

前立腺癌微小転移診断への分子生物学的アプローチ

—リンパ節転移および骨転移の検討—

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 河田幸道教授)

出口 隆, 楊 睦正, 西野 好則

江原 英俊, 高橋 義人, 河田 幸道

岐阜市民病院泌尿器科 (部長: 土井達朗)

伊藤 慎一, 伊藤 康久, 土井 達朗

MOLECULAR APPROACH TO DETECTION OF MICROMETASTATIC PROSTATIC
CANCER CELLS IN THE LYMPH NODES AND THE BONE MARROWTakashi DEGUCHI, Muhzeng YANG, Yoshinori NISHINO,
Hidetoshi EHARA, Yoshito TAKAHASHI and Yukimichi KAWATA
*From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine*Shinichi ITO, Yasuhisa ITO and Tatsuo DOI
From the Department of Urology, Gifu City Hospital

We detected micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes and bone marrow using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) specific for prostate-specific antigen (PSA). RT-PCR revealed PSA mRNA in two lymph nodes obtained from two patients with negative histological and immunohistochemical analyses for lymph node metastases. Of 26 patients with negative bone scan imaging, 7 had PSA mRNA detected in the bone marrow by RT-PCR. The RT-PCR will be a relevant tool to allow a more accurate clinical assessment of lymph node and bone metastases in patients with prostate cancer.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 787-790, 1996)

Key words: PSA, RT-PCR, Prostate cancer, Micrometastasis

緒 言

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) は, mRNA から reverse transcriptase により cDNA を合成し, さらに cDNA より DNA polymerase により DNA を増幅する方法であり, 細胞に発現する mRNA の解析および微量の mRNA の検出に応用されている. 前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen, PSA) は, 前立腺組織特異抗原であるが, 前立腺癌においても高率に発現し, 血清 PSA の測定は前立腺癌の診断や前立腺癌患者の follow-up に有用であり, 転移性腫瘍では PSA の発現が前立腺原発であることの証明に利用されてきた. そして新たに RT-PCR による PSA mRNA の検出を指標とした前立腺癌細胞の検出法が開発され, その前立腺癌微小転移診断への応用がなされつつある¹⁻¹⁰⁾ 今回, 本法によりリンパ節および骨髄における前立腺癌微小転移の検出を試み, 本法の前立腺癌微小転移診断の可能性を検討した.

対象および方法

1) RT-PCR による PSA mRNA 検出の基礎的検討 (Figs. 1, 2)

培養細胞および臨床材料より oligo (dT)-cellulose を用いて mRNA を抽出し, 逆転写酵素により cDNA を合成後, PSA の遺伝子の塩基配列の一部に相補的な oligonucleotide を PCR の伸長用 primer として RT-PCR を行った. そしてアガロースゲル電気泳動により PSA の cDNA の塩基配列より予測される増幅された 754 bp の DNA 断片を観察した. さらに, internal probe を用いた Southern blot hybridization により目的とする DNA 断片の増幅であることを確認した.

2) RT-PCR による前立腺癌リンパ節微小転移の検出

前立腺癌のリンパ節転移診断への応用の検討は, 臨床病期 D2 の前立腺癌患者 1 例より生検によりえた頸部リンパ節 1 個および前立腺癌患者 21 例 (臨床病期 A1 1 例, A2 6 例, B1 7 例, B2 5 例, C 2 例) の

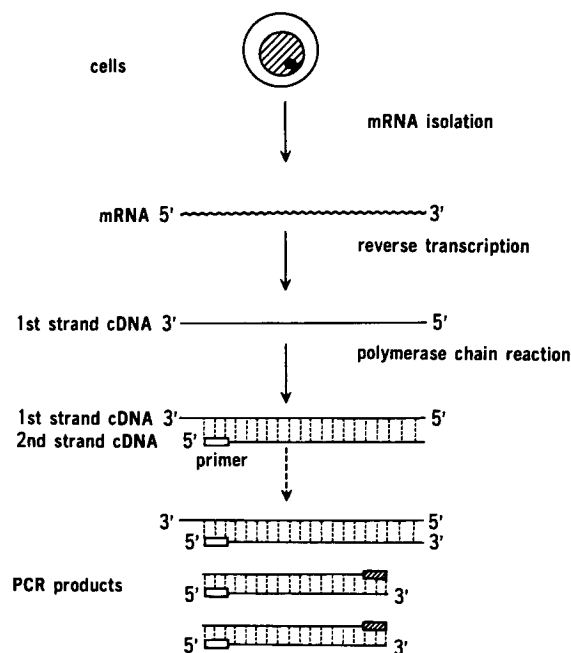


Fig. 1. Principle of RT-PCR assay.

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43個のリンパ節を対象とし、RT-PCRによるPSA mRNAの検出と、抗PSA抗体により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により行った。

3) RT-PCRによる前立腺癌骨微小転移の検出

前立腺癌の骨転移診断への応用の検討は、新鮮前立腺癌患者35例（臨床病期 A2 4例, B0 1例, B1 5例, B2 8例, C 7例, D1 1例, D2 9例）の腸骨稜からえられた骨髓穿刺液からのRT-PCRによるPSA mRNAの検出による骨転移診断と骨シンチグラフィを含む従来の画像診断法による骨転移診断との比較により行った。

結 果

1) RT-PCRによるPSA mRNA検出の基礎的検討

RT-PCRにより前立腺癌培養細胞株(LNCaPとPC-3)および55例の前立腺生検材料から目的とする

PSAのDNA断片の増幅が観察されたが、腎細胞癌株(ACHN)、移行上皮癌株(HT-1376)および5例の腎細胞癌患者と5例の膀胱腫瘍患者からえられた臨床材料からDNA断片の増幅は観察されず、RT-PCRによるPSA mRNAの発現の検出は、前立腺癌細胞検出に特異的であった。また、腎細胞癌、膀胱腫瘍およびBPHの手術時にえられた14個のリンパ節でのPSA mRNAの発現も認められなかった。RT-PCRの前立腺癌細胞の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 1.84×10^{-7} μ 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の検出が可能であった。

2) RT-PCRによる前立腺癌リンパ節微小転移の検出

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4例においてRT-PCRによりPSA mRNAが検出された。さらに病理組織学的および免疫組織学的に前立腺癌細胞の転移を認めない異なる2症例よりえられた2個のリンパ節からもRT-PCRによりPSA mRNAが検出され、前立腺癌のリンパ節転移と診断された(Table 1)。残りの16例においては、病理学的検討とRT-PCRにてそれぞれ前立腺癌細胞とPSA mRNAの発現とを認めず、リンパ節転移なしと診断された。

3) RT-PCRによる前立腺癌骨微小転移の検出

骨シンチグラフィにて骨転移が疑われ臨床病期D2と診断された9例中5例で骨髓穿刺液中にPSA mRNAが検出された。従来の画像診断法にて骨転移を認めない臨床病期Cの7例中4例、臨床病期B2の8例中2例および臨床病期D1の1例中1例において骨髓穿刺液中にPSA mRNAが検出され、前立腺癌の骨転移と診断された。一方、臨床病期B1およびA2と診断された10例において骨髓穿刺液中にPSA

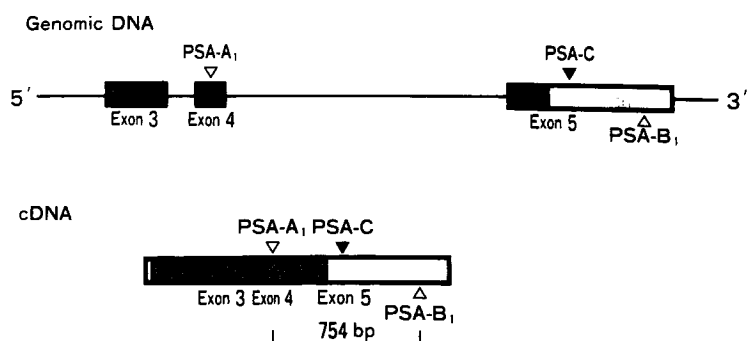
Fig. 2. Location of primers (PSA-A₁) and (PSA-B₁) and an internal probe (PSA-C) in the PSA gene and the PSA cDNA.

Table 1. Data for patients with positive RT-PCR assay results

症例	リンパ節	リンパ節転移		
		組織学的	免疫組織学的	RT-PCR
1	頸部	+	+	+
2	右内腸骨	+	+	+
	右外腸骨	—	+	+
	左閉鎖	—	—	+
3	右内腸骨	—	—	+
	左内腸骨	+	+	+
4	右内腸骨	+	+	+
	左内腸骨	—	—	—
5	左内腸骨	—	—	+
6	右内腸骨	—	—	+
	右閉鎖	—	—	—
	左内腸骨	—	—	—

Table 2. Detection of bone marrow metastasis by RT-PCR assay

臨床病期	症例数	RT-PCR 陽性症例数
D2	9	5
D1	1	1
C	7	4
B2	8	2
B1	5	0
B0	1	0
A2	4	0

mRNA は認められなかった (Table 2).

考 察

今回の検討から RT-PCR による PSA mRNA の検出を指標とした前立腺癌細胞の検出方法は、特異性に優れ、高感度であり、従来の病理学的検索あるいは画像診断法では検出困難なリンパ節あるいは骨への微小転移の診断も可能であることが示された。本法と同様の RT-PCR による微小骨転移の他の検討によれば、従来の画像診断法にて転移病変を有さず前立腺全摘除術が施行された症例では、骨髄の RT-PCR 法陽性例の検出組織において、病理学的に前立腺外へ進行した癌症例の割合が、陰性例と比較して有意に増加すると報告されており、RT-PCR 法による骨髄穿刺液中の PSA mRNA の検出が前立腺癌のより正確な病期診断に寄与するものと考えられている⁵⁾ また、RT-PCR 法による前立腺癌患者の末梢血からの前立腺癌細胞の検出では、遠隔転移のある前立腺癌患者のみならず、限局性前立腺癌患者からも PSA mRNA あるいは Prostate-specific membrane antigen mRNA が検出されており前立腺癌細胞の末梢血での存在が示されている⁷⁾。限局性前立腺癌患者においては根治的前立腺

全摘除術術前の末梢血での RT-PCR 法陽性例で、検出組織において前立腺癌の被膜浸潤と切除断端陽性例が有意に多く³⁾、さらに、観察期間は短いものの術前 RT-PCR 法陽性例で術後に再発なし生存率が RT-PCR 法陰性例より有意に低いと報告されている¹⁰⁾。このように、RT-PCR 法による限局性前立腺癌のより正確な術前の病期診断および術後の再発のリスクの高い症例の選択の可能性が示されている。また、前立腺全摘除術時に採取した末梢血における RT-PCR 法による前立腺癌細胞の検出の試みから、手術操作により前立腺癌細胞が血行性に播種していることが示されている⁹⁾。しかしながら、今回の検討症例を含め、このような RT-PCR 法により検出される微小転移が前立腺癌の経過 予後において、どのような臨床的意義を持つかは現時点では確立されていない。しかしながら、前立腺癌の微小転移の検出が可能となることで、より正確な病期診断が可能となり、より適切な治療がなされ、前立腺癌の予後の改善に寄与するものと期待される。

結 語

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、前立腺癌微小転移の検出には最適な方法と考えられる。前立腺癌の微小転移の検出が可能となることで、より正確な病期診断が可能となり、より適切な治療がなされ、前立腺癌の予後の改善に寄与するものと期待される。

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) Katz AE, Seaman E, Olsson CA, et al.: Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology* **43**: 765-775, 1994
- 4) 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
- 5) Wood DP Jr, Banks ER, Humphreys S, et al.: Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer* **74**: 2533-2540, 1994
- 6) Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, et al.: Sensitive nested reverse transcriptase polymerase chain

- reaction for detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* **54**: 6306-6310, 1994
- 7) Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, et al.: Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* **12**: 2634-2639, 1994
- 8) Cama C, Olsson CA, Raffo AJ, et al.: Molecular staging of prostate cancer. II. A comparison of the application of an enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for prostate specific antigen versus prostate specific membrane antigen. *J Urol* **153**: 1373-1378, 1995
- 9) Eschwege P, Dumas F, Blanchet P, et al.: Haematogenous dissemination of prostatic epithelial cells during radical prostatectomy. *Lancet* **346**: 1528-1530
- 10) Katz AE, de Vries GM, Begg MD, et al.: Enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate specific antigen as an indicator of true pathologic stage in patients with prostate cancer. *Cancer* **75**: 1642-1648

(Received on June 17, 1996)

(Accepted on July 26, 1996)

(迅速掲載)