

INVITED REVIEW ARTICLE

がん免疫療法のトランスレーショナルリサーチ

西 達也¹・富樫庸介¹

Translational Research in Cancer Immunotherapies

Tatsuya Nishi¹; Yosuke Togashi¹

¹Department of Tumor Microenvironment, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan.

ABSTRACT — Although a great deal of research on cancer immunotherapy has been conducted using mice, there are many differences between humans and mice, which is associated with some limitations. Therefore, the analysis of human clinical specimens is important for elucidating the essence of cancer immunology. Recently, advances in technology have made it possible to perform comprehensive gene analyses of various clinical specimens. While such analyses are often performed in bulk, we believe that it is important to analyze clinical specimens at the single-cell level in order to understand the role of each cell, including various immune cells, in detail. Various novel findings have been obtained from such analyses.

(JLCC. 2022;62:363-370)

KEY WORDS — Translational research, Neoantigen, CD8+ T cells, Tumor immunity, Biomarker

Corresponding author: Yosuke Togashi.

要旨 — がん免疫療法の基盤となる腫瘍免疫研究の多くがマウスで行われてきたが、ヒトとは相違点も多く限界があるため、ヒト臨床検体の解析が腫瘍免疫の本態解明に重要と考えられている。近年、技術革新により網羅的遺伝子解析が可能になり、腫瘍組織を代表に糞便まで含め様々な検体が解析されている。これらは塊(バルク)

で行われることが多いが、より精密な解析のためには免疫細胞を含む不均一な集団の1細胞解析が重要と思われる。そこから多くの新しい知見が明らかになっている。

索引用語 — トランスレーショナルリサーチ, ネオ抗原, CD8陽性T細胞, 腫瘍免疫, バイオマーカー

緒言

抗PD-1/PD-L1抗体をはじめとした免疫チェックポイント阻害薬(ICI)は肺癌を含む様々ながん種で効果が証明されている。¹⁻³ しかしながら、年単位で再発がなく完治したかのような症例もあれば、逆に効果がない上に、免疫療法特有の副作用が出てしまうような症例も存在し、効果予測バイオマーカーやより効果が高い治療方法の開発が求められている。

腫瘍免疫の基礎研究では現在でもマウスが用いられることが多いが、マウスではがん細胞を埋めるといった人工的な系が多い上に、ヒトとマウスでは免疫という点で

も異なるところが多く、ヒト臨床検体の解析こそが腫瘍免疫の本態解明のために不可欠であろうと考えている。

そういった観点で、本稿ではがん免疫療法に関するトランスレーショナルリサーチについて、我々の解析結果も交えて紹介したい。

効果予測バイオマーカー

肺癌は免疫療法の前にEGFRやALKなどのドライバー遺伝子を標的とした研究と治療が盛んになっていた経緯もあり、臨床検体を得て効果予測バイオマーカーを探索するような研究が多くなされてきた。ICIに関連して有効性や効果予測のためにPD-L1発現、腫瘍浸潤リン

¹岡山大学学術研究院医歯薬学域腫瘍微小環境学分野。

論文責任者：富樫庸介。

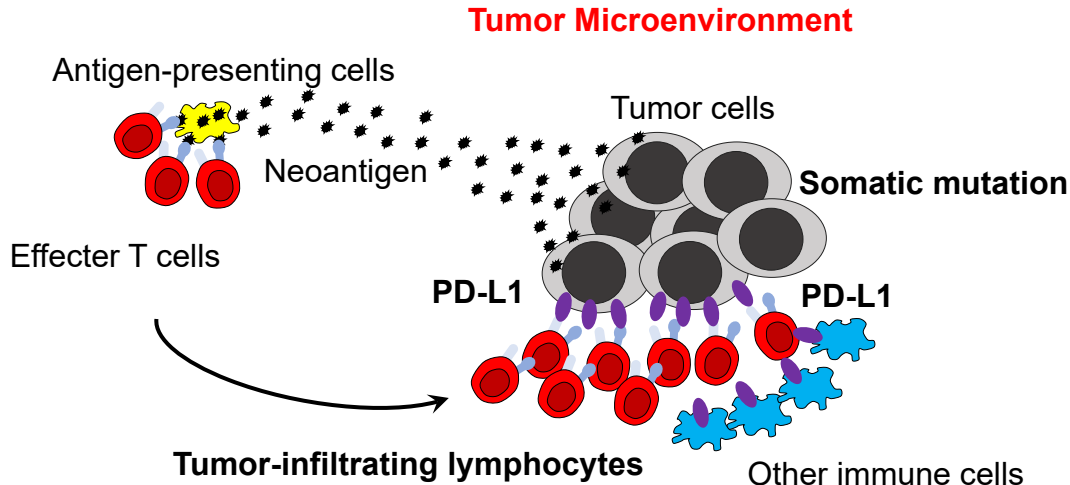


Figure 1. Relationship between PD-L1, tumor-infiltrating lymphocytes, and the somatic mutation burden. When the tumor mutation burden is high, the neoantigen load can increase. Such neoantigens activate effector T cells, which infiltrate the tumor microenvironment to attack tumor cells. Tumor cells and other types of surrounding immune cells increase the PD-L1 expression to suppress T cells via the PD-1/PD-L1 axis.

パ球 (TIL), 体細胞変異数の3つがよく研究されている。しばしば別々に議論されることも多いが、これらは一つの流れの上にあるものと考えている。体細胞変異数が多ければ確率的に体細胞変異由来の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がん抗原 (ネオ抗原) が多くなる。⁴ そのネオ抗原により抗腫瘍免疫応答の主役であるエフェクター T 細胞が強く活性化し、活性化エフェクター T 細胞が腫瘍細胞を攻撃するために腫瘍に浸潤していくが、腫瘍細胞や周辺細胞は T 細胞を抑制するために免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現を上昇させ、結果的に PD-1 を介して T 細胞が抑制される⁵ (Figure 1)。そのような抑制されたエフェクター T 細胞を活性化させる治療が ICI であり、この3つはお互い関連しあって効果予測バイオマーカーとして成り立っていると考えている。

PD-L1 発現

PD-L1 は効果予測バイオマーカーとして既に実臨床で用いられている。⁶ IFN- γ などの免疫応答に関わる刺激によってどんな細胞でも PD-L1 を発現する可能性がある。したがって 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。⁷ 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複数存在し、腫瘍細胞の PD-L1 発現だけでなく、宿主側の PD-L1 発現も ICI の効果に重要であることがわかってきている。⁸⁻¹⁰

TIL

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、上述のように ICI はエフェクター T 細胞を活性化して抗腫瘍効果を発揮しているため、抗腫瘍免疫応答の主役はエフェクター T 細胞である。^{8,9,11} よって、これまでも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。¹² もちろん、CD8 の免疫染色で CD8 陽性エフェクター T 細胞の浸潤が多いと ICI の効果が高い、という事実も非常に重要である。^{8,9} 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おり、前者が抗腫瘍免疫応答の本質と思われ、それらを区別する方法が必要である。^{10,13}

体細胞変異数

次世代シーケンス技術の発展に伴い、網羅的遺伝子解析が可能となったため全エクソン解析 (WES) などからネオ抗原を同定する方法が行われている。最もシンプルで解析としては「体細胞変異数」という数だけで評価する方法があり、実際、ある程度は体細胞変異数がネオ抗原の発現を反映し、抗腫瘍免疫応答や ICI の効果と相関するという報告も多い。^{4,14} さらに遺伝子パネル検査のパネルを用いて数を予測しているような解析も存在するが、¹⁵ がん種ごとに数の予測が異なるなどの問題点や、何よりも体細胞変異数自体も抗腫瘍免疫応答とそれほど相関しない上に、ICI の効果との相関精度も高くないという報告もされている。^{15,16} これらの現状を考えると単純な数だけで評価することの限界が示唆され、より

精度の高い評価方法が求められている。

がん抗原の解析

マウスで重要性が指摘されてきたネオ抗原であるがヒトでの重要性も明らかになってきており、様々な方法で同定が試みられている。^{4,17}「体細胞変異数」だけではなく、HLAに提示されたがん抗原がT細胞受容体(TCR)を介してT細胞を活性化するため、HLAに提示される結合強度をコンピューター上で予測し、その強度が強いものを「ネオ抗原」としている解析も多い。¹⁸実際に非小細胞肺癌(NSCLC)の患者検体から個人ごとにネオ抗原を同定した報告もある。¹⁹しかしながら、実際に免疫解析しても数多くの候補の中から数個しか反応しないような場合も多く、²⁰この方法で得られている「ネオ抗原」が真にネオ抗原なのかは不明な点が多い。我々もシングルセルシーケンスでT細胞側としては10以上のネオ抗原特異的TCRを持つT細胞が浸潤していたものの、予測から拾われたネオ抗原候補ペプチドがたった1個しか反応しなかったような経験もある。²¹またネオ抗原の中でも抗腫瘍免疫応答を抑制してしまうようなものも存在していることも明らかにしており、質的な問題もあるとも考えている(論文投稿中)。

他に、ネオ抗原を検出する方法としてがん細胞のHLAに提示されたペプチドをマスマスペクトロメトリー(MS)で解析する方法(HLAリガンドーム解析)がある。近年これにWESを組み合わせることで、患者ごとの参照データベースを作ることができるようになり、ネオ抗原の同定が可能となった(プロテオゲノミクスHLAリガンドーム解析)。この方法では標的となるがん細胞に実際に提示されているペプチドを直接解析でき、²²肺癌の細胞株をはじめ、²³メラノーマ²⁴などでも報告されている。さらにこの方法を応用して大腸がん患者の腫瘍検体からnon-coding RNAの一部が断片的にHLA上に提示されてネオ抗原として提示されていることなどがわかってきた。²⁵

WESは遺伝子をコードしているエクソン領域に由来するDNAのみを解析する方法であり、全ゲノム解析(WGS)と比較すると解析する領域を2%程度に抑えることができるためコスト面で有利である。しかしWESではエクソン領域以外の塩基置換や染色体の構造変化を検出することはできない。技術の進歩でWGS自体のコストが低下したため、WESではわからなかった領域の未知の転写産物がネオ抗原にならないかを検討する試みも行われるようになった。さらにWGSに加えてロングリードシーケンス技術の進歩に伴い様々な可能性も広がってきている。²⁶

腫瘍組織の遺伝子解析

上述のように、次世代シーケンス技術の発展に伴い、ネオ抗原探索以外の目的でも網羅的遺伝子解析が盛んに行われている。例えば肺癌ではEGFR遺伝子変異がある場合やKRAS変異/SKT11変異がある場合には抗腫瘍免疫応答が抑制され、ICIの効果が悪いことが報告されている。^{5,27}他にも肺癌以外も含めてWNTシグナルやPI3Kシグナルなどが活性化している場合には抗腫瘍免疫応答が抑制されてしまうことも報告されており、^{28,29}これらの報告は臨床検体のWESや網羅的遺伝子発現解析から導き出されている。

腫瘍組織は腫瘍細胞だけでなく周辺細胞も含むため、腫瘍組織の解析は浸潤免疫細胞なども含むことになる。そこで腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析によって治療効果の予測や特定の遺伝子による患者選択ができるのではないかとこの発想でこれまでも数多く解析されている。^{8,30}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 関連の遺伝子発現(CXCL9, CXCL10, IDO1, CD274 [PD-L1をコードする遺伝子]など)、エフェクターT細胞の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、ICIが有効な患者をある程度選択できそうではあるのだが、カットオフを設定して特定の因子によって十分な効果予測バイオマーカーとできるほど精密なものは報告されていない。^{8,30}

腫瘍微小環境は非常に不均一な集団であり、それらを全部まとめた塊(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のが現状であろう。そこで、網羅的遺伝子発現解析から細胞分画を予測するような方法も開発されている。例えば肺腺がんに対してCell-type Identification By Estimating Relative Subsets Of RNA Transcripts(CIBERSORT)という腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析の結果から白血球の分画を推測するアプリケーションを用いて、腫瘍への免疫細胞の浸潤パターンを4つのサブタイプに分類するとともに定量化スコアを作成したところ、サブタイプごとに全生存期間(OS)に違いがあったという報告がある。^{31,32}

しかしながら、バルクでの遺伝子発現だけでは割合を予想することはできても、どの細胞がどの遺伝子を発現し実際に何をしているのか、といった詳細まではわからない。例えば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り、³³バルクで割合の推定はできて

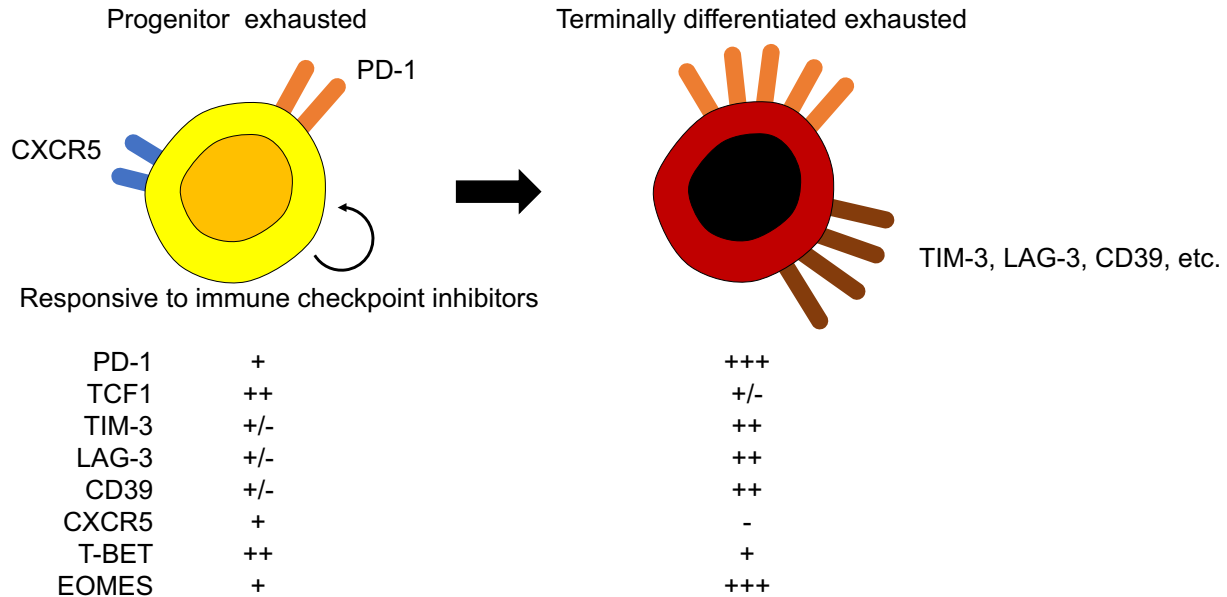


Figure 2. Heterogeneity of exhausted T cells. Progenitor exhausted T cells differentiate into terminally differentiated exhausted T cells. Immune checkpoint inhibitor reinvigorate this progenitor population but not the terminally differentiated population.

も、そこに存在する細胞の詳細な表現型まで明らかにすることは困難である。

また TCR は様々な抗原を認識するために非常に多様性を持っているが、それをシーケンスして、その多様性を評価するような TCR レパトア解析もしばしば腫瘍組織で行われている。腫瘍組織で多様性が低く、ある程度同じ T 細胞クローンが集まっている方が、ICI の効果が高いことが報告されている。⁹ しかしながらその TCR が実際に腫瘍細胞を攻撃しているか？ どのような表現型をした T 細胞が持っているか？ まではこの方法では同定はできない問題点がある。

免疫細胞の解析

腫瘍微小環境のエフェクター T 細胞

上述したように、腫瘍浸潤エフェクター T 細胞の中にも腫瘍細胞を直接攻撃しているものだけでなく、非特異的なものもいることが明らかになっており、免疫細胞 1 つ 1 つの正確な役割を明らかにし、腫瘍免疫応答の本態に迫るためには 1 細胞レベルでの解析は必須である。^{10,13}

腫瘍浸潤エフェクター T 細胞を抗体による標識でフローサイトメトリー、マスサイトメトリーや多重免疫染色などを用いて 1 細胞レベルでタンパク発現を解析した報告では、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、^{34,35} 我々も同様の結果

を得ている。³⁶ したがって腫瘍浸潤 PD-1 陽性エフェクター T 細胞が腫瘍細胞を直接攻撃している T 細胞である可能性が高いと考えられている。

一方で、シングルセルシーケンスは 1 細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析が可能のため、もともと注目していない、標識用の抗体がない分子まで同定することができる。特に我々は腫瘍浸潤 T 細胞をシングルセルシーケンスで TCR まで同時に解析することで PD-1 陽性で「疲弊」と呼ばれるような表現型を呈している CD8 陽性 T 細胞 (exhausted T 細胞) が腫瘍細胞を直接攻撃する T 細胞であることを正確に同定し、そこに特異的に発現する新たな分子も見出している。²¹ 他の研究では、PD-1 弱陽性 TCF1 陽性 CD8 陽性 T 細胞浸潤が ICI の効果に関わり、耐性時には PD-1 強陽性 CD39 陽性 TIM-3 陽性 TCF1 陰性 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。³⁷ 一般に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 exhausted T 細胞の状態に陥るとされている。Exhausted T 細胞の中にも分化段階があり、ICI による再活性化が期待できる progenitor exhausted T 細胞が前者 (PD-1 弱陽性 TCF1 陽性 CD8 陽性 T 細胞) にあたるが、さらに疲弊が進むと terminally differentiated exhausted T 細胞として PD-1 に加えて TIM-3 などの抑制性分子を発現した後者のような表現型の細胞 (PD-1 強陽性 CD39 陽性 TIM-3 陽性 TCF1 弱陽性/陰性 CD8 陽性 T 細胞) になってしまい、ICI による再活性化が期待できなくな

り耐性化してしまうとされている^{38,39} (Figure 2).

末梢血のエフェクター T 細胞など

末梢血は免疫細胞を含み、容易に得られるため、その免疫解析は多く行われている。特に末梢血免疫細胞サブセットを解析し、ICI による臨床転帰を予測した研究があるが、好中球/リンパ球比 (NLR) が ICI の効果予測に有用であることが NSCLC を含めた複数がん種で報告されている。⁴⁰ 他にも NSCLC 患者の末梢血における T 細胞免疫を縦断的に調査した報告がある。ICI により良好な抗腫瘍効果を得ることができた患者では投与前の CD62 弱陽性 CD4 陽性細胞の割合が有意に高かったことが報告されている。⁴¹ また、末梢血の疲弊した PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の Ki67 の発現が ICI 治療後に上昇する、即ち末梢血の疲弊 T 細胞が ICI で活性化するような場合で効果が高いことが報告されている。⁴² 詳細にシングルセルシーケンスで解析した報告も存在し、腫瘍局所と末梢血で共通する TCR を持つエフェクター様 T 細胞が ICI 治療後に末梢血でクローン拡大することが効果に関与することを報告している。⁴³ しかしながらこの報告では前述の腫瘍細胞を直接攻撃しているであろう exhausted T 細胞は、ほとんど末梢血には存在していないため、それらには注目できていない。我々も同様に末梢血には腫瘍を直接攻撃している exhausted T 細胞クローンがほとんど存在しないことを示しており、腫瘍局所の詳細までは反映できていない可能性もある。²¹

制御性 T 細胞

T 細胞の中にはエフェクター 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。³³ 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因子であることは様々ながん種で報告されている。³³ 末梢血の解析にはなるが、NSCLC 患者で抗 PD-1/PD-L1 抗体が有効だったのは CD25 陽性 CD127 弱陽性制御性 T 細胞の頻度が治療開始 7 日後に有意に減少した集団であり、逆にいわゆる hyperprogressive disease を経験した集団ではその頻度が有意に増加していたという報告がある。⁴⁴ このように制御性 T 細胞の存在が ICI の耐性に関わると予想されたため、様々な解析が行われている。^{45,46} 我々も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、抗腫瘍免疫応答を抑制してしまい、hyperprogressive disease が引き起こされることを報告した。⁴⁷ 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。³⁶

B 細胞

抗腫瘍免疫応答における B 細胞の役割、特に ICI が投与された患者における役割はそれほど詳細に解析されてこなかった。B 細胞にも抑制性に働く制御性 B 細胞というものが存在し、抗腫瘍免疫応答を抑制しているという報告もあれば、^{48,49} 逆にシングルセルシーケンスなどを用いて抗腫瘍免疫応答を活性化し、効果予測バイオマーカーとなる可能性についての報告も相次いでなされている。⁵⁰⁻⁵² これらによると特に B 細胞浸潤を含む 3 次リンパ様構造 (tertiary lymphoid structures ; TLS) が ICI の効果に重要なようである。⁵⁰⁻⁵² 他にも NSCLC の手術検体の 1 細胞レベルの解析では CD79A と CD20 の両方を発現している B 細胞の存在が予後と相関すると報告されている。⁵³ さらに ICI 投与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、有効例では TLS・B 細胞浸潤が特徴的に見られることが報告されているため、⁵⁴ 今後より詳細に大規模な解析が期待される。

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

抑制性の細胞である TAM や MDSC が ICI の耐性に関係することは以前からマウスで報告されていた。^{55,56} 実際にヒトでは末梢血に MDSC が多いことが ICI の予後不良マーカーである可能性が複数報告されており、⁵⁷ 腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析からも TAM や MDSC の浸潤が多いような遺伝子発現パターンをもつ患者では ICI の効果が悪いという報告もある。⁵⁸ 他にも NSCLC 患者の腫瘍組織の解析では TAM の PD-L1 高発現が ICI の予後良好マーカーになりうることも報告されている。⁵⁹ 一方で、TAM や MDSC には定義や可塑性の問題があり、解析と結果の解釈を難しくしている部分もある。

末梢血の液性因子の解析

免疫細胞同様に容易に検体が得られるため、液性因子の解析の報告は多い。TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-8、TGF- β などのサイトカインが ICI への反応と有害事象の予測因子として検討されている。血中の IFN- γ レベルの上昇は ICI 有効性と有害事象について正の効果予測バイオマーカーとして作用し、逆に IL-8 のベースライン高値や血中レベルの上昇、IL-6 と TGF- β の上昇は負の効果予測バイオマーカーとして作用していると報告されている。⁶⁰ しかしながら、免疫細胞と同じく液性因子の変化が腫瘍局所の状況を反映しているかは疑問の余地がある。

腸内細菌叢

遺伝子や代謝産物の網羅的解析技術が進歩したこと

より、腸内細菌叢がICIの抗腫瘍効果に関係する因子であることが明らかになってきている。例えば抗菌薬の投与が腸内細菌に対してICIの治療効果を減弱させるような影響を与えるという報告もあれば、⁶¹ 肺がんも含めた複数のがん種でICI投与前のベースライン便サンプルを16Sメタゲノム解析法、ショットガンメタゲノム解析、選択した細菌に対する定量ポリメラーゼ連鎖反応を行い、常在菌の構成とICIの効果との間に有意な関連が認められたという報告もある。⁶² 他にもICIによる治療を受けたNSCLC患者を対象としたレトロスペクティブ解析で*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588) 投与群が非投与群と比較して無増悪生存期間 (PFS) と OS を有意に延長させたという報告もある。これらを踏まえて糞便移植やプロバイオティクス、プレバイオティクスなどの臨床試験が行われ、中には有望な結果が報告されているものもある。⁶³⁻⁶⁶

おわりに

呼吸器内科医として肺がんの治療に関わるようになり、細胞傷害性抗腫瘍剤で有害事象のコントロールをしながら治療している中に分子標的薬が登場し、そのキレのよさと有害事象の少なさに驚かされた。そこから時間が経つとほぼ全例が耐性化し、こんなにいい薬が出てきても、がんを克服するというのは難しいことなのだと感じた。その後ICIが登場し、免疫関連有害事象という独特の有害事象が出現することもあるものの、何年も病勢進行を認めない患者さんに出会い、いたく感動した記憶がある。少ないながらもそのような患者さんが存在するため、治癒を目指すのであれば免疫療法なのだと意識するようになった。がん免疫療法が臨床で使用されはじめて5年以上になり、臨床検体を用いた効果予測バイオマーカー研究も多数行われている。我々の取り組みも含めて様々なデータを紹介したが、臨床の現場でするには現実的ではない解析も多く、未だ臨床ではPD-L1免疫染色を凌駕するバイオマーカーは登場していない。研究者目線ではPD-L1発現50%以上のNSCLCに対するPembrolizumabの効果は「完璧」ではなく、決して「美しい」とは言えない結果だが、臨床の現場では「簡便」かつ「許容」できる結果のため臨床の先生方にも受け入れられているものと思っている。⁶ 研究者の追求する「完璧さ」「美しさ」と臨床の先生方が利用に値する「簡便さ」「許容」のギャップを埋めることがトランスレーショナルリサーチの役割ではあるのだが、研究者の立場としては「簡便さ」の中にも、できる限りの「美しさ」を追求したくなるのである。

本論文内容に関連する著者の利益相反：富樫庸介 [日当・講

演料] 小野薬品工業, BMS, MSD, 中外製薬 [研究費・助成金などの総額] 第一三共株式会社, 小野薬品工業, BMS, KORTUC

謝辞：ご多忙にも関わらず直接ご指導くださっている岡山大学の長崎先生、一層深い基礎研究のチャンスをくださった木浦先生、市原先生、シーケンス・解析で協力いただいた東京大学の鈴木稜先生、鈴木絢子先生、KOTAIバイオテクノロジーの山下先生、貴重な臨床検体を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。

REFERENCES

1. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369:122-133.
2. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:2018-2028.
3. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;378:2288-2301.
4. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124-128.
5. Sugiyama E, Togashi Y, Takeuchi Y, Shinya S, Tada Y, Kataoka K, et al. Blockade of EGFR improves responsiveness to PD-1 blockade in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Sci Immunol*. 2020;5:eaav3937.
6. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375:1823-1833.
7. 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.
8. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515:563-567.
9. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515:568-571.
10. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo SL, Teng KWW, et al. Bystander CD8⁺ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature*. 2018;557:575-579.
11. 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.
12. Chuah S, Chew V. High-dimensional immune-profiling in cancer: implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020;8:e000363.
 13. Schepers W, Kelderman S, Fanchi LF, Linnemann C, Bendle G, de Rooij MAJ, et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med*. 2019;25:89-94.
 14. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160:48-61.
 15. Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, Mazzarella L. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges. *J Immunother Cancer*. 2019;7:183.
 16. Foote MB, Maron SB, Cercek A, Argilés G, Rousseau B, Diaz LA Jr. TMB cut-offs fail to predict benefit of PD-1 blockade in gastroesophageal adenocarcinoma in KEYNOTE-061. *Ann Oncol*. 2021;32:1188-1189.
 17. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoeediting. *Nature*. 2012;482:400-404.
 18. Nonomura C, Otsuka M, Kondou R, Iizuka A, Miyata H, Ashizawa T, et al. Identification of a neoantigen epitope in a melanoma patient with good response to anti-PD-1 antibody therapy. *Immunol Lett*. 2019;208:52-59.
 19. Zhang W, Yin Q, Huang H, Lu J, Qin H, Chen S, et al. Personal Neoantigens From Patients With NSCLC Induce Efficient Antitumor Responses. *Front Oncol*. 2021;11:628456.
 20. Löffler MW, Mohr C, Bichmann L, Freudenmann LK, Walzer M, Schroeder CM, et al. Multi-omics discovery of exome-derived neoantigens in hepatocellular carcinoma. *Genome Med*. 2019;11:28.
 21. Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, et al. PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes. *Cell Rep*. 2022;38:110331.
 22. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, Lupardus P, Tanguay J, Bumbaca S, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. 2014;515:572-576.
 23. Kochin V, Kanaseki T, Tokita S, Miyamoto S, Shionoya Y, Kikuchi Y, et al. HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses. *Oncimmunology*. 2017;6:e1293214.
 24. Bassani-Sternberg M, Bräunlein E, Klar R, Engleitner T, Sinitcyn P, Audehm S, et al. Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun*. 2016;7:13404.
 25. Kikuchi Y, Tokita S, Hirama T, Kochin V, Nakatsugawa M, Shinkawa T, et al. CD8⁺ T-cell Immune Surveillance against a Tumor Antigen Encoded by the Oncogenic Long Noncoding RNA PVT1. *Cancer Immunol Res*. 2021;9:1342-1353.
 26. Oka M, Xu L, Suzuki T, Yoshikawa T, Sakamoto H, Uemura H, et al. Aberrant splicing isoforms detected by full-length transcriptome sequencing as transcripts of potential neoantigens in non-small cell lung cancer. *Genome Biol*. 2021;22:9.
 27. Skoulidis F, Byers LA, Diao L, Papadimitrakopoulou VA, Tong P, Izzo J, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov*. 2015;5:860-877.
 28. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. 2015;523:231-235.
 29. Kumagai S, Togashi Y, Sakai C, Kawazoe A, Kawazu M, Ueno T, et al. An Oncogenic Alteration Creates a Microenvironment that Promotes Tumor Progression by Conferring a Metabolic Advantage to Regulatory T Cells. *Immunity*. 2020;53:187-203.e8.
 30. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127:2930-2940.
 31. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*. 2015;12:453-457.
 32. Wang X, Xu Z, Liu Z, Lin W, Cao Z, Feng X, et al. Characterization of the Immune Cell Infiltration Landscape Uncovers Prognostic and Immunogenic Characteristics in Lung Adenocarcinoma. *Front Genet*. 2022;13:902577.
 33. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16:356-371.
 34. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, 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.
 35. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 2014;124:2246-2259.
 36. Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, 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.
 37. Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, et al. Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell*. 2019;176:404.
 38. Philip M, Schietinger A. Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections. *Curr Opin Immunol*. 2019;58:98-103.
 39. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol*. 2019;19:665-674.
 40. Hwang M, Canzoniero JV, Rosner S, Zhang G, White JR, Belcaid Z, et al. Peripheral blood immune cell dynamics reflect antitumor immune responses and predict clinical response to immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2022;

- 10:e004688.
41. Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, Yoshimura K, Horimoto K, Kitazawa M, et al. CD4⁺ T-cell Immunity in the Peripheral Blood Correlates with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res.* 2020;8:334-344.
 42. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature.* 2017; 545:60-65.
 43. Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, Banchereau R, Chen YJ, Chitre AS, et al. Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature.* 2020;579:274-278.
 44. Kang DH, Chung C, Sun P, Lee DH, Lee SI, Park D, et al. Circulating regulatory T cells predict efficacy and atypical responses in lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;71: 579-588.
 45. Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol.* 2013;31:4311-4318.
 46. 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;34:833-842.
 47. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, 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.
 48. Xiao X, Lao XM, Chen MM, Liu RX, Wei Y, Ouyang FZ, et al. PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. *Cancer Discov.* 2016;6:546-559.
 49. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 2014;41:1040-1051.
 50. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature.* 2020; 577:561-565.
 51. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature.* 2020;577:549-555.
 52. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature.* 2020;577:556-560.
 53. Chen J, Tan Y, Sun F, Hou L, Zhang C, Ge T, et al. Single-cell transcriptome and antigen-immunoglobulin analysis reveals the diversity of B cells in non-small cell lung cancer. *Genome Biol.* 2020;21:152.
 54. Cottle TR, Thompson ED, Forde PM, Stein JE, Duffield AS, Anagnostou V, 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.
 55. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, 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.
 56. Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y, 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.
 57. Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol.* 2018;9:1310.
 58. McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, Escudier B, 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.
 59. Liu Y, Zugazagoitia J, Ahmed FS, Henick BS, Gettinger SN, Herbst RS, et al. Immune Cell PD-L1 Colocalizes with Macrophages and Is Associated with Outcome in PD-1 Pathway Blockade Therapy. *Clin Cancer Res.* 2020; 26:970-977.
 60. Wang M, Zhai X, Li J, Guan J, Xu S, Li Y, et al. The Role of Cytokines in Predicting the Response and Adverse Events Related to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol.* 2021;12:670391.
 61. Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, Halpenny D, Fidelle M, Rizvi H, et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29:1437-1444.
 62. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science.* 2018;359:104-108.
 63. Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM, Morrison RM, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science.* 2021;371:595-602.
 64. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science.* 2021;371:602-609.
 65. Dizman N, Meza L, Bergerot P, Alcantara M, Dorff T, Lyou Y, et al. Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase I trial. *Nat Med.* 2022; 28:704-712.
 66. Tomita Y, Ikeda T, Sakata S, Saruwatari K, Sato R, Iyama S, et al. Association of Probiotic Clostridium butyricum Therapy with Survival and Response to Immune Checkpoint Blockade in Patients with Lung Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2020;8:1236-1242.