尿路性器悪性腫瘍例における末梢血中ケラチン19 mRNA の検出

東北大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 折笠精一教授)

金田 隆志 星 宣次 毛 厚平 高橋とし子
鈴木 謙一 佐藤 信 折笠 精一

DETECTION OF UROGENITAL MALIGNANT CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD BY NESTED RT-PCR USING KERATIN 19 mRNA

Takashi Kaneda, Senji Hoshi, Hauping Mao, Toshiko Takahashi,
Kenichi Suzuki, Makoto Sato and Seiichi Orikasa
Department of Urology, Tohoku University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi Orikasa)

(Introduction and Objectives) It is reported that cytokeratin 19 (CK-19) mRNA is not expressed in the peripheral blood cells of the healthy subjects (Am. J. Pathol. 142: 1111. 1993). Detection of DNA fragments of CK-19 in the peripheral blood suggests the existence of epithelial malignant tumor cells. In this study, we detected CK-19 genes in peripheral blood of patients with urogenital malignancy, and thus clarified the possibility of understanding tumor expansion.

(Methods) Mononuclear cells were separated from the peripheral blood of 39 patients with urogenital tumor and 9 controls. Total cellular RNA was extracted according to the method described elsewhere. The CK-19 gene expression was investigated using nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) and confirmed by Southern Blotting. These results were compared to the clinical stages.

(Results) CK-19 mRNA was not detected in any of 9 controls. CK-19 mRNA was detected in 3 out of the 10 bladder cancer cases. Two had metastases and 1 had muscle invasion without metastasis. One of 6 urothelial cancer case of the upper urinary tract showed positive amplification, and had liver, bone and lymphnode metastases. After one course of chemotherapy, mRNA became negative. In prostate cancer cases, three among 7 were positive and all 3 cases had distant metastases. In renal, testicular and penile cancer cases, the positive ratio were 3/6, 1/8 and 2/2, respectively. All positive cases of renal and testicular cancer had distant metastases, but one case of penile cancer had no metastasis.

(Conclusion) The detection of CK-19 mRNA in the circulating blood by nested RT-PCR makes it possible to detect micrometastasis. to evaluate therapeutic effects and to predict the prognosis.

Key words: keratin 19 mRNA, nested RT-PCR, urogenital malignancy

要旨: (目的) 健常者の末梢血液中にはケラチン19は存在せず, もし血液中から検出されれば上皮性癌細胞が存在しているものと考えられる。そこで nested RT-PCR 法を用いて, 種々の尿路性器悪性腫瘍患者の末梢血液からケラチン19 mRNA の発現の有無を検討し, 転移との関連を検討した。

(方法) ヒト尿路性器癌培養細胞12種類, 泌尿生殖器癌患者39例, 健常者9例を対象とし, 患者および健常者の末梢静脈から血液6mlを採血し, Ficollを用いてリンパ球層を回収した。そして培養細胞, リンパ球層沈渣から total RNA を抽出し, ケラチン19のプライマーを用いて nested RT-PCR を行い, サザンブロッティングで確認した。

(結果) 用いた培養細胞は全て陽性で, 検出率は健常者リンパ球 1×10^7 個に対して腎癌細胞 TOS-1は

1 個の混入でもケラチン19 mRNA が検出され、膀胱癌細胞 KK47では 1×10^6 個の混入ではじめてケラチン19 mRNA が検出された。健常者 9 例の末梢血は全例陰性であった。尿路性器悪性腫瘍患者の末梢血では転移のみられない症例よりも、転移を有する症例のほうが nested RT-PCR の陽性率が高く、またリンパ節のみの転移よりも他の遠隔転移を有する症例のほうが陽性率が高かった。また、短期間の観察であるが、転移を有する場合でも nested RT-PCR 陽性のほうが予後不良であった。疾患別では、精巣腫瘍は検出されにくく陰茎癌は検出されやすい印象であった。

(結論) RT-PCR 法を用いたケラチン19 mRNA の末梢血よりの検出法は尿路性器腫瘍にも利用できる。

キーワード：ケラチン19 mRNA, nested RT-PCR, 尿路性器癌

緒 言

悪性腫瘍の血行性転移は、腫瘍細胞が血液中を循環することから始まると考えられるため、血液中から腫瘍細胞が検出されれば、微小転移を含めた転移の存在やこれから転移が起こりえる可能性が示唆される。しかし顕微鏡的に血液中の腫瘍細胞を正確に判断することは、種々の紛らわしい細胞の存在や、観察者の主観にもとづく検査法のため困難を伴う。

サイトケラチンはおもに上皮細胞に存在する中間径フィラメントで、現在20種類の subunit にわけられている^{1)~4)}。ケラチン19 mRNA は正常末梢血液の単核球には発現しておらず⁴⁾⁵⁾、このため血液中からケラチン19 mRNA が検出されれば、血液中に上皮性癌細胞が存在しているものと考えられる。

最近、mRNA の発現の有無を認べる方法として、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法がよくつかわれており^{4)6)~11)}、泌尿器科領域では前立腺癌の腫瘍マーカーである PSA を用いた報告がみられる^{6)~9)}。RT-PCR 法は免疫染色よりも検出感度が高いといわれており、また観察者の主観にとらわれることもなく、以前の種々の検査法と比較して有意義な方法と考えられる。今回、当院泌尿器科に入院あるいは外来通院している患者を対象にして、さらに高感度 nested RT-PCR 法を用いて血液中のケラチン19 mRNA の発現の有無を調査し、転移の有無と比較してその有用性を検討した。

対象および方法

1) 癌培養細胞、泌尿性生殖器癌患者、健常者

ヒト腎癌 TOS-1, TOS2, ACHN, SMKT-R-3, SMKT-R-4, ヒト前立腺癌 LNCaP, DU145, PC-3, ヒト膀胱癌 YTS-1, KK47, ヒト精巣腫瘍 NEC8, NEC14の12種類の培養細胞をもちいた。各々の細胞は10%FCS 加 RPMI で数日間培養し、0.02%EDTA, 7.5%アクチナーゼで剥離後 5×10^6 個を実験に用い

た。さらに TOS-1, KK47の 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 個に対しボランティアのリンパ球 10^7 個を各々混ぜ、ケラチン19 mRNA の検出感度を検討した。

当科入院中または外来通院中の患者39例に対し、各々末梢静脈から6ml を採血した。患者のうちわけは、膀胱癌10例、腎盂尿管腫瘍3例、膀胱腎盂尿管腫瘍3例、前立腺癌7例、腎癌6例、精巣腫瘍8例、陰茎癌2例であった。

対照として当教室のボランティア9名(男6名、女3名、24~45歳、平均35.1歳)の末梢静脈から各々6ml を採血し実験に用いた。

2) RNA 抽出

ボランティアおよび患者の血液は、採血後ただちに EDTA 加試験管に移し振倒混和後 icebox 中で保存し、1 時間以内に次の処理を行った。50ml 遠心管に Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 10ml をいれ、その上に等量の cold PBS で希釈した血液を重ねし、 4°C , 200g で30分間遠心後リンパ球層を回収した。これを新たに50ml 遠心管に移し cold PBS で約50ml に希釈後、 4°C , 2,000g で30分間遠心し、上清をすて沈渣を回収した。

血液から回収したリンパ球層の沈渣および培養細胞の沈渣は、ISOGEN-LS (ニッポンジーン, Japan) で溶解し、そのプロトコールに従い total RNA を抽出した。

3) PCR Primers, RT-PCR, and Southern Blotting

ケラチン19の primers と probe, G3PDH の primers を図1に示す。Primers A, B, C, D は, Datta ら³⁾の方法に、primer E, F, probe は Traweck ら⁴⁾の方法にしたがい、G3PDH の primers は TAKARA より購入した。

a) Reverse Transcription: $5 \sim 10 \mu\text{g}$ の total RNA に oligo-(dT) 12-18 (GIBCO, USA) $0.5 \mu\text{g}$, さらに水を加え $14.5 \mu\text{l}$ とし 70°C , 10分, そのあと on

ice 5分。これに5×First Strand Buffer (GIBCO, USA) 5 μ l, RNase inhibitor (TOYOBO, Japan) 65U, 0.1MDTT (GIBCO, USA) 2.5 μ l, dNTPs (Pharmacia, Japan) 10nM, Reverse Transcriptase (GIBCO, USA) 200U を加え合計25 μ l とし, 37°C, 60分; 70°C, 10分; 4°C forever でcDNA を作製し, -80°C, 10分以上凍結した。

b) First-round PCR: total RNA 2 μ g 相当量のcDNA に10×PCR buffer (TAKARA, Japan) 5 μ l, dNTPs (Pharmacia, Japan) 40nM, primer A と B (図1) を各々50 μ M, Taq DNA Polymerase (TAKARA, Japan) 2.5U を加え, さらに RNase free の水を加えて合計50 μ l とし, DNA Thermal Cycler 480 (PERKIN ELMER, Japan) を用いて denaturation 94°C, 50秒; annealing と polymerase extension を72°C, 2分30秒で35cycle 行い, 最後に72°C, 10分, 4°C forever 後, -80°C, 10分以上凍結した。

c) Second round PCR: first round PCR 産物の1 μ l に10×PCR buffer (TAKARA, Japan) 5 μ l, dNTPs (Pharmacia, Japan) 40nM, primer C と D (図1) を各々50 μ M, Taq DNA Polymerase (TAKARA, Japan) 2.5U を加え, さらに水を加えて合計50 μ l とし, DNA Thermal Cycler 480 (PERKIN ELMER, Japan) を用いて denaturation 94°C, 50秒; annealing と polymerase extension を72°C, 2分で35cycle 行い, 最後に72°C, 10分, 4°C forever とした。

d) Primer E & F による PCR: total RNA 2 μ g 相当量のcDNA に10×PCR buffer (TAKARA, Japan) 10 μ l, dNTPs (Pharmacia, Japan) 40nM, primer E と F (図1) を各々50 μ M, Taq DNA Polymerase (TAKARA, Japan) 2.5U を加え, さらに水を加えて合計100 μ l とし, DNA Thermal Cycler 480 (PERKIN ELMER, Japan) を用いて denaturation 94°C, 5分後, denaturation 94°C, 1分: annealing 55°C, 1分: polymerase extension 72°C, 2分で40cycle 行い, 最後に72°C, 10分, 4°C forever とした。

e) G3PDH の PCR: total RNA 1 μ g 相当量のcDNA に10×PCR buffer (TAKARA, Japan) 5 μ l, dNTPs (Pharmacia, Japan) 40nM, primer G と H (図1) を各々50 μ M, Taq DNA Polymerase (TAKARA, Japan) 2.5U を加え, さらに水を加えて合計50 μ l とし, DNA Thermal Cycler 480 (PERKIN ELMER, Japan) を用いて初めに denaturation 94°C, 5分行い, denaturation 94°C, 1分, annealing 55°C,

図1 Keratin 19 Primers, Probe and G3PDH Primers Sequence

a) Primers A, B, C, D は nested RT-PCR に用いた primers で, A, B は outer primers, C, D は inner primers (Datta ら³⁾から引用)。Primers E, F と probe は Ttaweeck ら⁴⁾から引用した。b) G3PDH の primers は TAKARA より購入した。

a) Keratin 19 and Probe Sequence

Primer A : 5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGC-3'
Primer B : 5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC-3'
Primer C : 5'-TCCCGCGACTACAGCCACTACTACAGACC-3'
Primer D : 5'-CGCGACTTGATGTCCATGAGCCGCTGGTAC-3'
Primer E : 5'-GCGGGACAAGATTCTTGGTG-3'
Primer F : 5'-CTTCAGGCCTTCGATCTGCAT-3'
Probe : 5'-CTTCCGAACCAAGTTTGAGAC-3'

b) G3PDH Primers

Primer G : 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT-3'
Primer H : 5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

1分, polymerase extension 72°C, 2分で40cycle 後, さらに72°C, 10分, 4°C forever とした。

f) 電気泳動: 0.017%ethidium bromide 入りの 1.67%agarose gels 上で, 10 μ l の PCR 産物を分画し写真撮影した。

g) サザンブロッティング: 分画した agarose gels をアルカリ性バッファー (NaOH 0.2M, NaCl 0.6M) で45分間, そのあと中和バッファー (Tris-HCl 0.2M, NaCl 0.6M) で45分間処理した後 DNA の分画を nylon membrane に転写し, 紫外線照射により固定した。その後 DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Boehringer) を用いて probe (図1) に DIG-dUTP/dATP を tailing させ, DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer) をもちいて, prehybridization を42°C, 4時間以上, hybridization を42°C, overnight で行い, その後 anti DIG AP conjugate で incubation 後 color-substrate solution で発色させた。

4) 培養細胞および摘出または生検腫瘍組織の免疫染色

培養細胞は, 塗抹標本を作製し95%エタノールで固定した。組織標本は, ホルマリン固定された薄切標本を脱パラフィン後トリプシン処理したものを用いた。0.3%過酸化水素メタノール処理にて内因性ペルオキシダーゼを不活性化し, 抗ケラチン19抗体としてサイ

図2 ケラチン19 RT-PCR 法の検出率

健常者のリンパ球 1×10^7 個にたいして TOS-1 および KK47 の細胞を 1×10^6 個から 1 個まで段階的に混合し、各々から total RNA を抽出し RT-PCR 施行。First round PCR では TOS-1 で 1×10^5 個まで検出されたが、KK47 では 1×10^6 個でも検出されなかった。Second round PCR では TOS-1 では 1 個まで検出され、KK47 では 1×10^6 個のみが検出された。TOS-1 細胞、KK47 細胞とも first round PCR よりも second round PCR のほうが検出率が高く、TOS-1 細胞と KK47 細胞とでは検出率は異なっていた。

1) TOS-1

a) First round PCR(southern blotting)

b) Second round PCR(southern blotting)

2) KK47

a) First round PCR(southern blotting)

b) Second round PCR(southern blotting)

N: 陰性コントロール (水)
L: 正常者リンパ球のみ

トケラチン-19モノクローナル抗体 RCK108 (DAKO, Denmark) を用い、二次抗体として biotinylated rabbit anti-mouse IgG を用い ABC キット (DAKO, Denmark) を用いて免疫染色を行った。判定は、染色された細胞数の割合を%で示し、その染色度の強さは最も強かった TOS-1細胞の染色強度を(++)として、(±) から (++) までに分類した。

結 果

1) ケラチン19RT-PCR 法の検出率 (図2)

健常者のリンパ球 1×10^7 個に混合した TOS-1細胞の段階希釈では、first round PCR (1,069bp) で 1×10^5 個まで検出可能であったが、second round PCR

(nested RT-PCR) (745bp) では TOS-1細胞数 1 個でも検出された。これにたいし培養細胞 KK47の段階希釈では、first round PCR では 1×10^6 個でも検出されず、second round PCR で 1×10^6 個が検出されるのみであった。以上から 1 回だけの RT-PCR より、nested RT-PCR のほうが検出率が高いことが示された。このため、この後の実験は nested RT-PCR 法を用いることとした。

2) 培養細胞の RT-PCR と免疫染色 (表1)

primer E と F を用いた RT-PCR (214bp) では、腎癌の培養細胞 TOS-1, TOS-2, ACHN, SMKT-R-4, 前立腺癌の培養細胞 LNCaP, DU145, PC-3, 精巣腫瘍の培養細胞 NEC8, NEC14が検出されたが、腎癌 SMKT-R-3, 膀胱癌 YTS-1, KK47は検出されなかった。一方、primer A, B, primer C, D を用いた nested RT-PCR 法では、全ての細胞で陽性であった。

CK-19モノクローナル抗体 RCK108を用いた免疫染色では、TOS-1, SMKT-R-4が最も強く全細胞が(++)に染色された。PC3は90%陽性で(++)であった。TOS-2, ACHN は (++) で陽性率は各々95%と80%であった。DU145, NEC14は(+)で陽性率は各々90%と50%であった。SMKT-R-3と NEC8は(±~+)で陽性率は各々85%と10%, KK47は30%で(±), LNCaP, YTS-1は(-)であった。染色強度(+)以上の細胞の primer E, F による RT-PCR は全て陽性であったが、(-) から (±~+) の細胞は、primer E, F による RT-PCR では陽性のものと陰性のものがあつた。

3) ポランティア血液の nested RT-PCR (図3)

健常者 9 名 (図3では 8 名, 他に 1 名施行) から採血して nested RT-PCR をおこなった。9 名とも nested RT-PCR 後のサザンプロットは陰性であった。

ethidium bromide 入りの agarose gels での電気泳動で 745bp 付近に分画がみられる症例があつたが、その後のサザンプロットは陰性であった。この現象は患者の血液からえられた試料でもみられることがあり、このため全例にサザンプロットを行い、ケラチン19 mRNA の発現の有無を判定した。

4) 転移の有無と患者血液中のケラチン19 mRNA (表2)

参考として、図4に患者 8 例の血液の nested RT-PCR の結果を ethidium bromide 染色とサザンプロットで示した。

各疾患毎の症例数は少ないが、転移のある症例では

表 1 培養細胞の RT-PCR と免疫染色

細 胞		Primer E&F による PCR	Primer A&D, C&D による nested PCR	免疫染色
腎癌	TOS-1	+	+	100%, ++
	TOS-2	+	+	95%, ++
	ACHN	+	+	80%, ++
	SMKT-R-3	—	+	85%, ±~+
	SMKT-R-4	+	+	100%, ++
前立腺癌	LNCaP	+	+	—
	DU145	+	+	90%, +
	PC3	+	+	90%, ++
膀胱癌	YTS-1	—	+	—
	KK47	—	+	30%, ±
精巣腫瘍	NEC8	+	+	10%, ±~+
	NEC14	+	+	50%, +

免疫染色の％は染色された細胞数の割合を、(—)から(++)は TOS-1を(++)としたときの染色強度を示す。

図 3 ボランティア血液の nested RT-PCR

症例 1 では ethidium bromide 染色で745bp 付近に DNA の分画を認めているが、サザンブロッティングでは発現しておらず、全例陰性である。

a) Ethidium bromide染色

b) Southern Blotting

M：DNAマーカー
C：陽性コントロール(TOS-1)
N：陰性コントロール（水）

膀胱癌，前立腺癌，陰茎癌でケラチン19 mRNA の陽性率は100%であった。尿路性器癌全体でみるとリンパ節のみに転移を有する症例の陽性率は37.5%であったが，リンパ節以外にも転移を有する症例の陽性率は61.5%で高値であった。また転移のみられない症例では2例が陽性で陽性率11.1%であった。疾患別にみると精巣腫瘍の陽性率は12.5%で最も低く，陰茎癌の陽性率は100%で最も高かった。

5) 患者血液中のケラチン19 mRNA と予後 (表 3)
観察期間は採血後最長 7 カ月と短期であるが，ケラチン19 mRNA 陰性例で予後不良 (死亡，再発，新転移発現等) 例は 2 例 (7.7%) のみであるが，陽性例では 5 例 (38.5%) と高値であった。さらに，前立腺癌の PSA 上昇も予後不良とみなすと 8 例 (61.5%) が予後不良であった。また転移を有する症例でみるとケラチン19 mRNA 陽性例の予後不良は45.5%，前立腺癌

表2 転移の有無と患者血液中のケラチン19mRNA

疾患名	転移			total
	あり	上段：リンパ節のみ 下段：リンパ節以外	なし	
膀胱癌	2/2 (100%)	1/1 (100%) 1/1 (100%)	1/8 (12.5%)	3/10(30.0%)
腎盂尿管腫瘍	1/3 (33.3%)	0/2 (0%) 1/1 (100%)	0/3 (0%)	1/6 (16.7%)
前立腺癌	3/3 (100%)	なし 3/4 (100%)	0/4 (0%)	3/7 (42.9%)
腎癌	3/4 (75.0%)	なし 3/4 (75.0%)	0/2 (0%)	3/6 (50.0%)
精巣腫瘍	1/8 (12.5%)	1/4 (25.0%) 0/4 (0%)	症例なし	1/8 (12.5%)
陰茎癌	1/1 (100%)	1/1 (100%) なし	1/1 (100%)	2/2 (100%)
尿路性器癌 全症例	11/21(52.4%)	3/8 (37.5%) 8/13(61.5%)	2/18(11.1%)	13/39(33.3%)

%はケラチン19mRNA の陽性率を示す。

図4 患者8例の血液の nested RT-PCR の結果
患者血液の nested RT-PCR の結果の代表8症例を示す。このなかでは、膀胱癌患者2例，精巣腫瘍患者1例が陽性である。

a) Ethidium bromide染色

b) Southern Blotting

M：DNAマーカー
N：陰性コントロール（水）
B：膀胱癌
R：腎癌
T：精巣腫瘍

のPSA上昇例も加えると72.7%で、陰性例10%と比較して高値であった。
予後不良例の概略を表4に示した。
6) 摘出または生検腫瘍組織のケラチン19の免疫染

色と患者血液中のケラチン19 mRNA（表5）
Nested RT-PCRを行った症例のうち、13例の摘出標本組織または生検組織の腫瘍組織にたいしてサイトケラチン-19モノクローナル抗体 RCK108を用いて免

表3 血中のケラチン19mRNA と予後(最長7カ月)

疾患名	ケラチン19mRNA	
	陽性	陰性
膀胱癌	1/3(33.3%)	0/7(0%)
腎盂尿管腫瘍	1/1(100%)	0/5(0%)
前立腺癌	0/3(0%)	1/4(25.0%)
腎癌	2/3(66.7%)	0/3(0%)
精巣腫瘍	1/1(100%)	1/7(14.3%)
陰茎癌	0/2(0%)	症例なし

%が採血後の死亡、再発または新転移発現率を示す。

疾患名	ケラチン19mRNA			
	陽性	上段：転移あり 下段：転移なし	陰性	上段：転移あり 下段：転移なし
尿路性器癌 全症例	5/13(38.5%)	5/11(45.5%) 0/2 (0%)	2/26(7.7%)	1/10(10.0%) 1/16(6.3%)

%は採血後の死亡、再発または新転移発現率を示す。

*PSA の変化

疾患名	ケラチン19mRNA	
	陽性	陰性
前立腺癌	3/3(100%)	1/4(25.0%)

%は採血後の PSA 上昇例を示す。

表4 予後不良例の概略

疾患名	年齢,性	ケラチン19 mRNA	採血時転移部位	結果(採血から)
膀胱癌	51歳,男	陽性	肝, 骨, RPLN, Virchow's LN	1ヵ月後死亡
腎盂腫瘍	75歳,女	陽性	肝, 骨, RPLN	3ヵ月後死亡
前立腺癌	57歳,男	陰性	なし	3ヵ月後骨転移
腎癌	60歳,男	陽性	肺	1ヵ月後肝, RPLN に転移
腎癌	45歳,女	陽性	肝, 骨, RPLN	1週後死亡
精巣腫瘍	55歳,男	陽性	RPLN	3ヵ月後対側精巣に再発
精巣腫瘍	25歳,男	陰性	肝, 骨, RPLN	1ヵ月後死亡

RPLN：後腹膜リンパ節

疫染色を行った。このうち精巣腫瘍の症例 H.S. 以外は染色陽性であった。陰茎癌の症例 K.T. では、高分化部位は染色陽性であったが低分化部位は陰性であった。しかし末梢血の nested RT-PCR の結果との相関は認められなかった。

考 察

ケラチンは上皮細胞や上皮性腫瘍に特徴的であるが、多くの非上皮性細胞や腫瘍でも検出されている⁴⁾¹²⁾¹³⁾。Traweck ら⁴⁾は、RT-PCR 法を用いてケラチ

ン19の分布を調べているが、それによると正常末梢血単核球、正常リンパ節、正常骨髄では陰性であった。従って、末梢血中の細胞分画を対象にケラチン19の mRNA の発現が RT-PCR 法で確認されれば、血液中に上皮細胞、すなわち上皮癌細胞が存在していることを示すものである。これは遠隔臓器に微小転移巣ありと結論づけることには無理があるものの、転移診断を早期に検出する分子診断として位置づけし得る可能性がある。

表5 摘出または生検腫瘍組織のケラチン19の免疫染色と患者血液中のケラチン19 mRNA

組織名	症例	ケラチン19免疫染色	血液中のケラチン19 mRNA
膀胱癌	Y. K.	80%, +	—
	M. S.	100%, ++~+++	—
	T. S.	100%, ++	+
	T. W.	100%, +	—
腎盂腫瘍	M. S.	80%, ±~++	+
前立腺癌	J. K.	100%, ++	—
	E. T.	100%, ±~++	—
腎癌	J. I.	80%, ±~+	—
	K. S.	30%, ±~+	—
精巣腫瘍	H. S.	—	—
	T. O.	60%, ±~++	—
	Y. T.	100%, ±~+	—
陰茎癌	K. T.	高分化部: 100%, + 低分化部: —	+

免疫染色の％は染色された細胞数の割合を、(—)から(+++)はTOS-1を(+++)としたときの染色強度を示す。
mRNAの(—)は陰性を、(+)は陽性を示す。

RT-PCR法を用いた癌診断の報告が最近多数認められるが、泌尿器科領域では前立腺癌の腫瘍マーカーであるPSAを用いた報告が見られる^{6)~9)}。Israeliら⁹⁾はnested RT-PCR法を用い、first round PCRにくらべ検出率が100倍高くなることを示している。またDattaら⁵⁾は、nested RT-PCR法を用いてbreast cancerのケラチン19 mRNAの発現を調べ、Stage IV症例の血液および骨髄で陽性を示す症例があることを示した。

今回、当院泌尿器科に入院または外来通院している患者のリンパ球からtotal RNAを抽出し、Dattaら⁵⁾のprimersを用いてnested RT-PCRをおこないケラチン19の発現を調べた。また培養細胞を用いてその検出率を調べたところ、やはりfirst round PCRのみよりもsecond round PCRも用いたnested RT-PCR法のほうが検出率は高かった。さらに、今回nested RT-PCR法により検査した尿路性器癌の培養細胞の全てにケラチン19の発現を認めたが、扱った細胞の種類によりその検出率は異なっていた。細胞の種類によりmRNAの発現量が異なっているものと思われる。

これらのprimersはともにその間にintronを含み⁵⁾¹³⁾、そのためgenome DNAとcDNAから増幅さ

れる塩基数が異なり、両者を区別できる。今回の実験では、PCR後の電気泳動でケラチン19と同じ塩基数の部位付近に非特異的バンドを認めることがあった。しかし、その後のサザンブロッティングではその非特異的バンドは検出されず、健常者9名では全て陰性であった。さらに健常者8名において、nested RT-PCRのあとの1μlを用いて、primers E, Fを用いて3回目のPCRをおこなってみたがやはり陰性であった。この非特異的バンドがどのような塩基配列かは検討していないがpseudogene¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾の問題も含めて検討が必要と考えられる。

Nested RT-PCR法を行う場合、その高い感度のためにcontaminationにたいする注意が必要と思われる。今回の実験ではcontaminationを避けるために、total RNA抽出後の操作は紫外線で処理されたクリーンベンチの中で行い、試料を吸い上げるマイクロピペットのチップにはフィルター付を用いた。さらに、RT後およびfirst round PCR後には、試料を一度-80℃で凍らせ、試料の空中散布を可能なかぎり防御した。また数個の試料を同時に扱う場合は、3ないし4個おきに水ブランクをおきcontaminationのないことを確認した。

G3PDHはEmbden-Meyerhof解糖系において、glyceralde-3-phosphateを1,3-diphosphoglycerateにかえる酵素で細胞内に広く分布しており、PCR法においてRNAの確認にβ-actinとともにひろく用いられている。今回の実験で、抽出されたRNAの確認にはG3PDHのprimerを用いてRT-PCRを行い、G3PDHが陰性の症例はtotal RNAの抽出が不適とみなしデータから省いた。

サイトケラチン-19モノクローナル抗体RCK108を用いた培養細胞の免疫染色では、強く染色される細胞と染色されない細胞、陽性部と陰性部が混在する細胞と種々みられ、腎癌細胞に強く染色されるものが多かった。染色強度(+)から(+++)までの細胞は全て1回のみのPCRでケラチン19 mRNAが検出された。染色度の低い細胞や染色されない細胞では、1回のみのPCRで陽性のものと陰性のものとがあった。しかし、免疫染色で陰性の細胞も、nested RT-PCRではケラチン19 mRNAの発現が検出され、免疫染色よりもnested RT-PCR法のほうが検出率が高いことがわかった。

患者末梢血から抽出したtotal RNAのnested RT-PCRでは、膀胱癌、腎盂尿管腫瘍、前立腺癌、腎癌で

は、かなり進行した症例のみが陽性で、転移を認めない症例は1例を除き陰性であった。腎盂腫瘍の1例では化学療法後に陰性化し、腎癌の1症例では embolization 後に陽性化しており、ともに興味深い。化学療法がケラチンの発現状態や腫瘍細胞の血中分布に影響を与えているのかもしれないが、今後症例を重ねて検討したい。精巣腫瘍では1例のみが陽性で、それ以外は肺や脳や肝臓に転移を有する症例でも陰性であった。精巣腫瘍培養細胞の NEC8, NEC14 の PCR は陽性であるが、Bartek ら¹⁵⁾によると正常精細管内の細胞はケラチン19にたいする免疫染色は陰性であり、仮に血液中に精巣腫瘍細胞が遊離していても、ケラチン19は発現しにくいものと思われる。陽性であった症例も、精巣と後腹膜リンパ節腫瘍の摘出術後には陰性化した。しかし、最近対側精巣に腫瘍を認めるようになった。PCR 陽性例であったことを考えると興味深い。陰茎癌では、2例中2例とも陽性で、転移の認められない症例でも陽性であった。Bartek ら¹⁵⁾によれば正常舌扁平上皮、食道扁平上皮においてケラチン19にたいする免疫染色は陽性であり、Wu ら¹⁶⁾によると舌扁平上皮癌由来の cell line SCC-4 と SCC-15、表皮扁平上皮癌由来の cell line SCC12 でケラチン19蛋白が認められている。また Moll ら¹⁷⁾の報告では、皮膚および舌の扁平上皮癌ではケラチン19は陰性だが、喉頭蓋、食道、肛門直腸部の扁平上皮癌では陽性である。発生部位により異なるようだが、一般に扁平上皮癌はケラチン19が発現しやすい印象であり、陰茎癌の陽性率が高かったことと関係があるかもしれない。さらに症例を重ねて検討する必要がある。

尿路性器癌全体でみると、転移のみられない症例よりも、転移を有する症例のほうが nested RT-PCR の陽性率が高く、またリンパ節のみの転移よりも他の遠隔転移を有する症例のほうが陽性率が高い。今回の nested RT-PCR が血液中の腫瘍細胞について検討していることを考えれば、当然の結果と思われる。また、短期間の観察であるが、転移を有する場合でも nested RT-PCR 陽性のほうが予後不良であったことから予後をうらなうマーカーになりえると考えられる。

Nested RT-PCR 法を用いて、末梢血からケラチン19 mRNA の発現の有無を検討する有用性には次のようなことが考えられる。結果が陽性的場合、転移を有する進行癌の存在あるいは病期が潜在的に進行していると考えられる。今回の症例では長期間にわたり採血を繰り返したり、その予後を検討した症例は数少ない

が、化学療法後に陰性化したもの、また陽性例でその後の死亡者や再発例を多く認めたことは、各種治療の効果判定や予後をうらなうマーカーになりえる可能性があると考えられる。RT-PCR 法を用いたケラチン19 mRNA の検出法は、乳癌にその報告がみられるが⁵⁾¹¹⁾、他の上皮性腫瘍にも広く利用できると考えられる。ただし、泌尿性器癌に対してケラチン19が最良のマーカーとは限らず、今後より感度のよいマーカーの検討が必要である。

摘出標本組織または生検組織の CK-19 モノクローナル抗体を用いた免疫染色では、施行した13例中12例が陽性であったが、染色割合、染色強度とも、末梢血の nested RT-PCR との相関はみられなかった。しかし、染色の程度と腫瘍細胞の血液中への流出とは関係しないため当然の結果と考えられる。

結 語

ケラチン19の primers を用いて nested RT-PCR を行い、血液中の尿路性器上皮癌細胞の検出を試み、病期との関連を検討した。

a) 尿路性器癌の培養細胞12種類を用いて nested RT-PCR を行ったが、全ての細胞でケラチン19 mRNA が検出された。

b) Nested RT-PCR 法は免疫染色より検出率が高く、腎癌の培養細胞 TOS-1 では健常者のリンパ球 1×10^7 個にたいして1個の混入でも検出可能であった。しかし膀胱癌細胞 KK47 では 1×10^6 個までしか検出されず、細胞により検出感度は異なっていた。

c) 臨床39例の末梢血の検討では、ケラチン19 mRNA が検出された症例の多くは転移例であった。このことから、ケラチン19 mRNA が検出されかつ転移陰性例は、微小転移など潜在的な進行癌の可能性が示唆された。

d) 疾患別にケラチン19 mRNA の検出率をみると、精巣腫瘍で低く、陰茎癌で高かった。

e) 血中ケラチン19 mRNA の検出は、今後泌尿性殖器癌の微小転移の診断、治療の奏功に応じた変化や予後の予測に使用される可能性が示唆された。

文 献

- 1) Osborn, M. and Weber, K.: Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. Lab. Invest., 48, 372—394, 1983.
- 2) Cooper, D., Schermer, A. and Sun, T.T.: Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to ker-

- atins: applications, and limitations. *Lab. Invest.*, **52**, 243—256, 1985.
- 3) Moll, R., Lowe, A., Laufer, J. and Franke, W.: Cytokeratin 20 in human carcinomas: a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.*, **140**, 427—447, 1992.
 - 4) Traweek, S.T., Liu, J. and Battifora, H.: Keratin gene expression in non-epithelial tissues: detection with polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.*, **142**, 1111—1118, 1993.
 - 5) Datta, Y.H., Adams, P.T., Drobyski, W.R., Ethier, S.P., Treey, V.H. and Roth, M.S.: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 475—482, 1994.
 - 6) Moreno, J.G., Croce, C.M., Fischer, R., Monne, M., Vihko, P., Mulholland, S.G. and Gomella, L. G.: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.*, **52**, 6110—6112, 1992.
 - 7) Deguchi, T., Doi, T., Ehara, H., Ito, S., Takahashi, Y., Nishino, Y., Fujihiro, S., Kawamura, T., Komeda, H., Horie, M., Kaji, H., Shimokawa, K., Tanaka, T. and Kawada, Y.: Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.*, **53**, 5350—5354, 1993.
 - 8) Katz, A.E., Seaman, E., Olsson, C.A., O'Toole, K.M., Raffo, A.J., McMahon, D., Cama, C., Benson, M.C., Perlman, H. and Buttyan, R.: Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urol.*, **43**, 765—775, 1994.
 - 9) Israeli, R.S., Miller, W.H., Su, J.S.L., Powell, C. T., Fair, W.R., Samadi, D.S., Huryk, R.F., DeB-lasio, A., Edwards, E.T., Wise, G.J. and Heston, W.D.W.: Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res.*, **54**, 6306—6310, 1994.
 - 10) Burchill, S.A., Bradbury, M.F., Pittman, K., Southgate, J., Smith, B. and Selby, P.: Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *BBr. J. Cancer*, **71**, 278—281, 1995.
 - 11) Schoenfeld, A., Luqmani, Y., Smith, D., O'Reilly, S., Shousha, S., Sinnett, H.D. and Coombes, R.C.: Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res.*, **54**, 2986—2990, 1994.
 - 12) Wu, Y.J., Parker, L.M., Binder, N.E., Beckett, M.A., Sinard, J.H., Griffiths, C.T. and Rheinwald, J.G.: The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell*, **31**, 693—703, 1982.
 - 13) Bader, B.L., Jahn, L. and Franke, W.W.: Low level expression of cytokeratins 8,18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *Eur. J. Cell Biol.*, **47**, 300—319, 1988.
 - 14) Savtchenko, E.S., Schiff, T.A., Jing, C.K., Freedberg, I.M. and Blumenberg, M.: Embryonic expression of the human 40-kD keratin: evidence from a processed pseudogene sequence. *Am. J. Hum. Genet.*, **43**, 630—637, 1988.
 - 15) Bartek, J., Bartkova, J., Taylor-Papadimitriou, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Lukas, Z. and Vojtesek, B.: Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies. *Histochemical. J.*, **18**, 565—575, 1986.
 - 16) Wu, Y.J. and Rheinwald, J.G.: A new small (40kD) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell*, **25**, 627—635, 1981.
 - 17) Moll, R., Franke, W.W. and Schiller, D.L.: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11—24, 1982.

(1996年10月7日受付, 1997年8月20日受理)