腎細胞癌における Le^x (SSEA-1) 抗原群の発現:

腫瘍分化度及び予後との相関についての検討

東北大学医学部泌尿器科 (主任: 折笠精一教授)

福士 泰夫 斎藤 誠一 折笠 精一

東北大学医学部第二病理 (主任: 笹野伸昭教授)

大 谷 明 夫

EXPRESSION OF Le^x ANTIGENS IN RENAL ADENOCARCINOMA DIFFERENTIATION AND THE PROGNOSIS

Yasuo Fukushi, Seiichi Saito and Seiichi Orikasa

Department of Urology, Tohoku University, School of Medicine

(Director: S. Orikasa)

Haruo Ohtani

Second Department of Pathology, Tohoku University, School of Medicine

(Director: N. Sasano)

Immunohistochemical observation of human renal cell carcinoma tissue using monoclonal antibodies FH4 and FH6, directed to difucosyl Le^x and sialosyl difucosyl Le^x structure, respectively, was performed. According to the staining pattern, tissue samples of 50 cases of renal cell carcinoma were divided into the following three groups; Group A (FH4 positive, FH6 positive), Group B (FH4 positive, FH6 negative), and Group C (FH4 negative, FH6 negative). This immunohistochemical grouping correlates to histological grading, but not to clinical staging. Although histological grading did not correlate to prognosis of the patient's postoperative course, Breslow's examination revealed that the cases included in group A show a significantly favourable postoperative course compared to the cases of the other groups ($p < 0.001$).

These results indicate that expression pattern of these oncofetal antigens is a good parameter indicating the degree of tumor cell differentiation and malignancy, and reflects the prognosis of the patients.

要旨: 腫瘍組織より抽出した糖鎖抗原 Difucosyl Le^x ($\text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4 [\text{Fuc}\alpha_1 \rightarrow 3] \text{GlcNAc}\beta_1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4 [\text{Fuc}\alpha_1 \rightarrow 3] \text{GlcNAc}\beta_1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta_1 \rightarrow 1\text{Cer}$) 及びその Sialosyl derivative である Sialosyl Le^x ($\text{NeuAc}\alpha_2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4 [\text{Fuc}\alpha_1 \rightarrow 3] \text{GlcNAc}\beta_1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4 [\text{Fuc}\alpha_1 \rightarrow 3] \text{GlcNAc}\beta_1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta_1 \rightarrow 1\text{Cer}$) の各々に対して確立したモノクローナル抗体 FH4¹⁾ 及び FH6²⁾ を用い、腎細胞癌の連続切片に対する免疫組織染色を施行した。その結果から、抗原の出現パターンを Group A (FH4陽性, FH6陽性), Group B (FH4陽性, FH6陰性), Group C (FH4陰性, FH6陰性) と分類し、各 Group と、Stage, Grade, 及び予後との相関を検討した。その結果、Group と Grade には相関が認められたが、Group と Stage には相関を認めなかった。又、予後との相関では、Stage と Group が各々予後と相関した。以上よりこれは Le^x 抗原群は、腎腫瘍においても分化を示す1つのパラメーターとして存在し、モノクローナル抗体を用いたこれらの免疫組織学的手法は腫瘍細胞の分化度或いは悪性度を客観的に判定し、更には予後を予測する有用な手段となり得ると考えられた。

緒 言

我々は、ラクトシル系 Type II chain に属する糖鎖抗原は細胞の分化や癌化に伴い、種々の活発な修飾を受けて細胞表面に出出されている事³⁾⁴⁾、更にそれらのあるものが血中に shedding され、血中の癌マーカーともなり得る事を報告してきた⁵⁾⁶⁾。特に腎については、いくつかの血液型関連物質が豊富に存在する事、又、ヒト腎の分化は、その各分化段階が非常に特徴的な形態をとる事が分かっているため、この分化過程を一連の FH-series のモノクローナル抗体(以下 M-Ab)を用いて検討した結果、抗原の出現パターンによって分化を時期的、場所的に区別できる事を確かめた⁷⁾。そこで今回は腎細胞癌におけるこれら抗原の出現パターンを調べる事によって、腫瘍細胞の分化度を知り、客観的な悪性度と、その予後を予測する事が可能か否か、すなわちこれらのラクトシル系 Type II chain が腫瘍の悪性度マーカーとなり得る否かを検討した。

対象および方法

1) 腫瘍組織標本の作成

程度のよい連続切片が得られ、Robson 分類による stage 分類が明らかであり、更に、予後調査の可能であった腎細胞癌50症例を選んだ。組織はすべて10% formalin にて室温固定され、パラフィンに包埋されたものである。各ブロックより3~5μm 厚の連続切片を採取し、以下の検索に用いた。各々について H-E 染色を施し、腎癌取扱規約に従って、核異型度による病理学的 grade 分類を行った。

2) モノクローナル抗体の選択

我々の確立した、一連の Le^x (SSEA-1) 抗原群に対する M-Ab の中から、difucosyl Le^xに対する M-Ab FH4¹⁾と、その sialosyl derivative である sialosyl difucosyl Le^xに対する M-Ab FH6²⁾を選んで用いた。これらの糖鎖抗原はヒト腎の分化抗原として存在する

のみならず、種々の腫瘍組織に発現されている事が判明しているものたちである。その抗原構造及び specificity を表 1 に示す。

3) 免疫組織化学的検索

得られた連続切片は、xylene で脱パラフィン (5 min×3) 後、エタノール系にて加水、FH4染色用切片に対しては normal horse, FH6染色用切片に対しては normal goat serum にて block (室温 1 時間) した。0.1%BSA 加0.05M phosphate buffer (pH 7.4) にて洗浄後、一次抗体として FH4, 6 各々の培養上清のをせ、室温, overnight で incubation した。同 buffer にて洗浄後(室温5min×3), FH4染色に関してはビオチン化抗マウス IgG, FH6染色に関してはビオチン化抗マウス IgM を二次抗体として反応させ(室温2hrs), 以下 ABC 法 (Vector) にて免疫染色を行った。後染色は hematoxylin を用いた。なお、内因性 peroxidase 不活性化の為、一次抗体洗浄後、0.3%H₂O₂ 加メタノール内にて室温30分処理した。

4) 結果の判定及び統計学的処理

腫瘍組織の30%以上が強~中等度に染まるものを陽性、それ以外を陰性とした。なお、FH4, FH6いずれも近位尿細管を陽性に染色するので (図 1) ⁷⁾、腫瘍組織陰性のものについては、同じ切片上の正常部分或いは同時に作製した同一症例のブロックからの正常部分に含まれる近位尿細管が陽性に染まる事を確かめた。こうする事によって、陰性例が標本固定から、染色操作の過程における抗原性失活の為でない事を確かめる事ができる。grade 分類(腎癌取扱規約に基づく核異型度分類), stage 分類(Robson 分類), 染色パターンによる group 分類相互の相関は、AIC (Akaike's Information Criteria)⁸⁾を用いて検定し、各々と予後との相関は Breslow 検定⁹⁾にて検討した。

表 1 Lactosyl 系 Type II chain に属する抗原構造とそれらを認識する M—Ab

Monoclonal antibody	Structure of antigen		
FH-4 (IgG)	Galβ ₁ →4GlcNAcβ ₁ →3Galβ ₁ →4GlcNAcβ ₁ →3Galβ ₁ →4Glcβ ₁ →1Cer		
	3	3	
	↑	↑	
	Fucα ₁	Fucα ₁	
FH-6 (IgM)	Galβ ₁ →4GlcNAcβ ₁ →3Galβ ₁ →4GlcNAcβ ₁ →3Galβ ₁ →4Glcβ ₁ →1Cer		
	3	3	3
	↑	↑	↑
	NeuAcα ₂	Fucα ₁	Fucα ₁

図1 モノクローナル抗体 FH6による成人腎皮質の免疫組織染色(パラフィン切片)。近位尿細管のみ強陽性に染色される。

結 果

抗原出現パターンを M-Ab による染色性によって A, B, C 3つの group に分類できた。group A は、両抗原が出現している腫瘍であり、group B は difucosyl Le^aのみが出現している腫瘍 (図 2a, b), group C は両抗原とも陰性の腫瘍である。なお、ここにあげた 3 通り以外の抗原出現パターンは認められなかった。この 3つの出現パターンは、分化が進むにつれて複雑な抗原構造が出現してくるという、ヒト腎の分化途上における抗原の出現パターンにもみられたパターンであった⁷⁾。表 2 は grade 分類別にみた group 分類の分布を示したものであるが、group A に属する腫瘍は、23例中21例が grade 1, 2例のみが grade 2に属しており、grade 3に属するものは認められなかった。一方 group B に属する腫瘍では、14例中 6 例が grade 1, 8 例が grade 2に属するものであるが、やはり grade 3 に属するものは認められなかった。group C に属する腫瘍では、grade 3に属するものも 2 例認められた。すなわち、両抗原共に発現している group A の腫瘍では、grade 1に属するものが91.3%にも及ぶのに対し、FH6による染色が陰性である group B, C においては grade 1の腫瘍は50%以下であった。この group 分類と grade 分類の相関を AIC で検討したところ、両者の間には、相関が認められた。

次に group 分類と stage 分類との分布を表 3 に示す。同じく AIC 法にて検定した結果では、両者の間には相関は認められなかった。

予後に関しては、術死した 4 例をのぞいた46例について Breslow 検定にて検討した。その結果、stage 分

図2 ヒト腎細胞癌の免疫組織染色。モノクローナル抗体 FH4によって陽性に染色されるが(a), FH6では染色されない (b)。

表2 group 分類と grade 分類の分布

	Grade			
	1	2	3	X
group A : FH-4(+), FH-6(+)	21	2	0	0
group B : FH-4(+), FH-6(-)	6	8	0	0
group C : FH-4(-), FH-6(-)	6	5	2	0

表3 group 分類と stage 分類の分布

	stage			
	I	II	III	IV
group A : FH-4(+), FH-6(+)	10	3	2	8
group B : FH-4(+), FH-6(-)	2	4	1	7
group C : FH-4(-), FH-6(-)	4	3	4	2

類と予後, group 分類と予後は相関したが, grade 分類と予後は相関しなかった。表 4 は grade 1に分類される29例について、その group 別分類と予後との相関

表4 Grade 1 に分類される29例の抗原表出による分類と予後

抗原表出 予後	FH-4 (+) FH-6 (+)	FH-4 (+) FH-6 (-)	FH-4 (-) FH-6 (-)
5年以上生存	7例 (Stage I, I, I, I, I, II, II, IV)	0例	0例
4年生存	4例 (Stage I, I, I, I, III, III)	1例 (Stage I)	0例
3年生存	4例 (Stage I, I, I, I, IV)	1例 (Stage III)	1例 (Stage I)
2年生存	1例 (Stage IV)	0例	0例
1年生存	1例 (Stage IV)	2例 (Stage II, IV)	2例 (Stage I, III)
1年以下で死亡	1例 (Stage IV)	2例 (Stage IV)	2例 (Stage I, III)

図3 染色パターン分類による group 分類別の生存率曲線。両抗原陽性の group は他の group に比して、有意に良好な予後を呈している。

を, stage 分類の分布をも含めて表したものであり, 同じ grade に属していても group (すなわち抗原の出現パターン) が異なると, 予後にも変化のみられる傾向が伺われる。例えば group A に属する18例中, 1年以内の死亡は1例である一方, group B, C に属する11例では1年以内に4例が死亡しており, その中には, grade, stage 共に1である group C の症例も含まれている。図3は全症例における group 分類と予後との相

関を Caplan Meier 法による生存率曲線を描いて示したものである。ここに示す様に, group A に属するものは, 他の group に対し, 有意に良好な予後を示している ($p<0.001$)。しかし, group B, group C との間には, 有意の差は認められなかった。又, 光顕的に区別できる, dark cell と clear cell における免疫組織染色の陽性率には明確な相違はみられなかった。しかし, 染色性をみると, clear cell type では cell wall が染色され, dark cell type では cell wall の他に cytoplasm も陽性に染まる傾向がみられ, 又, 非常に強い染色性を示す症例は, clear cell type にのみ含まれていた。

考 察

近年, 糖鎖構造は, 生体内においてホルモン, 毒素, 微生物等の receptor としての役割を有している事, 又, 細胞の分化や癌化の際に細胞表面において質や量を種々に変化させている事等が明らかにされ, これにつれて糖鎖構造の変化や機能を解明するといった面のみでなく, 糖鎖変化の利用といった方面の研究も目覚ましい発展を遂げてきている^{10)~13)}。この点において, Kehler と Milstein¹⁴⁾によって開発された cell fusion を用いて得られるモノクローナル抗体は, 非常に有力な手段となってきた。モノクローナル抗体の利用法は糖脂質や糖蛋白の糖鎖による検出, 純化, 機能の解明といった基礎的な分野のみでなく, 組織染色, 細胞診, 血中 circulating Ag の検出といった in vitro での診断, 又, cytotoxicity, target therapy といった治療にまでその利用が試みられており¹³⁾¹⁵⁾, 臨床面でも着実な成果を収めつつある。

我々は SSEA-1 (Le^x) 抗原群に属する抗原が, 種々に修飾を受けた形でヒト腫瘍組織中に蓄積している事に注目し, これらの variant を別々に認識するモノク

図4 器官分化及び癌化における分化抗原の消長。器官の分化が進むにつれて、複雑な抗原が出現するが、各ピークを有し、再度限局化する。癌化に伴う細胞の幼若化は、抗原出現パターンの幼若化 (retrogenetic expression) として表現され、腫瘍細胞の分化度を反映する。

ローナル抗体の確立を試みた。当初、免疫源としては、これらの homogenate を用いたが、より specificity の高い抗体を産生する cell を効率よく得るべく、purify した抗原 (糖脂質) をサルモネラ菌に付着させたものを免疫源として用い、よい結果を得た¹²⁾¹⁶⁾。すなわちこの方法をとる事により、我々の望む構造に対する M-Ab を確立する事ができた訳である。次にこれらのモノクローナル抗体を用いて種々のヒト胎児器官を免疫染色する事により、一連の Le^x抗原群の出現パターンは、ヒト器官の分化段階を示すパラメーターとなる事を明らかとした³⁾。又、これらの抗原群は、これら器官より発する腫瘍組織にも多量に出現している事が観察された³⁾⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。従って、器官の分化に伴う抗原出現パターンの変化は、腫瘍におけるこれらの抗原の出現パターンにも反映している可能性が考えられる (図4)。つまり細胞の幼若化が腫瘍化の1つのパターンであるとすれば、分化のある段階に specific に出現する抗原がその組織に発生した腫瘍組織に再度出現する事は、oncofetal な癌関連抗原の動きとして当然考えられる。そしてその場合、腫瘍組織すべてではなく、やはり、ある分化の段階にある腫瘍細胞にだけ specific に出現して来る事も充分に考え得る。すなわち、腫瘍組織における抗原の出現パターンが腫瘍細胞の分化度を知る parameter となる事が考えられる訳である。更に、このパターンと stage, grade, 予後との相関を調べる事により、抗原出現パターンが、悪性度を反映するか否かについても検討できるのみならず、oncogenesis と ontogenesis との関連においても興味あ

る知見を得る事ができる。

検討の結果、抗原出現パターンと核異型度による分類との間には相関がみられた。この事は、どちらの factor も細胞の分化のある一面を示す parameter であるという事の裏付けであろうと考えられる。又、今回検討した症例では、予後と関連したのは stage と抗原出現パターンのみであった。一方、stage 分類と抗原出現パターンとの間には相関は認められなかった。すなわち、抗原出現パターンは、stage とは独立に、それ単独で患者の予後と相関している事になる。この事は、この抗原出現パターン分類による分化度の判定が、腫瘍の悪性度をも反映している事を意味する結果であると考えられる。更に、より未分化な胎児組織にみられる抗原出現パターンが腫瘍にみられる程、その予後が悪いという結果は、未分化な腫瘍細胞ほど、悪性度が高いという概念とも一致して興味深い。この考えをすすめると、腫瘍マーカーが陽性であるという事は、その腫瘍がある分化段階に達している事をも示している事になり、例えば腫瘍の存在が明らかであるにもかかわらず、FH6 の様なマーカーが陰性である場合には、むしろその腫瘍が未分化な腫瘍である事を示す積極的な徴候とも考えられる事になる。

この様に、一連の抗原構造の中で変化する構造 variation に対する M-Ab を用い、腎の様に、正常器官の分化の過程が形態学的にもよくとらえられる臓器と、それから発生する腫瘍組織と用いた検討を行う事により、これらの抗原がヒトの正常器官のみならず、腫瘍においても、分化抗原として発現している事を確認できる。又、これが患者の予後とも相関する事から、又、これらの M-Ab を用いた組織染色は、腫瘍細胞の悪性度を判定する1つの客観的な parameter となり得る事が考えられる。こういった腫瘍関連抗原の利用法は、いわゆる“腫瘍マーカー”の今後進むべき方向の1つであり、この点は、腫瘍の研究において、生化学、病理学及び、臨床の分野との接点として、今後共大きく期待される研究分野である。

結 語

Le^x抗原群に属する difucosyl Le^x及び sialosyl difucosyl Le^xの腎細胞癌組織における分布を、各々の抗原に対して確立した M-Ab, FH4 と FH6 を用いた免疫組織染色によって観察した。その結果、抗原出現パターンは、腎細胞癌組織の分化度、更には、悪性度を示す1つの parameter たり得る事が示された。

なお、本論文の主旨は、第51回日本泌尿器科学会東部総会

にて発表した。

文 献

- 1) Fukushi, Y., Hakomori, S., Nudelman, E. and Cochran, N.: Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. II. Selective isolation of hybridoma antibodies that differentially recognize mono-, di-, and trifucosylated type 2 chain. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4681—4685, 1984.
- 2) Fukushi, Y., Nudelman, E., Levery, S.B., Rauvala, H. and Hakomori, S.: Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. III. A hybridoma antibody (FH6) defining a human cancer-associated difucoganglioside (VI³NeuAcV³III³Fuc₂nLc₆). *J. Biol. Chem.*, **259**, 10511—10517, 1984.
- 3) Fukushi, Y., Hakomori, S. and Shepard, T.: Localization and alteration of mono-, di-, and trifucosyl $\alpha 1 \rightarrow 3$ type 2 chain structures during human embryogenesis and human cancer. *J. Exp. med.*, **159**, 506—520, 1984.
- 4) Fukushi, Y., Kannagi, R., Hakomori, S., Shepard, T., Kulander, B.G. and Singer, J.W.: Localization of difucoganglioside (VI³NeuAcV³III³Fuc₂nLc₆) in normal and tumor tissues defined by its monoclonal antibody FH6. *Cancer Res.*, **45**, 3711—3717, 1985.
- 5) 福士泰夫, 折笠精一, 神奈木玲児, 箱守仙一郎: 泌尿系悪性疾患における血清中SSEA-1抗原群の免疫学的検索. *日泌尿会誌*, **78**, 232—237, 1987.
- 6) 神奈木玲児, 福士泰夫, 箱守仙一郎: 糖鎖特異的モノクローナル抗体によって認識される癌関連性ムチン (cancer-associated mucin) —SSEA-1 抗原群を中心として—. *癌と化学療法*, **13**, 812—825, 1986.
- 7) Fukushi, Y., Orikasa, S., Shepard, T. and Hakomori, S.: Changes of Le^x and dimeric Le^x haptens and their sialylated antigens during development of human kidney and kidney tumors. *J. Urol.*, **135**, 1048—1056, 1986.
- 8) Sakamoto, Y. and Akaike, H.: Analysis of cross-classified data by AIC. *Ann. Inst. Statist. Math.*, **30B**, 185—197, 1978.
- 9) Breslow, N.: A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika*, **57**, 579—594, 1970.
- 10) Hakomori, S., Fukuda, M. and Nudelman, E.: Role of cell surface carbohydrates in differentiation: Behavior of lactosaminoglycan in glycolipids and glycoproteins. In: T. Muramatsu, G. Gachelin, A.A. Moscona and Y. Ikawa(eds.), *Teratocarcinoma and Embryonic Cell Interactions*, p. 179, Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1982.
- 11) Hakomori, S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 733—764, 1981.
- 12) Hakomori, S., Nudelman, E., Levery, S., Solter, D. and Knowles, B.B.: The hapten structure of developmentally regulated glycolipid antigen(SSEA-1) isolated from human erythrocytes and adenocarcinoma: A preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1578—1586, 1981.
- 13) Hakomori, S.: Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: Overview and perspectives. *Cancer Res.*, **45**, 2405—2414, 1985.
- 14) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495—497, 1975.
- 15) Grossman, H.B.: Clinical applications of monoclonal antibody technology. *Urol. Clin. Nor. Am.*, **13**, 465—474, 1986.
- 16) 福士泰夫, 阿部和夫: 糖脂質に対するモノクローン抗体, I. モノクローン抗体の作製法. *蛋白質核酸酵素*, **32**, 1363—1730, 1987.
- 17) Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Fukushi, Y., Palekar, A., Phelps, P.C., Shamsuddin, A.M., Trump, B. F., Hakomori, S. and Kim, Y.S.: Lewis^x- and sialylated Lewis^x- related antigen expression in human malignant and nonmalignant colonic tissues. *Cancer Res.*, **46**, 2627—2632, 1986.
- 18) Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Ferrell, L.D., Fukushi, Y., Palekar, A., Hakomori, S. and Kim, Y. S.: Expression of Lewis^x and sialylated Lewis^x antigens in human colorectal polyps. *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 479—488, 1987.

(1988年1月12日受理)