慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	頭頸部扁平上皮癌におけるcyclin D1遺伝子の異常増幅は化学療法,放射線化学療法への抵抗性の指標となる
Sub Title	
Author	石黒, 隆一郎(Ishiguro, Ryuichiro) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2009
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.85, No.2 (2009. 4) ,p.T87- T98
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20090400-0234

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・85(2)：T87～T98，2009

学位論文

頭頸部扁平上皮癌における *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅は化学療法，放射線化学療法への抵抗性の指標となる

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室
（指導：小川郁教授）
石黒隆一郎（いしぐろりゅういちろう）

Key Words：cyclin D1, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), neoadjuvant chemotherapy (NAC), homogeneously staining region (HSR)

頭頸部扁平上皮癌は，先進国における統計では，癌全体の約5％の発生率を占め，全世界で毎年新たに50万人の患者が発生していると報告されている[1]．その発生要因は，患者の喫煙や飲酒などの生活習慣と明確に関連しているため，治療法の追求のみではなく，リスクファクターの回避を目標とした予防医学による啓蒙も重要である．最近20年間で手術的治療の技術，放射線療法，化学療法の進歩は，臓器温存適応の拡大やquality of life（QOL）の改善などに寄与してきたが，頭頸部扁平上皮癌の生存率は向上していない[2]．その一方で，遺伝子の異常と発癌の関連についての研究は進歩し，細胞生物学的，分子生物学的な手法を用いた解析は，癌遺伝子，癌抑制遺伝子のような遺伝子の異常が，発癌の様々な段階で細胞の形質変化に影響をおよぼすことを明らかにした．腫瘍の発生，浸潤，転移と関連する癌遺伝子の異常増幅は，悪性腫瘍における予後因子となることがあり，たとえば *c-erbB-2* の異常増幅は，乳癌や卵巣癌の患者の予後の悪さと直接関連するため，その治療方針の決定に有用であることが報告されている[3,4]．

頭頸部扁平上皮癌において，ヒト遺伝子11q13の異常増幅が高い確率で認められることは1996年に報告された[5]．11q13の異常増幅は，頭頸部扁平上皮癌患者の40-50%に認められることが明らかになり[6-8]，同時に，11q13領域には癌遺伝子としての性質を持つ *hst*-1，*int*-2，*ems*-1 そして *CCND1*（*cyclin D1* 遺伝子）がコードされていることが明らかになった．これらの癌遺伝子の中で，*cyclin D1* 遺伝子は特に重要な役割を果たし，その異常増幅は癌細胞の悪性度と深い関連があると考えられている．cyclin D1蛋白は，cyclin-dependent kinase（CDK）4および6と複合体を形成し，癌抑制遺伝子の1つであるRB遺伝子がコードするRB蛋白をリン酸化し，不活性化する．このRB蛋白の不活性化により，細胞周期のG1期の抑制が解除され，G1期からS期への移行が促進される．細胞周期において，G1期とS期の境界はrestriction pointとよばれ，細胞がアポトーシスや減数分裂などへ進むシグナルを受けとる際，それらの状態への分岐点もこのG1期とS期の境界に存在しているとされている．癌細胞は分裂停止のシグナルを無視して増殖する細胞であるため，cyclin D1蛋白を始め，多くの癌遺伝子産物はこのrestriction pointを強制的に通過させる働きを持っていると考えられている．

また，cyclin D1蛋白が過剰発現している癌細胞ではG2期からM期への移行も促進すると考えられ，増殖する過程で他の遺伝子異常を誘発する原因となる[9]．さらに，たとえば前立腺癌細胞株においては上皮性成長因子（EGF）のような他因子によりcyclin D1蛋白の発現が上昇することが報告されている[10]．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が，明らかに頭頸部扁平上皮癌細胞の腫瘍増殖能と関連するという報告や，cyclin D1蛋白を免疫組織化学染色で評価し，その過剰発現を認める患者は予後が有意に低下するという報告もあり[6,11]，これらはcyclin D1が生体内における発癌や，癌の進行，悪性度に重要な役割を果たしていることを示唆している．

腫瘍細胞に発生する遺伝子異常の1つである遺伝子増幅が，ある量を超えると，分裂細胞の染色体分析により，HSR（homogeneously staining region）やdmin

(extrachromosomally as double minute chromosomes) という2種類の染色体異常として検出される事が多い．しかし，このような遺伝子異常の形態を定性的に把握することは，免疫組織化学染色などの従来の手法では困難であることから，頭頸部癌において *cyclin D1* の増幅とその臨床的意義について検討した報告はない．本研究において著者は，無治療の頭頸部扁平上皮癌患者の原発部から採取した細胞の間期核に対し，fluorescence *in situ* hybridization（FISH）法を施行し *cyclin D1* の増幅について解析した．FISH法は，従来の手法よりも簡便かつ迅速に，頭頸部癌のわずかなサンプルからも蛍光シグナルの輝点として，HSRを含めた遺伝子増幅の異常を定性的にとらえることが可能である．そして，*cyclin D1* 遺伝子の増幅やcyclin D1蛋白の過剰発現と，患者の臨床病理学的因子や化学療法の奏効度との関連性についても検討した．さらに，HSRの予後因子としての有用性も併せて検討した．また，頭頸部扁平上皮癌細胞株HSC-2におけるcyclin D1蛋白の発現に，EGFが与える影響について検討した．

対象と方法

1. 対象患者

本研究では，1999年から2002年までに慶應義塾大学耳鼻咽喉科にて初回治療を行った単発性の頭頸部扁平上皮癌患者58例（男性49例，女性9例；平均年齢63.9歳，48-80歳）について検討した．これらの症例に対する治療は全て根治を目的として行われた．原発部位の内訳は，舌・口腔底癌23例，中咽頭癌14例，下咽頭癌21例である．平均観察期間は14.2ヶ月（1.5-45.0ヶ月）である．臨床病期分類は，1997年のUICC分類に基づいて行った．ステージの確定にはCT，MRIやガリウムシンチグラムなどの画像診断を用いた．診断は治療開始前に局所麻酔での生検や，全身麻酔下での顕微鏡下喉頭微細手術の際に得られた検体により行った．同時に，本研究ではfine needle aspiration biopsy（FNA biopsy）を原発部に直接，あるいは生検検体に針を刺入して施行し，細胞のサンプルを得た．

2. 治療

58例のうち32例（StageⅡ-StageⅣ）に対してシスプラチン，5-fluorouracil（5-FU）によるneoadjuvant chemotherapy（NAC）を初回治療として施行した．32例のうち28例（88%）はT3，T4の進行癌であり，29例（91%）に頸部リンパ節転移を認めた．原発部位の内訳を第1表に示した．初回治療としてNACを施行した症例は，舌・口腔底癌14例，中咽頭癌7例，下咽頭癌11例であった．初回治療としてNACを選択した下咽頭癌11例は，引き続き化学放射線療法を施行した．初回治療としてNAC以外の選択をした26例のうち，21例は初回治療として放射線療法を施行した．5例は手術を施行した．

第1表　頭頸部扁平上皮癌症例の内訳

Treatment	Primary Site of Carcinoma		
	Oral cavity	Oropharynx	Hypopharynx
NAC	14	7	11
Radiation	4	7	10
Operation	5	0	0

(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003のTable 1を改変，許可を得て転載.)

NACは，シスプラチン点滴　70 mg/m^2（day1），5-FU持続点滴700 mg/m^2（day1-5）の2剤を用いて3-4週間の間隔をおき，2コース施行した．

放射線療法は，6MV linac（linear accelerator）を使用し，2.0 Gy/day，総線量60 Gyで21例に施行した．そのうち5例は放射線単独照射で，下咽頭癌全10例を含む16例は初回治療として化学療法を同時併用した．化学療法の内容はシスプラチン15 mg/m^2（day1-4），5-FU 700 mg/m^2（day1-4）を投与した症例が5例，ドセタキセル（10 mg/m^2/week）を投与した症例が11例であった．

3. 治療効果の判定

頭頸部癌取扱い規約（2001年11月，改訂第3版）の「治療効果判定基準」に則り，治療効果を判定した．奏効度の基準は第2表に示した通りである．

4. FISHに用いる細胞検体の処置

FISHに使用する全ての腫瘍細胞は，初回治療の開始前に，原発部位からFNA biopsyによって採取した．腫瘍組織から細胞を単離させて浮遊液を作成し，FISHを行ったが，その手順は以下の通りである．まず，10 ml注射器に装着した21 Gまたは23 G注射針（検体の大きさにあわせ，適宜針のサイズを選択した）を，摘出した腫瘍検体に刺入した．陰圧をかけ腫瘍細胞を吸引し，ピペット内で75 mM KCl低張液500 μlと腫瘍細胞を5分間混和し，細胞核浮遊低張液を作成した．FISH検体を採取する際には同時に細胞診も行い，腫瘍細胞以外のcontaminationが多いものはFNAを再施行した．

第2表　治療奏効度の基準

著効 complete response（CR）	全ての病変が消失し，新病変の出現がない状態が4週間以上持続.
有効 partial response（PR）	2方向測定可能病変の縮小率が50%以上，1方向測定可能病変の縮小率が30%以上. または評価可能病変の改善が50%以上で，新病変の出現しない状態が4週間以上持続.
不変 no change（NC）	2方向測定可能病変の縮小率50%未満，1方向測定可能病変の縮小率が30%未満. または評価可能病変の改善が50%未満でそれぞれの病変が25%未満の増大または増悪にとどまり新病変が出現しない状態が4週間以上持続.
進行 progressive disease（PD）	測定可能病変が25%以上の増大または評価可能病変の25%以上の増悪，または新病変が出現.

直後に，細胞核浮遊低張液にカルノア液（メタノール：酢酸〔v/v〕＝3：1）500 μl を加え，3000 rpm，10分間遠心した．上清を除去し，細胞沈渣にカルノア液を加え，再び細胞を撹拌した後，細胞浮遊液をスライドグラスに滴下し37℃で12時間乾燥させた後，65-70℃で24時間インキュベートした．容器に75℃の70%ホルムアミド/2XSCC を満たし，標本スライドグラスを浸けて pH 7.0 で2分間熱変性させた．次に，冷却した70%エタノール，100%エタノールの順にスライドグラスを浸けて急冷し，脱水した．本研究では，cyclin D1 のプローブとして SO LSI cyclin D1 DNA probe（Vysis 社，Downers Grove, IL, USA）を用い，75℃で5分間変性させた．プローブは73℃で5分間変性させ，変性後の標本スライドグラスに滴下し，42℃に調整した密閉湿箱で18時間ハイブリダイズした．最後に，46℃の50%ホルムアミド/2X SCC で20分間，2X SCC で5分間洗浄し，4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride（DAPI）で対比染色を行った．*cyclin D1* 遺伝子は spectrum orange で標識されており，BX 60 型蛍光顕微鏡（Olympus 社，Tokyo, Japan）により観察した．

5. 間期核 FISH によるシグナルカウント法

各症例につき100個の間期核で *cyclin D1* 遺伝子を標識したシグナル数を計測した．核同士が重なり，あるいは接触して境界が不明瞭な核は対象から除外し，物理的に損傷していない核のみを対象とした．シグナルカウントの判定が困難である場合は，同一の検体で作成した別標本を使用した．また，症例の臨床的背景を認知しない2名の観察者によりカウントを行い，その平均値を結果として用いた．本研究では，コントロールとして正常口腔粘膜の扁平上皮組織について FISH を施行した．その結果，間期核内に正常な2個のシグナルが観察される割合は94%（標準偏差〔SD〕＝1.9%）であった．±2 SD に基づき，*cyclin D1* 遺伝子のシグナル異常の定義を以下のように定めた．a）100個の間期核のうち20%以上の細胞が，3個以上のシグナルを示した際，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅陽性とした．b）*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅陽性症例のうち，シグナルが明るく，無数の細かなクラスター状の輝点を示した症例を HSR 陽性とした．

6. 免疫組織化学染色

対象は，FISH を施行した58例のうち治療開始前に当院にて原発部から生検を行い，10%のホルマリン固定パラフィン包埋切片を得ることができた48例である．10例は治療開始前の標本を確保できなかったため，対象から除外した．パラフィン包埋切片は約5 μm の厚さに薄切し，免疫組織染色を施行した．脱パラフィンした標本を，30% H_2O_2 1.5 ml＋PBS 150 ml によってペルオキシダーゼ活性を瞬滅した後，pH 6.0 クエン酸バッファー（ヤトロン社製）を添加してマイクロウェーブ加熱処理（500 w，12分）による抗原賦活法を行った．その後，アビジン-ビオチン（ABC）法にて免疫組織学的検討を行った．すなわち，一次抗体に対する非特異的反応をブロッキング（37℃，20分間）した後，抗 cyclin D1 ウサギポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology 社，Santa Cruz, CA, USA）を用いて一次抗体反応を行った．二次抗体反応には Dako LSAB2 Kit のビオチン化2次抗体（Dako 社，Carpinteria, CA, USA）を用い，さらに0.25%ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン複合体にて反応させ，ジアミノベンジジン溶液（Sigma, St. Louis, MO, USA）にて発色後，Meyer のヘマトキシリン液で核染色し，封入検鏡した．陰性コントロールとして，一次抗体を付加させなかった標本を用いた．染色レベルの評価は，症例の臨床背景を認知しない病理医により，癌病巣で染色された細胞の割合で3段階に判定した．すなわち，癌病巣全体のうち染色された癌細胞の割合が50%以上を強陽性（＋＋），5-50%を陽性（＋），5%未満を陰性（－）

と判定した．

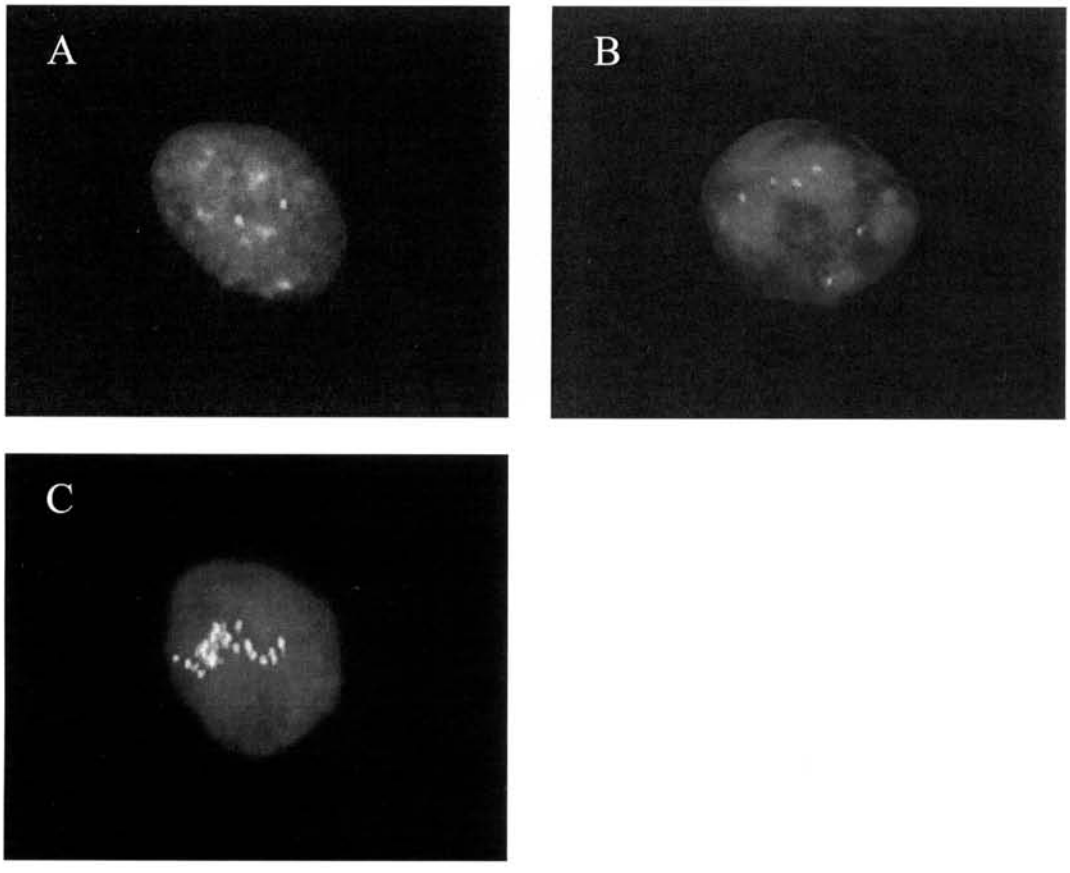
7．細胞培養と免疫細胞化学染色

ヒト頭頸部扁平上皮癌ヒト頭頸部扁平上皮がん細胞株HSC-2はJCRB（Japanese Collection of Research Bioresources）より譲渡された．この細胞株は，口腔底癌の頚部リンパ節転移巣から確立されたものである．標準培養液は100 IU/mlペニシリン，100 μg/mlストレプトマイシン，250 ng/mlアンホテリシンBを含むEagle's minimal essential medium（MEM）に10% FBSを混合して作成した．細胞は37度，5 %CO_2の条件下で培養したものを使用した．

HSC-2細胞は2×10^5個/mlに調整して24時間培養した後，EGF（湧永社，Tokyo, Japan）を添加した．EGFの最終濃度は1 ng/mlから10 μg/mlまで数段階に調整し，再び24時間培養した．1 %ホルマリンにて10分間固定後，ABC法にて免疫細胞化学染色を行った．EGF受容体（EGFR）に対する一次抗体として抗ヒトEGFR抗体（Novocastra Laboratories社，Newcastle upon Tyne, UK）を用いた．cyclin D1については免疫組織化学染色と同様の試薬を用いた．

8．統計学的検討

*cyclin D1*遺伝子，蛋白の発現と臨床病理学的因子との相関は，Kruskal-Walis test，Chi-square test，Fisher's exact testで評価した．*cyclin D1*遺伝子の異常増幅とcyclin D1蛋白の発現レベルの相関についてはMann-Whitney's U testとChi-square testで，*cyclin D1*遺伝子の異常増幅とNACの奏効度はFisher's exact testをそれぞれ使用し，検討した．ノンパラメトリック生存分についてはKaplan-Meier法を使用し，2群間の有意差検定はlog rank testで検討した．いずれ



第1図　間期核内*cyclin D1*遺伝子をターゲットとしたsingle-color FISH．*cyclin D1*遺伝子はオレンジ色の蛍光シグナルにより検出された（×600）．A：正常ヒト口腔扁平上皮細胞．核内に一対のシグナルとして，*cyclin D1*遺伝子が認められる．B：*cyclin D1*遺伝子の増幅例．核内に3個以上のシグナルが存在する．C：核内に，非常に輝度の強いクラスター状のシグナルが存在する．増幅した*cyclin D1*遺伝子のシグナルが，ある領域をもって斑紋上に検出されており，HSR（homogeneously staining region）と考えられる．（Ishiguro R et al：Anticancer Res, 5213–5220, 2003のFigure 1を改変，許可を得て転載）

も危険率 $p<0.05$ のとき統計学的に有意差ありと判定した．

結　果

1. *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と臨床病理学的パラメータ

58 例中 31 例（53%）において *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が認められた（図 1B，1C）．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と臨床的パラメータとの関連は第 3 表に示した通りであるが，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と，頭頸部扁平上皮癌患者の年齢，性別，T 分類，N 分類，および組織分化度との相関は認められなかった．しかし，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅は頭頸部扁平上皮癌の原発部によってその発生頻度が異なり，下咽頭癌で *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅の頻度が最も高かった（$p=0.0068$）．

第 3 表　*cyclin D1* 遺伝子の増幅と臨床病理学的因子との相関

CCND1 amplification	positive	negative	*p* value
Age (yrs)			
Average	64.9	62.8	
<60	12	11	NS*
≧60	19	16	
Gender			
Male	27	22	NS*
Female	4	5	
Primarysite			
Oralcavity	12	11	
Oropharynx	3	11	0.0068**
Hypopharynx	16	5	
Tcategory			
T1	2	0	
T2	8	12	NS***
T3	12	11	
T4	9	4	
Ncategory			
N0	5	3	
N1	6	3	NS***
N2	19	19	
N3	1	2	
Histological differentiation			
Grade1	13	11	
Grade2	11	11	NS***
Grade3	7	5	

NS：not significant
*：Fisher's exact test
**：Kruskal-Wallis rank test
***：chi-square test
(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Table 2 を改変，許可を得て転載．)

2. *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と NAC の奏効度

本研究では，32 例の頭頸部扁平上皮癌に対しシスプラチンと 5-FU による NAC を施行した．原発部の内訳は，舌・口腔底癌 14 例，中咽頭癌 7 例，下咽頭癌 11 例であった．その効果判定は 19 例が PR，13 例が NC であり，CR，PD を呈した例はなかった．PR 群 19 例のステージ分類は，StageⅡが 1 例，StageⅢが 3 例，StageⅣが 15 例であり，一方 NC 群 13 例は，StageⅡ，StageⅢ，StageⅣがそれぞれ 1 例，2 例，10 例であった（第 4 表）．PR 群と NC 群の 2 群間で，その原発部，ステージ分類，年齢，組織学的分化度の各々の因子の偏りについて比較検定したが，有意差は認めなかった．しかしながら，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を認めない 19 例のうち 15 例（79%）において NAC の効果が PR を示したのに対し，異常増幅を認めた症例 13 例で PR を示したのは 4 例（31%）のみであった（第 5 表）．したがって，NAC の奏効率と *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅との関連が示唆された（$p=0.011$）．一方，免疫組織化学染色の結果により，強陽性群とそれ以外の群での NAC 奏功率を比較したが，有意差は認めなかった．

3. *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と cyclin D1 蛋白の過剰発現

免疫組織化学染色により，癌細胞の核内に存在する

第 4 表　neoadjuvant chemotherapy（NAC）による治療を受けた頭頸部扁平上皮癌 32 例の臨床病期分類．

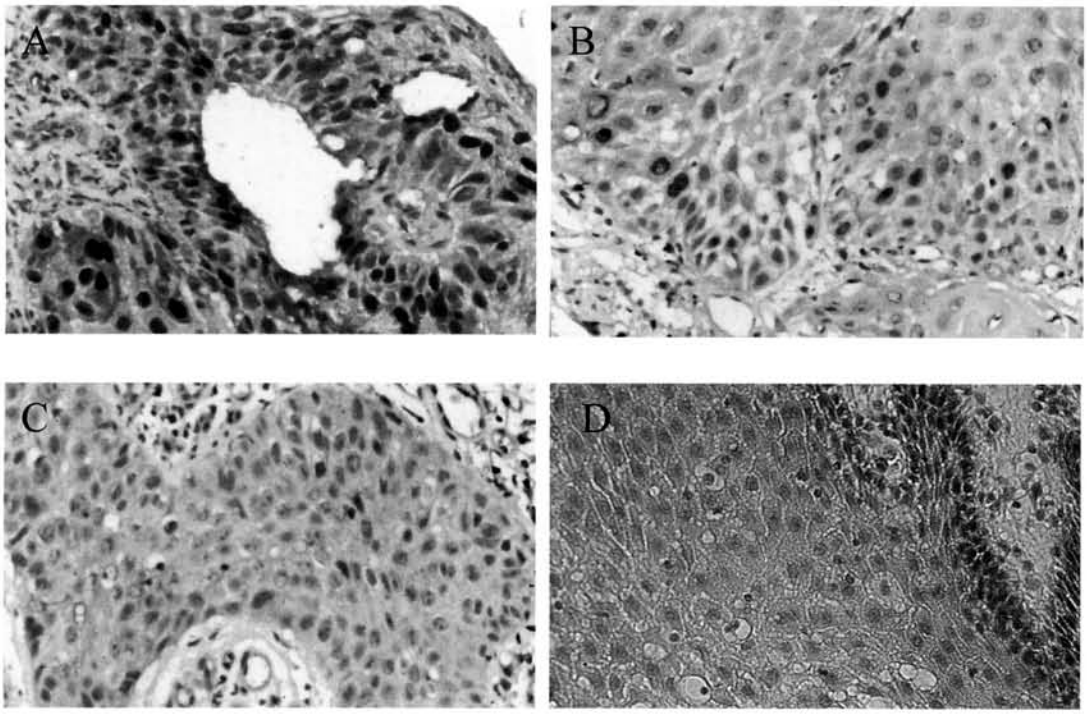
	responder group	non-responder group
Staging (UICC)		
Stage II	1	1
Stage III	3	2
Stage IV	15	10
Total	19	13

(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Table 2 を改変，許可を得て転載．)

第 5 表　*cyclin D1* 遺伝子の増幅と，シスプラチン，5-FU による NAC の効果との相関

Response to chemotherapy	*CCND1* amplification	
	positive (n=13)	negative (n=19)
responder group	4	15
non-responder group	9	4
response rate	31%	79%

$p=0.011$ (Fisher's exact test).
(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Table 4 を改変，許可を得て転載)



第2図　cyclinD1 蛋白に対する免疫組織化学染色（×100）．A：強陽性の1例．病巣内の50%以上の癌細胞が陽性である．B：陽性の1例．5-50%の癌細胞が陽性である．C：陰性の1例．0-5%の癌細胞が陽性である．D：正常扁平上皮．（Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Figure 2 を改変，許可を得て転載．）

cyclin D1 蛋白が染色された（第2図）．しかし，癌病巣の部位により染色核の濃度，形状は異なっており，また染色された細胞核の分布は均一ではなかった．すなわち，分裂能の高い癌細胞の核は，周囲の正常扁平上皮組織の核と比較し，強く染色される事が確認されたが，同一の癌病巣内で詳細に検討すると，その核染色の度合いに差が認められたため，病理医による染色レベルの評価を行った．第6表に，FISH で検出された *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅の有無と，cyclin D1 蛋白の発現との関連を示した．免疫組織化学染色を施行した48例のうち18例（37.5%）が強陽性（＋＋），12例（25.0%）が陽性（＋），18例（37.5%）が陰性（－）であった．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を示す27例では，強陽性が17例，陽性が5例を占め，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を示さない21例では13例が陰性であった．この結果から，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を示す症例は，cyclin D1 蛋白も過剰に発現する傾向があると考えられた（$p = 0.003$）．

第6表　*cyclin D1* 遺伝子の増幅と，cyclin D1 蛋白の発現との相関

CCND1 amplification	Cyclin D1 overexpression in IHC			
	(－)	(＋)	(＋＋)	Total
Positive	5	5	17	27
Negative	13	7	1	21
Total	18	12	18	48

IHC：immuhohistochemistry staining
$p = 0.003$ (Mann-Whitney's U test).
(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Table 5 を改変，許可を得て転載)

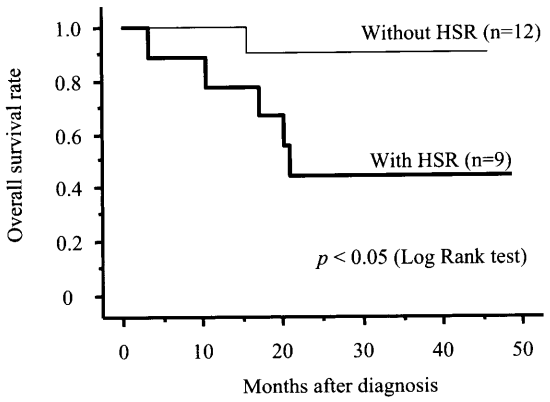
4. 頭頸部扁平上皮癌細胞における HSR

HSR は，間期核 FISH においては明るく，細かなクラスター状の蛍光シグナルとして検出される（第1図C）．本研究では14例が HSR を示したが，そのうち13例（93.0%）が免疫組織化学染色にて強陽性を示した．したがって，HSR を呈する腫瘍細胞は cyclin D1 蛋白を過剰発現する傾向が特に強いことが示唆された（$p < 0.0001$，第7表）．HSR は下咽頭癌9例，中咽頭癌1例，舌・口腔底癌4例で認められ，他の原発部と比較して下咽頭癌で有意に高率に発現する傾向があった（$p = 0.033$，第8表）．下咽頭癌症例21例を，HSR を発現した群（9例）と発現しない群（12例）に分類して予後を比較した．ステージ分類は2群間に有意差を認めなかったが，HSR 発現群では生存率が有意に低かった（$p <$

第7表　cyclin D1 蛋白の過剰発現と *cyclin D1* 遺伝子の増幅形態との相関

CCND1 amplification with HSR	Cyclin D1 overexpression in IHC			
	(−)	(+)	(++)	Total
Positive	0	1	13	14
Negative	18	11	5	34
Total	18	12	18	48

IHC：immuhohistochemistry staining
HSR：homogeneously staining region
$p < 0.0001$ (Mann-Whitney's U test).
(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Table 6 を改変，許可を得て転載)



第3図　Kaplan-Meier 法による，下咽頭癌 21 例の生存曲線．*cyclin D1* 遺伝子の増幅が HSR を示す群と，示さない群とに分類し検討した．2群間の生存率に統計学的有意差を認めた（$p < 0.05$, Log Rank test）．(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Figure 3 を改変，許可を得て転載．)

0.05，第3図）．また，HSR を発現しない群のうち 10 例（83%）では救済手術により喉頭を温存可能であったが，HSR 発現群では2例（22%）の温存率であった．

5．頭頸部扁平上皮癌細胞株における cyclinD 1 蛋白に対する EGF の影響

頭頸部扁平上皮癌において，cyclin D1 蛋白の過剰発現に影響をあたえる因子の存在を確認するため，頭頸部扁平上皮癌細胞 HSC-2 に対して，EGF を添加，培養し免疫染色を施行した．まず HSC-2 において EGFR が発現していることを確認した（第4図A）．その結果，細胞膜（細胞質）にびまん性の染色を認め，EGFR の発現を確認した．HSC-2 は EGF を添加しない培地での培養では，ほとんど cyclin D1 蛋白を発現していなかった（第4図B）．しかし，添加培地での培養を経た細胞は，1 ng/ml から 10 μg/ml まですべての EGF の濃度段階において cyclin D1 蛋白の過剰発現を認めた．（第4図C）．一方，EGF 添加培地で培養後の HSC-2 に対し FISH を施行したが，遺伝子の増幅は認められなかった．

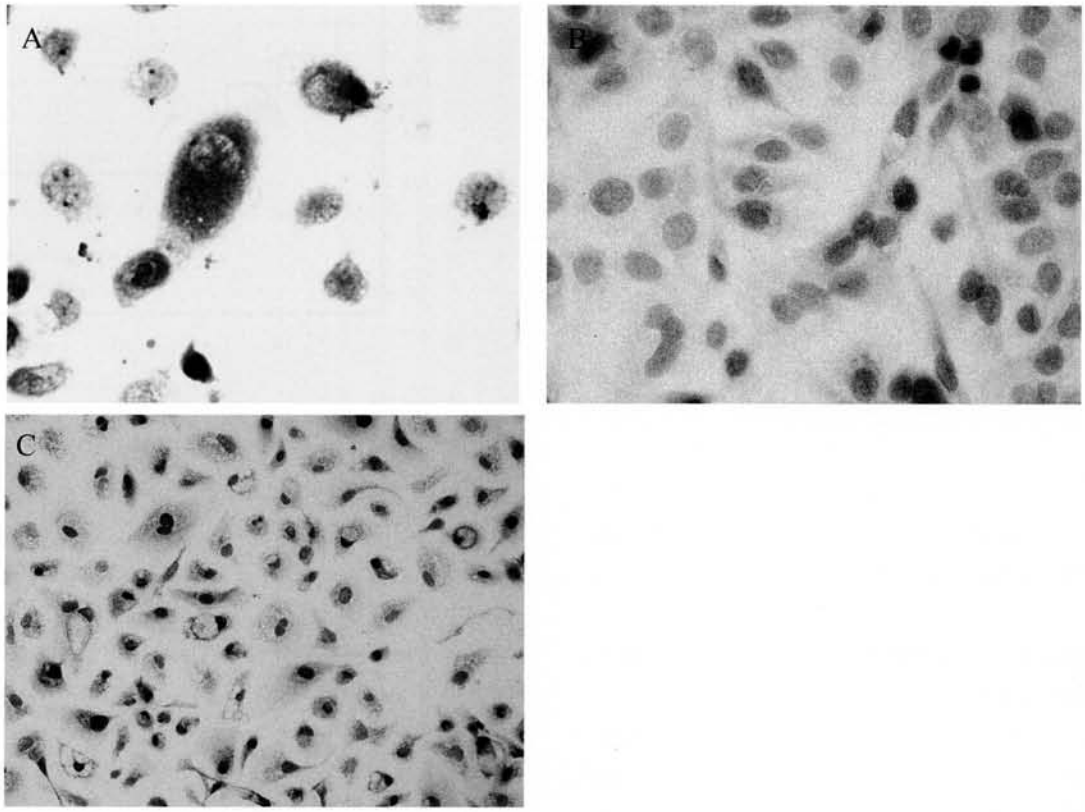
考　察

頭頸部扁平上皮癌において，cyclin D1 の果たす役割が重要であり，その異常が予後を悪化させる因子の一つであるとする研究は多く報告されている．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅は，たとえば局所浸潤，リンパ節転移発生率，ステージ分類による進行度，再発率，分化度，そして手術における切除断端の陽性率と関連が認められると報告されている[12, 14]．頭頸部扁平上皮癌における予後因子としての cyclin D1 の重要性を確認するため，本研究では，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と，cyclin D1 蛋白の過剰発現を FISH，免疫組織化学染色を用いて検出した．近年，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅や蛋白の過剰発現を検出するために，Southern blotting，PCR 法，免疫組織化学染色などを用いた報告が多い[8, 14, 15]．本研究では，治療前に FNA biopsy を用いて採取した検体により FISH を施行し，*cyclin D1* 遺伝子の異常を検出することを試みた．Southern blotting は検出に必要な高純度の精製 DNA を採集するため比較的多くの検体を必要とするが，原発部が小さい頭頸部癌症例では充分なサンプルが得ることができない．PCR 法では壊死組織や，正常細胞の混入が大きな問題となる．免疫組織化学

第8表　cyclin D1 遺伝子の増幅形態と原発部位との相関

CCND1 amplification with HSR	Primary site of HNSCC			
	Oral cavity	Oropharynx	Hypopharynx	Total
Positive	4	1	9	14
Negative	19	13	12	44
Total	23	14	21	58

IHC：immuhohistochemistry staining
$p = 0.003$ (chi-square test).
(Ishiguro R et al：Anticancer Res. 5213-5220, 2003 の Table 7 を改変，許可を得て転載)



第4図　頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC-2 における EGFR，cyclin D1 蛋白に対する免疫組織化学染色（A，B：×100，C：×200）．A：HSC-2 の細胞膜にびまん性の染色を認め，EGFR の発現を確認した．B：EGF を添加しない培地で培養された HSC-2 細胞株．cyclin D1 蛋白の発現はほとんど認められなかった．C：1 ng/ml に EGF を調整した培地で 24 時間培養した HSC-2 細胞株．核が濃染され，cyclin D1 蛋白の過剰発現を示した．

染色は，抗原の存在，局在を確認することが可能であるが，遺伝子レベルでの異常は検出することができない[12]．FISH は遺伝子の point mutation を検出することは不可能であり，定量化が困難であるという欠点を持つが，微少検体においても遺伝子の異常増幅，欠失，再配置などを同定することが可能である．早期の下咽頭癌や喉頭癌では，全身麻酔下においても，生検ではごく少量の腫瘍細胞しか得られないことが通常であるが，FNA biopsy では，装着する針のサイズを適宜変更することで，微少検体からも FISH を施行するために充分な量の間期核細胞を採取することが可能であった．したがって，FNA biopsy を用いて FISH を施行することは，治療前に施行可能であり，情報量が多く，かつ患者の苦痛が少ない非侵襲的検査として有用であると考えられる．

本研究において，FISH にて *cyclin D1* 遺伝子の増幅が陽性であったにも関わらず，蛋白を発現しなかった症例が5例存在した．その理由について以下のように考察する．本研究では，シングルカラー FISH により *cyclin D1* 遺伝子のみをターゲットに遺伝子の異常増幅を検出した．したがって，*cyclin D1* 遺伝子のみが異常増幅している状態であるのか，あるいは 11 番染色体自体が増加しているポリソミーの状態であるかという判別が困難であった．これはシングルカラー FISH の限界である．一方，ダブルカラー FISH は染色体のセントロメアを *cyclin D1* 遺伝子と同時に検出し，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅と 11 番染色体コピー数の増加とを判別することが可能である．11 番染色体のポリソミーにおいても cyclin D1 蛋白は過剰発現しているという報告も存在するが[13]，現在のところ明確な結論は出ていない．しかし，その染色体の量的な増加の意義が明らかではないポリソミーは，その病的意義についても不明な点が多い．さらに，ポリソミーと遺伝子の異常増幅はその発生する機構が全く異なり，遺伝子の増幅の方がはるかに複雑な事象であると考えられるため，HSR とポリソミーを遺伝子増幅群として同一のカテゴリーに含めて検討することは適切でない可能性がある．

また，本研究では，*cyclin D1* 遺伝子が増幅していないにもかかわらず，cyclin D1 蛋白が過剰発現している

例が8例認められた．cyclin D1の発現は他の多くの因子によって影響を受け，たとえばp53，p21，p16，EGFなどが過剰発現を誘導することが報告されている[16, 17]．p16は，癌抑制遺伝子の一つとして知られており，その遺伝子の欠失と *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が相互に影響をおよぼし，扁平上皮癌の予後を悪化させる[18]．近年Wiechらは，胃癌細胞株にEpstein-Barr virus由来の癌遺伝子である *BARF1* を導入したところ，cyclin D1蛋白の過剰発現が確認されたが，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅は認められなかったと報告した[19]．また，前立腺癌細胞においてEGFを添加し培養したところ，同様に *cyclin D1* 遺伝子の増幅を認めることなく，cyclin D1蛋白が過剰発現したという報告[10]もある．本研究では，頭頸部扁平上皮癌細胞株HSC-2において，cyclin D1の発現に対するEGFの影響について検討した．その結果，EGFRを発現しているHSC-2は，EGFの添加培地で培養することにより，*cyclin D1* 遺伝子の増幅を経ることなくその蛋白が過剰発現することが確認された．この結果から，頭頸部扁平上皮癌細胞においても，cyclin D1蛋白の過剰発現は *cyclin D1* 遺伝子の増幅以外の要因により影響を受ける可能性があることが示唆された．化学療法奏功度とcyclin D1蛋白発現の有無についての検討において，cyclin D1蛋白強陽性群は非強陽性群に対して，化学療法の効果に有意差が認められなかったという結果にも，EGFのような因子は影響している可能性があり，さらなる検討が必要であると考えられた．

シスプラチンは，頭頸部扁平上皮癌の化学療法において，重要なkey drugである．シスプラチンは，DNAの構成塩基であるグアニン，アデニンのN-7位に結合する．そして，2つの塩素原子部位でDNAと強固に結合し，DNA鎖内には架橋が形成される．こうしてDNA複製を阻害することで，DNA合成期であるS期の遅延を引き起こすのみならず，結果的にDNAに損傷を与えることから，S期からG2期，またG1期からS期への移行をも抑制するとされる[20]．Bruceらの分類[21]では，シスプラチンは細胞の増殖相および非増殖相に同等の効果を示すcell cycle non-specific agentに属しており，癌細胞の細胞周期全体を遅延化し，その細胞毒性によって損傷したDNAの修復により多くの時間を費やさせる作用を持っている[22, 23]．5-FUは代謝拮抗薬としてDNAに取り込まれるため，DNA合成を阻害する作用を持ち，腫瘍細胞の分裂を抑制し，また細胞周期をG2期に停止させる働きがあることが知られている[20]．したがって，シスプラチンと5-FUの併用は，単剤による治療よりも抗腫瘍効果が高いとされ，長く頭頸部扁平上皮癌治療に使用されてきた．現在のところcyclin D1がシスプラチン，5-FUの効果を減弱させる機構については完全に明らかになってはいないが，DNAの複製を阻害し，細胞周期を遅延させる化学療法の作用に対し，cyclin D1は分裂停止のシグナルを無視してG1期とS期の境界であるrestriction pointを強引に通過させる作用，またS期からG2期への移行を促す作用をもつと報告されており[24]，その遺伝子の増幅が化学療法の効果への抵抗性の指標として有用である可能性があると考えられる．近年，NACが生存率の向上に寄与しないとの報告がなされている[25]．すなわち頭頸部扁平上皮癌のNACに対する反応は，症例ごとに異なっており，進行した頭頸部扁平上皮癌症例でNACの効果が認められない場合は根治的治療の遅れにつながり，予後を悪化させるというものである．確かに，NACが奏効しない症例は，薬剤による副作用のために，根治的手術が可能となるまで数週間の待機を必要とする可能性もあるが，化学療法の効果を予測することができれば，根治的手術や放射線療法などの選択をより早く的確に行うことができると考えられる．本研究では，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅の有無と頭頸部扁平上皮癌症例におけるシスプラチンと5-FUを用いたNACの効果との関連が示唆され，この結果は，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が予後の予測因子として腫瘍の悪性度を反映する可能性があるとする報告[7, 14, 15, 26, 27]と矛盾しない．また，ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株や膵臓癌細胞株にantisense *cyclin D1* を導入したところシスプラチン，および5-FUの細胞毒性への感受性が上昇したとする報告があり[24, 28]，cyclin D1が化学療法の効果に対して何らかの影響を与えることが強く示唆される．文献的には，cyclin D1蛋白過剰発現群でシスプラチンと5-FUによる化学療法が奏効したという報告[20]があるものの，cyclin D1蛋白の過剰発現および遺伝子の増幅が頭頸部扁平上皮癌の予後不良因子であるとする報告が多く[6, 29, 30]，今後さらに検討が進められるものと思われる．

頭頸部領域において，下咽頭癌はもっとも悪性度が高く，予後不良な悪性腫瘍の一つとして知られている[31]．下咽頭癌の治療方針として根治的手術の有用性は明らかであるが，著者は初回治療としてNACあるいは化学放射線療法を施行後に臓器温存によるQOLの改善を目的とした救済手術を施行している．手術に際しては高い生存率と局所制御を目標とすることは当然であるが，QOLの観点からは特に喉頭機能温存が重要である．放射線療法は，臓器温存によるQOLの維持に優れるが，

癌の制御が困難となった場合，予後は非常に悪化する．今回の検討では，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅は下咽頭癌に有意に多く，中でもHSRを示す症例が多かった．そして，初回治療として化学放射線療法の適応となった場合，HSRを示した群は，HSRを示さなかった群と比べて有意に生存率が低く，さらに喉頭温存率も低い傾向にあった．現在，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅のパターンと，腫瘍悪性度との関連は報告されていない．しかし，HSRを示す症例はcyclin D1蛋白の過剰発現の誘因となり，化学療法や放射線療法に対して抵抗性を持つ可能性がある．また，DNAの複製やDNAの障害を検査するチェックポイントが，cyclin D1蛋白によりG1期からS期への移行が促進されることで十分に機能せず，遺伝子の誤ったコピーを作り続けることで，いわゆるgenomic instability（遺伝的不安定性）を招く．HSRを呈する下咽頭癌においては細胞周期チェックポイント機能の破綻が著しく，下咽頭癌細胞の異常増殖の大きな要因の一つとなりうる．したがって，genomic instabilityの指標としてのHSRの有用性についても今後検討されるべきと考える．患者の状態によって，最良の治療を選択するいわゆるオーダーメイド治療を厳密に施行することは困難であるが，本研究の結果から，FISHによって検出される *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が，臓器温存を目指すNACや化学放射線療法などを施行する際の予後予測因子となりうることが示唆され，特にHSRを伴う *cyclin D1* の異常増幅を示す症例では，より強力な治療法を選択する必要があると考えられた．

総　括

1. 頭頸部扁平上皮癌58例中31例（53%）において *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が認められた．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅の頻度は下咽頭癌で最も高かった．
2. 32例の頭頸部扁平上皮癌に対しシスプラチンと5-FUによるNACを施行した．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を認めない19例のうち15例（79%）においてNACの効果がPRを示したのに対し，異常増幅を認めた症例13例でPRを示したのは4例（31%）のみであり，NACの奏効率と *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅との関連が示唆された．
3. *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を示す27例は免疫組織化学染色で，強陽性は17例，陽性は5例を占め，*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を示さない25例は13例が陰性であった．*cyclin D1* 遺伝子の異常増幅を示す症例は，cyclin D1蛋白も過剰に発現する傾向が示唆された．
4. 14例が *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅の一形態であるHSRを示したが，13例（93.0%）が免疫組織化学染色にて強陽性を示し，HSRを呈する腫瘍細胞はcyclin D1蛋白を過剰発現する傾向が特に強いことが示唆された．HSRは下咽頭癌9例，中咽頭癌1例，舌・口腔底癌4例で認められ，下咽頭癌において有意に高率に発現する傾向があった．下咽頭癌症例21例を，HSRを発現した群（9例）と発現しない群（12例）に分類し化学放射線療法を施行した場合，HSR発現群は有意に生存率が悪化した．HSRを発現しない群のうち10例（83%）は，救済手術により喉頭を温存可能であったが，HSR発現群では2例，22%の温存率であった．

以上より，頭頸部扁平上皮癌において，FISHにより *cyclin D1* 遺伝子の異常増幅が検出可能であり，NACや放射線化学療法の効果を予測するマーカーとしての有用性が示唆された．

謝　辞

稿を終えるに当たり，御指導を賜りました慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室小川郁教授に深甚なる謝意を表します．本研究に対して直接御指導いただきました藤井正人客員准教授（現独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター部長）に深謝いたします．また，御指導，御助言をいただきました病理学教室亀山香織講師に厚く感謝いたします．さらに，本研究にご協力いただきました耳鼻咽喉科学教室諸兄に心より御礼申し上げます．

本研究の要旨は第60回日本癌学会（2001年　横浜），第38回日本癌治療学会（2000年　仙台），第25回，第28回日本頭頸部腫瘍学会（現日本頭頸部癌学会，2001年　札幌，2004年　福岡）において発表した．

また，本研究の一部は文部科学省科学研究費奨励研究A（平成13年度　No. 13770982）により行われた．

本論文はIshiguro R，Fujii M，Yamashita T，Tashiro M，Tomita T，Ogawa K，Kameyama K：*CCND1* amplification predicts sensitivity to chemotherapy and chemoradiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. Anticancer Res 23：5213-5220，2003の一部を含む

文　献

1) Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK：Head and neck cancer. N Engl J Med 328：184-194, 1993.
2) Boring CC, Squires TS, Tong T：Cancer statistics 1993. CA Cancer J Clin 44：7-26, 1993.
3) Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clerke Pearson DL, Marks P：Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. Cancer Res 50：4087-4091, 1990.
4) Nagai MA, Pacheco MM, Oshima CT, Brentani MM：c-erbB-2 DNA amplification and mRNA expression in human primary breast tumors and its relationship to other prognostic factors. Cancer Biother 8：29-35, 1993.
5) Hall M, Peters G：Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors in human cancer. Adv Cancer Res 68：67-108. 1996.
6) Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, et al：Overexpression of cyclin D 1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 123：497-502, 1997.
7) Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, Erickson NL, Williams ME：Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous carcinoma：association with poor prognosis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121：709-794, 1995.
8) Wang MB, Alavi S, Engstrom M, Lee J, Namazie A, Moatamed F, Srivatsan ES：Detection of chromosome 11q13 amplification in head and neck cancer using fluorescence in situ hybridization. Anticancer Res 19：925-931, 1999.
9) Skapek SX, Rhee J, Spices DB, Lassar AB：Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. Science 267：1022-1024, 1995.
10) Perry JE, Grossmann ME, Tindall DJ：Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. Prostate 35：117-124, 1998.
11) Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG：PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 74：152-158, 1994.
12) Fujii M, Ishiguro R, Yamashita T, Tashiro M：Cyclin D1 amplification correlates with early recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue. Cancer Lett 172：187-192, 2001.
13) Miyamoto R, Uzawa N, Nagaoka S, Nakakuki K, Hirata Y, Amagasa T：Potential marker of oral squamous cell carcinoma aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspiration biopsies. Cancer 95：2152-2159, 2002.
14) Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, Sakaida N, Okamura A, Iwanaga M, Shintaku M, Yamashita T, Hiai H, Fukumoto M：Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 74：576-581, 1997.
15) Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR：Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. Cancer 79：380-389, 1997.
16) Kanda Y, Nishiyama Y, Shimada Y, Imamura M, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M：Analysis of gene amplification and overexpression in human esophageal-carcinoma cell lines. Int J Cancer 58：291-297, 1994.
17) Zhou P, Jiang W, Weghorst CM, Weinstein IB：Over expression of cyclin D1 enhances gene amplification. Cancer Res 56：36-39, 1996.
18) Uzawa N, Sonoda I, Myo K, Takahashi K, Miyamoto R, Amagasa T：Fluorescence in situ hybridization for detecting genomic alterations of cyclin D1 and p16 in oral squamous cell carcinomas. Cancer 15：2230-2239, 2007.
19) Wiech T, Nikolopoulos E, Lassman S, Heidt T, Schopflin A, Sarbia M, Werner M, Shimizu Y, Sakka E, Ooka T, Zur Hausen A：Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. Virchows Arch 452：621-627, 2008.
20) Akervall JA, Brun E, Dictor M, Wennerberg J：Cyclin D1 overexpression versus response to induction chemotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck. Acta Oncol 40：505-511, 2001.
21) Bruce WR, Meeker BE, Valeriote FA：Comparison of the sensitivity of normal hematopoietitc and transplanted lymphoma colony-forming cell to chemotherapeutic agents administered in vivo. J Nat Cancer Inst 37：233-245, 1966.
22) Fujimura F：Effect of cisplatin and pepleomycin on cell cycle in oral cancer. J Fukuoka Dent Coll 20：211-229, 1993.
23) Warenius HM, Seabra LA, Maw P：Sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum in human cancer cells is related to expression of cyclin D1 but not c-raf-1 protein. Int J Cancer 67：224-231, 1996.
24) Wang MB, Yip HT, Srivatsan ES：Antisense cyclin D1 enhances sensitivity of head and neck cancer cells to cisplatin. Laryngoscope 111：982-988, 2001.
25) Haas J, Toohill R, Haas C：The effect of delaying standard treatment for induction chemotherapy in advanced head and neck cancer. Am J Clin Oncol 10：116, 1987.

26) Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Neri G : Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas : prognostic significance and clinical implications. Clin Cancer Res 2 : 175-180, 1996.
27) Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traserra J, Cardesa A : PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. Cancer Res 54 : 4813-4817, 1994.
28) Kornmann M, Danenberg K, Arber N, Beger H, Danenberg P, Korc M : Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes. Cancer Res 59 : 3505-3511, 1999.
29) Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP : Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. J Oral Pathol Med 28 : 165-169, 1999.
30) Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A : Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 55 : 975-978, 1995.
31) Ho CM, Lam KH, Wei WI, Yuen PW, Lam LK : Squamous cell carcinoma of the hypopharynx-analysis of treatment results. Head Neck 15 : 405-412, 1993.