

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 新しい前立腺がんマーカー

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-04-28 キーワード (Ja): キーワード (En): Prostate cancer, PSA, marker 作成者: 斎藤, 誠一, Saito, Seiichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015624

新しい前立腺がんマーカー

斎藤 誠一

琉球大学医学部器官病態医科学講座 泌尿器科学分野

A New Marker for Prostate Cancer

Seiichi Saito

*Division of Urology, Department of Organ-oriented Medicine, Faculty of Medicine,
University of the Ryukyus*

ABSTRACT

Prostate-specific antigen (PSA) has been widely used for detection and diagnosis of early prostate cancer. However, PSA has problems with specificity and does not reflect grade of malignancy. In addition, PSA has no cut-off value because the prevalence of prostate cancer was reported to be 15% among men with PSA 4 ng/mL or less. Therefore, a new serum marker to compensate for the problems of PSA is urgently required.

In an attempt to search a novel marker, we focused on the glycosyl epitope, β 1, 4-GalNAcDSLc₄, to which monoclonal antibody (mAb) RM2 was established using renal cell carcinoma cell line, based on the assumption that the hybrid structure of the glycosyl epitope is associated with the nature of prostate cancer. By immunohistochemistry using radical prostatectomy specimens, we found RM2 reacted to prostate cancer cells, reflecting grade of malignancy, whereas RM2 had no reactivity to benign prostatic hyperplasia. RM2 showed preferential reactivity toward haptoglobin-beta chain derived from prostate cancer than that from benign prostatic diseases. Haptoglobin-beta chain defined by RM2 (Hp-beta-RM2) in serum had sensitivity of 87% and specificity of 84% for detecting early prostate cancer among men with PSA value < 10 ng/mL. Hp-beta-RM2 is a novel serum marker that may be useful for detection of early prostate cancer. Furthermore, serum level of Hp-beta-RM2 may predict PSA failure after radical prostatectomy, although the number of patients examined is small. *Ryuky Med. J., 28(1,2)9~16, 2009*

Key words: Prostate cancer, PSA, marker

はじめに

前立腺がんの血清マーカーとして現在汎用されているPSA (prostate-specific antigen) は、前立腺がんの早期発見・早期診断、根治的治療後の早期再発チェック、進行前立腺がんに対するホルモン療法などの治療経過のモニタリングに役立っている。しかしながら、PSAは前立腺に特異的であるが、前立腺がんの特異的なマーカーではないため、前立腺肥大症 (BPH) や前立腺炎のような良性疾患でも PSA 値は上昇する^{1,2)}。そのため、患者群が最大の血清 PSA 値4-10ng/mLの範囲においてBPHとPSA値がオーバーラップし、血清PSA値4-10

ng/mLの男性における陽性予測値 (前立腺生検による癌の検出率) は約25%であり、結果的に約70%の男性は不必要な生検を受けることになる。さらに、生検数の増加に伴い癌か癌でないか迷う標本も出てくる^{1,2)}。PSAに関するもう一つの問題は、PSA単独では病理学的病期予測ができないことである³⁾。PSAレベルは、悪性度の上昇と逆相関する、すなわち低分化癌になるに従い細胞あたりのPSA産生量が減る^{4,5)}。ためと、BPHの容積に比例してPSAが上昇することから、特に血清PSA値が1桁 (4-10ng/mL) では、必ずしも病期に比例してPSAが上昇するわけではないことによる。上記の様な理由から、癌に対して高い特異性を有する新しい

Table 1 血清 PSA レベル ≤ 4.0 ng/mL の男性における前立腺がんの罹患率

PSA (ng/mL)	No. of men	No. of men with PCa (prevalence rate: %)	high-grade PCa (%)
≤ 0.5	486	32 (6.6)	4/32 (12.5)
0.5 - 1.0	791	80 (10.1)	8/80 (10.0)
1.0 - 2.0	998	170 (17.0)	20/170 (11.8)
2.0 - 3.0	482	115 (23.9)	22/115 (19.1)
3.0 - 4.0	193	52 (26.9)	13/52 (25.0)
	2950	449 (15.2)	67/449 (14.9)

high-grade: Gleason score ≥ 7

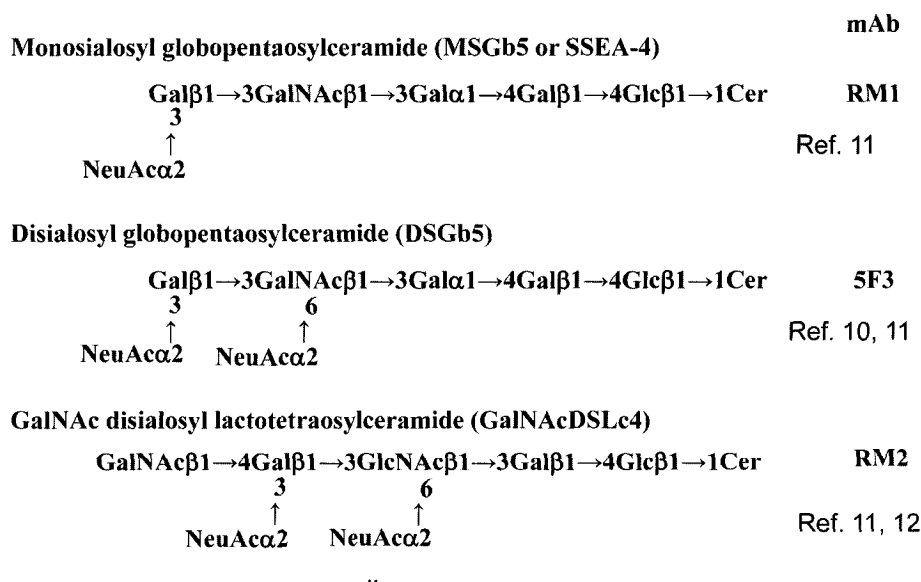


Fig. 1 腎癌から同定したガングリオシドとモノクローナル抗体

マーカーが求められていた。さらに2004年、Thompsonらにより、phase 3 PCPT (Prostate Cancer Prevention Trial) の placebo 群で、PSA のカットオフ値とされた4.0 ng/mL 以下の男性のなんと15%に前立腺がんが検出されたというショッキングな報告がなされ (Table 1)⁶⁾、新しいマーカーに対する渴望にさらに拍車がかかった。

新しいマーカーに求められる役割としては、早期癌と良性疾患を判別できることであり、これにより効率的なスクリーニングが可能となる。さらに、悪性度に比例してレベルが高くなるようなマーカーがあれば、病理学的病期予測や再発予測に役立つと考えられる。以上の条件を満たすか否かは、当該マーカーが個々の前立腺がん全体としての悪性度を定量的に反映しているか否かにかかっている。

EPCA-2

最近注目されている血清マーカーにEPCA-2 (early prostate cancer antigen-2) という nuclear matrix

protein がある⁷⁾。組織免疫染色では、94%の癌においてEPCAの発現が認められ、Gleason pattern や stage との関連が無く、前立腺がん発生早期の事象と考えられている^{8,9)}。EPCAのうちでも、EPCA-2は前立腺がんにて特異的であり、早期前立腺がん検出において、感度94%、特異度92%という驚異的な結果が報告された⁷⁾。今後、多数症例による追試で早期前立腺癌の検出における有効性が確認できれば、臨床的に有用なマーカーになる可能性がある。

糖鎖研究から得られた仮説

ところで、私自身は以前より、糖鎖変化と泌尿器系癌の臨床的意義について研究してきたこともあり、上記のようなPSAの問題点から、東北大学時代に荒井教授より糖鎖の観点から新たなマーカーが見つけれないかと示唆をうけた。考えてみれば臨床的に汎用されている代表的なマーカーとして有名なものに、消化器系癌のCA19-9があり、これは糖鎖 (sialyl Lewis a) であることから、糖鎖が前立腺がんのマーカーになる可能性も考え

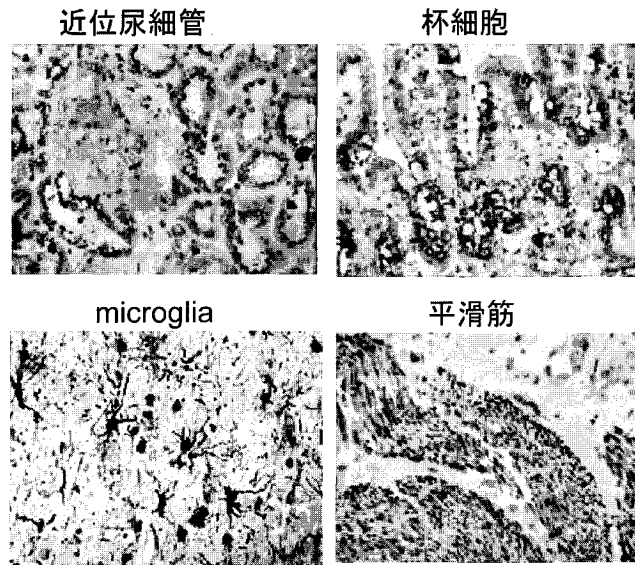


Fig. 2 正常組織における DSGb5-5F3の分布

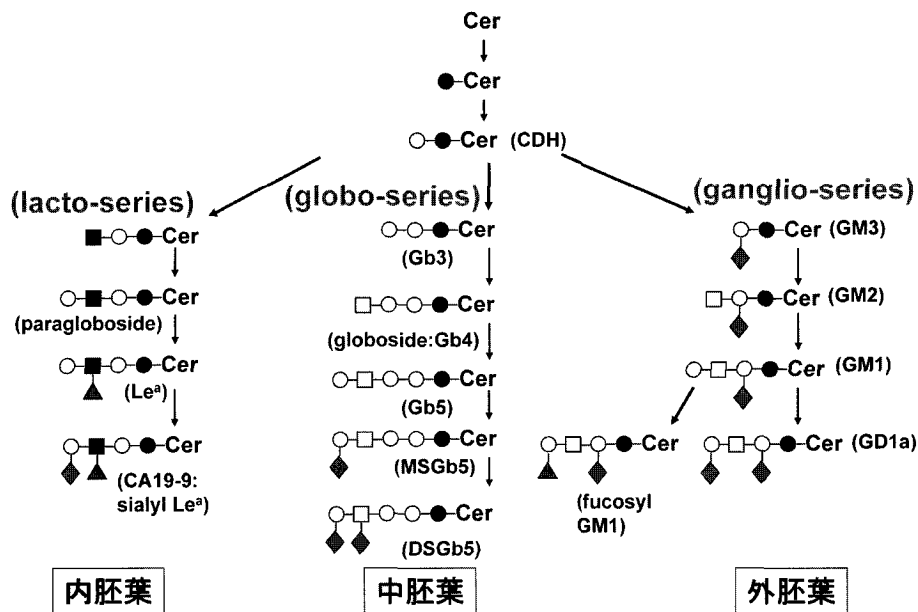


Fig. 3 糖脂質と発生

られる。そこで、これまでの研究で見出してきた糖鎖の中で何か役立ちそうなものはないか検討することにした。腎癌の糖脂質研究の中から見出してきた糖鎖 (Fig. 1) のなかで、モノクローナル抗体 (mAb) 5F3の認識する DSGb5 (DSGb5-5F3)の正常組織における分布を見てみると、近位尿細管、杯細胞、ミクログリア、平滑筋であり (Fig. 2)¹⁰⁾、DSGb5-5F3とはシアル酸の付加位置が異なる DSGb5は、骨格筋、赤血球に分布している。これが意味するところは、DSGb5は中胚葉由来の細胞に発現しているということである。糖脂質の合成経路は、lacto-(neolacto-)、globo-、ganglios-series と大きく3つに分類されるが、以前より ganglios-series は、中

枢神経系に豊富に発現することが知られており、外胚葉との関連が推察され、lacto-series は消化管の腺上皮に分布する CA19-9に代表される様に、内胚葉との関連が考えられる。われわれが行ってきた研究と合わせて、糖脂質研究の中で得られた仮説は、糖脂質合成の3つの経路は3胚葉に対応している可能性があるというものである (Fig. 3)。

糖鎖からマーカーへ

われわれが、腎癌組織から世界で初めて見出した糖鎖は2種類あるが、そのうちの1つである GalNAcDSLc₄

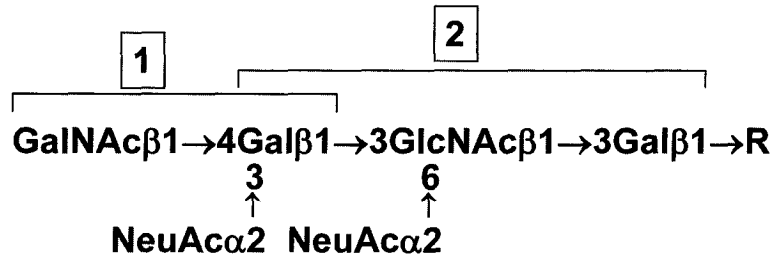


Fig. 4 RM2 抗原 (β 1,4-GalNAc-disialyl-Lc4)

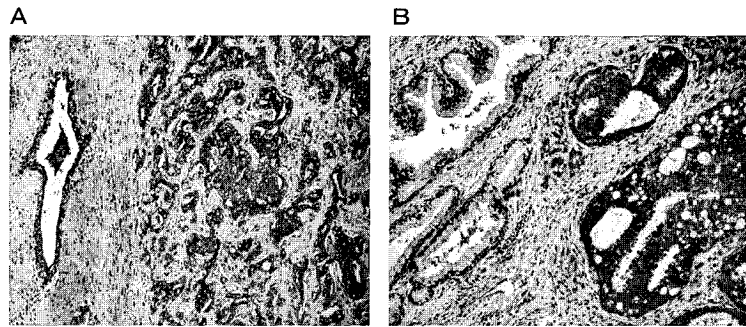


Fig. 5 RM2による組織免疫染色例: 腺癌と良性腺管

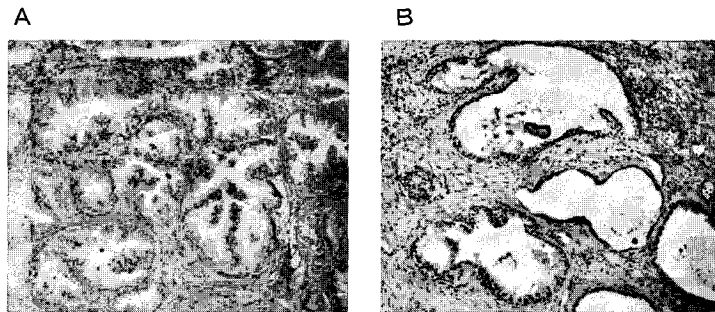


Fig. 6 RM2 による免疫染色例: benign prostatic hyperplasia

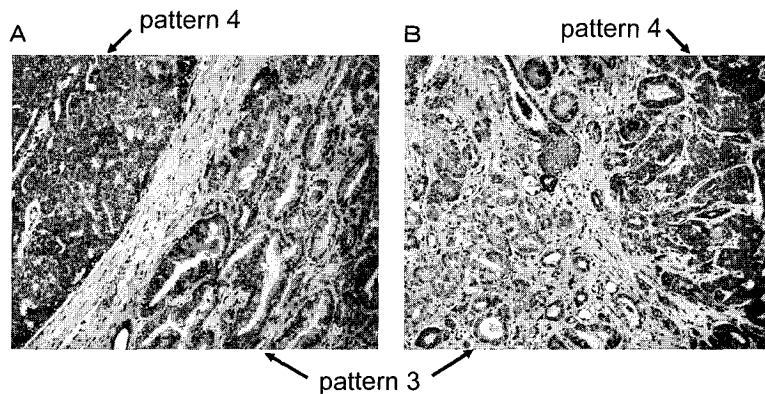


Fig. 7 RM2による免疫染色例: Gleason patterns 3と4の対比

は、最初モノクローナル抗体 (RM2) が作成されてから¹¹⁾, 7年後に構造が判明した糖鎖であるが¹²⁾, 非常に面白いことに基本骨格が ganglio-series と lacto-series のハイブリッド構造をとっている (Fig. 4). 一方, 前

立腺がんは、腺管 (内胚葉) 由来でありながら、悪性度が高くなると神経内分泌学的性質 (外胚葉) を帯びるという2重の性格を有する。先ほどの仮説に基づくと、RM2が認識する糖鎖のハイブリッド構造は、まさに前

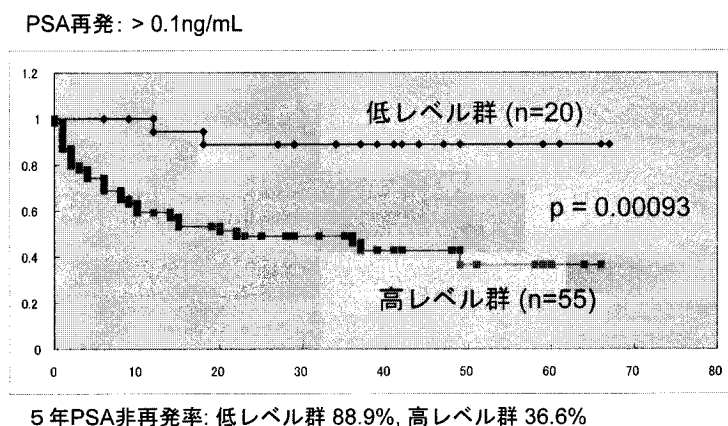


Fig. 8 RM2反応レベル別の前立腺全摘術後のPSA非再発率

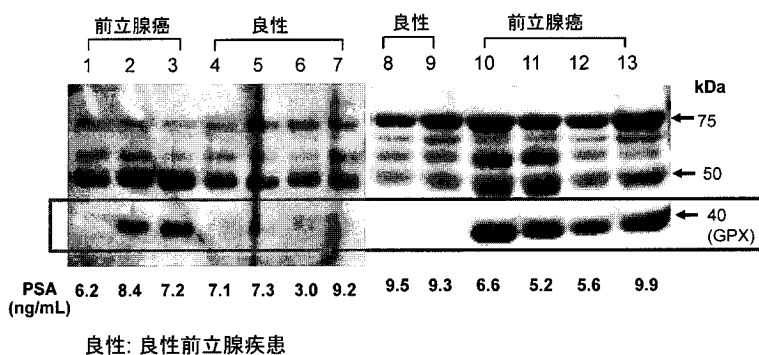


Fig. 9a 患者血清に対するRM2反応例: その1

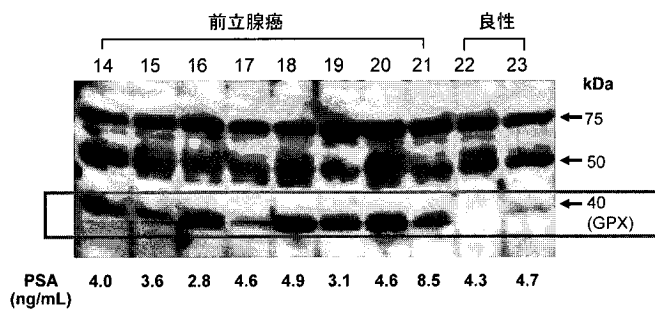


Fig. 9b 患者血清に対するRM2反応例: その2

立腺がんの内胚葉由来 (lacto-series) でありながら、外胚葉由来 (ganglio-series) の性質を帯びるといふ2重の性格に対応しているように考えられた。そこで、前立腺全摘術により得られた前立腺がん標本をモノクローナル抗体RM2により免疫染色してみた。

その結果、前立腺がん細胞のGleason pattern 4は強く染色されるが、良性腺管は染色されないか、弱く染色された (Fig. 5)¹³⁾。間質も弱いながら染色されていた。一方、前立腺肥大症は12例中12例とも腺管ならびに間質ともに染色されなかった (Fig. 6)。組織免疫染色の中でもっとも興味深い知見は、Gleason pattern 4では強いが、pattern 3では弱く、悪性度を反映して染

色されることである (Fig. 7)。そこで、前立腺全摘術を受けた症例のRM2反応レベル別のPSA非再発率をみたところ、RM2反応高レベル群は、低レベル群に比較してPSA非再発率が有意に低かった (Fig. 8)。

次にRM2反応分子が、血清マーカーになりうるか否かを検討した。組織免疫染色で、前立腺がん組織の間質にもRM2反応があるということは、がん細胞から間質にRM2反応分子が放出されて血液中に検出される可能性がある。また、RM2によりがんは染色されるが、BPHは染色されないため、血液中で検出されるとすれば、がんと良性疾患を判別できる可能性がある。そこで、血清に対してモノクローナル抗体RM2によりウエスタ

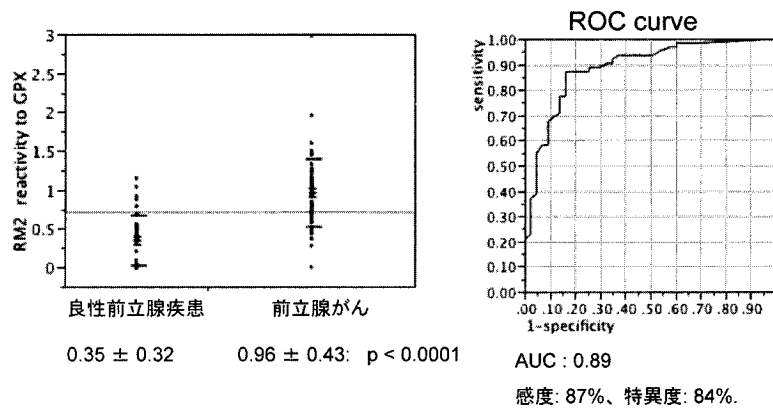


Fig. 10 早期前立腺がん検出における「GPX に対する RM2反応レベル」の有用性

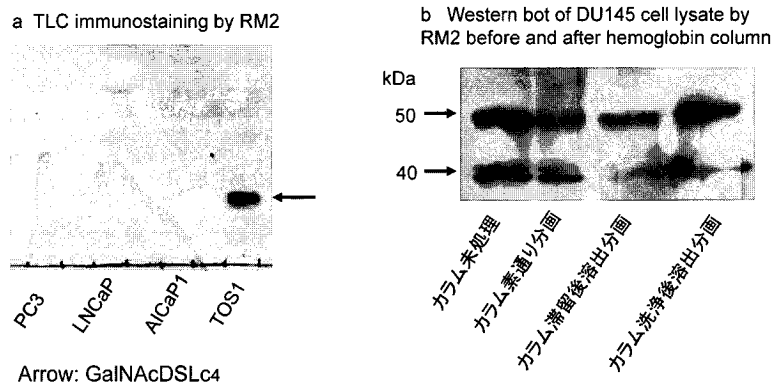


Fig. 11 前立腺がん細胞における RM2反応分子

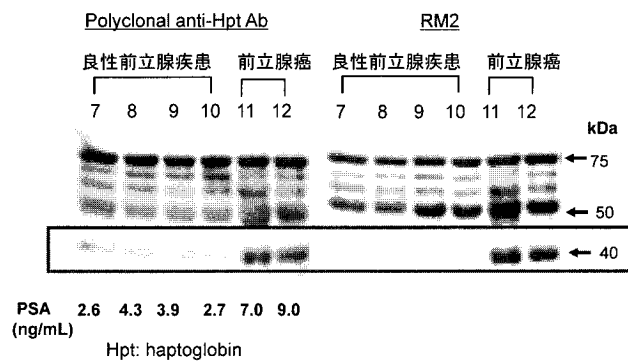


Fig. 12 前立腺がん患者由来の haptoglobin-β鎖に対する RM2の選択的反応性

ンプロットングを施行した。対象症例は、前立腺生検によりがん (n=62) か良性疾患 (n=43) かの診断がなされた PSA < 10 ng/mL の男性である。その結果、前立腺がんと良性前立腺疾患との違いは、約40kDa の糖蛋白 (GPX と仮称) 上の RM2反応の違いとして観察された (Fig. 9 a & b)¹⁴⁾。Scion image を用いて GPX に対する RM2反応をがんと良性とでほぼ同レベルの75kDa に対する反応で標準化すると、がんと良性とで明らかな反応レベルの差が観察された。ROC

(receiver operating characteristic) curve を描くと、AUC (the area under the ROC curve) は、0.89と高く、適切なカットオフ値 (sensitivity - (1-specificity) が最大となる値) を用いると RM2反応の早期前立腺がん検出における感度は87%、特異度は84%と比較的高い値であった (Fig.10)¹⁴⁾。プロテオミクスにより、40kDa のGPX を解析した結果、ハプトグロビンベータ鎖であることが判明した。アジレント社のカラムは血清中に豊富に存在する蛋白を吸着し、微量な蛋白は溶出する。

RM2の反応性は豊富に存在する蛋白分画側にあることがわかり、2次元電気泳動で展開し、RM2反応スポットを切り出し、ゲル消化し、マススペクトロメーターにより分析した。ペプチドシーケンスをデータベースと照らし合わせた結果、全てのペプチドシーケンスはハプトグロビンベータ鎖由来であることがわかった。

そこで、前立腺がん細胞におけるRM2反応分子は何であるかを検討したところ、3種類の細胞株においてはRM2が反応するガングリオシド (GalNAcDSLc4) の発現は観察されなかった (Fig.11a)¹⁴⁾。一方、DU145の cell lysate をハプトグロビンに結合能を有する hemoglobin column にインキュベートしたところ、RM2が反応するバンドはほぼ吸着されることから、がん細胞内のRM2反応物質はハプトグロビンベータ鎖と考えられた (Fig.11b)。50kDa に主なバンドがみられるが、おそらくこれはハプトグロビンベータ鎖とアルファ鎖の complex と思われる。

それでは、RM2は、市販のハプトグロビンに対する抗体と比べてどう違うのか検討したところ、RM2は市販のものに比べて前立腺がん患者由来のハプトグロビンベータ鎖に対する選択性がより高いことがわかった (Fig.12)。さらに、RM2とは異なり市販の抗体は組織免疫染色においても悪性度を反映していなかった (Fig.は示さず)。

つぎに、血清レベルを調べた癌患者64例中前立腺全摘術を受けた24例について、ハプトグロビンベータ鎖に対するRM2反応レベル別のPSA非再発率を調べた。RM2反応レベルが平均値 (0.96) より高いか低いかで2群に分けたところ、平均値より高い群 (n=13) は、低い群 (n=11) に比較して、有意差に近くPSA非再発率が低かった (2-y PSA failure free rate: 44% vs. 92%, p=0.0527) (Fig.は示さず)。このことから、RM2が反応するハプトグロビンベータ鎖は、がんか良性かを見分ける他に、治療後の再発予測にも役立つ可能性が示唆された。

現在、血清におけるハプトグロビンベータ鎖の簡易アッセイシステムの構築、その前立腺がん細胞における生物学的役割、他の泌尿器系がんにおけるマーカーとしての可能性、RI標識RM2を用いた画像診断の可能性について研究中である。

文 献

- 1) Gretzer MB, Partin AW. PSA markers in prostate cancer detection. *Urol Clin North Am* 30: 677-686, 2003.
- 2) Canto EI, Shariat SF, Slawin KM. Biochemical staging of prostate cancer. *Urol Clin North Am* 30: 263-277, 2003.
- 3) Carter HB, Partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia (PA): Saunders,; pp 3209-3226, 2002.
- 4) Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CYF, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG: Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A novel prostate cancer marker. *Urology* 49: 857-862, 1997.
- 5) Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Saeid HS, Young CYF, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG: Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastasis. *Urology* 53: 939-944, 1999.
- 6) Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Clotman CA. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004; 350: 2239-46.
- 7) Lehman ES, Cannon GW, Trock BJ, Sokoll LJ, Chan DW, Mangold L, Partin AW, Getzenberg RH. EPCA-2: A highly specific serum marker for prostate cancer. *Urology* 2007; 69: 714-20.
- 8) Dhir R, Vietmeier B, Arlotti J, Acquafondata M, Landsittel D, Masterson R, Getzenberg RH: Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. *J Urol* 171: 1419-1423, 2004.
- 9) Uetsugu H, Tsunemori H, Taoka R, Haba R, Ishikawa M, Kakehi Y: Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesion in the prostate. *J Urol* 174: 514-518, 2005.
- 10) Ito A, Saito S, Masuko T, Oh-eda M, Matsuura T, Satoh M, Moosavi Nejad F, Enomoto T, Orikasa S, and Hakomori S: Monoclonal antibody (5F3) defining renal cell carcinoma-associated antigen disialosylglobopentaosylceramide (V3NeuAcIV6NeuAcGb5), and distribution pattern of the antigen in tumor and normal tissues. *Glycoconj J* 18: 475-485, 2001.
- 11) Saito S, Lavery SB, Salyan MEK, Goldberg RI, and Hakomori S: Common tetrasaccharide epitope NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3 (NeuAc α 2 \rightarrow 6) GalNAc, presented by different carrier glycosylceramide or O-linked peptides, is recognized by different

- antibodies and ligands having distinct specificities. *J Biol Chem* 269: 5644-5652, 1994.
- 12) Ito A, Levery SB, Saito S, Satoh M, Hakomori S. A novel ganglioside isolated from renal cell carcinoma. *J Biol Chem* 276: 16695-16703, 2001.
- 13) Saito S, Egawa S, Endoh M, Ueno S, Ito A, Numahata K, Satoh M, Kuwao S, Baba S, Hakomori S, Arai Y. RM2 antigen (β 1,4-GalNAc-disialyl-Lc₄) as a new marker for prostate cancer. *Int J Cancer* 115: 105-113, 2005.
- 14) Saito S, Murayama Y, Pan Y, Taima T, Fujimura T, Murayama K, Sadilek M, Egawa S, Ueno S, Ito A, Ishidoya S, Nakagawa H, Kato M, Satoh M, Endoh M, Arai Y: Haptoglobin β chain defined by monoclonal antibody RM2 as a novel serum marker for prostate cancer. *Int J Cancer* 123: 633-640, 2008.