

6) 膀胱癌に発現する T 抗原 (Thomsen-Friedenreich 抗原),
Tn 抗原について

新潟大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 佐藤昭太郎教授)

西山 勉

T-antigen and Tn-antigen in urinary bladder cancer

Tsutomu NISHIYAMA

Department of Urology Niigata University School of Medicine

(Director: Prof. Shotaro SATO)

Recently, several investigators have demonstrated that Thomsen-Friedenreich antigen (T-Ag) and Tn-antigen (Tn-Ag) are expressed on the cells of several cancers including urinary bladder cancer. Antibodies against T-Ag are detectable in healthy as well as patient sera. T-Ag is composed of a specific carbohydrate chain, galactose- β -1-3-N-acetylgalactosamine (GalNAc), which is specifically detectable through the immuno-histochemical binding of peanut agglutinin (PNA). In normal cells, T-Ag is cryptic (cT-Ag) and can be unmasked by treatment with neuraminidase. Tn-Ag is composed of another carbohydrate chain, α -GalNAc-serine/threonine, and binds specifically to *Vicia villosa* agglutinin (VVA) or B₄ lectin from VVA. With the use of these lectins, the presence or absence of T-Ag and Tn-Ag was examined in normal bladder epithelium and specimens from 53 cases of human urinary bladder transitional cell carcinoma of various histological grades by means of the avidin-biotin-immunoperoxidase technique. The correlation between the expression of these antigens and the patient's clinical course was estimated. Out of 21 patients in whom the tumors expressed the phenotype Tn-Ag(+), T-Ag(+), or cT-Ag(-), 17 suffered from invasive recurrence. Although patients with tumors expressing the phenotypes T-Ag(-) and cT-Ag(+) have been reported to show a good clinical course, in our studies some of them showed a switch to invasive recurrence. Of 38 cases expressing the phenotypes T-Ag(-) and cT-Ag(+), 6 had tumors that carried Tn-Ag. Five of them suffered from invasive recurrence. These results indicated that the detection of Tn-Ag in combination with the examination of T-Ag and cT-Ag is useful for estimating the degree of malignancy of bladder cancer and the patient's clinical course. Besides, we evaluated serum anti-T antibody titer in bladder cancer patients by enzyme linked immunosorbent assay. Bladder cancer patients had depressed levels of IgM anti-T antibodies. On the contrary, levels of

Reprint requests to: Tsutomu NISHIYAMA,
Department of Urology, Niigata University
School of Medicine, Asahimachi-Dori 1,
Niigata City 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町 1 番町
新潟大学医学部泌尿器科学教室

西山 勉

IgG anti-T antibody in bladder cancer patients were significantly increased ($p < 0.05$).

Key words: T-antigen, Tn-antigen, Ig M Anti-T, Ig G Anti-T, Bladder cancer
T抗原, Tn抗原, Ig M抗T, Ig G抗T, 膀胱癌

目 的

近年、種々の癌において癌関連糖鎖抗原の発現が報告されている¹⁾。これらの癌関連糖鎖抗原の中でムチン型糖蛋白の母核構造を有する Thomsen-Friedenreich 抗原 (T抗原), Tn 抗原も各種の癌において発現し、癌の悪性度とT抗原, Tn 抗原の発現との相関が検討されている²⁾。ヒト膀胱癌においても、予後因子としてのT抗原の検討がなされているが³⁾、Tn 抗原に関してはほとんど検討されていなかった。我々は、膀胱癌組織においてT抗原, Tn 抗原の発現をそれらの糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いて検索してきた⁴⁾。

T抗原の糖鎖部分はガラクトース (Gal) β 1-3N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) で構成されており、ピーナツレクチン (PNA) により特異的に検出できる。さらに我々は GalNAc α -Ser/Thr で構成される Tn 抗原をヴィチアヴィローザアグルチニン (VVA), VVA のなかで Tn 抗原により親和性の強いアイソレクチンである B₄ レクチンにより検出し、膀胱癌組織におけるT抗原, Tn 抗原の発現と組織学的悪性度、患者の臨床経過との相関を検討してきた⁴⁾。

また、健康人の血中にはこのT抗原に対する抗T抗体が自然抗体として存在し⁵⁾、癌患者における血中の抗T抗体価の変化が検討されている⁶⁾⁷⁾。我々は膀胱癌患者血清中の抗T抗体価を酵素抗体法 (ELISA 法) で測定し、健康人のそれと比較検討してきた⁸⁾。

方 法

膀胱癌組織における Tn 抗原, T抗原の出現と患者の臨床経過との相関を、表在性膀胱癌の診断で2年以上の経過観察を行った患者について検討を行った。膀胱癌組織中の Tn 抗原, T抗原の検討には、表在性膀胱癌患者、男42例、女11例の計53例を用いた。患者の血液型はA型が21例、O型が16例、B型が10例、AB型が6例であった。膀胱癌組織中の Tn 抗原, T抗原の検索にはアビジン-ビオチン法を用いて行った⁴⁾。すなわち、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋切片をもちい、脱パラフィン、内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、50 μ g/ml のビオチン標識 VVA, B₄, または PNA

を加え、3時間反応させ、その後に HRP 標識ストレプトアビジンを加え、60分間反応後、DAB-H₂O₂ と反応させて検索した。crypticT 抗原の検索には PNA と反応させる前にニューラミナーゼと30分間反応させた。

膀胱癌患者の抗T抗体価の測定は、患者44例 (男32例、女12例) に対して行った。採血は治療前に行った。対照として健康人17例 (男9例、女8例) を用いた。

ELISA 法でマイクロプレート固相に吸着させるT抗原はヒトO型 NN 型の赤血球膜からグリコホリンを分離し、脱シアル化し、ピーナツレクチンアフィニティークラムにより分離精製して得た⁸⁾。抗T抗体価は ELISA 法で測定した⁸⁾。すなわち96穴マイクロプレートの固相に分離精製して得たT抗原を吸着させ、2倍に希釈した被験者血清を入れ、抗T抗体とT抗原を反応させた。その後2次抗体としてビオチン化抗ヒト IgM, または IgG 抗体を反応させ、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを入れ、ビオチンと反応させ、さらに基質としてオ-フェニレンジアミン デハイドロクロライドをいれ、各ウェルの吸光度をオートリーダーにて測定した。各サンプルはデュプリケートでおこない、その平均値を測定値とした。結果は各マイクロプレート間のばらつきを考慮して基準血清の抗T抗体価を1とした相対値 (index) で表した。

結 果

正常膀胱上皮は Tn 抗原陰性、T抗原陰性かつ crypticT 抗原陽性であった。

膀胱癌組織中の Tn 抗原, T抗原の発現はおもに細胞内にみとめられた (図 1)。

膀胱癌組織でのT抗原の発現または crypticT 抗原の消失はおもに grade 2, 3 の症例でみとめられた。Tn 抗原陰性、T抗原陰性、かつ crypticT 抗原陽性はおもに grade 1, 2 の症例に認められた (表 1)。表在性膀胱癌の診断で2年以上経過観察を行った53例のうち浸潤性再発をみとめた17例は全て Tn 抗原陽性、T抗原陽性、またはニューラミナーゼ処理後の crypticT 抗原陰性であった (表 2)。今までの報告で予後良好と考えられたT抗原陰性かつ crypticT 抗原陽性の38例中5例で浸潤性再発をみとめた。これらの症例はすべて Tn

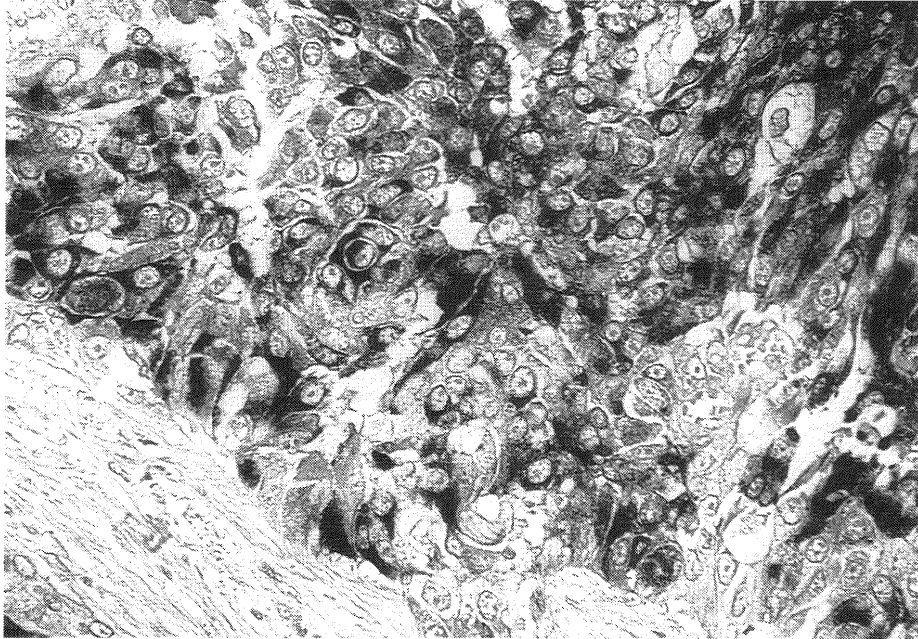


図 1 Tn 抗原陽性の Grade 3 膀胱移行上皮癌 (× 425)

表 1 T 抗原, Tn 抗原発現と組織学的悪性度

T 抗原 Tn 抗原 cryptic T 抗原	-	+	+	-	-	計
Grade 1	10	1				11
Grade 2	21	1	7	5	1	35
Grade 3	1		4	1	1	7
計	32	2	11	6	2	53

表 2 T 抗原, Tn 抗原発現と患者の予後

T 抗原 Tn 抗原 cryptic T 抗原	-	+	+	-	-	計
再発 (-) 群	23		2	1	1	27
非浸潤性再発群	9					9
浸潤性再発群		2	9	5	1	17
計	32	2	11	6	2	53

表 3 抗 T 抗体価

	被検者数	IgM 抗 T 抗体価 平均 ± SD	IgG 抗 T 抗体価 平均 ± SD
膀胱癌患者	44 例	0.342 ± 0.256	1.182 ± 0.550 *
対 照	17 例	0.425 ± 0.219	0.833 ± 0.397

* IgG 抗 T 抗体価の比較: $p < 0.05$

抗原陽性であった。また、Tn 抗原陰性、T 抗原陰性、かつ crypticT 抗原陽性の32例全例に浸潤性再発をみとめなかった。VVA, B₄ は免疫組織学的手法では血液型 A 型とフォルスマン抗原との交差反応はみとめなかった。以上の結果を Tn 抗原陰性、T 抗原陰性、かつ crypticT 抗原陽性のグループ A と、Tn 抗原陽性、T 抗原陽性、または crypticT 抗原陰性のグループ B に分けて検討すると、グループ A では浸潤性再発をみとめた症例はなかったが、グループ B では21例中17例に浸潤性再発をみとめた (表 3)。

抗 T 抗体価の測定では膀胱癌患者血清中の抗 T 抗体価は対照に比し、IgM 抗 T 抗体価は低下傾向を示したが、有意差はなかった。これに対して IgG 抗体 T 抗体価は危険率 0.05 以下で有意に上昇していた (表 4)。

考 察

Tn 抗原、T 抗原はムチン型糖蛋白糖鎖中心構造の合成不全から発現する可能性が示唆されている。T 抗原は膀胱癌をはじめ種々の癌に認められ、癌の悪性度との相関が検討されてきている²⁾。また、T 抗原をもつ癌の部位診断への応用が検討されてきている⁹⁾。一方、Tn 抗原は T 抗原に比べ、その分布、病理学的並びに臨床学的意義についての報告は少ない¹⁰⁾。Tollefsen らは VVA

のアイソレクチンである B₄ レクチンが Tn 抗原に特異的に結合することを報告した¹¹⁾。我々は Tn 抗原をこの VVA または B₄ レクチンを用い検出できることを証明し、PNA による T 抗原の検索とあわせて Tn 抗原の検索を行いその重要性を発表してきた⁴⁾。今までの報告では T 抗原陰性、かつ cryptic T 抗原陽性の細胞をもつ症例は予後良好と考えられていたが、今回の我々の結果では 5 例の浸潤性再発をみとめた。これらの症例は全て Tn 抗原陽性であった。今回の Tn 抗原、T 抗原の発現と患者の臨床経過が相関するという我々の結果から、これらの抗原が癌の悪性度に重要な役割を演じている可能性が示唆された。Tn 抗原発現を検索する場合、つねに考慮しなければならないことは、血液型 A 型やフォルスマン抗原などの αGalNAc を末端にもつ糖鎖構造物との交差反応であるが、今回用いた免疫組織学的手法では VVA、B₄ とも血液型 A 型とフォルスマン抗原との交差反応は認めなかった。

健康人では、T 抗原に対する抗体が自然抗体として存在し、これは IgM 分画に多く含まれるとされている⁶⁾。抗 T 抗体価の担癌患者血清中での変化の報告は散見されるが、その変化は報告者によりさまざまである⁶⁾⁷⁾。我々の行った ELISA 法での結果では、膀胱癌患者血清中の抗 T 抗体価のうち IgM 抗 T 抗体価は低下傾向を認めるものの有意差は認められなかった。一方、IgG 抗 T 抗体価は対照に比し有意に上昇していた。この事実は膀胱癌患者において T 抗原に対して液性免疫が惹起されていることを示唆しているが、その意義は不明である。

我々は膀胱癌の targeting therapy の基礎的研究として、T 抗原に特異的に結合する PNA に、それ自体ではほとんど毒性を示さないが細胞内に取り込まれると強い細胞毒性を示す ricin A を結合させ、この PNA-ricin A が T 抗原をもつヒト膀胱癌培養細胞株に与える細胞傷害性を in vitro で検索した。PNA を加えた群と ricin A を加えた群は対照群に比し各濃度でも細胞傷害性を示さないが、PNA-ricin A を加えた群は対照群に比し、³H-leucine の細胞内への取り込みの抑制が濃度依存性に認められた。以上の結果は PNA-ricin A が膀胱癌の targeting therapy へ応用できる可能性のあることを示している¹²⁾。

広橋らは肺癌に対するモノクローナル抗体を作成し、分析したところ、Tn 抗原を認識することを報告している¹³⁾。我々は広橋からそのモノクローナル抗体を供与してもらい、染色性を検討したところ、ほぼ今までの結果と同様の染色性を示すことがわかった。Springer は

数種類の抗 T、抗 Tn モノクローナル抗体を作成し我々に供与してきている¹⁴⁾。最近、箱守らはヒト正常組織には存在しないシアリル化 Tn 抗原に対するモノクローナル抗体を作成し、その有用性を報告している¹⁵⁾。また我々も抗 T、抗 Tn、抗シアリル化 Tn モノクローナル抗体を作成中であり、今後それらの抗体を用いて、組織内、尿中、血清中の T 抗原、Tn 抗原を測定し、その臨床的意義を検索していきたい。

参 考 文 献

- 1) **Hakomori, S.:** Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens, *Adv. Cancer Res.*, **52**: 257~331, 1989.
- 2) **Springer, G.F.:** T and Tn, general carcinoma autoantigens, *Science*, **224**: 1198~1206, 1984.
- 3) **Coon, J.S., Weistein, R.S. and Summers, J.L.:** Blood group precursor T-Antigen expression in human urinary bladder carcinoma, *Am. J. Clin. Pathol.*, **77**: 692~699, 1982.
- 4) **Nishiyama, T., Matsumoto, Y., Watanabe, H., Fujiwara, M. and Sato, S.:** Detection of Tn antigen with Vicia villosa agglutinin in urinary bladder cancer: Its relevance to the patient's clinical course, *J. Natl. Cancer Inst.* **78**: 1113~1118, 1987.
- 5) **Rogentine, G.N.:** Naturally occurring human antibody to neuraminidase-treated human lymphocytes, *J. Natl. Cancer Inst.* **54**: 1307~1311, 1975.
- 6) **Springer, G.F., Desai, P.R. and Scanlon, F.S.:** Blood group MN precursors as human breast carcinoma-associated antigens and "naturally" occurring human cytotoxins against them, *Cancer* **37**: 169~176, 1976.
- 7) 大岡啓二, 小田剛士, 横山雅好, 越知憲治, 竹内正文: 膀胱腫瘍患者血清中の抗 T 抗体価の検討. *日泌尿会誌*, **76**: 1201~1204, 1985.
- 8) 西山 勉, 佐藤昭太郎, 渡部久実, 藤原道夫, 坂田安之輔, 小松原秀一, 渡辺 学: 膀胱癌患者血清中の抗 T 抗体価の検討, *西日本泌尿*, **49**: 759~762, 1987.
- 9) **Noujaim, A., Selvaraj, S., Suresh, M.R., MacLean, G., Willans, D., Turner, C., Haines, D.M. and Longenecker, B.M.:** A molecular approach to Immunoscintigraphy: A study of the

- T antigen conformation on the surface of tumors. *Nuklearmedizin* **26**: 1~6, 1987.
- 10) **Springer, G.F.:** Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine α -O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: A functional predictor of aggressiveness. *Molec. Immunol.* **26**: 1~5, 1989.
- 11) **Tollefsen, S.E. and Kornfeld, R.:** The B₄ lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine α -linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **258**: 5172~5176, 1983.
- 12) **Nishiyama, T., Tomita, Y., Watanabe, H., Matsumoto, Y., Watanabe, T., Fujiwara, M. and Sato, S.:** Characterization of peanut agglutinin linked to ricin A chain: Potential therapeutic agent for human bladder cancer. (投稿準備中)
- 13) **Hirohashi, S., Clausen, H., Yamada, T., Shimosato, Y. and Hakomori, S.:** Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 AND-81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: Its identification as Tn antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 7039~7043, 1985.
- 14) **Springer, G.F., Chandrasekaran, E.V., Desai, P.R. and Tegtmeier, H.:** Blood group Tn-active macromolecules from human carcinomas and erythrocytes: Characterization of and specific reactivity with mono-and polyclonal Anti-Tn antibodies induced various immunogens. *Carbohydr. Res.*, **178**: 271~292, 1988.
- 15) **Kjeldsen, T., Clausen, H., Hirohashi, S., Ogawa, T., Iijima, H. and Hakomori, S.:** Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2 \rightarrow 6 α -N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-T) epitope. *Cancer, Res.*, **48**: 2214~2220, 1988.

司会 どうぞ内山君。

内山 一番最後に、シアル化 Tn 抗原のモノクローナル抗体を自分たちで作ろうとしているという話なんですけども、先生はやはりプロトコールは、細胞そのものじゃなくて、そういう pure な抗原を免疫してとろう

としておられるのでしょうか。

西山 mucin を多く含む物質を使っています。

内山 それやはり、シアル酸の、シアル何とかがっていうのは意外とモノクローナルをとっても作りづらいかという話もよく聞くんですけど、先生そういうことはどうなんですか。

西山 一応、箱守先生らと同じ方法でやる予定ということですよ。

内山 どうも。

司会 他にございませんか。最後に、ちょっと時間がオーバーしてありますが、総合的に何かあったら、藤原先生がおいでになってますから、何かこのシンポジウムの演題からの総合的な御見解でもございましたら一言。

藤原 御指名ですので、私たちのところでは泌尿器科の先生たちが、免疫組織学的方法を使っているいろんなことを検索しています。現在のところ富田先生が発表したように、ある抗原が表出されているかされていないかというところが非常に予後に重要であるということが分った。それから西山先生がやっておりましたように、今まであまり注目されていなかった抗原、Tn と T 抗原の組み合わせによって予後の判定ができるんじゃないか、ということ調べた。これは非常に意義が大きくて腫瘍マーカーとしてはいろんなことが知られて、実際の臨床の prognosis を予見するとか、或いは臨床的に診断するときに悪性度との関係、予後に関係しているんでしょうけども、そういう問題と関連させたというところでは、我々は少し進んだかなという印象をもっています。将来はやはり腫瘍マーカーとは、非常に specific のマーカーはなかなか難しいでしょうけども、それが例えば多く出ているから最終的に臨床的にどうかっていうところの関連がこれから求められるんじゃないかと思っています。

司会 有難うございました。何か一つ一つの演題、演者の方で言い足りなかったことなんかありましたら、最初にどなたかありませんでしょうか。吉谷先生宜しいですか。

吉谷 現在、卵巣癌の診断において多変量解析と言われるような、多種類のマーカーを組み合わせた診断システムが導入されておりますが、その中でも CA125 は主たる assay の一つで非常に重きを置かれている検査項目であります。Specificity が非常に高いマーカーが開発されればそれで済むことかも知れませんが、治療効果判定の観点からみますとマーカーが negative となってもなかなか cancer はなくなっていないというような所見もありますので、今後また臨床的な面で種々マ

カーについて検討していきたいと考えております。

司会 あと他にございませんでしょうか。基礎の方からなんかこう臨床に対して総括的にというようなことは、追手先生宜しいですか。

追手 今僕ちょっと内皮のことに興味を持っています。内皮っていうのは全身のどこにでもあるわけですよね。それでそういうものの試料を集めるときにシステムっていうのが今あんまりはっきりしない。今日の演題をお聴きしましても、縦割りの構造しかなくて、例えば泌尿器の癌だと泌尿器の癌、それから産婦人科の癌なら産婦人科の癌。ところが必ず共通要素っていうのはあると思うんですね。試料を集めるシステムっていうんですか、例えば癌をやっている人たちで何かそういうシステム作りをして、お互いに何か役に立てるような物質の供与、検体の供与を、お互いにやり合う。それから discussion も行う。そういう組織作りっていうのがこれからやっぱり新しいことをやっていくうえには必要なんじゃないか

なという印象をもちました。

司会 有難うございました。それでは丁度三十分程超過しましたものですから、御礼を申し上げて終りたいと思います。今日のこのシンポジウムは、学内ではかなり広い領域でたくさんの方がやってらっしゃると思うんですが、その中の主要な方々をお願いして、pick up というような格好でやったんですが、かなりいい back ground が示されたと思います。今藤原先生もおっしゃったように基礎研究がやっぱり優先していくと思いますし、臨床側からはそれを prognose でも治療でも応用していくというような姿勢がやっぱり研究を進めていく上で、大変役に立つ御意見でなかったかと思います。特に、臨床、基礎を問わず、目的が一つなので、協力し合ってやって行かなきゃならないということが私たちの希望であると思います。演者の先生方、本当に有難うございました。これを以って終りたいと思います。