

博士論文

前立腺生検組織における DSGb5 糖鎖発現の臨床的意義について

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座・泌尿器科学分野

佐藤 真彦

略語	3
1 要約.....	5
2 研究背景	8
3 研究目的	12
4 研究方法	13
5 研究結果	21
6 考察.....	26
7 結論.....	33
8 謝辞.....	34
9 参考文献	35
10 図の説明.....	39
11 表のタイトル	43
12 図	44
13 表	53

略語

ADT : androgen deprivation therapy

BSA : bovine serum albumin

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DSGb5 : di-sialyl globopentaosil ceramide

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

GalNAcDSLc4 : N-acetyl galactosyl disialyl lactotetraosil

Gb3 : globotriosylceramide

Gb4 : globoside

HE : hematoxylin-eosin

IMRT : intensity modulated radiation therapy

IQR : interquartile range

MRI : magnetic resonance imaging

MSGb5 : mono-sialyl globopentaosil ceramide

NK : natural killer

PBS : phosphate-buffered saline

PSA : prostate specific antigen

PZ : peripheral zone

Siglec : sialic acid binding immunoglobulin like lectin

TLC : thin-layer chromatography

TRUS : transrectal ultrasound scan

1 要約

【背景】

我々の研究室では各種泌尿器癌における糖鎖発現と臨床像とを比較検討し、糖鎖発現の役割を明らかにしてきた。その中で、腎癌の糖脂質研究で新規に同定された糖脂質である DSGb5 は、腎癌細胞の運動能と浸潤能を亢進させる事や、Siglec7 を介して NK 細胞の細胞障害活性を抑制する事、転移性腎癌組織での発現が亢進している事が分かっている。また前立腺癌においても、前立腺癌パラフィン包埋標本に対する免疫染色の結果から、DSGb5 の高発現は前立腺全摘標本での脈管侵襲と前立腺全摘術後の再発と関連していることが分かっている。そこで本研究では、前立腺生検標本での DSGb5 発現が根治治療後の予後を予測できるのかについて研究する事とした。

【方法】

2005 年 1 月から 2011 年 12 月までに当科にて前立腺生検を行い前立腺癌と診断された後に前立腺全摘除術を行った 121 例と、2004 年 1 月から 2013 年 12 月までに前立腺生検を行い前立腺癌と診断された後に Intensity Modulated Radiation Therapy (IMRT)を行った 109 例を対象とした。対象症例の前立腺生検標本を抗 DSGb5 抗体である 5F3 を使用した免疫組織染色を行い、DSGb5 の発現レベルと前立腺全摘標本での病理学的因子との関連や、根治治療後の再発との関連について比較検討した。

【結果】

前立腺生検組織における DSGb5 発現レベルは、前立腺全摘標本での脈管侵襲と有意な相関が認められた($p=0.028$)。また前立腺全摘術後の生化学的再発との関連について検討したところ、単変量解析では前立腺全摘標本の Gleason Score 8 以上と切除断端陽性が生化学的再発と有意に相関しており($p=0.001$ 、 $p=0.008$)、多変量解析では前立腺全摘標本の Gleason Score 8 以上と切除断端陽性に加えて DSGb5 高発現も有意に生化学的再発に相関していた($p=0.004$ 、 $p=0.008$ 、 $p=0.024$)。また断端陰性の症例に限って手術前パラメーターと全摘後の生化学的再発との関連について検討したところ、DSGb5 高発現は単変量解析でも多変量解析でも前立腺全摘術後生化学的再発の有意な予測因子であった($p=0.006$ 、 $p=0.007$)。

前立腺生検組織における DSGb5 発現レベルと IMRT 後の再発との検討では、単変量解析では前立腺生検標本の Gleason Score 8 以上と DSGb5 高発現が、再発と有意に相関していた($p<0.001$ 、 $p=0.041$)。また Stepwise 法による多変量解析でも、前立腺生検標本の Gleason Score 8 以上と DSGb5 高発現が、再発と有意に相関していた($p<0.001$ 、 $p=0.048$)。

【考察】

前立腺全摘術症例での検討の結果、前立腺生検標本での DSGb5 の発現は、全摘標本での脈管侵襲と有意に相関していた。これは先行研究での前立腺全摘標本の DSGb5 発現と脈管侵襲が関連していた事を生検標本でも証明する結果となった。また、前立腺生

検標本での DSGb5 は、前立腺全摘術後の再発や IMRT 後の再発を独立して予測できる事が分かった。つまり DSGb5 が、癌細胞の細胞運動能を亢進して脈管侵襲を助長するだけでなく、Siglec7 を介して免疫細胞を抑制する事などの機能により、前立腺癌においても転移の多段階のメカニズムの一部に関わっている可能性が考えられる。DSGb5 によって前立腺癌に対する根治治療を行う前に治療後の再発のリスクが高い症例を判別することが可能であると考えられ、治療法を検討する際に有用であると考えられる。

【結論】

前立腺生検標本を用いて抗 DSGb5 抗体である 5F3 で免疫染色を行い、DSGb5 高発現が前立腺全摘術標本での脈管侵襲や、前立腺全摘術や放射線療法後の再発に有意に関連していることが分かった。すなわち、診断時の生検標本での DSGb5 発現により、根治治療後の予後を予測可能であることが示唆された。今後、治療決定の際に術後の再発予測などに応用していきたい。

2 研究背景

我が国の統計において、2017年の前立腺癌罹患数は年間91,215人であり男性における部位別罹患数の第1位、2018年の前立腺癌死亡数は年間12,250人で第6位であり、罹患数、死亡数ともに増加傾向にある¹。また、高齢化や食生活の欧米化により今後も増加していくと予想されている。

1970年代に前立腺癌の腫瘍マーカーである prostate specific antigen (PSA)が発見されて以来、前立腺癌の罹患数は増加している。また PSA 検診の普及に伴い、限局性前立腺癌の割合が増加し、進行癌は減少傾向にある²。転移のない限局性前立腺癌や局所進行性前立腺癌に対する治療方針を決定する際に、PSA や臨床病期(clinical T stage) や Gleason Score を用いたリスク分類が用いられており^{3,4}、手術療法、放射線療法、PSA 監視療法、局所治療などの治療法が選択されている。Gleason Score は顕微鏡で前立腺癌の組織形態を観察して、第1優勢パターンと第2優勢パターンを1から5のパターンに分類して、その数値の合計で決定される⁵。Gleason Score は値が高いほど癌の悪性度が高くなり、理論上 Gleason Score は2~10となるが実際は5以下の値は付けられないこととなっているため、6~10でスコア化される。しかし上記のリスク分類は、PSA は前立腺肥大症や前立腺炎などの良性疾患でも上昇しうる事⁶、clinical T stage は直腸診で決定されるために診断医による不一致が認められる事⁷、Gleason Score は病理医間での診断の不一致がある事⁸、などから完全ではない。すなわち、リスク分類で

高リスクと診断された患者でも予後が良好な症例は含まれていたり⁹、逆に低リスクと診断された患者でも予後が不良であったりする¹⁰。また中間リスクには様々な予後の症例が含まれている。このリスク分類の問題点を改善する目的で、近年世界的には前立腺癌の組織検体のゲノム解析によるリスク分類が商業的に使用できるようになってきている^{11 12}。しかし、未だ日本では保険収載されておらず、他のリスク分類や新しいバイオマーカーの開発が求められている。

糖鎖が脂質や蛋白に結合した糖脂質や糖蛋白等の複合糖質は、細胞間の相互認識や細胞外の分子の認識、発生、細胞運動や増殖、細胞内シグナリングなどにも関与しており、癌化によって変化して癌の浸潤や転移と関連がある事が知られており、バイオマーカーとして糖鎖の果たす役割が注目されている^{13 14 15}。

我々の研究室では糖鎖発現と臨床像とを比較検討し、各種泌尿器癌における糖鎖発現の役割を明らかにしてきた。斎藤らは、腎癌の糖脂質発現を調べて腎癌の転移巣では長鎖のガングリオシド(シアル酸を有する糖脂質)の発現が増加する事を認め、原発巣において転移巣と同様な糖鎖の発現パターンを示す症例では術後早期に転移を来す傾向が認められた¹⁶。またこのガングリオシドの構造解析を行い、mono-sialyl globopentaosil ceramide(MSGb5)、di-sialyl globopentaosil ceramide(DSGb5)¹⁷、N-acetyl galactosyl disialyl lactotetraosil ceramide(GalNAcDSLc4)を新規構造物として同定した¹⁸。次にこれらのガングリオシドに対するモノクローナル抗体 (RM1¹⁷、5F3¹⁹、RM2¹⁷) を作成

し(図 1)、腎癌凍結切片の免疫染色を施行したところ、原発巣に GalNAcDSLc4 の発現増加を認める腎癌では転移のリスクが高い事を示唆するデータが得られた²⁰。また、腎癌のパラフィン包埋手術標本に対する免疫染色でも DSGb5 の発現は静脈侵襲と術後再発に有意に相関しており、DSGb5 高発現の腎癌では早期に転移が認められた²¹。当教室で行ったヒト腎癌培養細胞を用いた研究においては、DSGb5 は NK 細胞表面に抑制性レセプターとして発現している siglec7 と結合して²²、NK 細胞の細胞障害活性を抑制する事や²³、DSGb5 が高発現している腎癌細胞では運動能や浸潤能が亢進する事が確認され²⁴、腎癌細胞における DSGb5 の発現は腎癌の進展・転移に有利な方向に関与している事を示唆する知見が得られている。

一方、当教室では前立腺癌と上記のガングリオシドの発現についても調べている。それによると、DSGb5 と同様のジシアロガングリオシド構造を持つ GalNAcDSLc4 は Gleason Score が高い前立腺癌で高発現しており前立腺全摘術後の生化学的再発との関連が見られる事²⁵ や、去勢抵抗性前立腺癌細胞では MSGb5 の発現が増加する事を示している(當麻武信博士東北大学学位論文)。また、前立腺癌のパラフィン包埋手術標本に対する免疫染色を行ったところ、DSGb5 の発現は前立腺全摘標本での脈管侵襲と相関が見られ、DSGb5 高発現患者では前立腺全摘術後の生化学的再発が有意に多く、Gleason Score とは独立した術後の生化学的再発の予測因子である事が判明した²⁶。

そこで本研究では、前立腺生検標本での DSGb5 発現が、全摘標本での病理組織学的

因子や根治的治療である手術や放射線照射後の再発を予測可能かについて、すなわち前立腺癌に対する治療方針を決定する時点で治療後の予後が予測できるのかについて研究する事とした。

3 研究目的

前立腺癌の治療を決定する上で重要なリスク評価に使用できるバイオマーカーとしての DSGb5 の可能性について研究を行う。初めに、前立腺全摘患者における生検標本での DSGb5 の発現の有無によって手術標本病理パラメーターやその後の予後予測が出来るかどうかについて調べる。次に、放射線治療症例における生検標本での DSGb5 の発現の有無によって放射線治療後の予後予測が出来るかどうかについて調べる。

4 研究方法

4.1 研究対象

前立腺全摘術を受けた患者においては、2005年1月から2011年12月までに当科にて前立腺生検を行い前立腺癌と診断された後に前立腺全摘除術を行った121例を対象とした。ホルモン療法や術後追加放射線照射などの併用療法を行った症例は除外した。癌が検出された生検組織が追加免疫染色などで再薄切されており再度の薄切が不可能であった1例と、再薄切の標本には癌が含まれていなかった4例の症例は除外した。評価出来た116例における計286本の生検標本を評価した。

放射線治療を行った患者においては、2004年1月から2013年12月までに当科にて前立腺生検を行い前立腺癌と診断された後に Intensity Modulated Radiation Therapy (IMRT)を行った109例を対象とした。前立腺のみにIMRTを行った症例とするため、骨盤内放射線照射などを併用した症例や三次元放射線治療(3D-CRT)や小線源治療を行った症例は除外した。癌が検出された生検組織が追加免疫染色などで再薄切されており再度の薄切が不可能であった3例の症例は除外した。評価出来た106例における計322本の生検標本を評価した。

I 前立腺生検の適応について

当科での前立腺生検の適応は、PSAが4.0 ng/mL以上、またはPSAが2.0~4.0 ng/mLでfree/total (f/t)比が12%以下、または直腸診陽性、または経直腸的超音波検査(TRUS)

で所見がある患者としている。

II 生検方法と生検検体の処理方法と病理診断について

前立腺生検は、経直腸的超音波ガイド下に 12 ヶ所の系統的生検（初回生検では図 2 a のように Hodge らが提唱した 6 ヶ所生検²⁷に辺縁域外側の 4 ヶ所と尖部腹側の 2 ヶ所を加えた 12 ヶ所生検、2 回目生検では図 2 b のように Hodge らの 6 ヶ所生検に尖部の 6 ヶ所を加えた 12 ヶ所生検²⁸）と MRI や TRUS や直腸診などで癌が疑われる部位があれば追加で生検を行った。生検組織は、前立腺被膜と反対側に墨でマーキングを行い、腫瘍の局在判定の一助となるようにした。前立腺生検組織は 10%中性ホルムアルデヒドで固定した後にパラフィンに包埋した。病理診断は、当院の病理医(M.W.)により前立腺癌取扱い規約第 4 版に基づいて行われた。

III 前立腺全摘標本の病理診断について

全ての前立腺全摘標本は、5mm の Step section を作成して、マッピング図を作成した。癌が認められた部分の輪郭を取り、連続する切片で同じ部位にあるものを同一の癌とし、それぞれの癌について病理診断を行った。全摘標本の病理診断も生検病理診断同様に当院の病理医(M.W.)により前立腺癌取扱い規約第 4 版に基づいて行われた。

IV 限局性前立腺癌に対する根治治療について

当院での限局性前立腺癌に対する根治治療としては、前立腺全摘除術や IMRT、三次元放射線治療（3D-CRT）、小線源治療などがある。治療法の選択については、主治医と

患者との話合いで決めているが、当院ではリスク分類に基づいて低リスクでは小線源治療、低～中リスクでは手術療法、高リスクではホルモン療法併用の IMRT が勧められてきた。

今回の検討では、前述のように前立腺全摘術症例と IMRT 症例について検討した。前立腺全摘術は、低リスクと一部の中リスク症例ではリンパ節郭清は行わずに前立腺全摘のみを行っており、残りの中リスク・高リスク症例では骨盤内リンパ節郭清を伴う前立腺全摘を行った。IMRT は 3D-CRT と比べて照射範囲の中で放射線線量に強弱を付けることが出来るため、前立腺には治療に十分な量の放射線量を当てながら膀胱や直腸などの周囲臓器に当たる放射線量を低下させることが出来る放射線照射方法である。

IMRT 症例は前立腺のみに 76～80Gy の放射線照射を行った。また、低リスクでは IMRT 単独での治療を行い、中リスク・高リスク症例ではホルモン療法の併用を行った。ホルモン療法の併用期間については、現在の標準としては中リスク症例では IMRT 前半年間のホルモン療法を、高リスク症例では IMRT 前半年間に加えて IMRT 後約 2 年間のホルモン療法を行っているが、今回の検討症例では IMRT 前に骨盤内リンパ節郭清術を行い、リンパ節転移がなければ IMRT 後のホルモン療法は省略できるプロトコルであった。

4.2 細胞株と細胞培養

腎癌培養細胞株である ACHN は、腎癌肺転移をきたした 22 歳白人男性の癌性胸水

から確立された細胞株であり、大日本製薬より購入した。本研究において ACHN には DSGb5 が高発現していることを確認して使用した²³。細胞培養は、DMEM(Gibco-Invitrogen, CA, USA)に 10%FBS を加えた培地を用いて 37℃、水蒸気飽和、5%CO₂ 存在下で培養した。

4.3 抗体

抗体は以下の抗体を使用した。

Mouse anti-DSGb5 IgM antibody (5F3)は当教室で作成した。5F3 は MSGb5、Gb4、Gb3 などのグロボシリーズ糖脂質及び DSGb5 以外のジシアロシルガングリオシドとは結合せず DSGb5 のみに結合特異性を持つ抗体である事が TLC 免疫染色及び ELISA にて示されている¹⁹。DSGb5 は、MSGb5 の末端から 2 個目の糖鎖(GalNac)に α 2-6 でシアル酸が結合している糖鎖構造を持つものであるが、5F3 が MSGb5 と結合しないことから、DSGb5 の 2 個のシアル酸を含めた末端 7 糖の立体構造をエピトープとして特異的に認識していると推察されている。ヒストファイン抗高分子サイトケラチンモノクローナル抗体(34 β E12)は Nichirei 社(Tokyo, Japan)、normal mouse IgM は Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)、2 次抗体としての抗マウス標識ポリマー EnVision System-HRP Labelled Polymer は Dako Japan (Tokyo, Japan)、Fluorescein-Labeled Affinity Purified Antibody To Mouse IgG+IgM (H+L)は KPL (MD, USA)より購入した。

4.4 フローサイトメトリー

ACHN 細胞の培養ディッシュに Trypsin-EDTA を加えて細胞を剥離した後、細胞数が $2 \times 10^5/\text{mL}$ 以上になるように 1%BSA 入りの PBS で懸濁し 96well プレートに 100 μL ずつ分注した。1200rpm、4°C で 3 分間遠心した後に上清を除去して 1%BSA 入りの PBS で洗浄した。次に 5F3 を 4°C、1 時間反応させてから、2 次抗体の Fluorescein-Labeled Affinity Purified Antibody To Mouse IgG+IgM を 4°C、1 時間反応させて CytoFLEX LX (Beckman Coulter, USA) を用いて Flow Cytometry を行い抗体活性の確認を行った。陰性コントロールは一次抗体に normal mouse IgM を使用した。

4.5 前立腺生検標本の免疫染色方法

前立腺癌の診断時に採取した前立腺針生検標本のホルマリン固定パラフィンブロックを 4 μm の厚さで薄切した後に HE 染色と免疫染色を行った。今回の検討では病理医の診断で癌が認められた生検標本全てに対して免疫染色を施行したのではなく、図 3 のごとく前立腺を 6 つの領域(I - 右葉尖部背側、II - 右葉尖部腹側、III - 右葉底部、IV - 左葉尖部背側、V - 左葉尖部腹側、VI - 左葉底部)に分けて、それぞれの領域の中で癌を検出した生検標本のうち癌長が最も長い標本 1 本を対象として免疫染色を行った。例えば、6 つの領域のうち 1 領域しか癌が検出されなかった場合は 1 生検標本のみを対象とし、6 つの領域のうち複数領域で癌が検出された場合はその全ての領域において最大癌長を含む生検標本のみを対象として免疫染色を施行した(最大 6 検体)。両葉の外側縁

と正中線の中間のラインで前立腺中央の位置で生検しているもの(図2の②⑤)は、検討する領域が多くなるように尖部もしくは底部として検討した(②は図3のIもしくはIII、⑤は図3のIVもしくはVI)。

免疫染色方法は、先行研究で行われた前立腺全摘パラフィン包埋標本に対する免疫染色方法と同様の方法で前立腺生検標本を免疫染色した²⁶。最初にキシレンで脱パラフィンを行った後にエタノールに入れてキシレンを取り除き、その後に0.3% H_2O_2 メタノールで10分間処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後抗原賦活化のために、5F3免疫染色ではDSGb5が脱シアル化しないように0.01Mクエン酸緩衝液(pH7.0)に浸して121°C、5分間のオートクレーブ処理を行い、34βE12免疫染色ではpH6.0の0.01Mクエン酸緩衝液に浸して121°C、5分間のオートクレーブ処理を行った。その後に一次抗体の5F3と34βE12を100μL滴下して、湿潤箱に入れて4°Cで一晩静置した。PBSで洗浄した後に、2次抗体の抗マウス標識ポリマーEnVision System-HRP Labelled Polymerと室温で30分間反応させ、EnVision Liquid DAB+Substrate-Chromogenを用いて3~5分反応させて発色させた。発色後にヘマトキシリンで核染色を行い、脱水、透徹、封入して標本を作製した。

4.6 染色性の評価

5F3免疫染色の判定は、2人の研究者により評価を行った。正常部と癌部の評価は、HE標本と34βE12免疫染色(正常腺管の基底細胞のみが染色される)を参考にした。染

色性の評価方法は、以前の報告では正常腺上皮細胞と比較して染色強度を陰性、弱陽性、陽性、強陽性(0, 1+, 2+, 3+)の4段階に分類したが²⁶、今回の検討では、図5に示すように、正常腺管の濃く染色される部分を強陽性(3+)、正常腺管の薄めの部分を陽性(2+)、基底細胞の染色性を陰性(0)とし、弱陽性(1+)は陰性(0)と陽性(2+)の間と定義した。陽性と強陽性(2+, 3+)をDSGb5高発現、陰性と弱陽性(0, 1+)をDSGb5低発現とした。症例としての評価は、評価に使用した生検標本が1本である症例ではその評価した生検標本での染色性(DSGb5高発現 or DSGb5低発現)を症例の評価とした。評価に使用した生検標本が2本以上ある症例では、その評価した生検標本において最も高いDSGb5発現強度を、その症例のDSGb5発現強度とした。

4.7 再発の定義

前立腺癌取扱い規約に基づいて再発を定義した。すなわち前立腺全摘術後の再発は、1ヵ月以上経過した時点のPSAが $<0.2\text{ng/mL}$ である場合に生化学的再発(PSA再発)なしとする。その後の経過で2~4週あけて測定したPSAが2回連続して 0.2ng/mL 以上となった場合は生化学的再発と判定し、初回の変化日を再発日と規定した。手術後一度もPSAが $<0.2\text{ng/mL}$ と下降しなかった場合は、手術日の時点での再発と判定した。IMRT後の再発は、照射後のPSA最低値(nadir)+ 2ng/mL 以上となった場合を再発と定義し、測定日を再発日とした²⁹。手術症例、放射線照射症例ともに画像上の再発が認められた場合も再発とした。

4.8 統計解析

各 2 群間の割合の比較は Pearson's chi-square test、中央値の比較は Wilcoxon rank-sum test で検討し、DSGb5 発現強度、Gleason Score による非再発生存率の比較は Kaplan-meier 法を用いて生存曲線を描き、その 2 群間比較には Log-rank test を用いた。非再発生存率に関する単変量解析、多変量解析は Cox proportional hazard model にて検討した。多変量解析は、説明変数を強制投入法と Stepwise 法を用いて検討した。解析は統計ソフト JMP Pro 14.1 (SAS) で有意差検定を行い、 $p < 0.05$ で統計学的有意差ありとした。

5 研究結果

5.1 5F3 抗体活性の確認

DSGb5 高発現細胞である ACHN 細胞³⁰を用いたフローサイトメトリーにて 5F3 産生ハイブリドーマの培養上清中の 5F3 抗体活性の確認を 3 ヶ月に 1 回以上の割合で行った。normal mouse IgM を陰性コントロールとして 5F3 抗体活性が十分である事を確認した(図 4)。

5.2 生検標本での免疫染色と評価方法について

先行研究で行われた前立腺全摘パラフィン包埋標本に対する免疫染色方法と同様の方法で前立腺生検標本を免疫染色した。その結果、先行研究と同様に正常前立腺上皮細胞が強く染色され、基底細胞や間質は染色されなかった。また、前立腺癌細胞の染色性は陰性～強陽性まで様々であった(図 5)。

5.3 前立腺全摘術を受けた患者における DSGb5 発現について

患者背景と前立腺全摘標本における病理学的因子を表 1 に示す。年齢の中央値は 64.5 歳 (IQR 59-68)、PSA 中央値は 5.67 ng/mL (IQR 4.48-8.53 ng/mL)であった。前立腺生検標本の Gleason Score は 3+3 が 38 例 (32.8%)、3+4 が 48 例 (41.4%)、4+3 が 22 例 (19.0%)、8 以上が 8 例 (6.9%)であった。生検本数の中央値は 12 本で、生検癌検出本数の中央値は 3 本 (IQR 1.25-4)、全生検本数に対する生検癌検出本数割合の中央値は 25% (IQR 10.1-33.3%)であった。D'Amico のリスク分類では低リスクが 32 例

(27.6%)、中リスクが 69 例 (59.5%)、高リスクが 15 例 (12.9%)であった。全例で開腹の恥骨後式根治的前立腺全摘術を施行していた。リンパ節郭清術は、未施行が 48 例 (41.4%)、限局郭清が 60 例 (51.7%)、拡大郭清が 8 例 (6.9%)であり、神経温存は未施行が 10 例 (8.6%)、片側温存が 43 例 (37.1%)、両側温存が 63 例 (54.3%)であった。前立腺生検から手術までの期間の中央値は 4 ヶ月 (IQR 4-5)であった。前立腺全摘術の病理学的因子については、pT2 が 87 例 (75%)、pT3 が 29 例 (25%)であり、全摘標本の Gleason Score は 3+3 が 21 例 (18.1%)、3+4 が 54 例 (46.6%)、4+3 が 33 例 (28.4%)、8 以上が 8 例 (6.9%)であった。断端陽性は 32 例 (27.6%)、断端陰性は 84 例 (72.4%)であった。脈管侵襲は 12 例 (10.3%)で陽性、104 例 (89.7%)で陰性であった。リンパ節転移は 1 例 (0.9%)でのみ陽性であった。また、観察期間の中央値は 88 ヶ月 (IQR 63-112.5)であった。

図 6 に各生検標本の Gleason Score と DSGb5 高発現割合についてのグラフを示す。Gleason Score によらず DSGb5 高発現割合は 2~3 割であった。次に各全摘標本の Gleason Score と DSGb5 高発現割合を図 7 に示す。こちらも Gleason Score によらず 5F3 の染色割合は 3~5 割であり、この割合は嶋田らの報告と同程度であった²⁶。

DSGb5 発現レベルと術前パラメーターとの関係については、年齢や PSA、cT stage、生検 Gleason Score、陽性コア割合、最大癌長、D'Amico 分類、LN 郭清、神経温存、前立腺生検から手術までの期間において、DSGb5 発現レベルによる有意な差は認めな

かった。DSGb5 発現レベルと前立腺全摘標本での病理パラメーターとの関連については、pT stage や全摘 Gleason Score、断端陽性、前立腺組織外進展(EPE)、pn、精嚢浸潤、腫瘍径には有意差を認めなかったが、全摘標本での脈管侵襲との有意な相関が認められた($p=0.028$)。そこで、患者の術前因子と手術標本での脈管侵襲との関係について検討を行ったところ(表 2)、年齢や PSA、cT stage、生検 Gleason Score、生検癌検出コア割合、最大癌長との関連は認めなかったが、DSGb5 高発現が単変量解析でも多変量解析でも有意に相関していた($p=0.028$ 、 $p=0.027$ 、 $p=0.040$)。

患者の術前因子と手術標本でのパラメーターと前立腺全摘術後の生化学的再発との関係について検討を行った(表 3)。再発した症例は 17 例あったが、全症例で画像上再発所見ない生化学的再発であった。単変量解析では、前立腺全摘標本の Gleason Score 8 以上と切除断端陽性が、生化学的再発と有意に相関していた($p=0.001$ 、 $p=0.008$)。術後の生化学的再発と DSGb5 との相関は見られなかったが、多変量解析を行ったところ、前立腺全摘標本の Gleason Score 8 以上($p=0.004$ 、 $p<0.001$)と切除断端陽性($p=0.008$ 、 $p=0.005$)に加えて DSGb5 高発現も有意に生化学的再発に相関していた($p=0.024$ 、 $p=0.012$)。今回の研究では切除断端陽性が 32 例いたが、その内訳として、表には示していないが pT2 での断端陽性が 21 例、cT2 の術前診断であったが実際は pT3 であった症例が 9 例であり、cT3 の診断で手術を行い断端陽性となった症例は 2 例のみであった。前立腺癌の TNM 分類で、T2 は腫瘍が前立腺に限局するものであり、T3 は前立腺

被膜を超えて浸潤するものと定義される。つまり断端陽性患者の3分の2以上で、手術操作により断端陽性となっていたことになる。そこで手術因子の影響を取り除く目的で、断端陰性の症例に限って手術前パラメーターと全摘後の生化学的再発との関連について検討した(表 4)。断端陰性の症例で検討すると、年齢や PSA、cT stage、生検 Gleason Score、生検癌検出コア割合、最大癌長は生化学的再発の予測因子とはならなかったが、DSGb5 高発現は単変量解析でも多変量解析でも前立腺全摘術後の生化学的再発を有意な予測因子であった($p=0.006$ 、 $p=0.007$ 、 $p=0.007$)。また断端陰性の症例のみで、DSGb5 の発現レベルでの無生化学的再発生存割合を示す(図 8)。断端陰性症例において、DSGb5 高発現症例 34 例中 6 例が再発していたのに対して、DSGb5 低発現症例 50 例では 1 例のみが再発を来しており、DSGb5 高発現症例において有意差を持って生化学的再発が多く認められた($p=0.006$)。

5.4 IMRT を受けた患者における DSGb5 発現について

患者背景を表 5 に示す。年齢の中央値は 70 歳 (IQR 65-75)、PSA 中央値は 12.1 ng/mL (IQR 7.0-23.1 ng/mL)であった。前立腺生検標本の Gleason Score は 3+3 が 5 例 (4.7%)、3+4 が 14 例 (13.2%)、4+3 が 25 例 (23.6%)、8 以上が 62 例 (58.5%)であった。生検本数の中央値は 12 本で、生検癌検出本数の中央値は 5 本 (IQR 3-7)、全生検本数に対する生検癌検出本数割合の中央値は 41.7% (IQR 25-58.3%)であった。D'Amico のリスク分類では低リスクが 2 例 (1.9%)、中リスクが 6 例 (5.7%)、高リス

クが 98 例 (92.5 %)であった。IMRT 患者では、リスク分類に基づいて低リスクでは IMRT 単独、中リスクでは IMRT 前半年間の androgen deprivation therapy (ADT)を併用、高リスク群では IMRT 前半年間の ADT に IMRT 後 2 年間の ADT 追加を行っている。前立腺生検から IMRT までの期間の中央値は 9 ヶ月 (IQR 8-11)であった。また、観察期間の中央値は 72.5 ヶ月 (IQR 58.8-96)であった。DSGb5 発現レベルと患者背景との関連については、年齢や PSA、cT stage、生検 Gleason Score、生検癌検出本数割合、最大癌長、D'Amico 分類、放射線終了後の ADT において、DSGb5 発現レベルによる有意な差は認めなかった。

IMRT を受けた患者の背景と IMRT 後の生化学的再発との関連についても検討を行った(図 9、表 6)。単変量解析では、前立腺生検標本の Gleason Score 8 以上と DSGb5 高発現が、生化学的再発と有意に相関していた($p<0.001$ 、 $p=0.041$)。また Stepwise 法による多変量解析でも、前立腺生検標本の Gleason Score 8 以上と DSGb5 高発現が、再発と有意に相関していた($p<0.001$ 、 $p=0.048$)。

6 考察

当科では今までに各種泌尿器科癌において、その糖鎖発現と癌の臨床像との関連について研究を行い糖鎖発現の役割について明らかにしてきた。その中で腎癌細胞から新規に同定された糖脂質の DSGb5 は、NK 細胞の細胞障害能の抑制や腎癌細胞の運動能や浸潤能を亢進する事や、腎癌摘出標本における DSGb5 発現は術後の再発と関連する事を示してきた^{21 21 22 23}。また、前立腺癌でも前立腺全摘標本における DSGb5 発現は、摘出標本での脈管侵襲や術後の生化学的再発に関連していると報告した²⁶。そこで本研究では前立腺生検標本を用いて DSGb5 発現を調べることにより、前立腺癌診断時に前立腺全摘術標本における病理学的因子を予測しうるかどうかや、手術や放射線療法といった根治治療後の再発に関連するかについて検討した。

最初に、先行研究で行われた前立腺全摘パラフィン包埋標本に対する免疫染色方法が前立腺生検標本でも同様に染色されるかについて検討した。その結果、先行研究と同様に正常前立腺上皮細胞が強く染色され、基底細胞や間質は染色されなかった。また前立腺癌細胞も Gleason Score に関連無く染色されないものから強く染色されるものまで多様であり、再現性のある結果が得られた。なお、DSGb5 よりもシアル酸が 1 つ少ない MSGb5 についても、MSGb5 に対する抗体である RM1 抗体を用いて免疫染色を行ったが、正常組織での染色性の一貫性がなく、DSGb5 のように inner control となる様な組織が無いために免疫染色による検討は出来なかった。

糖鎖抗原には、分化抗原としての性質が知られており器官の分化や癌化に伴い抗原発現パターンが変化するとされ^{31,32}、また癌の悪性度が上がるにつれてさらに変化する事があるとされる³³。先行研究においても、前立腺での DSGb5 の発現は正常前立腺上皮細胞では発現しているが、癌化に伴い発現が低下し、さらに悪性度が高くなると再び発現が増加するという分化抗原としての役割を有すると考えられると結論づけている²⁶。

前立腺全摘術症例での検討の結果、前立腺生検標本での DSGb5 の発現は、全摘標本での脈管侵襲と有意に相関していたが、他の病理パラメーターである pT stage や全摘 Gleason Score、断端陽性、前立腺組織外進展、pn、精嚢浸潤、腫瘍径には有意差を認めなかった。先行研究でも前立腺全摘標本での DSGb5 の発現が全摘標本での脈管侵襲と関連していることを報告しているが、生検標本でも全摘標本で同様の結果が得られた²⁶。また、術前のパラメーターで脈管侵襲を予測できるかについて単変量解析と多変量解析を行ったが、DSGb5 高発現であると脈管侵襲を予測できることが分かった。つまり、前立腺生検標本で DSGb5 高発現であれば、手術標本で脈管侵襲がある可能性が高いことになる。前立腺全摘術標本における adverse pathology を予測する術前因子として、生検標本での遺伝子発現³⁴ や PSA と生検癌検出本数³⁵、生検標本中における Gleason Score 4 部分の長さ、などがある。しかし全摘標本における脈管侵襲を予測する術前因子として報告されているものはなく、生検標本での DSGb5 の発現が全摘標本における脈管侵襲を予測出来る唯一のマーカであると思われる。また脈管侵襲と前立

腺全摘術後の再発との関連を示した論文は多く、三塚らは前立腺全摘標本の病理診断で pT2、断端陰性であるにもかかわらず生化学的再発を起こした症例では、脈管侵襲が一番有意に関連すると報告しているが³⁶、今のところ脈管侵襲と前立腺全摘術後の再発との関係は controversial である³⁷。今回の検討では前立腺生検における DSGb5 高発現が全摘標本の脈管侵襲を予測し、術前因子・病理組織学的因子とも独立して生化学的再発を予測できたが、脈管侵襲自体は術後の生化学的再発の予測因子とはなっていなかった。つまり、癌細胞が脈管に侵入するだけでは、生化学的再発を形成するには至らず、脈管を通過してリンパ節や臓器で腫瘍を形成することで転移を来すと考えられる。DSGb5 糖鎖が、癌細胞の細胞運動能を亢進して脈管侵襲を助長するだけでなく、Siglec7 を介して免疫細胞を抑制する事をこれまで報告しているが²²⁻²⁴、このような DSGb5 の機能が前立腺癌においても転移の多段階のメカニズムの一部に関わっていると考えられる。

前立腺全摘術後の生化学的再発についても検討を行ったところ、単変量解析では前立腺全摘標本の Gleason Score が 8 以上である事と切除断端陽性の 2 項目のみが生化学的再発に有意に関連していた。しかし多変量解析を行ったところ、その 2 項目に加えて DSGb5 高発現が有意差を持って生化学的再発に関連していた。これは、有意差は無かったものの DSGb5 高発現症例に比べて低発現症例で断端陽性割合が多かった為に術後の生化学的再発に単変量解析では有意差がなかったが、多変量解析では独立した予測因

子として残ったと思われた。手術標本での断端陽性には、術者が術中に前立腺組織に切り込むことによって前立腺内にとどまっている癌細胞が露出したものと、もともと癌細胞が前立腺組織外に浸潤していた状態であるが周囲組織が術中に剥離されたために癌細胞が露出して陽性と判定される場合がある。そこでこのような手術による影響を取り除く目的で断端陰性の症例に限って手術前パラメーターと生化学的再発との関連についても検討したところ、年齢や PSA、cT stage、生検 Gleason Score、生検癌検出本数割合、最大癌長は予測因子とならなかったが、DSGb5 高発現は前立腺全摘術後の生化学的再発に有意差を持って相関していた。

また、IMRT 症例での検討の結果、前立腺生検標本の Gleason Score 8 以上と DSGb5 高発現が、IMRT 後の再発と有意に相関していた。また、年齢や PSA、cT stage や IMRT 後の ADT の有無は IMRT 後の再発とは関連していなかった。つまり、前立腺癌に対する根治治療を行う前に治療後の再発のリスクが高い症例を判別することが可能であると考えられた。生検標本での Ki67 labeling index^{38 39} や糖転移酵素である Core 2 β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase-1 (GCNT1) の発現⁴⁰、腫瘍の血管分布⁴¹、Clusterin⁴²、Ku70⁴³、ゲノム解析^{11 12}などが、手術や放射線照射といった根治治療後の再発を予測するという報告がある。Sato⁴⁰らの報告した GCNT1 は糖転移酵素であり、GlcNAc を UDP-GlcNAc からコア 1 型 O-glycan structure の C6 位の GalNAc, Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc-Ser/Thr に転移しコア 2 型 Gal β 1 \rightarrow 3(GlcNAc β 1 \rightarrow 6)GalNAc-Ser/Thr

を生成するコア 2 型グルコサミニル (N アセチル) トランスフェラーゼ 1 である。今回我々が報告した DSGb5 は糖脂質であり、糖鎖発現が前立腺癌における aggressiveness、すなわち、前立腺癌細胞の持つ本来の biological activity を適確に表している可能性が示唆された。

今回の検討において、前立腺全摘症例では生検組織における Gleason Score は全摘除術後の再発を予測出来なかったが、IMRT 症例では生検組織における Gleason Score は IMRT 後の再発を予測出来ていた。これは、前立腺癌が前立腺内で多発性に発生することや、前立腺全摘症例は D'Amico のリスク分類で低～中リスクが 9 割弱であるのに対して、IMRT 症例は高リスクが 9 割強である事が関連している可能性がある。つまり、前立腺全摘症例ではリスクが高くない症例が多く、腫瘍の数や体積も小さいために生検で評価出来た Gleason Score がその症例の真の Gleason Score と乖離がある一方、IMRT 症例では高リスクの症例が多く腫瘍の数や体積も大きいため生検で評価出来た Gleason Score がその症例の真の Gleason Score を表しているために生検での Gleason Score が IMRT 後の再発を予測出来た可能性がある。実際、データには示していないが前立腺全摘症例において、生検標本の Gleason Score と全摘標本の Gleason Score の一致率は 50%程度と低かった。なお、前立腺全摘症例でも DSGb5 が前立腺全摘術後の再発を予測できたことについては、Gleason Score とは関係なく発現しており、前述の転移の多段階メカニズムに関連している可能性があるからかもしれない。

食道癌⁴⁴や大腸癌⁴⁵においては、糖鎖抗原である CA19-9 と CA125 の術前高値が有意に手術後の再発に関連しているという報告がある。糖鎖抗原は腫瘍の発生、浸潤、転移に密接に関係しており、今日の多くの腫瘍マーカーも糖鎖抗原である。今回 DSGb5 の発現について免疫染色を用いて検討を行ったが、免疫染色は定性的解析であり、定量的解析は困難である。しかし今後、この DSGb5 が血中や尿中で濃度測定が可能になれば、腫瘍マーカーとしての応用も可能かもしれない。当科の先行研究において、DSGb5 は細胞膜上の脂質ラフトと呼ばれる部分に多く発現していることが分かっており、同じ脂質二重層からなるエクソソームなどを利用する方法なども考えられる。つまり血中や尿中のエクソソームを検出して、そのエクソソーム上に発現している DSGb5 を ELISA などの抗原抗体反応などを利用して定量化する方法なども考えられる。また、血中や尿中のエクソソームを検出して、それから質量分析などを利用して定量化する方法なども考えられる。どのような方法であれ定量化が出来るようになれば、その中で腫瘍由来の抗原を含むもののみを定量化することによりより感度が高い悪性度の指標となる可能性がある。

近年世界的には前立腺癌の組織検体のゲノム解析によるリスク分類が商業的に使用できるようになってきているが^{11,12}、それらと DSGb5 発現の組み合わせにより、より精度の高い予後予測マーカーとなる可能性がある。精度の高い予後予測が出来れば、高リスク症例に対する集学的治療の選択などにより治療効果を高めることが出来るかも

しれない。

Limitation としては、retrospective である事やサンプルサイズが大きくないこと、生検で認められた腫瘍が予後を決定する病変ではない可能性がある事があげられる。

しかし転移のない限局性前立腺癌や局所進行性前立腺癌に対するリスク分類である D'Amico 分類のみではリスク評価は不十分と考えられており、より良いリスク評価方法が求められている。商業的に利用できる組織検体のゲノム解析などもあるが、それでも完全に予後は予測出来ていない。今回の研究において、前立腺診断時の生検組織における DSGb5 発現は、は前立腺全摘術標本における脈管侵襲を予測し、手術後や IMRT 後の生化学的再発も予測できる事が分かり、今後治療方針の決定の際に使用する事が出来るバイオマーカーの候補として、most promising であることが示唆された。

7 結論

前立腺生検標本を用いて抗 DSGb5 抗体である 5F3 で免疫染色を行い、DSGb5 高発現が前立腺全摘術標本での脈管侵襲や前立腺全摘除術後や放射線療法後の生化学的再発に有意に関連していることが分かった。すなわち、診断時の生検標本での DSGb5 発現により、根治治療後の予後を予測可能であることが示唆された。

今後、治療決定の際に術後の再発予測などに応用していきたい。

8 謝辞

本研究にあたり、終始御指導御鞭撻を承りました東北大学医学系研究科外科病態学講座泌尿器科学分野教授 伊藤明宏先生 に深く感謝致します。また病理学的指導を承りました元東北大学病院病理部准教授・現東北公済病院病理診断科部長 渡辺みか先生、東北大学大学院医学系研究科保健学専攻臨床検査医科学領域教授 鈴木貴先生、免疫染色法を御指導いただいた中央検査室病理部 青山弥生技師、東北大学大学院医学系研究科保健学専攻臨床検査医科学領域講師 高木清司先生に感謝致します。また実験の遂行にあたり終始御協力いただきました泌尿器科研究室技能補佐員 阿部夏恵様、泌尿器科研究室技術補佐員 佐々木梓様に感謝申し上げます。

最後に本研究の機会を与えていただき、東北大学医学系研究科外科病態学講座泌尿器科学分野名誉教授・現宮城県立がんセンター総長 荒井陽一先生に深く御礼申し上げます。

9 参考文献

1. 人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部編）。
2. Aus, G., Bergdahl, S., Lodding, P. et al.: Prostate cancer screening decreases the absolute risk of being diagnosed with advanced prostate cancer--results from a prospective, population-based randomized controlled trial. *Eur Urol*, **51**: 659, 2007
3. D'Amico, A. V., Whittington, R., Malkowicz, S. et al.: Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*, **280**: 969, 1998
4. NCCN Guideline, Prostate Cancer Version 4. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf: accessed on January 9, 2019.
5. Gleason, D. F.: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, **50**: 125, 1966
6. Partin, A. W., Carter, H. B., Chan, D. W. et al.: Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol*, **143**: 747, 1990
7. 三塚浩二, 江., 嶋田修一, 他: 前立腺癌診断における直腸診の問題点 泌尿器科医間による所見のばらつき. *東北医誌*, **120**: 103
8. Epstein, J. I., Allsbrook, W. C., Jr., Amin, M. B. et al.: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, **29**: 1228, 2005
9. Hayes, J. H., Ollendorf, D. A., Pearson, S. D. et al.: Observation versus initial treatment for men with localized, low-risk prostate cancer: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med*, **158**: 853, 2013
10. Diaz, M., Peabody, J. O., Kapoor, V. et al.: Oncologic outcomes at 10 years following robotic radical prostatectomy. *Eur Urol*, **67**: 1168, 2015
11. Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H. et al.: Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, **18**: 11, 2010
12. Nguyen, P. L., Haddad, Z., Ross, A. E. et al.: Ability of a Genomic Classifier to Predict Metastasis and Prostate Cancer-specific Mortality after Radiation or Surgery based on Needle Biopsy Specimens. *Eur Urol*, **72**: 845, 2017
13. Hakomori, S., Kannagi, R.: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst*, **71**: 231, 1983
14. Hakomori, S.: Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, **52**: 257, 1989

15. Hakomori, S.: Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res*, **56**: 5309, 1996
16. Saito, S., Orikasa, S., Ohyama, C. et al.: Changes in glycolipids in human renal-cell carcinoma and their clinical significance. *Int J Cancer*, **49**: 329, 1991
17. Saito, S., Lavery, S. B., Salyan, M. E. et al.: Common tetrasaccharide epitope NeuAc alpha 2-->3Gal beta 1-->3(Neu-Ac alpha 2-->6)GalNAc, presented by different carrier glycosylceramides or O-linked peptides, is recognized by different antibodies and ligands having distinct specificities. *J Biol Chem*, **269**: 5644, 1994
18. Ito, A., Lavery, S. B., Saito, S. et al.: A novel ganglioside isolated from renal cell carcinoma. *J Biol Chem*, **276**: 16695, 2001
19. Ito, A., Saito, S., Masuko, T. et al.: Monoclonal antibody (5F3) defining renal cell carcinoma-associated antigen disialosyl globopentaosylceramide (V3NeuAcIV6NeuAcGb5), and distribution pattern of the antigen in tumor and normal tissues. *Glycoconj J*, **18**: 475, 2001
20. Saito, S., Orikasa, S., Satoh, M. et al.: Expression of globo-series gangliosides in human renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, **88**: 652, 1997
21. Itoh, J., Ito, A., Shimada, S. et al.: Clinicopathological significance of ganglioside DSGb5 expression in renal cell carcinoma. *Glycoconj J*, **34**: 267, 2017
22. Ito, A., Handa, K., Withers, D. A. et al.: Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression. *FEBS Lett*, **504**: 82, 2001
23. Kawasaki, Y., Ito, A., Withers, D. A. et al.: Ganglioside DSGb5, preferred ligand for Siglec-7, inhibits NK cell cytotoxicity against renal cell carcinoma cells. *Glycobiology*, **20**: 1373, 2010
24. Kawasaki, Y., Ito, A., Kakoi, N. et al.: Ganglioside, disialosyl globopentaosylceramide (DSGb5), enhances the migration of renal cell carcinoma cells. *Tohoku J Exp Med*, **236**: 1, 2015
25. Saito, S., Egawa, S., Endoh, M. et al.: RM2 antigen (beta1,4-GalNAc-disialyl-Lc4) as a new marker for prostate cancer. *Int J Cancer*, **115**: 105, 2005
26. Shimada, S., Ito, A., Kawasaki, Y. et al.: Ganglioside disialosyl globopentaosylceramide is an independent predictor of PSA recurrence-free survival following radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, **17**: 199, 2014
27. Hodge, K. K., McNeal, J. E., Terris, M. K. et al.: Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol*, **142**: 71, 1989
28. Orikasa, K., Ito, A., Ishidoya, S. et al.: Anterior apical biopsy: is it useful for prostate cancer detection? *Int J Urol*, **15**: 900, 2008

29. Roach, M., 3rd, Hanks, G., Thames, H., Jr. et al.: Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **65**: 965, 2006
30. Senda, M., Ito, A., Tsuchida, A. et al.: Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgloboside in normal and malignant kidney cells: downregulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. *Biochem J*, **402**: 459, 2007
31. Kannagi, R., Cochran, N. A., Ishigami, F. et al.: Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J*, **2**: 2355, 1983
32. Fukushi, Y., Oriyasa, S., Shepard, T. et al.: Changes of Lex and dimeric Lex haptens and their sialylated antigens during development of human kidney and kidney tumors. *J Urol*, **135**: 1048, 1986
33. Fukushi, Y., Ohtani, H., Oriyasa, S.: Expression of lacto series type 2 antigens in human renal cell carcinoma and its clinical significance. *J Natl Cancer Inst*, **81**: 352, 1989
34. Klein, E. A., Cooperberg, M. R., Magi-Galluzzi, C. et al.: A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. *Eur Urol*, **66**: 550, 2014
35. Park, J. W., Koh, D. H., Jang, W. S. et al.: Predictors of adverse pathologic features after radical prostatectomy in low-risk prostate cancer. *BMC Cancer*, **18**: 545, 2018
36. Mitsuzuka, K., Narita, S., Koie, T. et al.: Lymphovascular invasion is significantly associated with biochemical relapse after radical prostatectomy even in patients with pT2N0 negative resection margin. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, **18**: 25, 2015
37. Ng, J., Mahmud, A., Bass, B. et al.: Prognostic significance of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens. *BJU Int*, **110**: 1507, 2012
38. Bubendorf, L., Tapia, C., Gasser, T. C. et al.: Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol*, **29**: 949, 1998
39. Wilkins, A. C., Gusterson, B., Szijgyarto, Z. et al.: Ki67 Is an Independent Predictor of Recurrence in the Largest Randomized Trial of 3 Radiation Fractionation Schedules in Localized Prostate Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **101**: 309, 2018
40. Sato, T., Yoneyama, T., Tobisawa, Y. et al.: Core 2 beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase-1 expression in prostate biopsy specimen is an indicator of prostate cancer aggressiveness. *Biochem Biophys Res Commun*, **470**: 150,

2016

41. Khatami, A., Pihl, C. G., Norrby, K. et al.: Is tumor vascularity in prostate core biopsies a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy? *Acta Oncol*, **44**: 362, 2005
42. Pins, M. R., Fiadjoe, J. E., Korley, F. et al.: Clusterin as a possible predictor for biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy with intermediate Gleason scores: a preliminary report. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, **7**: 243, 2004
43. Hasegawa, T., Someya, M., Hori, M. et al.: Expression of Ku70 predicts results of radiotherapy in prostate cancer. *Strahlenther Onkol*, **193**: 29, 2017
44. Makino, T., Shimada, Y., Maeda, M. et al.: Carbohydrate antigens as a risk factor for hematogenous recurrence of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep*, **8**: 981, 2001
45. Yang, X. Q., Chen, C., Wang, F. B. et al.: Preoperative serum carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen19-9 and carbohydrate antigen 125 as prognostic factors for recurrence-free survival in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, **12**: 1251, 2011

10 図の説明

図 1 糖脂質とそれに対する抗体

当科での糖鎖研究により同定された mono-sialyl globopentaosil ceramide(MSGb5)、di-sialyl globopentaosil ceramide(DSGb5)、N-acetyl galactosyl disialyl lactotetraosil ceramide(GalNAcDSLc4)と、それらのガングリオシドに対するモノクローナル抗体 (RM1、5F3、RM2) を示す。

図 2 前立腺生検方法

- a. 初回生検、従来の系統的 6 ヶ所生検(①～⑥)に加えて辺縁域外側 4 ヶ所と尖部腹側 2 ヶ所を加えた 12 ヶ所生検
- b. 2 回目生検、従来の系統的 6 ヶ所生検(①～⑥)に加えて尖部 6 ヶ所を加えた 12 ヶ所生検

図 3 前立腺の領域分け

前立腺を 6 つの領域(I - 右葉尖部背側、II - 右葉尖部腹側、III - 右葉底部、IV - 左葉尖部背側、V - 左葉尖部腹側、VI - 左葉底部)に分けて、12 本の生検組織のうち癌が検出された生検標本を 6 つの領域に分けてその各領域において最大癌長を

含む生検標本を対象として免疫染色を施行した。両葉の外側縁と正中線の間
のラインで前立腺中央の位置で生検しているもの(図 2 の②⑤)は検討する領域が多
くなるように尖部もしくは底部として検討した(②は図 3 の I もしくは III、⑤は図
3 の IV もしくは VI)。

図 4 ACHN 細胞を使ったフローサイトメトリーによる 5F3 の活性確認

ACHN 細胞を用いてフローサイトメトリーを行った。一次抗体として normal
mouse IgM を使用した陰性コントロール(赤)と 5F3 (青)を使用したものを示す。

2 次抗体として Fluorescein-Labeled Affinity Purified Antibody To Mouse
IgG+IgM を使用して、CytoFLEX LX を用いてフローサイトメトリーを行って
5F3 の活性を確認した。

図 5 前立腺生検標本に対する免疫組織染色写真

a : 陰性(0)の前立腺癌細胞、b : 弱陽性(1+)の前立腺癌細胞、c : 陽性(2+)の前立腺
癌細胞、d : 強陽性(3+)の前立腺癌細胞。黄色い矢頭が前立腺癌細胞を、黒の矢印
は前立腺上皮細胞を示している。正常腺管の濃く染色される部分(赤の円)を強陽
性(3+)、正常腺管の薄めの部分(青の円)を陽性(2+)、基底細胞の染色性を陰性(0)と
し、弱陽性(1+)は陰性(0)と陽性(2+)の間と定義した。陽性と強陽性(2+, 3+)を

DSGb5 高発現、陰性と弱陽性(0, 1+)を DSGb5 低発現とした。

図 6 前立腺全摘除術を受けた患者における各生検標本での Gleason Score と DSGb5 高発現割合

Gleason Score によらず DSGb5 高発現割合は 2~3 割であった。

図 7 IMRT を受けた患者における各生検標本での Gleason Score と DSGb5 高発現割合

Gleason Score によらず DSGb5 高発現割合は 3~5 割であった。

図 8 前立腺全摘術後の無生化学的再発生存曲線

84 例の断端陰性症例において、DSGb5 高発現症例 34 例中 6 例が再発していたのに対して、DSGb5 低発現症例 50 例では 1 例のみが再発を来しており、DSGb5 高発現症例では有意差を持って生化学的再発が多く認められた($p=0.006$)。実線：DSGb5 低発現症例、破線：DSGb5 高発現症例

図 9 IMRT 後の無生化学的再発生存曲線

a. DSGb5 発現強度による無生化学的再発生存曲線、DSGb5 高発現症例では有意

差を持って生化学的再発が多く認められた($p=0.041$)

- b. Gleason Score による無再発生存曲線、Gleason Score 8 以上の症例では Gleason Score 7 以下の症例に比べて有意差を持って生化学的再発が多く認められた ($p<0.001$)

11 表のタイトル

表 1 前立腺全摘術を受けた患者の背景と病理学的因子

表 2 患者の術前因子と手術標本での脈管侵襲との関係

表 3 患者の術前因子と手術標本でのパラメーターと前立腺全摘術後の生化学的再発との関係

表 4 断端陽性患者の術前因子と前立腺全摘術後の生化学的再発との関係

表 5 IMRT を受けた患者の背景

表 6 IMRT を受けた患者の背景と IMRT 後の生化学的再発との関係

図1 糖脂質とそれに対する抗体

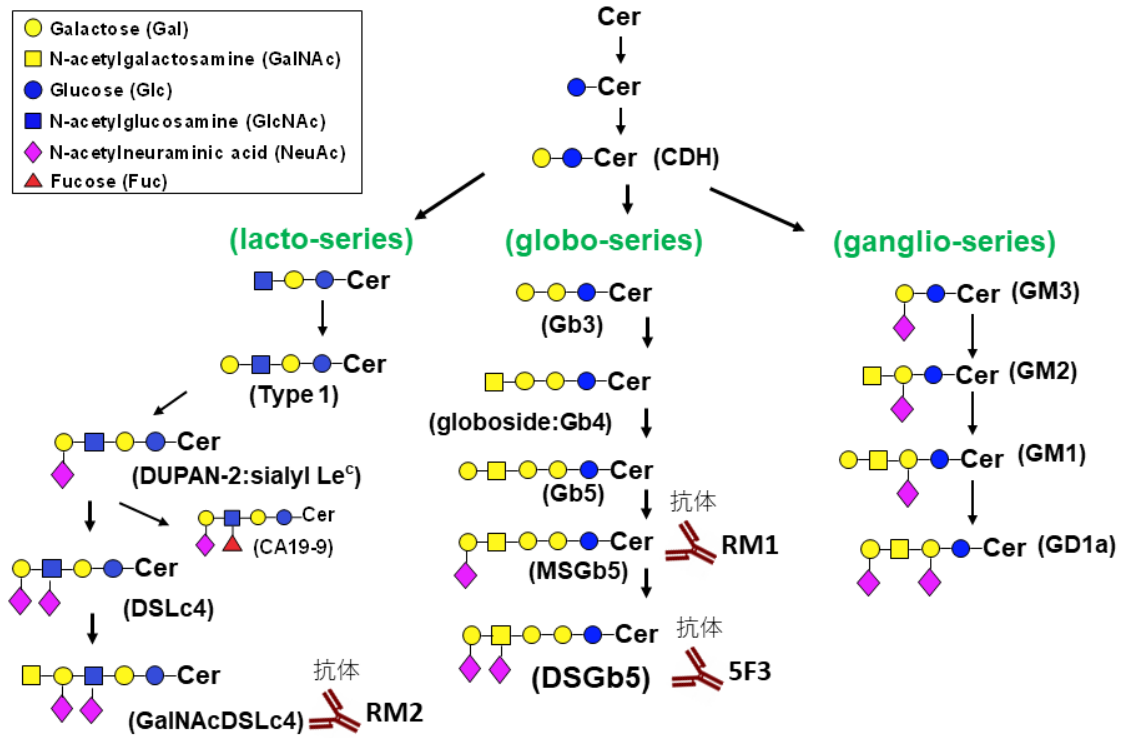
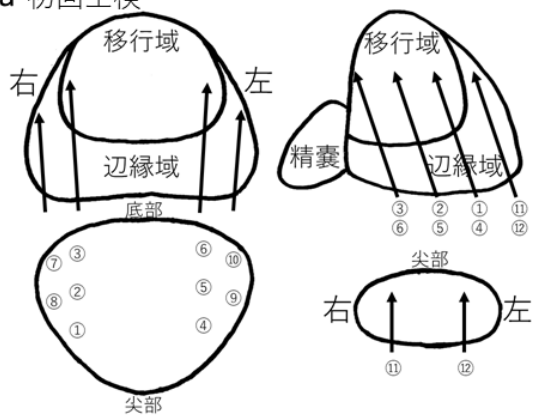


図2 前立腺生検方法

a 初回生検



b 二回目生検

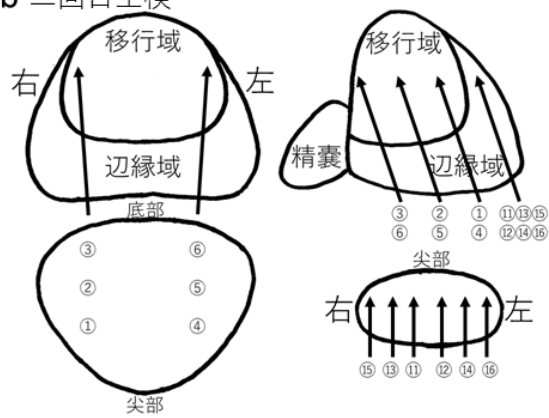


図3 前立腺の領域分け

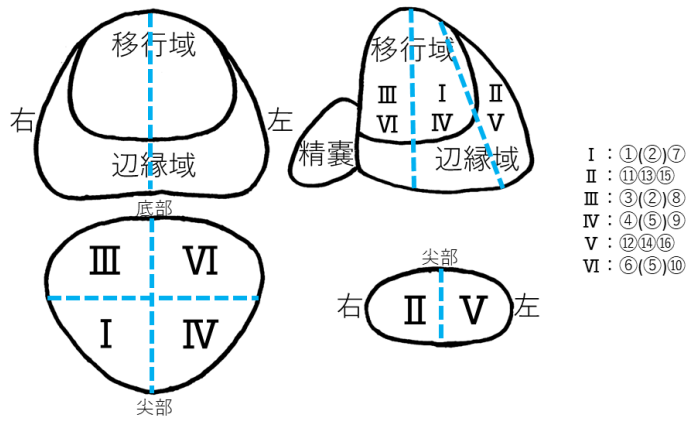


図 4 ACHN 細胞を使ったフローサイトメトリーによる 5F3 の活性確認

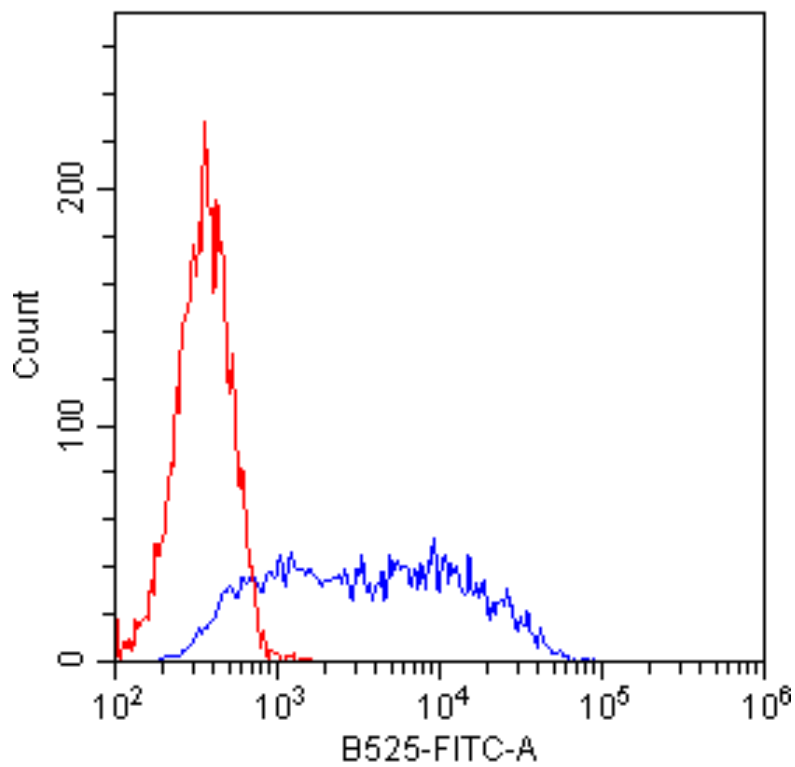


図5 前立腺生検標本に対する免疫組織染色写真

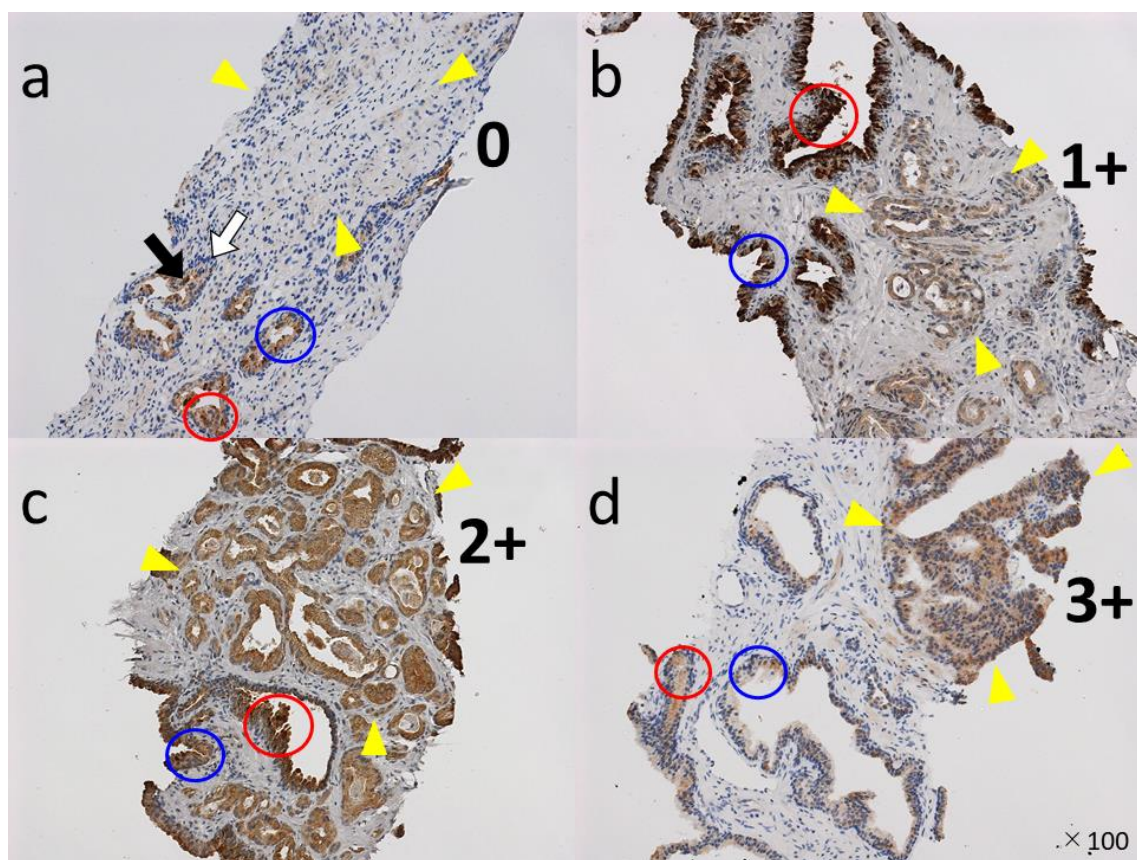


図6 各生検標本での Gleason Score と DSGb5 高発現割合

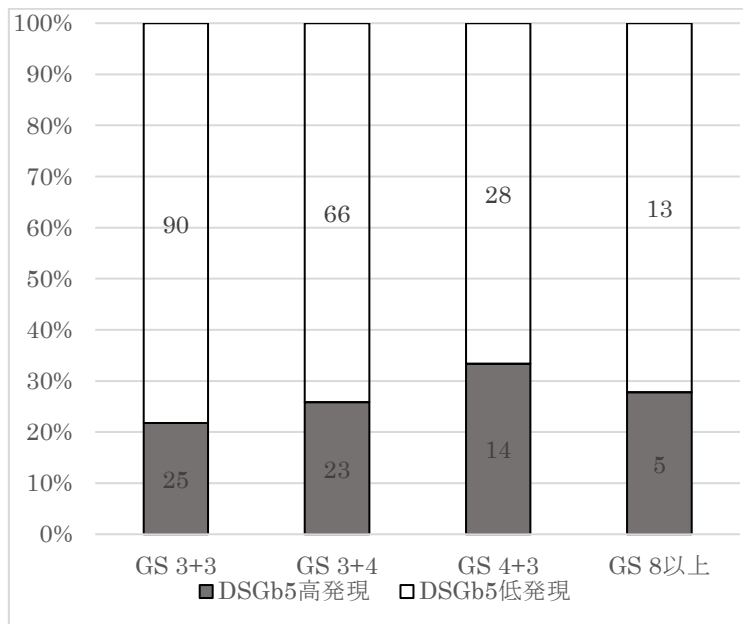


図 7 各症例での Gleason Score と DSGb5 高発現割合

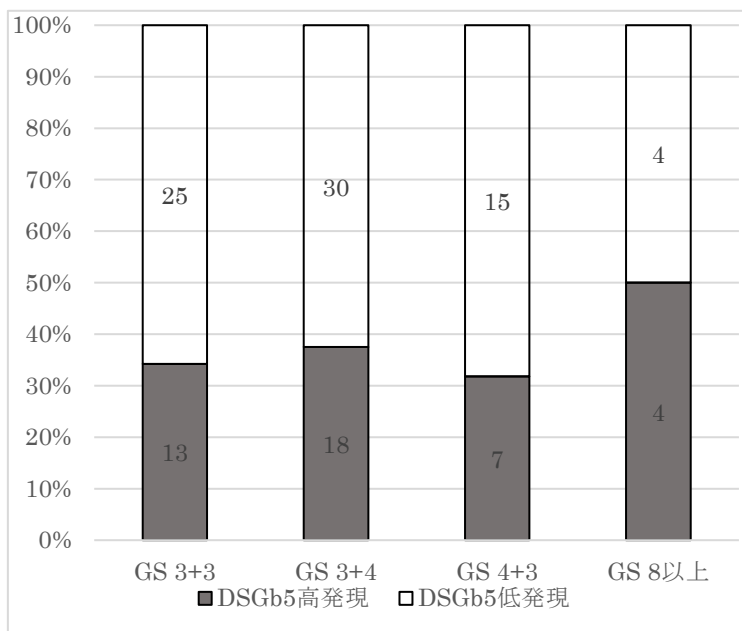


図8 前立腺全摘術後の無生化学的再発生存曲線

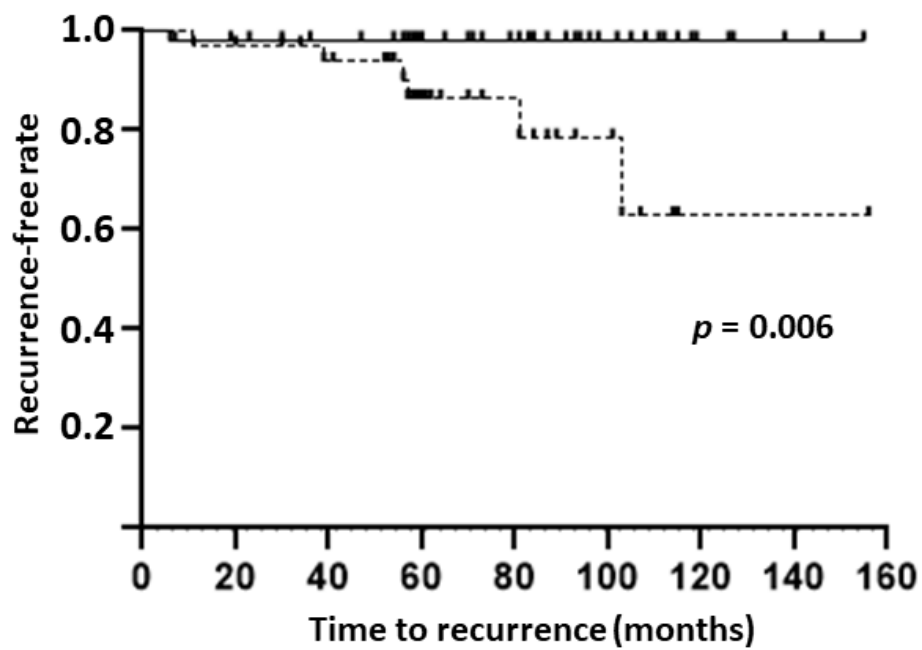
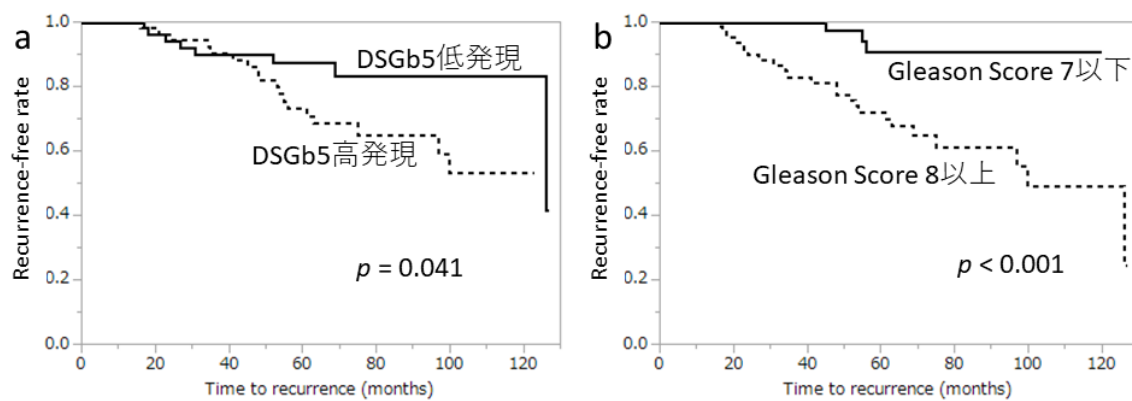


図9 IMRT後の無生化学的再発生存曲線



13 表

表 1 前立腺全摘術を受けた患者の背景と病理学的因子

	全症例	DSGb5 高発現 (n=42)	DSGb5 低発現 (n=74)	p 値
術前患者背景				
年齢中央値 (歳) (IQR)	64.5 (59-68)	65 (59-70)	64 (58.8-67)	0.074
PSA 中央値 (ng/mL) (IQR)	5.67 (4.48-8.53)	6.77 (4.75-9.35)	5.29 (4.18-7.34)	0.251
cT1c / cT2a / ≥ cT2b	82 / 26 / 8	30 / 9 / 3	52 / 17 / 5	0.981
生検 Gleason Score				0.815
3+3	38 (32.8%)	13 (31.0%)	25 (33.8%)	
3+4	48 (41.4%)	18 (42.9%)	30 (40.5%)	
4+3	22 (19.0%)	7 (16.7%)	15 (20.3%)	
8 以上	8 (6.9%)	4 (9.5%)	4 (5.4%)	
生検癌検出本数割合 (%) (IQR)	25 (10-33)	25 (8-42)	24 (16-33)	0.175
最大癌長 (mm) (IQR)	4 (3-8)	5 (3-8)	4 (3-7)	0.231
D'Amico リスク分類 (低/中/高)	32 / 69 / 15	10 / 26 / 6	22 / 43 / 9	0.779
術式				
リンパ節郭清 (なし/限局/拡大)	48 / 60 / 8	15 / 22 / 5	33 / 38 / 3	0.233
神経温存 (なし/片側/両側)	10 / 43 / 63	3 / 14 / 25	7 / 29 / 38	0.689
摘出標本の病理学的因子				
pT2 / pT3	87 / 29	33(78.6%) / 9(21.4%)	54(73.0%) / 20(27.0%)	0.656
全摘 Gleason Score				0.530
3+3	21 (18.1%)	8 (19.1%)	13 (17.6%)	
3+4	54 (46.6%)	17 (40.5%)	37 (50.0%)	
4+3	33 (28.4%)	15 (35.7%)	18 (24.3%)	
8 以上	8 (6.9%)	2 (4.8%)	6 (8.1%)	
切除断端 (陰性/陽性)	32 / 84	8(19.0%) / 34(81.0%)	24(32.4%) / 50(67.6%)	0.136
pn (+/-)	73 / 43	29(69.0%) / 13(31.0%)	44(59.5%) / 30(40.5%)	0.325
脈管侵襲 (あり/なし)	12 / 104	8(19.0%) / 34(81.0%)	4(5.4%) / 70(94.6%)	0.028
癌長 (1.55mm 以上/1.55mm 未満)	58 / 58	24(57.1%) / 18(42.9%)	34(45.9%) / 40(54.1%)	0.334
経過観察期間 (月) (IQR)	88 (63-112.5)	88 (60.8-110.8)	88 (60.8-114.3)	0.376

表 2 患者の術前因子と手術標本での脈管侵襲との関係

	単変量解析		多変量解析		多変量解析 (Stepwise)	
	OR (95% CI)	<i>p</i> 値	OR (95% CI)	<i>p</i> 値	OR (95% CI)	<i>p</i> 値
年齢 (65 歳以上 vs 65 歳未満)	3.4 (0.86-13)	0.125	2.9 (0.70-12)	0.124	2.9 (0.70-12)	0.123
PSA 値 (ng/mL) (10 以上 vs 10 未満)	1.1 (0.22-5.5)	1.000	1.0 (0.19-5.7)	0.968		
cT stage (cT2 以上 vs cT1c 以下)	1.2 (0.35-4.4)	0.745	1.4 (0.35-5.6)	0.635		
生検標本の Gleason Score (8 以上 vs 7 未満)	3.3 (0.58-18)	0.193	2.2 (0.34-14)	0.434		
癌陽性本数割合 (25%以上 vs 25%未満)	0.96 (0.29-3.2)	1.000	1.7 (0.38-7.6)	0.485		
最大癌長 (4mm 以上 vs 4mm 未満)	0.55 (0.17-1.8)	0.357	0.33 (0.073-1.5)	0.152		
生検標本における DSGb5 発現 (高発現 vs 低発現)	4.1 (1.2-15)	0.028	4.3 (1.1-16)	0.027	3.7 (1.0-13)	0.040

表 3 患者の術前因子と手術標本でのパラメーターと前立腺全摘術後の生化学的再発との関係

	単変量解析		多変量解析		多変量解析 (Stepwise)	
	HR (95% CI)	<i>p</i> 値	HR (95% CI)	<i>p</i> 値	HR (95% CI)	<i>p</i> 値
年齢 (65 歳以上 vs 65 歳未満)	0.91 (0.35-2.4)	0.850	1.1 (0.30-3.8)	0.919		
PSA 値 (ng/mL) (10 以上 vs 10 未満)	2.4 (0.83-6.7)	0.133	1.1 (0.30-3.7)	0.939		
D'Amico リスク分類 (高 vs 中&低)	2.1 (0.67-6.4)	0.236	0.42 (0.069- 2.6)	0.316		
生検標本における DSGb5 発現 (高発現 vs 低発現)	2.3 (0.88-6.2)	0.088	3.9 (1.1-13)	0.024	4.0 (1.4-12)	0.012
全摘標本における DSGb5 発現 (8 以上 vs 7 以下)	7.8 (2.7-22)	0.001	16 (2.6-101)	0.004	8.5 (2.8-26)	<0.001
pT stage (pT3 以上 vs pT2 以下)	2.2 (0.83-5.7)	0.127	0.99 (0.26-3.8)	0.991		
切除断端 (陽性 vs 陰性)	3.7 (1.4-9.8)	0.008	5.3 (1.5-19)	0.008	4.5 (1.6-12)	0.005
pn (+ vs -)	2.0 (0.64-6.0)	0.212	1.2 (0.30-4.6)	0.814		
尿管侵襲 (あり vs なし)	2.9 (0.95-9.0)	0.092	1.8 (0.49-6.3)	0.394		
癌長 (cm) (1.55 以上 vs 1.55 未満)	2.6 (0.91-7.3)	0.062	0.67 (0.15-3.0)	0.603		

表 4 断端陰性患者の術前因子と前立腺全摘術後の生化学的再発との関係

	単変量解析		多変量解析		多変量解析 (Stepwise)	
	HR (95% CI)	<i>p</i> 値	HR (95% CI)	<i>p</i> 値	HR (95% CI)	<i>p</i> 値
年齢 (65 歳以上 vs 65 歳未満)	1.6 (0.37-7.4)	0.514	1.5 (0.27-8.1)	0.655		
PSA 値 (ng/mL) (10 以上 vs 10 未満)	1.3 (0.16-11)	0.815	1.5 (0.12-18)	0.753		
cT stage (cT2 以上 vs cT1c 以下)	0.36 (0.043-3.0)	0.292	0.31 (0.028-3.3)	0.282		
生検標本の Gleason Score (8 以上 vs 7 以下)	2.3 (0.27-19)	0.488	2.8 (0.27-30)	0.425		
癌検出本数割合 (25%以上 vs 25%未満)	1.1 (0.24-4.7)	0.944	3.3 (0.43-25)	0.249		
最大癌長 (4mm 以上 vs 4mm 未満)	0.28 (0.054-1.5)	0.113	0.15 (0.016-1.4)	0.077	0.29 (0.053-1.6)	0.127
生検標本における DSGb5 発現 (高発現 vs 低発現)	11 (1.3-92)	0.006	11 (1.3-95)	0.007	11 (1.3-87)	0.007

表 5 IMRT を受けた患者の背景

	全症例	DSGb5 高発現 (n=55)	DSGb5 低発現 (n=51)	p 値
年齢中央値 (歳) (IQR)	70 (65-75)	71 (66-74)	70 (65-76)	0.827
PSA 中央値 (ng/mL) (IQR)	12.1 (7.0-23.1)	12.7 (8.3-26.2)	11.2 (5.9-20.9)	0.285
cT2a 以下 / cT2b / cT2c 以上	33 / 13 / 60	17 / 5 / 33	16 / 8 / 27	0.555
生検 Gleason Score				0.898
3+3	5 (4.7%)	3 (5.5%)	2 (3.9%)	
3+4	14 (13.2%)	6 (10.9%)	8 (15.7%)	
4+3	25 (23.6%)	13 (23.6%)	12 (23.5%)	
8 以上	62 (58.5%)	33 (60.0%)	29 (56.9%)	
生検癌検出本数割合 (%) (IQR)	41.7 (25-58.3)	41.7 (33.3-53.8)	41.7 (25-58.3)	0.330
最大癌長 (mm) (IQR)	9 (6-11.3)	9 (7-12)	9 (5-11)	0.247
D'Amico リスク分類 (低 / 中 / 高)	2 / 6 / 98	1 / 4 / 50	1 / 2 / 48	0.752
放射線終了後の ADT (あり / なし)	49/57	22/33	27 / 24	0.181
経過観察期間 (月) (IQR)	72.5 (58.8-96)	77 (63-100)	66 (53-93)	0.151

表 6 IMRT を受けた患者の背景と IMRT 後の生化学的再発との関係

	単変量解析		多変量解析		多変量解析 (Stepwise)	
	HR (95% CI)	<i>p</i> 値	HR (95% CI)	<i>p</i> 値	HR (95% CI)	<i>p</i> 値
年齢 (70 歳以上 vs 70 歳未満)	0.52 (0.24-1.15)	0.101	0.46 (0.20-1.05)	0.065	0.49 (0.22-1.09)	0.077
PSA 値 (ng/mL) (20 以上 vs 20 未満)	1.07 (0.45-2.58)	0.875	1.37 (0.53-3.50)	0.514		
cT stage (cT3 以上 vs cT2 以下)	1.29 (0.58-2.84)	0.528	1.73 (0.74-4.05)	0.205		
生検標本の Gleason Score (8 以上 vs 7 以下)	5.94 (1.78-19.89)	<0.001	7.33 (2.08-25.83)	0.002	5.78 (1.72-19.38)	<0.001
放射線終了後の ADT (あり vs なし)	0.77 (0.34-1.75)	0.533	1.01 (0.43-2.40)	0.981		
生検標本における DSGb5 発現 (高発現 vs 低発現)	2.38 (0.99-5.69)	0.041	2.15 (0.88-5.25)	0.093	2.32 (0.97-5.58)	0.048