

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82812

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11169

研究課題名(和文)新規イムノオングローブ分子であるB7-H3の可溶性分子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of soluble B7-H3

研究代表者

東 剛司 (AZUMA, TAKESHI)

東京都立多摩総合医療センター(臨床研究・教育研修センター(臨床研究部))・泌尿器科・部長

研究者番号：50719854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：血清中の可溶性B7-H3濃度はきん筋層非浸潤性膀胱癌患者において、健常人と比べて有意に増加していた。

また、可溶性B7-H3は、筋層非浸潤性膀胱癌患者の非再発生存率と非進行生存率とも関連を認めたことより、有効な予後予測因子になりうることを示唆された。さらに、日常診療において、頻用されるEuropean Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)のリスク分類におけるintermediate-lowとintermediate-highのグループで、可溶性B7-H3の有無が、非再発生存率と非進行生存率との関連を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清中の可溶性B7-H3濃度は有効な血清腫瘍マーカーになりうることを示唆された。

日常診療において、表在性膀胱癌の再発と進行の予測の精度が改善された。

研究成果の概要(英文)：We detected high levels of sB7-H3 in the sera of 47% of patients with NMIBC versus only 8% in healthy donors. The increase of sB7-H3 was significantly associated with poor RFS and PFS. Multivariate analysis showed that elevated sB7-H3 was an independent prognostic factor of RFS and PFS. According to the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), in intermediate-low and intermediate-high risk groups, the presence of sB7-H3 significantly determined the rate of recurrence and progression.

研究分野：泌尿器科 腫瘍免疫

キーワード：B7-H3 膀胱癌 イムノチェックポイント分子 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌の年齢調整罹患率は 6.9 人/10 万人/年であり、高齢化社会において今後増加する癌の一つと考えられている。また、膀胱癌は臨床的特徴より筋層非浸潤性膀胱癌と筋層浸潤性膀胱癌の二つに大別される。前者は、頻回な再発が問題であり、治療として Bacille de Calmette et Guerin (BCG)の膀胱内注入療法が行われる。後者は、転移を来し致死的な経過をたどることが問題であり、一般的には化学療法が施行される。しかし、これらの治療効果は限定的であることが臨床において問題となっている。そのため、臨床においては再発と進行を予測することが非常に有用である。

2. 研究の目的

膀胱癌において有用な血清腫瘍マーカーは現在存在しない。近年、膀胱癌において B7-H1 B7-H3 B7-H4 が細胞表面に発現し、予後と関連していることが報告されている。また、これらの分子は可溶性フォームを作成することも報告されている。B7-H3 については、血清中に可溶性 B7-H3 が存在することを確認している。今回我々は筋層非浸潤性膀胱癌において、血清の可溶性 B7-H3 の動態を解析することにより腫瘍マーカーと予後予測因子としての有用性について検討した。

3. 研究の方法

筋層非浸潤性膀胱癌患者は手術前に、健常人 (age and sex matched)は任意の時点で血清を採取し保存した。この血清中の可溶性 B7-H3 濃度を ELISA 法により測定した。ELISA には LSBio 社の soluble B7-H3 測定キットを用いた。

血清の保存ならびに B7-H3 濃度の測定に関しては、当院倫理委員会において承認され、患者の同意を書面にて頂いた。

無再発生存率(RFS)、非進行生存率(PFS)は、JMP (version 8)を用いて、Kaplan-Meier 法により算出した。膜型 B7-H3 を遺伝子投入した腎細胞癌株と可溶性 B7-H3 を遺伝子投入した同じ腎細胞癌株をいくつかの比率で混合し、アロの T 細胞と培養共培養し、リンパ球増殖能力の解析、エフェクター T リンパ球を用いて癌細胞株に対する細胞傷害活性の解析を施行することにより、可溶性 B7-H3 の機能を解析した。

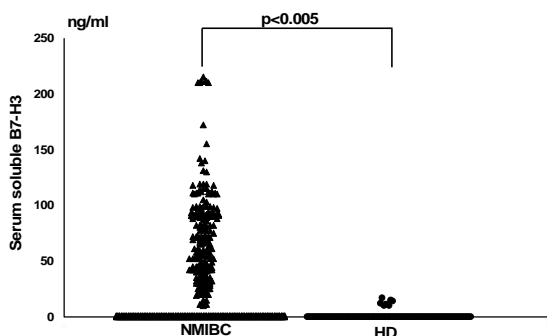
4. 研究成果

筋層非浸潤性膀胱癌患者における血清中の可溶性 B7-H3 の発現

筋層非浸潤性膀胱癌患者 555 例、健常人それぞれ 103 例の血清を採取した。患者背景は、筋層非浸潤性膀胱癌患者は、男女比 (445 人、110 人) 平均年齢 73.5 歳 (22-98 歳) 病理組織は全例、非筋層浸潤性尿路上皮癌であった。健常人、男女比 (81 人、22 人) 平均年齢 71.5 歳 (35-85 歳) であった。図 1 に示すように、筋層非浸潤性膀胱癌患者では、47% (555 例中 261 例) に血清中に可溶性 B7-H3 を認めただのに対して、健常人では 8% (103 例中 8 例) に認めるのみであった。筋層非浸潤性膀胱癌患者の血清中の可溶性 B7-H3 が平均濃度は 31.6ng/ml (陽性患者のみでは 67.1ng/ml) に対して、健常人では 1ng/ml (陽性患者のみでは 12.5ng/ml) と筋層非浸潤性膀胱癌患者で有意に高値であった ($p < 0.005$)。

図 1 Detection of serum soluble B7-H3 (sB7-H3) in patients with non-muscle invasive bladder cancer

Fig. 1



筋層非浸潤性膀胱癌患者における血清中の可溶性 B7-H3 の有無と予後との関連

図 2 に示すように、筋層非浸潤性膀胱癌患者 555 例の予後として非再発生存率を血清中可溶性 B7-H3 の有無で評価した。可溶性 B7-H3 陽性群では 3 年と 5 年時点での非再発生存率が、それぞれ 25.4%、23.2% に対して、陰性群では 60.2%、51.9% と有意に予後が良好であった ($p < 0.001$)。さらに、図 3 に示すように非進行生存率においても、可溶性 B7-H3 陽性群では 3 年と 5 年時点での非進行生存率が、それぞれ 85.0%、68.8% に対して、陰性群では 95.0%、91.7% と有意に予後が良好であった ($p < 0.005$)。

図 2 Kaplan-Meier recurrence-free survival rate curves for patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) with (n=261) and without (n=294) serum soluble B7-H3

(sB7-H3)

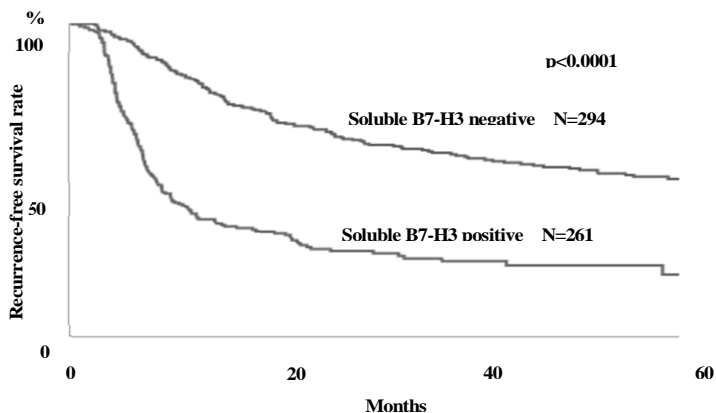
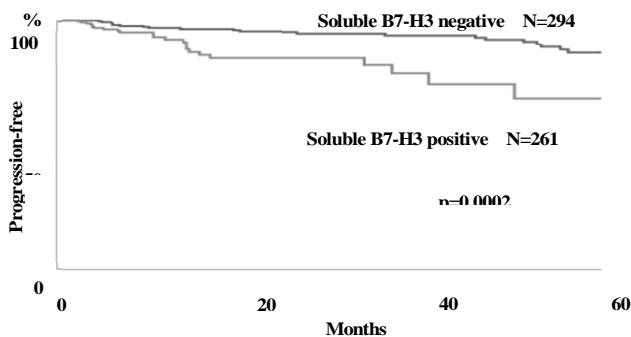


図 3 Progression-free survival rate curves for NMIBC patients with (n=261) and without (n=294) serum soluble sB7-H3



筋層非浸潤性膀胱癌患者の予後に影響する因子の同定

筋層非浸潤性膀胱癌患者の非再発生存率に影響を与える因子として、血清中の可溶性 B7-H3 の有無に加えて、腫瘍の数、腫瘍の大きさ、再発までの期間、T stage、CIS の有無、Grade を単変量解析にて解析した。表 1 に示すように、すべての因子で有意差を認めた。次に、これら全ての因子を用いて、多変量解析を施行したところ腫瘍の数、腫瘍の大きさ、再発までの期間、CIS の有無、Grade と血清中の可溶性 B7-H3 の有無において非再発生存率に影響を与える因子として有意差を認めた。さらに非進行生存率も同様に解析した。表 2 に示すように単変量解析では腫瘍の数、腫瘍の大きさ、T stage、CIS の有無、Grade、で可溶性 B7-H3 の有無有意差を認めた。多変量解析を施行したところ腫瘍の大きさ、T stage、CIS の有無、Grade と血清中の可溶性 B7-H3 の有無において非再発生存率に影響を与える因子として有意差を認めた。

表 1 Univariate and multivariate analysis of recurrence

	Cutoff	Univariate		Multivariate	
		HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Soluble B7-H3	Negative vs Positive	0.54 (0.43-0.66)	<0.0001	0.51 (0.40-0.63)	<0.0001
Number of tumors			<0.0001		<0.0001
	Single vs 2-7	0.43 (0.24-0.60)		0.41 (0.23-0.59)	
	2-7 vs >7	0.20 (0.031-0.38)		0.20 (0.026-0.38)	
Tumor size	≤3 vs >3 cm	0.30 (0.12-0.46)	0.0005	0.27 (0.086-0.45)	0.0051
T category	Ta vs T1	0.12 (0.0044-0.23)	0.039	0.023 (-0.15-0.11)	0.73
Carcinoma in situ	No vs Yes	0.17 (0.024-0.34)	0.027	0.20 (0.049-0.37)	0.0094
Grade			0.0039		0.011
	G1 vs G2	0.40 (0.17-0.65)		0.36 (0.12-0.63)	
	G2 vs G3	0.18 (0.023-0.35)		0.18 (0.015-0.35)	
Prior recurrence rate			0.079		0.05
	Primary vs ≤1rec/yr	0.22 (0.015-0.46)		0.27 (0.050-0.51)	
	≤1rec/yr vs >1rec/yr	0.15 (-0.076-0.39)		0.085 (-0.14-0.33)	

表 2 Univariate and multivariate analysis of progression

	Cutoff	Univariate		Multivariate	
		HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Soluble B7-H3	Negative vs Positive	0.56 (0.25-0.87)	0.0002	0.46 (0.14-0.78)	0.0048
Number of tumors	Single vs Multiple	0.11 (-0.18-0.42)	0.089	0.75 (-1.2-1.4)	0.95
Tumor size	≤3 vs >3 cm	1.1 (0.76-1.4)	<0.0001	0.77 (0.41-1.1)	<0.0001
T category	Ta vs T1	12 (5.2-14)	<0.0001	12 (8.3-14)	<0.0001
Carcinoma in situ	No vs Yes	0.62 (0.12-1.3)	0.026	4.5 (0.027-0.67)	0.033
Grade	G1 and G2 vs G3	0.86 (0.57-1.2)	<0.0001	1.75 (1.01-3.05)	0.046
Prior recurrence rate	Primary vs recurrent	0.15 (-0.15-0.46)	0.8	1.0 (-0.28-1.3)	0.8

筋層非浸潤性膀胱癌患者における血清中の可溶性 B7-H3 と EORTC risk table との関連

筋層非浸潤性膀胱癌患者 555 例を EORTC risk table のスコアリングシステムと可溶性 B7-H3 の有無で、表 3 のように分類した。図 4 に示すように、各リスク群を可溶性 B7-H3 の有無で、非再発生存率を評価した。陰性群では有意に予後が良好であった。さらに、図 5 に示すように非進行生存率においても陰性群で有意に予後が良好であった。

表 3 Characteristics of patients with and without Soluble B7-H3

		Patients without	Patients with	p value
		soluble B7-H3	soluble B7-H3	
EORTC recurrence	Low	22 (7)	14 (5)	0.58
	Low-intermediate	134 (46)	105 (40)	
	High-intermediate	129 (44)	125 (48)	
	High	9 (3)	17 (7)	
EORTC progression	Low	59 (20)	37 (14)	0.42
	Low-intermediate	103 (35)	104 (40)	
	High-intermediate	99 (34)	95 (36)	
	High	33 (11)	25 (10)	

図 4 Kaplan-Meier recurrence-free survival rate curves for patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) classified by the EORTC risk table for recurrence

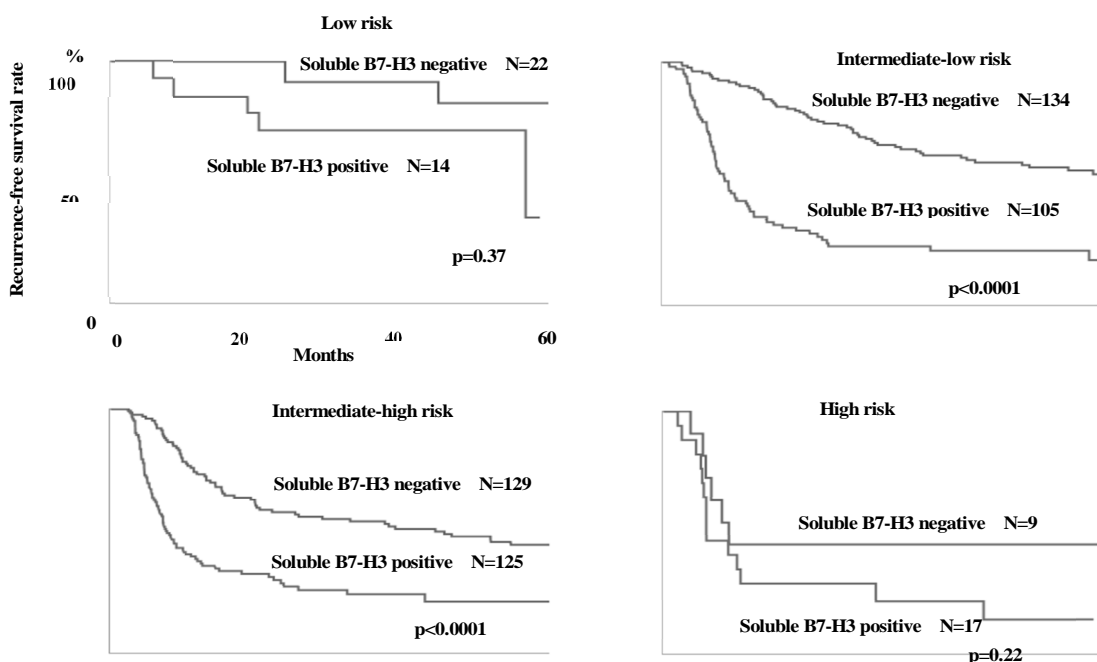
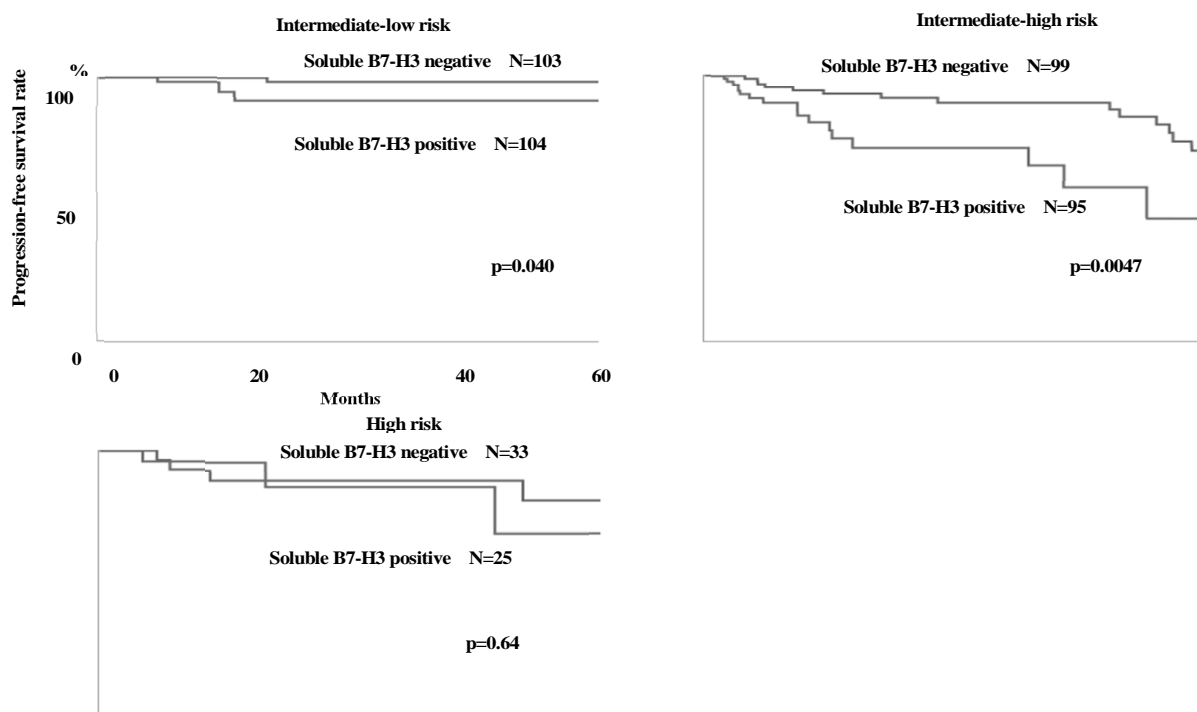


図 5 PFS rate curves for NMIBC patients classified by the EORTC risk table for progression



マウス癌細胞株を用いた B7-H3 の解析

図 6 に示した膜型 B7-H3 を発現したマウス癌細胞株を用いて解析した。さらに可溶性 B7-H3 を分泌する、同じ癌株も作成しており、これらをいくつかの比率で混合し、アロの T 細胞と培養し、T 細胞の増殖並びに細胞障害活性を解析した。しかし、膜型 B7-H3 の T 細胞に対する有意な抑制作用は認められなかった。そのため、可溶性 B7-H3 の作用を解析することは出来なかった。

図 6



成果のまとめ

血清中の可溶性 B7-H3 濃度は筋層非浸潤性癌患者において、健常人と比べて有意に増加していた。この結果から、有効な血清腫瘍マーカーになりうることを示唆された。また、可溶性 B7-H3 は、筋層非浸潤性膀胱癌患者の非再発生存率と非進行生存率とも関連を認めたことより、有効な予後予測因子にもなりうることを示唆された。

また、マウスの解析において、膜型 B7-H3 の T 細胞に対するダイレクトな有意な抑制作用は認めなかった。

筋層非浸潤性膀胱癌患者の確立した予後予測因子である EORTC risk table のスコアリングシステムの各リスク群を可溶性 B7-H3 の有無により分類することより、更に精密な非再発生存率と非進行生存率を予測できた。

このように可溶性 B7-H3 は筋層非浸潤性膀胱癌の臨床において、非常に有用な予後予測因子になりうる事が示された。また B7-H3 を介した免疫系のさらなる解析により、新たな免疫治療への開発の可能性が期待できる。今後の研究の蓄積が待たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Azuma Takeshi, Sato Yujiro, Ohno Tatsukuni, Azuma Miyuki, Kume Haruki	4. 巻 15
2. 論文標題 Serum soluble B7-H3 is a prognostic marker for patients with non-muscle-invasive bladder cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0243379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Azuma Takeshi, Sato Yujiro, Ohno Tetsukuni, Azuma Miyuki, Kume Haruki	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum soluble B7-H4 is a prognostic marker for patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0199719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0199719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Azuma Takeshi, Sugihara Tohru, Honda Sachi, Yoshizaki Uran, Niimi Fusako, Tsuru Ibuki, Kume Haruki	4. 巻 17
2. 論文標題 Metastatic renal cell carcinoma regains sensitivity to tyrosine kinase inhibitor after nivolumab treatment: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4011-4015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.10027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久米 春喜 (Kume Haruki) (10272577)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐藤 雄二郎 (Sato Yujiro) (40770871)	東京都立多摩総合医療センター（臨床研究・教育研修センター（臨床研究部））・泌尿器科・医員 (82812)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関