

博士論文

前立腺癌における DSGb5 糖脂質発現と
新規バイオマーカーとしての意義

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

嶋田修一

略語

BSA: bovine serum albumin

DAB: 3,3-diaminobenzidine, tetrahydrochloride

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DSGb5: disialosyl globopentaosyl ceramide

FACS: fluorescence activated cell sorter

FBS: fetal bovine serum

FITC: fluorescence isothiocyanate

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

GalNacDSLc4: N-acetyl galactosyl di-sialyl lactotetraosyl ceramide

HGPIN: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia

HIER: Heat-induced epitope retrieval

HRP: horseradish peroxidase

mAb: monoclonal antibody

MSGb5: monosialosyl globopentaosyl ceramide

NK: natural killer

PBS: phosphate buffer saline

PSA: prostate specific antigen

RM: resection margin

SAB: streptavidin-biotin

Siglec: sialic acid binding immunoglobulin like lectin

SSEA: stage-specific embryonic antigen

TLC: Thin-layer chromatography

1 要約

背景：当科研究室では、これまでに各種泌尿器科癌の糖鎖発現と臨床像を比較検討し、癌の転移や浸潤における糖鎖の果たす役割について明らかにしてきた。先行研究の中で、腎癌の糖脂質研究から新規に同定された糖脂質である DSGb5 は NK 細胞からの寛容を得ることや運動能を亢進させることにより腎癌の転移に関与することを示唆する所見が得られた。しかし前立腺癌における DSGb5 の役割についてはこれまで解明されておらず今後の研究が待たれていた。

目的：DSGb5 糖脂質の前立腺癌および正常前立腺組織における発現様式を検討し、そのバイオマーカーとしての臨床応用の可能性を明らかにする事を目的として本研究を施行した。

方法：抗 DSGb5 モノクローナル抗体である 5F3 による再現性のある免疫染色法を確立する。その後当科において 2005 年から 2007 年に限局性前立腺癌と診断され前立腺全摘術を施行した患者を対象とし、ホルマリン固定パラフィン包埋された検体を用いて免疫組織染色を行い、DSGb5 糖脂質の発現と臨床病理学的因子との関連を比較検討する。

結果：5F3 を用いた免疫染色において、加熱による賦活化ではクエン酸緩衝液 (pH7.0) を用いることで糖鎖構造を保ち、ポリマー法による検出で非特異的反応を抑えることで再現性のある免疫染色法を確立するに至った。この方法を用いた 5F3 による免疫染色の結果、正常腺上皮細胞は強く染色された。一方癌細胞は染色陰性から強陽性まで

幅広くみられた。5F3 免疫染色陽性前立腺癌は脈管浸潤が有意に多く、PSA 再発が有意差をもって 5F3 免疫染色陰性前立腺癌より多く認められた ($p=0.0220$)。多変量解析の結果、5F3 免疫染色陽性前立腺癌は独立した再発リスク因子であった。

考察：酵素抗体法による免疫染色では抗原賦活化法、賦活化時に使用する緩衝液の種類、pH、検出法など多数の組み合わせの中から最適な方法を選ぶ必要がある。また内因性酵素による非特異的応答を抑え染色過程での抗原性低下を防ぐ必要がある。5F3 免疫染色においてはクエン酸緩衝液 (pH7.0) を用いた加熱法による賦活化とポリマー法による検出法が最適であった。その結果、正常腺上皮細胞は 5F3 免疫染色陽性となり予後良好な前立腺癌は 5F3 免疫染色陰性、予後不良な前立腺癌は 5F3 免疫染色陽性となった。糖鎖抗原は分化に伴い発現が変化する分化抗原の性質があり、癌化する過程で DSGb5 の発現が低下し、悪性度が高くなるに従い再度発現が増加したものと推察された。また多変量解析の結果から、5F3 免疫染色陽性とグリソンスコアがそれぞれ独立した再発リスク因子であったことから、DSGb5 の発現はグリソンスコアとは異なる観点から前立腺癌の悪性度を反映していると考えられた。

2 研究背景

我が国の統計では、2008年の前立腺癌罹患率は年間51534人であり男性における部位別発生率の第4位、2011年の死亡数では10823人で第7位であり、罹患率、死亡数とも増加傾向にある¹⁾。実際2007年より東北大学病院での癌登録が開始となっているが、2007年から2011年まで男性の癌の第1位の患者数を記録しており、本学において最も重要な癌の一つとなっている。

前立腺癌腫瘍マーカーであるPSA血液検査による前立腺癌検診の普及により自覚症状が出現する前にPSAの上昇によって精査を受けて前立腺癌と診断されるケースが増えており、それに伴い限局性前立腺癌の割合が増加し、逆に進行癌は減少している²⁾。

限局性前立腺癌あるいは局所進行癌の治療方針を決めるうえでPSA、臨床病期(Tステージ)、グリソンスコアを用いたリスク分類が国際的に広く使用されており(図1)^{3, 4)}、リスク分類に応じて手術療法、放射線療法、PSA監視療法などが選択されている。

グリソンスコアは前立腺癌を組織学的形態により1から5のパターンに分類し、癌巢内の第1優勢パターンと第2優勢パターンの合計によって算出され、組織学的悪性度の指標とされる⁵⁾(図1)。しかしリスク分類の問題点としてPSAは前立腺肥大症や前立腺炎でも上昇すること⁶⁾、Tステージは直腸診で診断されるため診断医による不一致が認められること⁷⁾、生検組織でのグリソンスコアは病理医間による再現性に問題があること⁸⁾から各リスク群は多様性に富む集団であり、これらの因子を用いたリスク分類は実際のリスクを反映していないことがしばしばあり生物学的悪性度を適切

に表すには限界があると考えられる。すなわち高リスク前立腺癌と診断されても予後良好な症例も含まれており⁹⁾、中リスク前立腺癌の中には予後良好な症例と予後不良な症例が含まれている。そのため前立腺癌の生物学的悪性度を客観的に反映する新しいバイオマーカーの開発が求められている。

糖脂質や糖蛋白糖鎖は発生や細胞間の相互認識、細胞運動・増殖および細胞内シグナリングなどに関与し癌化により変化し癌の浸潤、転移と関連があることが知られており、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¹⁰⁻¹³⁾。

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。その中で腎癌における糖脂質発現の特徴を調べたところ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)の発現増加を認め、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¹⁴⁾。これらのカングリオシドの構造解析を行った結果、mono-sialyl globopentaosil ceramide(MSGb5)、di-sialyl globopentaosil ceramide(DSGb5) 及び N-acetyl galactosyl di-sialyl lactotetraosil ceramide(GalNAcDSLc4)を新規構造物として同定した^{15, 16)}。さらにこれらのカングリオシドに対してモノクローナル抗体(RM1、5F3、RM2)を作成し腎癌凍結切片の免疫染色を施行したところ、原発巣にグロボシリーズ糖脂質である DSGb5、MSGb5 の発現増加をみとめる腎癌では転移のリスクが高く、核異型度が高い事を示唆するデータが得られた^{17, 18)}。また当教室で行ったヒト腎癌培養細胞を用いた最近の研究により DSGb5

はNK細胞表面に抑制性レセプターとして発現する siglec7 と結合してNK細胞の細胞障害活性を抑制し免疫からの寛容を得ることが確認され、腎癌細胞における DSGb5 の発現は免疫系を介して腎癌の転移に有利な方向に関与していることを示唆する知見が得られている^{19, 20)}。

一方当教室の研究では、前立腺癌と糖鎖抗原に関して DSGb5 と同様のジシアロガングリオシド構造を持つ GaINAcDSLc4 はグリソンスコアが高い前立腺癌で高発現しており、前立腺全摘後の PSA 再発との関連がみられ²¹⁾、また去勢抵抗性前立腺癌細胞では MSGb5 の発現が増加することを示している（當麻武信博士東北大学学位論文）。MSGb5、DSGb5 はともにグロボシリーズの糖脂質であり DSGb5 の糖鎖構造は MSGb5 に1個のシアル酸が負荷した構造でありきわめて類似していることから、DSGb5 の発現が前立腺癌の悪性化に何らかの関与をしていることが推察された。

そこで本研究では、1：ホルマリン固定パラフィンブロックで保管されている前立腺癌組織での抗 DSGb5 モノクローナル抗体 5F3 を用いた免疫染色法の確立、2：前立腺癌組織における DSGb5 の発現と臨床病理学的因子との関連を調べ、バイオマーカーとしての可能性について検討する事を目的とした。

3 目的

前立腺癌の悪性度の客観的な指標となる新規バイオマーカーを探索することを目的として、初めに抗 DSGb5 モノクローナル抗体 5F3 を用いた再現性のある安定した免疫染色方法を確立し、続いて臨床応用の可能性を探るために前立腺癌患者の前立腺全摘標本を用いて DSGb5 の発現と予後との関連について検討した。

4 研究材料と方法

4.1 細胞株と細胞培養

腎癌培養細胞株 ACHN は、腎癌肺転移をきたした 22 歳白人男性の癌性胸水より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²⁰⁾。細胞培養は、DMEM (Gibco-Invitrogen, CA, USA) に 10% FBS を加えた培地を用いて 37°C、水蒸気飽和、5%CO₂ 存在下で培養した。

4.2 抗体

抗体に関しては以下の抗体を使用した

Mouse IgM anti-DSgb5 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ことが TLC 免疫染色及び ELISA にて示されている¹⁷⁾。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もつものであるが、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る。Monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen clone MIB-1 及び Monoclonal mouse anti-human cytokeratin, high molecular weight clone 34 β E12 は Dako (North America, Carpinteria, CA, USA) より購入した。陰性コントロールである Mouse IgM は Immunotech (Marseille, France) より購入した。

2 次抗体として、抗マウス標識ポリマー EnVision™ System-HRP は Dako Japan (Tokyo,

Japan)、ヒストファイン SAB-PO (M) キットは Nichirei 社 (Tokyo, Japan) より購入した。表 1 に MSGb5、DSGb5 糖脂質の構造と対応するモノクローナル抗体を示す。

4.3 フローサイトメトリー (FACS)

培養細胞を EDTA 入りのトリプシンを加えて剥離し、細胞数が 1×10^5 /ml 以上になるように血清含有の DMEM で懸濁し、96 ウェルプレートに $200 \mu\text{l}$ ずつ分注した。1200rpm、 4°C 、3 分間遠心後、上清を除去し、1%BSA 入りの PBS で洗浄した。mAb 5F3 は 4°C 、1 時間反応させ、ネガティブコントロールには normal mouse IgM を用いた。洗浄後、二次抗体として Fluorescein-Labeled Affinity Purified Antibody to Mouse IgG + IgM を 4°C 、1 時間反応させて蛍光標識を行い、PBS で洗浄後に懸濁し、FACS を用いて抗体活性の確認を行った²²⁾。

4.4 標本作成

前立腺全摘後、組織は 10%中性ホルムアルデヒドで固定したのちパラフィンに包埋した。一度病理診断に使用した後に保存された検体を使用した。癌が多発している場合は最大腫瘍径の癌 (Index cancer) と正常組織を含むブロックをマイクロームにて $3 \mu\text{m}$ の厚さで薄切し、MAS コートスライドグラス (Matsunami Glass Osaka, Japan) 上へのせ 47°C で進展させ固定しパラフィン切片を作成した。

4.5 免疫染色

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノールで脱水したのち、 $0.3\% \text{H}_2\text{O}_2$ メタノールで 10 分間処理し内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。5F3 免疫染色

切片については 0.01M クエン酸緩衝液 (pH7.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C、5 分間の加圧熱処理を行い、Ki-67、34βE12 免疫染色については 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬しオートクレーブ 121°C、5 分間の加熱処理をして抗原賦活化を行った。一次抗体として 5F3 は抗体産生ハイブリドーマ培養上清、300 倍希釈した抗 Ki-67 モノクローナル抗体 MIB-1 及び 100 倍希釈した 34βE12 を 100 μl 滴下し、湿潤箱中に 4°C で一晩静置した。PBS で洗浄したのち、5F3 は EnVision™System-HRP、MIB-1 と 34βE12 はヒストファイン SAB-P0 (M) キットを用いて 2 次抗体を室温 30 分反応させた。発色は DAB (3,3-diaminobensidine, tetrahydrochloride) で 5 分を行い、ヘマトキシリンにて核染色を行い、脱水、透徹、封入し標本を作製した。陰性コントロールとして一次抗体に IgM を使用した。

4.6 染色性の評価

5F3 免疫染色の判定は弱拡大で全体を鏡し、2 人の研究者により評価を行った。内因性陽性コントロールである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、染色強度にばらつきがみられた場合は陽性所見の強い領域が癌部の 10%以上認めれば陽性所見が強い領域を有意な所見とした。さらに癌部が陽性から強陽性 (2+, 3+) の所見を認めたものを 5F3 免疫染色陽性前立腺癌とし、陰性から弱陽性 (0, 1+) 所見のものを 5F3 免疫染色陰性前立腺癌とした (図 2)。この判定基準は当教室で報告した前立腺癌に対する RM2 免疫染色の判定基準に従った^{21, 23)}。

Ki-67 陽性率は 200 倍の視野にてカウントした総計 500 個以上の核数のうち染色陽性のものの比率を算出した (KI-67 labeling index)²⁴⁾。

4.7 薄層クロマトグラフィ (Thin-layer chromatography: TLC) にて各種抗原賦活化処理でのガングリオシドの糖鎖変化を評価

DSGb5 と同様にジシアロガングリオシド構造を持つ GD1a (Wako, Osaka, Japan) 1mg にクロロホルム/メタノール (1:1) を 1ml 加えて溶解し pyrex tube (Asahi techno Grass) に 100 μ l ずつ分注。それぞれのチューブに 50mM Tris-HCl (pH9.0, 25°C; pH 6.5, 121°C)、50mM Tris-HCl (pH7.6, 25°C; pH 5.0, 121°C)、0.01M クエン酸 (pH7.0)、0.01M クエン酸 (pH6.0)、を 1ml 加えて賦活化の条件である 121°C、5 分加温。室温まで冷却したサンプルを bond elute C18 cartridge (Varian 1210-2052) にアプライし、塩などの極性物質を洗い流した後、chloroform/methanol (2:1, v/v) で糖脂質を溶出させた。圧縮窒素下で溶媒を蒸散し chloroform/methanol (1:1, v/v) を 100 μ l 加えて、sonication で十分に溶解した。HPTLC Plate (Baker, Philipsburg, NJ, USA) に 5 μ l ずつスポットし chloroform/methanol/0.5% aqueous CaCl₂ (50:40:10, v/v/v) を溶媒とする展開槽で展開した。0.5% オルシノール / 2N 硫酸をスプレーし 110°C に加熱、化学発色した糖脂質のバンドをスキャナーに取り込み、糖脂質の発現を解析した^{16, 25)}。

4.8 対象症例

2005年1月から2007年12月まで当科にて前立腺癌に対して前立腺全摘術を施行した147例のうち、術前ホルモン療法を行った13例、導管癌1例、癌が微小であり同定できなかった1例、免疫染色が不良にて判定が出来なかった2例を除外した130例で検討を行った。本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認され(承認番号 2012-1-41)、すべての患者には十分なインフォームドコンセントを行い同意を得た検体を使用した。

摘出標本は、前立腺癌取扱い規約第4版に基づいた検体処理後に病理部で5mmのstep sectionを作成して本施設の病理医(M. W)が病理診断した。前立腺癌の再発(PSA再発)は前立腺癌取扱い規約で定められた定義に従い、前立腺全摘術後PSAが0.2ng/ml未満である場合再発なしとし、前立腺全摘後0.2ng/mL未満となったPSAが2回連続で0.2ng/mL以上に上昇した場合初回の変化日を再発日と規定した。術後一度もPSAが0.2ng/mL以下とならなかった場合は手術日の時点での再発と判定した。PSA再発は局所再発や転移など臨床的再発が出現する以前のイベントであるが、その後の臨床的再発と関連が高く再発の代用エンドポイントとして広く用いられている²⁶⁻²⁸⁾。

4.9 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、5F3染色、グリソンスコアによる非再発生存率の比較はKaplan-meier法とLog-rank testにて検討した。非再発生存率に関する単変量解析、

多変量解析は Cox proportional hazards model にて検討した。

解析は統計ソフト JMP10 (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 結果

5.1 5F3 抗体活性の確認

DSGb5 高発現細胞である ACHN 細胞²⁹⁾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から作成した培養上清中の 5F3 抗体活性の確認を 6 か月に 1 回以上の割合で行った。Normal mouse IgM をコントロールとし一次抗体に 5F3 を用いて比較し 5F3 の抗体活性が充分であることを確認し使用した(図 3)。

5.2 免疫染色法の確立

凍結切片における 5F3 の免疫染色法は確立されていたが¹⁷⁾、ホルマリン固定パラフィン包埋切片においては凍結切片と同一の染色法では非特異的反応が認められ再現性が得られなかった(図 4A)。加熱による抗体賦活化(Heat-induced epitope retrieval, HIER)を行ったところ非特異的反応が抑制されたため(図 4B)、最適な賦活化法について検討をおこなった。熱源にオートクレーブを用い、緩衝液を① 0.01M クエン酸バッファー(pH 6.0)、② 0.01M クエン酸バッファー(pH 7.0)、③ 50mM Tris-HCl (pH 7.6, 25°C; pH 5.0, 121°C)、④ 50mM Tris-HCl (pH 9.0, 25°C; pH 6.5, 121°C)の4種で検討を行ったところ、pH7.0 クエン酸にて特異的かつ最も強く陽性所見を認めた。緩衝液の違いによる DSGb5 の抗原性の変化を確認するために DSGb5 と同じジシアロシル構造をもつ糖脂質 GD1a を用い、121°C、5 分の加熱を加えることで各々の緩衝液に浸漬した糖鎖構造がどのように変化したか TLC にて検討した。pH 6.0 のクエン酸緩衝液および 50mM Tris-HCl (pH 7.6, 25°C; pH 5.0, 121°C) 緩衝液では加熱により GD1a のシ

アル酸が加水分解されて、GD1aの一部がモノシアロシル構造のGM1に変化したが、pH 7.0のクエン酸緩衝液では加熱によってもシアル酸の加水分解が生じないことが確認された(図5)。即ち前立腺癌におけるDSGb5も高温酸性条件下の賦活化で、GD1aと同様にシアル酸の加水分解が生じジシアロシル構造がモノシアロシル構造に変化している可能性が示唆された。

2次抗体以降の染色法では、SAB法を用いると内因性ビオチンによる非特異的反応が見られたため、内因性ビオチンに反応しないポリマー法を用いた染色を行うことで非特異的反応が抑えられ、再現性をもった免疫染色が可能となった(図6)。

5F3免疫染色のプロトコールを図7に示す。このプロトコールに従ってDSGb5の局在が明らかな正常腎組織の免疫染色を行ったところ^{17, 29)}、DSGb5が発現している近位尿細管に陽性像を認め、DSGb5が発現していないとされる遠位尿細管、糸球体では陽性像は認めなかった。

5.3 前立腺組織と前立腺癌におけるDSGb5の発現

正常の前立腺腺管は腺上皮細胞と基底細胞の2種類から構成され、腺上皮細胞から癌が発生すると考えられている³⁰⁾。5F3による免疫染色の結果、正常前立腺腺管では腺上皮細胞の細胞質と細胞膜が陽性から強陽性(2+, 3+)に染色された。基底細胞や間質は染色されなかった。前立腺癌細胞は染色陰性から強陽性まで幅広い染色パターンを認めた。そこで腺上皮細胞を内因性陽性コントロールとして前立腺癌細胞の染色強度を評価した。腺上皮細胞を内因性陽性コントロールにとることによって、陰性例が

標本固定から染色操作の過程において抗原性が失活した為でない事を確かめることが可能となる。

図8に正常腺管を含むグリソンパターン3の前立腺癌のHE染色(上段)、5F3(中段)、34βE12(下段)の免疫染色例を示す。34βE12免疫染色では基底細胞の細胞質が陽性である(黒矢印)。5F3免疫染色で腺上皮細胞は強陽性であるが(白矢印)、基底細胞は染色陰性であった。この標本中の前立腺癌細胞(黄△)は内因性陽性コントロールと比較し染色陰性であった。

図9(A-D)に正常腺管を含むグリソンパターン4の前立腺癌の5F3免疫染色陰性(0)、弱陽性(1+)、陽性(2+)、強陽性(3+)の染色例を示す。

5.4 患者背景と5F3免疫染色との関係

患者背景を表2に示す。評価観察期間の中央値は50.5月(0-96)であり、前立腺全摘後のPSA再発は17例(13%)で認めた。D'Amicoリスク分類³⁾では低リスク群18例、中間リスク群84例、高リスク群28例であった。130例中、5F3免疫染色は各々、陰性例(0)32例、弱陽性(1+)49例、陽性(2+)26例、強陽性(3+)23例であった。

High-grade prostatic intraepithelial neoplasia(HGPIN)は130例中35例で認め、その内21例(60%)で5F3免疫染色陽性(2+、3+)、14例(40%)で5F3免疫染色陰性(0、1+)であった(図9 E、F、黒△)。HGPINは35例とごく少数での発現しか認められず、同一症例における癌部とHGPINの間にDSSGb5の発現の相関は確認できなかった。

5.5 DSGb5 の発現と病理学的因子との関連

5F3 免疫染色をグリソンスコア別で比較したところ、グリソンスコア 6、7、8、9 で 5F3 陽性前立腺癌の割合はそれぞれ 21%、39%、42%、40%であり、グリソンスコアと 5F3 での染色比率との間に有意な関連は認めなかった(図 10 $p=0.6169$)。5F3 免疫染色と種々の臨床病理学的因子との関連を調べたところ、5F3 陽性前立腺癌では脈管浸潤陽性率が有意に高かった($p=0.0023$)。しかし病理学的病期、腫瘍径、Ki-67 LI との関連は認めなかった(表 3)。

5.6 前立腺全摘後の PSA 再発との関連

前立腺癌全摘標本での 5F3 免疫染色陽性前立腺癌では、5F3 免疫染色陰性前立腺癌と比較して前立腺全摘後の PSA 再発を有意に多く認めた。(図 11A log rank $p=0.0220$)。さらにグリソンスコア 7(3+4、4+3)の 99 人を対象とした検討ではグリソンスコア 3+4 と 4+3 で比較した場合は PSA 再発に有意差を認めなかった(図 11B log rank $p=0.2791$)。一方 5F3 陽性前立腺癌では PSA 再発を有意に多く認めた(図 11C log rank $p=0.0056$)。

5.7 前立腺全摘後の PSA 再発に影響する種々の因子に関する単変量解析および多変量解析

表 4 に前立腺全摘後の PSA 再発に影響する種々の因子に関する単変量解析と多変量解析の結果を示す。単変量解析では pT3、グリソンスコア 8 以上、脈管浸潤、最大腫瘍径、切除断端陽性、5F3 陽性前立腺癌で前立腺全摘後の PSA 再発に有意差を認めた。多変量解析ではグリソンスコア、最大腫瘍径、切除断端陽性、5F3 陽性前立腺癌が PSA

再発の独立した予測因子であった。

6 考察

当科のこれまでの研究では各種泌尿器科癌における糖鎖発現と臨床像を比較検討し、泌尿器科癌における糖鎖発現の役割を明らかにしてきた。その中で腎癌細胞から新規に同定された糖脂質 DSGb5 の機能として NK 細胞の細胞障害能の抑制や腎癌細胞の運動能を亢進することがこれまでの研究で明らかにされた²⁰⁾。しかし前立腺癌での機能に関しては不明であった。そこで本研究では抗 DSGb5 モノクローナル抗体 5F3 による免疫染色法の確立と、前立腺癌における DSGb5 の役割について検討した。

ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた免疫染色ではホルマリン固定による抗原性の低下が問題となるが、その対応の一つとして抗原の活性を賦活化する方法がある。その中で高熱を用いた抗原賦活化法(HIER)は簡便で抗原の反応性を非常に高める有効な方法である³¹⁾。しかし加熱の方法、加熱温度、加熱時間、加熱時に使用する緩衝液とその pH などの組み合わせは多様である。また加熱による賦活化ではしばしば内因性ビオチンが再活性化することがあり、非特異的反応が起こりうる³²⁾。従って最適な賦活化法と内因性酵素による非特異的反応を抑えた染色法を確立することで再現性のある染色が可能となる。またシアル酸を有するガングリオシドである DSGb5 は高温の酸性溶媒中では容易に加水分解によって脱シアル化を来して糖鎖構造が変化するので、加熱による賦活化において pH が低下しにくい緩衝液を選択することが肝

要である。Tris-HCl 緩衝液は高温下では pH が低下することが示されており、25°C で pH 7.6、9.0 であっても 121°C では、それぞれ pH 5.0、6.5 となることから、Tris-HCl 緩衝液による HIER により前立腺癌における DSGb5 のジシアロシル構造の加水分解が生じ、抗原性が低下したと考えられた。一方クエン酸緩衝液の pH は高温下でも変化しないためクエン酸バッファー (pH 7.0) による賦活化が最も適していると考えられた。

今回の免疫染色法の検討の結果、シアル酸の加水分解を起こさずに糖鎖構造が保つためには 0.01M クエン酸緩衝液 (pH7.0) を用いた HIER が最適であり、また内因性ビオチンによる非特異的反応を避けるために検出法はビオチンの影響を受けないポリマー法を用いることで再現性のある免疫染色法を確立するに至った。その方法を用いた結果正常前立腺と前立腺癌に特徴的な染色がみられた。正常前立腺では腺上皮細胞は強く染色されたが基底細胞は染色されなかった。また間質も染色されなかった。一方前立腺癌細胞はグリソンスコアに関連なく染色されないものから強く染色されるものまでバラエティーに富んでいた。特にその中で強く染色される前立腺癌は予後不良であった。

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出現パターンが変化する^{33, 34)}。例えば正常腎の近位尿細管に発現している糖鎖抗原であるシアロシルジフコシル Le^x は癌化に伴い発現が変化し、癌の悪性度が高くなると発現が低下することが当教室での研究で明らかになっている³⁵⁾。また DSGb5 と同じグ

ロボシリーズ糖脂質である stage-specific embryonic antigen 3、4 (SSEA-3、SSEA-4) はマウス胎児期に発現しその後分化の過程で消失するが奇形癌で再び発現が認められる³³⁾。SSEA-3、SSEA-4 はそれぞれ Gb5、MSGb5 と同一の糖脂質であり、DSGb5 ときわめて類似した構造であり DSGb5 も前立腺癌の分化の過程で発現様式が変化する分化抗原としての役割を有することが推察された。免疫染色の結果と合すると DSGb5 の発現パターンは正常腺管細胞に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考えられた。

HGPIN は 130 例中 35 例 (27%) で認め、その内 14 例 (40%) で 5F3 免疫染色陰性であった。HGPIN は基底細胞を有するが大型の核小体を有し核、細胞質の異形が癌と鑑別が難しい病変であり、前立腺癌と同様に辺縁領域に好発し分子学的変化に癌との類似性が認められ前癌病変と考えられている^{36, 37)}。HGPIN は低悪性度の前立腺癌に伴うことが多く³⁸⁾前癌病変と考えられている HGPIN の染色意義としては、5F3 免疫染色陰性の HGPIN では陽性の HGPIN とくらべ、初期の癌に近い性質があると推察された。

臨床病理学的因子と 5F3 免疫染色との検討では 5F3 陽性前立腺癌では脈管浸潤が有意に多く見られた。しかし細胞の増殖を反映する Ki-67 LI や腫瘍径とは有意な関連を認めなかった。このことは前立腺癌における DSGb5 の役割は増殖よりも浸潤能を亢進することによって前立腺癌の再発にかかわっていると推察され、腎癌における DSGb5 の役割に類似していると考えられた。さらに多変量解析の結果、グリソンスコア、最大腫瘍径、切除断端陽性と共に独立した再発予測因子であった。つまり DSGb5

高発現前立腺癌(5F3 免疫染色陽性前立腺癌)では PSA 再発のリスクの高い患者を予測することができると考えられた。

今回の研究から DSGb5 の前立腺癌での機能および発現意義は、浸潤能の亢進により病理学的因子の中では脈管侵襲と相関し、臨床的には前立腺全摘後の PSA 再発の予測因子となり得、多変量解析の結果からグリソンスコアとは異なる観点から癌の悪性度を反映していると推察された。さらに分化により発現が変化する分化抗原と考えられた。

前立腺全摘術後の PSA 再発症例に対する救済療法に関しては十分なエビデンスがないのが現状であるが、救済放射線療法による癌特異的生存率の向上が報告されている³⁹⁾。本研究の結果から再発リスクの高い患者を予測し慎重に経過観察する事により、再発症例に対して早期に救済療法を行うことが可能になると考えられる。また前立腺生検組織に応用し前立腺癌診断時のリスク分類に組み込むことで、従来のリスク分類で問題となっていた中リスク、高リスク前立腺癌で個々のリスクを正確に反映していないという問題を解決し、理想的な前立腺癌治療を個々の患者に提供可能になると考えられる。今後前立腺生検組織に対する 5F3 免疫染色と予後との関連について検討を行い臨床応用の可能性を追求し、さらに血清や尿中の糖鎖合成酵素遺伝子の発現解析や DSGb5 の発現を解析し、遺伝子レベルでの発現と臨床像との関連を検討する必要がある。

前立腺癌に発現する糖鎖抗原をターゲットとした 5F3 免疫染色法はこれまでのリス

ク分類とは別の観点から予後を予測する前立腺癌のバイオマーカーとなり得ることが本研究で示唆された。臨床応用での確立に向けてさらなる研究が望まれる。

7 結語

クエン酸緩衝液 (pH7.0) を用いた加熱による賦活化とポリマー法による検出により再現性のある 5F3 免疫染色法を確立した。その結果、5F3 陽性前立腺癌では前立腺全摘後の PSA 再発が有意に多く見られた。

これまでのリスク分類とは異なり細胞自体の悪性度を反映したバイオマーカーとなり得ることが示唆され、今後さらなる研究により臨床応用での確立を目指したい。

謝辞

本研究にあたり、終始後指導御鞭撻を承りました東北大学医学系研究科泌尿器科分野講師伊藤明宏先生に深く感謝いたします。また本研究の機会を与えていただいた事を、東北大学医学系研究科泌尿器科分野教授荒井陽一先生に深く御礼申し上げます。

8 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) Newcomer LM, Stanford JL, Blumenstein BA et al. Temporal trends in rates of prostate cancer: declining incidence of advanced stage disease, 1974 to 1994. *The Journal of urology*. 1997; 158: 1427-30.
- 3) D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1998; 280: 969-74.
- 4) Sylvester JE, Blasko JC, Grimm PD et al. Ten-year biochemical relapse-free survival after external beam radiation and brachytherapy for localized prostate cancer: The Seattle experience. *Int J Radiat Oncol*. 2003; 57: 944-52.
- 5) Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports Part 1*. 1966; 50: 125-8.
- 6) Partin AW, Carter HB, Chan DW et al. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *The Journal of urology*. 1990; 143: 747-52.

- 7) 三塚浩二, 江里口智大, 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*. 2008; 120: 103-4.
- 8) Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB et al. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2005; 29: 1228-42.
- 9) Kawamorita N, Saito S, Ishidoya S et al. Radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: biochemical outcome. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2009; 16: 733-8.
- 10) Hakomori S, Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983; 71: 231-51.
- 11) Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Advances in cancer research*. 1989; 52: 257-331.
- 12) Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer research*. 1996; 56: 5309-18.

- 13) Ishimura H, Takahashi T, Nakagawa H et al. N-acetylglucosaminyltransferase V and beta1-6 branching N-linked oligosaccharides are associated with good prognosis of patients with bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006; 12: 2506-11.
- 14) Saito S, Orikasa S, Ohyama C et al. Changes in glycolipids in human renal-cell carcinoma and their clinical significance. *International journal of cancer*. 1991; 49: 329-34.
- 15) Saito S, Lavery SB, Salyan ME 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. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269: 5644-52.
- 16) Ito A, Lavery SB, Saito S et al. A novel ganglioside isolated from renal cell carcinoma. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276: 16695-703.
- 17) 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. *Glycoconjugate journal*. 2001; 18: 475-85.

- 18) Saito S, Orikasa S, Satoh M et al. Expression of globo-series gangliosides in human renal cell carcinoma. *Japanese journal of cancer research : Gann.* 1997; 88: 652-9.
- 19) Ito A, Handa K, Withers DA et al. Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression. *FEBS letters.* 2001; 504: 82-6.
- 20) Kawasaki Y, Ito A, Withers DA et al. Ganglioside DSGb5, preferred ligand for Siglec-7, inhibits NK cell cytotoxicity against renal cell carcinoma cells. *Glycobiology.* 2010; 20: 1373-9.
- 21) Saito S, Egawa S, Endoh M et al. RM2 antigen (beta1,4-GalNAc-disialyl-Lc4) as a new marker for prostate cancer. *International journal of cancer.* 2005; 115: 105-13.
- 22) Aoki H, Satoh M, Mitsuzuka K et al. Inhibition of motility and invasiveness of renal cell carcinoma induced by short interfering RNA transfection of beta 1,4GalNAc transferase. *FEBS letters.* 2004; 567: 203-8.
- 23) Saito S, Murayama Y, Pan Y et al. Haptoglobin-beta chain defined by monoclonal antibody RM2 as a novel serum marker for prostate cancer. *International journal of cancer.* 2008; 123: 633-40.

- 24) Bubendorf L, Sauter G, Moch H et al. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *The Journal of pathology*. 1996; 178: 437-41.
- 25) Nakamura K, Suzuki M, Taya C et al. A sialidase-susceptible ganglioside, IV3 alpha (NeuGc alpha 2-8NeuGc)-Gg4Cer, is a major disialoganglioside in WHT/Ht mouse thymoma and thymocytes. *Journal of biochemistry*. 1991; 110: 832-41.
- 26) Freedland SJ, Sutter ME, Dorey F et al. Defining the ideal cutpoint for determining PSA recurrence after radical prostatectomy. Prostate-specific antigen. *Urology*. 2003; 61: 365-9.
- 27) Schild SE, Wong WW, Novicki DE et al. Detection of residual prostate cancer after radical prostatectomy with the Abbott IMx PSA assay. *Urology*. 1996; 47: 878-81.
- 28) Amling CL, Bergstralh EJ, Blute ML et al. Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point? *The Journal of urology*. 2001; 165: 1146-51.
- 29) 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. *The Biochemical journal*. 2007; 402: 459-70.

- 30) Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*. 2009; 461: 495–500.
- 31) Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1991; 39: 741–8.
- 32) Bussolati G, Gugliotta P, Volante M et al. Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Histopathology*. 1997; 31: 400–7.
- 33) Kannagi R, Cochran NA, 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. *The EMBO journal*. 1983; 2: 2355–61.
- 34) Fukushi Y, Orikasa S, Shepard T et al. Changes of Lex and dimeric Lex haptens and their sialylated antigens during development of human kidney and kidney tumors. *The Journal of urology*. 1986; 135: 1048–56.

- 35) Fukushi Y, Ohtani H, Orikasa S. Expression of lacto series type 2 antigens in human renal cell carcinoma and its clinical significance. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989; 81: 352–8.
- 36) Gonzalgo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. *The Journal of urology*. 2003; 170: 2444–52.
- 37) Haggman MJ, Macoska JA, Wojno KJ et al. The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *The Journal of urology*. 1997; 158: 12–22.
- 38) Eminaga O, Hinkelammert R, Abbas M et al. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: existence of HGPIN near prostate cancer. *The Prostate*. 2013; 73: 1115–22.
- 39) Trock BJ, Han M, Freedland SJ et al. Prostate cancer-specific survival following salvage radiotherapy vs observation in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2008; 299: 2760–9.

9 図

図1 グリソン分類と D' Amico のリスク分類

グリソン分類(上段左)は前立腺癌にみられる組織学的形態を1から5のパターンに分類し、癌巣内の面積上最も多いものを第1優勢パターン、次いで多くみられるものを第2優勢パターンとし、その合計によってグリソンスコアを算出する方法であり細胞異型は考慮しない。上段右は第1優勢パターンが癒合腺管からなるグリソンパターン4、第2優勢パターンが小型で明瞭な管腔を有するグリソンパターン3で構成され、グリソンスコア $4+3=7$ と算出される。

D' Amico のリスク分類はPSA、グリソンスコア、臨床病期の3つを組み合わせた分類であり、治療選択に重要な役割を果たしている。

図2 5F3免疫染色における染色強度の評価基準と分類

内因性陽性コントロールである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、染色強度にばらつきがみられた場合は陽性所見の強い領域が癌部の10%以上認めれば陽性所見が強い領域を有意な所見とした。さらに癌部が陽性から強陽性(2+, 3+)の所見を認めたものを5F3免疫染色陽性前立腺癌とし、陰性から弱陽性(0, 1+)所見のものを5F3免疫染色陰性前立腺癌とした。

図3 フローサイトメトリーによる 5F3 抗体活性の確認

5F3(青)を一次抗体とし、フローサイトメトリーを行った。コントロール(赤)と比較して、5F3の抗体活性が充分であることが確認された。

図4 5F3 免疫染色の最適化

加熱による抗原賦活化の有無を検討した。抗原賦活化なしでは、非特異的反応を認め、評価可能な染色を得ることが出来なかった。賦活化することによって非特異的反応が抑制された(×100)。

図5 緩衝液による糖鎖構造の変化

シジアルシル構造をもつ糖脂質 GD1a を用いて、免疫染色と同じ賦活化条件である 121°C、5 分の加熱を加えることで、各緩衝液に浸漬した糖鎖構造がどのように変化するか検討した。クエン酸緩衝液 (pH 6.0) および Tris-HCl (pH7.6, 25°C; pH5.0, 121°C) では加熱によりシアル酸が加水分解されて、GD1a の一部が GM1 に変化した。クエン酸緩衝液 (pH 7.0) および Tris-HCl (pH9.0, 25°C; pH6.5, 121°C) では、シアル酸の加水分解が生じないことが TLC で示された。

DSGb5 も高温酸性条件下で GD1a と同様にシアル酸が加水分解されシジアルシル構造が変化し、モノシアルシル構造となったため 5F3 免疫染色での抗原性が低下したと考えられた。

図6 本研究で用いた検出法の模式図(上段)と、賦活化により再活性化した内因性ビオチンによる非特異的反応の例(下段、SAB法で染色)。

SAB法を用いると内因性ビオチンによる非特異的反応が見られた(黒矢印)。

図7 mAb 5F3 免疫染色のプロトコール

本研究で用いた5F3免疫染色のプロトコールを示す。

図8 正常前立腺組織を含む、グリソンパターン3の前立腺癌のHE染色、5F3免疫染色、34βE12免疫染色例。

34βE12は基底細胞を染色する抗体である(黒矢印)。5F3免疫染色では、正常前立腺の腺上皮細胞の細胞質、細胞膜は強く染色されるが(白矢印)、基底細胞および間質は染色されない。本症例は、内因性陽性コントロールの腺上皮細胞と対比して癌細胞(黄△)が染色されていない5F3陰性例である(×200)。

図9 正常腺管を含むグリソンパターン4の前立腺癌の5F3陰性例(A)、弱陽性例(B)、陽性例(C)、強陽性例(D)。

内因性陽性コントロールである白矢印の腺上皮細胞と黄△の癌細胞を対比して、陰性例は染色なし、弱陽性例は淡く染色、陽性例は中等度の染色、強陽性は内因性陽性コ

ントロール同等以上として判定した(A-D ×100)。(E)陽性例のHGPIN(黒△)と(F)陰性例のHGPIN(黒△)を示す(×200)。

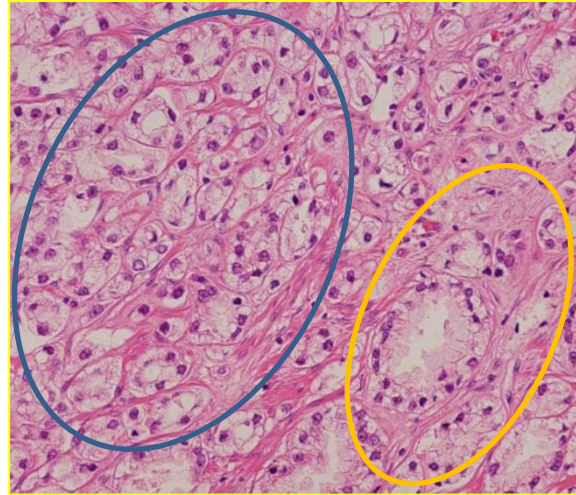
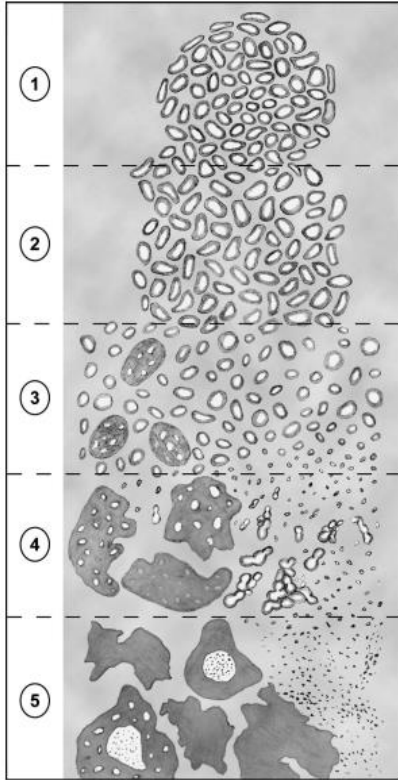
図10 グリソンスコア別の5F3陽性前立腺癌、陰性前立腺癌の割合。

グリソンスコアと染色強度との間に関連は認めなかった(p=0.6169)。

図11 カプランマイヤー法による非再発生存率の比較。

(A)全130例で、5F3陽性前立腺癌では5F3陰性前立腺癌と比較し有意に非再発生存率が低かった(log rank p=0.0220)。さらにグリソンスコア7の99症例で比較すると、

(B)グリソンスコア4+3/3+4では非再発生存率に有意差は見られなかったが(log rank p=0.2791)、(C)5F3陽性前立腺癌では5F3陰性前立腺癌と比較して有意に非再発生存率が低かった(log rank p=0.0056)。



グリソンスコア 4+3=7

青：グリソンパターン4

黄：グリソンパターン3

Epstein, J. I. Am J Surg Pathol. 2005

| 低リスク群 | 中リスク群 | 高リスク群 |
|---|---|---|
| PSA ≤ 10 かつ グリソンスコア ≤ 6 かつ T1-T2a | PSA 10.1-20 かつ/または グリソンスコア 7 かつ/または T2b | PSA > 20 または グリソンスコア 8-10 または T2c |
| | | |
| T2a: 片葉の1/2以下 | T2b: 片葉の1/2以上 | T2c: 両葉にわたる |

図1 グリソン分類(上)と D' Amico のリスク分類(下)

| 分類 | 5F3 免疫染色 陰性群 | | 5F3 免疫染色陽性群 | |
|------------------------------|--------------|----------|----------------|--------------------------|
| | 陰性 (0) | 弱陽性 (1+) | 陽性 (2+) | 強陽性 (3+) |
| 内因性 陽性コント ロールと対 比して | 染色陰性 | 淡く染色 | 弱陽性と強陽 性の中間 | 陽性コントロ ールと同等以 上に染色 |

図2 5F3 免疫染色における染色強度の評価基準と分類

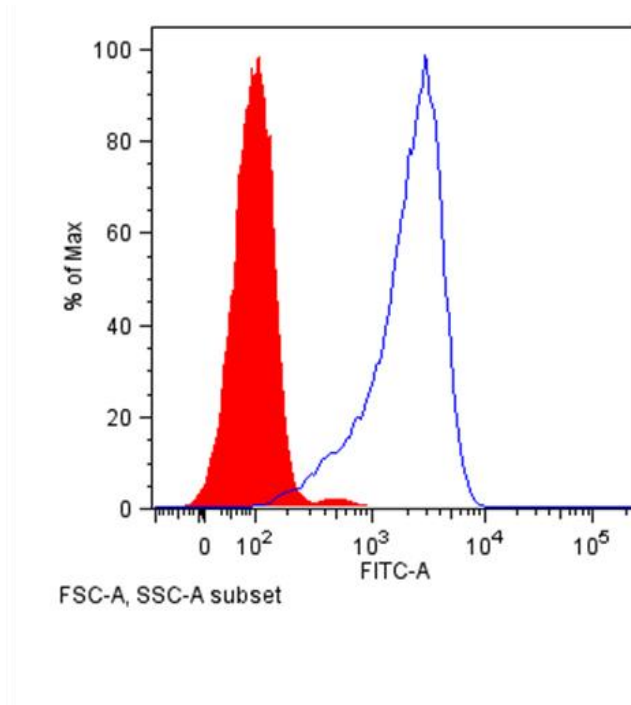
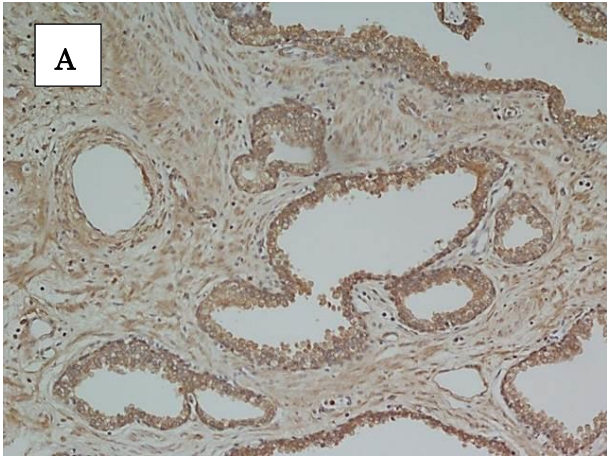
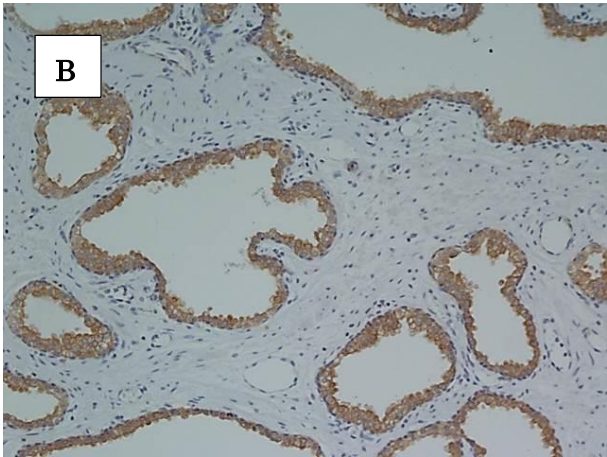


図3 フローサイトメトリーによる 5F3 活性の確認



賦活化なし



賦活化あり

図4 5F3免疫染色の最適化 抗原賦活化の有無で検討

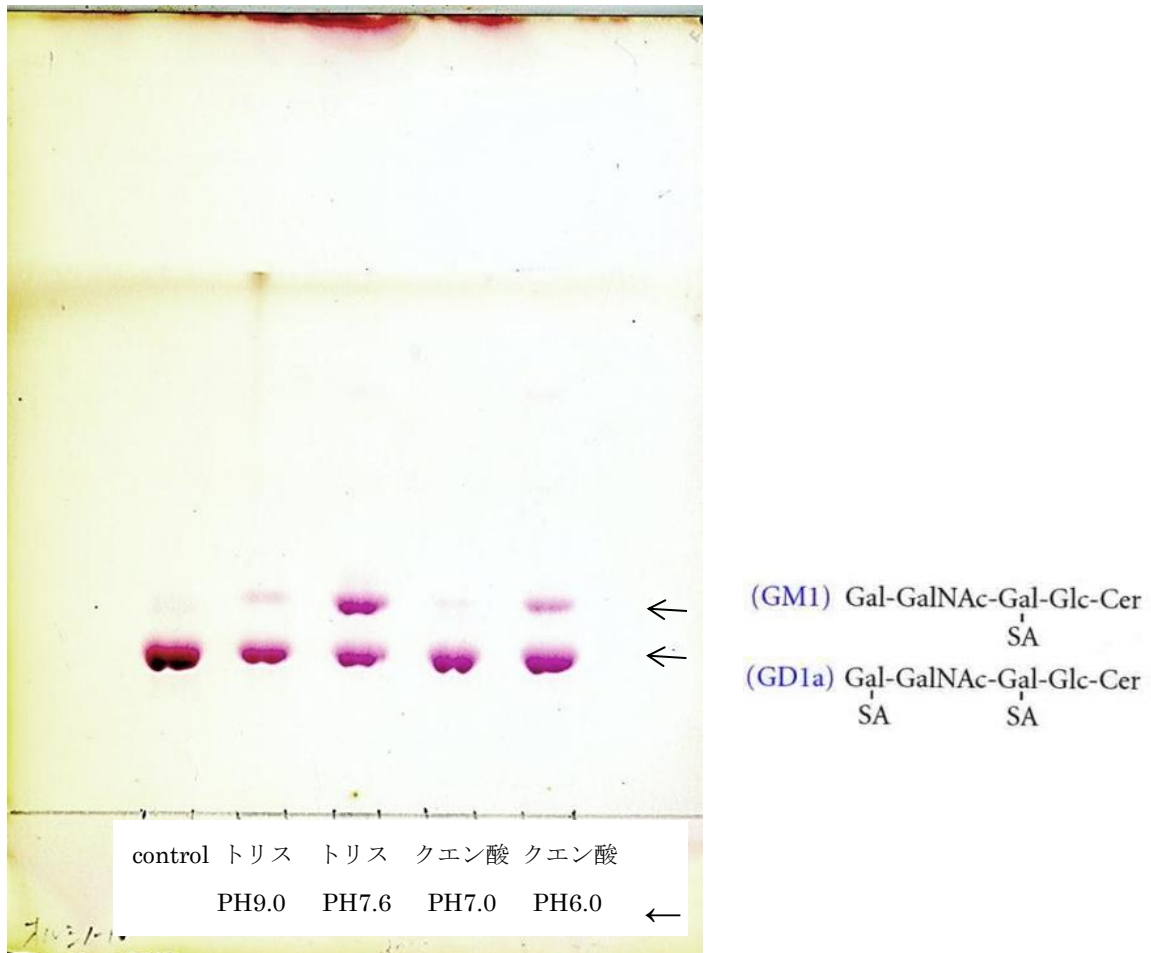
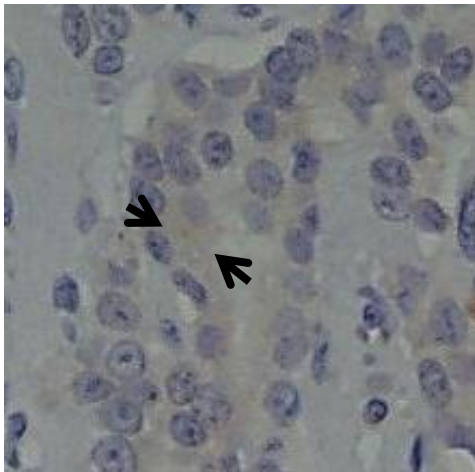
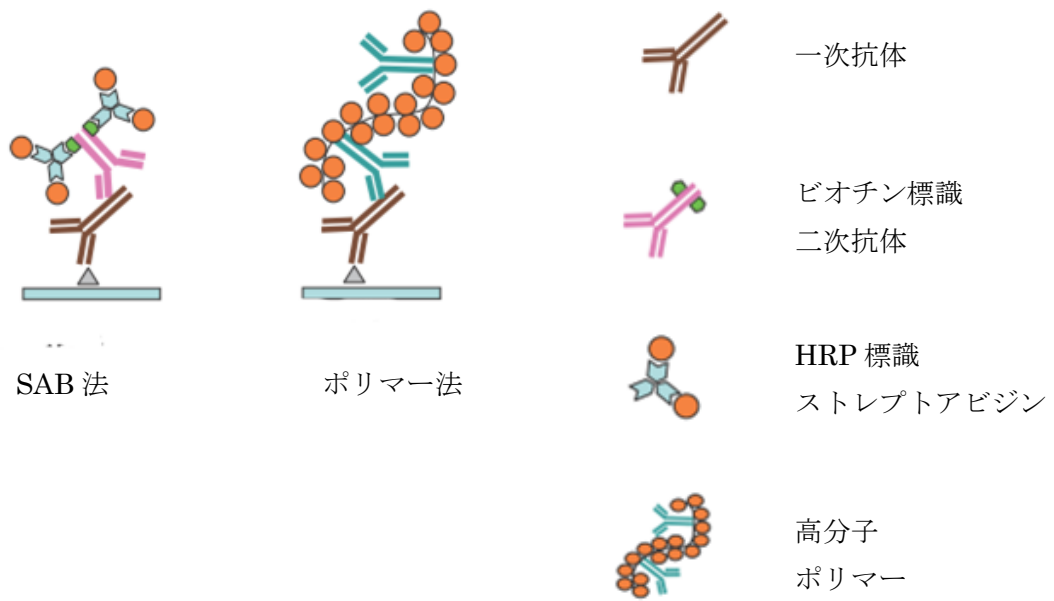


図5 賦活化に用いる緩衝液の違いで起こる糖鎖構造の変化



内因性ビオチンによる非特異的反応 (×400)

図6 免疫染色法(上)と内因性酵素による非特異的反応(下)

- ミクロトームによる薄切 (3 μm)
- 脱パラフィン
- 内因性ペルオキシダーゼ除去
 - 0.3 % H_2O_2 メタノール 10min
- 抗原の賦活化
 - 10mM クエン酸緩衝液 (PH 7.0)
 - オートクレーブ 121°C、5min
 - 室温にて冷却
- 1次抗体
 - mAb 5F3, 4°C over night
- 2次抗体
 - DAKO EnVision/HRP system、30min
- 3,3'-diaminobenzidine substrate solution、5min
- 核染 (ヘマトキシリン、1min)
- 封入

図7 mAb 5F3 免疫染色のプロトコール

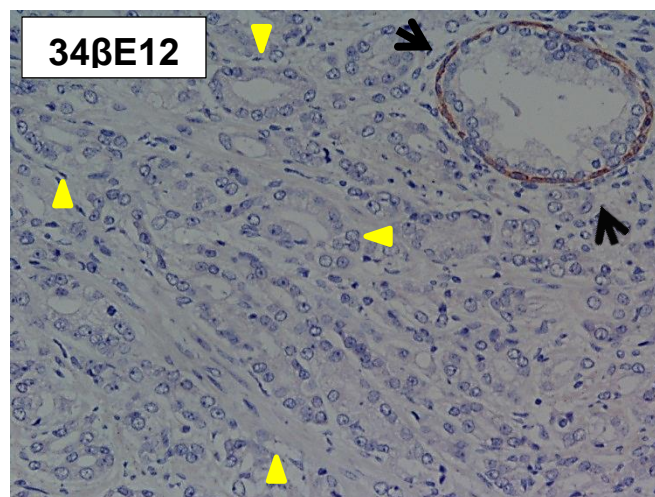
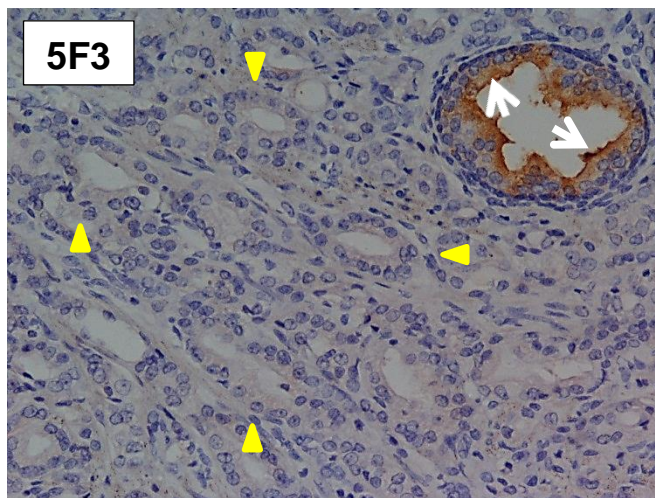
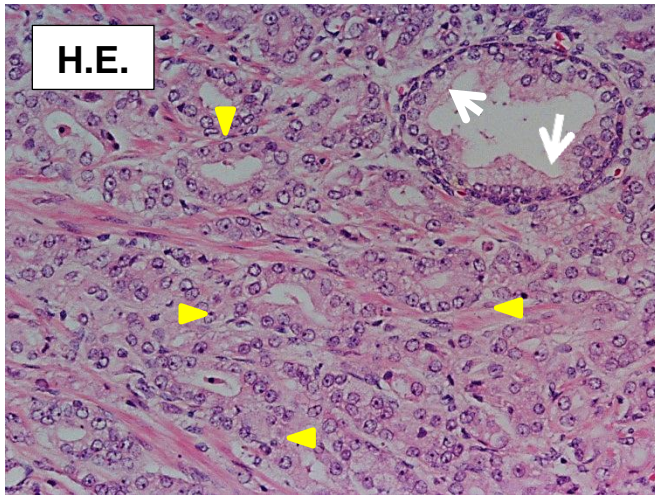
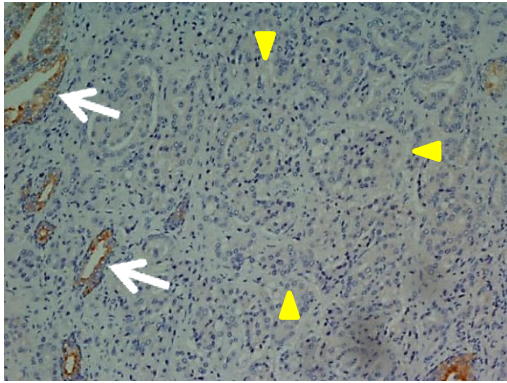
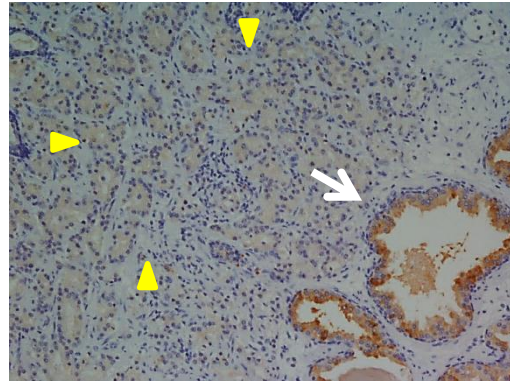


図8 正常腺管を含むグリソンパターン3の前立腺癌の染色例

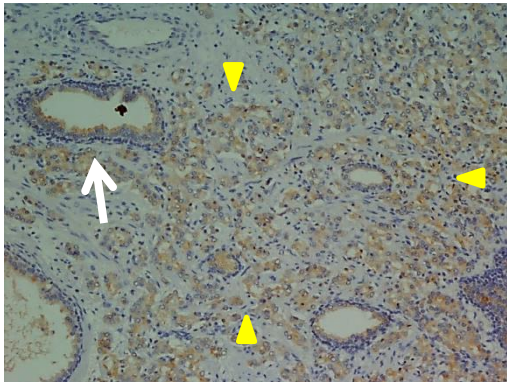
A



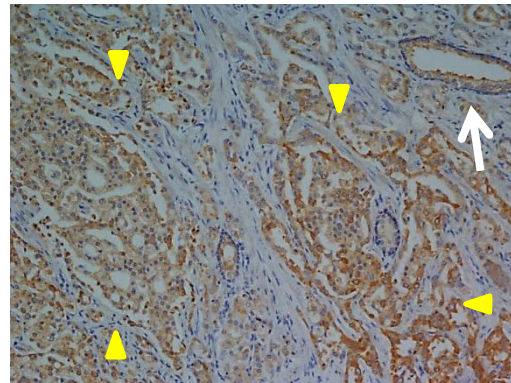
B



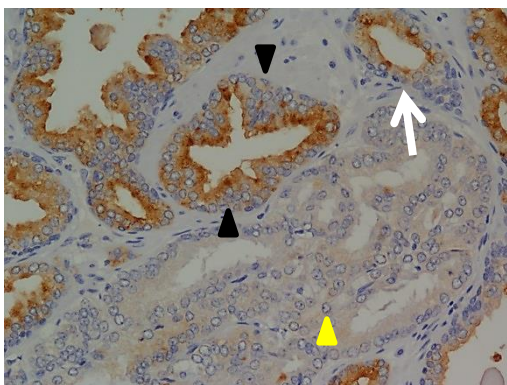
C



D



E



F

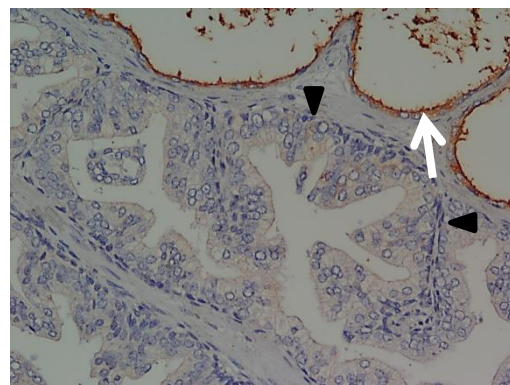


図9 正常腺管を含むグリソンパターン4の染色例と HGPIN の染色例

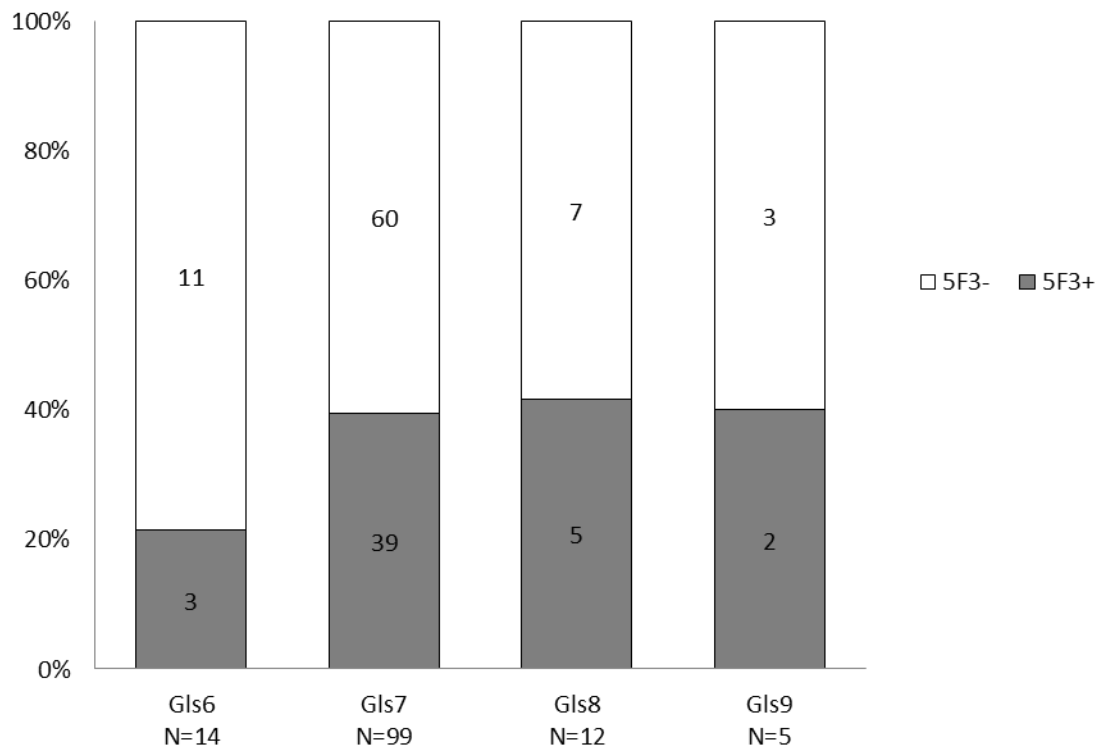


図 10 グリソンスコア別での 5F3 陽性前立腺癌、5F3 陰性前立腺癌の割合

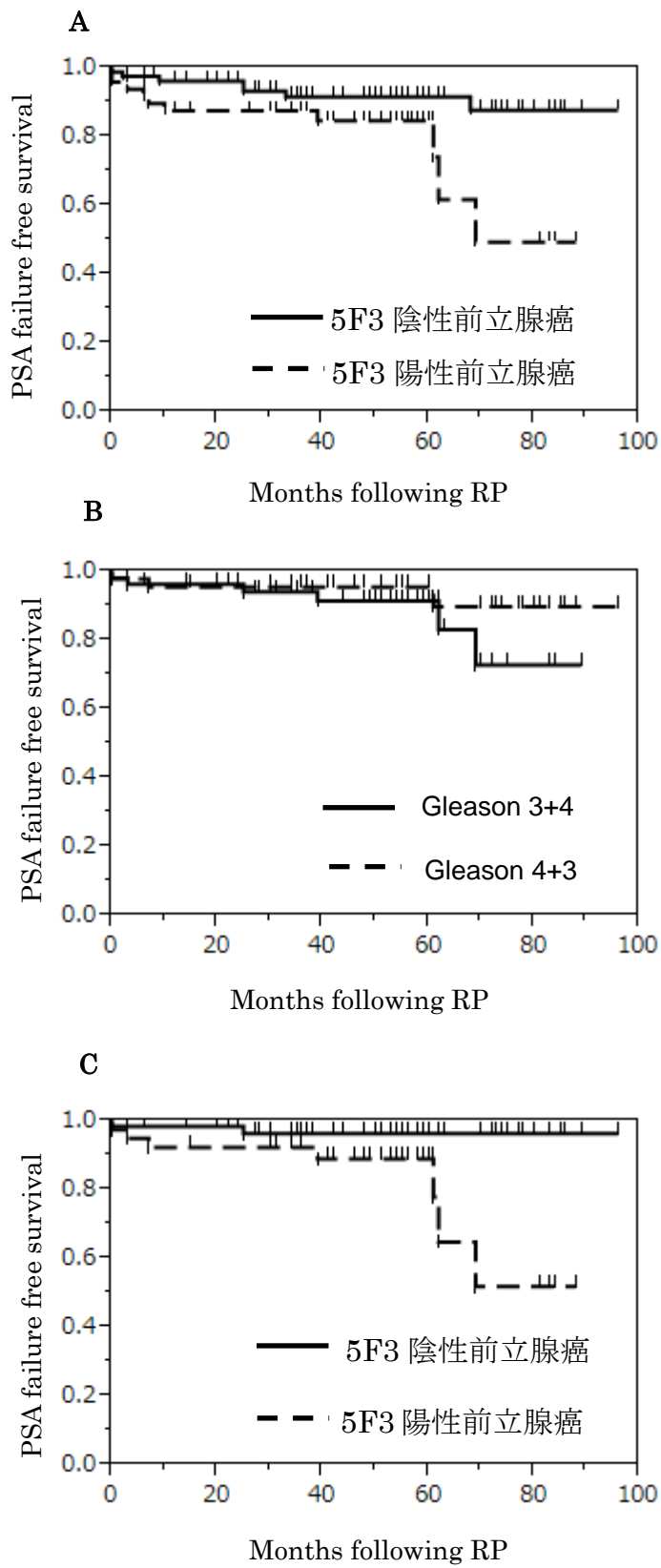


図 11 カプランマイヤー法による非再発生存率

表 1 糖脂質の構造と対応するモノクローナル抗体

| Name | Structures | mAb |
|-------|---|-----|
| MSGb5 | NeuAc α 3-Gal β 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β Cer | RM1 |
| DSGb5 | NeuAc α 3-Gal β 3[NeuAc α 6]GalNAc β 3Gal α 4Gal β Glc β Cer | 5F3 |

表 2 全患者背景

| | |
|----------------------|---------------|
| 年齢中央値 (IQR) | 62.5 (57-68) |
| PSA (ng/mL) (IQR) | 5.7 (4.4-8.3) |
| Clinical T stage | |
| 1c | 90 (69%) |
| 2a | 25 (19%) |
| 2b | 8 (6%) |
| 2c | 2 (2%) |
| 3a | 5 (4%) |
| 生検グリソンスコア | |
| 6 | 23 (18%) |
| 7 | 89 (68%) |
| 8 以上 | 18 (14%) |
| 最大腫瘍径 (cm) (IQR) | 1.5 (1.0-2.0) |
| Pathological T stage | |
| 2a | 15 (12%) |
| 2b | 0 (0%) |
| 2c | 84 (65%) |
| 3a | 27 (21%) |
| 3b | 4 (3%) |
| 摘出前立腺グリソンスコア | |
| 6 | 14 (11%) |
| 7 | 99 (76%) |
| 8 | 12 (9%) |
| 9 | 5 (4%) |
| 所属リンパ節転移 | |
| 陰性 | 130 (100%) |
| 陽性 | 0 (0%) |
| 脈管浸潤 | |
| 陰性 | 103 (79%) |
| 陽性 | 27 (21%) |
| 神経周囲浸潤 | |
| 陰性 | 59 (45%) |
| 陽性 | 71 (55%) |
| 切除断端 | |
| 陰性 | 103 (79%) |
| 陽性 | 27 (21%) |

IQR: interquartile range

表 3 5F3 陽性前立腺癌、陰性前立腺癌と各臨床病理学的因子との関係

| | 5F3 陽性前立腺癌 n=49 | 5F3 陰性前立腺癌 n=81 | p 値 |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------|
| 年齢中央値 (year) (IQR) | 64 (57-68) | 62 (57-67) | 0.7729 |
| PSA (ng/ml) (IQR) | 5.7 (4.6-8.1) | 5.7 (4.4-8.4) | 0.8176 |
| D' Amico リスク分類 | | | 0.2593 |
| 低リスク | 5 | 13 | |
| 中間リスク | 36 | 48 | |
| 高リスク | 8 | 20 | |
| 摘出前立腺 グリソンスコア | | | 0.4093 |
| 6 | 3 | 11 | |
| 7 | 39 | 60 | |
| 8 以上 | 7 | 10 | |
| Pathological T stage | | | 0.15191 |
| T2 以下 | 34 | 65 | |
| T3 以上 | 15 | 16 | |
| 最大腫瘍径 (cm) (IQR) | 1.7 (1.2-2.0) | 1.5 (1.0-1.9) | 0.0978 |
| 脈管浸潤 | | | 0.0023 |
| 陰性 | 32 | 71 | |
| 陽性 | 17 | 10 | |
| 切除断端 | | | 0.2079 |
| 陰性 | 36 | 67 | |
| 陽性 | 13 | 36 | |
| 神経周囲浸潤 | | | 0.2391 |
| 陰性 | 19 | 40 | |
| 陽性 | 30 | 41 | |
| Ki67-LI (%) (IQR) | 3.6 (1.0-7.3) | 2.5 (0.9-5.2) | 0.1741 |

IQR: interquartile range

表 4 単変量解析および多変量解析

| | 単変量解析 | | 多変量解析 | |
|---------------------------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | HR (95% CI) | p 値 | HR (95% CI) | p 値 |
| 5F3 expression (陽性前立腺癌 vs 陰性前立腺癌) | 3.00 (1.13-8.41) | 0.0274 | 3.66 (1.26-11.53) | 0.0168 |
| 年齢 (66 歳以上 vs 65 歳以下) | 1.27 (0.48-3.34) | 0.6156 | | |
| PSA (>10 vs ≤10) | 1.12 (0.26-3.46) | 0.8567 | | |
| D' Amico (高リスク vs 中、低リスク) | 1.53 (0.49-4.15) | 0.4341 | | |
| Pathological T stage (pT3 vs pT2) | 3.81 (1.45-10.16) | 0.0072 | 0.90 (0.24-3.05) | 0.8664 |
| Gleason score (8 以上 vs 7 以下) | 5.43 (1.96-14.20) | 0.0018 | 8.14 (2.33-29.87) | 0.0012 |
| Lymphovascular invasion (陽性 vs 陰性) | 3.16 (1.14-8.30) | 0.0282 | 0.57 (0.16-1.95) | 0.3707 |
| 神経周囲浸潤 (陽性 vs 陰性) | 1.07 (0.41-2.96) | 0.8882 | | |
| 最大腫瘍径 (cm) (>1.5 vs ≤1.5) | 4.99 (1.76-17.80) | 0.0020 | 4.65 (1.32-19.36) | 0.0160 |
| 切除断端 (陽性 vs 陰性) | 6.21 (2.38-17.10) | 0.0003 | 5.17 (1.70-16.87) | 0.0037 |
| Ki-67 LI (%) (>2.8 vs ≤2.8) | 1.99 (0.76-5.79) | 0.1640 | | |