

吸引細胞を用いた前立腺癌骨盤内リンパ節転移の遺伝子診断

東北大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 折笠精一教授)

星 宣次, 折笠 精一, 高橋とし子

鈴木 謙一, 金田 隆志, 斎藤 英郎

吉川 和行, 小野久仁夫, 引地 功侃

東北大学臨床検査診断学教室

大川 淳雄, 船渡 忠雄

GENETIC DIAGNOSIS OF PELVIC LYMPH NODE METASTASIS USING FINE NEEDLE ASPIRATION SAMPLES IN PROSTATE CANCER

Senji HOSHI, Seiichi OIKASA, Toshiko TAKAHASHI,

Ken-ichi SUZUKI, Takashi KANEDA, Hideo SAITOH,

KAZUYUKI YOSHIKAWA, Kunio ONO and Yoshinao HIKICHI

From the Department of Urology, Tohoku University School of Medicine

Atsuo OHKAWA and Tadao FUNATO

From the Department of Clinical and Laboratory Medicine, Tohoku University

We have developed a highly sensitive method to detect pelvic lymph node metastasis using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers specific for prostate-specific antigen (PSA) gene. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) of pelvic lymph nodes was performed in 24 patients with prostate cancer. Each aspirated sample (0.05–0.1 ml) was divided into 2 parts; one for RNA extraction and RT-PCR to detect the fragment of PSA mRNA, and the other to smear on a slide glass for conventional cytology.

The PSA gene was detected by RT-PCR in 11 FNAB samples which included not only all 6 cytologically positive and 2 cytologically class III cases but also 3 of 16 cytologically negative cases. The PSA gene was not detected by RT-PCR of FNAB samples in any of the 20 cases of bladder cancer. Thus RT-PCR for detection of the PSA gene in FNAB samples may be useful as a new diagnostic technique for detection of early lymph node metastasis in prostate cancer and an additional tool for cytological diagnosis of prostate cancer.

(Acta Urol. Jpn. 42: 781–785, 1996)

Key words: Prostate cancer, Lymph node metastasis, Fine needle aspiration biopsy, PSA mRNA, RT-PCR

緒 言

前立腺癌の骨盤内リンパ節転移の診断目的に両足背のリンパ管造影後の透視下のリンパ節穿刺細胞診(FNAB)を行ってきた。これまでに119例にリンパ節生検を行い前立腺癌40例の骨盤内リンパ節転移を診断してきた。40例の細胞診断陽性例中リンパ管造影で陽性は25例63%, CT/MRIでの陽性は12例30%であった。つまり28例(70%)はN1ないしN2の症例でありCT/MRIでは検出できない例であった¹⁾しかし、細胞診にはclass IIIの症例があり特に、組織球との鑑別が問題となる。また、Papanicolaou染色では細胞がアルコール固定中に流れる可能性がある。

一方前立腺特異抗原(PSA)は前立腺組織抗原であ

り、正常前立腺細胞、前立腺癌細胞で発現し、転移腫瘍ではPSAの発現が前立腺原発であることの証明に利用されている²⁾。そこでFNABの細胞液を用いたRT-PCR法³⁻⁶⁾によるPSA mRNAの検出による遺伝子診断を試みた。

材料および方法

1 検査材料は尿路性器の腫瘍株で前立腺癌培養細胞PSAを産生するLNCaP細胞⁷⁾、PSAを産生しないPC-3⁸⁾、DU-145細胞⁹⁾、腎癌細胞TOS-1、TOS-2、R4、ACHN、膀胱癌細胞YST-1、KK47、精巣腫瘍細胞NEC8、NEC14を10%牛胎児血清入り

的にうすめ、 10^6 個の健常人リンパ球を加え 1,500 rpm で遠沈しペレットを凍結保存した。

2. 前立腺癌23例、膀胱癌20例の骨盤内リンパ節吸引生検 (FNAB) の採取液を用いた。方法はあらかじめリンパ管造影を行ったリンパ節を経腹的に穿刺吸引する。硬膜外麻酔科に患者を仰臥位とし 23 gauge 15 cm の tops 製の穿刺針にて経腹的に穿刺する。レ線透視下に穿刺を行い、細胞診断者がその場で Diff Quick 法にて染色し診断する。細胞が十分とれていないときはその場で再検する。穿刺されたリンパ節は造影剤が吸引され丸く抜けるのが透視下に観察される。吸引細胞液 (0.05~0.1 ml) を 2 分し、一つはエッペンドルフチューブに入れ液体窒素で凍結保存した。他方はスライドガラスに塗布し、従来の細胞診を行った^{10,11)} 細胞診陽性、class III のプレバートは脱色し PSA 単クローン性抗体 (DAKO, Denmark) を用い PSA 免疫染色を行った¹²⁾

3. RNA 抽出 : 上記 1, 2 のサンプルより ISOGEN-LS にて total RNA を抽出し、50 μ L の RNase-free の溶液に溶解し、RNA 量を試色計にて測定する。

4. 逆転写反応 : 1 μ g の total RNA に 0.5 μ g の oligo (dT) primer を加え 65°C に 5 分間おき次に氷冷する。dNTP, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, DTT, RNase 阻害剤を加え 42°C 15 分反応させ、cDNA を合成する。

5. Polymerase chain reaction¹³⁾ : PSA cDNA^{14,15)} をコードする oligonucleotide primer は、PSA センス側 : 5'-TGCGCAAGTTCACCCCTCA-3' (595-612) PSA アンチセンス側 : 5'-CCCTCTCCTTACTTCA-TCC-3' (1347-1329) とし、それぞれの cDNA サンプルに、20 mM の Tris-HCl, 50 mM の KCl, 1.5 mM の MgCl₂, 0.2 mM のそれぞれの dNTP, 2.5 U の Taq polymerase, それぞれの 10 pM の primer

を加え PCR 反応を 94°C 5 分、さらに 94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分を 40 cycle 繰り返し行い、2 本鎖 DNA の 1 本鎖への分離、合成プライマーの 1 本鎖への annealing, DNA polymerase によるプライマーの伸長反応を行い目的とする DNA 断片を増幅した。

6. PCR 産物の電気泳動 : PCR 産物を 40 mM の Tris 酢酸塩, 1 mM EDTA 緩衝液の 1.7% agarose gel にて電気泳動を行い、ethidium bromide を紫外線下に発色させた。PSA 遺伝子は 753 bp に band が認められる。

7. サザンプロットによる PCR 産物の確認 : PSA の内部プローブ 5'-GTTGCTAGGAAAAGGAA-TCA-3' を用いて PSA の PCR 産物をサザンプロット法により確認した。

えられた遺伝子診断と従来の細胞診を比較した。

結 果

PSA を産生するヒト前立腺癌細胞 LNCaP を末梢白血球 10^6 個に混入させて検討した。LNCaP 細胞は計算上 1 個までの希釈で検出が可能であり、これらを Southern blot にて確認した (Fig. 1)。

前立腺癌の PC-3, DU-145, 膀胱癌 YST-1, KK47, 腎癌 TOS-1, ACHN, N4, 精巣腫瘍 NEC8, NEC14 はいずれも陰性であった。

FNAB 標本では膀胱癌で陰性であった。前立腺癌で陽性例が認められ (Fig. 2), FNAB 標本の細胞診では 24 例中 6 例が陽性、2 例が class III。遺伝子診断では細胞診陽性の 6 例、class III の 2 例の他に細胞診陰性の 3 例が陽性であった。PSA 免疫染色では細胞診陽性はすべて陽性であったが class III はいずれも陰性であった (Table 1)。13 例に前立腺全摘、リンパ節郭清を行った。摘出リンパ節の組織診断はいずれも転移なしであった。症例 4 は pT2aN0 であったが

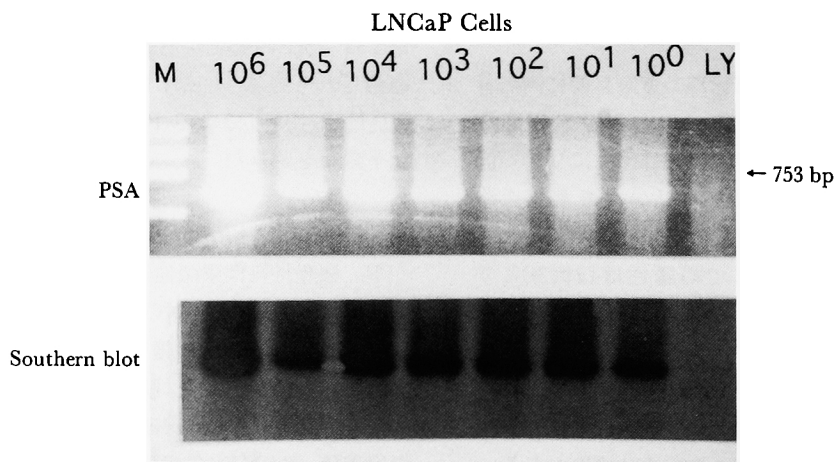


Fig. 1. Sensitivity of RT-PCR in detecting LNCaP cells mixed in 10^6 PBMC; LNCaP cell was mixed from 10^6 to 10^0 . Marker lane was loaded with *Hae*III-digested ϕ X174 DNA.

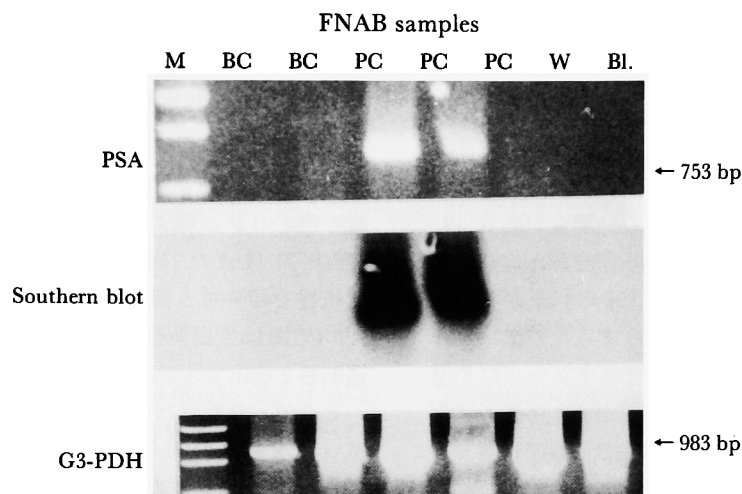


Fig. 2. Detection of mRNA from FNAB samples of pelvic lymph nodes mixed in 10^6 PBMC; BC: FNAB sample of pelvic lymph nodes in bladder cancer patient, PC: FNAB sample of pelvic lymph nodes in prostate cancer patient, W: PBMC without FNAB sample, Bl.: Distilled water.

Table 1. Results of RT-PCR in FNAB samples and clinical data on patients of prostate cancer

Name/Age	FNAB sample			Serum PSA* value (ng/ml)	Grade	Clinical Stage
	PSAmRNA	Cytology	PSA immunostain			
1 T.K. 71	+	+	+	136	II	T3N2M1
2 T.O. 72	+	+	+	110	III	T3N2M1
4 K.T. 65	-	-	n.d.	5.8	III	T2N0M0
4 K.H. 55	+	class III	-	10.5	III	T1N0M0
5 K.H. 61	+	+	+	60	III	T3N3M1
6 B.K. 55	+	+	+	3.2	III	T3N2M1
7 T.N. 62	+	+	+	8.4	II	T3N2M1
8 S.S. 60	-	-	n.d.	3.5	I	T1N0M0
9 K.S. 61	-	-	n.d.	5.1	I	T1N0M0
10 G.T. 79	+	class III	-	5.1	III	T2N0M0
11 T.A. 60	+	-	n.d.	3.2	I	T3N0M0
12 E.W. 76	-	-	n.d.	25.1	I	T2N0M0
13 K.S. 70	-	-	n.d.	1.1	II	T1N0M0
14 M.N. 66	+	-	n.d.	2	I	T2N0M0
15 E.T. 69	-	-	n.d.	11.8	II	T3N0M0
16 E.S. 72	-	-	n.d.	4.5	II	T2N0M0
17 E.C. 68	+	+	+	3,820	III	T3N3M0
18 Y.S. 65	-	-	n.d.	62	I	T3N0M0
19 G.K. 57	-	-	n.d.	17	I	T2N0M0
20 I.A. 67	-	-	n.d.	31.9	I	T3N0M0
21 I.A. 67	-	-	n.d.	5.9	I	T2N0M0
22 H.F. 70	-	-	n.d.	85	III	T3N0M0
23 Y.S. 61	-	-	n.d.	21.5	II	T2N0M0
24 H.T. 62	+	-	n.d.	3.2	III	T3N0M0

n.d.: not done. Clinical stage: decided without the data of FNAB. * Conversion to Tandem-R PSA was made.²³⁾

術後10カ月より血清 PSA 上昇中。症例11は pT3bN0 であったが摘出リンパ節も PSA 遺伝子を発現していた。

考 察

前立腺癌の骨盤内リンパ節転移の診断に腹腔鏡下リンパ節郭清が行われているが、腹腔鏡下リンパ節郭清

には全身麻酔が必要で、手術時間も2時間以上を要し、腸管の癒着による腸閉塞、腸管損傷、出血、感染などの合併症が報告されている¹⁶⁾。一方、骨盤内リンパ節の吸引生検は非常に簡単で、局所麻酔で十分であり、検査時間も30分以内であり、合併症もまったくみられない。さらに FNAB 陽性リンパ節には、neoadjuvant 療法後再度の FNAB にて neoadjuvant 療

法の評価ができるので大変有用である¹⁾

しかし、FNABの細胞診はしばしば困難となる場合がある。1. 23 gaugeの細針によるFNABでは採取される細胞数が少ない。2. 血液の混入のためリンパ節より採取された細胞が希釈され塗抹されたプレパラート上に細胞が載らず診断できない場合がある。3. リンパ管造影後リンパ節に浸潤する組織球と鑑別が難しい場合があり、しばしばclass IIIの診断がなされるがclass IIIの診断は臨床的にはまったく意味がない。4. パパニコロー染色では95%エタノールにて湿固定するが、この際採取された細胞が流れ落ちる場合がある。このよう原因により細胞診の正診率を落としている。

一方、RT-PCR法は微量のmRNAよりcDNAを何百倍にも増幅する方法である。RT-PCR法によるPSA遺伝子の検出は現在盛んに研究されている。Woodら¹⁷⁾はsense側800~817の塩基、anti-sense側957~975塩基を用い176 base pairのPCR産物を骨髓より検出している。Deguchiら¹⁸⁾はsense側858~875、anti-sense側1592~1610で753 base pairのPCR産物をリンパ節と骨髓より検出している。Morenoら⁶⁾、国見ら(金沢大)はexon 3-4間のPCR primerにて214 base pairで血中の細胞を検出している。Katzら¹⁹⁾はexon 3-5間のPCR primerにて710 base pairで血中の細胞をdegoxigeninによりenhanced PCRにて検出している。われわれも6例の末梢血単核球よりPSA遺伝子を検出しているがいずれもstage D例であった。

Israeliら²⁰⁾はnested PCRにて新たな前立腺特異抗原であるprostate membrane antigen (PSM)につき検討しており、PSAのprimerよりPSMのprimerを用いたほうが血中の細胞の検出感度が高かったと述べている。しかし、われわれのPSMの検討ではPSMは種々の尿路性器癌細胞に発現しており特異性に乏しかった。血液サンプルについても、Israeliらは腎癌と精巣腫瘍のそれぞれ1例にPSMの発現を認めているが、われわれも腎癌、膀胱癌、精巣腫瘍、さらに健常人でもPSMの発現が認められた。さらにCytogen社のPSM単クローン性抗体(CYT-351)で免疫染色を行ったが、前立腺癌の他に膀胱腫瘍、精巣腫瘍でも染色された²¹⁾

PSAを産生するLNCaPヒト前立腺癌細胞より抽出したtotal RNAよりわれわれ独自のPSA primerを用いて、753 bpのPSA遺伝子に特異的な遺伝子の断片を増幅することができた。PC3、DU145では検出できず他の尿路癌細胞でも検出できなかった。LNCaP細胞の希釈系列により10⁶個の末梢血単核球中に1個のLNCaP細胞、0.1個分のmRNAが存在すれば検出が可能であった。

臨床の腫瘍を用いた場合は検出感度は各腫瘍により異なるが、RT-PCR法を用いたPSA mRNAの検出感度は従来の組織学的あるいは免疫細胞化学的検出法よりも優れていることが示されている。Deguchiら¹⁸⁾は22例の前立腺全摘術を受けた限局性前立腺癌中6例のリンパ節よりPSA mRNAが検出された。RT-PCR陽性の9個のリンパ節中PSA単クローン性抗体を用いて5個のみが検出された。このようにRT-PCRは免疫染色でも検出されない微小なリンパ節転移を検出できる。

そこでわれわれは骨盤内リンパ節のFNAB標本を用いてRT-PCR法によるPSA遺伝子の検出に応用した。FNAB標本の細胞診では24例中6例が陽性、2例がclass IIIであったが、遺伝子診断では細胞診陽性の6例、class IIIの2例の他に細胞診陰性の3例が陽性であった。このように遺伝子診断法は従来の細胞診を凌ぐ可能性が示された。骨盤内リンパ節のFNABはリンパ管造影を行わなければできないので、リンパ管造影に新たな適応をもたらした。

これまで23 gaugeの細針を用いて460例の骨盤内後腹膜リンパ節のFNABを行ってきたが、出血、感染、腫瘍播種などの合併症は1例も経験していない。

結 論

CTによる骨盤内リンパ節転移診断はリンパ節が2 cm以上にならないと診断できない²²⁾ 骨盤内リンパ節転移診断に対してMRIはCTを凌ぐものではない。骨盤内リンパ節吸引細胞よりのPSA遺伝子の検出は前立腺癌の早期リンパ節転移の診断法となる可能性がある。

本研究は文部省科学研究費一般B(07457366)、平成7年「黒川利夫がん研究基金」の援助を受けた。

文 献

- 1) 星 宣次, 折笠精一: リンパ管造影とリンパ節吸引生検. 前立腺診療マニュアル, 前立腺研究財団, pp.262-271, 金原出版, 東京, 1995
- 2) Stamey TA, Kabalin JN, McNeal JE, et al.: Prostate-specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. J Urol 141: 1076-1083, 1989
- 3) Smith B, Selby P, Southgate J, et al.: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Lancet 338: 1227-1229, 1991
- 4) Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, et al.: Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. Eur J Cancer 27: 762-

- 765, 1991
- 5) Mattano LA, Moss TJ and Eerson SG: Sensitive detection of rate circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* **52**: 4701-4705, 1992
- 6) Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al.: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* **52**: 6110-6112, 1992
- 7) Horoszwicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al.: LNCaP model of human prostate carcinoma. *Cancer Res* **43**: 1809-1818, 1983
- 8) Kaighn ME, Shankar N, Ohnuki Y, et al.: Establishment and characterization of a human prostate carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **17**: 16-23, 1979
- 9) Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, et al.: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145). *Int J Cancer* **21**: 274-281, 1978
- 10) Luciani L and Piscoi F (eds.): *Aspiration cytology in the staging of urological cancer*. Springer-Verlag, London, 1988
- 11) Hoshi S: Evaluation of neoadjuvant therapy in locally invasive bladder cancer: core biopsy of bladder tumor and aspiration biopsy of regional lymph nodes. In: *evaluation of chemotherapy invasive bladder cancer*. Edited by Villavicencio H and Fair WR pp.61-77, Churchill Livingstone, New York, 1992
- 12) 高橋とし子, 星 宣次, 斎藤英郎, ほか: リンパ節吸引細胞診により膀胱癌リンパ節転移診断—サイトケラチン染色による癌細胞の鑑別診断—. *日臨細胞会誌* **34**: 1041-1046, 1995
- 13) Kwork S: Procedures to minimize PCR product carry-over. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sminsky JJ et al. pp.142-145, Academia Press, San Diego, CA, 1990
- 14) Lundwall A and Lilja H: Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett* **214**: 317-322, 1987
- 15) Reigman PHJ, Vietstra RJ, van der Korput JAGM, et al.: Characterization of the prostate-specific antigen gene: a novel human kallikrein-like gene. *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 95-102, 1989
- 16) Rukstalis DB, Gerber GS, Vogelzang NJ, et al.: Laparoscopic pelvic lymph node dissection: a review of 103 consecutive cases. *J Urol* **151**: 670-674, 1994
- 17) Wood DP, Banks ER, Humphrey S, et al.: Identification of bone marrow micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer* **74**: 2533-2540, 1994
- 18) 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
- 19) Katz AE, deVries M, Begg MD, et al.: Enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigens as an indicator of true pathologic stage in patients with prostate cancer. *Cancer* **75**: 1642-1648, 1995
- 20) Israeli RS, Miller JR WH, Su SL, et al.: Sensitive detection of prostatic hematogenous tumors cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *J Urol* **153**: 573-577, 1995
- 21) 高橋とし子, 星 宣次, 毛 厚平, ほか: PCRによるPSMの特異性に関する検討. 第5回泌尿器科細胞解析研究会抄録集, 森岡, pp.54, 1996
- 22) Mnotie JE: Staging of prostate cancer-Current TNM classification and future prospects for prognostic factors. *Cancer* **75**: 1814-1818, 1995
- 23) Kuriyama M, Akimoto S, Akaza H, et al.: Comparison of various assay system for prostate specific antigen standarization. *Jpn J Clin Oncol* **22**: 393-399, 1992

(Received on June 17, 1996)

(Accepted on June 24, 1996)