

口腔扁平上皮癌の臨床病態に関する癌関連因子の研究

石 岡 康 希

Studies of Cancer-Related Factors Concerning with Clinical Condition of Oral Squamous Cell Carcinoma

Yasuki Ishioka

(平成14年2月12日受付)

緒 言

発癌、浸潤、転移などの癌特有の進展過程には、多段階的に複数の遺伝子異常が細胞内に蓄積し¹⁾、さらに細胞接着因子などの異常の関与することが知られている。癌関連遺伝子は、本来、正常細胞にも存在し、正常細胞周期の調節にも関与しており、細胞の機能に重要な役割を果たしている。一般に、DNAに損傷が生じて細胞死が誘導されると、生体は防御機構によって生存することが考えられている。これらの細胞増殖/細胞死の制御に関わる主な遺伝子としては、p53, ras, サイクリンD1, Rbなどがあげられる^{2,3)}。これらの遺伝子に変異が生じると、生態の防御機構が破綻し、細胞は癌化し、進展する。

口腔扁平上皮癌(OSCC)は、原発時の発生部位の臨床病態の所見から、単発性癌と多発性癌に大別される^{4,5)}。単発性癌は、さらに口腔局所と所属リンパ節への転移状態や過程を考えると、時間的経過が加味され、原発部に限局性の非転移例、初診時に既に所属リンパ節へ転移をした転移例、一次治療後に局所の再発はなく、所属リンパ節へ後発転移を示す転移例⁶⁾、また5年以上の長期経過後に局所に再発をきたした晩期再発例⁷⁾に分類できる。このような種々な病態を呈する例のあることは、癌の発生や進展に関して、遺伝子レベルに何らかの差異が存在する可能性が推定される。

遺伝子における塩基配列を比較すると、個人間で多くの部位に差違がある。塩基の変化は、人口中1%以上の頻度で存在する場合には、遺伝子多型と呼ぶが、数百から一千塩基対に1ヶ所の割合で1塩基に差違の生

じるものを一塩基多型(SNP)と称している^{8,9)}。SNPは、判定が容易であり、かつ情報処理も容易なため、多型マーカーとして利用し易く、最近では、SNPを応用した遺伝子による疾患の研究が進められている。細胞周期調節因子であるサイクリンD1の遺伝子(CCND1)のエクソン4にはA/GのSNPが存在し、その遺伝子型には、AA, AG, GGの3種類が存在する。頭頸部癌では、短期間に再発する例がGG型に高かったことが報告されている²⁹⁾が、OSCCでの検討は行われていない。そこで、OSCCにおけるCCND1多型と臨床病態との関与が示唆され、本研究も重要な意味を有すると考えられた。

癌の病態を規定する細胞生物学的特性として、転移は重要な一大要因である。転移の事象に至るまでには、いくつかの組織細胞学的過程があるが、そこには、種々の細胞接着因子や増殖因子などにおける異常の発生が推定されている。まず、原発巣からの癌細胞の離脱は、転移における最も重要な初期のイベントである。この時点では、細胞間接着の中心的役割を担っているE-カドヘリンの不活化が関与しているとされている¹⁰⁾。したがって、原発巣におけるE-カドヘリンの変化が、各病態になんらかの影響を及ぼす可能性が考えられる。

OSCCでも癌関連因子異常の解析は進んでいるが、臨床病態に関連した報告はいまだに少なく、臨床的研究をさらに積み重ねていく必要がある。

本研究では、特に再発や転移に関連する異常病態の発生や機序を検索すべく、OSCC例を、前述のごとき臨床病態別に5群、すなわち、初発・非転移例、転移例、後発転移例、晩期再発例、および多発癌例に分類した。これら各群での臨床病理学的事項と各種の癌関連因子の異常との相関、また頭頸部癌で重要な外因性危険因子とされる喫煙や飲酒との関連を検討すべく、

以下のごとき検索を行った。

材料ならびに方法

I. 実験材料

本学歯学部附属病院第二口腔外科で生検や外科的に切除した OSCC 例を被験対象とした。この OSCC 79例の病態別分類と臨床病理学的事項との関係を表に示した (表1)。

1. 口腔癌における p53, H-ras, Rb の遺伝子変異の検索

細胞周期調節/細胞死制御の関連遺伝子の p53, H-ras および Rb 遺伝子変異に関して、臨床病態と臨床病理学的事項との関連をみるため、OSCC 79例の原発巣と再発巣、リンパ節転移巣の各例について検索を行った。その内訳は、原発部限局性・非転移例29例、転移例12例、後発転移例21例、晚期再発例8例、多発例9例であった。

2. CCND1 一塩基多型 (SNP) の検索

CCND1 多型に関して、臨床病態と臨床病理学的事項との関連をみるため、OSCC 68例を対象とした。その内訳は、原発部限局性・非転移例25例、転移例7例、後発転移例19例、晚期再発例8例、および多発例が9例であった。

3. E-カドヘリンの免疫組織化学的検索

OSCC における E-カドヘリンの発現様相を検索するとともに、その発現と臨床病理学的事項などの関係を検討するため、OSCC 62例を対象として検索した。その内訳は、原発部限局性・非転移例21例、転移例12例、後発転移例18例、晚期再発例4例、および多発例が7例であった。

II. 実験法

1. p53, H-ras, Rb 遺伝子変異の検索法

新鮮凍結組織やホルマリン固定・パラフィン包埋組織、および対照群として非癌化部の口腔粘膜上皮と末梢血液から、Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA) と DEXPAT (Takara, Tokyo, Japan) を用いて genomic DNA を抽出した。p53 遺伝子の exon 5~8, H-ras 遺伝子の exon 2, Rb 遺伝子の intron 25 について、PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法で遺伝子変異検索を行った。PCR の条件は、genomic DNA 50 ng, dNTP 1.5 mM, AmpliTaq Gold (Perkin Elmer, Cheshire, UK) 0.25U, 10×PCR buffer (Perkin Elmer, Cheshire, UK) は 1.5 μ l, MgCl₂ 1.5 mM, プライマー各 0.1 mM で、総量 15 μ l とし、各プライマー、アニーリング温度と

表1 臨床別分類と臨床病理学的事項との関連

症例分類	原発部・ 非転移例	転移例	後発 転移例	晚期 再発例	多発例	
	29例 (%)	12例 (%)	21例 (%)	8例 (%)	9例 (%)	
性別	男	16 (55%)	8 (67%)	11 (52%)	6 (75%)	3 (33%)
	女	13 (45%)	4 (33%)	10 (48%)	2 (25%)	6 (67%)
年齢	~49	3 (10%)	0 (0%)	4 (19%)	4 (50%)	0 (0%)
	50~69	18 (62%)	7 (58%)	9 (43%)	3 (37%)	4 (44%)
	70~	8 (28%)	5 (42%)	8 (38%)	1 (13%)	5 (56%)
T分類	T1	6 (20%)	2 (17%)	5 (24%)	3 (38%)	1 (12%)
	T2	13 (45%)	4 (33%)	9 (43%)	5 (62%)	2 (22%)
	T3	4 (15%)	1 (8%)	3 (14%)	0 (0%)	3 (33%)
	T4	6 (20%)	5 (42%)	4 (19%)	0 (0%)	3 (33%)
stage	I	6 (20%)	0 (0%)	5 (24%)	3 (38%)	0 (0%)
	II	13 (45%)	0 (0%)	9 (43%)	5 (62%)	2 (22%)
	III	4 (15%)	7 (58%)	3 (14%)	0 (0%)	4 (45%)
	IV	6 (20%)	5 (42%)	4 (19%)	0 (0%)	3 (33%)
分化度	低	3 (10%)	2 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12%)
	中	9 (31%)	5 (42%)	12 (57%)	2 (25%)	4 (44%)
	高	17 (59%)	5 (42%)	9 (43%)	6 (75%)	4 (44%)
異型性	軽度	3 (10%)	0 (0%)	3 (14%)	2 (25%)	1 (12%)
	中等度	19 (66%)	6 (55%)	11 (52%)	5 (63%)	4 (44%)
	高度	7 (24%)	6 (55%)	7 (34%)	1 (12%)	4 (44%)

表2 PCR-SSCPで使用したプライマー

	Primer Sequence	Annealing Temperature (°C)	Annealing Time (s)
p53	Exon 5 { 5'-GACTTTCAACTCTGTCTCCT-3' 5'-ATCAGTGAGGAATCAGAGGC-3'	55	33
	Exon 6 { 5'-GCCTCTGATTCCCTCACTGAT-3' 5'-CACTGACAACCACCCTTAAC-3'	55	30
	Exon 7 { 5'-CCTCATCTTGGGCCTGTGTT-3' 5'-CAGTGTGCAGGGTGGCAAGT-3'	55	30
	Exon 8 { 5'-GGACCTGATTTCCCTTACTGC-3' 5'-GCTTCTGTCTCCTCTGCTTGCTT-3'	55	30
H-ras	Exon 2 { 5'-TCCTGCAGGATTCCTACCGG-3' 5'-GGTTCACCTGTACTGGTGGA-3'	58	30
Rb	Intron 25 { 5'-ATCGAAAGCATCATAGTTAC-3' 5'-TAACGAAAAGACTTCTTGCA-3'	58	30

アニーリング時間などの条件は表にまとめた (表2)。PCR 反応は、Programmable Thermal Cycler (M.J. Research) 上で行い、denatureは、94°Cで30秒間、extensionは、72°Cで30秒間でサイクル回数は35回とし、first denatureは、94°Cで10分間、final extensionは、72°Cで10分間行った。PCR産物は、85°Cで10分間加熱・変性させて、15%ポリアクリルアミドゲル上に、35W、6~8時間電気泳動し、Silver Stain II Kit Wako (Wako, Osaka, Japan) で銀染色を行い、バンドを検出した。腫瘍部と正常コントロール部を比較し、移動度の異なったバンドを変異バンドと判定した。

p53 変異と喫煙歴と飲酒歴との関連については、Matthias *et al*⁽²⁹⁾ の方法に準拠し、喫煙指数と飲酒指数を検討した。

2. CCND1 一塩基多型 (SNP) の検索法

末梢血リンパ球から Genomic DNA purification kit (Promega) を用いて genomic DNA を抽出した。PCR-restriction fragment length of polymorphism (PCR-RFLP) 法により、CCND1 exon 4 の nucleotide position 870 の A/G 多型を検索した。PCR の条件は、McKay *et al*⁽³⁰⁾ の方法に準じて行い、New England Biolabs 社の制限酵素 *ScrF1* を使用した (図1)。PCR産物は、1×TAE 緩衝液および3%アガロースゲル (Nu Sieve 3:1, FMC) 上で電気泳動後に、エチジウムブロマイドで染色を行い、紫外線下で白黒ポラロイドフィルム (T667, Polaroid) を用いて撮影した。167 bp 部位にバンドがみられる例を AA 型、167 bp と 145 bp の両方にバンドがみられる例を AG 型、145 bp のみにバンド

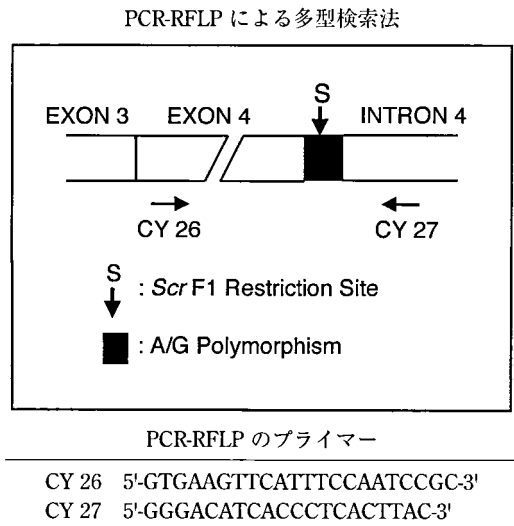


図1 PCR-RFLP による CCND1 多型検索法

上：制限酵素 *ScrF1* の認識部位 (矢印) に、A/G 多型部位 (黒四角) が存在するため、同部の切断の可否で多型を判定。

下：使用したプライマーを示す。

がみられる例を GG 型と判定した。

また、CCND1 多型と喫煙歴・飲酒歴との関連について検討したが、喫煙指数と飲酒指数は、Matthias *et al*⁽²⁹⁾ の方法に準じた。

3. E-カドヘリンの免疫組織化学的検索法

免疫組織化学的検索は、4.5 μm 厚切片のホルマリン

固定パラフィン包埋切片を用い、酵素抗体法で行った。すなわち、組織切片を脱パラフィンし、pH6.0 リン酸緩衝液に浸漬し、5分間のマイクロウェーブ処理を3回行った。次いで、0.1% H₂O₂-メタノール溶液に浸漬し、内因性のペルオキシダーゼを除去した後、1/100に希釈した一次抗体を1時間反応させ、続いて二次抗体を1時間反応させた。さらに、DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

一次抗体には、Anti-E-cadherin antibody (TDL, Lexington, KY, USA) を用い、また二次抗体としては Peroxidase-coupled goat anti-mouse antibody (MBL, Nagoya, Japan) を使用した。

観察部位は、癌巣周辺部(癌-間質境界部)で評価を行い、対照として標本内に含まれる非癌部口腔粘膜扁平上皮におけるE-カドヘリンの発現を検索し、これを陽性の基準とした。

OSCCにおけるE-カドヘリンの発現様相は、Shiozaki *et al*³⁸⁾ の分類に従い、非癌部と同等の陽性反応を示す例を非減弱型とし、陽性・陰性反応の混在例、陽性反応が全体に弱い例、あるいは陽性反応のない例を減弱型とした。癌細胞の細胞質にびまん性の染色を示し、膜状の陽性反応のない例も減弱型と評価した。

以上の1, 2, 3の結果と臨床病理学的事項ならびに臨床病態、喫煙歴や飲酒歴との相関性については、 χ^2 検定およびクラスカル・ワーリス検定により統計処理を行い、危険率5%以下を有意差ありと判定した。

結 果

I. p53, H-ras, Rb 遺伝子変異

p53 変異は、OSCC の79例中15例 (19%) に認められた。病態別にみると、原発部限局性・非転移例29例中3例 (10%)、転移例12例中2例 (17%)、後発転移例21例中5例 (24%)、晩期再発例8例中2例 (25%)、多発例9例中3例 (33%) に p53 変異が認められた(表3)。図2に、p53 変異例を示した。エクソン別にみると、15例中12例にエクソン8での変異を認めた。変異例15例中7例は歯肉原発、また6例は舌原発例であり、このうちエクソン8に変異のあった例は、歯肉5例、舌5例であった。後発転移例の1例は、原発巣と転移巣には異なった変異エクソンがみられ、3例は原発巣に変異があったが、転移巣には変異はみられなかった。病態間に明らかな相関は認められなかった。

発癌と喫煙や飲酒との関連では、p53 の変異は、喫煙例24例中4例 (17%) で、非喫煙例53例中11例 (21%) にみられ、一方、飲酒群27例中4例 (15%) で、非飲酒群では50例中11例 (22%) にみられた。しかし、その群間には明らかな相関は認められなかった(表4)。

なお、H-ras と Rb には変異はなかった。

II. CCND1一塩基多型 (SNP) の検討結果

OSCC の68例中、GG型が17例 (25%)、AG型が35例 (51%)、AA型が16例 (23%) であった。図3には、

表3 p53 の変異

	No.	age	sex	部位	変異 exon 部位	
					原発巣	再発/転移巣
原発部・非転移例	1	66	F	歯肉	exon 7	—
	2	61	M	歯肉	exon 5	—
	3	66	F	舌	exon 8	—
転移例	4	61	F	舌	—	exon 8
	5	56	F	歯肉	—	exon 8
後発転移例	6	48	M	舌	exon 8	—
	7	74	F	舌	exon 5	exon 5
	8	80	F	舌	exon 8	exon 7
	9	60	M	歯肉	exon 8	—
	10	66	M	口蓋	exon 8	—
晩期再発例	11	24	F	舌	—	exon 8
	12	65	M	頬粘膜	—	exon 5
多発例	13	55	F	歯肉	exon 6	exon 8
	14	72	F	左右歯肉	exon 8	—
	15	89	M	上下歯肉	—	exon 8

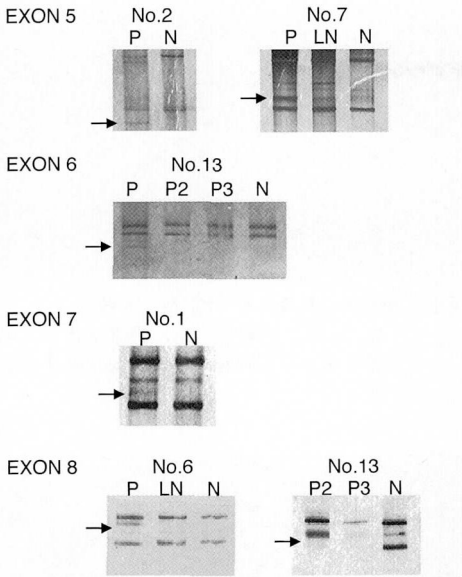


図2 PCR-SSCPによるp53変異の解析
 P; 原発巣, P2; 再発巣あるいは第2癌, P3; 第3癌, LN; 頸部リンパ節転移巣, N; 正常コントロール
 移動度の異なるバンドを変異バンドと評価(矢印)した。

表4 p53変異と飲酒, 喫煙との関係

p53変異と飲酒との関係				
分類		p53変異+ 15例	p53変異- 62例※	p-value
非飲酒群	50例 (%)	11 (22%)	39 (78%)	0.4474
飲酒群	27例 (%)	4 (15%)	23 (85%)	
アルコール量 (g/日)	0	11	39	0.7744
	<50	2	17	
	50≤, <100	1	5	
	100≤	1	1	

※カルテ記載不備の2例は除外

p53変異と喫煙との関係				
分類		p53変異+ 15例	変異- 62例※	p-value
非喫煙群	53例 (%)	11 (21%)	42 (79%)	0.6748
喫煙群	24例 (%)	4 (17%)	20 (83%)	
喫煙量 (本/日)	0	11	42	0.9638
	1~19	2	8	
	20~39	2	10	
	40~	0	2	

※カルテ記載不備の2例は除外

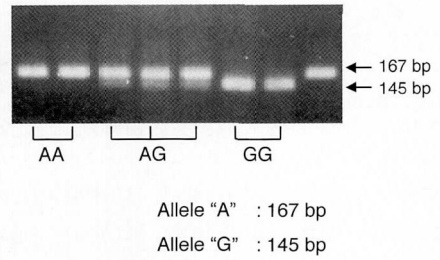


図3 PCR-RFLPによるCCND1多型の解析
 145 bpのみにバンドがみられる例をGG型, 145 bpと167 bpにバンドがみられる例をAG型, 167 bpのみにバンドがみられる例をAA型と判定した。

CCND1多型例を示した。臨床病理学的事項との関連について、stageをみるとGG型の頻度は、I型は14例中6例(43%)、II型は24例中7例(29%)、III型は13例中2例(15%)、IV型は17例中2例(12%)であったが、I型からIV型へと進行例になるにつれ、GG型の頻度には低下傾向が認められた。分化度別にみると、低分化型は5例中2例(40%)、中分化度は28例中9例(32%)、高分化型は34例中6例(18%)であり、高分化型に比べ、低分化型ではGG型の頻度が高い傾向を示したが、いずれも明瞭な相関はなかった(表5)。

表5 CCND1多型と臨床病理学的事項との関係

分類		GG 17例	AG 35例	AA 16例	
性別	男	40例(%)	9(23%)	23(57%)	8(20%)
	女	28例(%)	8(28%)	12(44%)	8(28%)
stage	I	14例(%)	6(43%)	5(36%)	3(21%)
	II	24例(%)	7(29%)	12(50%)	5(21%)
	III	13例(%)	2(15%)	7(54%)	4(31%)
	IV	17例(%)	2(12%)	11(65%)	4(23%)
分化度	低	5例(%)	2(40%)	2(40%)	1(20%)
	中	28例(%)	9(32%)	13(46%)	6(22%)
	高	34例(%)	6(18%)	19(56%)	9(26%)
異型性	軽度	7例(%)	2(29%)	4(57%)	1(14%)
	中等度	36例(%)	9(25%)	21(58%)	6(17%)
	高度	25例(%)	6(24%)	10(40%)	9(36%)

臨床病態別にみると、GG型の頻度は、転移例の7例中1例(14%)、後発転移例の19例中2例(10%)にみられ、他の例の原発部限局性・非転移例25例中7例(28%)、晩期再発例8例中4例(50%)、また多発例9例中3例(33%)と比較すると、GG型の発現頻度は低い傾向を示した(表6)。

表6 CCND1 多型と臨床病態との関係

分類		GG 17例	AG 35例	AA 16例
原発部・ 非転移例	25例(%)	7(28%)	10(40%)	8(32%)
転移例	7例(%)	1(14%)	4(58%)	2(28%)
後発転移例	19例(%)	2(10%)	14(74%)	3(16%)
晩期再発例	8例(%)	4(50%)	2(25%)	2(25%)
多発例	9例(%)	3(33%)	5(56%)	1(11%)

表7 CCND1 多型と飲酒, 喫煙との関係

CCND1 多型と飲酒との関係		GG (17例)	AG (34例)※	AA (16例)
非喫煙群	43例(%)	10(23%)	22(51%)	11(26%)
喫煙群	24例(%)	7(29%)	12(50%)	5(21%)
アルコール量 (g/日)	0	10	22	11
	<50	4	10	4
	50≤, <100	3	2	1
	100≤	0	0	0

※カルテ記載不備の1例を除外

CCND1 多型と喫煙との関係

CCND1 多型と喫煙との関係		GG (17例)	AG (34例)※	AA (16例)
非喫煙群	46例(%)	12(26%)	22(48%)	12(26%)
喫煙群	21例(%)	5(24%)	12(57%)	4(19%)
喫煙量 (本/日)	0	12	22	12
	~19	3	2	3
	20~39	2	8	1
	40~	0	2	0

※カルテ記載不備の1例を除外

CCND1 多型と喫煙歴や飲酒歴との関連では, 明らかな相関は認めなかった(表7)。

Ⅲ. E-カドヘリンの免疫組織化学的染色結果

非癌化部のE-カドヘリンの発現は, 基底層から有棘層に強く発現し, 角化層では陽性反応は認められなかった(図4)。癌組織におけるE-カドヘリンの発現様相は, 癌巣中央部では細胞間に膜状の陽性反応が認められたが, 癌巣周辺末梢部になるにつれ, その発現は減弱し, 間質と接する部位の癌細胞の細胞膜には, 陽性反応は少なくなるか認められなかった(図

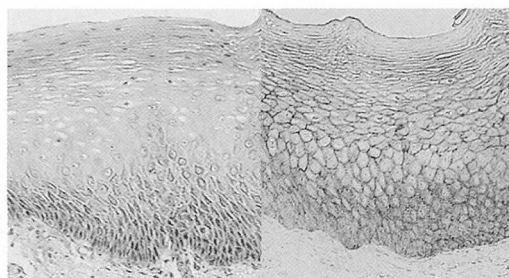


図4 非癌部におけるE-カドヘリン発現
左;(HE, 100倍), 右;(酵素抗体法, 100倍)
基底層から有棘層にかけて膜状陽性反応を示した。

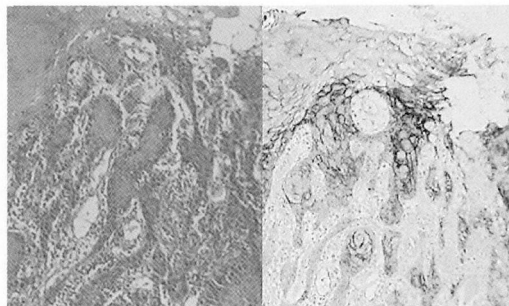


図5 癌組織におけるE-カドヘリン発現1
左;(HE, 100倍), 右;(酵素抗体法, 100倍)
癌巣末梢部では, E-カドヘリン発現の減弱を示した。

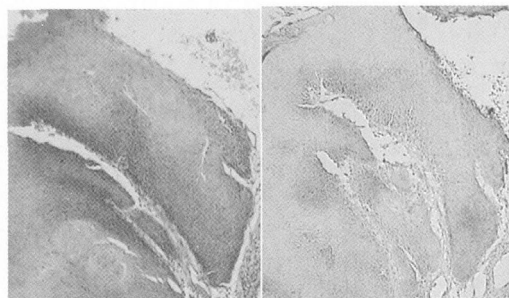


図6 癌組織におけるE-カドヘリン発現2
左;(HE, 100倍), 右;(酵素抗体法, 100倍)
膜状陽性反応を認めず, 細胞質に発色を示した。

5)。また, 細胞質にのみ強く発色していたり, E-カドヘリン活性の欠失が混在する部位も観察された(図6)。

E-カドヘリンの発現様相と臨床病理学的事項との関係を見ると, stage, 分化度, 異型度には相関は認められなかった(表8)。

表8 E-カドヘリン発現様相と臨床病理学的因子の関係

分類	癌巣末梢部		
	非減弱型	減弱型	
Stage	I, II	10	19
	III, IV	11	22
分化度	高	11	24
	中	8	13
	低	2	4
異型性	軽度	2	3
	中等度	14	20
	高度	5	18

表9 病態別 E-カドヘリンの発現様相

分類	癌巣末梢部		
	非減弱型	減弱型	
原発部・非転移例	21例 (%)	14 (67%)	7 (33%)
転移例	12例 (%)	3 (25%)	9 (75%)
後発転移例	18例 (%)	1 (6%)	17 (94%)
晩期再発例	4例 (%)	1 (25%)	3 (75%)
多発例	7例 (%)	2 (29%)	5 (71%)

*p<0.05

病態別 E-カドヘリンの発現様相では、癌巣周辺末梢部では、原発部限局性・非転移例21例中7例 (33%) が減弱型を示したのに対して、転移例では12例中9例 (67%)、後発転移例では18例中17例 (94%) が減弱型を示した。また、原発部限局性・非転移例と比較して、有意差が認められた (表9)。

考 察

p53 遺伝子は、全悪性腫瘍の約40~50%に変異が検出されている癌抑制遺伝子である^{11,12)}。非生理的なストレスが加わり、DNAに損傷が生じると、p53 遺伝子は細胞周期を停止させて損傷部の修復を行うか、または損傷程度が強い場合には細胞死を誘導して排除することにより、自己防御システムとして働いている。このため、p53 遺伝子は、ゲノムの守護神¹³⁾ と呼称されることがある。p53 の変異は、肝細胞癌¹⁴⁾ や脳腫瘍¹⁵⁾ では悪性度の指標になり、また乳癌¹⁶⁾、肺癌¹⁷⁾、大腸癌¹⁸⁾ などでは予後不良因子の一つになることが報告されているが、口腔癌では予後や病態との関係を示す報告は少ない。

p53 遺伝子には11個のエクソンが存在するが、ヒト

の癌における変異の大多数はエクソン5から8に認められている¹⁹⁾ ことから、本研究でもこの範囲で検索した。検索した OSCC では、79例中15例 (19%) に p53 変異が認められた。口腔癌にも約40%の例に変異を認めたとの報告もあるが、今回得られた研究結果ではそれよりも低い数値を示した。この理由として、今回の検索例数が前述の報告例に比べると少ないことや、変異の報告があるエクソン4と10¹²⁾ を検索しなかったことが影響している可能性もある。しかし、Sakata の報告²⁵⁾ でも、本研究結果と同様に、口腔癌での変異発現率は26%と比較的低い例もある。

本研究での p53 のエクソン変異部位をみると、エクソン8の変異例が15例中12例 (80%) で最も好発し、全ての群でみられた。この12例中、歯肉原発例は5例で舌原発例は5例であり、この2部位が大多数を占めていた。Hainaut *et al*²⁰⁾ も、エクソン8では他のエクソンの約2倍の頻度の変異が生じており、また、歯肉、舌、口底原発例などで多発していたと報告している。以上のことから、エクソン8は OSCC 特有のホットスポットである可能性が示唆されるが、本研究では変異様式の検索は行っていないため、今後は、変異様式についても検索し、その発現意義を検討する必要があると考えている。

原発巣と再発あるいは転移巣での変異部位を比較すると、後発転移例の1例では、原発巣と転移巣で異なるエクソンに変異がみられた。また、3例では原発巣に変異が認められたが、転移巣には変異を認めなかった。これらの原因としては、腫瘍が異なる遺伝子を持つヘテロな細胞集団から構成されている可能性が考えられた^{21,22)}。

本研究では p53 変異と臨床病態には明らかな相関はなかった。次に、外因性危険因子の関与を考え、頭頸部癌で p53 変異との関連が報告されている喫煙や飲酒^{23,24)} との関係について検討した。しかし、本研究結果からは変異の有無と喫煙、飲酒との相関は認められなかった。喫煙は、頭頸部癌の中でも、特に咽頭癌との相関の強いことが知られているが、同じ口腔癌でも発生部位によっては異なり、喫煙との相関性の少ないものもあると考えられる。また、喫煙指数として、年数と喫煙量の関係を考慮した pack-years²⁴⁾ があるが、これらの評価法の差異も結果に影響している可能性も考えられた。なお、H-ras、Rb については今回変異を認めなかったが、Sakata の報告²⁵⁾ でも変異率は5%であり低値であった。

サイクリン D1 は、G1/S 移行期に働く細胞周期調節因子であるが、細胞増殖の脱制御を惹起し、発癌に関与すると考えられている。サイクリンには臓器・組

織特異性があると考えられており、頭頸部扁平上皮癌では、サイクリン D1 が発癌、増殖および進展に関与する可能性があると考えられている^{26,27)}。

サイクリン D1 遺伝子 (*CCND1*) は、染色体 11q13 に位置し、5 個のエクソンと 4 個のイントロンからなっている全長約 15 kb の遺伝子である。A/G 多型 (A870G) はエクソン 4 に存在し、非小細胞肺癌 (NSCLC) のリスク因子として同癌の進展や予後と相関する²⁸⁾。Matthias *et al*²⁹⁾ は、頭頸部癌の低分化例では *CCND1* の GG 型の頻度が高く、初回治療後に短期間で再発し易いと報告している。本研究でも、高分化例に比べ低分化例では GG 型の頻度が高い傾向を示したが、低分化例が少なく、有意な相関はみられなかった。

本研究では、GG 型が 25%、AG 型が 51%、AA 型が 23% であった。Matthias *et al*²⁹⁾ の報告では、頭頸部癌患者は GG 型 25.9%、AG 型 50.3%、AA 型 23.8% であり、健常者は GG 型 28.8%、AG 型 52.9%、AA 型 18.3% で、癌患者と健常者間に明らかな差はなく、*CCND1* 多型が口腔癌の発癌に関与している可能性は低いと考えられた。

本研究では、GG 型の頻度が、転移例の 7 例中 1 例 (14%)、後発転移例の 19 例中 2 例 (10%) であり、他の群に比べ、転移群は GG 型の頻度が低い傾向を示した。また、臨床病期をみると、stage が進行するにつれ GG 型の頻度は低下する傾向を示していた。GG 型の患者では、癌が進展と転移しにくい傾向のあることが示唆された。

Betticher *et al*²⁸⁾ は、*CCND1* には 2 種類の転写産物 transcript a と transcript b が存在し、*CCND1* 多型のタイプによって、両者の混在比が異なることを報告している。多型のタイプにより異なるタンパク発現を示す可能性が示唆されるが、現在での、文献的渉猟の限りでは報告は見当たらなかった。

また、頭頸部癌において AA 多型と喫煙との間に相関を示した報告がある³¹⁾ が、本研究でも *CCND1* 多型と喫煙や飲酒との関連を検討した結果、相関はみられなかった。口腔癌では、喫煙は発癌リスク因子としては影響が少ないことが推測された。

複数の因子が関与し、転移のプロセスにも関与している。細胞接着関連因子としては、インテグリン³²⁾、CD44³³⁾、MMP³⁴⁾ などがあるが、本研究では、転移の初期段階である癌細胞の原発巣からの離脱に注目し、それに関与する E-カドヘリンについて検索した。

原発巣から癌細胞が離脱するには、E-カドヘリンのホモフィリックな細胞間接着の低下が関与する。E-カドヘリンは Ca イオンの存在下に、細胞外ドメインの最

先端部で強固に結合し、細胞間の接着に関わっている³⁵⁾。細胞内ドメインには β -カテニンや γ -カテニンが直接結合しており、さらにそれらは α -カテニン-アクチンとの結合を介して細胞骨格へと連結している。

E-カドヘリンの発現低下によって細胞間接着は低下するが、その発現低下機序は 2 つ考えられている。1 つは、E-カドヘリン遺伝子のプロモーター領域にある CpG island の高メチル化によって転写が阻害される場合³⁶⁾ であり、他の 1 つは、16q22.1 に存在する E-カドヘリン遺伝子の変異や欠失による場合³⁷⁾ である。

臨床病理学的には、E-カドヘリンと stage との間には、明らかな相関を認めなかった。一般に、E-カドヘリンの発現様式は個々の腫瘍で異なったものであり、原発巣の進展状態に関わらず転移能を有する可能性が示唆されている。

臨床病態別にみると、原発部限局性・非転移例と比較して、転移例と後発転移例では高頻度に E-カドヘリンの発現が減弱し、両群間に有意差が認められた。特に、後発転移例では減弱率が高く、原発巣での E-カドヘリンの発現をみることにより、所属リンパ節への転移を予測でき、ひいては、初診時転移のない N0 例における予防的頸部廓清術施行の判断の一助となりうる可能性が示唆された。症例数は少ないものの、多発例や晩期再発例でも E-カドヘリン発現の減弱が高頻度に見られ、転移だけでなく、再発との関連も示唆された。E-カドヘリン発現の減弱を示す例では、非減弱型よりも癌細胞が浸潤している可能性があり、切除における安全域を通常よりも広く設定する必要性も考えられる。E-カドヘリン発現様式を参考にした切除範囲の設定は、所属リンパ節への転移の制御のみならず、局所制御の向上にも役立つ可能性が推定された。

Shimoyama *et al*³⁹⁾ は、E-カドヘリンが強発現しているにも関わらず高い浸潤、転移能を示す例のあることを報告しているが、本研究でも後発転移例で E-カドヘリンの減弱を示さなかった 1 例がそれに相当するものと考えられた。これは、E-カドヘリンと α -カテニンがカドヘリン-カテニン複合体を形成し、 α -カテニンがカドヘリンの機能を調整しているためと考えられている。また、細胞増殖因子の刺激により β -カテニンのチロシン残基のリン酸化が亢進するとともに、細胞間の接着性が低下するという報告もあり^{40,41)}、 β -カテニンは E-カドヘリンの接着機能を制御している可能性が推定される。

以上のことから、*CCND1* 多型と E-カドヘリンの発現様相を総合的に検討することは、診断や治療に関する臨床病態の推定根拠になる可能性が示唆された。

結 論

OSCC を研究対象として、癌関連因子異常と臨床病態、臨床病理学的事項との関連を検索し、以下の結果を得た。

I. p53 変異は、OSCC の79例中15例 (19%) に認められた。p53 変異の発現率は、臨床病態別にみると、原発部限局性・非転移例29例中3例 (10%)、転移例12例中2例 (17%)、後発転移例21例中5例 (24%)、晩期再発例8例中2例 (25%)、多発例9例中3例 (33%) に認められたが、群間に差異はなかった。p53 変異例の15例中12例にエクソン8での変異を認め、エクソン8の部位がOSCCでのホットスポットである可能性が示唆された。

II. 臨床病理学的に、CCND1 GG型は、stage Iでは14例中6例 (43%)、stage IIでは24例中7例 (29%)、stage IIIでは13例中2例 (15%)、また stage IVでは17例中2例 (12%) であり、進行例ではGG型の頻度が低下傾向を示した。

臨床病態別には、CCND1 GG型は、転移例の7例中1例 (14%)、後発転移例の19例中2例 (10%) であり、他の例の原発部限局性・非転移例の25例中7例 (28%)、晩期再発例の8例中4例 (50%)、多発例の9例中3例 (33%) と比較して、転移群のGG型頻度の低い傾向がみられた。

CCND1 GG型患者は進行例が少なく、転移の少ない傾向を持つ可能性が示唆された。

III. 臨床病態別のE-カドヘリン発現様相は、原発部限局性・非転移例21例中7例 (33%) が減弱型を示したのに対し、転移例では12例中9例 (67%)、後発転移例では18例中17例 (94%) が減弱型を示し、相関が認められた。

E-カドヘリン発現の減弱を示す例は、初診時転移のない例であっても所属リンパ節転移をきたす可能性の高いことが強く推定された。

以上のことから、CCND1多型とE-カドヘリンの発現様相を総合的に検討することは、診断や治療に関する臨床病態の推定根拠になる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始懇切なるご指導と御校閲を賜った広島大学大学院医歯薬総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医学講座 (口腔外科学第二) 石川武憲教授に深甚なる謝意を表すとともに、貴重な御助言、御校閲を賜った本学先進医療開発科学講座 (口腔病理学) 高田 隆教授と本学先進医療開発科学講座 (口腔外科学第一) 岡本哲治教授に深謝致

します。

さらに本研究の遂行および論文の作成にあたり、ご指導、御助言を賜りました本学顎口腔頸部医学講座 (口腔外科学第二) の杉山 勝助教、宮内美和博士、同講座の諸先生方に感謝致します。

最後に、陰ながら私を支えてくれた家族に心から感謝致します。

文 献

- 1) 山中 昇: 頭頸部癌における遺伝子解析. 耳喉頭頸 **73**, 359-365, 2001.
- 2) 加藤順也: G1 サイクリンと CDKs. 実験医学 **15**, 1911-1916, 1997.
- 3) 安達淳一, 横田 淳: p53 による細胞周期制御機構とアポトーシス誘導機構. 実験医学 **15**, 1969-1974, 1997.
- 4) 松尾 亮, 植野 茂, 篠田 豊, 虫本浩三, 白数力也: 15年間に口腔粘膜の6か所から発生した多発癌の1例. 日口外誌 **41**, 318-320, 1995.
- 5) 川辺良一, 大村 進, 齊藤友克, 小林園生, 青木伸二郎, 藤田浄秀: 口腔多発癌の背景因子に関する検討. 日口外誌 **45**, 421-426, 1999.
- 6) 高田和彰, 遠藤邦彦: 口腔領域悪性腫瘍の頸部リンパ節転移に関する臨床統計的検討. 日口外誌 **34**, 872-878, 1988.
- 7) 大村あゆみ, 大関 悟, 笹栗正明, 中島幹雄: 口腔癌治療後, 長期経過して口腔内に腫瘍の再発をきたした症例の検討. 日口外誌 **40**, 1238-1247, 1994.
- 8) 中村祐輔: 先端のゲノム医学を知る. 羊土社, 東京, 12-39, 2000.
- 9) 中村祐輔: SNP 遺伝子多型の戦略. 中山書店, 東京, 2-17, 2000.
- 10) 清木元治: ヒト癌細胞の転移機構の解析. 癌転移 (渡邊 寛, 清木元治, 編). 医薬ジャーナル, 大阪, 15-42, 1998.
- 11) 多田光宏, 張 長亮: p53 変異とその機能的影響. 細胞工学別冊, 26-38, 1998.
- 12) Greenblatt, M.S., Bennett, W.P.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer epidemiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**, 4855-4878, 1994.
- 13) Lane, D.P.: p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16, 1992.
- 14) Oda, T., Tsuda, H.: p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **52**, 6358-6364, 1992.
- 15) Kyritsis, A.P., Bondy, M.L.: Germline p53 gene mutation in subset of glioma patients. *J Natl Cancer Inst* **86**, 344-349, 1994.
- 16) Bergh, J., Norberg, T.: Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in reaction to

- adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Medicine* **10**, 1029–1034, 1995.
- 17) Horio, Y., Takahashi, T.: Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **53**, 1–4, 1993.
 - 18) Goh, H-S., Yao, J.: p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* **55**, 5217–5221, 1995.
 - 19) Levine, A.J., Perry, M.E.: The role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* **69**, 409–416, 1994.
 - 20) Hainaut, P., Hernandez, T.: IARC Database of gene mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **26**, 205–213, 1998.
 - 21) 富田尚裕, 門田卓士: 分子病理学的観点からみた問題点と展望. 日外会誌 **98**, 366–372, 1997.
 - 22) Ohue, M., Tomita, N., Monden, T.: A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res* **54**, 4798–4804, 1994.
 - 23) Blot, W.J., Mclaughlin, J.K.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* **48**, 3282–3287, 1988.
 - 24) Brennan, J.A., Boyle, J.O., Koch, W.M.: Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **332**, 712–717, 1995.
 - 25) Sakata, K.: Alterations of tumor suppressor genes and the H-ras oncogene in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **25**, 302–307, 1996.
 - 26) Akama, Y., Yasui, W., Yokozaki, H., Kitahara, K., Ishikawa, T. and Tahara, E.: Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **86**, 617–621, 1995.
 - 27) Yasui, W., Akama, Y., Kuniyasu, H., Semba, S., Shimamoto, F. and Tahara, E.: Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas; correlation with proliferative activity and p53 status. *J Exp Therap Oncol* **1**, 88–94, 1996.
 - 28) Betticher, D.C., Thatcher, N., Altermatt, H.J., Hoban, P., Ryder, W.D. J., and Heighway, J.: Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* **11**, 1005–1011, 1995.
 - 29) Matthias, C., Branigan, K., Jahnke, V., Leder, K., haas, J., Heighway, J., Jones, P.W., Strange, R.C., Fryer, A.A. and Hoban, P.: Polymorphism within the Cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin cancer Res* **4**, 2411–2418, 1998.
 - 30) McKay, J.A., Douglas, J., Ross, V.G., Murray, G.I., Cassidy, J., McLeod, H.L.: Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. *Int J cancer* **88**, 77–81, 2000.
 - 31) Zheng, Y., Shen, H., Sturgis, E.M., Wang, L.E., Eicher, S.A., Strom, S.S., Frazier, M.L., Spitz, M.R., Wei, Q.: Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck; a case-control study. *Carcinogenesis* **22**, 1195–1199, 2001.
 - 32) Perrotti, D., Cimino, L., Falcioni, R.: Metastatic phenotype; growth factor dependence and integrin expression. *Anticancer Res* **10**, 1587–1597, 1990.
 - 33) Ue, T., Yokozaki, H., Kagai, K., Higashikawa, K., Yasui, W., Sugiyama, M., Tahara, E., Ishikawa, T.: Reduced expression of the CD44 variant exons in oral squamous cell carcinoma and its relationship to metastasis. *J Oral Pathol Med* **27**, 197–201, 1998.
 - 34) Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67–68, 1980.
 - 35) Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S.: Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* **267**, 386–389, 1995.
 - 36) Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A.: Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7416–7419, 1995.
 - 37) Kremmidiotis, G., Baker, E., Crawford, J.: Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity. *Genomics* **49**, 467–471, 1998.
 - 38) Shiozaki, Y., Tahara, H.: Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancer. *Am J Pathol* **139**, 17–23, 1991.
 - 39) Shimoyama, Y., Hirohashi, S.: Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinoma; loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* **57**, 131–135, 1991.
 - 40) Hamaguchi, M., Matsuyoshi, N., Ohnishi, Y.: p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J* **12**, 307–314, 1993.
 - 41) Shibamoto, S., Hayakawa, M.: Tyrosine phosphorylation of β -catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhesion Communi* **1**, 295–305, 1994.