

筑波大学

博士（医学）学位論文

口腔白板症における p62 発現  
と臨床病理的因子の解析

2 0 1 9

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

吉田 敏男

## 目次

### 1. 緒言

1-1 白板症について

1-2 白板症のバイオマーカー

1-3 p62 の歴史

1-4 p62 とがんについて

1-5 p62 とオートファジー、酸化ストレスについて

1-6 オートファジー

1-7 8-OHdG について

1-8 Ki67、p53 について

1-9 これまでの研究成果と本研究の目的

### 2. 対象と方法

2-1 対象

2-2 方法

2-2-1 評価項目の決定

2-2-2 免疫染色方法

2-3 評価

2-3-1 判定方法

## 2-3-2 カットオフ値の決定

## 2-4 統計学的解析

# 3. 結果

## 3-1 各判定結果

## 3-2 各マーカーの陽性細胞占有率分布

## 3-3 臨床項目と上皮異型の関係

## 3-4 各マーカーと上皮異型の関連性(単変量解析)

## 3-5 各マーカーと上皮異型の関連性(多変量解析)

## 3-6 p62 各マーカーと 8-OHdG、Ki67、p53 の関連性

# 4. 考察

## 4-1 白板症の原因因子について

## 4-2 酸化ストレス経路、オートファジーの障害と p62

## 4-3 白板症のがん化と種々のバイオマーカー

## 4-4 がん化と p62、腫瘍マーカーとしての可能性

## 4-5 p62 と p53 について

## 4-6 まとめ

# 5. 結論

図表

謝辭

引用文献

出典

## 1. 緒言

### 1-1 口腔白板症について

口腔白板症は、口腔粘膜に生じた摩擦によって除去出来ない白色の板状あるいは斑状の角化性病変で、頬粘膜や舌、歯肉にみられる（図1）。とくに舌に生じたものは悪性化する頻度が高く<sup>1</sup>、それゆえ、前がん病変の代表的なものといわれており、悪性化する可能性のある病変に分類されている<sup>2</sup>。肉眼的には、白板の性状は色調、形、表面、広がり方など多様で、単発性、多発性に分類される<sup>3</sup>。原因は明らかにされてなく、誘因としては局所に継続する物理的、化学的刺激（喫煙、飲酒、刺激性食品、不適合金属冠や不適合義歯など不良補綴物の刺激など）があげられている<sup>4</sup>。40歳以上の男性に多くみられるが、悪性化をきたす性差は女性のほうが高い<sup>3</sup>。治療法には、刺激となっている原因（不適合補綴物など）の除去、ビタミンAの投与などがあり、その反応を観察する。組織学的には上皮異型の存在が口腔白板症の悪性化（がん化）のリスク因子の1つとされている<sup>1</sup>。がん化率は、症例数や経過観察期間によって幅があり、最小のSkach(1960)の1.4%(71例、観察期間3-6年)<sup>5</sup>から、Jack Lee (2000)の31.4%(70例、観察期間10年)<sup>6</sup>にまでわたるが、一般的には4.4%~17.5%とされている<sup>7,8</sup>。さらに、将来、どの病変が悪性化する可能性をもつのか予測するためにいくつかの分子的

バイオマーカーを特定する試みがなされてきている<sup>9,10</sup>。近年、心血管疾患における抗凝固薬の広範な使用を考慮すると、外科的治療はリスクが高くなってきており悪性を事前に予測する手段・方法の開発は重要になってきている<sup>11</sup>。

## 1-2 白板症のバイオマーカー

Nagao らは、口腔白板症の化学予防療法に対するバイオマーカーとして、p53 と Ki67 の発現を研究し、口腔白板症への補助療法への臨床的反応と p53 の発現が逆相関していることを報告した<sup>12</sup>。de Vicente らの研究では、podoplanin の発現と上皮異型のグレードが相関することが示されており、口腔白板症の組織学的評価と悪性変異のリスク評価のための有効なバイオマーカーとなる可能性があるとされている<sup>13</sup>。Schaaij-Visser らによる報告では、cornulin、keratin 4 と keratin 13 の非発現は口腔白板症と有意な関連性は認められないが、これらのタンパク質の発現の減少は過角化症の存在と有意な関連性を認めている。それゆえ、上皮異型のグレードのみが白板症の悪性への進行と相関していると報告している<sup>14</sup>。Al-dhohrah らは、口腔白板症と口腔粘膜下線維症における Dickkopf homolog 3(DKK3)の発現状態を研究し、DKK3 の非発現状態と口腔粘膜線維症の間には有意的な関係を

認めたと、口腔白板症の上皮異型の程度と DKK3 の発現の間には、有意差がないことを報告している<sup>15</sup>。Balwant らは、口腔白板症や口腔粘膜下線維症、扁平苔癬のような前癌病変について、唾液や血清中の MDA(malonaldehyde) や 8-OHdG(hydroxy(-2'-)-deoxyguanosine or 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)、ビタミン C、ビタミン E などの酸化マーカーと curcumin の摂取との関係を調べ、curcumin を摂取すると唾液や血清中の MDA や 8-OHdG レベルは低下するが、ビタミン C とビタミン E は増加することを報告している<sup>16</sup>。さらに Zamora らは、慢性歯周炎および進行性歯周炎では唾液中の 8-OHdG が増加し、歯周病患者の酸化ストレスと細胞小核との間に正の相関があることを報告している<sup>17</sup>。これらの研究は、酸化ストレスと口腔白板症との間に何らかの関係性があることを示唆している。遺伝子発現に関する研究においては、Ferlazzo らが、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ (MTHFR) 多型による DNA メチル化への影響が、悪性形質転換に重要な役割を演じていることを報告している<sup>18</sup>。また、Chaves らは、CD8<sup>+</sup>細胞のレベルが後に悪性化した口腔前がん病変で増加したと報告している<sup>19</sup>。

### 1 - 3 p62 の歴史



p62 は、オートファジー関連因子として注目される多機能タンパク質で、A170/Sequestosome/ZIP などとして、1996 年頃より様々な経緯でクローニングされてきた。当研究室では、Nrf2-Keap1 系を介して発現する酸化ストレスタンパク質の研究中に、マウスマクロファージにおいて A170 という名称のタンパク質が判明し、その遺伝子配列を決定した<sup>20-22</sup>。同研究中には Peroxiredoxin 1 (MSP23) をクローニングし、その機能解析も行っている<sup>21,22</sup>。同時期の 1996 年には、Joung らのグループが Hela 細胞の SH2 ドメインにリン酸化に関係なく結合するタンパク質 p62 として<sup>23</sup>、さらに 1997 年には、Puls らがラットの研究から ZIP としてクローニングした<sup>24</sup>。ヒトでは Sequestosome1<sup>25</sup>、ラットでは ZIP と呼ばれるが、近年のオートファジーの研究が盛んになってきたころから、これらは一括して p62 と総称されるようになってきた。オートファジーは通常は非特異的に細胞質を分解するが、Komatsu らによって、タンパク質の分解を行うユビキチン-プロテアソーム系と同様、選択的に分解する「選択的オートファジー」の際に p62 がアダプタータンパク質として機能する事が発見され注目を浴びている<sup>26</sup>。

#### 1-4 p62 とがんについて

p62 とユビキチンは、肝、肺、前立腺、卵巣そのほかいくつかの胃小腸悪

性腫瘍を含むさまざまな悪性病変の予後と生存率に関連性を持つ微小制御性タンパク質である<sup>27-32</sup>。p62は酸化ストレスその他によるストレス誘導性の細胞内タンパク質であり、細胞内のユビキチン化した異物や misfolding proteinなどをLC3を介してオートファゴゾームに運ぶ作用を持つ。そのため、オートファジーが阻害された組織においてp62は顕著に細胞内に蓄積する<sup>26</sup>。近年、p62の蓄積を介したシグナル制御により、がんの形成や増殖が促進することが報告されている。さらに口腔がんにおいてもp62タンパク質が細胞内に異常蓄積しており、治療抵抗性を惹起し、予後を悪化させていることが明らかになっている<sup>33</sup>。上皮異型の低レベルまたは上皮異型を認めないものより、口腔がんにおいてP62の発現が見られることはより明らかである。P62の発現はさまざまな酸化ストレスの抵抗性を介して、癌化する未分化上皮異型を引き起こすことがあり得る<sup>33</sup>。組織学的には上皮異型の存在が口腔白板症の悪性化（がん化）のリスク因子の1つとされている。

#### 1-5 p62とオートファジー、酸化ストレスについて

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張し、オートファゴゾームが成立し、オ

オートファジーが進行する<sup>34</sup>。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、異常タンパク質を選択的に分解する機能を持つ<sup>26,34</sup>。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、なん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、凝集する<sup>35</sup>。p62 は核-細胞質間シャトルタンパク質でもあり、他のタンパク質と複合体として核膜孔複合体を通過する<sup>36</sup>。正常な口腔粘膜や前がん病変では、p62 核内発現と p62 細胞質発現は相関するが、口腔扁平上皮癌では、細胞質内に p62 が蓄積しても核内の発現が上昇せず、核膜輸送システムの変化が、がんの発生と関連する可能性が報告されている<sup>37</sup>。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<sup>38</sup>。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、抗酸化タンパク質が誘導されることが判明している<sup>39,40</sup>。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多数存在する<sup>28-31</sup>。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臨床指標、特に予後と大きく関連すると考えられる局所再発や遠隔転移との関連性についてはまだ不明な点が多い<sup>33,37</sup>。(図2、図3)

#### 1-6 オートファジー

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<sup>41</sup>。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(オートファゴゾーム)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ゾ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て巧妙かつ複雑な細胞内分解機構と捉えられている<sup>42,43</sup>。この系は主に栄養飢餓状態で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て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わかった<sup>44,45</sup>。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し、相反する2つの効果を持つとされる<sup>46</sup>。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<sup>47-49</sup>。(図2、図3)

#### 1-7 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4種類が存在し、特にDNA塩基と呼ばれる<sup>50</sup>。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修復塩基と呼ばれている。その中で比較的良好に研究され、DNA酸化損傷マーカーと知られているのが、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<sup>51</sup>。その後、DNAに対する放射線照射で産生されることや<sup>52</sup>、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<sup>53</sup>。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→TA のトランスマ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<sup>54-56</sup>。このことはがんなどの疾患の発症、進展、再発<sup>57</sup>や神経変成疾患の主要原因<sup>58</sup>として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。(図 4)

#### 1 - 8 Ki67、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、様々な機能をもつ p53 標的遺伝子を転写誘導する働きを持つ<sup>59-61</sup>。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係わっているとされる<sup>62-65</sup>。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<sup>66</sup>、変異型 p53 タンパク質は分解時間が4 – 8時間と著しく遅延し、細胞内に蓄積することがわかっている<sup>67</sup>。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出来る<sup>68,69</sup>。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報告されており、p53 遺伝子の変異がその発生に關与している可能性が指摘されている<sup>70-74</sup>。

Ki67 は白血病患者の血液中の自己抗体として発見された抗体の名称で<sup>75</sup>、この抗体が認識する Ki67 抗原(gene:10q26.2 ; MKI67)<sup>76</sup> は、増殖性細胞の核小体および核分裂期の G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>および M 期の染色体上に現れる機能不明の分子である<sup>77</sup>。増殖を休止している G<sub>0</sub> 期においては発現しないため、細胞増殖能を示す細胞増殖関連抗原として<sup>77</sup>、細胞増殖ならびに細胞周期のマーカーとして用いられている。MIB-1 は Ki-67 抗体のクローン名のひとつで、Key ら(1991)によって開発されたモノクローナル抗体で、熱処理を加えることにより、ホルマリン固定標本でも反応するものである<sup>78</sup>。2011 年、Ki-67 に関する Breast Cancer Working Group は、一次抗体として MIB-1、評価方法としてラベリングインデックスを用いることを推奨している。評価

する細胞数は 1000 個とされ、細胞陽性率(MIB-1 Index)で評価される<sup>79</sup>。  
Ki67 LI の高低を判断するカットオフ値については、2011 年に Cheang らは  
14%を提示したが<sup>80</sup>、その他の多くの研究では、カットオフ値は 1~50%の  
範囲に設定され、その中の多くは 10%~20%の範囲である。その評価方法は  
標準化されておらず、研究によりさまざまで、現時点では設定が困難とされ  
ている。Ki-67 は乳癌、胃癌、大腸癌、子宮癌など多くの腫瘍において、分  
化度、血管侵襲およびリンパ節転移といった腫瘍の悪性度や予後とよく相関  
することが知られており<sup>79-83</sup>、口腔がんにおいても同様の報告がされており  
<sup>73,84-87</sup>、細胞増殖マーカーとして有用である。

## 1-9 これまでの研究成果と本研究の目的

これまでの研究で、口腔がんにおけるサージカルマージン付近の正常粘膜  
におけるオートファジー関連タンパク質の LC3A、LC3B、p62 の発現を調  
査し、LC3A、LC3B の発現と腫瘍の局所再発および予後不良は関連性があ  
ること、p62 の発現は腫瘍の再発と関連性があることを明らかになっている  
<sup>88</sup>。今回、発がんの観点から口腔がんの前がん病変である口腔白板症に着目  
し解析を行った。

本研究の目的は口腔白板症組織における上皮異型と種々の臨床項目およ



び p62、8-OHdG、Ki67、p53 の発現状態の関連を評価し、上皮異型の存在と p62 の細胞内発現の意義を検討することである。

## 2. 対象と方法

### 2-1 対象

1991～2015年に愛知学院大学歯学部附属病院、愛知済生会病院、市立四日市病院、岡崎市民病院を受診した口腔白板症の臨床所見を示す患者のうち、研究に同意が得られた169名を抽出し、病理診断が口腔白板症と確定した患者50例のホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した。年間初診数は愛知学院大学歯学部附属病院が約3000、愛知済生会病院が約1000、市立四日市病院が約6000、岡崎市民病院が約4000であり、愛知済生会病院は現在閉鎖されている。また、169名の内訳は、愛知学院大学歯学部附属病院が68名（過角化症37、白板症9、その他）、愛知済生会病院が28名（過角化症2、白板症21、その他）、市立四日市病院が47名（過角化症16、白板症1、扁平苔癬1、Verrucous hyperplasia 1、その他）、岡崎市民病院が26名（過角化症2、白板症23、その他）であった。臨床的に口腔白板症を疑われた患者169名のうち、病理診断の確定した内容は、口腔白板症54例（4例はスライド紛失）、過角化症57例、扁平苔癬1例、Verrucous hyperplasia 1例、その他であった。医療記録から分類項目として、年齢、性別、部位、発生様式、飲酒歴、喫煙歴の各臨床記録と上皮異型の有無を収集し、本研究に使用した。各内訳は表1に示してある。

また、この研究は、愛知学院歯科病院倫理委員会の承認を得ている。

患者構成は、28歳から95歳の年齢からなり、男性24名、女性26名で、年齢の中央値は68歳であった。口腔白板症検体は、18例が舌から採取され、32例はそのほかの部位であった。50人の患者のうち、24名（48%）が喫煙者（不明2例）で、18名（36%）がアルコール常習者（不明1例）であった。上皮異型を有するものは18例（36%）で、単発性の発生様式が43例（86%）で多発性発生様式が7例（14%）であった。期間中のF/Uは8名（16%）、missed F/Uは42名（84%）、がん化は2名（4%）であった。（Table1）

## 2-2 方法

### 2-2-1 評価項目の決定

白板症組織における p62 核染色、p62 凝集、p62 細胞質染色の発現状態を調べる。比較指標として、DNA 酸化的損傷マーカーとして 8-OHdG、細胞増殖能因子として Ki67、がん抑制遺伝子の p53 の発現状態を比較検討し、白板症における細胞内の変化をオートファジーから酸化ストレス系、遺伝子変化、細胞分裂周期にわたり複合的に検証する。そのため、がん化のリスク因子である上皮異型の有無と各マーカー、上

皮異型の有無と年齢、性別、部位、発生様式、飲酒歴、喫煙歴の各臨床項目を統計学的に検証した。上皮異型の診断は、口腔病理専門医が行い、基準は WHO2005 Head and neck tumours の分類に従った<sup>89)</sup>。

## 2-2-2 免疫染色方法

### (1) p62

ABC 法にて、以下のごとく染色を行った。各組織スライドをキシレンに 12 時間浸漬後、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。その後、pH6.0 に調整した 10mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液に浸漬し、95°Cで 5 分間処理し抗原賦活化を行った。組織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後、十分に phosphate-buffered saline にて洗浄後、スライドに一次抗体(1:100, SQSTM1, ab56416, Abcam, Cambridge, UK) を乗せ、浸潤条件下に 4°Cで 6~12 時間処理して一次染色を行った。一次抗体の希釈には Single Enhancer HIKARI for Immunostain (発色増強剤) を使用した。再び phosphate-buffered saline で洗浄後、切片を二次抗体(馬血清抗体)で 30 分処理した。希釈には Single Enhancer HIKARI for Immunostain (発色増強剤) を使用した。発色を増強さ

せるため、アビジン-ビオチン標識酵素複合体処理（ABC法）を30分行った。3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride(DAB; Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan)を用いて15~40秒処理して発色させ、さらにヘマトキシリン溶液に20秒から1分間浸漬し、核を対比染色した。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い、疎水性封入材にて封入した。

## (2) 8-OHdG

条件設定については以下の如く染色(ABC法)を行った。

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い、その後、pH6.0に調整した10mmol/Lクエン酸ナトリウム緩衝液に浸漬し、90℃で20分間処理し抗原賦活化を行った。また、8-OHdGは核に特異的に染色性を持つため、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックする0.3%過酸化水素含有メタノール溶液処理は行わなかった。十分に洗浄後、スライドに一次抗体(1/200抗8-OHdGモノクローナル抗体(cloneN45.1)日研ザイル)を乗せ一次染色を行った。一次抗体の希釈にはSingle Enhancer HIKARI for Immunostain（発色増強剤）を

使用した。湿潤条件下に保ち、4°Cで6~12時間処理した。再び、十分に洗浄後、切片を二次抗体(馬血清抗体)で30分間処理した。希釈にはSingle Enhancer HIKARI for Immunostain (発色増強剤)を使用した。発色増強剤としてアビジン-ビオチン標識酵素複合体処理(ABC法)を30分行った。3.3´-

diaminobenzidinetetrahydrochloride(DAB;Cell Signaling Technology Japan,Tokyo, Japan)を用いて15~40秒処理し発色させ、さらにヘマトキシリン溶液に20秒から1分間浸漬し、核を対比染色した。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い、疎水性封入材にて封入した。

条件設定後は自動染色装置(ヒストステイナー48A ニチレイバイオサイエンス)を使用し、酵素標識ポリマー法にて自動染色を行った。

### (3) Ki67

組織検査用細胞性免疫染色キット(Dako EnVision FLEX)を用いて、自動染色装置(Dako Autostainer Link; Dako, Glostrup, Denmark)を使用し、酵素標識ポリマー法にて染色した。一次抗体にDako monoclonal mouse Clone MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark、二次抗体にポリマー(EnVision Flex/HRP)を使用した。抗原賦活化処理は高温で

10 分行った。

#### (4) p53

組織検査用細胞性免疫染色キット（Dako EnVision FLEX）を用いて、自動染色装置(Dako Autostainer Link; Dako, Glostrup, Denmark)を使用し、酵素標識ポリマー法にて染色した。一次抗体に Dako monoclonal mouse Clone DO-7, Dako, Glostrup, Denmark、二次抗体にポリマー(EnVision Flex/HRP)を使用した。抗原賦活処理は高温で 5 分行った。

## 2 - 3 評価

### 2 - 3 - 1 判定方法

すべての標本はキーエンス社 BZ-700 オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察した（図 5、図 6）。観察条件は明視野下とし、拡大率 100 倍で観察範囲を設定し、次に拡大率 200 倍と 400 倍にて個々の細胞を観察した。観察範囲内の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。各サンプル内の各マーカーがそれぞれ 1%陽性、10%陽性、20%陽性、30%陽性、50%陽性の水準で 3 名の口腔外科医が判読した。各水準の各サンプルの陽性・陰性の

判定結果で2名以上の口腔外科医の判定が同じとなる結果を採用した。200倍画像、400倍画像にて、各マーカーの陽性細胞占有率を計算し、階級値、ヒストグラム、箱ひげ図、ROC曲線を作成した。その結果を参考にして、各サンプルの判定結果から1%、10%、20%、30%、50%の陽性のうち、どの水準の判定結果を採用するか決めた。以上のような過程で、各マーカーのカットオフ値を決め、その水準の判定結果を統計学的解析に使用した。

#### 2-3-2 カットオフ値の決定

陽性/陰性の判定基準は参考研究と<sup>37,79,80,88,90,91</sup>、各標本の陽性細胞占有率、箱ひげ図における25th-75th percentile値、ROC曲線、ヒストグラムをもとに決めた。p62核染色は20%、p62細胞質染色は20%、8-OHdGは50%、Ki67は10%、p53は1%をカットオフ値とした。p62凝集については、各細胞質にdotをひとつ以上認めた細胞を陽性細胞と判定し、その陽性細胞占有率が1%以上の標本を陽性と判定した(図7、8、9、10、11、12)。

#### 2-4 統計学的解析

解析ソフト: JMP13 for Win (SAS Institute Japan, Tokyo,



Japan ) を用い、以下に示す①から④の解析を行った。

① 口腔白板症の上皮異型の存在と臨床項目（年齢、性別、部位、発生様式、飲酒歴、喫煙歴）の関連性について評価するために単変量および多変量名義ロジスティック回帰分析を行った（Table2）。

② 上皮異型と p62 核染色、p62 凝集、p62 細胞質染色、8-OHdG、Ki67、p53 の細胞内発現の関連性について単変量名義ロジスティック回帰分析を行った（Table3）。

③ 交絡因子の影響を除去するため、上皮異型と臨床項目（年齢、性別、部位、発生様式、飲酒歴、喫煙歴）及び各マーカー（p62 核染色、p62 凝集、p62 細胞質染色、8-OHdG、Ki67、p53）の多変量名義ロジスティック回帰分析を行い、そこから各マーカーの数値を選別し、表に示した（Table 4）。

④ また、p62 核染色、p62 凝集、p62 細胞質染色と 8-OHdG、Ki67、p53 のそれぞれの関連性を調べるために単変量名義ロジスティック回帰分析を行った（Table 5）。

### 3. 結果

#### 3-1 各判定結果

50 例中、p62 核染色が陽性は 21 例、p62 凝集を認めたものは 14 例、p62 細胞質染色を認めたものは 29 例、上皮異型は 18 例、8-OHdG 陽性は 32 例、Ki67 陽性は 10 例、p53 陽性は 29 例であった。

上皮異型陽性数は、64 歳以下が 20 例中 9 例(45%)、65 歳以上 30 例中 9 例(30%)、男性が 24 例中 12 例(50%)、女性が 26 例中 6 例(23%)であった。舌に発症した口腔白板症では、18 例中 11 例(61%)で上皮異型を認め、他の部位に発生した口腔白板症では、32 例中 7 例(22%)が上皮異型陽性であった。発生形態では、単発の発生様式で 43 例中 14 例(32%)で上皮異型が見られ、多発性の発生では 7 例中 4 例(57%)に上皮異型が陽性であった。飲酒習慣に関しては、アルコール常用者では 18 例中 9 例(50%)に上皮異型があり、非アルコール飲酒者では 32 例中 9 例(27%)に上皮異型が認められた。喫煙者では 24 例中 11 例(46%)に上皮異型が認められ、非喫煙者では 26 例中 7 例(27%)に上皮異型が陽性であった。上皮異型に関して、他の臨床項目との関連性に有意差がないことを確認した。

上皮異型と各マーカーでは、p62 核染色陰性では 29 例中 7 例(24%)、

p62 核染色陽性では 21 例中 11 例(52%)が、上皮異型陽性であった。

p62 凝集陰性では 36 例中 10 例(28%)、p62 凝集陽性では 14 例中 8 例(57%)が上皮異型陽性であった。p62 細胞質染色陰性では 21 例中 7 例(33%)、p62 細胞質染色陽性では 29 例中 11 例(38%)が上皮異型陽性だった。8-OHdG 陰性では 18 例中 4 例(22%)、8-OHdG 陽性では 32 例中 14 例(44%)が上皮異型陽性だった。Ki67 陰性では 40 例中 14 例(35%)、Ki67 陽性では 10 例中 4 例(40%)で上皮異型陽性であった。

p53 陰性では 21 例中 9 例(29%)、p53 陽性では 29 例中 12 例(41%)が上皮異型陽性であった。

### 3 - 2 各マーカーの陽性細胞占有率分布

p62 核染色は、一部で高発現と考えられる群を認めた。p62 凝集は、低発現で、p62 細胞質染色は低発現群と高発現群とに分かれた。8-OHdG は、幅広く酸化ストレスがかかっていることを示しており、Ki67、p53 は低発現であった。25-75%値では、p62 核染色は 2%～23%、p62 凝集は 0%～1.7%、p62 細胞質染色は 15%～87%、8OHdG は 30%～76%、Ki67 は 0.8%～7%、p53 は 0.5%～11%となった。中央値は p62 核染色で 14%、p62 凝集は 0.5%、p62 細胞質染色

は 26%、8OHdG は 51%、Ki67 は 2.3%、p53 は 2.8%であった。

(図 9、図 10)

### 3-3 臨床項目と上皮異型の関係 (単変量および多変量解析)

上皮異型の存在と各臨床項目の解析では、単変量名義ロジスティック回帰分析では上皮異型と舌の発生部位の関連性のみ有意差 ( $P=0.046$ ) を認めたが、交絡因子を除去した多変量名義ロジスティック回帰分析では、上皮異型といずれの臨床項目にも有意差を認めなかった (Table 2)。

### 3-4 各マーカーと上皮異型の関連性 (単変量解析)

上皮異型と各マーカーの解析では、単変量名義ロジスティック回帰分析では上皮異型と p62 核染色の関連性に有意差 ( $P=0.044$ ) を認めた (Table 3)。

### 3-5 各マーカーと上皮異型の関連性 (多変量解析)

交絡因子を除去した多変量名義ロジスティック回帰分析では、上皮異型と p62 核染色 ( $P=0.024$ )、上皮異型と p62 凝集 ( $P=0.048$ ) の関連性

にそれぞれに有意差を認めた (Table4)。

### 3 - 6 p62 各マーカーと 8-OHdG、Ki67、p53 の関連性

p62 核染色と p53 の関連性に単変量名義ロジスティック回帰分析

で有意差(P=0.031)を認めた (Table5)。

#### 4. 考察

今回、我々は口腔白板症において p62 の細胞内発現状態と上皮異型の存在、その他の臨床項目の関連について研究を行った。多変量解析で p62 核染色と上皮異型、p62 凝集と上皮異型との関連性に有意差を認めた。

##### 4-1 白板症の原因因子について

口腔白板症は口腔粘膜の白変病変で扁平上皮癌の代表的な前がん病変であり、病理学的および疫学的な調査は多くの文献で説明されている<sup>9</sup>。口腔粘膜上皮は常に喫煙、飲酒、歯周疾患他の炎症、食塩摂取、刺激的嗜好食品、他の環境的ストレスや生活スタイルからのさまざまなストレスに晒されている<sup>4,92</sup>。口腔白板症の原因にも喫煙、過度の飲酒、キンマ咀嚼、真菌やウイルスの慢性感染症などが知られている（アジア地域）<sup>92</sup>。また、歯周病に関しても、口腔白板症および他の粘膜病変の発生リスクを増大させ、口腔がんの素因となり得る可能性が報告されている<sup>93</sup>。

日本の被験者では、歯科補綴物や修復物と口腔白板症との関連性も報告されている<sup>4</sup>。これらのストレスは、大量の活性酸素種(ROS)を発生させ、明らかに前がん病変を進行させる要因となり、細胞内に容易に蓄積されうる。また、口腔白板症の種々の臨床像において、酸化抗酸化状

態を変化させることが考えられる<sup>94</sup>。

#### 4-2 酸化ストレス経路、オートファジーの障害と p62

酸化ストレスやその他のストレスが口腔粘膜に蓄積すると、細胞内のホメオスタシスが修飾され、オートファジーが障害される可能性がある。Kiffin Rらは、弱い酸化ストレスは正常なオートファジーを促進し、障害を受けた細胞小器官の除去に貢献するが、強い酸化ストレスまたは持続的な酸化ストレスは、逆に細胞内の活性酸素種を誘導しリソゾーム膜を障害し、オートファゴゾームの形成を妨害すると報告している<sup>95</sup>。もし、オートファジーが障害されたり、酸化ストレスのダメージがオートファジーの処理能力を超えてしまう場合、障害で変性した細胞内成分(p62を含む)が蓄積してくる。口腔白板症の病変部位でも結果として、細胞の防御反応の一部として、酸化ストレス障害に対して、同様の反応が起こっている可能性がある<sup>95</sup>。我々は、酸化ストレスとオートファジーの関連について、別の仮説も考えた。通常の状態化では、Nrf2-Keap1経路は酸化ストレスに対する細胞の防御メカニズムの重要な制御機構として働く<sup>38,40</sup>。標準的なNrf2-Keap1のシグナル経路では、Nrf2はKeap1と結合して細胞内にあり、転写因子として核内移行する前にユ

ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。ここに酸化ストレスや親電子物質のストレスが加わると、Nrf2 と keap1 の結合はずれ、Nrf2 はユビキチン化されずユビキチン-プロテアソーム系で分解されないため安定化して細胞内に蓄積して核内移行を始める。核内では、転写因子としてプロモーター領域の ARE(Antioxidant response element:抗酸化応答配列)配列と結合し、転写活性をあげ、下流の抗酸化たんぱく質や酸化ストレスたんぱく質 (Peroxi-redoxin 1、p62 も含まれる<sup>40</sup>。) を産生して、すぐにストレスに対応する<sup>96</sup>。ここでは、常に生成と分解を繰り返しており、何かの刺激が来た時点で分解を止めるため、急速に転写因子が増大するという形式のため、細胞の環境の変化に即応できるようになっている。生体内で急な対応が必要なストレス応答の場合、細胞に刺激が来てから転写活性を上げてたんぱく質を合成し始めるという反応では対応ができないためである。

一方、酸化ストレスをはじめ様々なストレスによる細胞内の異常たんぱく質凝集体や異常ミトコンドリア、また細胞内進入細菌が集積してくると p62 はリン酸化を受け、keap1 との結合が著しく増強され、Nrf2 の核内移行が増え転写活性が上昇することが 2010 年に komatsuらにより報告された<sup>39</sup>。p62 は Keap1 の Nrf2 の結合サイトと結合し、



p62 が Keap1 をオートファゴゾーム中に取り込んで隔離するため、Keap1 が Nrf2 を抑制しなくなり、その結果、Nrf2 を安定化し、安定化した Nrf2 が核内に移行し、p62 を含む抗酸化剤応答配列 (ARE:Antioxidant response element) の転写活性化を誘導する<sup>39,40</sup>。このように p62 の過剰発現は Nrf2 と Keap1 の反応と競合する。これは非標準的な Nrf2 の活性化経路であり、Nrf2 系の過剰な活性化は、p62 の過剰発現を引き起こし、生体防御というより、むしろ疾患の原因となっている可能性がある<sup>38,39</sup>。p62 が増加することによりポジティブフィードバックがかかって、さらに Nrf2 系を活性化し、病的惹起を引き起こすことが考えられる<sup>97</sup>。非標準的な経路では、keap1 を p62 が凝集するため、標準的な経路と違い機能の修復には時間がかかる。このようにオートファジーと Keap1-Nrf2 経路に関しても p62 がクロストークとして連動していることが解ってきている<sup>22</sup>。そして、この Nrf2 の非定型的なメカニズムは、急激な、または、持続的な酸化ストレス下にある口腔白板症において p62 の過剰発現と p62 の凝集の存在を説明しうる可能性がある。口腔がんでも、p62 との関連が報告されており、p62 の過剰発現や予後や浸潤能の関連が指摘されている<sup>33,37</sup>。

我々の研究では、8-OHdG の染色状態から、白板症組織には、広範

困に酸化ストレスの存在が認められた。p62 核染色では、一部に高発現群が認められ、細胞質染色には、低発現群と高発現群に分かれた。凝集は非常に少数で、Ki67、p53 は、低発現であった。標本に酸化ストレスが幅広くみられることから、弱い酸化ストレスでは、Nrf2-Keap1 系の標準的経路が誘導され、また、細胞内の障害を受けた小器官の処理などの必要性から正常なオートファジーが誘導され、p62 が発現すると考えらる。しかし、強い酸化ストレスまたは持続的な酸化ストレスでは、p62 の発現量が過剰になり、Nrf2-Keap1 系の非標準的経路が誘導されたり、活性酸素種が発生して、オートファジーが障害され、同様に p62 が蓄積していき、Nrf2-Keap1 系のポジティブフィードバックを誘発したり、p62 の凝集に至ったりと考えられる。この2つの経路の組み合わせが考えられるが、Ki67、p53 の分布からは、細胞増殖の異常や p53 遺伝子異常は高頻度ではないと考えられた。

#### 4-3 白板症のがん化と種々のバイオマーカー

最近では、遺伝学的研究が行われ、悪性化の変換メカニズムが明らかにされ、いろいろなバイオマーカーとして悪性化のリスクファクターがいくつか説明されている<sup>9,98-100</sup>。口腔扁平上皮癌の前癌病変から癌へ

の変換プロセスには、遺伝子配列的な影響を与える多岐にわたる分子とパスウェイが存在している<sup>101,102</sup>。Hunterらは、2006年に初めて、中間的な異型状態を介して口腔扁平上皮癌へ移行する多岐にわたる致死性的または非致死性的なパスウェイが存在することを報告した。彼らは、致死性的、非致死性的扁平上皮癌は、致死性的、非致死性的上皮異型に見られるほとんどの転写プロセスを共有するが、致死的な場合は付加的な変化があることを示した<sup>103</sup>。Leeたちは、がんのリスクとがんの発達時間の関係性を評価して、がんのリスクの最も予知可能な要因は口腔前がん病変の組織像とがん履歴と三つのバイオマーカー（染色体 polysomy、p53 の発現、染色体 3p または 9p のヘテロ接合性欠失（異種接合性欠失））であることを示している<sup>104</sup>。Beenkenらは、ビタミン A の誘導体である 13-シス型（同じ型の）レチノイン酸による口腔白板症の治療において上皮成長因子（EGFR）とトランスフォーミング増殖因子アルファ（TGF-alpha）と HER-2/new gene の発現状態を研究した。彼らは 1994 年にがん予防トライアル期間中の白板症治療において中間エンドポイントバイオマーカー(SEB)として TGF-alpha が役立つ可能性を示唆した<sup>105</sup>。1996年の研究では、Mutiranguraらは TRAP 測定法によって、口腔白板症と頭頸部扁平上皮癌におけるテロメラー

ゼ活性を調べた。その結果、テロメラーゼ活性は頭頸部扁平上皮癌のほとんど（87.5%）に検知できたのみならず、白板症などの前がん病変の38.5%にも認められた。この研究では、紅色肥厚症のすべてにT R A P測定が陽性であった。彼らは、口腔白板症の患者においてテロメラーゼ活性ががん化のリスク要因に対するバイオマーカーとして有効である可能性を示した<sup>106</sup>。2009年にMattaらによって、口腔白板症のマーカーとしてヘテロ核リボタンパクKが調べられ、同タンパク質と口腔扁平上皮癌の予後不良の関連性が調べられた。彼らの結果は、口腔粘膜の正常組織から口腔白板症、悪性病変にかけてのヘテロ核リボタンパクKの発現を調べ、その結果、頭頸部と口腔の扁平上皮癌の予後診断マーカーとして有用な可能性を示した。また、2次的に（再発例において）、細胞質内のヘテロ核リボタンパクKの発現は、白板症からがんにかけて有意に増加し、頭頸部扁平上皮癌および口腔扁平上皮癌の予後不良と相関していた。従って、頭頸部扁平上皮癌および口腔扁平上皮癌の原発癌の治療後の患者の再発可能性の予知因子として有用であることが示された<sup>107</sup>。

#### 4-4 がん化と p62、腫瘍マーカーとしての可能性

最近の研究では、肺がん、卵巣癌、前立腺癌、消化管癌を含むさまざまな固形癌において p62 の異常な細胞内発現が認められている<sup>27-32,108</sup>。

Levy らは、大腸腺腫症のがん化過程における腸上皮細胞のオートファジーの状態を調査するために p62 のレベルを分析した。報告は腸上皮内のオートファジーの障害が結腸直腸癌の発がん性リスクのある患者の腫瘍の発生と進行を障害したことを指摘している。さらに、オートファジーの障害における抗腫瘍効果において細菌叢の重要な役割を指摘している<sup>109</sup>。

一方では、ユビキチン/LC3 結合タンパク質の p62 が選択的オートファジーの制御物質として鍵となる役割をもつことが示されている。ユビキチン化された抗原と LC3 は両方ともオートファジーに関連し、オートファゴゾーム内への異常タンパク質の隔離に必要である<sup>110</sup>。寺邊らは、サージカルマージン付近の正常粘膜にオートファジー関連タンパク質の LC3A、LC3B、p62 の過剰発現を認めた場合、局所再発と予後不良に関連する有力なマーカーとなると報告した。彼らは、LC3A、LC3B の発現と腫瘍の局所再発および予後不良は関連性があること、p62 の発現は腫瘍の再発と関連性があることを明らかにし、これらのタ

ンパク質がサージカルマージン付近の正常粘膜に認められた場合、厳格な経過観察期間を要し、追加的な切除を考慮すべきであるとしている<sup>88</sup>。慢性骨髄性白血病（CML）でも、フィトアレキシンレスベラトロール（PSV）という植物が、JNK に介在による p62 の過剰発現を介してオートファジーによる細胞死を促進し、AMPK 活性化とこれらの経路が共同して CML 細胞のオートファジーによる除去を誘導することにより重要な抗白血病効果を示している<sup>111</sup>。また、p62 はオートファジーと老化および加齢に関連したさまざまな病態のインタフェイス因子としても考えられている<sup>112</sup>。

今回、我々は、p62 核染色、p62 凝集、p62 細胞質染色に分けて評価した。p62 は複合体として核膜孔複合体を通過する核-細胞質シャトルタンパク質でもあり<sup>36</sup>、p62 細胞質発現が上昇すると p62 核内発現も上昇すると考えられる<sup>37</sup>。口腔扁平上皮癌では、細胞質内に p62 が蓄積しても核内の p62 発現が上昇せず、核膜輸送システムが変化した可能性があると指摘されている<sup>37</sup>。以上から、p62 核染色は核-細胞質間輸送が正常に機能していることを示し<sup>36,37</sup>、p62 凝集はオートファジーの障害・破綻を示すと考えられる<sup>35</sup>。p62 細胞質染色は、酸化ストレス系やオートファジーが正常に機能しても、また障害を受けても発現が

上昇するため、評価は難しい。しかし、p62 が細胞質に過剰発現が認められるのに p62 核内発現が認められない場合、核膜輸送システムの変化と将来のがん化との関連性が考えられる。このように p62 は多様な機能を持ち、さまざまな疾患と関連しているため、オートファジー障害や酸化ストレスから誘導される悪性疾患の予後や生存要因の重要なバイオマーカーとなる可能性が考えられる。

#### 4 - 5 p62 と p53 について

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短く、細胞内で速やかに分解されるが<sup>66</sup>、変異型 p53 タンパク質は分解時間が著しく遅延し、細胞内に蓄積することがわかっている<sup>67</sup>。このため、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出来る<sup>68,69</sup>。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<sup>70-74</sup>。一般的に口腔がんに移行する口腔白板症では p53 タンパク質が有意に発現することが知られており、p53 が変異した幹細胞から上皮異型の領域が派生している<sup>71</sup>。本研究では、p62 核内発現と p53 発現との間に何らかの関連が生じ

た可能性が示唆される。

#### 4-6 まとめ

口腔白板症では悪性を予知したり、外科的切除を含む主種の治療法の予後を推測することは重要である。どの領域まで切除するかを決定するためのクライテリアは非常に有益であるため、悪性化する可能性のある領域を予測する分子的バイオマーカーを特定する試みがいくつかつかなされてきた<sup>9,10,113,114</sup>。本研究では、p62 核染色と p62 凝集が口腔白板症の上皮異型の存在と優位に関連があることを示した。

結果は口腔白板症における p62 関連マーカーの細胞内発現が悪性のマーカーとなる可能性を示している。

前述したように p62 は、肺がん、卵巣癌、前立腺癌、消化管癌を含むさまざまな固形がんにおいて細胞内の異常な発現が認められている<sup>27-32,108,115</sup>。口腔がんでも同様な報告が見られ、オートファジーの障害が顕著な p62 の細胞内発現を引き起こすためと考えられている<sup>26</sup>。p62 を介した細胞内の代謝障害は、細胞内のゲノム異常の発現を誘導し、結果としてがん化に至る可能性がある。口腔白板症でも同様のメカニズムが推測される。今回の報告では、p62 の代謝のメカニズムは明らか



にされていないが、口腔白板症において p62 核内発現と p62 凝集が上皮異型と優位に関連性があると示した報告は過去に見られない。今回の実験で、我々は p62 の発現が口腔白板症の上皮異型と優位に関連があることを示した。我々は、口腔白板症の悪性化に関するバイオマーカーとして p62 の臨床的実用化を目指すとともに、p62 核内発現と p62 凝集が認められた場合には、厳密な経過観察が必要であると考え

る。

今後、口腔白板症と口腔の前がん病変に関連する P62 と発がん性の関連について、標本数の増加と定量的な測定方法を含めた、よりよくデザインされた研究が必要であると考えられる。

## 5. 結論

口腔白板症では、将来の悪性化の可能性の考え、手術を含むいろいろな治療法を選択することが、予後を考える上で非常に重要となる。切除範囲決定は非常に重要であるため、悪性化の可能性を予測する分子的バイオマーカーの研究がいくつか試みられてきた<sup>9,10,113,114</sup>。我々の結果は口腔白板症における p62 関連マーカーの細胞内発現が悪性化のマーカーとなる可能性を示している。標本数が十分でないことから、今回のデータを将来の臨床応用に利用するのはまだ課題があると考えられる。また、ヒトの標本では p62 発現の評価方法としては免疫化学染色が唯一の方法であるため<sup>115</sup>、各バイオマーカーの定量的なデータは得られていない。ゆえに、p62 の定量的な実験方法の確立が必要であると考えられた。しかしながら、先行研究においては、口腔白板症の上皮異型と p62 核染色と p62 凝集の有意な関連性を示した報告は見当たらない。また、口腔白板症に関する p62 などのオートファジー関連因子の研究報告は少なく、今後の研究成果の蓄積が必要と考えられる。本研究によって、今後、口腔白板症の悪性化に関するバイオマーカーとしての p62 の臨床的実用化の可能性を示すことが出来たと考える。特に p62 核内発現と p62 凝集が認められた場合には、厳密な経過観察が必要であると考えられる知見を得られた。今回、我々は、口腔白板症での p62 の発現

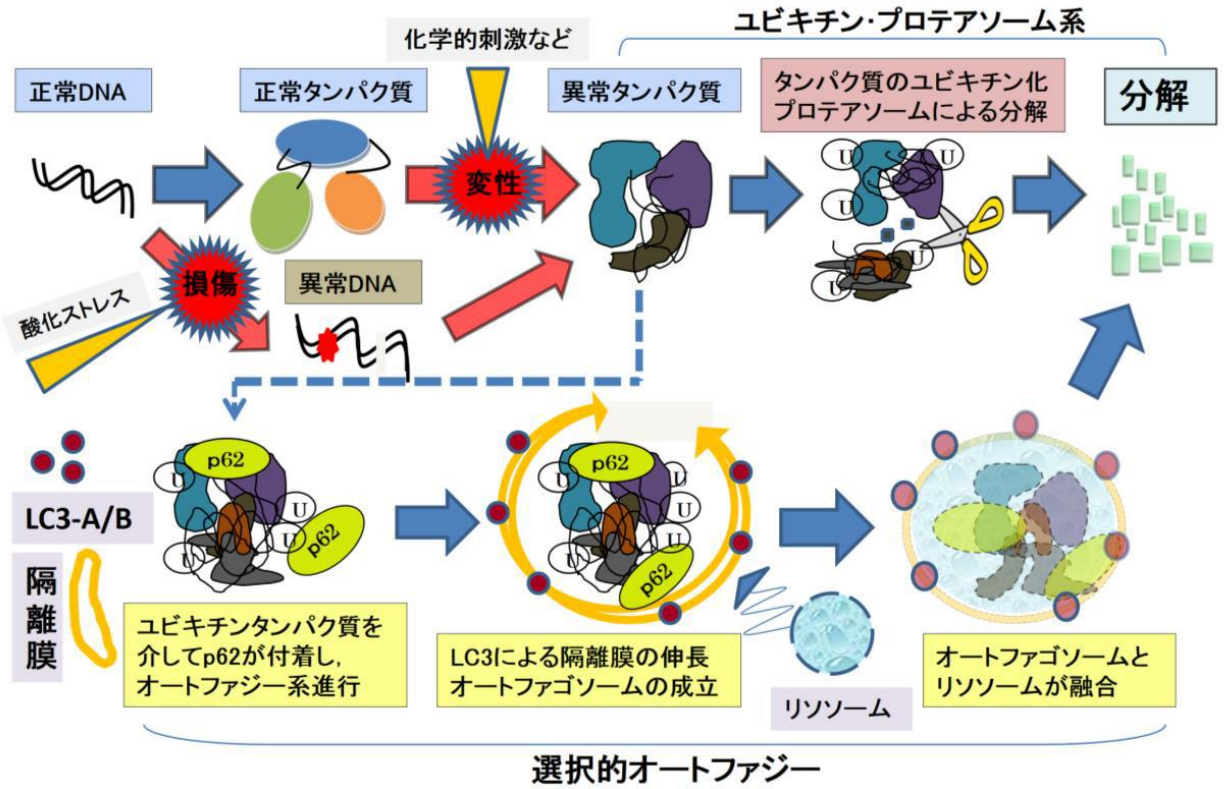
のみを研究したが、口腔扁平上皮癌では LC3A や LC3B のようなオートファジー関連マーカーが予後不良因として関連が報告されている<sup>88</sup>。口腔前がん病変の治療と診断を向上するため、LC3A や LC3B をはじめとして、口腔白板症の悪性化を予知可能とするバイオマーカーの探求のためにさらに詳細な広範囲にわたる研究が必要であると考えられる。

図表

図 1

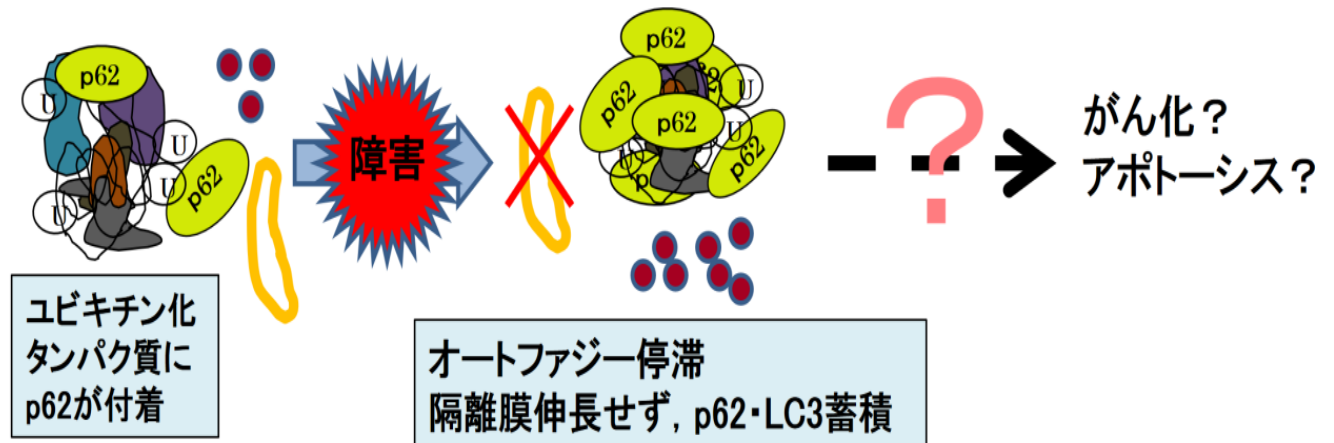


図 2



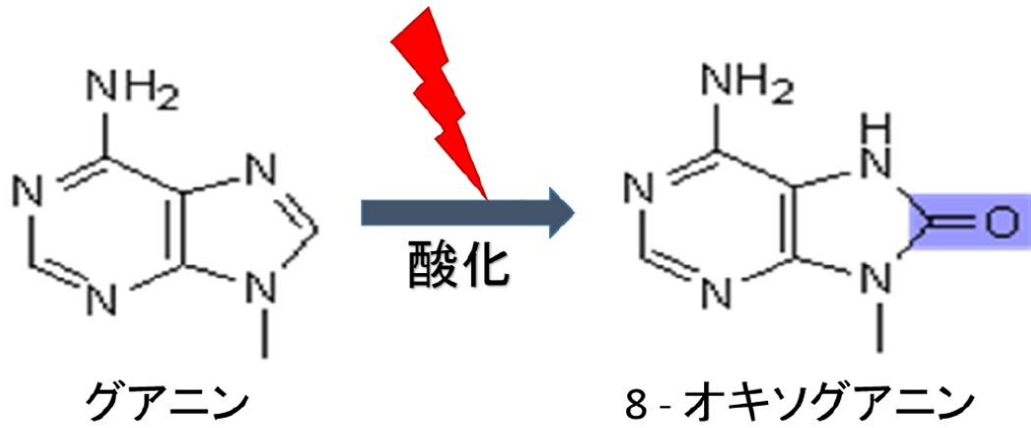
図表提供：地域医療振興会 石岡第一病院 歯科口腔外科 寺邊健人先生

図 3



図表提供：地域医療振興会 石岡第一病院 歯科口腔外科 寺邊健人先生

図 4



図表提供：地域医療振興会 石岡第一病院 歯科口腔外科 寺邊健人先生

**Table 1. Clinical classification**

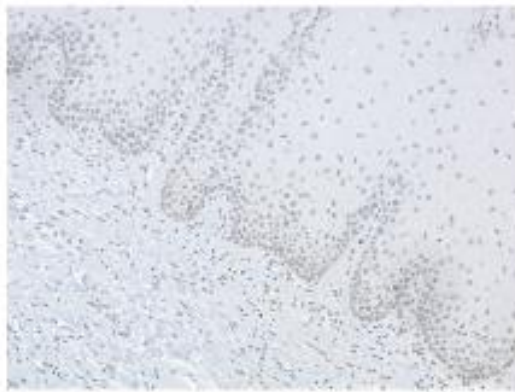
---

age	
-64	20
65-	30
sex	
man	24
women	26
location	
tongue	18
others	32
occurrence form	
single	43
multiple	7
drinking	
yes	18
no	31
smoking	
yes	24
no	24
epithelial dysplasia	
positive	18
negative	32

---



図 5



Sample N2:8-OHdG



Sample N2:Ki67



Sample N2:p53

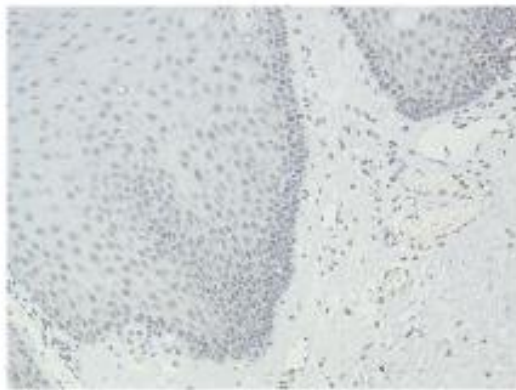


Sample N2:p62

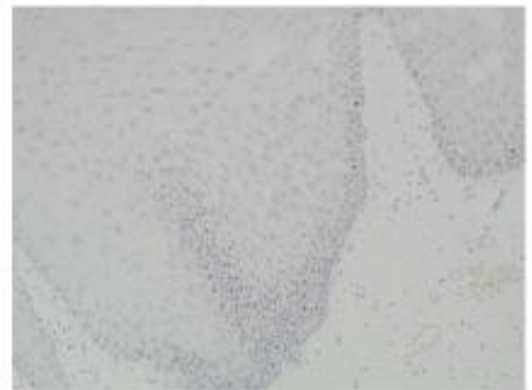
× 200

すべてに陽性の症例

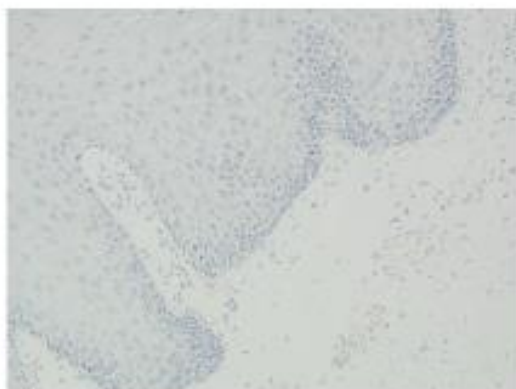
図 6



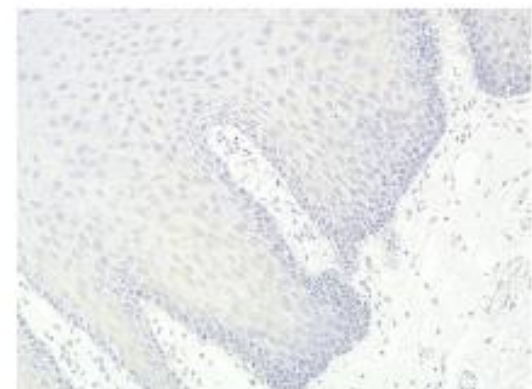
Sample N57:8-OHdG



Sample N57:Ki67



Sample N57:p53

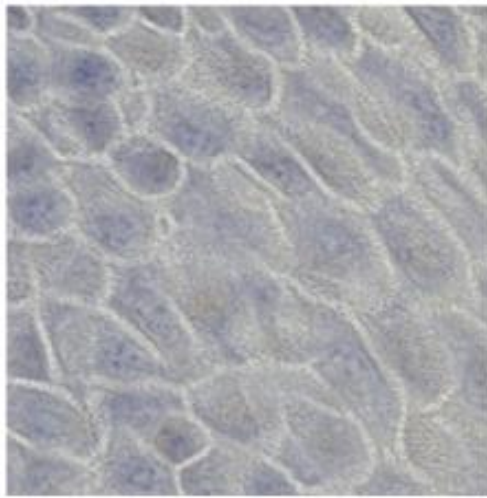


Sample N57:p62

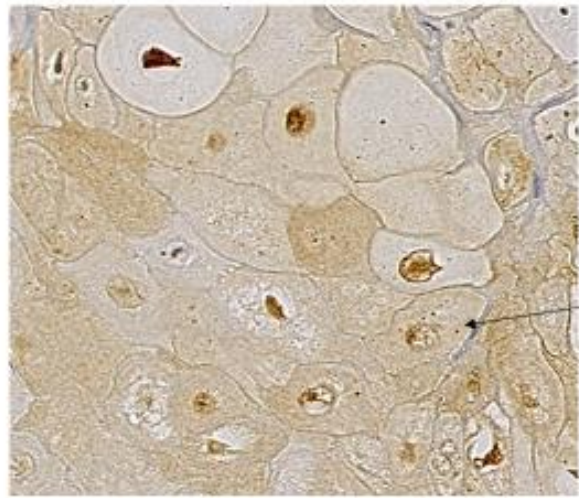
× 200

すべてに陰性の症例

図 7



Sample N57:  
p62の発現は認められない

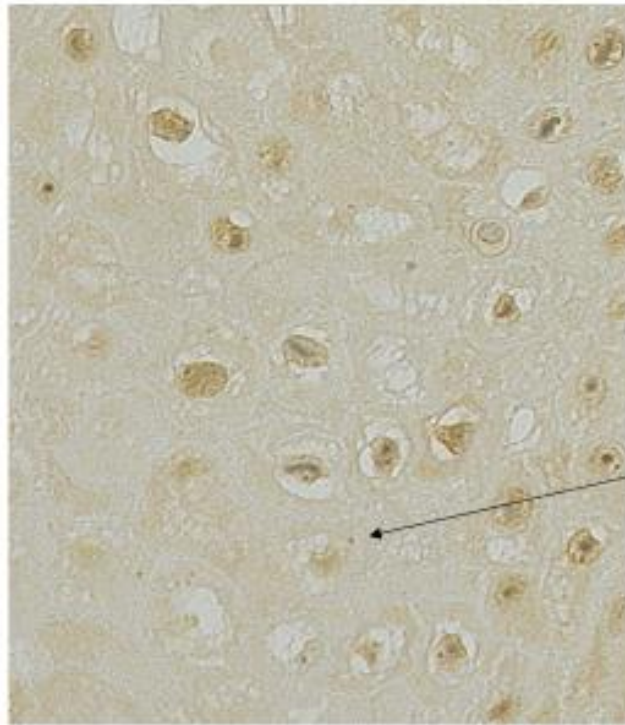


× 400

Sample N2:  
p62核染色、p62凝集、P62細胞質染色  
ともに陽性

※凝集は細胞質内にdot  
がひとつ以上観察された  
ものを陽性とした

図 8



※凝集は細胞質内にdotがひとつ以上観察されたものを陽性とした

**Sample G43** :  
p62核染色、p62凝集、P62細胞質染色  
ともに陽性

図 9

各マーカー陽性細胞占有率

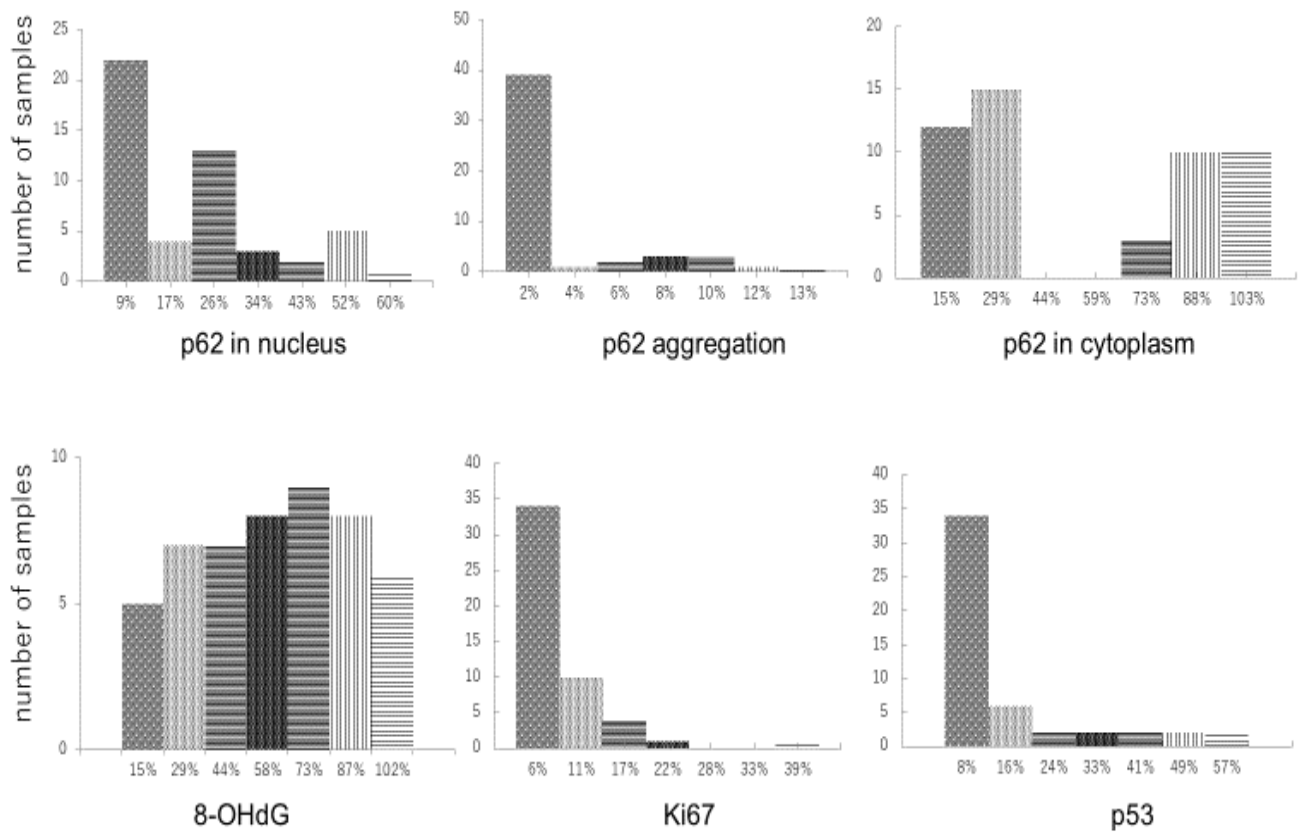


図 10

各マーカー箱ひげ図

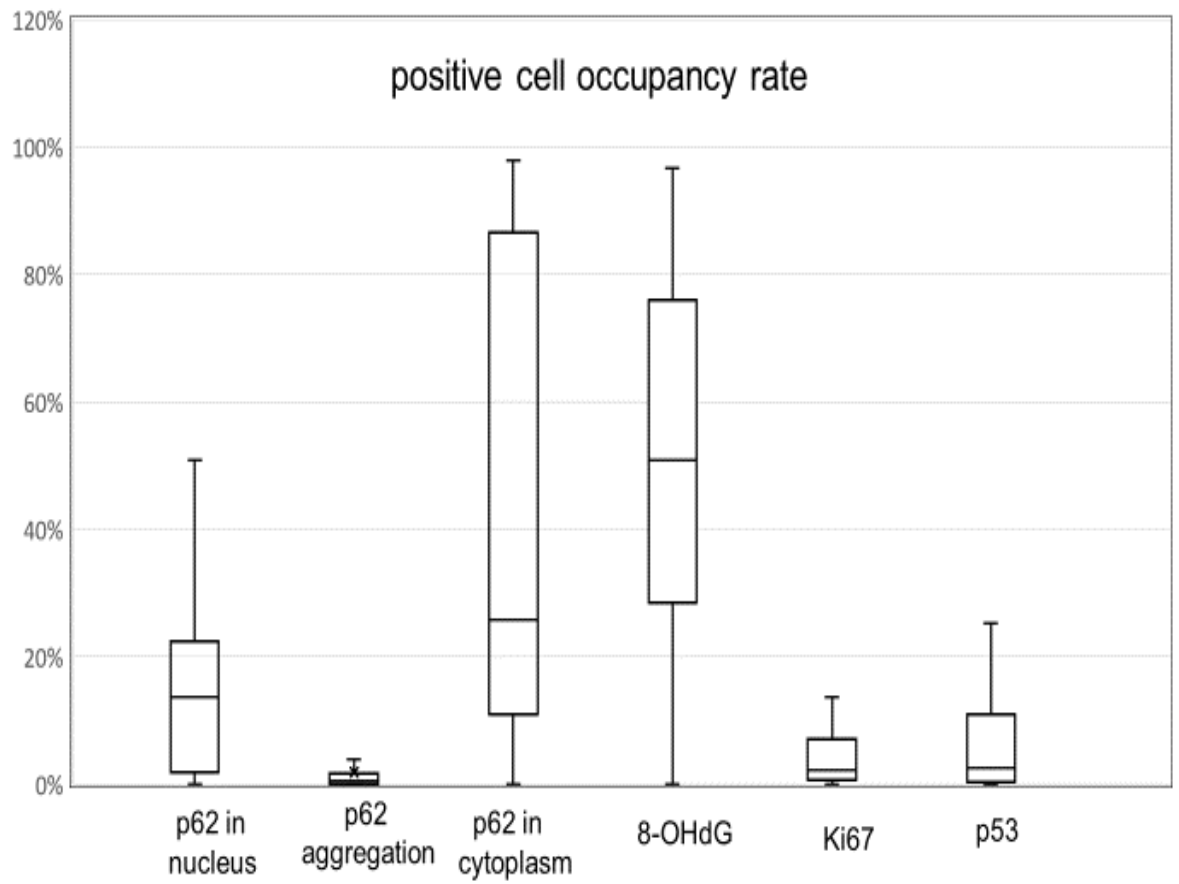


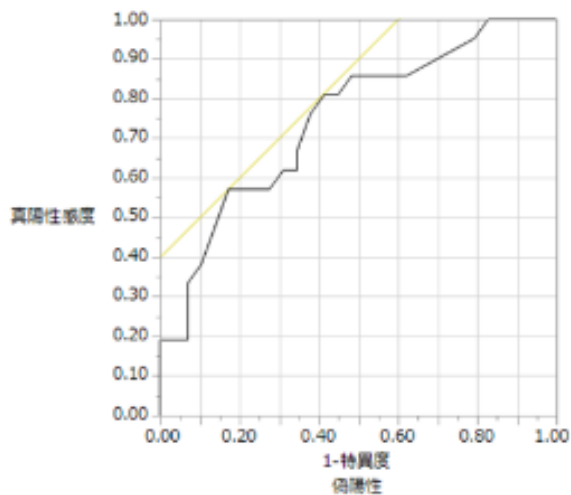
図 11 カットオフ値

p62 核染色 : 20% (陽性: 21 例 陰性: 29 例)

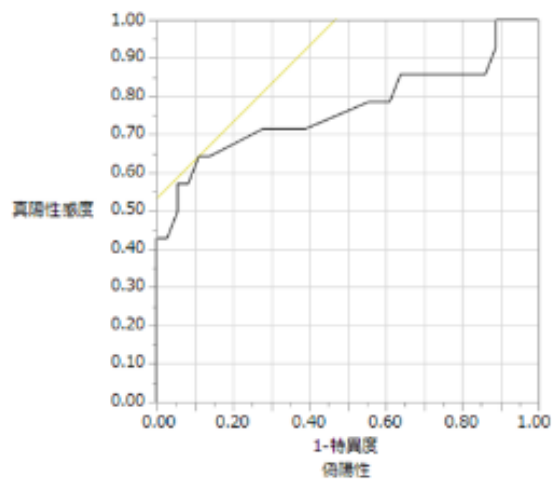
p62 凝集 : 1% (陽性: 14 例 陰性: 36 例)

p62 細胞質染色 : 20% (陽性 29 例 陰性 21 例)

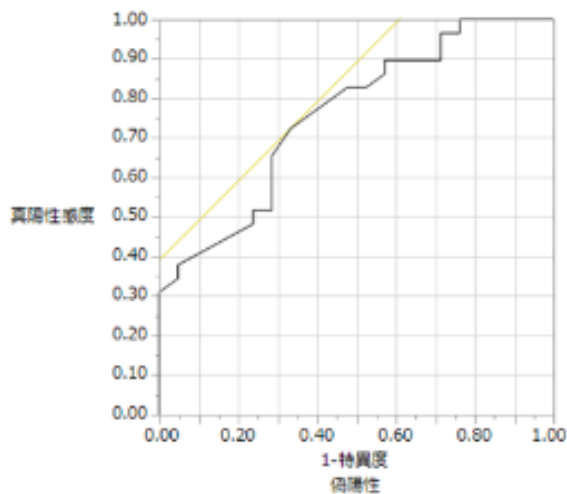
ROC 曲線



p62 核染色 (20%)  
 感度-(1-特異度):0.3990 AUC:0.74795



p62 凝集 (1%)  
 感度-(1-特異度):0.5317 AUC:0.76687



p62 細胞質染色(20%)  
 感度-(1-特異度):0.4220 AUC:0.76929

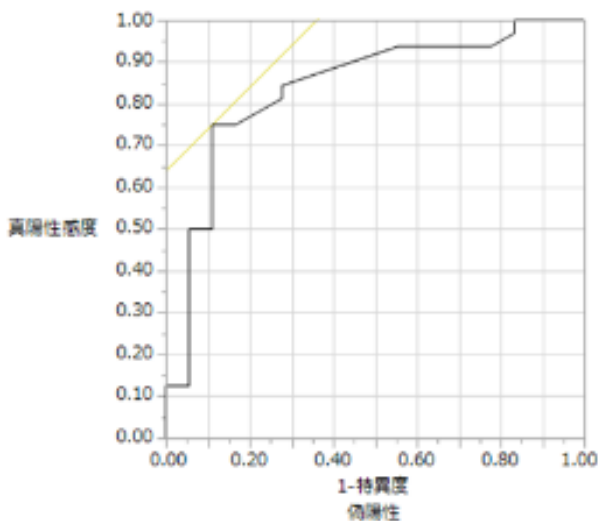
図12 カットオフ値

8-OHdG : 50% (陽性 32例 陰性: 18例)

Ki67 : 10% (陽性: 10例 陰性: 40例)

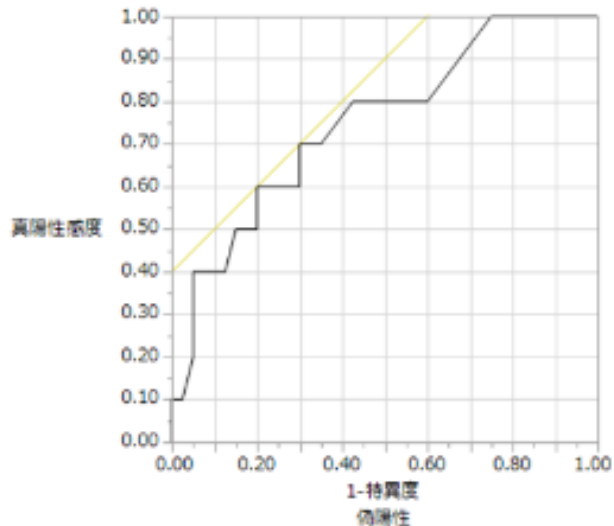
p53 : 1% (陽性: 29例 陰性: 21例)

ROC 曲線



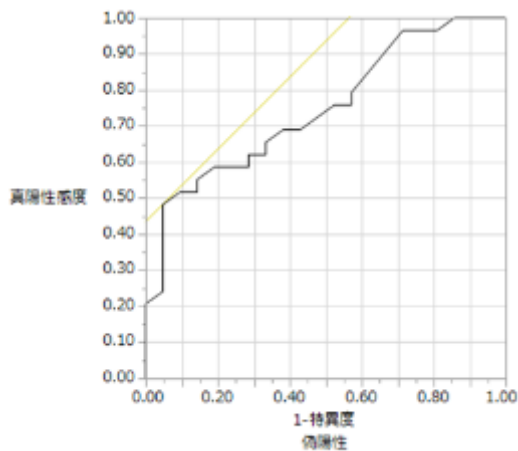
8-OHdG(50%)

感度-(1-特異度):0.6389 AUC:0.83854



Ki67(10%)

感度-(1-特異度):0.4000 AUC:0.74875



p53(1%)

感度-(1-特異度):0.4351 AUC:0.74877



**Table2. Epithelial dysplasia and other clinical parameters**

	univariate nominal scale logistic regression analysis			multivariate nominal scale logistic regression analysis		
	odd's-ratio	95%CI	P-value	odd's-ratio	95%CI	P-value
age						
≤64 vs 65≤	1.909	0.588–6.196	0.282	1.756	0.429–7.1844	0.434
sex						
man vs women	3.333	0.991–11.217	0.052	3.226	0.427–24.397	0.257
location						
tongue vs others	3.571	1.026–12.434	0.046	2.446	0.587–10.196	0.220
occurrence form						
single vs multiple	0.362	0.071–1.843	0.221	0.413	0.062–2.749	0.361
drinking						
yes vs no	2.444	0.732–8.167	0.146	1.002	0.183–5.486	0.998
smoking						
yes vs no	2.055	0.624–6.764	0.236	1.546	0.193–12.358	0.681

**Table3. univariate nominal scale logistic regression analysis in association with dysplasia and each biomarkers.**

Parameter	odd's-ratio	95%CI	p-value
p62 in nucleus	3.457	1.024–11.558	0.044
p62 aggregation	3.467	0.959–12.536	0.058
p62 in cytoplasm	1.222	0.377–3.966	0.738
8-OHdG	2.722	0.733–10.114	0.135
Ki67	1.238	0.299–5.134	0.769
p53	1.765	0.531–5.865	0.354

**Table4. multivariate nominal scale logistic regression analysis in association with dysplasia and each biomarkers.**

Parameter	odd's-ratio	95%CI	p-value
p62 in nucleus	5.750	1.262–26.189	0.024
p62 aggregation	6.157	1.013–37.418	0.048
p62 in cytoplasm	1.904	0.420–8.622	0.403
8-OHdG	5.306	0.956–29.458	0.056
Ki67	1.458	0.274–7.757	0.658
p53	2.349	0.566–9.759	0.240

**Table 5. univariate nominal scale logistic regression analysis in association with p62 parameters and other biomarkers.**

<b>p62 in nucleus</b>			
<b>Parameter</b>	<b>odd's-ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>p-value</b>
8-OHdG	2.600	0.750–9.008	0.132
Ki67	4.333	0.966–19.429	0.055
p53	3.938	1.137–13.645	0.031

<b>p62 aggregation</b>			
<b>Parameter</b>	<b>odd's-ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>p-value</b>
8-OHdG	1.591	0.417–6.071	0.497
Ki67	2.000	0.467–8.557	0.350
p53	3.667	0.874–15.384	0.076

<b>p62 in cytoplasm</b>			
<b>Parameter</b>	<b>odd's-ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>p-value</b>
8-OHdG	1.667	0.518–5.363	0.392
Ki67	3.619	0.682–19.208	0.131
p53	2.090	0.663–6.593	0.354

## 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（疾患性御医学専攻）において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、暖かく見守っていただき、論文のとりまとめに至るまでご指導・ご鞭撻を賜りました。こころ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、総合的にかつまた詳細に非常に数多くのご指導を賜りました筑波大学医療医学系教授 柳川徹先生に甚深の謝意を申し上げます。そして、本研究の遂行にあたってご協力を賜りました長井宏樹先生をはじめとする筑波大学大学院 歯科口腔外科諸先生方、図表の提供を頂きました地域医療振興会 石岡第一病院 歯科口腔外科 寺邊健人先生に心より感謝させていただきます。開業医である私にとりまして諸先生方のご協力なくしては、本論文を完成させることは不可能でありました。皆様のご協力にこころより感謝申し上げます。

## 出典

「本学位論文では Clinical and Experimental Dental Research : Version of  
Record online: 25 June 2019 (<https://doi.org/10.1002/cre2.193>) に掲載された  
論文の内容を John Wiley & Sons Ltd 社の規定にしたがって再利用している」

## 引用文献

1. Bánóczy J, Csiba Á. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia: analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 1976;42(6):766-774.
2. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-580.
3. 高須淳. 口腔病変診断アトラス. 含歯性嚢胞. 1980:98-101.
4. Nagao T, Warnakulasuriya S, Hasegawa S, et al. Elucidating risk factors for oral leukoplakia affecting gingivae in Japanese subjects. *Translational Research in Oral Oncology*. 2016;1(0).
5. Skach M, Svoboda O, Kutat K. Príspevek k. problému leukoplakie. *Acta Univ Carol Ser Med Supp*. 1960;10:363-371.
6. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(5):1702-1710.
7. Jr SS, Gorsky M, Ms FL, Dds. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow - up study of 257 patients. *Cancer*. 1984;53(3):563-568.
8. Pindborg J, Jølst O, Renstrup G, Roed-Petersen B. Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *The Journal of the American Dental Association*. 1968;76(4):767-771.
9. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
10. Wang Z, Feng X, Liu X, et al. Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *BMC genomics*. 2009;10(1):383.
11. Isola G, Matarese G, Cordasco G, Rotondo F, Crupi A, Ramaglia L. Anticoagulant therapy in patients undergoing dental interventions: a critical review of the literature and current perspectives. *Minerva Stomatol*. 2015;64(1):21-46.
12. Nagao T, Warnakulasuriya S, Sakuma H, et al. p53 and ki67 as biomarkers in determining response to chemoprevention for oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2016.
13. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E,

- García-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. *Oral oncology*. 2013;49(6):598-603.
14. Schaaij-Visser TB, Bremmer JF, Braakhuis BJ, et al. Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral oncology*. 2010;46(2):123-127.
  15. Al-Dhohorah T, Mashrah M, Yao Z, Huang J. Aberrant DKK3 expression in the oral leukoplakia and oral submucous fibrosis: a comparative immunohistochemical study. *European journal of histochemistry : EJH*. 2016;60(2):2629.
  16. Rai B, Kaur J, Jacobs R, Singh J. Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. *Journal of oral science*. 2010;52(2):251-256.
  17. Zamora - Perez A, Ortiz - García Y, Lazalde - Ramos B, et al. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *Journal of periodontal research*. 2015;50(1):28-36.
  18. Ferlazzo N, Currò M, Zinellu A, et al. Influence of MTHFR genetic background on p16 and MGMT methylation in oral squamous cell cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4):724.
  19. Chaves ALF, Silva AG, Maia FM, et al. Reduced CD8+ T cells infiltration can be associated to a malignant transformation in potentially malignant oral epithelial lesions. *Clinical oral investigations*. 2019;23(4):1913-1919.
  20. Ishii T, Yanagawa T, Yuki K, Kawane T, Yoshida H, Bannai S. Low micromolar levels of hydrogen peroxide and proteasome inhibitors induce the 60-kDa A170 stress protein in murine peritoneal macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;232(1):33-37.
  21. Ishii T, Yanagawa T, Kawane T, et al. 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(2):456-460.
  22. 柳川徹. 外傷歯における生体のストレスと p62 の機能: p62 とストレス応答・オートファジーの観点から. *日本外傷歯学会雑誌*. 2015;11(1):1-8.
  23. 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(12):5991-5995.
  24. 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(12):6191-6196.
25. Shin J. P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. *Archives of pharmacal research*. 1998;21(6):629-633.
  26. Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007;131(6):1149-1163.
  27. Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, et al. Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology*. 2006;48(2):157-161.
  28. Umemura A, He F, Taniguchi K, et al. p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells. *Cancer cell*. 2016.
  29. Yu H, Su J, Xu Y, et al. p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins. *European Journal of Cancer*. 2011;47(10):1585-1594.
  30. Mohamed A, Ayman A, Deniece J, et al. P62/Ubiquitin IHC Expression Correlated with Clinicopathologic Parameters and Outcome in Gastrointestinal Carcinomas. *Frontiers in oncology*. 2015;5:70.
  31. Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of cell biology*. 2011;193(2):275-284.
  32. Rolland P, Madjd Z, Durrant L, Ellis IO, Layfield R, Spendllove I. The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(1):73-80.
  33. 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(9):e74398.
  34. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of biological chemistry*. 2007.
  35. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y-s, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(33):22847-22857.
  36. Hu T, Guan T, Gerace L. Molecular and functional characterization of the p62 complex, an assembly of nuclear pore complex glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*. 1996;134(3):589-601.
  37. Liu J, Chen F, Lung J, et al. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2014;111(5):944.
  38. Lau A, Wang X-J, Zhao F, et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Molecular and cellular*

- biology*. 2010;30(13):3275-3285.
39. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology*. 2010;12(3):213.
  40. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(21):16023-16029.
  41. 水島昇, 吉森保. オートファジー—生命をささえる細胞の自己分解システム. In: 化学同人; 2012.
  42. 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(1):17-25.
  43. 小松雅明. 選択的オートファジー. *臨床検査*. 2009;53(12):1543-1549.
  44. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development*. 2007;21(22):2861-2873.
  45. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(12):1004.
  46. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(9):1533-1541.
  47. Gunst J, Derese I, Aertgeerts A, et al. Insufficient autophagy contributes to mitochondrial dysfunction, organ failure, and adverse outcome in an animal model of critical illness. *Critical care medicine*. 2013;41(1):182-194.
  48. Liu C, Xu P, Chen D, et al. 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(6):855-860.
  49. 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(12):1949-1961.
  50. 山田久陽. 基礎細胞生物学. *ファルマシア*. 2011;47(9):838-838.
  51. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic acids research*. 1984;12(4):2137-2145.
  52. Dizdaroglu M. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution. *Biochemistry*. 1985;24(16):4476-4481.
  53. 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(2):841-846.

54. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *nature*. 1991;349(6308):431.
55. 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(30):7024-7032.
56. 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(1):166-172.
57. 中別府雄作. 核酸の酸化と発癌. *医学のあゆみ*. 2005;214(11):949-952.
58. 中別府雄作. 核酸の酸化損傷に起因する神経変性の分子機序—8-オキソグアニンはDNA修復反応に依存して神経変性を引き起こす. *医学のあゆみ*. 2013;247(9):961-968.
59. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413-431.
60. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*. 1991;51(23 Part 1):6304-6311.
61. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989;57(7):1083-1093.
62. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009:a001883.
63. 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(4):466-474.
64. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49-53.
65. Brož DK, Attardi LD. In vivo analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models. *Carcinogenesis*. 2010;31(8):1311-1318.
66. Gronostajski RM, Goldberg A, Pardee A. Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Molecular and cellular biology*. 1984;4(3):442-448.
67. 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(2):531-539.
68. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer research*. 1998;58(18):4023-4037.

69. Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? *The FASEB Journal*. 1992;6(13):3169-3176.
70. Sakai E, Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene*. 1992;7(5):927-933.
71. JM Braakhuis B, René Leemans C, H. Brakenhoff R. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *Journal of oral pathology & medicine*. 2004;33(6):317-322.
72. 藤井佳人. 口腔前癌病変および扁平上皮癌における増殖細胞核抗原 (PCNA) と p53 蛋白の発現に関する免疫組織化学的研究. *岩手医科大学歯学雑誌*. 1996;21(3):286-299.
73. 西村泰典, 和唐雅博. 口腔癌における p53 の発現および Ki-67 抗原の局在と腫瘍の分化度および浸潤性との関連. *歯科医学*. 1994;57(5):325-334.
74. Gusterson B, Anbazhagan R, Warren W, et al. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*. 1991;6(10):1785-1789.
75. Schonk D, Kuijpers H, Van Drunen E, et al. Assignment of the gene (s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Human genetics*. 1989;83(3):297-299.
76. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter. *Genomics*. 1991;11(2):476-477.
77. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki - 67 reactive nuclear antigen expression. *Journal of cellular physiology*. 1987;133(3):579-584.
78. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1991;39(6):741-748.
79. Dowsett M, Nielsen TO, A'hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(22):1656-1664.
80. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(10):736-750.
81. Tzanakis N, Peros G, Karakitsos P, et al. Prognostic significance of p53 and Ki67 proteins expression in Greek gastric cancer patients. *Acta Chirurgica Belgica*. 2009;109(5):606-611.
82. Melling N, Kowitz CM, Simon R, et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*. 2016;69(3):209-

- 214.
83. Al-Saleh W, Delvenne P, Greimers R, Fridman V, Doyen J, Boniver J. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *American journal of clinical pathology*. 1995;104(2):154-160.
  84. Ma X, Wu Y, Zhang T, et al. Ki67 proliferation index as a histopathological predictive and prognostic parameter of oral mucosal melanoma in patients without distant metastases. *Journal of Cancer*. 2017;8(18):3828.
  85. Valente G, Orecchia R, Gandolfo S, et al. Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma? *Journal of clinical pathology*. 1994;47(2):109-112.
  86. 小宮山和正. 舌癌の増殖能に関する免疫組織化学的研究 Ki - 67 抗原発現と組織学的悪性度との関連性について. *日本口腔外科学会雑誌*. 1995;41(3):179-190.
  87. 川崎五郎, 柳本惣市, 陶山一隆, 水野明夫. 舌扁平上皮癌症例における Ki-67 抗原の発現と組織学的悪性度評価との関連について. *日本口腔科学会雑誌*. 1999;48(2):116-120.
  88. Terabe T, Uchida F, Nagai H, et al. Expression of autophagy-related markers at the surgical margin of oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and tumor recurrence. *Human pathology*. 2018;73:156-163.
  89. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classifications tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. *Lyon: IARC*. 2005.
  90. Nagao T, Warnakulasuriya S, Sakuma H, et al. p53 and ki67 as biomarkers in determining response to chemoprevention for oral leukoplakia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2017;46(5):346-352.
  91. Choi J, Jung W, Koo JS. Expression of autophagy - related markers beclin - 1, light chain 3A, light chain 3B and p62 according to the molecular subtype of breast cancer. *Histopathology*. 2013;62(2):275-286.
  92. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):340-350.
  93. Meisel P, Holtfreter B, Biffar R, Suemnig W, Kocher T. Association of periodontitis with the risk of oral leukoplakia. *Oral oncology*. 2012;48(9):859-863.
  94. Srivastava KC, Austin RD, Shrivastava D, Pranavadhyan G. Oxidant-antioxidant status in tissue samples of oral leukoplakia. *Dental research journal*. 2014;11(2).
  95. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(1-2):152-162.
  96. Lee J-M, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *BMB Reports*. 2004;37(2):139-143.
  97. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, et al. 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; jbc. M110. 118976.
98. Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral oncology*. 2009;45(8):647-653.
  99. Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral oncology*. 2012;48(7):578-584.
  100. Cervigne NK, Reis PP, Machado J, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Human molecular genetics*. 2009;18(24):4818-4829.
  101. Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. *International journal of cancer*. 2015;136(3):503-515.
  102. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(2):127-135.
  103. Hunter KD, Thurlow JK, Fleming J, et al. Divergent routes to oral cancer. *Cancer research*. 2006;66(15):7405-7413.
  104. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(5):1702-1710.
  105. Beenken SW, Huang P, Sellers M, et al. Retinoid modulation of biomarkers in oral leukoplakia/dysplasia. *Journal of cellular biochemistry Supplement*. 1994;19:270-277.
  106. Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S, et al. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 1996;56(15):3530-3533.
  107. Matta A, Tripathi SC, DeSouza LV, et al. Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*. 2009;125(6):1398-1406.
  108. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009;137(6):1062-1075.
  109. Lévy J, Cacheux W, Bara MA, et al. Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nature cell biology*. 2015.
  110. Twitty CG, Jensen SM, Hu H-M, Fox BA. Tumor-derived autophagosome vaccine: induction of cross-protective immune responses against short-lived proteins through a p62-dependent mechanism. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(20):6467-6481.
  111. Puissant A, Robert G, Fenouille N, et al. Resveratrol promotes autophagic cell death in

- chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer research*. 2010;70(3):1042-1052.
112. Bitto A, Lerner CA, Nacarelli T, Crowe E, Torres C, Sell C. P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *Age*. 2014;36(3):9626.
  113. Liu S-C, Sauter ER, Clapper ML, et al. Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 1998;7(7):597-603.
  114. Yan S-K, Wei B-J, Lin Z-Y, Yang Y, Zhou Z-T, Zhang W-D. A metabonomic approach to the diagnosis of oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus and oral leukoplakia. *Oral oncology*. 2008;44(5):477-483.
  115. Ruan H, Xu J, Wang L, et al. The prognostic value of p62 in solid tumor patients: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(3):4258.