

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791490

研究課題名（和文） 光力学診断を用いた尿中前立腺癌細胞の検出

研究課題名（英文） Detection of Prostate Cancer Cells in Urine Sediments by Photodynamic Diagnosis

研究代表者

穴井 智（ANAI SATOSHI）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70526699

研究成果の概要（和文）：前立腺癌における光学的診断の有用性を検討するため、前立腺針生検施行時、138 例の尿サンプリングを行い、5-アミノレブリン酸（ALA）による処理後、プロトポルフィリン IX（PPIX）発現の有無を蛍光顕微鏡下で尿細胞診として判定し、その結果を組織学的確定診断、ならびに Prostate Specific Antigen（PSA）値、前立腺体積、直腸診、経直腸エコーなどの臨床パラメータと比較した。PPIX 検出による前立腺癌尿細胞診の感度・特異度は各 74%・70%であり、既存の直腸診や経直腸エコーによる診断と比較し、高い感度を示し、PSA 値よりも高い特異度を示した。また、病理学的悪性度が高い症例ほど PPIX が陽性と判定される頻度が高く、PPIX 検出と前立腺癌の病理学的悪性度との関連性が示唆された。さらに、40 例に対しては、より定量的解析を行うため、分光光度計を用いて PPIX 定量を試み、定量的光学的診断による前立腺癌診断の感度・特異度はいずれも 63%であった。さらに、遺伝子学的検査のため、尿サンプリング時に total RNA を抽出し保存し、PSA および TMPRSS2-ERG の検出を quantitative PCR により試みた結果、PSA については PPIX 陽性症例において有意に高値を示すも、TMPRSS2-ERG については関連性を証明することはできなかった。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the feasibility of photodynamic diagnosis (PDD) using 5-aminolevulinic acid (ALA) for detecting of prostate cancer (PCa) cells in the urine obtained following prostate massage. Urine samples were collected from 138 men performed the prostate massage (attentive digital rectal examination) before prostate needle biopsy. Urine sediments were exposed to 5-ALA (1mM) for 3 hours and cytospun onto glass slides. Protoporphyrin IX (PPIX), which is the metabolite of 5-ALA in the heme biosynthetic pathway, was observed using the fluorescent microscope (excitation filter 380-420 nm, emission filter 630 nm) as a positive signal of cancer cell. Any fluorescent signal in the samples was evaluated as positive. After histological diagnosis, the results of 5-ALA-PDD were compared with the histological diagnosis. Prostate cancer cells were successfully visualized by the PPIX. Of the 81 cases with biopsy-proven prostate cancer, 60 were evaluated as positive by 5-ALA-PDD (sensitivity: 74 %). Although 57 cases were diagnosed as no cancer with biopsy, 17 5-ALA-PDD positive cases were detected (specificity: 70 %). The positive predictive value of 5-ALA cancer detection was 78%.

The proportion of 5-ALA PDD positive in the patients biopsy-proven prostate cancer was increased to 68% in Gleason score (GS) 6, 74% in GS 7, and 83% in GS 8 to 10, respectively ($p=0.07$). We have successfully demonstrated that PPIX in urine sediments treated with 5-ALA could be detected in the PCa patients. Furthermore, pathologically, the higher Gleason score was associated with the larger incidence of 5-ALA-PDD positive. 5-ALA-PDD positive cells might indicate how malignant the prostate cancer cells in the urine obtained following prostate massage are. So this harmless cancer detecting system appears to have the useful clinical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：腫瘍学、前立腺癌、光学的診断

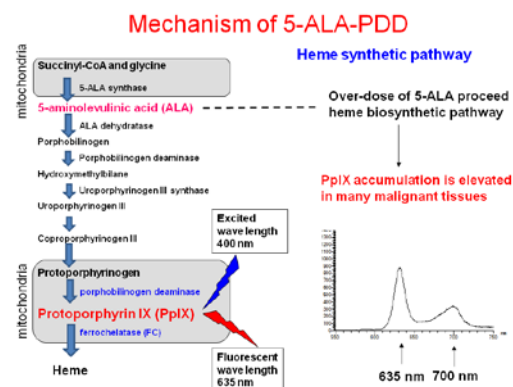
1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の診断は、一般に前立腺癌腫瘍マーカーである PSA 値と直腸診所見を基に針生検法で確定されるが、その診断率は、決して高いといえるものではなく、当施設における、いわゆる PSA グレーゾーン (PSA range: 4.1-10.0ng/ml) の患者の癌検出率は 23.4% である。針生検の適応については、PSA density や F/T、doubling time、velocity などが補助的に用いられているが、診断率の向上に十分寄与しているとはいえない現状で、日常診療に応用可能な新しい biomarker の開発が望まれている。

癌細胞においてはヘム合成経路が亢進しており、5-アミノレブリン酸 (ALA) 過剰投与により、その代謝産物であるプロトポルフィリン IX (PPIX) が、正常細胞と比較し癌細胞において過剰に蓄積する特性が知られて

おり (図 1)、その特性を活用した光学的診断は、既に膀胱癌においてその有用性は実証されているが、前立腺癌の診断への応用、特に細胞診の有用性に関する検討の報告は多くは見られない。

図 1



我々は、前立腺癌細胞株 (PC-3、LNCaP、DU-145) を 1mM ALA で 3 時間培養処理した後、無処理細胞株で

は全く蛍光が検出されないのに対し、処理細胞株では赤色の蛍光が検出され、また、前立腺正常細胞 (PrEC) においては、ALA 処理、無処理群に関わらず蛍光信号は検出されないことを検証している。

さらに、臨床研究として、前立腺針生検で組織学的確定診断を行った 43 名において、生検施行前の直腸診後に尿を採取し、尿中細胞を 5-ALA (1 mM) 含有細胞培養液中で処理した後、蛍光顕微鏡下で観察し PPIX 陽性細胞と組織学的診断結果との関連性について検討した。その結果、PPIX 陽性率は 65.1% であり、組織学的診断 (生検陽性率 58.1%) との感度は 89%、特異度は 53% であり、PPIX を用いた光学的尿中前立腺癌細胞検出法が、前立腺針生検の適応決定ならびに補助的診断に有用である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

今回、癌細胞に特異的により多く蓄積される PPIX を指標として、前立腺マッサージ後に回収した尿中剥離細胞にその前駆物質である 5-ALA を反応させることにより、前立腺分泌液から尿中に混入した前立腺癌 (異型) 細胞を励起光波長 400nm、蛍光波長 630nm を用いて光学的に検出し、前立腺癌の診断率の向上を目的とした。

しかしながら、これまでの検討において前立腺マッサージ後にみられた PPIX 陽性細胞が、真に前立腺癌由来の細胞である確証はなく、PPIX 陽性細胞に対する分子生物学的な基礎検証が必須と考えている。今回の研究において、これらの基礎的な検証を行うと共に、多数症例を用いて 光力学診断 を用いた尿中前立腺癌細胞の検出法を確立し、その意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺マッサージ後尿にみられた PPIX 陽性細胞が前立腺癌由来細胞である確認

① 前立腺マッサージ後尿に検出された PPIX 陽性細胞が前立腺由来細胞であることを FACS を用いて検証する。従来の方法に準じ、前立腺癌を疑われ針生検を実施する患者を対象に、針生検前に前立腺マッサージ後尿を採取して 5-ALA で処理し FACS で蛍光細胞数を確認する。この検証には FACS cell sorter を用いて蛍光細胞を分別採取し、固定後 PSA 染色を行い前立腺由来細胞であることを確認する。

② PPIX 陽性と判断された蛍光細胞が癌細胞である検証には、スライドグラス上の尿沈渣細胞が PPIX と同時に PSA、サイトケラチンの発現の有無を蛍光二重染色により確認する。また同時に得られる尿沈渣サンプルの半量を用いて、一般的に前立腺癌組織内に発現が認められる PSA の発現量の有無について RT-PCR を用いて評価する。

(2) 前立腺マッサージ後尿にみられた PPIX 陽性細胞の臨床的意義に関する研究

① 今まで行ってきた前立腺マッサージ後尿中 PPIX 陽性細胞の定性的評価に加えて、本研究では PPIX 陽性細胞数の定量的評価を行い、臨床的意義を確立する。具体的には、これまでカバーグラス上の尿沈渣の塗抹細胞において PPIX 陽性細胞の有無について定性的評価を行っていたが、今回、複数視野で撮影・記録し、その陽性細胞数ならびに蛍光強度について、画像解析ソフトウェアを用いて定量的に評価する。

② 本研究に先行して光学的診断を用いて尿中異型細胞を選択的に採取する装置を開

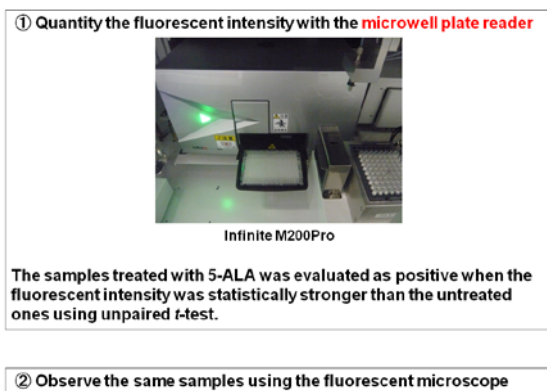
発しており、本装置を用いてまた、遺伝子学的な発現検索も同時に行う。最近、**androgen-regulated gene** の 1 つである **TMPRSS2** と **ETS gene family** の 1 つである **ERG** の遺伝子融合が、**限局性前立腺癌** の 50%以上**に存在**することが報告されている。しかし、本邦における **TMPRSS2-ERG** 遺伝子融合の頻度は明らかではない。今回、尿沈渣中の細胞における **TMPRSS2-ERG** 融合遺伝子の発現の有無についても検討する。

4. 研究成果

(1) 前立腺マッサージ後尿にみられた PPIX 陽性細胞が前立腺癌由来細胞である確認

前立腺マッサージ後尿に検出された PPIX 陽性細胞の検出を FACS を用いて試みたが、PPIX の蛍光波長である 630nm と同一の波長での観察は困難であった。このため、励起光波長と蛍光波長を PPIX を測定すべく特定の波長で観察するため、分光光度計を用いて評価した (図 2)。

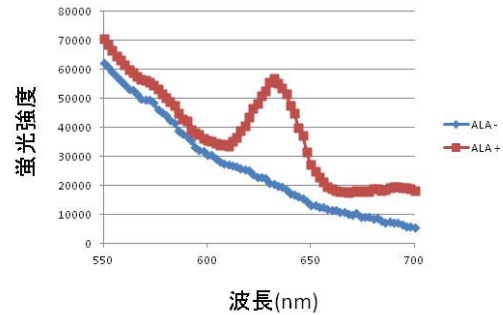
図 2



分光光度計による解析では、630nm をピークに、5-ALA 処理細胞と未処理細胞において、蛍光強度の解離を認め、正確に PPIX 陽性細胞を同定できている可能性が示唆された (図 3)。

蛍光細胞診の複数視野の画像解析による定量化は、分光光度計による光力学診断陽性細胞の定量化が可能となったため、そちらにシフトした。

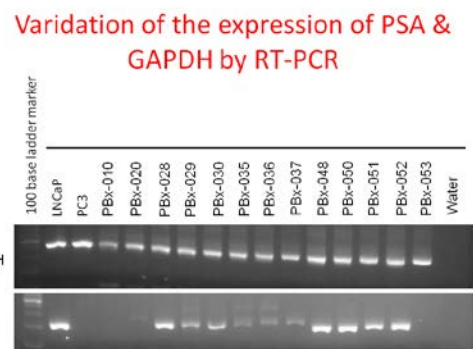
図 3



さらに、PPIX 陽性細胞が前立腺由来細胞である確認として、これらの検体から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により、一般的に前立腺癌組織内に発現が認められる PSA の発現量の有無を評価した。

図 4 に示すように、PSA の発現量には、検体間で差を認めた。PSA 発現が確認されたことで、少なくとも、検体内に前立腺 (癌) 細胞が含まれていることが示唆された。

図 4



今回の研究では、androgen-regulated gene の 1 つである **TMPRSS2** と **ETS gene family** の 1 つである **ERG** の遺伝子融合の検出を患者尿検体から試みるも、検出不可であった。また、PPIX 陽性細胞に対する PSA およびサイトケラチン染色による二重染色は実現不可であった。

(2) 前立腺マッサージ後尿にみられた PPIX 陽性細胞の臨床的意義に関する研究

前立腺癌腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 (PSA) の異常高値、あるいは前立腺直腸指診により前立腺に腫瘤を触知された、前立腺癌疑いの症例に対し、前立腺癌確定診断のために、前立腺針生検を行った患者を対象とした。このうち生検で組織学的に前立腺癌が証明された患者を陽性と判断し、証明されなかった患者を陰性と判断した。

患者検体の処理は図 5 に示す。

図 5

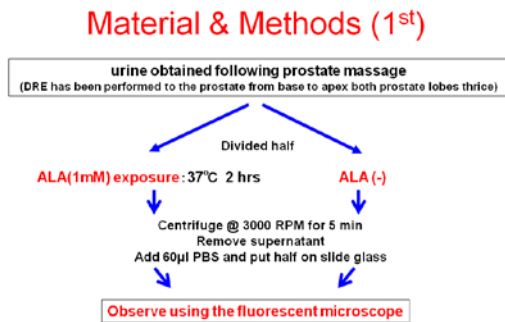


図 6

Patients Background (1st)

	Total (n=138) mean ± SD	Cancer (n=81) mean ± SD	Non-cancer (n=57) mean ± SD	P-value
Age(years)	69.6 ± 6.9	71.0 ± 7.3	67.4 ± 6.1	0.002
PSA(ng/ml)	31.9 ± 88.1	50.5 ± 121.9	8.6 ± 4.8	0.002
Free PSA(ng/ml)	9.6 ± 69.7	6.4 ± 14.9	1.3 ± 0.75	0.008
F/T(%)	15.9 ± 7.2	16.0 ± 7.0	16.7 ± 0.62	0.679
PV (cm ³)	33.9 ± 16.7	31.0 ± 14.5	40.1 ± 19.0	0.002
TZV (cm ³)	17.5 ± 13.4	15.7 ± 8.6	21.9 ± 19.1	0.04
PSAD (ng/ml/cm ³)	1.3 ± 4.7	2.0 ± 6.0	0.26 ± 0.19	<0.001

Mann-Whitney test

また、今回対象となった患者背景を図 6 に示す。対象症例は 138 例で、前立腺針生検により、81 例が癌陽性と診断された。癌なしと判断された群と比較すると、年齢、PSA 値は、癌ありの群で高値を示し、前立腺体積は癌な

し群で高値を示した。

これらの患者群における、蛍光顕微鏡による光学的診断結果は、感度 74.1%、特異度 70.2%であった。

図 7

Comparison cancer detection ratio by PNB with PDD observed under the fluorescent microscope

	Prostate needle biopsy	
	positive	negative
ALA positive	60	17
ALA negative	21	40

Positive predictive value 77.9%
sensitivity 74.1%
specificity 70.2%

光学的診断結果と生検時 PSA 値および前立腺癌の病理学的悪性度分類であるグリソンスコアとの関連性について検討したものを図 8 に記す。PSA 値と生検結果ならびに光学的診断との間には関連性を認めなかったが、グリソンスコアについては、上昇するほど、つまり悪性度が高くなるほど、光学的診断の陽性率の比率が増加した。これは前立腺癌における悪性度と、光学診断陽性との間に関連性があることが示唆された。

図 8

Results of 5-ALA-PDD in PBx (2)

	PNB positive		PNB negative	
PSA (ng/ml)				
No. 0-4	3	ALA: pos 3, neg 0 (100%)	1	ALA: pos 0, neg 1
No. 4.1-10	37	ALA: pos 27, neg 10 (73%)	27	ALA: pos 9, neg 18 (33%)
No. 10.1-20	14	ALA: pos 11, neg 3 (79%)	14	ALA: pos 4, neg 10 (29%)
No. 20.1-	20	ALA: pos 14, neg 6 (70%)	2	ALA: pos 0, neg 2
No. Gleason Score (%)				
6	25	ALA: pos 17, neg 8 (68%)		
7	31	ALA: pos 23, neg 8 (74%)		
8, 9, 10	18	ALA: pos 15, neg 3 (83%)		

P - value 0.0774 χ^2 test for trend

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 1 件)

- ① 穴井 智ら (2011) 日本腎泌尿器疾患
予防医学研究会誌 Vol. 19, No. 1: 80-82
〔学会発表〕(計3件)
- ① Satoshi Anai ら、Photodynamic
detection using 5-aminolevulinic acid
(ALA) of prostate cancer cells in the
urine obtained following prostate
massage、2011年米国癌学会総会、2011
年4月5日フロリダ
- ② Satoshi Anai ら、The Quantification
for the bladder cancer orthotopic
mouse by photodynamic detection using
5-ALA、2011年日本癌学会総会、2011年
10月3日、名古屋
- ③ Satoshi Anai ら、Can the photodynamic
diagnosis using 5-aminolevulinic acid
(ALA) predict how malignant the
prostate cancer cells in the urine
obtained following prostate massage
are? 2011年国際泌尿器科学会総会、
2011年10月17日、ベルリン

6. 研究組織
(1) 研究代表者

穴井 智 (ANAI SATOSHI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70526699