Flow Cytometry による前立腺癌の核 DNA 量解析

—前立腺癌における DNA Heterogeneity の検討—

福岡大学筑紫病院泌尿器科 (主任: 有吉朝美教授)

道 永 成 有 吉 朝 美

原三信病院臨床病理部 (部長: 金城 満)

金 城 満

同 泌尿器科 (部長: 鷺山和幸)

鷺 山 和 幸

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF THE DNA CONTENT OF THE PROSTATE CANCER

—Study on the Tumor Heterogeneity in Prostate Cancer—

Shigeru Michinaga and Asami Ariyoshi

Department of Urology, Fukuoka University, Chikushi Hospital

(Director: Prof. A. Ariyoshi)

Mitsuru Kinjo

Division of Pathology, Harasanshin General Hospital

(Chief: K. Kinjo)

Kazuyuki Sagiyama

Division of Urology, Harasanshin General Hospital

(Chief: K. Sagiyama)

(Purpose) Clinical significance of DNA ploidy pattern and its DNA heterogeneity is examined in prostate cancer.

(Methods) Fresh needle biopsy specimens were analyzed with flow cytometry and were compared with histopathological findings in 42 patients.

(Results) Seven patients had stage B (1 case of B1, 6 cases of B2), 14 had stage C and 21 had stage D disease respectively. Histopathologically, 18 of the cases were well, 12 were moderately and 12 were poorly differentiated adenocarcinoma. Diploid was observed in 20, aneuploid in 22. Though 22 cases showed no DNA heterogeneity, 14 had type A heterogeneity with aneuploid in association with diploid pattern, and 6 cases had type B heterogeneity in which multiple aneuploid patterns with different D.I. values were observed. The heterogeneity was observed in 28% of well, 58% of moderately and 67% of poorly differentiated adenocarcinoma, respectively, and also in 14% of stage B, 50% of stage C and 57% of stage D patients, respectively.

(Conclusion) We conclude that DNA heterogeneity in prostate cancer is more frequently seen in poorer differentiated ones on histologic grade and in more advanced ones on clinical stage.

Key words: flow cytometry, heterogeneity, prostate cancer

要旨: (目的) 前立腺癌における DNA ploidy pattern と病理組織学的所見・臨床病期および DNA heterogeneity との関係について検討した。

(方法) 前立腺癌42例に対して針生検を施行しフローサイトメトリーで DNA 量解析を行った。

(結果) 臨床病期は Stage B (B 1 が 1 例, B 2 が 6 例) が 7 例, Stage C が 14 例, Stage D が 21 例で, 病理組織学的には高分化腺癌が 18 例, 中分化腺癌が 12 例, 低分化腺癌が 12 例であった。DNA ploidy

pattern では20例が diploid で、22例が aneuploid であった。42例中22例は DNA ploidy pattern に heterogeneity を認めず、14例に1種類の aneuploid と diploid が混在した Type A heterogeneity を認め、残り6例は異なる D.I.値の aneuploid が複数混在した Type B heterogeneity を示していた。分化度別には高分化腺癌の28%、中分化腺癌の58%、低分化腺癌の67%に DNA heterogeneity を認めた。また臨床病期別には Stage B の14%、Stage C の50%、Stage D の57%に DNA heterogeneity に認めた。

(結論) DNA heterogeneity を示す前立腺癌は、分化度の低い癌と臨床病期が進行した例に多いと思われる。

キーワード：フローサイトメトリー、前立腺癌、核 DNA 量の多様性

緒 言

前立腺癌の分化度や病期と DNA ploidy との関連性については、低分化癌や進行癌において DNA aneuploidy の頻度が高いことが言われているが¹⁾、その頻度については標本の固定法の違いやサンプリングの違いなどからかなりのずれが見られる²⁾。

消化管の腫瘍での検討では、このような現象が実は regional あるいは clonal DNA heterogeneity に基づくのではないかとの報告³⁾が見られる。我々は前立腺癌においてこの regional あるいは clonal DNA heterogeneity についての検討を行った。

対象と方法

1. 対象

福岡大学筑紫病院、福岡大学病院および、原三信病院で針生検組織診により前立腺癌と診断された42症例を対象とした。患者の年齢は58歳～85歳、平均71.2歳であった。

2. 方法

標本採取の方法は、経直腸的に超音波ガイド下に Biopsy-Gun (Bard 社, U.S.A.) を用い18G 針で生検した。採取部位は基本的に前立腺の尖部と基部の左右4箇所、各2本ずつ合計8本採取した。生検後1本は通常の組織学的検索を行って癌の存在を確認し、他の1例は、DNA 量の測定に用いた。超音波または直腸診で癌が疑われる所見があるときはその部を追加採取した。

DNA 量測定用の標本は、採取後直ちに -80°C に凍結保存し、測定時は Sasaki らの方法⁴⁾に準じて処理した。すなわち、検体を眼科用鉗で細切し、それに0.4% Triton X-100と0.2% RNase を等量加えピペッティングし、それを50 μm ナイロンメッシュで濾過し、細胞浮遊液に等量の100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の propidium iodide を加え染色し、約10分間静置した後 FACSsort (Becton-Dickinson, U.S.A.) を使用して $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個の細胞核を測定し、histogram を作成した。

表1 DNA heterogeneity の定義

藤巻ら：(1992)
type A：同一病変内に diploidy と aneuploidy の部分が併存するもの
type B：DNA index の異なる複数の aneuploid stem line の混在するもの
伊佐ら：(1993)
type D：Diploid
type A1：1種類の aneuploid、または aneuploid+diploid
type A2：2種類以上の aneuploid
Sasaki K. et al：(1995)
type A：腫瘍が1個の aneuploid clone からなるもの
type B：腫瘍が2個の異なる aneuploid clones からなるもの
type C：DNA histogram 上で鋸歯状、台形状隆起となり、先鋭なピークを形成せず、DI が判然としな
いもの
type D：type A と type C、type B と type C が見られ、混合型と考えられるもの

DNA ploidy pattern の評価は単一の G0/G1 peak を持つものを diploid とし、diploid peak 以外に明らかな異常 peak を有するものと、G2/M の peak が G0/G1 peak の10%以上を有するものを aneuploid とした。

DNA heterogeneity の定義は、報告者によりまちまちで一定のものはまだないようであるが、表1に示したような分類方法が報告されている。その中で、われわれは比較的分類が単純で、わかりやすい藤巻ら⁵⁾の分類に従って検討を進めた。

われわれの症例における代表的な DNA heterogeneity の histogram を図1に示す。

臨床病期分類、病理組織学的分類については前立腺癌取扱規程⁶⁾に準じた。

検定は χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

図1 DNA heterogeneity の典型例を示す。経直腸的前立腺生検を4カ所で行い DNA ploidy の測定を施行した。上段はdiploid とaneuploid の部分が併存する type A、下段はDI 値が1.5と1.8の異なる複数の aneuploid stem line が混在する type B と判定した。

表2 DNA ploidy と組織学的分化度 (n=42)

	wel	mod	por	Total
Diploid	12	4	4	20
Aneuploid	6	8	8	22
	18	12	12	42

表3 DNA heterogeneity と組織学的分化度 (n=42)

	wel	mod	por	Total
non-Dh	13	5	4	22
A	5	3	6	14
B	0	4	2	6
	18	12	12	42

p<0.05

結 果

DNA ploidy pattern と組織学的分化度との関係 (表 2)

42例中 diploid が20例 (47.6%), aneuploid が22例 (52.4%)であった。組織学的分化度別にみると、高分化腺癌 (wel) の18例では diploid が12例 (60%) と aneuploid の6例 (40%) よりも多く認められた。しかし、中分化腺癌 (mod) の12例では diploid の4例 (33.3%) に対し aneuploid が8例 (66.7%) と多く、低分化腺癌 (por) の12例でも diploid の4例 (33.3%) に対し aneuploid が8例 (66.7%) を占めており、wel より mod, por の方が aneuploid が多い傾向が認められた。

DNA heterogeneity と組織学的分化度との関係 (表 3)

42例中 non-DNA heterogeneity (non-Dh) 22例

(52.4%), DNA heterogeneity (Dh) 20例 (47.6%) でほぼ同数であった。

組織学的分化度との関係を見ると、wel の18例では non-Dh の13例 (72.2%) に対し、Dh は5例 (27.8%), mod の12例は non-Dh 5例 (41.7%) と Dh 7例 (58.3%) で、por の12例では non-Dh の4例 (33.3%) に対し、Dh は8例 (66.7%) と増加し、分化度が低くなるに従って heterogeneity の症例の増加を有意 (p<0.05) に認めた。

DNA heterogeneity と臨床病期との関係 (表 4)

Stage B の7例 (B1が1例, B2が6例)では non-Dh が6例 (85.7%), Dh が1例 (14.3%), Stage C の14例では non-Dh が7例 (50%), Dh が7例 (50%) であり、Stage D の21例では non-Dh が9例 (42.9%) に対

表4 DNA heterogeneity と臨床病期 (n=42)

	B	C	D	Total
non-Dh	6	7	9	22
A	1	7	6	14
B	0	0	6	6
	7	14	21	42

p<0.05

し Dh が12例 (57.1%) となっており、病期が進行するに従い heterogeneity の症例の増加を有意 ($p<0.05$) に認め、特に Type B heterogeneity は Stage D のみに見られた。

考 察

前立腺癌の組織学的分化度と臨床病期との間には相関があるとの報告は散見される。しかし、同じ組織学的分化度と臨床病期の前立腺癌であっても病期の進行スピードに違いが見られることも多く、より適切な予後診断法の出現が強く望まれるところである。

フローサイトメトリーによる腫瘍の核 DNA 量の測定は、かなり客観的な情報として癌の予後推定に役立つのではないかと考えられる。

Nativ ら⁷⁾は、Stage C の前立腺癌についての研究で、組織学的分化度と予後との相関は弱い、DNA ploidy pattern と予後との間には良好な相関関係を認めている。また Lundberg ら⁸⁾は有意差はないものの低分化腺癌に aneuploid tumor が多いことを報告している。

今回のわれわれの検討でも、高分化腺癌では33%にしか認められなかった aneuploid tumor を、中・低分化腺癌では67%もの高率に認めている。

一方、腫瘍の多様性を示すとも考えられる DNA heterogeneity については、O'Malley ら⁹⁾は前立腺癌9例中5例 (56%) に存在を認めており、われわれの47.6% (42例中20例) とほぼ同様の成績と考えてよいであろう。他の腫瘍について DNA heterogeneity をみると、永森ら¹⁰⁾は腎細胞癌の63% (30例中19例) に認めており、消化器腫瘍では胃癌⁵⁾の67.3%、大腸癌¹¹⁾の78%に heterogeneity が認められたと報告されている。腫瘍により heterogeneity の出現に若干の相違があるようである。

Heterogeneity のタイプ別検討では、diploid と aneuploid の混在したタイプ A が14例で70%を占めており、複数の aneuploid stem line の混在したタイプ B は6例30%であった。同様のパターン分類を胃癌に

ついて行った藤巻ら⁵⁾によれば、タイプ A と B の割合はそれぞれ40%、60%であったが、タイプ B の方がより進行した症例に多く認められたことを報告している。自験例でも、臨床病期の進行に伴って heterogeneity が存在する症例が増加し、とくに複数の clone を持つタイプ B は、転移を伴う stage D の前立腺癌のみに認められた。

また、藤巻ら⁵⁾は aneuploid clone は diploid clone に比べ遺伝的に不安定である可能性を指摘している。一方、永森ら⁹⁾によれば、腎癌細胞は diploid で発癌するが突然変異により aneuploid clone が生じ、それを繰り返しながら進展するものと考えられると述べている。前立腺癌においても遠隔転移を伴った進行例にタイプ B heterogeneity の症例が多く認められたことから、腎癌の場合と同様の現象が起こっていることが推測される。

前立腺癌における核 DNA 量解析の重要性は、予後に関連性のある DNA ploidy pattern を把握できることだけでなく、治療に対して異なった生物学的特性を有する複数の cell clone の存在をもしりうることにある。われわれはすでに LH-RH agonist による内分泌治療によって、前立腺癌の aneuploid peak の低下や消失が起ることを確認している¹²⁾。これは、直接的には内分泌治療が前立腺癌に有効であることを示す一つの有力な所見と考えられるが、それと同時に、生き残った clone が内分泌療法に抵抗性である可能性や、新たに抵抗性を獲得する現象などにも関連しているのではないかと考えている。このような意味から、前立腺癌における clonal heterogeneity は、DNA ploidy pattern の変化と併せて判断することにより、従来困難であった予後判定の一助となる可能性がある。

結 語

前立腺癌症例において、針生検組織を用いてフローサイトメトリーで核 DNA 量を解析し、DNA ploidy pattern と病理組織学的所見および臨床病期との関係また前立腺癌の DNA heterogeneity についても検討を行った。

1. 前立腺癌42例中20例 (47.6%) は diploid で、aneuploid pattern を示したものは22例 (52.4%) であった。

2. DNA heterogeneity を示すものは、42例中20例 (47.6%) に認め、non-Dh を22例 (52.4%) に認めた。低分化になるほど DNA heterogeneity を示す症例が増加した。

3. 臨床病期からみると、DNA heterogeneity は Stage B の14.3%, Stage C の50%, Stage D の57.1% に認められ進行例に高頻度であった。またより高度の type B heterogeneity は Stage D 症例にのみ認められ、転移との関係が示唆された。

本論文の要旨は第5回日本サイトメトリー学会にて発表した。

文 献

- 1) Neill, W.A., Norval, M. and Habib, F.K.: Nuclear DNA analysis of prostate tissues: Correlation with stage and grade of tumor. *Urol. Int.*, **44**, 141—146, 1989.
- 2) 道永 成, 辻 祐治, 有吉朝美, 金城 満, 鷺山和幸, 濱野克彦: 前立腺癌の flow cytometric DNA analysis 際してのパラフィン包埋標本と新鮮標本との比較. *日泌尿会誌*, **86**, 169, 1995.
- 3) Sasaki, K., Kurose, A., Uesugi, N. and Sugai, T.: Intertumoral regional heterogeneity of DNA ploidy patterns in colorectal carcinomas. *Analytical Cell Pathol.*, in press 1995.
- 4) Sasaki, K., Hashimoto, T., Kawachino, K. and Takahashi, M.: Intertumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer*, **62**, 2569—2575, 1988.
- 5) 藤巻英二, 佐々木功典, 中野 修, 田沢秀樹, 千葉茂樹, 山敷宏正, 藤野靖久, 折居正之, 佐藤俊一, 菅井 有: フローサイトメトリーを用いた胃癌の DNA ploidy heterogeneity の検討. *Cytometry Res.*, **2**, 150—156, 1992.
- 6) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編: 前立腺癌取り扱い規約, 第2版. 金原出版, 1992.
- 7) Nativ, O., Winkler, H.Z., Rez, Y., Therneau, T. M., Farrow, G.M., Myers, R.P., Zincke, H. and Liber, M.M.: Stage C prostate adenocarcinoma: Flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin. Proc.*, **64**, 911—919, 1989.
- 8) Lundberg, S., Carstensen, J. and Rundquist, I.: DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res.*, **47**, 1973—1977, 1987.
- 9) O'Malley, F.P., Grignon, D.J., Keeney, M., Kerkvliet, N. and McLean, C.: DNA heterogeneity in prostatic adenocarcinoma. *Cancer*, **71**, 2797—2802, 1993.
- 10) 永森 聡: Flow cytometry による腎細胞癌の Heterogeneity の検討. *日泌尿会誌*, **81**, 593—600, 1990.
- 11) 菅井 有, 佐々木功典, 高山和夫, 小野貞英, 鹿内俊樹, 須藤隆之, 藤巻秀二, 折居正之, 吉田 博, 岡本和美: 大腸癌における DNA ploidy heterogeneity の検討. *Cytometry Res.*, **1**, 147—152, 1991.
- 12) 道永 成: 前立腺癌に対する内分泌療法のプロセスサイトメトリーによる評価の試み. *Cytometry Res.*, in press 1995.

(1995年9月11日受付, 1996年2月26日受理)