

前立腺癌における微小癌転移の遺伝子診断の現状

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 出口 隆教授)

出口 隆, 楊 睦正, 安田 満
横井 繁明, 西野 好則, 江原 英俊
山本 直樹, 高橋 義人, 石原 哲THE CURRENT STATUS OF MOLECULAR DETECTION
OF MICROMETASTATIC PROSTATE CANCER CELLSTakashi DEGUCHI, Muzheng YANG, Mitsuru YASUDA,
Shigeaki YOKOI, Yoshinori NISHINO, Hidetoshi EHARA,
Naoki YAMAMOTO, Yoshito TAKAHASHI and Satoshi ISHIHARA
From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine

We summarized and reviewed published reports, including our studies, on the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes, bone marrow and peripheral blood. Some published data preliminarily suggest that the RT-PCR assay of micrometastatic prostate cancer cells may allow a more accurate assessment of lymph node and bone metastases of prostate cancer, and offer a presurgical prediction of the pathological stage of clinically localized disease. In addition, the RT-PCR assay may have a unique prognostic value in prostate cancer. However, controversy remains over the clinical significance of the RT-PCR assay. This assay could potentially develop into a diagnostic procedure for the clinical decision making in patients with prostate cancer. To establish the clinical significance of the RT-PCR assay, further optimized and standardized RT-PCR assay studies are needed, investigating large populations and involving long-term follow-up for the determination of any association between the results of the RT-PCR assay and specific clinical outcome.

(Acta Urol. Jpn. 45 : 565-569, 1999)

Key words : Prostate cancer, RT-PCR, Micrometastasis

緒 言

前立腺癌治療において病期診断は、治療法の選択と予後の予測に際してきわめて重要である。癌が前立腺内に局在する場合には、一般的には外科的処置あるいは放射線療法が行われる。しかしながら、根治的手術がなされた症例においても、術後血清中の腫瘍マーカーの上昇を認める例や実際に遠隔転移あるいは局所再発を認める例が存在する。したがって、これらの転移例や再発例では、画像診断法や病理診断法などの通常の診断法では検出されない微小な前立腺癌細胞の残存や転移が存在したのであろうと推測される。このような微小な癌細胞を検出するためには、従来の方法よりも感度と特異性に優れた癌細胞の検出方法が必要となる。

前立腺癌においては、前立腺組織に発現する蛋白であるが前立腺癌においても高率に発現する前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen, PSA), 前立腺特異膜抗原 (prostate-specific membrane antigen, PSM) および human glandular kallikrein (hK2) の

mRNA を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検出し、それらの検出を指標とした前立腺癌微小転移の遺伝子診断法が開発されてきた。1992年に Moreno ら¹⁾により RT-PCR 法による末梢血中の前立腺癌細胞の検出が報告されて以来、末梢血、リンパ節、骨髄および前立腺摘除術時の術野の血液を対象として、RT-PCR 法による前立腺癌細胞の検出がなされ、多くの報告がなされている。本稿ではわれわれの検討結果を含め、今日まで報告された結果を集計し前立腺癌における微小転移の遺伝子診断の現状と課題を検討した。

対象と方法

前立腺癌における微小転移の遺伝子診断の現状と課題を検討する目的で、自験例を含め1998年12月までに報告され、検索可能であった文献中から PSA, PSM あるいは hK2 の mRNA を RT-PCR 法にて検出することにより、リンパ節内、骨髄内あるいは末梢血液内で前立腺癌細胞を検出した報告を集計した。RT-PCR 法における臨床検体の採取法、RNA の抽出法、

プライマーの種類, 反応条件, それらに伴う検出感度の差などについては考慮せず集計した.

結 果

1. リンパ節中の前立腺癌細胞の検出

われわれは PSA mRNA を標的とする RT-PCR 法による前立腺癌のリンパ節転移診断への応用を初めて報告した²⁾ 骨盤内リンパ節郭清術および前立腺全摘除術時に選択したリンパ節を対象とし, RT-PCR 法による PSA mRNA の検出と, 抗 PSA 抗体による免疫組織化学による検索を含む従来の病理組織学的検討との比較を行った. 通常の病理学的検討により前立腺癌細胞の転移を認め, 抗 PSA 抗体により免疫組織化学的に PSA の局在が確認され, 病理組織学的に前立腺癌のリンパ節転移と診断された5リンパ節すべてで RT-PCR法により PSA mRNA が検出された. さらに病理組織学および免疫組織学的に前立腺癌細胞の転移を認めない限局性前立腺癌患者18症例中2症例の2リンパ節からも RT-PCR 法により PSA mRNA が検出され, 前立腺癌のリンパ節転移と診断した. その後, Takahashi ら³⁾ は骨盤リンパ節穿刺により得られたリンパ節検体を, Edelstein ら⁴⁾ はホルマリン固定パラフィン包埋された骨盤リンパ節を, Ferrari ら⁵⁾ は high risk の前立腺癌患者 (T \geq 2B, 血清 PSA \geq 20 ng/ml あるいは Gleason score \geq 7) の骨盤リンパ節を対象として RT-PCR 法により PSA mRNA あるいは PSM mRNA の検出を行い前立腺癌におけるリンパ節微小転移の検討を行った (Table 1). これらの検討結果から, 病理組織学的に検出困難な前立腺癌のリンパ節への微小転移が存在することが示唆され,

RT-PCR 法による検索が, 従来の病理組織学的検討よりもリンパ節転移の検出感度に優れていることが示された.

2. 骨髄中の前立腺癌細胞の検出

RT-PCR 法の前立腺癌の骨転移診断への応用は, Wood らにより1994年から始められた⁶⁾ われわれの検討を含め骨シンチグラフィーなどによる画像診断にて骨転移が認められる症例では, 56%から100%の症例で骨髄中に RT-PCR 法により PSA mRNA が検出されている (Table 2). 一方, 骨転移を認めない症例においても20%から71%の症例において PSA mRNA が検出され, 前立腺癌細胞の存在が示唆される. われわれの臨床病期との関係では, 臨床病期 A2 の5例および B1 の9例では骨髄穿刺液中に PSA mRNA が検出されず, 臨床病期 B2 の4例中2例, Cの7例中4例および D1 の1例中1例において骨髄穿刺液中に PSA mRNA が検出され, 骨シンチグラフィー上骨転移のない前立腺癌患者26例中7例 (27%) に PSA mRNA の発現を認め, 前立腺癌の微小骨転移と診断した⁷⁾ 報告された病理学的病期との関係では pT2pN0 の前立腺癌症例では20%から68%に, pT3pN0 および pT4pN0 の前立腺癌症例では65%から76%に, 骨髄中に PSA mRNA の発現が検出されている (Table 3). これらの結果からは, 通常の骨シンチグラフィーによる骨転移の検索よりも RT-PCR 法による骨髄穿刺液中の PSA mRNA の検出が検出感度において優れており, さらに, 前立腺癌が前立腺に局在する早期の時期にすでに骨髄へ転移していることを示唆している.

Table 1. RT-PCR detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes without histologically identifiable lymph node metastasis

報告者	RT-PCR 法陽性		文 献
	リンパ節数 (%)	症例数 (%)	
Deguchi et al.	4/39 (10)	2/18 (11)	Cancer Res 53 : 5350-5354, 1993
Takahashi et al.		2/12 (17)	J Urol 155 : 378A, 1996
Edelstein et al.		16/36 (44)	Urology 47 : 370-375, 1996
Ferrari et al.	37/54 (69)	23/29 (79)	J Natl Cancer Inst 89 : 1498-1504, 1997

Table 2. RT-PCR detection of micrometastatic prostate cancer cells in bone marrow in patients with or without radiologically identifiable bone metastasis

報告者	RT-PCR 法陽性症例数 (%)		文 献
	骨転移陽性	骨転移陰性	
Wood et al.	2/ 2 (100)	1/ 5 (20)	J Histochem Cytochem 42 : 505-511, 1993
Wood et al.	5/ 5 (100)	19/43 (44)	Cancer 74 : 2533-2540, 1994
Deguchi et al.	5/ 9 (56)	7/26 (27)	Br J Cancer 75 : 634-638, 1997
Corey et al.	10/13 (77)	45/63 (71)	Urology 50 : 184-188, 1997
Melchior et al.	12/14 (86)	44/71 (62)	Clin Cancer Res 3 : 249-256, 1997
Wood et al.		39/86 (45)	J Clin Oncol 15 : 3451-3457, 1997

Table 3. RT-PCR detection of micrometastatic prostate cancer cells in bone marrow in patients with organ-confined diseases or extraprostatic extension diseases

報告者	RT-PCR 法陽性症例数 (%)		文 献
	≤pT2	pT3≤	
Wood et al.	4/20 (20)	15/23 (65)	Cancer 74 : 2533-2540, 1994
Corey et al.	25/37 (68)	19/25 (76)	Urology 50 : 184-188, 1997
Melchior et al.	24/43 (56)	19/26 (73)	Clin Cancer Res 3 : 249-256, 1997
Wood et al.	13/44 (29)	26/42 (62)	J Clin Oncol 15 : 3451-3457, 1997
Wood et al.	1/ 7 (14)	17/22 (77)	Clin Cancer Res 4 : 2119-2123, 1998

Table 4. RT-PCR detection of PSA mRNA in peripheral blood in patients with organ-confined diseases or extraprostatic extension diseases, reported by groups excluding the Columbia University group

報告者	RT-PCR 法陽性症例数 (%)		文 献
	≤pT2	pT3≤	
Israeli et al.	0/18 (0)	1/15 (7)	Cancer Res 54 : 6306-6310, 1994
Lori et al.	1/17 (6)	2/10 (20)	Clin Chem 41 : 698-704, 1995
Sokoloff et al.	30/51 (59)	13/18 (72)	J Urol 156 : 1560-1566, 1996
Corey et al.	8/37 (22)	4/25 (16)	Urology 50 : 184-188, 1997
de Cremoux et al.	3/14 (21)	3/15 (20)	Eur Urol 32 : 69-74, 1997
Melchior et al.	7/43 (16)	7/26 (27)	Clin Cancer Res 3 : 249-256, 1997
Thiounn et al.	4/29 (14)	6/17 (35)	Urology 50 : 245-250, 1997
Ellis et al.	13/75 (17)	10/46 (22)	J Urol 159 : 1134-1138, 1998
Grasso et al.	2/40 (5)	5/27 (19)	Cancer Res 58 : 1456-1459, 1998
Okegawa et al.	2/15 (13)	7/17 (41)	Int J Urol 5 : 349-356, 1998

Table 5. RT-PCR detection of PSM mRNA in peripheral blood in patients with organ-confined diseases or extraprostatic extension diseases

報告者	RT-PCR 法陽性症例数 (%)		文 献
	≤pT2	pT3≤	
Israeli et al.	13/18 (72)	9/15 (60)	Cancer Res 54 : 6306-6310, 1994
Lori et al.	6/17 (35)	6/10 (60)	Clin Chem 41 : 698-704, 1995
Katz et al.	10/48 (21)	9/32 (28)	Urology 47 : 948-958, 1996
Sokoloff et al.	8/51 (16)	4/18 (22)	J Urol 156 : 1560-1566, 1996
Noguchi et al.	1/ 5 (20)	3/ 3 (100)	Int J Urol 4 : 374-379, 1997
Grasso et al.	14/40 (35)	21/27 (78)	Cancer Res 58 : 1456-1459, 1998
Okegawa et al.	4/15 (27)	13/17 (76)	Int J Urol 5 : 349-356, 1998

3. 末梢血中の前立腺癌細胞の検出

RT-PCR 法による末梢血中の前立腺癌細胞の検討は、1992年に Moreno ら¹⁾により初めて報告されたが、それ以後、限局性前立腺癌の病理学的病期の術前の予測法、すなわち molecular staging としての可能性の観点から検討されてきた。1994年にコロンビア大学の Katz らは、限局性前立腺癌患者の根治的前立腺全摘除術術前の末梢血中に PSA mRNA が検出された症例では、摘出組織における前立腺癌の被膜浸潤例と切除断端陽性例とが陰性症例に比較して有意に高いことを報告した⁸⁾ 1998年にはコロンビア大学での根治的前立腺全摘除術300例における術前末梢血中での PSA mRNA の検出結果と病理学的病期との比較が報告され、PSA mRNA 陽性例では75%が癌の前立腺外

伸展の可能性があり、陰性例では76%が前立腺内に限局する可能性があることを示し、術前の病理学的病期の予測に有用であることを追認した⁹⁾ しかしながら、他の施設からの報告では病期が進むにつれ RT-PCR 法陽性率は上昇するものの術前の病理学的病期の予測における有用性を認めないとする報告が大部分を占めている (Table 4)。

RT-PCR 法による末梢血中での PSM mRNA の検出では、PSA mRNA の検出率よりも検出率は上昇するものの、検出結果と病理学的病期との間の相関性については肯定的な報告と否定的な報告が半ばしている (Table 5)。hK2 mRNA の検出に関しては少数の報告例があるのみであるが、検出結果と病理学的病期との間の相関性については否定的である¹⁰⁾

考 察

われわれは、1993年に PSA 遺伝子を標的とした RT-PCR 法を開発した²⁾ 検出感度の検討では、LNCaP 前立腺癌培養細胞より抽出した mRNA $1.84 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ まで PSA mRNA の検出が可能であり、その mRNA 量は LNCaP 細胞の0.1個に相当し、また、末梢血単核球 10^6 個に混入させた場合には、LNCaP 細胞1個まで PSA mRNA の検出が可能な高感度の検出方法であった。その後の検討ではより感度を上昇させるため、PCR を2回繰り返す nested PCR 法も試みられており、末梢血単核球 10^7 個に混入させた LNCaP 細胞1個まで検出可能となっている⁵⁾ しかしながら、高感度になるにしたがって前立腺癌以外の癌細胞での PSA mRNA などの発現および前立腺癌以外の患者、良性疾患患者あるいは健康コントロールの末梢血中での PAS mRNA あるいは PSM mRNA の検出も報告されている¹¹⁾ 今後は検出感度を高めるのみだけでなく、RT-PCR 法による前立腺癌細胞検出の特異性を保つための検出感度の至適化が重要である。また、PSA mRNA と PSM mRNA のいずれが検出の標的として適しているのか、また両者の検出が必要であるのかについても検討の余地が残されている。さらに、最も重要な検討課題である RT-PCR 法により検出される微小癌細胞が常に臨床的に意味のある転移巣を形成するかについては現時点では明確な結論が出ていない。リンパ節微小転移に関しては、Edelstein ら⁴⁾ は骨盤内リンパ節の RT-PCR 法にて PSA mRNA の発現を認めた16例中14例 (88%) に5年以内に血清 PSA 値の上昇を認め、RT-PCR 法によるリンパ節転移診断の結果と臨床経過との関連を報告した。われわれは RT-PCR 法のみによりリンパ節転移と診断した2例に対して、術後内分泌療法を施行しており、これら2症例においては、現時点では、血清 PSA 値の上昇、再発などを認めていない¹²⁾ Wood らは、臨床的に前立腺に局在する前立腺癌に対して根治的前立腺全摘除術が施行された86例を対象として、術前の骨髄における RT-PCR 法による PSA mRNA の発現と予後との関連を検討した¹³⁾ RT-PCR 法陽性例39例中10例 (26%)、陰性例47例中2例 (4%) に再発が認められ、RT-PCR 法陽性例は陰性例に比較して有意に癌なし生存期間が短いことを報告し、RT-PCR 法により検出される骨髄微小転移が根治的前立腺全摘除術が行われる患者の予後予測因子として有用であることを示唆した。また、Melchior らは根治的前立腺全摘除術後に骨髄内の PSA mRNA のモニターが再発の予測する上で臨床上有用となる可能性を示唆した¹⁴⁾ RT-PCR 法による末梢血中での PSA mRNA の検出の予

後因子としての検討では、限局性前立腺癌患者において根治的前立腺全摘除術術前の PSA mRNA 陽性例は陰性例に比較し術後の生化学的再発が有意に高いことが示された¹⁵⁾ またホルモン療法不応性前立腺癌転移症例の検討では、末梢血中での PSA mRNA 陽性例では陰性例に比較して有意に生存率が低下しており、他の予後因子とは独立した予後因子であることが報告されている¹⁶⁾ その一方では、術前の RT-PCR 法の結果と術後の再発との間に関連を認めないとの報告もみられる¹⁷⁾

以上のように、臨床的データはなお少数例でかつ短期間での観察のみであり、まだ十分には得られておらず、RT-PCR 法により検出される前立腺癌微小転移が治療方針の変更を指示するものか、また予後を決定する因子となりうるのかなどの臨床的意義に関しては検討が必要である。今後は微小転移癌細胞の臨床的意義をより明確にするためには、今日まで指標とされてきた PSA や PSM などの前立腺組織マーカーのみならず、癌細胞の悪性度の指標となる遺伝子変化などを合わせて検出することが必要であるのかもしれない。

RT-PCR 法による前立腺癌細胞の検出法は、従来の病理学的方法あるいは画像診断法に比較して高感度の検出法であり、癌微小転移の検出には最適な方法と考えられる。本法はより正確な前立腺癌の病期診断を可能にし、外科的手術の適応と根治性の判定、術後療法の必要な患者の選択、予後の予測などに有用な検査法となる可能性を含んでいる。しかしながら、RT-PCR 法による前立腺癌の微小転移の遺伝子診断の有用性を確立するためには、現時点では RT-PCR 法の至適化と標準化、そして至適化および標準化された RT-PCR 法による多数例での検討と長期の注意深い臨床経過の観察から検出される微小転移の臨床的意義を明らかにすることが不可欠であり、本法はなお研究段階の検査法である。

結 語

リンパ節、骨髄と末梢血中の微小転移前立腺癌細胞の RT-PCR 法による検出に関するわれわれの検討を含む1998年までの報告を集計し、前立腺癌における微小癌転移の遺伝子診断の現状を検討した。RT-PCR 法は前立腺癌のリンパ節転移および骨転移のより正確な評価を可能にし、臨床的局在性前立腺癌の病理学的病期の術前予測を可能にすることが示唆された。さらに、RT-PCR 法は前立腺癌の予後因子となりうる可能性も示唆された。しかしながら、RT-PCR 法は前立腺癌患者において治療方針を決定するための診断方法に発展する可能性を有しているものの、RT-PCR 法の臨床的意義を確立するためには、多数例での検討と長期の注意深い臨床経過の観察から検出される微小

転移の臨床的意義を明らかにすることが不可欠である。

文 献

- 1) Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al.: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* **52**: 6110-6112, 1992
- 2) Deguchi T, Doi T, Ehara H, et al.: Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* **53**: 5350-5354, 1993
- 3) Takahashi T, Hoshi S, Orikasa S, et al.: Genetic diagnosis of pelvic lymph node metastasis in prostate cancer. *J Urol* **155**: 378A, 1996
- 4) Edelstein RA, Zietman AL, Morenas A, et al.: Implications of prostate micrometastasis in pelvic lymph nodes: an archival tissue study. *Urology* **47**: 370-375, 1996
- 5) Ferrari AC, Stone NN, Eyer JN, et al.: Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1498-1504, 1997
- 6) Wood DP Jr, Banks ER, Humphreys S, et al.: Sensitivity of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in detecting prostate cancer cells in bone marrow. *J Histochem Cytochem* **42**: 505-511, 1994
- 7) Deguchi T, Yang M, Ehara H, et al.: Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the bone marrow of patients with prostate cancer. *Br J Cancer* **75**: 634-638, 1997
- 8) Katz AE, de Vries GM, Olsson CA, et al.: Molecular staging of genitourinary malignancies. *Urology* **47**: 948-958, 1996
- 9) Nejat RJ, Katz AE and Olsson CA: The role of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for staging patients with clinically localized prostate cancer. *Semin Urol Oncol* **16**: 40-45, 1998
- 10) Corey E, Arfman EW, Oswin MM, et al.: Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) messages. *Urology* **50**: 184-188, 1997
- 11) Ishikawa T, Kashiwagi H, Iwakami Y, et al.: Expression of alpha-fetoprotein and prostate-specific antigen genes in several tissues and detection of mRNAs in normal circulating blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Clin Oncol* **28**: 723-728, 1998
- 12) Deguchi T, Yang M and Kawada Y: Micrometastasis of prostate cancer to lymph nodes: detection by means of reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1471-1473, 1997
- 13) Wood DP Jr and Banerjee M: Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *J Clin Oncol* **15**: 3451-3457, 1997
- 14) Melchior SW, Corey E, Ellis WJ, et al.: Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* **3**: 249-256, 1997
- 15) Katz AE, de Varies, Benson GM, et al.: The role of the reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for prostate-specific antigen in the selection of patients for radical prostatectomy. *Urol Clin North Am* **23**: 541-549, 1996
- 16) Ghossein RA, Rosai J, Scher HI, et al.: Prognostic significance of detection of prostate-specific antigen transcripts in the peripheral blood of patients with metastatic androgen-independent prostatic carcinoma. *Urology* **50**: 100-105, 1997
- 17) Ellis WJ, Vesella RL, Corey E, et al.: The value of a reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging and followup of patients with prostate cancer. *J Urol* **159**: 1134-1138, 1998

(Received on May 25, 1999)

(Accepted on June 23, 1999)