creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000266867
조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2018년 8월

박사학위 논문

간세포암종에서 2종류 클론의 PD-L1과 C-MET 발현의 의의

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

천 형 욱

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

간세포암종에서 2종류 클론의 PD-L1과 C-MET 발현의 의의

Significance of two different clones of PD-L1 and C-MET expressions in hepatocellular carcinoma

2018년 8월 24일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

천 형 욱

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

간세포암종에서 2종류 클론의 PD-L1과 C-MET 발현의 의의

지 도 교 수 홍 란

이 논문을 의학박사학위 신청논문으로 제출함

2018년 4월

조 선 대 학 교 대 학 원
의 학 과
천 형 욱

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

천형욱의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 기 근 홍 (인)

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 미 자 (인)

위 원 원광대학교 교수 최 금 하 (인)

위 원 조선대학교 교수 홍 란 (인)

2018년 6월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

표목차 ..... ⅰ

도목차 ..... ⅱ

Abstract ..... ⅲ

Ⅰ. 서 론 1

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 증례선정..... 3
2. 조직병리학적 분석
   1) 광학현미경적 검사..... 3
   2) 면역조직화학적 검사 3
   3) 면역조직화학적 염색의판정..... 4
3.통계학적 분석..... 5

Ⅲ. 결 과

1. 임상병리학적 인자들의 분포..... 6
2. PD-L1의 발현과 임상병리학적 인자들의 상관성..... 6
3. C-MET의 발현과 임상병리학적 인자들의 상관성..... 7
4. 2종류 클론의 PD-L1 발현의 비교..... 7
5. C-MET 발현과 PD-L1 발현의 상관성..... 9

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 고 찰 10

Ⅴ. 결 론 17

참고문헌 18

표 26

사진부도 32

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Summary of clinicopathologic factors 26

Table 2. Relation of clinicopathologic factors with expression of PD-L1 (SP263) on tumor cells and immune cells 27

Table 3. Relation of clinicopathologic factors with expression of PD-L1 (SP142) on tumor cells and immune cells..... 28

Table 4. Relationship of clinicopathologic factors with expression of C-MET 29

Table 5. Comparison of expression of 2 clones of PD-L1, SP263 and SP142 30

Table 6. Agreement of PD-L1 detection between tumor cells and immune cells determined by SP263 clone 30

Table 7. Agreement of PD-L1 detection between tumor cells and immune cells determined by SP142 clone 30

Table 8. Correlation of expression of c-MET and 2 clones of PD-L1 31

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Fig 1. Immunostaining pattern of 3 antibodies (SP263 PD-L1, SP142 PD-L1, and C-MET) 32

Fig 2. Immunostaining score of representative cases 33

Fig 3. Relationship between PD-L1 detection by SP263 and SP142 34

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Significance of expressions of two different clones of PD-L1 and C-MET in Hepatocellular carcinoma

Chun, Hyung-Wook
Advisor: Prof. Ran Hong, M.D. Ph.D
Department of Medicine
Graduate School of Chosun University

Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) is an essential immune checkpoint protein for immune evasion of malignant tumor. Also, the overexpression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and PD-L1 has been associated with poor prognosis in many cancers. In recent years, there have been advances in cancer immunotherapy and the blocking of the binding between the PD-1 and PD-L1 has been investigated and utilized as the primary target for anti-tumor immunotherapies. In diagnostic pathology, it is crucial to detect the PD-L1 positive cases with a validated immunohistochemistry (IHC) in malignant tumor including lung cancer and urinary bladder cancer. Preliminary data show that C-MET promotes survival of some cancers such as renal cancer through the regulation of PD-L1. However, the expression and the relationship for PD-L1 in Hepatocellular carcinoma (HCC) have not been well characterized and no immunotherapeutic option is currently available for HCC in Korea. Therefore, it is crucial to investigate the expression of PD-L1 and C-MET and their association with clinicopathologic factors to develop targeted treatments for HCC.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

This study was aimed to examine the expression of PD-L1 in tumor cells (TC) and immune cells (IC) of 70 HCC samples using IHC. This study utilized two clones of anti-PD-L1 antibodies (Abs), SP263 and SP142, which are currently commercially-approved for quantifying PD-L1 expression for lung cancer and urinary bladder cancer. And, This study assessed the expression of C-MET in TC. In addition, This study examined the correlation between expression of two clones of PD-L1 and clinicopathologic factors. The SP263 PD-L1 identified more positive cases compared with the SP142 PD-L1 in both TC and IC; for TC, there were 14/70 positive cases by SP263 but only 2/70 positive cases by SP142. For IC, 49/70 (SP263) and 30/70 (SP142) cases were immuno-reactive for PD-L1 expression. For each clone of anti-PD-L1 Ab, the expression of PD-L1 were much higher in IC than those in TC. Of several clinicopathologic factors, Edmondson-Steiner grade was statistically related to high expression level of SP263 PD-L1 in TC.

This study also investigated the C-MET expression and the correlation of its expression with other clinicopathologic factors. C-MET was significantly associated with advanced T stage. C-MET expression was positively related to SP263 PD-L1 expression in TC. These results suggest that C-MET plays a role in regulating PD-L1 expression in HCC. Identification of PD-L1 positive cases using two different clones of anti-PD-L1 Abs was generally comparable in 70 HCC samples.

These results would be helpful in providing background data for developing targeted immunotherapy of HCC using PD-L1 or C-MET and for evaluating selection criteria of target population for such treatments.

Key words: PD-L1, C-MET, Immunotherapy, Hepatocellular carcinoma, Immunohistochemistry

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서론

간세포암종(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 전 세계적으로 매년 백만 명 이상의 사망원인이 되는 공격적인 악성종양 중 하나로 종양으로 인한 사망원인 중 두 번째로 높은 것으로 알려져 있다[1, 2]. 이는 B형과 C형 바이러스 간염 등의 만성 간염 발생과 높은 상관관계를 보이고 있으며[3], 한국에서는 100,000명 당 24.5명 빈도의 높은 유병률을 보이고 있다[4]. 간세포암종을 치료하기 위해 절제술이나 이식, 그리고 경동맥 화학색전술 등을 포함하는 국소 치료요법이 향상되고 있지만 후기 질병 단계의 환자나 재발 환자 다수에서는 여전히 예후가 불량하다[4]. 간세포암종 환자의 다수는 간암화학색전술이나 넥사바를 이용한 치료가 가능하였으나[5] 넥사바의 경우 비싼 가격과 부작용으로 인해 치료가 제한적이고, 간세포암종의 성장을 억제하는 효과가 보고되었지만, 괴사를 유도하지는 못한다고 알려져 있다[6]. 이러한 여러 제한점 때문에 간세포암종 환자의 치료에 대한 새로운 접근이 요구되고 있다[4]. 그중 하나로 최근 면역시스템의 중요한 체크포인트와 관련된 유전자를 타겟으로 하는 종양 치료에 주목할 만한 발전이 있었다[7]. 그 중 가장 주목받고 있는 것은 PD-L1(Programmed cell death ligand 1)으로 이는 비활성화된 면역세포에서만 제한되어 발현되는 것으로 알려졌으나 여러 연구를 통하여 활성화된 T세포, B세포, 자연살해세포, 수지상 세포, 단핵구 등 활성화된 다양한 면역세포에서도 발현되는 것으로 밝혀졌다.[8,9]. PD-L1 은 항원제시세포와 실질세포, 내피세포 등의 다양한 인간세포에서 발현되는 PD-1 (Programmed cell death protein 1)의 리간드로써, PD-1과 결합하였을 때 종양을 억제 시키는 면역반응(항종양면역)을 억제하는데 중요한 역할을 하고 있다. PD-1/PD-L1 신호전달경로를 살펴보면 신호를 전달하는 중간물질이 탈인산화를 거쳐 T 세포 기능을 억제하며 이로 인해 IFN-γ 등의 사이토카인의 생산이 감소되고, T 세포 증식이 억제된다[9]. 이는 신장세포암, 위암, 난소암, 혈액암 등 여러 종류의 암종에서 활성화된다고 보고되었으며[10-15], PD-1/PD-L1 신호전달경로의 활성화에 따른

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

부적절한 예후가 난소내피악성종양, 폐의 비소세포암종, 위암, 비인두 종양 등 다양한 악성종양에서 보고되고 있다[16-21].

C-MET은 HGF(간세포증식인자, Hepatocyte Growth Factor)/Scatter factor(HGF/SF)의 수용체로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 암세포 내의 여러 경로를 활성화시킴으로써 암의 침윤 및 전이와 직접적인 관련이 있다고 보고되어 신규 항암제의 표적단백질로 각광받고 있는 물질이다[22]. PD-1/PD-L1 신호전달이 활성화되는 과정에서도 HGF-induced C-MET activation이 일어나 C-MET의 여러 가지 작용 중 PD-L1 경로 조절 기전이 있는 것으로 알려져 있다[22]. C-MET는 HGF와 결합하여 이량체를 형성하고, C-MET의 카복시 말단에 있는 티로신 잔기가 인산화되어 결과적으로 MAPK, PI3K 등이 활성화되며 최종적으로 세포의 증식, 생존 그리고 혈관신생에 영향을 준다. 암세포의 경우 C-MET/HGF 신호전달경로가 과활성화되어 세포증식과 혈관신생 등이 제어되지 않는다[23,24]. C-MET를 타겟으로 하는 약물에는 카보잔티닙(Carbozantinib)이 있는데 간세포암종 환자에서 종양의 반응성과 Alpha-fetoprotein (AFP)의 수치를 감소시켰다고 보고되었다. 도 다른 간세포암종 치료제인 티반티닙(Tivantinib)은 현재 임상시험 진행 중이며 C-MET의 발현이 높은 환자군에게 투여하였을 때 전체적 생존율이 증가하였다고 보고되었다[25,26].

현재 우리나라에서 면역항암제는 폐의 소세포암종, 방광암종, 전이성 흑색종에 한하여 승인되어 있는 실정이다. 면역항암제 개발과 승인을 위해 우리나라 간세포암종 환자에서 PD-L1과 C-MET의 발현양상에 때한 연구와 함께 이 물질들의 간세포안종의 성장 및 억제기전에 대한 연구가 필요하다. 이를 위해 본 연구에서는 면역항암제 옵디보와 티센트릭의 처방기준이 되는 SP263 clone과 SP142 clone의 PD-L1 발현 여부 및 그 정도를 간세포 암종의 종양세포 및 면역세포에 대하여 각각 비교, 분석하고, 이들의 발현과 여러 임상병리학적 인자들과의 상관성을 분석하였다. 또한 C-MET 억제를 통한 면역조절 기전도 항암작용에 기여할 것으로 기대되므로, 향후 이를 이용한 항암제 및 면역항암제 개발 등을 위한 기초연구로써 간세포암종에서 C-MET과 PD-L1 발현 양상을 확인하고 서로 상관관계를 조사하였다. 이 연구의 결과가 향후 우리나라에서 간세포암종의 면역항암제개발이나 처방기준 결정에 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 기대한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 증례선정

2013년 2월부터 2017년 12월까지 조선대학교병원에서 간세포암종의 진단 하에 간엽절제술(lobectomy) 혹은 구역절제술(segmentectomy)로 외과적 적출을 시행한 환자 중 조직 보관 상태와 의무 기록이 양호한 70명의 환자를 비연속적으로 선택하였다.

2. 조직병리학적 분석

1)광학현미경적 검사

환자의 임상기록과 조직 슬라이드를 후향적으로 분석하였다. 환자의 나이, 성별을 확인하였으며 혈청학적으로 HBsAg 및 HBsAb의 유무를 확인하였다. 관찰대상이 된 조직들은 10% 중성 완충 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4~5 ㎛ 두께로 박절하여 H&E 염색을 실시하여 슬라이드를 제작하였다. 광학현미경으로 검경하여 연구 목적에 부합하는 대표적인 부위, 즉 종양과 종양-비종양의 경계부위가 포함된 블럭을 선택하여 면역조직화학적 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다. H&E 슬라이드를 통해 각 종양을 재검토하고 종양의 크기 및 T 병기, 종양의 조직학적 분류, 종양의 개수, 종양의 문맥침윤 유무, 담관침윤 여부, 종양의 배경에 경화성 병변의 존재여부 및 Edmonson-Steiner grade (ES grade)를 확인하였다. 면역조직화학적 염색을 통해 두 종류의 서로 다른 클론의 PD-L1(SP-142 clone, SP-263 clone)과 C-MET의 발현여부를 확인하였다.

2)면역조직화학적 검사

PD-L1 (SP-142,Ventana,Roche)과 PD-L1 (SP-263,Ventana,Roche), C-MET (SP-44, Ventana, Roche)에 대한 rabbit 단클론항체는 제조사 메뉴얼에 따라 테스트하였

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

다. 면역조직화학 염색은 Benchmark ULTRA (Ventana medical system, USA)을 이용하여 시행하였다. PD-L1 (SP-142)의 특이항체의 발현 및 증폭은 OptiView DAB IHC detection Kit (Cat.No.760-700/0639650000)과 OptiView Amplification Kit (Cat.No.760-099/06396518001)을 사용하였다. PD-L1 (SP-263)의 immuno-localization은 haptenated 2차 항체와 multimer anti-hapten-HRP conjugate (Optiview DAB IHC detection kit,Cat.No.760-700)를 사용하였다. 이후 Specific Ab-enzyme complex는 enzyme reaction product를 사용하여 가시화하였다. C-MET은 상용화된 usual Ventana detection kit을 사용하였다. 각 항체는 양성 및 음성대조군 염색을 동시에 시행하였으며, PD-L1 (SP-142)은 정상 편도조직을, PD-L1 (SP-263)은 태반조직을 음성 및 양성 대조군으로 사용하였고, C-MET은 대장암 조직을 양성대조군으로 사용하였다. 염색과정을 간략히 설명하면, 파라핀 포매 조직을 4㎛ 두께로 박절하여 X-tra TM슬라이드 (Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene에 탈파라핀 한 뒤, 무수알코올 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시킨 후 LSAB방법에 의해 염색을 시행하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10mm,pH6.0)에 슬라이드를 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50mM Tris 완충용액 (TBS, pH7.5)으로 수세하였다. 조직절편 내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 1차 항체 처리하였다. 슬라이드에 각각 PD-L1 (SP-142), PD-L1 (SP-263), C-MET을 도포하여 32분 동안 배양하였다. 헤마톡실린(Ventana catalog no.760-2021)으로 대조염색을 시행하고, Clearmount™ Mountingsolution (Zymed Laboratories, South SanFrancisco, CA, USA)으로 봉입하였다.

3)면역조직화학적 염색의 판정

염색결과 판정은 주관성을 배제하기 위하여 환자의 임상경과를 알지 못하는 병리의사에 의해 시행되었다. PD-L1 (SP-142)과 PD-L1 (SP-263)은 종양 내 및 종양 인접 주위 기질에 있는 면역세포(림프구, 대식구, 가지세포, 과립구)에 짙은 갈색

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

의 punctate staining pattern으로 염색상을 보이며, 면역세포의 ≥5%에서 염색되는 경우 양성으로 판정하였다. 종양세포에서는 짙은 갈색의 cell membrane pattern의 염색상을 보이며, 종양세포의 <1%, 1~5%, 5~50%, ≥50%에서 염색되는 경우를 각각 0, 1, 2, 3 점으로 구분하였다. C-MET은 종양세포의 세포막 and/or 세포질에 노란색~진한 갈색으로 발현되었으며 염색강도에 따라 4등급으로 나누었다 (0:negative 1: weak 2: moderate 3: intense).

3. 통계학적 분류

통계학적 분석은 STAT View software package(Abacus Concepts, Berkeley, USA) 프로그램을 사용하였다. 간세포 암종에서 PD-L1(SP-142), PD-L1(SP-263), C-MET 단백의 발현분포를 살펴보았고, 각 단백의 발현간의 상관관계, 여러 임상병리학적 요소들과 각 단백의 발현과의 상관관계에 대한 통계학적 분석은 X^2-test와 Fisher's exact test를 이용하였으며, 통계학적 유의수준은 $p<0.05$으로 하였다. 통계처리를 위하여 T stage는 2, 3, 4단계 전체를 1단계와 비교하였고 Edmonson-Steiner grade는 1, 2단계는 저등급으로, 3, 4단계는 고등급으로 분류하여 비교하였다. PD-L1은 0점과 1점은 음성 (<5%)으로, 2와 3점은 양성으로, C-MET는 0점과 1점은 저등급으로, 2와 3점은 고등급으로 구분하여 통계학적 분석을 시행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 결과

1. 임상병리학적 인자들의 분포

총 70명의 간세포암종 환자들의 여러 임상병리학적 인자들의 분포를 조사하였다(Table 1). 평균 연령은 61세였고 연령분포는 33세에서 80세까지였다. 전체적인 성비는 6:1 (85.7%:14.3%)로 남성이 여성에 비해 월등히 많았다. 종양의 크기는 T 병기의 기본이 되는 2cm로 나누었을 때 2cm 미만 31례(44.3%), 2cm이상 39례(55.7%)이었으며, T 병기의 분포는 pT1이 54례(77.1%), pT2가 11례(15.7%), pT3가 3례(4.3%), pT4가 2례(2.9%)로 분류되었다. 간 문맥 침범은 3례(4.3%)에서 관찰되었다. 종양의 조직학적 분류는 육주형(Trabecular type)이 54례(77.1%), 위샘형(pseudoglandular type)이 4례(5.7%), 혼합형(mixed type)이 12례(17.1%)로 나타났다. 담관 침윤이 1례(1.4%)에서 관찰되었다. ES grade는 저등급 (1,2단계)이 45례 (64.3%), 고등급 (3, 4단계)이 25례(35.7%)에서 관찰되었다. HBsAg와 HBsAb 의 존재여부를 분석했을 때 각각 43례(61.4%)와 13례(18.6%)에서 양성으로 확인되었다. 53례(75.7%)의 조직에서 주변 간의 뚜렷한 경화성 병변을 확인할 수 있었다.

2. PD-L1의 발현과 임상병리학적 인자들의 연관성

2가지 클론의 PD-L1 (SP263, SP142)의 발현 양상을 살피고 그들의 발현과 여러 임상병리학적 인자들 간의 연관성을 조사하였다(Table 2, Table 3, Table 5). SP263 클론의 PD-L1은 종양세포의 20%(14/70)에서, 면역세포의 70%(49/70)에서 발현되었다. SP142 PD-L1은 종양세포의 2.9%(2/70)에서, 면역세포의 42.9%(30/70)에서 발현되는 것이 확인되었다. SP142 PD-L1의 면역세포에서의 발현은 SP263 PD-L1의 면역세포의 발현과 2례를 제외하고 모두 중복되었다. 종양세포의 발현에서는 SP142 PD-L1의 발현이 2 case로 이들은 모두 SP263 PD-L1에도 양성을 보였다.

종양세포에서의 SP263 PD-L1 발현은 여러 임상학적 인자들 중 유일하게 ES grade와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다(Table 2, $p<0.01$). 즉, ES grade가 높을수록,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

즉 더 악성도가 높을수록 SP263 PD-L1의 양성률도 높았다. ES grade가 3,4단계인 경우는 PD-L1이 발현되는 14례의 종양 중 10례(71.4%)였으나, PD-L1이 발현되지 않는 56례의 종양 중 15례(26.8%)에 불과했다. 종양세포의 SP263 PD-L1 발현과 그 외 다른 임상적 요인들과는 유의한 연관성을 보이지 않았으나 종양의 조직학적 분류에서 위샘형과 혼합형이 육주형보다 PD-L1의 발현빈도가 높은 경향을 보였다(p=0.09).

SP263 PD-L1의 면역세포에서의 발현 및 SP142 PD-L1의 종양세포 및 면역세포에서의 발현은 임상병리학적 인자들과 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

3. C-MET의 발현과 임상병리학적 인자들의 연관성

C-MET의 발현 중에서 고등급의 발현양상 비율은 전체적으로 낮았다(10/70례,14.3%)(Table 4). 여러 임상병리학적 인자들 중 T 병기가 높을수록 C-MET가 고등급의 발현이 증가하는 유의한 관련을 보였다(p=0.042). T stage를 pT1과 pT2~4로 구분하고 C-MET는 저등급과 고등급으로 분석하였을 때 T stage가 pT2~4인 경우에 있어서 C-MET의 발현은 고등급인 10례 중 5례(50.0%)에서 발현되어, 저등급인 60례 중 11례(18.3%)보다 높게 발현되었다. 그 외의 통계학적 유의한 관련은 관찰되지 않았다.

4. SP263 PD-L1과 SP142 PD-L1 발현의 비교

2가지 클론의 PD-L1 발현을 비교하였을 때, SP142 PD-L1에 비해 SP263 PD-L1 발현이 더 높게 나타났다. 대부분의 예에서(51/70례, 72.9%) PD-L1 발현이 측정되었는데 모두 종양주변 면역세포에서 발현되었다(SP263:49례, SP142:30례). 흥미롭게도 SP142에 의한 PD-L1 양성 반응을 보인 30례 중 28례는 SP263 양성 증례와 중복발현이었고, 단 2례만이 SP142로만 면역 세포의 PD-L1 발현이 측정되었다. 이를 종양세포와 면역세포에서 발현을 각각 비교하였을 때, 암세포보다는 면역세포에서 현저하게 높은 발현을 보였다. 전체적으로는 SP263 면역세포(49/70, 70%), SP142 면역세포 (30/70, 42.9%), SP263 암세포(14/70, 20%), SP142 암세포(2/70, 2.9%) 순으로 발현되었다.

종양세포(TC)에서 PD-L1 발현율은 낮았는데(14/70례, 20%), 14례 모두 SP263에서

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

PD-L1발현이 측정되었으며 그중 2례는 SP142 양성으로도 나타나, SP263 양성 증례와 중복되었다. 각 세포 종류별로 결과를 요약할 때, 면역 세포와 종양 세포 내에서 모두 두 클론의 결과가 서로 상당 부분 일치하며 SP142 PD-L1 양성 반응은 대부분 SP263 PD-L1 양성 반응에 포함되는 경향성이 있었다.

한편 두 클론을 이용했을 때 서로 다른 세포 종류 간에 나오는 결과를 비교해 보았다. 종양세포에서 SP263 PD-L1 양성 반응이 나온 14례는 모두 면역세포 SP263 반응이 양성이었다. SP142 PD-L1 양성 반응이 나온 2례의 종양 세포는 SP263 종양 세포 결과도 양성이었고 면역세포에서 SP142 PD-L1 또한 중복 양성이었다. 이를 종합해 보면 PD-L1 발현 측정 시 면역세포에서 양성반응은 종양세포에서도 대부분 양성을 보이는 중복성과 포괄성을 발견하였다.

이들의 발현의 상관도를 분석하였을 때, 통계적으로 유의미한 양의 관계성이 있었다(Table 5, Table 6, Figure 3). 즉 면역세포에서 SP263 PD-L1 양성률이 높을수록 SP142 PD-L1의 양성율도 높았다(Table 5, $p<0.001$).

간세포암종에서의 SP263 PD-L1 반응과 면역세포에서의 SP142 PD-L1반응도 유의미한 연관성이 있었다(Table 5, $p=0.005$, SP263과 SP142 동시 양성반응:11/70, SP263과 SP142 동시 음성반응:37/70).간세포암종에서의 SP263 PD-L1 결과와 간세포암종에서의 SP142의 PD-L1 결과도 양의 유의성이 있었으나(Table 5, $p=0.038$), 이 중 SP263과 SP142 동시 양성반응의 경우는 2/70례이었으며 SP263과 SP142 동시 음성반응 경우가 56/56례로, 일치도는 높았으나 PD-L1 양성반응도가 매우 낮았다. SP263 PD-L1의 면역세포 내 반응과 SP142 PD-L1의 간암세포내 반응 결과는 유의한 관련이 없었다(Table 5, $p=1.000$).

SP263 PD-L1을 이용했을 때 각 시료 내에서 면역세포와 간암세포에서의 나온 반응 역시 유의한 관련이 있었다(Table 6). 각 시료에서 면역세포와 간암세포 모두 양성 반응이 나온 경우가 14/70이었으며, 면역세포와 간암세포 모두 음성반응이 21/70례에서 있었다($p=0.007$, Table 6). SP142 PD-L1에 의한 결과는 면역세포와 종양세포의 양성반응에서 상관성이 없었다(Table 7).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. C-MET 발현과 PD-L1 발현의 상관성

각 클론의 PD-L1 발현과 C-MET 발현과의 상관성을 조사하였을 때 SP263 PD-L1의 종양세포에서의 발현과 C-MET 발현이 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다(p=0.022) (Table 8). 면역세포에서의 SP263 PD-L1 발현과, SP142 PD-L1 발현은 C-MET발현과 통계적으로 유의한 관련이 보이지 않았다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 고 찰

체내 면역 시스템에서 T 세포는 T 세포 수용체를 통해 MHC-항원 복합체를 인지하며 활성화되, 동시자극(co-stimulatory)신호 및 동시억제(co-inhibitory) 신호의 조절을 통해서 T 세포의 활성화를 조절한다[27]. 하지만 암세포에서 체내 면역공격에 대한 면역회피 기작이 활성화되는데 이 중 하나로 암세포 파괴를 방해하는 단백질을 발현시켜 T 세포의 면역공격을 방어한다[27].

인공면역 단백질을 체내에 주입하여 면역체계를 자극함으로써 면역세포가 선택적으로 암세포만을 공격하도록 유도하는 치료약제인 면역항암제에는 면역체크포인트억제제(CTLA4 억제제, PD-1 억제제, PD-L1 억제제), 면역세포치료제, 면역바이러스치료제 등이 있다[27]. 면역항암제는 1세대 화학항암제의 부작용과 2세대 표적항암제의 내성을 개선시킨 항암제로, 장기간 지속되는 효과와 장기간 생존(long-term survival), 넓은 스펙트럼의 항암효과(broad anti-tumor activity), 낮은 부작용(low toxicity profile) 등의 장점이 있다[27]. 이러한 장점으로 면역항암제는 관심을 받기 시작했고 2010년에 전립선 샘암종 치료에 승인된 자가종양백신 (autologous tumor vaccine)인 프로벤지 주(Provenge®, 성분명:sipuleucel-T) 이후 면역체크포인트를 억제하는 약물이 승인되었다[27]. 최근에는 PD-1/PD-L1 신호전달경로를 타겟으로 하여 T 세포의 암세포에 대한 사멸기작활성을 유도하는 PD-1 및 PD-L1 억제제가 개발 및 승인되고 있다[24]. PD-1/PD-L1 경로는 암세포의 T세포 면역 회피 기전 중 하나로 암세포가 세포표면 단백질로 PD-L1을 발현하게 되고 이를 T 세포에서 발현하는 PD-1이 결합하여 T세포의 항종양 면역기능이 억제된다[27].

2014년 미국 FDA의 승인을 받은 최초의 PD-1 억제제인 키트루다 주(Keytruda®, 성분명: pembrolizumab)는 2015년에 국내에서 전이성 흑색종 및 비소세포폐암에 대한 치료제로 승인되었다[27]. 이어서 옵디보 주(Opdivo®, 성분명: nivolumab)는 PD-1에 대한 두 번째 억제제로써 2015년 미국 FDA의 승인을 받았다[27]. 국내에서는 전이성 흑색종 및 비소세포폐암, 림프종, 두경부 편평세포암, 요로상피암에 대한 치료제로써 승인받았다[27]. PD-1 억제제 개발 이후 암세포에서 발현하는 PD-L1의 억제제에대한 면역항암제의 개발이 이루어졌다[27]. 최초의 PD-L1 억제제는 2016년 미국 FDA의 승인을

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

받은 티쎈트릭 주(Tecentriq®, 성분명: atezolizumab)로서 국내에서는 2017년 국소 진행성 또는 전이성 요로상피암 및 비소세포폐암의 치료제로 승인되었다. 요로상피암종과 비소세포폐암에 대한 PD-L1 발현율은 각각 35-95%, 33-80%로 알려져 있다[27]. 같은 해에 두 번째 PD-L1 억제제인 임핀지 주(Imfinzi®, 성분명: durvalumab)가 수술 또는 항암치료 이후에도 진행되는 중증 방광암 치료제로 미국 FDA의 승인을 받았다[27].

이처럼 면역세포의 PD-1과 암세포의 PD-L1의 상호작용을 억제하는 면역항암제는 초기의 흑색종의 치료에 좋은 임상결과를 얻었고 더 나아가 비소세포폐암과 신장암 치료에도 승인되었으며 현재에는 림프종, 요로상피세포암 등과 같은 다양한 암의 치료제로 그 적응증이 확대되고 있다[28]. 2018년에 미국 FDA는 옵디보를 현재 간암약물치료의 표준치료제로 권고되는 표적치료제인 넥사바(성분명: 소라페닙)로 치료를 받은 경험이 있는 간암에 대해 2차 치료제로 PD-L1 발현여부와 관계없이 적응증으로 승인하였다[28]. Checkmate-040 임상연구에 의하면, 옵디보는 미국에서 활성 B형 및 C형 간염의 동반 여부와 PD-L1 발현율과 관계없이 간암 환자에서 효능을 보였다[28].

PD-L1은 종양세포에서 발현하는 수용체로 PD-1과 상호작용하여 T세포의 활성을 억제함으로 항종양 면역을 억제하며 실제로 PD-L1의 높은 발현을 보이는 환자군에서 나쁜 예후를 보여주고 있다[29]. Gao 등[25]은 PD-L1의 과발현과 종양의 크기가 종양의 재발에 있어서 중요한 상관관계가 있다고 보고하였다. 이 연구에서는 PD-L1의 발현이 높은 간세포암종 환자군이 PD-L1의 발현이 낮은 간세포암종 환자군보다 나쁜 예후를 보였으며 더 나아가 다변량 분석을 통해서 수술 후 재발에 대한 독립적인 지표로 간세포암종에서의 PD-L1의 발현이 사용될 수 있음을 확인하였다. 또 다른 최근의 연구에서는 CD4+ T세포, CD8+ T세포와 함께 PD-L1 발현이 간세포 암종에 대한 예후적 지표가 될 수 있음을 제시하였다. 이 연구는 PD-L1 항체에 대한 양성염색이 간세포암종 재발의 예후적 지표가 될 수 있음을 보여 주었다[30].

Chang 등[7] 은 간세포암종에 대한 연구를 통해, CD8+ Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) 환자 군에서 PD-L1이 나쁜 예후인자임을 증명하였으며 생존 연구를 통해 PD-L1이 독립적인 나쁜 예후인자임을 밝혔다. 간세포암종 환자군에 대한 나쁜 예후와 PD-L1, PD-L2의 과발현 간의 상관관계를 분석한 Jung 등[4] 은 PD-L1군의 과발현

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

이 전체적인 종양의 크기 이외에도 생존과 종양 재발에 상관관계가 있음을 보여주었다.

반면, 식도암 환자의 예후와 PD-L1 발현 간의 상관성 연구에서는 식도암 조직에서 PD-L1의 발현이 나타났지만 예후와 PD-L1 발현 간의 상관관계를 보이지 않았다[31]. 그러나 Miao 등[22]의 연구에서는 식도암 환자의 나쁜 예후는 다른 장기로 전이가 주된 원인이며, PD-L1의 발현이 전이에 중요한 역할을 할 것이라고 예측했다. 이를 비추어 보았을 때 PD-L1의 발현은 종양의 재발을 예측하는 데 있어서 중요한 지표로써 연구의 가치가 있을 것으로 예상된다.

한편 Gao 등[25]의 또 다른 연구결과는 PD-L1과 PD-L2의 과발현이 나쁜 생존율과 밀접한 관련이 있음을 보여 주었지만, 재발률의 차이에 대해서는 통계학적으로 입증하지 못하였다. 이것은 PD-L1 또는 PD-L2의 발현을 억제하는 것보다 PD-1의 발현을 억제하는 것이 암을 타겟팅하는 데 있어서 더 중요할 수도 있음을 보여 주었다.

임상과 예후에 관한 자료를 기반으로 하는 연구 이외에도 간염과 간세포암종 환자의 간 조직에서의 PD-1과 PD-L1의 발현을 면역염색기법을 사용하여 확인한 연구에서는 B형 간염 바이러스(HBV)-간염환자와 간암 환자에서 보이는 PD-L1의 발현은 종양이 증식하는 동안 간세포암종의 초기 병기에서 높은 수준의 발현이 나타나는 반면, 말기로 진행될수록 낮은 수준으로 발현함을 보여 주었다[26]. 한편, HBV 감염은 간암 조직에서 PD-L1 발현에 영향을 주지 않는 인자로 관찰되었다. 하지만 냉동요법(cryoablation) 치료를 시행한 HBV 원인의 간세포암종환자군에서 PD-1, PD-L1의 발현과 예후의 상관관계를 조사한 연구에서는 PD-L1의 발현이 간암 환자의 나쁜 예후에 영향을 주는 결과를 보여 주었다[32]. 앞선 결과들은 PD-L1의 발현과 HBV 감염에 의한 간암환자의 생존율과의 상관관계에 대해서는 추가적으로 연구가 필요하다는 것을 시사한다.

SP142는 PD-L1억제제인 티쎈트릭제제의 처방기준이 되는 PD-L1 단일항체로써 PD-L1에 대한 토끼 혈청의 단일 항체로 알려져 있다[33,34]. 이 단일 항체는 진행된 요로상피암과 비소세포폐암에 대해서 atezolizumab을 이용한 치료 가이드라인을 확립하는 과정에서 PD-L1을 탐지하기 위한 complementary assay kit로써 승인을 받는 과정에서 타당성이 입증되었다[35-37]. 이 연구들에서 complementary assay는 다양한 면역세포와 종양세포에서 PD-L1 발현 수준의 조합이 임상시험에서의 양성 판정 기준으로 이용되었

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

다[38-39]. SP263은 PD-1 억제제인 옵디보제재의 처방기준이 되는 PD-L1 단일항체로서 승인되었다. SP263은 인간 PD-L1의 세포 내부에 위치하는 부분을 직접 타겟팅하는 단일항체이며[40], 비소세포폐암 조직시료에 대해 적용함에 있어서 최적화가 이루어졌고 진단적 가치로써 타당성이 입증되었다. 또한 임상시험에서 nivolumab을 이용한 치료 가이드라인을 세우는데 도움이 되는 가치로서도 타당성을 입증 받았다[41,42].

한 연구에서는 160명의 비소세포폐암 환자의 수술로 절제된 부위와 이와 일치하는 폐 생검 부위에서 PD-L1 발현을 SP142를 이용한 면역조직화학 분석 기법을 통해 확인하였다. 이 연구에서 PD-L1의 발현은 종양세포와 면역세포 모두에서 분석이 진행되었다[43]. 이 연구의 결과는 절제된 부위와 이와 일치하는 생검 조직에서 SP142를 이용하여 PD-L1의 발현을 확인하였을 때 일치하지 않는 결과를 보여 주었다(overall discordance rate = 48%, κ = 0.218 [poor agreement]). 하지만 79명의 비소세포폐암 환자로부터 절제된 조직과 작은 생검조직을 후향적으로 비교하는 또 다른 연구에 의해 반박되었다[44]. 이 연구에서는 전 연구와 비교에서 작은 조직 시료를 얻었고 절제된 부위와 생검 시료에 대해 SP142를 이용한 면역조직화학 기법을 통해 PD-L1의 발현 양성도를 확인하였을 때 각각 38.0%와 35.4%로 일치하는 결과를 제시하였다(concordance rate of 92.4% and κ value of 0.8366). 결과적으로 작은 시료에 대한 PD-L1의 발현이 비교적 정확하다는 것이 확인되었다. 이러한 회고적 연구는 상대적으로 작은 시료 크기에 제한되기 때문에 전체 생검 시료를 대표할 수 없다는 것이 해결해야 될 숙제로 남겨졌지만[44-46], SP142를 이용한 면역조직화학 분석 기법을 활용하여 PD-L1 발현을 보다 더 정확히 확인하는 방법을 제시하였다는 점에서 의의가 있다.

이전의 많은 연구들은 PD-L1의 발현이 다양한 종양발생 신호전달경로(oncogenic signaling pathway)와 상관관계가 있음을 제시하였다. 한 예로, Azuma 등[45] 은 수술로 절제된 비소세포암종에서 EGFR 돌연변이의 과발현이 높은 PD-L1발현과 상관관계가 있음을 보여주었다. 또한 Tang 등[46] 은 진행된 비소세포폐암에 대해서 티로신 인산화효소 억제제를 이용한 치료 과정에서 EGFR 돌연변이와 PD-L1의 발현이 상관관계가 있음을 밝혔다.

Gabrielson 등 은 간세포암종에서 PD-L1 발현이 종양내부의 CD3+ T세포 및 CD8+ 세포독성 T세포의 밀도와 유의한 관련을 보이며, 생존율의 증가나 낮은 종양 재발률과도

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

상관관계를 보여 종양절제를 시행한 간세포암종환자에서 유용한 예후인자가 될 것이라고 보고하였다[47]. 본 연구에서도 일부 환자군에서 PD-L1의 발현이 면역세포에서도 관찰되었으며, 또한 암세포에서도 관찰되었다. PD-L1의 양성 반응 비율은 SP263 clone으로 확인된 면역세포에서의 발현이 70%로 가장 높았으며, SP142의 면역세포, SP263의 암세포, S142의 암세포 순서의 발현 양상을 보였다. 이들은 2 례를 제외하고 SP263 면역세포 양성증례와 중복되는 양상의 결과를 보여 주었다. 또한 암세포보다는 면역 세포에서 두 종류 항체의 반응율이 높았으며 SP263 clone이 SP142 clone보다 양성도가 높게 나타났다. 두 종류의 항체 간, 면역 세포 간 발현 양상이 전체적으로 양의 상관성이 있음을 보여 주었다. 이 결과를 비추어 보았을 때 SP263나 SP142 결과에서 하나라도 양성 반응이 나온 환자군이 실제 PD-L1을 발현하거나 PD-L1 표적 치료에 적합하다고 가정하면, 다른 세포와 항체의 조합을 이용한 테스트보다 면역 세포 내에서의 SP263 PD-L1 결과가 진단적 가치가 높다고 볼 수 있다. 이는 향후 한국에서 간암종의 면역항암제의 처방기준을 결정할 때 조직학적 기준이 되는 PD-L1 클론 및 양성율 결정의 중요한 자료가 될 것으로 기대된다.

Jung 등[48] 은 간세포암종 환자군에 대한 연구를 통해 PD-L1 발현, 조직소견, 전체적인 종양의 크기 등이 나쁜 예후를 예측할 수 있는 인자임을 보고한 바 있으나, 우리나라 간세포암종 환자군을 대상으로 종양세포와 면역세포에서의 PD-L1과 C-MET의 발현 양상과 서로의 상관성 및 통상적인 예후 예측 인자들과의 연관성에 대한 연구는 없다. C-MET는 암세포의 세포 표면에 과발현 또는 돌연변이 되어 있는 tyrosine kinase의 일종으로 리간드인 간세포성장인자 hepatocyte growth factor(HGF)가 결합하였을 때 세포내부로 암세포의 증식 및 성장의 신호를 전달하는 출발점의 역할을 한다. C-MET/HGF 신호전달은 과활성화 되었을 때 소세포폐암의 침윤 및 증식과 관련되어 있음이 밝혀져 있으며[30], 많은 연구에서 과활성화된 C-MET에 의한 세포 내부 신호전달경로가 폐암뿐만 아니라 다른 고형암에서 나쁜 예후에 대한 예후인자가 될 수 있다는 증거를 제시하였다[49-52].

항종양 면역에 관련하여 종양세포에서 발현하는 수용체인 C-MET는 티로신 인산화효소 수용체(receptor tyrosine kinase)로써 HGF가 리간드로써 결합할 때 활성화된다[53]. C-MET는 사람에게 흔히 나타나는 암종인 간세포암, 위암, 직장암, 유방암 등에

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

서 과발현 되어 있음이 보고되었다[54]. C-MET는 리간드 결합으로 인한 C-MET 수용체의 활성화에 의해 종양의 생존, 증식, 침윤, 전이를 촉진 시킨다고 알려져 있다[55]. 또한 C-MET 활성화에 의한 신호전달은 암의 증식과 침입에 있어서 중요한 메커니즘으로 잠재적, 치료적 타겟으로 확인되고 있다[56,57]. 폐의 비소세포암에 대한 여러 임상적 연구에서 C-MET의 과발현이 나쁜 생존율과 상관관계가 있음을 보고하였으며[58-61], 소세포 폐암환자군의 생존과 PD-1, C-MET의 발현을 연구한 Miao 등[31]은 제한 병기의 소세포 폐암환자에서 C-MET의 과발현이 예후적 중요성이 있음을 보고하였다. 반면에 간세포암종에 대해서는 간세포암종 병변에서 C-MET의 단백질이 발견된 많은 연구가 있었음에도, 예후적 인자에 대한 확신은 명확하지 않은 채로 남아있다. 최근의 연구로 간세포암종 병변의 수술적 절제를 겪은 1,480명의 간세포암종 환자를 대상으로 진행한 메타 분석이 있었다[33]. 이 연구에서는 C-MET의 발현이 낮은 간암 환자와 C-MET의 발현이 높은 간암 환자를 비교하였을 때, C-MET의 과발현이 재발과 생존에 대한 임상적 예후 인자로써 중요한 가치가 있음을 제시하였다. PD-L1이나 C-MET이 발현되면 면역 회피 기전이 작용하여 예후가 나쁠 가능성이 있다고 판단된다.

간세포암종 조직에서 C-MET의 과발현은 종양 진행 단계[62,63], 간중심 정맥 침윤 또는 혈전증[53,54], 간내 전이[64,65], 종양 재발[64,65] 및 전체 생존기간의 단축[66]과 상관관계가 있다고 보고되었다. Wang ZL 등[66] 은 절제술을 받은 간세포암종의 크기가 5 cm 미만인 환자군에서 C-MET의 높은 발현이 생존기간단축과 독립적인 상관관계가 있음을 밝혔다. 그러나 간세포암종 환자군에 대해 진행된 몇 연구에서는 부분적 간절제술을 시행한 초기 병기 환자에서는 C-MET의 과발현이 예후적 가치가 있지만, 말기 간세포암종 환자에게는 명백한 평가지표로 나타나지 않아 C-MET의 과발현이 갖는 예후적 가치가 제한적임을 보여주었다[62,65].

본 연구에서는 C-MET와 두종류 PD-L1의 상관관계와 세 항체와 임상병리학적 인자와 등과 상관관계를 연구하여 상호 간의 관련성을 밝혔다. 암세포에서의 SP263 PD-L1 발현 결과는 C-MET 발현과 양의 상관관계가 있었으며 이는 간세포암종에서 PDL-1의 C-MET 조절 기전이 작용함을 보여준다. 두 번째로 암의 예후와 일반적으로 관계있는 임상학적 인자들과의 상관성을 테스트했을 때 암세포에서의 SP263 PD-L1 결과와 ES grade가 통계적으로 유의하게 나왔으며 C-MET의 발현 양상과 T 병기가 통계적으로 유

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의한 상관성이 있었다. 이와 같이 PD-L1과 C-MET 발현과 임상학적 인자들의 상관관계는 간세포암종의 예후 인자로서 가능성이 있음을 제시하였다.

본 연구는 면역조직화학염색을 통해 SP142 clone과 SP263 clone의 PD-L1의 발현양상을 확인하고 이를 비교하여 향후 간암종에 대하여 면역항암제 승인 및 처방기준의 결정 시 유용한 자료가 될것으로 기대한다. 또한 PD-L1, C-MET의 발현과 임상병리학적 인자와의 상관관계를 밝힘으로써 PD-L1, C-MET의 예후인자로서의 가치를 제시하며 아울러, C-MET의 발현과 SP263 PD-L1의 발현과의 상관관계를 밝힘으로써 향후 C-MET을 타겟으로 하는 면역항암제 개발에 기본 자료가 될 수 있기를 기대한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 결 론

본 연구는 암세포의 면역체계로부터의 회피기전에 관계되는 checkpoint 단백질인 PD-L1과 이를 조절한다고 알려진 C-MET가 간세포암종에서 어떠한 발현 양상을 보이는지 조사하고자 하였다. 특히 PD-L1 발현을 확인함에 있어, 폐암과 방광암에 대해 치료제로 승인된 면역항암제인 nivolumab (Obdivo®)과 atezolizumab (Tecentriq®)의 처방기준이 되는 SP263과 SP142 clone의 PD-L1 항체를 이용하였으며, 간세포암종의 종양세포와 면역세포에서 두 클론의 발현결과를 대조 분석하였다. 이 연구에 사용된 70례의 간암종 중 면역세포에서 51례(72.9%)가 PD-L1 양성으로 확인되었다.(SP263 PD-L1:49/70례, SP142 PD-L1:30/70례(28례는 SP263 PD-L1과 중복발현)). 이는 우리나라 간세포암종 중 높은 비율이 PD-L1을 타겟으로 하는 면역항암요법에 반응할 가능성을 제시하며, 현재 상용화된 SP263과 SP142 클론으로 진단이 용이함을 보여준다. 높은 양성도를 기준으로 했을 때 진단적 가치는 SP263이 SP142 클론보다 높으며, 종양세포보다는 면역 세포에서 높은 경향이 있었다. 이는 향후 우리나라에서 간세포암종의 면역항암제 처방기준을 결정할 때 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

C-MET와 PD-L1 발현이 통계적으로 유의한 관계를 보였는데 이는 C-MET와 PD-L1이 암 증식의 지표로써 가치가 있음을 보여주고, 향후 C-MET 억제를 통한 간세포암종을 위한 면역항암제 개발의 가능성을 제시하였다. 아울러, 본 연구에는 간세포암종 환자의 예후에 대한 결과가 없으므로 PD-L1이나 C-MET의 간세포암종에서의 예후를 직접적으로 분석할 수는 없었으나, 일반적으로 다양한 암에서 예후와 연관된 여러 임상병리학적 인자들과 각 항체들 간의 상관관계를 살펴보았다. SP263 클론의 종양세포에서의 PD-L1 발현은 Edmonson-Steiner grade와 C-MET은 T 병기와 각각 통계적으로 유의미한 연관성이 있었으며, 이는 PD-L1과 C-MET 발현이 간세포암종 환자의 예후를 간접적으로 예측하는데 사용할 수 있는 가능성을 보여주었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참 고 문 헌

1. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2011;365:1118-27

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, MathersC, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015;136:E359-86

3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2015;65:87-108

4. Jung HI, Jeong D, Ahn TS, Bae SH, Chin S, Chung JC, et al. Overexpression of PD-L1 and PD-L2 is associated with poor prognosis in patients with Hepatocellular carcinoma. Cancer Res Treat 2017;49:246-54

5. Vilarinho S and Taddei T. Therapeutic strategies for hepatocellular carcinoma: new advances and challenges. Curr Treat Options Gastroenterol 2015;13:219-34

6. Sangro B, Palmer D, and Melero I. Immunotherapy of hepatocellularcarcinoma. HepatOncol 2014;1:433-46

7. Chang H, Jung W, Kim A, Kim HK, Kim WB, Kim JH, et al. Expression and prognostic significance of programmed death protein 1 and programmed death ligand-1, and cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 in hepatocellular carcinoma. APMIS 2017;125:690-8

8. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, and Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008;26:677-704

9. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, ImamuraS, Minato N, et al. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. Int Immunol 1996;8:773-80

10. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, and Webster WS. Tumor

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. Cancer Res 2006;66:3381-5

11. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, and Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. Acta Histochem 2006;108:19-24

12. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:3360-5

13. Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi RZ, Liu ZW, Zhang JY, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. Int J Cancer 2011;128:887-96

14. Maine CJ, Aziz NH, Chatterjee J, Hayford C, Brewig N, Whilding L, et al. Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. Cancer Immunol Immunother 2014;63:215-24

15. Norde WJ, Hobo W, van der Voort R, and Dolstra H. Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention. Blood 2012;120:728-36

16. Zhang Y, Kang S, Shen J, He J, Jiang L, Wang W, et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. Medicine 2015;94:e515

17. Zhang L, Qiu M, Jin Y, Ji J, Li B, Wang X, et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression on gastric cancer and its relationship with clinicopathologic factors. Int J Clin Exp Pathol 2015;8:11084-91

18. Hsu MC, Hsiao JR, Chang KC, Wu YH, Su IJ, JinYT, et al. Increase of

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. Mod Pathol 2010;23:1393-403

19. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, and Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. Hum Pathol 2009;40:1715-22

20. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2007;13:1757-61

21. Swaika A, Hammond WA, and Joseph RW. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. Mol Immunol 2015;67:4-17

22. Miao L, Lu Y, Xu Y, Zhang G, Huang Z, Gong L, et al. PD-L1 and c-MET expression and survival in patients with small cell lung cancer. Oncotarget 2017;8:53978-88

23. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, and Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. Nat Rev Cancer 2012;12:89-103

24. Goyal L, Muzumdar MD, and Zhu AX. Targeting the HGF/c-MET Pathway in Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res 2013;19:2310-8

25. Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2009;15:971-9.

26. Wang BJ, Bao JJ, Wang JZ, Wang Y, Jiang M, Xing MY, et al. Immunostaining of PD-1/PD-Ls in liver tissues of patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2011;17:3322-9

27. 최병철, 면역항암제(Cancer Immunotherapy), 약학정보원 이슈&트렌드

28. Suzuki K, Hayashi N, Yamada Y, Yoshihara H, Miyamoto Y, Ito Y, et al. Expression of the c-MET protooncogene in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 1994;20:1231-6

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

29. McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, Massard C, Gordon MS, Hamid O, 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;34:833-42

30. Gelsomino F, Rossi G, and Tiseo M. MET and Small-Cell Lung Cancer. Cancers 2014;6:2100-15

31. Kim R, Keam B, Kwon D, Ock Cy, Kim M, Kim TM, et al. Programmed death ligand-1 expression and its prognostic role in esophageal squamous cell carcinoma. World J Gastroenterol 2016;22:8389-97

32. Zeng Z, Shi F, Zhou L, Zhang MN, Chen Y, Chang XJ, et al. Upregulation of circulating PD-L1/PD-1 is associated with poor post-cryoablation prognosis in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. PLoS One 2011;6:e23621.

33. Boyd ZS, Smith D, Baker B, Vennapusa B, Koeppen H, Kowanetz M, et al. Development of a PD-L1 companion diagnostic IHC assay (SP142) for atezolizumab. Appl immunohistochem Mol Morphol 2018(epub)

34. Schats KA, Van Vre EA, De Schepper S, Boeckx C, Schrijvers DM, Waelput W, et al. Validated programmed cell death ligand 1 immunohistochemistry assays (E1L3N and SP142) reveal similar immune cell staining patterns in melanoma when using the same sensitive detection system. Histopathology 2017;70:253-63.

35. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancet 2017;389:67-76.

36. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. Lancet 2017;389:255-65

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

37. Sidaway P. Bladder cancer: atezolizumab: an alternative to cisplatin? Nat Rev Urol 2017;14:67

38. Mizugaki H, Yamamoto N, Murakami H, Kenmotsu H, Fujiwara Y, Ishida Y, et al. Phase I dose-finding study of monotherapy with atezolizumab, an engineered immunoglobulin monoclonal antibody targeting PD-L1, in Japanese patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs 2016;34:596-603

39. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancet 2016;387:1909-20

40. Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, Sabalos C, Schechter N, Li X, et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. Diagn Pathol 2016;11:95

41. Diggs LP and Hsueh EC. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. Biomarker Research. 2017;5:12

42. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlel L, et al Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PDL1 therapeutic strategies. Ann Oncol 2016;27:147-53

43. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, Utsumi H, Kanda S, Horinouchi H, et al. Reliability of small biopsy samples compared with resected specimens for the determination of programmed death-ligand 1 expression in non-smallcell lung cancer. Clin Lung Cancer 2015;16:385-90

44. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, and Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. Clin Cancer Res

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2004;10:5094-100

45. Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. Ann Oncol 2014; 25:1935-40

46. Tang Y, Fang W, Zhang Y, Hong S, Kang S, Yan Y, et al. The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. Oncotarget 2015; 6:14209-19

47. Gabrielson A, Wu Y, Wang H, Jiang J, Kallakury B, Gatalica Z, et al. Intratumoral CD3 and CD8 T-cell densities associated with relapse-free survival in HCC. Cancer Immunol Res 2016;4:419-30.

48. JU Kim. Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review. Oncotarget 2017;10;8:90351-7

49. Arriola E, Cañadas I, Arumí-Uría M, Dómine M, LopezVilariño JA, Arpí O, et al. MET phosphorylation predicts poor outcome in small cell lung carcinoma and its inhibition blocks HGF-induced effects in MET mutant cell lines. Br J Cancer 2011;105:814-23.

50. Park S, Choi YL, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ, et al. High MET copy number and MET overexpression: Poor outcome in non-small cell lung cancer patients. Histol Histopathol 2012;27:197-207

51. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL 3rd, and Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2overexpressing breast cancer cells. Cancer Res 2008;68:1471-7

52. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, et al. c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. Cancer Res 2007;67:1670-9

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

53. Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, and Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-MET proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. Hepatology 1997;25:619-23

54. Kondo S, Ojima H, Tsuda H, Hashimoto J, Morizane C, Ikeda M, et al. Clinical impact of c-MET expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma. Int J Clin Oncol 2013;18:207-13

55. Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, et al. c-MET expression level in primary colon cancer: a Predictor of tumor invasion and lymph node metastases. Clin Cancer Res 2003;9:1480-8

56. Danilkovitch-Miagkova A and Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. J Clin Invest 2002;109:863-67

57. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: A MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. Nat Rev Cancer 2006;6:637-45

58. Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J, Fukayama M. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. Cancer Sci 2007;98:1006-13

59. Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, and Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. Jpn J Cancer Res 1996;87:1063-69

60. Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kikuchi K, Yamamoto Y, Yamamoto T, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. Oncology 1996;53:392-7

61. Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR, and Landreneau RJ. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. Cancer Res 1997;57:433-9

62. Wu F, Wu L, Zheng S, Ding W, Teng L, Wang Z, et al. The clinical value of

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

hepatocyte growth factor and its receptor-c-MET for liver cancer patients with hepatectomy. Dig Liver Dis 2006;38:490-7

63. Kondo S, Ojima H, Tsuda H, Hashimoto J, Morizane C, Ikeda M, et al. Clinical impact of c-MET expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma. Int J Clin Oncol 2013;18:207-13

64. Wang ZL, Liang P, Dong BW, Yu XL, and Yu DJ. Prognostic factors and recurrence of small hepatocellular carcinoma after hepatic resection or microwave ablation: a retrospective study. J Gastrointest Surg 2008;12:327-37

65. Kelley PK, Verslype C, Cohn AL, Yang TS, Su WC, Burris H, et al. Carbozantinib in hepatocellular carcinoma: results of a phase 2 placebo-controlled randomized discontinuation study. Ann Oncol 2017;28:528-34

66. Wang ZL, Liang P, Dong BW, Yu XL, Yu de J. Prognostic factors and recurrence of small hepatocellular carcinoma after hepatic resection or microwave ablation: a retrospective study. J Gastrointest Surg. 2008; 12:327-37.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Summary of clinicopathologic factors

Factor	N (%)
Age (year)	
<62	33(47.1)
≥62	37(52.9)
Sex	
Male	60(85.7)
Female	10(14.3)
Tumor size (cm)	
≤2	31(44.3)
>2	39(55.7)
T stage (pT)	
pT1	54(77.1)
pT2-4	16(22.9)
Portal vein invasion	
Absent	67(95.7)
Present	3(4.3)
Cirrhosis	
Absent	17(24.3)
Present	53(75.7)
Tumor histology	
trabecular	54(77.1)
glandular	4(5.7)
mixed	12(17.1)
Edmonson-Steiner grade	
1&2	45(64.3)
3&4	25(35.7)
Bile duct invasion	
Absent	69(98.6)
Present	1(1.4)
HBsAg	
Absent	27(38.6)
Present	43(61.4)
HBsAb	
Absent	57(81.4)
Present	13(18.6)

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Relation of clinicopathologic factors with expression of PD-L1 (SP263) on tumor cells and immune cells.

Factor	PD-L1(SP263), TC (n=70)			PD-L1(SP263), IC (n=70)		
	(-) (n=56)	(+) (n=14)	P	(-) (n=21)	(+) (n=49)	p
Age (year)						
<62	28(50.0)	5(35.7)	0.38	12(57.1)	21(42.9)	0.31
≥62	28(50.0)	9(64.3)		9(42.9)	28(57.1)	
Sex						
Male	48(85.7)	12(85.7)	1.0	2(9.5)	8(16.3)	0.71
Female	8(14.3)	2(14.3)		19(90.5)	41(83.7)	
Tumor Size (cm)						
≤2	22(39.3)	9(64.3)	0.13	9(42.9)	22(44.9)	1.0
>2	34(60.7)	5(35.7)		12(57.1)	27(55.1)	
T stage (pT)						
pT1	43(76.8)	11(78.6)	1.0	18(85.7)	36(73.5)	0.36
pT2-4	13(23.2)	3(21.4)		3(14.3)	13(26.5)	
PV invasion						
Absent	55(98.2)	12(85.7)	0.1	21(100.0)	46(93.9)	0.55
Present	1(1.8)	2(14.3)		0(0.0)	3(6.1)	
Cirrhosis						
Absent	14(25.0)	3(21.4)	1.0	5(23.8)	12(24.5)	1.0
Presen	42(75.0)	11(78.6)		16(76.2)	37(75.5)	
Histology						
trabecular	46(82.1)	8(57.1)	0.09	17(81.0)	37(75.5)	0.42
glandular	2(3.6)	2(14.3)		2(9.5)	2(4.1)	
mixed	8(14.3)	4(28.6)		2(9.5)	10(20.4)	
ES grade						
1&2	41(73.2)	4(28.6)	<0.01*	15(71.4)	30(61.2)	0.59
3&4	15(26.8)	10(71.4)		6(28.6)	19(38.8)	
BD invasion						
Absent	56(100)	13(92.9)	0.2	21(100.0)	48(98.0)	1.0
Present	0(0)	1(7.1)		0(0.0)	1(2.0)	
HBsAg						
Absent	21(37.5)	6(42.9)	0.76	8(38.1)	19(38.8)	1.0
Present	35(62.5)	8(57.1)		13(61.9)	30(61.2)	
HBsAb						
Absent	46(82.1)	11(78.6)	0.72	18(85.7)	39(79.6)	0.74
Present	10(17.9)	3(21.4)		3(14.3)	10(20.4)	

PV:Portal vein, BD:bile duct, ES grade:Edmondson-Steiner grade
TC:tumor cells, IC:immune cells,*:p<0.05

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Relation of clinicopathologic factors with expression of PD-L1 (SP142) on tumor cells and immune cells

Factor	PD-L1(SP142), TC (n=70)			PD-L1(SP142), IC (n=70)		
	(-) (n=68)	(+) (n=2)	P	(-) (n=40)	(+) (n=30)	p
Age (year)						
<62	33(48.5)	0(0.0)	0.49	21(52.5)	12(40.0)	0.34
≥62	35(51.5)	2(100.0)		19(47.5)	18(60.0)	
Sex						
Male	9(13.2)	1(50.0)	0.27	6(15.0)	4(13.3)	1.0
Female	59(86.8)	1(50.0)		34(85.0)	26(86.7)	
Tumor Size (cm)						
≤2	30(44.1)	1(50.0)	1.0	14(35.0)	17(56.7)	0.09
>2	38(55.9)	1(50.0)		26(65.0)	13(43.3)	
T stage (pT)						
pT1	52(76.5)	2(100.0)	1.0	31(77.5)	23(76.7)	1.0
pT2-4	16(23.5)	0(0.0)		9(22.5)	7(23.3)	
PV invasion						
Absent	65(95.6)	2(100.0)	1.0	39(97.5)	28(93.3)	0.57
Present	3(4.4))	0(0.0)		1(2.5)	2(6.7)	
Cirrhosis						
Absent	15(22.1)	2(100.0)	0.06	8(20.0)	9(30.0)	0.4
Presen	53(77.9)	0(0.0)		32(80.0)	21(70.0)	
Histology						
trabecular	53(77.9)	1(50.0)	0.85	32(80.0)	22(73.3)	0.53
glandular	3(4.4)	1(50.0)		2(5.0)	2(6.7)	
mixed	12(17.6)	0(0.0)		6(15.0)	6(20.0)	
ES grade						
1,2	45(66.2)	0(0.0)	0.12	26(65.0)	19(63.3)	1.0
3,4	23(33.8)	2(100.0)		14(35.0)	11(36.7)	
BD invasion						
Absent	67(98.5)	2(100.0)	1.0	40(100.0)	29(96.7)	0.43
Present	1(1.5)	0(0.0)		0(0.0)	1(3.3)	
HBsAg						
Absent	27(39.7)	0(0.0)	0.52	14(35.0)	13(43.3)	0.62
Present	41(60.3)	2(100.0)		26(65.0)	17(56.7)	
HBsAb						
Absent	55(80.9)	2(100.0)	1.0	33(82.5)	24(80.0)	1.0
Present	13(19.1)	0(0.0)		7(17.5)	6(20.0)	

PV:Portal vein, BD:bile duct, ES grade:Edmondson-Steiner grade

TC:tumor cells, IC:immune cells,*:p<0.05

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Relationship of clinicopathologic factors with expression of C-MET

Factor	C-MET (n=70)		
	Low (n=60)	High (n=10)	p
Age (year)			
<62	28(46.7)	5(50.0)	1.0
≥62	32(53.3)	5(50.0)	
Sex			
Male	9(15.0)	1(10.0)	1.0
Female	51(85.0)	9(90.0)	
Tumor Size (cm)			
≤2	25(41.7)	6(60.0)	0.32
>2	35(58.3)	4(40.0)	
T stage (pT)			
pT1	49(81.7)	5(50.0)	0.042*
pT2-4	11(18.3)	5(50.0)	
PV invasion			
Absent	58(96.7)	9(90.0)	0.38
Present	2(3.3)	1(10.0)	
Cirrhosis			
Absent	16(26.7)	1(10.0)	0.43
Present	44(73.3)	9(90.0)	
Histology			
trabecular	3(5.0)	1(10.0)	
glandular	9(15.0)	3(30.0)	0.18
mixed	48(80.0)	6(60.0)	
ES grade			
1&2	41(68.3)	4(40.0)	0.15
3&4	19(31.7)	6(60.0)	
BD invasion			
Absent	59(98.3)	10(100.0)	1.0
Present	1(1.7)	0(0)	
HBsAg			
Absent	21(35.0)	6(60.0)	
Present	39(65.0)	4(40.0)	0.17
HBsAb			
Absent	49(81.7)	8(80.0)	
Present	11(18.3)	2(20.0)	1.0

PV:Portal vein, BD:bile duct, ES grade:Edmondson-Steiner grade, *:p<0.05

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Comparison of expression of 2 clones of PD-L1, SP263 and SP142

	SP263, TC			SP263, IC		
	-	+	P	-	+	P
SP142, TC						
-	56 (100.0)	12 (85.7)	0.038*	21 (100.0)	47 (95.9)	1.000
+	0 (0.0)	2 (14.3)		0 (0.0)	2 (4.1)	
SP142, IC						
-	37 (66.1)	3 (21.4)	0.005*	19 (90.5)	21 (42.9)	<0.001*
+	19 (33.9)	11 (78.6)		2 (9.5)	28 (57.1)	

TC:tumor cells, IC:immune cells

Table 6. Agreement of PD-L1 detection between tumor cells and immune cells determined by SP263 clone

	TC (SP263)		
	- (n=56)	+ (n=14)	P
IC (SP263)			
- (n=21)	21 (37.5)	0 (0.0)	0.007*
+ (n=49)	35 (62.5)	14 (100.0)	

TC:tumor cells, IC:immune cells, *:p<0.05

Table 7. Agreement of PD-L1 detection between tumor cells and immune cells determined by SP142 clone

	TC(SP142)		
	- (n=68)	+ (n=2)	P
IC (SP142)			
- (n=40)	39 (57.4)	1 (50.0)	1.000
+ (n=30)	29 (42.6)	1 (50.0)	

TC:tumor cells, IC:immune cells

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Correlation of expression of c-MET and 2 clones of PD-L1

Factors	C-MET			
	n(%)	Low(n=60)	High(n=10)	P
IC (SP263)				
-	21 (30.0)	19(31.7)	2 (20.0)	0.712
+	49 (70.0)	41(68.3)	8 (80.0)	
TC (SP263)				
-	56 (80.0)	51(85.0)	5 (50.0)	0.022*
+	14 (20.0)	9(15.9)	5 (50.0)	
IC (SP142)				
-	68 (97.1)	58(96.7)	10 (100.0)	1.000
+	2 (2.9)	2(3.3)	0 (0.0)	
TC (SP142)				
-	40 (57.1)	36(60.0)	4 (40.0)	0.308
+	30 (42.9)	24(40.0)	6 (60.0)	

TC:tumor cells, IC:Immune cells, *:p<0.05

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 1. Immunostaining pattern of 3 antibodies (SP263 PD-L1, SP142 PD-L1, and C-MET)

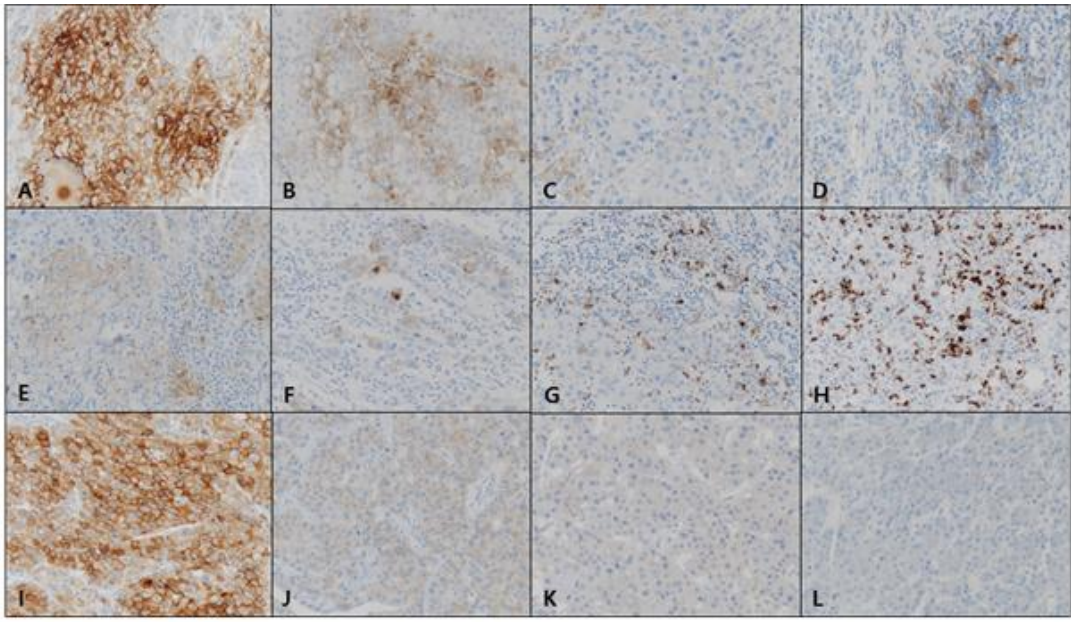

Fig.1 Immunostaining pattern of 3 antibodies **A-D:** SP263 clone of PD-L1; A:3+ in tumor cell, B:2+, C:1+, D: expression in peritumoral immune cells. **E-H:** SP142 clone of PD-L1; E-F: positive staining in tumor cells, G-H: positive in peritumoral and intratumoral immune cells. **I-L:** C-MET; I: 3+, J:2+, K:1+, L:Negative

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 2. Immunostaining score of representative cases

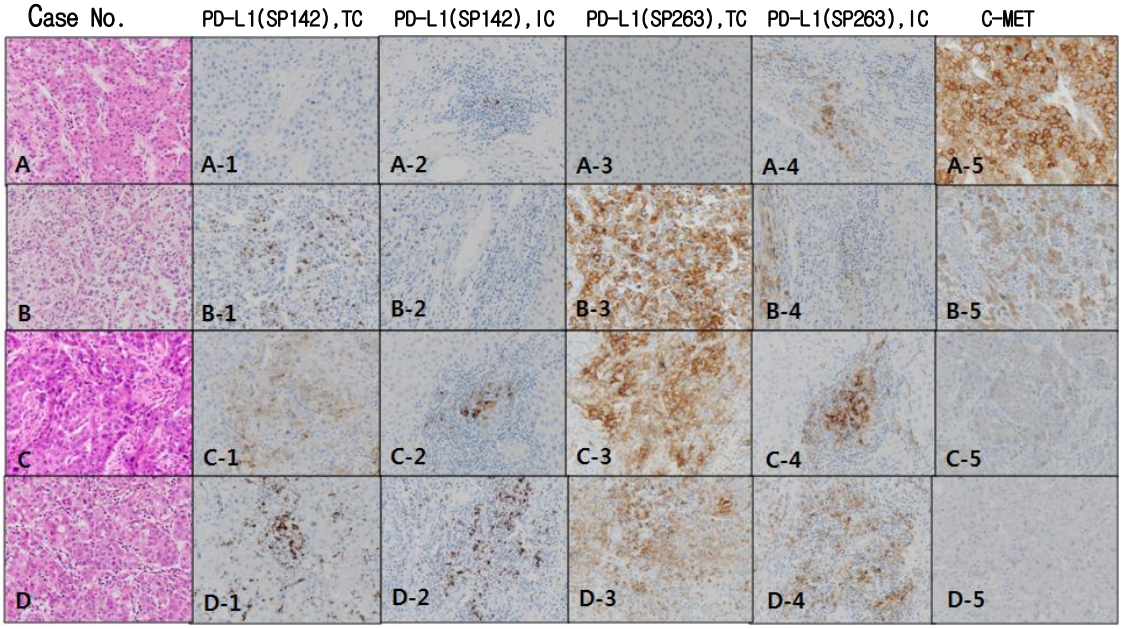

Fig.2 Immunostaining score of representative cases. A:[0,0,0,1,3] B:[0,1,3,1,2] C:[1,1,3,1,1] D:[0,1,3,1,0] (TC : tumor cell, IC:immune cell)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 3. Relationship between PD L-1 detection by SP263 and SP142

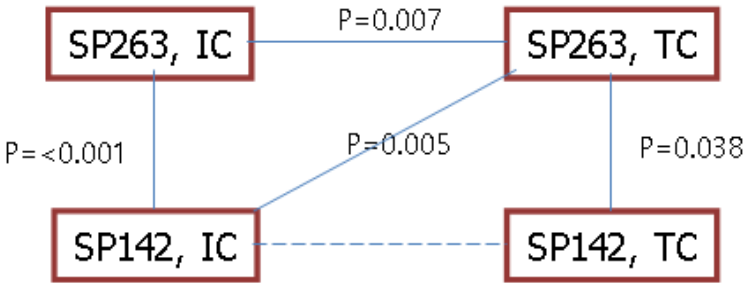

Fig 3. Expression of SP263 PD-L1 in TC show statistically significant relationship with expression of SP263 PD-L1 in IC (p=0.007), SP142 PD-L1 in IC (p=0.005) and SP142 PD-L1 in TC (p=0.038). And, expression of SP263 PD-L1 (IC) are also related with SP142 PD-L1 (IC) (p=<0.001).

Collection @ chosun