

## 前立腺癌における血行性微小播種の分子診断

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 並木幹夫教授)

國 見 一 人

### MOLECULAR STAGING OF HEMATOGENOUS MICRODISSEMINATION OF PROSTATE CANCER CELLS

Kazuto KUNIMI

From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

We have used a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for prostate specific antigen (PSA) expression to detect hematogenous microdissemination in patients with prostate cancer. Thirty-nine consecutive patients with prostate cancer were surveyed. Nineteen patients (48.7%) were positive for PSA-expressing cells in this assay. Positivity rates by stage were as follows: stage A1-0/1, A2-0/2, B-2/6, C-2/9, D0-3/3, D1-1/4, D2-11/14. In clinically organ-confined cancers with a positive assay result, two stage C patients subsequently developed bone metastasis, while two stage B patients who were positive had no evidence of disease progression. In patients with a negative assay result, 3 of the 3 stage A, 3 of the 4 stage B, and 6 of the 7 stage C patients did not develop hematogenous dissemination during the follow-up period. Molecular assay for hematogenous microdissemination of prostate cancer cells provides an opportunity for earlier detection of disseminated disease and may have prognostic value.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 791-794, 1996)

**Key words:** Prostate specific antigen, Molecular staging, Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

#### 緒 言

限局性前立腺癌の40~50%は初診時の stage 診断が understaging であるとする報告<sup>1)</sup>があること, また骨転移の臨床診断法としてルーチン化されている骨シンチ検査において, 加齢がもたらす骨変化による偽陽性所見や画像分解能レベル以下の陰性所見が認められることは, 正確な stage 診断を妨げる一因である。

前立腺癌の臨床診断におけるこのようなジレンマは

種々の悪性腫瘍の場合でも同様であり, この問題点を解決すべく, 正常細胞には認められず癌細胞に特異的な DNA 配列, あはいはメッセンジャー RNA (mRNA) をマーカーにした分子診断法が検討されてきた (Table 1)。この分子診断学の背景には, 逆転写酵素反応—ポリメラーゼチェーンリアクション (RT-PCR) 法などの進歩により, 目的とする DNA, RNA の塩基配列の微量検出が可能になったことが寄与しているものと考えられる。

今回, 当院および関連病院を受診した前立腺癌患者 39人を対象に, 前立腺特異抗原 (PSA) の mRNA を前立腺癌細胞のマーカーとした血行性癌微小播種の分子診断法を検討したので報告する。

#### 対 象 と 方 法

種々の stage の前立腺癌患者39人, および陰性コントロールとして, 前立腺肥大症患者 5人, 急性前立腺炎患者 1人, 女性患者 5人より末梢静脈より約 10 ml 採血後, Ficoll-Paque gradient centrifugation 法にて, 血液中の細胞分画を採取した。さらに TRIzol™ 溶液を用いて細胞分画の RNA を抽出した。なお, PSA mRNA 産生が認められる前立腺癌樹立細胞株 LNCaP より抽出した RNA を陽性コントロールに用いた。Fig. 1 に示すような PSA mRNA 配列に相補

Table 1. Molecular staging of cancer using PCR technique

Primary	Site of interest	Marker
All	Peripheral blood	T cell receptor $\sigma$ subtype
Melanoma	Peripheral blood	Tyrosinase
Neuroblastoma	Peripheral blood	Neuroendocrine protein gene product 9.5
Breast, Colorectum	Peripheral blood Bone marrow. LN	Keratin 19
Prostate	Bone marrow LN Peripheral blood	PSA PSA, PSM
Breast, Gastrointestine	LN	CEA
Gastrointestine	LN	Mutated K-ras or p53

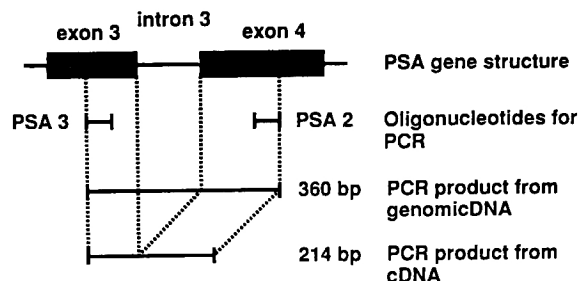


Fig. 1. Schematic illustration of a set of PSA-based RT-PCR primers. Complementary sequences of the PSA gene to PSA2 and PSA3 span intron III to discriminate amplification of the PSA mRNA (214 bp) from that of genomic DNA sequences (360 bp) which might contaminate cellular RNA preparation.

的なプライマー (PSA2 と PSA3) を用いて RT-PCR 増幅後、電気泳動を行い、PSA mRNA 由来である 214 bp サイズの PCR 産物の有無をサザン解析にて検出した。なお、正常、癌細胞いずれにおいても恒常的に発現しているとされるトランスフェリンレセプターの mRNA 配列に相補的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、抽出した RNA のクオリティーに問題がないことをあらかじめ確認した。

## 結 果

Fig. 2 にサザンオートラジオグラムを示すが、トランスフェリンレセプターの mRNA はほぼ一様に発現しており、RNA の変性が生じていないものと判定された。また、図中の case 2 および 12 で認められる 360 bp サイズの PCR 産物は RNA 抽出操作中の contaminated DNA 由来のシグナルであり、PCR 産物のサイズより、RNA 由来のものと区別可能であった。一方、前立腺癌患者の検体からは、種々の強度を示す PCR 産物のシグナルがえられた。前立腺癌患者 39 人中 19 人 (48.7%) が陽性を示し、前立腺肥大症患者 5 人、急性前立腺患者 1 人、女性患者 5 人はいずれも陰性であった。

前立腺癌患者の種々の stage 別の陽性率は、stage A1: 0/1, A2: 0/2, B: 2/6, C: 2/9, D0: 3/3, D1: 1/4, D2: 11/14 であった (Table 2)。また、病理学的分化度別の陽性率は、高分化型: 2/5, 中分化型: 7/16, および低分化型: 10/16 であった。

stage B および C の患者における PSA RT-PCR アッセイの結果とその後の臨床経過とを比較した (Table 3)。対象となった stage B 患者は、いずれもアッセイ検討後根治手術を受け、アッセイ陽性を示した 2 人はいずれも術後観察期間 (13, 21 カ月) 中、再発・遠隔転移を認めていない。アッセイ陰性を示した 4 人においては、3 人が術後 9, 13, 15 カ月間再発

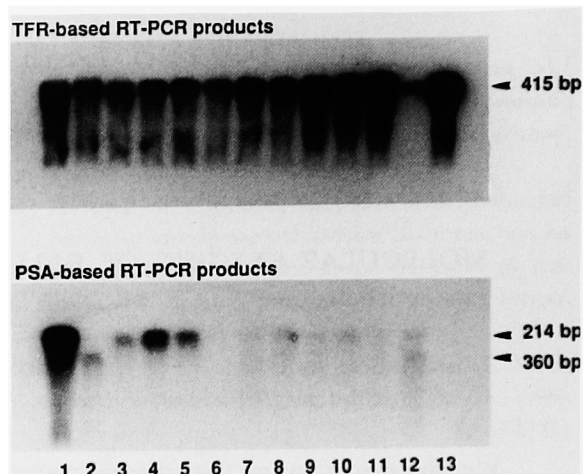


Fig. 2. Representative Southern autoradiograms of TFR- and PSA-based RT-PCR assay. TFR-based RT-PCR products yielded approximately homogenous autoradiographic signals (top), but PSA-based RT-PCR products showed a wide range of signal intensities among the samples tested (bottom). Lanes 2 and 12 showed a low signal intensity, not originating from PSA mRNA, but from genomic DNA. Lane 1: LNCaP cells (positive control), 2: BPH, 3: stage D0, 4 and 5: stage D2, 6: female, 7-9: stage C, 10-12: stage B, and 13: stage A2.

Table 2. Positive rates of PSA-based RT-PCR assay and pathological differentiation and stage of prostate cancers

Pathological differentiation	Positive rate (%)
Well	2/5 (40.0)
Moderately	7/16 (43.8)
Poorly	10/16 (62.5)
Unknown	0/2 (0.0)
Stage	
A	0/3 (0.0)
B	2/6 (33.3)
C	2/9 (22.2)
D0	3/3 (100.0)
D1	1/4 (25.0)
D2	11/14 (78.6)

遠隔転移を認めておらず、1 人は 21 カ月後に骨転移 (EOD 1) が発見された。stage C 患者については、アッセイ陽性 2 人は、それぞれ 6, 11 カ月後に EOD 1 の骨転移が認められた。アッセイ陰性 7 人のうち、手術を受けた 3 人では、2 人が術後それぞれ 11, 13 カ月間、再発・遠隔転移が生じておらず、残りの 1 人に局所再発が認められた。抗ホルモン療法が施行された 4 人では、3 人がそれぞれ 12, 14, 20 カ月間、stable disease の状態であり、1 人は 16 カ月後に EOD 1 の骨転移が認められた。

Table 3. Results of PSA-based RT-PCR assay and clinical outcome of stages B and C

	Positive	Negative
Stage B	NED for 13 mo. NED for 21 mo.	Post-ope, NED for 9 mo. Post-ope, NED for 13 mo. Post-ope, NED for 15 mo. Post-ope, EOD1 after 21 mo.
Stage C	EOD1 after 6 mo. EOD 1 after 11 mo.	Post-ope, NED for 11 mo. Post-ope, NED for 13 mo. Stable disease for 12 mo. Stable disease for 14 mo. Stable disease for 20 mo. EOD 1 after 16 mo. Post-ope, local recurrence

考 察

従来の血清腫瘍マーカーとしての PSA 値測定は、前立腺（癌）細胞より分泌され、血中に leak した PSA タンパクを定量解析するものであり、間接的な、あるいは臨床統計学的な遠隔転移の指標としての一面を有する。一方、今回の検討で示した分子学的診断法は、PSA タンパクの産生源である mRNA を癌細胞のマーカーにした解析法であり、PSA mRNA を有する癌細胞を血液中より直接証明しうる方法といえる。血液中の前立腺癌細胞の検出を試みた報告を遡ると、Handy ら<sup>2)</sup>は血液中の細胞成分を分離し、抗 PSA 抗体を用いて免疫染色を施し癌細胞の同定を検討している。しかし、血液中に遊離している PSA タンパクを貪食した immunocyte の像と癌細胞の像とを明確に鑑別することは困難であったと述べている。この限界を克服しうる分子学的なアプローチとして、1992年、Moreno ら<sup>3)</sup>は stage D の前立腺癌患者の末梢血を対象に PSA RT-PCR 法を行い、高率に癌細胞が血中に存在することを報告している。われわれも彼らの方法に準じて検討した結果、同様に stage D 患者における高い陽性率がえられ、PSA RT-PCR 法による血中微小播種検出の妥当性が示されたものと解釈している。また、血液中の播種の検出のみならず、Deguchi ら<sup>4)</sup>は、骨盤リンパ節組織に PSA RT-PCR 法による分子診断法を応用し、微小リンパ節転移に有用な方法であると報告している。

今回の検討において、限局性前立腺癌患者のうち、stage B の 6 人中 2 人、stage C の 9 人中 2 人が PSA RT-PCR アッセイで陽性を示し、その後の臨床経過から結果的に PSA RT-PCR アッセイが血中播種の早期微小診断につながった症例が認められたことは、前立腺癌の臨床診断の限界、あるいは under-estimation の可能性を示唆するものである。また、逆に PSA RT-PCR アッセイで陽性を示し血中微小播種の可能性が疑われたにもかかわらず、臨床的には no

evidence of disease の症例も認められたことは、血中に存在する癌細胞が必ずしも臨床的な転移巣形成につながらないことを示している。このことは、Liotta らの報告結果<sup>5)</sup>と符合するものである。いずれにせよ、PSA RT-PCR アッセイによる分子診断法は癌播種の微小・早期発見につながりうる可能性を秘めており、今後対象症例数を増やし、個々の臨床経過との関連を観察すべきものと考えている。

上述した PSA RT-PCR アッセイの over-estimation の問題の他に、血液中に癌細胞が遊離していても、同アッセイの検出能以下のレベルの PSA mRNA しか有さない細胞であれば、偽陰性になるという欠点が挙げられる。この点に関して、Memorial Sloan Kettering からの報告<sup>6)</sup>では、前立腺癌細胞の細胞膜局在型タンパクである prostatic specific membrane antigen (PSM) がクロニングされ、PSA RT-PCR アッセイが陰性で PSM RT-PCR アッセイで陽性を示した例が報告されている。このようにアッセイの感度を高める工夫に進展がみられる一方、マーカー遺伝子の選択、PCR プロトコルやプライマーのデザインを変えることにより特異性が低下することが示唆されており、分子診断の臨床応用を考えるうえでアッセイの感度と特異性の両者が適度なバランスを保つことが必要と考えられる。

文 献

- 1) Epstein JI, Pizov G and Walsh PC: Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer* **71**: 3582-3593, 1993
- 2) Handy FC, Lawry J, Anderson JB, et al.: Circulating prostate specific antigen-positive cells correlate with metastatic prostate cancer. *Br J Urol* **69**: 392-396, 1992
- 3) Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al.: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* **52**: 6110-6112, 1992

- 4) 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
- 5) Liotta LA, Kleinerman J and Saidel G : Quantitative relationships of intravascular tumor cells : tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* **34** : 997-1003, 1974
- 6) Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, et al. : Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostate cancer cells : comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* **54** : 6306-6310, 1994

(Received on June 17, 1996)

(Accepted on July 16, 1996)

(迅速掲載)