

原著 PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10) の発現がアンドロゲン除去療法を施行した Stage IV 前立腺癌の予後に及ぼす影響

昭和大学医学部病理学講座 (臨床病理診断学部門)

松原 英司 矢持 淑子 塩沢 英輔
佐々木陽介 太田 秀一 瀧本 雅文

昭和大学医学部泌尿器科学講座

深貝 隆志 小川 良雄

昭和大学横浜市北部病院泌尿器科

井上 克己 島田 誠

要約：細胞内増殖シグナル伝達の経路に PTEN/PI3K/Akt (Phosphate and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10/Phosphoinositide 3-kinase/Akt) 経路があり、同経路は癌の発現・進行に重要な役割を担っているとされている¹⁾。PTEN は同経路を抑制する癌抑制因子である。今回われわれは PTEN の発現がアンドロゲン除去療法 (ADT: Androgen Deprivation Therapy) を施行された Stage IV 前立腺癌の予後に与える影響を検討した。症例は米国ハワイ州の The Queen's Medical Center cancer tumor registry database より、1992 年から 2006 年の間に前立腺癌組織標本が採取され、ADT が施行された Stage IV 前立腺癌 192 例を抽出した。さらに組織が入手可能かつ評価可能であった 85 歳以下で抗癌化学療法が施行されていない 133 例を抽出した。133 例中治療前 PSA (Prostate Specific Antigen) 値が得られたのは 108 例であった。免疫組織化学的に標本を PTEN で染色して 0, 1+, 2+, 3+ の 4 段階で評価した。全生存率と年齢・治療前 PSA 値・Gleason score²⁾ との関係や、PTEN の発現と全生存率との関係を統計学的手法を用い解析した。年齢・治療前 PSA 値・生存期間の中央値はそれぞれ 71.2 歳, 53.4 ng/ml, 80.4 か月であった。Gleason score の分布は 7 以下が 25%, 8 以上が 75% を占めていた。PTEN 0, 1+, 2+, 3+ の割合はそれぞれ 45%, 8%, 5%, 42% であった。Stage IV 前立腺癌全症例において、年齢・治療前 PSA 値・Gleason score それぞれと全生存率の間に相関があったが、PTEN の発現と全生存率の間に相関はなかった。Stage IV 前立腺癌 133 例を Jewett Staging System の Stage C, D1, D2 の 3 つのサブグループに分けて解析したところ、Stage D2 群において PTEN の発現と生存率の間に相関がみられ、Gleason score と PTEN の発現は多変量解析でそれぞれ生存率との間に相関がみられた。PTEN の強い発現は、Stage D2 前立腺癌の予後因子である可能性が示唆された。Gleason score と PTEN の発現はそれぞれ独立した予後因子である可能性も示唆された。

キーワード：PTEN, 前立腺癌, アンドロゲン除去療法, 去勢抵抗性前立腺癌

前立腺癌は欧米での癌死亡率、罹患率の上位であり、本邦でも罹患率の上昇は著しい³⁾。前立腺癌はその進行をアンドロゲンに依存しており、根治療法が適応にならない進行前立腺癌症例や高齢症例の治療の主体はアンドロゲン除去療法 (ADT: Andro-

gen Deprivation Therapy) である。ほとんどの症例で ADT に対する反応は良好であるが、多くは数年で去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC: Castration Resistant Prostate Cancer) となり、その予後は不良である。

細胞内増殖シグナル伝達の主な経路に PTEN/PI3K/Akt (Phosphate and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10/Phosphoinositide 3-kinase/Akt) 経路や MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase) 経路などがあり、両者とも発癌・癌の進行に重要な役割を担っているが、前立腺癌では特に PTEN/PI3K/Akt 経路が癌の増殖に影響があるという報告がある¹⁾。活性化された PI3K は PIP2 (Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate) にリン酸基を供与し PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate) を産生する。PIP3 はセカンドメッセンジャーとして働き、PDK1 (Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1), mTORC2 (Mammalian target of rapamycin Complex 2) による Akt のリン酸化を誘導する。活性化した Akt は BAD (BCL2 Antagonist of Cell Death), GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β)・FOXO (Forkhead box O) の抑制, mTORC1 (Mammalian target of rapamycin Complex 1) の活性化, I κ B (Inhibitor κ B) kinase を介した NF κ B (Nuclear factor- κ B) の活性化, MDM2 を介した p53 の抑制などに作用し細胞を生存, 成長しやすい環境を作り出す⁴⁾。PTEN は PIP3 を脱リン酸化して PIP2 に戻す働きがあり, Akt のリン酸化を抑制することで, 同経路に抑制的に作用する⁴⁾。

前立腺癌において PTEN の発現を臨床的に検討したものである²⁾との比較⁵⁾や根治的前立腺全摘後の PSA 再発との検討⁶⁾はなされているが, 生存率との比較は少なく, CRPC 標本の PTEN gene を FISH 法を用いて検討した報告のみである⁷⁾。今回われわれは, PTEN/PI3K/Akt 経路の活性化が Stage IV 前立腺癌の予後増悪因子であるという仮説をたて, PTEN の免疫組織化学的発現と Gleason score との相関と, Stage IV 前立腺癌の生存率との関係を検討した。

研究方法

1. 対象

米国ハワイ州 Hawaii University Tumor Cancer Registry から 1992 年～2006 年の間に臨床的, または病理学的に TNM 分類 Stage IV (T4 or N1 or M1) と診断され, かつ ADT を施行された 192 例を後ろ向きに抽出した。さらに標本が入手可能, 評

価可能であった 85 歳以下でかつ抗癌化学療法が未施行の 133 例を抽出した。133 例全て標本採取時はホルモン・放射線ナイーブと考えられた。ADT は除睾術, もしくは黄体化ホルモン放出ホルモンアゴニストを投与されていたれば, 抗アンドロゲン剤投与の有無は区別しなかった。治療前 PSA を得ることができたのは 133 例中 108 例であった。標本の採取方法は針生検 116 例, 経尿道的前立腺切除術 11 例, 根治的前立腺全摘除術 4 例, 膀胱全摘除術 2 例であった。

2. 方法

前立腺癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を免疫組織化学的に Envision plus detection system (Dako, Carpinteria, CA) を用いて評価した。PTEN 抗体は 6H2.1 Clone (Dako, Carpinteria, CA) を用いた。陽性コントロールに乳癌検体を用い, 陰性コントロールに 1 次抗体なしでは染色されないことを確認した。染色方法は以前の文献を参考にした⁸⁾。

発現の評価は以前の報告と同様に 0 : < 10%, 1+ : 10 ~ 20%, 2+ : 20 ~ 50%, 3+ : 50% < の 4 段階で評価した⁶⁾。評価は病理専門医 3 名 (TY, ES, MT) によってなされ, 一致しなかったものは協議の上決定した。PTEN の発現と ADT 開始後の全生存率をパラメータにして PTEN の Stage IV 前立腺癌に与える影響を解析した。

統計処理は生存率と PTEN の発現の検討では, PTEN の発現を 0, 1+, 2+ 群と 3+ 群の 2 群に分けて半定量的に解析した。PTEN の発現と生存率の関係を Kaplan-Meier 生存曲線で示し, Log-rank test で評価した。生存期間と各臨床情報 (年齢, 治療前 PSA 値, Gleason score) との単変量および多変量解析は Cox proportional hazards model を用いた。Gleason score と PTEN の発現の関係の検討は Mann-Whitney U 検定を用いた。その際以前の報告と方法を近似させるため, PTEN の発現は 0 群と 1+, 2+, 3+ 群の 2 群に分けて半定量的に検討した⁵⁾。Gleason score はそのままの数を変数とした。

本検討では疾患特異生存率は得られなかったが, 各症例を追跡可能であった最終時点の癌の状態が 110 例から得られた。主治医の判断で癌の所見あり, 癌の所見なし, 不明の 3 群に分けられ, 死亡時に癌の所見なしであれば本検討では非癌死とみなした。

本研究は, 米国ハワイ州 The Queen's Medical

Center, Research and Institution Review Committeeにおいて審査され、承認された（承認番号 RA-2011-028, 承認日 2011年6月17日）。

結 果

患者背景を示す（Table 1）。Stage IV全症例群の年齢、治療前 PSA値、生存期間の中央値はそれぞれ 71.2 歳、53.4 ng/ml、80.4 か月であった。3年生存率は 72%、5年生存率は 56%であった。Gleason score の分布は 7 以下が 25%、8 以上が 75%を占めていた。死亡が確認された非打ち切り例が 90 例、打ち切り例が 43 例であった。死亡が確認された非打ち切り例の内、死亡時に何らかの癌の所見があったものが 72 例、なかったものが 8 例、不明なものが 10 例であり、少なくとも 8 例（癌の状態が分かっている 80 例の内の 10%）は非癌死と考えられた。

さらに Stage IV の 133 例をサブグループとして T4N0M0（Jewett Staging System Stage C の一部、以後 Stage C と表記）、TXN1M0（同 Stage D1）、

TXNXM1（同 Stage D2）に分けて解析した。Stage C：10 例、Stage D1：39 例、Stage D2：84 例であった。Stage C 群、Stage D1 群、Stage D2 群の治療前 PSA値の中央値はそれぞれ 76.1 ng/ml、21.6 ng/ml、87.6 ng/ml、生存期間の中央値はそれぞれ 76.1 か月、156.4 か月、48.9 か月、5年生存率は 57%、87%、42%であった。非癌死症例の割合はそれぞれ 43%、30%、3%であった。

各群のパラメータと生存率との相関の有無を示す（Table 2）。Stage IV 全症例群では年齢、治療前 PSA値、Gleason score いずれも生存率との単変量解析で相関を認めた（年齢： $p = 0.0041$ 、治療前 PSA値： $p = 0.0001$ 、Gleason score： $p = 0.0035$ ）。Stage C 群、Stage D1 群には相関はみられなかった。Stage D2 群には治療前 PSA値と Gleason score にそれぞれ生存率との間に相関を認めた（治療前 PSA値： $p = 0.011$ 、Gleason score： $p = 0.020$ ）。

パラフィン包埋組織切片の PTEN の免疫組織化学所見を示す（Fig. 1）。

Table 1 Patient characteristics

TNM classification	T4N0M0	TXN1M0	TXNXM1	T4 or N1 or M1	
Stage	Stage C	Stage D1	Stage D2	Stage IV	
Number of cases	10	39	84	133	
Age	44.1 ~ 85.9 median 73.5	47.9 ~ 80.8 median 65.5	47.5 ~ 85.9 median 74.2	44.1 ~ 85.9 median 71.2	
Pretreatment PSA (ng/ml)	13.0 ~ 485 median 76.1	5.1 ~ 340 median 21.6	5.9 ~ 7885 median 87.6	5.1 ~ 7885 median 53.4	
Gleason score	6 7 8 9 10	0 1 (10%) 3 (30%) 4 (40%) 2 (20%)	4 (10%) 8 (21%) 13 (33%) 14 (36%) 0	3 (4%) 18 (21%) 19 (23%) 40 (48%) 4 (5%)	7 (5%) 27 (20%) 35 (26%) 58 (44%) 6 (5%)
Survival time (month)	7.3 ~ 168 median 72.4	3.6 ~ 190 median 156.4	2.7 ~ 135 median 48.9	2.7 ~ 190 median 80.4	
3-year survival rate	90%	90%	62%	72%	
5-year survival rate	57%	87%	42%	56%	
Mortality rate for not cancer	3/7 (43%)	3/10 (30%)	2/63 (3%)	8/80 (10%)	

PSA: Prostate specific antigen

Table 2 Univariate Cox analysis including clinical characteristics for over all survival

TNM classification	T4N0M0	TXN1M0	TXNXM1	T4 or N1 or M1		
Stage	Stage C	Stage D1	Stage D2	Stage IV		
	p value	p value	p value	Hazard ratio	p value	Hazard ratio
Age	n.s. (0.91)	n.s. (0.55)	n.s. (0.17)	1.037	0.0041	1.037
Pretreatment PSA	n.s. (0.095)	n.s. (0.087)	0.011	1.00026	0.0001	1.00026
Gleason score	n.s. (0.35)	n.s. (0.50)	0.020	1.43	0.0035	1.43

PSA: Prostate specific antigen

各群と PTEN の発現を示す (Table 3). Stage IV 全症例群の PTEN の発現は 0 : 45%, 1+ : 8%, 2+ : 5%, 3+ : 42% であった. 各サブグループの PTEN3+ の割合は Stage C 群は 50%, Stage D1 群は 31%, Stage D2 群は 45% であった.

各群それぞれに PTEN と生存率の関係を Kaplan-Meier 生存曲線で示し, Log-rank test で評価した (Fig. 2, 3, 4, 5). Stage D2 群においてのみ PTEN0, 1+, 2+ 群と 3+ 群間の生存率に有意な差を認めた ($p = 0.033$). 中央値で約 28 か月の差があった. Stage D2 群においての全生存率との単変量解析で有意な相関を認めた治療前 PSA 値, Gleason score, PTEN の発現をパラメータにして多変量解析をした (Table 4) Gleason score と PTEN の発現において相関がみられた (Gleason score : $p = 0.048$, PTEN の発現 : $p = 0.0015$). また, Stage D2 群において PTEN の発現と Gleason score の関係を検定したところ相関がみられ, PTEN の発現の強い症例は Gleason score は低い傾向にあった ($p = 0.021$).

考 察

今回われわれの検討では, Stage IV 全症例では PTEN の発現と全生存率との間に相関はみられなかった. 各群毎に比較すると Stage C・D1 群において相関はみられなかったが, Stage D2 群において相関がみられ, PTEN の発現が強い症例の予後は比較的良好であることが示された. 各群間で結果に差が表れたのは, 遠隔転移がない Stage C・D1 群は非癌死症例がそれぞれ 43%, 30% と多く, Stage D2 群は 3% と少なかったことが一因と考えられる. Stage D2 群において PTEN/PI3K/Akt 経路の抑制が生存期間の延長をもたらした可能性が示

唆される.

過去に根治的前立腺全摘後の PSA 再発と PTEN・pAkt の発現を検討した報告があるが, PTEN 陰性かつ pAkt 陽性群の再発率が高く, 同経路の活性化が PSA 再発を予測する優れた因子であると述べられている⁶⁾. 今回のわれわれの検討と併せて考えると, 前立腺癌の進行に同経路が密接にかかわっていることが示唆される.

また先に述べたように, Gleason score と PTEN の発現の相関を示す報告がある⁵⁾. 今回のわれわれの検討でも同様に相関がみられた. PTEN の発現が強ければ Gleason score が低く, PTEN の発現が弱ければ Gleason score は高い. つまり PTEN は前立腺癌組織の分化度と関係があると考えられる.

さらにわれわれの検討では, PTEN が独立した予後因子であるか検討するため, Stage D2 群において全生存率と年齢・PTEN の発現・Gleason score との関係が多変量解析したところ, PTEN の発現と Gleason score が全生存率との間に相関を示した. 過去の報告に局所進行前立腺癌に ADT 単独で治療した際の PSA 再発のリスク因子は年齢と Gleason score である¹⁰⁾という報告があり, Gleason score に加えて PTEN の発現が独立した予後因子, さらに去勢抵抗性獲得の因子である可能性がある.

また, 前立腺癌移植マウスが去勢抵抗性を獲得するまでの期間が PTEN knock out mouse が通常のマウスより早かったという報告からも, PTEN が去勢抵抗性獲得に影響していることが示唆されている⁹⁾. 本検討で Stage D2 群の PTEN の発現が弱い症例の生存期間がより短い傾向があった理由として, マウスと同様, 去勢抵抗性の獲得が早かったから, という可能性が考えられた.

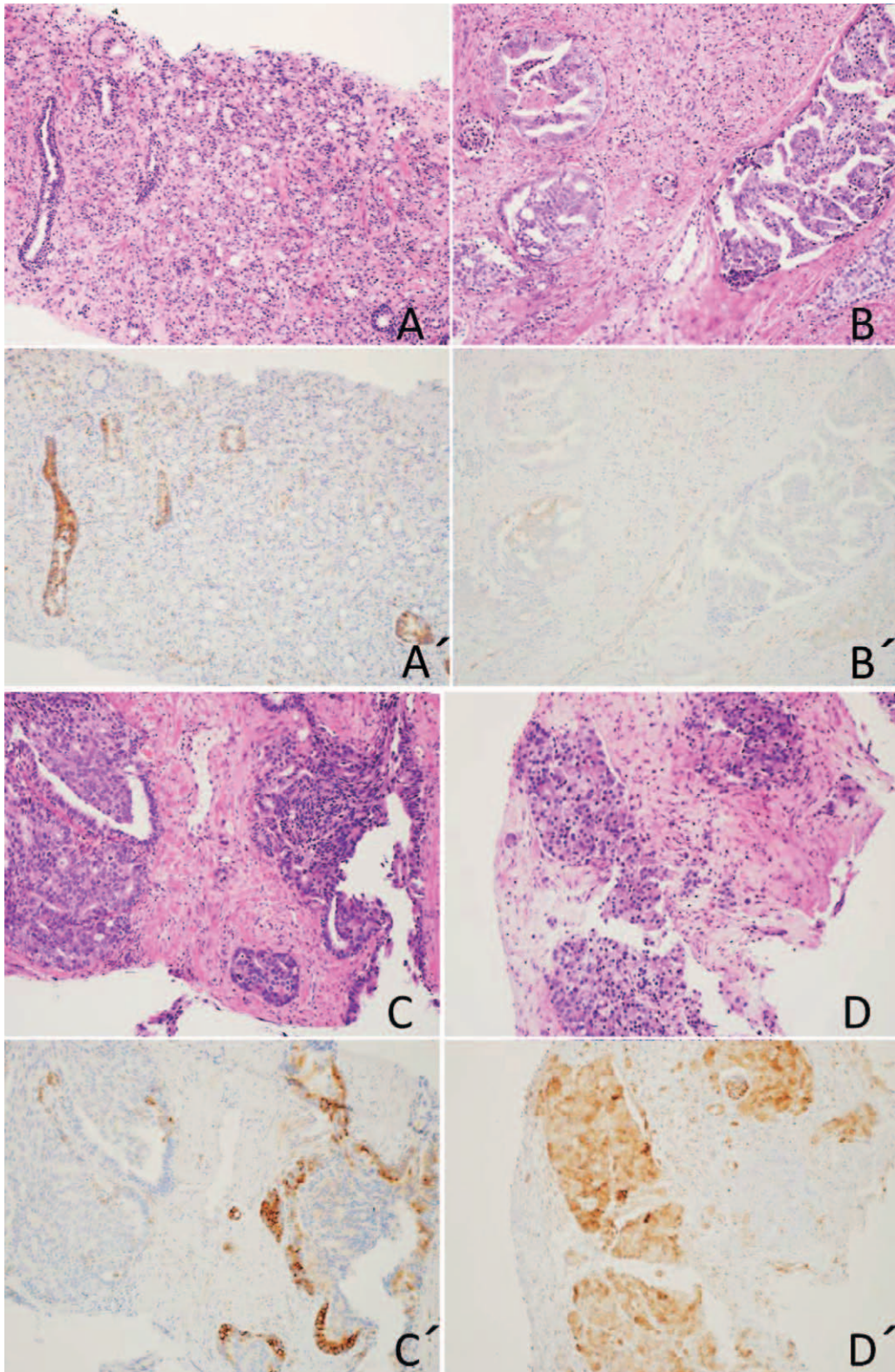


Fig. 1 Immunostaining to show various levels of PTEN expression. A, B, C, D are hematoxylin-eosin staining. A' is no PTEN expression on cancer tissue (intensity = 0). Stained tissue is benign prostate. B' is faint PTEN expression (intensity = 1+). C' is medium PTEN expression (intensity = 2+). D' is strong PTEN expression (intensity = 3+).

PTEN が Stage IV 前立腺癌に与える影響

Table 3 PTEN expression in each stage

TNM classification	T4N0M0	TXN1M0	TXNXM1	T4 or N1 or M1
Stage	Stage C	Stage D1	Stage D2	Stage IV
PTEN expression				
0	4/10 (40%)	22/39 (56%)	34/84 (40%)	60/133 (45%)
1+	0	3/39 (8%)	8/84 (10%)	11/133 (8%)
2+	1/10 (10%)	2/39 (5%)	4/84 (5%)	7/133 (5%)
3+	5/10 (50%)	12/39 (31%)	38/84 (45%)	55/133 (42%)

PTEN: Phosphate and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10

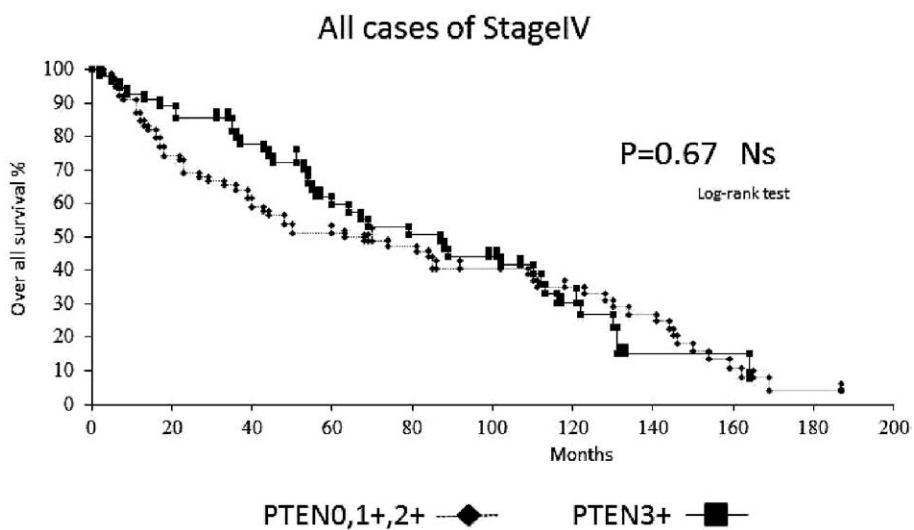


Fig. 2 Kaplan-Meier curves illustrating over all survival among all cases of Stage IV. Log-rank test does not show significant difference.

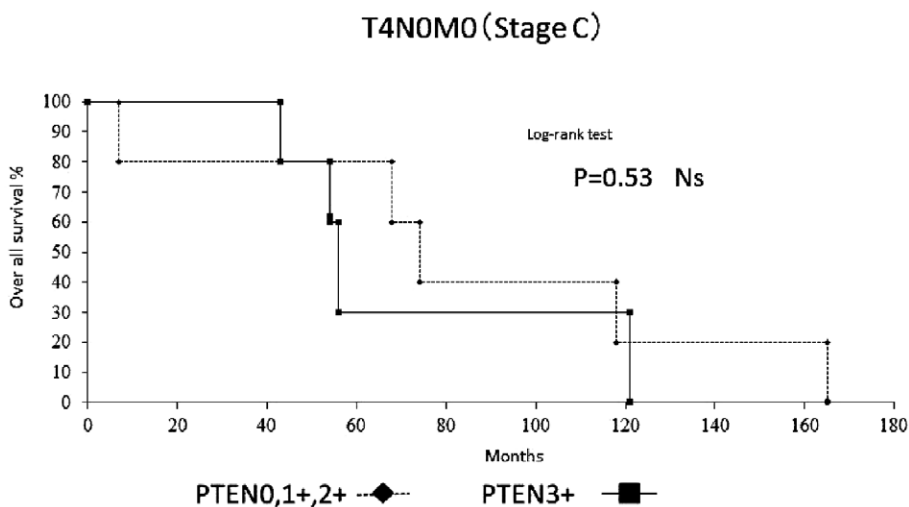


Fig. 3 Kaplan-Meier curves illustrating over all survival among Stage C prostate cancer patients. Log-rank test does not show significant difference.

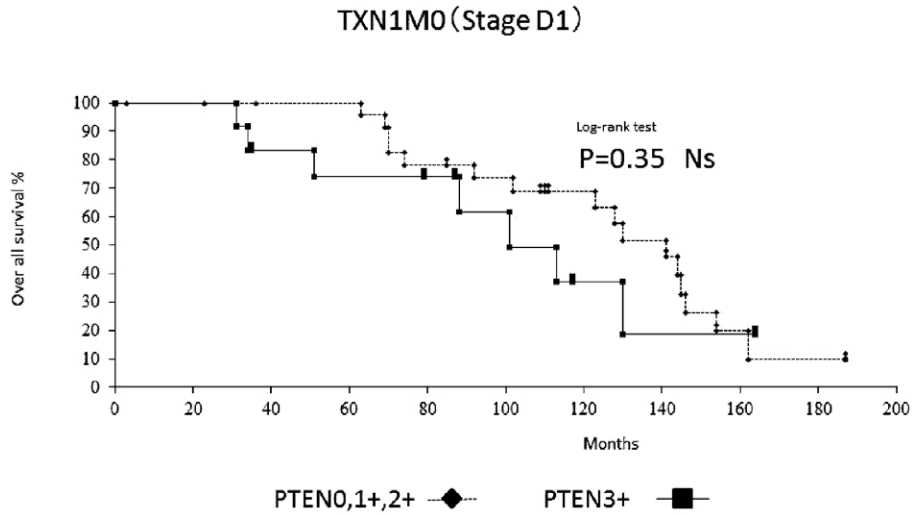


Fig. 4 Kaplan-Meier curves illustrating over all survival among Stage D1 prostate cancer patients. Log-rank test does not show significant difference.

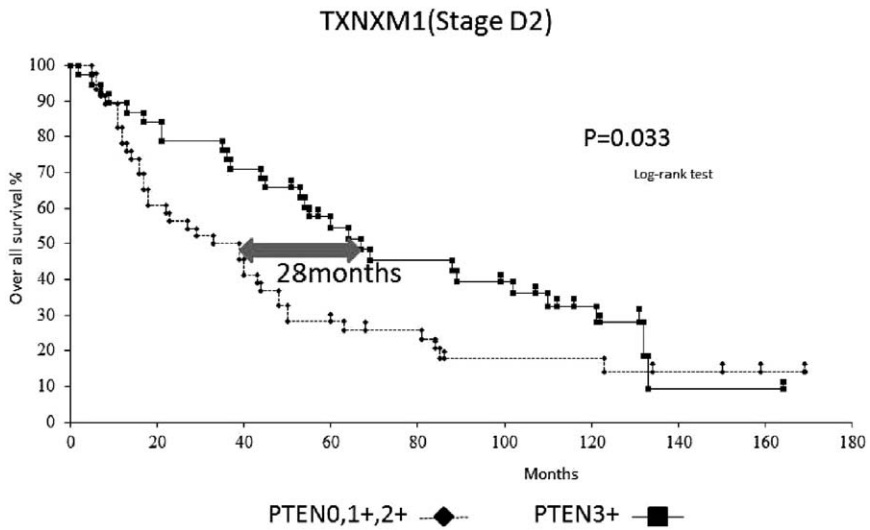


Fig. 5 Kaplan-Meier curves illustrating over all survival among Stage D2 prostate cancer patients. Log-rank test shows significant difference.

Table 4 Multivariate Cox analysis including PSA and Gleason score and PTEN expression for over all survival in Stage D2 cases

	p value	Hazard ratio
Pretreatment PSA	n.s. (0.32)	
Gleason score	0.048	1.43
PTEN 3 +	0.0015	0.35

PSA: Prostate specific antigen

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10

去勢抵抗性前立腺癌の PTEN の発現は良性前立腺組織や未治療前立腺癌のような高分化な組織より弱い, という報告があるが, 去勢抵抗性を獲得するのに PTEN が関与していたのか, 去勢抵抗性前立腺癌となり, 脱分化した結果 PTEN の発現が弱くなったのかは明らかでなかった⁹⁾. その検討のコントロールにはホルモンナীবで転移性前立腺癌標本のような低分化な組織が適しているとされている⁹⁾. 今回のわれわれの検討は原発巣ではあるが, 全てホルモンナীব前立腺癌組織を用いており, PTEN の発現が弱い症例の生存率が低いのは, 去勢抵抗性を獲得しやすいからであるという可能性がある.

今回われわれは, PTEN の発現が Stage D2 前立腺癌の予後因子であることを示した. PTEN/PI3K/Akt 経路が前立腺癌の進行に与える影響を解明するためには, さらなる臨床情報の集積と, 病理学的検索が必要であると考えられた.

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない.

文 献

- 1) Ghosh PM, Malik SN, Bedolla RG, *et al.* Signal transduction pathways in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12:119-134.
- 2) Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging.

J Urol. 1974;111:58-64.

- 3) 若井建志. 我が国における前立腺癌の疫学動向と欧米との比較. *日臨.* 2005;63:207-212.
- 4) Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65.
- 5) McMenamin ME, Soung P, Perera S, *et al.* Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 1999;59:4291-4296.
- 6) Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JI, *et al.* Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3860-3867.
- 7) Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, *et al.* PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol.* 2009;218:505-513.
- 8) Sakr RA, Barbashina V, Morrogh M, *et al.* Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18:371-374.
- 9) Bertram J, Peacock JW, Fazli L, *et al.* Loss of PTEN is associated with progression to androgen independence. *Prostate.* 2006;66:895-902.
- 10) Janoff DM, Peterson C, Mongoue-Tchokote S, *et al.* Clinical outcomes of androgen deprivation as the sole therapy for localized and locally advanced prostate cancer. *BJU Int.* 2005;96:503-507.

EFFECTS OF PTEN EXPRESSION FOR STAGE IV PROSTATE CANCER WITH ANDROGEN DEPRIVATION THERAPY

Eiji MATSUBARA, Toshiko YAMOCHI, Eisuke SHIOZAWA,
Yosuke SASAKI, Hidekazu OTA and Masafumi TAKIMOTO

Department of Pathology, Showa University School of Medicine

Takashi FUKAGAI and Yoshio OGAWA

Department of Urology, Showa University School of Medicine

Katsuki INOUE and Makoto SHIMADA

Department of Urology, Showa University Northern Yokohama Hospital

Abstract — The PTEN/PI3k/Akt pathway is a pathway in intracellular growth signal transduction that also plays an important role in the onset and progress of cancer. PTEN is a tumor suppressor that inhibits this pathway. This study examined how PTEN expression influences the prognosis of stage IV prostate cancer. Case subjects were extracted from The Queen's Medical Center cancer tumor registry database in Hawaii, USA, and included 192 stage IV prostate cancer patients that underwent androgen deprivation therapy (ADT) and who had a prostate tissue sample taken between 1992 and 2006. Of these, 133 cases under the age of 85 years whose tissue was available and could be assessed, and who did not receive anti-cancer chemotherapy, were extracted. We were able to obtain pretreatment PSA values in 108 of the 133 cases. Samples were immunohistochemically stained for PTEN and evaluated on a 4 level scale of 0, 1+, 2+, and 3+. The relationship between the overall survival rate and age/pretreatment PSA value/Gleason score, and the relationship between PTEN expression and overall survival rate were statistically analyzed. The age at ADT initiation, pretreatment PSA value, and median survival period was 71.2 years, 53.4 ng/ml, and 80.4 months, respectively. A Gleason score of less than 7 accounted for 25% and 75% had a score of over 8. The ratio of PTEN 0, 1+, 2+, and 3+ was 45%, 8%, 5%, and 42%, respectively. A correlation was found between pretreatment PSA values, Gleason score, and age in all stage IV prostate cancer cases, but there was no correlation with PTEN expression. On subdividing the 133 stage IV prostate cancer cases into the 3 stages of C, D1, D2 of the Jewett staging system, a correlation was found between PTEN expression and the survival rate in the stage D2 group. Moreover, in stage D2 prostate cancer, a significant difference between the Gleason score and PTEN expression was observed by multivariate analysis. This suggests that strong PTEN expression may be a prognostic factor of stage D2 prostate cancer and that such an expression is an independent prognostic factor.

Key words: PTEN, prostate cancer, androgen deprivation therapy, castration resistant prostate cancer

[受付：1月15日，受理：1月29日，2013]