

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：82812

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11037

研究課題名（和文）尿路悪性腫瘍におけるB7-H4の機能解析と新規免疫療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of B7-H4 function in urological cancer and development of the new therapy of immunity

研究代表者

佐藤 雄二郎 (Yujiro, Sato)

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

研究者番号：40770871

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：血清中の可溶性B7-H4濃度は腎細胞癌患者において、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-H4は、非転移性腎細胞癌患者の無増悪生存率と全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。

また、マウスの解析において、膜型B7-H4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。一方、腎細胞癌患者において可溶性B7-H4濃度は末梢血中の好中球数と正の相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、進行癌における癌の微小環境の研究が注目を集め、進行している。これらの研究で、好中球を含めた骨髄系の細胞が、細胞障害性T細胞を抑制し癌の増殖に有利に作用していることが示されている。

可溶性B7-H4と好中球への作用機序のさらなる詳細な解析により、癌細胞の免疫逃避のメカニズムが明らかになる可能性がある。

このようにB7-H4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。

研究成果の概要（英文）： We detected high levels of soluble B7-H4 in the sera of 56% of patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma versus only 10% of healthy donors. Elevated soluble B7-H4 levels were associated with changes in an elevated peripheral blood neutrophil count. The increase of soluble B7-H4 also was significantly associated with poor PFS and OS. Multivariate analysis showed that the elevation of the soluble B7-H4 level was an independent prognostic factor for PFS and OS.

Our data suggest that the association between serum soluble B7-H4 and peripheral blood neutrophil count, as well as the evaluation of serum soluble B7-H4 expression is a useful tool for predicting the prognosis of patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：腎細胞癌 イムノチェックポイント B7-H4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌において、有用な血清腫瘍マーカーは存在しない。そのため日常診療において診断、治療効果判定、再発の確認などで困難を要する事が少なくない。我々は、近年腎細胞癌において発現されていることが報告されている B7-H4 に着目し、腎細胞癌患者血清中の可溶性 B7-H4 の術前、術後の濃度を ELISA 法にて測定し、その有用性を検討した。健常人に比して腎細胞癌患者では、可溶性 B7-H4 陽性例が有意に増加していた。また手術により腎細胞癌を除去し得た症例では、可溶性 B7-H4 の著明な減少を認めた。さらに、血清中の可溶性 B7-H4 の濃度と予後が悪いことを認めた。以上より可溶性 B7-H4 は腎細胞癌患者において、非常に有望な血清腫瘍マーカー、さらに予後予測因子に成り得ることが示唆された。

2. 研究の目的

腎細胞癌患者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、腎細胞癌において 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 1-3。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-H4 については、腎細胞癌患者の血清中に可溶性 B7-H4 が存在すること、さらに腎細胞癌のマウスモデルにおいて B7-H4 の可溶性フォームが腫瘍の増殖に重要であることを確認している 4。今回我々は腎細胞癌患者において手術、薬物療法などの治療経過中に血清の可溶性 B7-H4 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

腎細胞癌患者は手術前、術後 1 カ月の時点で、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-H4 濃度を ELISA 法により測定した。ELISA には LSBio 社の soluble B7-H4 測定キットを用いた。

また腎細胞癌患者では同時点における血中好中球数を測定した。

血清の保存ならびに B7-H4 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(PFS)、全生存率(OS)は、JMP (verison 8)を用いて、Kaplan-Meier 法により算出した。

膜型 B7-H4 を遺伝子投入した腎細胞癌株と可溶性 B7-H4 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-H4 の機能を解析する。

4. 研究成果

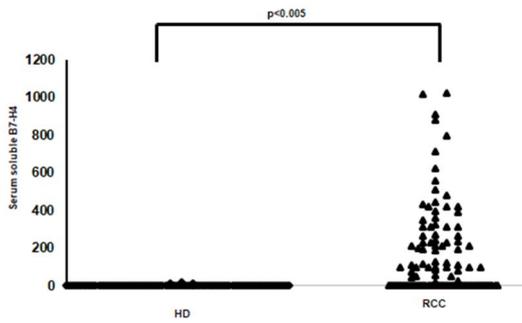
泌尿器悪性腫瘍患者における可溶性 B7-H4 の発現

腎細胞癌、膀胱癌、前立腺癌患者の血清において可溶性 B7-H4 の有無を確認した。膀胱癌患者 2 例/20 例、前立腺癌 1 例/20 例と発現頻度は低かった。一方、非転移性腎細胞癌患者においては、60 例/108 例と可溶性 B7-H4 を血清中に高頻度に認めた。

非転移性腎細胞癌患者における血清中の可溶性 B7-H4 の発現

腎細胞癌患者と健常人それぞれ 108 の血清を採取した。患者背景は、腎細胞癌患者は、男女比 (69 人、39 人)、平均年齢 65.1 歳 (32-88 歳)、病理組織は全例淡明細胞癌であった。健常人、男女比 (69 人、39 人)、平均年齢 64.5 歳 (42-85 歳)であった。図 1 に示すように、腎細胞癌患者では、56% (108 例中 60 例) に血清中に可溶性 B7-H4 を認めたのに対して、健常人では 10% (108 例中 11 例) に認めるのみであった。腎細胞癌患者の血清中の可溶性 B7-H4 が平均濃度は 167.1ng/ml に対して、健常人では 0.9ng/ml (陽性患者のみでは 8.5ng/ml) と腎細胞癌患者で有意に高値であった ($p < 0.005$)。

図 1 Detection of serum soluble B7-H4 in patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma



非転移性腎細胞癌患者における血清中の可溶性 B7-H4 の発現と末梢血中の好中球数との関連
腎細胞癌患者において、血清中の可溶性 B7-H4 の有無と末梢血中の好中球数との関連を評価した。図 2 に示すように、血清中の可溶性 B7-H4 陽性患者は陰性患者に比して有意に末梢血中の好中球が増加していた($p < 0.005$)。

図 2, 3 The association between serum soluble B7-H4 and peripheral blood neutrophils

図 2

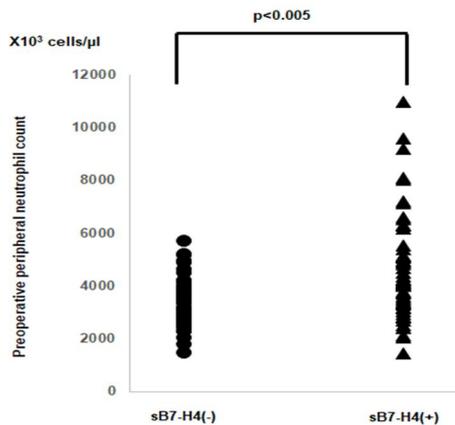
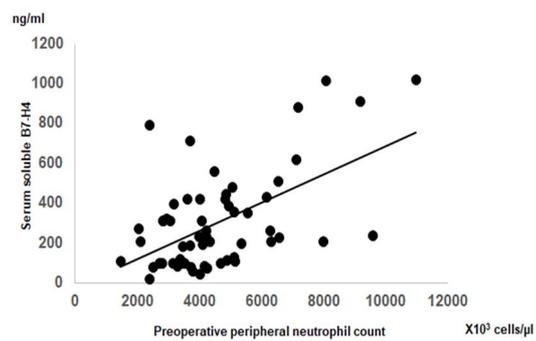


図 3

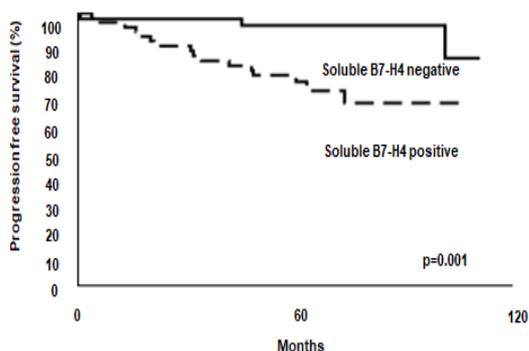


また図 3 に示すように、可溶性 B7-H4 陽性患者において、可溶性 B7-H4 濃度と末梢血中の好中球数をプロットすると正の相関関係を認めた($y = 0.07x - 19.6$, $R^2 = 0.428$, $T < 0.05$)。

非転移性腎細胞癌患者における血清中の可溶性 B7-H4 の有無と予後との関連

図 4 に示すように、腎細胞癌患者 108 例の予後として無増悪生存率を血清中可溶性 B7-H4 の有無で評価した。可溶性 B7-H4 陽性群では 5 年時点での無増悪生存率が 91.3% に対して、陰性群では 95.6% と有意に予後が良好であった($p < 0.001$)。

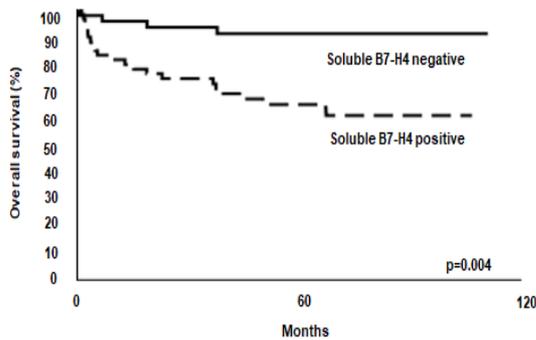
図 4 Progression-free survival of non-metastatic clear cell renal cell carcinoma patients with and without serum soluble B7-H4



次に全生存率を評価した。図 5 に示すように、可溶性 B7-H4 陽性群では 5 年時点での無増悪生存率が 65.4% に対して、陰性群では 75.0% と、無増悪生存率と同様に有意に予後が良好であっ

た(p<0.004)。

図 5 Overall survival of non-metastatic clear cell renal cell carcinoma patients with and without serum soluble B7-H4



腎細胞癌患者の予後に影響する因子の同定

腎細胞癌患者の無増悪生存率に影響を与える因子として、血清中の可溶性 B7-H4 の有無に加えて、年齢、性別、病理所見として Grade、T stage、末梢血の好中球数を単変量解析にて解析した。表 1 に示すように、腎癌細胞の Grade と血清中の可溶性 B7-H4 の有無において有意差を認めた。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、血清中の可溶性 B7-H4 の有無のみが無増悪生存率に影響を与えると因子として有意差を認めた。

表 1 Univariate and Multivariate analyses of risk factors predicting progression free survival in patients with renal cancer

Variable	Cutoff	Univariate		Multivariate	
		HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Age	≤65 vs >65	-0.102 (-0.508 - 0.292)	0.613	0.054 (-0.382 - 0.481)	0.806
Gender	Male vs Female	-0.232 (-0.626 - 0.175)	0.246	-0.336 (-0.761 - 0.094)	0.124
Grade	G1-2 vs G3-4	-0.499 (-0.954 - 0.053)	0.039	0.057 (-0.644 - 0.838)	0.879
T stage	T1-2 vs T3-4	-0.316 (-0.747 - 0.190)	0.171	-0.535 (-1.25 - 0.201)	0.151
Preoperative neutrophil count	≤8000 vs >8000	-0.480 (-0.964 - 0.136)	0.068	-0.248 (-0.734 - 0.32)	0.365
Serum soluble B7-H4	Negative vs Positive	-0.797 (-1.41 - 0.314)	0.001	-0.949 (-1.59 - 0.316)	0.002

同様に、全生存率においても解析した。表 2 に示すように、腎癌細胞の Grade、T stage、血清中の可溶性 B7-H4 の有無において有意差を認めた。次に、全ての因子を用いて、多変量解析を施行したところ、血清中の可溶性 B7-H4 の有無のみが全生存率に影響を与えると因子として有意差を認めた。

表 2 Univariate and Multivariate analyses of risk factors predicting overall survival in patients with renal cancer

Variable	Cutoff	Univariate		Multivariate	
		HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Age	≤65 vs >65	-0.290 (-0.787 - 0.167)	0.218	-0.076 (-0.608 - 0.431)	0.771
Gender	Male vs Female	-0.638 (-1.55 - 0.288)	0.159	-0.481 (-0.997 - 0.024)	0.062
Grade	G1-2 vs G3-4	-0.837 (-1.31 - 0.312)	0.0002	-0.311 (-1.07 - 0.492)	0.442
T stage	T1-2 vs T3-4	-0.603 (-1.06 - 0.104)	0.008	-0.625 (-1.39 - 0.148)	0.112
Preoperative neutrophil count	≤8000 vs >8000	-0.501 (-1.06 - 0.231)	0.10	-0.521 (-1.13 - 0.163)	0.123
Serum soluble B7-H4	Negative vs Positive	-0.834 (-1.57 - 0.275)	0.004	-0.868 (-1.72 - 0.177)	0.018

マウス腎細胞株を用いた B7-H4 の解析

図6に示した膜型 B7-H4 を発現したマウス腎細胞癌株を用いて解析した。図7に示した可溶型 B7-H4 を分泌する、同じ腎細胞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-H4 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、可溶型 B7-H4 の作用を解析することは出来なかった。

図6 フローサイトメトリー

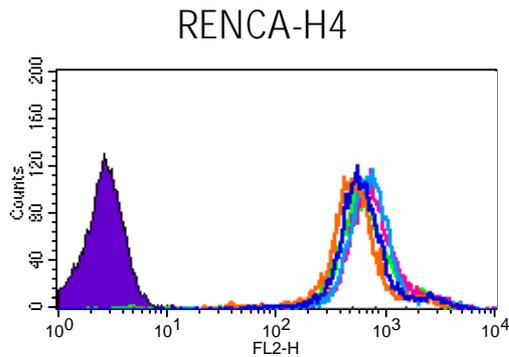
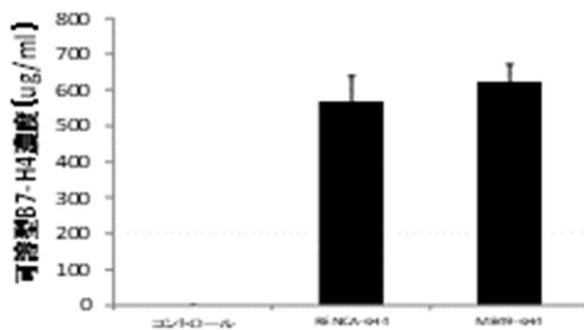


図7 可溶型 B7-H4



成果のまとめ

血清中の可溶型 B7-H4 濃度は腎細胞癌患者において、健康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が示唆された。また、可溶型 B7-H4 は、非転移性腎細胞癌患者の無増悪生存率と全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が示唆された。

また、マウスの解析において、膜型 B7-H4 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。一方、腎細胞癌患者において可溶型 B7-H4 濃度は末梢血中の好中球数と正の相関を認めた。近年、進行癌における癌の微小環境の研究が注目を集め、進行している。これらの研究で、好中球を含めた骨髄系の細胞が、細胞障害性 T 細胞を抑制し癌の増殖に有利に作用していることが示されている。

可溶型 B7-H4 と好中球への作用機序のさらなる詳細な解析により、癌細胞の免疫逃避のメカニズムが明らかになる可能性がある。

このように B7-H4 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1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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） https://doi.org/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

〔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	東 剛司 (Azuma Takeshi) (50719854)	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 (82812)	
研究分担者	長瀬 泰 (Nagase Yasushi) (60221462)	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・非常勤医員 (82812)	削除：2017年5月9日
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)	