

公益財団法人 寺岡記念育英会

2019 年度 海外留学滞在費助成事業 研究活動報告書一覧

- 乾癬性関節炎患者の治療反応性を予測する新たなリンパ球細胞群の役割  
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 山村裕理子 … 1
- Damage-associated molecular patterns および補体を介した  
全身性エリテマトーデスの病態制御機構解明と新規治療開発  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 渡辺晴樹 … 3
- アルコール性肝疾患における Kupffer 細胞の中心的役割  
川崎医科大学 肝胆膵内科学 佐々木恭 … 5
- 尿路上皮癌における予後予測バイオマーカーの探索  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 泌尿器病態学 片山聡 … 7

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

(表題) 乾癬性関節炎患者の治療反応性を予測する新たなリンパ球細胞群の役割

(所属) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

(氏名) 山村 裕理子

(概要)

1. 渡航先

University of Glasgow, Institute of Infection, Immunity and Inflammation

2. 日程

令和3年3月27日渡航、令和4年4月現在研究継続中

3. 研究及びその成果の概要

令和3年3月より Iain McInnes 教授や Carl Goodyear 教授の御指導の下、乾癬性関節炎 (PsA) 患者における治療薬の反応性を見極めるバイオマーカー確立を目指した研究を行っている。留学先研究室では関節リウマチや PsA を初めとする炎症性関節疾患患者から採取した検体を豊富に有しており、患者検体を使用したバイオマーカー確立を目的とする研究をはじめ、基礎と臨床を結ぶ橋渡し研究が盛んに行われている。しかし、世界的な新型コロナウイルス流行拡大に伴い、感染拡大予防の観点から患者検体の収集が困難になったため、当初の研究計画を大幅に変更せざるを得なくなり、同機関に凍結保存されている PsA 患者の検体を使用して末梢性関節炎を伴う PsA 患者における治療薬の反応性を見極めるバイオマーカー確立を目指した研究を行った。

PsA ではインターロイキン (IL)-23/IL-17 経路が病態において中心的な役割を果たすことが示されている。近年従来型抗リウマチ薬に加えて抗体製剤、ヤヌスキナーゼ阻害薬、ホスホジエステラーゼ (PDE) 4 阻害薬など多数の治療薬が登場し、治療の進歩に伴って治療ガイドラインでは関節破壊や変形を予防するために早期の寛解導入が推奨されている。しかし、どの治療薬を選択するかははっきりとした指標はなく、臨床の現場では依然手探りの状態が続いている。最適と判断した治療薬を選択するも副作用や効果不十分のために治療薬を変更せざるを得ず、適切な治療薬にたどり着くまでに長期間を要する症例も多い。そのため、導入前に治療薬の有効性や安全性を判断できるバイオマーカーを利用し、治療薬を選択するプレジジョン・メディシンの確立が求められているが、PsA 患者の治療反応性を予測できるバイオマーカーは残念ながら存在しない。今回の派遣研究で健常ボランティアの末梢血単核球検体を使用して、多種類の細胞表面マーカーや細胞内サイトカインの検出・測定するフローサイトメトリーパネルを既製品に頼ることなく構築、確立した。このパネルを利用し、派遣先研究機関に保存されている PsA 患者検体を使用し、バイオマーカーになり得ると期待される細胞群について研究する予定であったが、派遣先機関に保存されている凍結検体が解凍直後不安定で、細胞刺激によって容易に死滅する上に、細胞凝集を形成して実験に活用できる細胞数が減少するといった二つの課題が生じたため、まずこの課題解決を図った。よって実際の患者検体を使用、研究する前に凍結保存検体の最適な解凍、利用方法を追求する予備実験を行った。

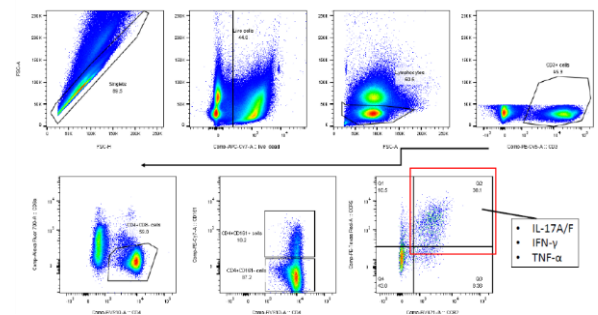
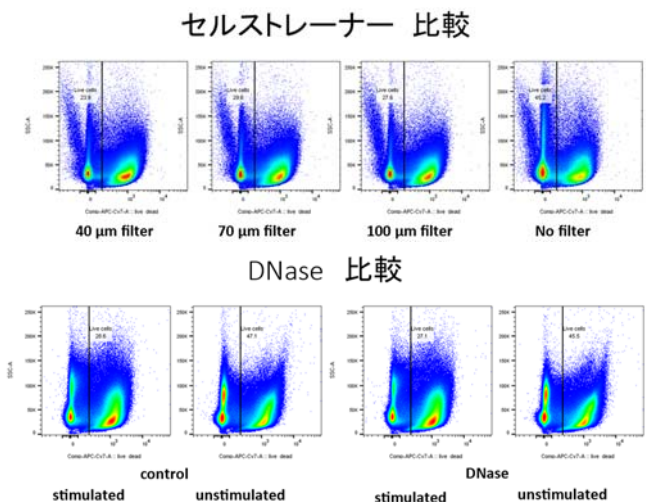
細胞の不安定性については 30 分程度培養した後に細胞刺激を行っていたが、刺激前の培養時間を延長することでの細胞の安定性確保を検討した。健常ボランティアから得られた末梢血単核球を 1 週間から 1 ヶ月程度凍結保存した後に、細胞のバイアルを 37 度の水浴で素早く融解し、RPMI 培養液に混合、凍結保存剤を除去した後、2 時間あるいは一晩 RPMI 培養液中に 37 度 5%炭酸ガスインキュベーターで培養した。培養後、PMA およびイオノマイシンで 4 時間程度刺激後、フローサイトメトリー染色を行い、生細胞/全細胞率を比較した。結果、30 分刺激後の生細胞率は 20%程度であったが、2 時間/一晩いずれにおいても 40-80%程度と大きな改善が得ら

れたため、培養時間の延長が末梢血単核球解凍後の安定性確保に有用と考えられた。

細胞凝集の形成についてはフィルター透過あるいは DNase 投与での解消比較検討を行った。上記プロトコルで解凍・培養した末梢血単核球を 40  $\mu$ l、70  $\mu$ l、100  $\mu$ l のセルストレーナーに透過し、一晚 RPMI 培養液中に 37 度 5%炭酸ガスインキュベーターで培養した後に刺激、フローサイトメトリー染色を行い、細胞凝集の解消、細胞回復率の比較検討を行った。いずれのセルストレーナーに透過させた単核球も細胞凝集の解消が確認できたが、生細胞生存率が 10-20%程度低下したため、セルストレーナーの使用は適当でないと判断した。次に同様のプロトコルで解凍・培養した末梢血単核球に DNase を投与した後、一晚 RPMI 培養液中に 37 度 5%炭酸ガスインキュベーターで培養した後に刺激、フローサイトメトリー染色を行い、細胞凝集の解消、細胞回復率の比較検討を行った。結果、DNase 投与細胞群では細胞凝集が解消、細胞生存率も低下しなかったことから、細胞凝集の解消に DNase 投与が有用と考えられた。

これらの結果より、凍結細胞を融解、DNase を投与して細胞凝集を解消した上で二時間あるいは一晚培養した後に PMA およびイオノマイシンでの細胞刺激が最も融解細胞を安定化させ、細胞凝集も解消できると考えられた。よって、今後は同プロトコルを使用して治療抵抗性と診断、ホスホジエステラーゼ (PDE) 4 阻害薬を導入された PsA 患者から治療薬導入前後に採取・凍結保存した末梢血単核細胞を融解し、CD4+CD161+CCR2+CCR5+細胞比を測定、細胞比をはじめ、サイトカイン産生の治療前後による変化、健常者/PsA 患者および治療有効/無効における同細胞群の比率の違いを調べる予定である(フローサイトメトリーのゲーティングを右に示す)。PsA の病態の中心に位置づけられる IL-17 産生細胞は CD161 陽性 T 細胞から分化することが報告されており、PsA と同様 Th17 細胞が病態に関わるとされる小児発症多発性硬化症において CD4+CD161+T 細胞数が上昇しているほか、ケモカインレセプター 2 (CCR2) と CCR5 を併せて発現していることが報告されている。さらに、CCR2、CCR5 は炎症部位への細胞浸潤に関与していることも指摘されており、CD4+CD161+CCR2+CCR5+T 細胞が自己免疫性疾患の発症早期において病因として重要な T 細胞サブセットであることが示唆されている。また、PDE4 阻害薬は他の治療薬に比して副作用が少ないものの、効果については個人差が大きく、ガイドラインにおいては他剤の次点での導入が推奨されている。CD4+CD161+今回習得、構築したフローサイトメトリーパネルで測定した CD4+CD161+CCR2+CCR5+細胞比が、PDE4 阻害薬の導入が望ましい PsA 患者を判別するバイオマーカーとなりうると期待している。

新型コロナウイルス流行拡大に伴ってイギリス全土がロックダウンとなり、一時期派遣先研究室も休止するなど、渡航も危ぶまれる中での留学であった。研究室再開後も依然規制は厳しく、実験以外の業務の在宅勤務やマスク着用の義務づけ、部屋への入室可能人数の制限、新たな規制周知のための講習受講、Web ミーティングの徹底など、新たな技術の習得と同時にニューノーマルへの順応も求められた研究生生活であった。しかし、こうした厳しい規制の甲斐あって、イギリスは日本より遙かに高い感染状況ではあったが、研究室におけるクラスター発生はなく、パンデミック下においても安全に研究を継続するための大きな学びとなっている。



# (表題) Damage-associated molecular patterns および補体を介した 全身性エリテマトーデスの病態制御機構解明と新規治療開発

(所属) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

(氏名) 渡辺 晴樹

(概要)

## 1. 渡航先

Feinstein Institutes for Medical Research

## 2. 日程

2020年10月7日より研究開始。2021年10月現在研究継続中。

## 3. 研究及びその成果の概要

全身性エリテマトーデス (SLE)は自然免疫および獲得免疫の異常によって引き起こされる全身疾患で、本邦では指定難病とされており、2019年度の受療患者数は61,835人と免疫系疾患の中では最も多い。SLEは若年女性に多い疾患で、ステロイドや免疫抑制薬が用いられるようになり予後は改善したが、未だ病勢のコントロールが困難で腎不全や中枢神経障害など不可逆的な臓器障害に至る症例も存在し、生命の質の他、妊娠や出産などのライフイベントにも影響する。SLEの正確な発症機序は未だ不明であるが、遺伝要因と環境要因が組み合わさって抗DNA抗体などの自己抗体が産生され、抗体依存性に、あるいは免疫複合体として組織に沈着することで免疫を活性化し組織障害を引き起こすと考えられている。SLEではアポトーシスの処理異常が認められ、ウイルス感染や紫外線暴露などを契機として secondary necrosis に陥った細胞から核酸や非ヒストン核蛋白 high mobility group box 1 (HMGB1)などが細胞外に放出されると考えられる。HMGB1は通常は核内においてDNAと結合してその構造維持や転写に関わっているが、壊死細胞から受動的、あるいは炎症細胞から能動的に細胞外に放出され

To11様受容体 (TLR) や終末糖化産物受容体 (RAGE) などに結合し、細胞内シグナル伝達を介して炎症を惹起する damage-associated molecular patterns の1つである。傷害された細胞から放出された HMGB1 と核酸が結合し、細胞表面の RAGE を介して、エンドソームに運ばれ TLR により認識されることで、樹状細胞から I 型インターフェロン (IFN) の産生を促し、また自己反応性 B 細胞の活性化を通じて抗 DNA 抗体の産生を引き起こすことが SLE の前駆期の病態と考えられる。(図1、Watanabe H, Son M. The Immune Tolerance Role of the HMGB1-RAGE Axis. Cells 2021;10:564)。

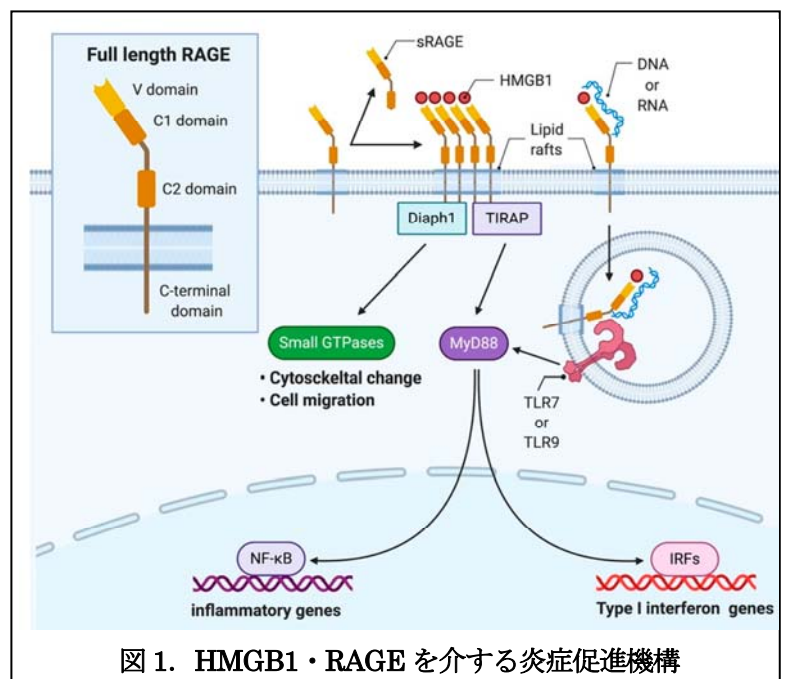
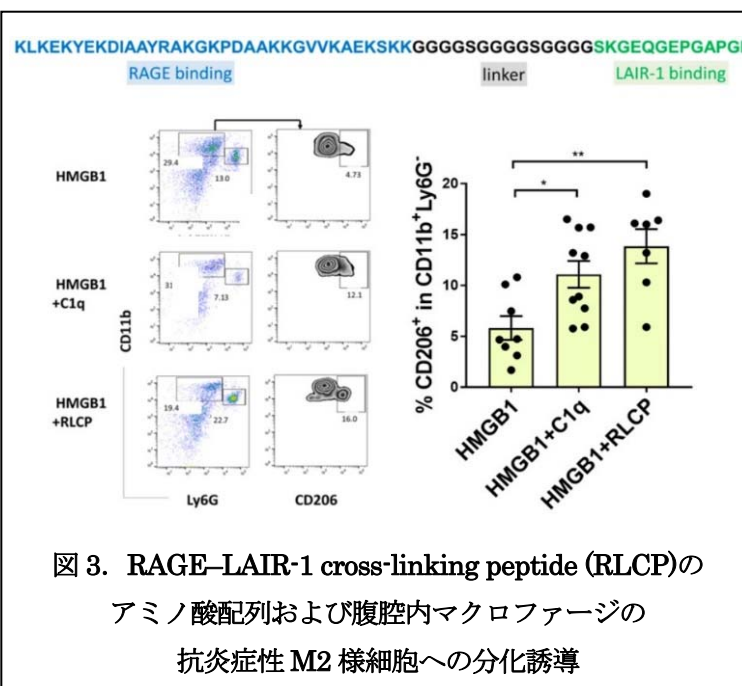
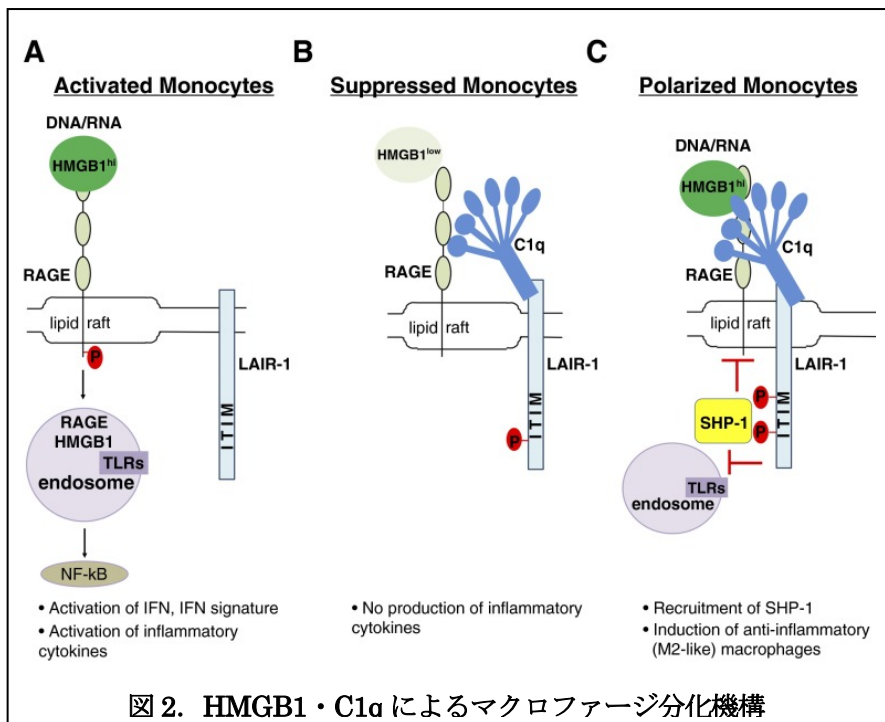


図1. HMGB1・RAGEを介する炎症促進機構

RAGE は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するマルチリガンドレセプターで HMGB1 の他、AGE や S100 蛋白など様々なリガンドが結合し、一般的には炎症を促進すると考えられてきた。一方渡航先の研究室では、HMGB1 刺激により単球が炎症促進性の M1 様マクロファージに分化する一方、HMGB1 および補体成分の 1 つである C1q で刺激すると免疫抑制性の M2 様マクロファージに分化することを明らかにした。この機序として HMGB、RAGE、C1q、および C1q 受容体の 1 つである leukocyte-

associated Ig-like receptor (LAIR)-1 が 4 量体を形成することを報告している (図 2、Son M, Porat A, He M, et al. C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. Blood 2016;128:2218-2228)。

HMGB1 と C1q によるマクロファージ分化機構における詳細な細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることを目的として、渡航後は主にヒト末梢血から単離した単球を用いて研究を行っている。HMGB1 が RAGE 依存性に単球の細胞質に内在化し、C1q はその内在化を抑制することに着目し、アクチン重合や形質膜の形態変化を制御する RhoGTPases やアクチンフィラメントについて検討を進めている。その中で HMGB1 による RhoGTPases の活性化が C1q により抑制されることを明らかにしており、その検証実験及びアクチン重合への影響をイメージングフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析している。今後は HMGB1 および C1q による単球刺激早期に RAGE や LAIR-1 の細胞質ドメインに誘導される分子を免疫沈降法などにより探索する予定である。また渡航先では C1q の LAIR-1 結合領域と HMGB1 の RAGE 結合領域を含むペプチドである RAGE-LAIR-1 cross-linking peptide (RLCP) を合成しており、HMGB1 および C1q による単球制御の分子メカニズムの解明や RLCP の臨床応用の可能性も検討している (図 3)。これまでに RLCP は LAIR-1 をリン酸化し、RAGE と LAIR-1 を近接させ、ヒト単球の HMGB1 刺激による IRF5 遺伝子発現を抑制し IL-10 遺伝子発現を上昇させることを明らかにしているが、今後ノックアウトマウスや SLE モデルマウスを用いて、RLCP の作用機序の検証や SLE に対する治療効果も明らかにしていく予定である。



## (表題) アルコール性肝疾患における Kupffer 細胞の中心的役割

(所属) 川崎医科大学 肝胆膵内科学

(氏名) 佐々木 恭

(概要)

### 1. 渡航先

University of Kansas Medical Center, Liver Center

### 2. 日程

2020年8月25日渡航、9月1日より研究開始。2021年9月現在研究継続中。

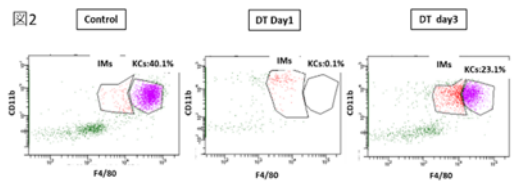
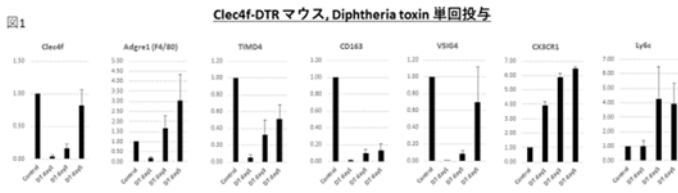
### 3. 研究及びその成果の概要

背景・目的:

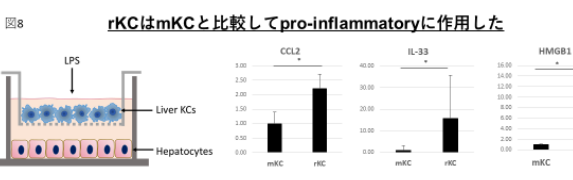
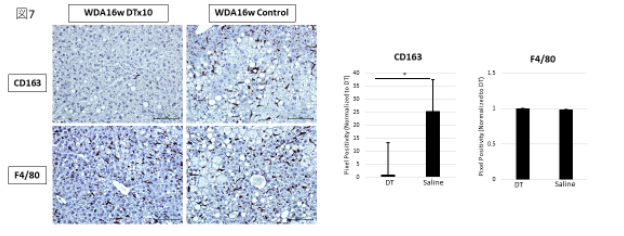
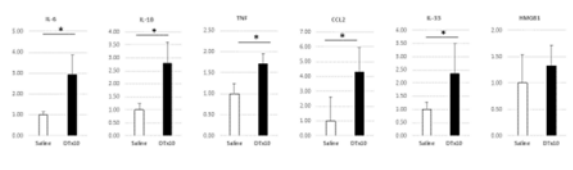
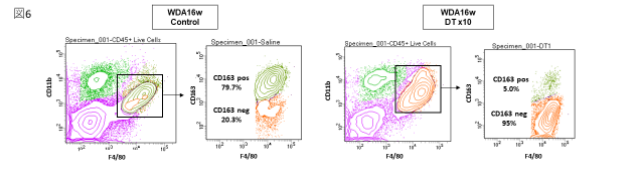
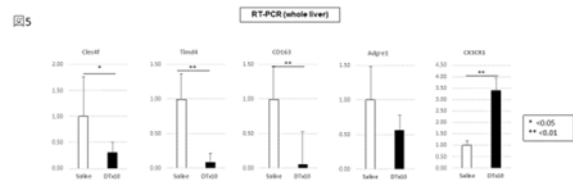
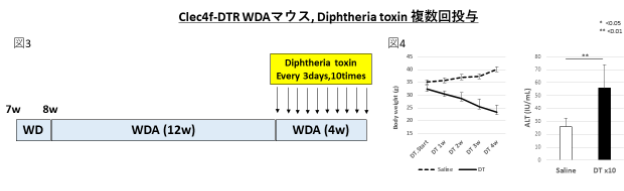
アルコール関連肝疾患 (ALD) は腸機能の変化が肝細胞の代謝変化と組み合わせたり、脂肪肝、炎症、および線維症などを引き起こす複雑な病態である。Kupffer 細胞は細菌や内皮細胞から信号を受け取り、肝細胞や星細胞の両方に損傷信号を送信するなど肝疾患において中心的な役割を果たす。卵黄嚢由来の embryonic mature Kupffer 細胞 (mKC) は正常な肝臓を支配するが、肝疾患では Kupffer 細胞様の単球由来のマクロファージ (Replacement KC : rKC) に部分的に置き換わる。アルコール関連肝疾患の以前の研究ではマクロファージ集団に多様性があることが示されているが、これらの細胞の機能と起源は不明である。この研究の目的は、アルコール関連脂肪性肝炎における肝マクロファージのサブタイプの同定と機能を同定することである。

方法: 7週齢の C57BL/6J マウスに高脂肪食と 10~20%のアルコール飲料水(WDA)を 16 週間与え慢性アルコール性脂肪性肝炎モデルを作成した。シングルセル RNA シーケンス、系統追跡、および Clec4f-cre-DTR マウス (The Jackson Laboratory) へ選択的ジフテリア毒素(DT)を腹腔内投与し、選択的に短期または長期的に Kupffer 細胞を除去しアルコール性脂肪性肝炎モデルマウスの Kupffer 細胞のダイナミクスおよび肝炎、肝線維化への影響について検討した。マウスの肝臓から門脈からの 2 段階コラゲナーゼ肝灌流法により、初代肝細胞および非実質肝細胞(NPCs)、Kupffer 細胞を単離し各実験系に用いた。

結果: 16 週間の WDA 食餌はマウスに脂肪性肝炎と細胞周囲線維症を引き起こした。CD45 陽性非実質肝細胞のシングルセル RNA-シーケンス解析により、Clec4f high/Timd4 high (embryonic mature KC: mKC)、Clec4f high/Timd4 low(replacement KC :rKC) ,Ly6C-high IM(Infiltrative macrophage)、Ly6C low-IM と、KC 遺伝子と IM 両方の遺伝子を発現する移行細胞(transition cells :TCs) に対応する 5 つの異なるマクロファージ集団が特定された。アルコール暴露により早期に KC の 40%が apoptosis を起こし、骨髄単球由来の Kupffer 細胞に置き換わっていた。Clec-DTR マウスに DT を投与すると、Clec4f、Timd4、CD163 などの発現が低下し(図 1)、フローサイトメトリーでは 1 日目に Kupffer 細胞は完全に消失したが(0.1%)、投与 3 日目には Kupffer 細胞は既に存在していた(23.1%)。(図 2)



Kupffer 細胞の長期的な枯渇による影響を確認する目的で、Clec-cre-DTR WDA mouse へ 1 か月間 DT を複数回投与すると (図 3)、WDA マウスでは体重が減量し、ALT の上昇 (図 4) と IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-33、HMGB1 および CCL-2 などの炎症性遺伝子の発現が有意に上昇したが (図 5)、normal Chow マウスではこれらの体重変化や炎症性変化は認められなかった。フローサイトメトリー (図 6) 及び免疫染色 (図 7) では、Control 群と同様に DT 群においても Kupffer 細胞は存在したが、DT 群の Kupffer 細胞の 95% が CD163 陰性であり置換された Kupffer 細胞が存在していることが判明した。



更に図 7 で示した rKC を正常マウスから単離した肝細胞と共培養すると、mKC と比較して rKC は肝細胞に対し有意に炎症性誘発性を示した。(図 8)

アルコール食は、真の常駐 Kupffer 細胞の喪失と、単球由来の代替物による Kupffer 細胞の置換を引き起こすことにより肝臓のマクロファージプロファイルを変化させる。アルコールの存在下では tKC は肝保護的な役割を果たすが、置換された Kupffer 細胞は肝臓の炎症を促進することが示唆された。保護的 KC サブセットを維持しながら、炎症誘発性 KC との比率や特性をターゲティングすることはアルコール性肝疾患の治療戦略となりえる可能性がある。

# 尿路上皮癌における予後予測バイオマーカーの探索

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 泌尿器病態学

片山 聡

(概要)

## 1. 渡航先

Medical University of Vienna, Department of Urology

## 2. 日程

2020/09/01-2021/09/30

## 3. 研究及びその成果の概要

(背景)

筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)に対する標準治療は、術前全身化学療法とそれに続く膀胱全摘+リンパ節郭清術であるが、十分な手術を行っても局所浸潤あるいはリンパ節転移のある患者においては約半数が5年以内に病勢進行し、死亡する。そのため、術前あるいは術後に急速な進行を示す可能性のある膀胱癌患者を同定するのは重要である。今回の研究では、間質細胞由来サイトカインであり MET 受容体の内因性リガンドである hepatocyte growth factor (HGF)に着目した。HGF はまた散乱因子として知られ、HGF 依存性あるいは非依存性に引き起こされる HGF/MET signaling pathway の活性化により、細胞の運動、増殖、血管新生、浸潤を促し、生存率を低下させることが知られている。肺癌や結腸癌においては、血中 HGF が生存率悪化と関連していることが報告されているが、膀胱癌においてはほとんどない。また MET に対する研究は進んでおり、主に MET や VEGFR2 を標的とするカボザンチニブが開発され、いくつかの HGF/MET 標的治療薬は臨床応用が試されている。膀胱癌においても、HGF のバイオマーカーを含めた役割に関する研究が進めば、治療への応用が行われることが期待される。本研究では、術前に測定した血中 HGF の予後因子としての関与について解明することを目的とした。

(方法)

血漿サンプルは術前絶食の後、手術当日の朝に Vacutainer CPT (Becton Dickinson Vacutainer Systems)にて集め、室温で遠心分離を行った(20min, 1,500×g)。血漿部分をすぐに凍結し、-80°Cの温度でポリプロピレンバイアルで保管した(Nalgene, Nalge Nunc)。血中 HGF 値の定量的な測定には、市販のイムノアッセイ(R&D Systems)を使用した。各サンプルは2つずつ測定、平均値を算出し解析を行った。測定間の変動係数はすべての症例において10%以下であった。血中 HGF 値は中央値に基づき、高 HGF 群と低 HGF 群に分けられた。

(結果)

本研究では、膀胱全摘+リンパ節郭清術を施行した非転移性 MIBC (cT2 以上)患者 565 名を対象とし解析を行った。高 HGF 群

Preoperative Cox regression model predicting RFS, OS, and CSS

	RFS			OS			CSS		
	Multivariable			Multivariable			Multivariable		
	HR	(95% CI)	P value	HR	(95% CI)	P value	HR	(95% CI)	P value
<b>Preoperative model</b>									
Age	1.01	1.00-1.03	0.13	1.04	1.03-1.06	<0.001	1.01	1.00-1.03	0.06
Sex (ref. male)	1.59	1.17-2.16	0.003	1.53	1.20-1.95	<0.001	1.74	1.27-2.37	<0.001
<b>Clinical stage (ref. cT2)</b>									
cT3/cT4	1.17	0.79-1.73	0.4	1.17	0.87-1.59	0.3	1.21	0.81-1.80	0.4
<b>HGF</b>	1.16	1.10-1.23	<0.001	1.09	1.04-1.14	<0.001	1.17	1.10-1.23	<0.001
<b>C-index</b>	without HGF	with HGF		without HGF	with HGF		without HGF	with HGF	
	0.57	0.63		0.62	0.63		0.59	0.64	



では低 HGF 群と比べ、より進行した病理ステージ ( $p=0.01$ )、脈管侵襲あり ( $p=0.03$ )、リンパ節転移あり ( $p<0.001$ ) と有意に関連していた。ロジスティック回帰分析による多変量解析においても、HGF 高値は有意にリンパ節転移や pT3/T4 膀胱癌との関連を示した。術前予後予測モデルに HGF を組み入れると、リンパ節転移、pT3/T4 膀胱癌の予測能は、それぞれ AUC で 7%、6% の増加を示した。Decision curve analysis (DCA) では、約半数の膀胱癌患者において HGF 測定を行うことが有用であることが示唆された。さらに、minimal clinically important difference (MCID) を用いて、術前化学療法を行う上で 18% の患者は HGF 測定により利益を得ることが示唆された。続けて生存への寄与を検討した。Cox 比例ハザードモデルに基づく多変量解析 (術前・術後の交絡因子で調整) において、血中 HGF は無再発生存率低下、全生存率低下、疾患特異生存率 (CSS) 低下のいずれにおいても有意に関連することが示された。しかしながら、術後の予後予測モデルに血中 HGF を組み入れたモデルでは、予測精度の向上にはつながらなかった。以上より、血中 HGF の上昇は予後不良を示す臨床病理学的因子と有意に関連し、術前予後予測モデルに組み入れることで局所進行性/転移性膀胱癌の予測能向上に寄与した。HGF/MET pathway 阻害による膀胱癌における新規治療の開発・適応を視野に、HGF の膀胱癌進展における関与を解明する研究を継続していく必要がある。

## ②非筋層浸潤性膀胱癌予後予測における Systemic immune-inflammation index (SII) の役割

(背景)

非筋層浸潤性膀胱癌 (NMIBC) は、予後良好なものから筋層浸潤癌に至るものまで heterogeneous な疾患である。さらに intermediate-risk NMIBC は、様々は術後補助療法が提案されており最適な治療選択には難渋する。膀胱癌は BCG 療法により良い炎症性・免疫性応答を引き起こし、治療効果を示す炎症性疾患である。その点に着目し、本研究では炎症と宿主の免疫機構を反映する SII の予後予測因子としての役割の解析を行った。

(方法)

SII (血小板×好中球/リンパ球比) は、経尿道的膀胱腫瘍切除術前 30 日以内に測定された。ROC 曲線・Youden-index を用いてカットオフ値 (580) を決定した。

(結果)

Cox 比例ハザードモデルに基づく多変量解

析において、術前 SII は無増悪生存率 (PFS) ・CSS と有意に関連していた。Intermediate-risk NMIBC によるサブグループ解析では、PFS ・CSS と有意に関連していた。予後予測モデルに SII を組み入れたモデルでは、PFS ・CSS 予測精度の向上を示した (C-index でそれぞれ 6%、12% の向上)。

NMIBC の術後補助療法療法の選択において、SII 測定は有用なツールとなりうることを示唆された。

上記研究に平行して、3 本の Systematic review & meta-analysis、4 本の原著論文を first author として執筆、投稿中である (3 編においては、以下のごとくすでに出版)。

<執筆論文>

1. **Katayama S** et al. Eur Urol Focus. 2021. 27:S2405-4569(21)00154-1.
2. **Katayama S** et al. World J Urol. 2021 DOI: 10.1007/s00345-021-03740-3.
3. **Katayama S** et al. Int J Clin Oncol. 2021. 27:S2405-4569(21)00154-1.

Multivariable Cox regression analysis in patients with intermediate-risk who did not receive intravesical BCG therapy

	OS			CSS			PFS			RFS		
	HR	(95% CI)	P value	HR	(95% CI)	P value	HR	(95% CI)	P value	HR	(95% CI)	P value
Age (ref. ≤70)												
>70	2.20	1.54-3.16	<0.001	1.11	0.34-3.64	0.86	1.89	0.86-4.15	0.11	1.52	1.11-2.08	0.009
Sex	0.72	0.46-1.14	0.16	0.66	0.18-2.37	0.54	0.52	0.20-1.37	0.19	0.65	0.45-0.95	0.027
Smoking	1.04	0.68-1.61	0.84	3.23	0.61-17.1	0.17	2.67	0.89-7.96	0.08	1.28	0.89-1.85	0.18
Number of tumor (ref. <8)												
≥5	1.28	0.56-2.94	0.57	5.62	1.14-27.8	0.039	3.56	1.20-10.6	0.022	1.17	0.65-2.12	0.61
Tumor size (ref. <3)												
≥5	1.05	0.72-1.54	0.80	1.13	0.36-3.54	0.57	1.17	0.52-2.63	0.70	2.09	1.52-2.87	<0.001
Prior recurrence rate												
1< recurrence/yr										1.36	0.67-2.78	0.39
Grade (ref. Grade1,2)												
Grade3	1.29	0.31-5.37	0.73	13.9	2.37-81.3	0.007	12.1	3.75-38.9	<0.001	1.10	0.44-2.77	0.84
SII	1.21	0.79-1.84	0.38	4.93	1.70-14.3	0.005	3.39	1.57-7.31	0.002	1.40	1.00-1.96	0.05
C-index without SII											0.61	0.63
C-index with SII											0.62	0.63