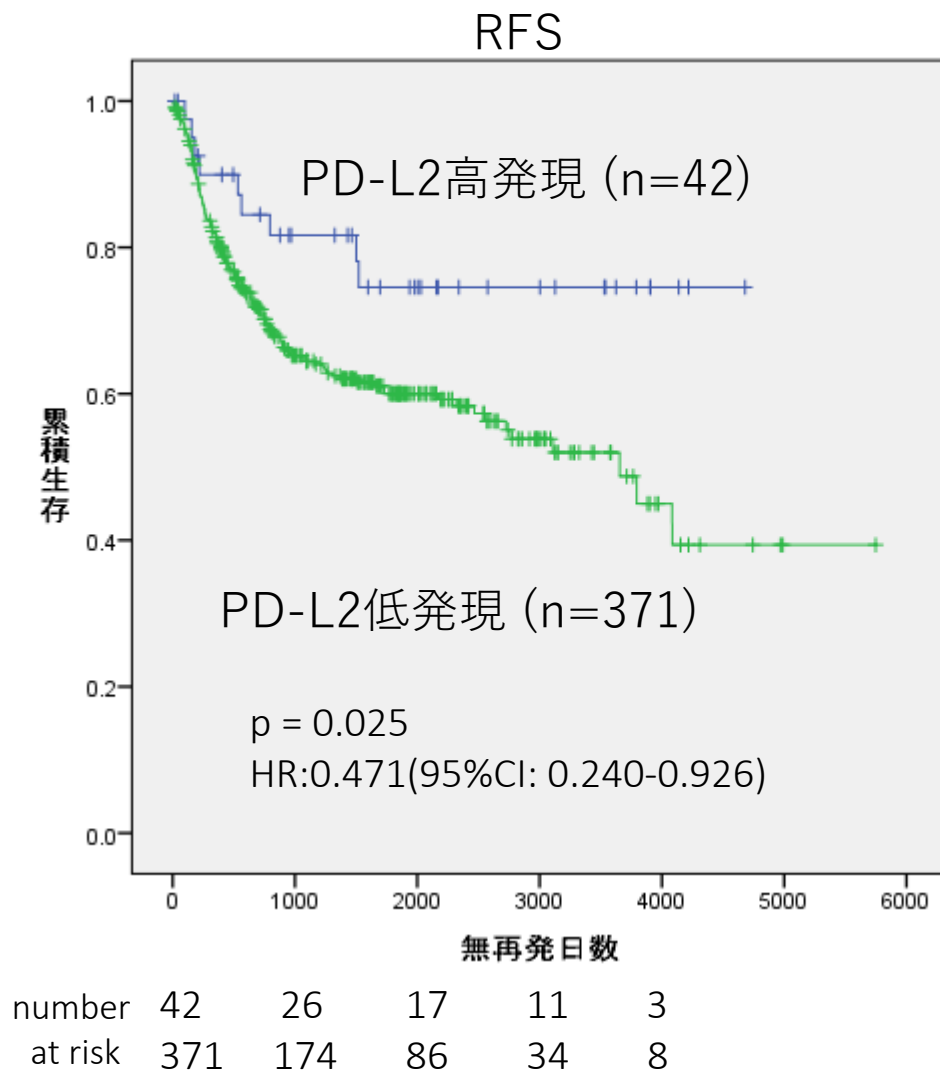
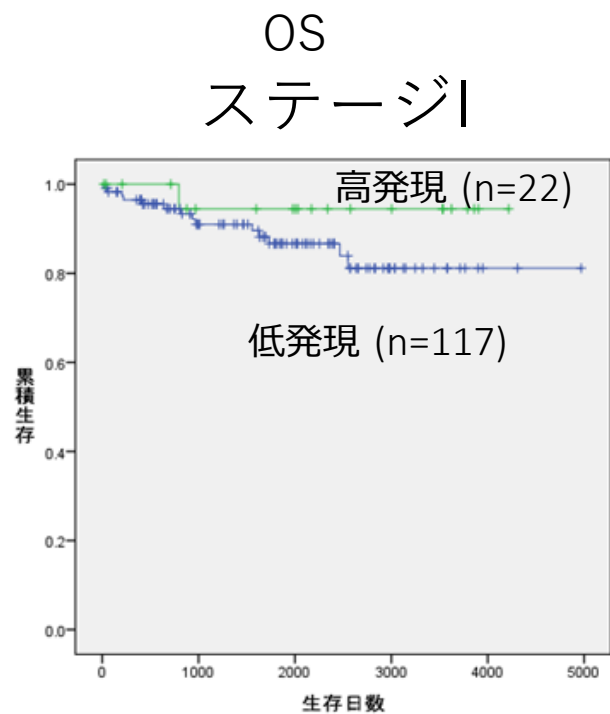
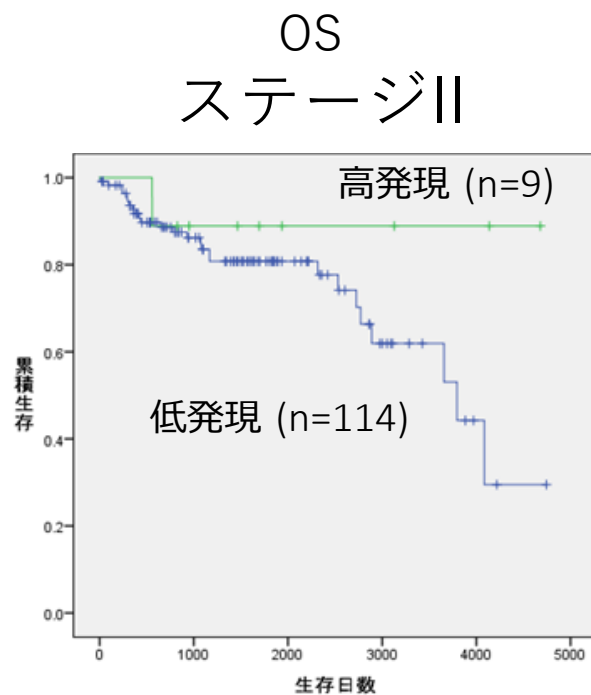


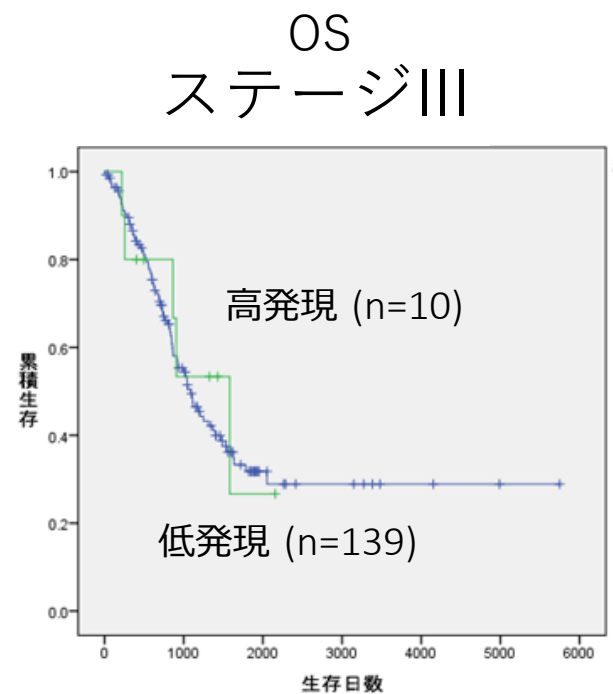
図6 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L2発現による生存曲線（全生存率）：ステージ別



$p=0.267$



$p=0.185$



$p=0.793$

表 1 腹膜播種有無によるPD-L1およびPD-L2発現の比較

			症例数	平均値 (95%CI)	中央値	標準偏差	分散	平均値の比較 P値
PD-L1	播種	なし	504	103.5 (28.7-178.3)	12.0	854.5	730186.0	0.355
		あり	82	16.0 (9.9-22.1)	7.8	28.0	782.5	
PD-L2	播種	なし	485	92.6 (33.1-152.1)	24.8	667.2	445198.3	0.331
		あり	81	20.3 (15.2-25.4)	12.0	23.2	538.0	

表 2 洗浄細胞診によるPD-L1およびPD-L2発現の比較

			症例数	平均値 (95%CI)	中央値	標準偏差	分散	平均値の比較 P値
PD-L1	細胞診	陰性	483	103.4 (29.1-177.8)	12.1	852.0	725890.8	0.369
		陽性	71	13.1 (8.7-17.6)	6.2	19.0	361.9	
PD-L2	細胞診	陰性	489	91.2 (32.1-150.2)	24.7	664.4	441429.7	0.360
		陽性	71	18.8 (12.1-25.5)	8.1	28.3	802.8	

表3 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L1およびPD-L2 発現と臨床病理因子との相関

	PD-L1 low	PD-L2 high	P値	PD-L2 low	PD-L2 high	P値
年齢（平均）	70.1	74.9	0.004	70.0	73.5	0.042
性別 男性	272	32(10.5%)		265	28(9.6%)	
女性	117	11(8.6%)	0.255	110	14(11.3%)	0.251
ステージ I	126	14(10.0%)		117	22(15.8%)	
II	117	15(11.4%)		115	9(7.3%)	
III	143	13(8.3%)	0.835	140	10(6.7%)	0.040
深達度 m/sm	100	13(11.5%)		92	19(17.1%)	
mp/ss	191	16(7.7%)		183	17(8.5%)	
se/si	93	13(12.3%)	0.352	95	5 (5.0%)	0.008
リンパ節転移 無	166	18(9.8%)		159	18(10.2%)	
有	220	24(9.8%)	0.985	213	23(9.7%)	0.374
組織型 分化型	185	24(11.5%)		182	21(10.3%)	
低分化型	202	19(8.6%)	0.319	191	21(9.9%)	0.505
リンパ管侵襲 なし	153	19(10.5%)		147	16(9.8%)	
あり	236	25(9.6%)	0.748	228	26(10.2%)	0.515
静脈侵襲 なし	136	13(8.7%)		130	15(10.3%)	
あり	253	30(10.6%)	0.775	245	27(9.9%)	0.939

深達度 m:mucosa, sm;submucosa, mp: muscularis propria, ss: subserosa, se: serosa exposed, si:serosa infiltrating

表4 根治手術症例における腹水中細胞のPD-L1およびPD-L2が予後に与える影響

因子	P値	HR	95% CI	
PD-L1 高発現 / 低発現	0.430	1.415	0.597	3.352
PD-L2 高発現 / 低発現	0.259	1.581	0.713	3.505
ステージ I.II / III	<0.001	3.767	2.504	5.667
年齢 (<72 / ≥72)	0.060	1.446	0.985	2.123
組織型 (分化型/低分化型)	0.654	1.087	0.755	1.565
リンパ管侵襲 (無/有)	0.044	1.676	1.015	2.767
静脈侵襲 (無/有)	0.019	1.847	1.108	3.079