岐　歯　学　誌
36巻３号　121～130
2010年２月

総　　説

口腔悪性病変の発現遺伝子解析と診断応用への試み

近　藤　信　夫　　亀　山　泰　永　　八　代　耕　児
高　山　英　次　　神　谷　真　子

Gene Expression Signatures for the Diagnosis of Oral Malignancy

KONDOH NOBUO, KAMEYAMA YASUNAGA, YASHIRO KOJI, TAKAYAMA EIJI and KAMIYA MASAKO

口腔悪性病変で特異的に発現の変化するマーカー遺伝子を抽出し，それを用いた遺伝子診断モデルの構築を試みた．さらにそれが未知の検体に対してどのような診断精度を示すか検討した．先ず口腔前癌病変である白板症と口腔扁平上皮癌の鑑別を試みた．そのために白板症から扁平上皮癌に至る発現遺伝子の変化をマイクロアレイ法で16,200種の遺伝子の中で比較し，118種のマーカー遺伝子候補を得た．さらにその中から定量的 PCR 法により真に白板症と扁平上皮癌の間で優位差を示すマーカー遺伝子を27種選別した．線形判別解析と逐次増加法により診断に必要なパラメーター（遺伝子）を抽出し，診断モデルの構築を行なった．その結果，11種のマーカー遺伝子が抽出され，それに基づいた白板症と扁平上皮癌の鑑別診断モデルを構築した．次いで Leave-one-out 検証法により未知の検体に対する予測精度を検討すると，95％以上の高値を示した．さらに，７種のマーカー遺伝子を用いて軽度および高度異型成の鑑別診断を行なうモデルを構築した．次いで，同様のアプローチにより，悪性度の高い症例群の鑑別診断を試みた．リンパ節転移を伴う扁平上皮癌と，伴わないものとの間で発現遺伝子解析を行ない，悪性度との相関が高いとされる山本—小浜の浸潤度分類と有意に相関するマーカー遺伝子群53種を同定した．線形判別解析と逐次増加法および Leave-one-out 検証法によりモデル構築と診断予測精度を検討した．その結果，発現遺伝子に基づいて浸潤度分類の５段階評価（グレード１，２，３，４C，４D）をそれぞれ16から25種のマーカー遺伝子を用いてほぼ92％から95％の確度で分類可能な４つの遺伝子診断モデルを構築した．
これらの診断モデルは口腔悪性病変を客観的にスクリーニングするための手段として効力を発揮することが期待される．

キーワード：口腔扁平上皮癌，白板症，cDNA マイクロアレイ，定量的 PCR，浸潤

This study investigated diagnostic markers for oral malignancy, and evaluated their diagnostic potential. Oral leukoplakias（LPs）are white lesions that include hyperplasias and dysplasias of the oral mucosa, and often undergo malignant transformation to oral squamous cell carcinoma（OSCC）. To identify marker gene candidates, differential gene expression between LPs and OSCCs were examined by cDNA microarray. The expressions of 118 marker gene candidates were further evaluated by quantitative reverse transcription-PCR（QRT-PCR）analyses of 27 OSCC and 19 LP tissues. We identified 12 up-regulated and 15 down-regulated marker genes in OSCCs compared to LPs. Using Fisher's linear discriminant analysis（LDA）, we demonstrated 11 gene predictors as a novel marker set that could best distinguish OSCCs from LPs（> 97% accuracy）. A further 7 of these gene predictors could be utilized to distinguish higher grade（higher than moderate）from lower grade（lower than mild）dysplasias（>95% accuracy）. These predictor gene sets provide multigene classifiers for the diagnosis of pre-cancerous to cancerous transition of oral lesions. We also identified molecular signatures and established a diagnostic model for progressive OSCCs. Total RNAs were

朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野
501-0296　岐阜県瑞穂市穂積1851
Department of Oral Biochemistry, Diviosion of Oral Structure, Function and Development
Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan
（平成21年11月30日受理）

isolated from primary OSCCs from both node-positive and -negative patients and used in cDNA microarray analysis. Among the 16, 600 possible target cDNAs in the array analysis, we identified 53 marker genes that can be implicated in the Yamamoto-Kohama's（YK）mode of invasion for OSCCs（$p<0.06$）. Using LDA fitted with a stepwise increment method, we created four discriminatory predictor models based on 16-to 25-gene signatures that could best distinguish the five established grades of the YK mode of invasion. Leave-one-out validation analyses demonstrated that the stability of these models was 92-95%. For further validation, we also examined an independent set of 13 primary OSCCs; the predictor models determined the invasion status with an accuracy ranging from 77% to 100%（on average, 85%）in comparison with pathological observations. We have constructed prediction models for the evaluation of the invasion status of these cancers.

Our models could thus provide objective screening criteria for the diagnosis of oral malignancies.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, leukoplakia, cDNA microarray, quantitative reverse transcription PCR, invasion

はじめに

口腔の悪性病変は，その多くが粘膜上皮に由来する扁平上皮癌（OSCC）である．その発症には喫煙，飲酒，発癌プロモーターを含む嗜好品や，齲歯，不適合補綴物による化学的物理的反復刺激やパピローマウイルス感染など，様々な原因が指摘されている．白板症は口腔粘膜上皮に特異的な，白色を帯びた慢性病変の総称であるが，組織学的には扁平上皮の過角化，錯角化および異形成など増殖性変化に基づいて分類され，病変部にはしばしばOSCCが混在する．前癌病変としての白板症は高分化型，中分化型から低分化型異形成へと段階的に移行し概ね10～20%の頻度でOSCCを発症する．白板症の治療方針は多くの場合分化度に応じて決められるが，病理診断では13項目にも及ぶ形態学的特徴を検討する必要があり，その分類や鑑別診断には多くの経験や熟練を要する．また，医療機関によって分類基準が異なる場合などが見受けられ，病理像と臨床的な予後との相関が一致しない症例を見るなどの問題がしばしば指摘されている．一方，OSCCの進行症例では転移能や浸潤能などの癌固有の臨床病理像を把握することが予後を予測する上で大変重要な手掛かりとなる．より悪性度の高い腫瘍は顕著な多様性を持つことなどから，悪性度の判定も複雑化してゆくことが考えられる．こうした緒問題を解決するために，既存の臨床病理学的な診断をより客観的な手法で補完可能な新規診断技術を開発することが必要である．

以前より著者らは肝臓癌を初め，病変特異的な発現遺伝子を同定するための方策を検討し，簡便な発現遺伝子解析の方法として特異的アダプター―プライマーによるPCR法を応用したDifferential Display法[1]や，発現遺伝子配列のタグ化を行い検体間で遺伝子プロファイルの比較を行なうSerial Analysis of Gene Expression（SAGE）法[2,3]を開発した．こうした試みは未知の塩基配列を持つ疾患関連遺伝子の同定に貢献している[4-8]．その一方で，近年ではヒト遺伝子データベースの完備とともにマイクロアレイ法による発現遺伝子解析がほぼ全ての遺伝子において検討可能となり，定量的PCR（QRT-PCR）法などRNA発現の定量技術と組み合わせて様々な疾患の診断技術開発が試みられている．実際に乳癌では発現遺伝子に基づく新規診断技術の有効性が確かめられ[9]，実用化されている（Oncotype DX；米 国 Genomic Health, Inc.）が，口腔癌を初め多くの癌では未だ研究の途上にある．

本編では，我々の研究室で取り組んでいる発現遺伝子を中心とした口腔悪性病変の新規診断技術の開発を中心に紹介し，今後解決すべき問題点について論じる．

口腔前癌病変（白板症）とOSCCとの鑑別診断

既に述べたように白板症の鑑別診断は多くの経験と熟練を要する作業なので，先ずこれに匹敵する作業過程を発現遺伝子レベルで行えないか検討した[10]．具体的な作業行程を以下の２段階に分けて行なった．すなわち先ず癌と前癌病変の病理組織・臨床像を反映するマーカー遺伝子群（mRNA）を同定する段階と，次いでそれら発現を多変量解析し，具体的な診断モデルを構築する段階である．

１．前癌病変またはOSCCのマーカー遺伝子の同定

前癌病変と癌との間で発現の異なるマーカー遺伝子候補を網羅的にスクリーニングする目的で，cDNAマイクロアレイ法を行った．発現遺伝子スクリーニングにはタカラcDNAマイクロアレイ（The IntelliGene HS Human expression chip，Takara）を用いた．その遺伝子スクリ－ニングの概略を図１に示す．先ず，様々なグレードの白板症およびOSCC各５例の組織からRNAを抽出し，個体差を平均化するためにそれぞれ等量を混合して，以下の一連の方法により両群間で発現の異なる遺伝子を検討した：　先ず，これら組

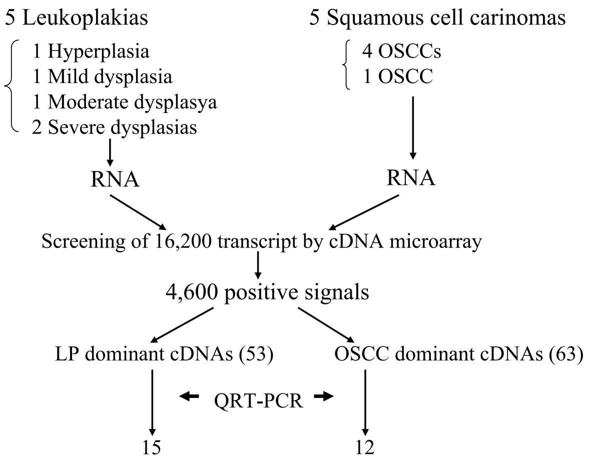

図１．白板症と口腔扁平上皮癌のマーカー遺伝子検索

織間における mRNA を標識し cDNA マイクロアレイに存在する16,200種類の遺伝子プローブとハイブリダイズすると4,600種で発現が確認され，そのうち63種で OSCC 特異的に，一方53種で白板症特異的に発現が２倍以上に上昇していた．cDNA マイクロアレイ法は発現遺伝子スクリーニングに効果的な技術であるが，発現量を正確に把握する場合に再現性に乏しいことを我々は経験している．一方，定量的 PCR 法は増幅サイクル数から厳密な発現量の比較が可能で，再現性に優れている．そこでこの118種のマーカー遺伝子候補から，OSCC と白板症の両群間で真に発現に有意差を示すマーカー遺伝子を選別する目的で，OSCC 27例と LP19例（表１）で定量的 PCR 法を用いてこれらの発現を検討した．その結果，Mann Whitney's U-test を用いて発現が OSCC と LP 群の間で有意差（0.05＞P）を示す27種のマーカー遺伝子（白板症で高い遺伝子15種および OSCC で高い12種）が同定された（表２）．マーカー遺伝子のうち，LP29（keratin 13）や LP28（transglutaminase 3）は正常口腔粘膜上皮または食道扁平上皮で特異的に発現し癌化の進行と伴に消失することが報告されている[11–13]．また，SC5（gamma 2 laminin）は頭頸部癌で発現が亢進していることが既に知られている[14]．さらに，LP19（*C1orf 10*）は cornulin とも呼ばれ，発現低下が扁平上皮癌の発生に必要であることが示唆されている[15]が，これらの事実は選別されたマーカー遺伝子群の妥当性を支持するものである．

２．マーカー遺伝子発現に基づいて行なった組織サンプルのクラスタリング解析

鑑別診断に必要なマーカー遺伝子の組み合わせが少なくともこの27マーカー遺伝子中に存在するかどうか検討する目的で，遺伝子発現に基づく症例のクラスタリング解析を行なった（図２）．これは症例毎の27種

表１．発現遺伝子解析に用いた白板症および扁平上皮癌組織

[a]Histology	[b]Site	[c]Sex	Age	TNM classification	WHO grade	[d]Mode of Invasion
OSCC 1	P	F	66	T2N0M0	I	2
OSCC 2	T	M	74	T2N0M0	I	3
OSCC 3	Si	M	54	T1N0M0	III	3
OSCC 5	UG	M	50	T4N0M0	I	3
OSCC 6	Bu	M	73	T3N0M0	I	3
OSCC 7	LG	M	40	T4N2M0	I	3
OSCC 8	LG	M	71	T4N0M0	I	-
OSCC 10	LG	M	65	T3N0M0	I	-
OSCC 11	T	F	71	T2N0M0	II	4C
OSCC 12	T	M	66	T2N0M0	II	3
OSCC 13	FM	M	70	T2N0M0	II	4C
OSCC 14	P	F	84	T3N0M0	I	1
OSCC 15	UG	F	58	T4N0M0	I	4C
OSCC 16	T	F	64	T1N0M0	II	4C
OSCC 17	LG	F	71	T1N0M0	I	1
OSCC 19	FM	M	63	T4N2cM0	I	3
OSCC 22	T	M	57	T3N0M0	I	3
OSCC 23	T	F	71	T2N1M0	II	4C
OSCC 55	T	F	46	T3N0M0	I	4C
OSCC 56	T	M	90	T3N0M0	II	3
OSCC 57	T	M	90	-	-	-
OSCC 58	Si	M	65	T3N2bM0	II	?
OSCC 59	FM	F	83	T2N1M0	I	4C
OSCC 60	UG	F	77	T1N0M0	I	2
OSCC 61	Bu	F	81	T3N0M0	I	1
OSCC 64	LG	M	79	T4N0M0	II	-
OSCC 65	Bu	M	79	T3N0M0	II	3
S dys 25	T	M	57	NA	NA	NA
S dys 26	T	F	58	NA	NA	NA
S dys 27	LG	F	87	NA	NA	NA
S dys 29	Bu	F	70	NA	NA	NA
S dys 49,50[#]	T	M	54	NA	NA	NA
Mod dys 21	T	F	60	NA	NA	NA
Mod dys 30	Bu	M	82	NA	NA	NA
Mod dys 36-40*	T	M	50	NA	NA	NA
Mod dys 42-44*	T	F	71	NA	NA	NA
Mod dys 33	UG	F	98	NA	NA	NA
Mod dys 52	T	F	48	NA	NA	NA
Mod dys 47,48[#]	T	F	61	NA	NA	NA
Mild dys 28	T	M	67	NA	NA	NA
Mild dys 32,33[#]	T	M	67	NA	NA	NA
Mild dys 46	T	M	39	NA	NA	NA
Hyperplas 24	T	M	60	NA	NA	NA
Hyperplas 31	LG	F	55	NA	NA	NA
Hyperplas 32	LG	M	42	NA	NA	NA
Hyperplas 35	T	F	68	NA	NA	NA

[a] HP, hyperplasia; Mid/Mod/S, mild/moderate/severe dysplasia
[b] T, tongue; P, palate; LG/UG, lower/upper gingive;FM, floor of mouth; Bu, buccal mucosa; Si, sinus.
[c] M, male; F, femal
[d] Mode of Invasion was evaluated as Yamamoto and Kohama, et al. (6)
* Mixture of three samples derived from different portions in the same lesion.
[#] Mixture of two samples derived from different portions in the same lesion.

表２．白板症と口腔扁平上皮癌の鑑別に用いる27種マーカー遺伝子

[#]Gene ID	[$]Classifier	Gene name (symbol)	Category	Accession No.
LP1	A	Matrix Gla protein (MGP)	Extra Cellular Matrix	NM_000900
LP8	A	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (NR2F2)	Nuclear Receptor	NM_021005
LP12	A	Slit homolog 3 (Drosophila) (SLIT3)	Secretory protein	NM_003062
LP21	A	Keratin 1 (KRT1)	Epithelial / Cytoskeretal	NM_006121
LP29	A	Keratin 13 (KRT13)	Epithelial / Cytoskeretal	X14640
LP17	B	Proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein (PRELP)	Extra Cellular Matrix	NM_002725
LP19	B	Chromosome 1 open reading frame 10 (C1orf10)	Epithelial /Protein modificatior	NM_016190
LP27	B	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB)	Trans cription factor	NM_006732
LP5	B	Dermatopontin (DPT)	Extra Cellular Matrix	NM_001937
LP28	A,B	Transglutaminase 3 (TG3)	Epithelial /Protein modificatior	NM_003245
LP4	A,B	FXYD domain containing ion transport regulator 6 (FXYD6)	Membrane Protein /Receptor	NM_022003
LP15		Microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4).	Extra Cellular Matrix	NM_002404
LP22		Dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)	Metabolism	NM_001387
LP2		Clusterin (CLU)	Anti Apoptotic	NM_001831
LP16		Cysteine-rich protein 1 (intestinal) (CRIP1)	Immune response/Developmen	NM_001311
SC1	A	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	Interferon-induced	NM_001565
SC5	A	Laminin, gamma 2 (LAMC2), transcript variant 1	Extra Cellular Matrix	NM_005562
SC13	A	Follistatin (FST), transcript variant FST317	Secretory protein	NM_006350
SC43	A,B	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein (IGJ)	Secretory protein	NM_144646
SC3		Retinol binding protein 1, cellular (RBP1)	Nuclear Receptor	NM_002899
SC27		Parathyroid hormone-like hormone (PTHLH)	Secretory protein	NM_198966
SC41		Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFBI)	Secretory protein	NM_000358
SC9		Epithelial stromal interaction 1 (EPSTI1)	Epidermal specific	NM_033255
SC6		Interferon-induced protein 44 (IFI44)	Interferon-induced	NM_006417
SC44		Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFI	Interferon-induced	NM_001549
SC10		Ubiquitin specific protease 18 (USP18)	Ubiquitine proteasome	NM_017414
SC7		Carbonic anhydrase II (CA2)	Metabolism	NM_000067

[#] Genes upregulated in leukoplakia (LP) or oral sqamous cell carcinoma (SC).
[$]A, 11 predictor genes that can discriminatte between LPs and OSCCs; B, 7 predictor genes that can discriminate between mild- and mo

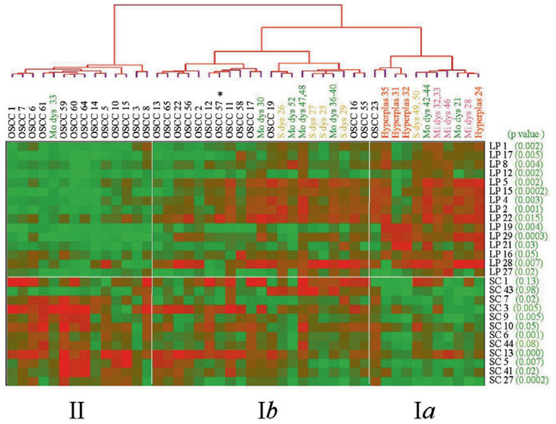

図２．白板症と口腔扁平上皮癌のマーカー遺伝子発現によるクラスタリング解析
右端に遺伝子名(LP，白板症で発現が高いもの：SC，OSCCで発現が高いもの）を記す．
上部には組織名（OSCC，扁平上皮癌；Hyperplasia，過形成；Mi，Mo，S dys；軽度，中等度，重度異形成）．赤は高発現，緑は低発現を示す．

のマーカー遺伝子の発現パターンをコンピューターに認識させ，その類似性により近縁にあるものを分類するものである．図２のヒートマップ上の緑が発現の低い領域，赤が高い領域を示している．46症例の癌および白板症の分類を試みた結果，LP 遺伝子群の発現が高い白板症群（グループ Ｉa)，SC 遺伝子群の高いOSCC 群（グループ Ⅱ)，中間的な発現領域が多く両組織の混在する中央のグループＩb に分類することが出来た．このうちＩb は更に白板症優位（右側）とOSCC 優位（左側）のサブグループに分かれた．発現遺伝子を基に OSCC と白板症の分類が可能であることが推測されたので，これら遺伝子群を用いて診断モデルの構築を試みた．

３．癌と白板症の鑑別診断モデルの構築

診断モデルの構築は，『教師あり学習法(Supervised learning method)』[16] に基づいて行なった．その概略を図３に示す．この方法では症例毎の遺伝子発現パターンを予めコンピューターに学習させ，マーカー遺伝子群の中から癌，非癌の分類に最適なパラメーター（即ち診断に必要なマーカー遺伝子群）を選択し，同時に鑑別アルゴリズムの構築を行なう．「分類器」としては，代表的な２群分類法として用いられる線形判別解析（LDA）と逐次増減法を組み合わせて用いた．実際この方法を用いてパラメータの数（仮にＫ種）を１から逐次増加させながら全症例（n＝46）の癌，非癌への分類で最適化を図ったところ，結果は図４に示すように横軸に示すパラメーター数（Ｋ種）がＫ＝11まで逐次増加する過程では診断精度（縦軸の％）も上

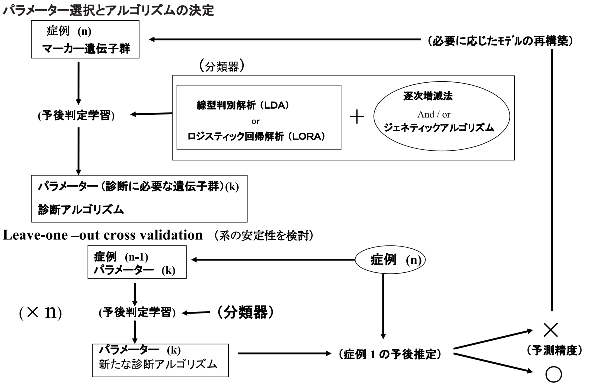

図３．診断モデルの構築（教師あり学習法）と Leave-one-out 交叉検証法の概要

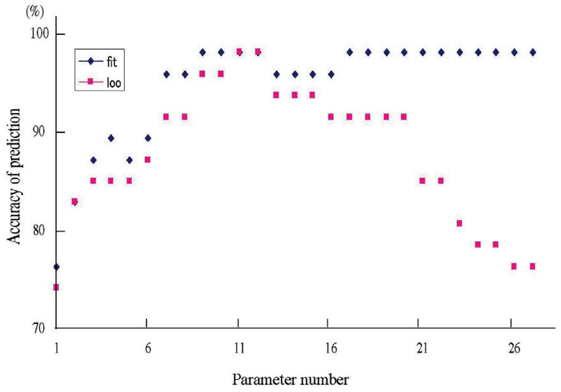

図４．診断モデルの構築と Leave-one-out 交叉検証法（-loo）による診断モデルの安定性の検討の実際
縦軸，診断精度（％）；横軸，パラメーター数；fit，LDAと逐次増加法により求めた診断モデルによる精度；loo，Leave-one-out 法で検討した未知の検体の診断予測精度．

昇し，その後，11＜Ｋ＜27の間はほぼ最高値（97％）で推移した（図４の fit)．

４．診断モデルの安定性の検討

次に，パラメーターと構築されたモデルの安定性を確かめるためにLeave-one-out（loo-）交差検証を行った．この方法では，パラメーター（Ｋ種）を用いて，先ほどと同様に，但し１症例を除いたｎ－１症例で新たな診断アルゴリズムを構築し，このモデルで残りの１症例を未知の症例として診断するという操作を行う．これをｎ回繰り返し正しい診断がなさる頻度を求め，個々のパラメーター群とモデルの安定性を予測する．図４に，全症例（n＝46）で検討した予測精度（fit）に併せて，n＝45症例でモデル構築し未知の１症例を診断した交差検証の結果（-loo）を記載する．その結果，１＜Ｋ＜10の間では，Ｋ数の増加につれて fit と loo-は伴に増加した．興味深いことに，11＜Ｋでは fit の値は高値を維持したのに対して，loo-はパラメーター11種をピークとして減少へ転じた．このこと

から，パラメーターの組み合わせでは特定の11種類のマーカー遺伝子を用いたモデルが最も精度が高く，信頼性においてこの11種以外の遺伝子を加味すると，未知の検体に対する診断精度が逆に不安定となることが予想された．この11遺伝子を用いた診断に必要なスコアは単純な以下の関係式により求められる．具体的な診断は検体の11遺伝子の発現値をこの式に代入しスコアがプラスならば癌，マイナスならば非癌組織という単純な Out put として示される．但しこの時スコアの絶対値の大きさは特に意味を持たない．

Score＝－0. 231（LP1）＋0. 223（LP4）－0. 0537（LP28）－0. 0734（LP21）－0. 892（LP12）－0. 0617（LP29）－0. 282（LP8）＋0. 0122（SC1）＋0. 0669（SC13）－0. 0684（SC43）－0. 0366（SC5）．

図５には実際その11種類のパラメーター（遺伝子）を用いたモデル（LDA スコアの関係式）と，個々の症例のスコアを図示した．この診断モデルによると，我々の用いた46症例のうち，45症例において病理診断と遺伝子診断とが完全に一致した．ところが病理診断で中等度異形成と診断された Mo dys 33については，遺伝子診断で OSCC と評価された．この１例は口腔内多発癌を発症した特殊な症例で，今回我々が検討した組織部位も臨床所見から疣贅癌様の悪性病変であることが疑われ，全摘出術が施された．臨床所見と病理診断が一致しなかったこの症例で遺伝子診断がより臨床所見を支持していたことは，遺伝子診断が単に病理診断を踏襲するものではなく，悪性度の評価法としての独立性を保っていることを支持すると考えられるが，この点は更に多くの症例を用いて検証してゆく必要がある．

同様のアプローチによって，我々は軽度異形成や過

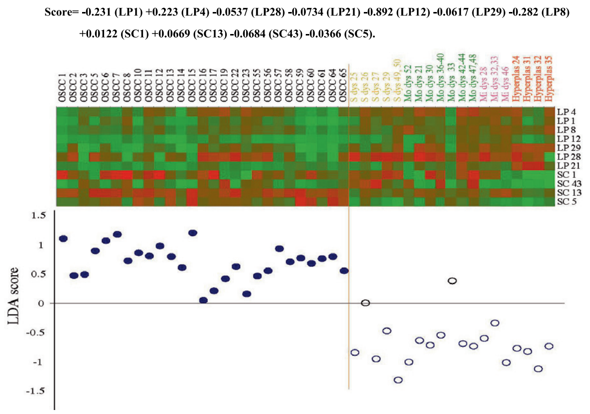

図５．11遺伝子を用いた線形判別解析（LDA）スコアによる白板症と OSCC の鑑別
図の右端にパラメーターとして用いた遺伝子を列記する．上方にはスコアを求める計算式と組織名を記す．

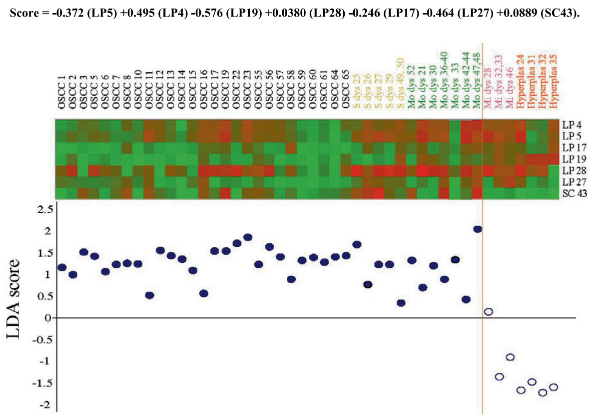

図６．７遺伝子を用いた線形判別解析（LDA）スコアによる高分化型，低分化型異形成の鑑別
説明は図５と同じ．

形成を，中等度異形成や癌と区別するためのモデル構築を試みた（図６）．この分類ではパラメーターとして７種類の遺伝子が抽出され，以下の式によりスコアが正ならば高度異形成または癌，負ならば軽度異形成と診断される．loo-による予測では95％の精度で鑑別が可能だった．

Score＝－0. 372（LP5）＋0. 495（LP4）－0. 576（LP19）＋0. 0380（LP28）－0. 246（LP17）－0. 464（LP27）＋0. 0889（SC43）．

口腔扁平上皮癌の進行症例における遺伝子診断

次に我々は，より悪性度の高い口腔癌の進行症例を評価するための遺伝子診断について検討した[17]．

１．OSCC の悪性度を示すマーカー遺伝子群の同定

悪性度の異なる OSCC 症例群として，T グレード，リンパ節転移，山本・小浜の浸潤度に顕著な差のある６症例ずつからなる２群（所属リンパ節転移の無いループ A と，転移その他の悪性形質を持つグループ B）を選別し（表３），既に述べてきたのと同様の方法で両群の間でマイクロアレイによるマーカー遺伝子候補のスクリーニングを行った．その結果，マーカー遺伝子候補として比較的，悪性度の低いグループ A で発現が優位な48種，逆に進行症例群のグループ B で優位な62種が見出された（図７）．次いで，真のマーカー遺伝子を見出すために，様々な悪性度を示す OSCC 64例を用いて定量的 PCR を行ない，山本・小浜の浸潤様式，T グレードおよびリンパ節転移の有無で有意差を示す遺伝子を選別した．その結果を悪性度に伴い発現が低下する遺伝子群（表４）と，逆に上昇する遺伝子群（表５）にまとめた．これらの内訳は，山本・小浜の浸潤様式との相関を示すマーカー遺伝子（表４，５の中の右側に A で表示）が最も多く53種

表３．OSCC の進行症例の発現遺伝子解析に用いた扁平上皮癌組織

Characteristic		Group A	Group B
Total sample No		6	6
Gender	Male	5	6
	Female	1	0
Site	Tongue	6	6
T classification	T2	6	1
	T3	0	5
Lymph note metastasis	Negative	6	0
	Positive	0	(Lymp.) 4
			(Neck) 2
Mode of invasion	YK-3	2	1
	YK-4C	3	3
	YK-4D	1	2

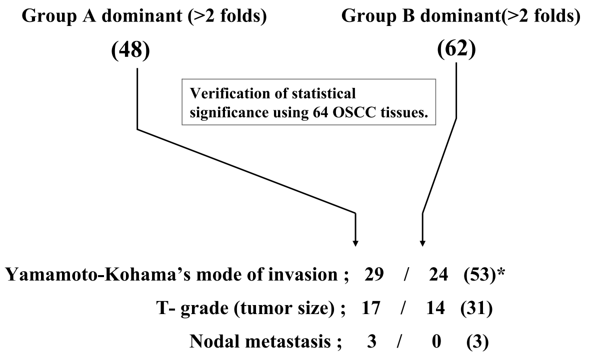

図７．進行症例の臨床・病理像に関連するマーカー遺伝子 A グループ，B グループそれぞれで優位な発現遺伝子を求め，浸潤度，大きさ，転移頻度との関係のあるものを分類した．結果は表４と５にまとめた．

（悪性度に伴い発現が低下する遺伝子群29種，上昇する遺伝子群24種）見出され，以下同様に腫瘍径（T-グレード）との相関を示すものが31種（表４，５の中の右に B で表示），リンパ節転移との相関を示すものは３種（表４の右に C で表示）見出された（図７）．これらマーカー遺伝子のうち，*TGM3*，*PLAU*，*LAGY/HOP*，*MMP2*，*MMP-11*，*LGALSI*，*ACTN1* や *HLA-DB1* などは既に頭頚部癌の悪性度と相関することが報告されている[10, 13, 14, 18–21]．

２．悪性度の鑑別診断モデルの構築

今回見出したマーカー遺伝子が最も高い相関を示す山本・小浜の浸潤度分類（YK 分類）は，病理所見の

表４．OSCC の進行症例で発現の低下するマーカー遺伝子群

Symbol	Accession no.	Gene cathegory and name	YK grade	Tgrade	Meta
		Cyto skeleton-associated			
TGM3	NM_003245	Transglutaminase 3	A		C
CLSP	NM_017422	Calmodulin-like skin protein. Associated with TGM3.	A		
KRT17	NM_000422	Keratin 17.	A		
LOC144501	XM_096612	Similar to cytokeratin (AA 1-513)	A		
SPRR1B	NM_003125	Small proline-rich protein 1B (cornifin).	A	B	
ZNF185	NM_007150	Zinc finger protein 185 (LIM domain).	A	B	
KRT1	NM_006121	Homo sapiens keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis).		B	
		Membrane			
TM7SF2	NM_003273	Transmembrane 7 superfamily member 2.	A		
AQP3	NM_004925	Aquaporin 3, Channering, water transport.	A	B	
C4.4A	NM_014400	GPI-anchored metastasis-associated protein homolog.	A		
FLJ11036	NM_018306	Hypothetical protein FLJ11036, transmembrane protein 40 (TMEM40),	A	B	
		Cell adhesion			
CEACAM5	NM_004363	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5.	A		
HSPC159	NM_014181	Homo sapiens galectin-related protein, HSPC159 protein.	A	B	
		Protease modification			
CSTB	NM_000100	Cystatin B (stefin B) (CSTB), cysteine protease inhibitors	A	B	C
KLK7	NM_005046	Kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum) (KLK7), transcript variant 1	A	B	
MPN	NM_031948	Pancreasin (MPN), novel tryptic serine peptidase expressed primarily by the pancreas	A		
WFDC12	NM_080869	WAP four-disulfide core domain 12 (WFDC12), functions as a protease inhibitor	A	B	
SLPI	NM_003064	Secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase), secreted inhibitor of serine proteases.	A	B	
		Signal transduction			
RAB25	NM_020387	RAB25, member RAS oncogene family.	A	B	
S100A12	NM_005621	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C),involved in specific calcium-dependent signal transduction	A	B	
		Cell growth/ differentiation			
HOP	NM_032495	Homeodomain-only protein, transcript variant 1	A	B	
CSRP2	NM_001321	Cysteine and glycine-rich protein 2,development and cellular differentiation.	A	B	
CRABP2	NM_001878	Cellular retinoic acid binding protein 2.	A		
		Proliferation differentiation transformation			
CDA	NM_001785	Cytidine deaminase.	A	B	
CBR3	NM_001236	Carbonyl reductase 3.	A		
FOSB	NM_006732	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B.	A	B	C
		Others			
ODC1	NM_002539	Ornithine decarboxylase 1.	A		
SULT2B1	NM_004605	Sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1.	A	B	
RNASE7	NM_032572	Ribonuclease, RNase A family, 7.	A	B	
D4S234E	NM_014392	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence.	A	B	
UBD	NM_006398	Homo sapiens ubiquitin D (UBD),		B	
APOBEC3A	NM_145699	Homo sapiens apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalyticpolypeptide-like 3A.		B	
APM2	NM_006829	Adipose specific 2.	A		

表５．OSCC の進行症例で発現の上昇するマーカー遺伝子群

Symbol	Accession no.	Gene cathegory and name	YK grade	T grade
		Cell recognition		
HLA-DPB1	NM_002121	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1 (HLA-DPB1)	A	
HLA-DMB	NM_002118	major histocompatibility complex, class II, DM beta (HLA-DMB)	A	
GLG1	NM_012201	golgi apparatus protein 1 (GLG1), E-selectin ligand-1, MG-160, cysteine-rich fibroblast growth factor receptor	A	B
		Complements		
C1S	NM_001734	complement component 1, s subcomponent (C1S)	A	B
C1QG	NM_172369	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide (C1QG)	A	
C1QA	NM_015991	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide (C1QA)	A	
		ECM remodeling		
PLAU	NM_002658	plasminogen activator, urokinase (PLAU)	A	B
MMP11	NM_005940	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11)	A	B
MMP2	NM_004530	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) (MMP2)	A	B
COL1A1	NM_000088	collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	A	B
COL6A1	NM_001848	collagen, type VI, alpha 1 (COL6A1)	A	B
COL3A1	NM_000090	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant) (COL3A1)	A	B
LGALSI	NM_002305	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1) (LGALS1)	A	B
		Cyto skeleton-associated		
TAGLN	NM_003186	transgelin (TAGLN)	A	B
ACTN1	NM_001102	actinin, alpha 1 (ACTN1)	A	B
CKM	NM_001824	creatine kinase, muscle (CKM)	A	
MYL9	NM_006097	myosin, light polypeptide 9, regulatory (MYL9)	A	B
FHL1	NM_001449	four and a half LIM domains 1 (FHL1)	A	
		Cytokines		
CCL19	NM_006274	chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19)	A	
NK4	NM_004221	natural killer cell transcript 4 (NK4),interleukin 32 (IL32), transcript variant 2	A	
TNFSF10	NM_003810	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10)	A	B
		Others		
GRCC10	NM_138425	hypothetical protein BC009925 (LOC113246), (GRCC10)	A	
AFG3L2	NM_006796	AFG3 ATPase family gene 3-like 2 (yeast) (AFG3L2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	A	
HIST1H2BK	NM_080593	histone 1, H2bk (HIST1H2BK)	A	

中で，最も悪性度，特に転移能との相関が高いことが知られている表現形で，YK-1，-2，-3，-4C，-4D の５段階のグレードで癌組織の浸潤様式を評価する[22-24]．我々の用いた64症例でも，リンパ節転移の比率は明らかに YK グレードの上昇と相関することが確認されているが，T-グレードとの相関は見られなかった（図８）．そこで我々は YK 分類に相当する悪性度の遺伝子分類を試みた．OSCC 64症例で53種のマーカー遺伝子発現を定量的 PCR 法で調べ，既に述べてきたのと

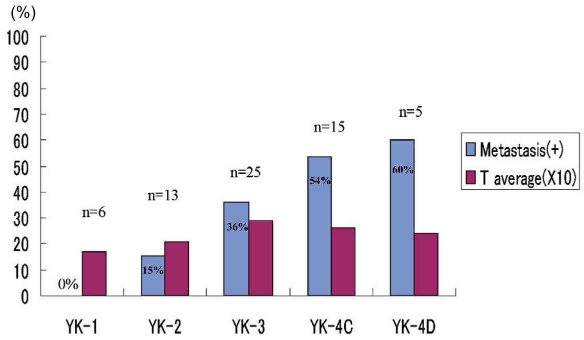

図８．OSCC　64症例における YK 分類とリンパ節転移の頻度

山本・小浜の浸潤度分類した症例群において，転移頻度と T グレードの平均を求めた．

青いバーが転移頻度，紫は腫瘍径（T-grade）の平均値を示す．

同様の手順に沿って，LDA 法を基本とした２群鑑別モデルを構築し，Leave-one-out 交差検証を試みた．以下にその結果のみをまとめる．先ず，YK-1と他のグレードを鑑別するモデルは，18種のマーカーを用いて以下の式によりスコア化され，93.8%の予測精度となった．

Score ＝ 0.394866 ＋ 0.229884（HOP）＋ 0.211169（CKM）＋ 0.324503（CDA）－ 0.620754（CSRP２）－ 0.338919（C１S）＋ 0.004993（ODC１）＋ 0.136036（TNFSF10）＋0.05849（TAGLN）－0.104157（NK4）＋ 0.15035（HLA－DBP1）－ 0.164207（HLA－DMB）＋ 0.359343（GRCC10）＋0.159684（GLG1）－0.097888（C4.4A）＋0.078056（KLK7）－0.161743（S100A12）＋ 0.031256（SULT2B1）－0.131336（TGM3）．

YK-1，-2と，-３から-4D までのグレードを鑑別するモデルは，18種のマーカーを用いて以下の式によりスコア化され，95.3%の予測精度となった（図９）．

Score ＝ 0.986068 － 0.010085（CLSP）－ 0.03203（RNASE7）＋0.088897（LOC14450）－0.250882（SLPI）＋ 0.03128（ZNF185）＋ 0.182597（CKM）＋ 0.224274（CDA）－0.360236（D4S234E）＋0.398142（TNFSF10）－ 0.136753（CBR３）＋ 0.213823（MYL９）＋ 0.045013（MMP 11）－ 0.222319（HLA － DMB）＋ 0.116148（ACTN１）－ 0.124201（HSPC159）－ 0.267171（FLJ 11036）．－0.538498（AFG3L2）＋0.221296（TM7SF2）．

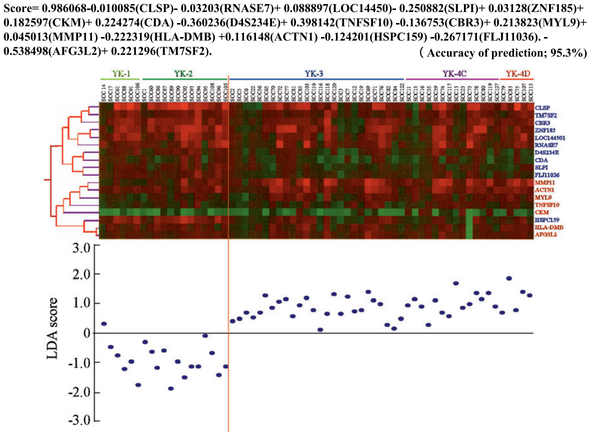

図９　18遺伝子を用いた線形判別解析（LDA）スコアによる浸潤度 YK1，2と YK3，4C，4D の鑑別

説明は図５と同じ．（浸潤度診断モデルの例として本図を掲載するが，他の３種のモデルについては式のみ本文に記載し図を省略する．）

YK-1，-2，-3と-4C，-4D を鑑別する鑑別するモデルは，25種のマーカーを用いて以下の式によりスコア化され，92.2%の予測精度となった．

Score = − 0.328603 + 0.128613（CCL19）− 0.00548（CLSP）+ 0.345872（FHL1）− 0.39984（SLPI）− 0.023614（APM2）− 0.052443（AQP3）− 0.040878（CSTB）+ 0.24299（CSRP2）− 0.141004（D4S234E）− 0.00906（ODC1）+ 0.211764（TNFSF10）+ 0.046316（TAGLN）+ 0.157812（PLAU）− 0.038082（NK4）− 0.165494（HLA − DMB）+ 0.337967（LGALSI）− 0.369404（GLG1）− 0.090304（COL1A1）− 0.372974（FLJ11036）+ 0.217867（AFG3L2）+ 0.19053（KLK7）+ 0.010609（MPN）+ 0.092418（SULT2B）− 0.138387（WFDC12）+ 0.098447（TGM3）．

YK-1，から4C までと,-4D を鑑別するモデルは，16種のマーカーを用いて以下の式によりスコア化され，93.8%の予測精度となった．Score = − 0.771245 + 0.071189（LOC144501）− 0.401477（D4S234E）− 0.066541（CBR3）+ 0.080463（PLAU）− 0.14224（MMP2）− 0.045855（MMP11）+ 0.481743（LGALSI）− 0.106972（HIST1H2BK）− 0.412974（GLG1）+ 0.087268（C1QG）+ 0.026049（COL6A1）− 0.513483（FLJ11036）+ 0.019158（MPN）+ 0.0567（SULT2B1）− 0.259138（WFDC12）+ 0.209169（TGM3）．

これらモデルの妥当性を確かめる目的で新規に13症例の OSCC 組織を独自に遺伝子診断し，並行して行なった病理診断と比較した（表６）．結果は，13症例のうち８症例において遺伝子診断の結果と病理診断とが一致した．不一致であった５例の内４例は１グレードの誤差であった．また，この５例のうち４例は遺伝子診断のほうがより高いグレード判定側に偏っていた．興味深いことに，症例 SCC130は最初病理診断でグレード２と判定されたが，遺伝子診断の結果を受けて再調査したところ，実際は遺伝子診断と同様の4C であることが判明した．病理検査では面状に現れる極めて限られた範囲の変化をいくつかの連続切片において断片的に観察するが，遺伝子診断は RNA 抽出する際にある程度の組織容量を立体的にスクリーニングするので，前者に比べより広範な領域をカバーすることが出来る．従って，遺伝子診断による評価がより悪性側（over estimation）を示す理由の一つとして，病理検査では見逃されている悪性形質が遺伝子診断で検出される可能性も考えられる．この点を検証するためにはさらに症例数を重ね，検討を加えてゆく必要があるが，遺伝子診断は臨床，病理診断を補完する第３の診断法として必要性を増すことが示唆された．

表６．浸潤度の病理診断と遺伝子診断の比較

Patients	YK grade(I) (Pathological diag.)	Classification by LDA models[a] LDA1	LDA2	LDA3	LDA4	YK grade(II) (Molecular diag.)
SCC129	1	+	+	+	-	4C（↑↑↑）[b]
SCC126	2	+	+	-	-	3（↑）
SCC132	2	-	-	-	-	1（↓）
SCC131	3	+	+	-	-	3
SCC133	3	+	+	-	-	3
SCC127	3	+	+	-	-	3
SCC139	3	+	+	-	-	3
SCC137	3	+	+	-	-	3
SCC134	3	+	+	+	-	4C（↑）
SCC138	3	+	+	-	-	3
SCC125	3	+	+	+	-	4C（↑）
SCC130	4C[#]	+	+	+	-	4C
SCC124	4C	+	+	+	-	4C
Fidelity (%)[c]		77	85	77	100	

a, Gray backgrownd denotes discrepancy between pathological and molecular diagnoses.
b, One rank over（↑）/Under（↓）estimation compared with the pathologycal diagnosis.
c, Fidelity to the pathological diagnosis.
#, After intensive examination, the pathological diagnosis has been corrected grade 2 to 4C.

今後の課題

我々は口腔悪性病変の予後をより正確に診断する技術の開発を目指しており，前癌病変と癌や進行癌症例の浸潤度の鑑別のための発現遺伝子による診断モデルを構築した．今後更により悪性度の高い進行症例の予後，特にリンパ節転移の予測について検討を進めなければならないと考えている．頭頸部癌のリンパ節転移を発現遺伝子に基づいて診断する試みは既にいくつか報告されているが[12, 25, 26]，それらの報告によれば転移の遺伝子診断の精度は75%から85%の範囲に留っており，診断精度の観点からは改善の余地が残されている．我々の検索においても明らかにリンパ節転移との相関を示す遺伝子は *TGM3*，*CSTB*，*FOSB* の３種（表４にＣで表示）のみが見出され，転移形質とマーカー遺伝子発現の相関が見出し難いことが示唆された．その原因として進行癌の悪性形質の多様性が増加

していることが考えられるが，腫瘍を取り巻く環境因子にも転移能に影響する何らかの原因が潜んでいることを考慮する必要がある．

腫瘍が発生してから，転移などの悪性形質を獲得してゆく過程で癌組織は多くの関門を経ることが想定される．例えば癌組織を取り巻く微小環境は，転移を考える上で大きな障壁となり，同じ組織型のOSCCでも舌に発生したものに比べ，本来リンパ管の発達が低い歯肉などに発生したものは転移し難いことが考えられる．一方，旧くから癌の進行と患者の免疫力が逆相関することがしばしば論じられている．癌組織周辺のリンパ球の浸潤が顕著な症例では，顕著でない症例に比べ予後が比較的良好である場合が多い[27]．また，最近の動物実験で癌細胞の *snail* 遺伝子が宿主の免疫系を抑制し，その結果転移が促進されることが判明し，転移阻止には宿主の免疫応答が重要な役割を担っていることが示されている[28]．免疫応答と癌の悪性度との相関は，予後良好な胃癌患者においてCD57T細胞の大半がCD8陽性であり，抗腫瘍サイトカインであるIFN-γの早期産生能が高いこと[29]や，逆に予後不良な胃癌患者ではCD4陽性のCD57T細胞が増加しており，末梢血リンパ球のIFN-γ産生能が不安定であること[30]，さらに，IL-10やIL-18などのTh1-抑制性サイトカインの産生が予後不良な末期癌で増強されること[31–33]などの例が報告されている．これらの事実は癌患者の免疫応答と予後との間に密接な関連性のあることを示唆するが，口腔悪性病変における患者の免疫応答能と予後との関連性は未だ検討されていない．我々は，癌組織の遺伝子診断と，血液細胞や血清を用いた癌患者の免疫応答能力の測定を組み合わせることにより，口腔扁平上皮癌の予後をより正確に診断することが可能かもしれないと考えている．

文　献

1) Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Tanaka K, Hada A, Shichita M and Yamamoto M. A method to isolate differentially expressed genes by displaying specific inner portion of cDNA fragments. *Anal Biochem*. 1999; 269: 427-430.

2) Ryo A, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Yamamoto N and Yamamoto M. A method for analyzing the qualitative and quantitative aspects of gene expression: a transcriptional profile revealed for Hela cells. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26: 2586-2592.

3) Ryo A, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Yamamoto N and Yamamoto M. A modified serial analysis of gene expression that generates longer sequence tags by nonpalindromic cohesive linker ligation. *Anal Biochem*. 2000; 277: 160-162.

4) Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Hada A, Aihara T, Horiuchi S, Goseki N, Matsubara O, Takenaka K, Shichita M, Tanaka K, Shuda M and Yamamoto M. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 1999; 59: 4990-4996.

5) Ryo A, Suzuki Y, Ichiyama K, Wakatsuki T, Kondoh N, Hada A, Yamamoto M and Yamamoto N. Serial analysis of gene expression in HIV-1-induced T cell lines. *FEBS lett*. 1999; 462: 182-186.

6) Inoue H, Sawada M, Ryo A, Tanahashi H, Wakatsuki T, Hada A, Kondoh N, Nakagaki K, Takahashi K, Suzumura A, Yamamoto M and Tabira T. Serial analysis of gene expression in a microglia cell line. *Glia*. 1999; 28: 265-271.

7) Ryo A, Suzuki Y, Arai M, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Sato C, Yamamoto M and Yamamoto N. Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000; 16: 995-1005.

8) Arai M, Amano S, Ryo A, Hada A, Wakatsuki T, Shuda M, Kondoh N and Yamamoto M, Identification of epilepsy-related genes by gene expression profiling in the hippocampus of genetically epileptic rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003; 118: 147-151.

9) Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL and Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node－negative, estrogen receptor－positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3726-34.

10) Kondoh N, Ohkura S, Aria M, Hada A, Ishikawa T, Yamazaki Y, Shindoh M, Takahashi M, Kitagawa Y, Matsubara O and Yamamoto M. Gene expression signature that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2007; 43: 455-462.

11) Whipple ME, Mendez E, Farwell DG, Agoff SN and Chen C. A genomic predictor of oral squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2004; 114: 1364-1354.

12) Roepman P, Weesels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijinzaad P, Tilanus GJ, Koole R, Hordijk G-J, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ and Holstege FCP. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Genet*. 2005; 37: 182-186.

13) Chen BS, Wang MR and Xu X. Transglutaminase-3, an esophageal cancer-related gene. *Int J Cancer*. 2000; 88: 862-865.

14) Patel V, Aldridge K, Ensley JF, Odell E, Boyd A, Jones J, Gutkind JS and Yeudall WA. Laminin-gamma 2 overexpression in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2002; 99: 583-588.
15) Imai FL, Uzawa K, Nimura Y, Moriya T, Imai MA, Shiba M, Bukawa H, Yokoe H and Tanzawa H. Chromosome 1 open reading frame10 (C1orf10) gene is frequently down-regulated and inhibits cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37: 1641-1655.
16) Fisher NA. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics*. 1936;7:179-188.
17) Kondoh N, Ishikawa T, Ohkura S, Arai M, Hada A, Yamazaki Y, Kitagawa Y, Shindoh M, Takahashi M, Ando T, Sato Y, Izumo T, Hitomi K and Yamamoto M. Gene expression signatures that classify the mode of invasion of primary oral squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog*. 2008;47:744−756.
18) Ohkura S, Kondoh N, Hada A, Arai M, Yamazaki Y, Sindoh M, Takahashi M, Matsumoto I and Yamamoto M. Differential expression of the keratin−4, −13, −14, −17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia. *Oral Oncol*. 2005; 41: 607-613.
19) Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ and Yarbrough WG. Gene expression profiles identify epitherial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kB signaling as chsaracteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2006; 66: 8210-8218.
20) O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, Singhal S, Weber R, O'Malley B, Cheng Y, Putt M, Feldman M, Ziober B and Muschel RJ. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene*. 2005; 24: 1244-1251.
21) Delebecq TJ, Porte H, Zerimech F, Copin MC, Gouyer V, Dacquembronne E, Balduyck M, Wartz A and Huet G. Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1086-1092.
22) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M and Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1983; 51: 2175-2180.
23) Kaihara T, Kusaka T, Kawamata H, Oda Y, Fujii S, Morita K, Imura J and Fujimori T. Decreased expression of E-cadherin and Yamamoto-Kohama's mode of invasion highly correlates with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology*. 2001; 69: 172-178.
24) Nakayama A, Ogawa A, Fukuta Y and Kudo K. Relation between lymphatic vessel diameter and clinicopathologic parameters in squamous cell carcinomas of the oral region. *Cancer*. 1999; 86: 200-206.
25) Zhou X, Temam S, Oh M, Pungpravat N, Huang BL, Mao L and Wong DT. Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006; 8: 925-932.
26) Watanabe H, Mogushi K, Miura M, Yoshimura R, Kurabayashi T, Shibuya H, Tanaka H, Noda S, Iwakawa M and Imai T. Prediction of lymphatic metastasis based on gene expression profile analysis after brachytherapy for early-stage oral tongue carcinoma. *Radiother Oncol*. 2008; 87: 237-242.
27) Maccarty WC. Longevity in cancer: A study of 293 cases. *Ann Surg*. 1922; 76: 9-12.
28) Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T and Kawakami Y.Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*. 2009; 15: 195-206.
29) Takayama E, Koike Y, Ohkawa T, Majima T, Fukasawa M, Shinomiya N, Yamaguchi T, Konishi M, Hiraide H, Tadakuma T and Seki S. Functional and Vbeta repertoire characterization of human CD8+ T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56+ CD57- T cells, CD56+ CD57+T cells and CD56- CD57+ T cells. *Immunology*. 2003; 108: 211-219.
30) Chochi K, Ichikura T, Majima T, Kawabata T, Matsumoto A, Sugasawa H, Kawarabayashi N, Takayama E, Hiraide H, Seki S and Mochizuki H. The increase of CD 57+ T cells in the peripheral blood and their impaired immune functions in patients with advanced gastric cancer. *Oncol Rep*. 2003; 10: 1443-1448.
31) Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Hiraide H and Mochizuki H. Interleukin-10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2001; 78: 124-130.
32) Kawabata T, Ichikura T, Majima T, Seki S, Chochi K, Takayama E, Hiraide H and Mochizuki H. Preoperative serum interleukin-18 level as a postoperative prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 2001; 92: 2050-2055.
33) Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Matsumoto A, Kawabata T, Chochi K, Hiraide H and Mochizuki H. The influence of interleukin-10 and interleukin-18 on interferon-gamma production by peritoneal exudate cells in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2002; 22: 1193-1199.