

筑波大学

博士（医学）学位論文

口腔扁平上皮がん切除マージン部分における  
オートファジーおよび酸化ストレス関連タンパク質  
の発現と臨床動態の関連について

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

寺邊 健人

## 目次

### 0. 序論 研究の背景

- 0.1. はじめに
- 0.2. 口腔がんの発生と酸化ストレスの関連
  - 0.2.1. 8-OHdG について
  - 0.2.2.  $\gamma$ H2AX について
- 0.3. 口腔がんとオートファジー異常の関連
  - 0.3.1. p62 タンパク質について
  - 0.3.2. LC3 タンパク質について
- 0.4. p53 について
- 0.5. 口腔がんの治療
- 0.6. 本研究の目的と特色
- 0.7. 序論図表

### 第 1 章

口腔がん切除断端における 3 種のオートファジー関連タンパク質の発現と臨床指標の関連

- 1.1. 目的
  - 1.2. 材料および方法
    - 1.2.1. 試料
    - 1.2.2. 試薬
    - 1.2.3. 免疫染色
  - 1.3. 分析
  - 1.4. 統計学的分析
  - 1.5. 結果
    - 1.5.1. p62 タンパク質の発現
      - 1.5.1.1. 各種臨床指標との関連
      - 1.5.1.2. 腫瘍関連死との関連
    - 1.5.2. LC3A, 3B タンパク質の発現
      - 1.5.2.1. 各種臨床指標との関連
      - 1.5.2.2. 腫瘍関連死との関連
  - 1.6. 考察
- 第 1 章図表

## 第 2 章

口腔がん切除断端における 3 種の遺伝子異常マーカーの発現と臨床指標の関連

### 2.1. 目的

### 2.2. 材料および方法

#### 2.2.1. 試料

#### 2.2.2. 試薬

#### 2.2.3. 免疫染色

### 2.3. 分析

### 2.4. 統計学的処理

### 2.5. 結果

#### 2.5.1. 8-OHdG の発現

##### 2.5.1.1. 各種臨床指標との関連

##### 2.5.1.2. 腫瘍関連死との関連

#### 2.5.2. $\gamma$ H2AX の発現

##### 2.5.2.1. 各種臨床指標との関連

##### 2.5.2.2. 腫瘍関連死との関連

#### 2.5.3. p53 タンパク質の発現

##### 2.5.3.1. 各種臨床指標との関連

##### 2.5.3.2. 腫瘍関連死との関連

### 2.6. 考察

## 第 2 章図表

## 終章

結果のまとめ

総合考察

図表

謝辞

引用文献

参考論文

## 序論 研究の背景

### 0.1. はじめに

頭頸部がんは世界で6番目に多いがんであり、世界中で毎年40万例以上の新たな症例が報告されており、その内の多くの症例がアジア諸国で報告されている。(1-3)我が国における発生率は、南アジア諸国ほど高くないが、全がんの約4%を占め、年々増加傾向にある。(4, 5)また口腔がんは頭頸部がんの中で最大の約40%を占める癌腫であるが、罹患者数は1975年の2,100名から2005年で6,900名と30年間で約3倍に増加し、今後も罹患者数は増え続けると予想されている。また死亡率についても大きな改善は見られず、近年の絶え間ない診断・治療の進歩にも関わらず、口腔がん全体の5年生存率は過去数十年の間、約40~60%であった。(6, 7)

口腔がんの死亡率が未だ高い理由の一つとして、口腔がんの再発および転移を予測するマーカーの欠如が挙げられる。現在口腔がんのモニタリングに比較的有效とされているcytokeratin 19 fragment (CYFRA), 扁平上皮癌関連抗原 (SCC: squamous cell carcinoma-related antigen), 組織ポリペプチド抗原 (TPA: tissue polypeptide antigen)などはいずれの報告においても感度・特異度が良好とは言えず、マーカーとしては不十分と言わざるを得ない。(8-11) このため口腔がんの再発・転移の新しいマーカーを同定することは、患者の予後を大きく改善する可能性が高い。

### 0.2. 口腔がんの発生と酸化ストレスの関連

口腔がんは顎口腔領域に発生する悪性腫瘍の総称であるが、病理組織学的には口腔がんの90%以上は扁平上皮がんである。(12, 13) 以降、口腔がんとは扁平上皮がんを指すものとする。

口腔は様々な異物が侵入する最初の器官であり、口腔粘膜を構成する重層扁平上皮細胞は食品による冷温刺激や酸刺激、歯牙それ自体や義歯等の補綴物による物理的刺激、歯周病等による炎症性の刺激、アルコールの摂取や煙草等の嗜好品による酸化ストレスへの曝露など、様々な外的刺激に曝されている。これらの中でも特に飲酒歴と喫煙歴の有無は口腔がんの発症と関連があることは広く知られているが、これらの本態は主に酸化ストレスによる上皮細胞へのダメージである。(14, 15)

酸化ストレスとは、生体内で生成する活性酸素群の損傷力と生体内の抗酸化システムの差として定義される。(16) 活性酸素群は口腔内で頻発しうる細菌等の侵入異物に対する攻撃などをはじめとして、不要な細胞の処理、エネルギー産生、細胞情報の伝達に際して生産されるものであるが、生体内の抗酸化システムで補足しきれない過剰な活性酸素群が生じる場合、生体の構造や機能を担っている脂質やタンパク質、さらにDNAを酸化し損傷を与え、生体の機能を障害する。(17-20) これによって動脈硬化(21-23)、肥満や高血圧症、高脂血症などの生活習慣病の原因となるほか(24-26)、がんの発生にも大きく関わると指摘されている。(27-29) この酸化ストレスが口腔がんの発生に関与する可能性については、これ

までに数多くの指摘がなされている。(30-32) しかしながら、実際の酸化ストレスの良い指標となる DNA 損傷を示す 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)や、DNA2 本鎖切断のマーカである  $\gamma$ H2AX の口腔がんにおける発現については、これまでに確たる報告はない。

#### 0.2.1. 8-OHdG について

DNA はデオキシリボース（五炭糖）とリン酸、塩基から構成されるが、このうち塩基はプリン塩基であるアデニン(A)とグアニン(G)、ピリミジン塩基であるシトシン(C)とチミン(T)の四種類が存在し、特に DNA 塩基と呼ばれる。(33) DNA 塩基は放射線やフリーラジカルとの反応で変化しやすいことが知られており、変化した塩基は DNA 修飾塩基と呼ばれる。その中で比較的よく研究され、DNA 酸化的損傷マーカーとして知られているのが 8-OHdG である。8-OHdG は DNA 塩基であるグアニン(G)のプリン環の 8 位が酸化された物質で、1984 年に国立がんセンターの葛西らによって発見された。(34) その後、DNA に対する放射線照射で産生されることや(35)、実際の細胞内でも産生されていることが相次いで報告された。(36) 酸素をエネルギー源として利用する生物の DNA 上に多く発生しているとされ、その原因は放射線のほかに化学物質、重金属、食物、そして微生物などの外来性因子である。その後、8-OHdG は高確率でアデニンと結合しうること、8-OHdG が含まれる状態で DNA の複製が進むと、GC $\rightarrow$ TA のトランスバージョン型の点突然変異を誘導することが知られている。(37-39) このことはがんなどの疾患の発症、進展、再発に重要な役割を演じていると考えられており、酸化ストレスの加わる可能性の高い口腔粘膜上皮においても、8-OHdG の存在ががん化の原因となり得る可能性を秘めている。この 8-OHdG は免疫染色により同定可能であり、酸化ストレスによる DNA 損傷マーカーとして確立されている。8-OHdG の構造を図 1 に示す。

#### 0.2.2. $\gamma$ H2AX について

真核生物の DNA は、核内においてヒストンと呼ばれるタンパク質と結合した状態で折りたたまれ存在する。(33) この構造はクロマチンと呼ばれ、その基本的な構成単位はヌクレオソームと呼ばれる。ヌクレオソームでは 4 種類のヒストンタンパク質(H2A・H2B・H3・H4)が 2 コピーずつ集まって八量体を形成しており、DNA はこれに巻き付くような形で存在していることが分かっている。(40) 0.2.1.でも触れたが、DNA は放射線のほかにも化学物質、重金属、食物、そして微生物などの外来性因子によってダメージを受ける。これらの要因が加わった結果、DNA 塩基の損傷や脱落、架橋形成、鎖切断など様々な形で損傷が発生する。(41,42) この中でも鎖切断は重大な影響を及ぼす可能性のある障害で、二重螺旋の一方だけが切断される 1 本鎖切断と両方が切断される 2 本鎖切断がある。放射線 1Gy あたりの生成数は、塩基脱離と塩基修飾が合わせて数千個、1 本鎖切断が 約千個、2 本鎖切断が 20~50 個との報告がある。(43) 2 本鎖切断は少数ではあるが、細胞内に 1 か所でも存在す

ると細胞分裂が停止し、最終的に染色体異常や細胞死に至る可能性があり最も致命的であるとされる。(44-46) これに対し生物は複数の修復機構を進化の過程で獲得しているが、特に2本鎖切断損傷の修復過程において重要な因子となるのがヒストン H2AX タンパク質である。H2AXはコアヒストンの一つである H2A のバリエーションとして知られているが、DNA2本鎖切断が発生すると傷周辺の H2AX は ATM と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素に感知され、直ちにリン酸化を受けることが判明している。(47, 48) このリン酸化された H2AX は  $\gamma$ H2AX と呼ばれる。鎖切断の修復経路は非相同末端結合と相同組み換え修復の2経路存在するが、いずれの系においても DNA 損傷修復タンパク質は  $\gamma$ H2AX と相互作用することで鎖切断部位に結合し、DNA 損傷修復を開始することができる。(49-51)

このように  $\gamma$ H2AX は DNA2 本鎖切断のマーカーであると同時に、その修復機構においても重要な役割を果たしている。また免疫組織染色で同定可能であるため、組織における DNA2 本鎖切断の有無を確認することができる。(図2)

### 0.3. 口腔がんオートファジー異常の関連

近年、様々ながんにおいて、オートファジーの異常が報告されている。オートファジーとは真核生物が持つ細胞生存機構であり、異常なタンパク質の分解・除去を行い、恒常性の維持に寄与する機構である。細胞外環境に応答して細胞質中に出現した隔離膜が伸長し、細胞質成分をランダムに取り囲んだ脂質二重膜構造体(オートファゴソーム)が形成され、これが種々の分解酵素を含むリソソームと融合することで細胞質成分を分解する。これによってオートファゴソーム内にトラップされたタンパク質をアミノ酸にまで分解することができ、新しい膜形成と連動した巧妙かつ複雑な細胞内分解機構と捉えられている。(52, 53) この系は栄養飢餓状態主に強く誘導されることから、自己タンパク質の分解によるアミノ酸供給を介した生存戦略と認識されてきたが、近年平常時においても一部が継続して機能し、外的刺激等により発生したミスフォールディングタンパク質や損傷した細胞小器官の分解・除去を行うことで細胞の代謝回転を行い、細胞の恒常性維持に寄与していることが分かった。(54, 55) 異常タンパク質の分解を行い、蓄積を防ぐことから抗腫瘍効果を持つと考えられるが、活性化することで逆に腫瘍細胞に増殖活性および治療抵抗性をもたらす、相反する2つの効果を持つとされる。(56) 一方でオートファジーの障害は、がんを含む様々な疾患の原因および増悪因子であることが指摘されている。(57-59)

#### 0.3.1. p62 タンパク質について

オートファジーに関連するタンパク質の一種として、p62 が挙げられる。p62 はもともと、Shin らによりヒトのリンパ球においてチロシンキナーゼ p56lck の SH2 ドメインに結合するタンパク質として 1996 年に報告された。(60, 61) ほぼ同時期に Ishii らによってマウスのマクロファージから酸化ストレス誘導タンパク質として A170 が、Plus らによってラット脳から PKC  $\zeta$  結合タンパク質として ZIP が、それぞれ p62 のホモログとして報告さ

れた。(62, 63) Shin らはさらに p62 の C 末端にユビキチン結合ドメインがあることに着目し、当時既知であったタンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソーム系とは異なるタンパク質分解経路が存在すると予想した。(64) 後年それがオートファジーであると判明し、p62 のオートファジーにおける重要な役割が次々と判明した。

p62 は細胞内に発生した異常タンパク質に対し、ユビキチンタンパク質を介して結合し、さらにオートファジー関連タンパク質である LC3A および LC3B と結合することで隔離膜が伸長、オートファゴソームが成立し、オートファジーが進行する。本来オートファジーは p62 が存在しない場合でも成立するが、p62 がアダプタータンパク質として機能するこの選択的オートファジーと呼ばれる機構は、従来タンパク質の分解を行うとされたユビキチン-プロテアソーム系と同様、異常タンパク質を分解する機能を持つ。(65, 66) (図 3) この選択的オートファジーが進行する際に p62 も分解されるが、何らかの原因でオートファジーが停滞すると、p62 は分解されず、異常タンパク質に結合する形で細胞内封入体を形成して蓄積する。(67) (図 4) このように p62 が蓄積しているか、発現が上昇している状態は免疫組織染色で同定可能である。

さらに p62 はこれまでの研究で、酸化ストレス応答システムとして知られる Nrf2-Keap1 経路に関与し、Keap1 タンパク質に結合することが判明している。(68) 特に p62 が細胞内に過剰に蓄積した場合、p62 によって Keap1 と Nrf2 の結合が競合的に阻害され、Nrf2 が安定化する結果、抗酸化たんぱく質が誘導されることが判明している。(69-72) この効果によりがん細胞は治療抵抗性を獲得している可能性があり、各種がん細胞における p62 の発現について検討する報告が複数存在する。(73-75) 口腔がんにおいてもがん細胞中の p62 の発現と予後の関連が少数ながら報告されているが、そのメカニズムや各種臨床指標、特に予後と大きく関連すると思われる局所再発や遠隔転移との関連についてはまだ不明な点が多い。(76, 77)

### 0.3.2. LC3 タンパク質について

LC3(light chain 3)タンパク質はもともとラットの脳から発見された微小管関連タンパク質(Microtubule Associated Protein 1 A ,B : MAP1A, MAP1B)の軽鎖サブユニットとして発見されたタンパク質である。(78-80) その後酵母においてオートファジーに関連する研究が進み、数多くの酵母におけるオートファジー関連遺伝子が同定されたが、そのうちのひとつである Atg8 の哺乳類におけるホモログのうちのひとつが LC3 であることが分かった。(81) LC3 は隔離膜やオートファゴソーム膜結合タンパク質として知られる。その他のオートファジー関連タンパク質の中にもオートファゴソームに結合するものはあるが、LC3 の結合は特に広く安定であることから、広くこれらの膜のマーカーとして使用されている。(81, 82) LC3 は proLC3 として合成されたのち、Atg4B システインプロテアーゼによってただちに C 末端が切断され LC3- I 型となる。(82, 83) I 型はおもに細胞質に存在するが、その後 E3 酵素としての役割を果たす Atg12-Atg5-Atg16 複合体により C 末端にフォスファチジル



エタノールアミン(PE)がアミド結合した LC3- II型に変換される。(81, 83-85) II型は主に隔離膜やオートファゴソーム膜上に局在するが、オートファジーの誘導とともに I型から II型への変換が増加すること、また II型は膜融合を触媒する機能を示すことから、オートファゴソーム形成に直接かかわる分子と考えられている。(86) LC3(特に II)はオートファゴソームの外膜内膜いずれにも存在するが、内膜に存在するものはオートファジーの進行に伴いそのまま分解され、外膜に存在するものは再び Atg4B によって C 末端の切断を受け LC3- I に戻り、再利用される。(87) このため LC3 タンパク質はオートファジーによって特異的に分解される器質とみなすことができる。

なお上述の p62 タンパク質には、LC3 interacting region (LIR)と呼ばれる LC3 と直接相互作用する領域が存在する。(66, 67, 88) LIR のアミノ酸置換を起こし、LC3 との相互作用が不可能となるような p62 変異体を発現させた細胞は、オートファジーが正常であるにもかかわらず p62 の分解は滞る。(67)よって、LC3 は LIR 領域を介して p62 とともに選択的オートファジーの進行に寄与していると考えられる。この LC3 の存在は免疫組織染色で同定可能である。p62 同様、口腔がん細胞における LC3 の発現と、口腔がんの発生や予後などとの関連に関する報告が散見される。(89-91) 一方で口腔がん周囲の正常組織における LC3 タンパク質の発現に関しては、渉猟し得た限り報告例はない。

なお、本来 LC3 タンパク質には A から C の 3 種のサブタイプが存在する。いずれのタイプもオートファジーに関連していると言われているが、まだその働きはよく分かっていない。一方で、正常組織では LC3A および B のいずれかまたは両方がしばしば強く発現するが、LC3C の発現レベルは非常に低い。(92) このため今回我々は LC3A と LC3B の 2 種類を検討した。

#### 0.4. p53 について

p53 遺伝子は染色体 17p13 に存在する腫瘍抑制遺伝子であり、DNA 損傷や老化、がん遺伝子の活性化、低酸素などのストレスが細胞に加わることで活性化し、様々な機能を持つ p53 標的遺伝子を転写誘導する働きを持つ。(93-96) 特に細胞周期やアポトーシスを制御し、DNA 修復などのゲノム安定性維持に重要な役割を果たしており、その変異は多くのヒトのがんの発生に関わっているとされる。(97-100) 変異のない p53 遺伝子から翻訳された野生型 p53 タンパク質は半減期が 30 分程度と短く、細胞内で速やかに分解されるが(101)、変異型 p53 蛋白は分解時間が 4~8 時間と著しく遅延し、細胞内に蓄積することが分かっている。(102) このため変異型 p53 タンパク質の存在は免疫組織染色によってタンパク過剰発現として同定することが可能で、逆に変異型 p53 タンパク質の存在から p53 遺伝子異常の存在を類推することができる。(103, 104)

口腔がんにおいても、がん細胞における変異型 p53 タンパク質の蓄積が複数報告されており、p53 遺伝子の変異がその発生に関与している可能性が指摘されている。(105-107) その一方で口腔がん周囲の正常組織における変異型 p53 タンパク質の発現に関しては、渉猟し

得た限り報告例はない。

#### 0.5. 口腔がんの治療

口腔がんの治療は、発生した部位や病期によって異なるものの、外科切除が可能な症例については外科的切除治療が選択される。これに抗がん薬を用いた化学療法や放射線療法、あるいはその両者を組み合わせた治療が行われる場合がある。(108, 109)一般的に病期の進行に伴い外科的切除は困難となり、局所再発や所属リンパ節である頸部リンパ節への転移、肺など遠隔組織に転移する確率が上昇、生命予後は悪化する。頸部リンパ節転移を来した症例については頸部郭清術が行われるが、遠隔転移に対する治療ガイドラインはいまだはっきりしたものは存在しない。咀嚼および摂食・嚥下、発音などの機能面ならびに顎顔面領域の整容面に及ぼす影響も大きいため、術後の患者の QOL を重視した治療体系が望まれている。(108, 110, 111)

#### 0.6. 本研究の目的と特色

本研究では口腔がん患者の切除検体を用い、特に切除マージン部に着目し、オートファジー関連マーカーである p62, LC3A, LC3B, DNA 損傷マーカーである 8-OHdG,  $\gamma$ H2AX, 多くのがんで高頻度に異常が認められる p53 の発現を免疫組織染色によって調べた。さらにこれらの発現と再発・転移といった各種臨床指標との関連を調べることで口腔がんに関する新たなマーカーを発見し、患者の予後を改善することを最終的な目的とした。

0.7. 序論図表

図1

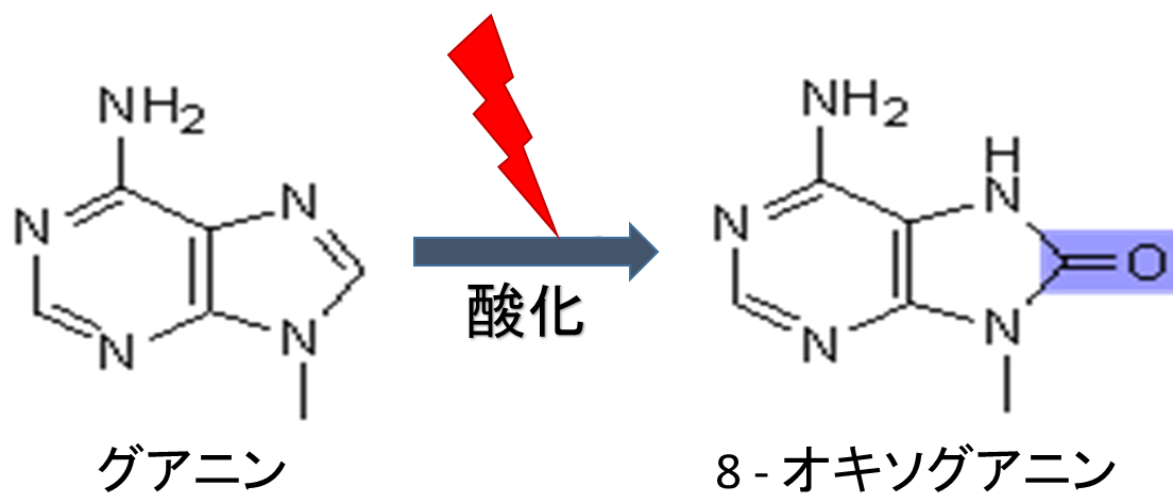


図2

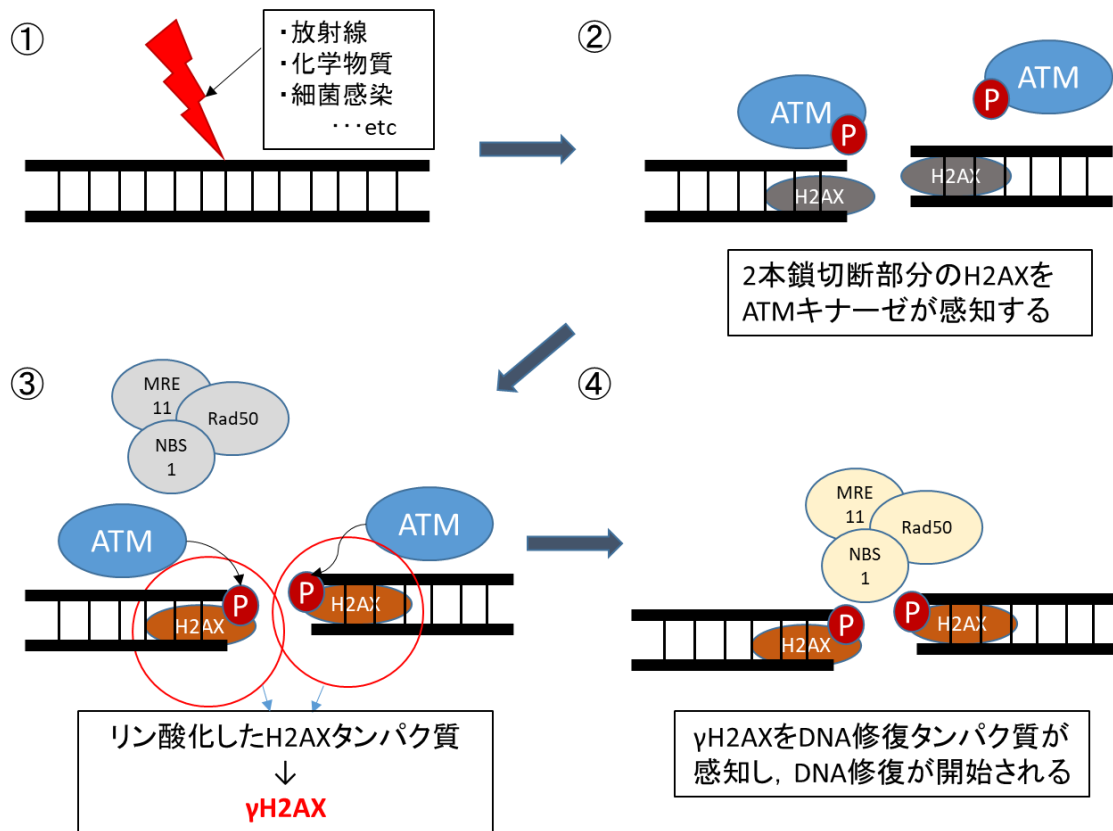


図 3

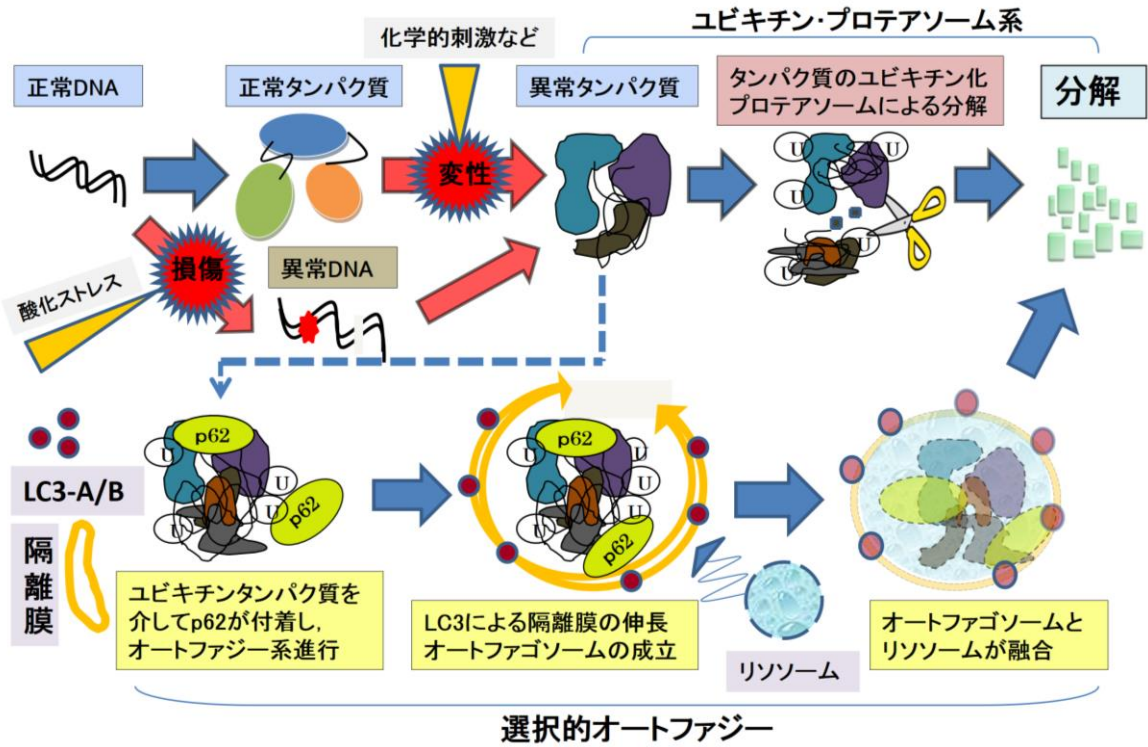
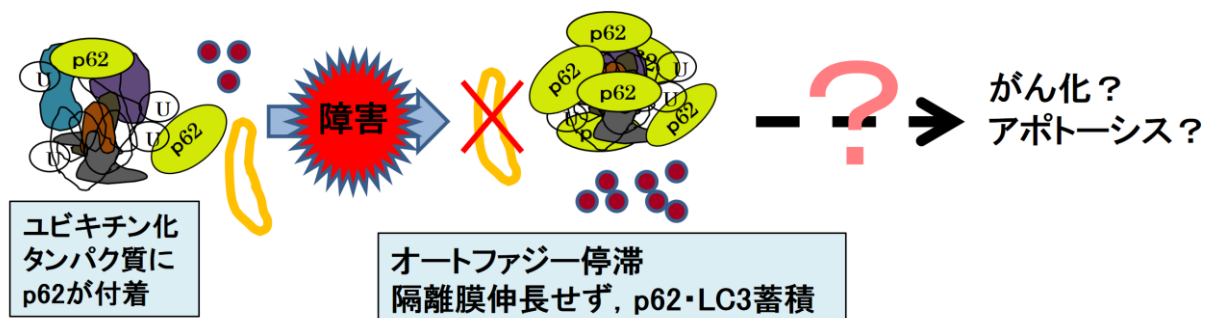


図4



## 第 1 章

### 口腔がん切除断端における 3 種のオートファジー関連タンパク質の発現と臨床指標の関連

#### 1.1. 目的

口腔がん患者の予後を大きく左右する局所再発、頸部リンパ節転移等の発生を高確率で予測できるマーカーは、現在のところ存在しない。オートファジーは様々な腫瘍と関連する可能性が指摘されているが、そのアダプタータンパク質である p62, LC3A および LC3B の発現は、胃がん、肝臓がん、子宮頸がん等において高頻度で確認されている。(112-114) 口腔がんについても p62 や LC3B のがん細胞中における発現が患者の予後と関連するという報告はあるが、再発との関連についての報告は渉猟し得た限り存在せず、また切除断端の正常粘膜におけるオートファジー関連タンパク質の発現と臨床指標との関連についても未だ確たる報告はない。(77, 115)

今回、腫瘍切除断端部分の正常粘膜に対して免疫染色を行い、オートファジー関連タンパク質である p62, LC3A および LC3B の発現を調べ、腫瘍切除後の再発や遠隔転移との関連を探索することで、新たな口腔がん診断マーカーとなり得るタンパク質の検索を行うことを目的とした。

また p62 の免疫染色に使用した抗体は抗 p62/SQSTM1 抗体という名称であるが、SQSTM1 とは sequestosome 1 の略であり、sequestosome に含まれる 1 番目のタンパク質の意である。sequestosome はユビキチン化されたタンパク質を細胞内に隔離する構造体として shin らによって定義されたものであり、ヒトにおいて p62 は sequestosome 1 を示すことからこれらは同義である。(60) (64) 併記される場合もあるが、オートファジーに対する p62 の関与が報告されて以来、p62 のみの表記が多く使用される。本稿では p62 に統一する。

#### 1.2. 材料および方法

##### 1.2.1. 試料

本研究では筑波大学附属病院歯科口腔外科にて全身麻酔下、外科的切除を受けた 71 名の口腔がん患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック標本を試料として用いた。手術は 1997 年から 2009 年の間に実施された。TNM 分類および Stage 分類は、American Joint Committee on Cancer 第 7 版の基準に従って実施した。(116) 各種臨床情報および追跡調査データは、すべて本院の診療情報記録から得られたものである。すべての標本は少なくとも 2 人の病理医によって断端陰性と診断されたものであるが、切除縁から腫瘍までの距離が 10mm 以上離れており、かつ切除縁周囲に電気メスなどによる変性を来していない検体のみ採用した。この研究は筑波大学病院附属病院の倫理委員会の承認を受け、すべての患者の同意が得られていることを確認した。

### 1.2.2. 試薬

試薬に関しては、以下の企業より購入した。特に記載のない試薬に関しては和光純薬工業社製の特級試薬を用い、実験に使用した水は、Direct-Q UV (Merck Millipore, Darmstadt Germany) を使用して得られた超純水を使用した。

ナカライテスク (京都)

- ・ Blocking one histo (免疫化学研究用タンパクブロッキング剤)
- ・ Histo VT One (免疫化学研究用抗原賦活液, トリス EDTA 緩衝液)
- ・ Signal Enhancer HIKARI for Immunostain

松波硝子工業 (大阪)

- ・ マルチマウント 480
- ・ NEO micro cover glass 25×45mm

和光純薬工業 (大阪)

- ・ マイヤーヘマトキシリン溶液

abcam (Cambridge, UK)

- ・ Anti-SQSTM1 / p62 antibody (ab56416)
- ・ Anti-MAP1LC3A antibody [EP1983Y] (ab52768)
- ・ Anti-LC3B antibody (ab48394)

Agilent (Santa Clara, CA)

- ・ Dako Wash Buffer 10×
- ・ Dako pen
- ・ IHC Microscope Slides, FLEX

Cell Signaling Technology (Danvers, MA)

- ・ SignalStain® DAB Substrate Kit

Vector Laboratories (Burlingame, CA)

- ・ Vectastain Universal Elite ABC Kit

### 1.2.3. 免疫染色

すべての組織切片はホルマリン固定後にパラフィン包埋され、ミクロトームで3μmの厚さに切断した上で、シランコーティングスライドガラス上に乗せ、62°Cで30分間乾燥させ



標本とした。使用した抗体は全てマウスと交差反応性を持っていたため、ポジティブコントロールとしてマウス足底由来の上皮細胞を使用した。一方ネガティブコントロールとして同じマウス足底由来上皮細胞に一次抗体を使用せず、そのほかの操作をプロトコール通り行った。プロトコールは Ramos らの方法や、多くの製品を試薬として採用したナカライテスク社の規定プロトコールを参考に、おおよそ以下の如く定めた。(117,118)

なお使用する抗体によっては、以下の条件の一部を変更して染色条件検討を行ったものがある。各抗体に関する条件検討の内容に関しては後述の結果欄にて示す。

- ① スライドをキシレンに 12 時間浸漬、次いでエタノールに 99.5%→70%→50%の順に浸漬し、脱パラフィンおよび水和処理を行った。
- ② スライドを pH 6.0 に調整した 10 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液もしくはトリス EDTA 緩衝液 (Histo VT One) に浸漬し、90°C で 20 分間処理し抗原賦活化を行った。
- ③ 検体中の内因性ペルオキシダーゼ活性を、0.3%過酸化水素含有メタノール溶液にて 20 分間処理することでブロックした。
- ④ 十分に洗浄後、スライドに一次抗体を乗せ一次染色を行った。各種一次抗体については事前に条件検討を行い、また特異性を確認したうえで、適切な濃度を決定した。一次抗体の希釈には Signal Enhancer HIKARI for Immunostain (発色増強剤) を使用した。湿潤条件下に保ち、室温(20°C)で 6~12 時間処理した。
- ⑤ 再び十分に洗浄後、切片を二次抗体で 30 分間処理した。こちらも希釈には Signal Enhancer HIKARI for Immunostain を使用した。
- ⑥ 発色を増強させる目的でアビジン-ビオチン標識酵素複合体処理 (ABC 法) を 30 分間行った。
- ⑦ 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) を用いて 15~40 秒間処理し発色させ、さらにヘマトキシリン溶液に 20 秒~1 分間浸漬し、核を対比染色した。
- ⑧ 検体をエタノール 50%→70%→99.5%の順に浸漬し、次いでキシレンに浸漬し脱水処理を行った。
- ⑨ 疎水性封入剤を使用して封入した。

### 1.3. 分析

標本の観察は、腫瘍から少なくとも 10 mm 離れた正常粘膜上皮部分とした。電気メスの焼灼等により観察に向かない部位を除外した。観察の結果、いくつかの標本には軽度の異形細胞が含まれていた。

すべての標本はキーエンス社の BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察した。観察条件は明視野下とし、まず拡大率 200 倍として観察範囲を設定、個々の細胞は拡大率 400 倍で観察した。次に観察範囲内における各ターゲットの陽性細胞数を計測し、視野下の全上皮細胞数に占める割合を算出した。陽性/陰性の判定基準は各先行研究と、各標本の陽

性細胞占有率の 25th - 75th percentile をもとに, p62, LC3A, LC3B についてはいずれも陽性細胞占有率 1%以上と設定した. (77) (119-123) 判定は 1 人の口腔病理医と, 3 人の口腔外科医が担当した. 標本は陽性または陰性のみの判定とした.

#### 1.4. 統計学的処理

免疫染色の結果と各種臨床指標との比較については  $\chi^2$  検定を採用した. また腫瘍再発の評価として無再発生存期間, 予後の評価として疾患特異的生存期間を採用した. 無再発生存期間は切除手術当日から局所再発と診断された日までの期間, 疾患特異的生存率は切除手術当日から口腔がんおよびその関連疾患による死亡当日までの期間とした. これらは Kaplan-Meier 法を用いて図表とし, 両群間の差の検定には log-rank 検定, さらに詳細な検討のために, 単変量および多変量 Cox 比例ハザード分析を行い, ハザード比 (hazard ratios: HR) と 95%信頼区間 (95% confidence intervals: CI) を求めた.

すべての p 値は両側検定であり, 0.05 未満が統計的に有意であるとみなした. 統計分析は JMP for Mac ver.13 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った.

#### 1.5. 結果

##### 1.5.1. p62 タンパク質の発現

###### 1.5.1.1. 各種臨床指標との関連

免疫染色の結果, p62 陽性例は 31 例, 陰性例は 40 例であった. 免疫染色の各種条件検討結果については表 1 に, 結果の代表例を図 5 に, 各種臨床指標との関連を表 2 に示す. p62 の発現は  $\chi^2$  検定の結果, 局所再発との間に有意差を認めた ( $P=0.045$ ) が, そのほかの臨床指標との間に有意差は認められなかった. また無再発生存期間については Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成した. 両群の差については log-rank 検定で  $P=0.019$  と有意差を認めた. (図 6) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P=0.022$ , HR; 2.91, 95% CI ; 1.17 - 7.80, さらに多変量 Cox 比例ハザード分析においても  $P=0.007$ , HR ; 3.76, 95%CI ; 1.43 - 10.89 といずれの検討においても有意差を認めた. (表 3)

###### 1.5.1.2. 腫瘍関連死との関連

腫瘍関連死との関連については,  $\chi^2$  検定の結果, 有意差は認められなかった. ( $P=0.064$ ) また無再発生存期間と同様, Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成した (図 6). 両群の差は log-rank 検定で  $P=0.069$ , 単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P=0.072$ , HR; 2.31, 95% CI ; 0.93 - 6.21, 多変量 Cox 比例ハザード分析においても  $P=0.135$ , HR; 2.08, 95%CI ; 0.80 - 5.83 といずれも有意差を認めなかった. (表 4)

##### 1.5.2. LC3A,3B タンパク質の発現

###### 1.5.2.1. 各種臨床指標との関連

免疫染色の結果、LC3A 陽性例は 47 例、陰性例は 24 例、LC3B 陽性例は 49 例、陰性例は 22 例であった。免疫染色の各種条件検討結果については表 5 および 6 に、免疫染色結果の代表例を図 3 に、各種臨床指標との関連を表 1 に示す。 $\chi^2$  検定の結果、LC3A ( $P = 0.008$ )、LC3B ( $P = 0.016$ ) のいずれも局所再発との間に有意差を認めた。そのほかの臨床指標との間には、後述の腫瘍関連死以外に有意差は認められなかった。また無再発生存期間については p62 同様に Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成した。両群の差については log-rank 検定の結果、LC3A ( $P = 0.013$ )、LC3B ( $P = 0.022$ ) のいずれも有意差を認めた。(図 6) また単変量 Cox 比例ハザード分析では LC3A は  $P = 0.007$ , HR ; 5.21, 95% CI ; 1.49 – 32.9, LC3B は  $P = 0.009$ , HR ; 2.16, 95% CI ; 1.20 – 4.04, さらに多変量 Cox 比例ハザード分析においても LC3A は  $P = 0.002$ , HR ; 6.54, 95% CI ; 1.82 – 41.7, LC3B は  $P = 0.004$ , HR ; 2.44, 95% CI ; 1.33 – 4.69 とすべての場合において有意差を認めた。(表 3)

#### 1.5.2.2. 腫瘍関連死との関連

腫瘍関連死との関連については、 $\chi^2$  検定の結果、LC3A ( $P = 0.002$ )、LC3B ( $P = 0.004$ ) のいずれも局所再発との間に有意差を認めた。また無再発生存期間と同様、Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成した。両群の差については log-rank 検定の結果、LC3A ( $P = 0.004$ )、LC3B ( $P = 0.007$ ) のいずれも有意差を認めた。(図 6) また単変量 Cox 比例ハザード分析では LC3A は  $P = 0.001$ , HR ; 10.86, 95% CI ; 2.24 – 94.9, LC3B は  $P = 0.042$ , HR ; 1.78, 95% CI ; 1.10 – 3.17, さらに多変量 Cox 比例ハザード分析においても LC3A は  $P = 0.001$ , HR ; 10.33, 95% CI ; 2.10 – 86.9, LC3B は  $P = 0.015$ , HR ; 2.07, 95% CI ; 1.15 – 3.80 とすべての場合において有意差を認めた。(表 4)

### 1.6. 考察

口腔がんの切除マージン部における p62, LC3A, LC3B の発現は、いずれも口腔がんの局所再発の有無との間に有意差を認めた。一方で腫瘍関連死については、LC3A および LC3B の発現との間には有意差を認めたが、p62 との間には有意差が認められなかった。また、これら 3 種のオートファジー関連タンパク質と各種臨床指標との間の関連は、いずれも認められなかった。

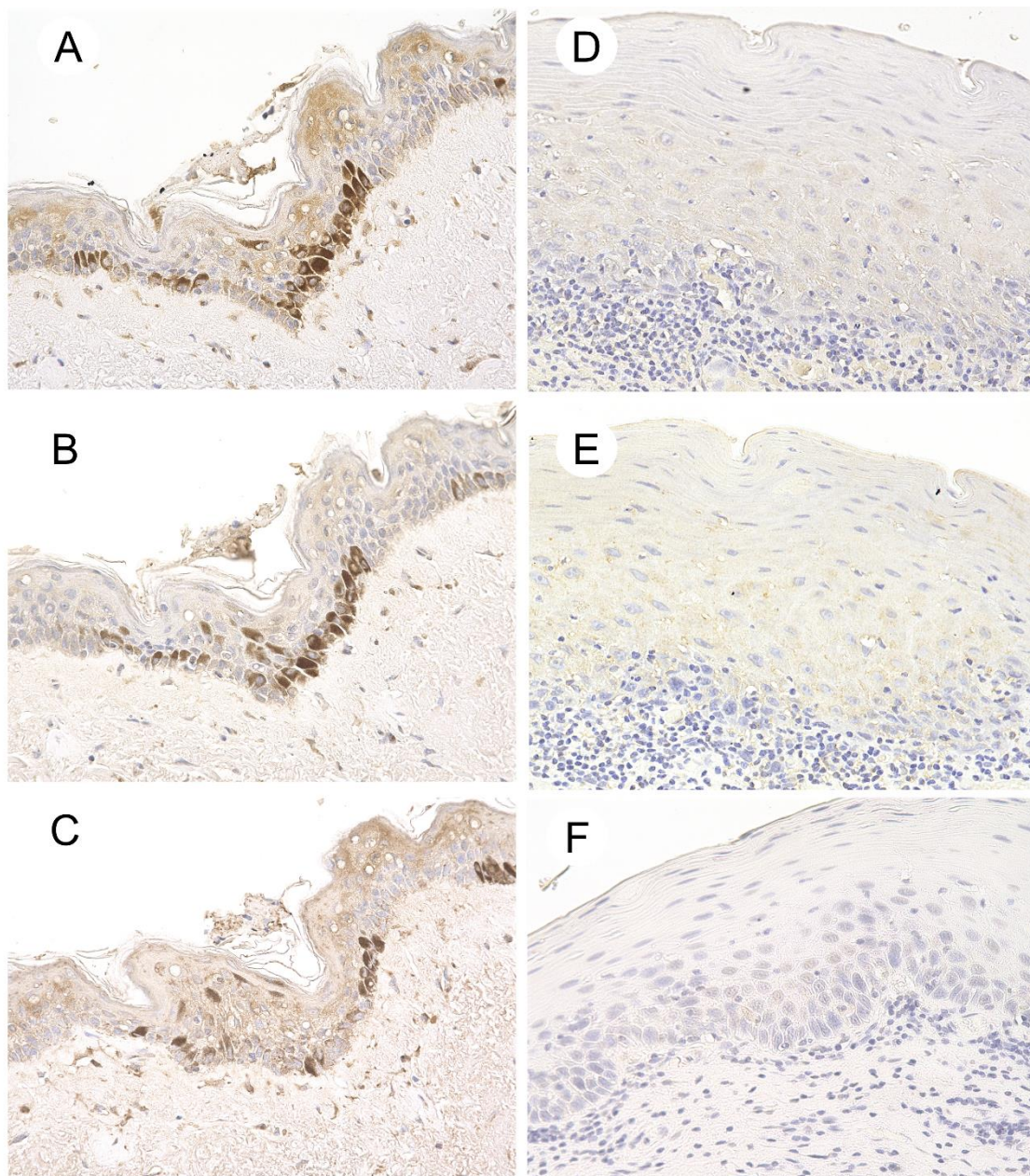
p62 は LC3 ファミリーの N 末端に存在する  $\alpha$  ヘリックスからなる 3 次元構造である LC3 interacting region (LIR) に対し強く結合するが、この 2 種のタンパク質が結合することによって隔離膜が伸長し、選択的オートファジーが進行する。このため両社の結合は選択的オートファジーによるポリユビキチン化タンパク質の分解に必須である。一方、LC3 遺伝子がオートファジーの誘導とともに発現し、LC3 タンパク質は膜融合を触媒する II 型が増加し、オートファゴソーム形成に直接かかわるなど、オートファジーに特異的なタンパク質であることに対して、p62 遺伝子は Ishii らの報告にあるように酸化ストレスによって誘導され

る特性があり、(124) p62 タンパク質は酸化ストレス応答システムである Nrf2 – Keap1 系と関連するなど、オートファジー以外にも機能を持つ多機能のアダプタータンパク質である。(65, 66, 92, 125) 特に Nrf2 が活性化する条件では p62 遺伝子が正の制御を受け、発現上昇を来すこともある。(126) この他にも、核外輸送因子 CRM-1 と相互作用があるとされており、CRM-1 濃度によって p62 遺伝子の発現も調節される可能性がある。(127-131) そのため p62 タンパク質の発現レベルの解釈には注意が必要であり、細胞内における p62 の蓄積をもってオートファジーの活性低下や停滞と結論付けてしまうことは、真の現象を見誤る可能性がある。

今回の結果は、特にオートファジーに特異的である 2 種の LC3 タンパク質の発現が口腔がん患者の無再発生存期間および疾患特異的生存率と関連したことから、少なくとも口腔がん切除断端の正常粘膜上皮細胞において、何らかのオートファジーの異常が起きていると考えられた。p62 の発現が無再発生存期間とは関連したものの、腫瘍関連死と関連がなかったことに関しては、p62 がオートファジー以外のシステム(Nrf2 – Keap1 系や CRM-1 との相互作用)にも関与したため、結果が修飾を受けた可能性が考えられた。(132, 133) しかしながら今回は免疫組織染色の結果のみの解析であるため、オートファジーにどのような異常が起きているのかは不明である。すなわち 3 種のタンパク質が強く発現していても、オートファジーの停滞による蓄積か、それともオートファジーの活性が大きく上昇しているために過剰発現が生じているのかは判別できない。オートファジーの停滞は Alzheimer 病を始めとした様々な疾患で認められ、その増悪に関与する報告が多数存在する。(134-137) このことから口腔がん周囲の正常粘膜において発生していると考えられるオートファジー異常も停滞であると推察できるが、本態の解明には mRNA の発現解析等の核酸の評価や、凍結薄切法による電子顕微鏡観察等による検討が必要と考えられた。

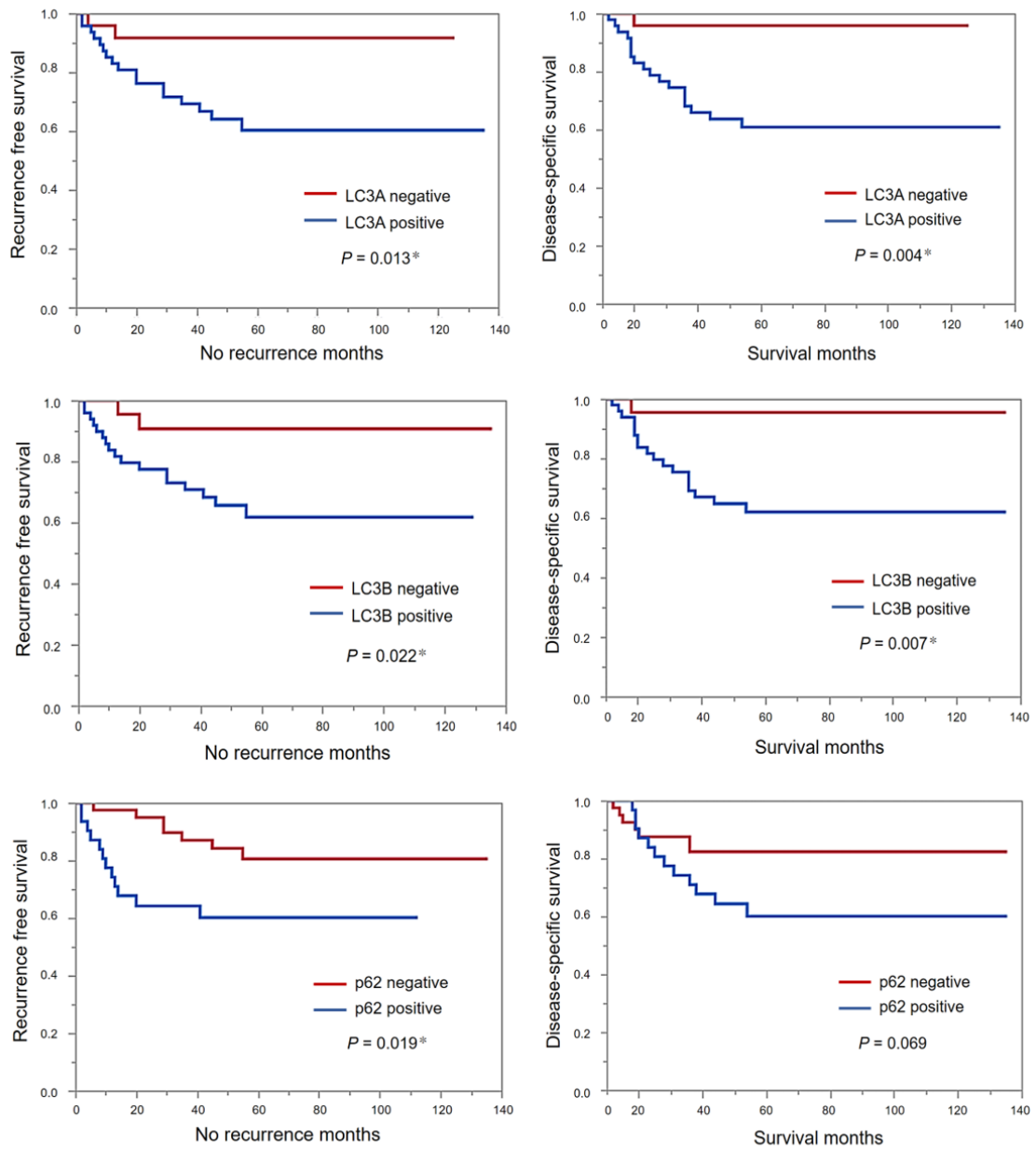
第1章 圖表

圖5



A : LC3A 陽性例    D : LC3A 陰性例  
B : LC3B 陽性例    E : LC3B 陰性例  
C : p62 陽性例     F : p62 陰性例

図 6



Kaplan-Meier 法による 3 種のオートファジー関連タンパク質の発現と、無再発生存期間および疾患特異的生存率との比較検討

## 表 1

表 1 p62免疫染色の条件検討結果

抗体濃度	抗原賦活剤	1次抗体作用時間	DAB発色時間	ヘマトキシリン染色時間	染色結果	
					上皮細胞	background
1 / 50	EDTA	12h	10秒	60秒	過染色	過染色
1 / 100	EDTA	12h	10秒	30秒	過染色	過染色
1 / 100	クエン酸	12h	10秒	30秒	強い	過染色
1 / 150	EDTA	12h	15秒	30秒	強い	過染色
1 / 150	クエン酸	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 200	EDTA	12h	15秒	30秒	良好	弱い
1 / 200	クエン酸	12h	15秒	30秒	良好	弱い
1 / 400	EDTA	12h	40秒	30秒	弱い	弱い
1 / 200	EDTA	12h	20秒	20秒	弱い	良好
1 / 200	クエン酸	12h	20秒	20秒	良好	弱い
1 / 200	EDTA	12h	15秒	15秒	良好	良好
1 / 200	EDTA	18h	15秒	15秒	やや強い	良好

\* 抗体濃度1 / 200, EDTA buffer, DAB・ヘマトキシリンとも15秒処理の条件を採用

表 2

Table 2 Relationship between LC3A, LC3B and p62 expression and clinicopathologic variables in surgical margin of OSCCs.

Variable	No. of cases	LC3A expression			LC3B expression			p62 expression		
		positive(%)	negative(%)	P-value	positive(%)	negative(%)	P-value	positive(%)	negative(%)	P-value
Age <sup>a</sup>										
≤ 65 years	38	25(66)	13(34)	0.937	25(66)	13(34)	0.527	14(37)	24(63)	0.213
> 65 years	33	22(67)	11(33)		24(73)	9(27)		17(52)	16(48)	
Sex										
Male	40	25(63)	15(37)	0.453	27(68)	13(32)	0.754	18(45)	22(55)	0.796
Female	31	22(71)	9(29)		22(71)	9(29)		13(42)	18(58)	
T stage										
T1/T2	45	29(64)	16(36)	0.680	29(64)	16(36)	0.267	23(51)	22(49)	0.240
T3/T4	26	18(69)	8(31)		20(77)	6(23)		8(31)	18(69)	
N stage										
N0	55	35(64)	20(36)	0.389	36(65)	19(35)	0.213	23(42)	32(58)	0.562
N1/2/3	16	12(75)	4(25)		13(81)	3(19)		8(50)	8(50)	
Stage										
I / II	37	22(59)	15(41)	0.210	22(59)	15(41)	0.067	18(49)	19(52)	0.376
III/IV	34	25(74)	9(26)		27(79)	7(21)		13(38)	21(62)	
Histologic grade										
G1	45	27(60)	18(40)	0.140	31(69)	14(31)	0.976	19(42)	26(58)	0.748
G2/G3	26	20(77)	6(23)		18(69)	8(31)		12(46)	14(54)	
Location										
Tongue	32	21(66)	11(34)	0.890	23(72)	9(28)	0.799	13(41)	19(59)	0.840
Gingiva	25	16(64)	9(36)		16(64)	9(36)		11(44)	14(56)	
Others <sup>b</sup>	14	10(71)	4(29)		10(71)	4(29)		7(50)	7(50)	
Preoperative treatment										
Yes	46	30(65)	16(35)	0.813	30(65)	16(35)	0.343	21(46)	25(54)	0.646
No	25	17(64)	8(36)		19(76)	6(34)		10(40)	15(60)	
Alcohol										
Yes	28	20(71)	8(29)	0.449	21(75)	7(25)	0.375	11(39)	17(61)	0.548
No	43	27(63)	16(27)		28(65)	15(35)		20(47)	23(53)	
Smoking										
Yes	29	20(69)	9(31)	0.681	22(76)	7(24)	0.296	13(45)	16(55)	0.869
No	42	27(64)	15(36)		27(64)	15(36)		18(43)	24(57)	
Tumor recurrence										
Yes	19	17(89)	2(11)	0.008 <sup>*</sup>	17(89)	2(11)	0.016 <sup>*</sup>	12(63)	7(37)	0.045 <sup>*</sup>
No	52	30(58)	22(42)		32(62)	20(38)		19(36)	33(64)	
Prognosis										
Alive	52	29(56)	23(44)	0.002 <sup>*</sup>	31(60)	21(40)	0.004 <sup>*</sup>	19(37)	33(63)	0.064
Dead <sup>c</sup>	19	18(95)	1(5)		18(95)	1(5)		12(63)	7(27)	

NOTE: Values are shown as n (%), where n is number of patients.

<sup>a</sup> Mean ± s.d. : 65.8 ± 13.3<sup>b</sup> Oral floor, Buccal mucosa and Lip<sup>c</sup> Only cancer related death<sup>\*</sup> P < 0.050



表 3

Table 3 Univariate and multivariate Cox proportional hazard analyses of clinicopathologic variables for recurrence-free survival rate

		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
<b>VS LC3A expression</b>							
LC3A expression	Positive vs Negative	5.21	1.49 - 32.9	0.007 <sup>*</sup>	6.54	1.82 - 41.7	0.002 <sup>*</sup>
T grade	III/IV vs I/II	1.21	0.47 - 3.09	0.676	1.13	0.27 - 2.64	0.826
Preoperative treatment	No vs Yes	1.52	0.69 - 3.77	0.370	2.20	0.69 - 6.93	0.174
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.65	0.63 - 5.09	0.231	3.27	1.12 - 11.0	0.029 <sup>*</sup>
Alcohol	Yes vs No	1.34	0.67 - 5.39	0.529	1.91	0.67 - 5.39	0.220
Smoking	Yes vs No	1.11	0.43 - 2.74	0.826	1.01	0.38 - 2.84	0.968
<b>VS LC3B expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
LC3B expression	Positive vs Negative	2.16	1.20 - 4.04	0.009 <sup>*</sup>	2.44	1.33 - 4.69	0.004 <sup>*</sup>
T grade	III/IV vs I/II	1.21	0.47 - 3.09	0.676	1.87	0.93 - 3.69	0.081
Preoperative treatment	No vs Yes	1.52	0.69 - 3.77	0.370	1.96	0.93 - 4.33	0.082
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.65	0.63 - 5.09	0.231	1.55	0.81 - 2.92	0.177
Alcohol	Yes vs No	1.34	0.67 - 5.39	0.529	1.15	0.41 - 1.80	0.707
Smoking	Yes vs No	1.11	0.43 - 2.74	0.826	1.53	0.44 - 1.66	0.669
<b>VS p62 expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
p62 expression	Positive vs Negative	2.91	1.17 - 7.86	0.022 <sup>*</sup>	3.76	1.43 - 10.9	0.007 <sup>*</sup>
T grade	III/IV vs I/II	1.21	0.47 - 3.01	0.676	1.08	0.33 - 3.19	0.893
Preoperative treatment	No vs Yes	1.51	0.59 - 3.77	0.370	2.58	0.80 - 8.12	0.111
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.64	0.63 - 5.01	0.321	3.18	0.98 - 12.7	0.052
Alcohol	Yes vs No	1.33	0.53 - 3.32	0.529	2.08	0.69 - 6.30	0.190
Smoking	Yes vs No	1.11	0.43 - 2.74	0.826	1.21	0.43 - 3.52	0.712

表 4

**Table 4** Univariate and multivariate Cox proportional hazard analyses of clinicopathologic variables for disease-specific survival rate

		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
<b>VS LC3A expression</b>							
LC3A expression	Positive vs Negative	10.86	2.24 - 94.9	0.001 <sup>†</sup>	10.33	2.10 - 86.9	0.001 <sup>†</sup>
T grade	III/IV vs I/II	2.04	0.82 - 5.12	0.123	1.21	0.38 - 4.17	0.7437
Preoperative treatment	No vs Yes	3.70	1.49 - 9.97	0.012 <sup>†</sup>	4.52	1.44 - 16.0	0.009 <sup>†</sup>
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.70	1.09 - 6.98	0.032 <sup>†</sup>	1.37	0.51 - 3.80	0.529
Alcohol	Yes vs No	2.26	0.92 - 5.85	0.076	2.64	0.90 - 8.39	0.075
Smoking	Yes vs No	1.28	0.51 - 3.17	0.594	1.40	0.27 - 1.88	0.494
<b>VS LC3B expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
LC3B expression	Positive vs Negative	1.78	1.10 - 3.17	0.042 <sup>†</sup>	2.07	1.15 - 3.80	0.015 <sup>†</sup>
T grade	III/IV vs I/II	2.04	0.82 - 5.12	0.123	2.73	1.34 - 5.34	0.006 <sup>†</sup>
Preoperative treatment	No vs Yes	3.70	1.49 - 9.97	0.012 <sup>†</sup>	3.91	1.83 - 8.87	<0.001 <sup>†</sup>
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.70	1.09 - 6.98	0.032 <sup>†</sup>	1.13	0.59 - 2.28	0.629
Alcohol	Yes vs No	2.26	0.92 - 5.85	0.076	1.24	0.38 - 1.67	0.551
Smoking	Yes vs No	1.28	0.51 - 3.17	0.594	1.18	0.60 - 2.27	0.622
<b>VS p62 expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
p62 expression	Positive vs Negative	2.31	0.93 - 6.21	0.072	2.08	0.80 - 5.83	0.135
T grade	III/IV vs I/II	2.04	0.82 - 5.12	0.123	1.21	0.36 - 4.58	0.764
Preoperative treatment	No vs Yes	3.70	1.49 - 9.97	0.012 <sup>†</sup>	3.98	1.21 - 14.9	0.013 <sup>†</sup>
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.70	1.09 - 6.98	0.032 <sup>†</sup>	1.51	0.52 - 4.36	0.439
Alcohol	Yes vs No	2.26	0.92 - 5.85	0.076	2.28	0.76 - 7.32	0.144
Smoking	Yes vs No	1.28	0.51 - 3.17	0.594	1.12	0.42 - 2.99	0.801

## 表 5

表 5 LC3A免疫染色条件検討結果

抗体濃度	抗原賦活剤	1次抗体作用時間	DAB発色時間	ヘマトキシリン染色時間	染色結果	
					上皮細胞	background
1 / 50	EDTA	12h	10秒	60秒	強い	強い
1 / 100	EDTA	12h	10秒	30秒	弱い	良好
1 / 100	クエン酸	12h	10秒	30秒	弱い	良好
1 / 150	EDTA	12h	15秒	30秒	弱い	弱い
1 / 150	クエン酸	12h	15秒	30秒	弱い	弱い
1 / 200	EDTA	12h	30秒	20秒	弱い	弱い
1 / 200	クエン酸	12h	30秒	20秒	弱い	弱い
1 / 400	EDTA	12h	40秒	20秒	弱い	弱い
1 / 100	EDTA	12h	30秒	30秒	弱い	良好
1 / 100	クエン酸	12h	30秒	30秒	良好	良好
1 / 100	EDTA	12h	20秒	30秒	弱い	良好
1 / 100	クエン酸	12h	20秒	30秒	弱い	良好
1 / 100	EDTA	12h	45秒	30秒	良好	良好
1 / 100	EDTA	12h	45秒	30秒	弱い	良好
1 / 100	EDTA	18h	20秒	30秒	弱い	良好

\* ともに良好な2条件を比較し、抗体濃度1 / 200, EDTA buffer, DAB45秒, ヘマトキシリン15秒処理の条件を採用

## 表 6

表 6 LC3B免疫染色 の条件検討結果

抗体濃度	抗原賦活剤	1次抗体作用時間	DAB発色時間	ヘマトキシリン染色時間	染色結果	
					上皮細胞	background
1 / 50	EDTA	12h	5 秒	60秒	過染色	過染色
1 / 100	EDTA	12h	10秒	60秒	過染色	過染色
1 / 100	クエン酸	12h	10秒	60秒	過染色	強い
1 / 150	EDTA	12h	10秒	40秒	強い	強い
1 / 150	クエン酸	12h	10秒	40秒	強い	強い
1 / 200	EDTA	12h	10秒	20秒	強い	良好
1 / 200	クエン酸	12h	10秒	20秒	強い	良好
1 / 400	EDTA	12h	20秒	20秒	弱い	弱い
1 / 200	EDTA	12h	5秒	30秒	弱い	弱い
1 / 200	クエン酸	12h	5秒	30秒	弱い	弱い
1 / 300	EDTA	12h	10秒	30秒	弱い	弱い
1 / 300	クエン酸	12h	10秒	30秒	弱い	弱い
1 / 200	EDTA	12h	10秒	20秒	強い	良好
1 / 200	クエン酸	12h	10秒	20秒	強い	弱い
1 / 200	EDTA	6h	10秒	10秒	良好	弱い
1 / 200	クエン酸	6h	10秒	10秒	良好	弱い
1 / 200	EDTA	9h	10秒	20秒	良好	良好
1 / 200	クエン酸	9h	10秒	20秒	良好	良好
1 / 200	EDTA	9h	10秒	30秒	良好	弱い

\* いくつかの条件から抗体濃度1 / 200,1次抗体作用9時間, EDTA buffer, DAB10秒, ヘマトキシリン20秒処理の条件を採用

## 第 2 章

### 口腔がん切除断端における 3 種の遺伝子異常マーカーの発現と臨床指標の関連

#### 2.1. 目的

序論でも触れたが、口腔は様々な外的刺激を受けやすい部位であり、酸化ストレスなど遺伝子にダメージを与えうる要因も高い頻度で発生している。遺伝子の異常とがんの発生が強く関連することは広く知られており、特にがん抑制遺伝子である p53 の変異は非常に多くのがんに関連があるとされる。(138, 139) p53 と口腔がんとの関連も複数指摘されており、前癌病変や腫瘍周囲の異形粘膜上皮における発現の検討もなされている。(106, 140, 141)

我々は第 1 章同様、腫瘍切除断端部分の正常粘膜に対して免疫染色を行い、酸化的 DNA 損傷マーカーである 8-OHdG, DNA 二本鎖切断マーカーの  $\gamma$ H2AX に加え、p53 の発現を調べ、腫瘍切除後の再発や遠隔転移との関連を探索することで、新たな口腔がん診断マーカーを発見することを目的とした。

#### 2.2. 材料および方法

##### 2.2.1 試料

本研究では筑波大学附属病院歯科口腔外科にて全身麻酔下、外科的切除を受けた 71 名の口腔がん患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック標本を試料として用いた。手術は 1997 年から 2009 年の間に実施された。TNM 分類および Stage 分類は、American Joint Committee on Cancer 第 7 版の基準に従って実施した。(116) 各種臨床情報および追跡調査データは、すべて本院の診療情報記録から得られたものである。すべての標本は少なくとも 2 人の病理医によって断端陰性と診断されたものであるが、切除縁から腫瘍までの距離が 10mm 以上離れており、かつ切除縁周囲に電気メスなどによる変性を来していない検体のみ採用した。この研究は筑波大学病院附属病院の倫理委員会の承認を受け、すべての患者の同意が得られていることを確認した。

##### 2.2.2. 試薬

試薬に関しては、以下の企業より購入した。特に記載のない試薬に関しては和光純薬工業社製の特級試薬を用い、実験に使用した水は、Direct-Q UV (Merck Millipore, Darmstadt Germany) を使用して得られた超純水を使用した。

ナカライテスク (京都)

- ・ Blocking one histo (免疫化学研究用タンパクブロッキング剤)
- ・ Histo VT One (免疫化学研究用抗原賦活液, トリス EDTA 緩衝液)
- ・ Signal Enhancer HIKARI for Immunostain

日研ザイル（東京）

- ・ 抗 8-OHdG モノクローナル抗体 (clone N45.1)

松波硝子工業（大阪）

- ・ マルチマウント 480
- ・ NEO micro cover glass 25×45mm

和光純薬工業（大阪）

- ・ マイヤーヘマトキシリン溶液

abcam（Cambridge, UK）

- ・ Anti-p53 antibody [PAb1801] (ab28)
- ・ Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody (ab2893)

Agilent（Santa Clara, CA）

- ・ Dako Wash Buffer 10×
- ・ Dako pen
- ・ IHC Microscope Slides, FLEX

Cell Signaling Technology（Danvers, MA）

- ・ SignalStain® DAB Substrate Kit

Vector Laboratories（Burlingame, CA）

- ・ Vectastain Universal Elite ABC Kit

### 2.2.3. 免疫染色

すべての組織切片はホルマリン固定後にパラフィン包埋され、マイクロームで3 $\mu$ mの厚さに切断した上で、シランコーティングスライドガラス上に乗せ、62°Cで30分間乾燥させ標本とした。使用した抗体は全てマウスと交差反応性を持っていたため、ポジティブコントロールとしてマウス足底由来の上皮細胞を使用した。一方ネガティブコントロールとして同じマウス足底由来上皮細胞に一次抗体を使用せず、そのほかの操作をプロトコール通り行った。プロトコールは Ramos らの方法や、多くの製品を試薬として採用したナカライテスク社の規定プロトコールを参考に、おおよそ以下の如く定めた。(117,118)

なお使用する抗体によっては、以下の条件の一部を変更して染色条件検討を行ったものがある。各抗体に関する条件検討の内容に関しては後述の結果欄にて示す。

- ① スライドをキシレンに 12 時間浸漬, 次いでエタノールに 99.5%→70%→50%の順に浸漬し, 脱パラフィンおよび水和処理を行った。
- ② スライドを pH 6.0 に調整した 10 mmol / L クエン酸ナトリウム緩衝液もしくはトリス EDTA 緩衝液 (Histo VT One) に浸漬し, 90°C で 20 分間処理し抗原賦活化を行った。
- ③ 検体中の内因性ペルオキシダーゼ活性を, 0.3%過酸化水素含有メタノール溶液にて 20 分間処理することでブロックした。ただし, 核に特異的に染色性を持つ 8-OHdG および  $\gamma$  H2AX の染色に際しては, この処理を行わなかった。
- ④ 十分に洗浄後, スライドに一次抗体を乗せ一次染色を行った。各種一次抗体については事前に条件検討を行い, また特異性を確認したうえで, 適切な濃度を決定した。一次抗体の希釈には Signal Enhancer HIKARI for Immunostain (発色増強剤) を使用した。湿潤条件下に保ち, 室温(20°C)で 6~12 時間処理した。
- ⑤ 再び十分に洗浄後, 切片を二次抗体で 30 分間処理した。こちらも希釈には Signal Enhancer HIKARI for Immunostain を使用した。
- ⑥ 発色を増強させる目的でアビジン-ビオチン標識酵素複合体処理 (ABC 法) を 30 分間行った。
- ⑦ 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) を用いて 15~40 秒間処理し発色させ, さらにヘマトキシリン溶液に 20 秒~1 分間浸漬し, 核を対比染色した。
- ⑧ 検体をエタノール 50%→70%→99.5%の順に浸漬し, 次いでキシレンに浸漬し脱水処理を行った。
- ⑨ 疎水性封入剤を使用して封入した。

### 2.3. 分析

標本の観察は, 腫瘍から少なくとも 10 mm 離れた正常粘膜上皮部分とした。電気メスの焼灼等により観察に向かない部位を除外した。観察の結果, いくつかの標本には軽度の異形細胞が含まれていた。

すべての標本はキーエンス社の BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察した。観察条件は明視野下とし, まず拡大率 200 倍として観察範囲を設定, 個々の細胞は拡大率 400 倍で観察した。次に観察範囲内における各ターゲットの陽性細胞数を計測し, 視野下の全上皮細胞数に占める割合を算出した。陽性/陰性の判定基準は各先行研究と, 各標本の陽性細胞占有率の 25th - 75th percentile をもとに, p53 については陽性細胞占有率 1%以上,  $\gamma$  H2AX については 3%以上, 8-OHdG については 10%以上と設定した。(77) (119-123) 判定は 1 人の口腔病理医と, 3 人の口腔外科医が担当した。標本は陽性または陰性のみの判定とした。

### 2.4. 統計学的処理

免疫染色の結果と各種臨床指標との比較については  $\chi^2$  検定を採用した。また腫瘍再発の

評価として無再発生存期間, 予後の評価として疾患特異的生存期間を採用した. 無再発生存期間は切除手術当日から局所再発と診断された日までの期間, 疾患特異的生存率は切除手術当日から口腔がんおよびその関連疾患による死亡当日までの期間とした. これらは Kaplan-Meier 法を用いて図表とし, 両群間の差の検定には log-rank 検定, さらに詳細な検討のために, 単変量および多変量 Cox 比例ハザード分析を行い, ハザード比 (hazard ratios: HR) と 95%信頼区間 (95% confidence intervals: CI) を求めた.

すべての  $p$  値は両側検定であり, 0.05 未満が統計的に有意であるとみなした. 統計分析は JMP for Mac ver.13 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った.

## 2.5. 結果

### 2.5.1. 8-OHdG の発現

#### 2.5.1.1. 各種臨床指標との関連

免疫染色の結果, 8-OHdG 陽性例は 40 例, 陰性例は 31 例であった. 免疫染色の各種条件検討については表 7 に, 免疫染色結果の代表例を図 7 に, 各種臨床指標との関連を表 8 に示す. 8-OHdG の発現は  $\chi^2$  検定の結果, 後述する腫瘍関連死以外の臨床指標との間に有意差は認められなかった. また無再発生存期間については第 1 章と同様, Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成したが, 両群を比較したところ log-rank 検定で  $P=0.112$  と有意差を認めなかった. (図 8) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P=0.103$ , HR; 2.24, 95% CI; 0.86–6.94, 多変量 Cox 比例ハザード分析においても  $P=0.083$ , HR; 2.39, 95% CI; 0.91–7.50 といずれの検討においても有意差を認めなかった. (表 9)

#### 2.5.1.2. 腫瘍関連死との関連

腫瘍関連死との関連については,  $\chi^2$  検定の結果,  $P=0.049$  と有意差を認めた. しかしながら Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し, 両群の差について log-rank 検定を行った結果,  $P=0.091$  と有意差は認められなかった. (図 8) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P=0.079$ , HR; 2.50, 95% CI; 0.91–8.76, 多変量 Cox 比例ハザード分析においても  $P=0.171$ , HR; 2.11, 95% CI; 0.74–7.53 とすべての場合において有意差を認めなかった. (表 10)

### 2.5.2. $\gamma$ H2AX の発現

#### 2.5.2.1. 各種臨床指標との関連

免疫染色の結果,  $\gamma$ H2AX 陽性例は 28 例, 陰性例は 43 例であった. 免疫染色の各種条件検討については表 11 に, 免疫染色結果の代表例を図 9 に, 各種臨床指標との関連を表 8 に示す.  $\gamma$ H2AX の発現は  $\chi^2$  検定の結果, いずれの臨床指標との間にも有意差は認められなかった. また無再発生存期間について log-rank 検定で  $P=0.471$ , (図 8) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P=0.476$ , HR; 1.39, 95% CI; 0.55–3.45, 多変



量 Cox 比例ハザード分析においても  $P = 0.533$ , HR ; 1.34, 95%CI ; 0.52 – 3.43 といずれの検討においても有意差を認めなかった. (表 9)

#### 2.5.2.2. 腫瘍関連死との関連

腫瘍関連死との関連についても,  $\chi^2$  検定の結果,  $P = 0.172$  と有意差を認めなかった. Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し, log-rank 検定を行った結果  $P = 0.136$  と有意差は認められなかった. (図 8) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P = 0.147$ , HR ; 1.95, 95% CI ; 0.79 – 4.91, 多変量 Cox 比例ハザード分析においても  $P = 0.344$ , HR ; 1.47, 95% CI ; 0.53 – 4.03 と, すべての場合において有意差を認めなかった. (表 10)

#### 2.5.3. p53 タンパク質の発現

##### 2.5.3.1. 各種臨床指標との関連

免疫染色の結果, p53 陽性例は 23 例, 陰性例は 48 例であった. 免疫染色の各種条件検討については表 12 に, 免疫染色結果の代表例を図 9 に, 各種臨床指標との関連を表 8 に示す. p53 の発現は  $\chi^2$  検定の結果, いずれの臨床指標との間にも有意差は認められなかった. また無再発生存期間について Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し, log-rank 検定を行ったが  $P = 0.238$ , (図 8) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P = 0.255$ , HR ; 1.72, 95% CI ; 0.66 – 4.25, 多変量 Cox 比例ハザード分析においては  $P = 0.186$ , HR ; 1.91, 95%CI ; 0.72 – 4.87 といずれの検討においても有意差を認めなかった. (表 9)

##### 2.5.3.2. 腫瘍関連死との関連

腫瘍関連死との関連についても,  $\chi^2$  検定の結果,  $P = 0.297$  と有意差を認めなかった. Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し, log-rank 検定を行ったが  $P = 0.339$  と有意差は認められず, (図 8) また単変量 Cox 比例ハザード分析では  $P = 0.353$ , HR ; 1.55, 95% CI ; 0.60 – 3.83, 多変量 Cox 比例ハザード分析においても  $P = 0.197$ , HR ; 1.89, 95% CI ; 0.71 – 4.72 と, すべての場合において有意差を認めなかった. (表 10)

#### 2.6. 考察

DNA 損傷マーカーである 8-OHdG および  $\gamma$  H2AX, 腫瘍抑制効果を示す転写因子である p53 タンパク質の発現は, 無再発生存期間及び疾患特異的生存率の間に関連を認めず, また各種臨床指標との関連も認められなかった.

DNA 損傷マーカーである 8-OHdG および  $\gamma$  H2AX の発現は, 今回の検討結果ではいかなる項目とも関連を持たなかった. 前述の通り, 8-OHdG は DNA 塩基であるグアニン(G)のプリン環の 8 位が酸化されて生成した物質で DNA 障害の中では比較的軽微な障害とされる DNA 修飾のマーカーであるが,  $\gamma$  H2AX はコアヒストンの一つである H2A のバリエーションとして知られる H2AX がリン酸化されて発生する, DNA 損傷の中でも重大な障害であ

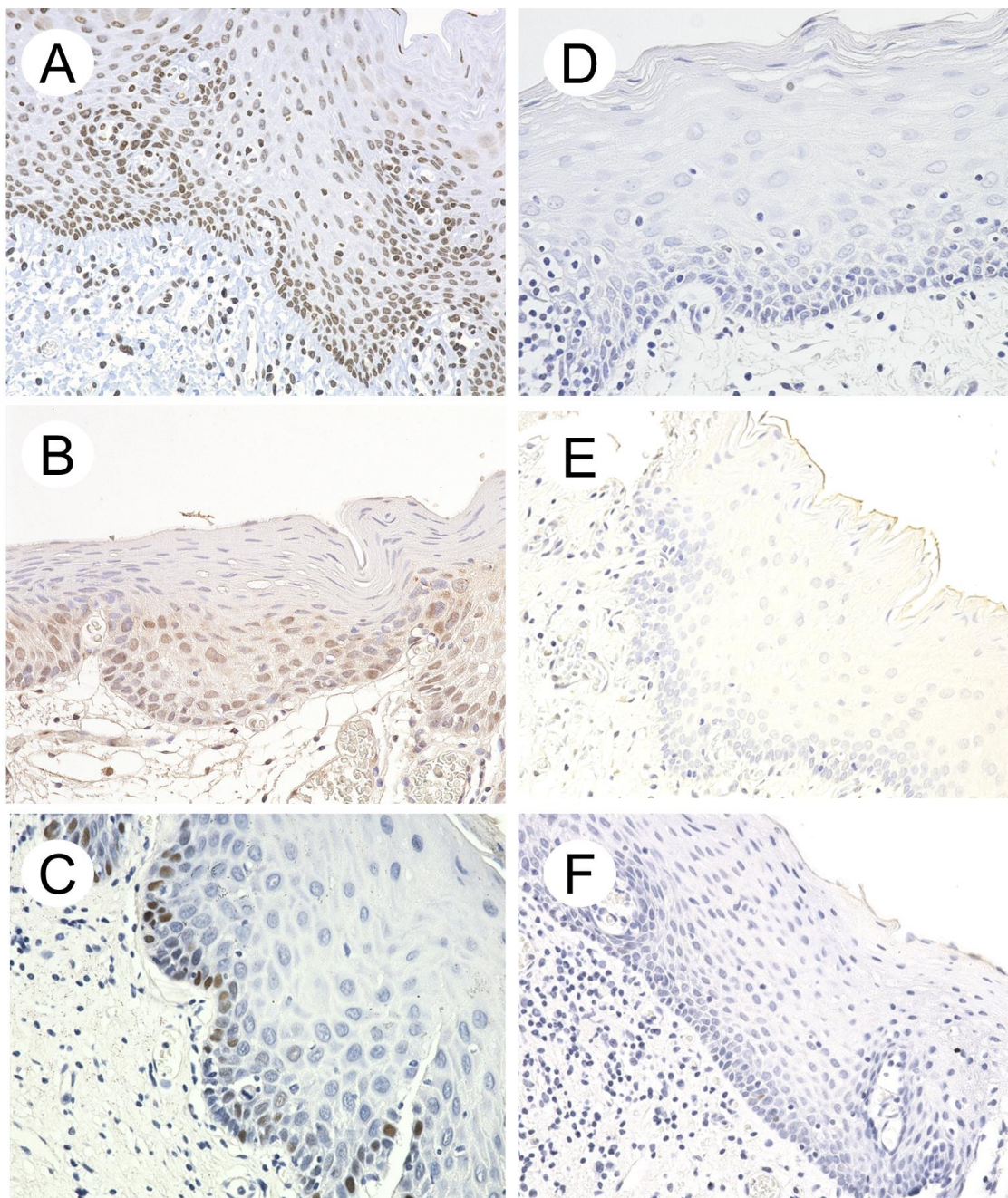
る DNA2 本鎖切断のマーカーである。Asanthamby らの報告によれば放射線 1Gy あたりの生成数は、塩基脱離と塩基修飾が合わせて数千個、1 本鎖切断が 約千個、2 本鎖切断が 20~50 個程度とされる。(43) 71 症例の陽性細胞含有率は表 1 3 に示される通りであるが、8-OHdG 陽性率の中央値は 9.91% であることに對し、 $\gamma$ H2AX の中央値は 2.05% であることから、口腔粘膜に対する外的刺激による DNA 損傷の発生は他の部位と同様な傾向で発生するものと考えられる。しかしながら今回の結果では、DNA 損傷マーカー 2 種の発現と局所再発や腫瘍関連死との関連は認められなかった。口腔粘膜は酸化ストレスをはじめとした様々な外的要因による刺激に曝露されやすい部位であるが、一般的にヒト細胞は DNA 損傷に對し、複数の修復機構が存在する。具体的には DNA 塩基損傷、塩基脱落、1 本鎖切断に對しては塩基除去修復機構と呼ばれる共通の機構が存在し、DNA グリコシラーゼによる損傷部位の切断と AP エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼによる除去、相補鎖の合成後に DNA リガーゼによる DNA 結合を受けるといふ流れで修復される。(51, 142) 一方で 2 本鎖切断はそれとは異なり、非相同末端結合と呼ばれる末端部分の損傷部位を取り除いて再結合させる方法か、相同組み換え修復と呼ばれる DNA 複製後にできる姉妹染色体を鋳型にして修復する方法のいずれかで修復される。(143, 144) これまでに正常の口腔粘膜における DNA 損傷修復機構の活性に関する報告は渉猟し得た限り存在しないため、断定することはできないが、腫瘍周囲の正常粘膜において DNA 損傷は発生しているものの、上述の DNA 修復機構は機能しているため、腫瘍の再発への関与や予後への悪影響は小さく、2 種の DNA 損傷マーカーの発現は局所再発や腫瘍関連死のマーカーとして適さない可能性が高いと考えられる。今後はサンプル数を増やした検討や、DNA 修復機構に必須の酵素の発現を検討するため、核酸の評価、特に mRNA の挙動を調べることなどが必要であると考えられた。

p53 の発現も、いかなる項目とも有意差を認めなかった。p53 は従来、口腔がん細胞において強い発現を認めることに加え、正常粘膜上皮においては細胞の異形が強くなるに従い発現が強くなる傾向が複数報告されている。(145-147) 今回の検討では陽性細胞数が全ての症例において少なく、25 percentile 値は 0.38%、中央値は 0.82%、75 percentile 値は 1.19% であった。(表 13) このため陽性・陰性を判断するカットオフ値の設定が困難であった。検討した部位は軽度の異型上皮を含むことはあったものの基本的に正常上皮と診断されており、口腔がん近傍という要素は p53 の変異の発生についてあまり意味を持たないものと考えられた。また陽性例は、図 7 に示されるような基底細胞層に陽性細胞が限局している例が多かった。なお抗 p53 モノクローナル抗体については多くの種類があり、その種類によっては同一の検体であっても同一の結果が得られないなどの問題点が指摘されている。(148, 149) 今回我々は過去に使用報告が多く、実際の p53 遺伝子変異と高く相関するとされる PAb1801 を採用した。(150) PAb1801 は N 末端領域(32~79 アミノ酸残基)を認識し、変異型、野生型の両方に反応するモノクローナル抗体である。(151) しかしながら、陽性細胞が基底細胞層にのみ限局し、かつまばらに存在するこのような組織像では実際には遺伝

子変異を起こしていない可能性がある。(152-154) 以上から、p53 の口腔がん切除マージン部分における局所再発や腫瘍関連死のマーカーとしての運用は難しいものと考えられた。

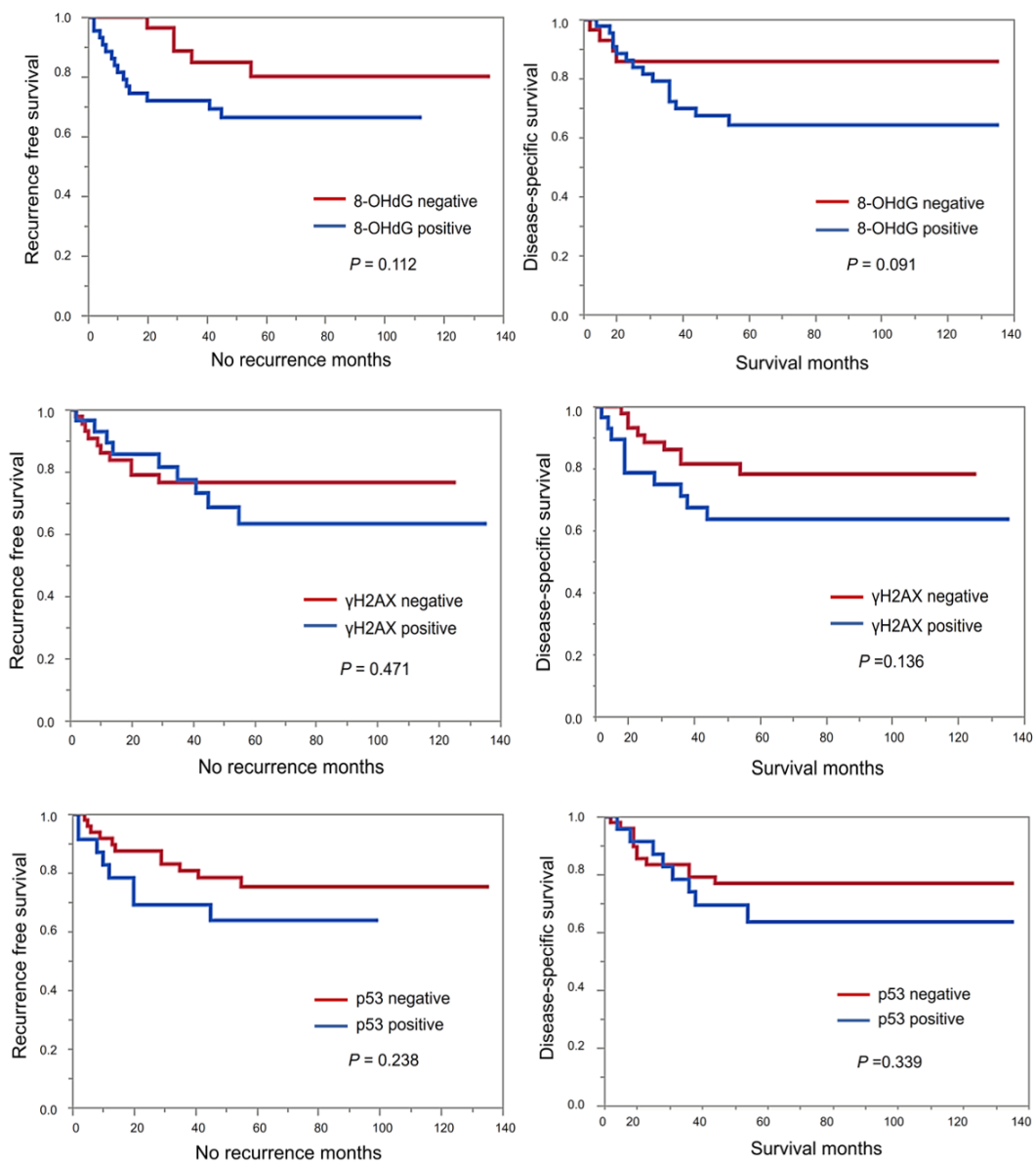
第2章圖表

圖7



A : 8-OHdG 陽性例    D : 8-OHdG 陰性例  
B :  $\gamma$ H2AX 陽性例    E :  $\gamma$ H2AX 陰性例  
C : p53 陽性例    F : p53 陰性例

図 8



Kaplan-Meier 法による DNA 損傷マーカー2種および p53 タンパク質の発現と、無再発生存期間および疾患特異的生存率との比較検討

## 表7

表7 8-OHdG免疫染色の条件検討結果

抗体濃度	抗原賦活剤	1次抗体作用時間	DAB発色時間	ヘマトキシリン染色時間	染色結果	
					上皮細胞	background
1 / 50	EDTA	12h	10秒	60秒	過染色	過染色
1 / 100	EDTA	12h	10秒	30秒	強い	過染色
1 / 100	クエン酸	12h	10秒	30秒	強い	過染色
1 / 150	EDTA	12h	15秒	30秒	強い	過染色
1 / 150	クエン酸	12h	15秒	30秒	強い	過染色
1 / 200	EDTA	12h	30秒	30秒	良好	強い
1 / 200	クエン酸	12h	30秒	30秒	良好	強い
1 / 400	EDTA	12h	40秒	20秒	弱い	弱い
1 / 200	EDTA	12h	10秒	20秒	良好	良好
1 / 200	クエン酸	12h	10秒	20秒	良好	良好
1 / 200	EDTA	12h	5秒	20秒	弱い	良好
1 / 200	クエン酸	12h	5秒	20秒	弱い	良好
1 / 300	EDTA	12h	20秒	30秒	弱い	良好

\* 良好な結果の2条件を比較し、抗体濃度1 / 200, クエン酸 buffer, DAB10秒, ヘマトキシリン20秒処理の条件を採用

表 8

**Table 8** Relationship between 8-OHdG,  $\gamma$ H2AX and p53 expression and clinicopathologic variables in surgical margin of OSCCs.

Variable	No. of cases	8-OHdG expression			$\gamma$ H2AX expression			p53 expression		
		positive(%)	negative(%)	P-value	positive(%)	negative(%)	P-value	positive(%)	negative(%)	P-value
Age <sup>a</sup>										
≤65 years	38	22(58)	16(42)	0.777	15(39)	23(61)	0.951	11(29)	27(71)	0.506
>65 years	33	18(55)	15(45)		13(39)	20(61)		12(36)	21(64)	
Sex										
Male	40	25(63)	15(37)	0.234	15(37)	25(63)	0.704	17(43)	23(57)	0.783
Female	31	15(48)	16(52)		13(42)	18(58)		6(19)	25(81)	
T stage										
T1/T2	45	25(56)	22(44)	0.861	19(42)	26(38)	0.526	15(33)	30(67)	0.824
T3/T4	26	15(58)	11(42)		9(35)	17(65)		8(31)	18(69)	
N stage										
N0	55	30(55)	25(45)	0.570	22(40)	33(60)	0.857	20(36)	35(64)	0.189
N1/2/3	16	10(63)	6(37)		6(37)	10(63)		3(19)	13(81)	
Stage										
I / II	37	21(57)	16(43)	0.841	15(41)	22(59)	0.842	14(38)	23(62)	0.305
III/IV	34	19(56)	15(44)		13(38)	21(62)		9(26)	25(74)	
Histologic grade										
G1	45	22(49)	23(51)	0.093	17(38)	28(62)	0.407	16(36)	29(64)	0.748
G2/G3	26	18(69)	8(31)		11(42)	15(58)		7(27)	19(73)	
Location										
Tongue	32	17(53)	15(47)	0.778	13(41)	19(59)	0.895	8(25)	24(75)	0.301
Gingiva	25	14(56)	11(44)		9(36)	16(64)		11(44)	14(56)	
Others <sup>b</sup>	14	9(64)	5(36)		6(43)	8(57)		4(29)	10(71)	
Preoperative treatment										
Yes	46	25(54)	21(46)	0.655	17(37)	29(63)	0.563	15(33)	31(67)	0.959
No	25	15(60)	10(40)		11(44)	14(56)		8(32)	17(68)	
Alcohol										
Yes	28	16(57)	12(43)	0.812	14(50)	14(50)	0.143	7(25)	21(75)	0.278
No	43	24(56)	19(44)		14(33)	29(67)		16(37)	27(63)	
Smoking										
Yes	29	19(66)	10(34)	0.192	11(38)	18(62)	0.596	8(28)	21(72)	0.471
No	42	21(50)	21(50)		17(41)	25(59)		15(36)	27(64)	
Tumor recurrence										
Yes	19	14(74)	5(36)	0.069	9(47)	10(53)	0.511	8(42)	11(58)	0.297
No	52	26(50)	26(50)		19(37)	33(63)		15(29)	37(71)	
Prognosis										
Alive	52	25(48)	27(52)	0.049*	18(35)	34(65)	0.172	15(29)	37(71)	0.297
Dead <sup>c</sup>	19	15(79)	4(21)		10(53)	9(47)		8(42)	11(58)	

NOTE: Values are shown as n (%), where n is number of patients.

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  s.d. : 65.8  $\pm$  13.3<sup>b</sup> Oral floor, Buccal mucosa and Lip<sup>c</sup> Only cancer related death\*  $P < 0.050$

表 9

**Table 9** Univariate and multivariate Cox proportional hazard analyses of clinicopathologic variables for recurrence-free survival rate

		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
<b>VS 8-OHdG expression</b>							
8-OHdG expression	Positive vs Negative	2.24	0.86 - 6.94	0.103	2.39	0.91 - 7.50	0.083
T grade	III IV vs I II	1.21	0.47 - 3.09	0.826	1.29	0.44 - 3.96	0.640
Preoperative treatment	No vs Yes	1.52	0.69 - 3.77	0.370	1.97	0.62 - 6.00	0.243
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.65	0.63 - 5.09	0.231	2.04	0.71 - 6.69	0.189
Alcohol	Yes vs No	1.34	0.67 - 5.39	0.529	1.66	0.63 - 4.42	0.300
Smoking	Yes vs No	1.11	0.43 - 2.74	0.826	1.47	0.53 - 4.22	0.453
<b>VS <math>\gamma</math>H2AX expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
$\gamma$ H2AX expression	Positive vs Negative	1.39	0.55 - 3.45	0.476	1.34	0.52 - 3.43	0.533
T grade	III IV vs I II	1.21	0.47 - 3.09	0.826	1.07	0.35 - 3.61	0.804
Preoperative treatment	No vs Yes	1.52	0.69 - 3.77	0.370	2.02	0.61 - 8.71	0.249
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.65	0.63 - 5.09	0.231	2.41	0.83 - 8.16	0.108
Alcohol	Yes vs No	1.34	0.67 - 5.39	0.529	1.73	0.59 - 4.87	0.403
Smoking	Yes vs No	1.11	0.43 - 2.74	0.826	1.04	0.39 - 2.89	0.937
<b>VS p53 expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
p53 expression	Positive vs Negative	1.72	0.66 - 4.25	0.255	1.91	0.72 - 4.87	0.186
T grade	III IV vs I II	1.21	0.47 - 3.09	0.826	1.07	0.35 - 3.55	0.899
Preoperative treatment	No vs Yes	1.52	0.69 - 3.77	0.370	2.14	0.66 - 6.98	0.203
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.65	0.63 - 5.09	0.231	2.39	0.82 - 8.06	0.113
Alcohol	Yes vs No	1.34	0.67 - 5.39	0.529	2.02	0.69 - 5.83	0.198
Smoking	Yes vs No	1.11	0.43 - 2.74	0.826	1.07	0.39 - 2.96	0.900



表 10

**Table 10** Univariate and multivariate Cox proportional hazard analyses of clinicopathologic variables for disease-specific survival rate

		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
<b>VS 8-OHdG expression</b>							
8-OHdG expression	Positive vs Negative	2.50	0.91 - 8.76	0.079	2.11	0.74 - 7.53	0.171
T grade	III IV vs I II	2.04	0.82 - 5.12	0.123	1.57	0.48 - 5.72	0.476
Preoperative treatment	No vs Yes	3.70	1.49 - 9.97	0.012	4.60	1.36 - 17.4	0.014
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.70	1.09 - 6.98	0.032	1.54	0.54 - 4.32	0.419
Alcohol	Yes vs No	2.26	0.92 - 5.85	0.076	2.67	0.92 - 8.43	0.070
Smoking	Yes vs No	1.28	0.51 - 3.17	0.594	1.26	0.49 - 3.31	0.627
<b>VS <math>\gamma</math>H2AX expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
$\gamma$ H2AX expression	Positive vs Negative	1.95	0.79 - 4.91	0.147	1.47	0.53 - 4.03	0.344
T grade	III IV vs I II	2.04	0.82 - 5.12	0.123	1.24	0.36 - 4.98	0.737
Preoperative treatment	No vs Yes	3.70	1.49 - 9.97	0.012	4.23	1.24 - 16.85	0.020
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.70	1.09 - 6.98	0.032	1.61	0.60 - 4.48	0.341
Alcohol	Yes vs No	2.26	0.92 - 5.85	0.076	2.43	0.81 - 7.83	0.113
Smoking	Yes vs No	1.28	0.51 - 3.17	0.594	1.06	0.40 - 2.97	0.891
<b>VS p53 expression</b>							
Variable		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
p53 expression	Positive vs Negative	1.55	0.60 - 3.83	0.353	1.89	0.71 - 4.72	0.197
T grade	III IV vs I II	2.04	0.82 - 5.12	0.353	1.37	0.41 - 5.00	0.619
Preoperative treatment	No vs Yes	3.70	1.49 - 9.97	0.353	4.69	1.36 - 17.4	0.013
Histologic grade	G2/G3 vs G1	2.70	1.09 - 6.98	0.353	1.73	0.64 - 4.96	0.282
Alcohol	Yes vs No	2.26	0.92 - 5.85	0.353	2.76	0.94 - 8.81	0.065
Smoking	Yes vs No	1.28	0.51 - 3.17	0.353	1.32	0.50 - 3.54	0.572

表 11

表 1 1  $\gamma$  H2AX免疫染色の条件検討結果

抗体濃度	抗原賦活剤	1次抗体作用時間	DAB発色時間	ヘマトキシリン染色時間	染色結果	
					上皮細胞	background
1 / 50	EDTA	12h	10秒	30秒	過染色	過染色
1 / 100	EDTA	12h	15秒	30秒	過染色	過染色
1 / 100	クエン酸	12h	15秒	30秒	過染色	過染色
1 / 150	EDTA	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 150	クエン酸	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 200	EDTA	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 200	クエン酸	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 400	EDTA	12h	15秒	30秒	弱い	弱い
1 / 150	EDTA	12h	5秒	15秒	弱い	良好
1 / 150	クエン酸	12h	5秒	15秒	弱い	良好
1 / 200	EDTA	12h	5秒	20秒	弱い	良好
1 / 200	クエン酸	12h	5秒	20秒	弱い	良好
1 / 300	EDTA	12h	10秒	20秒	弱い	弱い
1 / 300	クエン酸	12h	10秒	20秒	弱い	弱い
1 / 150	EDTA	18h	5秒	20秒	やや強い	良好
1 / 150	クエン酸	18h	5秒	20秒	やや強い	良好
1 / 200	EDTA	18h	5秒	20秒	弱い	良好
1 / 200	クエン酸	18h	5秒	20秒	弱い	良好
1 / 150	EDTA	12h	8秒	20秒	良好	良好
1 / 150	クエン酸	12h	8秒	20秒	良好	良好
1 / 150	EDTA	12h	7秒	30秒	弱い	良好

\* 抗体濃度1 / 150, EDTA buffer, DAB 8 秒, ヘマトキシリン20秒処理の条件を採用

表 12

表 1 2 p53免疫染色条件検討結果

抗体濃度	抗原賦活剤	1次抗体作用時間	DAB発色時間	ヘマトキシリン染色時間	染色結果	
					上皮細胞	background
1 / 50	EDTA	12h	10秒	60秒	過染色	過染色
1 / 100	EDTA	12h	10秒	30秒	強い	強い
1 / 100	クエン酸	12h	10秒	30秒	強い	強い
1 / 150	EDTA	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 150	クエン酸	12h	15秒	30秒	強い	強い
1 / 200	EDTA	12h	15秒	30秒	良好	良好
1 / 200	クエン酸	12h	15秒	30秒	弱い	良好
1 / 400	EDTA	12h	40秒	30秒	弱い	良好
1 / 200	EDTA	12h	20秒	20秒	強い	弱い
1 / 200	クエン酸	12h	20秒	20秒	やや強い	良好
1 / 200	EDTA	12h	10秒	20秒	良好	良好

\* 良好な結果の2条件を比較し、抗体濃度1 / 200, EDTA buffer, DAB・ヘマトキシリンとも15秒処理の条件を採用

表 13

**表 1 3** 200倍視野中の各種標的タンパク質の陽性細胞含有率

	p62	LC3A	LC3B	8-OHdG	$\gamma$ H2AX	p53
データ数	71	71	71	71	71	71
平均値	1.39	4.86	8.99	16.9	4.76	1.02
最小値	0	0	0	0	0	0
最大値	11.8	30.08	44.34	69.7	44.3	4.01
標準偏差	1.96	6.43	10.9	17.8	1.68	0.94
標準誤差	0.23	0.76	1.29	2.11	0.95	0.11
第一四分位数	0.28	0.83	0.69	3.71	0.67	0.38
第二四分位数(中央値)	0.75	2.05	5.11	9.91	2.05	0.82
第三四分位数	1.83	6.57	12.55	23.5	4.54	1.19
四分位範囲	1.56	5.74	11.86	319.75	3.87	0.81
最頻値	0	0	0	0	0	0
10%調整平均	1.09	3.94	7.68	15.23	3.29	0.92
中央絶対偏差	1.06	4.04	7.86	12.7	3.94	0.65

\* 単位はデータ数を除き (%)

## 終章

### 結果のまとめ

今回我々は口腔がん切除マージン部分の正常粘膜上皮における 6 種類のタンパク質の発現を免疫組織染色により同定し評価した。その結果、選択的オートファジーにおけるアダプタータンパク質である p62, 選択的オートファジーに特異的なタンパク質である LC3A および LC3B が発現していた場合, p62 は局所再発と, LC3A と LC3B は局所再発および腫瘍関連死と関連することを実証した。一方で DNA 損傷マーカーである 8-OHdG および  $\gamma$ H2AX の発現と, 代表的ながん抑制遺伝子である p53 の異常を示す p53 タンパク質の発現は, 特に臨床指標との関連が認められなかった。

これら 6 種のタンパク質は, 口腔がんの再発および予後のマーカーとしての運用を目指しており, その発現を評価する際, 最も重要なのは閾値の設定, すなわち各症例の陽性細胞率を算出し, 陽性もしくは陰性を判定する適切な基準を検討することである。上記の 6 種のタンパク質は, 従来各種がん細胞において先行研究が複数存在するが, その基準は様々である。Liu らは口腔がん細胞における p62 および LC3B タンパク質の発現を免疫組織染色によって評価している。細胞内の標的タンパク質の凝集(dots)をもとに個々の細胞の判定を行っている点異なるが, positive (weak) の閾値は陽性細胞率 1%である。(89) LC3 に関しては, Tang らも口腔がんにおける発現を評価する際, 陽性細胞率 1%を閾値としている。(90) この他, Niklaus らの報告では大腸がんでは p62 の閾値を 3%とする(155) など, 部位によって異なる閾値が設定されている場合が多い。なお遺伝子異常マーカーについても, 口腔がん細胞における検討ではあるが,  $\gamma$ H2AX と p53 では 10%を閾値とする報告が存在する。(121)  $\gamma$ H2AX は口腔がんでの報告は少なく, 卵巣がんにおいては閾値を 10%とする報告や(156), 正常な角膜における発現の閾値を 1%とした報告がある。(157)

このように閾値の設定に関しては様々な基準が存在するが, 口腔がんの先行研究はそもそも少なく, また上述の報告はがん細胞における評価や, 他の部位における評価であり, 正常な粘膜上皮における発現の評価は渉猟し得た限り, 行われていない。このような場合の閾値の設定, あるいは設定された閾値が適切かどうかの判断には各 percentile 値を参考として算出し評価する例が多い。(158-160) 我々は上述の先行研究に加え, 第 2 章の図 13 に示されるように, 各症例の陽性細胞占有率を算出し, percentile 値のうち特に四分位値を参考に, 最も適切と思われる閾値を設定した。

口腔がん標本の選定に際しては切除断端陰性であることは病理医によって明確にされており, また免疫染色後に観察を行った部位は, 軽度の異型上皮が含まれる場合があったが, 腫瘍細胞はもちろん, 中等度以上の異型上皮は含まれていなかった。したがって口腔がんの局所再発が発生した場合, 切除マージン付近の病理学的に正常と診断された粘膜上皮にもオートファジー異常が発生している可能性が高く, 同部のオートファジー関連タンパク質 p62, LC3A および LC3B の蓄積は, 局所再発のリスク検出や, 予後に有用なマーカーであることが示唆された。一方, 様々な外的要因による DNA 損傷は発生したとしても DNA 修復

機構が正常に機能している等の理由で、再発や予後には関連しないことが示された。また p53 の異常蓄積も従来の報告通り、粘膜上皮細胞の異型の強さによって決まる可能性が高く、口腔がん近傍であることは関連が低く、腫瘍の再発や予後との関連は認められない可能性が考えられた。

なお、一つの検体について切除断端は 2 側に存在するが、我々は可能な限り両側とも標的タンパク質発現の確認を行っている。すべての症例については確認できていないが、確認できた症例については個々の細胞の染色性に強弱の差が認められる例はあったが、いずれの断端においても陽性例は陽性であり、また陰性例についても判定が変わることは無かった。代表的な例を図 9 に示す。

また今回、再発および腫瘍関連死との関連を認めた 3 種のオートファジー関連タンパク質の発現について、どのターゲットが最も信頼性の高いマーカーとなり得るかの評価を行うことは重要である。ただし LC3A と LC3B の発現はスピアマンの順位相関係数：0.4871 と非常に相関が強く、多重共線性の問題から同時に多変量解析のパラメーターに設定することは困難である。(表 14) このため LC3A と LC3B を比較し、より良好な HR である LC3A 値を変数として選択、p62 の発現および臨床的に関連の深い 3 項目を含めた多変量解析を行い、表 15 に無再発生存期間との比較、表 16 に疾患特異的生存率との比較を示す。

その他、各統計学的モデルの良さを評価する指標に、赤池の情報量規準値 (AIC 値) がある。(161) 3 種のオートファジー関連タンパク質の発現と単変量 Cox 比例ハザード分析について、AIC 値を求めた結果を表 17 に示す。これらの結果からは、単変量解析では LC3A が最も無再発生存期間および疾患特異的生存期間との関連が深く、また統計モデルとして適切であり、マーカーとして有用であることが判明した。また多変量解析においても、LC3A が p62 よりも再発および予後のマーカーとして優れていると判明した。

なお今回は口腔がん切除マージン部の正常上皮における 6 種のタンパク質の発現を評価したが、がん細胞においてもこれらのタンパク質が発現していることが確認されている。また、今回観察した切除マージン部分よりも明らかにがん細胞における染色性が上回っている例が多数存在した。がん細胞におけるこれらのタンパク質の発現と再発・予後の関連については、他種のがんでは様々な報告があるが、口腔がんでの報告はいまだ少数である。今後の研究課題として、がん細胞における各種タンパク質の発現と、切除マージン部分の正常粘膜上皮における発現のいずれが鋭敏なマーカーであるかの比較検討や、発現の強弱を区別して検討を行うことが、より有用なマーカーを探索する上で必要であると考えられた。

## 総合考察

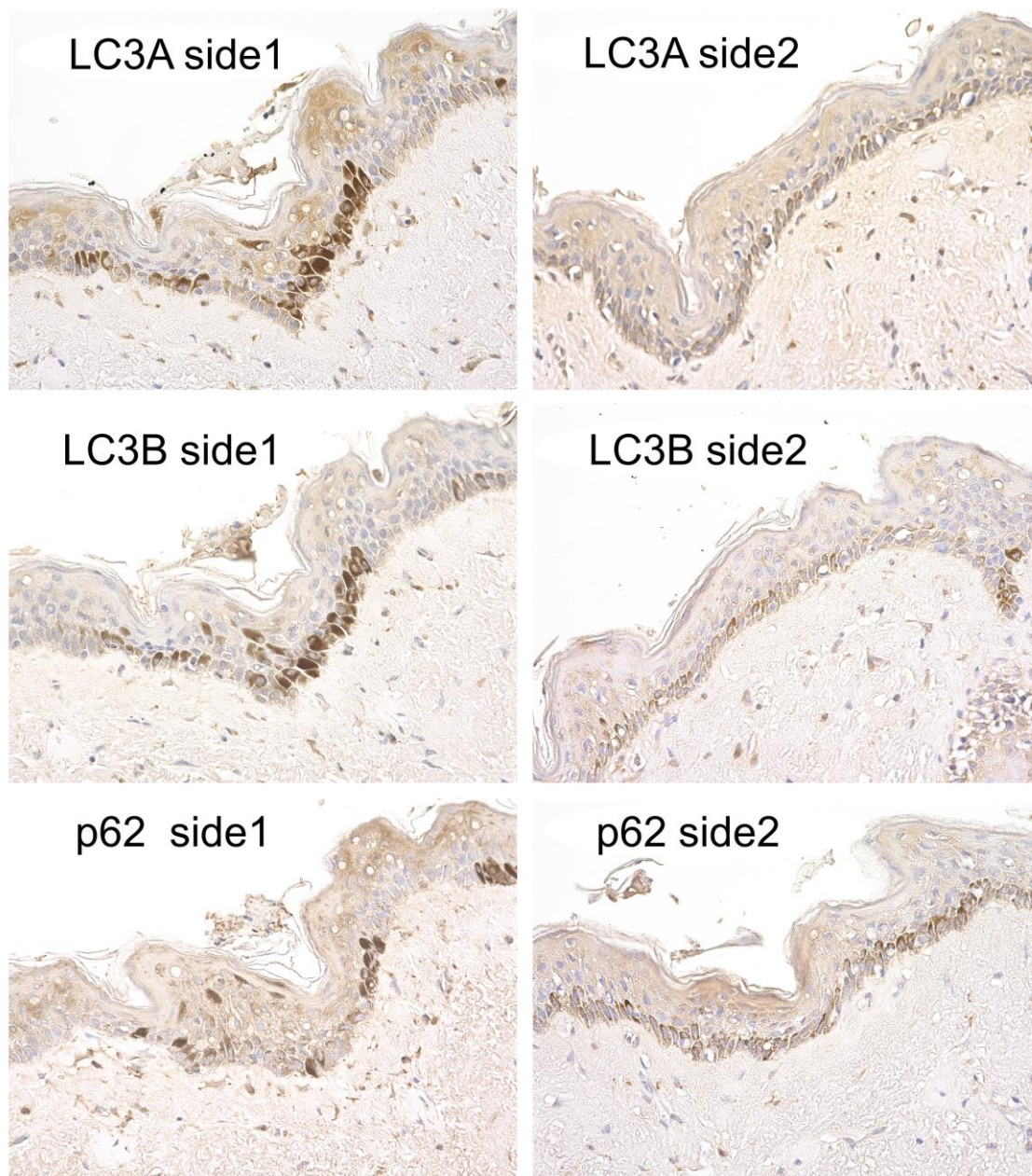
オートファジーと各種がんの発生との関係は、促進と抑制の相反する 2 つの関係性を持ち、その決定的役割は未知のままであるが、口腔がんの再発に関しては、オートファジーの停滞がその発生に関与している可能性がある。オートファジーが停滞するはっきりとした原因は未だ不明であるが、可能性の一つとして、外的刺激の増加に伴う細胞内異常タンパク

質の蓄積が挙げられる。(162, 163) 口腔はその性質上, さまざまな外的刺激を受けやすいことから, オートファジーの停滞は起こりやすい環境であると言える。

以上から, オートファジー関連タンパク質が口腔がん切除マージン付近の正常粘膜で検出された場合, 局所再発に留意するため厳密なフォローアップ観察を行い, 場合によっては追加切除も考慮されるべきと考えられた。

終章図表

図9



同一検体における両側の切除マージンの免疫染色結果を示す.



表 14

表 1 4 p62,LC3A,LC3B間のスピアマン順位相関係数

	順位相関係数
p62 vs LC3A	-0.0313
p62 vs LC3B	0.3724
LC3A vs LC3B	<b>0.4871</b>

\*LC3A と LC3B の発現の間には相関が高い

表 15

**Table 15** multivariate Cox proportional hazard analyses of clinicopathologic variables for recurrence-free survival rate

Variable		Multivariate analysis		
		HR	95% CI	<i>P</i> -value
LC3A expression	Positive vs Negative	7.95	2.18 - 51.34	0.001*
p62 expression	Positive vs Negative	4.57	1.70 - 13.6	0.024*
T grade	III IV vs I II	1.11	0.39 - 2.98	0.842
Preoperative treatment	No vs Yes	2.89	0.95 - 8.54	0.062
Histologic grade	G2/G3 vs G1	3.62	1.22 - 12.7	0.020*

表 16

**Table 16** multivariate Cox proportional hazard analyses of clinicopathologic variables for disease-specific survival rate

Variable		Multivariate analysis		
		HR	95% CI	<i>P</i> -value
LC3A expression	Positive vs Negative	10.41	2.13 - 187.6	0.001*
p62 expression	Positive vs Negative	2.42	0.97 - 6.57	0.059
T grade	III IV vs I II	1.16	0.42 - 3.26	0.776
Preoperative treatment	No vs Yes	3.30	1.20 - 9.58	0.020*
Histologic grade	G2/G3 vs G1	1.60	0.60 - 4.37	0.344

表 17

表 17 Cox比例ハザード分析におけるAIC(赤池情報基準量)値の比較

	p62	LC3A	LC3B	5項目(多変量)
局所再発	151.16694	149.15404	150.13518	143.73296
腫瘍関連死	154.71136	146.87976	148.34386	141.54638

\* 5項目：LC3A, p62, T分類, 術前治療有無, 分化度

## 謝辞

本論文は、著者が筑波大学大学院 人間総合科学研究科の博士課程(疾患制御医学専攻)において行った研究成果をまとめたものです。この間、指導教官である武川教授には、当研究グループのメインの研究テーマとは異なる分野の選択にもかかわらず、試行錯誤の連続の日々を暖かく見守っていただき、論文のとりまとめに至るまで厳しくも温かいご指導・ご鞭撻を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。また、研究成果のとりまとめにあたり、特に統計学的観点から数多くのご指導を賜りました筑波大学医学医療系 臨床試験・臨床疫学研究室 五所 正彦准教授、オートファジー関連、特に p62 タンパク質発現の解釈に関していくつもの重要なポイントをご指摘下さいました筑波大学医学医療系 生命医科学域 藤栄治講師、在学中、公私ともに様々な相談に乗って下さり、論文のとりまとめに際しても繰り返し大変ありがたいご助言を頂きました筑波大学附属病院 歯科口腔外科 内田 文彦病院講師、当科の講師職を離任されるまで私の研究の指針となるべき非常に重要な助言を頂き、また私が重大なトラブルに直面した際にも多くの対策を提案して下さった豊川市民病院 歯科口腔外科 長谷川 正午先生、同じ広島大学の出身で、臨床では 1 学年先輩として多くの場面でご指導を頂き、大学院では同期として数多くの実験を共同で行い、4 年間の大学院生活を共に乗り切った筑波大学附属病院 歯科口腔外科 長井 宏樹先生に深甚の謝意を表します。先生方のご協力なくしては、本論文を完成まで漕ぎ着けることは難しかったと存じます。

最後に、本研究の遂行にあたってご協力を賜りました筑波大学附属病院 歯科口腔外科の諸先生方およびスタッフの皆さん、並びに共同研究グループである形成外科学分野の先生方と分子スポーツ医学研究室の皆さん、そして医師として臨床に出ながら子育てを両立し、著者が休日等に研究に集中し、家族のための時間を取れなかった時期にも自分を犠牲にし、快く送り出してくれた妻と娘に心より感謝したいと思います。本当にありがとうございました。

## 引用文献

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology* 2009; 45, 309-316.
2. Coleman MP, Forman D, Bryant H, Butler J, Rachet B, Maringe C, Nur U, Tracey E, Coory M, Hatcher J, McGahan CE, Turner D, Marrett L, Gjerstorff ML, Johannesen TB, Adolfsson J, Lambe M, Lawrence G, Meechan D, Morris EJ, Middleton R, Steward J, Richards MA. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data. *Lancet (London, England)* 2011; 377, 127-138.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 2016; 66, 7-30.
4. Marugame T, Matsuda T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2001 based on the data from 10 population-based cancer registries. *Japanese journal of clinical oncology* 2007; 37, 884-891.
5. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, Group JCSR. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Japanese journal of clinical oncology* 2014; 44, 388-396.
6. Japan Society for Head and Neck Cancer Registry Committee : Report of head and neck cancer registry of Japan. *Clinical statistics of registered patients, 2002. Jpn J Head and Neck Cancer* 2006; 32, 15-34.
7. 吉野邦俊, Yoshino K. 頭頸部癌の疫学. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 2004; 76, 345-350.
8. Kurokawa H, Tsuru S, Okada M, Nakamura T, Kajiyama M. Evaluation of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma in the oral cavity. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 1993; 22, 35-38.
9. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers—a new diagnostic tool for oral cancer. *Clinical Cancer Research* 2006; 12, 3979-3984.
10. Ogawa YT, Nobuhiko Kimura, Shinji Nishioka, Hirofumi Akagi, Kazunori Nishizaki, Keiko Nishioka, John Rutka, Teruhiro. Comparison of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Oto-Laryngologica* 1999; 119, 72-76.
11. 黒川英雄, 丸岡由佳, 山下善弘, 村田朋之, 徳留慎吾, 石橋浩晃, 梶山稔. 口腔へん平上皮癌における血清 Cyfra21 - 1 の臨床的評価 とくに予後因子との関連性について. *日本口腔外科学会雑誌* 1996; 42, 881-888.
12. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA: a cancer journal for clinicians* 2002; 52, 195-215.
13. Silverman S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: the outcomes,

- the trends, the challenge. *The Journal of the American Dental Association* 2001; 132, 7S-11S.
14. Lee C-H, Wu D-C, Lee J-M, Wu I-C, Goan Y-G, Kao E-L, Huang H-L, Chan T-F, Chou S-H, Chou Y-P. Carcinogenic impact of alcohol intake on squamous cell carcinoma risk of the oesophagus in relation to tobacco smoking. *European journal of cancer* 2007; 43, 1188-1199.
  15. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *British journal of cancer* 2001; 85(11), 1700-1705.
  16. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 1997; 82, 291-295.
  17. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology* 2010; 38, 96-109.
  18. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44, 239-267.
  19. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg Jr EF. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental health perspectives* 1998; 106, 289.
  20. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 2007; 121, 2381-2386.
  21. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet* 1994; 344, 793-795.
  22. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49, 3-8.
  23. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; 25, 29-38.
  24. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40, 405-412.
  25. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. *Hypertension* 2004; 44, 248-252.
  26. Milbury P, Blumberg JB. Dietary antioxidants—human studies overview. *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention (In 2 Volumes)*: World Scientific 2003; 487-502.
  27. Hwang E-S, Kim G-H. ~~RETRACTED~~: Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* 2007; 229, 1-10.
  28. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal* 2007; 401, 1-11.
  29. Da Costa LA, Badawi A, El-Sohemy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2012; 60, 27-36.
  30. 片山善章. 酸化ストレス. *生物試料分析* 2009; 32, 245-246.

31. Agha - Hosseini F, Mirzaii. Dizgah I, Farmanbar N, Abdollahi M. Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012; 41, 736-740.
32. Fan H, Paiboonrungruan C, Zhang X, Prigge JR, Schmidt EE, Sun Z, Chen X. Nrf2 regulates cellular behaviors and Notch signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017; 493.1, 833-839
- 33 山田久陽, 田村隆明. 基礎細胞生物学 2011; 47.9, 838.
34. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic acids research* 1984; 12, 2137-2145.
35. Dizdaroglu M. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* 1985; 24, 4476-4481.
36. Floyd R, Watson J, Harris J, West M, Wong P. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochemical and biophysical research communications* 1986; 137, 841-846.
37. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *nature* 1991; 349, 431-434.
38. Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 1990; 29, 7024-7032.
39. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267, 166-172.
40. Bian Q, Belmont AS. Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization. *Current opinion in cell biology* 2012; 24, 359-366.
41. 山口彦之. 放射線生物学 1995, 1, 210.
42. 松本義久. 放射線の人体影響の生物学的基礎 日本職業・災害医学会会誌 2013; 61, 180-185.
43. Asaithamby A, Chen DJ. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose  $\gamma$ -irradiation. *Nucleic acids research* 2009; 37, 3912-3923.
44. Radiation UNSCotEoA. Sources and effects of ionizing radiation. UNSCEAR 2000 report to the General Assembly, with scientific annexes. Volume II: Effects. 2000.
45. Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100, 12871-12876.
46. 近藤宗平. 人はなぜ放射線に弱いのか人はなぜ放射線に弱いのか 第3版, 1989.



47. Lavin MF, Kozlov S. ATM activation and DNA damage response. *Cell cycle* 2007; 6, 931-942.
48. Lavin M. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 2007; 26, 7749-7758.
49. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO journal* 2003; 22, 5612-5621.
50. Paull T, Rogakou E, Yamazaki V, Kirchgessner C, Gellert M, Bonner W. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 2000; 10, 886-895.
51. 泉雅子. 放射線の人体への影響. *日本物理學會誌* 2013; 68, 141-148.
52. 小松雅明. 選択的オートファジー. *臨床検査* 2009; 53, 1543-1549.
53. 村田茂穂, 田中啓二. ユビキチン・プロテアソーム系による タンパク質の品質管理. *神経研究の進歩* 2004; 48, 17-25.
54. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development* 2007; 21, 2861-2873.
55. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; 9, 1004-1010.
56. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular cancer therapeutics* 2011; 10, 1533-1541.
57. Gunst J, Derese I, Aertgeerts A, Ververs E-J, Wauters A, Van den Berghe G, Vanhorebeek I. Insufficient autophagy contributes to mitochondrial dysfunction, organ failure, and adverse outcome in an animal model of critical illness. *Critical care medicine* 2013; 41, 182-194.
58. Liu C, Xu P, Chen D, Fan X, Xu Y, Li M, Yang X, Wang C. Roles of autophagy-related genes Beclin-1 and LC3 in the development and progression of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Biomedical reports* 2013; 1, 855-860.
59. Wolfe DM, Lee Jh, Kumar A, Lee S, Orenstein SJ, Nixon RA. Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *European Journal of Neuroscience* 2013; 37, 1949-1961.
60. Joung I, Strominger JL, Shin J. Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93, 5991-5995.
61. Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271, 20235-20237.
62. Ishii T, Yanagawa T, Kawane T, Yuki K, Seita J, Yoshida H, Bannai S. Murine peritoneal

macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56 lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications* 1996; 226, 456-460.

63. Puls A, Schmidt S, Grawe F, Stabel S. Interaction of protein kinase C  $\zeta$  with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94, 6191-6196.

64. Shin J. P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. *Archives of pharmacal research* 1998; 21, 629-633.

65. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y-s, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J-i, Ezaki J, Murata S. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 131, 1149-1163.

66. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282, 24131-24145.

67. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y-S, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283, 22847-22857.

68. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140, 313-326.

69. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169, 425-434.

70. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285, 22576-22591.

71. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou Y-S, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology* 2010; 12, 213-223.

72. Lau A, Wang X-J, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Molecular and cellular biology* 2010; 30, 3275-3285.

73. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 2009; 137, 1001-1004.

74. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *American journal of cancer research* 2012; 2.4, 397-413.
75. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends in biochemical sciences* 2012; 37, 230-236.
76. Inui T, Chano T, Takikita-Suzuki M, Nishikawa M, Yamamoto G, Okabe H. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. *PloS one* 2013; 8, e74398.
77. Liu J, Chen F, Lung J, Lo C, Lee F, Lu Y, Hung C. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 2014; 111, 944-954.
78. Halpain S, Dehmelt L. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome biology* 2006; 7, 224.
79. Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylolation. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276, 12839-12848.
80. Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269, 11492-11497.
81. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 2000; 19, 5720-5728.
82. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology* 2000; 151, 263-276.
83. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; 408, 488-492.
84. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282, 37298-37302.
85. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* 2008; 19, 2092-2100.
86. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 2007; 130, 165-178.

87. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science* 2004; 117, 2805-2812.
88. Noda N, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, Ishii J, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells* 2008; 13, 1211-1218.
89. Liu J, Chen F, Lung J, Lo C, Lee F, Lu Y, Hung C. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 2014; 111, 944-954.
90. Tang J-Y, Hsi E, Huang Y-C, Hsu NC-H, Chu P-Y, Chai C-Y. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Human pathology* 2013; 44, 2558-2562.
91. Wu SY, Liu YW, Wang YK, Lin TH, Li YZ, Chen SH, Lee YR. Ionizing radiation induces autophagy in human oral squamous cell carcinoma. *J BUON* 2014; 19, 137-144.
92. He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, Pei Y, Chen Y, Ling W, Wu C. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278, 29278-29287.
93. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57, 1083-1093.
94. Kastan B, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research* 1991; 51, 6304-6311.
95. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358, 15-16.
96. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009; 137, 413-431.
97. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2009; 1, a001883.
98. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & cancer* 2011; 2, 466-474.
99. Brož DK, Attardi LD. In vivo analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models. *Carcinogenesis* 2010; 31, 1311-1318.
100. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253, 49-53.
101. Gronostajski RM, Goldberg A, Pardee A. Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Molecular and cellular biology* 1984; 4, 442-448.
102. Finlay C, Hinds P, Tan T, Eliyahu D, Oren M, Levine A. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an

- altered half-life. *Molecular and cellular biology* 1988; 8, 531-539.
103. Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? *The FASEB Journal* 1992; 6, 3169-3176.
104. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer research* 1998; 58, 4023-4037.
105. 石井菜穂子. ヒト口腔扁平上皮癌における p53 癌抑制遺伝子の発現の解析. *口腔病学会雑誌* 1993; 60, 131-148.
106. Sakai E, Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 1992; 7, 927-933.
107. Gusterson B, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane D, O'hare M, Stamps A, Carter R, Jayatilake H. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 1991; 6, 1785-1789.
108. 富永進. XI 頭頸部がんの標準的治療. *岡山医学会雑誌* 2008; 120, 193-200.
109. 大関悟, 篠原正徳, 又賀泉. 口腔癌治療ガイドライン:舌癌. 2007; 19.3, 139-161.
110. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Head and Neck Cancers Version 1. 2016.
111. 頭頸部癌取り扱い規約 日本頭頸部癌学会編 2012.
112. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Uchiyama Y, Monden M. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *International journal of oncology* 2008; 33, 461-468.
113. Trivedi P, Jena G, Kumar V. Melatonin modulated autophagy and Nrf2 signaling pathways in mice with colitis - associated colon carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis* 2016; 55, 255-267.
114. Hanning JE, Saini HK, Murray MJ, Caffarel MM, van Dongen S, Ward D, Barker EM, Scarpini CG, Groves IJ, Stanley MA. Depletion of HPV16 early genes induces autophagy and senescence in a cervical carcinogenesis model, regardless of viral physical state. *The Journal of pathology* 2013; 231, 354-366.
115. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer science* 2015; 106, 1-8.
116. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* 2010; 17, 1471-1474.
117. Ramos-Vara J, Miller M. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Veterinary pathology* 2014; 51, 42-87.

118. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1981; 29, 577-580.
119. Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL, Mallery SR, Schuller DE, Stoner GD. Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1997; 83, 471-477.
120. Partridge M, Kiguwa S, Emilion G, Pateromichelakis S, A'hern R, Langdon J. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 1999; 35, 45-55.
121. Oliveira-Costa JP, Oliveira LR, Zanetti R, Zanetti JS, da Silveira GG, Buim MEC, Zucoloto S, Ribeiro-Silva A, Soares FA. BRCA1 and  $\gamma$ H2AX as independent prognostic markers in oral squamous cell carcinoma. *Oncoscience* 2014; 1, 383-391
122. Nagini S, Letchoumy PV, Thangavelu A, Ramachandran C. Of humans and hamsters: a comparative evaluation of carcinogen activation, DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas. *Oral oncology* 2009; 45, 31-37.
123. Yang J-S, Lin C-W, Chuang C-Y, Su S-C, Lin S-H, Yang S-F. Carbonic anhydrase IX overexpression regulates the migration and progression in oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biology* 2015; 36, 9517-9524.
124. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275, 16023-16029.
125. Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *Journal of cell science* 2008; 121, 2685-2695.
126. Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. *Autophagy* 2008; 4, 1063-1066.
127. Souquere S, Weil D, Pierron G. Comparative ultrastructure of CRM1-Nucleolar bodies (CNoBs), Intranucleolar bodies (INBs) and hybrid PML/p62 bodies uncovers new facets of nuclear body dynamic and diversity. *Nucleus* 2015; 6, 326-338.
128. Lindsay ME, Holaska JM, Welch K, Paschal BM, Macara IG. Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *The Journal of cell biology* 2001; 153, 1391-1402.
129. Pankiv S, Lamark T, Bruun J-A, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to

- promyelocytic leukemia bodies. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285, 5941-5953.
130. 木村誠. インポーテイン  $\beta$  ファミリータンパク質が媒介する核-細胞質間輸送. *日本生化学会誌* 2015; 87, 7-15.
131. Walker DG, Lue L-F. Understanding the neurobiology of CD200 and the CD200 receptor: a therapeutic target for controlling inflammation in human brains? *Future neurology* 2013; 8, 321-332.
132. Seibenhener ML, Geetha T, Wooten MW. Sequestosome 1/p62—more than just a scaffold. *FEBS letters* 2007; 581, 175-179.
133. Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends in biochemical sciences* 2007; 32, 95-100.
134. Nixon RA. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends in neurosciences* 2006; 29, 528-535.
135. Nixon RA, Yang D-S. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. *Neurobiology of disease* 2011; 43, 38-45.
136. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* 2013; 19, 983-997.
137. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132, 27-42.
138. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *oncogene* 2002; 21, 7435-7451.
139. Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee S-L, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; 97, 527-538.
140. Cruz IB, Meijer CJ, Snijders PJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. p53 immunoexpression in non - malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. *The Journal of pathology* 2000; 191, 132-137.
141. Calenic B, Okamura K, Yaegaki K, Tovar S, Tanaka T, Imai T. Role of p53-mediated apoptotic pathway in oral lichen planus: Relationship among pro-apoptotic, anti-apoptotic, and keratinocytic markers. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 2014; 26, 221-227.
142. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 2008; 30, 2-10.
143. 泉雅子. 放射線の人体への影響. *日本物理學會誌* 2013; 68, 141-148.
144. Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives.

Molecular cell 2010; 40, 179-204.

145. Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *The Journal of pathology* 1998; 184, 360-368.

146. Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP. Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *The Journal of pathology* 1992; 166, 389-394.

147. Kerdpon D, Rich A, Reade P. Expression of p53 in oral mucosal hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 1997; 3, 86-92.

148. Zhang H. Evaluation of four antibodies in detecting p53 protein for predicting clinicopathological and prognostic significance in colorectal adenocarcinoma. *Clinical cancer research* 1999; 5, 4126-4132.

149. Bertorelle R, Esposito G, Belluco C, Bonaldi L, Del Mistro A, Nitti D, Lise M, Chieco-Bianchi L. p53 gene alterations and protein accumulation in colorectal cancer. *Clinical molecular pathology* 1996; 49, M85.

150. Xu, L., Chen, Y. T., Huvos, A. G., Zlotolow, I. M., Rettig, W. J., Old, L. J., & Garin-Chesa, P. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinomas of head and neck without apparent gene mutations. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*, 1994; 3, 83-92.

151. Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *The FEBS Journal* 1986; 159, 529-534.

152. 森泰昌. 早期口腔癌の病理組織像とその捉え方 (総説). *日本口腔腫瘍学会誌* 2013; 25, 42-53.

153. 坪井清孝. 食道扁平上皮癌早期病変の p53 遺伝子変異に関する研究. *新潟医学会雑誌* 2010; 124, 627-637.

154. 野村武史, 柴原孝彦. 口腔扁平上皮癌周囲に広がる上皮性異形成に対する切除範囲の決定法. *歯科学報* 2014; 114.6 586-593.

155. Niklaus M, Adams O, Berezowska S, Zlobec I, Graber F, Slotta-Huspenina J, Nitsche U, Rosenberg R, Tschan MP, Langer R. Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget* 2017; 8, 54604-54615.

156. Xu X, Wang Y, Guo W, Zhou Y, Lv C, Chen X, Liu K. The significance of the alteration of 8-OHdG in serous ovarian carcinoma. *Journal of ovarian research* 2013; 6, 74.

157. Tsai Y-Y, Cheng Y-W, Lee H, Tsai F-J, Tseng S-H, Lin C-L, Chang K-C. Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis* 2005; 11, 71-75.



158. Skliris GP, Nugent ZJ, Rowan BG, Penner CR, Watson PH, Murphy LC. A phosphorylation code for oestrogen receptor- $\alpha$  predicts clinical outcome to endocrine therapy in breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2010; 17, 589-597.
159. Skliris G, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson P, Murphy L. Expression of oestrogen receptor- $\beta$  in oestrogen receptor- $\alpha$  negative human breast tumours. *British journal of cancer* 2006; 95, 616-626.
160. Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, Sakuramoto S, Katai H, Sano T, Imamura H. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer* 2015; 18, 538-548.
161. Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *Selected Papers of Hirotugu Akaike*: Springer, 1998, p. 199-213.
162. Schneider JL, Cuervo AM. Autophagy and human disease: emerging themes. *Current opinion in genetics & development* 2014; 26, 16-23.
163. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer* 2007; 7, 961-967.

## 参 考 论 文