



· 论 著 ·

# PD-L2在头颈部鳞状细胞癌免疫治疗预后评估中的意义

黄 鹤，鞠侯雨，杨文艺，严 明，任国欣，胡镜宙

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面-头颈肿瘤科，上海交通大学口腔医学院，国家口腔医学中心，国家口腔疾病临床医学研究中心，上海市口腔医学重点实验室，上海市口腔医学研究所，上海 200011

**[摘要]** 背景与目的：程序性死亡 [蛋白] -1 (programmed death-1, PD-1) 单抗免疫治疗在头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 中的作用愈发重要，然而目前具有响应率低、缺乏预测性生物标志物的问题。本研究旨在确定程序性死亡 [蛋白] 配体-2 (programmed death ligand-2, PD-L2) 能否作为预测HNSCC中PD-1单抗免疫治疗获益情况的生物标志物。**方法**：收集50例接受PD-1单克隆抗体免疫治疗的中晚期HNSCC的组织标本及临床数据，采用免疫组织化学染色法分析程序性死亡 [蛋白] 配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1)、PD-L2表达量，采用SPSS 26.0软件根据基本临床特征、PD-L1与PD-L2表达量分组统计并进行Kaplan-Meier生存分析，采用GraphPad Prism软件绘制生存曲线。**结果**：PD-L2在HNSCC患者中阳性表达率较高，有超过80%的患者肿瘤组织可检出PD-L2表达；PD-L2的表达量显著影响免疫治疗结局，PD-L2高表达的患者平均生存期为18.8 (16.0~21.7) 个月，而PD-L2低表达的患者平均生存期为11.0 (9.1~12.8) 个月，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论**：PD-L2可作为评估HNSCC中PD-1单克隆抗体免疫治疗获益的生物标志物。

**[关键词]** 头颈部鳞状细胞癌；免疫治疗；PD-L2；PD-1单克隆抗体

中图分类号：R739.91 文献标志码：A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.06.009

**Clinical implication of PD-L2 in the prognosis assessment of HNSCC immunotherapy** HUANG He, JU Houyu, YANG Wenyi, YAN Ming, REN Guoxin, HU Jingzhou (Department of Oral & Maxillofacial-Head & Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China)

Correspondence to: HU Jingzhou, E-mail: huyayi@163.com.

**[Abstract]** **Background and purpose:** Programmed death-1 (PD-1) monoclonal antibody therapy plays an increasingly important role in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). However, low response rate and lack of predictive biomarkers are still the challenging problems. This study aimed to confirm that programmed death ligand-2 (PD-L2) is a predictive biomarker for the outcome of HNSCC anti-PD-1 immunotherapy. **Methods:** The samples and clinical data of 50 HNSCC patients undergoing PD-1 monoclonal antibody immunotherapy were collected. Immunohistochemical staining was used to analyze the level of programmed death ligand-1 (PD-L1) and PD-L2. Kaplan-Meier overall survivals were analyzed using SPSS 26.0 software, grouped by the basic clinical characteristics and the PD-L1 and PD-L2 levels. Survival curves were plotted using GraphPad Prism. **Results:** HNSCC had a relatively high expression rate of PD-L2 with more than 80% of cases detected as PD-L2 positive. The expression of PD-L2 significantly correlated with the clinical outcome of immunotherapy, with a mean survival of 18.8 (16.0-21.7) months for patients with high PD-L2 expression and 11.0 (9.1-12.8) months for patients with low PD-L2 expression, this difference being statistically significant. **Conclusion:** PD-L2 has the potential to be used as a predictive biomarker for HNSCC anti-PD-1

第一作者：黄 鹤 (ORCID: 0000-0002-5066-3668)，医学学士，硕士研究生在读。

通信作者：胡镜宙 (ORCID: 0000-0003-4402-3370)，医学博士，主任医师，E-mail: huyayi@163.com。

immunotherapy.

[ **Key words** ] Head and neck squamous cell carcinoma; Immunotherapy; Programmed death ligand-2; Programmed death-1 monoclonal antibody

头颈癌（包括口腔癌和口咽癌等）是世界范围内常见的恶性肿瘤之一。据统计，2023年美国预计新增头颈癌约5.5万例，预计死亡1.2万例<sup>[1]</sup>。头颈部鳞状细胞癌（head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC）约占头颈部恶性肿瘤的90%，不仅损害患者的容貌和语音，更严重影响患者的进食功能、呼吸功能甚至是生命。手术+辅助放化疗是中晚期HNSCC治疗受国际认可的范式<sup>[2-3]</sup>。近年来，以程序性死亡[蛋白]-1（programmed death-1, PD-1）阻断为代表的免疫检查点阻断疗法（immune checkpoint blockade, ICB）在包括HNSCC在内的实体瘤治疗中发挥重要作用<sup>[4]</sup>，应用PD-1单抗药物可将复发转移的HNSCC患者中位生存期从5.1个月延长至7.5个月<sup>[5]</sup>，PD-1单抗单药或联用化疗、靶向治疗已经成为临床指南中不可切除复发转移HNSCC的一线治疗方案<sup>[6-7]</sup>。然而，在所有HNSCC患者中，单用PD-1阻断疗法（不与化疗、靶向治疗联用）的响应率仍不足15%<sup>[8]</sup>。虽然总体而言PD-1阻断疗法安全性较高，但是仍有部分患者还可能出现超进展等严重不良反应<sup>[9]</sup>。

程序性死亡[蛋白]配体-2（programmed death ligand-2, PD-L2）是Latchman等<sup>[10]</sup>于2001年发现的另一种PD-1配体。PD-L2是一种I类穿膜蛋白，与程序性死亡[蛋白]配体-1（programmed death ligand-1, PD-L1）同属B7蛋白家族。PD-L2由PDCD1LG2基因编码，该基因由7个外显子构成，与PD-L1基因共同位于人类9号染色体短臂2区4带2亚带，二者位置上相距仅42 kb，且结构具有一定相似性。在正常组织中，PD-L2和PD-L1有时共同表达，但在某些组织中只能检测到其中一种的表达。PD-L2和PD-L1一样，不仅能与PD-1分子结合，还能激活免疫细胞PD-1分子，拮抗TCR-CD28信号转导通路，从而部分抑制T细胞激活。二者具有相似的免疫调节

作用。

本研究探索PD-L2高表达与低表达患者接受免疫治疗的临床结局的差异，旨在确定PD-L2是否可以作为PD-1单抗免疫治疗的预测性生物标志物应用于临床。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床样本收集与整理

根据相关临床指南推荐，免疫检查点抑制剂在HNSCC中主要用于复发/转移患者<sup>[6-7]</sup>。本研究收集上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面-头颈肿瘤科2020年7月—2022年6月收治的HNSCC患者的病历资料及手术或活检标本，并进行随访，随访截至2022年10月。收集的病历资料包括患者性别、原发部位、美国癌症联合会（American Joint Committee on Cancer, AJCC）分期、治疗史、初次免疫治疗时间、末次随访时间、生存状况。纳入标准包括：① 原发灶经本院病理学检查确诊、无手术机会的复发/转移HNSCC或患者无法耐受手术的中晚期HNSCC；② 使用帕博利珠单抗（pembrolizumab）或卡瑞利珠单抗（camrelizumab）进行免疫治疗。排除标准包括：① 无复发转移的单纯术后辅助治疗患者；② 术前新辅助治疗的患者；③ 未在本院进行病理学检查或病理学检查标本遗失的患者及因标本体积小切片后不满足存档条件的患者。

### 1.2 治疗方法

除使用PD-1单克隆抗体药物外，大部分纳入本研究的患者还联合使用了一种或多种化疗药物及靶向治疗药物。化疗药物包括紫杉类药物、铂类药物、5-FU、甲氨蝶呤类药物等。靶向治疗药物包括表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）单克隆抗体、血管内皮细胞生长因子受体（vascular endothelial growth

factor receptor, VEGFR) 抑制剂等。

### 1.3 免疫组织化学染色与评估

使用PD-L1抗体(CST#13684, pH=6.0柠檬酸抗原修复液高温高压抗原修复)、PD-L2抗体(Abclonal A17943, pH=9.0 EDTA抗原修复液微波加热抗原修复)进行常规免疫组织化学DAB染色,在有经验的病理科医师的指导下,显微镜下读片寻找肿瘤组织,统计肿瘤组织中肿瘤细胞和间质免疫细胞中PD-L2、PD-L1阳性细胞的比例。

### 1.4 统计学处理

根据PD-L2、PD-L1阳性细胞占比分布选择合适的阈值,将患者分为PD-L2高表达或低表达组、PD-L1高表达或低表达组。将患者的基本临床资料、PD-L2与PD-L1表达情况及患者生存情况录入SPSS 26.0软件根据患者的基本临床特征、PD-L2与PD-L1表达情况分组并进行Kaplan-Meier生存分析,录入GraphPad Prism 9软件绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 临床基本特征、治疗史、实验室检查及治疗方法

共50例患者纳入本研究(表1)。患者年龄分布为24~82岁,中位年龄58岁。43例(86%)患者原发部位位于口腔(包括唇红),6例(12%)位于口咽或下咽,1例(2%)位于腮腺。47例患者为治疗后复发(94%),3例肿瘤为原发(6%)。在AJCC分期方面,除2例(4%)Ⅲ期但身体状况不能耐受手术的患者外,其余48例(96%)在开始治疗时处于Ⅳ期。32例(64%)患者就诊时有区域淋巴结转移,11例(22%)有远处转移,其中远处转移最常见的部位是肺(在11例患者中均出现)。

治疗史、实验室检查与治疗方法见表2。其中34例(64%)患者治疗前曾经接受过放疗。在免疫治疗综合阳性评分(combined positive score, CPS)方面,有45例(90%)患者治疗前接受了CPS,其中43例(95.56%) $CPS \geq 1$ 。在具

体治疗方法方面,22例(44%)患者使用了帕博利珠单抗治疗,28例(56%)使用了卡瑞利珠单抗。在46例(92%)患者中免疫治疗为一线治疗手段,其余4例(8%)中为二线治疗手段。绝大多数患者(47例,94%)都接受了靶向治疗或化疗;有33例(66%)仅接受了紫杉类药物+铂类药物或铂类药物+5-FU化疗,11例仅接受了EGFR单抗或VEGFR抑制剂的靶向治疗,3例同时接受了靶向治疗和化疗。

表1 纳入患者基本临床特征

Tab. 1 Basic clinical characteristics of the included cases

Basic clinical characteristics	Case <i>n</i> (%)
Gender	
Male	35 (70.00)
Female	15 (30.00)
Primary site	
Oral cavity and mucosal lip	43 (86.00)
Body of tongue	18 (41.86)
Buccal mucosa	9 (20.93)
Lower gingiva	6 (13.95)
Mouth floor	4 (9.30)
Upper gingiva and hard palate	4 (9.30)
Upper lip	1 (2.33)
Lower lip	1 (2.33)
Oropharynx and hypopharynx	6 (12.00)
Parotid gland	1 (2.00)
AJCC staging	
Ⅲ	2 (4.00)
Ⅳa	6 (12.00)
Ⅳb	31 (62.00)
Ⅳc	11 (22.00)
Recurrent disease	
Yes	47 (94.00)
No	3 (6.00)
Regional lymph node metastasis	
Yes	32 (64.00)
No	18 (36.00)
Distal metastasis	
Yes	11 (22.00)
No	39 (78.00)

表2 纳入患者的治疗史、实验室检查及治疗方法

cases	
Medical history, laboratory test, and treatment	Case <i>n</i> (%)
Previous history of radiotherapy	
Yes	34 (68.00)
No	16 (32.00)
CPS test before treatment	
Yes	45 (90.00)
CPS ≥ 1	43 (95.56)
CPS < 1	2 (4.44)
No	5 (10.00)
Combined treatment	
Combined chemotherapy only	33 (66.00)
Combined target therapy only	11 (22.00)
Combined both chemotherapy and target therapy	3 (6.00)
No combined treatment	3 (6.00)

## 2.2 免疫组织化学染色检查

对临床样本进行PD-L2免疫组织化学检查发现, 50例样本中有42例可以检出PD-L2表达阳性的细胞, 阳性细胞比例占1%~60%。如果以10%为界, ≥10%为PD-L2高表达, <10%为PD-L2低表达, 则50例样本中共有22例PD-L2高表达患者, 28例PD-L2低表达患者。

我们也对PD-L1指标进行染色, 结果发现50例样本中有46例可以检出PD-L1阳性细胞, 阳性细胞占比占1%~80%。相关治疗指南中对帕博利珠单抗生物标志物CPS的阈值通常为20, 若以20%为界, ≥20%为PD-L1高表达, <20%为PD-L1低表达, 则50例样本中共有29例PD-L1高表达患者, 21例PD-L1低表达患者。PD-L1、PD-L2免疫组织化学染色结果见图1。

## 2.3 生存分析

### 2.3.1 患者基本临床特征与生存期的关系

纳入患者的中位随访时间为13.1个月。对患者基本临床特征进行单因素生存分析, 研究变量包括性别、年龄、局部淋巴结转移、远处转移及放疗史, 发现这些因素均与患者生存无显著相关性 ( $P > 0.05$ , 表3)。

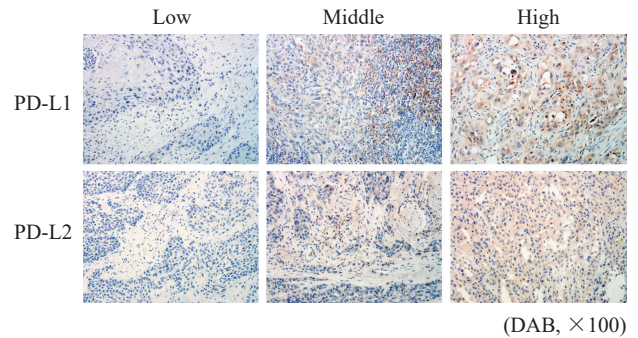


图1 PD-L1、PD-L2高、中、低表达典型免疫组织化学染色图

Fig. 1 Typical immunohistochemistry staining of high, middle, and low PD-L1 or PD-L2 expression samples

表3 患者基本临床特征分布与生存期

Tab. 3 Distribution of basic clinical characteristics and overall survival			
Characteristics	Case <i>n</i>	Mean OS <i>t</i> /month	<i>P</i> value
Gender			0.234
Male	35	13.03 ± 1.23	
Female	15	16.30 ± 1.96	
Age/year			0.878
≥ 58	26	14.35 ± 1.29	
< 58	24	14.53 ± 1.79	
Regional lymph node metastasis			0.336
Yes	32	13.83 ± 1.35	
No	18	15.24 ± 1.70	
Distal metastasis			0.657
Yes	11	12.22 ± 1.97	
No	39	14.84 ± 1.29	
Previous history of radiotherapy			0.931
Yes	34	13.88 ± 1.11	
No	16	14.32 ± 2.25	

### 2.3.2 PD-L1表达量与患者生存期的关系

PD-L1高表达患者的平均生存期为16.9 (14.0~19.7)个月, 因随访时间较短, 该组尚有超过50%的患者存活, 无法统计中位生存期; PD-L1低表达组平均生存期为11.2 (8.6~13.8)个月, 中位生存期为11.7 (9.0~14.4)个月。PD-L1

高表达与低表达组的生存期差异有统计学意义 ( $P=0.031$ )。PD-L1高表达组生存期明显更长 (图2)。

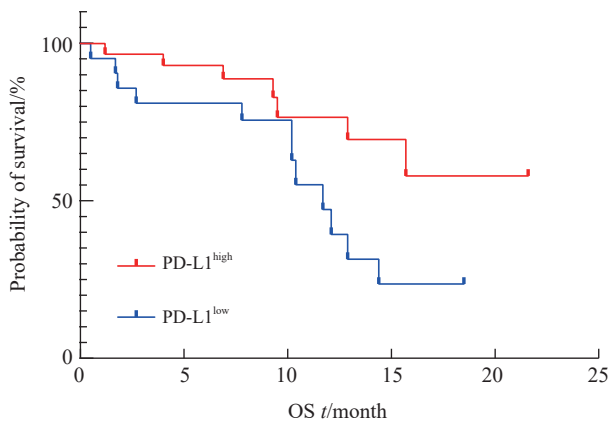


图2 PD-L1高表达与低表达组患者的总生存期

Fig. 2 Overall survival of PD-L1<sup>high</sup> and PD-L1<sup>low</sup> patients

### 2.3.3 PD-L2表达量与患者生存期的关系

PD-L2高表达患者的平均生存期为18.8 (16.0~21.7)个月,因随访时间较短,该组尚有超过50%的患者存活,无法统计中位生存期;PD-L2低表达组平均生存期为11.0 (9.1~12.8)个月,中位生存期为12.1 (9.7~14.5)个月。PD-L2高表达与低表达组的生存期差异有统计学意义 ( $P=0.004$ ),PD-L2高表达组生存期更长 (图3)。

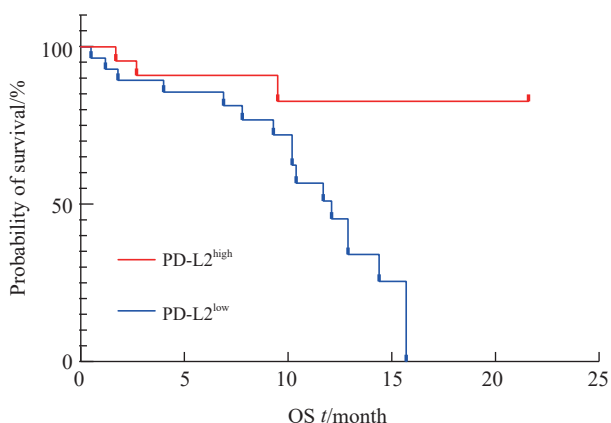


图3 PD-L2高表达与低表达组患者的总生存期

Fig. 3 Overall survival of PD-L2<sup>high</sup> and PD-L2<sup>low</sup> patients

## 3 讨论

HNSCC是头颈部最常见的恶性肿瘤。当前已经应用于临床的PD-1阻断疗法的标志物包括PD-L1表达水平相关指标和肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden) 相关指标。其中PD-L1表达水平相关指标包括了诸如CPS、肿瘤细胞阳性比例分数 (tumor cell proportion score, TPS) 和免疫细胞阳性比例分数 (immune cell proportion score, IPS) 等。而肿瘤突变负荷相关指标则包括了微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 和错配修复缺陷 (deficient mismatch repair, dMMR) 等指标<sup>[11]</sup>。在HNSCC中,目前临床上应用的预测性生物标志物是PD-L1表达水平相关的指标,主要是CPS。

然而,临床上目前使用的评价PD-L1阳性细胞比例的指标CPS,有时不能准确地反映PD-1阻断疗法响应与预后的情况。若依赖PD-L1作为预测性生物标志物,则很可能出现假阴性,即低表达PD-L1的患者仍有概率响应PD-1单抗疗法。

为达到精准医疗的目的,HNSCC免疫治疗中的预测性生物标志物某种程度上可以说是不可或缺的,但现有的PD-L1相关指标尚存在不足,寻找新的生物标志物对现有的PD-L1相关指标加以补充迫在眉睫。基于PD-L2自身具备的生物学功能及HNSCC免疫治疗的临床观察,本研究对PD-L2表达量预测PD-1单抗治疗HNSCC的获益情况进行分析。结果发现,PD-L2表达量显著影响PD-1单抗免疫治疗的获益,高PD-L2表达与更好的免疫治疗预后相关。既往研究<sup>[12]</sup>结果显示,PD-L2表达量可能影响帕博利珠单抗单药免疫治疗的预后,但就中国目前实际情况而言,该研究存在口腔癌患者数较少的不足。最重要的一点是,该研究中的患者仅使用了帕博利珠单抗单药治疗,并未进行其他治疗的联合用药。

本研究报道了HNSCC中PD-L2表达与免疫治疗预后的关系。纳入的绝大多数患者为中国更为常见的口腔癌,口腔癌中占比最高的发病部位依次为舌体 (41.86%)、颊黏膜 (20.93%)、

下牙龈 (13.95%)。根据相关研究<sup>[13]</sup>报道, 2000年—2019年就诊的467位口腔鳞状细胞癌患者最常见的发病部位为舌体 (43.0%)、颊黏膜 (14.8%)、下牙龈 (12.2%), 这与本研究纳入患者的情况基本相符, 说明本研究的样本具有一定代表性。同时, 本研究纳入的患者大多数使用了化疗或靶向治疗, 这也更加贴近目前国内外指南推荐和临床实际<sup>[6]</sup>。

本研究的结果进一步提示了PD-L2具有作为预测性生物标志物应用于临床的潜力, 即PD-L2可以在很大程度上补充现有PD-L1相关指标的不足; 对于一些PD-L1低表达甚至不表达的患者, 若可检出PD-L2表达, 则其从PD-1单抗疗法中获益的可能性也会更大。开发针对PD-L2蛋白的伴随诊断产品有望继续扩大接受PD-1单抗免疫治疗的获益人群。

需要指出的是, 由于相关药物应用于临床的时间较短, 且满足纳入条件的晚期HNSCC患者数量较少, 本研究仅能作为粗略的分析和比较加以参考。目前的证据无法说明PD-L1与PD-L2之间哪个分子对PD-1单抗治疗的预后评估更有意义; 鉴于二者在组织中的表达情况有所差异, 尚不能认为它们之间可以相互替代。当前仅能认为二者可以作为相互独立又互为补充的两个指标加以应用, 未来需要更加有针对性的试验设计并进行深入研究。

**利益冲突声明:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17–48.
- [2] KEAM B, MACHIELS J P, KIM H R, et al. Pan-Asian adaptation of the EHNS-ESMO-ESTRO clinical practice guidelines for the diagnosis, treatment and follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck [J].

*ESMO Open*, 2021, 6(6): 100309.

- [3] LICITRA L, FELIP E, GUIDELINES WORKING GROUP E O. Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(Suppl 4): 121–122.
- [4] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy [J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56–61.
- [5] FERRIS R L, BLUMENSCHNEIN G Jr, FAYETTE J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1856–1867.
- [6] NCCN. NCCN clinical practice guidelines in oncology: head and neck cancers [EB/OL]. Version 1.2023. [2023-03-15]. <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1437>.
- [7] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会 (CSCO)免疫检查点抑制剂临床应用指南-2022 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022.
- Guide Working Committee of the Chinese Society of Clinical Oncology. Guidelines of Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) immune checkpoint inhibitor clinical practice-2022 [M]. People's Medical Publishing House, Beijing, 2022.
- [8] COHEN E E W, SOULIÈRES D, LE TOURNEAU C, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study [J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 156–167.
- [9] DESILETS A, SOULIÈRES D. Safety evaluation of pembrolizumab for treating recurrent head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2020, 19(8): 927–934.
- [10] LATCHMAN Y, WOOD C R, CHERNOVA T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 261–268.
- [11] BAGCHI S, YUAN R, ENGLEMAN E G. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance [J]. *Annu Rev Pathol*, 2021, 16: 223–249.
- [12] YEARLEY J H, GIBSON C, YU N, et al. PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12): 3158–3167.
- [13] WANG W L, ADEOYE J, THOMSON P, et al. Statistical profiling of oral cancer and the prediction of outcome [J]. *J Oral Pathol Med*, 2021, 50(1): 39–46.

(收稿日期: 2023-03-16 修回日期: 2023-06-02)