

博士論文

頭頸部扁平上皮癌における  
遺伝子変異と蛋白表現型による p53 機能分類

小 林 謙 也

## 目次

要旨	3
序文	4
目的	12
方法	12
結果	
1 本検討症例の内訳	32
2 p16 陽性中咽頭癌の遺伝子変異と予後	35
3 p16 陽性中咽頭癌を除外した頭頸部扁平上皮癌の遺伝子変異	40
4 TP53 ミスセンス変異の解析	40
5 TP53 変異と p53 蛋白表現型の検討	42
6 各遺伝子変異ステータスや蛋白表現型の予後との相関	45
7 遺伝子変異と蛋白表現型を併用した p53 機能分類の予後との相関	51
8 外科的切除断端と p53 機能分類の局所予後との相関	56
考察	66
参考文献	75
謝辞	82

## 要旨

外科的治療された 317 例の頭頸部扁平上皮癌を対象に、次世代シーケンサーを用いた *TP53*、*PIK3CA*、*AKT*、*HRAS* の遺伝子変異解析、及び免疫染色による p53、p16 蛋白表現型解析を施行し、臨床予後との相関、腫瘍の分子生物学的特徴を検討した。

p16 陽性中咽頭癌はその他の頭頸部癌より予後良好であったが、*TP53* 変異は予後因子とならなかった。p16 陽性中咽頭癌を除外した頭頸部扁平上皮癌において、*TP53* 遺伝子変異と p53 蛋白表現を併用解析した p53 機能分類は粗生存、局所無再発生存、遠隔無再発生存に対する独立した予後因子であった。p53 機能不良群では、外科的に十分な断端距離で切除されていても局所無再発生存率が低かった。

## 序文

### 1 頭頸部扁平上皮癌について

頭頸部扁平上皮癌は世界で 6 番目に多い癌腫とされており (1)、2014 年の米国調査においては全米第 9 位であった (2)。本邦においても、地域がん登録を集計した 2012 年度の「がん情報サービス」によると、口腔・咽頭・喉頭癌は年齢調整罹患率で第 9 位と報告されている (3)。一言で頭頸部癌といっても発生部位はさまざま、複雑な解剖構造を呈する頭頸部領域すべてに起こりうる。主な発生頻度は日本頭頸部癌学会の 2013 年度頭頸部悪性腫瘍全国登録報告によると、口腔癌 2202 例 (29.5%)、喉頭癌 1520 例 (20.4%)、下咽頭癌 1481 例 (19.8%)、中咽頭癌 1099 例 (14.7%)、大唾液腺癌 400 例 (5.4%)、上顎癌 290 例 (3.9%)、上咽頭癌 236 例 (3.2%)、鼻腔癌 230 例 (3.1%) であった (4)。部位別発生頻度の推移を見てみると、口腔癌は微増、喉頭癌は減少、中下咽頭癌は増加傾向にある (5)。これには頭頸部癌特有のリスク因子が関与しており、喉頭癌の減少には喫煙率の低下が、中咽頭癌の増加にはヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) の増加が、下咽頭癌の増加には飲酒の関与が指摘されている。

頭頸部癌のリスク因子として、先に述べたように、飲酒、喫煙、ウイルスなどがあげられる。飲酒者の発癌リスクはエタノールの代謝産物であるアルデヒドの濃度を規定するアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase: ADH) とアルデ

ヒト脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase: ALDH) の酵素活性と関連しており、この二つの代謝酵素の遺伝子多型の影響を強く受けている。黄色人種では白人・黒人種と比較して、酵素活性が低い変異型ヘテロ接合体や、ホモ接合体を持つ頻度が高く、欧米人と異なる日本人特有の発癌リスク因子と考えられている(6,7)。

喫煙に関しては煙に含まれる 70 以上の発癌物質が、DNA 付加や変異、炎症、酸化ストレス、エピジェネティックな変化をもたらし、発癌につながると考えられている(8)。たばこ煙中の発癌物質は体内で代謝され解毒・排泄される一方で、DNA に結合することで DNA 付加体 (DNA adduct) が生じ、miscoding や変異をもたらし、DNA の不安定性が生じる。さらに、DNA 付加体のがん遺伝子やがん抑制遺伝子に生じると、その機能に異常をきたし、これらの蓄積により発癌に至る。一例としてベンゾピレンは TP53 に DNA 付加体を生じることが知られており、頭頸部癌の発癌に強く関与していると考えられている(9)。

ウイルスに関しては、中咽頭癌において HPV が、上咽頭癌において Epstein-Barr virus (EBV) が関与している。特に近年、喫煙習慣が減少している欧米諸国では喫煙関連の頭頸部癌は減少しており、高リスク型 HPV 感染者の中咽頭癌が注目されている。HPV 感染後の宿主側の発癌メカニズムは十分には解明されていないが、扁桃窩の上皮は薄く、HPV 感染に理想的な環境と考えられている。欧米では、中咽頭癌における HPV 陽性率は近年では 80-90%と報告されており(10)、

本邦でも 2008 年から 2010 年での HPV 陽性率は 50.3%であったと報告されており (11,12)、今後さらなる増加が予測される。

頭頸部癌は、解剖学的な発生部位、腫瘍の生物学的性質、嚥下・発声・呼吸といった機能を考慮しつつ治療方針が決定される。その治療は、手術、放射線、化学療法 of のいずれか、あるいはその組み合わせにより施行されることが多い。HPV 陽性中咽頭癌や早期喉頭癌では放射線の感受性が高いことから、化学放射線治療による治療を施行することもあるが、未だ多くの進行頭頸部癌では外科的治療を中心とした加療が施行されている。

予後においては、2014 年度に全国で 10155 人が頭頸部癌で死亡し、全癌死の約 2.8%を占めている。年齢調整死亡率の推移は男女ともに喉頭癌は減少傾向にあるも、口腔・咽頭癌においては増加傾向にあり (3,13)、今後もさらなる発癌予防、治療開発が求められている。

## 2 頭頸部扁平上皮癌における遺伝子変異の特徴と今後の展望

癌の大規模遺伝子配列解析を包括的網羅的に施行した The Cancer Genome Atlas (TCGA) project のなかで、頭頸部扁平上皮癌は 279 例の全エクソン解析が行われた。この解析で明らかになったことは、1) HPV 関連の予後良好なサブグループの存在、2) 治療ターゲットとなる druggable 変異の出現頻度は低い、3) 変

異頻度が多かった遺伝子は *TP53* (72%)、*FAT1* (23%)、*CDKN2A* (22%)、*PIK3CA* (21%)、*NOTCH1* (19%)、*KMT2D* (18%)、*NSD1* (10%) ということであった (14)。

HPV 関連頭頸部癌はウイルス蛋白である E6・E7 が、がん抑制遺伝子である *TP53*、*RBI* の機能を抑制し発癌に至ると考えられている。TCGA の症例群では 279 例中 35 例が HPV 関連頭頸部癌であったが、HPV 非関連頭頸部癌に比較して、遺伝子や染色体の異常が少なく、*TP53* 変異や *HRAS* 活性型変異、*CDKN2A* 変異・欠失も少なかったが、*PIK3CA* 変異だけは比較的多かった。HPV 関連頭頸部癌は *TP53*、*CDKN2A* の不可逆的機能不全が生じていないため、いかなる治療に対しても治療効果が高いことが分かっており、これを受けて UICC/AJCC (Union Internationalis Contra Cancrum/American Join Committee on cancer) の TNM 分類第 8 版において、HPV 関連中咽頭癌の大幅な down staging が行われた (15)。

一方で HPV 非関連頭頸部癌では、HPV 関連頭頸部癌に比較してゲノム異常が多いことが分かっており、TCGA 症例群では *TP53* 変異は 83%、*PIK3CA* 変異は 18%、*PTEN* 変異は 12%、*HRAS* 変異は 5% で発現していた。しかしながら、特定のがん遺伝子の活性型変異有無による明確なサブグループは同定できなかった。HPV 非関連頭頸部癌は特定のがん遺伝子の活性型変異により発症するのではな

く、様々な遺伝子変異が蓄積した結果、がん抑制遺伝子の不可逆的な機能不全が生じ発癌に至る。このため治療効果が低く予後不良であると考えられている。

Heterogeneous な頭頸部扁平上皮癌において、*TP53* 変異は多くの症例で生じており、*TP53* 変異と臨床予後を詳細に検討することが重要と考えられた。

以上のように、TCGA project により頭頸部扁平上皮癌における遺伝子変異の全体像が明らかになった現在においても、蛋白表現型や臨床像との関連については未解明の課題が残されている。今後は、膨大なデジタルデータを用いたバイオインフォマティクス研究が求められており、ゲノム情報と臨床情報を詳細に検討し個別化治療の構築を目指す取り組みが求められている。

### 3 頭頸部扁平上皮癌における *TP53* 変異と予後

*TP53* 変異は頭頸部扁平上皮癌において最も高頻度に出現する変異であり、HPV 非関連頭頸部扁平上皮癌においては、60-85%の頻度と報告されている(14,16,17)。*TP53* 変異は予後と密接に関与していることが明らかになっているが(18)、日常診療においてルーチンでは使用されていない。この理由として、*TP53* 変異が p53 蛋白に与える影響が多様であることが挙げられる。

*TP53* のナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常は単独で p53 蛋白の機能不全を引き起こすが、*TP53* ミスセンス変異は変異部位、アミノ

酸置換の種類により、p53 蛋白に及ぼす影響は様々である。あるミスセンス変異を有する癌の予後は野生型 *TP53* と変わらない一方で、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常と同様に予後不良なミスセンス変異も報告されている。さらに、*TP53* はがん抑制遺伝子であり、通常は機能欠失型変異により機能不全が生じるが、近年、*TP53* 機能獲得型ミスセンス変異も報告されており、この変異は予後不良因子であるという報告がある (19)。これまでアミノ酸置換部位や蛋白構造変化に基づいた様々な *TP53* ミスセンス変異の予後分類が報告されているが (18,20)、現時点ではコンセンサスは得られておらず、日常診療に活用されていない。

さらに、DNA はそれ自体に機能があるわけではなく、アミノ酸でコードされた情報が、RNA に転写、蛋白に翻訳され初めて機能が生じる。従って、ゲノム情報は最終的には蛋白質発現量や活性に反映される。近年のゲノム、プロテオーム解析によると蛋白の発現は DNA や RNA レベルの解析だけでは不十分で、mRNA と蛋白の発現も 30%程度の相関しかないことが報告されており (21,22)、ゲノムレベルの変化だけでなく、蛋白レベルの評価も重要であると考えられている。

現在、次世代シーケンサーを用いたクリニカルシーケンスはがん遺伝子解析の中心となりつつある。そのなかで、ゲノム情報に加えて、蛋白レベルの評価も

考慮した遺伝子機能評価は重要であると考ええる。

#### 4 外科治療におけるゲノム情報の活用

頭頸部扁平上皮癌の外科治療において、原発巣の一塊完全切除は手術の基本と考えられてきた。しかしながら、頭頸部癌は初診時すでに進行癌で見つかる症例が多い一方で、頭頸部領域には、咀嚼・嚥下・発声などの重要な機能が集結していることから、根治性と機能温存という、相反する二つのテーマに常に直面してきた歴史的背景がある。

過去の報告によると、頭頸部扁平上皮癌の局所再発を来す病理学的切除断端距離は5~7mmとされており(23)、手術の際、粘膜断端・深部断端共に、一般的には10mm程度の安全域を確保し切除することが推奨されている。例えば口腔癌においては後方粘膜断端・深部断端を、中咽頭癌においては尾側粘膜断端・深部断端を安全に切除するために原発巣を頸部に引き出して切除する pull-through 法を用いて切除を行う。さらに、粘膜断端の切除の際に肉眼病変を超えた癌の浸潤や異形上皮を同定するために、1.25%ルゴール液を塗布し、腫瘍周囲の不染帯を同定し(24)、術中迅速病理検査も活用しつつ、原発巣の病理学的一塊完全切除を狙う。

しかしながら、実臨床では、上記方法を駆使して切除を行っても切除断端陽

性・近接となることがあり、さらに病理学的に切除断端陰性であっても、**field cancerization** という概念で表されるように、周囲に散在する *TP53* 変異を伴う前癌病変から局所再発を来すことがある。従来 of 術前・術中検査による切除範囲の決定には限界があると考えられ、ゲノム情報に基づく腫瘍の分子生物学的な特徴に合わせた切除断端距離の設定も重要課題である。

さらに、近年の技術革新により、微細なパラフィン包埋ホルマリン (FFPE) 検体からも、DNA や RNA の抽出が可能となり、その信憑性においても多数の報告がなされている (25,26,27,28)。新鮮凍結検体は質の高い核酸が抽出できるものの、採取、処理、保存が煩雑であるため、サンプル数や観察期間の確保に難渋することが多い。一方で、多くの組織サンプルは FFPE 処理により保存されるため、過去のアーカイブを用いて、多くの臨床情報との検討が可能となる。術前・術中検体を用いた個別化治療の構築は、切除により十分な腫瘍検体を採取できる外科治療ならではのアプローチである。

## 目的

詳細な臨床情報に紐づけされた 317 例の頭頸部扁平上皮癌の初回腫瘍を次世代シーケンサーにて *TP53* 遺伝子を中心に解析することで、*TP53* 変異と p53 蛋白表現型の併用解析が精度の高い臨床予後解析を可能にし、個別化治療に反映できるかを明らかにする。

## 方法

### 対象

2013 年 1 月から 2015 年 12 月までに国立がん研究センター中央病院頭頸部外科にて初回根治手術治療を行った頭頸部扁平上皮癌は 400 例であった。その内、上咽頭・外耳道・唾液腺原発症例、原発不明頸部リンパ節転移症例、重複癌症例であった 42 例を除外し、原発巣を口腔、中咽頭、下咽頭、喉頭に限定させた。この 358 例のうち、次世代シーケンサーにて遺伝子変異解析が施行できた 317 例を解析の対象とし、*TP53*、*PIK3CA*、*AKT*、*HRAS* の遺伝子変異解析、及び免疫染色による p53、p16 の蛋白表現型解析を行い、性別、年齢、原発巣、T 分類、N 分類、Stage 分類、喫煙・飲酒歴、治療方針、臨床予後との比較を行った。

TNM 分類は Union for International Cancer Control 規約第 8 版 (2018) に従って分類した。喫煙量に関しては一日喫煙量×年数÷20 のいわゆる pack-year を、飲酒

量については問診上の酒を種類毎に飲酒量をエタノール換算した。Smoker は 20pack-year 以上とし(29)、drinker は一日エタノール×年で 450g 年以上と定義した(30)。

## 対象患者の治療方針の概略

国立がん研究センター中央病院頭頸部外科における 2013 年から 2015 年の頭頸部扁平上皮癌に対する部位別の外科的治療方針の概略を述べる。

### 口腔癌

ステージにかかわらず、切除可能症例には外科的切除を原則としている。根治的放射線治療は、切除不能症例、手術適応外症例、及び手術拒否症例に対して施行している。頸部リンパ節転移陽性症例に対して、頸部郭清を施行。予防的頸部郭清は、原発巣の深部浸潤が強い症例に対して施行している。

### 中咽頭癌

T1・T2 症例で経口的切除可能症例に関しては、口内法による切除を原則としている。T1・T2 症例で経口的に切除不能症例や、T3・T4 といった局所進行症例に対しては、pull-through 法を用いた外科的治療を施行している。しかしながら、軟口蓋全摘が必要な症例や迷走神経と舌下神経両方の切除が必要な症例では術後の著明な嚥下障害が予測されるため、喉頭温存手術は適応外としている。なお、

p16 陰性症例に対しては、根治性を重視した拡大切除を原則とし、遊離皮弁再建を念頭においた術式を選択している。一方 p16 陽性症例に対しては、比較的予後が良いことから、治療後の嚥下機能を重視した手術計画を立てている。すなわち周囲の組織を可及的に保存し、一期縫縮を積極的に施行している。具体的には、切除に関しては可能な限り経口的な腫瘍切除を目指し、尾側のマージンが経口切除不能な症例に対しては、pull-through 法により頸部から切除を行う。その際、舌骨上筋群の可及的な温存、舌下神経、上喉頭神経の温存を試みている。頸部に関しては、予防的頸部郭清は施行しておらず、頸部転移陽性に対して、頸部郭清を施行している。根治的放射線治療は、切除不能症例、手術適応外症例、及び手術拒否症例に対して施行している。

#### 下咽頭癌

筋層浸潤、頸部リンパ節転移を認めない T1・T2 症例に対しては経口的に切除を施行している。筋層浸潤を伴う T1・T2 症例、頸部リンパ節転移陽性症例には頸部外切開による下咽頭部分切除・一期縫合・頸部郭清術を施行している。しかしながら、輪状後部原発症例や咽頭粘膜面切除面が 1/3 周を超える等で術後嚥下機能低下が予測される症例に対しては、喉頭温存手術適応外としている。声帯麻痺を伴わない T3 症例に対しては、喉頭温存下咽頭部分切除術、咽頭喉頭頸部食道切除術、根治的放射線治療の中から治療法を選択してい

る。声帯麻痺を伴う T3 症例及び T4 症例に対しては咽頭喉頭頸部食道切除術を原則としている。根治的放射線治療は、切除不能症例、手術適応外症例、及び手術拒否症例に対して施行している。

### 喉頭癌

早期喉頭癌の治療方針は亜部位によって異なる。T1-2N0-1 声門癌に対しては、根治的放射線治療を施行している。一方で、T1・T2 声門上癌に対しては経口的切除を原則とするが、深部浸潤が強い症例に対しては頸部外切開による喉頭部分切除術または根治的放射線治療を施行している。声帯麻痺を伴わない T3 症例に対しては、喉頭部分切除術、喉頭全摘術、根治的放射線治療の中から治療法を選択している。声帯麻痺を伴う T3 症例、声門下浸潤症例、後連合浸潤症例、T4 症例に対しては喉頭全摘術を原則としている。根治的放射線治療は、切除不能症例及び手術拒否症例に対して施行している。

### 術後治療

原発巣の切除断端陽性、リンパ節転移巣の節外浸潤陽性といった術後再発高リスク症例に対しては、術後化学放射線治療の適応としている。頸部多発リンパ節転移、脈管侵襲、リンパ管侵襲、神経周囲浸潤、pT3・pT4、口腔中咽頭癌における下頸部転移といったその他の術後再発リスク因子陽性症例に対しては、患者の performance status、術後合併症や併存疾患の有無を考慮し、包括的に判断し

た上で施行している。

### **p53・p16 免疫染色**

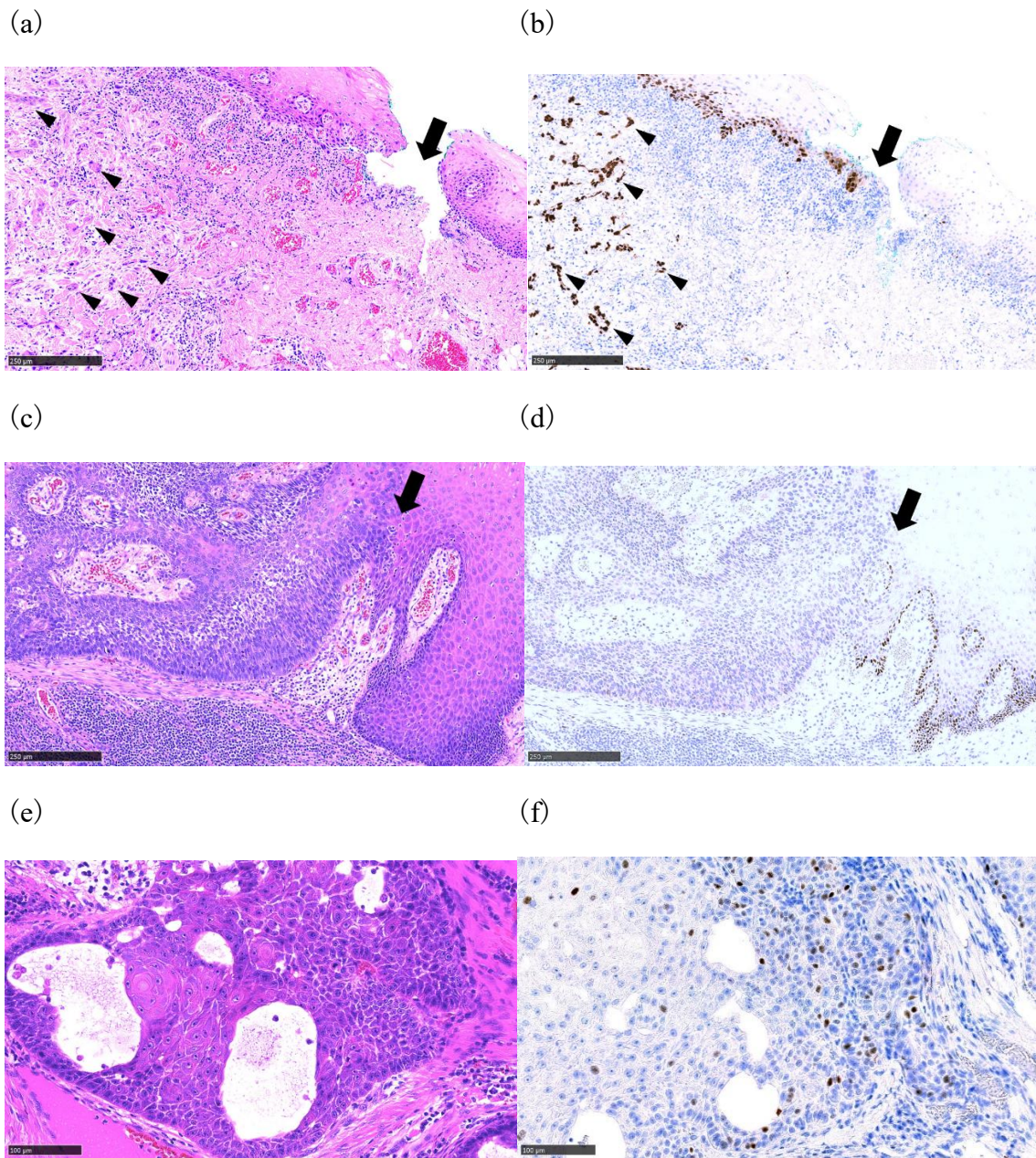
免疫組織学的解析は術前生検のパラフィン包埋ホルマリン (FFPE) 検体切片より行った。脱パラフィン処理、抗原賦活化の後、免疫染色を行った。一次抗体として、p53 マウスモノクローナル抗体 (DO-7、1 : 200、Dako、Glostrup、Denmark) 及び p16 マウスモノクローナル抗体 (G175-405、1:100、BD、CA、USA) を使用 (31,32)。検出は Dako の EnVision Kit を用いた。

p53 蛋白は正常細胞にも発現するため、癌部の領域性をもった蛋白の過剰な蓄積、あるいは欠失などの変化に注目して評価を行った。癌部に領域性を持って、角化部や壊死部を除いたほとんどの癌細胞の核が強く濃染されるものを **Extremely positive (EP)**、すべての癌細胞の核が染色されないものを **Lost**、その他のものを **Others** と分類した (図 1)。正常扁平上皮を内因性コントロール、HPV 陽性 *TP53* 野生型中咽頭癌標本を外因性コントロールとした。

p16 免疫染色に関しては、腫瘍細胞の 70%以上に核及び細胞質いずれも濃染を認めるものを陽性と判定した (図 2) (33)。

全ての免疫染色の評価は病理専門医と頭頸部癌専門医二人でおこない、評価が異なる場合は、評価者同士で再度検討し評価を一致させた。

図 1. 代表的な p53 免疫染色の組織像

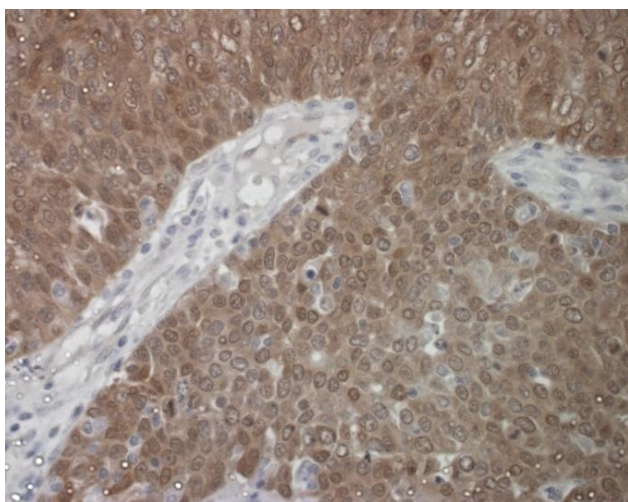


(a) p53 Extremely positive (EP)症例の HE 染色. 癌領域は矢印までである. 矢頭は浸潤癌を示す. (b) p53 EP 症例の p53 免疫染色. 癌領域に強い核染色を認める.

(c) p53 Lost 症例の HE 染色. 癌領域は矢印までである. (d) p53 Lost 症例の p53 免

疫染色. 癌領域に核染色を認めない. (e) p53 Others 症例の HE 染色. (f) p53 Others 症例の p53 免疫染色. p53 蛋白は正常でも出現するため、様々な核染色を認めるが、領域性をもった強い核染色や無染色を認めない.

図 2. 代表的な p16 免疫染色の組織像



腫瘍細胞の 70%以上で核及び細胞質に濃染を認めるものを p16 陽性と判定した.

## 遺伝子変異解析

*TP53*、*PIK3CA*、*AKT*、*HRAS* の変異解析は次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンスにて施行した。

### DNA 抽出

外科的切除標本の FFPE 検体を 10 $\mu$ m に薄切後、脱パラフィン処理を行った。腫瘍組織のみをマクロダイセクションした後、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen、Hilden、Germany) を用いて DNA を抽出した。

### 次世代シーケンサーによる遺伝子変異検出

ライブラリーの調製は 2-step Tailed PCR 法を用いた。第一回 PCR では、領域特異的配列とプライマリー結合配列を持った 2 つのプライマーを使用した。各々のプールには変異 *TP53*、*PIK3CA*、*AKT*、*HRAS* をターゲットとした 36 個のプライマーを投入した。プライマーの詳細を表 1 に示す。本研究では *TP53* の全エクソン領域を詳細に解析するため、24 のアンプリコンを独自で作成し、depth を深く設定して *TP53* 全エクソンシーケンスを実施した。FFPE 検体はホルマリン固定によって DNA が断片化するため、核酸検査には限界があると考えられている。そのため、アンプリコンサイズを小さくし、お互いを重複させるようにプライマーを設定する工夫を行った。またプライマープールを 3 つに分け、シーケンス





エラーが生じやすい配列はオーバーラップさせ、重複領域は stitch して変異解析を行った (図 3)。

PCR は 10ng の DNA に kapa HiFi Hotstart Ready Mix (Kapa Biosystems、Boston、MA、USA) を付加し施行した。アンプリコンを 95°C で 3 分変性させたのち、98°C、64°C、72°C で 20 サイクルかけて増幅させさらに、72°C で 3 分伸長させた。

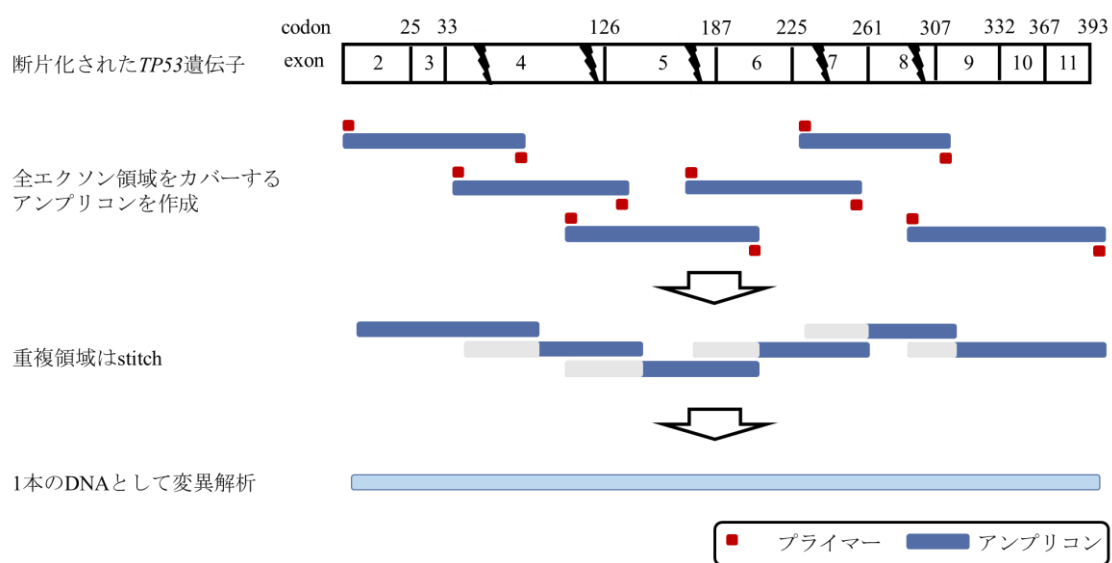
PCR 産物は、Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter、Brea、CA、USA) で精製し、低 TE buffer 30µl で溶出させた。第二回 PCR では初回 PCR 産物の 5µl にサンプル特異的な指標と p5/p7 配列を結合させた。アンプリコンは 95°C で 3 分変性させたのち、98°C、65°C、72°C で 20 サイクルかけて増幅させさらに、72°C で 3 分伸長させた。PCR 産物は低 TE buffer 30µl で溶出させた。

ライブラリー濃度は KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo、Tokyo、Japan) と DNA standards (KK4903、Kapa Biosystems) を用いた qPCR にて 4nM に調整した。

遺伝子変異解析は MiSeq 次世代シーケンサーを用いて、MiSeq Reagent Micro Kit v2 を使用しシングルリード法で行った。解析結果は TruSeq Amplicon (以上 Illumina、San Diego、CA、USA) によりアンプリコン末端のプライマー配列を削除した後、UCSC の human genome 19 を使用してマッピングした。

変異のコールは Depth 100 回以上、Frequency 5%以上とした。TP53 のエクソン領域シーケンスのカバレッジを高めるため、それぞれのアンプリコンの Depth は

図 3. TP53 のプライマー、アンプリコンの工夫



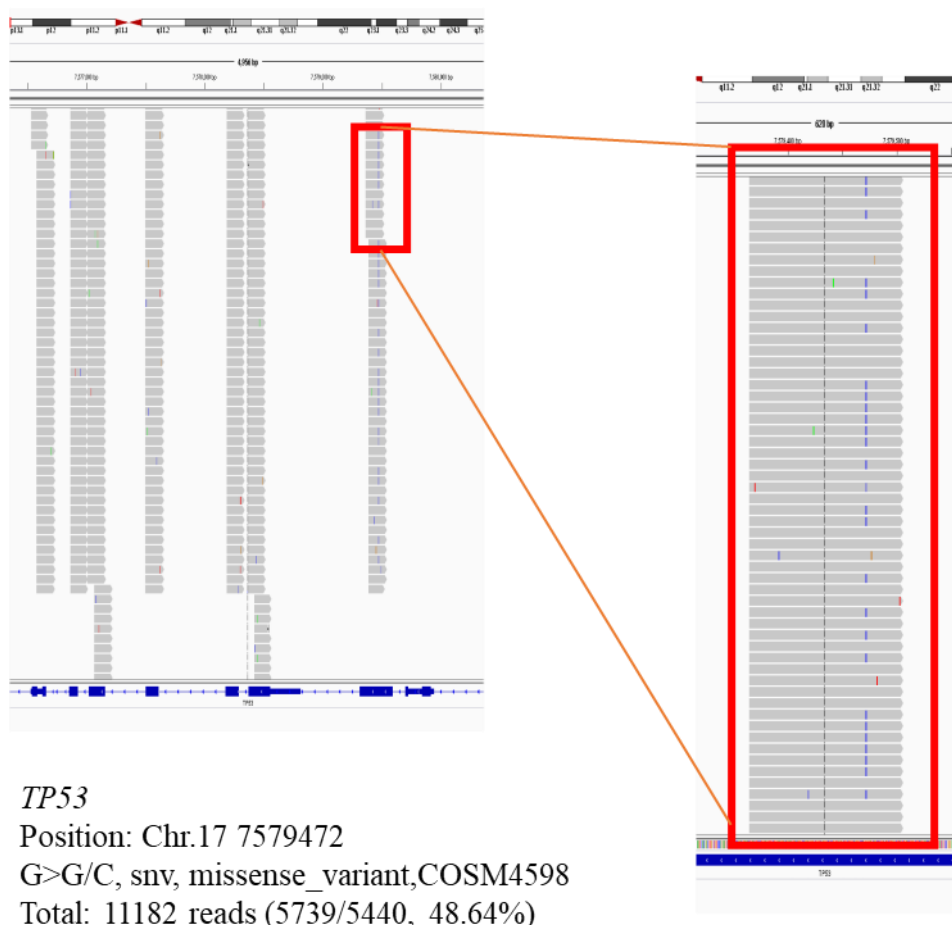
FFPE 検体は、DNA が断片化するため核酸検査に限界があると考えられている。

そのためアンプリコンサイズを小さくし、さらにシーケンス領域をオーバーラ

ップさせるようにプライマーを設定し、重複領域はstitchして変異解析を行った。

1000 回以上とした。同義的変異と Single Nucleotide Polymorphism Database (<https://www.uniprot.org/database/DB-0013>) で同定されている一塩基多型は除外した。TP53 遺伝子エクソン領域のカバレッジが 100%となるよう 24 のアンプリコンを独自に設計・作成した。また解析後カバレッジが 100%であることを確認した (図 4)。PIK3CA、AKT、HRAS に関しては ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) に登録されている Hot Spot 領域のみを作成した。

図 4. 次世代シーケンサーによる *TP53* 変異解析例



次世代シーケンサーによる *TP53* 変異コール例を示す.変異のコールは Depth100  
回以上、Frequency5%以上とした. *TP53* のエクソン領域シーケンスのカバレッジ  
を高めるため、それぞれのアンプリコンの Depth は 1000 回以上とした.

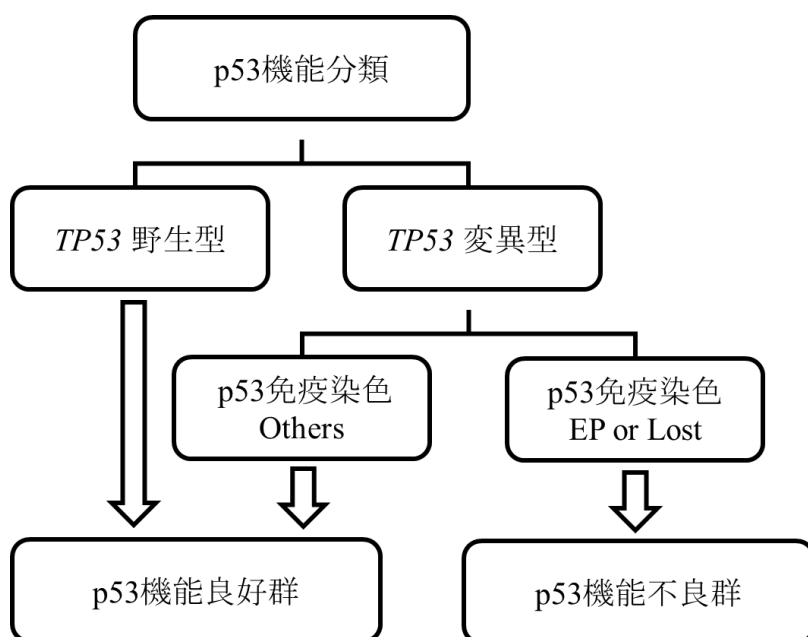
### **TP53 ミスセンス変異の解析**

ミスセンス変異による p53 蛋白構造変化は過去に報告されている Evolutionary Action score of TP53 (EAp53 スコア)にて評価した。スコアが 75 以上を蛋白構造変化が大きいと判断した (20)。

### **p53 機能分類の定義**

本検討では TP53 変異型と p53 蛋白表現型を併用解析することで p53 の機能分類を行った。変異型 TP53 でかつ p53 蛋白表現型が EP、Lost であるものを p53 機能不良群、野生型 TP53 または変異型 TP53 でかつ p53 蛋白表現型が Others であるものを p53 機能良好群と分類した (図 5)。

図 5. p53 機能分類

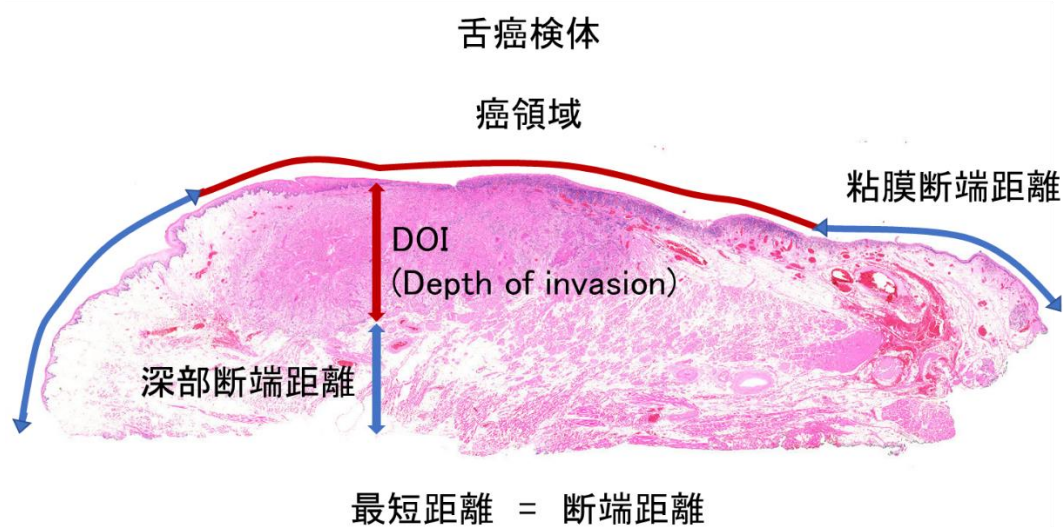


*TP53* 変異と p53 蛋白表現型を重ね合わせて p53 機能分類を行った.変異型 *TP53* でかつ免疫染色が EP (Extremely positive)または Lost であった場合は p53 機能不良群、変異型 *TP53* でかつ免疫染色が Others、及び野生型 *TP53* であった場合は p53 機能良好群と定義した.

## 切除断端評価

断端評価は国立がん研究センター中央病院病理診断科にて施行されているルーチンの断端評価を基に、病理専門医と頭頸部癌専門医の二人で再評価した。全ての外科的切除断端は、粘膜断端距離及び深部断端距離の2点を計測し、その最短距離を断端距離と定義した（図6）。

図 6. 切除断端評価



舌癌検体における切除断端解析の一例を示す。癌の粘膜病変及び深部浸潤(DOI; Depth of invasion)を各々評価(赤線)、それぞれの断端からのクリアランスを測定(青線)、断端距離が短い方を断端距離と定義した。この断端評価は、国立がん研究センター中央病院病理診断科でおこなっている routine の断端評価に準じている。

## 統計学的解析

二群間の比較に関してはフィッシャーの正確確率検定を行った。免疫染色での評価者間における結果の一致率は  $\kappa$  係数にて評価した。生存解析のエンドポイントは粗生存、局所無再発生存、遠隔無再発生存とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、生存曲線の 2 群間の検定にはログランク法を用いた。多変量解析には Cox のハザードモデルを用いた。投入する変数は単変量解析で  $p < 0.05$  であった因子および、すでに確立している予後因子を選択基準とした。

切除断端距離解析として顕微鏡学的に断端陰性であった症例に対して ROC 曲線を作成、左上にもっとも近かった点を局所再発をきたすカットオフ値とした。さらに、局所無再発生存をエンドポイントとして算出したカットオフ値を用いて断端距離別の生存解析を行った。統計解析ソフトは、SPSS(version 22.0.0, IBM, Armonk, NY, USA) を使用。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

尚、本研究の実施は、国立がん研究センター中央病院倫理委員会（2010-77）にて承認されている。

## 結果

### 1. 本検討症例の内訳

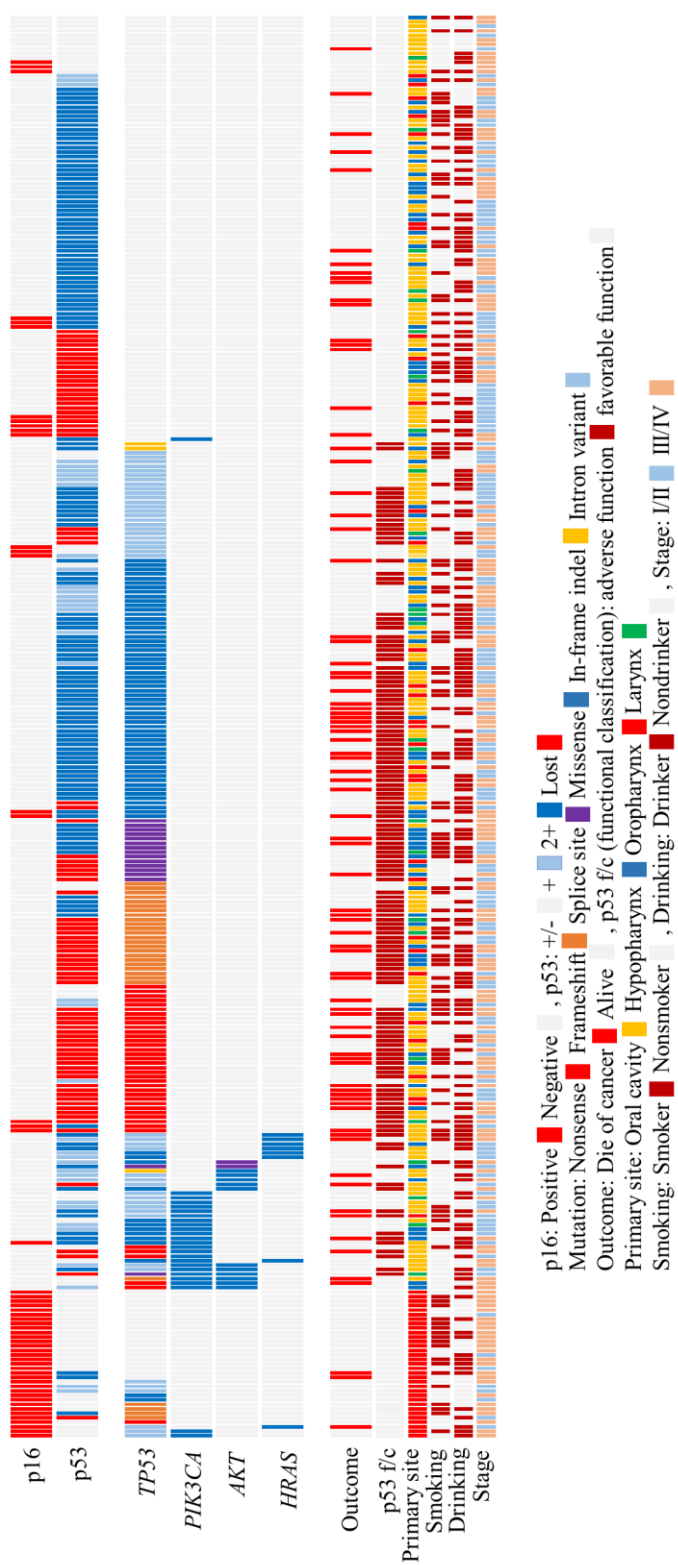
対象症例の内訳を表 2 に示す。男性 252 例、女性 65 例、年齢は 29 歳から 90 歳、中央値は 69 歳であった。原発巣は口腔 153 例、下咽頭 74 例、中咽頭 65 例、喉頭 25 例であった。p16 免疫染色の結果は陽性 53 例、陰性 264 例であった。TNM 分類は Union for International Cancer Control 規約第 8 版 (2018) に従って分類し、Stage I 100 例、Stage II 68 例、Stage III 51 例、Stage IV 98 例であった。手術単独治療は 262 例に施行されており、術後照射は 55 例に施行されていた。切除後の欠損に対しては遊離皮弁再建が 185 例において施行されていた。喫煙に関しては、Smoker 126 例、Nonsmoker 191 例、飲酒に関しては、Drinker 190 例、Nondrinker 127 例であった。全 317 例の遺伝子変異と臨床情報のまとめを図 7 に示す。

表2. 患者背景

	計 317	p16陽性 中咽頭癌 33	p16陽性中咽頭癌を除いた頭頸部癌		p 値
			p53機能良好群 144 (%)	p53機能不良群 140 (%)	
性別					
男	252	32	106 (48%)	114 (52%)	0.076
女	65	1	38 (59%)	26 (41%)	
年齢					
≥75歳	223	4	108 (49%)	111 (51%)	0.24
<75歳	94	29	36 (55%)	29 (45%)	
原発巣					
口腔	153	0	85 (56%)	68 (44%)	0.093
下咽頭	74	0	36 (49%)	38 (51%)	
中咽頭	65	33	10 (31%)	22 (69%)	
喉頭	25	0	13 (52%)	12 (48%)	
p16					
陽性	53	33	14 (70%)	6 (30%)	0.059
陰性	264	0	130 (49%)	134 (51%)	
pT分類					
T1	84	5	36 (46%)	43 (54%)	0.42
T2	122	22	57 (57%)	43 (43%)	
T3	71	5	31 (47%)	35 (53%)	
T4	40	1	20 (51%)	19 (49%)	
pN分類					
N0	191	9	93 (51%)	89 (49%)	0.40
N1	43	20	10 (43%)	13 (57%)	
N2	36	4	20 (63%)	12 (37%)	
N3	47	0	21 (45%)	26 (55%)	
TNM分類					
I	100	26	34 (46%)	40 (54%)	0.82
II	68	6	33 (53%)	29 (47%)	
III	51	1	26 (52%)	24 (48%)	
IV	98	0	51 (52%)	47 (48%)	
治療					
手術	262	20	124 (51%)	118 (49%)	0.40
手術 + 術後放射線治療	55	13	20 (48%)	22 (52%)	
遊離皮弁再建					
あり	185	11	90 (52%)	84 (48%)	0.38
なし	132	22	54 (49%)	56 (51%)	
喫煙歴					
Smokers	126	14	63 (56%)	49 (44%)	0.083
Nonsmokers	191	19	81 (47%)	91 (53%)	
飲酒歴					
Drinkers	190	18	88 (51%)	84 (49%)	0.47
Nondrinkers	127	15	56 (50%)	56 (50%)	

p 値: p53機能良好群と不能群を比較した

図 7. 頭頸部扁平上皮癌 317 例のゲノム解析と臨床情報のまとめ



## 2. p16 陽性中咽頭癌の遺伝子変異と予後

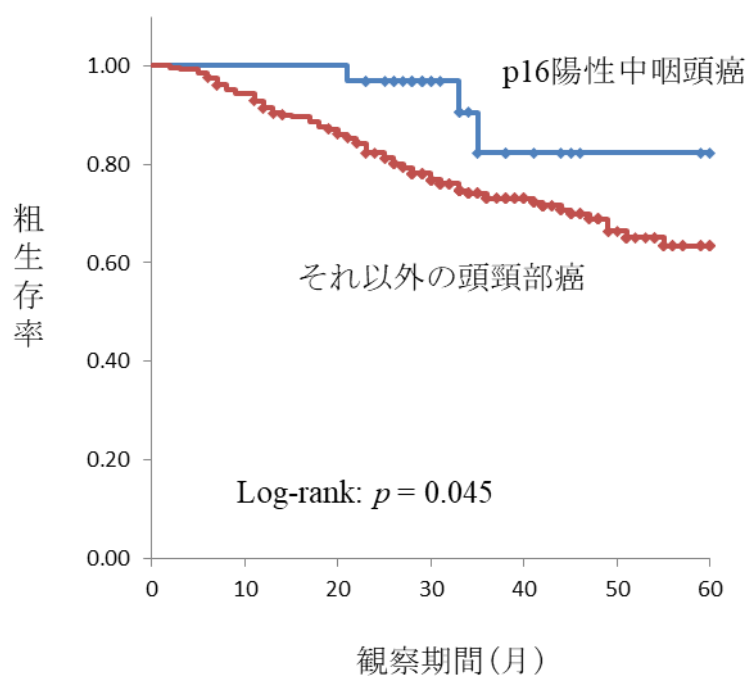
p16 陽性中咽頭癌は 33 例であった。*TP53*、*PIK3CA*、*HRAS*、*AKT* 遺伝子変異はそれぞれ、13 例 (39%)、2 例 (6%)、1 例 (3%)、0 例 (0%) に認められた。p16 陽性中咽頭癌では、これを除いた頭頸部扁平上皮癌と比較して、統計学的に有意に若年者 (50 歳未満) に多く (p16 陽性中咽頭癌 vs それ以外の頭頸部癌 : 15% vs 5%  $p = 0.044$ )、Smoker の頻度が少なく (p16 陽性中咽頭癌 vs それ以外の頭頸部癌 : 42% vs 61%  $p = 0.036$ )、*TP53* 変異の頻度が少なく (p16 陽性中咽頭癌 vs それ以外の頭頸部癌 : 39% vs 66%  $p = 0.0024$ ) (表 3)、2 年、5 年粗生存率が高かった (p16 陽性中咽頭癌 vs それ以外の頭頸部癌 : 2 年粗生存率、97% vs 82%、5 年粗生存率、82% vs 63%、 $p = 0.045$ ) (図 8)。また、p16 陽性中咽頭癌では *TP53* 変異の有無、p53 機能機能分類で粗生存率に統計学的な差を認めなかった。( *TP53* 変異型 vs 野生型 : 2 年粗生存率、100% vs 95%、 $p = 0.64$ 、p53 機能不良群 vs p53 機能良好群 : 2 年粗生存率、100% vs 97%、 $p = 0.63$ ) (図 9,10)。

表3. p16陽性中咽頭癌とTP53変異の関係

	TP53変異あり	TP53変異なし
p16陽性中咽頭癌	13	20
それ以外	189	95

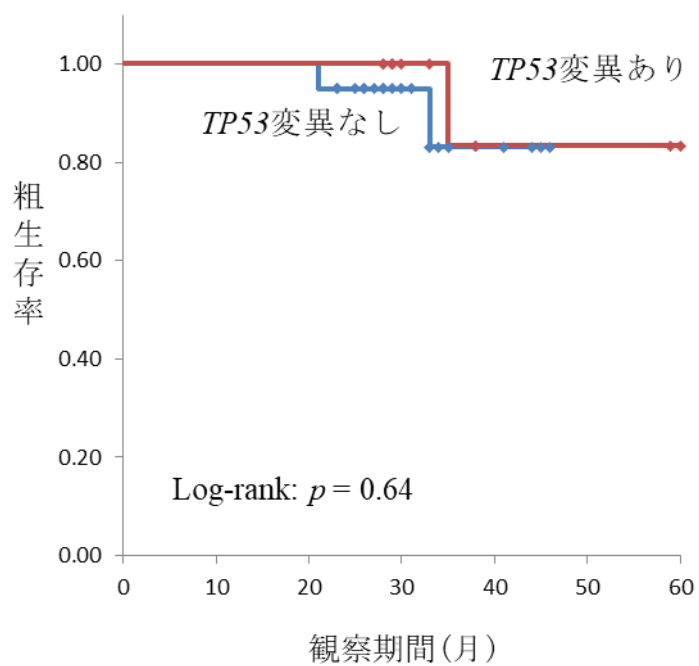
$p = 0.0024$

図 8. p16 陽性中咽頭癌の予後



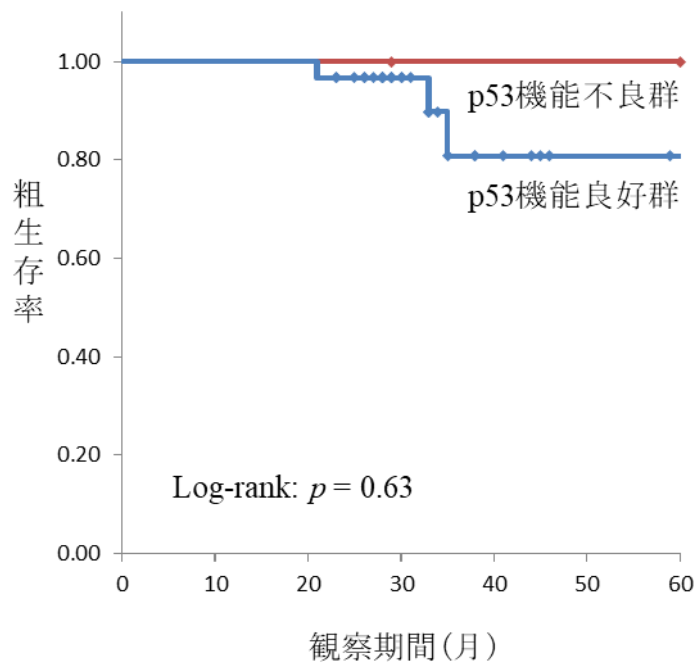
p16 陽性中咽頭癌はそれ以外の頭頸部癌と比較して統計学的に有意に粗生存率が良好であった。

図 9. p16 陽性中咽頭癌における TP53 変異による予後の差



p16 陽性中咽頭癌では TP53 変異の有無で統計学的に有意な粗生存率の差を認めなかった.

図 10. p16 陽性中咽頭癌における p53 機能分類による予後の差



p16 陽性中咽頭癌では p53 機能分類により統計学的に有意な粗生存率の差を認めなかった.

### 3. p16 陽性中咽頭癌を除外した頭頸部扁平上皮癌の遺伝子変異

p16 陽性中咽頭癌を除いた 284 例において、最も変異の頻度が高かったのは *TP53* 変異で 189 例 (67%)、次いで *PIK3CA* 変異が 23 例 (8%)、*AKT* 変異が 13 例 (5%)、*HRAS* 変異が 7 例 (2%) と続いた (図 7)。*TP53* 変異に関してはミスセンス変異が 69 例 (37%)、イントロンバリエントが 39 例 (21%)、ナンセンス変異が 38 例 (20%)、フレームシフト変異が 24 例 (13%)、スプライシング異常が 16 例 (9%)、in-frame deletion が 2 例 (1%) であった。

*AKT* 変異は *PIK3CA* 変異を認めた症例の 26% で生じていたが、*PIK3CA* 野生型の症例では 3% と有意に *AKT* の変異が少なかった ( $p = 0.00017$ )。*HRAS* 変異は、口腔癌症例において、87% と高頻度で出現していた。

### 4. *TP53* ミスセンス変異の解析

p16 陽性中咽頭癌を除いた症例における *TP53* ミスセンス変異を認めた全 69 例における変異の詳細を図 11 に示す。変異のほとんどはコドン 100~300 番のコアドメイン領域に集中しており、R248Q といった hot spot にも変異を認めた。67 例 (97%) がヘテロの機能欠失型変異であったが、2 例において、機能獲得型変異と報告されている R249W および D281G を認めた。予後不良と報告されている L2、L3 領域の変異や、EAp53 スコアが高い症例以外でも原病死を認めた。

図 11. TP53 ミスセンス変異の変異部位と臨床情報のまとめ

COSMIC ID	Domain	Codon No.	遺伝子機能	EAp53 Score	症例数 (例)					
					1	2	3	4	5	
11935		D49H	LOF	low	EP	Lost				
-		I50M	LOF	low	EP					
250061		P72R	LOF	low	EP					
-		S96A	LOF	low	Others					
11517		Y126C	LOF	high	Others					
44226		S127F	LOF	high	EP					
45481		L130P	LOF	high	EP					
11582		K132R	LOF	low	EP					
43963		K132N	LOF	high	EP					
10647		C135F	LOF	high	EP					
43708		C141Y	LOF	high	EP					
10760		R156P	LOF	low	Others					
11323		A161D	LOF	high	lost					
11114	L2 領域	C176W	LOF	high	EP					
10687	L2 領域	C176Y	LOF	high	EP					
44901	L2 領域	H178D	LOF	low	EP					
44215	L2 領域	H178P	LOF	high	EP					
10768	L2 領域	H179Y	LOF	high	Others					
10889	L2 領域	H179R	LOF	high	EP	EP	Others	EP	EP	
44151	L2 領域	H179N	LOF	high	EP	EP				
43635	L2 領域	H179L	LOF	high	EP	EP	EP			
53772	L2 領域	E180K	LOF	low	EP					
10738	L2 領域	R181H	LOF	low	Others					
10742	L2 領域	H193R	LOF	high	Others	EP				
43833	L2 領域	H193P	LOF	high	EP					
11066	L2 領域	H193L	LOF	high	EP	EP	EP	Others		
44571	L2 領域	L194R	LOF	high	EP					
11089	L2 領域	I195T	LOF	low	EP					
44424		V197E	LOF	high	EP					
43642		Y205H	LOF	low	Others	EP				
43947		Y205C	LOF	high	Others	EP				
10667		V216M	LOF	low	EP					
10667		Y220H	LOF	low	Others					
43865		Y234S	LOF	high	Others					
10834	L3 領域	M237I	LOF	low	EP					
11356	L3 領域	C242W	LOF	high	Others					
43555	L3 領域	M246V	LOF	low	EP					
10662	L3 領域	R248Q	LOF	high	EP					
43629	L3 領域	R249W	GOF	high	Others					
10771	L3 領域	P250L	LOF	high	EP					
44535		I254N	LOF	high	EP	EP				
44719		E258A	LOF	high	EP					
43621		F270C	LOF	low	EP					
43809		F270I	LOF	low	EP					
10719		E271K	LOF	high	EP					
10769		V274F	LOF	low	EP					
44443		V274L	LOF	low	EP					
10701		C275F	LOF	high	EP	EP				
45695		A276G	LOF	low	EP					
10887		P278R	LOF	high	Others					
11232		D281G	GOF	high	Others					
44352		T284P	LOF	low	EP	EP				

コアドメイン領域  
 L2 領域 L2 領域  
 L3 領域 L3 領域  
 LOF 機能欠失型変異  
 GOF 機能獲得型変異  
 EAp53 Score Evolutionary Action Score of TP53  
 Low EAp53 Score <75  
 high EAp53 Score ≥75  
 生存症例  
 原病死症例  
 EP Extremely positive

マス中に p53 免疫染色の結果を示す. コアドメイン領域の機能欠失型変異主体であった. 変異による蛋白構造変化は EAp53 スコアにて評価. スコアが 75 以上を構造変化が大きいと判断した (20). 予後良好と報告されている L2、L3 領域以外の変異や、EAp53 スコアが低い症例でも原病死を認めた (18,20).

## 5. TP53 変異と p53 蛋白表現型の関係

免疫染色による p53 蛋白表現型に関しては、EP が 134 例 (47%)、Lost が 85 例 (30%)、Others が 65 例 (23%) であった。評価者間による、免染評価の違いを表 4 に示す。κ 値 0.89 と評価者間の一致率は高かった。蛋白表現型と変異型の相関については、蛋白表現型が EP であった場合に TP53 変異がミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエーションである感度は 59%、特異度は 60% と共に低かった。一方で、蛋白表現型が Lost であった場合に TP53 変異がナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常である感度は 67% と低く、特異度は 84% と高かった (表 5)。

表4. 評価者間による免疫染色評価の違い

		評価者 1		
		EP	Lost	Others
評価者2	EP	132	0	2
	Lost	0	81	3
	Others	7	1	58
2次の重み付け $\kappa$ 値		0.89 (95%信頼区間 0.83-0.95)		
		EP: Extremely positive		

表5. p53免疫染色とTP53変異の関係

免疫染色	TP53変異	感度	特異度
EP	ms/others	59%	60%
Lost	ns/fs/sp	67%	84%

EP: Extremely positive

ms/others: ミスセンス変異、in-frame deliation、イントロンバリエーション

ns/fs/sp: ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常

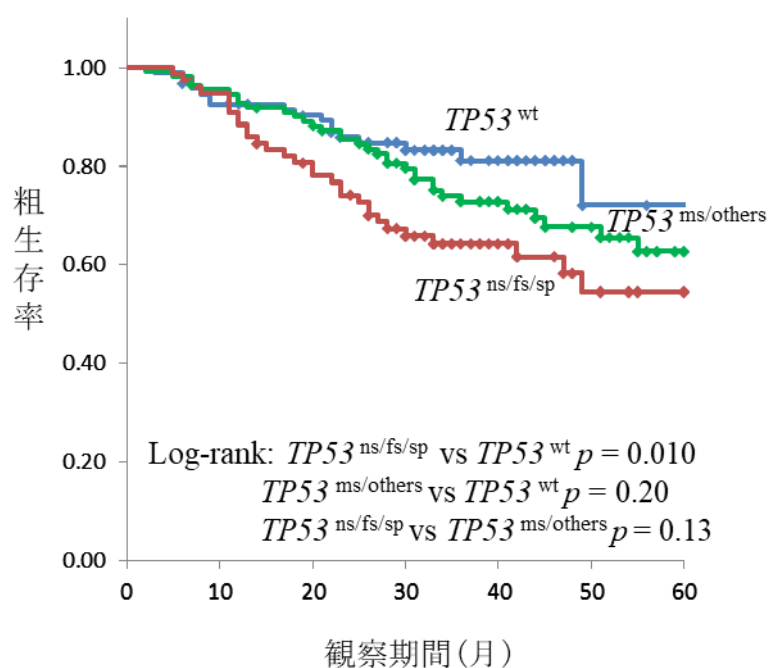
## 6. 各遺伝子変異ステータスや p53 蛋白表現型の予後との相関

p16 陽性中咽頭癌を除いた症例において、TP53 ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常を認めた症例は、TP53 野生型症例に比較して、統計学的に有意に 2 年、5 年粗生存率が低かった (TP53 ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常 vs 野生型 : 2 年粗生存率、74% vs 86%、5 年粗生存率、54% vs 72%、 $p=0.010$ ) (図 12)。一方で、TP53 ミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエントを認めた症例は TP53 野生型症例に比較し、2 年、5 年粗生存率に統計学的有意差を認めなかった (TP53 ミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエント vs 野生型 : 2 年粗生存率、84% vs 86%、5 年粗生存率、63% vs 72%、 $p=0.20$ ) (図 12)。

そこで、TP53 ミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエントのいずれか一つを認めた症例を p53 蛋白表現型で比較した。すると、p53 蛋白表現型が EP、Lost であった症例は、Others であった症例に比較して、統計学的に有意に 2 年、5 年粗生存率が低かった (EP、Lost vs Others : 2 年粗生存率、82% vs 91%、5 年粗生存率、50% vs 89%、 $p=0.0033$ ) (図 13)。

なお PIK3CA、AKT、HRAS 変異の有無は粗生存率と相関を認めなかった (図 14, 15, 16)。

図 12. TP53 変異による予後の差



wt;野生型、ms;ミスセンス変異、ns;ナンセンス変異、fs;フレームシフト変異、sp;

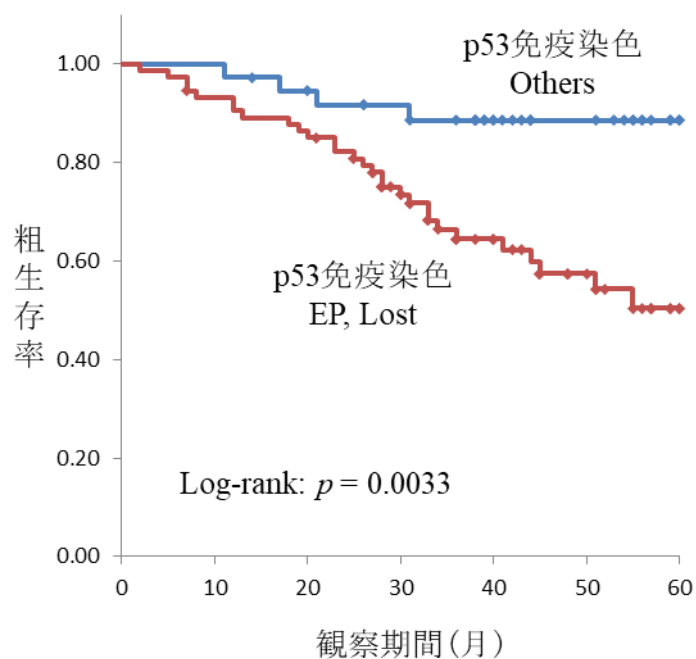
スプライシング異常、others;その他の変異

TP53 のナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常は野生型に

比較して統計学的に有意に粗生存率が低かった.ミスセンス変異、その他の変異

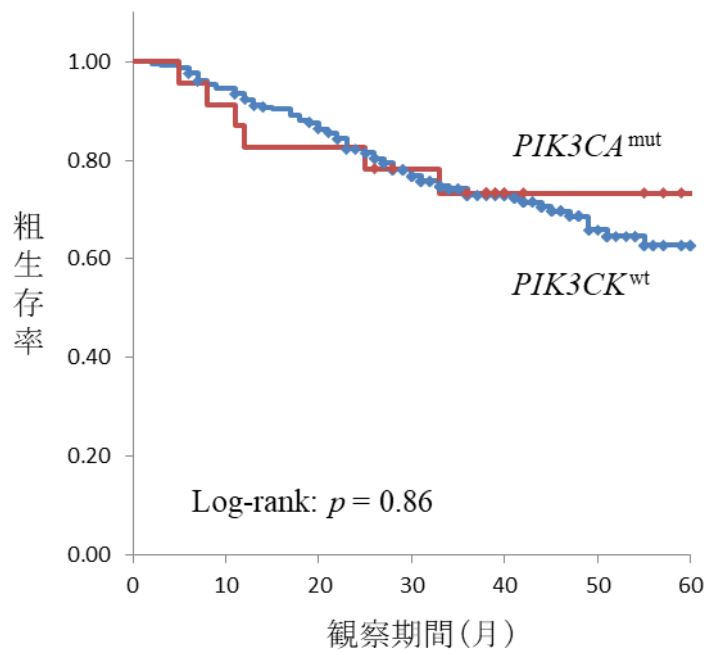
との野生型では統計学的に粗生存率の差を認めなかった.

図 13. TP53 ミスセンス変異/in-frame deletion/イントロンバリエント症例における p53 免疫染色による予後の差



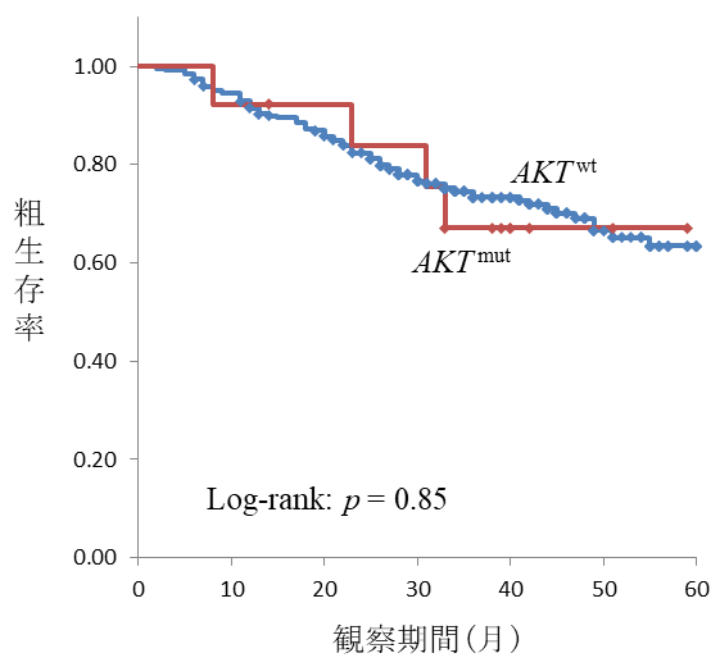
TP53 ミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエントの症例群において、p53 免疫染色が EP、Lost であった症例は Others であった症例に比較して統計学的に有意に粗生存率が低かった。

図 14. *PIK3CA* 変異の有無による予後の差



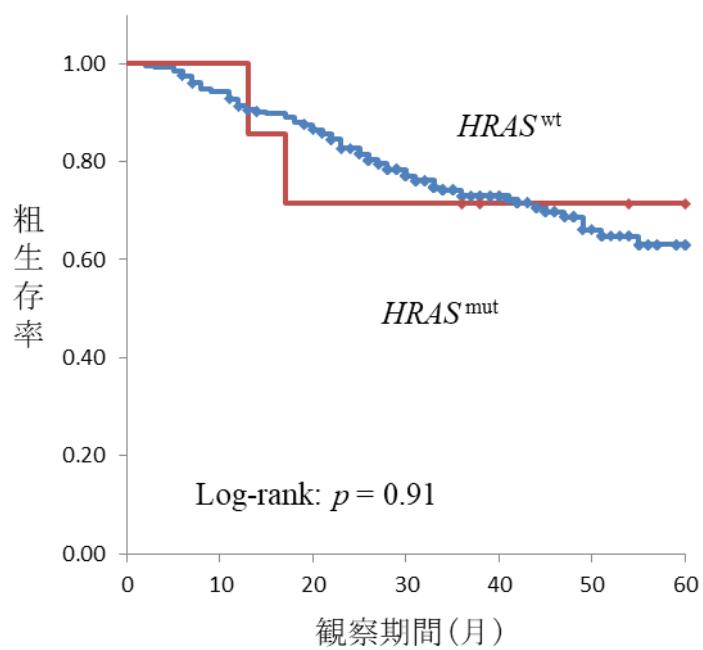
*PIK3CA* 変異の有無により粗生存率に差を認めなかった.

図 15. *AKT* 変異の有無による予後の差



*AKT* 変異の有無により粗生存率に差を認めなかった.

図 16. *HRAS* 変異の有無による予後の差



*HRAS* 変異の有無により粗生存率に差を認めなかった。

## 7. 遺伝子変異と蛋白表現型を併用した p53 機能分類の予後との相関

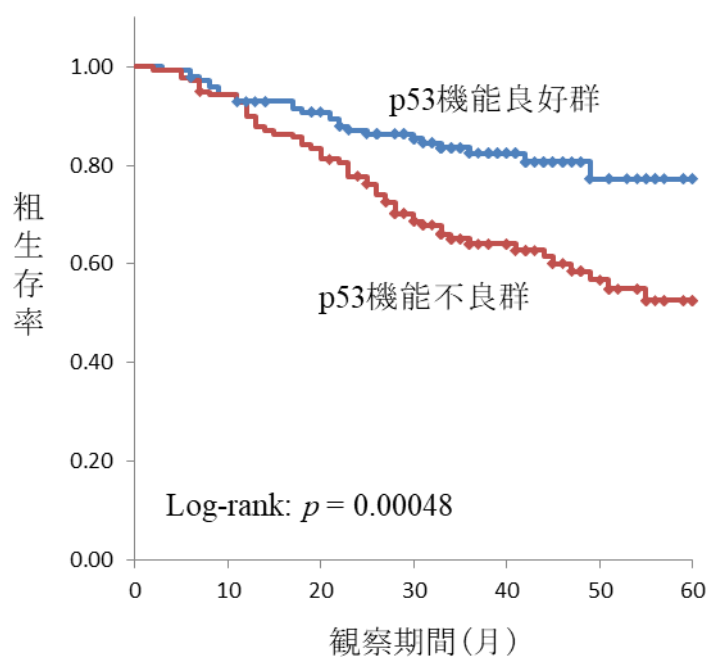
p16 陽性中咽頭癌を除外した 284 例の内、p53 機能不良群は 140 例、p53 機能良好群は 144 例であった。p53 機能不良群は p53 機能良好群に比較して、統計学的に有意に 2 年、5 年粗生存率が低かった (p53 機能不良群 vs p53 機能良好群 2 年粗生存率、78% vs 87%、5 年粗生存率、53% vs 77%、 $p = 0.00048$ ) (図 17)。

粗生存において、単変量解析では、pT、pN、脈管侵襲、リンパ管侵襲、神経周囲浸潤、p53 機能分類、術後治療が有意な予後因子であり、多変量解析では、pT と p53 機能分類が独立した予後因子であった (表 6)。

局所無再発生存において、単変量解析では、切除断端と p53 機能分類が有意な予後因子であり、多変量解析でも、切除断端と p53 機能分類が独立した予後因子であった (表 7)。

遠隔無再発生存において、単変量解析では、飲酒歴、原発巣、pT、pN、脈管侵襲、リンパ管侵襲、p53 機能分類、術後治療が有意な予後因子であり、多変量解析では、pN、p53 機能分類、術後治療が独立した予後因子であった (表 8)。

図 17. p53 機能分類による予後の差



TP53 変異型と p53 免疫染色を併用した p53 機能分類では精度の高い予後予測が可能であった.

表6. 粗生存に対する予後の検討

	単変量解析		多変量解析	
	ハザード比 (95% 信頼区間)	P 値	ハザード比 (95% 信頼区間)	p 値
性別 (男性 vs 女性)	1.09 (0.64-1.87)	0.74	-	-
年齢 (75以上 vs 75未満)	1.58 (0.98-2.55)	0.061	-	-
喫煙 (smokers vs nonsmokers)	1.23 (0.78-1.95)	0.37	-	-
飲酒 (drinkers vs nondrinkers)	1.55 (0.99-2.41)	0.051	-	-
原発巣 (口腔 vs 咽頭 / 喉頭)	0.75 (0.48-1.17)	0.20	-	-
pT 分類 (pT3/pT4 vs pT1/T2)	3.16 (2.02-4.93)	4.52E-07	2.03 (1.25-3.31)	0.0044
pN 分類 (pN2/N3 vs pN0/N1)	3.17 (2.04-4.92)	2.75E-07	1.69 (0.92-3.12)	0.092
脈管侵襲 (v1/v2 vs v0)	2.79 (1.78-4.35)	6.56E-06	1.30 (0.75-2.25)	0.35
リンパ管侵襲 (Ly1/Ly2 vs Ly0)	3.05 (1.96-4.74)	8.30E-07	1.33 (0.75-2.36)	0.33
神経周囲浸潤 (n1/n2 vs n0)	2.99 (1.87-4.79)	4.81E-06	1.69 (0.99-2.91)	0.057
切除断端 (陽性 vs 陰性)	1.22 (0.74-2.02)	0.44	1.34 (0.79-2.29)	0.28
p16 (陰性 vs 陽性)	2.28 (0.72-7.24)	0.16	-	-
p53機能分類 (予後不良群 vs 予後良好群)	2.27 (1.42-3.65)	0.00067	2.19 (1.36-3.54)	0.0013
PIK3CA (変異型 vs 野生型)	0.93 (0.40-2.13)	0.86	-	-
AKT (変異型 vs 野生型)	1.10 (0.40-3.01)	0.85	-	-
HRAS (変異型 vs 野生型)	0.92 (0.23-3.74)	0.91	-	-
術後治療 (あり vs なし)	3.17 (1.94-5.17)	3.74E-06	1.32 (0.71-2.44)	0.39

表7. 局所無再発生存に対する予後の検討

	単変量解析		多変量解析	
	ハザード比 (95% 信頼区間)	P 値	ハザード比 (95% 信頼区間)	p 値
性別 (男性 vs 女性)	0.81 (0.46-1.43)	0.46	-	-
年齢 (75以上 vs 75未満)	1.54 (0.88-2.66)	0.13	-	-
喫煙 (smokers vs nonsmokers)	0.78 (0.47-1.29)	0.33	-	-
飲酒 (drinkers vs nondrinkers)	0.68 (0.39-1.19)	0.18	-	-
原発巣 (口腔 vs 咽頭 / 喉頭)	1.10 (0.66-1.83)	0.73	-	-
pT 分類 (pT3/pT4 vs pT1/T2)	1.60 (0.96-2.67)	0.072	-	-
pN 分類 (pN2/N3 vs pN0/N1)	0.89 (0.49-1.63)	0.71	-	-
脈管侵襲 (v1/v2 vs v0)	0.70 (0.40-1.24)	0.23	-	-
リンパ管侵襲 (Ly1/Ly2 vs Ly0)	1.68 (0.99-2.86)	0.055	-	-
神経周囲浸潤 (n1/n2 vs n0)	1.07 (0.54-2.11)	0.85	-	-
切除断端 (陽性 vs 陰性)	2.55 (1.52-4.29)	0.00038	2.55 (1.51-4.29)	0.00043
p16 (陰性 vs 陽性)	1.63 (0.51-5.20)	0.41	-	-
p53機能分類 (予後不良群 vs 予後良好群)	2.48 (1.44-4.27)	0.0011	2.29 (1.33-3.95)	0.0030
PIK3CA (変異型 vs 野生型)	0.38 (0.09-1.55)	0.18	-	-
AKT (変異型 vs 野生型)	0.33 (0.05-2.39)	0.27	-	-
HRAS (変異型 vs 野生型)	2.06 (0.64-6.58)	0.22	-	-
術後治療 (あり vs なし)	0.44 (0.16-1.22)	0.12	0.40 (0.15-1.12)	0.081

表8. 遠隔無再発生存に対する予後の検討

	単変量解析		多変量解析	
	ハザード比 (95% 信頼区間)	P 値	ハザード比 (95% 信頼区間)	p 値
性別 (男性 vs 女性)	1.41 (0.59-3.39)	0.44	-	-
年齢 (75以上 vs 75未満)	0.73 (0.30-1.76)	0.49	-	-
喫煙 (smokers vs nonsmokers)	1.73 (0.83-3.58)	0.14	-	-
飲酒 (drinkers vs nondrinkers)	2.16 (1.12-4.17)	0.022	0.56 (0.23-1.35)	0.20
原発巣 (口腔 vs 咽頭 / 喉頭)	0.35 (0.17-0.71)	0.0036	0.78 (0.33-1.85)	0.58
pT 分類 (pT3/pT4 vs pT1/T2)	3.54 (1.79-7.00)	0.00027	1.43 (0.66-3.09)	1.43
pN 分類 (pN2/N3 vs pN0/N1)	7.61 (3.74-15.5)	2.29E-08	4.34 (1.54-12.2)	0.0054
脈管侵襲 (v1/v2 vs v0)	4.33 (2.13-8.76)	4.63E-05	1.98 (0.85-4.59)	0.11
リンパ管侵襲 (Ly1/Ly2 vs Ly0)	3.86 (2.00-7.47)	5.97E-05	0.91 (0.39-2.11)	0.83
神経周囲浸潤 (n1/n2 vs n0)	2.23 (1.07-4.65)	0.033	0.77 (0.31-1.89)	0.57
切除断端 (陽性 vs 陰性)	0.82 (0.36-1.88)	0.64	0.64 (0.27-1.53)	0.32
p16 (陰性 vs 陽性)	1.52 (0.36-6.37)	0.57	-	-
p53機能分類 (予後不良群 vs 予後良好群)	3.09 (1.45-6.58)	0.0034	3.80 (1.66-8.69)	0.0015
PIK3CA (変異型 vs 野生型)	1.04 (0.32-3.39)	0.95	-	-
AKT (変異型 vs 野生型)	0.61 (0.08-4.46)	0.63	-	-
HRAS (変異型 vs 野生型)	0.92 (0.12-6.71)	0.93	-	-
術後治療 (あり vs なし)	8.05 (4.13-15.70)	8.93E-10	3.59 (1.46-8.84)	0.0055

## 8. 外科的切除断端距離と p53 機能分類の局所予後との相関

本検討において、病理学的完全切除症例は 222 例であった。このうち、術後放射線治療を施行した 29 例を除外した口腔癌 117 例、喉頭咽頭癌 76 例の計 193 例を用い、原発巣別に切除断端距離と p53 機能分類の局所再発との関係を解析した。これらの症例の中で、局所再発を認めた症例は 35 例(18%)であった。また観察期間中央値は口腔癌 34 カ月(2-72 カ月)、咽頭喉頭癌 34 カ月(7-74 カ月)であった。

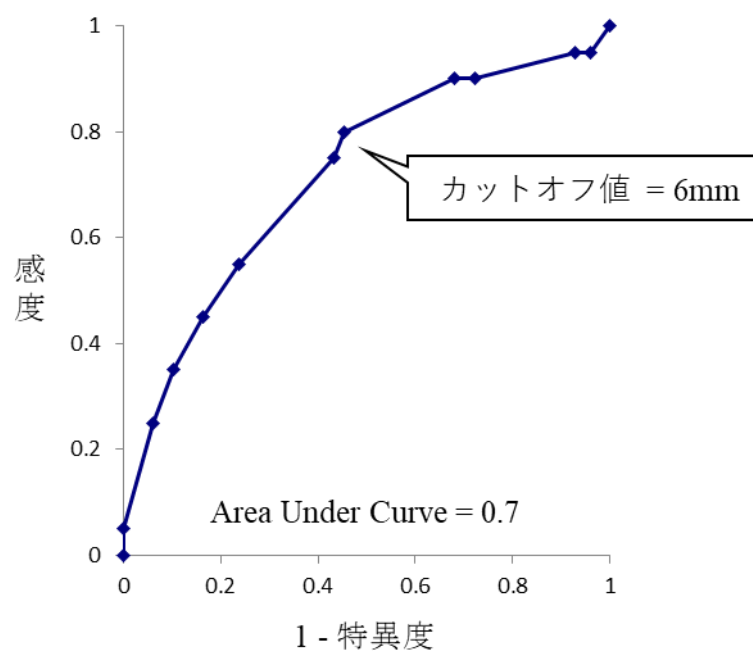
まず口腔癌 117 例において、局所再発をきたす切除断端距離のカットオフ値は、ROC 曲線解析により 6mm (AUC=0.7) であった(図 18-a)。切除断端距離が 6mm 未満であった症例では、p53 機能分類のステータスに関わらず、局所無再発生存に差は認めなかった(図 18-b,c)。一方、切除断端距離が 6mm 以上の症例では、p53 機能不良群は、p53 機能良好群に比較して統計学的に有意に 3 年局所無再発生存率が低かった (p53 機能不良群 vs p53 機能良好群 87% vs 100%  $p = 0.025$ ) (図 18-b,d)。

次に喉頭咽頭癌 76 例においては、局所再発をきたす切除断端距離のカットオフ値は ROC 曲線解析により 4mm (AUC=0.5) であった(図 19-a)。口腔癌同様に、切除断端距離が 4mm 未満の場合は、p53 機能分類のステータスに関わらず、局所無再発生存に差は認めなかった(図 19-b,c)。切除断端距離が 4mm 以上の症

例では、p53 機能不良群は、p53 機能良好群に比較して統計学的に有意に 3 年局所無再発生存率が低かった (p53 機能不良群 vs p53 機能良好群 70% vs 100%  $p = 0.0060$ ) (図 19-b,d)。

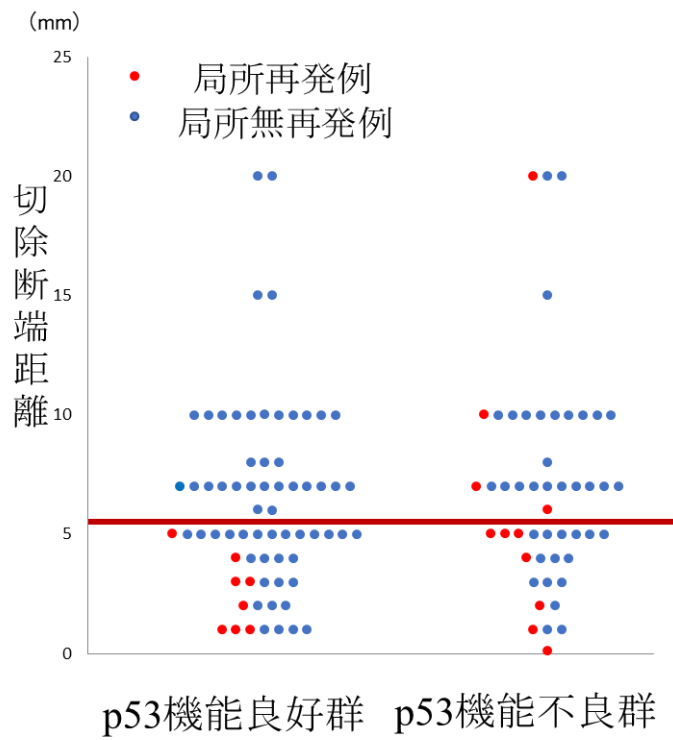
図 18. 口腔癌における切除断端のカットオフ値と p53 機能分類

(a) ROC 曲線解析によるカットオフ値の設定



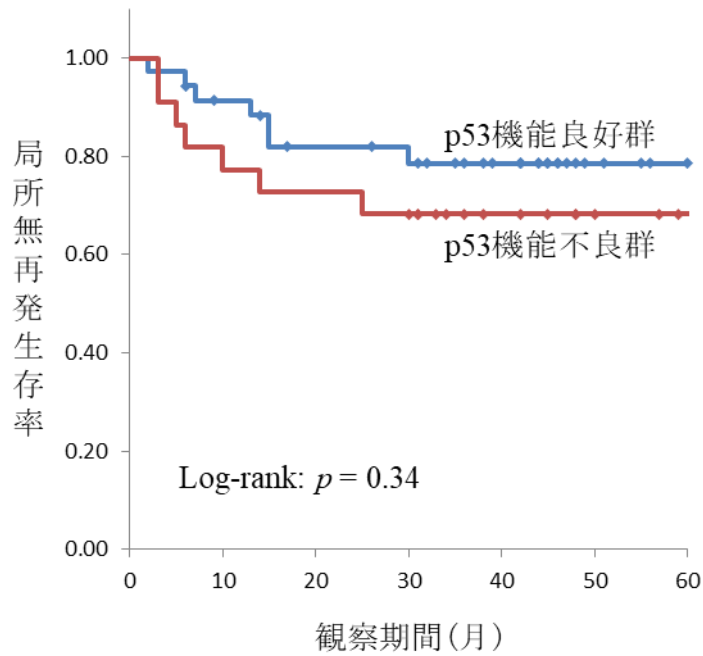
ROC 曲線解析による口腔癌の断端距離の局所再発のカットオフ値(曲線における左上に最も近い点)は **6mm** であった.

(b) 口腔癌における切除断端距離と p53 機能分類の関係



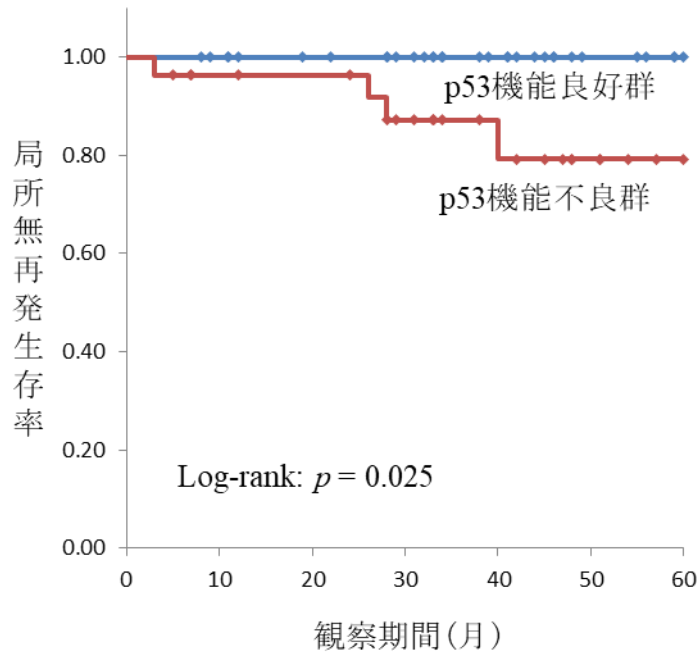
p53 機能不良群では 6mm 以上の断端距離でも再発症例を認めた.

(c) 切除断端距離 6mm 未満の口腔癌における p53 機能分類と局所無再発生存率  
の関係



群断端距離が 6mm 未満であった場合、p53 機能不良群と p53 機能良好群で局所無再発生存に統計学有意差は認めなかった。

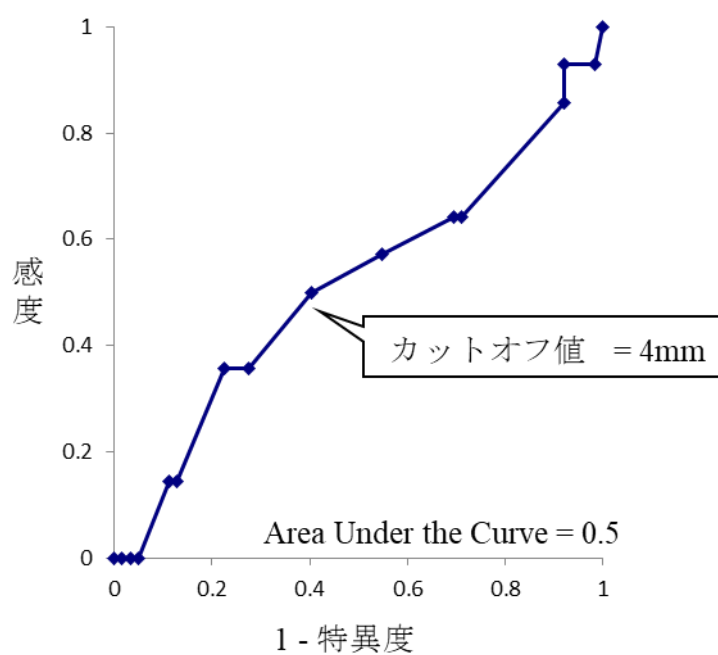
(d) 切除断端距離 6mm 以上の口腔癌における p53 機能分類と局所無再発生存率  
の関係



群断端距離が 6mm 以上であった場合、p53 機能不良群は p53 機能良好群と比較し統計学的に有意に局所無再発生存率が低かった。

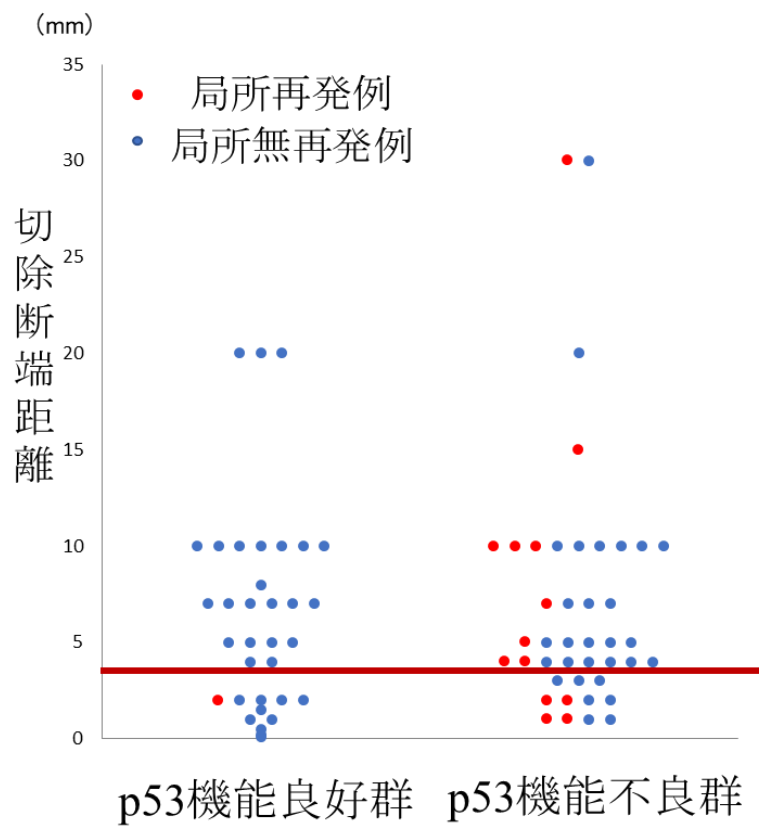
図 19. 咽頭喉頭癌における切除断端のカットオフ値と p53 機能分類

(a) ROC 曲線解析によるカットオフ値の設定



ROC 曲線解析による咽頭喉頭癌の断端距離の局所再発のカットオフ値(曲線における左上に最も近い点)は **4mm** であった。

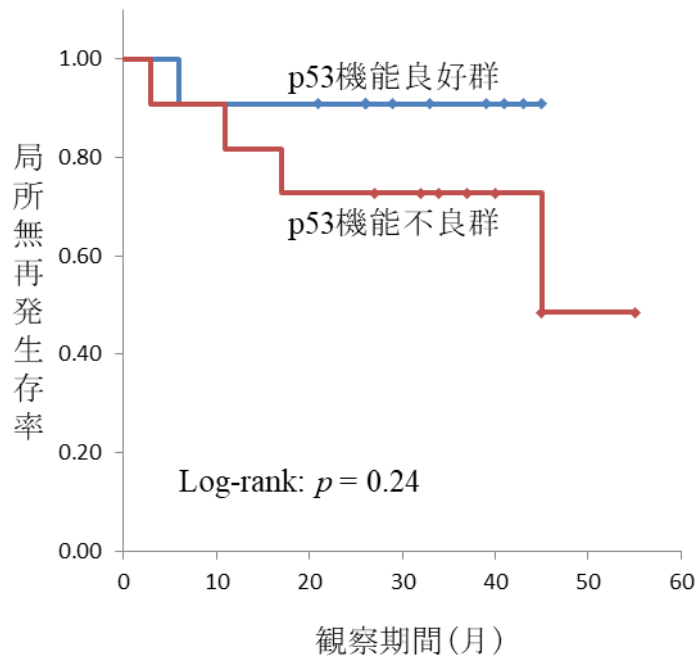
(b) 咽頭喉頭癌における切除断端距離と p53 機能分類の関係



p53 機能不良群では 4mm 以上の断端距離でも再発症例を認めた.

(c) 切除断端距離 4mm 未満の咽頭喉頭癌における p53 機能分類と局所無再発生

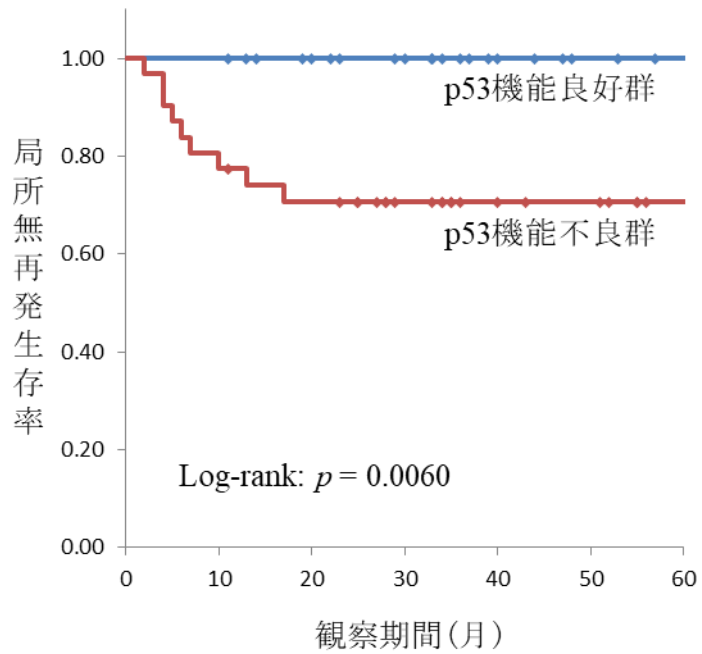
存率の関係



群断端距離が 4mm 未満であった場合、p53 機能不良群と p53 機能良好群で局所無再発生存に統計学有意差は認めなかった。

(d) 切除断端距離 4mm 以上の咽頭喉頭癌における p53 機能分類と局所無再発生

存率の関係



群断端距離が 4mm 以上であった場合、p53 機能不良群は p53 機能良好群と比較

し統計学的に有意に局所無再発生率が低かった。

## 考察

本研究では詳細な臨床情報に紐づけされた 300 例を超える多数の頭頸部扁平上皮癌の FFPE 検体を用いてゲノム解析を施行し、p16 陽性中咽頭癌を除外した頭頸部扁平上皮癌において、*TP53* 変異解析と p53 蛋白表現解析を併用した p53 機能分類は粗生存、局所無再発生存、遠隔無再発生存に対する独立した予後因子であること、さらに p53 機能不良群では十分な切除断端距離が得られても局所無再発生存率が低いことを明らかにした。また、*PIK3CA*、*AKT*、*HRAS* 変異は予後には関与していないこと、p16 陽性中咽頭癌において *TP53* 変異は予後因子としないことも示した。

p16 陽性中咽頭癌すなわち HPV 関連中咽頭癌は若年に多く、飲酒喫煙との関連が少なく、*TP53* 変異の頻度が低く、予後良好であり分子生物学的にその他の頭頸部癌とは異なる性質を持つことが知られている(34,35)。本検討においても、p16 陽性中咽頭癌は若年者の頻度が多く、*smoker* の頻度が少なく、*TP53* 変異の頻度が低く、その他の頭頸部癌に比較して予後良好であり、過去の報告に矛盾しなかった。HPV の関連性を証明する検査として、ウイルス DNA を *in situ hybridization* で直接同定する方法と HPV 感染により間接的に上昇する p16 蛋白を代理マーカーとして評価する p16 免疫染色がある。中咽頭癌の日常診療においては、すでに p16 免疫染色による HPV 関連癌の診断が一般化されており、

UICC/AJCC TNM 分類第 8 版、及び本邦の頭頸部癌治療ガイドライン第 7 版でも p16 免疫染色による診断が推奨されており、本研究でもこれに追随した(15,36)。

一方で、中咽頭癌以外の頭頸部癌における p16 免疫染色の HPV 感染における代理マーカーとしての妥当性は示されていない(37)。p16 をコードする遺伝子は *CDKN2A* であり、細胞周期の調節を司っている。p16 過剰発現の原因として、HPV 感染と *RB* 遺伝子の変異がある。HPV 感染により発現するウイルス由来の E7 蛋白により *RB* 遺伝子の不活性化が生じ、p16 が細胞内で蓄積した状態での細胞増殖が生じる。また、*RB* 遺伝子自体に変異が生じ機能不全が生じた場合でも、細胞周期が止まらず、p16 の過剰発現が生じる。実際 TCGA の症例群でも、非中咽頭癌も含めた HPV 非関連頭頸部癌の 4%に *RB* 変異が生じていることが報告されており、これらの症例では免疫染色にて p16 は陽性となっていた(38-40)。過去の報告によると、中咽頭癌を除く口腔咽頭喉頭癌の 10~20%で免疫染色にて p16 陽性であるが、中咽頭癌とは異なり、HPV 感染と一致していないことも多く、予後との関連も十分には解明されていない(37)。本検討においては、口腔・下咽頭・喉頭癌の 8%に免疫染色にて p16 陽性症例を認めたが、予後においては統計学的な有意差は認めなかった。

p16 陽性中咽頭癌において、*TP53* 変異が予後因子となりうるかについては議論が分かれている。いくつかの報告では予後因子として有効と報告されている

が(41)、大規模な後ろ向き研究で *TP53* 変異情報による予後の切り分けはできなかったとする報告もある(42)。本検討では、p16 陽性中咽頭癌において、*TP53* 変異、及び p53 機能分類は予後因子とはならなかった。

一方、HPV 非関連癌では、飲酒、喫煙の関与が強く、*TP53* 変異の頻度も多いことが知られている。そこで、p16 陽性中咽頭癌を除外した症例群で *TP53* 変異を中心とした臨床予後解析を行った。

*TP53* のミスセンス変異は、過去の報告同様コドン 100-300 番の DNA 結合ドメインに生じていた。ミスセンス変異の臨床予後との相関については、DNA 結合ドメインの L2 領域 (コドン 163-195)、L3 領域 (コドン 236-251) の変異が予後不良と報告されている(18)。しかしながら、本検討では、L2・L3 領域以外の変異でも予後不良な症例が存在していた。変異による蛋白構造変化をスコア化した EAp53 スコアが高値な症例は予後不良とも報告されているが(20)、我々の症例群では、EAp53 スコアも一定の傾向は認めるものの予後予測に対して効果的ではなく、本研究ではミスセンス変異に限定すると解析数は 69 例であり、サンプルサイズが一因となっている可能性が考えられた。

さらに、*TP53* はがん抑制遺伝子であり、通常は機能欠失型変異により機能不全が生じるが、近年、p53 機能獲得型ミスセンス変異も報告されており、頭頸部扁平上皮癌においてもこの変異を有した場合、浸潤性が高く、シスプラチンに抵

抗性があり、転移をきたしやすいと報告されている(20,43)。過去に報告されている機能獲得型変異として、R175H、G245S、R248Q、R248W、R273H、D281Gなどが上げられる(44)。本研究ではR249W、D281Gを認めたが、どちらの症例も非担癌生存しており、予後との相関は認めなかった。このように、ミスセンス変異は変異部位、塩基置換の種類により、p53 蛋白に与える影響は様々である。この多様性を極める TP53 ミスセンス変異を一般化するため、我々は、p53 蛋白表現型により TP53 ミスセンス変異を分類することを考案した。

免疫染色を利用した p53 蛋白表現型による予後予測は、乳癌や卵巣癌では既に報告されている(45,46)。Boylet らは、p53 免疫染色を強陽性、強陰性とそれ以外に分類することで、乳癌の粗生存率に p53 免疫染色が有用なことを報告している(45)。しかしながら、p53 免疫染色の評価法は十分にコンセンサスを未だ得られていない。

p53 免疫染色の判定基準については、過去にも様々な考察がなされている。本研究では、p53 免疫染色を EP、Lost、Others に分類した。p53 蛋白はストレスが加わっていない正常状態でも存在しているため、弱い核濃染を認める。TP53 ミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエーションは p53 蛋白構造に軽度から中等度の構造変化を生じさせ、プロテオソームである Murine double minute 2(MDM2)による分解を受けず、p53 蛋白の核内蓄積をもたらす、結果として、免

疫染色で EP を呈すると考えられる。一方、*TP53* ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常は p53 蛋白構造に高度な構造変化をもたらすことで、mRNA または蛋白レベルでの deletion が生じ、免疫染色で Lost が生じると考えられる (45,47)。しかしながら、免疫染色とシーケンス結果は一定の相関を認めるものの、完全には一致しないことも分かっている。この原因として、ミスセンス変異によっては Loss of heterozygosity (LOH) を認めなくても残存する野生型アレルの機能抑制を引き起こすドミナント・ネガティブ変異が存在すること、ヒストンアセチル化などといったエピジェネティクス異常による遺伝子不活化の要素、さらには細胞ストレスにより野生型 *TP53* が蓄積することなどが考えられている (45,46)。

p53 には様々な種類の抗体があるが、日常診療でよく使用されるクローンは 20～25 番目のアミノ酸にエピトープがある DO7 クローンである。32～79 番目のアミノ酸にエピトープがある PAb1801 クローンも用いられることがあるが、DO7 クローンに比較して、感度が低いとされている。本研究では DO7 クローンを使用した。

本研究の p53 免疫染色分類法における p53 蛋白表現型と *TP53* 変異型の相関は、蛋白表現型が EP であった場合にミスセンス変異、in-frame deletion、イントロンバリエーションである感度は 59%、特異度は 60%であり、蛋白表現型が Lost で

あった場合にナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常である感度は 67%、特異度は 84%であった。過去の報告によると、免疫染色によりミスセンス変異を予測する感度は 80%、特異度は 53%、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング異常を予測する感度は 40%、特異度は 93%とされている。今回の結果はナンセンス変異に関して矛盾はないものの、ミスセンス変異の感度が低かった(47)。これは、p53 免疫染色における核濃染所見の判定を厳しくしたことが原因と考えられた。異常染色パターンの評価を厳しくしたことで、評価者間の評価の一致率は  $\kappa$  値 0.89 と高いものとなっていた。

以上より、TP53 変異型を免疫染色のみによって予測することには限界があると考えられたが、本研究では次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析と、古典的な免疫組織染色による蛋白評価を組み合わせることにより、精度の高い予後解析が可能となることを明らかにした。特に、TP53 ミスセンス変異は p53 蛋白に与える影響が様々であるため、蛋白質レベルでの評価も重要であると考えられた。また、次世代シーケンサーによるゲノム解析は腫瘍塊全体の平均化されたデータしか得られない一方で、免疫染色では heterogeneity に富む頭頸部扁平上皮癌の各部位における蛋白表現型を評価できるのも精度を高めた理由と考えられた。本研究では予備解析として p16 陽性中咽頭癌を除外した症例群において、Decision tree 解析によるデータマイニングを施行した。その結果、TP53 変異解析

結果をさらに、p53 免疫組織染色による蛋白表現型で分類することでより精度の高い予後解析が可能となることが示唆された。それに基づく p53 機能分類は、粗生存、局所無再発生存、遠隔無再発生存において過去に明らかになっている因子と独立した予後因子となった。

頭頸部扁平上皮癌の外科治療において、病理学的に切除断端が陰性であっても 10~30%で局所再発が生じると報告されている(48)。本研究においても、病理学的断端陰性切除後の局所再発率は 18%であった。この原因としては、病理学的切除断端評価の限界と切除断端における前癌病変からの再発が考えられている(49,50)。頭頸部領域において、局所再発をきたす切除断端距離は一般的には 5-7mm と考えられている(23,51-57)。本検討でも、局所再発をきたす断端距離のカットオフ値は、口腔癌では 6mm、咽喉頭癌では 4mm であった。咽喉頭癌においては、ROC 曲線における AUC が 0.5 と有効なカットオフ値を設定できなかった。これはサンプルサイズの問題、咽頭癌・喉頭癌を一つのグループにまとめたことが原因と考えられた。口腔、咽頭、喉頭いずれの部位においても、断端近接例においては p53 機能分類のステータスに関わらず一定の率で局所再発をきたす一方で、十分な断端距離が得られても、p53 予後不良群では局所無再発生存率が低いことが明らかになり、局所における治療強度をあげる必要性が示唆された。

切除断端陽性、脈管侵襲、リンパ管侵襲、神経周囲浸潤、pT3、pT4 に対しては術後化学放射線治療が局所制御率を高めることが明らかになっているが(49,58-64)、断端近接例に対する術後治療適応については一定のコンセンサスがなない。本研究で用いた p53 機能分類は、断端近接例に対する追加治療を判断する因子になる可能性がある。さらに、p53 機能不良群においては、30mm 以上の安全域を得ても、局所再発を認めた症例があった。このような症例においては、さらなる広範囲切除は機能的にも困難であると考えられ、外科治療のみで腫瘍コントロールを狙うのは困難であると考えられた。現在、当院で同時期に根治的放射線治療が施行された、頭頸部扁平上皮癌症例においても、TP53 変異解析および p53 蛋白表現型解析を施行中である。これにより、放射線感受性に基づいた個別化放射線治療の樹立も目指している。

興味深いことに、HPV 非関連頭頸部扁平上皮癌において、TP53 不活性型変異に HRAS、PIK3CA 変異が伴う症例は予後良好であると報告されている(14)。しかしながら本検討では PIK3CA、HRAS、AKT 変異と予後の相関は認められなかった。本研究では PIK3CA、HRAS 変異症例が少なく、さらに症例を増やし今後検討していく必要があると考えられた。

最後に本研究の限界について述べる。第一に、本研究は単施設における後ろ向き比較試験のため、既知の交絡因子においては両群間の患者背景に有意差は

認めなかったが、測定不能な因子におけるバイアスが存在する可能性がある。第二に、研究対象を外科治療症例に限定しているため、あくまで切除可能症例が対象となっており、潜在的に予後良好な症例が抽出される選択バイアスが生じている可能性がある。第三に、本検討では頭頸部癌の亜部位を口腔と咽頭・喉頭の2亜部位に分けて検討を行った。網羅的ゲノム解析を施行した過去の報告においてもこのような分類は見受けられるが、本来であれば亜部位によって術式、予後、再発様式が異なるため、個別に解析した方が望ましい。第四に、蛋白表現型解析において、免疫染色という半定量的解析を用いており、一般化した場合に評価者間による測定バイアスが生じる可能性がある。

結論として、本研究では頭頸部扁平上皮癌の FFPE 検体からの *TP53* 全エクソンシーケンスと p53 蛋白表現型を併用した解析により、精度の高い予後解析を可能とした。今後さらなる技術革新により、術前の微細な生検検体からゲノム解析が可能となり、腫瘍の分子生物学的な特徴を予測することが可能になると思われる。これらの情報は、個別化外科治療の樹立につながり、術式決定への一要素になる可能性がある。

## 参考文献

1. Kamanger F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24:2137-2150,2006.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, YuM, Ruhl J, Tatalvich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER cancer statistics review, 1975-2011. National cancer institute, Bethesda, 2014. [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2011/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2011/),2014.
3. 国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター. がん情報サービス <http://gan-joho.jp/professional/index.html> Accessed March 14,2019.
4. Japan Society for Head and Neck Cancer Cancer Registry Committee: Report of Head and Neck Cancer Registry of Japan Clinical Statistics of Registered Patients 2013. *頭頸部癌* 41:1-115,2015.
5. 加藤孝邦、波多野篤、斉藤孝夫. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域疾患の最新疫学: 頭頸部癌.耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85:1076-1083,2013
6. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet* 88:344-346,1992
7. Matsuo K, Wakai K, Hirose K, Ito H, Saito T, Tajima K. Alcohol dehydrogenase 2 His47Arg polymorphism influences drinking habit independently of aldehyde dehydrogenase 2 Glu487Lys polymorphism: analysis of 2,999 Japanese subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1009-1013,2006
8. IARC:IARC monographs on the evaluation of the evaluation of carcinogenic risk to humans. Vol 83: Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Press, Lyon, 2004.
9. IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk humans. Vol 89: Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-Nitrosamines. IARC Press, Lyon, 2007.
10. Carey TE, Prince MEP. primer of the Molecular Biology of cancer, 2<sup>nd</sup> ed, wolters Kluwer Health p139-146,2015
11. Hama T, Tokumaru Y, Fujii M, Yane K, Okami K, Kato K, Masuda M, Mineta H, Nakashima T, Sugasawa M, Sakihama N, Yoshizaki T, Hanazawa T, Kato H, Hirano S, Imanishi Y, Kuratomi Y, Otsuki N, Ota I, Sugimoto T, Suzuki S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a multicenter study in japan. *Oncology* 87:173-182,2014
12. 徳丸 裕、平野滋、益田宗幸、菅澤正、中島寅彦、花澤豊行、崎浜敬之、倉富勇一朗、丹生健一、加藤久幸、今西順久、藤井正人、杉本太郎、鈴木真輔、

- 佐藤雄一郎、家根且有、濱孝憲、志賀清人、峯田周幸、吉崎智一、大上研二、太田一郎. 中咽頭癌におけるヒト乳頭種ウイルスの関与に関する多施設共同研究. 頭頸部癌 37:398-404,2011
13. 人口動態統計 (厚生労働省大臣官房統計情報部) .<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jin-kou/geppo/nengai15/index.html>  
Accessed March 14,2019.
  14. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517:576-582,2015
  15. Horne ZD, Glaser SM, Vargo JA, Ferris RL, Balasubramani GK, Clump DA, Heron DE, Beriwal S. Confirmation of proposed human papillomavirus risk-adapted staging according to AJCC/UICC TNM criteria for positive oropharyngeal carcinomas. *Cancer* 122: 2021-2030, 2016
  16. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bottegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Winstein JN, Trevino L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Voglesten B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333:1154-1157,2011
  17. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, Mckenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortes ML, Auclair D, Berger MF, Sakasena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareno C, Fernander-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zaigla J, Winckler W, Ardie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333:1157-1160,2011
  18. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastere A, Benoit N, Califano JA, Goodwin J, Kenedy D, Sausders J, Westra W, Sidransky D, Koch WN. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 357:2552-2561,2007.
  19. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9:701-713,2009
  20. Neskey DM, Osman AA, Ow TJ, Katsonis P, McDonald T, Hicks SC, Hsu TK, Pickering CR, Ward A, Patel A, Yordy JS, Skinner HD, Giri U, Sano D, Story MD, Beadle BM, El-Naggar AK, Kies MS, Willian WN, Caulin C, Frederik M, Kimmel M, Myers JN, Lichtarge O. Evolutionary action score of TP53 identifies high-risk

- mutations associated with decreased survival and increased distant metastases in head and neck cancer. *Cancer Res* 75:1527-1536,2015
21. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu J, Shi Z, Chambers MC, Zimmerman LJ, Shaddox KF, Kim S, Davies SR, Wang S, Wang P, Kinsinger CR, Rivers RC, Rodriguez H, Townsend RR, Elis MJ, Carr SA, Tabb DL, Coffey RJ, Slebos RJ, Liebler DC, NCI CPTAC. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 513: 382-387,2014
  22. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13:227-232,2012
  23. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, Takes RP, Silver CE, Westra WH, Seethala RR, Rodrigo JP, Corry J, Bradford CR, Hunt JL, Strojan P, Devaney KO, Gnepp DR, Hartl DM, Kowalski LP, Rinaldo A, Barnes L. Surgical margins in head and neck cancer: A contemporary review. *Head Neck* 35:1362-1370,2013
  24. Petruzzi M, Lucchese A, Baldoni E, Grassi FR, Serpico. Use of Lugol's iodine in oral cancer diagnosis: an overview. *Oral oncology* 46:811-813,2010
  25. Ismailov S, Rashitov M, Kobayashi M, Shibata N, Kato Y, Omi Y, Iihara M, Okamoto T. Trefoil factor 3 (TFF3) mRNA expression level in follicular thyroid tumors using formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks. *Open Journal of Pathology* 3:78–84,2013
  26. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One* 2:e1261,2007.
  27. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, González-Barón M, Pinto-Marín A, Hardisson D, López R, Madero R, Cejas P, Mendiola M, Espinosa E, Vara JA. Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. *Biotechniques* 48:389–397,2010
  28. Mittempergher L, de Ronde JJ, Nieuwland M, Kerkhoven RM, Simon I, Rutgers EJ, Wessels LF, Van't Veer LJ. Gene expression profiles from formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissue are largely comparable to fresh frozen matched tissue. *PLoS One* 6:e17163,2011
  29. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Sheard J, Woolgar JA, Heliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing on oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res* 17:6262-6271,2011
  30. D'souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WN, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papilloma virus and oropharyngeal cancer.

N Engl J Med 356:1944-1956,2007

31. Melhem MF, Law JC, el-Ashmawy L, Johnson JT, Landerneau RJ, Srivastava S, Whiteside TL. Assessment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers. *Am J Pathol* 146:1170-1177,1995
32. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11:781-789,2010
33. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res* 17: 6262-6271, 2011
34. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguven-Tan PF, Weatra WH, Chng CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363:24-35,2010
35. Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, Urba SG, Eisbruch A, Teknos TN, Chepeha DB, Prince ME, Tsien CL, D'Silva NJ, Yang K, Kunit DM, Mason HL, Miller TH, Wallace NE, Bradford CR, Carey TE. Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol* 26:3138-3146,2008
36. El-Naggar AK, Westra WH. P16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* 34:459-461, 2012
37. ChungCH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, Wang D, Redmond KP, Shenouda G, Trptti A, Raben D, Gillison ML, Jordan RC, Le QT. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32:3930-3938, 2014
38. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cell correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumor suppressor gene product. *EMBO J* 14:503-511, 1995
39. Andi T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX. Etiological involvement of oncogenic human papilloma virus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 58:5-13, 1998
40. Heyes DN, Grandis JR, El-Naggar AK. The cancer Genome Atlas: Integrated analysis of genome alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*

31 :365s, 2013

41. Zhang W, Edwards A, Fang Z, Flemington EK, Zhang K. Integrative Genomics and Transcriptomics analysis reveals potential mechanisms for favorable prognosis of patients with HPV-positive head and neck carcinomas. *Sci Rep* 6:24927,2016
42. Tinhofer I, Stenzinger A, Eder T, Konschak R, Niehr F, Endris V, Distel L, Hautmann MG, Mandic R, Stromberger C, Weichert W, Budach V. Targeted next-generation sequencing identifies molecular subgroups in serum cell carcinoma of the head and neck with distinct outcome after concurrent chemoradiation. *Ann Oncol* 27:2262-2268,2016
43. Osman AA, Monroe MM, Ortega Alves MV, Patel AA, Katsonis P, Fitzgerald AL, Neskey DM, Frederick MJ, Woo SH, Caulin C, Hsu TK, McDonald TO, Kimmel M, Meyn RE, Lichtarge O, Myers JN. Wee-1 kinase inhibition overcomes cisplatin resistance associated with high-risk TP53 mutations in head and neck cancer through mitotic arrest followed by senescence. *Mol Cancer Ther* 14:608-619. 2015
44. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. *J Cell Biochem* 117:2682-2692, 2016
45. Boyle DP, McArt DG, Irwin G, Wilhelm-Benartzi CS, Lioe TF, Sebastian E, McQuaid S, Hamilton PW, James JA, Mullan PB, Catherwood MA, Harikin DP, Salto-Tellez M. The prognostic significance of the aberrant extremes of p53 immunophenotypes in breast cancer. *Histopathology* 65:340-352,2014
46. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih leM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 24:1248-1253,2011
47. Alsner J, Jensen V, Kyndi M, Offersen BV, Vu P, Borresen-Dale AL, Overgaard J. A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. *Acta Oncol* 47:600-607,2008
48. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, Van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of the neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 73:187-190,1994
49. van Houten VM, Leemans CR, Kummer JA, Dijkstra J, Kuik DJ, van den Brekel NW, Snow GB, Brakenhoff RH. Molecular diagnosis of surgical margins and local recurrence in head and neck cancer patients: a prospective study. *Clin Cancer Res* 10:3614-3620,2004
50. van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J,

- Leemans R, Van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol* 198:476-486,2002
51. Looser KG, Shah JP, Strong EW. The significance of “positive” margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg* 1:107-111,1978
  52. Chen TY, Emrich LJ, Driscoll DL. The clinical significance of pathological findings in surgically resected margins of the primary tumor in head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13:833-837,1987
  53. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 160: 410-414,1990
  54. Garzino-Demo P, Dell’Acqua A, Dalmasso P, Fasolis M, La Terra Maggiore GM, Ramieri G, Berrone S, Ramipino M, Schena M. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg* 34:344-350,2006
  55. El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, AI-Rajhi N, Ai-Amro A, Rostom AY, Abuzeid M, Otischan A, Flores AD. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38:193-199,2000
  56. Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, Pinto CA, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol* 40:780-786,2004
  57. Weijers M, Snow GB, Bezemer DP, van der Wal JE, van der Waal I. The status of the deep surgical margins in tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma and risk of local recurrence; an analysis of 68 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:146-149,2004
  58. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Sackis M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK; Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350:1937-1944,2004
  59. Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schweizer N. Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36:999-1004,1996
  60. Shah JP, Cendon RA, Farr HW, Strong EW. Carcinoma of the oral cavity. factors affecting treatment failure at the primary site and neck. *Am J Surg* 132:504-507,1976
  61. Johnson JT, Barnes EL, Myers EN, Schramm VL Jr, Borochoviz D, Sigler BA. The

- extracapsular spread of tumors in cervical node metastasis. *Arch Otolaryngol* 107: 725-729,1981
62. Feldman M, Fletcher GH. Analysis of the parameters relating to failures above the clavicles in patients treated by postoperative irradiation for squamous cell carcinomas of the oral cavity or oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:27-30,1982
63. Mirimanoff R, Wang CC, Doppke KP. Combined surgery and postoperative radiation therapy for advanced laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11:499-504,1985
64. Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillaumondegui O, Morrison WH, Weber RS, Garden AS, Frankenthaler RA. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26: 3-11,1993

## 謝辞

本研究は著者が国立がんセンター中央病院頭頸部外科で行った研究成果をまとめたものである。

東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授 山唄達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、この遂行にあたって終始ご指導を頂いた。ここに深謝の意を表す。東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の安藤瑞生先生、吉田昌史先生、齊藤祐毅先生には研究の遂行にあたり、日々適切なお助言、ご指導を頂いた。国立がん研究センター中央病院 頭頸部外科科長 吉本世一先生には、本研究のコアとなる詳細な臨床情報を提供頂いた。国立がん研究センター中央病院 病理診断科 森泰昌先生にはゲノム解析及び、病理学的評価の支援を頂いた。国立がん研究センター中央病院 頭頸部外科 小村豪先生には、日々適切なお助言を頂いた。他、多数の協力者があって初めてこの研究成果を得られたものとする。ここに感謝の意を表す。