

博士論文

下咽頭癌における Focal Adhesion Kinase 発現と
関連遺伝子異常の臨床的意義に関する研究

小 村 豪

目次

I. 要旨	3
II. 序文	4
1. 下咽頭癌について	4
2. <i>TP53</i> 変異、 <i>PIK3CA</i> 変異・増幅と頭頸部扁平上皮癌	7
3. Focal Adhesion Kinase (FAK) と癌の予後	8
III. 目的	10
IV. 方法	10
V. 結果	20
1. 107 例全体の生命予後	20
2. FAK 発現と臨床病態、生存率、及び遠隔転移出現率の検討	22
3. 下咽頭癌における HPV 関連癌の検討	30
4. <i>ALDH2</i> 多型の頻度及び飲酒量との関係の検討	30
5. <i>TP53</i> 変異の検討	34
6. <i>PIK3CA</i> 変異及び増幅の検討	47
VI. 考察	53
VII. 謝辞	59
VIII. 引用文献	60

I. 要旨

東京大学医学部附属病院で手術治療を行った下咽頭癌 107 例を対象として **Focal Adhesion Kinase (FAK)** の発現評価を行い、**FAK** 発現が予後因子であることを証明した。**FAK** 陽性症例はリンパ節転移が多く、遠隔転移出現率も高いことが明らかになった。また 2008 年以降の 57 症例の検討により、下咽頭癌発症にヒトパピローマウイルス感染は関与せず、*ALDH* 多型と飲酒量が寄与することを示した。*TP53* 変異症例は、頭頸部癌全部位を対象とした既報と同様、下咽頭癌においても予後不良であった。**FAK** 陽性と *TP53* 変異は独立した予後因子である一方、*PIK3CA* 遺伝子異常には有意な関連を見出せなかった。

II. 序文

1. 下咽頭癌について

頭頸部扁平上皮癌(以下、頭頸部癌)は頭蓋底から鎖骨上部までの粘膜に発生する、世界で6番目に多い癌腫である。¹ この頭頸部癌は鼻・副鼻腔癌、上咽頭癌、中咽頭癌、下咽頭癌、口腔癌、喉頭癌に大別され、それぞれ発癌要因が異なり、発生頻度においても地域差が存在する。例えば、上咽頭癌の一部はEBウイルス感染が関連し、中国南東部や台湾で発症数が多く、口腔癌は噛みタバコの習慣がある南アジアで多い。² 近年では頭頸部癌におけるヒトパピローマウイルス(Humanpapilloma virus 以下、HPV)感染発癌が明らかになり、特に中咽頭癌においてHPV感染例は予後良好なことが多く報告されている。^{3,4} 一方、以前より咽頭癌や食道扁平上皮癌(以下、食道癌)においては飲酒が発癌リスクとされ、エタノールの代謝産物であるアルデヒドが頭頸部癌及び食道癌の発癌物質として International Agency for Research on Cancerに認定されている。⁵ さらに、2型アルデヒド脱水素酵素(Aldehyde dehydrogenase-2 以下、ALDH2)の遺伝子多型(*ALDH2**2、Glu504Lys)はアルデヒドの代謝活性を低下させ、食道癌ならびに下咽頭癌の発生頻度を高めると報告されている。^{6,7} 野生型ホモ接合体(*ALDH2**1/*1)と比較して、変異型ヘテロ接合体(*ALDH2**1/*2)では代謝活性は1/16程度まで低下し、変異型ホモ接合体(*ALDH2**2/*2)ではほぼゼロまで低下する。人種別での*ALDH2**1/*2保因率は白人・黒人ではほぼ0%、黄色人種は40%と報告されていて、⁸日本人健常者コホートでは*ALDH2**1/*2が40.9%、*ALDH2**2/*2が9.4%に存在すると報告されている。⁹ このような背景があり、食道癌と下咽頭癌は日本人に多い癌種である。

下咽頭は解剖学的に梨状陥凹、輪状後部、後壁の3重部位に分類され、口側境界は中咽頭と、尾側は頸部食道と連続している。また、腹側は喉頭に連続し、これと共に気道と食道の分岐点を形成している。下咽頭には豊富なリンパ流が存在するため、下咽頭癌は早期からリンパ節転移を来たしやすく、頭頸部癌の中で最も予後不良とされている。また、摂食嚥下や発声に関わる部位であるため、下咽頭癌の治療には疾患制御と共にQOLの維持が要求される。¹⁰ 本邦では平均寿命の延長に伴い、この20年で口腔・咽頭癌の罹患率は上昇し、特に高齢者での罹患率が上昇している。¹¹ 罹患者の高齢化とそれに伴う併存症は、下咽頭癌の治療選択を難しくさせている。

今日、下咽頭癌に対しては手術療法、放射線療法、及び化学療法を組み合わせた集学的治療が行われている。このうち最も根治性の高い手術療法では、以前はT1/2の早期癌に対しても頸部外切開による下咽頭部分切除術＋遊離組織移植による再建術が行なわれていたが、この術式は術後に嚥下障害を伴うことが多く、適応は十分な臓器予備能を有する患者に限定されていた。しかし、近年では内視鏡¹² や手術支援ロボット(da Vinci)¹³ を用いた経口腔的切除が可能となり、臓器予備能の低い症例も含め早期癌への手術適応が広がりつつある。一方、T3/4の進行癌や臓器予備能の低い症例に対する手術では、隣接する喉頭の全摘出を余儀なくされる場合が多く、術後は発声機能を喪失する。従来は筆談、食道発声、電気喉頭発声などで術後コミュニケーションをとっていたが、近年ではvoice prosthesis (Provox2[®])により、簡便に代用音声を獲得され、失声によるQOL低下は軽減されつつある。^{14,15}

手術以外の治療法では、2000年にPignonらが93の前向き比較試験から大規模メタアナリシスを行い、化学放射線同時併用療法が放射線療法単独と比較して生存率の上乗せ効果があると報告した。¹⁶ また、一時下火になっていた導入化学療法についても、従来のPF療

法 (Cisplatin + 5FU) に Docetaxel を加えた TPF 療法による上乗せ効果があることが、2007 年の TAX324 試験によって明らかになった。¹⁷ これら化学療法の進歩に伴い、喉頭を温存したままの疾患制御に一定の進歩が認められている。しかし、白金製剤併用の化学放射線療法は治療強度が強く、高齢者や併存症を有する症例では適応できない。進行下咽頭癌症例における手術療法と化学放射線療法の比較では、手術群が予後良好の傾向にあると報告されているが、¹⁸ ランダム化前向き比較試験での化学放射線療法と手術療法の優劣検討は、喉頭摘出が関与するため事実上不可能である。以前、我々は局所進行下咽頭癌に対する咽頭喉頭摘出術の治療成績を検討し、5 年局所制御率は 76% で良好であるが、5 年疾患特異的生存率は 53% にとどまり、多発頸部リンパ節転移症例では遠隔転移出現率が高いことを報告している。¹⁹ 局所進行症例でも手術により良好な局所制御率が得られるため、下咽頭癌の治療成績向上には、遠隔転移の予防が重要と考えられる。RTOG8503 及び RTOG8824 試験の結果より、頭頸部癌の術後再発危険因子は多発頸部リンパ節転移、節外浸潤、断端陽性と報告されている。²⁰ 術後再発危険群に対する Cisplatin 併用の化学放射線療法は、放射線単独療法と比較して局所制御率に改善を認めたが、遠隔転移出現率の改善はなく、さらに病理学的多発頸部リンパ節転移症例については局所制御・遠隔転移いずれにも上乗せ効果を認めなかった。^{21,22} これらの結果から、新規抗腫瘍薬の開発と、それを用いた術後補助療法による多発頸部リンパ節転移症例の遠隔転移予防こそが下咽頭癌の制御率向上に繋がると考えられる。また、既存の TNM 分類や従来の病理組織診断学に基づいた治療体系をより洗練させるためには、治療標的分子あるいはバイオマーカーを同定し、治療方針の決定や治療標的そのものに結びつける戦略も必要である。

2. *TP53* 変異、*PIK3CA* 変異・増幅と頭頸部扁平上皮癌

*TP53*は染色体17p13領域に存在し、11個のexonで構成される癌抑制遺伝子である。ヒトの癌においては50%以上に変異が認められ、癌関連遺伝子の中で最も変異頻度が高いとされる。²³ 変異の多くはexon 5から8に認められる。²⁴ *TP53*がコードするp53タンパクは393アミノ酸で構成される核内タンパクで、N末端側から転写活性化ドメイン、プロリンリッチドメイン、DNA結合ドメイン、四量体形成ドメイン、塩基性ドメインの5つの主要ドメインから構成されている。通常、細胞にストレスがかからない状態では、p53はMDM2と結合の上でユビキチン化され、速やかに分解される。一方で様々なストレス(放射線照射、紫外線照射、癌遺伝子の活性化など)によりp53がリン酸化やアセチル化を起こすと四量体を形成し、標的遺伝子の転写活性を高め、細胞周期進行の停止、DNA複製の阻止、アポトーシスの誘導などを行う。このような多様な作用を持つことからp53は「ゲノムの護衛者 guardian of the genome」と呼ばれている。^{25,26} *TP53*の点突然変異やヘテロ接合性の消失(Loss of heterozygosity)により、p53の表現型に実質的な変化が起きる。^{27,28} これまで*TP53*変異の如何なる分類が臨床的に最も有効なバイオマーカーであるのか検討されてきたが、未だ決定的な分類法はない。頭頸部癌に関してPoetaらは、野性型*TP53*症例と比較して*TP53*変異症例では有意に予後不良であり、そのうちmRNAの翻訳すなわちタンパク質生成が途中で停止してしまうナンセンス変異・フレームシフト変異・スプライシング異常、もしくはL2、L3結合ドメイン部で極性・電荷が変化するミスセンス変異を含めた「Disruptive変異」を有する症例が最も予後不良であるとした。²⁹ 一方、乳癌では*TP53*変異のナンセンス変異・フレームシフト変異・スプライシング異常を含めた「Truncated変異」を有する症例が予後不良となり、³⁰ 頭頸部癌においてもLindenbergh-van der PlasらはTruncated変異症例が有意に予後不良であると報告した。³¹ ただし、PoetaらやLindenbergh-van der Plasらが対象とした症例群は口腔癌・中咽頭癌の割合

が多く、口腔癌は*TP53*変異頻度が高い一方、HPV関連中咽頭癌では*TP53*変異がほとんど存在しないことが知られている。さらに、下咽頭癌症例はそれぞれ32例、0例しか含まれていない。また、Poetaらの報告では放射線療法後の救済手術症例も含まれており、雑多な対象群での検討である。前述のように下咽頭癌は日本人に多い癌であり、欧米人症例の知見ではなく、日本人症例での*TP53*変異と予後についての知見を得る必要がある。

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT経路は多くの細胞増殖因子受容体により活性化され、下流のPIP3 (phosphatidylinositol P3)、AKTを介して細胞増殖・分化・浸潤など様々な機能を制御している。PI3Kファミリーは一次構造や基質特異性からclass I、II、IIIに分類され、class I PI3Kは触媒サブユニットp110 α と調整サブユニットp85 α で構成される。^{32,33} *PIK3CA*はp110 α をコードする癌遺伝子で、PI3Kファミリーの中で変異が起こりやすい。変異の殆どは、ホットスポットにおける3種の機能獲得変異 (E542K、E545K、H1047R) である。³⁴ 頭頸部癌において変異は2.6-22%、³⁵⁻³⁷ 増幅が22-32%^{35,36} に認められ、また臨床的にはリンパ節転移のない症例群において*PIK3CA*増幅が予後不良と報告されている。³⁵

3. Focal Adhesion Kinase (FAK) と癌の予後

Focal Adhesion Kinase (FAK)はProtein Tyrosine Kinase 2 (*PTK2*) 遺伝子によってコードされ、125kDaのインテグリン結合タンパクとして知られる非受容体型チロシンキナーゼである。FAKはp53との相互作用、PI3K/AKT経路の活性化、上皮間葉移行など様々なシグナル経路を通じて、癌細胞の増殖、浸潤、転移に関与しており、³⁸⁻⁴² 様々な癌腫においてFAK高発現が予後不良あるいは再発予測因子であると報告されている。⁴³⁻⁵⁰ 特に、下咽頭癌と同様にALDH2活性低下者の飲酒が発癌要因とされる日本人食道癌においても、FAK高発現群が予後不良と報告されている。⁴³ また乳癌において、FAK発現上昇が*TP53*変異

及びp53発現上昇と相関するとされ、^{44,51} その理由として*PTK2*遺伝子のプロモーター部位には2つのp53結合部位があり、野生型p53によって発現抑制を受けるため、変異型p53の機能喪失がFAKの発現上昇をもたらすと考えられている。⁵² 以上のことから、食道癌と同様の発癌機序が考えらえる下咽頭癌においても、FAKが予後予測のバイオマーカーとなり、また、術後補助療法の治療標的になりうることが予想される。頭頸部癌は*TP53*変異やPI3K/AKT経路活性化が多く認められる癌腫であり、FAK発現との相関を調べることで下咽頭癌におけるFAKの具体的な機能を明らかにできると考えた。

III. 目的

東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で施行した下咽頭癌手術治療例の切除検体を用いて、1. FAK 発現が下咽頭癌の予後予測因子になりうるかを検討し、さらに 2. FAK と癌抑制遺伝子 *TP53* の変異、及び 3. 癌遺伝子 *PIK3CA* の変異・増幅との相関性を明らかにすることを目的とした。また、下咽頭癌の発癌原因を探るため、4. HPV 感染及び *ALDH2* 多型との関連を検討した。なお、本研究は東京大学医学部附属病院倫理委員会 (2487, 2904) で承認を得て実施した。

IV. 方法

・ 対象

2004年4月から2014年12月までに東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で初回に手術療法を施行した下咽頭癌新鮮例107例を対象とした。対象症例は男性が99例、女性が8例、年齢は36～84歳、中央値は67歳であった。原発巣の亜部位は梨状陥凹の72例(68%)が最多で、後壁が27例(25%)、輪状後部が8例(7%)であった。TNM分類はUnion for International Cancer Control規約第7版(2009)に従って分類した。表1に内訳を示す。Stage Iが6例(6%)、Stage IIが7例(6%)、Stage IIIが34例(32%)、Stage IVaが56例(52%)、Stage IVbが2例(2%)、Stage IVcが2例(2%)であった。手術前に化学療法や放射線治療が行われていた症例、(化学)放射線治療後の救済手術例、頸部リンパ節転移に対して頸部郭清術を行った後に原発巣に対して(化学)放射線療法を行った症例は、対象から除外した。

表 1.下咽頭癌手術施行例全 107 症例の TNM 分類

	T1	T2	T3	T4a	Total
N0	6	7	20	11	44 (41%)
N1	0	1	13	4	18 (17%)
N2 (a/b/c)	3 (1/1/1)	7 (0/5/2)	18 (0/14/4)	15 (0/12/3)	43 (1/32/10) (40%)
N3	0	2	0	0	2 (2%)
計	9 (8%)	17 (16%)	51 (48%)	30 (28%)	107 (100%)

M1: 2 例

- ・ 東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科における下咽頭癌の治療方針

東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科における下咽頭癌に対する治療方針を述べる。

T1,T2症例では下咽頭部分切除あるいは経口法での切除が施行されていた。但し

T1,T2でも手術を希望しない症例で放射線単独照射あるいは少量シスプラチン併用

(5mg/body/day週5回)照射が行われていた。T3症例は、2008年9月以前は咽喉食摘術

を第一選択とし、患者が喉頭温存を希望した症例でシスプラチンと5FUをメインとす

る同時化学放射線療法を行っていた。このような喉頭温存希望例に対して2008年10

月以降はTPF療法(シスプラチン60mg/m²+5FU600mg/m²+ドセタキセル60mg/m²)

による導入化学療法2コースの後、原発巣の著効例に対して放射線単独照射を選択し、

著効例以外では咽喉食摘術が施行されていた。ただしT4a症例については放射線治療

での原発巣制御は困難と考えており、TPF療法なしで咽喉食摘術を選択されていた。

術後後治療については、放射線療法を1．原発巣の切除断端陽性例、2．病理学的転移リンパ節個数4個以上の症例、3．節外浸潤陽性例に対し、患者のperformance status、術後合併症の有無を考慮し、包括的判断した上で行われていた。

- ・ **FAK発現と臨床病態、生存率、及び遠隔転移出現率の検討**

107例の手術材料を用いてFAKの免疫染色を行い、腫瘍のFAK発現状態と予後、ならびに年齢、原発巣部位、T分類、N分類、stage分類、喉頭摘出の有無、組織学的分化度、切除断端における腫瘍の有無、リンパ節外浸潤の有無、術後(化学)放射線療法施行の有無等の背景因子との関係を検討した。

免疫染色法の具体的手技を述べる。東京大学病理学教室に保存されているホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 標本の手術検体を用いた。標本を4 μ m厚に薄切し、キシレン及びエタノールで脱パラフィンを行った後、S1700 (DAKO Japan) で121°C、20分のオートクレーブ操作により賦活化を行った。3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った後、一次抗体としてFAKモノクローナル抗体 (1:1000) (Millipore社, #05-537)を用い、ヒストファインシンプルシステムMAX-PO (M) を二次抗体として用いた。最後にヘマトキシリンで核染色を行った。評価判定法は過去の報告に倣い、FAKは腫瘍細胞の40%以上の細胞でその細胞質が正常粘膜上皮細胞より強く染色されている症例を陽性と判定した。⁴³

次に凍結生標本を用いて腫瘍組織及び正常粘膜のWestern blotを行い、FAKの免疫組織染色による評価との整合性を確認した。具体的にはFAK陽性、陰性症例のそれぞれ腫瘍部位と正常粘膜部位の検体を1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Japan社)を加えたCellLytic MT Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich Japan社)を用いてホモゲナイズ処理を行い、4°C10分間8000回転/分で遠心分離した。上澄み液を10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (GE Healthcare Life Sciences社)に1レーンに30 μ gずつ載せて37分電気泳動展開し、polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences社)に転写した。得られた膜を10%スキムミルク、及びTris Buffered Saline (TBS) Tabletsを

用いて1時間ブロッキングを行った後、FAKモノクローナル抗体(1:2000) (#05-537; Millipore社, #05-537)、ローディングコントロールとして β -アクチンウサギポリクローナル抗体(1:10,000) (#PM053; MBL社)でブロットした。Amersham enhanced chemiluminescence western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences社)で化学発光させ、写真撮影を行った。

・ HPV感染の検討

2008年4月倫理委員会で承認以降、2014年12月までの57例を対象症例とした。これら57症例において、下咽頭癌発症におけるHPVの関与について検討した。

まず免疫染色法によりp16発現の評価を行った。免疫染色法の手技はFAKと同様に行った。p16マウスモノクローナル抗体(1:100) (Santa Cruz社, sc-56330)を一次抗体に用い、腫瘍細胞の70%以上の細胞でその細胞質が染色されている症例を陽性と判定した。^{5,53} HPV発癌の過程で生じるp16の過剰発現の検索はHPV関連癌の代理マーカーとして広く用いられているが、HPV in-situ hybridization (ISH-HPV)との間に不一致があるとされている。この不一致症例ではHPVとは無関係にp16が過剰発現している可能性が考えられている。⁴ そこでp16免疫染色でのHPV偽陽性を除外する目的でp16陽性症例にはISH-HPVを追加で行った。ISHの方法は過去の報告に準じて、⁵⁴ パラフィン包埋標本を脱パラフィンの後、S1700(DAKO Japan社)にて95°C、40分のオートクレーブ処置により賦活化を行った。プロテナーゼKにより消化酵素処理を行った後、過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ因子のブロッキングを行った。組織を乾燥後、GenPoint HPVプローブ(HPV高リスク型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68のカクテルプローブ、DAKO Japan社)を摘下了後、95°Cでディネーチャー5分、その後にハイブリダイゼーションを37°Cで16時間

行った。プローブをStringent Wash Solution (DAKO Japan社)にて48°C、30分洗浄した後、GenPoint System (DAKO Japan社)を用いて一次抗体、ビオチン標識タイラミド、二次酵素試薬の反応を行った後、DABで発色させた。十分に水洗後、ヘマトキシリンにより対比染色を行った。腫瘍細胞のほぼ全ての核に点状の染色が認められる症例をHPV陽性と判定した。

・ALDH2多型頻度と飲酒量との関係の検討

同57例について、Sanger法によりALDH2多型を検索した。具体的なSanger法の手技を述べる。凍結生標本が保存されている症例はQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社)を用い、ゲノムDNAを抽出した。凍結生標本のない症例はFFPE標本上で癌部分をメスで削り出し、QIA amp DNA FFPE キット(QIAGEN社)を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを20ng/μlに濃度調整した後に、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ社)を用いて、凍結生標本例では各々テンプレート:1μg、PrimeSTAR HS DNA Polymerase:0.3μl、5xPrimeSTAR Buffer:5μl、dNTP Mixture:2μl、プライマー:2.5μl、精製水:14.2μlを混和し計25μlとした。FFPE標本例では各々テンプレート:5μg、PrimeSTAR HS DNA Polymerase:0.5μl、5xPrimeSTAR Buffer:10μl、dNTP Mixture:4μl、プライマー:5μl、精製水:28.5μlを混和し、計50μlとし、PCR法で増幅した。凍結生標本に使用したプライマーを表2に、FFPE標本に使用したプライマーを表3に示す。PCRの条件は凍結生標本例では98°Cで10秒の後68°Cで90秒を1サイクルとし、44サイクル行った。一方、FFPE標本はforward、reverseともに2段階でPCRを行った。また、FFPE標本のALDH2のforwardの1回目、2回目はともに25サイクルで増幅を行い、QIAquick PCR Purification Kitを用いてPCR産物を精製

した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit及びGenetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems社)によって配列を決定し、これらの変異を検索した。

飲酒量については、東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科腫瘍外来初診時の問診票をもとにSake-Index、すなわち日本酒合数に換算した1日当たりの飲酒量に飲酒年数を乗じた数値で評価した。⁵⁵

・TP53変異及びp53発現の検討

同57例についてSanger法でTP53の変異とその頻度を検索した。表2,3に使用したプライマーを示す。PCRの条件は98°Cで10秒の後68°Cで90秒を1サイクルとし、44サイクル行った。FFPE標本のexon 2/3/6はforward、reverseともに2段階でPCRを行った。過去の報告に基づき、^{36,37} ナンセンス変異、スプライシング異常、及びフレームシフト変異を「Truncated変異」として分類した。また、p53タンパク発現を免疫染色法により評価した。免疫染色法の手技はFAK、p16と同様に行った。p53マウスモノクローナル抗体(1:100) (Leica Bioscience社 DO-7) を一次抗体に用い、過去の報告同様、腫瘍細胞の10%以上の細胞でその核が染色されている症例を、それぞれ陽性と判定した。^{44,56} exon毎のTP53変異頻度、そして、TP53変異と臨床病理学的背景との関係、ALDH2多型、p53タンパク発現、FAK発現との相関性、ならびに予後との関連性について検討した。

・PIK3CA変異及び増幅の検討

同57例について、PIK3CAの変異ホットスポットであるexon 9部分(E542K, E545K)、exon 20部分(H1047R)についてSanger法により変異検索を行った。表2,3に使用したプライマーを示す。PCRの条件は98°Cで10秒の後68°Cで90秒を1サイクルとし、44サイクル行った。ま

た定量的real-time PCRを用いて、*PIK3CA*の遺伝子コピー数を検索した。その手技を述べる。20ng/μlに調整したゲノムDNAを用いて定量的real time PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて解析を行った。具体的には、QuantiTect SYBER Green PCR Kit (QIAGEN社)を用い、各カラムにテンプレート:2.5μl、プライマー:3μl、SYBER Green:25μl、精製水:19.5μlを混和し計50μlとした。7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems社)により検出した。タイプⅧコラーゲン遺伝子(*COL8A1*)を内在性コントロール遺伝子をとした。*PIK3CA*のプライマーシーケンスはforward:5'-ATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCT-3'、reverse:5'-CTAGGGTCTTTTCTGAATGTATG-3'、*COL8A1*のプライマーシーケンスはforward:5'-GGGCTAAGAAAGGCAAGAATGG-3'、reverse:5'-GTGGGAAAGGTGCGGTTAGCT-3'を用いた。PCRの条件は50°Cで2分、95°Cで15分加熱したのち、94°Cを15秒及び60°Cを15秒行うサイクルを60回行ったのち、72°Cで1分加熱した。過去の報告に基づき、³⁵コピー数3以上を遺伝子増幅ありと判定した。*PIK3CA*変異あるいは増幅と生存率、FAK発現との関連性を検討した。

表 2.凍結生標本の PCR プライマー

遺伝子	exon		sequence (5'-3')
<i>ALDH2</i>		forward	tcaactgctatgatgtgttggag
		reverse	ggcaggctcctgaacctctg
<i>TP53</i>	exon 2,3	forward	atccccacttttcctcttgc
		reverse	agcccaacccttgccttac
	exon 4	forward	aaacaacgttctggtaaggacaag
		reverse	gacaggagtcagagatcacacatt
	exon 5,6	forward	gtgcttacgcatgtttgtttct
		reverse	ttataggagggtcaaataagcagc
	exon 7	forward	ttgggcctgtgttatctcctag
		reverse	ggtggatgggtagtagtatggaag
	exon 8,9	forward	cttactgctcccactcagttttct
		reverse	cacttgataagagggtccaagact
<i>PIK3CA</i>	exon 9	forward	catctgtgaatccagaggg
		reverse	agcacttacctgtgactcca
	exon 20	forward	tggggtaaagggaatcaaaag
		reverse	cctatgcaatcggctcttgc

表 3. FFPE 標本の PCR プライマー

遺伝子	exon		sequence (5'-3')
<i>ALDH2</i>		forward-1 回目*	ttctgcaatctcgtttcaaatta
		forward-2 回目*	ttacagggtaactgctatgatgt
		reverse-1 回目	ccaccagcagaccctcaa
		reverse-2 回目	agaccctcaagccccaac
<i>TP53</i>	exon 2,3	forward-1 回目	tggaagtgtctcatgtctggat
		forward-2 回目	atccccacttttcctcttgc
		reverse-1 回目	ctgtagatgggtgaaaagagcagt
		reverse-2 回目	agcccaacccttgccttac
	exon 4	forward	aaacaacgttctggttaaggacaag
		reverse	gacaggagtcagagatcacacatt
	exon5	forward	ccagttgctttatctgttcacttg
		reverse	taagagcaatcagtgaggaatcag
	exon6	forward-1 回目	agagacgacagggtggtt
		forward-2 回目	ggttataggaggtcaaataagca
		reverse-1 回目	ataggaggtcaaataagcagcag
		reverse-2 回目	ataggaggtcaaataagcagcag
	exon 7	forward	ttgggcctgtgttatctcctag
		reverse	ggtggatgggtagtagtatggaag
	exon 8,9	forward	gacaggtaggacctgatttcctta
		reverse	aaaacggcattttgagtgttagac
<i>PIK3CA</i>	exon 9	forward	catctgtgaatccagaggg
		reverse	agcacttacctgtgactcca
	exon 20	forward	tattcgacagcatgccaatc
		reverse	tgtgtggaagatccaatcca

ALDH2、*TP53* exon 2/3/6 は forward、reverse とともに 2 回 PCR を施行。
ALDH2 の forward の 1 回目、2 回目はともに 25 サイクルで増幅. (*)

・統計解析法

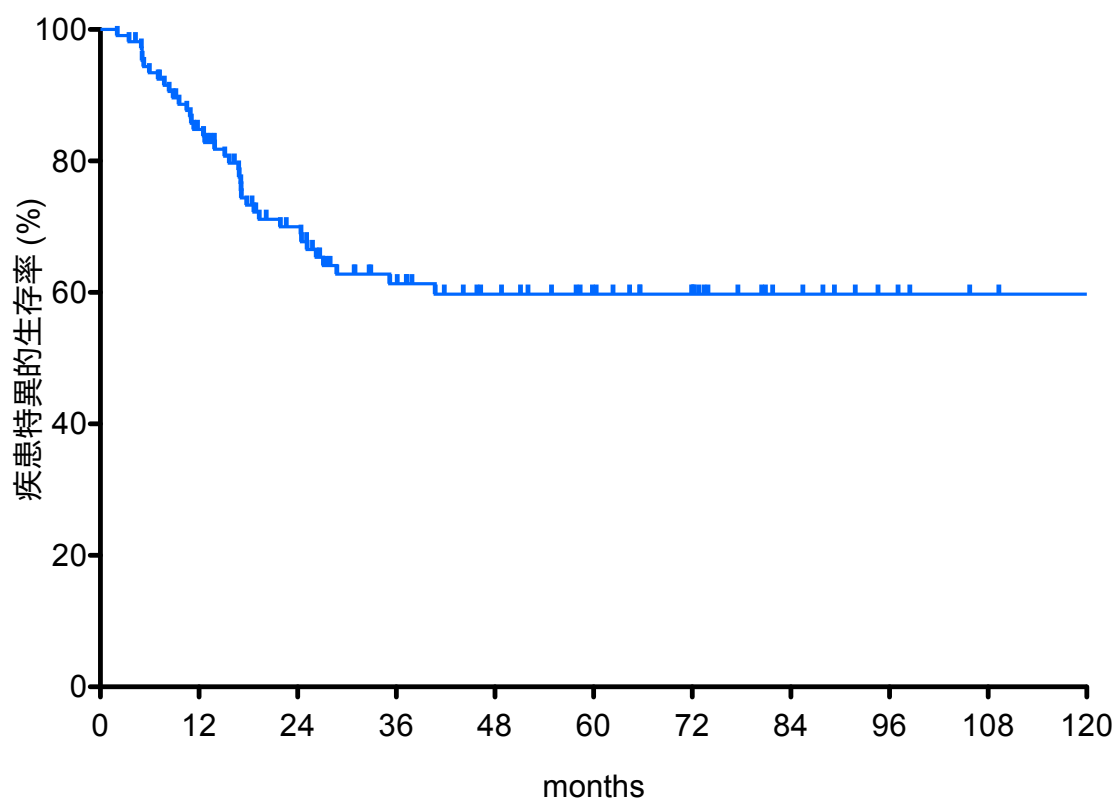
生存解析のエンドポイントは疾患特異的生存率とした。患者背景因子の群間比較は、定性的データに対しては χ^2 検定、もしくは標本数が4以下の場合はFisherの確率確定検定を用いた。定量的データはMann-WhitneyのU検定を用いた。生存曲線はKaplan-Meier法を用い、生存曲線の2群間検定にlog-rank検定を用いた。多変量解析はCox比例ハザードモデルを用いた。ハザード比と95%信頼区間を算出し、相対評価を行った。*P*値0.05未満を統計学的有意差ありと規定した。 χ^2 検定、フィッシャーの確率確定検定、Mann-WhitneyのU検定、ログランク法にはGraphPad Prism 5 software（GraphPad Software社）を使用し、Cox比例ハザードモデルにはMac多変量解析 Ver. 2.0（エスミ社）を用いた。

V. 結果

1. 107 例全体の生命予後

全 107 症例における無病生存は 54 例、他病死は 15 例、原病死は 38 例であった。全体の術後観察期間は 2-139 ヶ月（中央値 27 ヶ月）であり、生存者の術後観察期間は 13-139 ヶ月（中央値 55 ヶ月）であった。全体の疾患特異的生存率の生存曲線を図 1 に示す。5 年生存率は 60%であった。

図 1.下咽頭癌手術治療例 107 例の生存曲線



5 年疾患特異的生存率= 60%

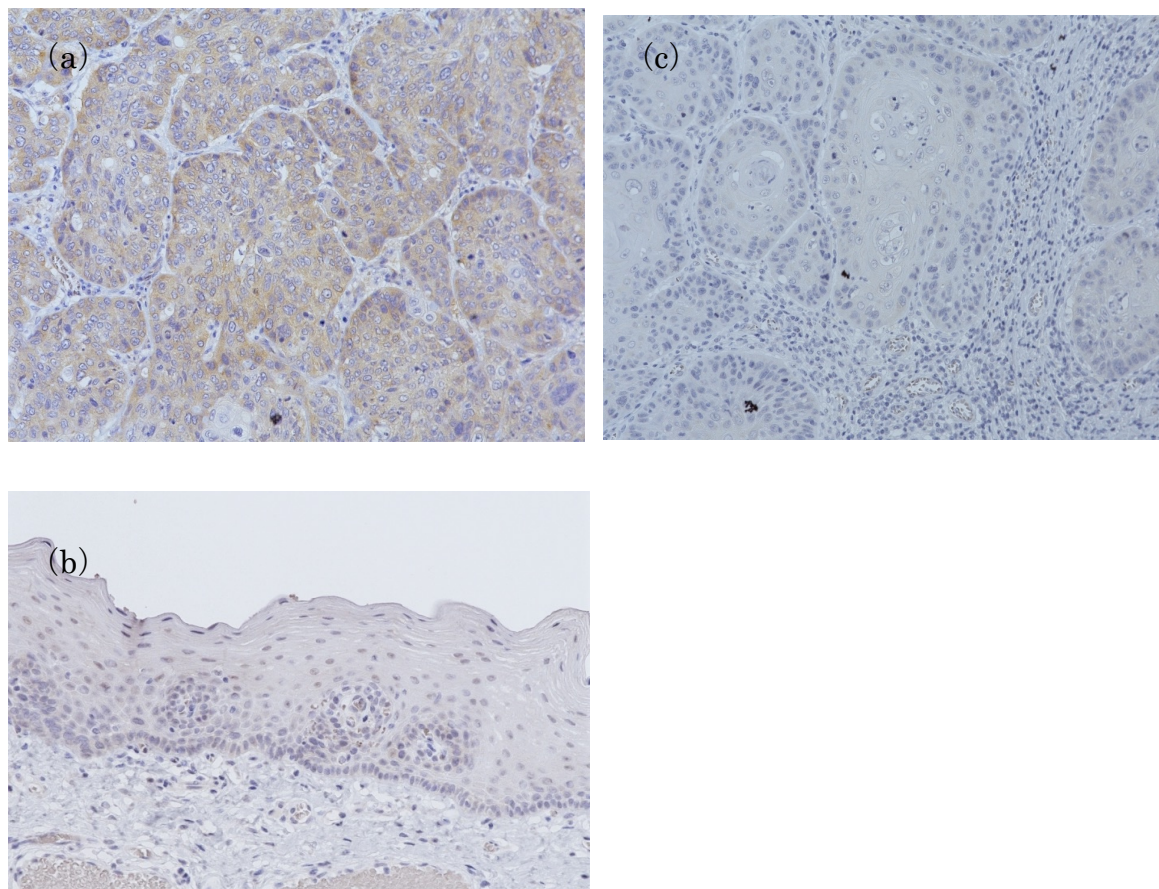
2. FAK 発現と臨床病態、生存率、及び遠隔転移出現率の検討

全 107 例中 54 例(50%)で FAK 陽性と判定された。陽性症例では当該症例の正常扁平上皮組織細胞と比較して、腫瘍細胞の細胞質により強く染色を認めた。図 2(a)に FAK 陽性例の腫瘍部の代表的な組織像を、図 2(b)に同じ症例の正常扁平上皮細胞部の組織像を、図 2(c)に FAK 陰性細胞の腫瘍部の組織像を示す。また、図 3 に図 2(a, b)に示した FAK 陽性症例と図 2(c)に示したのと FAK 陰性症例の腫瘍部、正常粘膜部を用いた Western blot の結果を示す。

表 4 に FAK 発現の有無で分類した 107 症例の臨床病理学的背景を示す。病理学的転移リンパ節個数については、以前に東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科での局所進行下咽頭癌に対する咽喉食摘術症例について検討を行った結果、4個以上の転移リンパ節個数を有する症例が有意に予後不良であること、¹⁹ また治療方針において4個以上の転移リンパ節個数を有する症例に術後放射線治療が施行されていたことから、4個をカットオフ値とした。FAK 陽性群では Stage IV 及び、病理学的転移リンパ節 4 個以上の症例数が有意に多かった。また、病理学的転移リンパ節個数について FAK 陰性例は 1.98 ± 0.36 個であったのに対し、FAK 陽性例は 4.76 ± 1.27 個であり、FAK 陽性例で有意に転移リンパ節個数が多かった。 $(P = 0.046)$ 、図 4) 次に Kaplan-Meier 法を用いて FAK 発現と予後の関係を検討した。FAK 陰性例の 5 年疾患特異的生存率は 77%であったのに対し、FAK 陽性例では 44%であり、FAK 陽性例は有意に予後不良であった。 $(P = 0.003)$ 、図 5(a)) 次に FAK 発現と Kaplan-Meier 法で算出した遠隔転移出現率を検討した。FAK 陰性例の 5 年遠隔転移出現率は 12%であったのに対し、FAK 陽性例は 44%と、FAK 陽性例は統計学的有意に高率で遠隔転移が出現していた。 $(P = 0.004)$ 、図 5(b)) 次に FAK 発現の有無、頭頸部癌手術療法における既存の術後予後不良因子とされる切除断端と節外浸潤の有無、²⁰ 及び病理

学的 T 分類について多変量解析を用いて予後因子を検討した。(表 5) この結果から FAK 陽性 ($P=0.01$; ハザード比 $=2.55$; 95%信頼区間 $=1.24-5.23$) 及び節外浸潤 ($P=0.004$; ハザード比 $=2.80$; 95%信頼区間 $=1.40-5.62$) が独立した予後不良因子であった。

図 2. 代表的な FAK の免疫染色の組織像 (200 倍)



- (a) FAK 陽性例の腫瘍部. 細胞質はびまん性に染色.
- (b) (a)と同症例の正常扁平上皮. 正常粘膜では染色されない.
- (c) FAK 陰性例.

図 3. FAK 陽性・陰性症例の Western blot

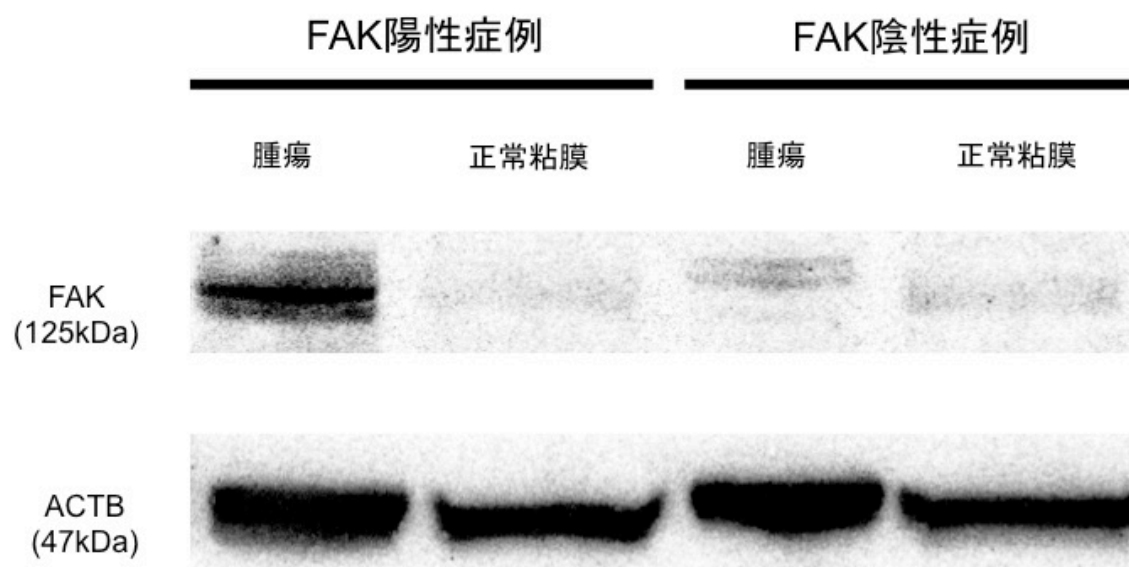
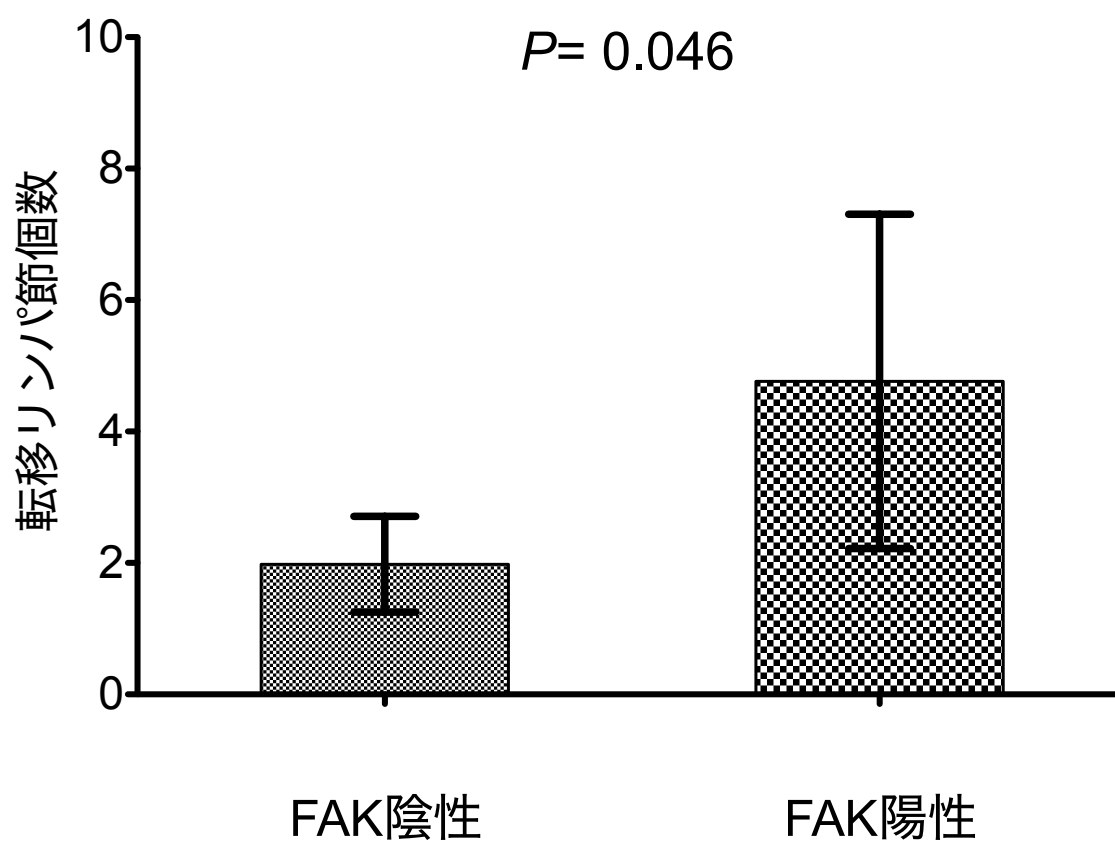


表 4. FAK 発現と臨床病理学的背景

		計 (107)	FAK		P 値
			陰性 (53)	陽性 (54)	
年齢	Range (median)		46-84 (67)	36-84 (69)	0.31
亜部位	PS	72	35	37	0.37
	PC	8	5	3	
	PW	27	13	14	
cT 分類	cT1-3	77	40	37	0.42
	cT4	30	13	17	
cN 分類	cN0-1	62	34	28	0.10
	cN2-3	45	19	26	
cM 分類	cM0	105	53	52	0.25
	cM1	2	0	2	
cStage	I-III	47	29	18	0.01
	IV	60	24	36	
分化度	高・中分化	93	47	46	0.39
	低分化	14	6	8	
術式	喉頭摘出	87	44	43	0.40
	喉頭温存	20	9	11	
pT 分類	pT1-3	76	42	34	0.06
	pT4	31	11	20	
pN 分類	pN0-1	48	26	22	0.19
	pN2-3	59	27	32	
切除断端	陰性	90	46	44	0.30
	陽性	17	7	10	
転移リンパ節個数	3 個以下	77	43	34	0.03
	4 個以上	30	10	20	
節外浸潤	無	76	39	37	0.28
	有	31	14	17	
術後(化学) 放射線療法	無	84	41	43	0.40
	有	23	12	11	

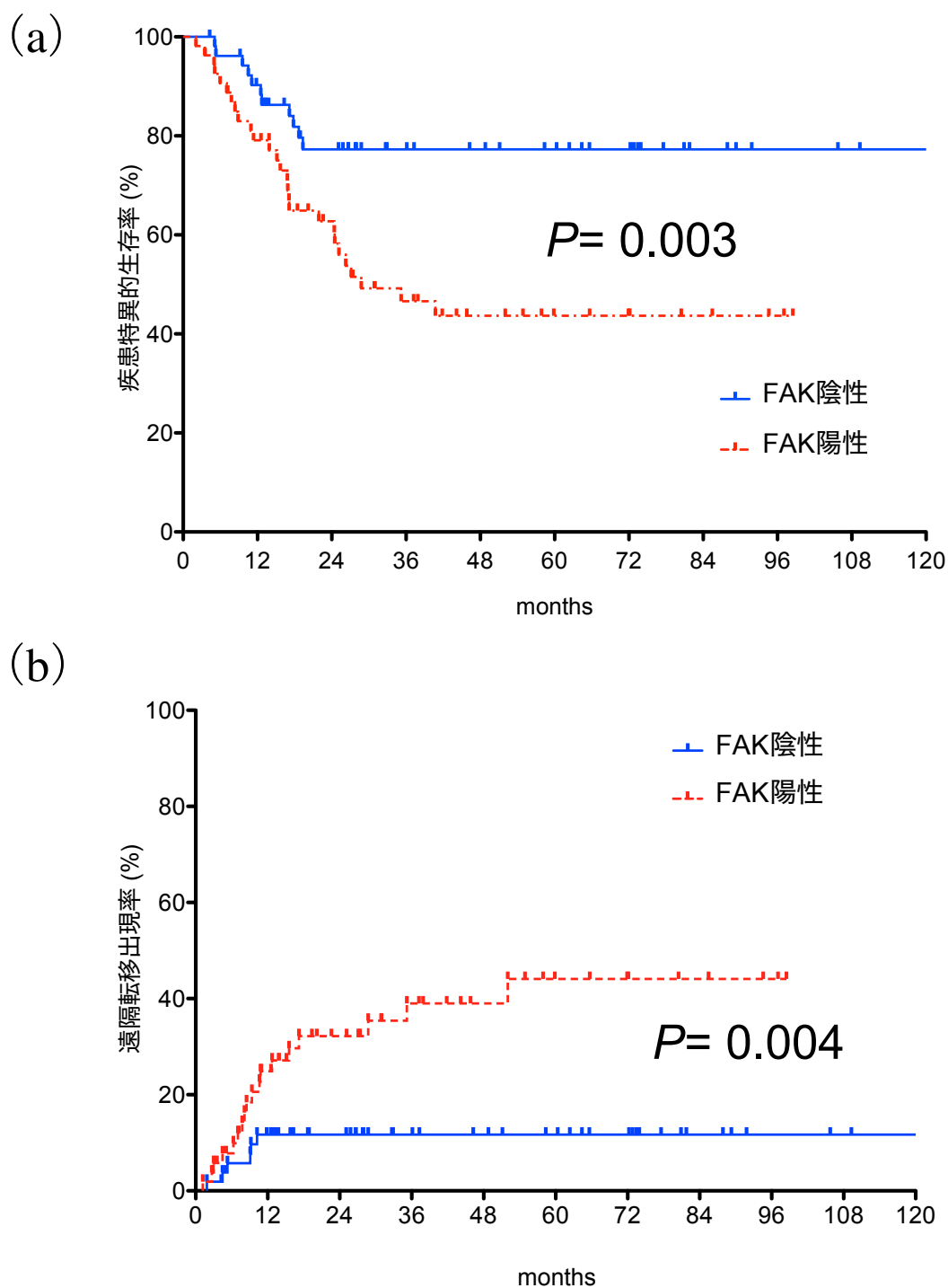
cT 分類= 臨床的 T 分類、cN 分類= 臨床的 N 分類、cM 分類= 臨床的 M 分類 cStage= 臨床的 stage 分類 pT 分類= 病理学的 T 分類、pN 分類= 病理学的 N 分類

図 4. FAK 発現と術後病理学的転移リンパ節個数の関係



FAK 陰性例= 1.98±0.36 個、FAK 陽性例= 4.76±1.27 個.($P= 0.046$)

図 5. FAK 発現の有無での疾患特異的生存率及び遠隔転移出現率



(a) 疾患特異的生存率. 5 年生存率:FAK 陰性例= 77%、FAK 陽性例= 44%. ($P= 0.003$)

(b) 遠隔転移出現率. 5 年遠隔転移出現率:FAK 陰性例= 12%、FAK 陽性例= 44%. ($P= 0.004$)

表 5. 多変量解析による 107 例の疾患特異的生存に対する予後因子の検討

		疾患特異的生存率	
		ハザード比 [95% 信頼区間]	<i>P</i> 値
FAK	陰性 vs. 陽性	2.55 [1.24–5.23]	0.01
節外浸潤	陰性 vs. 陽性	2.80 [1.40–5.762]	0.004
断端	陰性 vs. 陽性	1.63 [0.63–4.19]	0.31
pT 分類	pT1-3 vs. pT4	1.50 [0.74–3.01]	0.26

pT 分類= 病理学的 T 分類

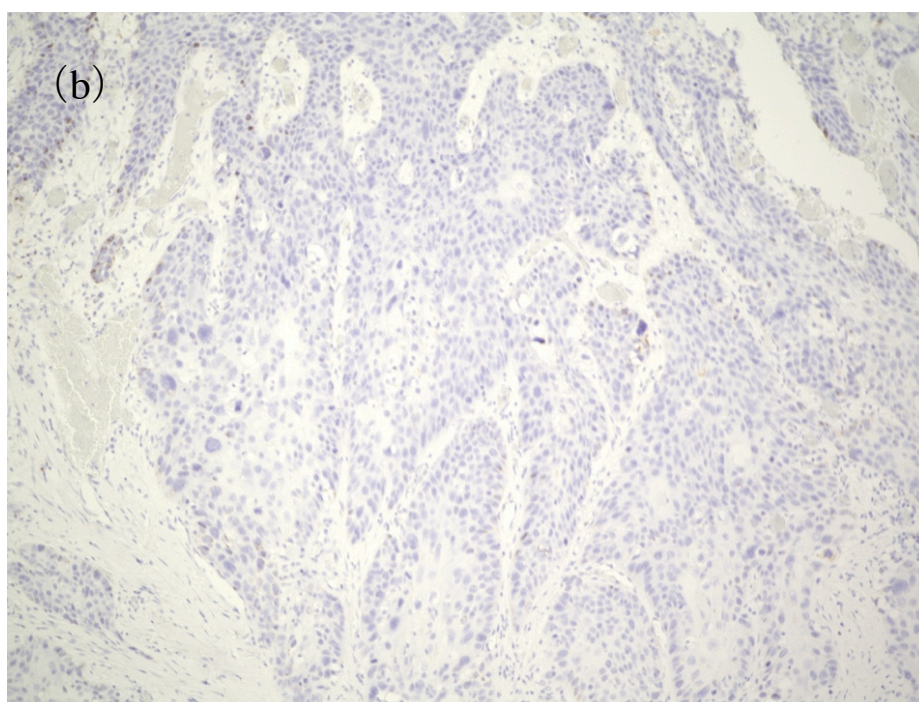
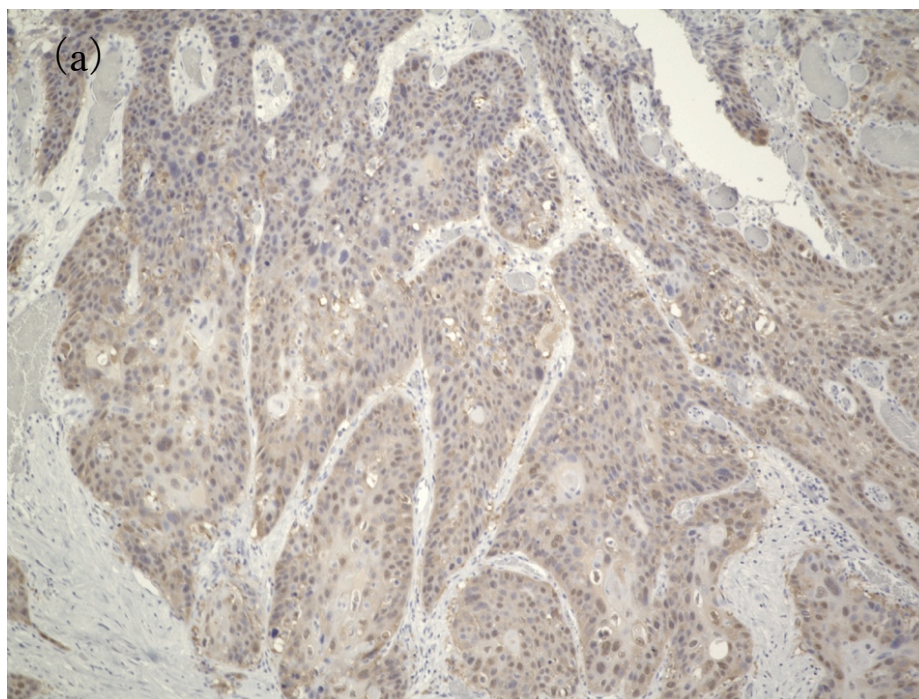
3. 下咽頭癌における HPV 関連癌の検討

2008年4月倫理委員会で承認以降、2014年12月までの対象症例は57例であった。これらの症例について、下咽頭癌におけるHPV感染の関与を検討した。まずHPV関連癌の代理マーカーとして頻用されているp16免疫染色を行い、その結果3例でp16はほぼ全ての腫瘍細胞がびまん性に染色され、p16陽性と判定された。(図6(a)) しかしp16陽性と判定した3例のISH-HPVではほぼ全ての腫瘍細胞の核内染色が認められず、3例ともISH-HPV陰性と判定された。(図6(b)) すなわち、検討した57症例は全例がHPV非関連癌と判断された。

4. ALDH2 多型の頻度及び飲酒量との関係の検討

同様に57例についてALDH2多型を検索した。図7(a)はALDH2*1/*1(野生型ホモ)の、図7(b)はALDH2*1/*2(変異型ヘテロ)の代表的な波形である。57例中、ALDH2*1/*1症例は24例(42%)、ALDH2*1/*2症例は33例(58%)、ALDH2*2/*2(変異型ホモ)症例は0例(0%)であった。また、57例のSake-indexは0-250で、中央値は72であった。ALDH2多型毎の飲酒量(Sake-index)について比較検討を行ったところ、ALDH2*1/*1症例はSake-index = 112.9 ± 14.8、ALDH2*1/*2症例はSake-index = 73.3 ± 9.8であり、ALDH2*1/*2症例は有意に少ない飲酒量で下咽頭癌を発症していた。(P= 0.02) (図8) ALDH2*1/*1症例と、ALDH2*1/*2症例の2群間における疾患特異的生存率に有意な差は認めなかった。(P= 0.45)

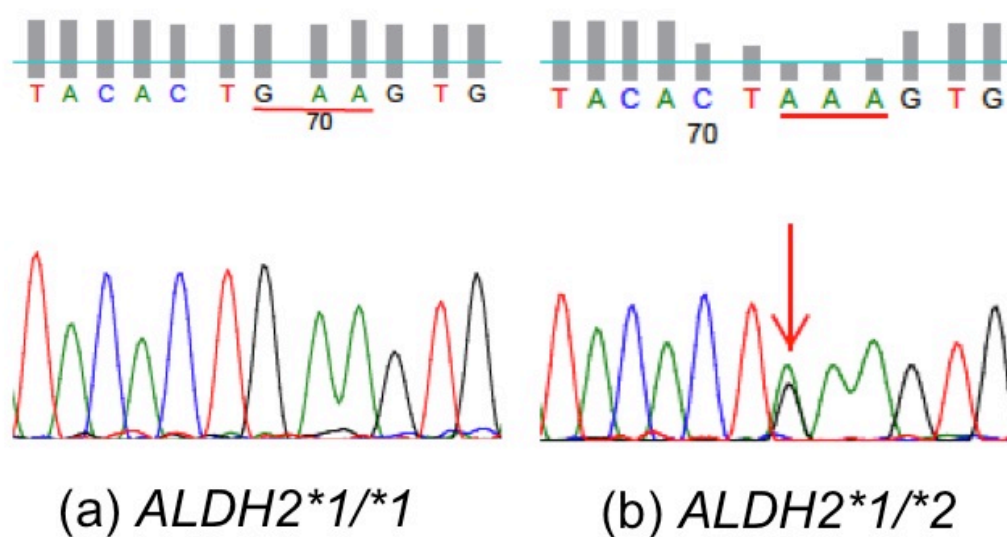
図 6. 代表的な p16 陽性例と同症例の ISH-HPV の組織像（100 倍）



(a) p16 陽性例の組織像.

(b) (a)と同一症例、同一部位の ISH-HPV. p16 陽性例全例で核の染色は認めず.

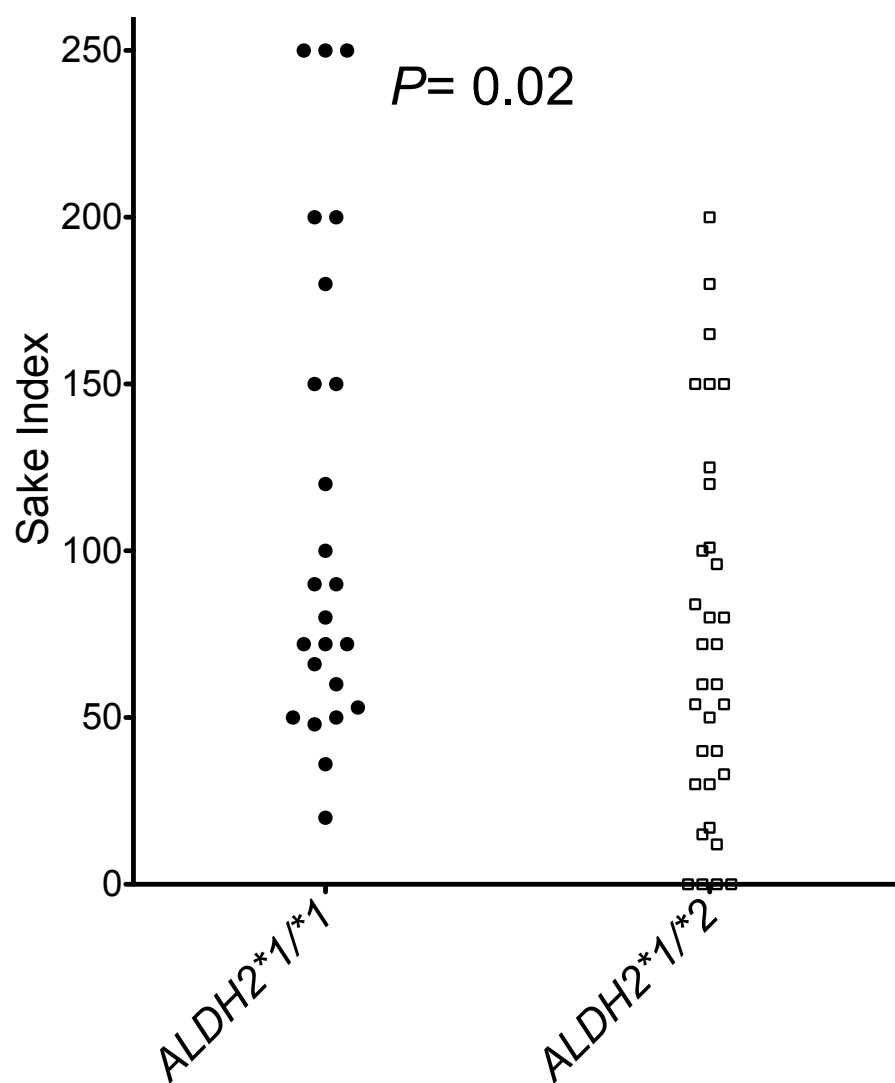
図 7. Sanger 法による *ALDH2* 多型の代表的な波形



(a) *ALDH2**1/*1 (野生型ホモ) : 504 番目のアミノ酸はグルタミン酸 (GAA) .

(b) *ALDH2**1/*2 (変異型ヘテロ) : 504 番目のアミノ酸はグルタミン酸 (GAA) とリジン (AAA) がほぼ等量に存在.

図 8. 飲酒量(Sake-index)と *ALDH2* 多型の関係



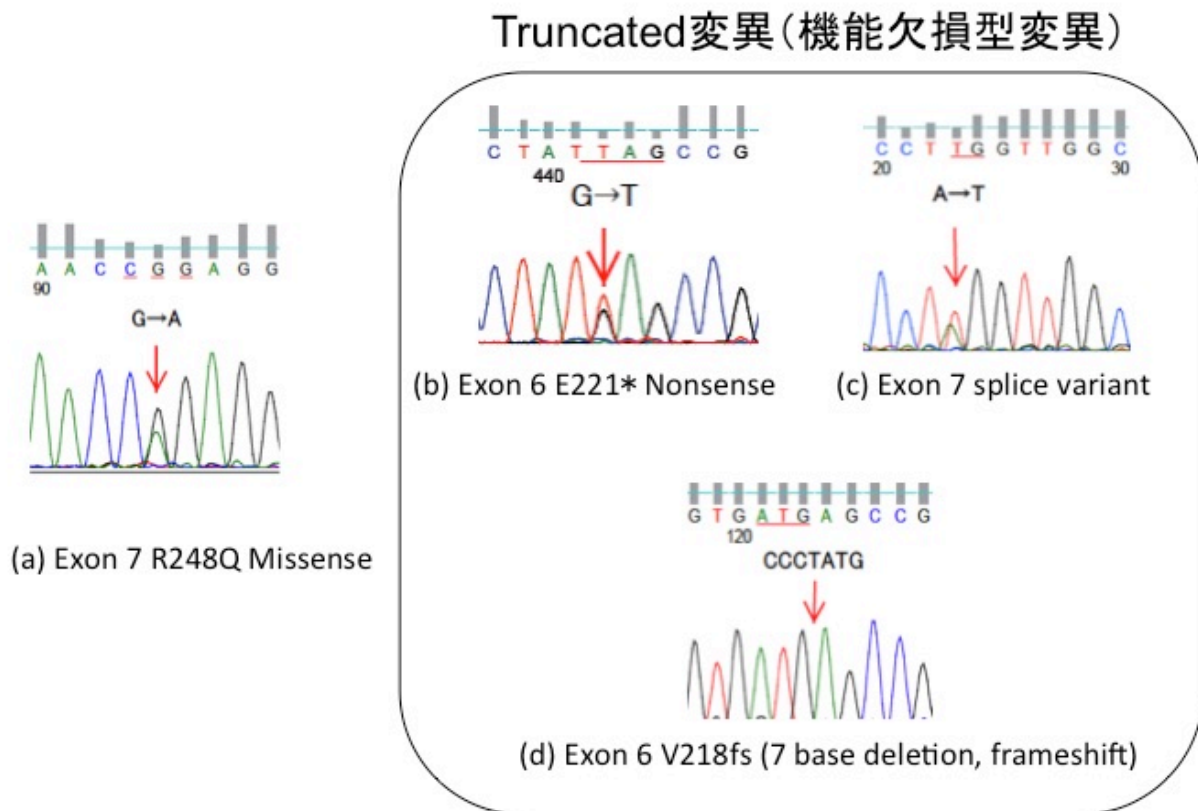
ALDH2^{*1}/**1* 症例: Sake-index = 112.9 ± 14.8、*ALDH2*^{*1}/**2* 症例: Sake-index = 73.3 ± 9.8 (*P* = 0.02).

5. TP53 変異の検討

次に同じ57例についてTP53遺伝子の変異を検索した。塩基置換により異なるアミノ酸が生成される「ミスセンス変異」、塩基置換により終止codonとなる「ナンセンス変異」、スプライス部位の塩基置換によって正常なスプライシングが行われなくなる「スプライシング異常」、数塩基の欠失あるいは挿入によってcodonの読み枠がずれる「フレームシフト変異」の4タイプの変異を認めた。(図9) TP53変異様式の頻度は、野生型18例(32%)、ミスセンス変異24例(42%)、ナンセンス変異9例(16%)、スプライシング異常4例(7%)、フレームシフト変異2例(3%)であり、39例(68%)で何らかのTP53変異をきたしていた。ナンセンス変異、スプライシング異常、及びフレームシフト変異を合わせた「Truncated変異」を15例(26%)に認めた。(図10) また、TP53変異はexon 5-8に集中するという他癌の報告³⁴と同様に、本検討でもTP53変異を有する50例(88%)はexon 5-8に生じていた。(図11)

表6にTP53変異と臨床病理学的背景の関係を示す。TP53変異症例では頭頸部・食道癌の重複が有意に多く認められた。(P= 0.02)

図 9. Sanger 法による *TP53* 変異の代表的な波形



- (a) ミスセンス変異:塩基置換の結果、異なるアミノ酸へ変化(図は 248 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンへ変化)。
- (b) ナンセンス変異:塩基置換の結果、終止 codon へ変化(図は 221 番目のグルタミン酸以降が作られなくなる)。
- (c) スプライシング異常:塩基置換の結果、正常なスプライシングが行われなくなり、exon 丸ごと読まれなくなる(図は exon 7 のスプライス部位の変異)。
- (d) フレームシフト変異:数塩基の欠失あるいは挿入の結果、codon の読み枠がずれる(図は 218 番目のバリン以降 7 塩基欠失)。

図 10. TP53 変異の分類

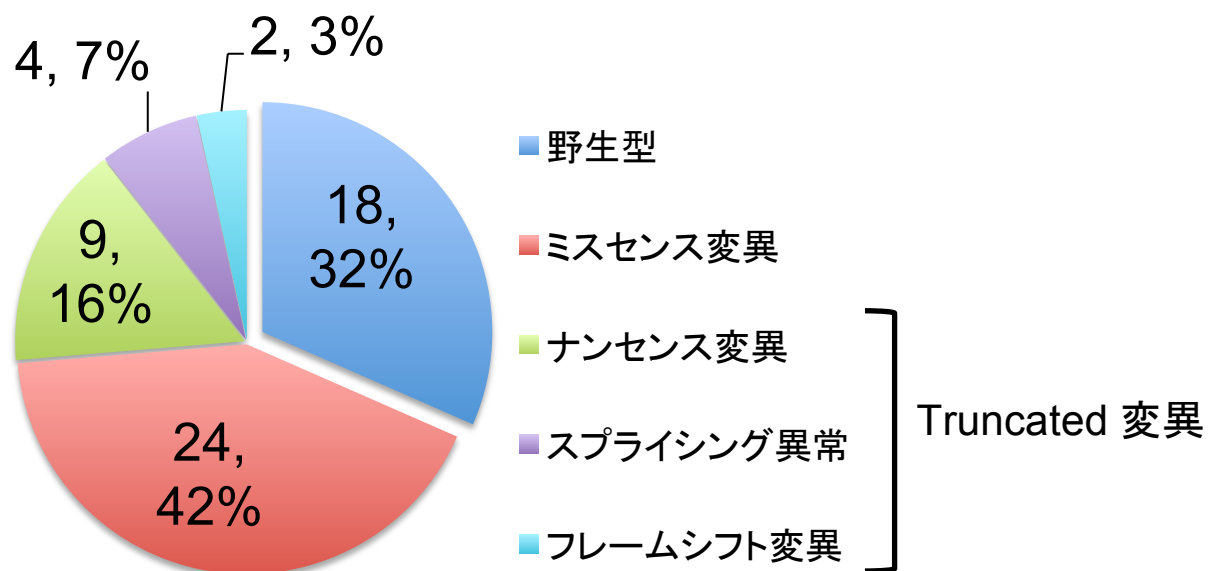


図 11. *TP53* 変異の exon 分布

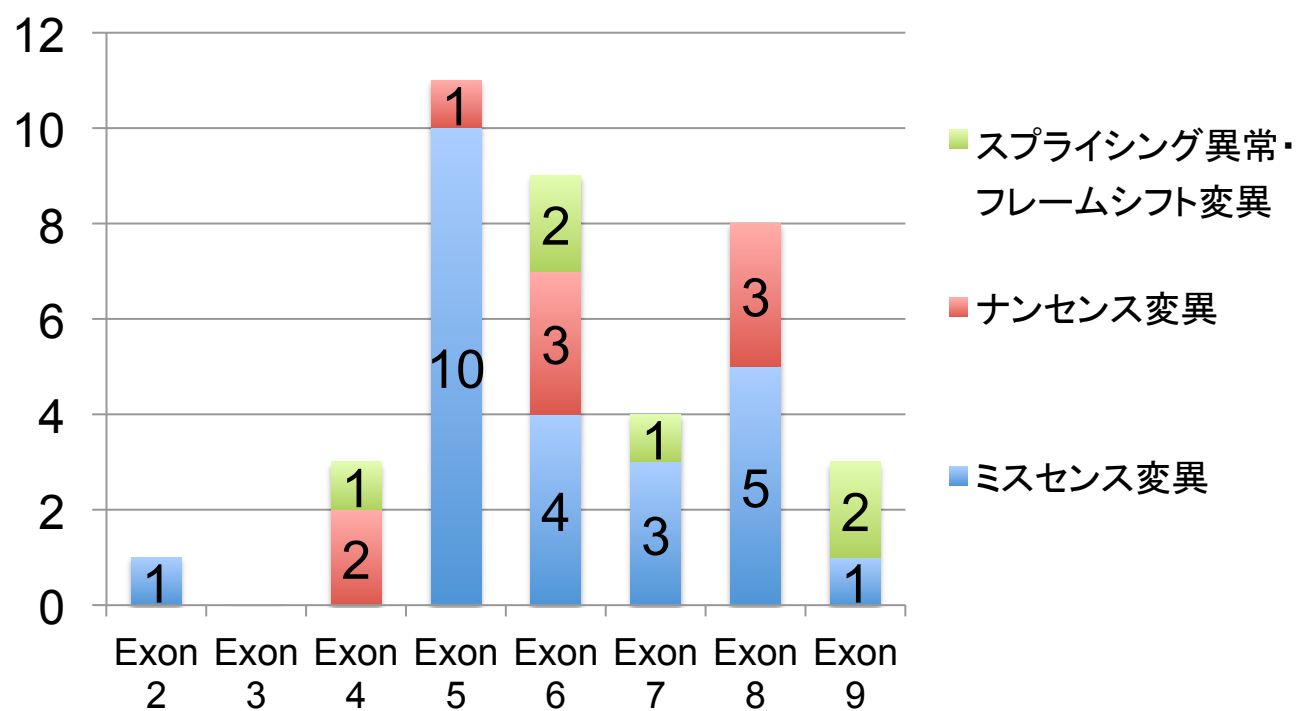


表 6. *TP53* 変異有無と臨床病理学的背景

		計 (57)	TP53		P 値
			野生型 (18)	変異型 (39)	
年齢	Range (median)		47-83 (70)	46-84 (68)	0.45
亜部位	梨状陥凹	27	12	15	0.25
	輪状後部	5	0	5	
	後壁	15	6	9	
cT 分類	cT1-3	40	14	26	0.30
	cT4	17	4	13	
cN 分類	cN0-1	32	13	19	0.15
	cN2-3	25	5	20	
cStage	I- III	24	10	14	0.25
	IV	33	8	25	
分化度	高・中分化	52	15	37	0.31
	低分化	5	3	2	
術式	喉頭温存	7	6	1	0.003
	喉頭摘出	50	12	38	
pT 分類	pT1-3	42	16	26	0.07
	pT4	15	2	13	
pN 分類	pN0-1	24	8	16	0.40
	pN2-3	33	10	23	
切除断端	陰性	46	14	32	0.73
	陽性	11	4	7	
転移リンパ節個数	3個以下	43	14	29	1.00
	4個以上	14	4	10	
節外浸潤	無	42	16	26	0.11
	有	15	2	13	
頭頸部・食道癌重複	無	42	17	25	0.02
	有	15	1	14	

次にALDH2多型とTP53変異の相関性について検討した。ALDH2*1/*1とALDH2*1/*2の分布は、野生型TP53症例ではそれぞれ10例と8例である一方、TP53変異症例ではそれぞれ14例と25例であり、TP53変異症例においてALDH2*1/*2の割合が多い傾向にあった。(P=0.08、図12)

次にTP53変異とp53タンパク発現の関連性について検討した。57例中、免疫染色法によるp53タンパク陰性症例は35例(61%)、陽性症例は22例(39%)であった。代表的なp53陽性例の組織像を図13に示す。野生型症例ではp53陰性/陽性=13/5例、ミスセンス変異症例ではp53陰性/陽性=7/17例、Truncated変異症例ではp53陰性/陽性=15/0例であり、統計学的に有意差を認めた。(P=0.0001)(図14)

次にFAK発現とTP53変異の相関性について検討した。表7にその結果を示す。TP53変異の有無(P=0.57)、ならびにTP53 Truncated変異であるか否か(P=0.25)は、いずれもFAK発現との関連性を認めなかった。

最後にTP53変異と予後について検討を行った。3年疾患特異的生存率は野生型症例が94%、ミスセンス変異症例が58%、Truncated変異症例が42%であった。(図15) 図16(a)にTP53変異有無での2群間比較を、図16(b)にTruncated変異の有無での2群間比較の生存曲線を示す。TP53変異症例は野生型TP53症例と比較し、有意に予後不良であった。(P=0.01) また、Truncated変異症例は野生型+ミスセンス変異症例と比較し、有意に予後不良であった。(P=0.03) 次にTP53変異の有無、FAK発現について多変量解析を用いて予後因子を検討した。この結果からTP53変異(P=0.03; ハザード比=4.89; 95%信頼区間=1.12-21.3)とFAK陽性(P=0.04; ハザード比=3.02; 95%信頼区間=1.07-8.49)は独立した予後不良因子であることがわかった。(表8)

図 12. *ALDH2* 多型と *TP53* 変異の関係

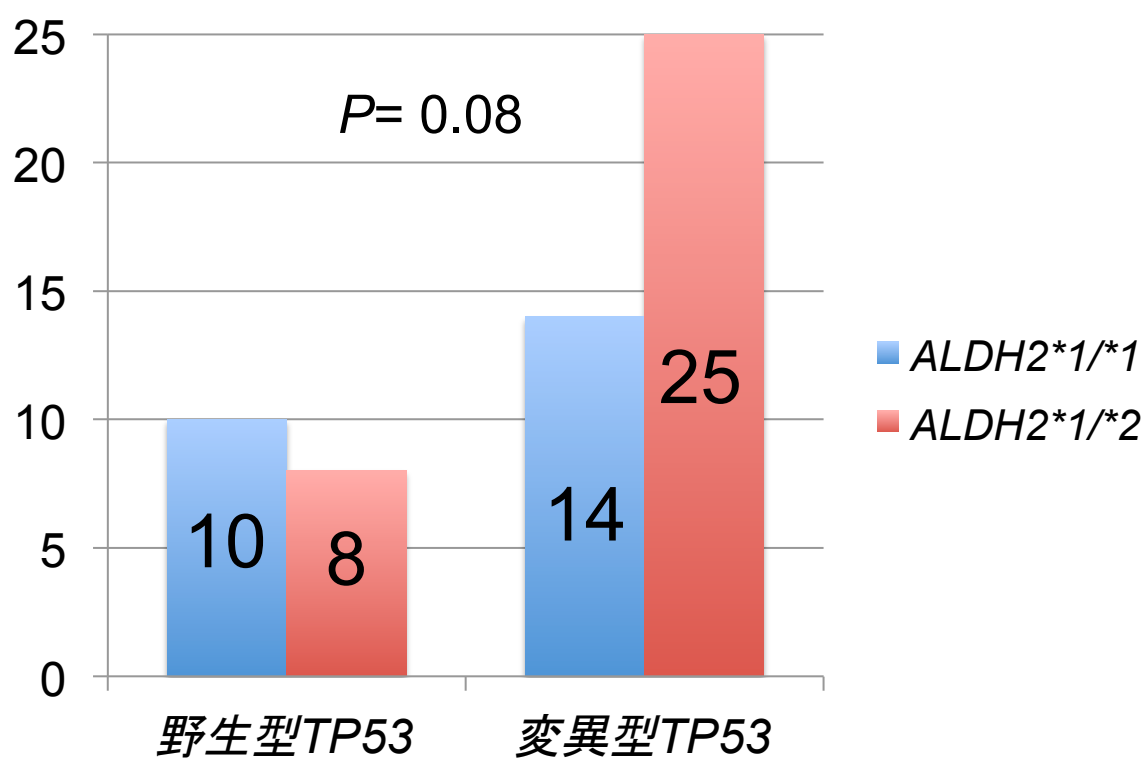
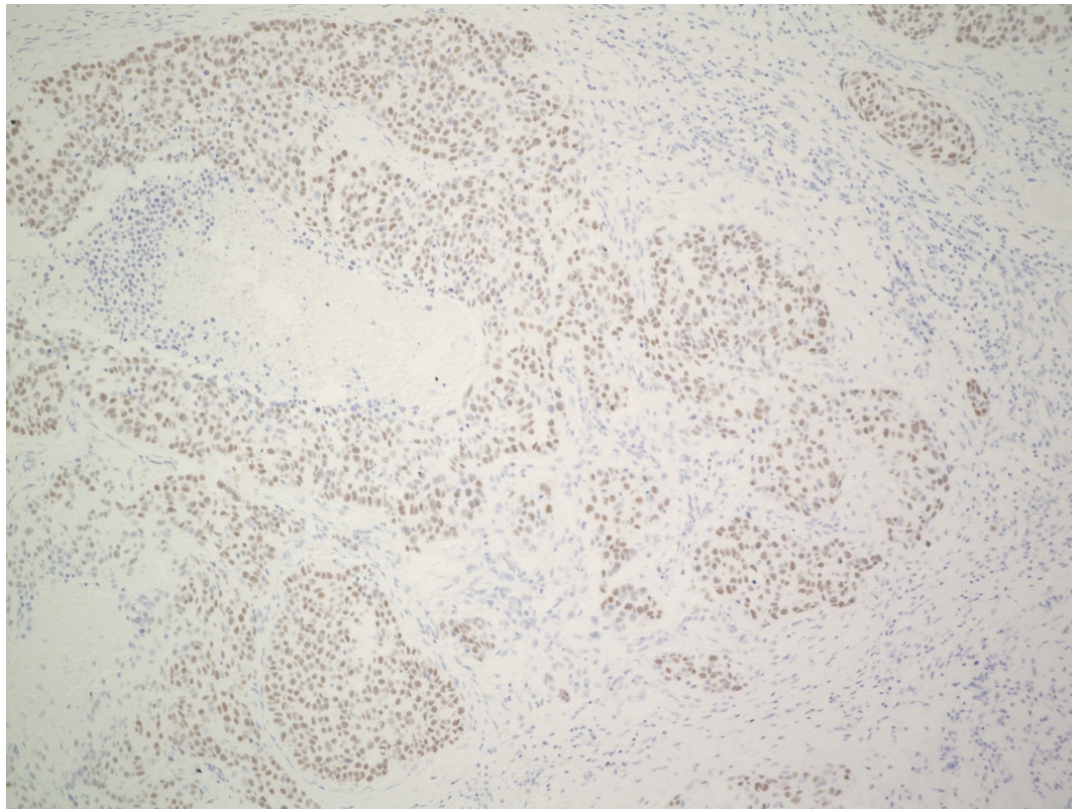
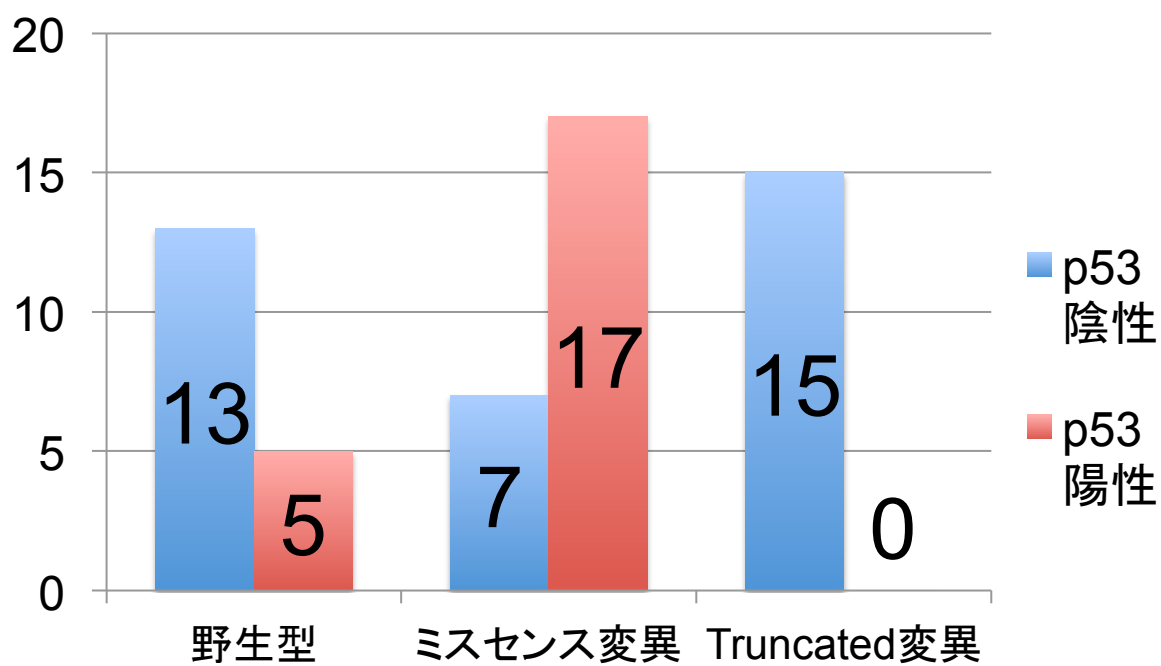


図 13. 代表的な p53 陽性例の組織像（100 倍）



p53 陽性例では核が染色.

図 14. *TP53* 変異様式と p53 タンパク発現の関係

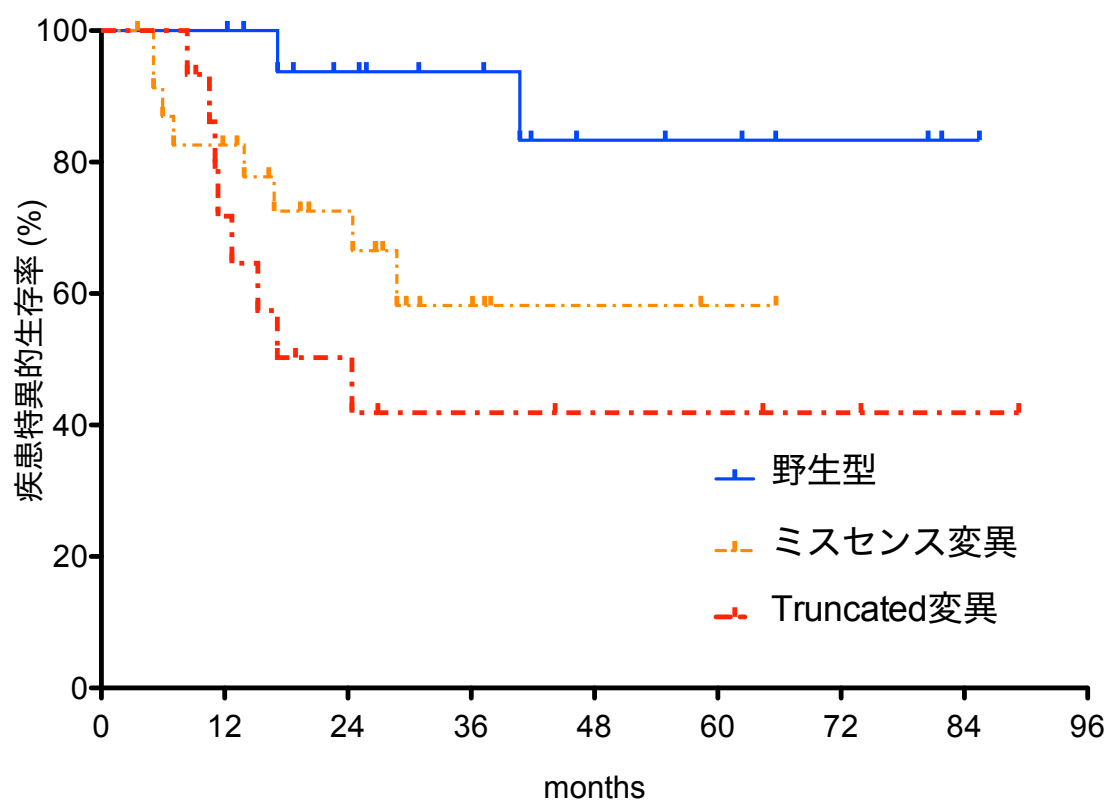


ミスセンス変異では p53 陽性症例が多く、Truncated 変異では p53 陽性症例はなかった。(P=0.0001)

表 7. FAK 発現と *TP53* 変異の関係

		FAK 陰性	FAK 陽性	<i>P</i> 値
変異の有無	野生型	9	10	0.57
	変異型	19	20	
p53 機能欠損型	野生型+ミスセンス変異	19	23	0.25
	Truncated 変異	9	6	

図 15. *TP53* 変異毎の疾患特異的生存率



3年疾患特異的生存率:野生型症例=94%、ミスセンス変異症例=58%、Truncated 変異症例=42%

図 16. *TP53* 変異分類別での疾患特異的生存率の 2 群間比較

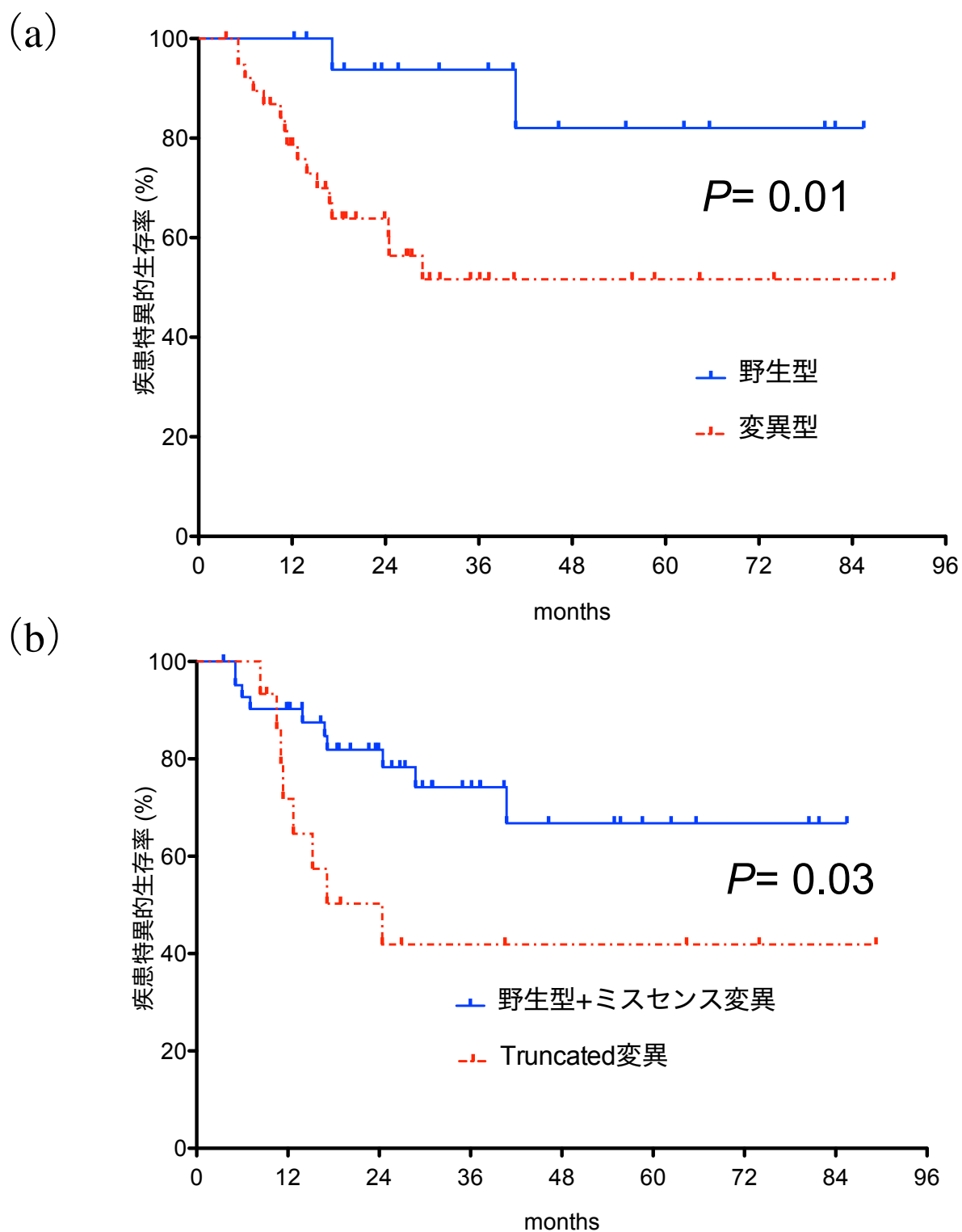


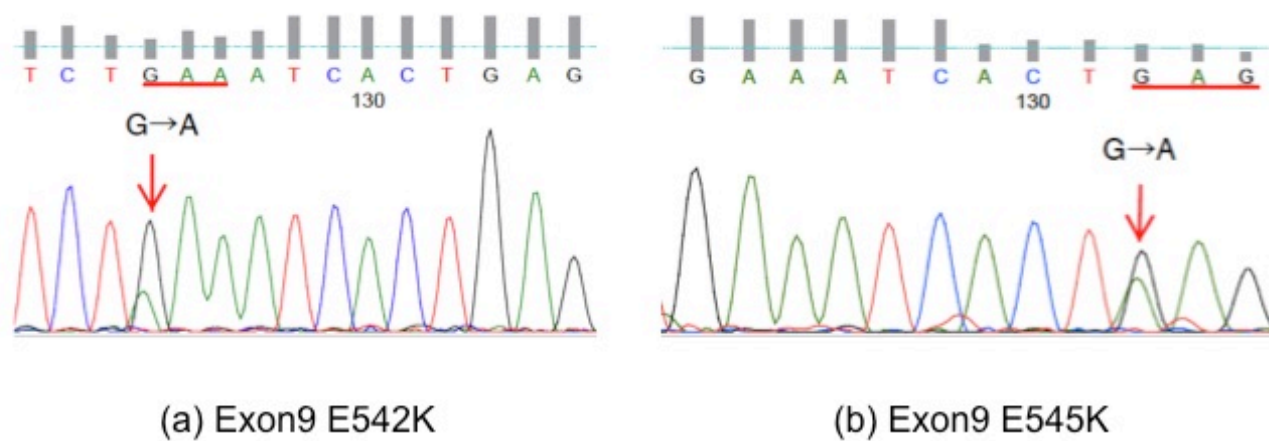
表 8. 多変量解析による 57 例の疾患特異的生存に対する予後因子の検討

		疾患特異的生存率	
		ハザード比 [95% 信頼区間]	<i>P</i> 値
<i>TP53</i> 変異	野生型 vs. 変異型	4.89 [1.12–21.3]	0.03
FAK	陰性 vs. 陽性	3.02[1.07–8.49]	0.04

6. *PIK3CA* 変異及び増幅の検討

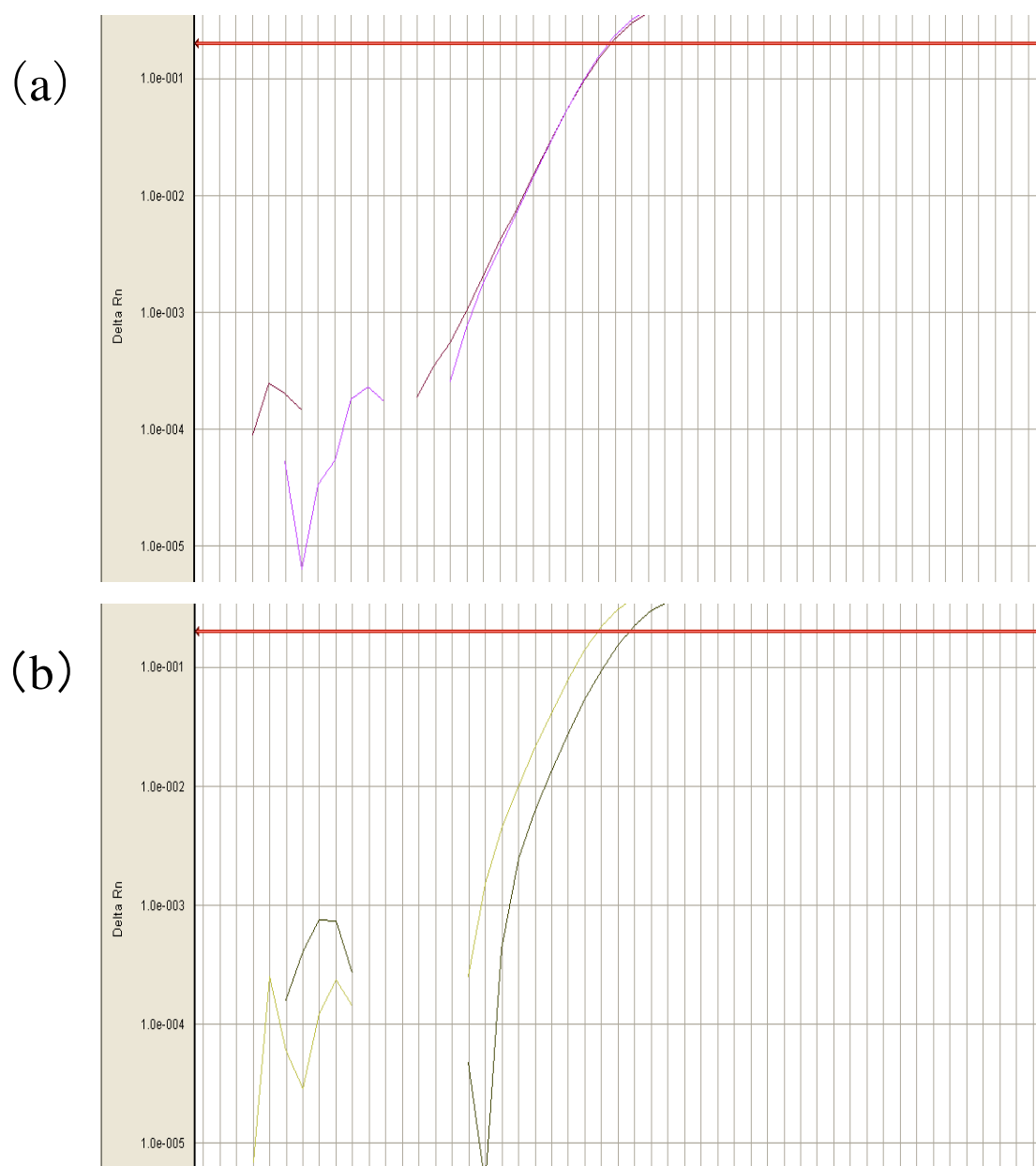
同様の57例について、*PIK3CA*遺伝子の変異ホットスポットであるexon 9部分(E542K, E545K)及びexon 20部分(H1047R)の変異検索を行い、9例(16%) (E542K変異=1例、E545K変異=8例)で変異を認めた。代表的なE542K及びE545K変異の波形を図17に示す。また、図18に*PIK3CA*遺伝子コピー数の代表的な定量的real-time PCRの結果を示す。遺伝子コピー数は0.85-18.2に分布し(中央値=2.45)、19例(33%)を増幅症例と判定した。(図19) 26例(46%)で*PIK3CA*の変異あるいはコピー数増幅が認められ、2例では*PIK3CA*の変異と増幅が重複していた。(図20) *PIK3CA*変異あるいは増幅のある症例と、野生型かつ増幅のない症例の2群間における疾患特異的生存率に有意な差は認めなかった。 $(P=0.37)$ また、FAK発現と*PIK3CA*変異及びコピー数増幅の間にも相関性を認めなかった。(表9)

図 17. Sanger 法による *PIK3CA* 変異の代表的な波形



- (a) Exon9 542 番目のアミノ酸がグルタミン酸 (GAA) からリジン (AAA) へ変化.
- (b) Exon9 545 番目のアミノ酸がグルタミン酸 (GAA) からリジン (AAA) へ変化.

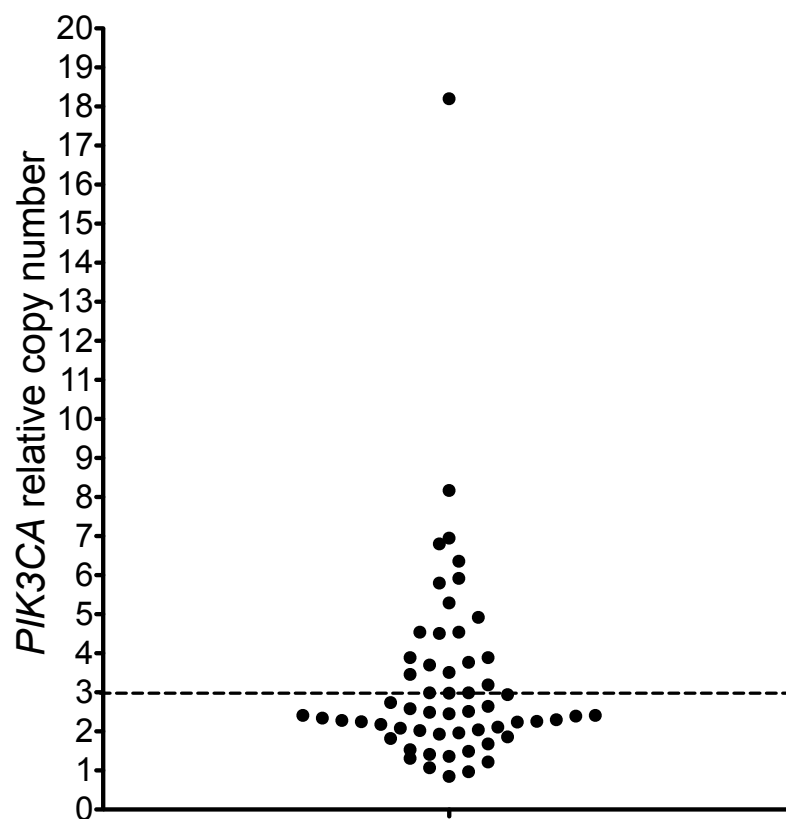
図 18. *PIK3CA* 遺伝子コピー数の代表的な定量的 real-time PCR



(a) *PIK3CA* コピー数増幅なし症例

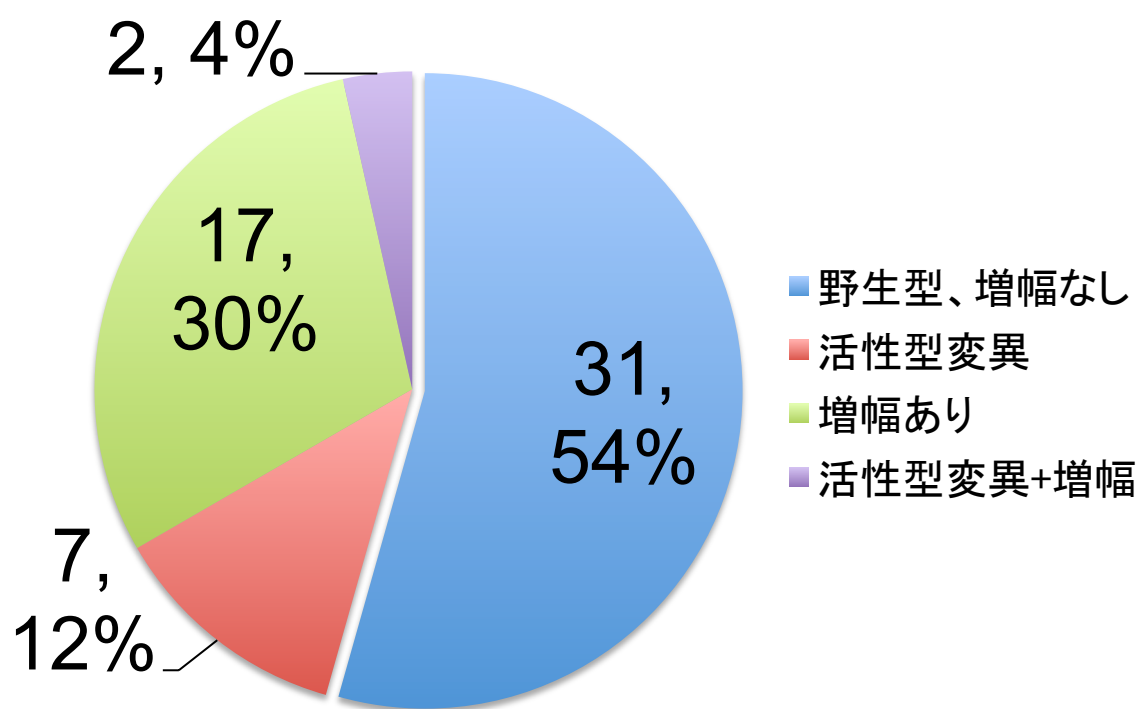
(b) *PIK3CA* コピー数増幅あり症例

図 19. *PIK3CA* のコピー数変化の分布



0.85-18.2(中央値=2.45)、19 例(33%)を増幅症例と判定.

図 20. *PIK3CA* 変異・増幅の分布



26 例 (46%) で *PIK3CA* の変異・増幅あり.

表 9. FAK 発現と *PIK3CA* 変異及びコピー数増幅の関係

		FAK 陰性	FAK 陽性	<i>P</i> 値
<i>PIK3CA</i> 変異の有無	野生型	22	26	0.40
	活性型変異	6	3	
<i>PIK3CA</i> コピー数増幅	増幅なし	21	19	0.25
	増幅あり	7	11	
<i>PIK3CA</i> 変異及び増幅の有無	野生型、増幅なし	17	14	0.17
	変異型 or 増幅あり	11	15	

VI. 考察

本研究では、東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で手術を行った下咽頭癌症例において、①原発巣のFAK高発現が疾患特異的生存率、リンパ節転移個数、そして遠隔転移出現率に相関すること、②下咽頭癌の発癌要因としてHPVは関与せず、*ALDH2*多型と飲酒量が寄与すること、③*TP53*変異が予後に相関すること、④FAK発現が*TP53*あるいは*PIK3CA*遺伝子異常との関連をもたない可能性を明らかにした。

まずFAK発現と頭頸部癌との関係について、de Vicenteら⁵⁰は口腔癌においてFAK高発現は腫瘍径、転移リンパ節、及び予後と関連すると報告し、Rodrigoら⁵⁷は声門上喉頭癌においてFAK高発現かつE-cadherin低発現はリンパ節転移の危険因子、ならびに予後不良因子であると報告している。今回の検討では、頭頸部癌の中で最も予後不良とされる下咽頭癌において、FAK発現が予後バイオマーカーになりうる可能性を示した。FAK陽性症例では有意に病理学的リンパ節転移数が多く、遠隔転移も高率に出現することから、原発巣におけるFAK発現がリンパ節転移、潜在的遠隔転移を予測しうるものと考えられた。近年では早期下咽頭癌に対して、Transoral Robotic Surgery (TORS)、Transoral Videolaryngoscopic Surgery (TOVS)、Endoscopic Submucosal Resection (ESD)、Endoscopic Laryngo-pharyngeal Surgery (ELPS)等の内視鏡や手術支援ロボットを使用する低侵襲な経口腔的切除術が行われるようになり、喉頭温存手術の適応拡大が当領域のトピックスの一つとなっている。これら経口腔的に行う術式の予後及び術後発声機能・嚥下機能は、短期成績ではあるが良好と報告されている。^{12,13} 従来型の頸部外切開による下咽頭部分切除術では術野展開の必要性があるため臨床的にリンパ節転移を認めない(cN0)症例に対しても予防的頸部郭清術が行われるが、経口腔的喉頭温存手術では咽頭内操作のみで切除が行われるため、予防的頸部郭清術は通常施行されない。それゆえ、原発巣切除

後に行うFAK発現状況の評価は、予防的頸部郭清術の追加、あるいは遠隔転移予防のための補助療法の適応を判断する上で有用となる可能性がある。また、治療前の生検材料を用いた評価が可能になれば、手術療法によって高い根治性が予想されるFAK陰性症例には喉頭摘出を含む手術療法を推奨し、術後再発する可能性が予想されるFAK陽性症例には化学放射線療法を推奨する、などの治療法選択の基準になる可能性も示唆される。

また、FAK自体が下咽頭癌の治療標的となる可能性がある。下咽頭癌におけるFAKとその周辺分子の重要性が証明されれば、FAK阻害剤を用いた術後補助療法の確立を目指す臨床試験の理論的根拠となる。現在、FAKのキナーゼ活性を抑制する複数のATP拮抗阻害剤が開発され、臨床応用への研究段階にある。具体的にはTAE226がマウスの腹膜播種した大腸癌を著明に縮小させ、かつ生存期間を延長したと報告されている。⁵⁸ また、PF-562-271 (VS-6062)は第I相試験にて毒性が許容され、腫瘍増大の抑制効果が認められた。現在、VS-6063 (PF-04554878, defactinib)、VS-4718 (PND-1186)、GSK2256098の臨床試験が行われており、特にVS-6063は、*KRAS*変異陽性の非小細胞肺癌に対し*CDKN2A*変異と*TP53*変異の有無で4群に分けた第II相試験 (NCT01951690)、日本人に対しては第I相試験 (NCR00787033)が進行中である。⁴² これらの臨床試験の結果によりFAK阻害剤が実臨床に導入される暁には、下咽頭癌においても有力な治療薬となることが期待される。

本研究では、下咽頭癌の発癌に関与する要因についても検討を行った。まず、HPV感染による発癌機構は以下のように考えられている。HPV感染による異形成の初期にはHPVゲノムはepisomeの状態で保持されているが、感染が持続すると宿主のDNAにintegrateし、E6, E7蛋白それぞれの活性が高まる。E6関連蛋白はユビキチン・プロテアソーム系を阻害してp53の機能を阻害する。一方、E7蛋白はE2F転写因子を阻害し、pRbの不活性化、p16の過

剰発現を引き起こすとされる。近年、中咽頭癌においてはHPV感染とその代理マーカーとしてのp16陽性が予後因子になることが広く認知されている。^{4,5} 一方、中咽頭以外の頭頸部癌においては、HPV及びp16に関する臨床的意義は未だ明らかにされていない。下咽頭癌におけるp16陽性の頻度は14.6-16.4%、HPV16感染の頻度は3.7-6.7%と報告され、⁵⁹⁻⁶² またp16陽性は予後に関連しないが、⁵⁹⁻⁶¹ HPV16感染は予後に関連するなどの報告がある。^{60,61} 他方で、RTOG0129、RTOG0234、RTOG0522にエントリーした中咽頭以外の頭頸部癌においてはp16陽性が予後因子になるとの報告⁶² もあり、HPV感染及びp16陽性に関して統一した見解は得られていない。本研究において下咽頭癌におけるp16陽性の割合は5%と低く、またp16陽性症例でのHPV-ISH 結果は全例陰性であった。一方、p16陰性症例におけるHPV陽性は中咽頭癌においても2%しかなく、⁶³ 下咽頭癌においては複数の報告が0%としている。⁶⁰⁻⁶² これらのことから、下咽頭癌発症にHPVはほぼ関与せず、下咽頭癌におけるp16陰性症例に対し更なるHPV感染のチェックは不要である可能性が高いと考えられた。なお、本研究においてみられたp16陽性、HPV陰性症例については、HPV感染以外の経路でp16が活性化されたものとする。The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータでは、HPV非関連癌において*RBI*変異が4%で認められ、³⁶ pRbの不活性化からp16過剰発現をするものと推察されている。また本研究におけるp16陽性頻度は下咽頭癌のこれまでの報告と比較して低率であった。これは多くの報告が多民族国家のシンガポール⁵⁹ や欧州⁶⁰⁻⁶² からのものであったことを考慮すると、人種差が大きく関係しているものと推察される。

一方、下咽頭癌の発癌リスクとして注目される*ALDH2*多型について、本研究の下咽頭癌症例では*ALDH2**1/*2症例が58%、*ALDH2**2/*2症例は0%であった。*ALDH2**2/*2症例はアルデヒドの代謝活性はほぼ0であり、全く飲酒ができない。実際、日本人健常者2,299人コホートでは、*ALDH2**2/*2例の217例中、211人(97.2%)⁹で飲酒習慣を認めていない。本研究

の下咽頭癌症例に $ALDH2^*2/^*2$ 症例が0例であったことは、飲酒ができない人には下咽頭癌の発生は稀であることを示唆する。また、本研究により、①下咽頭癌症例における $ALDH2^*1/^*2$ 頻度が日本人健常者コホート(40.9%)より17%も多かったこと、②下咽頭癌症例における $ALDH2^*1/^*2$ 保因者が $ALDH2^*1/^*1$ 保因者と比較してより少ない飲酒量で下咽頭癌に罹患していることが明らかになった。以上のことから、下咽頭癌の発症には飲酒と $ALDH2$ 多型が深く関与していることが再認識された。さらに、 $TP53$ 変異症例は野生型 $TP53$ 症例と比較して頭頸部・食道癌の重複の割合が有意に高く、 $ALDH2^*1/^*2$ の保因率も高い傾向にあった。頭頸部・食道の扁平上皮に多発癌を引き起こすfield cancerizationという概念は1953年にSlaughterらが口腔粘膜において提唱したもので、⁶⁴ 現在ではアセトアルデヒドの反復性暴露が引き起こす頭頸部・食道重複癌の発癌機構としても知られている。⁶⁵

$ALDH2$ はアセトアルデヒドによるDNA損傷に関係するとされ、^{66,67} Pagetらはアルデヒド暴露が食道癌において $TP53$ 変異を引き起こす原因として報告している。⁶⁸ さらにWaridelらは重複癌患者と単発癌患者それぞれの正常粘膜における $TP53$ 変異を検索した結果、重複癌症例で有意に多くの $TP53$ 変異を認め、field cancerizationにおいては発癌の比較的早い段階で $TP53$ 変異が生じると述べている。⁶⁹ これらのことから、 $ALDH2^*1/^*2$ 保因者は $ALDH2^*1/^*1$ 保因者と比較してアルデヒド代謝が遅く、飲酒によるアルデヒドに暴露されることで頭頸部・食道上皮における前癌病変に $TP53$ 変異が蓄積し、重複癌の発症に至るものと推察される。この仮説に関しては更なる症例の蓄積、ならびに動物モデルでの証明が必要と考えている。下咽頭・食道癌の発癌には $ALDH2$ の多型のみではなく、アルコール脱水素酵素1B($ADH1B$)多型^{7,66} や喫煙(特にタバコに含まれるニトロサミン⁷⁰)の関与も報告されていて、食道癌の発癌リスクについては $ALDH2$ 多型のみではなく $ADH1B$ 、喫煙も合わせて検討されることが多い。^{66,71} 本研究においては両者の検討は行っておらず、今後は $ADH1B$

多型と喫煙も検討に加え、下咽頭癌における発癌機構、予後への影響など新たな知見を増やしたいと考えている。

また本研究では、*TP53*変異が下咽頭癌の手術治療例においても予後因子になることが示された。2015年にTCGAから報告された頭頸部癌の網羅的変異解析データによれば、HPV非関連癌(243例)の*TP53*変異頻度は84%であった。うち下咽頭癌はわずか2例であるため直接比較は困難であるが、⁴² 本研究では*TP53*変異が68%とやや低い結果であった。この理由として、人種・発癌部位による差異の他に、TCGAデータは次世代シーケンサーによるexome sequence解析であり、本研究のSanger法と比較して検出精度に優れる可能性が挙げられる。

*TP53*変異とp53タンパク発現の関係についてまとめると、①野生型症例ではp53陰性が多く、②ミスセンス変異症例ではp53陽性が多く、③Truncated変異症例では全例p53陰性であった。①は、正常p53タンパクがユビキチン-プロテアソーム系により速やかに分解されることから説明可能である。②は、異常p53タンパクが分解されずに蓄積することで高発現していると理解できる。蓄積した変異型p53は、優性阻害変異あるいは機能獲得型変異として発癌に寄与すると考えられる。③は、mRNA decayによりmRNAに転写された時点で分解されてしまう、もしくはそもそも一次抗体が認識可能なp53タンパクが作られないことが考えられる。以前より*TP53*変異有無とp53免疫染色の結果は一致しないことが多く、p53免疫染色の意義について議論がなされていたが、本研究では野生型症例とTruncated変異症例ではp53低発現、ミスセンス変異症例では高発現が多いことが明らかになった。

本研究では、FAK発現とその下流カスケードに位置する*TP53*変異、*PIK3CA*変異・増幅との相関関係は見出せなかった。乳癌とは異なり、下咽頭癌においてはFAK発現と*TP53*変異が独立した予後因子であることも明らかになった。Golubovskayaらは乳癌の臨床検体に

において、⁴⁴ van Miltenburgらはマウスモデルにおいて、⁵² FAK発現と*TP53*変異が相関すると報告している。乳癌と下咽頭癌症例の差異を説明しうるものは*TP53*変異頻度の差であろう。乳癌における*TP53*変異頻度は27.2-38.2%と報告されており、⁷²⁻⁷⁴ 本研究における下咽頭癌の*TP53*変異頻度68%より相当に低頻度である。FAKは多彩な下流カスケードを持つがゆえに、癌種毎での知見の蓄積が必要であると考えられる。最近、細胞核内のFAKが制御性T細胞を誘導し、抗腫瘍性CD8⁺T細胞の機能を抑制することで腫瘍免疫からの回避を促進することが明らかになり、発癌におけるFAKの重要な作用機序であることが示唆される。⁷⁵ 今後、FAKに関する下咽頭癌臨床データの蓄積とともに、扁平上皮細胞におけるFAKの機能解析を遂行していく計画である。

VII. 謝辞

本研究は筆者が東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・聴覚音声外科所属時に日常臨床業務の傍らに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 山嵜達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、この遂行にあたって終始ご指導を頂いた。東京医科歯科大学医学部附属病院頭頸部外科（前東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科准教授）朝蔭孝宏教授には本研究の指導ならびに、学生時代に頭頸部腫瘍学を志すきっかけを頂いたのち、研修医時代から頭頸部外科医として育てて頂いた。東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科講師 安藤瑞生講師には臨床及び研究でご多忙の中、PCRの方法、解釈法につき徹頭徹尾ご指導頂いた。東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科 齊藤祐毅助教には臨床統計、免疫染色、In situ hybridizationの方法、解釈法につき日夜ご指導頂いた。東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科の吉田昌史先生、明石健先生、坂本幸士先生、近藤健二講師、金谷佳織先生、国立がん研究センター中央病院頭頸部腫瘍科 小林謙也先生、埼玉医科大学国際医療センター頭頸部腫瘍科 蝦原康宏講師には研究遂行にあたり日々適切な助言、ご指導を頂いた。パラフィン包埋標本の切り出し、プレパラート準備に当たっては東京大学耳鼻咽喉科学教室の露崎敦子様に丁寧なご指導を頂いた。他、長時間手術や術後合併症などの対応に遅くまで患者さんの治療にあたっていた、歴代の耳鼻咽喉科専門研修医、病棟スタッフのおかげで初めてこの研究成果を得られたものとする。ここに諸氏に対して感謝の意を表す。

VIII. 引用文献

1. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. GLOBOCAN (2008) Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. International Agency for Research on Cancer; 2010: Lyon, France. Available from <http://globocan.iarc.fr>. Accessed March 14, 2016.
2. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*. 2009; 21: 194-200.
3. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglian V. A review of human carcinogens- Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 2009; 10: 1033-1034.
4. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung 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.
5. Saito Y, Yoshida M, Ushiku T, Omura G, Ebihara Y, Shimono T, Fukayama M, Yamasoba T, Asakage T. Prognostic value of p16 expression and alcohol consumption in Japanese patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013; 119: 2005–2011.
6. Hamajima N, Takezaki T, Tajima K. Allele frequencies of 25 polymorphisms pertaining to cancer risk for Japanese, Koreans and Chinese. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002; 3: 197-206.
7. Asakage T, Yokoyama A, Haneda T, Yamazaki M, Muto M, Yokoyama T, Kato H, Igaki H, Tsujinaka T, umagai Y, Yokoyama M, Omori T, Watanabe H. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28:865-874.
8. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Human Genetics* 1992; 88: 344-346.
9. 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* 2006; 15: 1009-1013.

10. Montgomery PQ, Phys Evan PH, Gullane PJ. Principles and practice of head and neck surgery and oncology. Second edition. Colchester: Informa Healthcare; 2009. 233 p.
11. 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://ganjoho.jp/pro/statistics/gdball.html?2%2%1> Accessed March 14, 2016.
12. Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Shiotani A. Transoral videolaryngoscopic surgery for oropharyngeal, hypopharyngeal, and supraglottic cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014; 271: 589-597.
13. Park YM, Kim YS, De Virgilio A, Lee SY, Seol JH, Kim SH. Transoral robotic surgery for hypopharyngeal squamous cell carcinoma: 3-year oncologic and functional analysis. *Oral Oncol* 2012; 48: 560-566.
14. Hilgers FJ, Ackerstaff AH, Balm AJ Tan IB, Aaronson NK, Persson JO. Development and clinical evaluation of a second-generation voice prosthesis (Provox2), designed for anterograde and retrograde insertion. *Acta Otolaryngol* 1997; 117: 889-896.
15. Terada T, Saeki N, Toh K, Uwa N, Sagawa K, Mouri T, Sakagami M. Voice rehabilitation with Provox2TM voice prosthesis following total laryngectomy for laryngeal and hypopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2007; 34: 65-71.
16. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000; 355: 949-955.
17. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, Tjulandin S, Shin DM, Cullen K, Ervin TJ, Murphy BA, Racz LE, Cohen RB, Spaulding M, Tishler RB, Roth B, Viroglio Rdel C, Venkatesan V, Romanov I, Agarwala S, Harter KW, Dugan M, Cmelak A, Markoe AM, Read PW, Steinbrenner L, Colevas AD, Norris CM Jr, Haddad RI; TAX 324 Study Group. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007; 357:1705-1715.
18. Harris BN, Biron VL, Donald P, Farwell DG, Luu QC, Bewley AF, Chen AM, Daly ME. Primary surgery vs chemoradiation treatment of advanced-stage hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 141: 636-640.
19. Omura G, Ando M, Saito Y, Kobayashi K, Yamasoba T, Asakage T. Disease control and clinicopathological prognostic factors of total pharyngolaryngectomy for hypopharyngeal cancer: a single-center study. *Int J Clin Oncol* 2015; 20: 290-297.
20. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK; Radiation Therapy Oncology

- Group 9501/Intergroup. Precisely defining high-risk operable head and neck tumors based on RTOG #85-03 and #88-24: targets for postoperative radiochemotherapy? *Head Neck* 1998; 20: 588–594
21. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay 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* 2004; 350: 1937–1944
 22. Cooper JS, Zhang Q, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Lustig R, Ensley JF, Thorstad W, Schultz CJ, Yom SS, Ang KK. Long-term follow-up of the RTOG 9501/intergroup phase III trial: postoperative concurrent radiation therapy and chemotherapy in high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 84: 1198–1205
 23. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007; 6: 1006–10.
 24. 渋谷 正史、湯浅 保仁 編. がん生物学イラストレイテッド. 羊土社 2011;122-130p
 25. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutation in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
 26. 武藤 誠、青木 正博 訳. ワインバーグ がんの生物学. 南江堂. 2008; 307-356p
 27. Olshan AF, Weissler MC, Pei H, Conway K. p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 499–504.
 28. Gonzalez MV, Pello MF, Lopez-Larrea C, Suarez C, Menendez MJ, Coto E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1043–1049.
 29. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. TP53 mutation and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007; 357: 2552-2561.
 30. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1157-1167.

31. Lindenberg-van der Plas M, Brakenhoff RH, Kuik DJ, Buijze M, Bloemena E, Snijders PJ, Leemans CR, Braakhuis BJ. Prognostic significance of truncating *TP53* mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3733-3741.
32. 武藤 誠、青木 正博 訳. ワインバーク がんの生物学. 南江堂. 2008; 176-183p
33. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001; 114: 1439-1445.
34. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the *PIK3CA* gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554.
35. Suda T, Hama T, Kondo S, Yuza Y, Yoshikawa M, Urashima M, Kato T, Moriyama H. Copy number amplification of the *PIK3CA* gene is associated with poor prognosis in non-lymph node metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12: 416.
36. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517: 576-582.
37. Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, Bennett BP, Su GH. *PIK3CA* mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1441-1446.
38. Fu W, Hall JE, Schaller MD. Focal adhesion kinase-regulated signaling events in human cancer. *Bio Mol Concepts* 2012; 3: 225-240.
39. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer – a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 505-515.
40. Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 359-374.
41. Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 35-49.
42. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 598-610.
43. Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, Sohda M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Tsukada K, Kuwano H. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89: 140-145.

44. Golubovskaya VM, Conway-Dorsey K, Edmiston SN, Tse CK, Lark AA, Livasy CA, Moore D, Millikan RC, Cance WG. FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 1735-1738.
45. Hsu NY, Chen CY, Hsu CP, Lin TY, Chou MC, Chiou SH, Chow KC. Prognostic significance of expression of nm23-H1 and focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2007; 18: 81-85.
46. Lark AL, Livasy CA, Calvo B, Moore DT, Yang X, Cance WG. Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 215-222.
47. Itoh S, Maeda T, Shimada M, Aishima S, Shirabe K, Tanaka S, Maehara Y. Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2812-2817.
48. Sood AK, Coffin JE, Schneider GB, Fletcher MS, DeYoung BR, Gruman LM, Gershenson DM, Schaller MD, Hendrix MJ. Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion. *Am J Pathol* 2004; 165: 1087-1095.
49. Rovin JD, Frierson HF Jr, Ledin W, Parsons JT, Adams RB. Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *Prostate* 2002; 53: 124-132.
50. de Vicente JC, Rosado P, Lequerica-Fernández P, Allonca E, Villallaín L, Hernández-Vallejo G. Focal adhesion kinase overexpression: Correlation with lymph node metastasis and shorter survival in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2013; 35: 826-830.
51. van Miltenburg MH, van Nimwegen MJ, Tijdens I, Lalai R, Kuiper R, Klarenbeek S, Schouten PC, de Vries A, Jonkers J, van de Water B. Mammary gland-specific ablation of focal adhesion kinase reduces the incidence of p53-mediated mammary tumour formation. *Br J Cancer* 2014; 110: 2747-2755.
52. Glubovskaya V, Kaur A, Cance W. Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: nuclear factor κ B and p53 binding sites. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1678: 111-125.
53. 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* 2011; 17: 6262-6271.
54. Saito Y, Ebihara Y, Ushiku T, Omura G, Kobayashi K, Ando M, Sakamoto T, Fukayama M, Yamasoba T, Asakage T. Negative human papillomavirus status and excessive alcohol consumption are significant risk

- factors for second primary malignancies in Japanese patients with oropharyngeal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2014; 44: 564-569.
55. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, Todo T, Hongyo T, Inohara H. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer Sci* 2014; 105: 409-417.
 56. Rodrigo JP, Martínez P, Allonca E, Alonso-Durán L, Suárez C, Astudillo A, Garcia-Pedrero JM. Immunohistochemical markers of distant metastasis in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2014; 31: 317-325.
 57. Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133: 145-150.
 58. Hao HF, Takaoka M, Bao XH, Wang ZG, Tomono Y, Sakurama K, Ohara T, Fukazawa T, Yamatsuji T, Fujiwara T, Naomoto Y. Oral administration of FAK inhibitor TAE226 inhibits the progression of peritoneal dissemination of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 744-749.
 59. Ang SH, Haaland B, Acharyya S, Thu MM, Krisna SS, Hwang SG, Tan PH, Ng QS, Tan DS, Tai WM, Tan EH, Lim WT, Ang MK. Interactions between clinical factors, p16, and cyclin-D1 expression and survival outcomes in oropharynxgeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2015; 37: 1650-1659.
 60. Dalianis T, Grün N, Koch J, Vlastos A, Tertipis N, Nordfors C, Näsman A, Wendt M, Romanitan M, Bersani C, Munck-Wikland E, Ramqvist T. Human papillomavirus DNA and p16^{INK4a} expression in hypopharyngeal cancer and in relation to clinical outcome, in Stockholm, Sweden. *Oral Oncol* 2015; 51: 857-861.
 61. Wendt M, Romanitan M, Näsman A, Dalianis T, Hammarstedt L, Marklund L, Ramqvist T, Munck-Wikland E. Presence of human papillomaviruss and p16 expression in hypopharyngeal cancer. *Head Neck* 2014; 36: 107-112.
 62. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, Wang D, Redmond KP, Shenouda G, Trotti 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* 2014; 32: 3930-3938.

63. Saito Y, Yoshida M, Omura G, Kobayashi K, Fujimoto C, Ando M, Sakamoto T, Asakage T, Yamasoba T. Prognostic value of p16 expression irrespective of human papillomavirus status in patients with oropharyngeal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2015; 45: 828-836.
64. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6: 963-968.
65. 日本頭頸部癌学会. <http://www.jshnc.umin.ne.jp/psmd.html> Accessed March 14, 2016.
66. Yukawa Y, Muto M, Hori K, Nagayoshi H, Yokoyama A, Chiba T, Matsuda T. Combination of ADH1B*2/ALDH2*2 polymorphisms alters acetaldehyde-derived DNA damage in the blood of Japanese alcoholics. *Cancer Sci* 2012; 103: 1651-1655
67. Amanuma Y, Ohashi S, Itatani Y, Tsurumaki M, Matsuda S, Kikuchi O, Nakai Y, Miyamoto S, Oyama T, Kawamoto T, Whelan KA, Nakagawa H, Chiba T, Matsuda T, Muto M. Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithetium. *Sci Rep* 2015; 5: 14142
68. Paget V, Lechevrel M, Sichel. Acetaldehyde-induced mutational pattern in the tumour suppressor gene *TP53* analysed by use of a functional assay, the FASAY (functional analysis of separated alleles in yeast). *Mutat Res* 2008; 652: 12-19.
69. Waridel F, Estreicher A, Bron L, Flaman JM, Fontollet C, Monnier P, Frebourg T, Iggo R. Field cancerisation and polyclonal p53 mutation in the upper aero-digestive tract. *Oncogene* 1997; 14: 163-169.
70. Hoffmann D, Hecht SS. Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. *Cancer Res* 1985; 45: 935-944.
71. Ishiguro S, Sasazuki S, Inoue M, Kurahashi N, Iwasaki M, Tsugane S; JPHC Study Group. Effect of alcohol consumption, cigarette smoking and flushing response on esophageal cancer risk: a population-based cohort study (JPHC study). *Cancer Lett* 2009; 275: 240-246.
72. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, Zhang H, McLellan M, Yau C, Kandoth C, Bowlby R, Shen H, Hayat S, Fieldhouse R, Lester SC, Tse GM, Factor RE, Collins LC, Allison KH, Chen YY, Jensen K, Johnson NB, Oesterreich S, Mills GB, Cherniack AD, Robertson G, Benz C, Sander C, Laird PW, Hoadley KA, King TA; TCGA Research Network, Perou CM. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell* 2015; 163: 506-519.
73. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, Nik-Zainal S, Martin S, Varela I, Bignell GR, Yates LR, Papaemmanuil E, Beare D, Butler A, Cheverton A, Gamble J, Hinton J, Jia M, Jayakumar A, Jones D, Latimer C, Lau KW, McLaren S, McBride DJ, Menzies A, Mudie L, Raine K, Rad

- R, Chapman MS, Teague J, Easton D, Langerød A; Oslo Breast Cancer Consortium (OSBREAC), Lee MT, Shen CY, Tee BT, Huimin BW, Broeks A, Vargas AC, Turashvili G, Martens J, Fatima A, Miron P, Chin SF, Thomas G, Boyault S, Mariani O, Lakhani SR, van de Vijver M, van 't Veer L, Foekens J, Desmedt C, Sotiriou C, Tutt A, Caldas C, Reis-Filho JS, Aparicio SA, Salomon AV, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012; 486: 400-404
74. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, Lawrence MS, Sivachenko AY, Sougnez C, Zou L, Cortes ML, Fernandez-Lopez JC, Peng S, Ardlie KG, Auclair D, Bautista-Piña V, Duke F, Francis J, Jung J, Maffuz-Aziz A, Onofrio RC, Parkin M, Pho NH, Quintanar-Jurado V, Ramos AH, Rebollar-Vega R, Rodriguez-Cuevas S, Romero-Cordoba SL, Schumacher SE, Stransky N, Thompson KM, Uribe-Figueroa L, Baselga J, Beroukheim R, Polyak K, Sgroi DC, Richardson AL, Jimenez-Sanchez G, Lander ES, Gabriel SB, Garraway LA, Golub TR, Melendez-Zajgla J, Toker A, Getz G, Hidalgo-Miranda A, Meyerson M. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012; 486: 405-409.
75. Serrels A, Lund T, Serrels B, Byron A, McPherson RC, von Kriegsheim A, Gomez-Cuadrado L, Canel M, Muir M, Ring JE, Maniati E, Sims AH, Pachter JA, Brunton VG, Gilbert N, Anderton SM, Nibbs RJ, Frame MC. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. *Cell* 2015; 163: 160-173.