

169. 食道癌免疫チェックポイント機構の分子機序の解明

中島 雄一郎

*九州大学病院 消化管外科

Key words : 食道扁平上皮癌, PD-L1, 免疫チェックポイント機構, 上皮間葉移行, ZEB1

緒言

食道癌は主に2つの病理学的組織型よりなり、食道扁平上皮癌 (ESCC) と食道腺癌で構成される。ESCC はアジア諸国で多いとされており、本邦では ESCC は食道腺癌の 26 倍の頻度とされている¹⁾。

PD-1 は活性化した T 細胞、B 細胞、NK 細胞により誘導され、免疫寛容の調整に重要な役割を担う。二つの PD-1 に対するリガンド (PD-L1、PD-L2) が認識されている²⁾。PD-L1 は様々なヒトの腫瘍に発現し、癌において宿主免疫回避機構の重要な役割を担う。さまざまな悪性疾患において PD-L1 の発現は予後不良因子として報告されている³⁾。最近の臨床試験では、PD-1 と PD-L1 との間の相互作用を阻害する抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体療法は癌患者の予後を改善する可能性が期待されている。

上皮細胞が極性と細胞間の接着能を失い、浸潤能を獲得し、間葉系の表現型へと変化する過程である上皮間葉移行 (EMT) は癌の浸潤・転移に重要とされている⁴⁾。多くの癌において、HGF、EGF、PDGF と TGF- β など腫瘍間質から産生される EMT 刺激シグナルは、癌細胞内の Snail、Slug、zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1)、Twist、FOXC2 といった EMT 誘導転写因子の誘導や機能活性化に関与する⁵⁾。

我々は ESCC において PD-L1 の発現は悪性度と予後に関連することを報告してきたが⁶⁾、ESCC における PD-L1 発現のメカニズムと形式はすべては明らかにはなっていない。今回我々は PD-L1 遺伝子のプロモーター領域に ZEB1 の結合領域が存在することから、PD-L1 発現は転写因子である ZEB1 によって調整されていると推測した。本研究の目的は ESCC において、PD-L1 発現と EMT の関係性、また臨床病理学的特徴を明らかにするものである。

方法

1. 患者

九州大学大学院消化器・総合外科において 1997 年から 2005 年に術前無治療で食道切除術を施行された 90 例 (平均 62.7 歳) を対象とした。本研究は九州大学倫理審査委員会によって承認された (認定番号: 27-397)。

2. 免疫組織化学染色と染色の評価

免疫組織化学染色 (IHC) には PD-L1 rabbit polyclonal 抗体 (1:200; Lifespan Bioscience, Seattle, WA, USA)、ZEB1 IgG mouse monoclonal 抗体 (1:150; Origene, Rockville, MD, USA)、CD8 抗体 (1:100; DAKO, Santa Clara, CA, USA)、E-cadherin 抗体 (1:1000; TAKARA BIO, Siga, Japan) を使用した。

4 μ m に薄切された切片をキシレンにて脱パラフィン後、エタノールにて脱水した。抗原賦活のために PD-L1 (121°C, 10 min, in 0.01 M citrate buffer; pH 6.0) and ZEB1 (121°C, 20 min, in Target EDTA, pH 9.0)、and CD8 (121°C, 20 min, in 0.01 M citrate buffer; pH 6.0) , E-cadherin (121°C, 15 min, in 0.01 M citrate buffer; pH 6.0) の条件にてオートクレーブ処理を行った。0.3%過酸化水素水にて 30 分間内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングを施行した。非特異的ブロッキングの後に PD-L1、ZEB1、CD8、E-cadherin の一次抗体を用いて、4°C、一晚反応させた。二次抗体反応は EnVision system と DAB kits (DAKO) を用いた。PD-L1、ZEB1、CD8、E-cadherin の発現レベルは 1 人の病理医を含めた 2 人で評価した。PD-L1 の発現は以前の報告のように腫瘍先進部での腫瘍細胞の細胞膜と細胞質の染色の程

*現所属：九州大学大学院 消化器・総合外科

度を評価した¹⁰⁾。腫瘍先進部はヘマトキシリン染色の所見を基に腫瘍の最深達層を評価した。本研究では他のいくつかの報告に基づき、腫瘍細胞の5%以上が染色されたものをPD-L1陽性と判定した。ZEB1は腫瘍先進部のPD-L1と同部位における細胞核の染色数をカウントし、評価した。ZEB1陽性腫瘍細胞の合計個数はhot spot領域の3高倍率視野(3HPFs)をカウントし、ZEB1陽性腫瘍細胞がすべての腫瘍細胞に占める割合を測定した。CD8陽性腫瘍浸潤リンパ球の個数も3HPFsにて行い、低発現、高発現にて層別化した。本研究ではZEB1とCD8のカットオフ値はそれぞれの発現の平均値とし、ZEB1は6.9%であり、CD8はそれぞれのHPSあたり50個がカットオフ値であった。ZEB1^{28,29}とCD8³⁰⁻³²のIHCを行った以前の報告はあるが、一定の定まったカットオフ値は存在しない。そのため本研究では、我々は90例の発現の平均値をカットオフ値と定めた。E-cadherinは以前の報告に基づき、下記のように評価した。腫瘍細胞の膜染色が正常細胞の膜染色よりも強いものを陽性とし、一方、弱いものを陰性とした。

3. 細胞培養と transfection アッセイ

我々は、それぞれ低分化、高分化、中分化、中分化のヒトESCC細胞株であるTE5、6、8、11を用いた。細胞はRPMI-1640培地に20%胎児ウシ血清(FBS)を添加した培地にて培養し、37°C、5%CO₂下にて管理した。TE5、6、11細胞株は上皮系の性質であり、TE8はEMTの性質であった。

siRNA transfectionにおいて、TE8は6-well plate (0.25×10⁶ cells per well)に散布し、取扱説明書に準じてLipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて30 pmolのsiRNAを48時間transfectionした。ZEB1に対するsiRNAsはStealth siRNAsのHSS110548とHSS186235(それぞれZEB1-1、ZEB1-2)(Thermo Fisher Scientific)を用いた。TwistとSnailに対するsiRNAsは、HSS144372とHSS186975(それぞれTwist-1、Twist-2)、またHSS143995、HSS143996(それぞれSnail-1、Snail-2)を用いた。

Stealth RNAi™ siRNA negative controlをnontargeting (NT) siRNAとして用いた。TE8細胞ではIFN- γ (R&D system, Minneapolis, MN, USA)を5 ng/mlにて用いた。TGF- β 1 treatmentではTE5、TE6、TE11を6-well plate (0.25×10⁶ cells per well)に散布し、recombinant TGF- β 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を20 ng/mLで96時間treatmentした。

4. Quantitative real-time PCR (q-PCR)

mRNA発現レベルはTaqMan qPCRを用いて測定した。Total RNAはSuperScript® III First-strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)を用いて、cDNAへ合成された。リアルタイムPCRはStepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、反応はそれぞれ3回の独立した実験にて行われた。ハウスキーピング遺伝子として β -actinを使用し、それぞれの発現レベルにおいて標準化のコントロールとした。

5. Western blot (WB) analysis

6-well dishesにて培養した細胞を回収し、300 μ lのRIPA buffer (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)に溶解した。検体を11000rpm、30分、4°Cにて遠心分離を行った。iBind™ Western System (Invitrogen)を用いて、撮影にはAmersham Imager600 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)を使用した。1次抗体は β -actin (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA, 1:1000)、ZEB1 (Origene, clone 3G6, 1:1000)、E-cadherin (Cell Signaling Technologies, 1:1000)、Vimentin (Cell Signaling Technologies, 1:1000)を使用した。

6. Flow cytometry analysis (FACS)

細胞はPD-L1マウス monoclonal 抗体 (Biolegend, San Diego, CA, USA)、ZEB1マウス monoclonal 抗体 (Novusbio, Littleton, CO, USA)にて染色を行い、isotypeコントロールとしてそれぞれmouse IgG2b, κ (Biolegend) and IgG1 (Novusbio)を使用した。細胞膜染色ではPD-L1抗体とisotypeコントロールを用いて30分、4°Cインキュベートした。解析の前に7-aminoactinomycin D (Thermo Fisher Scientific)を加えた。細胞内染色ではFixationとPermeabilization Solution (BD Biosciences, Franklin, MA, USA)にて細胞固定を行い、取扱説明書に準じて処理を行った。細胞は20分、4°Cで固定を行い、Perm/Wash buffer (BD Biosciences)にて2回洗浄した。細胞はZEB1抗体とisotypeコントロールで30分、4°Cで染色した。Perm/Wash bufferで洗浄し、FACS bufferで再懸濁した。蛍光データはCell Sorter SH800 (Sony, Tokyo, Japan)を使用し、解析にはFlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)を用いた。

7. 統計学的解析

in vitro 実験において、量的実験データは平均標準偏差として示されている。2 群間の差異はスチューデント t 検定とカイ二乗検定を用いた。カプラーマイヤー曲線は全生存、無再発生存に対して使用し、統計学的有意差はログランク検定を用いた。P 値 < 0.05 を統計学的有意とした。全ての解析は JMP9.0 software (SAS Institute) を使用した。

結果

1. 腫瘍先進部での PD-L1 発現と臨床病理学的因子、予後との相関

IHC の評価では PD-L1 は ESCC 切片の腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現していた。ESCC の 90 例において、腫瘍先進部での PD-L1 発現陽性は 57 例 (63.3%) に認めた。CD8 陽性リンパ球浸潤の高発現は 40 例 (44%) に認めた (図 1)。予後解析では PD-L1 陽性群は全生存率、無再発生存率の両者で予後不良であった。PD-L1 陽性群の 5 年全生存率は陰性群に比べ、有意に予後不良であった (39.2% vs. 67.0%, $P = 0.0112$)。PD-L1 陽性群の 5 年無再発生存率もまた陰性群に比べ、有意に予後不良であった (22.4% vs. 57.8%, $P = 0.0040$) (図 2)。

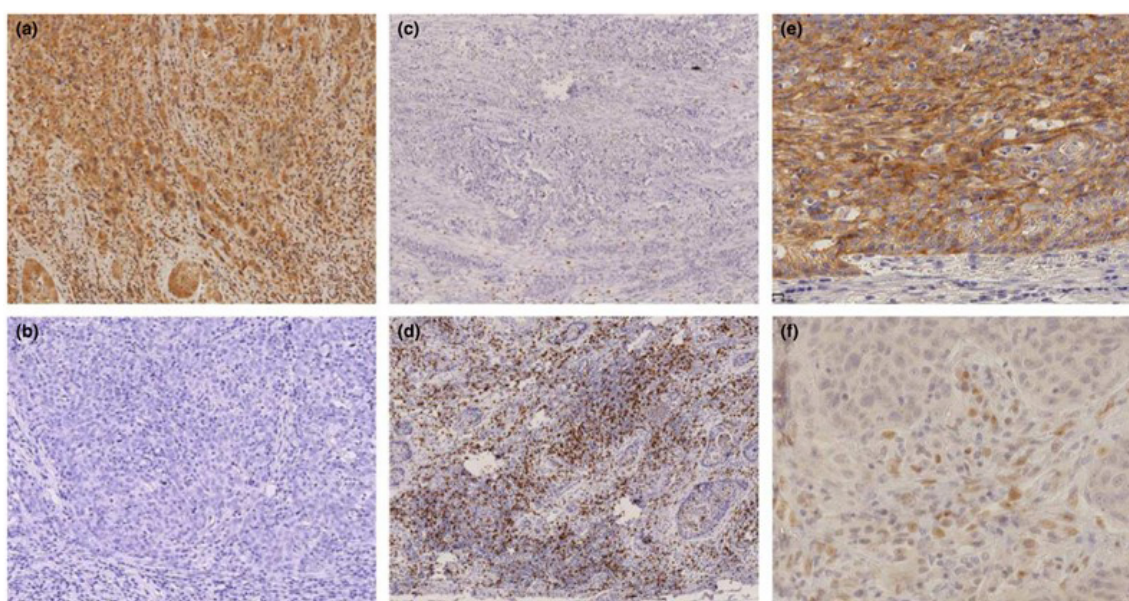


図 1. 食道扁平上皮癌の腫瘍先進部における PD-L1、ZEB1、E-cadherin、CD8 の発現

PD-L1 抗体 (a : 陽性、b : 陰性)、CD8 抗体 (c : 低発現、d : 高発現)、E-cadherin 抗体 (e : 高発現)、ZEB1 (f : 高発現) の免疫組織化学染色画像。

2. ZEB1 と PD-L1 発現の相関

ZEB1 発現は腫瘍先進部の PD-L1 と同部位での腫瘍細胞の細胞核陽性染色個数のカウントによって評価した。ZEB1 の高発現は 37 例 (41.1%) であった。ZEB1 発現による臨床病理学的因子の比較検討は付録表 2 に示されている。ZEB1 高発現は腫瘍深達度 ($P = 0.005$) と EMT ($P = 0.0006$) と有意な相関を認めた。予後解析では ZEB1 高発現群は有意に全生存率が不良であり、無再発生存率も不良な傾向にあった。ZEB1 高発現、低発現群の 5 年全生存率はそれぞれ 36.2% と 60.1% であった ($P = 0.0271$)。ZEB1 高発現、低発現群の 5 年無再発生存率はそれぞれ 32.0% と 38.3% であった ($P = 0.1836$)。ZEB1 高発現群において、PD-L1 陽性群と陰性群はそれぞれ 76% と 24% であり、ZEB1 と PD-L1 発現に正の相関を認めた ($P = 0.0397$)。PD-L1 と ZEB1 の発現によって 4 群に分類すると PD-L1 陽性かつ ZEB1 高発現群は全生存 ($P = 0.0240$)、無再発生存 ($P = 0.0328$) においても有意に予後不良であった (図 2)。

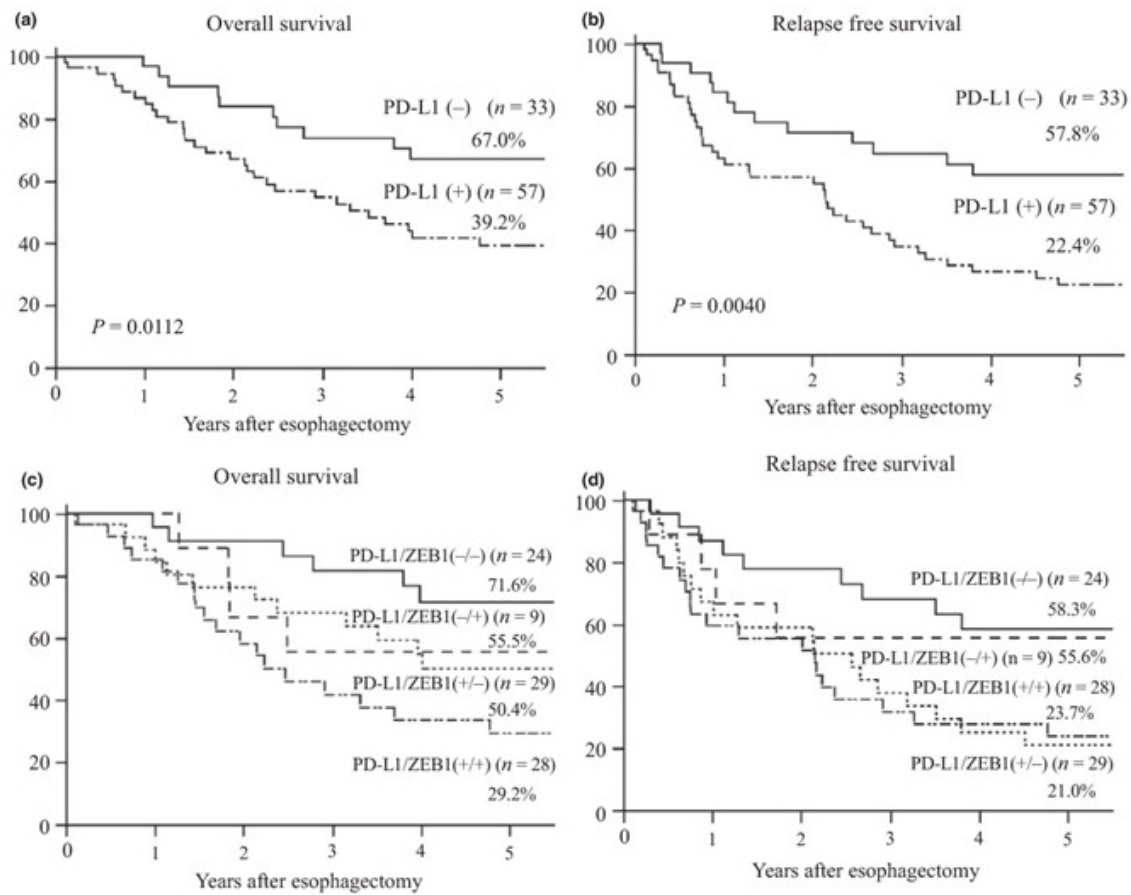


図2. 食道扁平上皮癌患者のPD-L1とZEB1発現による予後曲線

食道扁平上皮癌患者のPD-L1発現の状態による (a) 全生存率、(b) 無再発生存率。PD-L1とZEB1発現による (c) 全生存率、(d) 無再発生存率。

3. siZEB1によるPD-L1発現の抑制

TE5、6、8、11細胞株において、PD-L1、ZEB1、E-cadherin、Vimentin、TGF- β 1 mRNA発現を測定した。またZEB1、E-cadherin、Vimentin蛋白の発現をWB法にて解析した(図3)。PD-L1 mRNA発現レベルは全ての細胞株でほとんど変わらなかった。ZEB1とTGF- β 1 mRNA発現はTE8が他の細胞株に比べ高かった。TE8はEMTの性質を示し、紡錘状の形態を呈し、間葉系マーカーであるVimentinが高発現しており、上皮系マーカーであるE-cadherinが低発現であった。一方、TE5、TE6、TE11は上皮系の性質であり、敷石状の形態を呈し、上皮系マーカーであるE-cadherinが高発現しており、間葉系マーカーであるVimentinが低発現であった。

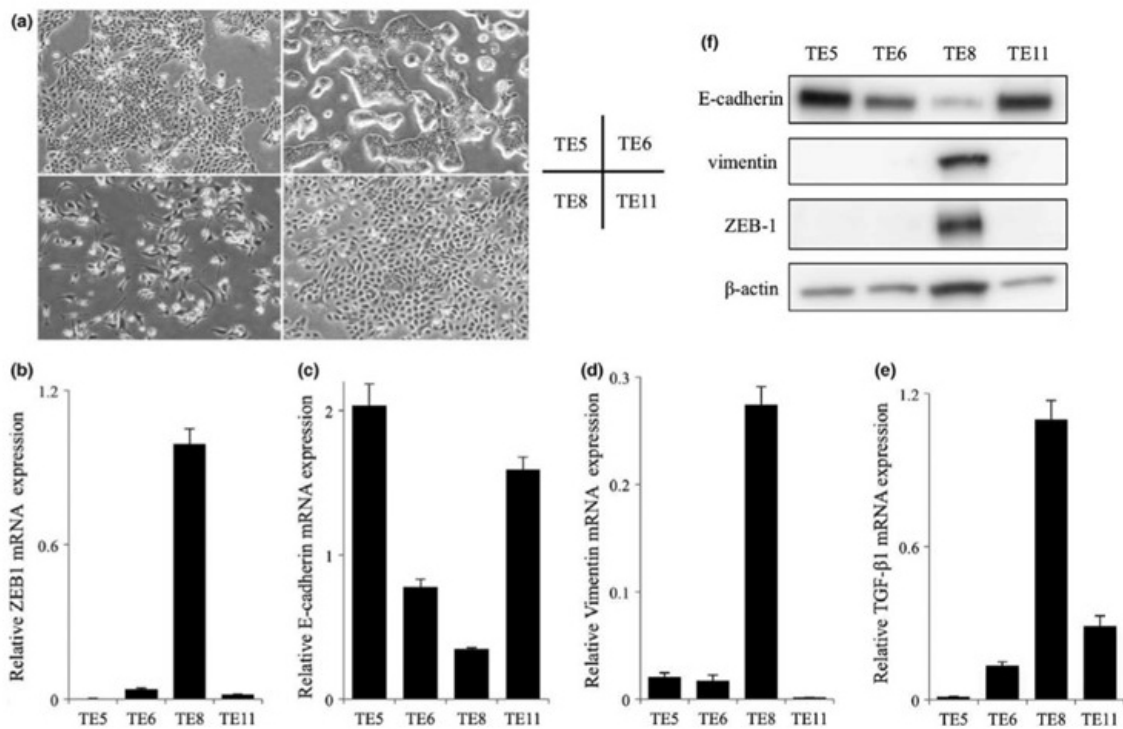


図3. 食道扁平上皮癌細胞株の特徴

(a) TE5、TE6、TE8、TE11 細胞株の形態学的特徴。TE5、TE6、TE11 は上皮系の特徴を呈する。TE8 は EMT の特徴を呈する。(b-e) TE5、TE6、TE8、TE11 細胞株における ZEB1、E-cadherin、Vimentin、TGF- β 1 mRNA 発現の解析。(f) TE5、TE6、TE8、TE11 細胞株における ZEB1、E-cadherin、Vimentin の Western blotting による解析。

次に PD-L1 と E-cadherin の mRNA 発現は EMT 誘導転写因子である ZEB1、Twist、Snail によってどのような影響を受けるかを TE8 細胞株において q-PCR を用いて検討した (図 4)。ZEB1 (siZEB1-1, siZEB1-2)、Twist (siTwist-1, siTwist-2)、Snail (siSnail1, siSnail-2) に対する siRNA を使用した。TE8 において siZEB1 は non-targeting (NT) siRNA と比較して、ZEB1 と PD-L1 mRNA 発現を抑制し、E-cadherin mRNA 発現を亢進した。一方、siTwist と siSnail はそれぞれ Twist と Snail の mRNA 発現は抑制したが ($P < 0.001$)、PD-L1 mRNA 発現は抑制しなかった。

FACS を用いて、PD-L1 と ZEB1 の細胞膜、細胞内の発現を測定した。TE8 において PD-L1 の細胞膜発現は低く、ZEB1 の PD-L1 に対する影響をより明確に調べるために siZEB1 導入した TE8 細胞に IFN- γ 処理 (5 ng/ml) を行った。FACS 解析により siZEB1 は細胞内の ZEB1 発現を抑制することが示された。また siZEB1 によって、細胞膜の PD-L1 発現も抑制された。siZEB1 は E-cadherin 発現を亢進したが、Vimentin 発現は変化しなかった。この結果から ESCC 細胞株において、ZEB1 は PD-L1 発現を調整していることが示唆された。

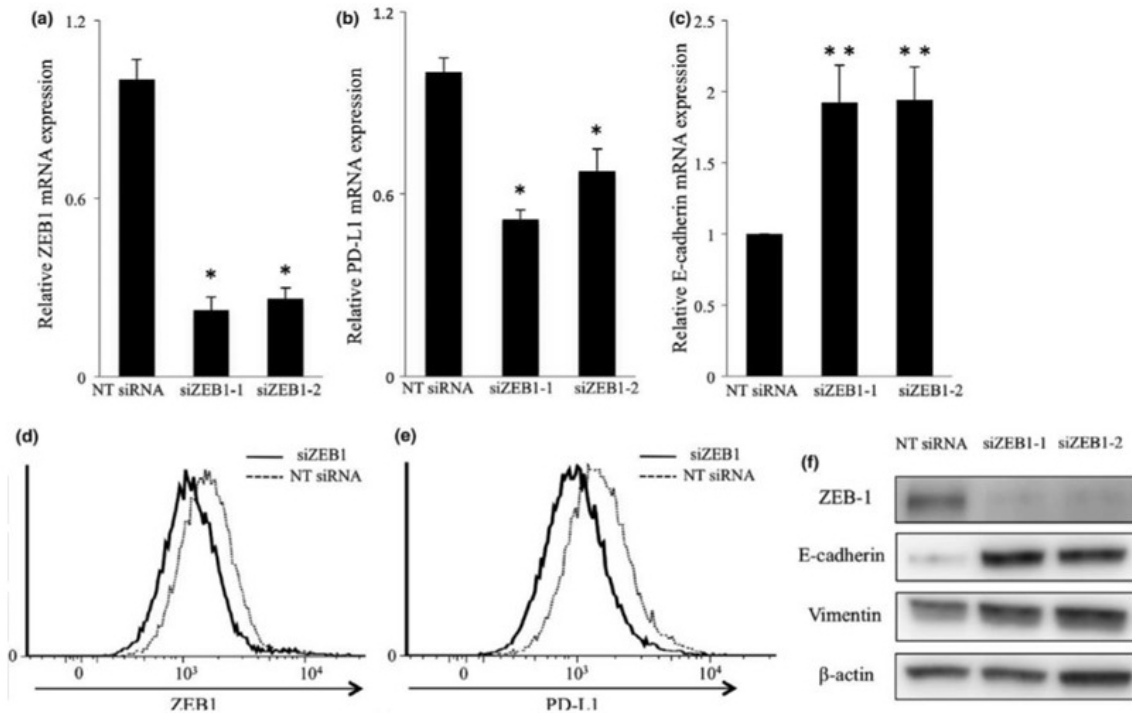


図4. TE8細胞株におけるZEB1によるPD-L1発現調整

TE8細胞株をZEB1に対するsiRNAまたはNontargeting (NT) siRNAにて48時間処理し、(a) ZEB1、(b) PD-L1、(c) E-cadherinのmRNA発現レベルをquantitative real-time PCRにて測定した。結果はNT siRNAにて処理した細胞のmRNA発現レベルを基準とした(任意に1と定義した)(*P < 0.001, **P < 0.05)。(d, e) NT siRNA、またsiZEB1をIFN- γ 刺激処理をした細胞の(d) ZEB1の細胞内発現と(e) PD-L1の細胞膜発現。(f) NT siRNA、またsiZEB1をIFN- γ 刺激処理をした細胞のWestern blottingによる蛋白発現の解析。

4. TGF- β 1によるEMTとPD-L1発現の誘導

上皮癌においてEMTを強力に誘導するTGF- β を投与して検討した(図5)。上皮系の形質を有するTE5、TE6、TE11細胞株を96時間TGF- β 1にて処理すると、敷石状の上皮系の形態から紡錘状の間葉系の形態へと変化した。WB解析ではE-cadherin低発現、VimentinとZEB1の高発現への変化を認めた。FACSによる細胞膜のPD-L1発現を測定したところ、PD-L1発現はTE5、TE6、TE11細胞において明らかな増加を認めた。これらの結果から敷石状の間葉系の表現型をもつESCC細胞株において、TGF- β 1はZEB1発現を誘導し、さらにEMTの表現型へと変化させ、細胞膜のPD-L1高発現を導くことが示された。

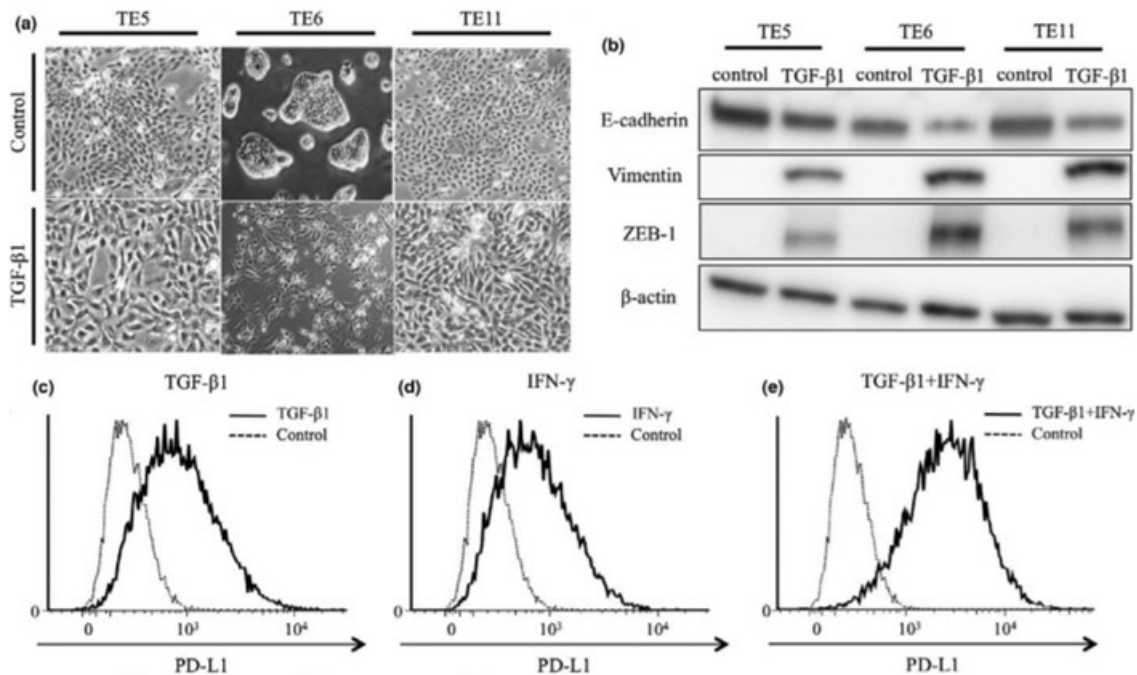


図5. 食道扁平上皮癌細胞株において、TGF- β 1によって誘導されるZEB1、PD-L1発現と形態学的変化

TE5、TE6、TE11細胞株はTGF- β 1にて96時間処理した。(a) TGF- β 1にて96時間処理したTE5、TE6、TE11の形態学的変化。(b) TGF- β 1にて96時間処理した細胞のWestern blottingによる蛋白発現の解析。(C~E) TE6細胞株をTGF- β 1とIFN- γ にて処理した際のPD-L1細胞膜発現のFACS解析。

考 察

多種類のヒトの癌においてPD-L1発現について多くの報告がある^{2,3)}。しかしながら、ESCCにおけるPD-L1発現のメカニズムと様式はほとんど明らかではない。この研究では、我々はESCCの腫瘍先進部でのPD-L1発現に着目した。我々のデータではESCCにおいて、腫瘍先進部での高発現はstageの進行と予後不良に関連し、最深部におけるPD-L1発現の状態はESCCの悪性度の重要な予測因子になりうる可能性を示唆している。

腫瘍のPD-L1過剰発現患者は抗PD-1/PD-L1抗体による治療によって、臨床予後が改善された⁷⁾。それゆえに、PD-L1高発現はPD-1/PD-L1による免疫療法の効果予測因子になりうるかもしれない。我々はESCCの先進部での免疫応答を評価するためにCD8発現を評価した。癌組織における宿主免疫応答を制限する一つのメカニズムはPD-L1のupregulationを介しており、抗原特異的CD8陽性T細胞でのPD-L1のPD-1への結合であり、それらは自然免疫と獲得免疫抵抗性の二つのメカニズムによって制御されている。いくつかの報告ではCD8陽性T細胞とPD-L1発現の相関は正の相関、または逆相関関係と示されている。この違いは病理学的切片の着目領域の差異による結果かもしれない。本研究では癌組織の先進部に着目したために、CD8陽性T細胞浸潤はPD-L1発現と逆相関の関係にあった。この統計学的結果とは別に、いくつかの症例において、EMT変化を起こしていない腫瘍細胞でのPD-L1高発現もまたCD8陽性リンパ球浸潤との関連を認めた(データ掲載なし)。これらの結果から、ESCCにおける獲得免疫抵抗性の制御下において、PD-L1発現に対する少なくとも二つの異なる経路があると考えられた。ひとつはCD8陽性浸潤リンパ球を介してIFN- γ がPD-L1のupregulationを誘導する経路であり、もう一方はTGF- β を介してEMTと関連してPD-L1を発現する経路である。IFN- γ とTGF- β の両者がTE細胞株のPD-L1発現をupregulateするという我々の*in vitro*によるデータはこの仮説を支持している。それゆえに癌細胞においてPD-L1発現過程の獲得免疫抵抗性はESCCの先進部での腫瘍発育を加速させているかもしれない。

EMTは癌の転移と浸潤に関係し、ESCCにおいてEMTは明らかに癌の浸潤、転移、予後に関連している。様々な癌においてPD-L1発現とEMTの関係を示したいくつかの報告がある^{8,9)}。皮膚の上皮細胞において、E-cadherinのdownregulationとSlug、Twistのupregulationを介してPD-L1はEMTの促進の過程で機能することが報告された⁸⁾。他の報告では特にClaudin-lowサブタイプの乳癌細胞において、EMTとPD-L1発現間の双方向性の影響は主にPI3K/AKT経路の活性化に依存していることが報告されている⁹⁾。本研究では新たなZEB1-PD-L1経路とESCCの腫瘍先進部でのPD-L1とEMTの関連を示した。癌の転移において、転写因子であるZEB1はE-cadherinの抑制因子として作用することで、強くEMTを誘導する。PD-L1のプロモーター領域にはZEB1の結合領域が存在するために、我々はZEB1がPD-L1発現に影響を与えていると仮説をたてた(UCSC Genome Browser)。我々は本研究にてESCCの先進部におけるZEB1発現はPD-L1発現と相関があることを報告した。ESCC細胞株において、ZEB1-PD-L1経路を介してsiZEB1はPD-L1発現を抑制し、TGF- β 1はEMTを誘導した。我々のデータは転写因子であるZEB1はPD-L1シグナル経路の上流にあり、PD-L1発現を調整し、EMTを誘導すると同時に、免疫機構からの回避も引き起こすことを示した。Chenらは肺癌において、microRNA-200がPD-L1発現を標的とし、ZEB1がmiR-200の抑制を取り去り、腫瘍細胞のPD-L1がCD8陽性T細胞の免疫抑制と転移を引き起こすことを報告した¹⁰⁾。本研究ではPD-L1のプロモーター領域にはZEB1の結合領域が存在することに着目し、本研究を行った。現在までにPD-L1の遺伝子領域にZEB1結合領域があることに注目した報告はない。我々は遺伝子の結合領域の観点からPD-L1とZEB1の関連性を最初に報告した。しかしながら、我々は腫瘍の微小環境においてZEB1は二つのシグナル経路を持つと考察している。一つは遺伝子プロモーター領域を介した直接的な調整経路であり、もう一方はmiR-200を介した間接的な調整経路である。IFN- γ 、TLR、JAK/STAT、viruses等のいくつかの因子がPD-L1発現を調整している⁵⁾。PD-L1はいくつかのサイトカイン、特にIFN- γ 、また病原体関連分子構造による外生の刺激が引き金となり、炎症状態において誘導される。細胞周期、増殖、アポトーシスと生体(NF- κ B、MAPK、PI3K、mTOR、JAK/STAT)に影響を与えるレセプターを介したシグナル分子はPD-L1誘導に関与する。我々のデータではESCCにおいて、TGF- β 1がZEB1を誘導し、引き続いてPD-L1発現も誘導していることを示した。

結論として、ESCCにおいて腫瘍先進部でのPD-L1発現はZEB1発現、EMT、予後不良と関連している。我々は腫瘍免疫回避機構とEMTが協調して作用することが癌の悪性度に寄与していることを示した。ESCCのZEB1-PD-L1シグナル経路をターゲットとした治療のために、さらなる研究が必要である。

文 献

- 1) Shibata A, Matsuda T, Ajiki W, Sobue T. Trend in incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Japan, 1993-2001. *Jpn J Clin Oncol*. 2008 Jul;38(7):464-8. doi: 10.1093/jco/hyn064. PubMed PMID: 18664481.
- 2) Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2517-9. doi: 10.1056/NEJMe1205943. Epub 2012 Jun 2. PubMed PMID: 22658126.
- 3) Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1757-66. doi: 10.1002/cncr.24899. PubMed PMID: 20143437.
- 4) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54. Review. PubMed PMID: 12189386.
- 5) Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*. 2008 May 30;283(22):14910-4. doi: 10.1074/jbc.C800074200. Epub 2008 Apr 14. PubMed PMID: 18411277; PubMed Central PMCID: PMC3258899.
- 6) Ito S, Okano S, Morita M, Saeki H, Tsutsumi S, Tsukihara H, Nakashima Y, Ando K, Imamura Y, Ohgaki K, Oki E, Kitao H, Mimori K, Maehara Y. Expression of PD-L1 and HLA Class I in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Factors for Patient Outcome. *Ann Surg Oncol*. 2016 Aug;23(Suppl 4):508-515. Epub 2016 Jul 5. PubMed PMID: 27380638.
- 7) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443-54. doi: 10.1056/NEJMoal200690. Epub 2012 Jun 2. PubMed PMID: 22658127; PubMed Central PMCID: PMC3544539.
- 8) Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, Ritprajak P, Hashiguchi M, Hirose S, Azuma M. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Res*. 2011 Feb 15;71(4):1235-43. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2217. Epub 2010 Dec 15. PubMed PMID: 21159661.

- 9) Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, Fitwi H, Tulbah A, Al-Tweigeri T, Al-Alwan M, Ghebeh H. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2015 Aug 7;14:149. doi: 10.1186/s12943-015-0421-2. PubMed PMID: 26245467;PubMed Central PMCID: PMC4527106.
- 10) Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn YH, Byers LA, Zhang X, Yi X, Dwyer D, Lin W, Diao L, Wang J, Roybal J, Patel M, Ungewiss C, Peng D, Antonia S, Mediavilla-Varela M, Robertson G, Suraokar M, Welsh JW, Erez B, Wistuba II, Chen L, Peng D, Wang S, Ullrich SE, Heymach JV, Kurie JM, Qin FX. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun*. 2014 Oct 28;5:5241. doi: 10.1038/ncomms6241. PubMed PMID: 25348003; PubMed Central PMCID: PMC4212319.