

フローサイトメトリーによる前立腺上皮細胞 の PA/DNA 量同時解析

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 酒徳治三郎教授)

島袋 智之, 吉弘 悟, 松山 豪泰

山本 憲男, 酒徳治三郎

PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (PA) AND DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) ANALYSIS IN THE PROSTATIC EPITHELIAL CELLS USING FLOW CYTOMETRY

Tomoyuki SHIMABUKURO, Satoru YOSHIHIRO, Hideyasu MATSUYAMA,
Norio YAMAMOTO and Jisaburo SAKATOKU

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

We developed a new method to analyze simultaneously cellular prostate-specific antigen (PA) content and deoxyribonucleic acid (DNA) content of each prostatic epithelial cell by using flow cytometry (FCM). We report the possibilities of this method and we analyzed firstly 8 samples from 6 patients with benign prostatic hypertrophy (BPH). The content of cellular PA and DNA of prostatic epithelial cells can be analyzed simultaneously. The PA is synthesized only in the cells with a 2C DNA content ($G_{0/1}$ cells) and not in the S- or G_2M -phase cells. In the near future, by applying this analytical method to prostatic cancer samples we could obtain more interesting knowledge of the behavior of prostatic cancer.

(Acta Urol. Jpn. 35: 1335-1337, 1989)

Key words: Prostate-specific antigen, DNA, Flow cytometry

緒 言

Wang ら¹⁾によって報告された前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen: PA) は, 前立腺癌の腫瘍マーカーのひとつとして注目を浴びてきた. とくに血清 PA 値を測定することにより, 診断や臨床経過判定に役立てようとする試みが多数報告されている^{2,3)}. しかしながら前立腺上皮細胞における PA の産生・分泌に関する問題や, 進行前立腺癌組織においては PA の陽性率が低下傾向にある⁴⁾反面, 何故血清 PA 値が高値をとるのかという問題も興味深いテーマである. これらの問題を解決することは, PA の腫瘍マーカーとしての可能性と限界について知るために, きわめて重要であると思われる.

この論文では, flow cytometry (FCM) を用いて前立腺上皮細胞内 PA 量と DNA 量を同時に測定する方法を開発したので報告する. 併せて PA の産生に関して若干の知見を得たので報告する.

対象と方法

対象は経尿道的に切除された前立腺肥大症 6 例 (8 検体) である. 年齢分布は 53-77 歳で, 平均年齢は 69 歳であった. 切除された数片の前立腺組織を軽く PBS にて洗浄したあと, 間質組織や焼灼部を除去しながらメスの刃を用いて細切した. ついで, 0.1% collagenase (Sigma 社, type I) 液を用いて 37°C・60 分間の細胞分散処理を行った. 再度 PBS にて洗浄し, ナイロン・メッシュを通して細胞塊を除去したあと, 70% 冷エタノールにて固定し 4°C にて保存した.

免疫蛍光二重染色法の既略を Fig 1 に示した. すなわち, 固定細胞を PBS にて 2 回洗浄し, エタノールを除去したあと, 0.5% BSA と 0.5% tween 20 含有 PBS で 100 倍に希釈した抗 PA モノクローナル抗体 (和光純薬工業) を, 室温で 1 時間反応させた. 再度 PBS にて洗浄したあと, 同様に 50 倍に希釈した FITC 標識二次抗体 (DAKO 社) を室温で 30 分間反応させ, 最後に 20 $\mu\text{g/ml}$ の Propidium Iodide

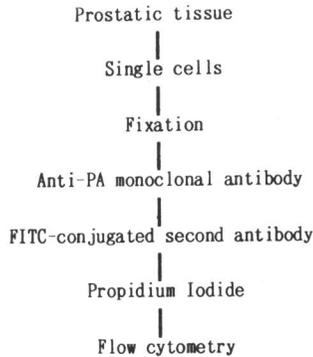


Fig. 1. Immunofluorescent staining method of cellular prostate-specific antigen (PA) and deoxyribonucleic acid (DNA).

(Sigma 社, PI) 液で室温・1時間の DNA 染色を行った。

フローサイトメトリー: 測定装置は EPICS 753 (Coulter Electronics Inc.) を用いた。励起光は 488 nm, 300 mW の LASER 光線を用いて行い, PI よりの赤色蛍光強度は 630 nm long-wave pass filter を通し, FITC よりの緑色蛍光強度は 560 nm short-wave pass filter と 525 nm band pass filter を組み合わせて測定した。また, PI と FITC の蛍光強度を同時に測定し, PI の蛍光強度は横軸 (linea 表示) に, FITC の蛍光強度は縦軸 (log 表示) にとり, 64×64 チャンネルの二次元座標上に dot plot として表示した。さらに X 軸に DNA 量, Y 軸に PA 量, Z 軸に細胞数をとった三次元座標上に表示し, 理解し易くした。装置は CV 値が 2% になるように調整し

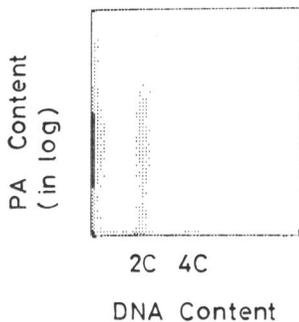


Fig. 2. Dot plots of bivariate PA/DNA distributions measured for prostatic epithelial cells obtained from BPH tissue. The y-axis is \log_{10} green fluorescence of fluorescein (PA content) and the x-axis is linear intensity of red fluorescence of PI (DNA content). Note that the PA is synthesized only in the G₁-phase cells.

たあと, 1 検体につき 2×10^4 個の細胞について測定を行った。

結 果

前立腺肥大症 6 例全例とも PA 陽性であり, PA/DNA 同時解析が可能であった。Fig. 2 と Fig. 3 に代表的な二次元像と三次元像を示したが, 全例ともほぼ同様のパターンを呈していた。DNA 分布は全例 diploid パターンを呈しており, DNA aneuploidy や heterogeneity は認めなかった。また全例とも PA 分布は G_{0/1} 期 (2C) にある細胞にのみ認め, S 期や G₂M 期 (4C) にある細胞では認めなかった (Fig. 2, 3)。それぞれの症例において, 緑色蛍光強度 (PA 量に比例) に明らかな差はなかった。

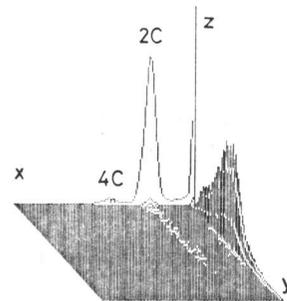


Fig. 3. Three-dimensional cytogram of Fig. 2. The z-axis is frequency of cell number.

考 察

前立腺特異抗原 (PA) は前立腺組織・精漿より精製された, 分子量約 35KD の糖蛋白であり, 前立腺癌の新しいマーカーとして γ -seminoprotein (γ -Sm) とともに現在盛んに研究されている。最近, PA の完全なアミノ酸組成と cDNA シーケンスが決定された^{5,6)}。その構造は kallikrein 様蛋白, とくに human kallikrein hGK-1 と human pancreatic kallikrein との類似性が指摘されている。したがって PA も蛋白分解酵素であり, その生体内での役割のひとつは seminal coagulum を消化し, 種々の分解物にすることだと思われる。しかしながら, 前立腺上皮細胞における PA の産生や分泌機構に関してはいまだ明確な報告は見られない。日常の臨床現場において, 血清 PA 値を測定することの真の意味を知るためにも, 是非とも解決しなければならない問題である。

今回の検討結果から注目されるのは, PA は 2C の DNA 量を有する細胞 (G_{0/1} 期細胞) においてのみ産

生され, S期や G₂M期にある細胞では産生されていないことが確認されたことである。分化した前立腺上皮細胞の正常の機能としての, 蛋白分解酵素である PA 産生ということを考えれば, この結果は想像されえる結果であった。しかしながら, 前述したごとく前立腺上皮細胞における PA の産生, 分泌機構に関して不明確な部分が多く, 今後この方面の研究の発展が望まれるところである。

今回の症例は全例前立腺肥大症であったため, DNA aneuploidy を呈する症例は見られず, また緑色蛍光強度 (PA 量に比例) にも明らかな差は認められなかったが, 今後種々の分化度の癌症例を用いてこの同時測定法を行うことにより, PA/DNA 分布に関してさらに興味深い知見が得られると思われる。この意味からも期待の持てる方法と考えられた。

結 語

前立腺上皮細胞内 PA 量と DNA 量を同時に測定可能な FCM 法を開発した。その可能性を探るため, 前立腺肥大症の組織検体を用いて基礎的検討を行い, 以下の結果を得た。

1. FCM 法により, 前立腺上皮細胞内 PA 量と DNA 量を同時に測定できた。
2. 前立腺肥大症の全例とも DNA 分布は diploid pattern を呈していた。
3. PA は 2C の DNA 量を有する細胞 (G_{0,1} 期細胞) でのみ産生され, S 期や G₂M 期にある細胞では産生されていなかった。

今後前立腺癌症例にも本法を適用することにより, さらに興味深い知見が得られると思われる。

文 献

- 1) Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP and Chu TM: Purification of human prostate specific antigen. *Invest Urol* **17**: 159-163, 1979
- 2) Killian CS, Yang N, Emrich LJ, Valgas FP, Kuriyama M, Wang MC, Slack NH, Papsidero LD, Murphy GP, Chu TM and the Investigators of the National Prostatic Cancer Project: Prognostic importance of prostate-specific antigen for monitoring patients with stage B₂ to D₁ prostate cancer. *Cancer Res* **45**: 886-891, 1985
- 3) Oesterling JE, Chan DW, Epstein JI, Kimball JR, AW, Bruzek DJ, Rock RC, Brendler CB and Walsh PC: Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* **139**: 766-772, 1988
- 4) 鳥袋智之, 吉弘 悟, 松山豪泰, 山本憲男, 酒徳治三郎: 前立腺特異抗原の病理組織学のおよびフローサイトメトリーによる検討。西日泌尿: 投稿中
- 5) Watt KWK, Lee PJ, M^oTimukulu T, Chan W and Loo R: Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 3166-3170 1986
- 6) Riegman PHJ, Klassen P, van der Korput JAGM, Aomijn JC and Trapman J: Molecular cloning and characterization of novel prostate antigen cDNA's. *Biochem Biophys Res Commun* **155**: 181-188, 1988

(1988年11月15日受付)