

舌癌組織における von Hippel-Lindau タンパク質  
発現の免疫組織化学的検討(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系耳鼻咽喉科学専攻

長谷川 央

修了年 2016 年

指導教員 大島猛史

## I. 緒言

### 1. 舌癌における von Hippel-Lindau (VHL) タンパク質発現に着目した背景

舌癌が属する頭頸部癌の罹患数は年々増加の一途をたどり、ここ数十年予後の改善は乏しいのが現状である。頭頸部癌は、約 90%が扁平上皮癌であり、その進行はがん抑制遺伝子とがん遺伝子の多段階な変化によるものと考えられている(1)。頭頸部癌における遺伝子異常の解析では、染色体 3p、9p、17p 領域に loss of heterozygosity (LOH) が多いとされている(2)。染色体 3p 上で LOH 頻度が高い部位の近傍に位置する代表的ながん抑制遺伝子に *VHL* 遺伝子(3p25)がある(3)。*VHL* 遺伝子については、これまで同遺伝子と特に関連の深い腎細胞癌で研究が進められてきた。腎細胞癌全体の約 80%を占めるのは淡明細胞型腎細胞癌(4)であり、その 60-80%には *VHL* 遺伝子の異常を認める(4-6)。*VHL* 遺伝子の産物である product VHL (pVHL) の機能は、低酸素化で誘導される hypoxia-inducible factor (HIF) 1- $\alpha$  の分解を導くことにある(7)。HIF は、血管内皮増殖因子などを誘導し、血管新生や増殖をうながし、癌化や転移を促進させる(8-12)。

頭頸部癌の *VHL* 遺伝子の LOH については、いまだ一定の見解は得られていない。頭頸部領域は複数の臓器で構成されており、特に舌を含む口腔咽頭癌は他の頭頸部癌に比べて若年層での発症も多く散見され、遺伝的背景の影響が考えられている(13)。そのため対象を舌癌に絞って遺伝子変化やその影響を調査する意味がある。2008年、Asakawaらは *VHL* 遺伝子の LOH 解析を舌癌について検討し、初めて舌癌でも高頻度に *VHL* 遺伝子の LOH があることを証明した(14)。しかし、pVHL の舌癌における発現については、これまでほとんど検討がなされておらず、不明の点が多い。これが本研究で舌癌における pVHL 発現に着目した背景である。

### 2. Cytokeratin (CK) 13、17

口腔上皮の異形成とは、浸潤を欠く上皮内腫瘍性病変と定義される(15)。異形成は、単独もしくは浸潤癌周囲にしばしば認められ、CK13 および CK17 は、口腔内病変において異形成の補助的診断マーカーの候補とされている(16)。CK13 は、正常口腔粘膜上皮に発現し、悪性化に伴い消退する(17, 18)。CK17 は、正常粘膜上皮には発現せず、悪性病変で発現が認められる(16)。

### 3. LOH 解析

LOHとは、がん細胞で生じる様々なタイプのDNA障害のなかで、本来1対ある対立遺伝子のうちの片側の対立遺伝子が消失していることを示す。本研究では、ヘテロ接合型AGの症例をLOH判定可能例とし、各マーカーのピーク面積比を求め、

癌部AG比が非癌部AG比の60%未満をLOH陽性(Positive)とし、また60%以上をLOH陰性(Negative)とした。60%のカットオフ値は、LOHのモデル定量実験により定めた(19)。さらに、ヘテロ接合型AGがみられなかった症例をLOH判定不能例(not informative)とした。

## II. 目的

*VHL* がん抑制遺伝子の LOH が高頻度にみられる舌癌の組織において、pVHL の発現の様式や特徴を免疫組織化学染色により明らかにする。さらに LOH によって pVHL 発現に差がみられるかどうかを解析し、その発現様式の臨床的意義や有用性について検討する。

## III. 研究対象と方法

### 1. 腎細胞癌症例

1998年から2004年の7年間に日本大学附属病院および関連病院で治療を施行した散発性淡明細胞型腎細胞癌 Stage Ia(腫瘍径4cm以下)22例である。症例22例はすべて日本大学医学部泌尿器科学分野五十嵐智博博士によって *VHL* 遺伝子変異および LOH が解析され、供与を受けた(20)(表1)。腎正常組織においては、腎細胞癌組織を採取した際に組織に含まれていた正常組織部分を用いて検討した。

### 2. 舌癌症例

1999年から2003年の5年間に日本大学医学部附属板橋病院で治療を施行した原発性舌癌19例である。症例19例はすべて日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野浅川剛志博士によって *VHL* 遺伝子変異および LOH が解析され、供与を受けた(14)(表2)。mild、moderateあるいはsevere dysplasiaを異形成として扱った。それぞれの症例の中から標本として正常上皮、異形成、浸潤癌(高分化型、中分化型、低分化型)を抽出した。舌正常上皮においては、舌浸潤癌を採取した際に組織に含まれていた正常上皮部分を用いて検討した。

### 3. 免疫組織化学染色(Immunohistochemistry:IHC)

ホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片4 $\mu$ mを作製した。脱パラフィン処理

後、5%過酸化水素水で15分間インキュベートし、エタノール系列処理により水和した。抗原賦活化処理は、0.01Mクエン酸緩衝液(Citrate Buffer Solution pH 6.0、武藤化学社、東京、日本)に浸漬して圧力鍋で加熱処理をおよそ121°C、5分間で行った。ブロッキング液(PBSで調製した5%スキムミルク(Skim Milk Powder、和光社、大阪、日本))で各切片を37°Cで30分浸した。ブロッキング液を除去し、PBSで調製した1次抗体を37°Cで60分間反応させた。pVHLに対するマウスモノクローナル抗体(Purified Mouse Anti-VHL:556347、BD Biosciences社、California、USA)は100倍希釈で、抗CK13抗体(NCL-CK13、Leica Biosystems社、Nussloch、Germany)は100倍希釈で、抗CK17抗体(Anti-ck17 cloneE3 IR620、DAKO社、Glostrup、Denmark)は希釈済で反応させた。陰性対照として、PBSを使用した。発色キットとして、pVHLはヒストファインシンプルステインMAX-PO(ニチレイバイオサイエンス社、東京、日本)を用いてプロトコールに従って処理を行った。CK13、CK17については、Envision Plus kit (EnVision™ FLEX Mini Kit、DAKO社、Glostrup、Denmark)を用いた。発色はジアミノベンジジン(Diaminobenzidine;DAB)溶液(シンプルステインDAB溶液、ニチレイバイオサイエンス社、東京、日本)にて5分処理をし、ヘマトキシリン液にて核染色を行った。核染色後、脱水、透徹をし、封入した。

#### IV. 結果

##### 1. 腎細胞癌症例

腎正常組織ではpVHLは、近位尿細管で細胞質全体が染色された。また、淡明細胞型腎細胞癌は、全22例中16例(73%)でpVHLは染色された。淡明細胞型では、細胞質内の周辺部がよく染色された(図1B)。また、顆粒細胞型では、細胞質がびまん性に染色された(図1D)。

##### 2. 舌癌症例

舌正常上皮において検討すると、pVHLは基底層と、有棘層のうち基底層の周辺部の細胞質に局在して染色された(4標本中4標本)(図2B)。舌異形成において検討すると、pVHLは基底層から有棘層の中層程度まで陽性細胞の出現が拡大した(9標本中9標本)(図3B)。pVHL陽性細胞の拡大の程度はそれぞれの標本で異なっていた。舌浸潤癌において検討すると、高分化型では細胞質がよく染色された(14標本中14標本)(図4B)。また、癌巣周辺部では細胞質が染色され、癌巣中心付近では癌細胞の細胞質細胞膜近傍部が染色された。中分化型では、細胞質が高分化型よりもさらに強く染色された(6標本中6標本)(図4D)。低分

化型では、細胞質は高分化型よりも淡く染色された(3 標本中 3 標本)(図 4F)。結果として検討対象 19 例中 19 例で pVHL 染色は陽性であった。

### 3. pVHL 染色と CK13 および CK17 染色との比較

舌正常上皮では、CK13 は pVHL 陰性領域に染色された(図 5C)が、CK17 は全層で陰性を示した(図 5D)。

舌異形成では、pVHL、CK13、そして CK17 の染色パターンが様々に認められ、その組み合わせが 3 つに分類された(図 6)。パターン A は、CK13 陰性に伴い、CK17 が陽性になるタイプのもの(図 6cd)で、pVHL 染色は概ね CK17 と一致していた(図 6b)。このパターン A は代表的なタイプで舌異形成の 9 標本中 7 標本に観察された。パターン B(9 標本中 1 標本)は、CK13 が陰性で CK17 が全層で陽性であるタイプ(図 6gh)で、pVHL は有棘層の中層程度までの染色にとどまっており、全層で陽性ではなかった(図 6f)。パターン C(9 標本中 1 標本)は、CK13 が強く減弱しており、CK17 も弱陽性と異型度の判定の困難な染色パターン(図 6kl)だが、pVHL は異型細胞で陽性であった(図 6j)。

舌浸潤癌では、CK13 は全標本で陰性であった。CK17 との関係では、概ね両者の陽性・陰性部は一致していた(図 7)。しかし、詳細にみると、浸潤癌の高分化型で角化が進んだ部位では pVHL が染色されなかったのに対し、CK17 では強く染色された(図 7BC)。

### 4. VHL 遺伝子の LOH と pVHL 染色像との関連性

VHL 遺伝子の LOH 陽性 4 例と陰性 4 例で pVHL 染色像を比較した。LOH 陽性例と LOH 陰性例で染色態度に明確な差はなかった(図 8)。

## V. 考察

舌癌の pVHL 染色は、これまでに 1 つの報告をみるのみである(21)。しかし、そこに示された染色像は非特異的で、本研究とは異なる結果であった。異形成や LOH の検討もなく、舌癌での pVHL 陽性例は、27 例中 10 例(37%)で、本研究と大きく異なっていた。このような結果の差異は、使用した抗体や染色条件が異なることに起因すると考えられる。

舌正常上皮において pVHL が基底層と、有棘層のうち基底層の周辺部の細胞質に局在して染色されたのは、同部に存在する胚細胞あるいは未分化細胞が染色され易い特徴があるためと考えられる。近位尿管の正常上皮細胞はよく染色され(22)、また淡明細胞型腎細胞癌の発生母地と考えられている(23)。舌癌に

においても腎細胞癌における近位尿管との関係と同様のことを表していると考えられる。

臨床的に白板症として知られる病変には、反応性と腫瘍性の鑑別が困難なことも多い。近年、白板症の異型度をみる病理診断の補助として、CK13 や CK17 の発現パターンが有用であると認識されるようになってきた。CK13 および CK17 は、パターン A のような標本には異型度の評価に有用である。しかし、パターン B は、HE 染色では異形成を示しており、pVHL も HE 染色でみられた異型部で染色され、不一致がみられる。また、パターン C は、異型度の判定は困難である。舌異形成の異型部を検出する補助マーカーとして pVHL の方が感度の点で優れている可能性が示唆される。もし、pVHL が潜在的に増殖能を秘めた細胞に発現するのであれば、異形成の癌化への予後を予測できる新しいツールとなる可能性がある。

本研究では舌浸潤癌では、分化の程度によらず全標本で pVHL 染色がみられた。分化度による染色の特徴は、既知の報告と同様で癌細胞の密度が高いところに強く pVHL は発現するため(24)と考えられた。また、分化度の低い癌は pVHL 発現が低下しているという報告もある(25)。これらの点から、癌で pVHL 発現がみられたのは、より分化度の低い癌への進展、あるいは細胞のさらなる増殖亢進を抑制するために発現する可能性が考えられた。

本研究では舌癌において、*VHL* 遺伝子の LOH と pVHL の染色とは関連がみられず、舌癌全例で pVHL は染色された。このことは、*VHL* 遺伝子の変異や LOH は、pVHL の発現には影響を与えないと考えられた。

## VI. 結語

舌癌組織において pVHL の免疫組織化学染色を行い、*VHL* 遺伝子の LOH とは無関係に、全例で、そして非癌部よりもむしろ癌部で pVHL が発現していた。

pVHL 発現が腫瘍化過程に関連し、その免疫組織化学的染色が異形成の有無を判断する補助的マーカーとして病理組織診断に有用である可能性を示唆した。

表1. 淡明細胞型腎細胞癌 22 例

No.	Age	Sex	Genetic alternation		Grade
			Mutation	LOH	
1	68	M	N	N	1
2	51	M	N	N	2
3	50	M	N	N	2
4	32	M	N	N	2
5	58	M	N	N	1
6	58	M	N	P	1
7	64	F	N	P	1
8	46	M	N	P	1
9	60	F	N	P	1
10	74	M	N	P	2
11	59	M	N	P	1
12	62	F	P	N	1
13	44	M	P	N	2
14	68	F	P	N	1
15	35	M	P	P	2
16	72	M	P	P	2
17	60	M	P	P	1
18	57	M	P	P	2
19	42	M	P	P	1
20	77	M	P	P	2
21	70	M	P	P	1
22	56	F	ni	ni	2

LOH, loss of heterozygosity; P, positive; N, negative; ni, not informative. Grade 1 は高分化型、Grade 2 は中分化型。遺伝子異常は五十嵐らより引用した(20)。

表2. 舌癌 19 例

Case No.	Age	Sex	Stage	LOH	Grade	Histological examination				
						Normal	Dysplasia	Tumor (differentiation)		
								Well	Moderate	Poor
1	55	M	II	P	1		+	+	+	
2	56	F	II	P	1			+		
3	64	F	II	P	1			+		
4	73	M	II	P	2			+	+	
5	22	M	II	N	1		+	+		
6	30	F	IV	N	1			+		
7	32	M	IV	N	1	+		+		
8	62	F	I	N	1	+	+	+		
9	25	M	II	ni	1			+		
10	30	F	III	ni	1	+	+	+		+
11	66	M	I	ni	1		+	+		
12	72	F	I	ni	1	+		+		
13	73	F	II	ni	1		+	+	+	
14	76	M	I	ni	1			+		
15	79	F	II	ni	1		+	+		
16	61	F	II	ni	2			+	+	+
17	63	F	IV	ni	2		+		+	
18	69	M	III	ni	2		+		+	
19	76	F	III	ni	3					+
Total						4	9	16	6	3

LOH, loss of heterozygosity; P, positive; N, negative; ni, not informative. Grade 1 は高分化型、Grade 2 は中分化型、Grade 3 は低分化型。LOH 陽性・陰性は Asakawa らより引用した(14)。なお、全例で *VHL* 遺伝子変異はみられなかった(14)。

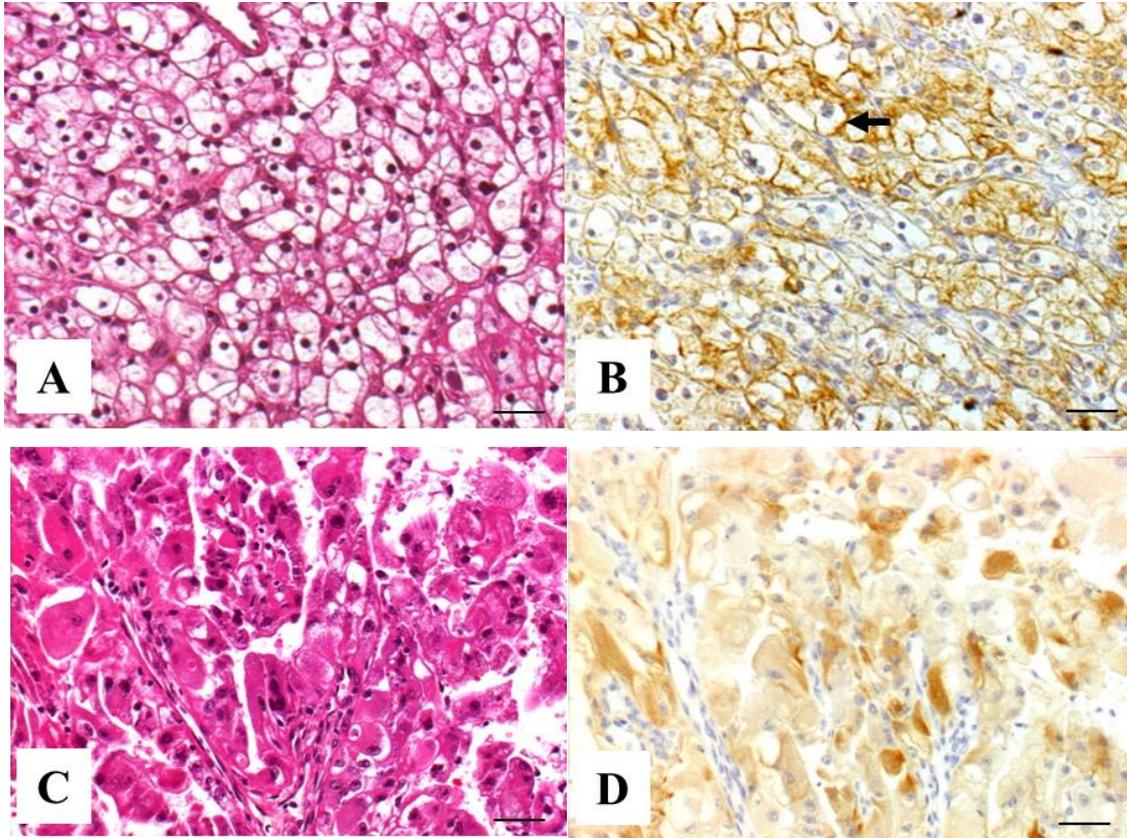


図1. 淡明細胞型腎細胞癌の HE 染色と pVHL の免疫組織化学染色  
(A)淡明細胞型腎細胞癌の HE 染色、(B)淡明細胞型腎細胞癌の pVHL 染色、矢印は癌細胞陽性部位を示す。(C)顆粒細胞型部分の HE 染色、(D)顆粒細胞型部分の pVHL 染色。スケールバーは 50  $\mu$ m。

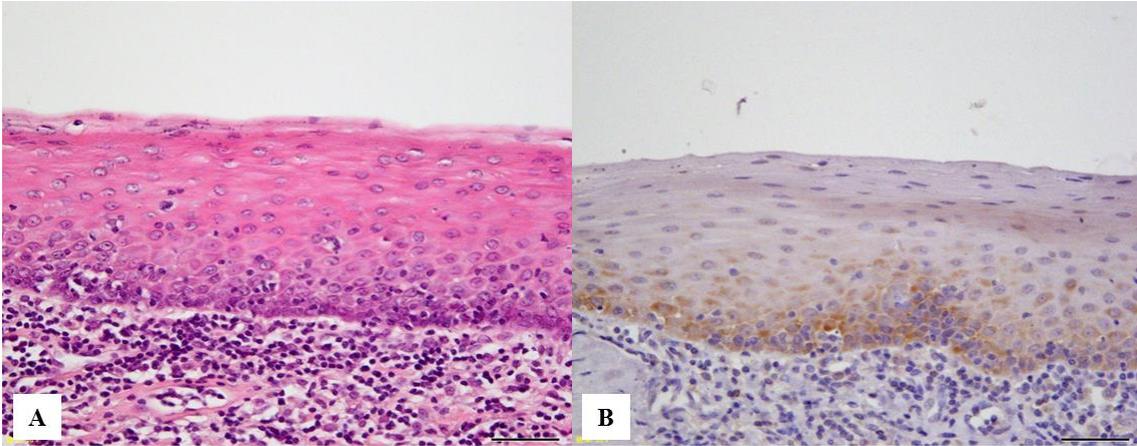


図2. 舌正常上皮の HE 染色と pVHL の免疫組織化学染色  
(A) 舌正常上皮の HE 染色、(B) 舌正常上皮の pVHL 染色。スケールバーは  $25\ \mu\text{m}$ 。

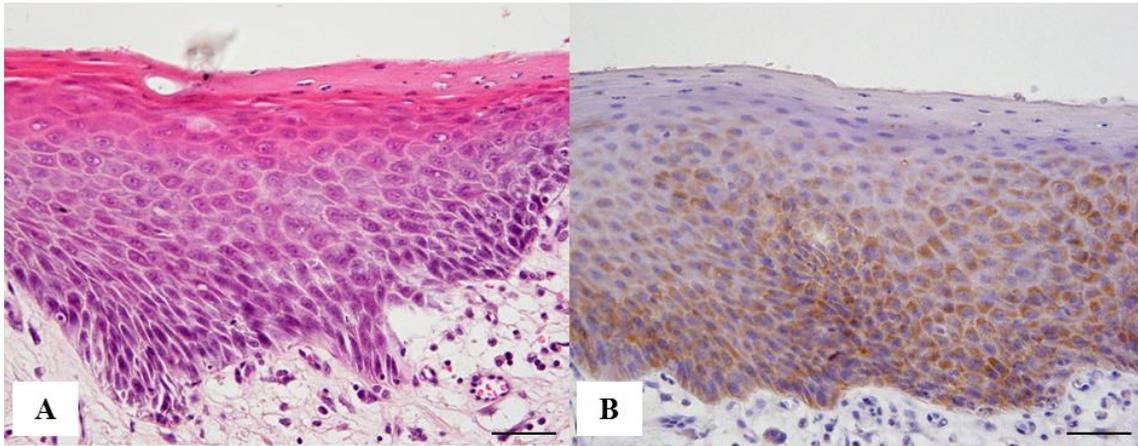


図3. 舌異形成の HE 染色と pVHL の免疫組織化学染色  
(A) 舌異形成の HE 染色、(B) 舌異形成の pVHL 染色。スケールバーは 25  $\mu$ m。

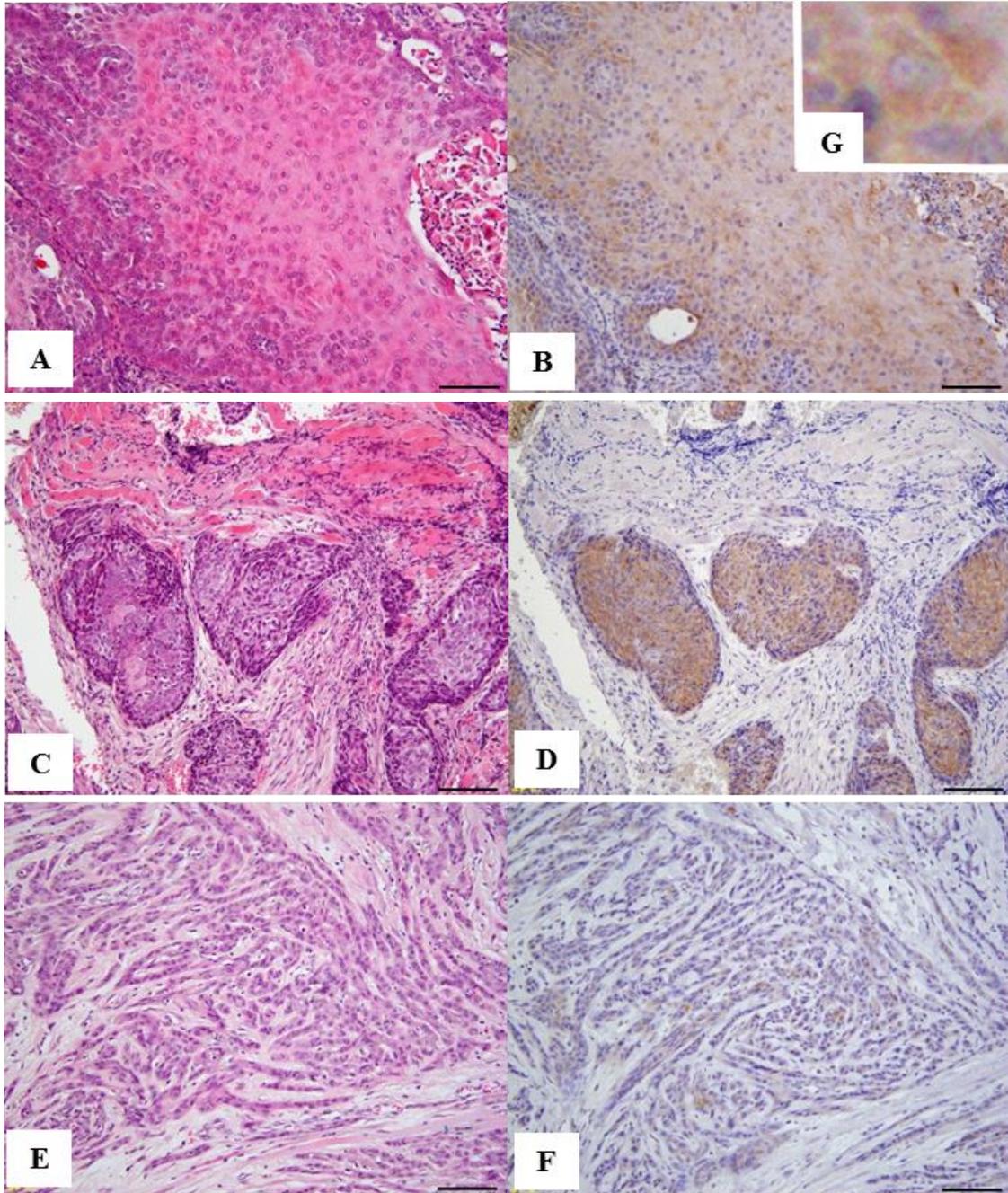


図4. 舌浸潤癌の HE 染色と pVHL の免疫組織化学染色：高分化型、中分化型、低分化型病変の比較  
 HE 染色(左)、pVHL 染色(右)。(A-B)高分化型、(C-D)中分化型、(E-F)低分化型、(G)B の強拡大。(A-F)スケールバーは 50  $\mu$ m。

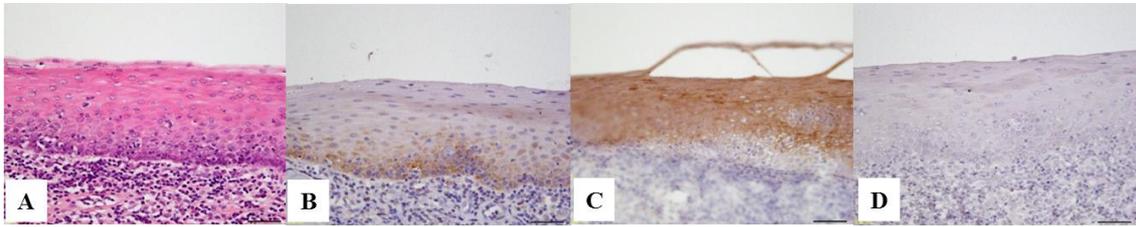


図5. 舌正常上皮の HE 染色と pVHL、CK13、CK17 の免疫組織化学染色の比較  
(A)HE 染色、(B)pVHL 染色、(C)CK13 染色、(D)CK17 染色。スケールバーは 25  $\mu$ m。

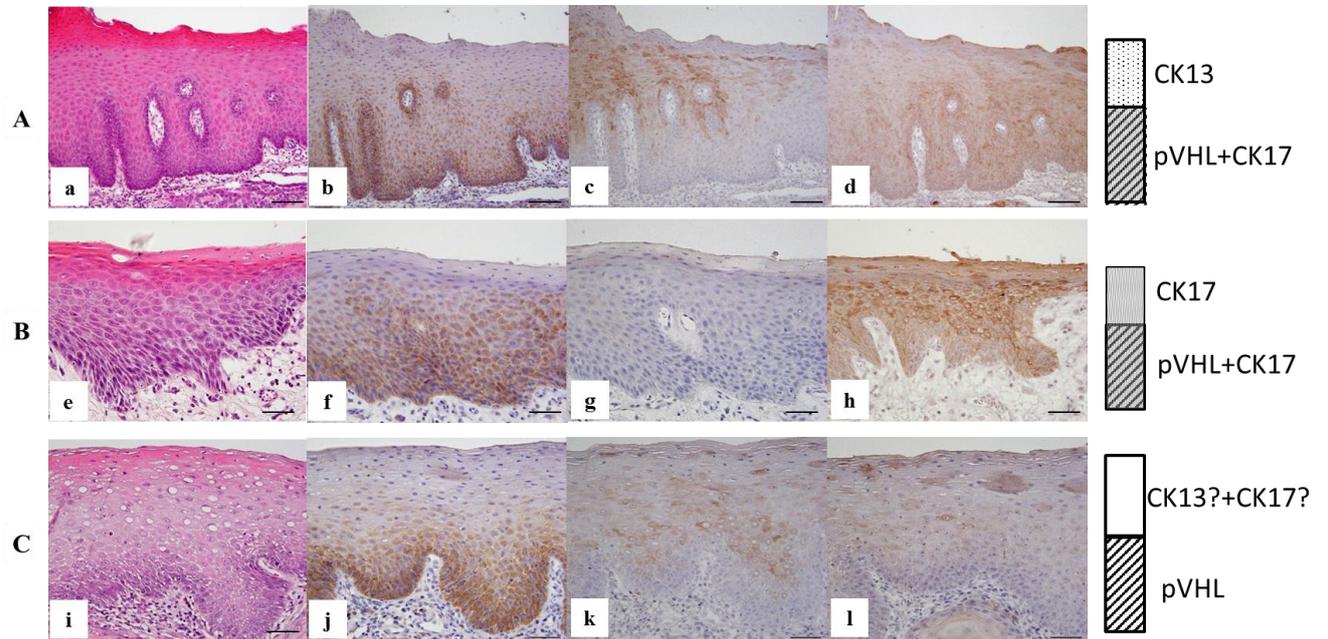


図6. 舌異形成の HE 染色と pVHL、CK13、CK17 の免疫組織化学染色の比較  
 HE 染色(1 列目)、pVHL 染色(2 列目)、CK13 染色(3 列目)、CK17 染色(4 列目)、  
 染色パターンの模式図。(a-d)パターン A、(e-h)パターン B、(i-l)パターン C。  
 スケールバーは  $25 \mu\text{m}$ 。

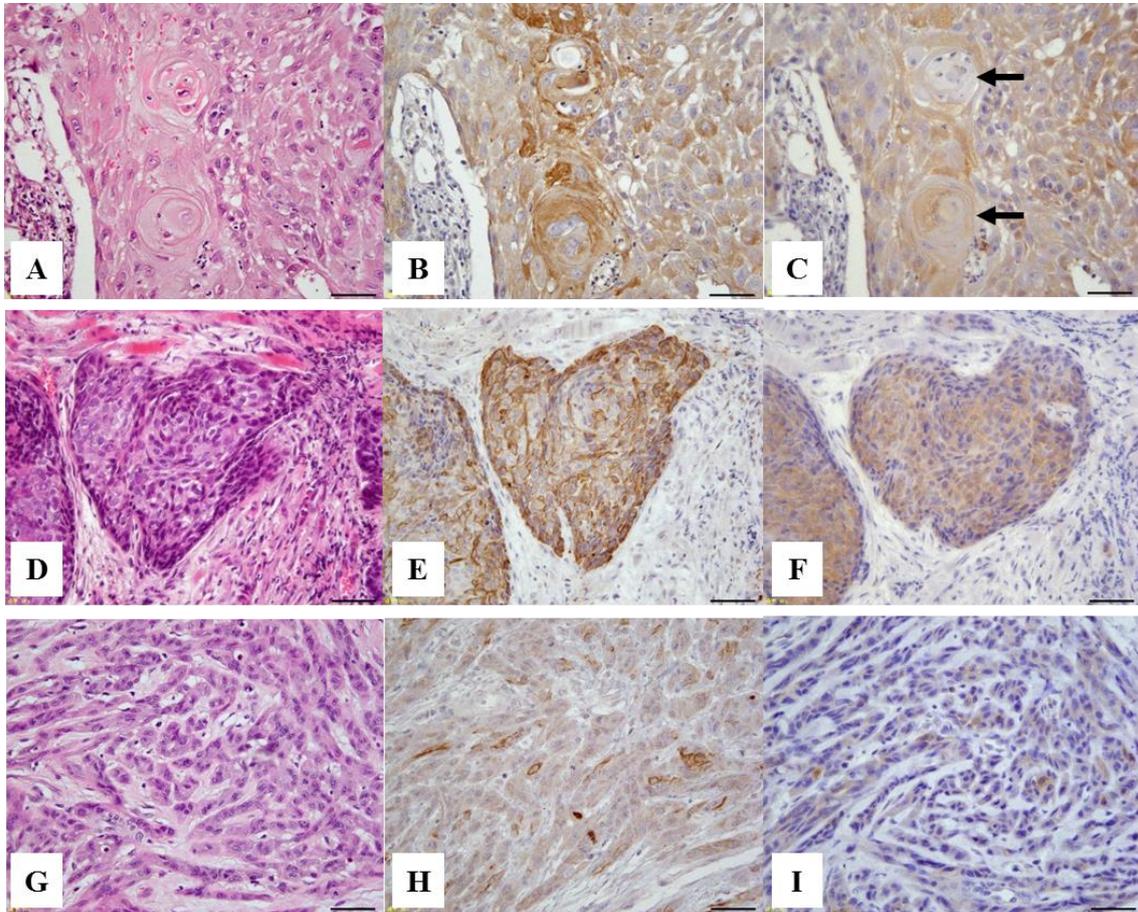


図7. 舌癌の pVHL と CK17 の免疫組織化学染色の比較  
 HE 染色(1 列目)、CK17 染色(2 列目)、pVHL 染色(3 列目)。(A-C)高分化型、矢印  
 は舌癌の角化が進んだ部位を示す、(D-F)中分化型、(G-I)低分化型。スケール  
 バーは 25  $\mu$  m。

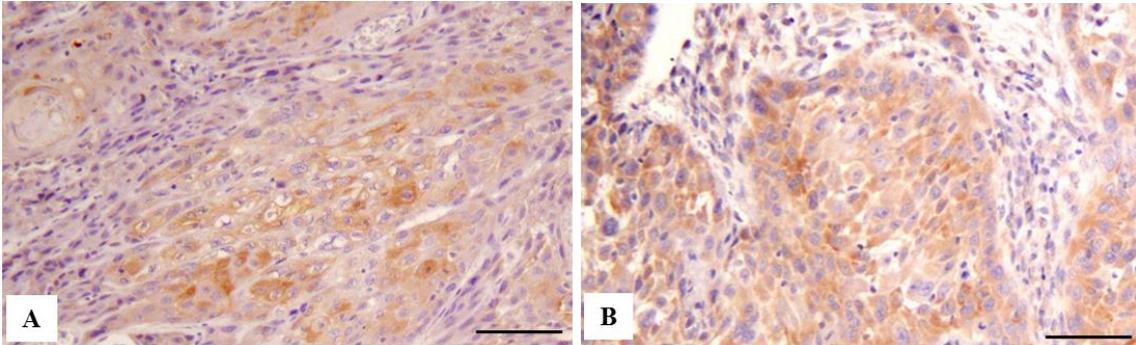


図8. 舌浸潤癌(高分化型)の LOH 陽性例と陰性例の pVHL 免疫組織化学染色の比較

(A) LOH 陽性例の pVHL 染色、(B) LOH 陰性例の pVHL 染色。スケールバーは 25  $\mu\text{m}$ 。

## 引用文献

1. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Research*. 1996;56(11):2488-92.
2. Scully C, Field J, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology*. 2000;36(3):256-63.
3. Waber PG, Lee NK, Nisen PD. Frequent allelic loss at chromosome arm 3p is distinct from genetic alterations of the Von-Hippel Lindau tumor suppressor gene in head and neck cancer. *Oncogene*. 1996;12(2):365-9.
4. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009;373(9669):1119-32.
5. Hamano K, Esumi M, Igarashi H, Chino K, ISHIDA and H, OKADA K. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2002;167(2):713-7.
6. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(23):2477-90.
7. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(2 Pt 2):680s-4s.
8. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genetics*. 1994;7(1):85-90.
9. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr., Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(20):10595-9.
10. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5.
11. Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene

mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *Journal of Urology*. 2003;170(2 Pt 1):588-92.

12. Kapitsinou PP, Haase VH. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(4):650-9.

13. Vargas H, Pitman KT, Johnson JT, Galati LT. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. *Laryngoscope*. 2000;110(10 Pt 1):1623-6.

14. Asakawa T, Esumi M, Endo S, Kida A, Ikeda M. Tongue cancer patients have a high frequency of allelic loss at the von Hippel-Lindau gene and other loci on 3p. *Cancer*. 2008;112(3):527-34.

15. Barnes L. *Pathology and genetics of head and neck tumours*: IARC; 2005. 177-8 p.

16. Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, et al. Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncology*. 2011;47(6):497-503.

17. Bloor BK, Seddon SV, Morgan PR. Gene expression of differentiation-specific keratins (K4, K13, K1 and K10) in oral non-dysplastic keratoses and lichen planus. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2000;29(8):376-84.

18. Ohta K, Ogawa I, Ono S, Taki M, Mizuta K, Miyauchi M, et al. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. *Oncology Reports*. 2010;24(1):9-14.

19. Mochida Ji, Esumi M, Kitajima A, Okada K. Allelic loss analysis of tumor suppressor genes regardless of heterozygosity: von Hippel-Lindau gene loss in renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2008;180(2):724-8.

20. 五十嵐 智, 高橋 悟, 江角 真. VHL 遺伝子異常の有無による淡明細胞型腎細胞癌の違いについて 包括的遺伝子発現解析による比較. *日大医学雑誌*. 2007;66(1):87-96.

21. Zhang S, Zhou X, Wang B, Zhang K, Liu S, Yue K, et al. Loss of VHL expression contributes to epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2014;50(9):809-17.

22. Corless CL, Kibel AS, Iliopoulos O, Kaelin WG, Jr. Immunostaining of the von

Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Human Pathology*. 1997;28(4):459-64.

23. Cohen C, McCue PA, Derosé PB. Histogenesis of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical study. *Cancer*. 1988;62(9):1946-51.

24. Mohan S, Burk RD. von Hippel–Lindau protein complex is regulated by cell density. *Oncogene*. 2003;22(34):5270-80.

25. Chen C, Zhou H, Liu X, Liu Z, Ma Q. Reduced expression of von Hippel-Lindau protein correlates with decreased apoptosis and high chondrosarcoma grade. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2011;93(19):1833-40.