

Comparative genomic hybridization(CGH) 法による 早期舌癌の細胞遺伝学的解析

桑 原 将 司

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態情報医科学講座放射線医学
(主任：伊藤勝陽教授)

受付：平成13年12月25日

受理：平成15年1月28日

Comparative genomic hybridization (以下, CGH と略す) 法は, 腫瘍細胞における全ゲノムの相対的なコピー数の増減を網羅的に検出する手法である。本研究の目的は CGH 法を用いて, 早期舌癌 (T1-2N0M0) の染色体異常と予後の関連性を解析することである。対象は1998年4月1日から2001年3月31日に, 広島大学医学部放射線科において舌癌の組織内照射前に原発巣から組織が採取できた早期舌癌 26例 (I期6例, II期20例) とした。男女比は15:11, 平均年齢61.7才, 初診からの観察期間の中央値は25.5ヶ月であった。実験方法は腫瘍細胞 DNA と正常細胞 DNA をそれぞれ異なる蛍光色素で標識し, スライドガラス上で正常分裂中期 (染色体) 細胞とハイブリダイゼーションを行った。その後, CCD カメラ付の顕微鏡にて画像を取り込み, 染色体上のそれぞれの蛍光色素の量を測定し, コピー数の増減を解析した。結果は, 1q (62%), 5q (62%), 16p (65%), 19p (77%) にコピー数の増加を認め, 3p (31%), 21q (35%) にコピー数の減少を認めた。I期とII期の病期別の比較では, I期よりもII期で 1q のコピー数の顕著な増加が認められた (17% vs. 75%, $p<0.05$)。一方, 患者の観察期間中に認められた8例の後発頸部リンパ節転移の内7例は病期II期であった。特に, II期での後発頸部リンパ節転移症例はリンパ節転移のない症例に比べ, 3q のコピー数増加が高頻度に認められた (86% vs. 31%, $p<0.05$)。この結果, CGH 法を用いた早期舌癌の染色体異常の解析は, 早期舌癌の予後因子としての診断に有用であることが示された。特にII期の舌癌にみられる 3q の増幅は後発頸部リンパ節転移と相関していることから, 患者治療法の選択に際して重要な判断材料である。

Key words : Early tongue carcinoma, CGH, Gain of 3q, Lymphnode metastasis

口腔内悪性腫瘍の約55%を占める舌癌は, Ir-192 等の組織内照射が有効で高い5年生存率を得ることが知られている。特に T1-2N0M0 に分類される早期舌癌において良好な治療成績が得られている。しかし, 早期舌癌治療後の約30%にみられる頸部リンパ転移を併発する症例 (以下, 後発頸部リンパ節転移) では, 治療成績が著しく低下することが報告されている。舌癌の治療成績向上のためには後発頸部リンパ節転移の予測が重要であるが, 後発頸部リンパ節転移ならびに局所制御率の予測因子として現在は病理組織学的所見や病期分類が広く用いられている。

近年, 悪性腫瘍の発生, 進展, 転移には, 様々な遺伝子変異の蓄積が関与していることが明らかとなってきた。しかしながら, それぞれの患者についてこれら

全ての癌関連遺伝子を検索することは極めて困難である。Comparative genomic hybridization (以下, CGH と略す) 法は, 腫瘍細胞における1回のハイブリダイゼーションで全染色体の遺伝子異常に由来する DNA コピー数の増加及び減少を網羅的に検索できる手法である¹³⁾。実際, CGH 法は頭頸部ならびに口腔領域腫瘍にも応用されて, その有用性が示されている^{2-6,12,17,19,26,28)}。従来, 舌癌に関する CGH 法解析例は少なく²⁷⁾, 特に治療予後との解析については皆無であった。

本研究では, 早期舌癌症例の CGH 法による解析で, 腫瘍細胞の DNA コピー数の変化と, 臨床病期, 後発頸部リンパ節転移, 治療成績との相関性から, CGH 法解析結果が診断や治療効果の予後因子になるかを検

討した。

材料と方法

1. 材料

検体は、1998年4月1日から2001年3月31日に広島大学医学部放射線科で早期舌癌 (T1-2N0M0) と診断され、組織内照射前に生検で腫瘍組織を採取した26症例である。病期分類は、T1N0M0 (I期) が6例、T2N0M0 (II期) が20例であった。患者の平均年齢は61.7才 (中央値58才, 35~88才), 男女比は15対11, 組織型は全例扁平上皮癌であった (Table 1)。検体採取前に、補助療法として、外照射, 化学療法, 外照射と化学療法の両者併用が行われていた。外照射は7例 (I期1例, II期6例) に施行され、線量の中央値は30 Gyであった。化学療法は14例 (I期1例, II期13例) に施行され、主として CDDP+5-Fu が2コース投与されていた。外照射と化学療法の両者併用されたのは2例であった。一方、補助療法を受けていない症例は7例 (I期4例, II期3例) であった。全例に Ir-192 による低線量率組織内照射が施行され、線量の中央値は 69.75 Gy (60~71.6 Gy) であった。

患者の初診時からの観察期間の中央値は25.5ヶ月 (9~42ヶ月) であった。

2. 実験方法

1) DNA の抽出及び蛍光色素の標識

腫瘍細胞をプロテアーゼ K で処理した後、フェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。腫瘍細胞の 1 µg DNA をニックトランスレーション法により Spectrum Green-dUTP (Vysis, Inc., Downers Grove, IL) で蛍光標識した。同様に正常細胞の 1 µg DNA を Spectrum Red-dUTP (Vysis, Inc., Downers Grove, IL) で蛍光標識した。それぞれ蛍光色素で標識された DNA は、CGH 法の至適の大きさである 300 bp ~ 3000 bp となるようにニックトランスレーション法の酵素反応時間を調節した。

2) 蛍光色素標識 DNA の染色体へのハイブリダイゼーション

10 µl の Cot1-DNA (Life Technologies, Bethesda, MD) と、蛍光色素標識された腫瘍 DNA および正常 DNA をそれぞれ 400 ng 混合し、エタノール沈殿を行った。得られた DNA を CGH ハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド/2×SSC 溶液/10%硫酸デキストラン) に溶解し、73°C, 5分間変性処理した。

男性健常人の末梢血から得られたヒト分裂中期染色体標本 (Normal Metaphase CGH Target Slide, Vysis, Inc., Downers Grove, IL) をカプランジャー内の 2×SSC/0.5%NP-40 溶液で37°C, 30分間にて前処理した後、70%, 85%, 100%の冷エタノール溶液で脱水, 洗浄した。さらに70%ホルムアミド/2×SSC

Table 1. Summary of genetic alterations detected by comparative genomic hybridization in 26 early tongue carcinomas.

Case No.	Sex	Age	Histological grade	Stage	Lymphnode metastasis	gain	loss
1	F	74	well	I	-	3p.5p.7q.9p.10p.19p.21q	-
2	M	53	well	I	-	1p.7p.7q.8q.13q.16p.19p.19q.20p	-
3	M	65	well-mod.	I	-	2p.2q.3q.4q.5q.6p.7p.18q.21q	14q
4	F	76	-	I	-	1p.3p.5q.7q.8p.9p.9q.10p.10q.11p.12p.12q.16p.16q.17p.18p.19p.19q.20p.20q	13q.21q
5	F	59	well	I	-	1p.1q.2q.3q.4p.5q.6p.6q.8p.8q.10q.12p.13q.16p.17p.17q.18p.18q.19q.20q.21q.22q	3p.5p.14q
6	M	56	-	I	+	4p.8q.9p.9q.10p.12p.17q.18p.19q.20q	4q.6q
7	F	64	well	II	-	3q.5q.7p.8p.13q.14q.16p.16q.17p.19p.20p.20q	-
8	M	57	-	II	-	1p.1q.2q.5p.6q.7p.7q.10q.13q.14q.16q.18p.19p	-
9	M	48	-	II	-	1q.2p.2q.5p.5q.10p.10q.11p.11q.17p.19p.20p.20q	7p.9p.18q.21q
10	F	71	-	II	-	1p.1q.2q.4q.5p.5q.8p.8q.9p.14q.16q.18p.19p.21q	3p
11	M	57	-	II	-	1p.1q.5p.5q.7q.8q.10p.11p.11q.16p.17p.17q.18q.19p.20q	2p.13q.21q
12	M	46	-	II	-	1q.2p.3q.6q.10p.10q.15q.16p.16q.17p.17q.18q.19p.20p.22q	1p.3p.4p.5p.13q.14q.21q
13	F	80	-	II	-	1q.7q.8p.9p.9q.11q.12p.14q.15q.16p.16q.17p.18p.18q.20p.20q.21q	13q.22q
14	F	54	poor	II	-	1q.2p.2q.4q.5p.6p.8p.9q.10p.11p.12q.13q.14q.16p.16q.17q.19p.21q.22q	3p.3q.5p.6q.18q
15	M	79	well	II	-	1p.1q.2q.4p.4q.5p.5q.6q.7p.9p.9q.13q.14q.15q.16q.17p.18p.18q.19p.22q	8q.10q
16	M	43	well	II	-	1p.1q.2p.4q.5p.5q.7p.7q.8q.9p.9q.10q.12p.12q.13q.14q.16p.18p.19p.21q.22q	3p.3q
17	F	75	-	II	-	1p.1q.4p.5q.6p.7q.8q.9p.9q.10p.13q.15q.16p.16q.17p.17q.18p.19p.19q.20q	3p.3q
18	F	49	mod.	II	-	1p.1q.2p.3q.4p.5p.6p.7p.7q.8p.9p.9q.10p.12q.14q.16p.16q.17p.18p.18q.19p.19q.20p.20q.22q	2q.4q.8q.11q.21q
19	F	53	-	II	-	1p.3p.3q.4p.4q.5p.5q.7p.7q.8p.8q.9p.9q.10p.11p.12q.13q.16p.16q.17p.18p.18q.19p.19q.20p.20q.21q.22q	1q.2q.6p.6q.10q.11q
20	M	88	-	II	+	2p.3q.4p.4q.10q.12p.12q.18p.18q.19p.19q.20q.21q.22q	3p.5p
21	M	78	well	II	+	2p.2q.3q.7p.7q.11p.12p.16p.19p.19q.20p.20q.21q.22q	17q
22	M	85	-	II	+	1q.2p.3q.4q.5q.6q.8p.11q.12q.15q.17p.18q.19p.21q	6p.14q.22q
23	F	79	-	II	+	1p.1q.4p.7q.14q.16p.16q.17p.17q.18p.18q.19p.19q.20q.22q	21q
24	M	35	-	II	+	3p.3q.4p.5p.5q.6q.7p.7q.9p.9q.11q.12p.13q.14q.16p.16q.18p.20p.20q	1p.2p.2q.8p.8q.12q.19p.21q
25	M	43	-	II	+	1q.2q.3q.4q.5q.8p.8q.9p.9q.10p.10q.12q.13q.14q.15q.16p.16q.17p.17q.18q	1p.2p.3p.5p.6p.6q.7q.11q.19p.21q.22q
26	M	38	-	II	+	1q.2p.2q.3p.3q.4q.5q.6q.7p.8q.9p.9q.10p.10q.11p.11q.12q.14q.16p.17q.18p.18q.19p.20p.	6p.7q.8p.21q

溶液で73°C, 3分間変性処理した。再び70%, 85%, 100%の冷エタノール溶液で脱水, 洗浄した後, 37°Cホットプレート上で乾燥させた。上記で得られた染色体標本上に, 変性処理直後の混合溶液を滴下し, パラフィルムで覆い, 乾燥防止のため周囲をペーパーセメントで封じた。ハイブリダイゼーションは37°Cの湿潤密閉された暗箱内で, 3日間行った。

ハイブリダイゼーション終了後, パラフィルムを取り除き, 45°Cの50%ホルムアミド/2×SSC溶液にて1回10分間, 3回洗浄を行った。さらに45°Cの2×SSC溶液で10分間1回, 45°Cの2×SSC/0.5%NP-40溶液で5分間1回, 室温の2×SSC溶液で5分間1回洗浄した。風乾した後, 10 µlの4,6-di-amino-2-phenylidole(DAPI)と抗蛍光退色試薬を含む溶液にて対比染色を行い, カバーガラスで覆い, 周囲をネイルポリッシュにて封じた。

3) 画像処理及び解析

上記の方法で蛍光色素標識された染色体は, CCDカメラ付きの蛍光顕微鏡で, CGH 蛍光画像解析システム (CytoVision CGH, Applied Imaging 社, 英国) に画像として取り込んだ。CGH 法の解析は, 蛍光強度を定量し, 赤色に対する緑色の蛍光強度の比 (G/R比) を各染色体の長軸に沿って算出し, プロファイルを作製した。少なくとも5個以上の中期分裂期細胞を用いて95%信頼区間を算出し, その平均値を増幅, 欠失の判定の基準とした。増幅, 欠失を判定するカットオフ値は G/R 比1.25以上を増幅, 0.75以下を欠失とした。染色体番号は Q バンドに準じた DAPI バンドにより識別した。本研究の前に, すでに染色体の増幅, 欠失の判明している乳癌由来の細胞 MPE-600 を用いて実験の再現性を行った。なお, 今回の研究で正常 DNA は健常人男性の末梢血リンパ球の DNA のみを用い, 腫瘍 DNA と性差があるので, 性染色体は CGH 法の解析から除外した。

成 績

1. CGH 法の結果

CGH 法の結果の1例として症例3の蛍光画像を Fig. 1 に, 同じ症例より得られた CGH プロファイルを Fig. 2 に示した。上記の方法で解析した全患者の各染色体長腕及び短腕部分の CGH 法の結果を Fig. 3 に示した。60%以上の染色体に DNA コピー数の増加を認めた領域は, 1q (62%), 5q (62%), 16p (65%), 19p (77%) であり, DNA コピー数の減少した領域を30%以上に認めたのは, 21q (35%), 3p (31%) であった。

DNA コピー数の変異の総数は, 1症例あたり平均

19.6 (中央値18.5, 8~34) であった。病期別では, I 期で1症例あたり平均14.8 (中央値12.0, 8~26), II 期で1症例あたり平均21.1 (中央値20, 12~34) であった。両病期間での統計学的な有意差は認められなかった ($p=0.06$)。

2. 早期舌癌26例の臨床経過

全症例の1年粗生存率は90.9%, 3年粗生存率は85.2% (Kaplan-Meier 法) であった。病期別の3年累積生存率はI期で100%, II期で81.4% (Kaplan-Meier 法) であった (Fig. 4)。後発頸部リンパ節転移症例は8症例 (I期1例, II期7例) あり, 組織内照射から後発頸部リンパ節再発までの期間は中央値4ヶ月 (1~18ヶ月) であった。後発頸部リンパ節転移の累積発生率は観測期間1年で27%であった (Fig. 5)。

3. CGH 法の結果と臨床データとの比較

臨床病期と DNA コピー数の増加または減少した領域の関係は, 1q の増幅が, I 期では6例中1例 (17%) 認められたのに対し, II 期では20例中15例 (75%) と有意に増加した ($p<0.05$, Fisher の直接確率法) (Fig. 6)。さらに, 後発頸部リンパ節転移出現の有無と DNA コピー数の増加または減少した領域との関係では, 3q のコピー数の増加が, II 期の後発頸部リンパ節転移のない13例中4例 (31%) であったのに対し, 後発頸部リンパ節転移症例7例中6例 (86%) と, 有意に増加していた ($p<0.05$, Fisher の直接確率法) (Fig. 7)。

一方, 病理組織学的分化度においては, 高分化扁平上皮癌と低, 中分化扁平上皮癌との間に染色体増幅または欠失領域の有意差を検出できなかった。

考 察

本研究で染色体の増幅が多く認められた染色体部位は 1q, 5q, 16p, 19p であった。これらの増幅は頭頸部癌を含む腫瘍で既に報告されている結果と良く一致している。すなわち, 1q の増幅は上咽頭癌で⁹⁾, 5q の増幅は頭頸部癌で²⁵⁾, 16p の増幅は, 舌癌²⁷⁾や大腸, 直腸癌で報告されている¹⁾。19p の増幅は頭頸部癌では報告されていないが, 家族性前立腺癌の半数に認められている²³⁾。1q を除く 5q, 16p, 19p の癌遺伝子は未だに特定されていない。

本研究では 1q のコピー数の増加が I 期 (17%) より II 期 (75%) で多く認められた。1q の増幅と病期については, Fang らが上咽頭癌で臨床病期と同様の相関を報告している⁹⁾。肝癌では 1q 領域に存在する hypomethylation of satellite 2 (Sat2) が, 腫瘍の進展

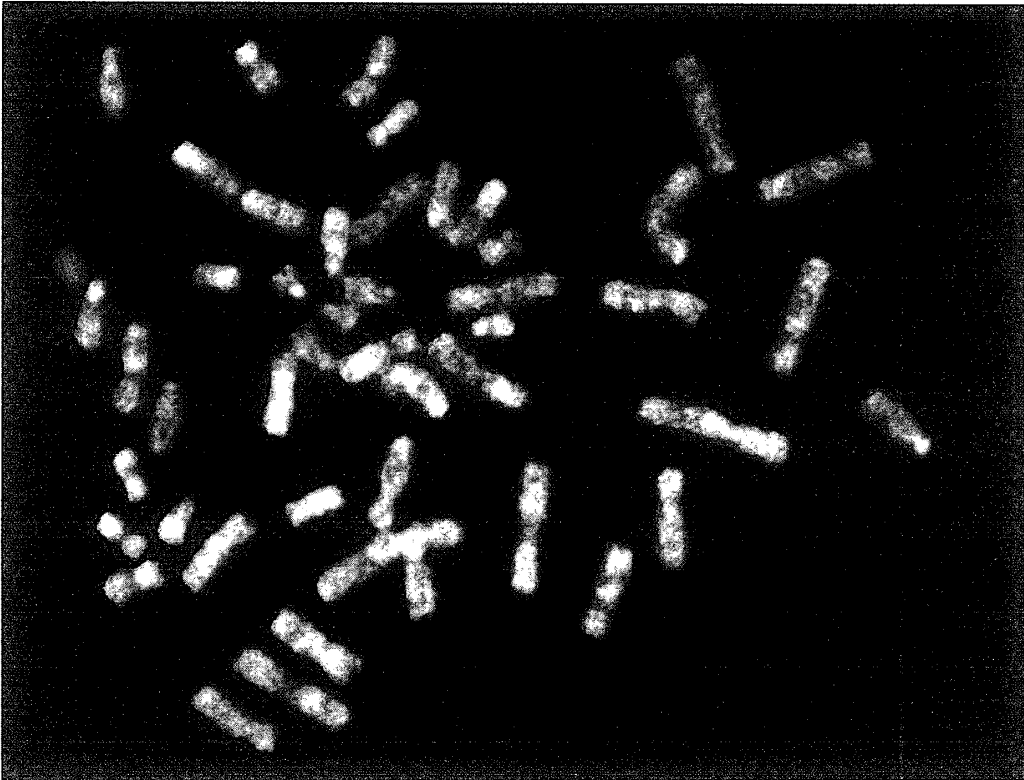


Fig. 1. In two-color images, intermediate tones (yellow) indicate two copies of genomes. Green color represents a gain of DNA tumor and red color represents a loss of genome.

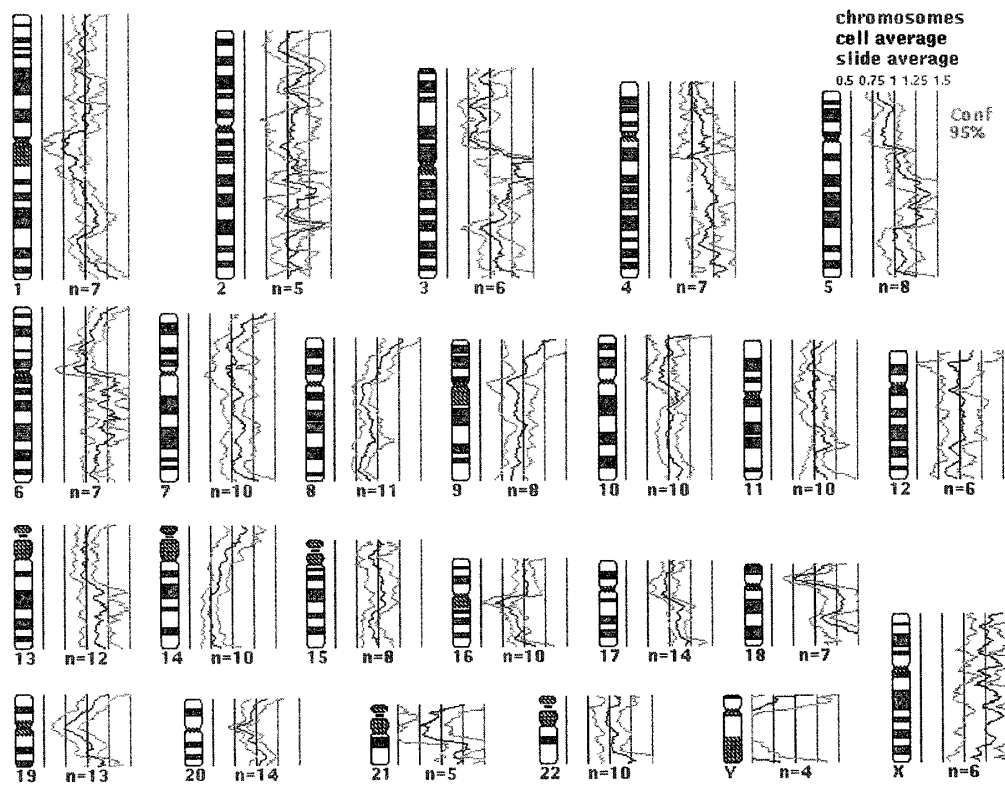


Fig. 2. CGH profile of case No.3. The averaged profiles of n chromosomes with paralleled 95% confidential lines are plotted on five straight vertical lines representing, from left to right, a G/R ratio of 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, and 1.5. Diagnostic thresholds were ratio 0.75 and ratio 1.25 for chromosomal losses and gains, respectively.

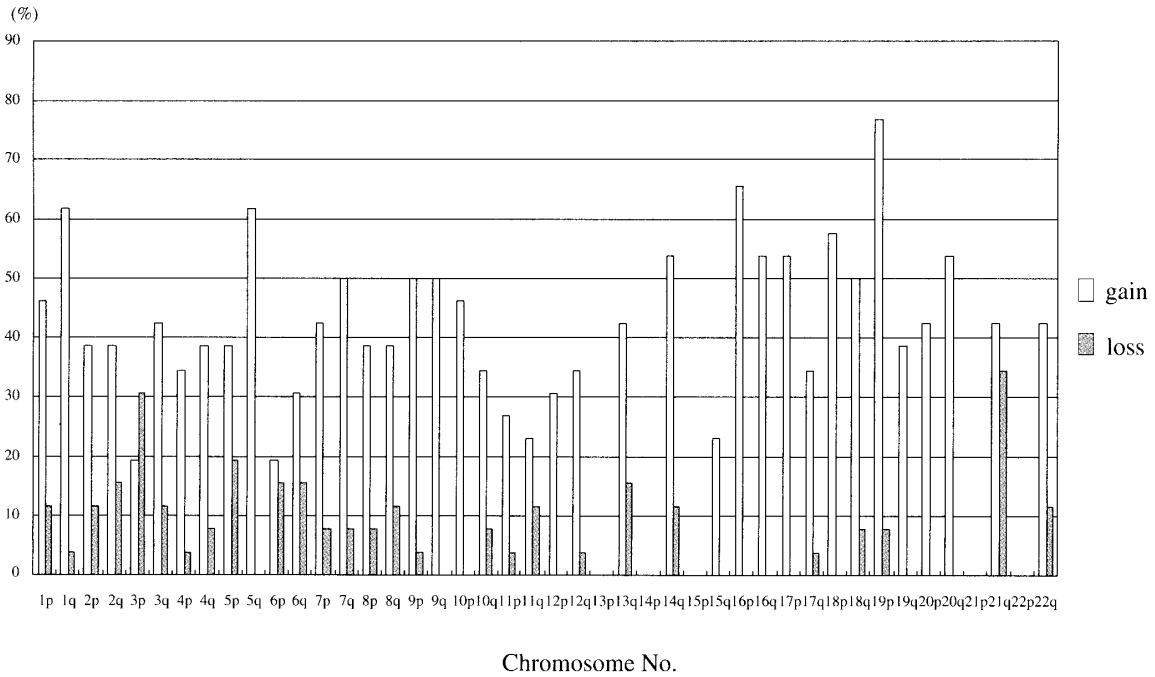


Fig. 3. Distribution of genetic alterations detected by comparative genomic hybridization in 26 early tongue carcinomas.

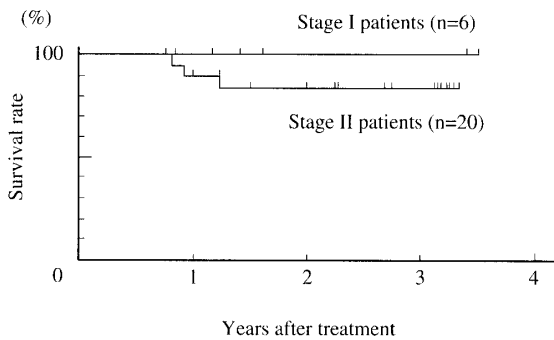


Fig. 4. Over all survival rates for Stage I and II patients for tongue carcinomas.

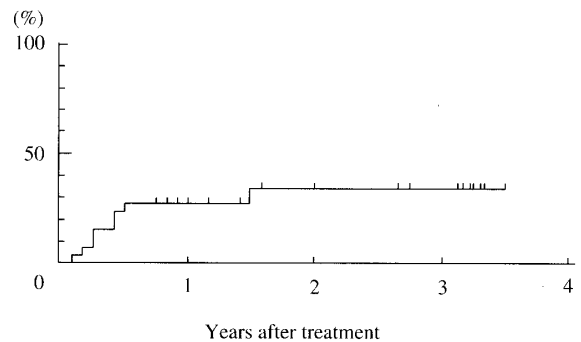


Fig. 5. Late occurrence rate of lymphnode metastasis of 26 early tongue carcinomas.

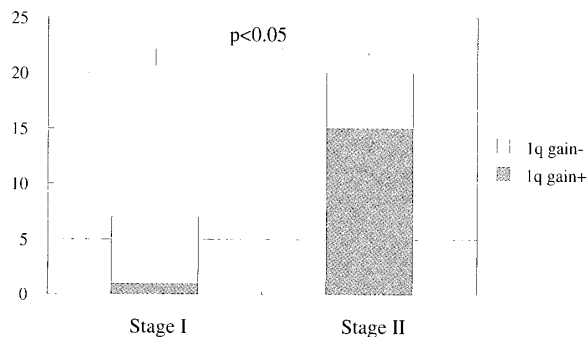


Fig. 6. The distribution of gain found at chromosome 1q in patients with different clinical stage for all patients. The difference is statistically significant between stage I and stage II patients. ($p<0.05$, Fisher exact test)

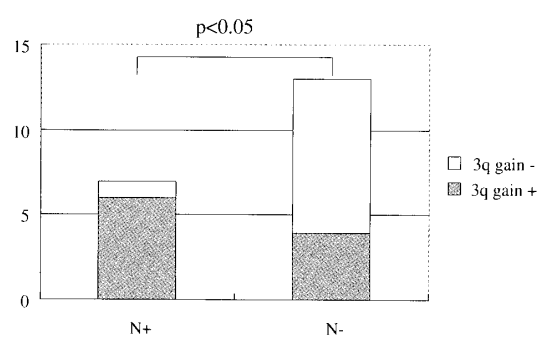


Fig. 7. The distribution of gain found at chromosome 3q in the patients with or without lymph node metastasis in stage II patients. The difference is statistically significant between with and without lymph node metastasis. ($p<0.05$, Fisher exact test)

に関連しているという報告がある²⁹⁾。また、Pimkhaokhamらは、食道癌細胞株において、1q32に細胞増殖や細胞周期を制御する癌関連遺伝子のATF3とCENPFを同定している²¹⁾。本研究の結果はこれらSat2, ATF3, CENPF癌遺伝子が、舌癌の進展にも関連している可能性を示した。

一方、染色体欠失が高頻度に認められた染色体部位は3p, 21pであった。CGH法で検出された欠失領域は片方のアレル欠失と考えられ、このヘミ接合体によるLOH(loss of heterozygosity)が知られている。アレル欠失によるLOHはp53領域や3pのプロープによるFISH (fluorescence in situ hybridization)法により確認されている^{7,18)}。CGH法によるアレル欠失とLOHも前立腺がんでは報告されている⁸⁾。癌細胞で生じたLOH領域には癌抑制遺伝子が存在するとされており、従って、CGH法で認められた欠失領域に固有の癌抑制遺伝子が示唆される。本研究で染色体欠失が認められた3pには癌抑制遺伝子のFHIT(fragile histidine triad gene)が同定されており、実際、舌癌においてFhitの発現低下が報告されている¹⁶⁾。21pには該当する癌抑制遺伝子が現在まで知られていないが、本研究で共通して認められている欠失領域であり、新規の舌癌特有の癌抑制遺伝子が存在する可能性がある。

本研究において使用した生検試料は、放射線照射や抗癌剤処理を受けた患者から採取したものである。従って、これらの処理により染色体欠損や遺伝子変異を起こす可能性がある。しかし、本研究の結果で示したような染色体上の特異な部位での欠損・変異は放射線照射ならびに抗癌剤処理では知られていない。これらの処理により、欠損ならびに変異が一律に増加する可能性はあるが、本研究の結果に影響を及ぼす事はないと思われる。

本研究では、欠失を示す細胞の割合は最高でも35%と、増幅を示す細胞の割合よりも極端に低い値を示した(Fig. 3)。原因として2つの理由が考えられる。その1つは、CGH法によるDNAコピー数の検出可能な領域サイズの限界である。CGH法の感度はampli-con(増幅単位)と増幅レベルの2つのパラメーターから規定されている。増幅単位が5 Mb以上であれば、2倍の増幅レベルでも検出可能であるが、増幅単位が300 kbでは5~10倍以上の増幅レベルを要する。逆にこのことから、DNAコピー数の欠失の検出には5 Mb以上のDNAサイズが必要だとされている²²⁾。本研究では小サイズの欠失が検出できないために、染色体欠失を示す細胞の割合が低下したと考えられる。第2番目の理由は、腫瘍組織への正常細胞の混入による

CGH法の検出感度の低下の可能性が指摘される。正常細胞の混入による影響は、腫瘍DNAを100%用いた場合、G/R比が1.5以上を示していた領域でも、20%の正常細胞が混入することで、G/R比が1.25を下回ることが確認されている¹⁵⁾。CGH法のデータをより正確に解釈するためには、正常細胞の混入をできるだけ抑えることが望ましいと思われる。今回、著者は、腫瘍部分のみを肉眼的に生検したが、さらに顕微鏡レベルで癌細胞のDNAだけをレーザー法などで抽出できれば染色体欠失の検出感度をさらに高くできると思われる¹⁰⁾。

後発頸部リンパ節転移とDNAコピー数の変化について有意な相関を認めた染色体領域は3qであった。3qの増幅は舌癌(頻度42%)²⁷⁾に加えて、頭頸部、口腔領域の腫瘍でも報告されている^{11,25)}。また、頭頸部扁平上皮癌において3pの欠失を伴うisochromosomeの形成による3qの微小増幅が報告されている^{6,26)}。3q26-27領域には、癌遺伝子PIK3CA(phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)が卵巣癌や子宮頸癌で同定されている^{20,24)}。しかし、リンパ節転移に関連した遺伝子は現在までに報告されていない。一方、頭頸部癌では10qの欠失が、リンパ節転移と相関が見られたという報告がある³⁾。後発頸部リンパ節転移には本研究で示唆された3qの癌遺伝子や、10qの癌抑制遺伝子を含めた複数遺伝子の関与の可能性が指摘される。

放射線治療後の後発頸部リンパ節転移の有無が、早期舌癌の治療成績において重要である。このため、30 Gy程度の予防的頸部照射や予防的頸部リンパ節郭清術が良好な頸部リンパ節制御率をもたらすことが報告されている¹⁴⁾。今回の我々の検討では、3q領域の染色体増幅が後発頸部リンパ節転移と強く相関していることが示された。今後、CGH法の臨床応用により、後発頸部リンパ節転移の高危険群を選別して、個々の患者に合わせた最適な治療法の選択の可能性が期待される。

結 語

今回、CGH法を用い、早期舌癌患者組織のDNAコピー数の異常領域と臨床データとの相関性を検討した結果、次の結論が得られた。

- (1) 早期舌癌組織に高頻度に異常が認められた染色体領域は、1q, 5q, 16p, 19pにコピー数の増加, 3p, 21pにコピー数の減少であった。
- (2) 早期舌癌において、特に1qの増幅がI期からII期への進行に伴って増加した。このことは、同領域

のがん遺伝子が舌癌の進展に重要な役割を果たしている可能性が示された。

(3) 3q 領域の増幅がⅡ期舌癌での後発頸部リンパ節転移と強く相関していた。後発頸部リンパ節転移の新たな予後因子として CGH 法による 3q 増幅の臨床応用が期待される。

以上のことより、CGH 法は、従来からの臨床的予後因子、病理組織学的所見に加え、早期舌癌患者の新たな予後因子としての有用性が示された。特に 3q の増幅を示すⅡ期の舌癌患者に対して、後発頸部リンパ節制御のための予防的照射や予防的頸部リンパ節郭清術との併用治療法による治療成績向上が期待される。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご懇切なご指導、ご高閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態情報医科学講座放射線医学伊藤勝陽教授に深甚なる感謝の意を表します。また終始ご指導、ご教授を賜りました同廣川裕助教授に感謝の意を述べさせていただきます。更に本研究に於いて数々のご支援、ご助言を賜りました京都大学放射線生物研究センターの小松賢志教授、広島大学原爆放射線医科学研究所ゲノム障害制御研究部門放射線ゲノム学研究分野の松浦伸也教授、城多恵子技官、諸先生方に心より深謝致します。

参 考 文 献

1. Aragane, H., Sakakura, C., Nakanishi, M., Yasuoka, R., Fujita, Y., Taniguchi, H., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Abe, T., Inazawa, J. and Yamagishi, H. 2001. Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int. J. Cancer* 94 : 623-629.
2. Bergamo, N. A., Rogatto, S. R., Poli-Frederico, R. C., Reis, P. P., Kowalski, L. P., Zielenska, M. and Squire, J. A. 2000. Comparative genomic hybridization analysis detects frequent over-representation of DNA sequences at 3q, 7p, and 8q in head and neck carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 119:48-55.
3. Bockmuhl, U., Kuchler, I. and Petersen, I. 2000. Improved prognostic assessment of head-neck carcinomas by new genetic markers. *HNO* 48 : 451-456.
4. Bockmühl, U., Peterson, S., Schmidt, S., Jahnke, V., Dietel, M. and Peterson, I. 1997. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res.* 57 : 5213-5216.
5. Bockmühl, U., Wolf, G., Schmidt, S., Schwendel, A., Jahnke, V., Dietel, M. and Peterson, I. 1998. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head and Neck* 20 : 145-151.
6. Brzoska, P. M., Levin, N.A., Fu, K. K., Kaplan, M. J., Singer, M. I., Gray, J. W. and Chrisman, M. F. 1995. Frequent novel DNA copy number increases in squamous cell head and neck tumors. *Cancer Res.* 55 : 3055-3059.
7. Chen, L. C., Matsumura, K., Deng, G., Kurisu, W., Ljung, M. I., Waldman, F. M. and Smith, H. S. 1994. Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers. *Cancer Res.* 54 : 3021-3024.
8. Cher, M. L., MacGrogan, D., Bookstein, R., Brown, J. A., Jenkins, R. B. and Jensen, R. H. 1994. Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 11 : 153-162.
9. Fang, Y., Guan, X., Guo, Y., Sham, J., Deng, M., Liang, Q., Li, H., Zhang, H., Zhou, H. and Tret, J. 2001. Analysis of genetic alterations in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 30 : 254-260.
10. Hashimoto, Y., Oga, A., Imate, Y., Yamashita, Y. and Sasaki, K. 2000. Relationship between cytogenetic aberrations by CGH coupled with microdissection and DNA ploidy by laser scanning cytometry in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytometry* 40 : 161-166.
11. Hashimoto, Y., Oga, A., Kawauchi, S., Furuya, T., Shimizu, N., Nakano T., Imate, Y., Yamashita, H. and Sasaki, K. 2001. Amplification of 3q26 approximately qter correlates with tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 129 : 52-56.
12. Hermsen, M. A., Joenje, H., Arwert, F., Braakhuis, B. J., Baak, J. P., Westerveld, A. and Slater, R. 1997. Assessment of chromosomal gains and losses in oral squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Oral Oncol.* 33 : 414-418.
13. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Suder, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waidman, F. and Pinckel, D. 1992. Comparative genomic

- hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258 : 818-821.
14. 木村泰男, 伊藤善之, 不破信和, 有地榮一郎 2000. 舌癌 T2N0 例における頸部予防照射の検討. *日本口腔腫瘍学会誌* 12 : 10-17.
 15. 小宮山高之, 宮原勇治, 天笠光雄, 岩城 博, 平田 康, 土田信夫 1999. 口腔扁平上皮癌におけるDNAコピー数異常の検索 - Comparative genomic hybridization 法を用いた検討. *日口外誌* 45 : 313-316.
 16. Lee, J. I., Soria, J. C., Hassan, K., Liu, D., Tang, X., El-Naggar, A., Hong, W. K. and Mao, L. 2001. Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in tongue cancer. *Cancer Res.* 61 : 837-841
 17. Matsumura, K. 1995. Detection of DNA amplifications and deletions in oral squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization (CGH). *Kokubyo Gakkai Zasshi* 64 : 513-531.
 18. Matsumura, K., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O., Chen, L., Smith, H., Pinkel, D., Gray, J. and Waldman, F. M. 1992. Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 52 : 3474-3477.
 19. 宮原勇治 2000. CGH 法を用いた口腔扁平上皮癌における癌悪性度と DNA コピー数の変化の比較検討. *口病誌* 67 : 193-200.
 20. Ma, Y. Y., Wei, S. J., Lin, Y. C., Lung, J. C., Chang, T. C., Whang-Peng, J., Liu, J. M., Yung, D. M., Yung, W. K. and Shen, C. Y. 2000. PIK3CA as oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19 : 2739-2744.
 21. Pimkhaokham, A., Shimada, Y., Fukuda, Y., Kurihara, N., Imoto, I., Yang, Q. Z., Imamura, M., Nakamura, Y., Amagasa, T. and Inazawa, J. 2000. Nonrandom chromosomal imbalances in esophageal squamous cell lines: possible involvement of the ATF3 and CENPF gene in the 1q32 amplicon. *Jpn. J. Cancer Res.* 91 : 1126-1133.
 22. Piper, J., Rutovitz, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Waldman, F. M., Gray J. W. and Pinkel, D. 1995. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19 : 10-26.
 23. Rokman, A., Koivisto, P. A., Matikainen, M. P., Kuukasjarvi, T., Poutiainen, M., Helin, H. J., Karhu, R., Kallioniemi, O. P. and Schleutker, J. 2001. Genetic changes in familial prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Prostate* 46 : 233-239.
 24. Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W. L., Bladocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinckel, D., Powell, B., Mills, G. B. and Gray, J. W. 1999. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* 21:99-102.
 25. Singh, B., Gogineni, S. K., Sacks, P. G., Shaha, A. R., Shah, J. P., Stoffel, A. and Rao, P. H. 2001. Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res.* 61 : 4506-4513.
 26. Speicher, M. R., Howe, C., Crotty, P., du Manoir, S., Costa, J. and Ward, D. C. 1995. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 55: 1010-1013.
 27. Steinhart, H., Bohlender, J., Iro, H., Jung, V., Constantinidis, J., Gebhart, E., Pahl, S. and Urbschat, S. 2001. DNA amplification on chromosome 7q in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int. J. Oncol.* 19 : 851-855.
 28. Wolff, E., Girod, S., Lieher, T., Vorderwulbecke, U., Ries, J., Steininger, H. and Gebhart, E. 1998. Oral squamous cell carcinomas are characterized by rather uniform pattern of genomic imbalances detected by comparative genomic hybridization. *Oral Oncol.* 34 : 186-190.
 29. Wong, N., Lam, W. C., Lai, P. B., Pang, E., Lau, W. Y. and Johnson, P. J. 2001. Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 159 : 465-471.

Comparative Genomic Hybridization Detects the Chromosomal Gains and Losses in Early Tongue Carcinomas

Masashi KUWAHARA

Division of Medical Intelligence and Informatics, Programs for Applied Biomedicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima

The aim of this study was to detect the genomic deletions and amplifications in early tongue carcinomas. Genetic imbalances were assessed in twenty-six primary early tongue carcinomas using comparative genomic hybridization (CGH). Early tongue carcinomas were consisted of 6 patients of stage I, and 20 patients of stage II. The median follow-up time for all patients was 25.5 months (range 9 to 42 months). Copy number increases were most frequently observed on chromosomes 19p (77%), 16p (65%), 1q (62%) and 5q (62%). Copy number decreases were occurred mostly frequently at 21p(35%) and 3p(31%). Gains of 1q was significantly higher in stage II patients than in stage I patients (17% vs. 75%, $p < 0.05$). In comparison to eight patients with lymph node metastasis (stage I; 1 patient, stage II; 7 patients), it was noted that the gains of 3q was frequently observed in tumors metastatic lymph nodes in stage II patients (86% in patient with metastasis vs. 31% in without metastasis, $p < 0.05$). These results showed that CGH detected chromosomal imbalances in early tongue carcinomas and gain of 3q may help to improve the therapeutic result defining lymph node metastasis of stage II patients of tongue carcinomas.