

胃癌切除患者における ULBP1 と NKG2D の発現レベルは
全生存期間に影響を与える

氏名 亀井 滝士

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻 消化器・腫瘍外科学講座

平成30年 1月

目 次

1. 要旨	3
2. 背景と目的	4
3. 方法	5
4. 結果	9
5. 考察	11
6. 謝辞	12
7. 参考文献	13
8. Table	15
9. Figure	18

【要旨】

腫瘍細胞表面に発現した ULBP1(UL16 binding protein 1)は、NK 細胞、CD8+T 細胞と γ δ T 細胞に存在する NKG2D receptor に結合する。しかしながら胃癌において ULBP1 と NKG2D 発現の役割そしてそれに関連した免疫反応については不明確である。この研究では、胃癌患者における ULBP1 と NKG2D の発現と臨床的結果について調査した。ヒト胃癌 cell line と 2004 年から 2008 年に手術を行った 98 人の胃癌摘出標本で ULBP1 と NKG2D 発現のレベルを調べた。MKN-74 cells では、ULBP2、ULBP5 または ULBP6 とともに ULBP1 を発現していた。NKG2D は活性化された T 細胞と NK 細胞においてより高いレベルで発現していた。NKG2D 発現陽性の切除標本のうち 6 人の患者が CD8 と CD56 が陽性であった。すべての組織において、NKG2D を発現している細胞は決まって CD8+T 細胞であった。腫瘍内で NKG2D 発現のある患者では、NKG2D 発現のない患者と比較して有意に全生存期間が長いことが示された(P=0.0217)。最も長い全生存期間は ULBP1 と NKG2D 陽性の患者であり、一方どちらも陰性の患者では全生存期間が最も短かった。ULBP1 と NKG2D の相互作用が胃癌患者の全生存期間を改善する可能性があり、癌患者の獲得免疫を誘導する免疫療法に応用できるかもしれない。加えて、ULBP1 と NKG2D は胃癌における予後のバイオマーカーとして実用的になるかもしれない。

【背景と目的】

胃癌は地球上において癌の中で第四番目の疾患であり、癌関連の死亡数は二番目を占めている(1)。それゆえ、胃癌に対する新しい治療法が即座に必要とされている。

NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞とCD8+T細胞におけるNKG2D発現は、1991年に初めて同定され(2)、続いて1999年にその機能が報告された(3)。ULBP1-6のすべてとMICA/B(MHC class I chain-related proteins A and B)はヒトNKG2Dにおいて二つの主要なNKG2DLs(NKG2D ligands)である。mRNA export factor、Mult 1とhistocompatibility antigen 60がマウスのNKG2Dにおける三つの主要なNKG2DLsである(4)。NKG2DLsは細胞またはゲノムのストレスによって誘導される。CD8+T細胞に発現したとき、NKG2Dは共刺激信号を受け取るように機能し、その結果CD8+T細胞が活性化される(5)。NKG2DL発現は、ストレスと悪性転化によって誘導される(6)。加えて、単核球でのNKG2D発現は早期胃癌患者と比較し進行胃癌患者において有意に低い。さらに、NKG2D発現は胃癌患者において術前よりも術後のほうが有意に高かった(7)。ストレスを受けた癌細胞におけるNKG2DLsのupregulationはNK細胞による溶解を引き起こす(8)。

表面の糖蛋白質であるMICAは、健康な組織にはなく上皮性と造血性の腫瘍において広く発現するNKG2DLである。腫瘍細胞からMICAが放出されると、可溶性のMICAは免疫逃避に機能するようになる。さらに重要なこととして、可溶性MICAのレベルは乳癌患者においてTNM stageと明らかに相関していた(9)。その上、可溶性MICAはNKG2Dの発現を減少させ、NKの介在する免疫監視を弱めることで、乳腺腫瘍において免疫逃避を導いていたことが示されている(9)。IL-12はNKG2Dの発現をupregulateし、NK細胞の細胞傷害性を増強させる。しかしながら、胃癌患者においてバイオマーカーまたは予後因子としてキーとなりうるNKG2DLとULBP1の実用性についてはいまだ確定されておらず、胃癌患者におけるULBP1/NKG2Dの相互作用の役割はいまだはっきりしていない。

この研究では、胃癌患者においてULBP1とNKG2Dの発現レベルが臨床的結果に関連しているかを調査した。

【方法】

胃癌 *cell lines* と培養状況。国立がんセンターで確立されたヒト胃癌 MKN-74 *cell line* が、5%の CO₂ を含む大気中 37°C で、10% 熱不活化 FBS (FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で培養された。

患者。2004 年 1 月から 2008 年 12 月に山口大学大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科で手術を行われた患者から計 98 の標本が得られた。それらはすべて MP 以深の深達度をもつ胃癌と診断された。術前治療を受けた患者はいなかった。病理学的 staging は、日本胃癌学会 TNM 分類に基づいた日本胃癌取扱い規約(第 14 版)によって行った(11)。患者の臨床病理学的特徴を Table I にまとめた。この研究のプロトコールは当院で承認された。この研究の説明と同意について術前にすべての患者から得られた。

Cancer cell lines での ULBP, MICA/MICB の発現と *flow cytometry* による NK/T 細胞での NKG2D 発現との解析。MKN-74 胃癌細胞における NKG2DLs の発現と NK/T 細胞表面の NKG2D 発現を確認するために *flow cytometry* を行った。BD FACSFlo_w (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) が *flow cytometry* の buffer として使われた。MKN-74 の ULBP1 は PE (phycoerythrin) 抱合型マウス抗 ULBP1 抗体(希釈, 1:10; cat no. FAB1380P; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を使って染色し、MKN-74 の ULBP2/5/6 は APC (allophycocyanin) 抱合型マウス抗 ULBP2/5/6 抗体(希釈, 1:10; cat no. FAB1298A; R&D Systems, Inc.) を使って染色した。NK と T 細胞の CD3 は v450 抱合型マウス抗 CD3 抗体(希釈, 1:20; cat no. 560351; BD Biosciences) を使って染色し、NK と T 細胞の CD8 は APC-Cy7 抱合型マウス抗 CD8 抗体(希釈, 1:20; cat no. 557834; BD Biosciences) を使って染色し、NK と T 細胞の CD16 は v500 抱合型マウス抗 CD16 抗体(希釈, 1:20; cat no. 561394; BD Biosciences) を使って染色し、NK と T 細胞の CD56 は PE-CF594 抱合型マウス抗 CD56 抗体(希釈, 1:20; cat no. 562289; BD Biosciences) を使って染色した。すべてのサンプルを 4°C で 30 分間おいた。MKN-74、単核球、活性化された T 細胞と NK 細胞のそれぞれの細胞表面マーカーを特定するために染色した。BD FACSFlo_w buffer で 3 回洗浄後、細胞は 2×10^5 cells/100 μ l の濃度で 2% FBS の入った PBS に再懸濁した。適切な isotype control 抗体が前述の方法で染色された。

サンプルは BD LSRFortessa X-20 instrument (BD biosciences) [フローサイトメーター] で分析され、データは FlowJo software version x10.0.7r2 (Tree Star, Inc., Ashland OR, USA) で解析された。相対的な蛍光強度 (RFI) は以下のように計算した: $RFI = \frac{[分子の MFI] - [対応する isotype control の MFI]}{[対応する isotype control の MFI]}$ 。MFI は平均蛍光強度。

NK と *T* 細胞の活性化。単核球(LP_241; Cellular Technology. Ltd., Cleveland, OH, USA) が 500 U/ml/well の IL-2 を添加した 5 μ l/ml/well の CD2 と CD335(all from Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)の混合液を加えることによってNK細胞を生成するために2時間活性化された。*T*細胞活性化のために、単核球が 100 U/ml/well の IL-2 (Miltenyi Biotec GmbH)を添加した 2 μ g/ml/well の抗 CD3 作動性抗体(eBioscience; Thermo Fisher Scientific, Inc.)と 1 μ g/ml/well の抗 CD28 作動性抗体(BioLegend, San Diego, CA, USA)を加えることによって2時間刺激された。

免疫組織化学(IHC)。パラフィンで固定した組織のブロックは 5 μ m の薄さにカットされ、無菌の生食をかけたスライドに載せ、次にキシレンと段階的なアルコール洗浄によって脱脂、脱水を行う。抗原賦活化は Target Retrieval solution (pH 9; Dako; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)を使用しマイクロウェーブ熱処理によって行われた。内在性ペルオキシダーゼは 0.1%アジ化ナトリウムを含んだ PBS に 0.3%過酸化水素水(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を加えて室温 15 分でブロックされた。PBS で二回洗浄後、薄切切片は Protein Block Serum-Free(Dako; Agilent Technologies, Inc.)を用い室温 30 分間でブロックされた。それから一次抗体が加えられた。抗 ULBP1 抗体(cat no. HPA007547; 1:100; Sigma-Aldrich; Merck KGaA)、抗 NKG2D 抗体(cat no. ab36136; 1:100; Abcam, Cambridge, UK)、抗 CD56 抗体(cat no. B159; 1:50)と抗 CD8 抗体(cat no. SK1; 1:50) (both from BD Biosciences)がメーカーのプロトコールに従って IHC のために使われた。簡潔に言うと、4°C で 15 時間一次抗体とインキュベートした後、PBS で二回洗浄、オリジナルの濃度の rabbit/mouse 抗体抱合型の horseradish ペルオキシダーゼ(K406311-2; EnVision Plus mouse/HRP system; Dako; Agilent Technologies, Inc.)で室温 30 分間インキュベートし、Dako-Chromogen solution(Dako の色素発生溶液)でインキュベート後、脱イオン水にて洗浄した。Mayer's ヘマトキシリンにて background を染色した後、薄切切片にアルコール濃度を上昇させて通した後キシレンについで脱水し、スライドにのせられた。抗体の特異性を調べるために negative control slides が mouse IgG1 モノクローナル抗体(ab81032; 1:100; Abcom)でインキュベートされた。IHC の結果は免疫活性陽性部を含むことの確認できる視野の 8 か所で低倍率(x100)画像によって評価された。加えて、免疫染色は高倍率(x400) (ECLIPSE E200 and Nikon 1 V2 Micro imaging system; Nikon, Tokyo, Japan)で評価された。ULBP1 と NKG2D 発現の顕微鏡での解析は、三人のブラインドされ独立した観測者によって行われた。

癌細胞での *ULBP1* 発現のスコアリング。癌細胞での *ULBP1* 染色の評価は、以前 Loos et al(12)に報告されたように染色の領域と濃淡に基づいて半定量的に行われた。染色領域のスコアリングシステムは以下の様とした。癌細胞の<33%が score 1、癌細胞の 33-66%が score 2、癌細胞の>66%を score 3 とした。染色濃淡についてのスコアリングは以下の様にした。なしと弱染色は score 1、中染色は score 2、強染色は score 3。それぞれの切片は、前述の領域と濃淡のスコアの組み合わせで最終的な grade が決められた。最終的なスコアは濃淡と領域のスコアを加えて分類された。合計 3 以下は low *ULBP1* expression(*ULBP1* low)、合計 3 を超えるものは high *ULBP1* expression(*ULBP1* high)を示していると分類された。

胃腫瘍周囲単核球の *NKG2D* 発現のスコアリング。腫瘍内へ 1 μm 浸潤した *NKG2D* 陽性細胞の絶対数は三人のブラインドされた独立した個々によって手動で数えられた。腫瘍周囲の *NKG2D* 陽性細胞の数は、オリンパス AX70 光学顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)でオリンパス DP70 CCDカメラによりコンピューター化された画像解析システムを使って数えられた。それぞれの患者のサンプルにおいて、独立した元のままの顕微鏡の視野を X400 の倍率で 8 か所以上コンピューター化した。もっとも高密度にリンパ球浸潤を示している合計四つの独立した顕微鏡視野(倍率 x400)が代表性と均質性を確保するためにそれぞれの患者のサンプルから選ばれた。四つの視野のスコアが倍率 x400(0.0768 mm^2/field)の一つのコンピューター化された顕微鏡視野の最終的な数値を計算するために平均化された。*NKG2D* 陽性細胞の評価は三人の独立してブラインド化された観測者によって行われた。数値の不一致は 5%の範囲内となるよう再評価され総意の決定がなされた。*NKG2D* 陽性細胞/腫瘍浸潤リンパ球(TILs)の率はそれぞれの標本で計算された。TIL のサブグループを定義するために中央値がカットオフ値として選ばれた(中央値 0.093)。*NKG2D* の率が高いもの低いものをそれぞれ *NKG2D* high、*NKG2D* low と表現した。

統計解析。差異は Fisher's exact test を使って解析された。全生存率と無再発生存率は Kaplan-Meier 法で計算され、log-rank test で解析された。単変量解析は Fisher's exact tests を使って行われた。全生存期間に影響を及ぼしている因子を調べるために Cox 比例ハザード回帰モデルを使って多変量解析が行われた。比例ハザード回帰モデルに基づく多変量解析によって NKG2DLs/NKG2D の発現と臨床病理学的特徴との間の関連を評価するために第二の解析が行われた。T 細胞と NK 細胞の活性は Mann-Whitney 検定によって解析された。それぞれの変数の比較のために paired-sample t-test が行われた。両側 $P < 0.05$ が統計学的有意差を示すと判断した。全ての統計解析は EZR version 1.35 (さいたま医療センター、自治医科大学)、R 仕様のグラフィックユーザーインターフェース (The R Foundation for Statistical Computing, v.2.13.0) 明確には生物統計学で多用される統計機能を加えてデザインされた R commander 修正版 (v.1.6-3) を使って行われた。

【結果】

Cancer cell lines における *NKG2DLs* の発現。フローサイトメトリー解析において、MKN-74 細胞での ULBP1 と ULBP2/5/6 の細胞表面の発現は本質的に高かった(Fig. 1A)。対照的に MICA と MICB の細胞表面の発現は MKN-74 細胞において検出できなかった。

単核球における *NKG2D* の発現。CD3+T 細胞における *NKG2D* の細胞表面の発現は、T 細胞活性化前の発現(MFI, 243)と比較して活性化後(MFI, 621)で有意に上昇した[P=0.0286, n=4, standard deviation (SD) = 378; Fig. 1B]。同様に CD3+CD8+T 細胞における *NKG2D* の細胞表面の発現は、T 細胞活性化前の発現(MFI, 515)と比較して活性化後(MFI, 1234)に有意に高かった (P=0.0286, n=4, SD=719; Fig. 1C)。CD16+CD56+NK 細胞における *NKG2D* の細胞表面の発現は、NK 細胞活性化前の発現(MFI, 276)と比較して活性化後(MFI, 974)で有意に高かった (P=0.0283, n=4, SD=698; Fig. 1D)。

ULBP1 の IHC 染色。ULBP1 発現は細胞膜と細胞質で観察される。Fig.2A と B は胃癌における ULBP1-high staining の代表的な画像を示している (倍率はそれぞれ x100 と x400)。Fig.2C と D は胃癌における isotype control staining を示している (倍率はそれぞれ x100 と x400)。98 サンプル中 70 サンプルが ULBP1 発現陽性であった。

NKG2D の IHC 染色。*NKG2D* は胃腫瘍周囲の単核球細胞膜に発現する。Fig.2E と F は腫瘍浸潤リンパ球(TILs)における high *NKG2D* expression を示している (倍率はそれぞれ x100 と x400)。Fig.2G と H は、Fig.2E と F で使用した同切片における腫瘍浸潤リンパ球(TILs)での isotype control staining を示している (倍率はそれぞれ x100 と x400)。98 サンプル中 19 サンプルが *NKG2D* 陽性であった。

NKG2D+、*CD8+*と *CD56+*の IHC 染色。*NKG2D* 発現組織切片中計 6 サンプルが *CD8* と *CD56* で染色され代表的な切片として使われた。Fig.2I-L は Fig.2E-H で使用された同サンプルにおける *CD8* または *CD56* の発現を示している。すべての組織において *NKG2D* 発現細胞の大多数が *CD8+T* 細胞であった。

ULBP1 と *NKG2D* の発現と臨床病理学的所見。単変量解析では単核球の *NKG2D* 発現がリンパ管侵襲($P=0.0028$)と術後再発($P=0.0048$)に関連があることが示された(Table II)。ULBP1 発現は病理学的所見と術後再発において有意な関連は認めなかった(Table II)。

ULBP1 と *NKG2D* の high expression 群と low expression 群において術後生存曲線の比較を行った。ULBP1 においては 70 例が陽性(high)で 28 例が陰性(low)であった(Table II)。対照的に、*NKG2D* では 19 例が陽性(high)で 79 例が陰性(low)であった(Table II)。ULBP1 発現に関して全生存期間に有意差はみられなかった($P=0.334$; Fig. 3A)。しかしながら、*NKG2D* を発現している患者群は発現していない患者群に比べ有意により長い全生存期間を持つことが示された($P=0.0217$; Fig. 3B)。*NKG2D* と ULBP1 の発現の組み合わせもまた次のように解析された: ULBP1-high/*NKG2D*-high ($n=12$), ULBP1-high/*NKG2D*-low ($n=58$), ULBP1-low/*NKG2D*-high ($n=7$), ULBP1-low/*NKG2D*-low ($n=21$)。全生存期間に関して、ULBP1-high/*NKG2D*-high 群がもっとも予後がよく ULBP1-low/*NKG2D*-low 群がもっとも予後が悪いことが示された($P=0.0096$; Fig. 3C)。

多変量解析。全生存期間に対する ULBP1、*NKG2D*、性、リンパ節転移、リンパ管侵襲そして静脈侵襲のハザード比を調べるために多変量解析が行われた。*NKG2D* 発現($P=0.0431$)とリンパ管侵襲($P=0.0030$)が全生存期間に対する独立した予後因子として確認された(Table III)。

【考察】

この研究では予後と NKG2D と ULBP1 の発現の関連について調査した。結果、ULBP1 と NKG2D 発現の組み合わせは胃癌患者の全生存期間の予測に対する効果的なストラテジーになりうることが示された。それゆえ、胃癌におけるこれら二つの蛋白の役割に対して重要な見識を与えるかもしれない。いくつかの固形腫瘍では恒常的に NKG2DLs を発現し NKG2D 依存の免疫監視を受けている(6)。しかしながら、可溶性 NKG2DLs が腫瘍から放出され NKG2D 活性をブロックすることで免疫逃避を行っている(6)。血清中の可溶性 NKG2DLs のレベルが腫瘍の進行に影響を与えていることが示されている(6)。加えて、細胞表面から放出された MICA は NKG2D/NKG2DL interactions に影響を与えている(6)。今までに ULBP1 の可溶性形態での役割を調査した研究はない。この研究では、ULBP1 は NKG2D 発現を通して腫瘍免疫に少しの拮抗的な影響も示さなかった。

NKG2DLs は乳癌組織にしばしば発現する(13)。特に、MIC-A/B と ULBP2 発現は癌患者の予後を改善することに関連する(13)。NKG2DLs の免疫学的機構は示されていない(13)。しかしながら他の研究では可溶性 MICA が腫瘍の免疫逃避に関与していることが示されている(9)。この研究において、胃癌における ULBP1 発現は NKG2D と結合することによって positive ligand として働き、それによってこれらの蛋白が共発現した際に予後が改善される。その上、Osaki らは NKG2D 発現の減少は胃癌の腫瘍による免疫逃避の原因である可能性を示唆しており(14)、low NKG2D expression の患者が最も予後が悪いというこの研究の結果と一致した。

この研究では、NKG2DLs と NKG2D の interaction が癌と腫瘍における T 細胞の活性化に関連していることを示した。この interaction は癌における NK 活性にもまた重要であると考えられる(3)。したがって NKG2D/ULBP1 interaction は癌と T 細胞の関連に関与しているかもしれない。ULBP1 と NKG2D そして ULBP1/NKG2D interaction は免疫療法の分子標的となりうる。進行非小細胞肺癌、メラノーマ、腎細胞癌の患者において、PD-L1 を抑制すると強力な反応を示し病気の進行が妨げられた(15)。抗 PD-1 抗体は、非小細胞肺癌、メラノーマ、腎細胞癌の患者の 20~25%に目的とする反応を引き起こした(16)。したがって ULBP1/NKG2D interaction をブロックする一つのアプローチは ULBP1 と NKG2D に対する特異抗体を使用することで、それが固形腫瘍周囲の T 細胞をターゲットとし、それによって T 細胞の活性化を促進する。適応する免疫系での ULBP1/NKG2D interaction の効果を調べる更なる研究が必要である。

したがって、胃癌における ULBP1 と NKG2D の interaction は全生存期間に関連する。さらに、ULBP1 と NKG2D は癌患者の獲得免疫を誘導するための免疫療法の適応となりうること、胃癌患者の術後の予後の予測となりうるがこの研究では示された。NKG2DL と NKG2D の詳細な interaction においては更なる調査が必要である。NKG2DL をターゲットとした免疫療法の発達は未来の臨床応用として重要なものとなるかもしれない。

【謝辞】

本研究は国立がんセンター研究開発基金（grant no. 27-A-2）にサポートを受けました。テクニカル・サポートについて佐野昭子さん（山口大学）、英語編集において Editage（東京）と小林真奈美さん（国立がんセンター）に謝意を表したいと思います。

【参考文献】

1. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL and Trotti A: AJCC Cancer Staging Manual. Springer, 2010.
2. Houchins JP, Yabe T, McSherry C and Bach FH: DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173: 1017-1020, 1991.
3. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729, 1999.
4. Raulet DH: Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3: 781-790, 2003.
5. González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, López-Vázquez A and López-Larrea C: NKG2D ligands: Key targets of the immune response. *Trends Immunol* 29: 397-403, 2008.
6. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O and Kabelitz D: Generation of soluble NKG2D ligands: Proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol* 78: 120-129, 2013.
7. Saito H, Osaki T and Ikeguchi M: Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 15: 27-33, 2012.
8. Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M and Polić B: Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci* 68: 3519-3529, 2011.
9. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A and Salih HR: Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 118: 684-687, 2006.
10. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Zhang J and Tian Z: Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol* 69: 490-500, 2008.
11. Japanese Gastric Cancer Association: Japanese classification of gastric carcinoma-2nd english edition. *Gastric Cancer* 1: 10-24, 1998.
12. Loos M, Hedderich DM, Ottenhausen M, Giese NA, Laschinger M, Esposito I, Kleeff J and Friess H: Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer. *BMC Cancer* 9: 463, 2009.

13. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, Jafferji I, Trowsdale J, Liefers GJ, van de Velde CJ and Kuppen PJ: NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: An observational study. *BMC Cancer* 12: 24, 2012.
14. Osaki T, Saito H, Yoshikawa T, Matsumoto S, Tatebe S, Tsujitani S and Ikeguchi M: Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 13: 382-387, 2007.
15. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, et al: Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366: 2455-2465, 2012.
16. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, et al: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366: 2443-2454, 2012.

Table I.

Table I. Characteristics of the study population.

Variables	No. of cases
Number of patients	98
Age, years (range)	64±14 (23-92)
Gender	
Male/Female	65/33
Depth of tumor invasion	
MP/SS/SE/SI	21/25/49/3
Histologic grade	
Papillary adenocarcinoma/tubular adenocarcinoma/poorly differentiated adenocarcinoma/signet-ring cell carcinoma/mucinous adenocarcinoma	3/28/51/9/7
Stroma	
Medullary type/interstitial connective tissue/scirrhous type	7/42/43
Pattern of tumor infiltration	
a/b/c	4/34/60
Lymphatic invasion	
0/1/2/3	7/25/37/29
Venous invasion	
0/1/2/3	23/50/21/4
Regional lymph nodes	
N0/N1/N2/N3	27/20/13/38
Stage	
I/II/III/IV	11/30/34/23

MP, muscularis propria; SS, subserosa; SE, serosal exposure; SI, invasion.

Table II.

Table II. Univariate analysis of overall survival of patients with gastric cancer following gastrectomy.

Parameters	Cases, n	ULBP1		P-value	NKG2D		P-value
		Positive (n=70)	Negative (n=28)		Positive (n=19)	Negative (n=79)	
Depth of tumor invasion (T)				0.076			0.132
T2 (muscularis propria or subserosa)	46	37	9		12	34	
T3 (serosal exposure), T4 (invasion)	52	33	19		7	45	
Histological classification of gastric tumours				0.814			0.784
Papillary adenocarcinoma/tubular adenocarcinoma	30	21	9		5	26	
Poorly differentiated adenocarcinoma/signet-ring cell carcinoma/ mucinous adenocarcinoma	68	49	19		14	53	
Cancer stromal volume				0.647			1.000
Medullary type/interstitial connective tissue	49	36	13		9	40	
Sclerous type	48	29	14		9	39	
Tumor infiltrative pattern into the surrounding tissues				0.819			1.000
a, b	38	28	10		7	31	
c	60	42	18		12	48	
Lymphatic invasion				0.669			0.003
0	7	6	1		5	2	
1, 2, 3	91	64	27		14	77	
Venous invasion				0.798			0.066
0	23	16	7		8	15	
1, 2, 3	75	54	21		11	64	
Lymph node metastasis				0.461			0.776
0	27	21	6		6	21	
1, 2, 3	71	49	22		13	58	
Stage grouping				0.262			0.311
I, II	41	32	9		10	31	
III, IV	57	38	19		9	48	
Stage grouping				0.111			0.549
I, II, III	75	57	18		16	59	
IV	24	13	10		3	20	
Postoperative recurrence				0.799			0.005
Presence	33	25	8		2	31	
Absence	45	32	12		15	30	

ULBP1, UL16 binding protein 1; NKG2D, natural killer group 2 member D3

Table III.

Table III. Multivariate proportional hazards analysis of overall survival patients with gastric cancer following gastrectomy.

Variable	Hazard ratio	95% CI	P-value
Lymph node metastasis	1.5670	1.1640-2.1100	0.0030
NKG2D expression	0.3369	0.1173-0.9672	0.0431

CI, confidence interval; NKG2D, natural killer group 2 member D.

Figure 1.

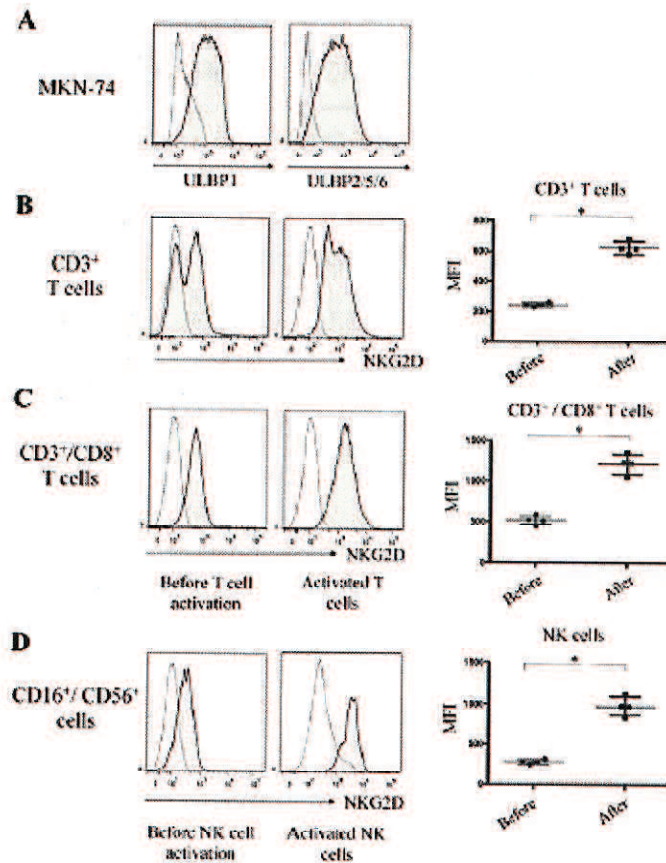


Figure 1. (A) ULBP1 and ULBP2/5/6 expression on the surface of MKN-74 cells. (B) NKG2D expression on CD3⁺ cells prior and subsequent to T-cell activation (n=4). (C) NKG2D expression on CD3⁺/CD8⁺ cells prior and subsequent to T-cell activation (n=4). (D) NKG2D expression on CD16⁺/CD56⁺ cells prior and subsequent to NK cell activation (n=4). *P<0.05. ULBP, UL16 binding protein; CD, cluster of differentiation; NKG2D, natural killer group 2 member D; MFI, mean fluorescence intensity; NK, natural killer.

- (A) MKN-74 細胞表面における ULBP1 と ULBP2/5/6 の発現。
- (B) T 細胞活性化前後の CD3⁺細胞での NKG2D 発現 (n=4)。
- (C) T 細胞活性化前後の CD3⁺/8⁺細胞での NKG2D 発現 (n=4)。
- (D) NK 細胞活性化前後の CD16⁺/56⁺細胞での NKG2D 発現 (n=4)。

Figure 2.-①

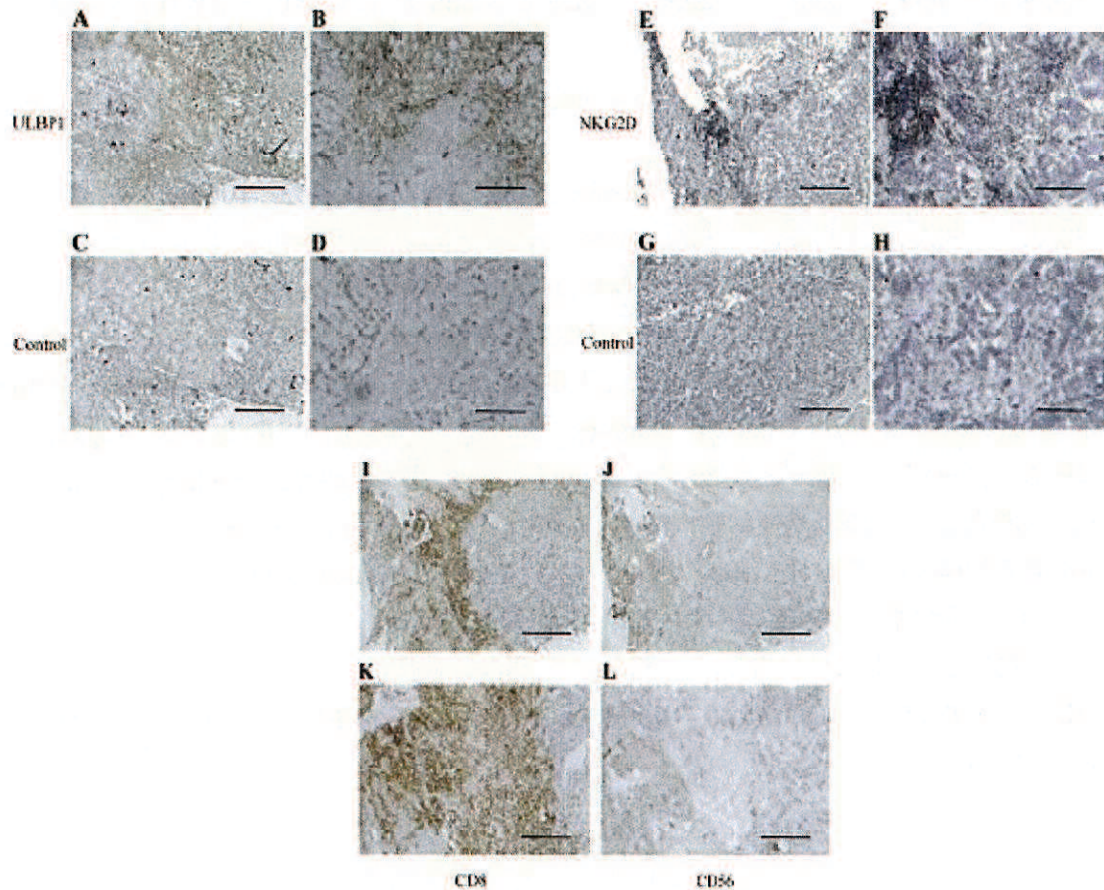


Figure 2. Representative histopathological images showing immunohistochemical staining of ULBP1, NKG2D, CD8 and CD56 in gastric cancer tissues. (A) High ULBP1 expression in gastric cancer tissues. ULBP1 expression is revealed in the cell membrane and cytoplasm (brown staining). (B) High ULBP1 expression in gastric cancer tissues. Magnification, $\times 400$; scale bar, $100\ \mu\text{m}$. (C) Isotype control for staining of ULBP1. Magnification, $\times 100$; scale bar, $200\ \mu\text{m}$. (D) Isotype control for staining of ULBP1. Magnification, $\times 400$; scale bar, $100\ \mu\text{m}$. (E) High NKG2D expression in tumor-infiltrating lymphocytes. Magnification, $\times 100$; scale bar, $200\ \mu\text{m}$. (F) High NKG2D expression in tumor-infiltrating lymphocytes. Magnification, $\times 400$; scale bar, $100\ \mu\text{m}$. (G) Isotype control for staining of tumor-infiltrating lymphocytes. Magnification, $\times 100$; scale bar, $200\ \mu\text{m}$. (H) Isotype control for staining of tumor-infiltrating lymphocytes. Magnification, $\times 400$; scale bar, $100\ \mu\text{m}$. (I) Staining of CD8-positive cells in gastric cancer. Magnification, $\times 100$; scale bar, $200\ \mu\text{m}$. (J) Staining of CD8-positive cells in gastric cancer tissues. Magnification, $\times 400$; scale bar, $100\ \mu\text{m}$. (K) Staining of CD56-positive cells. Magnification, $\times 100$; scale bar, $200\ \mu\text{m}$. (L) Staining of CD56-positive cells. Magnification, $\times 400$; scale bar, $100\ \mu\text{m}$. Immunohistochemical detection of CD8-positive or CD56-positive mononuclear cells around gastric tumors in 1-L used the same sections as those in E-H. ULBP, UL16 binding protein; CD, cluster of differentiation; NKG2D, natural killer group 2 member D.

Figure 2.-②

胃癌組織における ULBP1、NKG2D、CD8 と CD56 の IHC 染色を示す代表的な病理組織画像。

(A) 胃癌組織での high ULBP1 expression。ULBP1 expression は細胞膜と細胞質に現れる (brown staining)。

(B) 胃癌組織での high ULBP1 expression。倍率, x400; scale bar, 100 μ m。

(C) ULBP1 染色の isotype control。倍率, x100; scale bar, 200 μ m。

(D) ULBP1 染色の isotype control。倍率, x400; scale bar, 100 μ m。

(E) 腫瘍浸潤リンパ球(TILs)での high NKG2D expression。倍率, x100; scale bar, 200 μ m。

(F) 腫瘍浸潤リンパ球(TILs)での high NKG2D expression。倍率, x400; scale bar, 100 μ m。

(G) 腫瘍浸潤リンパ球(TILs)染色の isotype control。倍率, x100; scale bar, 200 μ m。

(H) 腫瘍浸潤リンパ球(TILs)染色の isotype control。倍率, x400; scale bar, 100 μ m。

(I) 胃癌組織での CD8 陽性細胞の染色。倍率, x100; scale bar, 200 μ m。

(J) 胃癌組織での CD8 陽性細胞の染色。倍率, x400; scale bar, 100 μ m。

(K) CD56 陽性細胞の染色。倍率, x100; scale bar, 200 μ m。

(L) CD56 陽性細胞の染色。倍率, x400; scale bar, 100 μ m。

I-L での胃癌周囲の CD8 または CD56 陽性単核球の免疫組織化学的検出は E-H で使用した同切片を用いた。

Figure 3.-①

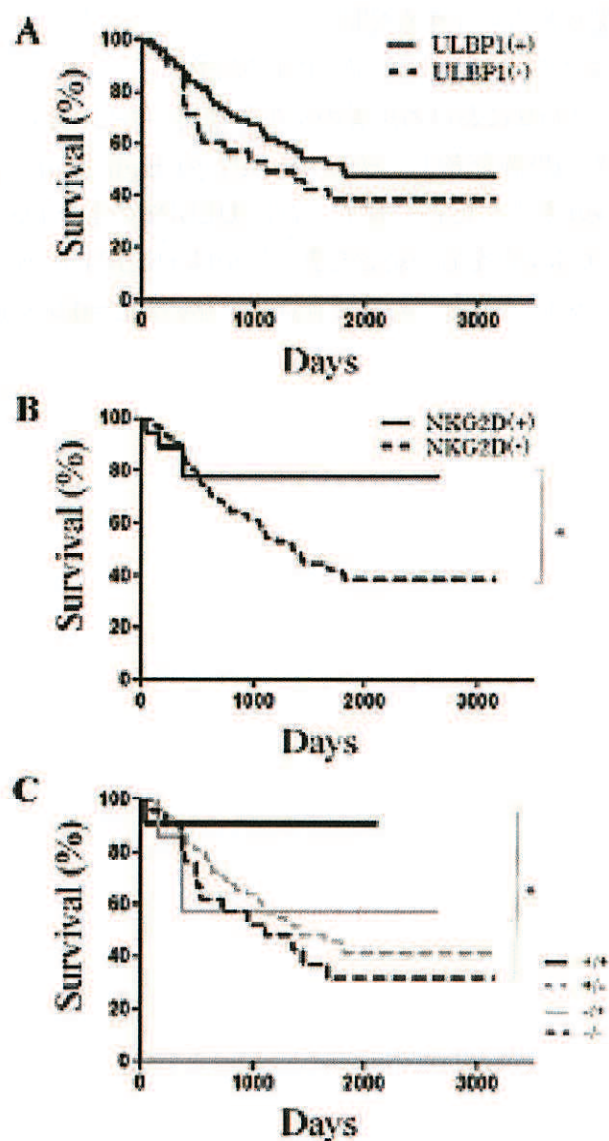


Figure 3. (A) OS in patients with high (+) or low (-) ULBP1 expression. (B) OS in patients with high (+) or low (-) NKG2D expression ($P=0.0217$). (C) OS in patients with combinations of ULBP1 and NKG2D expression. ++ represents patients with high expression levels of ULBP1 and NKG2D. +/- represents patients with high ULBP1 and low NKG2D expression levels. -/+ represents patients with low ULBP1 and high NKG2D expression levels. -/- represents patients with low ULBP1 and NKG2D expression levels. There is a significant difference between ++ and -/- ($P=0.0096$). OS, overall survival; ULBP, UL16 binding protein; NKG2D, natural killer group 2 member D.

Figure 3.②

(A) high(+)と low(-) ULBP1 発現患者の全生存期間。

(B) high(+)と low(-) NKG2D 発現患者の全生存期間(P=0.0217)。

(C) ULBP1 と NKG2D の組み合わせにおける患者の全生存期間。+/+は ULBP1 と NKG2D の high expression level をもつ患者を表す。+/-は ULBP1 の high expression level と NKG2D の low expression level をもつ患者を表す。-/+は ULBP1 の low expression level と NKG2D の high expression level をもつ患者を表す。-/-は ULBP1 と NKG2D の low expression level をもつ患者を表す。+/+と-/-の間で有意差を認めた(P=0.0096)。