

Prostatakarzinomscreening durch einen neuen Marker auf der Basis zirkulierender Blutmakrophagen?

Das Prostatakarzinom stellt das häufigste Karzinom bei Männern in den meisten westlichen Bevölkerungen dar und ist die zweithäufigste Ursache für den Krebstod bei Männern [1]. Trotz seiner hohen Morbidität bleibt die Ätiologie des Prostatakarzinoms zum größten Teil unbekannt [1].

Beginnend im Jahre 1988, konnte eine markante Zunahme an Diagnosen von Prostatakreberkrankungen aufgrund der Entwicklung eines Tests für prostataspezifisches Antigen (PSA) verzeichnet werden. Es existiert aber weiterhin eine Streitfrage über den Wert von PSA als Tumormarker [2]. Wegen seiner limitierten Aussagekraft ist PSA kein ausreichend guter Marker, der als alleiniges Screeningwerkzeug benutzt werden sollte.

Die Molekularbiologie hat zu einem schnellen Anstieg an einer Anzahl potentieller neuer Prostata-Tumormarker geführt, die schließlich vielleicht die Schwächen von PSA antizipieren könnten [2]. Trotz des beträchtlichen Fortschritts und der laufenden wissenschaftlichen Anstrengungen in der Entwicklung diagnostischer Verfahren konnte bislang kein ausreichend guter Marker bis zur Praxisreife entwickelt werden [2]. In dieser Arbeit sollen die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen an zirkulierenden Blutmakrophagen und deren potenzieller Wert als verlässlicher neuer Tumormarker dargestellt werden.

Aus elektronenmikroskopischen immunhistochemischen Untersuchungen

der Prostata ist bekannt, dass in ein Prostatakarzinom eingewanderte Gewebemakrophagen PSA enthalten [3]. Die bisherige Lehrmeinung ging aber davon aus, dass diese Makrophagen nach der Phagozytose am Ort verbleiben. Gleichzeitig wurden Zellen in der Blutzirkulation gefunden, die nicht epithelialen Ursprungs sind, also keine Karzinomzellen darstellen, aber PSA auf der Oberfläche aufweisen [4, 5]. Weder der Ursprung dieser Zellen, noch der des PSA waren bisher bekannt.

Es ist nachweisbar, dass eine kleine Untergruppe von zirkulierenden CD14-positiven (CD14⁺) Monozyten, welche zusätzlich den Aktivierungsmarker CD16 (FcγRIII-receptor) auf der Oberfläche exprimieren, bei Patienten mit bakterieller Sepsis erhöht ist [6]. Wir konnten erstmals zeigen, dass diese Subpopulation von Zellen auch bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms erhöht ist. Dieser Anstieg ist vergleichbar mit dem Anstieg der Subpopulation bei Bestehen einer ausgeprägten bakteriellen Sepsis und zwar in einem Stadium der Prostataerkrankung, die als klinisch stabil bezeichnet wird.

Die CD14⁺CD16⁺-Subpopulation wurde zunächst als proliferative Monozyten bezeichnet (PM) [7, 8, 9, 10] und es wurde angenommen, dass diese Zellen an den Ort der Inflammation vordringen [11, 12, 13, 14], ihn aber nicht mehr verlassen. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass es sich hierbei offensichtlich um zirkulierende Makrophagen handeln muss [15, 16, 17, 18].

In publizierten Studien konnten wir zeigen, dass diese zirkulierenden Makrophagen zusätzlich Anteile enthalten, die epithelialen Ursprungs (zur Gewebezelle gehörig) sind. Diese epithelialen Anteile waren u. a. epitheliales Membranantigen, Cytokeratin und PSA [19]. Damit muss angenommen werden, dass diese Makrophagen bereits im Gewebe waren und die Fragmente der dort phagozytierten Zellen in sich tragen [19, 20]. Interessanterweise konnte die Anzahl der im Blut gefundenen zirkulierenden PSA-positiven Makrophagen (imPSA) zusätzlich für die Stratifizierung von Patienten in solche mit maligner Prostataerkrankung und solche ohne genutzt werden.

In dieser Arbeit soll der klinische Nutzen dieser Entdeckung für die Erkennung eines Prostatakarzinoms durch eine einfache Blutprobe und deren weitere Validierung dargestellt werden.

Patienten

Von September 2005 bis September 2006 wurden, zusätzlich zu den bisherigen Untersuchungen [19, 20, 21], 38 Patienten mit und 36 Patienten ohne Prostatakarzinom untersucht (■ **Tab. 1**). Diese Patienten wurden geblendet in 2 voneinander unabhängigen Studienzentren (43 Patienten aus Zentrum 1, 31 Patienten aus Zentrum 2) untersucht. Insgesamt besaßen 18 Patienten ein lokal begrenztes Prostatakarzinom. Diese Patienten waren alle negativ für Prostatakarzinome in den

Tab. 1 Vergleich verschiedener PSA-Messverfahren für Patienten mit BPH oder Prostatakarzinom und Kontrollen

Parameter	Patienten (Nr.)	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanzniveau
imPSA				
Kontrolle	20	1,82	1,79	n.s. ^a
BPH	16	2,95	2,26	
Lokal begrenztes Prostatakarzinom	18	12,76	9,73	0,0001 ^b
Metastasiertes Prostatakarzinom	20	29,44	16,18	0,0001 ^c
Serum-PSA				
Kontrolle	20	0,79	1,6	0,005 ^d
BPH	16	19,28	33,55	
Lokal begrenztes Prostatakarzinom	18	11,23	9,44	n.s. ^e
Metastasiertes Prostatakarzinom	20	203,20	231,37	0,001 ^f

^avs. BPH.
^bvs. BPH, vs. Kontrolle.
^cvs. lokal begrenztes Prostatakarzinom, vs. BPH.
^dvs. BPH.
^evs. BPH, vs. Kontrolle.
^fvs. lokal begrenztes Prostatakarzinom, vs. BPH.

intraoperativ entnommenen Lymphknoten. Die Blutprobe wurde 1 Tag präoperativ entnommen. Weitere 20 Patienten litten an einem metastasierten Prostatakarzinom mit Knochenmetastasen, welche mittels Computertomographie (CT) und Knochenscan verifiziert wurden. Als Kontrollgruppe dienten Patienten mit entweder histologisch durch Biopsie bestätigter benigner Prostatahypertrophie (BPH) oder gesunde junge Personen (14 Männer, 6 Frauen, Kontrolle).

Probenabnahme, Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie

Für die Analyse wurden dem Patienten 6 ml Vollblut in einem speziellen Abnahmeröhrchen, einem sog. „cell preparation tube“ (CPT™) mit Natriumzitrat (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), entnommen. Dieses Produkt kombiniert ein Antikoagulantium mit einem Ficoll-Dichtegradienten, die durch eine Gelbarriere voneinander getrennt sind. Durch eine einmalige 5-minütige Zentrifugation können die peripheren blutmonozytären Zellen (PBMC) abgetrennt werden und stehen sofort der weiteren Analyse zur Verfügung.

Anschließend wurde eine Oberflächenfärbung mit Allophycocyanin (APC-)konjugiertem monoklonalen Antikörper (mAb) gegen CD14 (Clone MΦ P9, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), und einem Fluoresceinisothiocyanat-

anate- (FITC-)konjugiertem Anti-CD16-Antikörper (Clone NPK15, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Aliquot dieser Probe intrazellulär mit einem Phycoerythrin-gelabelten PSA-Antikörper (Clone ER-PR8), wie zuvor bereits beschrieben [19, 20], gefärbt.

Mindestens 10.000 Zellen wurden untersucht. Zentrum 1 benutzte ein LSR1-Durchflusszytometer (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA) mit CellQuest-Pro-Software (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA), die Zelluntersuchungen im Zentrum 2 wurden mit einem FACS-Calibur-Durchflusszytometer (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA) unter Verwendung der CellQuest-Software (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt.

Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Zellen wurden zunächst im sog. „forward scatter/side scatter dot plot“ dargestellt und die Monozyten/Makrophagen für weitere Multifarbanalysen selektiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte dann in einer CD14/CD16- bzw. CD14/PSA-Darstellung. Für die statistische Auswertung wurde die SPSS 12.0-Software für Windows (Chicago, IL, USA) benutzt.

Die Daten wurden in Mittelwerten mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Subgruppenanalysen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests für 2 Grup-

pen und dem Kruskal-Wallis-Test für >2 Gruppen durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

Für die Ergebnisse wurde weiterführend die „receiver operator characteristics“ (ROC) zur Sensitivitäts-/Spezifitätsanalyse sowie der Fläche unter der Kurve (AUC) für Patienten mit Prostatakarzinom berechnet. Weiterhin wurde eine Regressionsanalyse für Serum-PSA und imPSA im Hinblick auf das Erkrankungsstadium durchgeführt.

Ergebnisse

Die schon zuvor beschriebenen guten Ergebnisse [4, 19, 20] können auch in der jetzt als geblendet durchgeführten Multicenteruntersuchung weiterhin bestätigt werden. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der im Blut auftauchenden zirkulierenden Makrophagen zwischen Patienten mit lokal begrenztem und metastasiertem Prostatakarzinom (■ **Tab. 1**). Ein typischer „dot plot“ eines Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom ist in ■ **Abb. 1** dargestellt.

Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, dass eine signifikante Unterscheidung zwischen den Kontrollpatienten, Patienten mit BPH und solchen mit lokal begrenztem Prostatakarzinom eindeutig möglich ist (■ **Tab. 1**). Es konnte ein statistisch signifikanter Anstieg des imPSA zwischen der Kontrollgruppe ($p = 0,0001$)

und BPH-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Prostatakarzinom gefunden werden (■ **Tab. 1**). Wegen der hohen SD war diese Unterscheidung mit Hilfe des klassischen Serum-PSA-Tests nicht möglich (■ **Tab. 1**). Diese Ergebnisse waren zwischen den Studienzentren nicht statistisch signifikant unterschiedlich (■ **Abb. 2**).

■ **Tab. 1** zeigt weiterhin, das sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der zirkulierenden Makrophagen zwischen der Kontrollgruppe (n=20), Patienten mit BPH (n=16) und Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom (n=18) ergibt. Es zeigt sich, dass der imPSA-Wert bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom im Mittel 3-mal höher ist, verglichen mit Patienten mit BPH (p=0,0001). Weiterhin zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit metastasiertem und lokal begrenztem Prostatakarzinom. Der imPSA-Wert lag bei den metastasierten Patienten im Mittel doppelt so hoch (p=0,0001).

Die AUC für den imPSA-Wert lag bei 0,966 (p=0,0001). Eine Regressionsanalyse zeigt, dass imPSA ein vom Serum-PSA-Wert unabhängiger Marker bei BPH [R-Square=0,176, nicht signifikant (n.s.)] und lokalisiertem Prostatakarzinom (R-Square=0,021, n.s.) ist.

Um die Leistungsfähigkeit des Tests in Bezug auf Sensitivität vs. Spezifität zu ermitteln, wird eine ROC für das Unterscheidungsmerkmal „lokal begrenztes Prostatakarzinom“ geplottet (nicht abgebildet). Die AUC für diese Gruppe beträgt 0,966 (p=0,0001).

Diskussion

Die Spezifität des Serum-PSA-Tests muss als suboptimal angesehen werden, da in nahezu 75% der Männer mit einem Serum-PSA-Wert zwischen 4 und 10 ng/ml bei der Biopsie kein Karzinom gefunden wird [22, 23]. Um aber mit dem aggressiven und metastasierungsfreudigen Potential einiger früher Prostatakarzinomtypen umgehen zu können, werden neue Testverfahren dringend benötigt.

Um diesem Anspruch gerecht zu werden haben wir eine neue Methode entwickelt, die auf der Basis von im Blut zirkulierenden phagozytosefähigen Zellen be-

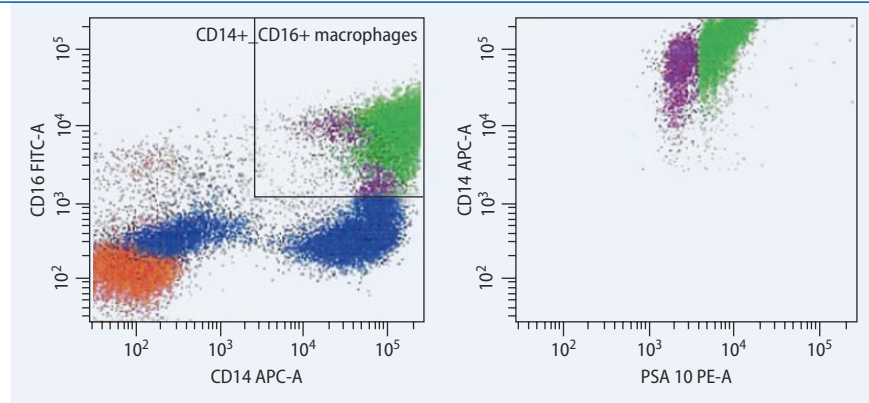


Abb. 1 ▲ „Dot plot“ einer CD14/CD16- (a) und einer imPSA/CD14-Verteilung (b) bei einem Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom. Die roten Punkte repräsentieren Lymphozyten und andere CD14⁻-Zellen; die blauen Punkte im unteren linken Eck stehen für CD14^{low+}-Monozyten; die blauen Punkte in der rechten unteren Ecke zeigen CD14⁺CD14⁺⁺-Monozyten; die violetten Punkte charakterisieren CD16⁺-Zellen. Im oberen linken Eck zeigen sich natürliche Killerzellen, im oberen rechten Eck die Makrophagen. Die grün markierten Punkte zeigen Zelle, die zusätzlich imPSA enthalten

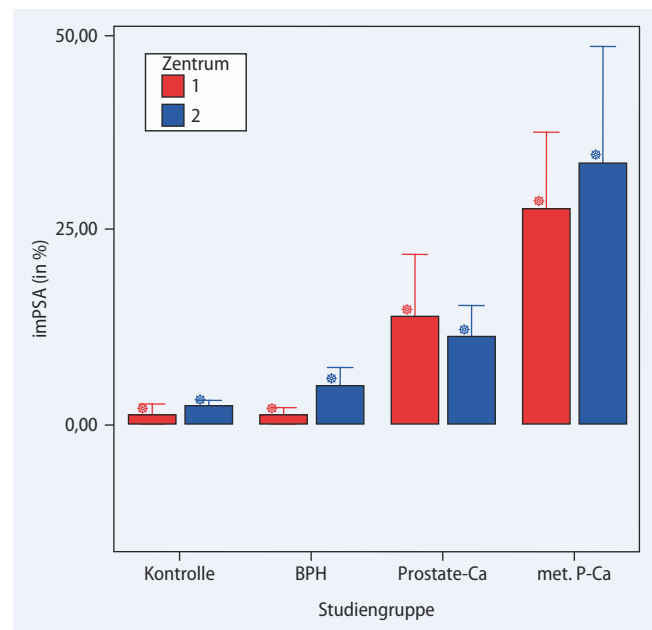


Abb. 2 ► Verteilung der Kontrolle mit BPH oder Prostatakarzinom und imPSA in 2 unterschiedlichen Studienzentren

ruht. Diese spezielle, erst kürzlich entdeckte Subpopulation der monozytären Zellreihe enthält neben Baustrukturen von epithelialen Zelle wie Cytokeratin und epithelalem Membranantigen auch PSA bei Patienten mit einem Prostatakarzinom [19, 20]. Zur besseren Isolierung dieser Zellreihe und Stabilisierung der Ergebnisse ist eine Anfärbung der Zelloberfläche mit CD14 und CD16 nützlich [21]. Zusätzlich konnten wir die bisherigen guten Ergebnisse in einer geblindeten Multicenteruntersuchung verifizieren. Trotz der unterschiedlichen benutzten Geräte und unterschiedlicher Gerätesoftware waren die Ergebnisse zwischen den beiden

Studienzentren im Bezug auf die untersuchten Gruppen nicht statistisch signifikant unterschiedlich (■ **Abb. 2**).

Mit Hilfe der imPSA-Bestimmung war es möglich, eine klare, statistisch signifikante Differenzierung zwischen Patienten mit BPH und lokal begrenztem Prostatakarzinom vorzunehmen. Dies war wegen der großen Spanne der Werte und der daraus resultierenden hohen SD durch die Serum-PSA-Bestimmung nicht möglich. Diese Ergebnisse demonstrieren noch einmal die Überlegenheit des imPSA-Tests über die konventionelle Serum-PSA-Bestimmung. Durch eine Regressionsanalyse der Daten kann gezeigt wer-

den, dass der imPSA-Wert ein vom Serum-PSA unabhängiger Marker ist.

Unserer Meinung nach ist die Untersuchung des imPSA-Wertes eine hoch spezifische unabhängige Methode zur Differenzierung zwischen benigner und maligner Prostataerkrankung. Dieser Parameter ist einfach zu bestimmen und liefert stabile Analyseergebnisse. Unsere weiteren Forschungsbemühungen zielen darauf hin, dieses neue Testverfahren als Screeningmethode einer breiten Öffentlichkeit zugänglich zu machen.

Korrespondenzadresse

Dr. R. Herwig

Urologische Klinik, Medizinische Universität
Währinger Gürtel 18–20, 1090 Wien
Österreich
ralf.herwig@meduniwien.ac.at

Literatur

- Hsing AW, Chokkalingam AP (2006) Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 11: 1388–1413
- Chodak G (2006) Prostate cancer: epidemiology, screening, and biomarkers. *Rev Urol* 8(Suppl 2): 3–8
- Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF (1987) Immunoelectron microscopic localization of prostatic-specific antigen in human prostate by the protein A-gold complex. *Cancer* 60: 1288–1293
- Hamdy FC, Lawry J, Anderson JB et al. (1992) Circulating prostate specific antigen-positive cells correlate with metastatic prostate cancer. *Br J Urol* 69: 392–396
- Fadlon EJ, Rees RC, McIntyre C et al. (1996) Detection of circulating prostate-specific antigen-positive cells in patients with prostate cancer by flow cytometry and reverse transcription polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 74: 400–405
- Nockher WA, Scherberich JE (1998) Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 66: 2782–2790
- Cheung DL, Hamilton JA (1992) Regulation of human monocyte DNA synthesis by colony-stimulating factors, cytokines, and cyclic adenosine monophosphate. *Blood* 79: 1972–1981
- Finnin M, Hamilton JA, Moss ST (1999) Direct comparison of the effects of CSF-1 (M-CSF) and GM-CSF on human monocyte DNA synthesis and CSF receptor expression. *J Interferon Cytokine Res* 19: 417–423
- Finnin M, Hamilton JA, Moss ST (1999) Characterization of a CSF-induced proliferating subpopulation of human peripheral blood monocytes by surface marker expression and cytokine production. *J Leukoc Biol* 66: 953–960
- Moss ST, Hamilton JA (2000) Proliferation of a subpopulation of human peripheral blood monocytes in the presence of colony stimulating factors may contribute to the inflammatory process in diseases such as rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 202: 18–25
- Bitterman PB, Saltzman LE, Adelberg S et al. (1984) Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J Clin Invest* 74: 460–469
- Hamilton JA (1993) Rheumatoid arthritis: opposing actions of haemopoietic growth factors and slow-acting anti-rheumatic drugs. *Lancet* 342: 536–539
- Henderson B, Glynn LE, Bitensky L, Chayen J (1981) Evidence for cell division in synoviocytes in acutely inflamed rabbit joints. *Ann Rheum Dis* 40: 177–181
- Jutila MA, Banks KL (1988) Increased macrophage division in the synovial fluid of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Infect Dis* 157: 1193–1202
- Hornell TM, Burster T, Jahnsen FL et al. (2006) Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J Immunol* 176: 3536–3547
- Quadbeck B, Stucke M, Eckstein AK et al. (2006) Dysregulation of TNF/TNFR superfamily members: A systemic link between intra- and extrathyroidal manifestations in Graves' disease. *Scand J Immunol* 64: 523–530
- Tacke F, Randolph GJ (2006) Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211: 609–618
- Gille C, Spring B, Tewes L et al. (2006) A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults. *Cytometry A* 69: 152–154
- Herwig R, Horninger W, Rehder P et al. (2005) Ability of PSA-positive circulating macrophages to detect prostate cancer. *Prostate* 62: 290–298
- Herwig R, Pelzer A, Horninger W et al. (2004) Measurement of intracellular versus extracellular prostate-specific antigen levels in peripheral macrophages: a new approach to noninvasive diagnosis of prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 3: 184–188
- Herwig R, Djavan B, Kramer G et al. (2006) Differentiation enhancement of circulating immune cells containing intracellular PSA: A new method for discrimination between benign and malignant prostatic disease. *J Urol* 175: 82
- Barry MJ (2001) Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med* 344: 1373–1377
- Ornstein DK, Kang J (2001) How to improve prostate biopsy detection of prostate cancer. *Curr Urol Rep* 2: 218–223