

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791501

研究課題名（和文） 限局性前立腺癌における微小リンパ節転移の検出とその臨床病理学的意義に関する検討

研究課題名（英文） NATURAL HISTORY OF PROSTATE CANCER PATIENTS WITH MICROMETASTASES IN PELVIC LYMPH NODES DETECTED BY REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION

研究代表者 倉橋 俊史（ KURAHASHI TOSHIFUMI ）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80444587

研究成果の概要（和文）：限局性前立腺癌を含む悪性腫瘍における微小リンパ節転移の有無を明らかにすることで、適格な予後予測およびそれに基づいた術後の治療戦略の選択が可能となり、臨床上極めて有用な情報提供に繋がり得ると考えられる。したがって、今回、臨床的限局性前立腺癌のリンパ節転移に焦点を絞り、より信頼性の高い微小転移検出方法の確立、適切な骨盤リンパ節郭清範囲およびリンパ節郭清の治療効果等について検討を加えるため本研究を計画した次第である。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to characterize the natural history of patients who underwent radical prostatectomy (RP) without any neoadjuvant therapies and were subsequently diagnosed as having micrometastases to pelvic lymph nodes by real-time reverse-transcriptase PCR (RT-PCR).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：(1)限局性前立腺癌 (2)リンパ節微小転移 (3) Real-time RT-PCR 法

(4) kallikrein family (5)PSCA (6)前立腺全摘除術 (7)術前内分泌学療法

## 1. 研究開始当初の背景

限局性前立腺癌に対する根治的前立腺全摘除術施行例において、病理学的限局性癌の予後は良好で満足すべき制癌効果が認められるが、非限局性癌、特にリンパ節転移陽性症例の予後は不良である。しかし、病理学的限局性癌の中にも、生化学的再発、それに引き続く局所再発およびリンパ節等への転移を発症し不幸な転帰を迎える症例が存在する (Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, et al. *Anticancer Res*, 2005; 25: 3645-9, Miyake H, Yamanaka K, Muramaki M, Kurahashi T, et al. *Oncol Rep* 2005; 14: 1371-5, Harada K, Sakai I, Muramaki M, Kurahashi T, et al. *Urol Int*, 2006; 76: 82-6, Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, et al. *Anticancer Res*, 2006; 26: 1583-7). 近年、様々な分子生物学的手法により、膀胱癌、乳癌、子宮癌および食道癌等の種々の悪性腫瘍における所属リンパ節への微小転移の実態が明らかにされ、その臨床的意義が認識されつつある。我々も前立腺癌全摘症例の骨盤内微小リンパ節転移に着目し、限局性前立腺癌症例の骨盤内リンパ節に微小転移が存在するか否かをReal-time RT-PCR法を用いて検証し、その臨床的意義を明らかにしてきた。つまり、通常の病理学診断ではリンパ節転移が検出されないが、微小転移を有すると診断された症例の、臨床病理学的背景および予後は、病理学的にリンパ節転移陽性と診断された症例とほぼ同等であった (Miyake H, Hara I, Kurahashi T, et al. *Clin Cancer Res*, 2007; 13: 1192-7, Miyake H, Kurahashi T, et al. *BJU Int*, 2007; 99: 315-20). 浸潤性膀胱癌についても同様の目的で骨盤内リンパ節の微小転移の検出を試みたが、やはり病理学的にはリンパ節転移陰性にもかかわらず微小転移を有する症例と、病理学的にリンパ節転移を認める症例の予後はほぼ同等であった (Kurahashi T, et al. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3773-7). これらの研究からも、限局性前立腺癌を含む悪性腫瘍における微小リンパ節転移の有無を明らかにすることで、適格な予後予測およびそれに基づいた術後の治療戦略の選択が可能となり、臨床に極めて有用な情報提供に繋がり得ると考えられる。したがって、今回、臨床的限局性前立腺癌のリンパ節転移に焦点を絞り、より信頼性の高い微小転移検出方法の確立、適切な骨盤リンパ節郭清範囲およびリンパ節郭清の治療効果等について検討を加えるため本研究を計画した次第である。

## 2. 研究の目的

我々がこれまでに施行した研究では、前立腺

癌に特異的な腫瘍マーカーであるPSAおよびPSMAを標的としたReal-time RT-PCR法を施行し、PSAおよびPSMAいずれもの発現が陽性のリンパ節を微小転移陽性と定義した (Miyake H, Hara I, Kurahashi T, et al. *Clin Cancer Res*, 2007; 13: 1192-7, Miyake H, Kurahashi T, et al. *BJU Int*, 2007; 99: 315-20). 今後この研究の信頼性をより高めかつより適切な標的遺伝子を探索するために、kallikrein familyに属するhuman kallikrein 2 (hK2)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA) およびDD3などの遺伝子を標的としたReal-time RT-PCRを施行し、その信頼性を従来のPSAおよびPSMAを標的としたReal-time RT-PCRと比較検討する予定である。これらの遺伝子はいずれも、前立腺癌組織において高発現しており、且つその発現が正常前立腺あるいは前立腺癌組織に限局していると報告されており、微小リンパ節転移検出の標的遺伝子としては理想的な特徴を有している。

また、我々は経済性や臨床応用の可能性等を考慮し、より普及しているRT-PCR法にてもPSAおよびPSMAを含む上記の遺伝子発現を定性的に解析し、Real-time RT-PCR法との比較検討を行ない、RT-PCR法に比してReal-time RT-PCR法の優位性を明らかにした (Terakawa T, Miyake H, Kurahashi T, et al. *BJU Int* in press). よって今回、新たに検索する予定の3種類の標的遺伝子に関して、Real-time RT-PCR法とRT-PCR法の比較を行ないたいと考えており、これにより微小リンパ節転移検出に最適な標的遺伝子とその検出方法の組み合わせが決定できるものと期待される。更に、mRNAのみならず蛋白レベルでも微小転移の存在を確認するため、上記遺伝子の各種抗体を用いて免疫組織化学的検討も併せて行ないたい。なお、我々は過去の研究で120例の前立腺全摘の際に郭清した総計2215個の骨盤リンパ節のcDNAおよびパラフィンブロック標本を有しており、その準備は整っている。

リンパ節郭清の治療的意義に関して、様々な見解が報告されている。一般に治療前よりリンパ節転移を有する症例では、前立腺全摘除術を回避し内分泌療法や放射線療法を第一選択とするのが現状であるが (Miyake H, et al. *Int J Clin Oncol* 1999; 4: 32-5, Hara I, Miyake H, et al. *Jap J Clin Oncol* 2002;32: 14-8, Miyake H, et al. *Uro Oncol* 2004; 4: 151-6), 治療前よりリンパ節転移を有しても、術前に内分泌療法を先行し、前立腺全摘術と同時に通常より広範なリンパ節郭清を行うことで、予後の改善を期待できる症例が存在するとの報告もある。したがって、限局性前立腺癌における骨盤内リンパ節転移を病理学的に診断された転移分布のみならず、微小

転移の分布も含めて詳細に検討し、至適骨盤リンパ節郭清範囲を新たな概念に基づいて提唱したいと考える。我々は、先に触れた総計 2215 個の骨盤リンパ節の詳細な mapping データを有しており、それに基づいた標的遺伝子毎の微小リンパ節転移分布を解析することで、上記の問題点に一定の見解を導き出せるものと確信する。リンパ節郭清範囲とも関連するが、リンパ節郭清の治療的意義の検討も興味深い。まず、リンパ節郭清に治療的意義が存在するとすれば、十分な個数のリンパ節採取が必須である。解剖体を用いた研究では、前立腺癌等のリンパ節郭清の対象となる骨盤内リンパ節は約 20 個であるとされるが、我々は 1 症例あたり平均 18 個のリンパ節を郭清しており、この点からは治療的意義を考察するために十分なリンパ節郭清を施行していると評価出来ると思われる。したがって、採取リンパ節数と病理学および微小リンパ節転移の検出との関係、更には予後への影響も併せて検討したい。

外科切除を意図するものの、高度浸潤性病変を有する症例やリンパ節転移症例に対して、術前内分泌療法が施行される場合があるが (Miyake H, Hara I, Kurahashi T, et al. *Urol Int.* 2006; 77: 122-6), その効果は報告により様々であり、信頼できる前向き試験による明確な結論は得られていないのが現状である。術前にリンパ節転移が疑われる症例に対し、術前の内分泌療法によりリンパ節が画像上消失した後に前立腺全摘術を施行した場合、病理学的にはリンパ節の転移を認めない症例に遭遇することがあるが、そのような症例でも良好な経過を得られる場合と短期間で再発を認める場合がある (Miyake H, et al. *Urol Int.* 2006; 77: 122-6. Miyake H, et al. *Urol Int.* 2005; 74: 27-31). 我々は既に前立腺癌微小リンパ節転移検出における PSA および PSMA を標的とした Real-time RT-PCR の有用性を、術前内分泌療法が施行例においても確認しているが (Miyake H, Kurahashi T, et al. *BJU Int.* 2007; 99: 315-20)、hK2, PSCA および DD3 を標的とした Real-time RT-PCR を新たに施行し、術前内分泌療法によるリンパ節転移の制癌効果を評価することで、その予後予測に応用出来るか否かを検討する予定である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 前立腺全摘除術における至適リンパ節郭清手技の検討

前述の如く限局性前立腺癌に対するリンパ節郭清の至適範囲および採取すべきリンパ節の個数に関しては、従来の見解とは異なる種々の報告がなされ現在活発な議論が行なわれている途上である。しかし、それらは全

て通常の病理学的診断結果に基づいて行なわれており (Miyake H, et al, *Int J Urol* 2003; 10: 196-200, Miyake H, Fujisawa M. Significance of micrometastases in prostate cancer. *Surg Oncol*, 2008; 17: 247-52), 我々の Real-time RT-PCR 法による解析結果を考慮すれば、微小転移のレベルでの所見を、その検討に反映させるべきであると考えられる。我々は上記の 2215 個のリンパ節のマッピングデータを有しており、

(1)により得られる予定の PSA, PSMA, hK2, PSCA および DD3 遺伝子の発現に基づく微小転移分布所見と病理学的に診断されたリンパ節転移の分布所見とを詳細に比較検討する。これにより、微小転移所見を考慮した場合のリンパ節転移分布様式が明らかになり、その結果をリンパ節郭清の至適範囲決定に際し反映させ得るものとする。また、リンパ節郭清の適切性を判断するのに最も単純でありながら有用な指標が採取リンパ節数であるが、この点に関しても採取リンパ節数と病理学的リンパ節転移、微小リンパ節転移およびこれらの分布様式との関係を解析し、それぞれのレベルでの陽性リンパ節を確実に郭清するための目安としての、リンパ節採取個数を明らかにしたい。更に、リンパ節郭清個数が予後に及ぼす影響を、上記と同様に病理学的リンパ節転移および微小リンパ節転移の所見との関連を含めて解析する予定である。

#### (2) 術前内分泌学療法施行例におけるリンパ節微小転移の検討

術前内分泌療法による治療効果という修飾が加わると、病理学的診断、特に微小な病変に対する診断は極めて困難となる。PSA および PSMA に関しては、術前補内分泌療法後の病理学的診断への影響は既に明らかにされている (Miyake H, Kurahashi T, et al. *BJU Int.* 2007; 99: 315-320). しかし、他の遺伝子に関しては、内分泌療法が病理学的診断に及ぼす影響は検討されていない。また前立腺癌に対するホルモン剤を用いた内分泌療法の高感受性を考えると、一定の修飾が加わり病理学的診断に少なからず影響を及ぼしているものと予想される。よって、まず動物実験で内分泌療法が腺癌組織に及ぼす影響を以下の如く検討する。つまり、ヌードマウス皮下にヒト前立腺癌細胞株 LNCaP (Miyake H, et al. *Br J Cancer.* 2001; 84: 859-63, Miyake H, et al. *Endocrinol.* 2000; 141: 2257-65, Miyake H, et al. *Cancer Res.* 2000; 60: 170-6) を移植し、castration 施行群と非施行群に分ける。castration 施行群においては、皮下腫瘍のサイズ別に最大腫瘍径が 5mm 以下、5mm から 10mm および 10mm 以上の 3 群に分けて観察する。2 週間後にヌードマウスを屠殺し

腫瘍組織を採取し、上述のReal-time RT-PCR法およびRT-PCR法による解析に供する。これにより、内分泌療法が微小転移検出のための標的遺伝子発現レベルに及ぼす影響およびその結果と対象病変のサイズとの関係の概要が明らかになる。次いで、臨床標本を用いた解析を実施する。術前内分泌療法を施行した後に採取した骨盤内リンパ節を、hK2, PSCA およびDD3 を標的にし、上述のReal-time RT-PCR法およびRT-PCR法による解析に供し、病理学的診断結果との関係を検討する。また、病理学的診断およびReal-time RT-PCR法およびRT-PCR法による微小転移診断の一致率等を、術前内分泌療法非施行症例との間で比較検討する。更に、術前内分泌療法がリンパ節転移病巣に誘導する抗腫瘍効果の影響を検討するために、TUNEL染色を施行しApoptotic Indexを算出し (Kurahashi T, et al. BJU Int 2005; 96: 895-9, Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, et al. Anticancer Res 2006; 26: 1583-7, Kurahashi T, Miyake H, et al. J Urol, 2007; 177: 757-1, Kurahashi T, Miyake H, et al. Urol Oncol, 2007; 25: 128-33), 内分泌療法が癌細胞に誘導する細胞障害の程度と病理学的診断の正確性との関係を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 前立腺全摘除術における至適リンパ節郭清手技の検討

昨年度の研究により得られたPSA, PSMA, hK2, PSCA およびDD3 遺伝子の発現に基づく微小転移分布所見と病理学的に診断されたリンパ節転移の分布所見とを詳細に比較検討した。これにより、微小転移所見を考慮した場合のリンパ節転移分布様式が明らかになり、その結果をリンパ節郭清の至適範囲決定に際し反映させることが可能となった。また、採取リンパ節数と病理学的リンパ節転移、微小リンパ節転移およびこれらの分布様式との関係を解析し、それぞれのレベルでの陽性リンパ節を確実に郭清するための目安としての、リンパ節採取個数を明らかにした。更に、リンパ節郭清個数が予後に及ぼす影響を、上記と同様に病理学的リンパ節転移および微小リンパ節転移の所見との関連を含めて解析した。

##### (2) 術前内分泌学療法施行例におけるリンパ節微小転移の検討

動物実験で内分泌療法が腺癌組織に及ぼす影響を検討した。ヌードマウス皮下にヒト前立腺癌細胞株を移植し、Real-time RT-PCR法およびRT-PCR法による解析を行い、内分泌療法が微小転移検出のための標的遺伝子発現レベルに及ぼす影響およびその結果と

対象病変のサイズとの関係を明らかにした。次いで、臨床標本を用いた解析を実施した。術前内分泌療法を施行した後に採取した骨盤内リンパ節を、hK2, PSCA およびDD3 を標的にし、Real-time RT-PCR法およびRT-PCR法による解析を行い、病理学的診断結果との関係を検討した。また、病理学的診断およびReal-time RT-PCR法およびRT-PCR法による微小転移診断の一致率等を、術前内分泌療法非施行症例との間で比較検討した。更に、術前内分泌療法がリンパ節転移病巣に誘導する抗腫瘍効果の影響を検討するために、TUNEL染色を施行しApoptotic Indexを算出し、内分泌療法が癌細胞に誘導する細胞障害の程度と病理学的診断の正確性との関係を明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Terakawa T, Miyake H, Kurahashi T, Furukawa J, Takenaka A, Fujisawa M. Improved sensitivity for the detection of micrometastases in pelvic lymph nodes by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) compared with conventional RT-PCR in patients with clinically localized prostate cancer who underwent radical prostatectomy. BJU Int, 2009 Apr;103(8):1074-8.

2. Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. Urologic Oncology, 2009;41(3):581-6.

3. Kumano M, Miyake H, Muramaki M, Kurahashi T, Takenaka A, Fujisawa M. Adverse prognostic impact of capsular incision at radical prostatectomy for Japanese men with clinically localized prostate cancer. Int Urol and Nephrol, 2009;41(3):581-6.

4. Miyake H, Kurahashi T, Takenaka A, Inoue T, Fujisawa M. Clinical outcome of combined immunotherapy with interferon- $\alpha$  and low-dose interleukine-2 for Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma. Urologic Oncology, 2009 Nov-Dec;27(6):598-603.

5. Kurahashi T, Miyake H, Kumano M, Muramaki M, Takenaka A, Fujisawa M. Brain metastases from malignant germ cell tumors of the testis: our experience of 5 cases with a review of the literature. Current Urology, in press.

6. Takenaka A, Soga H, Terakawa T, Kumano M, Furukawa J, Muramaki M, Kurahashi T, Miyake H, Tanaka K, Yamanaka N, Fujisawa M. Assessment of voiding function of orthotopic neobladders in elderly patients with long-term survival. BJU Int, 2009 Apr;103(7):927-30.

7. Takenaka A, Soga H, Kurahashi T, Miyake H, Tanaka K, Fujisawa M. Early recovery of urinary continence after laparoscopic versus retropubic radical prostatectomy: evaluation of preoperative erectile function and nerve-sparing procedure as predictors. International Urol Nephrol, 2009;41(3):587-93.

[学会発表] (計 2 件)

1. NATURAL HISTORY OF PROSTATE CANCER PATIENTS WITH MICROMETASTASES IN PELVIC LYMPH NODES DETECTED BY REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION

第 105 回米国泌尿器科学会議

2. CLINICAL SYMPTOMS IN LOCALIZED RENAL CELL CARCINOMA REFLECT ITS INVASIVE POTENTIAL: COMPARATIVE STUDY BETWEEN INCIDENTALY DETECTED AND SYMPTOMATIC DISEASES

第 105 回米国泌尿器科学会議

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 俊史 (KURAHASHI TOSHIFUMI)

神戸大学・医学部附属病院・医学研究員

研究者番号：

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者