

Expression of B7-H3 which is a potential factor of tumor  
immune evasion in combination with the number of  
regulatory T cells affects against recurrence free  
survival in breast cancer patients

(乳癌腫瘍における B7-H3 発現と制御性 T 細胞の検討)

氏名 前田 訓子

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻

消化器・腫瘍外科学分野

博士後期課程

平成 26 年 1 月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	4
3. 目的	5
4. 方法	5
5. 結果	8
6. 考察	10
7. 結語	13
8. 謝辭	13
9. 参考文献	14

## 1. 要旨

近年、腫瘍周囲の微小環境において、腫瘍を標的とする活性化 T 細胞を阻害する因子が注目されている。B7-H3 は B7 superfamily に属する免疫調節リガンドの一つであり、T 細胞の調節において共刺激もしくは共阻害因子として免疫応答に重要な役割を担っている。しかしながら、B7-H3 のレセプターやその機構は不明な点が多い。制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) は広く抗腫瘍免疫に関わる負の因子として知られている。今回、乳癌腫瘍における B7-H3 発現と腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte; TIL) 内の制御性 T 細胞の発現を調べ、予後や臨床病理学的因子について検討を行った。

90 例の乳癌腫瘍のパラフィン包埋標本を用い、B7-H3 と制御性 T 細胞のマスタ一遺伝子である Foxp3 の免疫染色を施行した。B7-H3 の評価については、染色強度と染色陽性細胞の割合にてスコア化を行い、B7-H3 高発現群と B7-H3 低発現群に分類した。Foxp3 の評価は腫瘍浸潤リンパ球内の Foxp3 陽性細胞を計測し、比率にて Foxp3 陽性細胞比率が高い群と低い群に分類して評価を行った。

B7-H3 高発現群の無再発生存期間は B7-H3 低発現群に比べ有意に短く、Foxp3 陽性細胞比率が高い群の無再発生存期間は Foxp3 陽性細胞比率の低い群に比べ有意に短かった。多変量解析では B7-H3 が無再発生存に与える独立した因子となった。B7-H3 の発現ならびに TIL 内の Foxp3 陽性細胞の比率別に分けて検討したところ、B7-H3 高発現および Foxp3 陽性細胞比率が高い群は他の群に比べ有意に無再発生存率が低下していた。臨床病理学的因子との検討では、TIL 内 Foxp3 陽性細胞の比率が高い群は、腫瘍径 (>2cm)、リンパ節転移陽性、HER2 陽性、高い核グレードと有意に関連していた。B7-H3 発現はいずれの因子とも関連が認められなかった。B7-H3 発現と TIL 内 Foxp3 陽性細胞の比率との間に相関関係を認めなかった。

乳癌腫瘍における B7-H3 発現とその TIL 内 Foxp3 陽性細胞の発現は不良な予後を予測しうる有用なマーカーと考えられた。今回の検討では B7-H3 と Foxp3 発現に相関関係は認められなかったが、B7-H3 ならびに Foxp3 の高発現群の予後は不良であった。両者は直接の関係を認めないが、いずれも腫瘍の免疫逃避機

構に関与していると考えられた。

## 2. 背景

乳癌は近年増加しており、日本国内では女性の悪性腫瘍における死因の第 5 位となっている。乳癌においてもその増殖や抑制において腫瘍微小環境の解明が重要となっている。腫瘍微小環境において現在までの報告は腫瘍細胞と免疫エフェクター細胞との作用について着目したものが示されている。乳癌領域でも担癌患者での末梢血リンパ球の減少<sup>1,2</sup>や、制御性 T 細胞の増加など抗腫瘍免疫の抑制状態を示唆する報告がある<sup>3</sup>。

B7 family に属する B7-H3 は、T 細胞の活性化に関わる補助刺激/抑制分子である<sup>4</sup>。B7-H3 の受容体はいまだ同定されていないが、リガンド分子の結合では活性化 T リンパ球に発現することが示唆されている。機能に関しては T リンパ球の活性化を増強するという報告<sup>5</sup>と抑制する報告があり<sup>6</sup>、いまだ明らかになっていない部分が多い。B7-H3 はヒト癌細胞<sup>1,7-14</sup>に広く発現しており、抗腫瘍免疫に何らかの関与をしていることが考えられる。

乳癌における癌細胞の B7-H3 mRNA およびタンパク発現を検討した報告では、B7-H3 発現は腫瘍径、脈管浸潤、所属リンパ節転移ならびに病期と関連していた<sup>15</sup>。

制御性 T 細胞(Treg)は、免疫寛容において自己免疫疾患の抑制や抗腫瘍免疫に重要な役割を持っている。Treg は主に細胞障害性リンパ球の働きを抑制するとされている。Foxp3 は Treg の転写因子であり CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg における特異的分子マーカーであるとともに Treg のマスター遺伝子である<sup>16,17</sup>。担癌患者では制御性 T 細胞 (Treg) が末梢血<sup>18-20</sup>、リンパ節<sup>21,22</sup>、腫瘍組織<sup>20,23</sup>や腹水<sup>19</sup>に多く存在することが知られている。乳癌においても腫瘍組織内の Foxp3 発現は遠隔転移再発までの期間や全生存期間と関連があると報告されている<sup>24,25</sup>。

そこで我々は、乳癌原発腫瘍周囲の微小環境で抗腫瘍免疫に負の作用をもつ Treg と B7-H3 の発現および関連について検討した。

### 3. 目的

乳癌原発腫瘍周囲の微小環境において抗腫瘍免疫に大きな役割を持つ活性化 T リンパ球に作用する補因子 B7-H3 と抗腫瘍免疫に負の作用をもつ Treg の発現を検討し、これらの関連を検討することを目的とした。

### 4. 方法

#### 4-1. 対象と方法

浸潤性乳管癌の診断で、2003年4月から2007年3月に山口大学大学院 消化器・腫瘍外科学講座で外科的切除術を施行された90人の患者（全例女性、年齢中央値53歳）から得られた、90サンプルを検討した。検査プロトコルは、山口大学医学部の治験審査委員会(IRB)の許可を受け、事前に患者からも書面でのインフォームドコンセントを得た。全例が乳房温存手術（54例、60%）もしくは乳房切除術（36例、40%）に加え、センチネルリンパ節生検および腋窩リンパ節郭清を受けた。術前化学療法を行った症例は含まれていない。

全例において、臨床病理学的因子（腫瘍径、リンパ節転移の有無、脈管侵襲の有無、核グレード、ホルモン受容体、HER2発現）を検討した。88人（98%）の患者が術後に補助療法を受けており、化学療法単独が15人、内分泌治療単独が29人、化学療法と内分泌療法の両方が44人であった。観察期間の中央値は67か月（範囲は7.8か月から90.5か月）であり、13人の患者に再発を認めた。

#### 4-2. 免疫染色

原発腫瘍のパラフィン包埋切片（5 $\mu$ m）を用いて免疫染色を行った。

脱パラフィン処理後、エタノールで脱水し、抗原賦活処理として DAKO Target Retrieval Solution（pH 9; Dako, Glostrup Denmark）を用い、microwave で 95 $^{\circ}$ C、20 分間加熱した。その後、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。一次抗体は B7-H3 モノクローナル抗体（MAB1027; R&D Systems,

Minneapolis, MN) 400 倍希釈、Foxp3 モノクローナル抗体 (ab20034; Abcam, Cambridge, UK) 100 倍希釈、対照は抗ヒトマウス IgG1 モノクローナル抗体を用い、それぞれ 2 時間室温にて反応させた。染色は高分子デキストランポリマーに 2 次抗体とペルオキシダーゼをあらかじめ多数結合した試薬を 2 次抗体として用いる Envision Plus mouse/HRP system (Dako) を用いた。phosphate buffered saline (以下 PBS) で洗浄の後、Envision Plus mouse/HRP system 試薬を 30 分間反応させた。さらに PBS 洗浄の後、発色基質として DAB (3, 3'-diaminobenzidene) solution (Dako) を使用し 5 分間反応させた。後染色は Mayer のヘマトキシリン液で約 30 秒間行い、流水水洗の後、脱水、透徹後、封入し光学顕微鏡で観察した。

#### 4-3. B7-H3 発現の評価法

Loos らの報告をもとに、腫瘍細胞の染色強度ならびに染色陽性細胞割合にてスコアリングを行った<sup>12,26</sup>。染色強度のスコアは染色陰性または弱陽性をスコア 1、中等度陽性をスコア 2、強陽性をスコア 3 と分類した。染色陽性細胞割合のスコアは、腫瘍細胞の 33%未満陽性をスコア 1、33%以上 66%未満陽性をスコア 2、66%以上陽性をスコア 3 とした。染色強度のスコアと染色陽性細胞割合のスコアの積を B7-H3 染色スコアとして、スコア 3 以下を B7-H3 低発現群、スコア 4 以上を B7-H3 高発現群とした。

#### 4-4. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 中の Foxp3 陽性細胞の評価法

浸潤腫瘍内の Foxp3 陽性細胞と TIL の絶対数を目視にて計測した。使用機材は Olympus 社の AX70 光学顕微鏡ならびに DP70 CCD カメラを用い、モニタ画面に投影して計測した。計測範囲は  $0.0768\text{mm}^2/1$  視野であり、8 視野にて計測後、平均値を算出した。それぞれの切片での Foxp3 陽性細胞数と TIL 数の比を計算し、カットオフ値を中央値 (0.097) とし、Foxp3 高発現群と Foxp3 低発現群に分類した。

#### 4-5. 統計解析

2 群の比較は、 $\chi^2$  乗検定またはフィッシャーの正確確率検定法で行った。無再発生存 (DFS) 曲線は Kaplan-Meier 法を使用し、log-rank test にて検定した。多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いた。P 値は 0.05 以下を統計学的に有意であるとした。全ての統計解析は、Dr.SPSS for Windows version 12.0 ソフトウェアで行った。

### 5. 結果

#### 5-1. 乳癌腫瘍における B7-H3 の発現

B7-H3 の免疫組織化学染色の結果を Figure 1 に示す。B7-H3 は乳癌腫瘍細胞の細胞質が染色され、細胞質に B7-H3 タンパクの発現が認められた。7 サンプル (8%、Figure 1A) が染色陰性、弱陽性が 26 サンプル (29%、Figure 1B)、中等度陽性が 29 サンプル (32%、Figure 1C)、強陽性が 28 サンプル (31%、Figure 1D) であった。染色範囲も併せて判定し、B7-H3 染色スコアに基づき、58% (55 サンプル) が B7-H3 高発現群 (以下 B7-H3 high 群)、42% (33 サンプル) が B7-H3 低発現群 (以下 B7-H3 low 群) であった。Table 1 に示すように B7-H3 発現別に臨床病理学的因子との検討を行ったが、いずれの因子とも関連を認めなかった。

#### 5-2. 乳癌腫瘍浸潤リンパ球中における Foxp3 陽性細胞の発現

Foxp3 の免疫組織化学染色の結果を Figure 2 に示す。腫瘍浸潤リンパ球は腫瘍内部ではびまん性に広がるパターンを示し、腫瘍の辺縁に存在する場合はリンパ球数がより多く、リンパ集塊形成する傾向があった。Foxp3 高発現群が 43 サンプル (47%)、Foxp3 低発現群が 47 サンプル (53%) であった。Figure 2B は Foxp3 陽性細胞/TIL 低値群 (以下、Foxp3 low 群) の免疫組織化学染色の 1 例であり、Foxp3 陽性細胞と TIL の比は 0.032 であった。Foxp3 陽性細胞/TIL 高値群 (以下、Foxp3 high 群) を示した Figure 2C では、Foxp3 陽性細胞と TIL の比は 0.11 であった。これら 2 群と臨床病理学的因子を検討したものを Table 1 に示す。Foxp3 high 群では、リンパ節転移陽性例が多く、腫瘍径も大きく、核グレードが高く、

HER2 陽性例が有意に多かった。ホルモンレセプターや脈管浸潤の有無に関しては関連を認めなかった。

### 5-3. 乳癌腫瘍における B7-H3 の発現と予後との関連

B7-H3 の発現別での無再発生存曲線を Figure 3A に示す。B7-H3 高発現群では有意に無再発生存期間が短縮していた (P=0.0137; hazard ratio (HR), 0.2781; 95% confidence interval (CI), 0.1005-0.7696)。5 年間の無再発生存率は B7-H3 低発現群で 94.7%、B7-H3 高発現群で 76.3%であった。しかしながら、全生存との関連は認めなかった (5 年生存率; B7-H3 低発現群:100%、B7-H3 高発現群: 97.7%)。

### 5-4. 乳癌 TIL 中における Foxp3 陽性細胞比率と予後との関連

TIL 中の Foxp3 陽性細胞の比率別での無再発生存曲線を Figure 3B に示す。Foxp3 high 群は Foxp3 low 群に比べ有意に無再発生存期間が短かった (P=0.0368; HR, 0.2974; 95%CI, 0.09525-0.9286)。しかしながら全生存では有意差を認めなかった。

### 5-5. B7-H3 発現と Foxp3 陽性細胞比率によるサブグループでの解析

B7-H3 発現と TIL 中の Foxp3 陽性細胞比率別に B7-H3 low/Foxp3 low 群、B7-H3 low/Foxp3 high 群、B7-H3 high/Foxp3 low 群、B7-H3 high /Foxp3 high 群の 4 群に分類し、予後との検討を行った。これら 4 群の無再発生存曲線を Figure 3D に示す。B7-H3 high/Foxp3 high 群は B7-H3 low/Foxp3 low 群に比し、有意に無再発生存期間が短かった (P=0.001; HR, 0.1325; 95%CI, 0.0382-0.4596)。興味深いことに、観察期間中に B7-H3 low/Foxp3 low 群で再発をきたした患者を認めなかった。

### 5-6. 多変量解析を用いた無再発生存期間における予後因子の検討

腫瘍径、リンパ節転移の有無、ホルモンレセプター、HER2、核グレード、脈管侵襲の有無、B7-H3 発現、TIL 中の Foxp3 陽性細胞比率を共変量として、無再発生存期間での Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い、B7-H3 高発現が独立した予後因子と判定された (P=0.025; HR, 8.5; 95%CI, 1.233-24.269; Table



2)。

#### 5-7. B7-H3 発現と TIL 中の Foxp3 陽性細胞との関連

TIL 中の Foxp3 陽性細胞の比率を B7-H3 発現別に検討したが、関連を認めなかった (P=0.532, Mann-Whitney U test; Figure.3D)。

### 6. 考察

本研究では乳癌腫瘍における B7-H3 発現と TIL 内の Foxp3 陽性細胞の検討を行った。TIL 内 Foxp3 陽性細胞の比率が高い群は、より大きな腫瘍径、高い核グレード、リンパ節転移陽性、HER2 陽性との関連を認めた。このように Foxp3 陽性細胞の検討では臨床病理学的因子との関連を認めたが、B7-H3 ではこれら因子との関連を認めなかった。B7-H3 高発現群は B7-H3 低発現に比べ、また TIL 中の Foxp3 陽性細胞の比率が高い群は比率が低い群に比べ、それぞれに有意に無再発生存期間が短かったが、全生存には有意差を認めなかった。

B7-H3 発現と Foxp3 陽性細胞の比率別で予後を検討したところ、B7-H3 と Foxp3 の両方が多く発現している群で無再発生存期間が短く、いずれも低発現の群では今回の観察期間中に再発した患者を認めなかった。

近年、抗腫瘍免疫を活性化または阻害する補助分子 B7 family が注目されており、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、今回検討した B7-H3 などが属している。B7-H1 と B7-H2 は、B7 family の代表的なタンパク質であり、抗原提示細胞に発現している。しかし、B7-H1 と B7-H3 は様々な器官や抗原提示細胞に発現しており、これらの分子が潜在的に炎症部位の免疫モジュレーター的作用に関与しているとされる<sup>27,28</sup>。ヒト B7-H3 は、炎症性サイトカインによって樹状細胞と単球で誘発され、活性化 CD4+CD8+ T 細胞上に存在する未知のレセプターと結合すると考えられている<sup>5</sup>。このレセプターは他の B7 family タンパクが結合する CD28、CTLA-4、PD-1、ICOS34 とは異なるものとされている。B7-H3 は優先的に Th1 細胞を介した免疫応答をダウンレギュレートすることにより抑制制御因子とし

て作用すると報告された<sup>27</sup>。一方、in vitro での実験でヒト B7-H3 が T 細胞受容体を介した T 細胞増殖、INF -  $\gamma$  の産生および細胞障害性 T 細胞の増殖に作用したことで、B7-H3 が細胞障害性 T 細胞の活性化を促進する因子としての報告もある<sup>5</sup>。

B7-H3 は乳癌<sup>15</sup>、前立腺癌<sup>10,29</sup>、非小細胞肺癌<sup>8</sup>、膵癌<sup>11,12</sup>、胃癌<sup>9,30</sup>、子宮内膜癌<sup>31</sup>、大腸癌<sup>14</sup> など、さまざまな悪性腫瘍で認められている。乳癌での B7-H3 発現は所属リンパ節転移と関連していると報告されている<sup>15</sup>。Sun らは非小細胞肺癌での検討で B7-H3 発現とリンパ節転移との関連を述べており<sup>8</sup>、前立腺癌では B7-H3 高発現群は低発現群に比べ予後が不良であったことが報告されている<sup>10</sup>。本研究で B7-H3 高発現群が低発現群に比し、有意に無再発生存期間が短いことより、乳癌でも類似した作用をしている可能性があると考えられた。しかしながら、B7-H3 発現は臨床病理学的因子との関連を認めなかった。今後、B7-H3 の作用機序およびレセプターの更なる解明により、原発性乳癌に対する新規治療戦略の一つになる可能性が考えられた。

制御性 T 細胞 (Treg) は腫瘍微小環境に存在し、T 細胞増殖を妨げることで抗腫瘍免疫を抑制する負の因子として広く知られている。乳癌<sup>25</sup> 以外にも、肺癌<sup>32</sup>、膵癌<sup>18,33,34</sup>、卵巣癌<sup>35</sup> などのヒト悪性腫瘍において Treg が過剰に存在している状態が報告されている。乳癌 TIL 内における Treg の存在は予後不良因子と報告されている<sup>25</sup>。

Foxp3 は転写因子 Forkhead box family に属し CD4+CD25+Treg における特異的分子マーカーであると共に Treg 分化のマスター遺伝子である。Treg にはほかのサブセットもあるが、現時点では Foxp3 が Treg を示す最良のマーカーと考えられている<sup>36</sup>。Foxp3 陽性 Treg は乳癌術前化学療法の治療効果や予後不良因子に関わるとの報告がある。腫瘍辺縁に存在する Foxp3 陽性 Treg は化学療法に対する病理学的完全奏効と関連し、腫瘍内 Foxp3 陽性 Treg は全生存や無増悪生存と関連していた<sup>37</sup>。

我々の検討では、乳癌腫瘍で B7-H3 と Treg の発現に相関関係を認めなかったが、

いずれも予後不良にかかわることが示された。加えて、無再発生存において、B7-H3 高発現群かつ Treg 高発現群が他の群に比べ最も予後不良であった。B7-H3 低発現群かつ Treg 低発現群では観察期間内に再発をきたした患者を認めなかった。このことは、乳癌患者の予後予測において、B7-H3 および Foxp3 発現を組み合わせた指標がそれぞれ単独の発現での指標よりもより正確である可能性があると考えられる。一般的に乳癌は、比較的短期予後成績が良好な疾患とされているが、晩期に再発をきたすこともある。本研究での観察期間は中央値が 67 か月と 5 年は超過しているものの、晩期再発の指標とするためにはより長期の観察期間が必要であると考えられる。

本研究ではホルモンレセプター陽性の患者が全症例の 81%を占めていた。ホルモンレセプター陽性乳癌の晩期（5 年以降）再発の特徴として、局所や骨の病変が多く、その進行は比較的緩徐とされる<sup>38,39</sup>。また再発後の治療に一定期間奏効することが多いとされている。このことが、全生存での有意差を認めなかった理由の一つと考えられる。

現在、同じ B7 family の一員である B7-H1 (PD-L1) を阻害する抗 PD-L1 抗体による臨床試験が世界中で行われている。B7-H3 は B7-H1 と高い相同性をもつこと、低用量のシクロフォスファミド投与は Treg のダウンレギュレートに作用することが報告されており<sup>40</sup>、これらの分子を阻害する薬剤の開発は実現の可能性が高いと考えられる。

## 7. 結語

乳癌腫瘍における B7-H3 発現と腫瘍浸潤リンパ球における Treg 発現は予後不良因子となることが示された。比較的、病勢進行が緩徐な乳癌においても腫瘍細胞の B7-H3 発現や TIL 中の Treg 発現は予後を決定づける重要な因子の一つであることが示唆された。

## 8. 謝辞

本研究を遂行するに当たり直接指導いただきました消化器・腫瘍外科学 助教吉村清博士に感謝いたします。本研究遂行にあたりご指導、ご助言をいただきました消化器・腫瘍外科学 岡正朗教授に深謝いたします。

## 9. 参考文献

1. Sun X, Vale M, Leung E, Kanwar JR, Gupta R, Krissansen GW. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene therapy*. 2003;10(20):1728-1734.
2. Caras I, Grigorescu A, Stavaru C, et al. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(12):1146-1152.
3. Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, et al. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2004;11(3):328-339.
4. Zang X, Allison JP. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18 Pt 1):5271-5279.
5. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*. 2001;2(3):269-274.
6. Leitner J, Klauser C, Pickl WF, et al. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *European Journal of Immunology*. 2009;39(7):1754-1764.
7. Zang X, Sullivan PS, Soslow RA, et al. Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas. *Mod Pathol*. 2010;23(8):1104-1112.
8. Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006;53(2):143-151.
9. Wu CP, Jiang JT, Tan M, et al. Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(3):457-459.
10. Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, et al. B7-H3 ligand expression by prostate

- cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res.* 2007;67(16):7893-7900.
11. Yamato I, Sho M, Nomi T, et al. Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2009;101(10):1709-1716.
  12. Loos M, Hedderich DM, Ottenhausen M, et al. Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:463.
  13. Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-II3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5150-5157.
  14. Sun J, Chen LJ, Zhang GB, et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(8):1163-1171.
  15. Arigami T, Narita N, Mizuno R, et al. B7-h3 ligand expression by primary breast cancer and associated with regional nodal metastasis. *Ann Surg.* 2010;252(6):1044-1051.
  16. Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(11):889-899.
  17. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-1061.
  18. Liyanage UK, Goedegebuure PS, Moore TT, et al. Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother.* 2006;29(4):416-424.
  19. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+

- regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer*. 2003;98(5):1089-1099.
20. Miller AM, Lundberg K, Özenci V, et al. CD4+CD25high T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients. *The Journal of Immunology*. 2006;177(10):7398-7405.
  21. Viguiier M, Lemaître F, Verola O, et al. Foxp3 Expressing CD4+CD25high Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells. *The Journal of Immunology*. 2004;173(2):1444-1453.
  22. Kawaida H, Kono K, Takahashi A, et al. Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *The Journal of surgical research*. 2005;124(1):151-157.
  23. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T Cells in Tumors from Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Late-Stage Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 2001;61(12):4766-4772.
  24. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(11):1746-1752.
  25. Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(34):5373-5380.
  26. Erkan M, Kleeff J, Esposito I, et al. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis.

- Oncogene*. 2005;24(27):4421-4432.
27. Suh WK, Gajewska BU, Okada H, et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol*. 2003;4(9):899-906.
  28. Shin T, Yoshimura K, Shin T, et al. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2005;201(10):1531-1541.
  29. Yuan H, Wei X, Zhang G, Li C, Zhang X, Hou J. B7-H3 over expression in prostate cancer promotes tumor cell progression. *J Urol*. 2011;186(3):1093-1099.
  30. Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, Yanagita S, Ishigami S, Natsugoe S. B7-H3 expression in gastric cancer: a novel molecular blood marker for detecting circulating tumor cells. *Cancer Sci*. 2011;102(5):1019-1024.
  31. Brunner A, Hinterholzer S, Riss P, Heinze G, Brustmann H. Immunoeexpression of B7-H3 in endometrial cancer: relation to tumor T-cell infiltration and prognosis. *Gynecol Oncol*. 2012;124(1):105-111.
  32. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 2006;107(12):2866-2872.
  33. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2002;169(5):2756-2761.
  34. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+



regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5423-5434.

35. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942-949.
36. Generali D, Bates G, Berruti A, et al. Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):1046-1051.
37. West NR, Kost SE, Martin SD, et al. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(1):155-162.
38. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005;23(29):7350-7360.
39. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2009;101(10):736-750.
40. Yoshimura K, Laird LS, Chia CY, et al. Live attenuated *Listeria monocytogenes* effectively treats hepatic colorectal cancer metastases and is strongly enhanced by depletion of regulatory T cells. *Cancer Res.* 2007;67(20):10058-10066.

**Table 1.** 乳癌腫瘍におけるB7-H3発現ならびにTIL内Foxp3陽性細胞の比率別  
と臨床病理学的因子との関連

Clinical parameters	cases	Foxp3-positive cell /TIL			B7-H3 expression		
		Low	High	<i>P</i> * value	Low	High	<i>P</i> * value
<b>Age</b>							
≤ 50	38	21(23.3)	17(18.9)	0.673	12(13.3)	26(28.9)	0.641
> 50	52	26(28.9)	26(28.9)		26(28.9)	26(28.9)	
<b>Tumor size(cm)</b>							
≤ 2cm	40	28(31.1)	12(13.3)	<b>0.003</b>	17(18.9)	23(25.6)	1.000
> 2cm	50	19(21.1)	31(34.4)		21(23.3)	29(32.2)	
<b>Nodal metastasis</b>							
Without	49	37(41.1)	21(13.3)	<b>&lt;0.001</b>	23(25.6)	26(28.9)	0.393
With	41	10(11.1)	31(34.4)		15(16.7)	26(28.9)	
<b>Hormone receptor</b>							
Positive	73	41(45.6)	32(35.6)	0.178	28(31.1)	45(50.0)	0.173
Negative	17	6(6.7)	11(12.2)		10(11.1)	7(7.8)	
<b>HER2</b>							
Positive	40	13(14.4)	27(30.0)	<b>0.001</b>	18(20.0)	22(24.4)	0.672
Negative	50	34(37.8)	16(17.8)		20(22.2)	30(33.3)	
<b>Nuclear grade</b>							
Low(0,1)	34	25(27.8)	9(10.0)	<b>0.002</b>	17(18.9)	17(18.9)	0.277
High(2,3)	56	22(24.4)	34(37.8)		21(23.3)	35(38.9)	
<b>Vascular invasion</b>							
Positive	58	32(35.6)	26(28.9)	0.451	24(26.7)	34(37.8)	0.828
Negative	32	15(16.7)	17(18.9)		14(15.6)	18(20.0)	

$\chi^2$  検定を行った。

**Table 2.** 無再発生存における多変量解析

Variable	Hazard Ratio	95% CI	P*
B7-H3 expression (high vs low)	5.471	1.233-24.269	0.025
Foxp3-positive cell in TIL (high vs low)	3.416	0.929-12.564	0.065
Lymphovascular invasion (+ve vs -ve)	5.405	0.670-43.588	0.113
Tumor size ( $\leq 2$ cm vs $> 2$ cm)	1.798	0.449-7.199	0.407
Nodal status (+ve vs -ve)	1.588	0.468-5.390	0.458
Nuclear grade (grade 1 vs grade 2,3)	0.669	0.105-4.259	0.671
Hormone receptor (+ve vs -ve)	0.779	0.192-3.161	0.726
HER2 (+ve vs -ve)	1.070	0.351-3.260	0.905

腫瘍径、リンパ節転移の有無、ホルモンレセプター、HER2、核グレード、脈管侵襲の有無、B7-H3発現、TIL中のFoxp3陽性細胞比率を共変量として、無再発生存期間でのCox比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。B7-H3高発現が独立した予後因子と判定された。

+ve : positive, -ve : negative, CI : confidence interval

\* Cox's proportional hazards regression analysis

## Figure

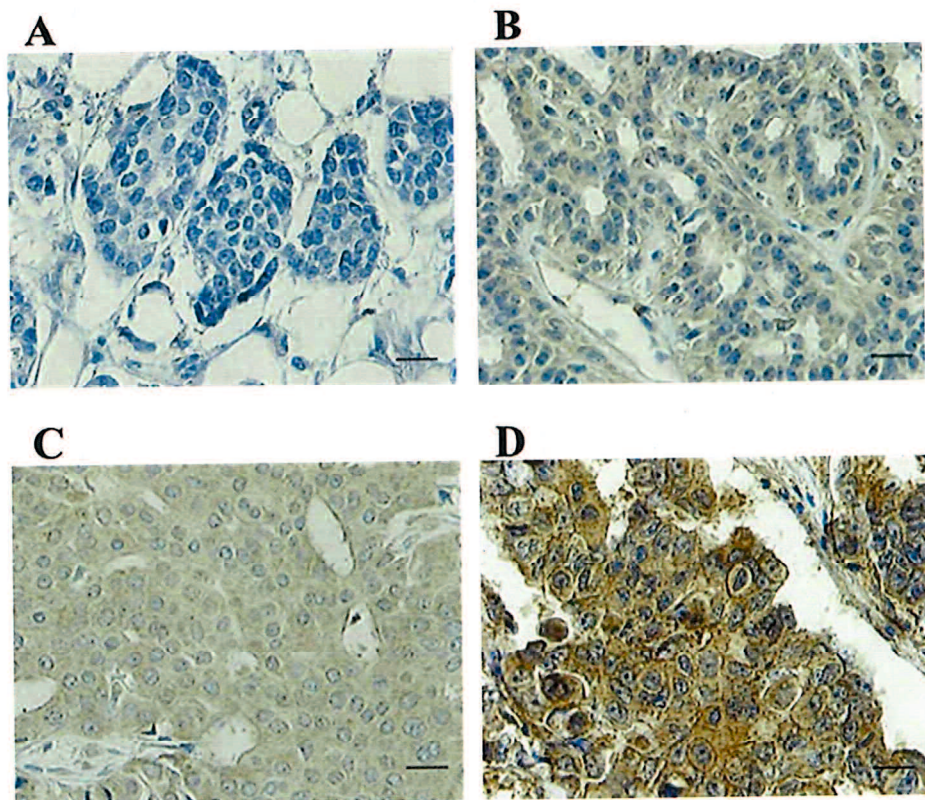


Figure 1 乳癌腫瘍における B7-H3 免疫組織化学染色

40倍拡大、(scale bar, 20  $\mu$ m)

(A) B7-H3発現なし (B7-H3スコア : 1、B7-H3 low)

(B) 染色強度は弱陽性、腫瘍細胞の66%以上が染色陽性

(染色スコア1、染色範囲スコア3でB7-H3スコア : 3、B7-H3 low)

(C) 染色強度は中等度陽性、腫瘍細胞の66%以上が染色陽性

(染色スコア2、染色範囲スコア3でB7-H3スコア : 6、B7-H3 high)

(D) 染色強度は強陽性、腫瘍細胞の66%以上が染色陽性

(染色スコア3、染色範囲スコア3でB7-H3スコア : 9、B7-H3 high)

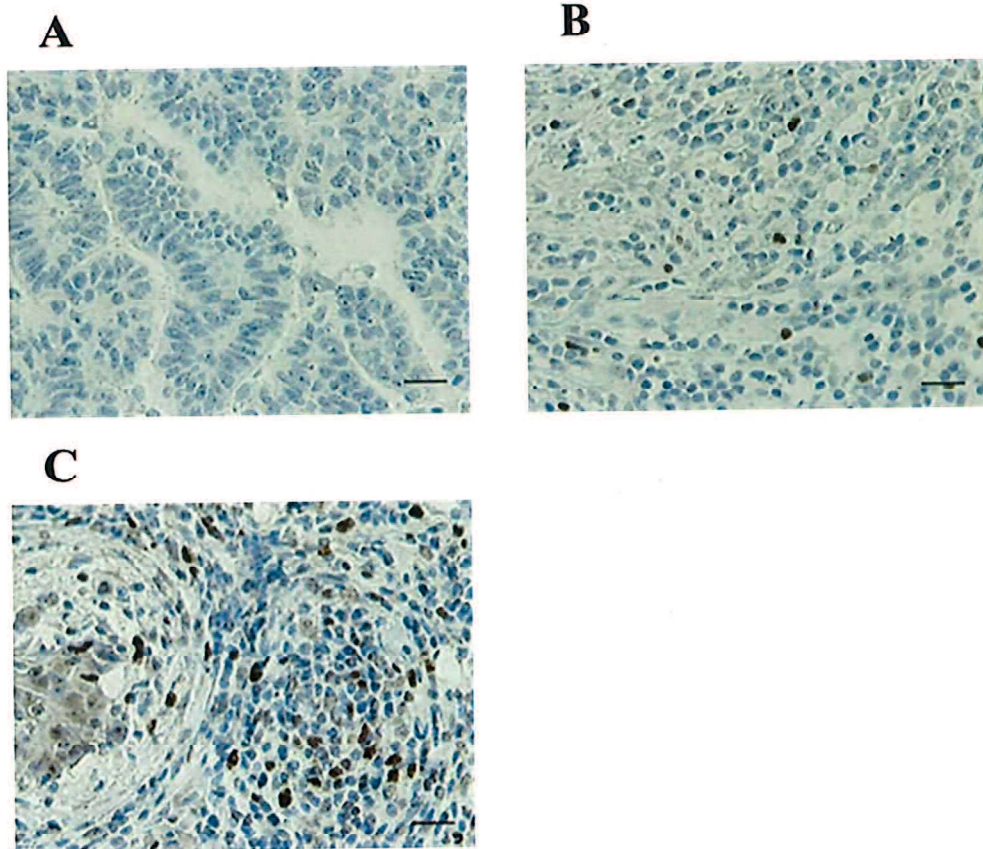


Figure 2 乳癌腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) におけるFoxp3免疫染色  
 TIL内のFoxp3陽性細胞の比率 (Foxp3陽性細胞/TIL) の中央値0.097をカットオフ  
 値とし、Foxp3-high と Foxp3-low の2群に分類した。

(A) コントロール

(B) Foxp3-low (Foxp3-positive cell/TIL; 0.032) .

(C) Foxp3-High (Foxp3-positive cell/TIL; 0.11)

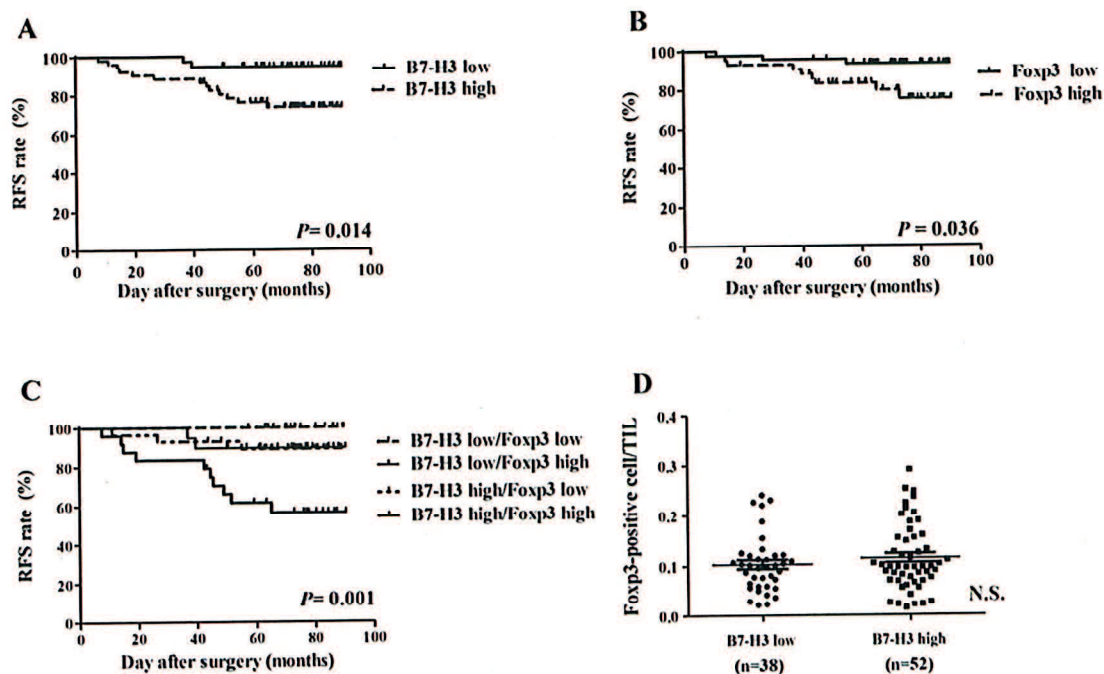


Figure 3

(A) B7-H3発現別での累積無再発生存率 (RFS)

B7-H3 high 群(n=52)はB7-H3 low群に比しRFSが有意に短かった (P=0.0137; HR, 0.2781; 95% confidence interval (CI), 0.1005-0.7696)。

(B) TIL内Fxp3陽性細胞比別での累積無再発生存率

Fxp3-high群 (n=43) はFxp3-low群に比べRFSが有意に短かった (P=0.0368; HR, 0.2974; 95% CI, 0.0953-0.929)。

(C) B7-H3発現とTIL内Fxp3陽性細胞比別に4群 (B7-H3 high/Fxp3 high; B7-H3 high/Fxp3 low; B7-H3 low/Fxp3 high; B7-H3 low/Fxp3 low) サブタイプでの累積無再発生存率

B7-H3 high/Fxp3 high 群がB7-H3 low/Fxp3 low群に比し、有意に無再発生存期間が短かった (P=0.0014; HR, 0.1325; 95%CI, 0.0382-0.4596)。

(D) TIL内のFoxp3陽性細胞の比率とB7-H3タンパク染色の関連 (Mann-Whitney U 検定)

B7-H3 high群とB7-H3 low群でTIL内Foxp3陽性細胞の比率に有意な関連を認めなかった (P=0.532)。