

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21592059

研究課題名(和文)尿中バイオマーカーによる前立腺癌診断および再発再燃予測

研究課題名(英文)Diagnosis and relapse prediction of prostate cancer by urine biomarkers.

研究代表者

深堀 能立(Fukabori, Yoshitatsu)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90199167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺生検予定症例に対し、直腸診後の初尿を採取し、RNAを抽出後、リアルタイム定量的PCRにより、14種の遺伝子の発現量を定量した。各遺伝子の発現度は、PSA発現量で標準化したCt値を算出し、尿中バイオマーカー値とした。その結果、FGF7の低発現性が癌診断に有用であり、特にグレーゾーン患者(血清PSA<10ng/ml)でPCA3をしのぐ結果を得たが、PCA3との有意差は認められなかった。内分泌療法が行われた前立腺癌症例では、WDR19低発現性が再燃予測因子となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Urine samples were obtained from the patients who needed prostate biopsy following a digital rectal exam (DRE) before either biopsy. After isolation of RNA from each sample, quantitative RT-PCR was performed to detect 14 prostate cancer biomarkers. The amount of PCR product was estimated by delta Ct method. The delta Ct value was normalized against urine PSA expression and was used as urine biomarker value. We found that the underexpression of FGF7 was useful for a prostate cancer detection particularly to exceed PCA3 in the gray zone (serum PSA<10ng/ml), but the significant difference was not found. In the prostate cancer cases that endocrine therapy was provided, the likelihood that WDR19 underexpression characteristics could become the relapse predictor was shown.

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：前立腺癌 尿中バイオマーカー 診断予測 再発予測

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 私は、これまで前立腺のアンドロゲン反応性増殖機序の解明(間質細胞の FGF-7/KGF-1 を介する増殖: Fukabori ら米国基礎泌尿器科学会 1992)と、その機序に基づいた前立腺癌のアンドロゲン非依存性再燃予測 (Fukabori ら米国泌尿器科学会 2005)について継続的・精力的に研究してきており、最近前立腺針生検から病理学的に前立腺癌の診断を裏付けられた mRNA を採取する方法論を確立した (Fukabori ら J. Urol. 2006)。これにより、ある程度の大きさをもち、超音波診断で前立腺癌の部位を推定できる大きな病巣に対しては、前立腺癌組織を採取し再燃予測を行うことが可能になったが、近年増加している T1c 癌や小さな病巣には対応困難であり、また凍結切片を作らねばならないという煩雑さを伴う。さらに、針生検という侵襲を経なければ検査できないという制限をもち、まして前立腺検診や、二次検診でこのような推測を行うことは不可能であった。

(2) 近年、直腸診後の尿沈渣を用いた prostate cancer antigen 3 (PCA3)の遺伝子発現定量により、PSA 検査ではグレーゾーンの症例に対し、不必要な針生検を減らして特異度・陰性的中率の高い前立腺癌の検出が可能となったことが報告された (van Gils ら Clin. Cancer Res, 2007)。さらに、Laxman らは尿沈渣を用い、PCA3 に融合遺伝子 TMPRSS2:ERG 等の発現量検査を併用した多重バイオマーカー解析により、PSA や PCA3 をしのぐ有用な前立腺癌診断法を報告した (Cancer Res, 2008)。

(3) 私は、これに私が従来研究してきた前立腺癌の再燃予測的発想を融合させてさらに発展させ、尿沈渣を用いた遺伝子発現により、再発・再燃予測まで可能なモデルを開発したいと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 近年 PSA 検診による前立腺癌死亡率低下の効果が確実に証明されつつあるが、PSA は感度が高いものの特異性が低く、それに伴う過剰の診断・治療を減少させる何らかのマーカーの開発が急務であるといわれている。我々は、各種尿中バイオマーカーを用いてこれらの問題を解決できないか検討した。

(2) 前立腺癌は、ホルモン依存性増殖をするため、アンドロゲン除去療法が治療の初期には奏功するものの、去勢抵抗性前立腺癌となって再燃し、予後不良の転帰をとるものも多い。再燃予測は前立腺組織で検討されている場合が多く、尿沈渣を用いた検討はほとんどない。我々は、各種尿中バイオマーカーを用いて去勢抵抗性再燃の予測ができないか検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 前立腺生検予定の 62 症例について、前立腺触診後の初尿を採取し、可及的速やかに遠心後、尿沈渣中細胞から RNA を抽出した。この RNA より cDNA を合成後、PCA3, TMPRSS2-ERG, EZH2, CRISP3, GOLPH2, Mcm5, WDR19, PSGR, AGR2, IL-1, FGFR2IIIb, FGFR2IIIc, FGF8, FGF7 および内部標準として PSA と GAPDH の遺伝子発現を、TaqMan probe を用いたりリアルタイム定量的 RT-PCR 法 (qPCR) にて測定した (Table 1,2 に購入あるいは作製したプライマーセットを示す)。各遺伝子の発現度は、発現の認められなかった場合の Ct 値を 50 とし、PSA の発現度により標準化して Ct 値とし、これをこれを尿中バイオマーカーとして用いて前立腺癌群と非癌群での発現度の比較を行った (Table 3)。前立腺生検は、経直腸的超音波ガイド下経会陰的系統的 20 カ所生検 (必要な場合には標的採取を追加) で行った。各種尿中バイオマーカーの前立腺癌診断における感度・特異度は ROC 解析を用いて行った。これにより尿中バイオマーカーの

cut off 値を設定し、陽性的中率、陰性的中率、正診率の検討を行った。統計学的検討は「R」(EZR)を用いて行った。尿中バイオマーカの有用性については日常的に用いられる PSAD や PSA F/T および直腸診や画像診断(主にMRI)との比較検討を行った。

(2) 再燃予測の検討については、獨協医科大学病院にて診断され、LHRH agonist と anti-androgen による内分泌療法が行われた 27 例の前立腺癌症例について、上述の尿中バイオマーカを用い、ROC 解析にて再燃予測の cut off 値を設定し、Kaplan-Meier 法にて血清 PSA 再燃の検討を行った。統計処理は「R」(EZR)を用いて行った。

Table 1. TaqMan® Gene Expression Assays

Target	Assay ID (Applied Biosystems)
PCA3	Hs01371939_g1
TMPRSS2-ERG	Hs03063375_ft
EZH2	Hs01016789_m1
CRISP3	Hs00195988_m1
GOLPH2	Hs00213061_m1
Mcm5	Hs00198823_m1
WDR19	Hs00228414_m1
PSGR	Hs00258239_s1
AGR2	Hs00180702_m1
IL-1 $\alpha$	Hs00174092_m1
FGF7	Hs00940253_m1
FGF8	Hs00171832_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
PSA (KLK3)	Hs02576345_m1

Table 2. Design for primers and TaqMan probes of FGFR2IIIb and FGFR2IIIc

Target	For/Rev/Probe	Sequence
FGFR2IIIb/c	Forward	CAGTGGATCAAGCACGTGGAA
	Reverse	GCGATTAAGAAGACCCCTATGCAG
FGFR2IIIb	TaqMan probe	TCAATGTGACCGAGGCGGATGC
FGFR2IIIc	TaqMan probe	CCGCCGGTGTAAACACCGGACGACA

These sequences were designed by Primer Express (Applied Biosystems).

Table 3.  $\Delta$ Ct法

PCR産物(X)はPCRをnサイクル行くと  $2^n$  ずつ増量する。

$$X = X_0 \cdot 2^n$$

定量的PCRにおいてPCR産物の量が閾値を超える時のサイクル数を Ct (threshold cycle)とすると、鋳型初期量(各遺伝子の発現量Q)の対数変換値はCt値と負の直線関係となるので、

$$\text{ex. } Ct_{PSA} = -a \cdot \log_2 Q_{PSA} + b$$

発現量を比較する代わりに、Ct値の差 $\Delta$ Ctを比較する事が可能となる。

ここでは、前立腺上皮における各マーカーの発現量を比較するため、PSAの発現量で標準化した「各マーカーの発現量 $Q_{マーカー}$ /PSAの発現量 $Q_{PSA}$ 」の代用として、 $\Delta$ Ct = Ct<sub>PSA</sub> - Ct<sub>マーカー</sub>

を比較する事にした。

#### 4. 研究成果

(1) 前立腺触診後の初尿に含まれる非常に少ない前立腺細胞から RNA を抽出し cDNA を作製する方法を確立するために、「RNeasy Micro Kit による RNA の抽出」と「QuantiTect Whole Transcriptome Kit による RNA の全トランスクリプトーム増幅」を用いて GAPDH の発現を検討したが、cDNA の増幅・合成ができていなかったため、さらに微量の試料から抽出・増幅が可能とされる「WT-Ovation One-Direct RNA Amplification System」を購入して実験を行った。しかしながらこれでも全く cDNA が合成できなかった。RNA の増幅はうまくいかなかったため、血液試料より細胞の RNA を抽出する「QIAamp RNA Blood Mini」を用いて RNA を抽出し増幅せず逆転写したところ、リアルタイム定量的 PCR が可能である程度の cDNA が合成できた。

(2) 方法論が確立されたので、上述の方法にて尿中バイオマーカの検討を行った。生検直後尿の PSA は高くなく、直腸診による前立腺の圧迫が有用と考えられた。融合遺伝以外の発現は、各試料とも比較的良好で、データ集積に値すると思われた。

(3) 前立腺癌群は 35 例、無悪性所見群は 27 例であった。集積症例の特徴を Table 4 に示す。これらの症例から ROC 解析を行ったところ、4 種の尿中バイオマーカ (PSGR=0.682, PCA3=0.638, FGFR2IIIb=0.629, EZH2=0.601)が AUC が 0.6 を超えた。これらを用いて感度・特異度・陽性的中率 (PPV)・陰性的中率 (NPV) の検討を行った結果を Table 5 に示す。

(4) 前立腺癌の生検適応を考慮する上で、判断に苦慮するのは主にグレイゾーンと呼ばれる血清 PSA 値が 10 未満の症例であり、これらに絞ってさらに検討を加えた。前立腺癌群は 17 例、無悪性所見群は 23 例であった。集積症例の特徴を Table 6 に示す。これらの症例から ROC 解析を行ったところ、4 種の尿中バイオマーカ (FGF7, PCA3, GOLPH2,

TMPRSS2-ERG)が AUC が 0.6 を超えた。この中で FGF7 の AUC が最大で PCA3 を超えたが、PCA3 と有意差は認められなかった。これらを用いて感度・特異度・陽性的中率(PPV)・陰性的中率(NPV)・正診率の検討を行った結果を Table 7 に示す。ここで特筆すべきは、FGF7 の場合は発現が少ない方が担癌を示したことである。

欧米では多いとされる融合遺伝子 TMPRSS2-ERG は、癌症例で 22%と少なく、本邦と欧米では前立腺癌の遺伝子的性格が異なっている可能性が考えられた。

Table 4. Patient Characteristics

patient number	62 cases
age	71 (42-84)*
PSA	8.42 (0.12-6010)*ng/ml
PSA ≤ 10	40 cases
10 < PSA ≤ 20	10 cases
PSA > 20	12 cases
PSA F/T	0.126 (0.006-0.521)*
PV	39 (13-137)*cc
PSAD	0.20 (0.0075-166.9)*
positive DRE	38 cases
positive imaging**	36 cases
positive biopsy	35 cases
Gleason Score	6     3 cases
	7     9 cases
	8     9 cases
	9     13 cases
	10    1 case
T Stage	1     1 case
	2     22 cases
	3     10 cases
	4     2 cases

\*: median (min.-max.), \*\*: by MRI or TRUS

Table 5. 各種尿中バイオマーカーの前立腺癌診断精度

Biomarker	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
PSGR	69%	70%	75%	63%
PCA3	60%	70%	72%	57%
FGFR2IIIb	49%	82%	78%	55%
EZH2	60%	70%	72%	57%

Table 6. Patient Characteristics (PSA < 10ng/ml)

patient number	40 cases
age	68 (42-83)*
PSA	6.55 (0.12-9.98)*ng/ml
PSA F/T	0.12 (0.006-0.521)*
PV	37 (13-137)*cc
PSAD	0.11(0.0075-0.612)*
positive DRE	22 cases
positive imaging**	18 cases
positive biopsy	17cases
Gleason Score	6     1 cases
	7     7 cases
	8     6 cases
	9     3 cases
	10    0 case
T Stage	1     0 case
	2     11 cases
	3     6 cases
	4     0 case

\*: median (min.-max.), \*\*: by MRI or TRUS

Table 7. Diagnostic precision of urine markers

	Biomarker	AUC	sensitivity(%)	specificity(%)	PPV(%)	NPV(%)	accuracy(%)
1	FGF7	0.826	88	70	68	89	78
2	PCA3	0.717	82	70	67	84	75
3	GOLPH2	0.638	88	48	56	85	65
4	TMPRSS2-ERG	0.606	59	74	63	71	68

(serum PSA < 10ng/ml)

(5) 再燃予測因子としての検討は、当大学病院にて診断され、内分泌療法が行われた 27 例の前立腺癌症例について行った。観察期間は 4-48 ヶ月であった。各尿中バイオマーカーを定性的指標とした血清 PSA 再燃の検討は Kaplan-Meier 法にて行った。各尿中バイオマーカーのうち、WDR19 発現低値群では無増悪生存期間が有意に短く (p < 0.05)、WDR19 高値群では生化学的再燃は認められなかった (Fig. 1)。PCA3、TMPRSS2-ERG、EZH2、IL-1a の高値群でも生化学的再燃が認められなかったが、有意差はなかった。WDR19 は、前立腺では正常・BPH と比べて癌で発現が高いが、組織 WDR 19 mRNA が低いと生化学的再燃や局所再発のリスクが高いと

いわれている。本研究では、尿中細胞の結果ではあるが、組織抽出のデータと同様の結果となり、より侵襲性の低い検査での有用性が示唆された。

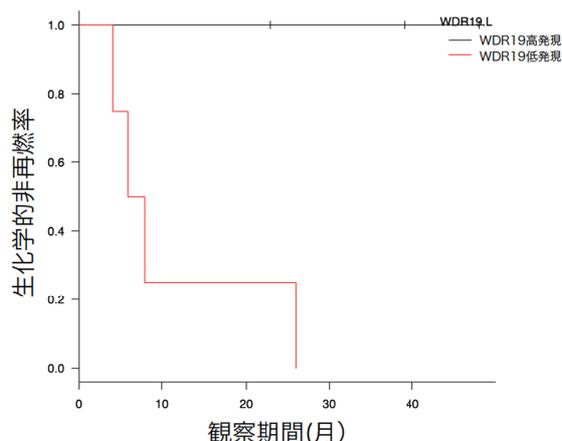


Fig. 1. WDR19 による PSA 再燃の検討

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Yashi M, Nishihara D, Mizuno T, Yuki H, Masuda A, Kambara T, Betsunoh H, Abe H, Fukabori Y, Muraishi O, Kamai T: Metronomic Oral Cyclophosphamide Chemotherapy Possibly Contributes to Stabilization of Disease in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Prospective Analysis of Consecutive Cases, Clin Genitourin Cancer. 査読有、印刷中、2014、doi: 10.1016/j.clgc.2014.02.007.

Magari T, Fukabori Y, Ogura H, Suzuki K. : Lower urinary tract symptoms of neurological origin in urological practice, Clin Auton Res. 査読有、vol 23、2013、pp67-72.

深堀能立, 山崎瞳, 柳林亜希, 新井京子, 神原常仁, 安土正裕, 釜井隆男: 前立腺癌診断における尿中バイオマーカーの有用性の検討 臨床データとの比較、泌尿器外科、査読無、26 巻、2013、pp1299-1302

深堀能立, 大竹伸明, 中田誠司, 鈴木和浩 :【前立腺癌(第 2 版)-基礎・臨床研究のアップデート-】臨

床 前立腺癌の疫学 遺伝性・家族性前立腺癌の特徴、日本臨床(前立腺癌)、査読無、69 巻増刊 5、2011、pp197-202

Kitajima K, Kaji Y, Fukabori Y, Yoshida K, Suganuma N, Sugimura K.: Prostate cancer detection with 3 T MRI: comparison of diffusion-weighted imaging and dynamic contrast-enhanced MRI in combination with T2-weighted imaging. J Magn Reson Imaging. 査読有、vol 31、2010、pp625-631.

深堀能立, 本田幹彦, 神原常仁, 吉田謙一郎:【前立腺癌】前立腺癌のアンドロゲン依存性とその消失、臨床検査、査読無、53 巻、2009、pp1631-1639

Kambara T, Oyama T, Segawa A, Fukabori Y, Yoshida K.: Prognostic significance of global grading system of Gleason score in patients with prostate cancer with bone metastasis. BJU Int. 査読有、vol 105、2010、pp1519-1525.

[学会発表] (計 14 件)

深堀能立、山崎瞳、安土正裕、阿部英行、別納弘法、増田聡雅、幸英夫、新井京子、釜井隆男: 前立腺癌再燃予測における尿中バイオマーカーWDR19の有用性、第 52 回日本癌治療学会、2014.8.28、横浜

Y. Fukabori, H. Yamazaki, A. Yanagibayashi, M. Yashi, H. Abe, H. Betsunoh, A. Masuda, H. Yuki, K. Arai, T. Kamai : FGF7 as a candidate urine biomarker for prostate cancer detection, 29th Annual Congress of the European Association of Urology, 2014.4.12, Stockholm, Sweden

深堀能立, 山崎瞳, 安土正裕, 柳林亜季, 新井京子, 釜井隆男: 前立腺非癌診断における FGF の尿中バイオマーカーとしての有用性、第 78 回日本泌尿器科学会東部総会、2013、10、18、新潟、

深堀能立, 別納弘法, 釜井隆男: 前立腺癌診断の

ための新規尿中バイオマーカーの開発. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013、10、5、横浜

深堀能立、山崎瞳、安土正裕、柳林亜希、新井京子、釜井隆男：アンドロメジンシステムに関する尿中バイオマーカーを用いた前立腺癌診断、日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会、2013.07.26、大阪

Fukabori Y, Yamazaki H, Kambara T, Yanagibayashi A, Arai K, Kamai T : FGFR2IIIb, PSGR and EZH2 as candidate urine biomarkers for prostate cancer detection、AUA Annual Meeting 2013、2013、5、13、San Diego、USA、

深堀能立、山崎瞳、柳林亜希、新井京子、神原常人、安土正裕、釜井隆男：前立腺癌診断における各種尿中バイオマーカーの有用性の比較検討. 第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013、4、13、札幌

深堀能立、山崎瞳、柳林亜希、新井京子、神原常仁、安土正裕、釜井隆男：前立腺癌診断における尿中バイオマーカーの有用性の検討、第 28 回前立腺シンポジウム、臨床データとの比較、2012.12.9、東京

Fukabori Y, Yamazaki H, Kambara T, Yanagibayashi A, Arai K, Kamai T : FGFR2IIIb as a candidate urine biomarker for prostate cancer detection、The 32nd Congress of the Société Internationale d'Urologie、2012.10.1、Fukuoka, Japan

深堀能立、山崎瞳、神原常仁、安土正裕、柳林亜希、新井京子、釜井隆男：前立腺癌診断における PSGR の尿中バイオマーカーとしての有用性、第 77 回日本泌尿器科学会東部総会、2012.10.18、東京

深堀能立、神原常仁、山崎瞳、新井京子、釜井隆男：前立腺癌診断における FGFR2IIIb の尿中バイオマーカーとしての有用性、第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21、横浜

深堀能立、神原常仁、山崎瞳、新井京子、吉田謙

一郎：尿中バイオマーカーMcm5 による前立腺癌診断の検討、第 76 回日本泌尿器科学会東部総会、2011.10.21、横浜

深堀能立、神原常仁、山崎瞳、新井京子、吉田謙一郎：尿中バイオマーカーによる前立腺生検適応の検討、第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011.4.22、名古屋

深堀能立、神原常仁、山崎瞳、新井京子、吉田謙一郎：尿中バイオマーカーによる前立腺癌診断の検討、第 75 回日本泌尿器科学会東部総会、2010.9.16、宇都宮

[図書] (計 2 件)

深堀能立、吉田謙一郎：ヌーヴェルヒロカワ、臨床病態学 第 2 版、2013、641p (pp364-366)

深堀能立：技術情報協会、がんの新しいバイオマーカー/予測因子による個別化医療時代に求められる抗がん剤開発、2011、365p (pp195-257)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

深堀 能立 (FUKABORI, Yoshitatsu)

獨協医科大学・医学部・泌尿器科学・准教授

研究者番号：90199167

### (2) 研究協力者

山崎 瞳 (YAMAZAKI, Hitomi)

獨協医科大学・医学部・泌尿器科学・研究技師