

両側性腎癌における *VHL* 遺伝子の解析

—発生機序と臨床応用に関する考察—

久米 春喜

論文題目

両側性腎癌における *VHL* 遺伝子の解析

—発生機序と臨床応用に関する考察—

久米春喜

目次

[I] 研究目的および研究背景

[II] 対象

[III] 材料および方法

1. DNA 抽出

2. DNA 増幅

3. ダイレクトシーケンス

[IV] 結果

1. 両側性腎細胞癌症例の臨床像

a) VHL 病症例

b) 散発性症例

2. VHL 病症例の VHL 遺伝子解析

3. 散発症例での腫瘍の VHL 遺伝子解析

[V] 考察

1. VHL 病症例の VHL 遺伝子解析

2. 散発症例での腫瘍の VHL 遺伝子解析

[VI] 結語

[VII] 謝辞

[VIII] 文献

[I] 研究目的および研究背景

腎細胞癌は 60 歳台の成人に好発する腎尿細管に由来する悪性腫瘍で、腎臓全体の悪性腫瘍の約 80~90%を占める。組織学的には淡明な胞体を有する細胞が胞巣状に列するいわゆる clear cell type の腫瘍を主体とするが、その他、嚢胞状や乳頭状の発育を示すものも存在する。通常は片側の腎臓に単発するが、約 2%~4%の症例では両側性に発生する (1-3)。両側性腎細胞癌は von Hippel-Lindau (VHL) 病などの遺伝性疾患を有する症例に高頻度で発生するが (4-6)、そのような遺伝性疾患を有さない症例にも発生する。例えば、組織学的に乳頭状の発育を示す乳頭状腎細胞癌ではしばしば両側の腎臓に腫瘍が多発する (7)。

両側性腎細胞癌は 1910 年に Chute により第 1 例目が報告された (8)。本邦では 1963 年に中川らにより第 1 例目が報告され (9)、以来 130 例を超える報告がなされている (図 1) (10)。両側性腎細胞癌ではこれまで主に治療法、治療成績に関することが議論の対象とされてきた。すなわち根治性のために両側の腎摘除術を施行し血液透析を行うか、片側もしくは両側の腎臓を温存する手術を施行するか、という手術方針に関する点、また温存手術でも部分切除術、核出術の適応、最近では体外手術の適応 (11, 12)、といった手術方法に関する点、手術成績や予後に関する点などについて論ぜられている (13-23)。

一方で、両側性腎細胞癌の病態や腫瘍発生に関しての報告、研究は比較的少ない。そのなかで古くから論点になっていることは、両側の腎臓に腫瘍があった場合、腫瘍が独立して発生したものなのか、片側から対側に転移したものなのか、という点である。過去の報告では臨床的、病理学的な見地から、いくつかの診断基準が提唱されている (13, 24-27)。しかし、これらの基準は形態学のみを比較に基づいているため、全ての場合に当てはまるわけではないことも指摘されている (27)。特に左右の組織像が類似している場合は困難である (10, 28)。また対象となる症例の中に VHL 病症例が含まれている可能性があること、組織型で乳頭状腎細胞癌症例が含まれているか

が明確にされていないことも不十分な点と考えられた。

最近になり、分子生物学的な手法を用いて両側性腎細胞癌の解析がなされるようになった(29-32)。Weaverらは、4例の両側性腎細胞癌を有する症例から得られた6つの腫瘍につき細胞遺伝学的な解析を行い、両側性腎細胞癌が第3、第7染色体の数の増加と性染色体の欠失があるという結果を示している(29)。またCinらは、5例の両側性腎細胞癌症例の細胞遺伝学的な解析を行い、また過去に文献で報告されている7例の症例の結果を合わせ考察し、非乳頭状腎細胞癌では左右のkaryotypeが異なっており、左右とも独立した発生であると結論している(32)。しかしこれらの報告も対象症例数が少ない上に、左右腫瘍のkaryotypeを比較したもので、対側への転移性のものなのか、両側ともに原発性であるのかを明確に区別するには、限界があると考えられる。

以上のように、両側性腎細胞癌の病態は今なお十分に解明されていないと言える。この理由として、1) VHL病の有無が必ずしもすべての報告で明らかにされていないこと、2) 乳頭状と非乳頭状などの組織型の分類が必ずしも十分でないこと、3) 対側への転移性、両側原発性の鑑別を明確にできるような良いマーカーがなかったことなどを考えた。

このような中、1993年にVHL病の原因遺伝子であるVHL遺伝子が染色体3p25-26上にクローニングされた(33)。VHL遺伝子の不活化は、早期癌を含めた非乳頭状腎細胞癌の約60%で観察され、まさにVHL遺伝子の不活化が非乳頭状腎細胞癌のごく初期の発生段階において重要な役割を果たすことも示された(34)。

本研究ではこの点に着目し、このVHL遺伝子こそがclonalityを明確にする良いマーカーとなると考え、これを解析した。まずgermlineの変異をみることにより、表現型が不完全なVHL病の有無を明らかにすることができると考えた。また腫瘍での変異を左右で比較することにより、これまで必ずしも明確にできなかった、左右の腎細胞癌のclonalityを明らかにし、これらの腫瘍が同一の起源を持つものなのか(対側への転移症例、Contralateral Metastatic Type)、異なる起源を持つものなのか(両側原発性、Bilateral Primary

Type) を検討した。最後にこれらの症例で、病理組織、臨床経過、などを再度検討しそれらの特徴につき考察した。また両側性腎細胞癌患者における *VHL* 遺伝子解析の臨床応用の可能性についても考察した。

[II] 対象

東京大学医学部附属病院、およびその関連施設の両側性腎癌症例 17 例を対象とした (表 1, 2)。剖検時に多発性他臓器転移をきたしていた剖検症例、発見時に多発性他臓器転移をきたしていた手術症例は除外した。ただし、1 つの肺転移巣を有する症例は含めた (症例 NP-8)。これら 17 例のうち、2 例は剖検例で、他の 15 例は手術例である。これらの両側性腎細胞癌の臨床経過、手術記録、病理組織像を再度検討した。

これら 17 例のうち 4 例 (3 家系) は、以前に報告された診断基準で臨床的に VHL 病と診断された (38-40)。残り 13 例のうち 3 例 (1 例の剖検症例を含む) の組織型は乳頭状腎細胞癌であった (図 2) (1, 7)。他の 10 例の組織型は非乳頭状腎細胞癌であった (図 3)。

VHL 病 4 例全例 (3 家系) で本人の同意のもと、末梢血の採血を行った。乳頭状腎細胞癌症例 3 例中 2 例、及び、非乳頭状腎細胞癌症例の 10 例中 9 例で、ホルマリン固定、パラフィン包埋した病理組織ブロックが得られ、以下解析を行った。

[III] 材料および方法

1. DNA 抽出

VHL 病症例より採血された末梢血 10ml を遠心し血球成分を分離し凍結保存した。以下の解析のために、解凍後に約 250 μ l を 1.5ml の遠心チューブに移し DNA 抽出を行った。

VHL 病症例以外の腫瘍組織、および非腫瘍部の組織（腎臓の非腫瘍部の組織）を得るために、これらの部分を含む病理組織ブロックで各々 8 μ m 厚の切片を数枚の作成した。これらの切片を、37°C、1 時間、キシレンにより 2 度脱パラフィン処理した。空気乾燥の後、1 切片は、腫瘍の範囲を正確に同定するために、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。この切片は、DNA 抽出のための鋳型として用いた。この切片を顕微鏡で十分に観察し、腫瘍の範囲および正常組織の範囲を正確に決めた。腫瘍範囲にはリンパ球などの血球成分や壊死した部分などができるだけ混在しない部分を選択した。腫瘍組織および正常組織を各々約 0.5 cm^2 の範囲より切り取り 1.5ml の遠心チューブに入れた。

これらに 500 μ l の抽出用混合液（1% SDS、10 mM Tris/ pH7.5、50 mM NaCl、10 mM EDTA、100mg/ml プロテイナーゼ K）を混合し、45°C にて一晚反応させた。500 μ l のフェノールをよく混合し 14,000rpm にて 5 分遠心、上清を抽出した。更にクロロホルム・イソアミルアルコール（24:1）500 μ l をよく混合し 14,000rpm にて 5 分遠心の後上清を抽出した。5M NaCl を加えてエタノール沈殿を行い、沈殿を TE バッファに溶解し約 200 μ g/ml に調製した。

2. DNA 増幅

VHL 遺伝子の全 3 エクソンのタンパク翻訳領域を PCR（Polymerase Chain Reaction）法によって増幅した。PCR で用いたプライマーはタンパク翻訳領域をすべて含むように設定された（図 4）。

PCR 反応は、25 μ l の系で行った。組成は鋳型 DNA 1.5 μ l、dNTP 混合物（それぞれ 2 mM）3 μ l、10x PCR バッファー 2.5 μ l、プラ

イマー (20 pmol/ μ l) 0.75 μ l、を混合し最後に 0.2 単位 Taq ポリメラーゼ (Boeringer Mannheim 社) を加え、これらの混合液を 94°C、3 分変性した後、94°C20 秒、60°C20 秒、72°C20 秒の反応を 40 回施行した (9700 Thermocycler, Perkin Elmer Cetus)。各検体につき、PCR 産物のうち 15 μ l を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した。増幅された PCR 産物のバンドをアガロースゲルより切り出し、SuprecTM-01 キット (Takara) を用いて精製し、60 μ l の蒸留水に溶解した。

3. ダイレクトシーケンス

精製した PCR 産物は、Thermo Sequence Cycle Sequence キット (Amersham 社) を用いてシーケンスした。まず、シーケンスプライマーとして、上記の PCR で用いたプライマーの片方を選び、³²P によりラベルした。[γ -³²P]ATP 4 μ l、プライマー 1 μ l、T4 polynucleotide kinase 1 μ l (Takara)、10x バッファー 1 μ l、蒸留水 3 μ l を混合し、37°C にて 30 分反応させた。このラベルしたプライマー 1 μ l に上記 PCR 産物 4 μ l、反応用バッファー 2 μ l、polymerase 2 μ l、蒸留水 8.5 μ l を混合した。この混合液を 4 μ l ずつ、ddG termination mix 4 μ l、ddA termination mix 4 μ l、ddT termination mix 4 μ l、ddC termination mix 4 μ l、にそれぞれ分注した。サイクルシーケンス反応の条件は、94°C30 秒、65°C30 秒、72°C30 秒で、これらを 40 回施行した (9700 Thermocycler, Perkin Elmer Cetus)。すべての反応において、シーケンスは順方向、逆方向の両方から行った。

更に、イントロンとエクソンの接合部周辺のシーケンスも確認した。

[IV] 結果

1. 両側性腎細胞癌症例の臨床像

臨床経過を表 1、2 に要約した。

a) VHL 病症例 4 例の VHL 病症例に関しては、全例で中枢神経系の脳血管芽細胞腫を合併していた。眼科専門医への診察を定期的に行っているが、網膜血管腫の併発症例は認められていない。1 例では右副腎褐色細胞腫を併発していた (症例 V1-2)。この症例の母親 (症例 V1-1) は VHL 病により死亡し剖検を施行したが、剖検で副腎には異常は認められなかった (40)。

症例 V2-1 を除き初発症状は中枢神経系の血管芽細胞腫であった。症例 V2-1 では初発症状は両側性腎細胞癌であった。初発当時、この症例は VHL 病の臨床症候での診断基準を満たしていなかったが (35, 36)、その後小脳血管芽細胞腫を発症し VHL 病と診断された (38)。

b) 散発性症例 13 例の散発性症例に関しては、初発時の平均年齢は 61.4 歳、性別は男 8、女 5 であり、一般の腎細胞癌と同様であった (1)。腎細胞癌の発症時期に関しては 8 例が同時性、4 例が異時性であった。

病理学的に 3 例は左右ともに乳頭状の発育を示す腎細胞癌 (図 2) で、他の 10 例は左右ともに乳頭状の発育を示さない非乳頭状腎細胞癌であった。後者は、胞巣状に発育を示し、淡明な胞体を持つ、いわゆる clear cell type の腎細胞癌である (図 3)。

乳頭状腎細胞癌では症例 P-3 で両側に腫瘍が多発していたものの、症例 P-1、P-2 では腫瘍は両側ともに単発性であった。

非乳頭状腎細胞癌では、症例 NP-1、NP-2、NP-3、NP-6 で片側もしくは両側に腫瘍が多発していた。症例 NP-1、NP-2 では肉眼的腫瘍栓を認めた。組織学的には左右で腫瘍の形態や grade には大きな差は認められなかった。顕微鏡的な血管侵襲は症例 NP-1、NP-2、NP-4、NP-8、NP-10 で片側もしくは両側に認められたが、腫瘍の grade などとの相関ははっきりしなかった。腫瘍の被膜はいずれの症例においても比較的明瞭であった。

2. VHL 病症例の VHL 遺伝子解析

VHL 病の 3 家系すべての症例で *VHL* 遺伝子の変異が確認された。この遺伝子変異は表 2 に示すとおりである。2 家系ではコドン 162 にあり、それぞれナンセンス変異 (C から A)、ミスセンス変異 (C から G) を認めた。残る 1 家系ではコドン 72 (第 930 塩基) に 1 塩基の deletion (シトシン) を認めた (38-40)。

3. 散発症例での腫瘍の VHL 遺伝子解析

VHL 病以外の散発性の症例での遺伝子変異を表 3 に示した。

すべての散発性の症例で germline には *VHL* 遺伝子の変異は認められず、潜在性の VHL 病はなかった。

3 例の乳頭状腎細胞癌症例の腫瘍においては腫瘍に *VHL* 遺伝子の変異は認められなかった。

9 例の非乳頭状腎細胞癌症例中、5 例において *VHL* 遺伝子の変異が両側、もしくは片側において確認された。変異の種類は、3 例が deletion で、2 例が点突然変異であった。後者にはナンセンス変異、ミスセンス変異が 1 例ずつ含まれていた。これら 5 例のうち 3 例では、各々の症例で *VHL* 遺伝子の変異は両側で同一であった (図 5)。残る 2 例では *VHL* 遺伝子変異は片側のみに認められ、左右で *VHL* 遺伝子の変異の状態が異なっていた。図 6 にこれら *VHL* 遺伝子変異を認めた散発症例の概要を示した。

変異が左右で一致していた症例では、腫瘍が多発しているという特徴があった。組織学的には左右で、組織型、分化度などに大きな差は認めなかった。また被膜も比較的明瞭であった。

肉眼的腫瘍栓は *VHL* 遺伝子の変異が左右で一致している症例にのみ存在した。顕微鏡的な血管侵襲は *VHL* 遺伝子の変異の左右差に関わりなく存在した。

[V] 考察

1. VHL 病症例の VHL 遺伝子解析

VHL 病は中枢神経系の血管芽細胞腫、網膜血管腫、腎細胞癌、腎のう胞、脾のう胞、副睾丸腫瘍、副腎褐色細胞腫、など全身に腫瘍を発生する常染色体優性に遺伝する疾患である。1904年、1910年ドイツの眼科医 von Hippel により網膜の血管腫を多発する症例が報告され (41, 42)、その後、このうちの 1 例が腎腫瘍を合併したことが報告された (43)。1926年スウェーデンの病理医 Arvid Lindau により同様な病態を示す症例が多く報告され (44)、全身性の腫瘍性疾患として認知された。1993年、原因遺伝子として *VHL* 遺伝子が染色体 3p25-26 上にクローニングされ (33)、この遺伝子が 3 つのエクソンよりなり、全長 213 アミノ酸、30kD のたんぱく質をコードすることが判明した。

その後 VHL 病の臨床症候と *VHL* 遺伝子の変異との関係が数多くの施設より報告された (45)。その中でも褐色細胞腫を合併した症例でミスセンス変異が多く Type 2 と分類されるようになった (45)。

今回の解析では、興味深いことにコドン 162 にナンセンス変異を有した症例 V1-2 は副腎褐色細胞腫を有していたが (ただし上述のように母親である症例 V1-1 は副腎褐色細胞腫を合併していなかった) (40)、ミスセンス変異を有した症例 V2-1 では副腎褐色細胞腫を併発していなかった。また、*VHL* 遺伝子のデータベースの検索では (46)、コドン 162 のナンセンス変異による副腎褐色細胞腫の合併例はなかった。

2. 散発症例での腫瘍の VHL 遺伝子解析

緒言で述べたように、両側性腎細胞癌の病態が十分に解明されていない理由として、1) 不完全な表現型の VHL 病を含んでいる可能性があること、2) 乳頭状と非乳頭状などの組織型の分類が不十分なこと、3) 対側への転移性、両側原発性の鑑別を明確にする良いマーカーがなかったことなどを考えた。

まず、両側性腎細胞癌を初発症状とし、他の症候を生じない VHL

病の有無を検索した。すなわち症例 V2-1 のように当初は中枢神経系の血管芽細胞腫や網膜の血管腫を併発しておらず、臨床的に VHL 病と診断できない症例で、「潜在性の」VHL 病の有無をみるために、VHL 遺伝子の germline 変異を検索した。今回の解析では散発性の症例では VHL 遺伝子の germline での遺伝子変異は認められなかった。

次に我々は、これまでの報告で乳頭状と非乳頭状などの組織型の分類が不十分なものが散見されることから、病理組織学的所見を再度評価し、13 例の散発性の症例を乳頭状腎細胞癌と非乳頭状腎細胞癌症例に分類した。乳頭状腎細胞癌は非乳頭状腎細胞癌と異なり、しばしば両側腎に多中心性に発生することが知られている (7)。その病態の機構は、まだ十分には解明されていないが、細胞遺伝学的な研究によれば、乳頭状腎細胞癌(47, 48)では非乳頭状腎細胞癌と明確に異なる染色体のパターンを持っていることが示されている (49)。更に最近、*c-met* が乳頭状腎細胞癌の発生に重要であることが報告された (50)。これまでに報告されたように今回の解析では乳頭状腎細胞癌において VHL 遺伝子の変異を認めなかった。また一般に報告されている乳頭状腎細胞癌の頻度 (5-10%) と比較すると、今回の解析での割合 3 例/13 例 (23%) は若干高いように思われた (51)。

一方、非乳頭状腎細胞癌の 9 例中 5 例に VHL 遺伝子の変異が認められた。これは、以前に報告されている非乳頭状腎細胞癌における VHL 遺伝子の変異の頻度 (約 60%) と一致する (33, 34)。これら 5 例のうち 3 例では、各々 VHL 遺伝子の変異が両側で一致していた。VHL 遺伝子の不活化が非乳頭状腎細胞癌の発生に重要な役割を有するというこれまでの報告を考慮すれば (33)、これらの症例においては片側の腫瘍が他側に転移したことを示していると考えられる (Contralateral Metastatic Type)。

一方、他の 2 つの症例 (Bilateral Primary Type) では、VHL 遺伝子の変異が片側においてのみ認められた。すなわち VHL 遺伝子の変異の状態が左右で異なっていることから、これらの左右の腫瘍が、転移ではなく独立に発生したと考えられる。

以前、Hyman (26) や Novick (13)、Sprenger (24) は臨床的、病理学的な考察から、いくつかの診断基準を提唱した。Novick は

Contralateral Metastatic Type の特徴として、1) 腫瘍が被膜で覆われていない、2) 対側腎の腫瘍が多発性である、3) 両側の組織型が同一である、4) 左右での腫瘍の発生間隔が短い、などの点を挙げた (13)。また、Sprenger は Bilateral Primary Type の特徴として、1) 両側腎腫瘍の組織型が大いに異なる、2) 両側腎腫瘍が被膜に覆われている、3) 両側腎腫瘍が単発である、などを挙げている (24)。

今回の解析で明らかになった Contralateral Metastatic Type の 3 症例の特徴は、1) 両側の腫瘍が同様の組織像を呈している、2) 片側の腫瘍が転移を生ずるに十分な大きさを有する (3cm 以上の径) (52)、3) もう片方の腫瘍は、比較的小さく多発している、などである。一方で Bilateral Primary Type の症例は両側ともに腫瘍が単発であった。

これらのうちで、単発・多発という点は、Hyman や Novick、Sprenger も以前に指摘している点である。特に多発という点に関しては、腫瘍が片側もしくは両側の腎臓に多発している症例が 4 例あったが、そのうち 3 例で転移であることが確認され、非常に特徴的な点であると考えた。

しかし被膜の有無に関しては、全例で組織学的に被膜は比較的明瞭で、必ずしも特徴的とは言えないと考えた。また組織型の左右差という点に関しても、いずれの症例でも左右で大きな差は認められず、特徴的な点ではないと考えられた。

両側の腫瘍の発生間隔に関しては Novick は転移性のものでは短いということを述べていた。今回の解析では Bilateral Primary Type の症例はすべて同時性であり、Contralateral Metastatic Type の症例は異時性であった。しかも、Contralateral Metastatic Type の症例 NP-2 では 14.5 年ときわめて長い症例もあり、発生間隔は必ずしも転移性のものでは短いということではなかった。

その他、肉眼的な腫瘍栓は、Contralateral Metastatic Type にのみ認められたものの、顕微鏡的に認められる血管侵襲は両者に認められ、血管侵襲は両者を区別する良い指標では無いように思われた。

なお、今回 Figure 6 に示した症例 NP-1 で、左右の腫瘍において

VHL 遺伝子の配列上 wild type のバンドが観察されたが、これは正常組織の混入によるものと考えている。すなわち、方法論として PCR・ダイレクトシーケンス法を用いているため、少量の DNA の混入も同様に増幅されてしまったものと考えられる。今までの散発性腎細胞癌の *VHL* 遺伝子の解析において、この領域の LOH (loss of heterozygosity) と *VHL* 遺伝子の変異がほとんどの腫瘍で認められることもこれを裏付けていると考えている (34)。

以上のように腫瘍の「多発性」という点が散発性の両側性腎細胞癌の腫瘍発生を考える上で重要な点であると考えた。今回の症例数はなお少なく、更に多くの症例の解析が必要と思われるが、少なくとも *VHL* 遺伝子を指標としたアプローチは両側性腎細胞癌の発生を研究する上で、きわめて重大な意味を持つものと考えられる。また、その他、臨床的にも個々の症例において、このような形で遺伝子解析が行われ、Bilateral Primary Type と Contralateral Metastatic Type とが判断されれば治療法にも大きく反映されるものと考ええる。例えば手術では前者であればある程度積極的に行えば根治を目指すことも可能である。またインターフェロン、インターロイキンなどの腎細胞癌の手術後に行われる補助療法は後者では前者よりも積極的に行われる可能性がある。

このように両側性腎細胞癌における腫瘍の *VHL* 遺伝子の解析は、臨床情報、病理組織所見と同様に、泌尿器科医にとって重要な情報になるものと考えている。

[VI] 結語

1. 両側性腎細胞癌 17 例で *VHL* 遺伝子の解析を行った。
2. 臨床的に *VHL* 病と診断された 4 例 (3 家系) では germline の *VHL* 遺伝子の変異を認めた。
3. 散発性症例 13 例は病理組織学的診断は 3 例が両側とも乳頭状腎細胞癌であり、残る 10 例は両側ともに非乳頭状腎細胞癌であった。このうち 11 例 (乳頭状腎細胞癌症例 2 例、非乳頭状腎細胞癌症例 9 例) でパラフィンブロックが得られ、*VHL* 遺伝子の解析を行った。
4. 散発症例では germline には *VHL* 遺伝子の変異は認められなかった。すなわち潜在性の *VHL* 病患者はいなかった。乳頭状腎細胞癌症例では腫瘍には *VHL* 遺伝子の変異は認められなかった。非乳頭状腎細胞癌症例 9 例中 5 例で腫瘍における *VHL* 遺伝子の変異を認めた。
5. 3 例では各々左右で腫瘍における *VHL* 遺伝子の変異が一致しており片側から対側への転移と考えられた (Contralateral Metastatic Type)。一方残る 2 例では *VHL* 遺伝子の変異は片側の腫瘍のみに認められ、左右とも独立して発生したものと考えられた (Bilateral Primary Type)。
6. 腫瘍の多発しているという点が前者に特徴的であると考えられたが、腫瘍の被膜の有無、血管侵襲の有無、左右の腫瘍の出現間隔などでは両者に大きな差は認められなかった。

[VII] 謝辞

稿を終えるにあたり、公私にわたり忍耐強く最後までご指導を賜った石川隆俊教授、北村唯一教授、ならびに医学研究という素晴らしい機会を賜りました河辺香月前教授(現焼津市立総合病院院長)に深甚の謝意を表します。公私にわたりご指導を賜りました亀山周二講師(現 NTT 関東病院部長)に心より感謝申し上げます。実験手技、病理組織診断の細部にわたり直接ご指導いただいた小田秀明助教授、中鶴陽子助手、清水誠一郎助手(現公立昭和病院部長)に感謝を申し上げます。

貴重な検体を賜りました井上泰部長(厚生年金病院)、河村毅部長(同愛記念病院)、手島伸一郎部長(同愛記念病院)、松本俊治助教授(順天堂大学病理学教室)に感謝申し上げます。

[VIII] 文献

- 1) Pertersen RO Renal cell carcinoma. In: Urologic Pathology, 2nd ed, PP78-105, J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1992
- 2) Jennings SB. and Linehan WM. Renal preirenal, and ureteral neoplasms. In: Gillenwater GY, Grayhack JT, Hawards SS and Duckett JW. Adult and Pediatric Urology. St. Louis: Mosby, 1996:643-94.
- 3) Vermillion CD, Skinner DG, Pfister RC (1972) Bilateral renal cell carcinoma. J Urol 108:219-22.
- 4) Neuman HPH, Zbar B (1996) Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. Kidney Int 51:16-26.
- 5) Li FP, Marchetto DJ, Brown RS (1982) Familial renal carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 7:271-5.
- 6) Levine E, Weigel JW, Collins DL (1983) Diagnosis and management of asymptomatic renal cell carcinomas in von Hippel-Lindau syndrome. Urology 21:146-50.
- 7) Weiss LM, Gelb AB, Medeiros LJ (1995) Adult renal epithelial neoplasms. Am J Clin Pathol 103:624-35.
- 8) Chute AL (1910) A case of bilateral hypernephroma. Trans Am Assoc Genito-Urin Surg 5: 181.
- 9) 中川 隆、吉田 修 (1963) 両側性 Grawitz 腫瘍。日泌尿会誌 54: 677。

- 10) 牧 佳男、小澤秀夫、津島知靖、公文裕巳、大森弘之 (1994) 組織型の異なる同時性両側性腎細胞癌の1例。西日泌尿 56: 1239-45。
- 11) 久米春喜、亀山周二、奴田原紀久雄、本間之夫、簗和田滋、東原英二、阿曾佳郎 (1991) 腎細胞癌で右腎摘後、左腎に再発し *ex vivo* 手術、自家腎移植を施行した1例。腎移植・血管外科 3: 59-63。
- 12) Wickham JEA. (1975) Conservative renal surgery for adenocarcinoma. The place of bench surgery. *Brit J Urol* 47:25-36.
- 13) Novick AC, Stroom S, Montie JE, Pontes AJE, Siegel S, Montague DK, Goormastic M (1989) Conservative surgery for renal cell carcinoma: a single center experience with 100 patients. *J Urol* 141: 835-9.
- 14) Topley M, Novick AC, Montie JE (1984) Long-term results following partial nephrectomy for localized renal adenocarcinoma. *J Urol* 131: 1050-52.
- 15) Johnson DE, Voneschenbach A, Sternberg J (1978) Bilateral renal cell carcinoma. *J Urol* 119:23-4.
- 16) Jacobs SC, Berg SI, Lawson RK. (1980) Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision. *Cancer* 46: 2341-5.
- 17) Marberger M, Pugh RC, Auvert J, Bertermann H, Costantini A, Gammelgaard PA, Petterson S, Wickham JE. (1981) Conservation surgery of renal carcinoma: the EIRSS experience. *Brit J Urol* 53: 528-32.

18) Zincke H, Swanson SK. (1982). Bilateral renal cell carcinoma: influence of synchronous and asynchronous occurrence on patient survival. J Urol 128: 913-5.

19) Smith RB, deKernion JB, Ehrlich RM, Skinner DG, Kaufman JJ. (1984) Bilateral renal cell carcinoma and renal cell carcinoma in the solitary kidney. J Urol 132: 450-4.

20) Novick AC, Stroom S, Montie JE, Pontes JE, Siegel S, Montague DK, Goormastic, M. (1989) Conservative surgery for renal cell carcinoma: a single-center experience with 100 patients. J Urol 141: 835-9.

21) Morgan WR, Zincke H. (1990) Progression and survival after renal-conserving surgery for renal cell carcinoma: experience in 104 patients and extended followup. J Urol 144: 852-7.

22) Stephens R, Graham SD Jr. (1990) Enucleation of tumor versus partial nephrectomy as conservative treatment of renal cell carcinoma. Cancer 65: 2663-7.

23) Kessler OJ, Livne PM, Servadio C. (1993) Bilateral asynchronous renal cell carcinoma: treatment approach. Isr J Med Sci 29: 721-5.

24) Sprenger A, Bohrod M. Bilateral renal carcinomas. (1935) J Urol 33: 427-433.

25) Small MP, Anderson EE, Atwill WH. (1968) Simultaneous bilateral renal cell carcinoma: case report and review of the literature. 100: 8-14.

26) Hyman RA, Voges V, Finby N (1973) Bilateral hypernephroma. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med 117:104-7.

27) Colt HG, Wholey MH (1998) Bilateral renal cell carcinoma. Am Fam Physician 37:121-5.

28) 岩佐 厚、菅尾英木、中村正広、並木幹夫、松田 稔 (1990) 両側同時性腎細胞癌の一例。西日泌尿 51: 1633-36。

29) Weaver DJ, Michalski K, Miles JH (1989) Cytogenetics of bilateral renal cell carcinoma. J Urol 142:697-700.

30) Banner BF, Brancazio L, Bahnson RR, Ernstoff MS, Taylor SR. (1990) DNA analysis of multiple synchronous renal cell carcinomas. Cancer 66:2180-85.

31) Punga-Maole ML (1994) Tubulo-papillary tumors of the kidney. Clinical, histological and cytogenetic features based on a series of 15 new cases. Prog Urol 4:977-86.

32) Cin PD, Sciort R, de Wever I, Brock P, Casteels-Van Daele M, Van Damme B, Van Den Berghe H (1996) Cytogenetic and immunohistochemical evidence that giant cell fibroblastoma is related to dermatofibrosarcoma protuberans. Genes Chromosomes Cancer 15:73-5.

33) Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science 260:1317-20.

34) Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, et al. (1994) Mutations of the VHL tumor

suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genet* 7:85-90.

35) Shuin T, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, Nagashima Y, Kitamura H, Latif F, Zbar B, et al. (1994) Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 54:2852-5

36) Maher ER, Yates JR, Harries R, Benjamin C, Harris R, Moore AT, Ferguson-Smith MA (1990) Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 77:1151-63.

37) Melmon KL, Rosen SW (1964) Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med* 36:595-617.

38) Kume H, Kameyama S, Tanaka Y, Kitamura T (1999) Cerebellar hemangioblastoma as a late manifestation of sporadic von Hippel-Lindau disease. *J Urol* 161: 911-2.

39) Kawahara N, Kume H, Ueki K, Mishima K, Sasaki T, Kirino T. (1999) VHL gene inactivation in an endolymphatic sac tumor associated with von Hippel-Lindau disease. *Neurology* 53: 208-10.

40) Kume H, Kameyama S, Yamazaki S, T Kitamura. (1999) "Sporadic" pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease. in submission.

41) von Hippel E. (1904) Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. *Albrecht von Graefes Arch Ophthal* 59: 83-6.

42) von Hippel E. (1911) Die anatomische Grundlage der von mir beschriebenen "sehr seltenen Erkrankung der Netzhaut." *Albrecht von Graefes Arch Ophthal* 79: 350-377.

- 43) Brandt R. (1921) Zur Frage der Angiomatosis retinae. Albrecht von Graefes Arch Ophthal 106: 127-165.
- 44) Lindau A (1926) Studien über Kleinhirnzysten: Bau Pathogenese und Beziehungen zur Angiomatosis retinae. Acta Pathol Microbiol Scand (Suppl I): 1-129.
- 45) Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M, Gnarra JR, Orcutt ML, Duh FM, Glenn G, Green J, Hsia YE, Lamiell J, Li H, Wei MH, Schmidt L, Tory K, Kuzmin I, Stackhouse T, Latif F, Linehan WM, Lerman M, Zbar B. (1995) Germline mutations in von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. Hum Mutat 5: 66-75.
- 46) Beroud C, Joly D, Gallou C, Staroz F, Orfanelli MT, Junien C. (1998) Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. Nucleic Acids Res 26: 256-58.
- 47) Kovacs G, Brusa P, De Riese W (1989) Tissue-specific expression of a constitutional 3:6 translocation: development of multiple bilateral renal-cell carcinomas. Int J Cancer 43:422-7.
- 48) Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF (1991) Cytogenetics of papillary renal cell tumors. Genes Chromosomes Cancer 3:249-55.
- 49) Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M (1987) Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. Nature 327:721-4

50) Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande Woude G, Neumann H, Walther M, Linehan WM, Zbar B (1998) Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res* 58:1719-22.

51) Bentz M, Bergerheim US, Li C, Joos S, Werner CA, Baudis M, Gnarra J, Merino MJ, Zbar B, Linehan WM, Lichter P (1996) Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 75:17-21.

52) Bell ET (1950) Tumors of the kidneys. In Bell ET (ed): *Renal diseases*, p411. Philadelphia, Lea & Febriger.

53) Kume H, Oda H, Nakatsuru Y, Matsumoto T, Inoue T, Kameyama S, Kitamura T, Ishikawa T (1999) Genetic Identification of metastatic of bilateral primary origin of bilateral non-familial, non-papillary renal cell carcinoma. In submission.

[IX] 付図説明

図2。乳頭状腎細胞癌の組織像 (症例 P-3)。ヘマトキシリン・エオジン染色、400x。左右ともに乳頭状の発育を示す。

図3。非乳頭状腎細胞癌の組織像 (症例 NP-1)。ヘマトキシリン・エオジン染色、200x。胞体が明るく透明な、いわゆる clear cell type の組織像を示している。

図4。PCR およびダイレクトシーケンスに用いたプライマーを示す。下段にはプライマーの配列を示した。各々のプライマーにより増幅される大きさは250bp程度に設計されている。

図5。*VHL* 遺伝子に変異を認めた症例の腫瘍の位置、大きさを示す。上段の3症例はそれぞれ左右ともに同じ変異を持ち、片側から対側への転移であることが示された (Contralateral Metastatic Type)。また下段の2症例では、片側のみに変異を認め、T、腫瘍塞栓。V、腫瘍の静脈浸潤。rt、右。lt、左。M、男性。F、女性。

図6。*VHL* 遺伝子解析 (症例 NP-1) の結果。Germline には変異は認めなかった。両側の腫瘍ともにコドン 117 にナンセンス変異が認められた (第 564 塩基のグアニンがアデニンに変異)。

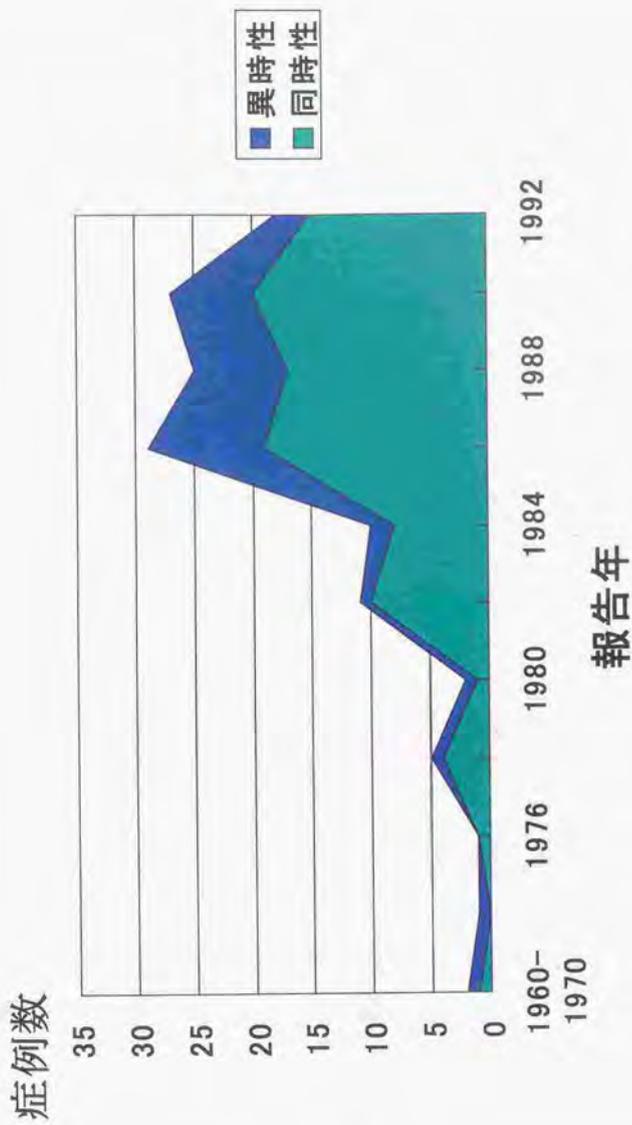


Figure 1. 本邦での症例報告数の推移

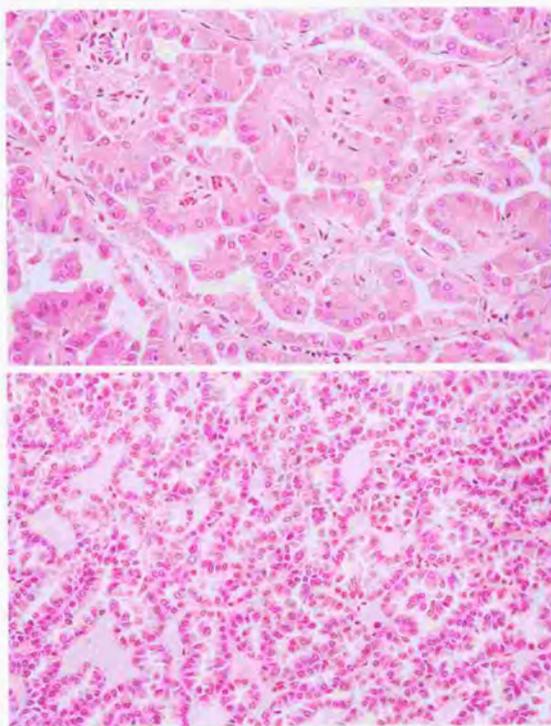


Figure 2. 乳頭状腎細胞癌の組織像(症例P-3)。
上段は右側、下段は左側。

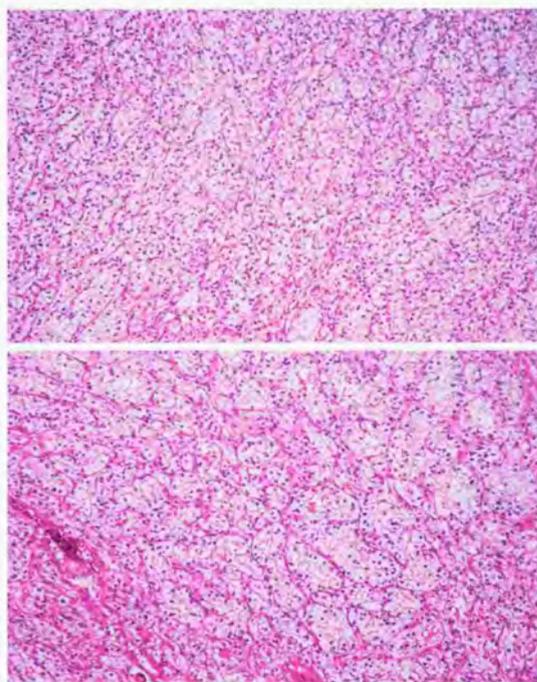
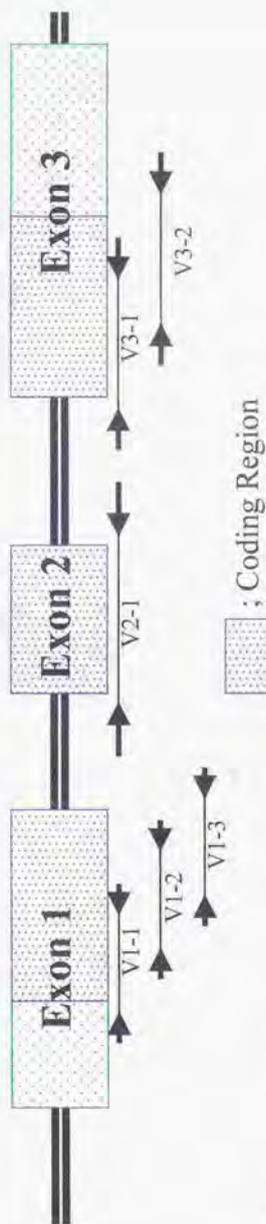


Figure3. 非乳頭状腎細胞癌の組織像(症例NP-1)。
上段は右側、下段は左側。

Figure 4. *VHL* 遺伝子の Primer 設定

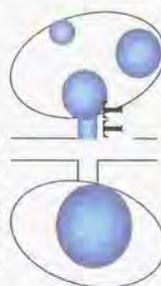


- V1-1 Forward; CGGGTGGTCTGGATCGCGG
 Reverse; CTCCTCCCCGCCGTCTTCTCA
 V1-2 Forward; GGAGGGCGGAGAACTGGGACGAGG
 Reverse; CAGGCGGCAGCGTTGGGTAGG
 V1-3 Forward; GCGTCGIGCTGCCCGTATGGCTC
 Reverse; GCTTCAGACCGTGCTATCGCC
 V2-1 Forward; GTGGCTCTTTAAACAACCTTTGC
 Reverse; CCTGTACTTACCACAACAACCTTATC
 V3-1 Forward; TTCCTTGTACTGAGACCCCTAGT
 Reverse; TCCAGGTCTTTCACACT
 V1-1 Forward; GAGACTGGACATCGICAGGT
 Reverse; ATCTAGATCAAGACTCATCAGTA

Figure 5. Tumor Sizes and Localizations with *VHL* Mutations

Cases with Contralateral Metastatic Type

Case NP-1

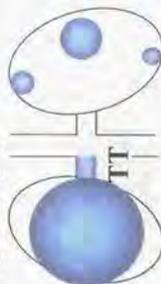


7.0 x 7.0 cm
5.0 x 4.5 cm
4.5 x 3.5 cm
2.0 x 1.5 cm
G1, V(+)
G1, V(+)

Asynchronous

(rt; 50 yo, lt; 54 yo, F)

Case NP-2

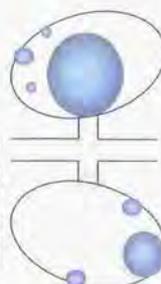


9.0 x 6.0 cm
4.1 x 2.8 cm
1.7 x 1.2 cm
1.1 x 1.1 cm
G2, V(+)
G2, V(-)

Asynchronous

(rt; 46 yo, lt; 60 yo, M)

Case NP-3



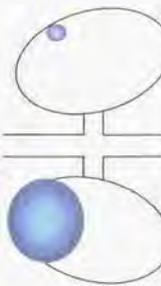
4.0 x 3.0 cm
1.0 x 1.0 cm
1.0 x 1.0 cm
1.0 x 1.0 cm
G3, V(-)
G3, V(-)

Asynchronous

(rt; 54 yo, lt; 57 yo, M)

Cases with Independent Type

Case NP-4

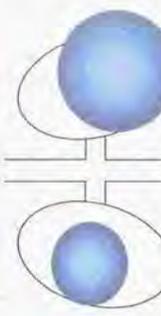


7.5 x 5.0 cm
G2, V(+)

Synchronous

(50 yo, M)

Case NP-5



8.0 x 5.0 cm
G1, V(-)

Synchronous

(64 yo, M)

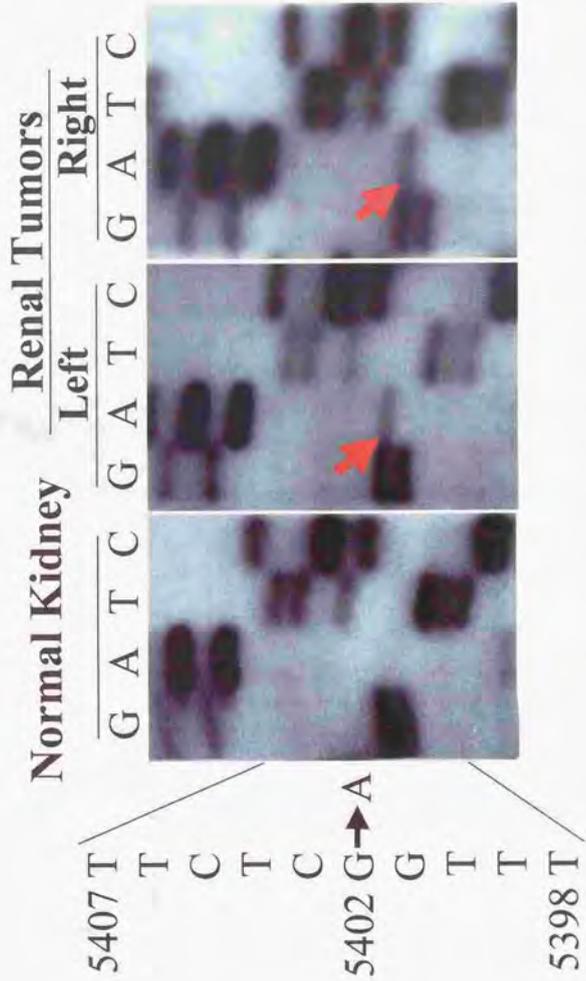


Figure 6. DNA Analysis of Case NP-1

Table 1. Characteristics of Cases with VHL Disease

Family-Case	Sex	Lesions				VHL mutation			
		CNS	Retina	Kidney	Pancreas	Adrenal	Nucleotide	Peptide	
Family 1	V1-1	F	HB	-	Bil RCC	Cysts	-	8080 C to A	162 Cys to Stop
	V1-2	F	HB	-	Bil RCC	Cysts	Pheo	8080 C to A	162 Cys to Stop
Family 2	V2-1	M	HB	-	Bil RCC	Cysts	-	8080 C to G	162 Cys to Trp
	V3-1	M	HB	Angioma	Bil RCC	Cysts	-	930 Del C	

F: Female M: Male

CNS: Central Nervous System HB: Hemangioblastoma

Bil RCC: Bilateral Renal Cell Carcinoma Pheo: Pheochromocytoma

Table 2. Clinical Features

Case	Sex	Side	Age	Interval	Renal Tumor		
					Size (cm)	Grade	Venous Involvement
Papillary Cases							
Case P1	Male	Right	77	Synchronous (Autopsy Case)	1.0x1.0cm	G1/V(-)	
		Left	77		1.0x1.0cm	G1/V(-)	
Case P2	Female	Right	67	Synchronous	4.8x3.5cm	G2/V(-)	
		Left	67		2.5x2.0cm	G2/V(+)	
Case P3	Male	Right	64	Synchronous	Max/13x9.0cm*	G2/V(+)	
		Left	64		Max/0.5x0.5cm*	G2/V(-)	
Non-papillary Cases							
Case NP1	Female	Right	50	3.8 Years	7.0x7.0cm	G1/V(+)	
		Left	54		Max/5.0x4.5cm*	G1/V(+)	
Case NP2	Male	Right	46	14.5 Years	9.0x6.0cm	G2/V(+)	
		Left	60		Max/4.1x2.8cm*	G2/V(-)	
Case NP3	Male	Right	54	3.3 Years	Max/4.0x3.0cm*	G3/V(-)	
		Left	57		Max/7.5x4.5cm*	G3/V(-)	
Case NP4	Male	Right	50	Synchronous	7.5x5.0cm	G2/V(+)	
		Left	50		1.3x1.2cm	G2/V(-)	
Case NP5	Male	Right	64	Synchronous	8.0x5.0cm	G1/V(-)	
		Left	64		10x7.0cm	G1/V(-)	
Case NP6	Female	Right	59	Synchronous	4.2x3.2cm	G1/V(-)	
		Left	59		Max/1.3x1.3cm*	G1/V(-)	
Case NP7	Male	Right	79	Synchronous (Autopsy Case)	1.0x1.0cm	G1/V(-)	
		Left	79		1.0x1.0cm	G1/V(-)	
Case NP8	Male	Right	60	Synchronous	6.0x6.0cm	G2/V(+)	
		Left	60		2.0x2.0cm	G1/V(-)	
Case NP9	Female	Right	69	Synchronous	4.0x2.0cm	G1/V(-)	
		Left	69		2.5x1.7cm	G1/V(-)	
Case NP10	Female	Right	59	Synchronous	5.4x4.0cm	G1/V(+)	
		Left	59		4.0x3.3cm	G1/V(-)	

Table 3. Results of VHL Gene Analysis

Case	Side	VHL Mutation	
		Nucleotide	Amino Acid
Metastatic Cases			
Case NP-1	Right	5402 (G to A)	117 (Trp to Stop)
	Left	Same as above	
Case NP-2	Right	Deletion (8830,8831)	
	Left	Same as above	
Case NP-3	Right	Deletion (8683,8684)	
	Left	Same as above	
Bilateral Primary Cases			
Case NP-4	Right	5458 (T to C)	136 (Phe to Ser)
	Left	No Mutation	
Case NP-5	Right	No Mutation	
	Left	Deletion (5436-5440)	

