

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861445

研究課題名(和文) 光力学診断を応用した去勢抵抗性前立腺癌の予後予測

研究課題名(英文) Photodynamic diagnosis reinforces the prediction for the prognosis of castration resistant prostate cancer

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌治療において最も重要な解決すべき課題は去勢抵抗性前立腺癌である。しかし、PSAが去勢抵抗性前立腺癌の30%程度で、PSA値と関連なく病勢進行を呈するため、去勢抵抗性前立腺癌の予後予測方法の確立は喫緊の課題である。今回、尿検体による前立腺癌検出を目的とした光学的診断は、去勢抵抗性前立腺癌の診断に応用可能であり、尿中剥離細胞中にプロトポルフィリンIX(PpIX)陽性細胞の検出が可能となった。さらに、根治的治療で予後不良因子とされるPTEN遺伝子の欠失を、FISH法を用いて、去勢抵抗性前立腺癌患者の尿検体で評価可能となった。PTEN遺伝子の欠失は約40%で認められた。

研究成果の概要(英文)：Castration Resistant Prostate Cancer (CRPC) comprises a large portion of cause of death among prostate cancer patients. In about 30% of CRPC cases, Prostate Specific Antigen (PSA), the most reliable marker for diagnosis and assessment of the therapeutic value, is not associated with the disease progression. As a result, developing a useful treatment in terms of the predictor of therapeutic value and prognosis was a pressing issue for us to be resolved. We have been developing the photodynamic diagnosis (PDD) using patients' urine for the detection of prostate cancer. In this study, PDD is applied to the diagnosis for CRPC. Namely, Protoporphyrin IX (PpIX) can be detected in CRPC patients' urine and the intensity of PpIX can be quantified by the spectrophotometer. Moreover, the deletion of PTEN, which is known as the biomarker for the curative therapy such as radiation and operation, can be detected in CRPC patients' urine by FISH. About 40% of CRPC appeared PTEN deletion by FISH.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 低侵襲検査 蛍光細胞診 尿細胞診 予後予測 治療効果予測 PTEN

1. 研究開始当初の背景

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(5-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(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、我々は、その特性を活用した光力学的診断の有用性を膀胱癌および前立腺癌において実証してきた。

具体的には、**癌細胞に特異的に多く蓄積される 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、蛍光顕微鏡下で観察することで、**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 405nm、蛍光波長 635nm を用いて**光力学的に検出し、前立腺癌の診断率の向上**に努めてきた。

しかし、蛍光尿細胞診では、顕微鏡下に陽性細胞の有無を判断するため、検者間で結果にばらつきが生じる懸念があった。そこで、**分光光度計を用いることで、定量的に PpIX 陽性細胞の有無を判断することが可能**となった。

さらに、京都大学工学研究科、田畑 修研究室と共同で、MEMS 技術によるフローセル・微細切替弁を作製し、癌細胞の検出・分別・採取を行う癌診断用カートリッジ型ハイスルーブット光力学尿細胞診断装置を開発してきた。これにより、簡便・高速・高精度に、**尿中から癌細胞を自動検出**することが可能となった。

また、染色体 10q23.3 上に存在する癌抑制遺伝子である **PTEN 遺伝子欠失が、前立腺癌において手術・放射線治療などの根治的治療で予後不良因子**となることが報告されている。PTEN 遺伝子欠失は、FISH 法を用いて検出することが可能であり、前立腺全摘除術においては、約 40%の症例で PTEN 遺伝子欠失が認められるとされるが、去勢抵抗性前立腺癌においては、PTEN 遺伝子欠失の程度は明らかではない。

今回、最も治療が困難である**去勢抵抗性前立腺癌において、患者尿検体を用いて低侵襲な予後診断法を確立**することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

(1) 去勢抵抗性前立腺癌患者の尿中剥離細胞中の PpIX 陽性細胞の検出・分別・採取

「カートリッジ型ハイスルーブット光力学尿細胞診断装置を用いて上記を行い、去勢抵抗性前立腺癌患者の尿中に PpIX 陽性細胞がどの程度含まれているのかを確認する。

(2) 分別採取された PpIX 陽性細胞における PTEN 遺伝子欠失の評価

PTEN 遺伝子欠失を FISH 法で検出するのは、すでに確立された方法であるが、患者尿検体かつ癌細胞と同定された細胞を評価することで、より正確に PTEN 遺伝子欠失を評価できる。

(3) PTEN 遺伝子欠失を FISH 法で評価した際の蛍光信号のマイクロ流体デバイスによる評価

PTEN 遺伝子の欠失は、核内における染色体 10q23.3 における PTEN 遺伝子を赤色蛍光で 1 箇所(欠失)ないし 2 箇所(正常)の信号として蛍光顕微鏡で評価するが、定量性に乏しいことが欠点といえる。そこで、PpIX の蛍光信号を定量できるマイクロ流体デバイスの特性を、FISH 法の蛍光信号検出に応用し、PTEN 遺伝子欠失の場合、正常(野生型)と比較して、その蛍光強度が半量になることを検出し得るかどうかを評価する。

3. 研究の方法

(1) 去勢抵抗性前立腺癌患者の尿中剥離細胞中の PpIX 陽性細胞の検出・分別・採取

当該研究では、PpIX 陽性の分別・採取については、すでに平成 23 年度戦略的基盤技術高度化支援事業で開発した「MEMS 技術を用いた癌診断用カートリッジ型ハイスルーブット光力学尿中細胞診断装置」を使用することが可能であり、研究期間を通じ、**去勢抵抗性前立腺癌患者の尿中剥離細胞中 PpIX 陽性細胞の有無**について検討を継続する。

(2) 尿検体より分別採取された PpIX 陽性細胞中の PTEN 遺伝子欠失の評価

培養細胞に対する FISH 法による PTEN 遺伝子欠失の検出

前立腺癌培養細胞において、DU-145 では PTEN 遺伝子欠失は認めないが、PC-3 や LNCaP では欠失を認める。これを、BAC clone RP11-383D9 (BACPAC

Resources Center)と CEP10 Spectrum Green probe (LSI PTEN/CEP 10 ,Vysis)を用いた FISH 法で解析を行う。培養細胞の FISH 法前処理は、パラフィン切片上の組織に対して行う際と同様に行う。

分別・採取された PpIX 陽性細胞中の PTEN 遺伝子欠失の評価

培養細胞での PTEN 遺伝子欠失が検出できることを確認し、(1)で分別採取した PpIX 陽性細胞についても 同様に PTEN 遺伝子欠失を評価し、従来の FISH 法による検出が可能であることを評価する。

(3) PTEN 遺伝子欠失を FISH 法で検出した蛍光信号のマイクロ流体デバイスによる評価

光力学的診断でのマイクロ流体デバイスの FISH 法検出への応用

FISH 法における蛍光信号の検出は、基本的には光力学診断における PpIX を検出する際の蛍光波長である 630nm に近似し、かつ PpIX による蛍光信号はブリーチング現象により数分後には消失するため、細胞固定などの工程を経ると、PpIX における光力学診断と同様の設定を用いることが可能である。

FISH 法での PTEN 遺伝子の欠失か野生型かの蛍光強度の差は、単純に欠失の方が半分になるため、PpIX 検出に使用してきたマイクロ流体デバイスの条件調整は、京都大学工学研究科、田畑 修研究室と共同で行う。

4 . 研究成果

(1) 去勢抵抗性前立腺癌患者の尿中剝離細胞中の PpIX 陽性細胞の検出・分別・採取

去勢抵抗性前立腺癌患者の約 80%において、PpIX 陽性細胞の存在が確認された。さらに、ドセタキセルなどの化学療法中に、PpIX 陽性細胞の消失が確認できた患者も散見され、限局性前立腺癌患者のみならず、去勢抵抗性前立腺癌患者においても、尿中剝離細胞を評価することが有意義であることが示唆された。

(2) 分別採取された PpIX 陽性細胞における PTEN 遺伝子欠失の評価

培養細胞においては FISH 法により PTEN 欠失の有無を確認可能であり、さらに患者尿検体の約 40%PTEN 欠失が確認できた。観察期間・対象症例数が十分ではないため、治療効果や予後との関連については現時点では言及できないが、今後の経過観察が必要である。

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 3 件)

Nakai Y, Anai S, (10 人中 2 番目)
Protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in bladder cancer cells in voided urine can be extracorporeally quantified using a spectrophotometer. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015 pii: S1572-1000(14)00173-2. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.010. [Epub ahead of print]

Nakai Y, Anai S, (10 人中 2 番目)
Photodynamic diagnosis of shed prostate cancer cells in voided urine treated with 5-aminolevulinic acid. BMC Urol. 2014, 14:59. doi: 10.1186/1471-2490-14-59.

Miyake M, Nakai Y, Anai S, (10 人中 3 番目)
Diagnostic approach for cancer cells in urine sediments by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic detection in bladder cancer. Cancer Sci. 2014 , 105(5):616-22. doi: 10.1111/cas.12393. Epub 2014 Apr 6.

[学会発表] (計 1 件)

Anai S
The sensitivity of the novel fluorescent urine cytology using 5-ALA is higher than the conventional urine cytology. American Urological Association Annual Meeting Orlando, FL, USA, 2014/5/18

〔その他〕
ホームページ等

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