

腫瘍微小環境とがん免疫療法のバイオマーカー

富樫 庸介

岡山大学学術研究院医歯薬学域 腫瘍微小環境学

キーワード: tumor microenvironment, cancer immunology, tumor-infiltrating T cell, PD-1/PD-L1

Cancer-immunotherapy biomarkers in the tumor microenvironment

Yosuke Togashi

Department of Tumor Microenvironment, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

がん免疫療法の1つである抗PD-1/PD-L1抗体を含む免疫チェックポイント阻害剤は様々ながん種で効果が証明されている。しかしながら、年単位で再発のない完治したかのような症例もあれば、まったく無効で免疫療法特有の副作用だけが出てしまうような症例も存在し、それらを見分けるための効果予測バイオマーカーや効果を高める治療方法の開発が求められている^{1,2)}。抗腫瘍免疫応答の本態解明のために、直接腫瘍と対峙している腫瘍浸潤免疫細胞を含む腫瘍微小環境の解析が注目されている^{3,4)}。CD8陽性エフェクターT細胞は抗腫瘍免疫応答の中心的な役割を果たすと考えられているため、その浸潤が多い腫瘍では免疫チェックポイント阻害剤の効果が高いという報告は以前からなされているが、完璧に治療効果が予測できるわけではない^{5,6)}。腫瘍微小環境は非常に不均一な集団であり、腫瘍に浸潤しているエフェクターT細胞にも抗腫瘍免疫応答にはまったく関係ないクローンが含まれていることも報告され^{7,8)}、より精密な解析が必要とされてい

る。そこで本稿では腫瘍微小環境の解析から明らかになっている免疫チェックポイント阻害剤の効果予測バイオマーカーについて、免疫細胞、特にT細胞を中心に我々のデータを交えて紹介したい。

腫瘍微小環境の重要性

がん免疫療法の効果予測バイオマーカーとしてはPD-L1発現、腫瘍浸潤エフェクターT細胞、体細胞変異数の3つがよく研究されているが、いずれも完璧ではない⁹⁾(図1A)。これらは別々で考えられていることもあるが、著者は基本的にはお互いに関連があるものと考えている。つまり、体細胞変異数が多ければ非自己として認識され強い免疫応答を起こすことができる抗原(ネオ抗原)が多く¹⁰⁾、そのネオ抗原によりエフェクターT細胞が強く活性化し、活性化エフェクターT細胞が腫瘍を攻撃するために浸潤してきて、浸潤してきたT細胞を抑制するためにPD-L1を腫瘍細胞や周辺細胞が上昇させ、結果的にPD-1を介してT細胞が抑制されている¹¹⁾(図1B)。もしこのストーリーが完璧であれば効果予測バイオマーカーはシンプルではあるが、最近ではこれら3つには相関関係があまりないとも報告されている¹²⁾。では何が最も重要なのか?を考えると、やはり腫瘍浸潤エフェクターT細胞と考

2021年8月11日受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7390 Fax: 086-235-7392

E-mail: ytogashi@okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆



2006年京都大学医学部医学科卒業、呼吸器内科医として肺癌の分子標的薬開発を目の当たりにし、臨床検体に関わる研究、TRの重要性を認識して、2012年～2015年近畿大学大学院医学研究科で医学博士を取得した(西尾和人教授)。在学中に免疫チェックポイント阻害剤のデータが報告され、「これは腫瘍免疫について勉強しなくては…」と思い2016年～2019年国立がん研究センター(西川博嘉分野長)で学び、2019年より研究室独立し、2021年より現職。2014年日本学術振興会特別研究員(DC2)、2017年日本学術振興会特別研究員(PD)を取得。臨床検体が一番ヒトの病気の真実に近いと思い研究に取り組み、そこから基礎的な検証ができ、また臨床に還元できるようなTR/reverse TRができる研究室を目指している。ご興味のある方はご一報ください。

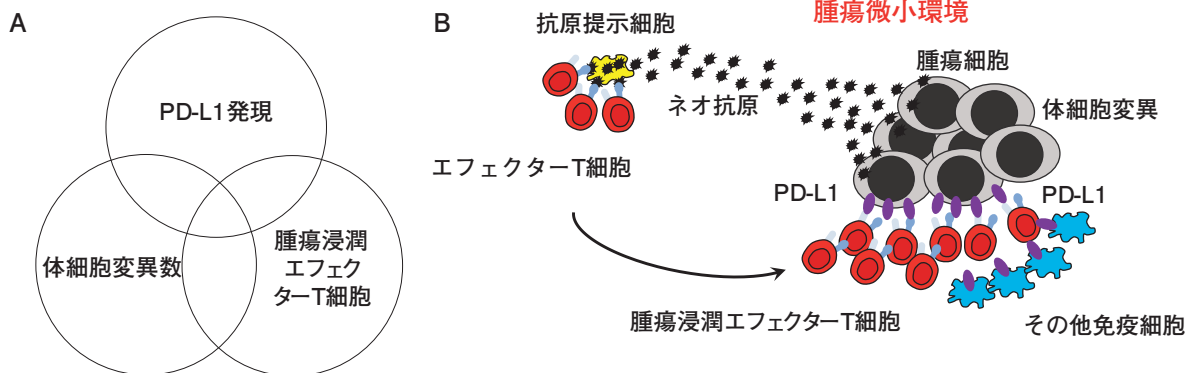


図1 既報の効果予測バイオマーカーの関係性

A: PD-L1発現, 腫瘍浸潤エフェクターT細胞, 体細胞変異数のバイオマーカーとしてオーバーラップしている部分もあるが, 一致しない部分も多い (文献9より改変). B: 体細胞変異数→ネオ抗原→エフェクターT細胞の活性化→腫瘍細胞を攻撃のために腫瘍微小環境に浸潤 (腫瘍浸潤エフェクターT細胞) →PD-L1発現というような関係性がお互いあると考えている.

T細胞を抑制しているPD-1/PD-L1を阻害し, T細胞を再活性化することで腫瘍細胞を攻撃して効果を発揮しているからである¹³⁾. どんなに体細胞変異数が多かろうと, どんなにPD-L1が高かろうと, 腫瘍を直接攻撃するT細胞が腫瘍微小環境に存在しなかったら絶対に効かないわけである. そういった発想で効果予測バイオマーカー探索のために腫瘍微小環境の解析に重点を置いた解析が行われてきた³⁾.

PD-L1発現

効果予測バイオマーカーの代表としてPD-L1発現を免疫染色で評価するバイオマーカーは肺癌などでは既にも臨床で用いられている¹⁴⁾. 当初のメラノーマや肺癌のデータから「PD-L1は腫瘍細胞に出ている」と考える方が多いかもしれないが, 実際はそう単純ではない¹⁵⁾. PD-L1という分子自体はインターフェロン γ (IFN- γ) といった免疫応答に関わる刺激で, どんな細胞でも発現する可能性がある. つまり, T細胞が腫瘍細胞を攻撃する際にIFN- γ を放出すれば周囲の細胞でも発現する可能性がある¹⁵⁾. 特に乳癌, 胃癌, 頭頸部癌などでは腫瘍微小環境の抗原提示細胞といった免疫細胞におけるPD-L1発現も抗PD-1/PD-L1抗体の効果に関わることが報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾. これらががん種では腫瘍細胞のPD-L1発現と周囲の免疫細胞のPD-L1発現との両方を合わせて評価するcombined positive score (CPS) というスコアを付けてバイオマーカーとして用いている¹⁶⁻¹⁸⁾. こういった腫瘍微小環境の免疫細胞でのPD-L1発現に注目して実験を行っ

ている報告もいくつか存在し, 腫瘍細胞のPD-L1発現だけでなく, 宿主側のPD-L1発現も抗PD-1/PD-L1抗体の効果に重要であることが明らかにされている¹⁹⁻²¹⁾.

腫瘍組織の遺伝子発現

シーケンスが安価にできる時代になり, 腫瘍組織の網羅的遺伝子発現で治療効果が予測できないか? 特定の遺伝子で患者を選べないか? というような試みは非常にシンプルな発想で, 今まで多くなされてきた^{5,22)}. 腫瘍組織の網羅的遺伝子発現は, 腫瘍細胞だけでなく腫瘍微小環境を含む状態であるため, 浸潤している免疫細胞なども反映していることが想定される. 様々な解析がなされてきたが, 結論としては「ある程度は予測できるが完璧ではない」といったところである^{5,22)}. 免疫応答に関わるような遺伝子発現, 具体的にはT細胞が活性化した時に放出されるIFN- γ に関わる遺伝子発現 (CXCL9, CXCL10, IDO1, CD274 [PD-L1をコードする遺伝子] など), エフェクターT細胞浸潤を反映するような遺伝子発現 (CD8A など), 細胞傷害性に関わる遺伝子発現 (GZMA, PRF1など) 等々で抗PD-1/PD-L1抗体の有効な患者をある程度は選ぶことができそうではあるが, 残念ながらカットオフをしっかりと決めて特定の因子だけで効果を予測できるほど精密なものは報告されていない^{5,22)}. 後述する理由からも腫瘍組織の遺伝子発現で既存のPD-L1免疫染色を凌駕するようなバイオマーカーを見つけることは現実的には難しいと個人的には考えている.

1 細胞レベルの解析

著者は腫瘍組織の遺伝子発現には、塊（バルク）の平均値しか明らかにできないという問題があり、限界であろうと考えている。免疫細胞は非常に不均一な集団で、免疫細胞といっても様々な細胞が存在し、腫瘍微小環境となるともっと色々な細胞が混在している。T細胞が重要と記載してきたが、そのT細胞ですら腫瘍細胞を攻撃するエフェクターT細胞もあれば、それを抑制するような制御性T細胞というものもある²³⁾。それらを全部まとめたバルクの解析で「免疫にかかわる遺伝子発現が高い」といっても、決してそれが真の抗腫瘍免疫応答を反映しているとは限らず精度の高い解析にはなっていない。特に微小なフラクションは他の集団に隠れてしまい無視されてしまう。CIBERSORTなどの遺伝子発現から細胞の分画を予測するようなアルゴリズムも開発されてはいるが²⁴⁾、T細胞割合までは予測できても、その中でどれくらいが腫瘍を攻撃しているかまでは決してわからない。そこで、これらの問題を解決する技術として1細胞レベルでの解析が注目されている^{25,26)}。従来から免疫学の分野で用いられてきた蛍光色素と抗体を用いるフローサイトメトリーだけでなく、近年では金属を利用してマーカーが30以上に増えたマスサイトメトリーや、多重免疫染色も1細胞レベルでカウントができるようになり、さらには1細胞レベルで網羅的遺伝子発現が解析できるシングルセルシーケンスも登場している³⁾。

腫瘍浸潤エフェクターT細胞の1細胞レベルの解析

腫瘍微小環境には線維芽細胞や血管内皮細胞などの様々な細胞が含まれているものの、やはり抗腫瘍免疫応答の主役は免疫細胞、特にエフェクターT細胞であり^{5,6,13)}、腫瘍浸潤エフェクターT細胞は様々な方法で解析されてきた³⁾。もちろん、CD8で免疫染色してCD8陽性エフェクターT細胞の浸潤が多いと治療効果が高い、という事実も非常に重要である^{5,6)}。しかしながら近年の1細胞レベルの解析からは腫瘍浸潤CD8陽性エフェクターT細胞の中にも腫瘍を直接攻撃しているものもあれば、攻撃していない非特異的なものも混在していることが明らかになっている^{7,8)}。そこで腫瘍浸潤エフェクターT細胞をフローサイトメトリーや多重免疫染色などで解析した報告では腫瘍浸潤PD-1陽性エフェクターT細胞が効果予測バイオマーカーとして

有用であることがいくつかのグループから報告されており^{27,28)}、我々も同様の結果を得ている²⁹⁾。さらに1細胞レベルで詳細に免疫染色できるような機器を用いてPD-1陽性CD8陽性エフェクターT細胞を腫瘍組織で染色したところ、PD-1を発現しているエフェクターT細胞は腫瘍細胞近傍に存在し、逆にPD-1陰性のエフェクターT細胞は間質に存在し、腫瘍浸潤PD-1陽性エフェクターT細胞が腫瘍を直接攻撃しているT細胞であることを示唆する結果を得ている³⁰⁾。しかしながらPD-1陽性だけでは腫瘍細胞を直接攻撃しているエフェクターT細胞（特にネオ抗原特異のエフェクターT細胞）を完璧に同定することは困難であることも報告されており、ある報告ではCD39がネオ抗原特異的T細胞のマーカーとしては最も有望であったとされているが⁷⁾、さらなる検証が待たれる。

シングルセルシーケンスは1細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現解析が可能のため、注目していない分子まで同定することができる。そのような系で実際のヒト検体を解析しTCF1陽性CD8陽性T細胞浸潤が抗PD-1/PD-L1抗体の効果に関わり、耐性時にはCD39陽性TIM-3陽性CD8陽性T細胞浸潤が増加するという結果が報告されている³¹⁾。慢性感染症や腫瘍形成過程では強い慢性的な抗原刺激によりT細胞が疲弊してしまうexhausted T細胞の状態に陥り、PD-1やTIM-3などといった疲弊分子を発現し機能が低下してしまうとされている^{32,33)}（図2）。疲弊の早期にはTCF1高発現CXCR5陽性T-BET高発現PD-1低発現のearly exhaustedの状態、memory-like exhausted T細胞として抗PD-1/PD-L1抗体により再活性化・増殖が期待できるとされているが、疲弊後期にはTCF1低発現CXCR5陰性T-BET低発現EOMES高発現PD-1高発現のterminal differentiated exhausted T細胞となり、機能不全状態で再活性化が期待できないとされている^{32,33)}。前述のTCF1陽性CD8陽性T細胞はまさにこのmemory-like exhausted T細胞を見ており³¹⁾（図2）、今後の大規模な解析が期待されている。

ヒト1個人で約 10^{18} もの多様なT細胞受容体（T cell receptor; TCR）を持ち、様々な抗原に対応できるようになっている。このTCRのレパトアを抗PD-1/PD-L1抗体投与患者の腫瘍組織で解析し、有効群では特定のTCRが増大している傾向が強かったことが報告されている⁶⁾。実際に腫瘍微小環境である特定のTCRが増大してPD-1といった分子を発現している腫

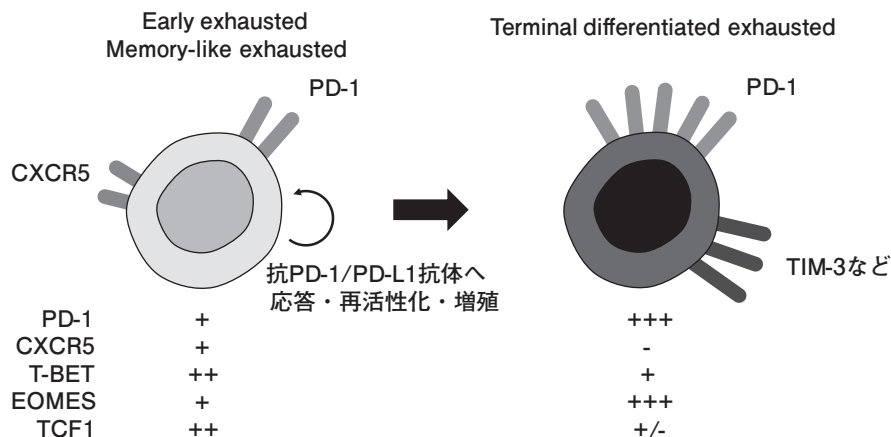


図2 T細胞の疲弊状態

慢性感染症や腫瘍などの慢性的な抗原刺激によりT細胞は疲弊(exhaust)の状態に陥る。疲弊初期(early exhausted T細胞)ではPD-1陽性CXCR5陽性T-BET強陽性EOMES弱陽性TCF1陽性で、抗PD-1/PD-L1抗体により再活性化や増殖が起きるとされている(memory-like exhausted T細胞)。しかし、より慢性的な抗原刺激が入ってしまうとPD-1強陽性CXCR5陰性T-BET弱陽性EOMES強陽性TCF1陰性のterminal differentiated exhausted T細胞になり、TIM-3なども陽性となり、抗PD-1/PD-L1抗体では再活性化はできない状態に陥るとされている(文献32より改変)。

瘍浸潤エフェクターT細胞が腫瘍細胞に対して反応することも報告されている²⁸⁾。著者も腫瘍組織で特定のTCRが増大していると腫瘍浸潤エフェクターT細胞のPD-1発現が高発現していることを見出している³⁴⁾。シングルセルシーケンスでは網羅的遺伝子発現とこのTCR配列を同時に解析することで、T細胞クローンごとの詳細な表現型解析が可能である。そのような研究では、腫瘍局所でT細胞クローンが増大しているようなT細胞集団はやはりPD-1といった疲弊分子が発現しているが、PD-1が低発現のT細胞の集団はクローンがほとんど増加していないことが報告されている³⁵⁾。したがって、腫瘍局所でPD-1といった疲弊分子を発現して増加しているようなT細胞クローンこそが腫瘍を直接攻撃し、抗PD-1/PD-L1抗体がそういったT細胞を活性化して効果を発揮していると考えられており、上記のフローサイトメトリーから得られている腫瘍浸潤PD-1陽性エフェクターT細胞が多いと抗PD-1/PD-L1抗体の効果が高いという報告とも矛盾しない²⁷⁻²⁹⁾。著者も抗PD-1抗体治療が著効した患者と耐性の患者由来腫瘍浸潤T細胞をシングルセルシーケンスし網羅的遺伝子発現とTCR配列のデータを得て、T細胞クローンの観点から解析し、既報のPD-1やCD39といった分子以上に特異的な分子をいくつか同定している(投稿中)。

腫瘍微小環境に存在するエフェクターT細胞以外の免疫細胞の解析

1. 制御性T細胞

T細胞が主役と散々記載してきたが、エフェクターT細胞とは逆に抗腫瘍免疫応答を抑制する制御性T細胞というものが存在する²³⁾。FOXP3陽性で特徴づけられるCD4陽性T細胞で、抗腫瘍免疫応答を抑制するためその浸潤が予後不良であることは様々ながん種で報告されている²³⁾。当然抗PD-1/PD-L1抗体の耐性に関わることが予想され、様々な解析が行われているが、実はそういった報告は思った以上に少ない^{36,37)}。我々はフローサイトメトリーを用いて、抗PD-1抗体によりPD-1陽性制御性T細胞が活性化してしまい、抗腫瘍免疫応答を抑制して効果とは逆に急激に悪化するような病態を引き起こすことを報告した³⁸⁾。さらに抗PD-1/PD-L1抗体の効果との関係も解析しており、制御性T細胞の単純な浸潤量よりはこのPD-1陽性制御性T細胞こそが耐性に関わり、PD-1陽性CD8陽性エフェクターT細胞とのバランスが効果に重要であることを見出している²⁹⁾。

2. B細胞

抗腫瘍免疫応答におけるB細胞の役割、特に抗PD-1/PD-L1抗体治療患者での役割はあまり詳細に解析されてこなかった。B細胞にも抑制的に働く制御性B細胞というもの存在し、抗腫瘍免疫応答を抑制し

ているという報告もあれば^{39,40)}、逆にシングルセルシーケンズなどを用いて抗腫瘍免疫応答が活性化し、効果予測バイオマーカーにある可能性についての報告が最近相次いでいる⁴¹⁻⁴³⁾。特にB細胞浸潤を含む3次リンパ様構造 (tertiary lymphoid structure; TLS) が抗PD-1/PD-L1抗体の効果に重要であることが報告されている⁴¹⁻⁴³⁾。さらに抗PD-1/PD-L1抗体治療後に手術をした患者検体の病理組織を評価した報告でも、TLS・B細胞浸潤が有効例では特徴的に見られることが報告されているため⁴⁴⁾、今後より詳細に大規模に解析されることを期待している。

3. Tumor-associated macrophage (TAM), myeloid derived suppressor cell (MDSC)

抑制性の細胞であるTAMやMDSCが抗PD-1/PD-L1抗体の耐性に関わることはマウスでは以前より報告されてきた^{45,46)}。実際に末梢血MDSCが多いことが免疫チェックポイント阻害剤耐性のバイオマーカーである可能性が複数報告されている⁴⁷⁾。しかしながら腫瘍微小環境での報告は少ない。遺伝子発現解析からTAMやMDSCの浸潤が多いような遺伝子発現パターンをもつ腫瘍の患者では抗PD-1/PD-L1抗体の効果が悪いことが報告されているが⁴⁸⁾、定義や可塑性の問題もあり腫瘍微小環境での効果予測バイオマーカーとしての役割を明確にヒト検体で示している報告は少ない。

おわりに

2015年に公表されたN Engl J Med誌の肺腺癌のDocetaxel対Nivolumabの生存曲線のクロスを見て、まるでかつてのIPASS試験でのCBDCA+PAC対Gefitinibの生存曲線に似ていると思った呼吸器の先生方は多いのではないだろうか^{49,50)}。著者もそのうちの一人で、「EGFR遺伝子変異のような効果予測バイオマーカーが抗PD-1/PD-L1抗体にもあるはずだ」と考え、この世界に足を踏み入れたのであるが、あれからもう約5年以上が過ぎてしまった。様々な最新のデータを我々の取り組みも含めて紹介したが、実臨床では現実的に難しい解析も多く、未だPD-L1免疫染色を凌駕するバイオマーカーは臨床の現場には登場していない。紹介した腫瘍浸潤エフェクターT細胞上のPD-1発現は我々も再現性が取れており、理にも適しているため、研究者目線では非常にいいバイオマーカーだと思っているが、やはり現実的にはそこまでの解析が難

しいのかもしれない。逆にPD-L1発現50%以上の非小細胞肺癌に対するPembrolizumabの効果は研究者目線では「完璧」ではなく決して「美しい」とは言えない結果だが、臨床の先生方にとっては「簡便」で「許容」できる結果のため臨床現場でも受け入れられているものと思っている¹⁴⁾。研究者の追求する「完璧さ」「美しさ」と臨床の先生方が求める「簡便さ」「許容」の狭間を埋めることがトランスレーショナルリサーチの役割だと考えているが、やはり研究者の立場としては「簡便さ」の中にも、可能な限り「美しさ」を追求したいものである。

謝 辞

何もわからぬ状態に腫瘍免疫の「いろは」をご教授いただいた国立がん研究センター西川先生、シーケンズ・解析で協力いただいた東京大学鈴木穰先生、鈴木絢子先生、KOTAIバイオテクノロジーの山下先生、貴重な臨床検体提供いただいた臨床の先生方、ラボの大学院生・技官の皆様、臨床検体解析に同意・協力してくださった患者様・ご家族様にこの場を借りて深謝申し上げます。

文 献

- 1) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, et al.: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* (2012) 366, 2443-2454.
- 2) Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, et al.: Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* (2012) 366, 2455-2465.
- 3) Chuah S, Chew V: High-dimensional immune-profiling in cancer: implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer* (2020) 8, e000363.
- 4) Duan J, Wang Y, Jiao S: Checkpoint blockade-based immunotherapy in the context of tumor microenvironment: Opportunities and challenges. *Cancer Med* (2018) 7, 4517-4529.
- 5) Herbst RS, Soria JC, Kowanzet M, Fine GD, Hamid O, et al.: Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* (2014) 515, 563-567.
- 6) Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, et al.: PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* (2014) 515, 568-571.
- 7) Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo SL, et al.: Bystander CD8⁺ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* (2018) 557, 575-579.
- 8) Scheper W, Kelderman S, Fanchi LF, Linnemann C, Bendle G, et al.: Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med*

- (2019) 25, 89–94.
- 9) Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM: Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* (2016) 16, 275–287.
 - 10) Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, et al.: Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* (2015) 348, 124–128.
 - 11) Sugiyama E, Togashi Y, Takeuchi Y, Shinya S, Tada Y, et al.: Blockade of EGFR improves responsiveness to PD-1 blockade in. *Sci Immunol* (2020) 5, eaav3937.
 - 12) Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, et al.: Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Oncol* (2018) 36, 633–641.
 - 13) Zou W, Wolchok JD, Chen L: PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* (2016) 8, 328rv4.
 - 14) Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, et al.: Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* (2016) 375, 1823–1833.
 - 15) Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC: Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell* (2019) 76, 359–370.
 - 16) Shitara K, Özgüroğlu M, Bang YJ, Di Bartolomeo M, Mandalà M, et al.: Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* (2018) 392, 123–133.
 - 17) Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, et al.: Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* (2018) 379, 2108–2121.
 - 18) Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, et al.: Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* (2019) 393, 156–167.
 - 19) Lin H, Wei S, Hurt EM, Green MD, Zhao L, et al.: Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest* (2018) 128, 805–815.
 - 20) Tang H, Liang Y, Anders RA, Taube JM, Qiu X, et al.: PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest* (2018) 128, 580–588.
 - 21) Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, Arthur CD, Lee SH, et al.: Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunol Res* (2017) 5, 106–117.
 - 22) Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, et al.: IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* (2017) 127, 2930–2940.
 - 23) Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H: Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2019) 16, 356–371.
 - 24) Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, et al.: Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* (2015) 12, 453–457.
 - 25) Papalexi E, Satija R: Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2018) 18, 35–45.
 - 26) Stuart T, Satija R: Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet* (2019) 20, 257–272.
 - 27) Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, et al.: A transcriptionally and functionally distinct PD-1⁺ CD8⁺ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* (2018) 24, 994–1004.
 - 28) Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, et al.: PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* (2014) 124, 2246–2259.
 - 29) Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, et al.: The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol* (2020) 21, 1346–1358.
 - 30) Umemoto K, Togashi Y, Arai Y, Nakamura H, Takahashi S, et al.: The potential application of PD-1 blockade therapy for early-stage biliary tract cancer. *Int Immunol* (2020) 32, 273–281.
 - 31) Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, et al.: Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* (2019) 176, 404.
 - 32) Philip M, Schietinger A: Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections. *Curr Opin Immunol* (2019) 58, 98–103.
 - 33) Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, et al.: Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol* (2019) 19, 665–674.
 - 34) Inamori K, Togashi Y, Fukuoka S, Akagi K, Ogasawara K, et al.: Importance of lymph node immune responses in MSI-H/dMMR colorectal cancer. *JCI Insight* (2021) 6, e137365.
 - 35) Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, et al.: Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* (2016) 352,

- 189–196.
- 36) Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, et al.: Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naïve melanoma. *J Clin Oncol* (2013) 31, 4311–4318.
- 37) McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, Massard C, Gordon MS, et al.: Atezolizumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. *J Clin Oncol* (2016) 34, 833–842.
- 38) Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, et al.: PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2019) 116, 9999–10008.
- 39) Xiao X, Lao XM, Chen MM, Liu RX, Wei Y, et al.: PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. *Cancer Discov* (2016) 6, 546–559.
- 40) Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, et al.: Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* (2014) 41, 1040–1051.
- 41) Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, et al.: Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* (2020) 577, 561–565.
- 42) Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, et al.: B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* (2020) 577, 549–555.
- 43) Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TW, Sun CM, et al.: B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* (2020) 577, 556–560.
- 44) Cottrell TR, Thompson ED, Forde PM, Stein JE, Duffield AS, et al.: Pathologic features of response to neoadjuvant anti-PD-1 in resected non-small-cell lung carcinoma: a proposal for quantitative immune-related pathologic response criteria (irPRC). *Ann Oncol* (2018) 29, 1853–1860.
- 45) Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, et al.: CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* (2014) 74, 5057–5069.
- 46) Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, et al.: Combined Blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 Signaling Abrogates Mutual Regulation of Their Immunosuppressive Effects in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* (2018) 78, 5011–5022.
- 47) Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, et al.: Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* (2018) 9, 1310.
- 48) McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, et al.: Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med* (2018) 24, 749–757.
- 49) Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, et al.: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* (2009) 361, 947–957.
- 50) Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, et al.: Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* (2015) 373, 1627–1639.