

腎細胞癌における高感度 RT-PCR 法を用いた 患者血液中癌細胞の検出

奈良県立医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 平尾佳彦教授)

植 村 天 受

MOLECULAR DETECTION OF CIRCULATING CANCER CELLS IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Hirotsugu UEMURA

From the department of Urology, Nara Medical University

We have developed a highly sensitive technique to detect circulating renal cell carcinoma (RCC) cells in the blood using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers specific for the MN/CA9 gene. RT-PCR analysis of RCC specimens resulted in the clear detection of MN/CA9 mRNA signal in 93%. In contrast, no expression of MN/CA9 was observed in normal kidney specimens.

Highly sensitive RT-PCR analysis of blood samples from RCC patients revealed the presence of circulating MN-positive cancer cells in the blood. Fifty samples obtained from the patients with RCC and 31 samples from healthy donors were investigated. The sensitivity and specificity of this RT-PCR analysis were 72% and 78%, respectively. These findings suggest that the MN antigen may be a potential diagnostic biomarker for early detection of RCC.

(Acta Urol. Jpn. 45 : 571-575, 1999)

Key words : Renal cell carcinoma, MN/CA9, Molecular detection, RT-PCR

緒 言

腎細胞癌 (RCC) は極めて予後不良の疾患で、一般癌治療である化学療法、放射線療法などはほとんど効果なく、手術的に摘除する以外に有用な治療法はないのが現状であり、進行腎細胞癌患者のほとんどは救命することはできない。また、腎細胞癌は転移巣の自然消退や腎摘除術後10年以上経過して再発転移する long dormancy など unique な生物学的特性をもっており、宿主免疫能に深く関係していると考えられている¹⁾。このような特性より、サイトカインを中心とする免疫療法に期待がもたれ、多くの clinical trial が世界中で実施され検討されてきたが、奏成功率は満足できるものではない。すなわち、RCC に特異的で革新的な治療法の開発が必要と考えられる。また、このような現況を鑑みると、早期発見、治療が最も重要であることはいうまでもないが、腎細胞癌は臨床症状に乏しく、また転移などを示唆する有用な腫瘍マーカーもなく早期診断が非常に困難である。

ヒト腎細胞癌に対するマウスモノクローナル抗体 mAbG250 は、RCC の膜抗原 (G250) を特異的に認識する。G250 抗原は免疫組織学的検索において、原発巣の95%、転移巣の75%に発現しており、また腎を含む他の正常組織では、ほとんど発現が認められてい

ない²⁾。以上のような特異性により、mAbG250 はすでにアメリカにおいて Phase-I trial が行われ、腎細胞癌患者において diagnostic agent としての有用性および安全性が示された³⁾。最近では mAbG250 キメラ抗体を開発し、診断・治療を含めた Phase-II trial がオランダで進行中である⁴⁾。われわれは以前より RCC 患者血清中の G250 抗原の存在について mAbG250、抗イディオタイプ抗体を用いて検討してきた。その結果、末期腎細胞癌患者のなかに、高い G250 抗原レベルを示すものがあり、G250 陽性細胞の末梢血中 circulation が示唆された。

最近、G250 抗原の cDNA がクローニングされ、他の数種の悪性腫瘍でも発現している癌関連抗原 MN であることが示された⁵⁾。しかしながら、正常組織に発現せず、RCC の95%と非常に高率に発現していることから、腎細胞癌の特異的抗原といっても過言ではない。そこで、患者血液中 RCC 細胞の高感度検出法を考案し、すなわち RT-PCR 法を用いて MN mRNA の検出を試み、腎細胞癌の腫瘍マーカーとしての有用性について検討した。

対象および方法

1 材 料

1995年4月から1997年12月までの期間に奈良県立医

科大学泌尿器科および関連施設において腎摘除術を施行した147例の腎細胞癌患者より得られた腎細胞癌および正常腎組織の新鮮凍結標本を対象とした。また血液サンプルは奈良県立医科大学に入院中の腎細胞癌担癌患者50人で、検体採取（血液 10 ml）は事前に本研究に関するインフォームドコンセントの得られた場合に限られた。なおコントロールとして健康成人32人より採取した血液を用いた。

2. 免疫組織化学

手術で得られた147例の標本は RT-PCR により MN/CA9 mRNA の発現の有無を確かめるとともに、mAbG250 にて免疫染色し同時に蛋白レベルの発現についても検討した。免疫染色は、4~5 μ m の凍結切片を室温で60分間乾燥させた後、アセトン/メタノールで固定し、mAbG250 (250 μ g/ml) と室温で60分間反応させた。二次抗体として GAM-PO (goat-anti-mouse IgG) を用い、DAB にて発色させた。

3. 血液サンプル

採血は抗凝固剤 (EDTA) 含有スピッツに 10 ml 行い、10 ml 4°C PBS と mix し、リンパ球分離溶液を添加し、4°C で30分間遠心分離する。Buffy coat を注意深く採取し再び PBS を加え遠心分離する。Pellet を再度 1.5 ml の micro-centrifuge tube にて遠心後、この buffy coat pellet を guanidine thiocyanate に resuspend し、後の RNA extraction のために -80°C

で保存しておく。

4. PCR amplification

Total RNA は acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 法により抽出し、RNA の cDNA への逆転写は cDNA synthesis kit を用いた。すなわち、2 μ g の RNA と逆転写酵素、primer oligo (dT) などと 42°C 1時間 incubation することによって cDNA を作製し、10 μ g の各 cDNA を 3' および 5' 側の primer, Taq polymerase, buffer に加え PCR mixture とし、amplification した。

また、amplification は30~35サイクルで MN/CA9 の primer sequence は primer 1; 5'-ACTGCTGCTTCTGATGCCTGT, 3'-GTCATCCCCCTTCTT-TGTCCCT, Primer 2; 5'-GGGACAAAGAAGG-GGATGACC, 3'-TTCTCATCTGCAAGGAACGC と設定した。

5. PCR アッセイの sensitivity

RT-PCR アッセイの sensitivity を決定するために MN 抗原陽性腎癌培養細胞 SKRC-44 を用い各種プライマーの感度精度について検討した。

すなわち健康成人 (volunteer) より採取した血液 10 ml に MN 陽性細胞を 0, 1, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ 個加えた 8 種類の条件でサンプルを作成し、前述の方法で RT-PCR を行い、PCR の感度について検討した。Positive control としては、SKRC-44

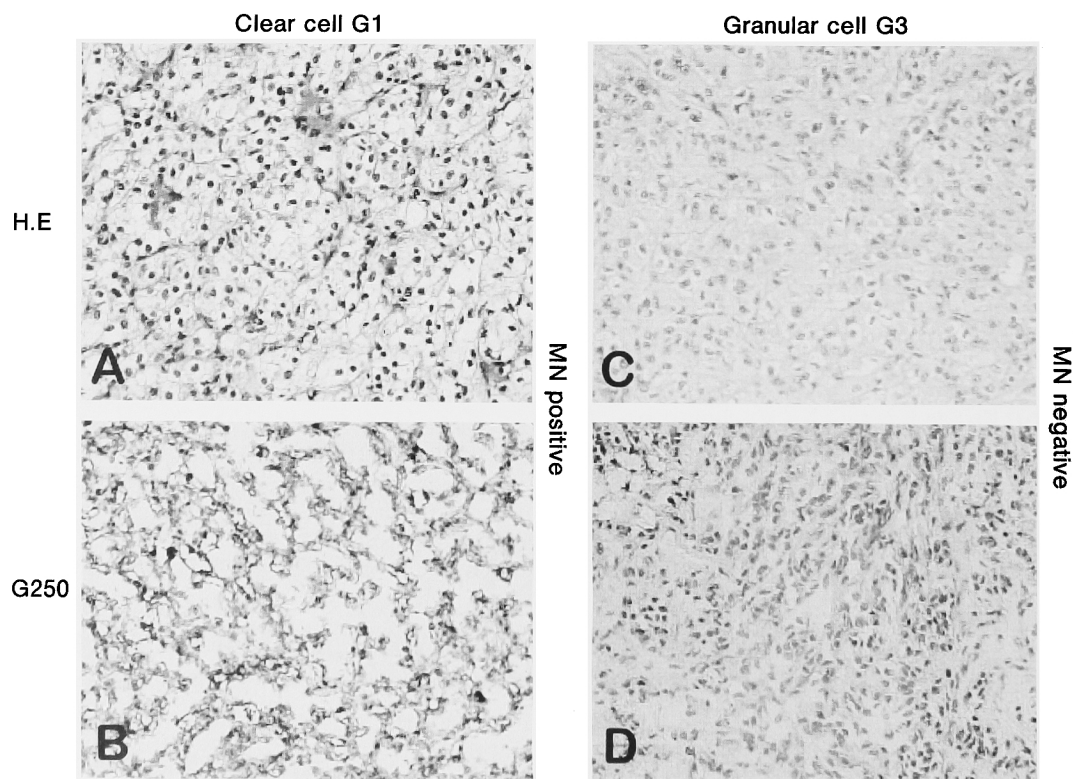


Fig. 1. A: Microscopic findings for clear cell type RCC (grade 1, alveolar) H.E. B: Positive immunostaining of the same case with mAbG250. C: Microscopic findings for granular (pleomorphic) cell type RCC (grade 3, solid) H.E. D: Negative staining of the same case with mAbG250. Magnification $\times 250$.

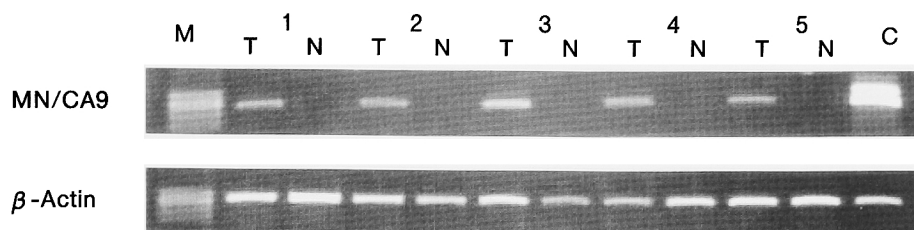


Fig. 2. MN/CA9 assessed by RT-PCR analysis in RCC patients. Case number 1 to 5 (clear cell or granular cell type, grade 1-2 RCCs) demonstrate clear expression of MN/CA9 mRNA, whereas all the corresponding normal kidney tissues are negative. Representative results are shown.

10^6 /PBS 50 ml を用いた。また internal control として β -actin (194 bp) を用いた。なお、すべての培養細胞は confluence 約80~90%で harvest し、single cell suspension を作成して用いた。

6. 高感度 RT-PCR

より高い感度を得るために、inner primer を設定し nested RT-PCR (total 50サイクル) や、MN/CA9 cDNA をプローブとした PCR サザンブロットを行った。

結 果

手術標本における MN 抗原の発現は免疫組織染色による蛋白レベルでは147例中128例 (87%) で発現しており、正常腎組織では全く発現が認められなかつ

た。染色性は strong かつ homogeneous であった (Fig. 1)。RT-PCR による mRNA レベルでは137例 (93%) に MN/CA9 の発現を認め、蛋白レベルに比較しやや多く発現していた (Fig. 2)。病期および悪性度の関係をみると、stage I 94.5%, stage II 90.9%, stage III 70.6%, stage IV 53.8%, grade 1 98.6%, grade 2 87.1%, grade 3 33.3%であり、両者とも MN の発現とは逆相関を示した (Table 1, 2)。

Sensitivity アッセイでは、スタンダード RT-PCR (30サイクル) において、血液 10ml 中10個の MN 陽性細胞 (SKRC-44) が含有していれば検出可能な感度であった (Fig. 3)。

血液中の MN 陽性細胞の同定は、スタンダード RT-PCR (30サイクル) では、術中腎静脈あるいは中心静脈より採取したサンプル数例でのみ検出可能で

Table 1. MN expression according to tumor stage

	MN+	MN-	Total
Stage I	69 (94.5)	4 (5.5)	73
Stage II	40 (90.9)	4 (9.1)	44
Stage III	12 (70.6)	5 (29.4)	17
Stage IV	7 (53.8)	6 (46.2)	13
	128 (87.1)	19 (12.9)	147

Table 2. MN expression according to tumor grade

	MN+	MN-	Total
G ₁	69 (98.9)	1 (1.4)	70
G ₂	54 (87.1)	8 (12.9)	62
G ₃	5 (33.3)	10 (66.7)	15
	128 (87.1)	19 (12.9)	147

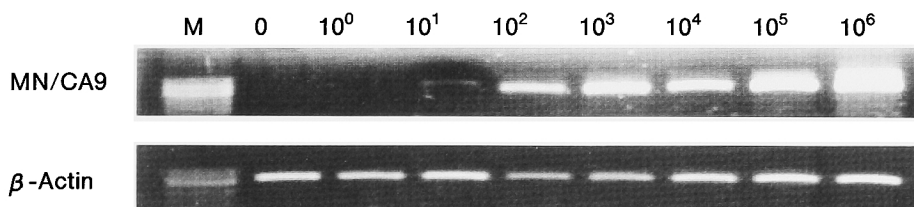


Fig. 3. Sensitivity assay of RT-PCR analysis. Serial dilutions of MN-positive cell suspension were added to 10 ml whole blood.

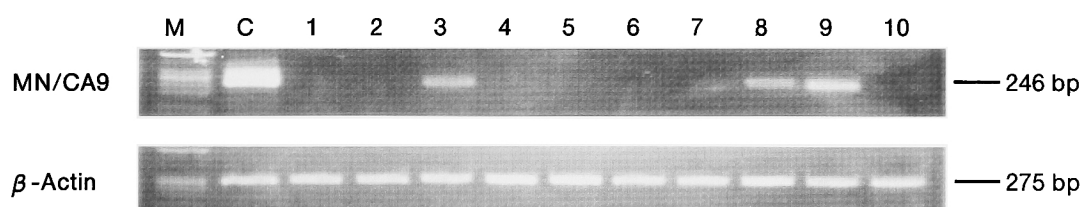


Fig. 4. MN/CA9 expression in blood samples by nested RT-PCR. C: MN/CA9 cDNA (positive control). Representative results are shown.

Table 3. Detection of circulating MN-positive cells

	MN+	MN-	Total
RCC	36 (72.0)	14 (28.0)	50
Normal	10 (32.3)	21 (67.7)	31

(): %

あった。そこで高い感度を得るため PCR-サザンブロットおよび nested RT-PCR を行ったところ、RCC 患者末梢血サンプル50例中36例 (72%) において MN/CA9 mRNA が検出された。しかしながら、健康成人より得られたコントロール血液サンプル31例中10例 (32%) においても MN/CA9 mRNA が検出された (Fig. 4, Table 3)。

考 察

近年の癌研究の進歩に伴い、癌治療の成績は飛躍的に向上したにもかかわらず、腎細胞癌は有効な治療法のない難治性の疾患である。特に進行性腎癌の予後は極めて悪く、ほとんどの患者は救命できないのが現状である。また、腎細胞癌は転移巣の自然消退や腎摘除術後10年以上経過して再発転移する long dormancy など特異な生物学的特性をもっており、宿主免疫能に深く関係していると考えられている。このような特性より、サイトカインを中心とする免疫療法に期待がもたれ、多くの臨床試験が世界中で実施され検討されてきたが、現在のところ最も効果的なインターフェロン、インターロイキン2などによる免疫療法においても十分な生存率の向上はみられず、手術療法を除いて有効な治療法は無いと言っても過言ではない。そのため腎細胞癌治療のための新しいアプローチが必要であるが、そのひとつとして免疫学的な手法を用いた特異的な治療法が有効と考えられる。また近年の分子生物学的手法の技術の向上により、微量な mRNA の発現を検出する手法が開発されてきており、これについては標的となる分子をコードする遺伝子が明らかである場合は非常に有効な診断方法となりうる。

癌関連抗原 MN/CA9 は、Oosterwijk らによって腎細胞癌細胞を抗原として作られたモノクローナル抗体 G250 (mAbG250) が認識する、細胞膜および核に存在する glycoprotein で、新しい carbonic anhydrase isoenzyme と考えられている。この抗体を用いた免疫組織学的検索の結果、MN 抗原は腎細胞癌の87%以上に高率に発現が認められるが、正常臓器では正常腎組織を含めほとんど発現は認められなかった。この結果から、MN 抗原は腎細胞癌に特異的に発現しており、腎細胞癌治療の標的分子として非常に有望であると考えられた。またこの抗原の塩基配列に関しては Pastorek らにより既に明らかにされており、遺伝子

診断の標的としても有望と考えられた。

このような現況を鑑みて、われわれは以前より癌関連抗原MNの腎細胞癌における診断および治療の標的分子としての有用性に着目し、本研究では、診断法の確立、すなわち既知となった遺伝子配列よりプライマーを設計し、RT-PCR 法による腎細胞癌患者血液中癌細胞の検出を試みた。

腎細胞癌における MN 抗原の標的分子としての有用性については、今回の検討で蛋白レベルおよび mRNA レベルとも陽性例が128例あり、両者とも陰性であるものが10例あった。残りの9例はいずれも MN 蛋白 (-)/mRNA (+) の症例で、このような discrepancy はおそらく免疫染色の sensitivity が PCR に比較し低いためと考えられるが、遺伝子変異による転写異常なども否定し得た訳ではない。一方、MN の発現と病期、悪性度とは負の相関を認め、腎癌細胞の malignant potential の上昇に伴い MN の発現が減弱あるいは消失する傾向が伺われる。しかしながら、grade 3 においても50%以上の例で MN mRNA の発現を認めることから、診断の標的分子としては有用であることが示唆された (data not shown)。

RT-PCR 法は極めて微量の mRNA より大量の cDNA を増幅することができ、泌尿器科学的には最近、前立腺癌患者の血液中、手術創より PSA あるいは PSM 遺伝子の検出が盛んに行われ、新しい prognostic factor として期待されているのは周知の如くである。

腎細胞癌においては現在のところ特異的な血液 marker は皆無で、早期診断や術後のモニターリングには超音波検査やレントゲン検査などに頼るほかになのが現状である。そこでわれわれは腎細胞癌に高率に発現している MN 抗原に着目し、高感度 RT-PCR 法による患者血液中 MN 陽性腎癌細胞の検出を試みた。今回の preliminary な検討では sensitivity 72%, specificity 78%と満足な結果ではないが、primer set や PCR 条件を optimal にすることでより高い sensitivity, specificity が期待でき、腎細胞癌の特異的な診断法となる可能性が示唆される。

結 語

MN 抗原は腎細胞癌において非常に高率に発現しており、診断および治療の標的分子として有用であると考えられる。また、高感度 RT-PCR 法により、循環血液中の MN 抗原陽性腎癌細胞の検出が可能となり、術後のモニターリングなど早期診断に寄与するものと期待される。

本研究の一部は、文部省科学研究費基盤研究 C (09671643)

によって行われた。

文 献

- 1) Ritchie AWS and deKernion JB: The natural history and clinical features of renal carcinoma. *Semin Nephrol* **7**: 131-139, 1987
- 2) Oosterwijk E, Ruiter DJ, Hoedemaeker JC, et al.: Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens. *Am J Pathol* **123**: 301-309, 1986
- 3) Oosterwijk E, Bander NH, Divgi CR, et al.: Antibody localization in human renal cell carcinoma: a phase I study of monoclonal antibody G250. *J Clin Oncol* **11**: 738-750, 1993
- 4) Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, et al.: Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *J Clin Oncol* **15**: 1529-1537, 1997
- 5) Uemura H, Okajima E, Debruyne FMJ, et al.: Internal image anti-idiotypic antibodies related to renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int J Cancer* **56**: 609-614, 1994
- 6) Uemura H, Beniers AMJC, Okajima E, et al.: Vaccination with anti-idiotypic antibodies mimicking a renal cell carcinoma-associated antigen induces tumor immunity. *Int J Cancer* **58**: 555-561, 1994
- 7) Oosterwijk E, De Weijert M, Van Bokhoven A, et al.: Molecular characterization of the renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Proc Amer Assoc Cancer Res* **37**: 461, 1996
- 8) De Riese W, Allhoff EP, Kirchner H, et al.: Complete spontaneous regression in metastatic renal cell carcinoma: an update and review. *World J Urol* **9**: 184-191, 1991
- 9) Allhoff EP, Liedke S, Kirchner H, et al.: Current clinical relevance of immunotherapy in metastatic renal cancer. *World J Urol* **9**: 228-231, 1991
- 10) Opavsky R, Pastoreková S, Zelnik V, et al.: Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* **33**: 480-487, 1996
- 11) Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, et al.: Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* **9**: 2877-2888, 1994

(Received on May 25, 1999)
(Accepted on July 29, 1999)