

CIP2A-EKSPRESSIO KIELIKARSINOOMISSA

LK Sanni Tervo
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Patologia
9/2012

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö

TERVO SANNI: CIP2A-EKSPRESSIO KIELIKARSINOOMISSA

Kirjallinen työ, 20 s.
Ohjaaja: professori Timo Paavonen

Syyskuu, 2012

Avainsanat: PP2A, syöpä, immunohistokemia, ennustetekijä, prognostiikka, selviytyminen

Kielikarsinoma on suun alueen syövästä yleisin. Se on tavallisesti pitkään oireeton ja voi lähettää etäpesäkkeitä varhain. Jo diagnoosihetkellä tauti voi olla metastasoitunut. Etäpesäkkeiden ilmentyminen on tärkein tekijä ennustetta arvioitaessa. Kielisyöväälle tyypillisiä ovat piilevät mikrometastaasit, mistä johtuen TNM-luokitus ei kovinkaan hyvin korreloi taudin selviytymisennusteen kanssa, ja olisikin syytä kehittää uusia spesifisiä menetelmiä prognostiikan tueksi. CIP2A on useimpien ihmisen kudosten soluissa pieninä pitoisuuksina esiintyvä sytoplasminen proteiini. Se inhiboi proteiini fosfataasi 2A:ta ja toimii siten onkoproteiinina. CIP2A:lla on todettu olevan prognostinen rooli keuhko- ja mahasyöprien yhteydessä. Myös varhaisen vaiheen kielikarsinoomien yhteydessä tulokset ovat olleet lupaavia. Tutkimuksemme tavoitteena on immunohistokemiallisin menetelmin selvittää CIP2A:n esiintymistä kielikarsinoomassa, kielihyperplasiassa sekä kielikarsinooman imusolmukemetastaaseissa, sekä tilastollisin menetelmin arvioida suurentuneen kielikarsinooman CIP2A ekspression yhteyttä metastasointiin ja sitä kautta selviytymiseen. Lisäksi selvitämme korreloiko korkea CIP2A ilmentyminen syöpäkasvaimen gradus-luokkaan. Tutkimusaineistomme käsitti retrospektiivisesti 96 potilasta, diagnoosina kielen karsinoma tai hyperplasia. Analysoitava parametri oli CIP2A värjäytyvyyden intensiteetti. Tutkimuksemme mukaan kielikarsinooman CIP2A ekspressiolla ei ole yhteyttä metastasointiin. Myöskään gradus-luokka ei näyttäisi korreloivan CIP2A immunoreaktiivisuuden kanssa. Jotta voitaisiin luotettavasti arvioida CIP2A:n merkitystä kielikarsinooman prognostiikassa, tulisi selvittää CIP2A ekspression yhteys potilaiden eloonjäämislukuihin tutkimusaineistossamme.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
1.1 KIELIKARSINOOMA	1
1.1.1 <i>Epidemiologia ja etiologia</i>	1
1.1.2 <i>Patogeneesi ja diagnostiikka</i>	2
1.1.3 <i>Hoito ja ennuste</i>	4
1.2 CANCEROUS INHIBITOR OF PP2A	5
1.2.1 <i>CIP2A:n rakenne ja toiminta</i>	5
1.2.2 <i>CIP2A-geeniekspression säätely</i>	6
1.2.3 <i>CIP2A:n rooli prognostisena molekyylimarkerina</i>	7
1.3 IMMUNOHISTOKEMIA	8
1.3.1 <i>Antigeenit ja vasta-aineet</i>	8
1.3.2 <i>Antigeenin paljastus</i>	9
1.3.3 <i>Vasta-aineiden leimaaminen</i>	10
1.4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	10
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	11
2.1. POTILAAT	11
2.2. KUDOSNÄYTTEET	12
2.3. IMMUNOREAKTIIVISUUDEN LUOKITTELU JA TILASTOLLISET ANALYYSIT	13
3 TULOKSET	14
4 POHDINTA	15
LÄHTEET	18

1 JOHDANTO

1.1 Kielikarsinooma

1.1.1 Epidemiologia ja etiologia

Kielisyöpä on suun alueen syövästä yleisin (Mäkitie ym. 2007). Kielisyövän esiintyvyys vaihtelee voimakkaasti eri maiden välillä, Suomessa sen ilmaantuvuus on noin 120 tapausta vuodessa. Viime vuosikymmenien aikana kielisyövän ilmaantuvuus on lisääntynyt sekä miehillä, että naisilla. Vuonna 2008 miesten kielisyövän ikävakioitu ilmaantuvuus sataatuhatta henkilövuotta kohden oli 1,9, vastaava luku naisilla oli 1,3. 60- ja 70-lukujen taitteessa vastaavat luvut olivat vielä 0,7 ja 0,5. Riski sairastua kielikarsinomaan on suurimmillaan 65-80 vuoden iässä. (Suomen syöpärekisteri.) Arvioiden mukaan länsimaiden suusyövästä 75 % olisi estettävissä riskitekijöiden ehkäisyllä, joista tärkeimmät ovat alkoholin liikakäyttö ja tupakointi (Suusyövän käypähoito 2012). Sukupuolten väliset erot näiden käyttötottumuksissa myös selittänevät miesten suuremman sairastuvuuden kielisyöpään, sekä muihin suun alueen syöpiin. Monien suun levyepiteelikarsinoomien on myös raportoitu liittyvän suun limakalvon hyvänlaatuisiin muutoksiin, kuten leuko- ja erytroplakiaan. Mikrobeista vain human papilloma viruksella (HPV) on todettu olevan yhteys suun alueen syöpään, mutta kielikarsinooman etiologiassa sen rooli on kiistelty. (Barnes ym. 2005, Neville ym. 2005.) Ruokavaliolla on merkitystä suusyövän synnyssä, nimittäin runsaan lihansyömisen on todettu altistavan suusyöväälle. Vastaavasti suojaavaksi tekijäksi on ehdotettu monipuolista, runsaasti hedelmiä ja raakoja vihanneksia sekä kalaa sisältävää ruokavaliota, joskin näiden yhteys on vielä epäselvä. Suusyövän periytyvyydestä ei ole näyttöä. (Suusyövän käypähoito 2012.)

1.1.2 Patogeneesi ja diagnostiikka

Suuontelon syövästä levyepiteelikarsinoma (SCC) käsittää 90 % (Barnes ym. 2005). Muita harvinaisempia maligniteetteja ovat lymfoepiteliaalinen karsinoma, sylkirauhasten tuumorit, pehmytkudoskasvaimet, hematolymfoidiset tuumorit sekä limakalvon melanooma. Karsinoma voi esiintyä missä osassa kieltä tahansa, tyypillisin paikka on kielen posteriorinen lateraalipinta. Esiintyessään kielen takakolmanneksessa kasvain luetaan suuontelon sijaan nenänielun kasvaimiin.

Suusyövän ajatellaan kehittyvän epiteeliaalisesta dysplasiasta (Lippman, Sudbo & Hong 2005). Kielisyöpä esiintyy yleensä kivuttomana, epiteelistä ulospäin työntyvänä kovettumana, haavaumana tai onteloisena rakenteena. Muutos voi olla väriltään vaalea, punainen tai kirjava. Syöpätaudin edetessä kasvainsolut voivat vaurioittaa kielen lihaksia tunkeutuessaan syvemmälle kudokseen, mistä aiheutuu voimakasta liikekipua. Kasvainkudoksessa voi esiintyä myös nekroottisia alueita. Oireettomuus pitkittää usein hoitoon hakeutumista. Kliininen tutkimus perustuu inspektioon, sekä limakalvon ja imusolmukkeiden palpatioon. Diagnoosi varmistetaan aina histologisesti kudospäätteestä. (Neville ym. 2005.)

Histopatologisesti levyepiteelikarsinoma (SCC) nähdään epiteelin invasiivisena kasvuna. Angiolymfaattinen sekä perineuraalinen kasvu ovat myös merkkejä pahanlaatuisuudesta. Tyvikalvo on hävinnyt ja basaalisolujen tilalle on muodostunut isoja epäsäännöllisen muotoisia soluja, joista lähtee sytoplasmisia ulokkeita ympäröivään sidekudokseen. Invaasio voi ulottua kielen lihaksiin asti. Differentiaatioastetta kuvataan grading-asteikolla. Hyvin erilaistuneessa kasvainkudoksessa nähdään paljon keratiinin muodostumista, ja solukko muistuttaa läheisesti normaalia levyepiteeliä. Huonosti differentoituneessa kasvainsolukossa epäkypsät solut dominoivat. Keratiinin muodostus on vähäistä

ja mitooseja havaitaan paljon. Invasiivinen kasvu voi esiintyä laajoina saarekkeina tai epämääräisinä juosteina ja yksittäisinä syöpäsoluina. Jälkimmäinen, infiltraatiivinen kasvutapa, on yleensä etenemiseltään aggressiivisempaa. Etenkin varhaisen vaiheen SCC:ssä diagnostiikkaa voi vaikeuttaa runsas tulehdussolukon esiintyminen. (Barnes ym. 2005.)

Huolellinen levinneisyystutkimus kuuluu onnistuneen hoidon edellytyksiin. Levinneisyystutkimus suoritetaan kliinisen tutkimuksen lisäksi kuvantamistutkimuksella, joko tietokonetomografialla (CT) tai magneettikuvauksella (MRI). Kuvista kartoitetaan taudin paikallista laajuutta, sekä paikannetaan mahdollisia imusolmukemetastaaseja (Barnes ym. 2005). Edellä mainittujen lisäksi voidaan tehdä vielä kaulanalueen kaikukuvaus sekä tarvittaessa siihen yhdistettävä ohutneulabiopsia parantamaan diagnostista tarkkuutta. Radioaktiivista merkkiainetta apuna käyttäen suoritettava vartijaimusolmuketutkimus on myös osoittautunut hyödylliseksi levinneisyystutkimukseksi. (Suusyövän käypähoito 2012.)

1.1.3 Hoito ja ennuste

Kielikarsinooman hoito perustuu TNM luokitukseen. Pienet kasvaimet poistetaan kirurgisesti usein pelkällä paikallisella leikkauksella. Primaarituumorin poiston yhteydessä noin puolelta potilaista poistetaan myös samanpuoleiset kaulan imusolmukkeet, indikaationa poistoon on laaja tai kaulaan etäpesäkkeitä lähettänyt kasvain. Alueellisesti levinneen tai aggressiivisesti kasvavan tuumorin kirurgiseen hoitoon yhdistetään sädehoito. Stage III ja stage IV potilaille suositellaan kemoterapiaa yhdessä sädehoidon kanssa (Forastiere ym. 2007, Finnegan ym. 2009, Pederson ym. 2010). Hoidosta riippumatta kielikarsinooma on yhteydessä huonoon ennusteeseen. 3- ja 5-vuoden tautispesifiset selviytymisennusteet olivat viime vuosisadan lopussa 74 ja 64 %. 5-vuoden selviytymisennusteet levinneisyysluokituksen mukaan olivat: Stage I 74 %, Stage II 62 %, Stage III 71 % ja Stage IV 33 %. (Mäkitie ym. 2007.)

OTSCC:n biologinen tausta eroaa muista pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista ja tämä tulisi ottaa huomioon myös tutkimuksissa. Muista suun alueen karsinoomista poiketen kielen imutiepitoinen rakenne antaa pienellekin syöpäkasvaimelle hyvät mahdollisuudet metastasoida kaulan imusolmukkeisiin. (Bello ym. 2010a.) OTSCC:n etäpesäkkeet esiintyvät yleensä samanpuoleisissa imusolmukkeissa. Metastasoitunut imusolmuke on kova, laajentunut ja kivuton. (Neville ym. 2005.) Imusolmukemetastaasien esiintyminen on paras keino ennustaa taudin etenemistä ja arvioida ennustetta. Pienikin syöpäkasvain voi lähettää etäpesäkkeitä jo varhain. Kielisyövälle ovat tyypillisiä myös piilevät mikrometastaasit, joita ei pystytä toteamaan luotettavasti millään preoperatiivisella kuvantamismenetelmällä. Näistä tekijöistä johtuen kielisyövän ennuste ei kovinkaan hyvin korreloi levinneisyysluokan kanssa, eikä TNM-järjestelmä siksi ole käyttökelpoinen kielisyövän ennusteen arvioinnissa (Bello ym. 2010a).

Imusolmukemetastaasien lisäksi huonoon ennusteeseen liitettyjä tekijöitä ovat paikallinen uusiutuminen ja sekundaarituumorien esiintyminen. Tuumorin infiltraation syvyys kudoksessa ennustaa tuumorin halkaisijaa paremmin piilevien metastaasien esiintymistä, mutta tutkimusmenetelmien standardoimattomuudesta johtuen ei kliiniseen käyttöön ole pystytty asettamaan selviä raja-arvoja eri ennusteryhmien välille. Patologisen tuumorin halkaisijamitan (pT) on sen sijaan havaittu korreloivan paikalliseen uusiutumiseen. Histologisella luokituksella ei ole todettu olevan yhteyttä kielisyövän ennusteeseen. (Bello ym. 2010b, Keski-Säntti ym. 2007.) Joidenkin syöpäsairauksien tutkimiseen on pystytty kehittämään morfologisia menetelmiä, joiden avulla potilaat on voitu jakaa ennusteryhmiin. Pään ja kaulan alueen syöpien prognostiikkaan ei vastaavia molekylaarisia markkereita ole vielä löydetty. Suomalaistutkijoidenkin kohteena olleiden Bmi-1:n ja CIP2A:n tutkimustulokset ovat kuitenkin olleet lupaavia kielikarsinooman prognostiikan suhteen (Häyry ym. 2010, Böckelman ym. 2011).

1.2 Cancerous inhibitor of PP2A

1.2.1 CIP2A:n rakenne ja toiminta

Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A), aiemmin tunnettu p90 autoantigeenina, on ihmisen useimpien kudostyyppien soluissa esiintyvä 90 kDa proteiini. Sitä koodaava geeni on KIAA1524, joka sijaitsee ihmisen kromosomissa lokuksessa 3q13.13. CIP2A-proteiinin ominaispiirre on sen karboksyyli-päässä sijaitseva 255 aminohappoa pitkä kiemurainen immunogeeninen rakenne. (Soo Hoo, Zhang & Chan 2002.) Normaalisti kudoksissa sen pitoisuus on hyvin pieni, lukuun ottamatta luuydintä, eturauhasta, kiveksiä ja pikkuaivoja, joissa sen pitoisuuden on todettu olevan hieman suurempi. (Junttila ym. 2007) CIP2A sijaitsee solun sytoplasmassa lähellä tumaa (Soo Hoo, Zhang & Chan 2002, Yeh ym. 2004).

CIP2A toimii onkoproteiinina inhiboimalla proteiini-fosfataasi 2A:ta (PP2A). PP2A on tuumorisuppressorimolekyylä, joka säätelee solun muuntumista edistävän onkoproteiini c-Myc:in, sekä monien muiden transkriptiotekijöiden toimintaa. Defosforyloimalla c-Myc seriini 62:n, PP2A aiheuttaa c-Myc:in ubikitoitumisen. Ubikitiinin kiinnittyminen c-Myc:iin ohjaa sen proteasomiin hajotettavaksi, jolloin sen pitoisuus pysyy normaalitasolla. (Yeh ym. 2004.) Inhiboimalla PP2A:ta CIP2A estää c-Myc:in proteolyttisen hajotuksen edistäen sen stabilisoitumista. C-Myc:in aktivaation säätely on solun normaalin proliferaation kannalta välttämätöntä, sillä sen suuren pitoisuuden on todettu soluviljelyissä ja koe-eläinmalleissa olevan yhteydessä neoplastisiin muutoksiin. Se voi myös heikentää solun erilaistumiskykyä ja aloittaa apoptoosin. (Junttila ym. 2007, Khanna ym. 2009.)

Toisaalta Böckelman ym. (2011) mukaan kielikarsinoomien solujen CIP2A ja c-Myc immunoekspressiolla ei todettu olevan yhteyttä, toisin kuin paksusuolen syövän yhteydessä on todettu (Böckelman ym. 2012). Mahdolliseksi CIP2A:n toiminnan välittäjäksi ehdotetaan PP2A riippuvaista Akt inaktivaatiota (Chen ym. 2010). Kielikarsinoomien yhteydessä fosforyloituneen Akt:n aktivaation on todettu olevan yhteydessä huonoon ei-tautispesifiseen selviytymiseen (Massarelli ym. 2005). Yhdeksi mahdolliseksi CIP2A vaikutuksen välittäjäksi on esitetty myös death-associated proteiini-kinasin (DAPk) inhibitiota (Guenebeaud ym. 2010). Vähentyneen DAP-kinasi-proteiinin ilmentymisen pään ja kaulan alueen syöpäsoluissa on todettu olevan yhteydessä taudin etenemiseen ja imusolmukemetastasointiin (Sanchez-Cespedes ym. 2000). DAP-kinasin toiminta liittyy ohjelmoituneeseen solukuolemaan, jolloin sen toiminnan eston ajatellaan edistävän syövän kehittymistä. Toisin kuin aiemmissä tutkimuksissa muiden syöpien kohdalla on ajateltu, kielikarsinoomissa CIP2A:n vaikutukset saattavat siis kohdistua muualle kuin c-Myc:in aktiivisuuden lisääntymiseen.

1.2.2 CIP2A-geeniekspression säätely

EGFR-MEK-ERK on soluissa toimiva signaalireitti. Epidermal growth factor reseptorin (EGFR) ja MEK1/2 kinaasin lisääntyneen aktiivisuuden ja yliekspression on havaittu liittyvän useisiin ihmisen maligniteetteihin (Ciardiello & Tortora 2008, Knight, Lin & Shokat 2010, Montagut & Settleman 2009). Toisaalta kliinisissä kokeissa on myös osoitettu EGFR, Raf ja MEK1/2 inhibiittorien suojaavan kasvaimen kehittymiseltä (Ciardiello & Tortora 2008, Knight, Lin & Shokat 2010, Flaherty ym. 2010, Yoon ym. 2009). Khanna ym. (2011) tutkimuksen mukaan syöpäsolujen lisääntynyt CIP2A ekspressio on EGFR-MEK-ERK -signaalireitin aktiivisuudesta riippuvaista, jota saattaisi välittää ETS-perheen transkriptiotekijä ETS1. CIP2A:n geeniekspression säätelystä vastaavan signalireitistön molekyylijä voisi olla mahdollista hyödyntää muun muassa kemoterapian kohteena. Asia vaatii kuitenkin lisätutkimuksia.

1.2.3 CIP2A:n rooli prognostisena molekyylimarkerina

Böckelman ym. (2011) tutkimuksen mukaan varhaisen vaiheen kielikarsinooman korkea CIP2A-immunoreaktiivisuus korreloi huonoon selviytymiseen. Tutkimusaineistona oli 73 preoperatiivisesti varhaisen vaiheen (T1N0M0 ja T2N0M0) OTSCC -potilasta. Näytteiden sytoplasminen immunopositiivisuus määritettiin asteikolla 0-3. Tilastollisia analyysejä varten potilaat jaettiin kahteen ryhmään: matala CIP2A immunoreaktiivisuus (pistemäärät 0-2) ja korkea immunoreaktiivisuus (pistemäärä 3). Tautispesifinen 5-vuoden selviytymisennuste voimakkaasti CIP2A-positiivisilla oli 71,0 % ja matalan CIP2A-immunoreaktiivisuuden potilailla vastaava luku oli 84,6 %. Ero ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä. Tilastollisesti merkitsevät erot eri ryhmien välillä havaittiin myös korkean gradusluokituksen, proliferaatioindeksin sekä invaasiosyvyyden suhteen. Sen sijaan voimakkaan CIP2A-positiivisuuden ei

havaittu olevan yhteydessä imusolmukemetastasointiin, paikalliseen uusiutumiseen, ikään, sukupuoleen tai tuumorin kokoon.

Lisääntyneen CIP2A ekspresion on todettu olevan yhteydessä myös moniin muihin maligniteetteihin, kuten eturauhasen ja suuontelon syöpiin (Vaarala ym. 2010, Katz ym. 2010). Rintarauhasensyövän yhteydessä sen on todettu korreloivan imusolmukemetastasointiin, proliferaatiomarkerien ekspresioon sekä p53 mutaatioihin, ja siten syövän aggressiiviseen etenemiseen (Come ym. 2009). CIP2A:n ekspresio on lisääntynyt myös keuhko- ja mahasyövässä ja sen korkean ilmentymistason on todettu olevan yhteydessä potilaan huonoon ennusteeseen (Khanna ym. 2009, Dong ym. 2011). CIP2A:ta on esitetty myös potentiaalisesti syöpähoidon kohteeksi.

1.3 Immunohistokemia

Immunohistokemian (IHC) juuret ovat 1940-luvulla, jolloin immunologian, histologian ja kemian tieteenaloja hyödyntävä menetelmä kehitettiin eläinten infektio- ja kasvaintautien rutiinidiagnostiikkaan sekä tutkimuskäyttöön. IHC:n toiminta perustuu immunologiseen antigeeni-vasta-aine tunnistukseen. Antigeenin ja vasta-aineen välille muodostuvat sidokset ovat heikkoja, ei-kovalenttisia sidoksia, useimmiten hydrofobisia tai elektrostaattisia vuorovaikutuksia (Ramos-Vara 2005).

1.3.1 Antigeenit ja vasta-aineet

Antigeenina voi toimia mikä tahansa molekyyli, jota kohtaan spesifinen vasta-aine tuotanto käynnistyy. Antigeenin vasta-aineen kanssa reagoivia kohtia kutsutaan antigeenisiksi determinanteiksi eli epitopeiksi. Antigeeninen

determinantti koostuu useista erilaisista makromolekyyleistä. Tutkittavaa antigeenia injektoimalla koe-eläimeen saadaan eläin immunisoitua antigeenia vastaan, jolloin spesifinen vasta-ainetuotanto käynnistyy. Tavallisimmin vasta-aineet ovat hiiressä tai kanissa tuotettuja IgG-, vähemmissä määrin myös IgM-luokan vasta-aineita. Immunoglobuliinien rakenne on Y-muotoinen ja koostuu kahdesta identtisestä kevyt ketjusta ja kahdesta raskasketjusta. Vasta-aineet voivat olla joko mono- tai polyklonaalisia. Polyklonaalisella vasta-aineella on suurempi sensitiivisyys, mutta matalampi spesifiteetti verrattuna monoklonaaliseen vasta-aineeseen, ja pystyy siten siis tunnistamaan kohdeproteiinin eri muunnoksia, isoformeja, mutta ristiin reaktiivisuuden mahdollisuus on vastaavasti myös suurempi. (Ramos-Vara 2005, Kiernan 2001, Dako 2006.)

1.3.2 Antigeenin paljastus

Antigeenin paljastus (antigen retrieval AR) -menetelmän huima kehittyminen 1990-luvulla on vienyt immunohistokemiaa eteenpäin siinä määrin, että lääketieteellä on kliinisessä käytössään jo useita luotettavia immunovärjäysmenetelmiä. Kudoksen fiksaus muuttaa proteiinien kolmiulotteisen rakenteen, jolloin antigeenista saattaa tulla vasta-aineelle tunnistamaton. Antigeenin paljastus on usein tarpeen cross-linking fiksatiivejä, tavallisimmin formaliinia, käytettäessä, jolloin se palauttaa molekyyliissä tapahtuneita muutoksia ja lisää siten immunovärjäyksen sensitiivisyyttä. Kaksi yleisintä AR-menetelmää ovat entsymaattinen (PIER) ja lämpöön perustuva antigeenin paljastus (HIER), joista jälkimmäinen on yleisimmin käytetty. HIER:n toimintamekanismi on tuntematon, mutta perustuu ainakin osaksi kuumentamisen aiheuttamaan epitooppien metyleeni-ristisidosten hydrolyysiin. Antigeenista riippuen HIER-tekniikan inkubaatioaika- ja lämpötila sekä puskuriliuos vaihtelevat. Tyypillisimmin paras tulos saadaan 20 minuutin inkubaatioajalla 90-95 °C höyryssä esim. sitraatti- tai Tris-puskurissa. (Ramos-Vara 2005.)

1.3.3 Vasta-aineiden leimaaminen

Vasta-aineita ei voida nähdä valomikroskoopissa, joten ne täytyy aina leimata liittämällä niihin väriä tuottava entsyymi, fluoresoiva merkkiaine tai metalli. Entsyymileimoista käytetyimpiä ovat piparjuuresta eristetty horseradish peroxidaasi (HRP) ja vasikan suolen alkaliini fosfataasi (AP). Entsyymille spesifisen substraatin ja kromogeenin läsnäollessa entsyymit tuottavat värillisen saostuman, joka osoittaa antigeeni-vasta-aine-reaktion paikan. Kromogeenista riippuen ne antavat yleisimmin reaktiolle ruskean, sinisen tai punaisen värin. Menetelmät voidaan jakaa suoriin ja epäsuoriin metodeihin sen mukaan, miten merkkiaine kiinnittyy vasta-aineeseen. (Ramos-Vara 2005, Kiernan 2001, Dako 2006.)

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Potilaista resekoidut kudospalat fiksataan, kudosprosessoidaan ja leikataan objektilaseille. Kudoksen histologian esiin saamiseksi näytelasit käsitellään rutiinisti hematoksyliini-eosinofiili (HE) -värjäyksellä, jonka tutkimuksen perusteella voidaan valita spesifinen värjäys diagnostiikan sekä prognostiikan avuksi. Kielikarsinoomien diagnostiikka on kokeneelle patologille helppoa. Luotettavaa ennustetta arvioivaa menetelmää tarvitaan potilaan hoitopäätösten tueksi. Kielen alueen yleisimmän maligniteetin, kielen levyepiteelikarsinooman, eteneminen on usein arvaamatonta eikä luotettavia prognostisia markkereja ole pystytty määrittämään. Immunohistokemialliset menetelmät ovat oikein suoritettuna sensitiivisiä, spesifisiä ja toistettavia.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää kielihyperplasioiden, kielikarsinoomien ja karsinoomiin liittyvien metastasoituneiden imusolmukkeiden CIP2A värjäytymisen voimakkuus immunohistokemiallisin menetelmin. Kielikarsinoomien primaarinäytteiden värjäytymisen intensiteettiä verrataan metastasointiin, jolloin voidaan tilastollisten menetelmien perusteella arvioida, korreloiko kohonnut CIP2A ekspressio huonoon ennusteeseen. Lisäksi selvitämme CIP2A ekspression yhteyttä syöpäkasvaimen gradus-luokkaan. Tutkimus tehdään lisäselvityksenä Böckelman ym. (2011) tutkimukselle, jonka mukaan varhaisen vaiheen kielikarsinoomissa kudoksen CIP2A ekspressio voisi olla potentiaalinen ennustetekijä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Potilaat

Keräsimme retrospektiivisesti 99 potilasta, joilta oli poistettu jokin kielen alueen kasvain. Hoito oli toteutettu Tampereen yliopistollisessa sairaalassa vuosina 1994-2007. 66 potilaalla lopullisena diagnoosina oli karsinooma, 30:llä hyperplasia ja kolmella dysplasia. Dysplasianäytteet kuitenkin poistettiin niiden vähyyden vuoksi, joten lopullisen aineiston kooksi saatiin 96 potilasta. Potilaista 53 (55 %) oli naisia ja 43 (45 %) miehiä, keski-ikä oli 60 vuotta (18-92). 37 karsinoomapotilaalla oli poistettu myös kaulan imusolmukkeet. Elektiivisissä kauladissektioissa näistä 23 potilaalla havaittiin positiivinen imusolmuke. Kaikki näytteet olivat patologin uudelleen tarkastamia.

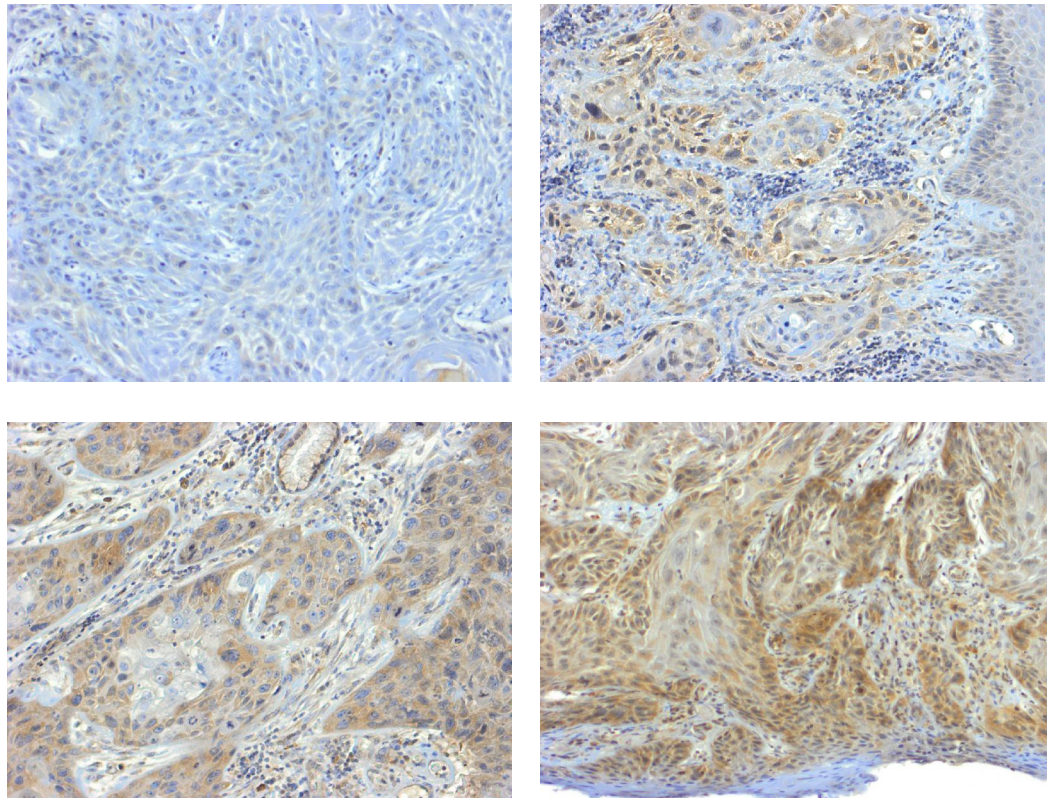
2.2. Kudosnäytteet

Potilaista resekoidut koepalat oli ensin käsitelty formalin fixed parafin embedded (FFPE) blokeiksi. FFPE:ssä näytteet fiksoitiin 10 % formaliinilla. Fiksointi pysäyttää autolyysin, estää bakteeritoiminnan sekä pyrkii säilyttämään kudoksen rakenteen mahdollisimman alkuperäisenä. Fiksaation jälkeen kasetoidut näytteet käsiteltiin kuduskuljetusprosessissa, jossa suoritettiin veden poisto. Kuduskuljetusprosessissa dehydraatio tehtiin siirtämällä näytepalat koneellisesti kuduskuljetusautomaatissa asteittain väkevämpään etanoliin ja lopuksi ksyleeniin. Ksyleeni mahdollistaa sulan parafiinin imeytymisen kudokseen. Parafiiniin valaminen tuo näytteeseen kovan tukiaineen, jotta se voidaan leikata. Blokkeja säilytettiin PSHP Laboratoriokeskuksessa, patologian osastolla.

Immunohistokemiallista värjäystä varten leikkasimme blokeista mikrotomilla 5 µm paksuisia leikkeitä, jotka poimittiin objektilaseille, deparafinoitiin ja esikäsiteltiin värjäysautomaatissa. Käyttämämme anti-CIP2A on IgG-luokan polyklonaalinen vasta-aine, joka kiinnittyy kudosnäytteissä antigeenina toimivaan CIP2A-molekyylisiin. Pipetoimme kudisleikkeisiin yhtä lasia kohden 0,1 ml 1:75 suhteessa laimennettua, valmiiksi titrattua CIP2A vasta-ainetta. Kudosten värjäys suoritettiin koneellisesti (BMK ultraView DAB Par). Tutkimuksemme vasta-aine leimattiin horseradish peroksidaasi -entsyymillä (HRP) käyttäen entsyymi-leimattua vasta-ainemenetelmää. HRP hapetti kromogeenina toimivan 3,3'-diaminobenzidinetrahydrokloridin (DAB) ruskean väriseksi alkoholiin liukenemattomaksi lopputuotteeksi, jolloin CIP2A-antigeenia ekspressoivat solut voitiin paikantaa. Vastavärinä käytimme hematoksyliiniä. Lopuksi näytteet vietiin nousevan alkoholisarjan läpi (aqua 1 min., etanoli 70 % 1 min., etanoli 94 % kahdesti 1 min., absoluuttinen etanoli kolmesti 1 min.), käytettiin ksyleenissä kolmesti 5 min. ja peitettiin peitinlasilla.

2.3. Immunoreaktiivisuuden luokittelu ja tilastolliset analyysit

Näytteiden sytoplasminen CIP2A immunopositiivisuus määritettiin valomikroskooppisesti parametrilla värjäytyvyyden intensiteetti asteikolla 0-3 (Kuva 1). Intensiteetti luokiteltiin siten, että negatiivisesti värjäytyneet saivat arvon 0 ja heikosti värjäytyvät arvon 1. Keskiasteisesti positiiviset ja paikallisesti voimakkaasti värjäytyvät saivat arvon 2, yleisilmeeltään voimakkaasti värjäytyvät saivat arvon 3. Yksittäinen solu katsottiin CIP2A-positiiviseksi, kun siinä havaittiin DAB:n sakkautumiselle ominaista ruskean väristä jyväsmuodostusta. CIP2A positiivisuuden ja kliinispatologisten muuttujien välinen yhteys testattiin x²-testillä (SPSS versio 19 PC:lle; SPSS Inc. An IBM Company).



Kuva 1. Sytoplasminen CIP2A –ekspressio pisteytys (a) negatiivinen, (b) heikosti positiivinen, (c) keskiasteisesti positiivinen ja (d) voimakkaasti värjäytynyt.

3 TULOKSET

Sytolasminen immunoreaktiivisuus jakautui hyperplasianäytteissä (n = 30) siten, että negatiivisia oli 8 (26,7 %), heikosti positiivisia 12 (40,0 %), keskiasteisesti positiivisia 5 (16,7 %) ja voimakkaasti värjäytyviä oli 5 (16,7 %). Karsinomanäytteissä (n = 64) negatiivisia oli 10 (15,6 %), heikosti positiivisia 23 (35,9 %), keskiasteisesti positiivisia 18 (28,1 %) ja voimakkaasti värjäytyneitä oli 13 (20,3 %). Imusolmukemetastaaseissa (n = 14) luvut olivat vastaavasti 4 (28,6 %), 4 (28,6 %), 4 (28,6 %) ja 2 (14,3 %). (Taulukko 1) Hyperplasioiden ja kielikarsinomanäytteiden CIP2A värjäytyvyydessä ei ollut eroa (x²-testi, p = 0,452). Kaksi karsinomatapausta (blokit ei saatavilla) sekä yhdeksän positiivista imusolmuketta (metastaasia ei lisäleikkeessä näy) joutuimme jättämään analyysien ulkopuolelle.

Taulukko 1. Värjäytyvyyspisteiden jakauma kielen hyperplasiassa, karsinoomassa ja imusolmukemetastaaseissa.

Tuumorin tyyppi	CIP2A sytolasminen ilmentyminen (n)				Yhteensä
	0	1	2	3	
hyperplasia	8	12	5	5	30
gradus 1 karsinooma	3	10	8	4	25
gradus 2 karsinooma	3	8	7	8	26
gradus 3 karsinooma	4	5	3	1	13
Imusolmukemetastaasi	4	4	4	2	14

Lopullisia tilastollisia analyysjä varten loimme kielikarsinomanäytteistä kaksi ryhmää, siten että negatiivisesti ja heikosti värjäytyneet (0-1) muodostivat ryhmän matala CIP2A ekspressio (n = 33), ja keskiasteisesti ja voimakkaasti värjäytyneet ryhmän korkea CIP2A ekspressio (n = 31). Vertasimme CIP2A:n ilmentymistä kliinispatologisiin muuttujiin, gradus-luokka ja

metastaasipositiivisuus. Kielikarsinoomanäytteiden eri gradus-luokkien välillä ei todettu tilastollisesti merkitsevää eroa (x2-testi, $p = 0,284$), kuten ei myöskään imusolmukemetastasoinnin (pN-luokitus) suhteen ($p = 0,214$). Yhteyttä ei myöskään havaittu yhdistämällä sellaiset kielikarsinoomatapaukset pN0 - ryhmään, joista imusolmukenäytettä ei ollut ollenkaan ($p = 0,532$).

Taulukko 2. CIP2A:n yhteys kliinispatologisiin muuttujiin 64 kielikarsinoomapotilaalla.

Kliinispatologiset muuttujat	Matala CIP2A ekspressio			Korkea CIP2A ekspressio		p-arvo
	n	n	%	n	%	
Gradus						
I	25	13	52	12	48	0,284
II	26	11	42,3	15	57,7	
III	13	9	69,2	4	30,8	
Imusolmuke positiivisuus						
pN0	14	5	35,7	9	64,3	0,214
pN+	21	12	57,1	9	42,9	

4 POHDINTA

Luotettavat prognostiset markerit ovat tarpeen potilaan hoidoista päätettäessä, jotta voitaisiin valita tehokkain mahdollinen, mutta kuitenkin potilasta säästävä hoitomenetelmä. Kielen levyepiteelikarsinooma poikkeaa käyttäytymiseltään muista suun- ja kaulan alueen syöivistä, sillä kielen histologisesta rakenteesta johtuen pienikin kasvain voi lähettää etäpesäkkeitä jo varhain. Siksi monissa syöivissä ennusteen arvioinnin välineenä käytetty TNM-luokitus ei ole käyttökelpoinen työkalu kielikarsinoomien prognostiikassa. Parhaiten

kielikarsinooman ennusteeseen korreloi metastaasien esiintyminen. (Bello ym. 2010a.) Kliinisessä käytössä ei vielä ole luotettavia kielisyöpöpotilaan selviytymistä ennustavia biomarkereja.

Lisääntyneen Cancerous inhibitor of PP2A –proteiinin ekspresion on todettu olevan yhteydessä maligniteetteihin. Rintarauhasensyövän yhteydessä sen on todettu korreloivan imusolmukemetastasointiin, proliferaatiomarkerien ekspresioon sekä p53 mutaatioihin, ja siten syövän aggressiiviseen etenemiseen (Come ym. 2009). Keuhko- ja mahasyövässä CIP2A:n korkean ilmentymistason on esitetty olevan yhteydessä potilaan huonoon ennusteeseen (Khanna ym. 2009, Dong ym. 2011). CIP2A:n on todettu esiintyvän suun alueen dysplasiassa ja karsinoomakudoksessa runsaammin kuin terveessä limakalvossa (Katz ym. 2010). Havaitimme voimakasta värjäytymistä erityisesti hyperplastisen epiteelin basaalisoluissa sekä maligniteettien mitoottisesti aktiivisimmissä soluissa. Kaikissa ryhmissä, hyperplasioissa, kielikarsinoomissa ja imusolmukemetastaaseissa, esiintyi sekä matala-asteisesti että voimakkaasti värjäytyneitä näytteitä.

Selvitimme CIP2A värjäytyvyyden yhteyttä maligniteetin erilaistumisastetta kuvaavaan gradus-luokkaan. Eroja ryhmien välillä ei kuitenkaan havaittu, toisin kuin Böckelman ym. (2011) tutkimuksessa, jossa CIP2A ekspresio korreloi gradus-luokan kanssa siten, että heikommin erilaistuneissa karsinoomissa CIP2A värjäytymisen intensiteetti oli voimakkaampaa kuin hyvin differentoituneissa. Poikkeavia tuloksia voivat selittää erot tutkimuspopulaatiossa, sillä Böckelman ym. (2011) tulokset ovat yleistettävissä vain varhaisen vaiheen kielenlevyepiteelikarsinoomiin, eivätkä siis täysin vertailtavissa oman tutkimuksemme kanssa. Böckelman ym. (2011) tulosten perusteella voitaisiin ajatella gradus-luokan olevan yhteydessä ennusteeseen, näin ei kuitenkaan Bello ym. (2010) ja Keski-Säntti ym. (2007) mukaan ole, vaikkakin yleisesti ottaen heikosti erilaistuneen levyepiteelikarsinooman on ajateltu olevan

etenemiseltään aggressiivisempaa (Barnes ym. 2005). Asia vaatii lisäselvitystä.

Ennustetta kuvaavana tekijänä käytimme primaarikasvaimen metastasoitumisherkkyyttä. Tutkimuksemme mukaan kasvainkudoksen CIP2A ekspressio ei ole yhteydessä imusolmukkeiden metastaasipositiivisuuteen, mikä on yhtenevä aikaisempien tutkimustulosten kanssa (Böckelman ym. 2011). Näin ollen kudoksen korkea CIP2A –pitoisuus ei näyttäisi olevan yhteydessä potilaan selviytymiseen. Kielikarsinoomalle tyypillisistä piilevistä mikrometastaaseista johtuen, imusolmukkeiden metastaasipositiivisuuden ei voida kuitenkaan parhaalla mahdollisella tavalla ajatella kuvaavan potilaan ennustetta. Parempana selviytymistä kuvaava parametrina voidaankin pitää tautispesifisiä eloonjäämislukuja. Böckelman ym. (2011) tutkimuksessa verrattiin kielen levyepiteelikarsinoomapotilaiden tautispesifisiä 5-vuoden eloonjäämislukuja matala- ja korkea-CIP2A-immunoreaktiivisuusryhmien välillä. Erot olivat tilastollisesti merkitseviä siten, että korkea CIP2A ekspressio näyttäisi ennustavan huonoa selviytymistä varhaisen vaiheen OTSCC-potilailla. Tarpeen olisikin siis seuraavaksi selvittää CIP2A ilmentymisen yhteyttä 5-vuoden eloonjäämislukuihin omassa aineistossamme.

LÄHTEET

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press 2005: Lyon, pp 169-170.

Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: mean, markers and perspectives (I). *Oral Oncol.* 2010a;46(9):630-5.

Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: mean, markers and perspectives (II). *Oral Oncol.* 2010b;46(9):636-43.

Böckelman C, Koskensalo S, Hagström J, Lundin M, Ristimäki A, Haglund C. CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2012;13(5):289-95.

Böckelman C, Hagström J, Mäkinen LK, Keski-Säntti H, Häyry V, Lundin J, Atula T, Ristimäki A, Haglund C. High CIP2A immunoreactivity is an independent prognostic indicator in early-stage tongue cancer. *Brit J Cancer.* 2011;104(12):1890-5.

Chen KF, Liu CY, Lin YC, Yu HC, Liu TH, Hou DR, Chen PJ, Cheng AL. CIP2A mediates effects of bortezomib on phospho-Akt and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 2010;29:6257-6266

Ciardello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *New Engl J Med.* 2008;358(11):1160-74.

Come C, Laine A, Chanrion M, Edgren H, Mattila E, Liu X, Jonkers J, Ivaska J, Isola J, Darbon JM, Kallioniemi O, Thezenas S, Westermarck J. CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5092-100.

Dako. Immunohistochemical staining methods: Education Guide. 2006.

Dong QZ, Wang Y, Dong XJ, Li ZX, Tang ZP, Cui QZ, Wang EH. CIP2A is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with poor prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(3):857-65.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *New Engl J Med.* 2010;363(9):809-19.

Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V, Kimchi A, Bernet A, Mehlen

P. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell*. 2010;40(6):863-76.

Hayry V, Makinen LK, Atula T, Sariola H, Makitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Brit J Cancer*. 2010;102(5):892-7.

Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, Ahola R, Arnold H, Bottzauw T, Ala-aho R, Nielsen C, Ivaska J, Taya Y, Lu SL, Lin S, Chan EK, Wang XJ, Grenman R, Kast J, Kallunki T, Sears R, Kahari VM, Westermarck J. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*. 2007;130(1):51-62.

Katz J, Jakymiw A, Ducksworth MK, Stewart CM, Bhattacharyya I, Cha S, Chan EK. CIP2A expression and localization in oral carcinoma and dysplasia. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(7):694-9.

Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmen J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol*. 2007;43(10):1007-13.

Khanna A, Böckelman C, Hemmes A, Junttila MR, Wiksten JP, Lundin M, Junnila S, Murphy DJ, Evan GI, Haglund C, Westermarck J, Ristimäki A. MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(11):793-805.

Kiernan JA. *Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice*. Hodder Arnold Publishers; 3. edition 2001.

Knight ZA, Lin H, Shokat KM. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nature Reviews. Cancer* 2010;10(2):130-7. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2009;283(2):125-34.

Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN, Papadimitrakopoulou VA. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* 2005;104(11):2430-6.

Mäkitie AA, Koivunen P, Keski-Säntti H, Tornwall J, Pukkila M, Laranne J, Luukkaa M, Vuola J, Joensuu T, Kajanti M, Grenman R. Oral tongue carcinoma and its treatment in Finland. *Eur Arch Oto-Rhino-L*. 2007;264(3):263-7.

Neville, Damm, Allen, Bouquot. *Oral & Maxillofacial Pathology*.

Ramos-Vara JA. *Technical Aspects of immunohistochemistry*. *Vet Pathol*. 2005;42:405-426.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res*. 2000;60(4):892-5.

Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2012.

Suomen syöpärekisteri. www.cancer.fi/syoparekisteri/

Suusyöpä. Käypähoito 2012. www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/

Vaarala MH, Väisänen MR, Ristimäki A. CIP2A expression is increased in prostate cancer. *J Exp Clin Canc Res.* 2010;29:136.

Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends in Molecular Medicine.* 2008;14(4):152-60.

Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol.* 2004;6(4):308-18.

Yoon YK, Kim HP, Han SW, Hur HS, Oh do Y, Im SA, Bang YJ, Kim TY. Combination of EGFR and MEK1/2 inhibitor shows synergistic effects by suppressing EGFR/HER3-dependent AKT activation in human gastric cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2009;8(9):2526-36.