

口腔扁平上皮癌の浸潤先端部における Runt-Related Transcription Factor-1

過剰発現とリンパ節転移および予後不良との関連性について

久野 高博

山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 歯科口腔外科学分野

平成 31 年 1 月

## 目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	2
(1) 対象	2
(2) 方法	2
(3) 解析	3
5. 結果	3
6. 考察	4
7. 結語	5
8. 謝辞	5
9. 参考文献	5

## 1. 要旨

本研究の目的は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における Runt-Related Transcription Factor-1 (RUNX1) の臨床的意義を検索することである。OSCC 患者 43 人において免疫組織化学染色によって RUNX1 の発現を解析した。RUNX1 発現の臨床的意義は、カイ二乗検定、カプランマイヤー法、Cox 比例ハザードモデルによって評価した。浸潤先端部における RUNX1 の発現は、腫瘍中央部での発現よりも有意に高かった ( $P < 0.01$ )。浸潤先端部で高い RUNX1 標識指数 (LI) を有する OSCC 患者は、低い LI を有する OSCC 患者と比較して、有意に生存期間が短かった ( $P < 0.05$ )。浸潤先端部での高い RUNX1-LI の患者の予後不良は、低分化 ( $P < 0.05$ )、浸潤様式 ( $P < 0.01$ )、およびリンパ節転移 ( $P < 0.05$ ) と統計的に相関していた。さらに、浸潤先端部での高い RUNX1-LI は、全生存期間に対する独立した予後因子であることが実証された ( $P < 0.01$ )。我々の検索結果から、OSCC の浸潤先端部における RUNX1 の過剰発現は、予後不良の有用な予測因子であると同時に、リンパ節転移を評価するのに有用なマーカーであり得ることが示唆された。

## 2. 研究の背景

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は口腔の中で最も典型的な悪性新生物であり、すべての口腔悪性腫瘍の約 90% を占める [1]。OSCC は、ヒトにおいて 8 番目に多い癌であり、これは、世界中の女性の全癌腫の約 2%、男性の 4% を占める [2, 3]。OSCC の発生率は徐々に増加している。世界中で約 30 万人の患者が口腔癌に罹患していると推定されており [4-6]、日本では約 11,000 人の新たな罹患患者が推定されている [7]。最近のがん治療法の進歩と抗癌剤の改善にもかかわらず、OSCC の 5 年生存率は病期の進行段階で約 50% である [8, 9]。OSCC は不均一な病変であり、同じ治療に対して異なる治療効果を示し、このことが進行期における予後不良の一因となっている。したがって、早期に OSCC を効果的に検出するための有用なバイオマーカーを見つけなければならない。さらに、OSCC は、早期転移のため死亡率は増加している [10]。OSCC の標準治療は、依然として外科的切除である。しかしながら、原発腫瘍の治癒的外科的切除にもかかわらず、20-40% の患者が最終的に転移で死亡する [10, 11]。したがって、転移のプロセスを理解することは、新しい治療法を開発し OSCC 患者の腫瘍死を改善するためには不可欠である。

転移のプロセスは、複雑である。それらには、悪性腫瘍浸潤先端部における様々な段階や分子的事象が含まれる。このような分子的事象や一連の段階は、転移性病変を形成するためにしばしば必要である。浸潤先端部は、先端部の腫瘍細胞の 3~6 層または腫瘍と宿主組織の間の散在した腫瘍群または腫瘍出芽部位としても知られる器官と定義される。OSCC は、浸潤先端部で細胞の脱分化を呈する。この現象は、上皮表現型の喪失および間葉表現型の獲得により特徴づけられている。さらに、これらが分化した癌細胞の浸潤・転移につながる。悪性進行は、上皮間葉移行に深く関与していると考えられている [11, 12]。我々は、OSCC の浸潤先端部における悪性腫瘍の進展レベルを評価するための有用なバイオマーカーを分析することを試みた。我々はまた、上皮間葉移行が癌幹細胞の典型的な特徴の一つであるため、いくつかの癌幹細胞関連因子がバイオマーカーの候補でなければならないと考えている。

Runt-Related Transcription Factor-1 (RUNX) ファミリーは、コア結合因子 (CBF) 複合体を形成し、DNA に結合して遺伝子転写を活性化または抑制する 3 つのメンバー (RUNX1 ~3) からなる [13, 14]。それらは、転写因子複合体である CBF 複合体を形成する。RUNX タンパク質は、遺伝子の転写を制御することによって、様々な組織における分化、生存、

および増殖に関与している[15]。さらに、それらの機能は高い特異性を有し、RUNX1 と RUNX2 は、それぞれ複数の造血系統の産生および骨形成に必須であり、RUNX3 は神経発生および腸管発達と密接に関連している[15, 16]。また、RUNX メンバーの発癌性および腫瘍抑制性機能が報告されている。

### 3. 目的

本研究では、RUNX1 の過剰発現が、皮膚癌[17]、子宮内膜癌[18]、卵巣癌[18]、前立腺癌[19]、乳癌[20]、結腸癌[15]、頭頸部癌[21]の悪性腫瘍において同定されているため、腫瘍性疾患における RUNX1 の役割に焦点をあてた。さらに、RUNX1 は、癌幹細胞ならびにリンパ球および骨髄球の分化のための転写因子として作用し得る[22]。RUNX1 が、いくつかのマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP-2 および-9) と関連して、OSCC の侵襲段階に寄与することが示されているが、OSCC における RUNX1 の発現パターンや OSCC への関与は、現在のところ明らかではない[23]。したがって、本研究の目的は、OSCC における浸潤先端部の RUNX1 発現の臨床的意義を調べることである。ここに我々は、頸部リンパ節転移への RUNX1 の関与を示すデータを示した。また、今回の検索結果は、RUNX1 が OSCC の生存予測因子の候補となり得るだけでなく、治療標的の可能性の有無も明らかにできることが期待される。

### 4. 方法

#### (1) 対象

本研究では、2001 年 1 月から 2012 年 12 月までに山口大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した OSCC 患者 43 例を解析した。患者は、初診時に遠隔転移を伴わない、主にステージ I または II であった。また、当科受診以前は何ら治療を受けていなかった。43 例すべてが組織病理学的に扁平上皮癌と診断された。患者の年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、分化度、浸潤様式 (YK 分類)、T 分類、N 分類、病期および転帰に関する臨床データを表 1 に示す。全ての患者は、いかなる術後または術前化学補助療法を施行されることなく外科的切除を受けた。一次治療の前に、生検により全ての 43 患者から組織標本が採取された。全ての組織サンプルはリン酸緩衝 10%ホルマリン中に固定され、パラフィン包埋された。我々は、この研究を行う際、山口大学病院の倫理委員会 (IRB) (IRB 承認番号 H26-43) の倫理基準を厳守した。本研究は後ろ向き研究のため、同意取得は放棄された。

#### (2) 方法

パラフィン包埋組織は 4  $\mu$ m の切片に切断された。組織切片はキシレン中で脱パラされ、段階的なエタノールで再水和され、室温で蒸留水を用いて洗浄された。組織学的評価のために、各検体の 1 切片はヘマトキシリン (武藤化学) およびエオジン (和光純薬工業株式会社) にて染色された。他の切片は pH 9.0 の抗原賦活化緩衝液を用いて抗原を賦活化するためにオートクレーブ中で 20 分間加熱された。その後、室温まで冷却され、蒸留水ですすがれた。内在性ペルオキシダーゼ活性は、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノールを用いて室温で 5 分間ブロックされた。非特異的結合を減少させるため、ブロッキング剤として、切片に 10% 正常ヤギ血清が 30 分適用された。RUNX1 タンパクに対するマウスモノクローナル抗体 (1:1000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) が一次抗体として使用された。切片は 4°C にて一晩インキュベートされ、PBS で洗浄された。室温で二次抗体 (ImmPRESS™ REAGENT Anti-Mouse IgG PEROXIDASE; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を 60 分間適用した後、3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB) で発色された。その後、切片は

ヘマトキシリンにて対比染色された。染色後、スライドは水道水で洗浄され、段階的なアルコールにて脱水し、キシレンで処理され、カバーガラスにて封入された。陰性対照実験のため、一次抗体はマウス免疫グロブリン (Agilent Technologies Dako, Glostrup, Denmark) に置き換えられた。

RUNX1 発現を定量するために、陽性腫瘍細胞の平均パーセンテージ(ラベリング指数; LI) は、腫瘍の浸潤先端部や腫瘍中央部だけでなく、扁平上皮内腫瘍 (SIN) においても、それぞれ 3 つの無作為な視野で決定された (図 1A)。SIN 1 は軽度異形成、SIN 2 は中等度異形成、SIN 3 は重度異形成に相当する。RUNX1 の発現強度は以下のようにスコア化された: 0、染色なし; 1+, リンパ球より弱い染色; 2+, リンパ球と同様の染色; 3+, リンパ球よりも強い染色 (図 1B)。さらに、我々は RUNX1 陽性細胞の判定に 3 つの異なる基準を使用した。すなわち、RUNX1 染色の強度 1 (強度 1, 2, 3) 以上、強度 2 (強度 2, 3) 以上、および強度 3 のみ (強度 3) を陽性であるとみなした。また、ROC 曲線を用いて高発現または低発現のカットオフ値を決定した。これらの判断は、患者の臨床状態に関する情報がない 3 人の著者 (TH、DC および KH) によって行われた。

### (3) 解析

RUNX1 と臨床病理学的因子との関連性は、カイ二乗検定、またはスピアマンの順位相関を用いて評価された。全生存期間 (OS) は Kaplan-Meier 法を用いて計算され、群間の比較は log-rank 検定で行われた。RUNX1 発現の予後の有意性およびいくつかの臨床病理学的因子の評価に Cox 比例ハザードモデルが使用された。すべての統計的有意性は  $p < 0.05$  に設定された。すべての統計解析は、StatView ソフトウェア (バージョン 5.0J、SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を用いて行われた。

## 5. 結果

表 1 は、この研究に参加した 43 人の OSCC 患者の臨床病理学的データをまとめたものである。全ての患者は、いかなる術後または術前化学補助療法を施行されることなく外科的切除を受けた。経過観察期間の中央値は 7.17 年であり、平均年齢は 68.2 歳 (22-98 歳) であった。臨床病期の I、II、III および IV は、それぞれ 27 人、12 人、2 人および 2 人であった。それらの患者の免疫組織化学染色の解析に十分な利用可能な組織材料があった。

RUNX1 発現は、OSCC 組織における腫瘍細胞の核において観察された。しかしながら、RUNX1 の核染色の強度は様々であった (図 1B)。そのため、我々は RUNX1 の陽性染色の基準を定義する必要があった。我々は、リンパ球中の RUNX1 発現を基準として選択し、以下のように強度の基準を設定した: 0、染色なし; 1+, リンパ球より弱い染色; 2+, リンパ球と同様の染色; 3+, リンパ球よりも強い染色。また、我々は、RUNX1 染色を 3 つの異なる基準で陽性とみなした。強度 1 (強度 1, 2, 3) 以上、強度 2 (強度 2, 3) 以上、または強度 3 のみ (強度 3) である。RUNX1 の陽性染色の基準にかかわらず、RUNX1-LI は、腫瘍中央部よりも浸潤先端部においてより高いことが示された (図 1C)。

追跡期間中央値 7.17 年で、合計 37 人の患者が生存し、6 人の患者が死亡した。RUNX1 発現と患者の全生存期間 (OS) の関係は、Kaplan-Meier 法によって分析された。また、我々は、腫瘍の浸潤先端部および腫瘍中央部とを別々に染色強度の 3 つの異なる基準に基づいてそれらを調査した。興味深いことに、RUNX1 染色の基準として強度 3 を使用した場合 (図 2)、浸潤先端部の腫瘍細胞における RUNX1 の高発現と短い全生存期間との間には有意な相関を認めた。

浸潤先端部における RUNX1 の高発現の重要性を定義するために、我々は、腫瘍の浸潤先端部または中央部で別々に 3 つの異なる染色強度基準に基づいて RUNX1 発現と臨床病理学

的因子との関連性を調べた。その後、RUNX1 の陽性染色の基準として強度 3 を使用した場合において、我々は、浸潤先端部で最大の統計的有意性を見出すことができた。RUNX1 の高発現と年齢、性別、パフォーマンスステータス、T 分類、N 分類、病期、喫煙歴および飲酒歴との間に相関は見られなかった。しかしながら、RUNX1 発現と術後リンパ節転移 ( $P < 0.05$ )、分化度 ( $P < 0.05$ )、浸潤様式 ( $P < 0.01$ ) との間に有意な相関が認められた。RUNX1 発現の状態と、腫瘍の浸潤先端部および中央部における患者の臨床病理学的特徴との関連は表 2 に別々に要約された。

RUNX1 の発現強度にかかわらず、上述のように RUNX1 免疫反応の強度を 0~3 の範囲にしたとき、腫瘍中央部の RUNX1-LI だけでなく、扁平上皮内腫瘍 (SIN) や、腫瘍に隣接する扁平上皮細胞の RUNX1-LI よりも、浸潤先端部の RUNX1-LI 方が高いことが示された (図 3 および表 3)。興味深いことに、非腫瘍性の扁平上皮細胞においては強度 3 における RUNX1 発現を検出することができなかったが、SIN においては検出することができた。さらに、SIN3 の RUNX1-LI は、SIN1 または SIN2 の RUNX1-LI に比べて高いことが分かった。

さらに、Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析によれば、65 歳未満 ( $P < 0.01$ )、腫瘍中央部における強度 3 の RUNX1 発現 ( $P < 0.01$ )、腫瘍中央部における強度 2, 3 の RUNX1 発現 ( $P < 0.05$ )、浸潤先端部における強度 3 の RUNX1 発現 ( $P < 0.05$ ) は、より短い生存を予測する因子であることがわかった (表 4)。

## 6. 考察

本研究は、OSCC 患者 43 人における RUNX1 の発現が評価された。さらに、この研究は、OSCC の浸潤先端部の RUNX1 過剰発現と予後との相関を分析した。我々の知る限りでは、本稿は OSCC の浸潤先端部における RUNX1 過剰発現のリンパ節転移および予後値を最初に検索するものである。

RUNX1 発現は、OSCC の浸潤病変および、腫瘍周辺の SIN における扁平上皮細胞の核に見られたが、その染色強度は様々であった (図 1B および図 3)。この染色強度の違いは、OSCC における RUNX1 の臨床的意義を決定するための大きな問題であると考えられた。したがって、我々は RUNX1 の陽性染色の適切な基準を定義しなければならなかった。本研究では、RUNX1 が転写因子としてリンパ球分化のためにリンパ系において広く発現するため、リンパ球の RUNX1 発現を基準として選択した [24]。次に、強度の基準を以下のように設定した：0、染色なし；1+、リンパ球より弱い染色；2+、リンパ球と同等の染色；3+、リンパ球より強い染色。この評価方法はさらなる検索の助けになった。

我々は、腫瘍の中央部と浸潤先端部との間の RUNX1 発現の差異を見出した。RUNX1-LI は、RUNX1 染色の陽性の基準にかかわらず、腫瘍の中央部よりも浸潤先端部で有意に高かった；強度 1, 2, 3、強度 2, 3、および強度 3 のみ (図 1C)。しかしながら、RUNX1 陽性染色として強度 3 のみを基準として使用した場合のみ、浸潤先端部の腫瘍細胞における RUNX1 の発現と短い OS に有意な関連性を見出すことができたことは注目に値する (図 2)。したがって、OSCC における RUNX1 の具体的な役割を決定するために、我々は浸潤先端部における強度 3 の RUNX1 発現と統計的に相関している臨床病理学的因子を見出すことを試みた。その結果、我々は、術後リンパ節転移 ( $P < 0.05$ )、分化度 ( $P < 0.05$ )、浸潤様式 ( $P < 0.01$ ) の患者で有意に高い RUNX1 発現を見出した。

我々の予想に反して、我々は RUNX1 発現と年齢を OS の単変量解析によって検出したが、OS の単変量および多変量解析では予後因子として、病期または術後リンパ節転移は検出できなかった (表 4)。それは調査された患者の数が少ないためであることに違いない。実際、当院では近年、術前補助化学療法または術後補助化学療法を選択することが多く、患者数は少ないが、43 人の患者が術前補助化学療法も術後補助化学療法も行わずに手術を受けた

全患者であった。

## 7. 結語

我々の上記の所見に基づき、RUNX1 発現は OSCC の予後、浸潤または転移の予測に有用であるかもしれないと結論付けられた。さらに本研究は、OSCC 細胞の悪性化の機序についての新たな見通しを提供することができる。特に浸潤先端部の腫瘍細胞において検体中に高い RUNX1 発現を検出する場合、病理学的診断が軽度の異形成であっても、病変は厳重な経過観察を必要とするはずである。腫瘍細胞における RUNX1 発現の評価は、我々が異形成病変の悪性化を予測することを可能にするだろう。さらに、RUNX1 は分子標的療法によって癌細胞の浸潤および転移を制御するための新たな標的分子の候補であると言えるかもしれない。

## 8. 謝辞

この研究は、日本の文部科学省からの助成金（助成金番号：15K11292）によって一部支援されている。

## 9. 参考文献

1. Lawoyin, J.O., Lawoyin, D.O. and Aderinokun, G.: Intra-oral squamous cell carcinoma in Ibadan: a review of 90 cases. *Afr. J. Med. Med. Sci.*, **26**: 187-188, 1997.
2. Exarchos, K.P., Goletsis, Y. and Fotiadis, D.I.: A multiscale and multiparametric approach for modeling the progression of oral cancer. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.*, **12**: 136, 2012.
3. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P.: Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, **55**: 74-108, 2005.
4. Rautava, J., Luukkaa, M., Heikinheimo, K., Alin, J., Grenman, R. and Happonen, R.P.: Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. *Oral Oncol.*, **43**: 911-919, 2007.
5. Funk, G.F., Karnell, L.H., Robinson, R.A., Zhen, W.K., Trask, D.K. and Hoffman, H.T.: Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. *Head Neck*, **24**: 165-180, 2002.
6. Mehrotra, R., Singh, M.K., Pandya, S. and Singh, M.: The use of an oral brush biopsy without computer - assisted analysis in the oral lesions: a study of 94 patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **106**: 246-253, 2008.
7. Tanaka, T., Tanaka, M. and Tanaka, T.: Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Patholog. Res. Int.*, **2011**: 431246, 2011.
8. Inagi, K., Takahashi, H., Okamoto, M., Nakayama, M., Makoshi, T. and Nagai, H.: Treatment effects in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, **547**: 25-29, 2002.
9. Shingaki, S., Takada, M., Sasai, K., Bibi, R., Kobayashi, T., Nomura, T. and Saito, C.: Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am. J. Surg.*, **185**: 278-284, 2003.

10. Pereira, M.C., Oliveira, D.T., Landman, G. and Kowalski, L.P.: Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J. Can. Dent. Assoc.*, **73**: 339–344, 2007.
11. Noguti, J., De, Moura, C.F., De, Jesus, G.P., Da, Silva, V.H., Hossaka, T.A., Oshima, C.T. and Ribeiro, D.A.: Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*, **9**: 329–335, 2012.
12. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F. and Kirchner, T.: Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 744–749, 2005.
13. Okuda, T., Nishimura, M., Nakao, M. and Fujita, Y.: RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. *Int. J. Hematol.*, **74**: 252–257, 2001.
14. Avramopoulos, D., Cox, T., Blaschak, J.E., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E.: Linkage mapping of the AML1 gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. *Genomics*, **14**: 506–507, 1992.
15. Slattery, M.L., Lundgreen, A., Herrick, J.S., Caan, B.J., Potter, J.D. and Wolff, R.K.: Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF- $\beta$ -signaling pathway. *Carcinogenesis*, **32**: 318–326, 2011.
16. Little, G.H., Noushmehr, H., Baniwal, S.K., Beran, B.P., Coetzee, G.A. and Frenkel, B.: Genome-wide Runx2 occupancy in prostate cancer cells suggests a role in regulating secretion. *Nucleic Acids Res.*, **40**: 3538–3547, 2012.
17. Hoi, C.S., Lee, S.E., Lu, S.Y., McDermitt, D.J., Osorio, K.M., Piskun, C.M., Peters, R.M., Paus, R. and Tumber, T.: Runx1 directly promotes proliferation of hair follicle stem cells and epithelial tumor formation in mouse skin. *Mol. Cell. Biol.*, **30**: 2518–2536, 2010.
18. Planagumà, J., Liljeström, M., Alameda, F., Bützow, R., Virtanen, I., Reventós, J. and Hukkanen, M.: Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Hum. Pathol.*, **42**: 57–67, 2011.
19. Yeh, H.Y., Cheng, S.W., Lin, Y.C., Yeh, C.Y., Lin, S.F. and Soo, V.W.: Identifying significant genetic regulatory networks in the prostate cancer from microarray data based on transcription factor analysis and conditional independency. *BMC Med. Genomics*, **2**: 70, 2009.
20. Ferrari, N., Mohammed, Z.M., Nixon, C., Mason, S.M., Mallon, E., McMillan, D.C., Morris, J.S., Cameron, E.R., Edwards, J. and Blyth, K.: Expression of RUNX1 correlates with poor patient prognosis in triple negative breast cancer. *PLoS One*, **9**: e100759, 2014.
21. Scheitz, C.J., Lee, T.S., McDermitt, D.J. and Tumber, T.: Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer. *EMBO J.*, **31**: 4124–4139, 2012.
22. Kim, W., Barron, D.A., San, Martin, R., Chan, K.S., Tran, L.L., Yang, F., Ressler, S.J. and Rowley, D.R.: RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**: 16389–16394, 2014.
23. Blyth, K., Cameron, E.R. and Neil, J.C.: The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 376–387, 2005.



24. Abe, N., Kohu, K., Ohmori, H., Hayashi, K., Watanabe, T., Hozumi, K., Sato, T., Habu, S. and Satake, M.: Reduction of Runx1 transcription factor activity up-regulates Fas and Bim expression and enhances the apoptotic sensitivity of double positive thymocytes. *J. Immunol.*, **175**: 4475-4482, 2005.
25. Seo, W., Ikawa, T., Kawamoto, H. and Taniuchi, I.: Runx1-Cbf $\beta$  facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. *J. Exp. Med.*, **209**: 1255-1262, 2012.
26. Huang, H., Woo, A. J., Waldon, Z., Schindler, Y., Moran, T. B., Zhu, H. H., Feng, G. S., Steen, H., and Cantor, A. B.: A Src family kinase-Shp2 axis controls RUNX1 activity in megakaryocyte and T-lymphocyte differentiation. *Genes Dev.*, **26**: 1587-1601, 2012.
27. Lam, K., Muselman, A., Du, R., Harada, Y., Scholl, A. G., Yan, M., Matsuura, S., Weng, S., Harada, H. and Zhang, D. E.: Hmga2 is a direct target gene of RUNX1 and regulates expansion of myeloid progenitors in mice. *Blood*, **124**: 2203-2212, 2014.

本稿は、下記雑誌にて公開している論文を和訳したものである。

The Bulletin of the Yamaguchi Medical School より学位論文としての投稿を許可されている。

Overexpression of Runt-Related Transcription Factor-1 at Invasive Front in Oral Squamous Cell Carcinoma is Associated with Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis  
Takahiro Hisano, Dan Cui, Koji Harada, Tokuhiko Kimura, Katsuaki Mishima and Eiji Ikeda

The Bulletin of the Yamaguchi Medical School Vol. 66, No. 1-2 (Jun. 2019)

## 図の説明

図 1 (A) 浸潤先端部 (太い、黒い線)、腫瘍の中心部および SIN の概略図。陽性腫瘍細胞の平均パーセンテージは、浸潤先端部 (黒丸)、腫瘍の中央部分 (点線の円) および SIN を含む各病変の 3 つの無作為な視野で決定した。(B) ヘマトキシリン-エオシン染色 (a、b、c、d) または抗 RUNX1 抗体 (e、f、g、h) を用いて染色された組織サンプルにおける RUNX1 発現。腫瘍細胞の核において観察された RUNX1 陽性染色 (矢印) (バー; 100  $\mu$ m)。RUNX1 免疫反応の強度を以下のようにスコア化した: 0、染色なし; 1+, リンパ球より弱い染色; 2+, リンパ球に対する同様の染色; 3+, リンパ球より強い染色。(C) 3 つの基準を使用することによる、OSCC の浸潤先端部または腫瘍中央部における RUNX1-LI。各基準において、RUNX1-LI は腫瘍の中心部より浸潤先端部で有意に高かった。統計分析はスピアマンの順位相関により行われた。

図 2 OSCC における RUNX1 発現と全生存期間 (OS) との相関。Kaplan-Meier 法は時間の相関関係として OS の確率を推定するのに用いられた。腫瘍中央部、浸潤先端部の強度 (1, 2, 3) および浸潤先端部の強度 (2, 3) の腫瘍細胞に対する RUNX1 陽性は、OS (a、b、c、d、e) に関連していなかった。しかし、RUNX1 の陽性染色の基準として強度 3 を使用した場合、浸潤先端部の腫瘍細胞における RUNX1 陽性は OS と関連していた (P < 0.05) (f)。

図 3 扁平上皮細胞における RUNX1 発現。SIN1、SIN2、SIN3、浸潤先端部および腫瘍中心部の組織サンプルはヘマトキシリン-エオシン溶液 (a、b、c、g、h、i) または抗 RUNX1 抗体 (d、e、f、j、k、l) で染色した。RUNX1 陽性染色は腫瘍細胞の核において観察された (バー; 100  $\mu$ m)。

表 1 患者背景

項目	症例数	%
年齢 (歳)		
< 65	14	32.6
≥ 65	29	67.4
性別		
男性	22	51.2
女性	21	48.8
EOCG パフォーマンスステータス		
0	39	90.7
1	4	9.3
T 分類		
T1	28	65.1
T2	13	30.2
T3	1	2.3
T4	1	2.3
N 分類		
N0	41	95.3
N1	1	2.3
N2	1	2.3
臨床病期		
I	27	62.8
II	12	27.9
III	2	4.7
IV	2	4.7
術後リンパ節転移		
-	34	79.1
+	9	20.9
分化度		
高分化	28	65.1
中分化	11	25.6
低分化	4	9.3
浸潤様式 (Y-K 分類)		
Grade 2	9	20.9
Grade 3	27	62.8
Grade 4C	7	16.3
喫煙歴		
無	26	60.5
有	15	34.9
不明	2	4.7
飲酒歴		
無	23	53.5
有	18	41.9
不明	2	4.7

表 2 OSCC における RUNX1 発現と臨床病理学的因子の相関

(A)

腫瘍中央部 項目	症例数	Intensity 1, 2, 3 (%)	p 値	Intensity 2, 3 (%)	p 値	Intensity 3 (%)	p 値
年齢			p=0.8970		p=0.3060		p=0.5510
< 65	14	69.5±14.9		19.7±9.67		7.43±4.56	
≥ 65	29	70.1±14.5		23.1±10.7		8.88±6.05	
性別			p=0.0310*		p=0.5560		p=0.3690
男性	22	75.1±13.7		23.4±11.6		9.69±6.81	
女性	21	64.5±13.6		20.5±8.95		7.07±3.64	
パフォーマンスステータス			p=0.6759		p=0.8672		p=0.9334
0	39	69.7±14.3		21.9±9.58		8.20±5.17	
1	4	72.0±17.6		23.0±17.0		10.5±8.83	
T 分類			p>0.9999		p=0.0650		p=0.0650
T1, 2	41	69.9±14.8		22.5±10.5		8.66±5.67	
T3, 4	2	69.9±10.4		11.2±1.19		3.35±0.51	
N 分類			p=0.0690		p=0.5450		p=0.9540
N 0	41	69.0±14.3		22.2±10.6		8.46±5.77	
N 1, 2	2	88.7±3.26		16.8±4.90		7.49±1.15	
病期分類			p=0.5354		p=0.3168		p=0.0861
I, II	39	68.9±14.5		22.8±10.6		8.72±5.80	
III, IV	4	79.3±12.2		14.0±4.52		5.42±2.25	
術後リンパ節転移			p=0.1115		p=0.9378		p=0.6066
-	34	67.5±14.1		22.0±10.9		8.29±5.75	
+	9	79.0±13.0		21.9±8.96		8.89±5.22	
分化度			p<0.0001**		p=0.0053*		p=0.0006**
高分化	28	61.9±10.8		18.2±7.58		5.94±3.18	
中分化・低分化	15	84.8±7.27		29.1±11.4		13.0±6.33	
浸潤様式 (Y-K 分類)			p=0.3705		p=0.3407		p=0.0733
Grade1, 2	9	66.3±11.5		19.5±9.45		6.58±5.79	
Grade3, 4	34	70.8±15.2		22.6±10.7		8.90±5.51	
喫煙歴			p=0.4995		p=0.3523		p=0.4914
無	28	68.6±14.9		21.3±11.2		8.21±5.72	
有	15	72.3±13.8		23.2±8.95		8.79±5.50	
飲酒歴			p=0.4166		p=0.5464		p=0.4166
無	25	67.2±14.9		21.3±10.8		7.78±5.14	
有	18	73.6±13.4		22.9±10.1		9.28±6.18	

\* p< 0.05, \*\* p< 0.01 using the Chi-square test

## (B)

浸潤先端部 項目	症例数	Intensity 1, 2, 3 (%)	p 値	Intensity 2, 3 (%)	p 値	Intensity 3 (%)	p 値
年齢			p=0.4140		p=0.6500		p=0.5510
< 65	14	83.2±10.7		51.5±10.7		15.9±7.73	
≥ 65	29	85.8±10.8		53.4±15.7		17.8±9.83	
性別			p=0.6620		p=0.4090		p=0.9320
男性	22	84.5±10.5		50.9±15.5		17.2±9.59	
女性	21	85.4±11.1		54.7±12.6		17.1±8.85	
パフォーマンスステータス			p=0.2253		p=0.4903		p=0.8344
0	39	84.3±11.1		52.4±14.2		17.3±9.24	
1	4	91.2±4.51		55.9±14.9		15.8±9.16	
T 分類			p=0.6037		p=0.3870		p=0.0534
T1, 2	41	84.8±10.8		53.6±13.2		17.8±9.03	
T3, 4	2	88.6±9.90		36.5±23.6		5.10±3.20	
N 分類			p=0.4530		p=0.6650		p=0.1340
N0	41	84.7±11.0		52.6±14.5		16.6±9.12	
N1, 2	2	90.4±3.72		56.4±7.66		28.1±2.31	
病期分類			p=0.7029		p=0.3168		p=0.2834
I, II	39	84.5±11.0		53.4±13.4		17.2±8.92	
III, IV	4	89.5±7.53		46.4±20.1		16.6±11.9	
術後リンパ節転移			p=0.3491		p=0.9378		p=0.0394*
-	34	84.8±11.6		53.1±15.6		15.4±8.91	
+	9	85.5±6.87		51.3±7.02		23.9±7.16	
分化度			p=0.0787		p=0.1394		p=0.0378*
高分化	28	82.5±12.1		50.0±14.8		14.9±9.06	
中分化・低分化	15	89.6±5.57		57.8±11.6		21.5±7.94	
浸潤様式 (Y-K 分類)			p=0.3101		p=0.2154		p=0.0069*
Grade1, 2	9	80.7±14.5		45.3±19.2		10.4±9.16	
Grade3, 4	34	86.1±9.31		54.7±12.0		19.0±8.38	
喫煙歴			p=0.1141		p=0.1573		p=0.8986
無	28	86.5±10.7		54.0±15.7		17.0±9.52	
有	15	82.1±10.4		50.5±10.9		17.5±8.67	
飲酒歴			p=0.4166		p=0.2787		p=0.9216
無	25	85.9±10.6		54.4±13.0		17.1±8.78	
有	18	83.7±11.1		50.5±15.7		17.2±9.84	

\* p &lt; 0.05, \*\* p &lt; 0.01 using the Chi-square test

表 3 扁平上皮細胞、SIN および OSCC における RUNX1 の発現

RUNX1 Intensity	RUNX1 LI (%)					
	扁平上皮細胞	SIN 1	SIN 2	SIN 3	浸潤先端部	腫瘍中央部
RUNX1 Intensity 1	4.4±8.20	28.6±21.8	31.9±22.6	53.5±23.7	32.2±10.6	47.9±12.4
RUNX1 Intensity 2	0.2±0.42	3.3±3.24	1.9±2.49	6.0±4.04	35.6±11.3	13.6±5.74
RUNX1 Intensity 3	0±0	0.7±0.85	0.7±1.24	2.5±2.01	17.2±9.24	8.4±5.65
RUNX1 Intensity 2, 3	0.2±0.42	3.9±3.84	2.6±3.68	8.5±5.87	52.8±14.3	22.0±10.5
RUNX1 Intensity 1, 2, 3	4.6±8.31	32.5±23.4	34.6±24.6	62.0±26.5	84.9±10.8	69.9±14.6

表 4 全生存期間の単変量および多変量解析

変数	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95%CI	p-value	ハザード比	95%CI	p-value
年齢 ＜ 65 vs ≥ 65	0.922	0.168 – 5.053	p = 0.009**	0.491	0.072 – 3.325	p = 0.4658
性別 男性 vs 女性		–			–	
パフォーマンスステータス 0 vs 1		–			–	
T 分類 T3, 4 vs T1, 2	1.673	0.267 – 10.477	p = 0.5822		–	
N 分類 N 0 vs N 1, 2		–			–	
病期分類 I, II vs III, IV		–			–	
術後リンパ節転移 - vs +		–			–	
分化度 高分化 vs 中分化・低分化	0.787	0.487 – 47.081	p = 0.1794		–	
浸潤様式 (Y-K 分類) Grade3, 4 vs Grade1, 2	1.250	0.134 – 11.244	p = 0.8424		–	
喫煙歴 有 vs 無	1.554	0.235 – 9.478	p = 0.6325		–	
飲酒歴 有 vs 無		–			–	
腫瘍中央部での RUNX1 発現 (Intensity 3) High vs Low	2.501	1.915 – 77.630	p = 0.0081**	1.807	0.129 – 5.042	p = 0.8187
腫瘍中央部での RUNX1 発現 (Intensity 2, 3) High vs Low	7.743	1.271 – 47.176	p = 0.0264*	4.364	0.533 – 35.760	p = 0.1697
腫瘍中央部での RUNX1 発現 (Intensity 1, 2, 3) High vs Low	1.905	0.337 – 10.761	p = 0.4654		–	
浸潤先端部での RUNX1 発現 (Intensity 3) High vs Low	5.549	0.890 – 34.608	p = 0.0411*	6.022	0.845 – 42.943	p = 0.0732
浸潤先端部での RUNX1 発現 (Intensity 2, 3) High vs Low	3.931	0.653 – 23.669	p = 0.1350		–	
浸潤先端部での RUNX1 発現 (Intensity 1, 2, 3) High vs Low	2.343	0.344 – 15.944	p = 0.3841		–	

CI: Confidence Interval

\* p &lt; 0.05, \*\* p &lt; 0.01

図. 1

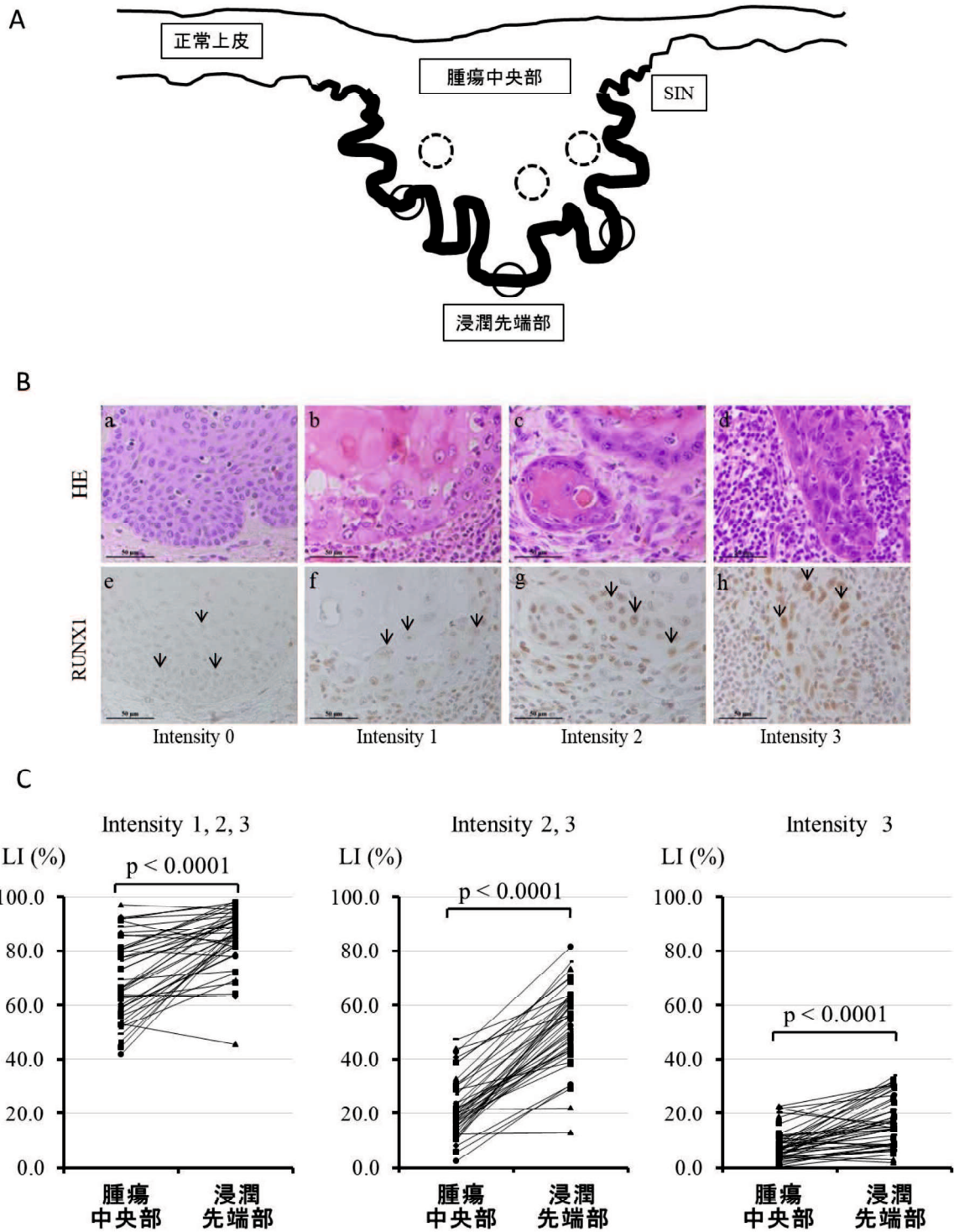


図. 2

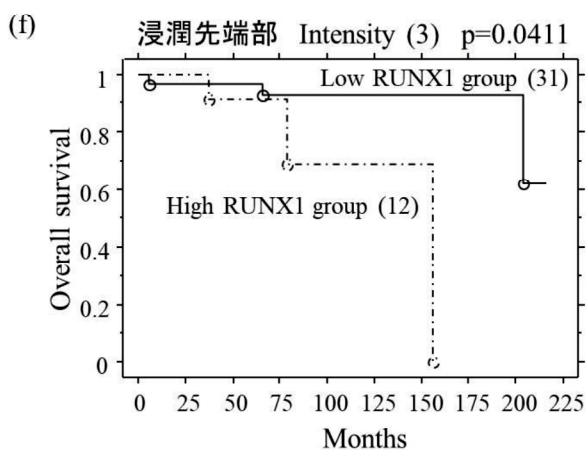
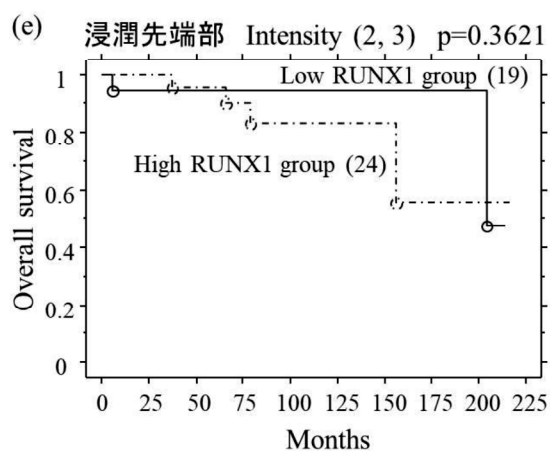
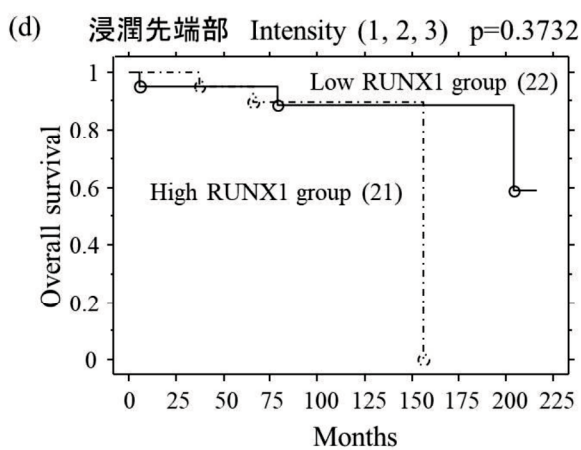
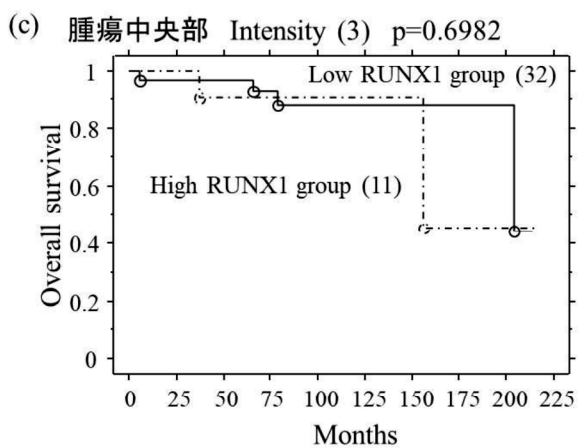
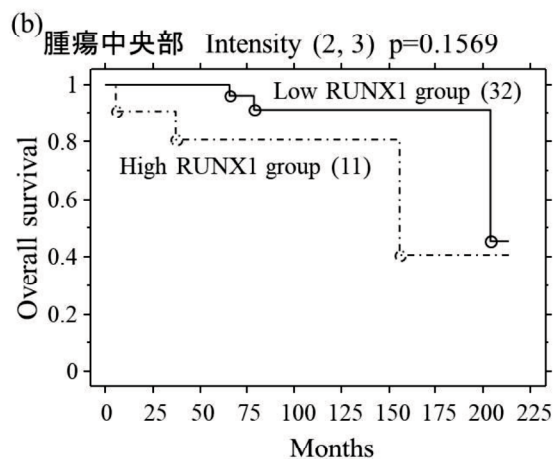
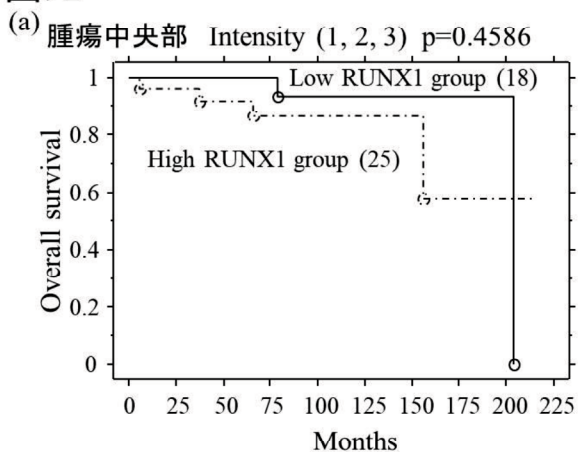




图. 3

