舌癌における p16, p21, cyclin D1 遺伝子産物の 発現の予後因子としての意義

高木 亮・片倉 朗・柴原孝彦・野間弘康

Cyclin D1, p16, and p21 gene product expression as a predictor of outcomes in tongue cancer

TAKAGI Ryo · KATAKURA Akira · SHIBAHARA Takahiko · NOMA Hiroyasu

Abstract: We evaluated the prognostic significance of the expression of p16, p21, and cyclin D1 in surgically resected squamous cell carcinomas (SCCs) of the tongue from 52 patients. Patients in this study underwent resection of SCC of the tongue in the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Dental College from February 1996 through March 2003. The study group comprised 35 men and 17 women, with an average age of 58.0 years. The average observation period was 2105 days. A high nodal metastasis grade (N) was associated with poor survival (log-rank test, N0/N2 $P = 0.0402$, N1/N2 $P = 0.0180$). We sliced sections and performed immunohistochemical staining for p16, p21, and cyclin D1. Specimens with at least one positively stained field were judged to be positive, and positivity was classified into three levels on the basis of expression. In resected tumors, the nucleus positive rates of p16, p21, and cyclin D1 were 32.7 % (17/52), 90.4 % (47/52), and 76.9 % (40/52), respectively. pN factor was significantly related to outcomes on Cox proportional-hazards multivariate regression analysis ($P = 0.006$). Survival in patients with cyclin D1 overexpression (cyclin D1 (+++)) was poorer than that in cyclin D1-negative patients (log-rank test, $P = 0.0415$). There was no significant relation between p16 or p21 expression and outcomes. These results suggest that N factor is a significant prognostic factor in patients with SCCs. In addition, overexpression of cyclin D1 may be related to outcomes.

Key words: p16 (p16), p21 (p21), cyclin D1 (サイクリン D1), prognosis (予後), tongue squamous cell carcinoma (舌扁平上皮癌)

緒 言

従来より口腔癌の臨床的な転帰と予後を予測する因子として、腫瘍の stage やリンパ節転移、分化度、浸潤様式などが利用されてきた¹⁾。しかし実際の臨床においては、stage I 症例においても再発や所属リンパ節に後発転移をきたし予後不良の転帰をみることがある。そこで、口腔癌における診断と診療方針における指標として有用な、バイオマーカーの検索を目的とし、中でも腫瘍細胞の増殖に最も重要な G₁/S 期進行を制御するタンパク群に着目して本研究を行った。

食道癌では、cyclin D1 の過剰発現は、低い生存率と相関

したという報告がある²⁾。また、肺非小細胞癌では、p16 と cyclin D1 の発現を組み合わせると予後との関係を検討した時、より明確に良好な予後を示したという報告がある³⁾。これらの報告を受け、口腔癌においてもこれらの cyclin や cyclin-dependent kinases inhibitor (CDK-inhibitor) の発現の有無が、口腔癌の予後の予測におけるバイオマーカーとしても有用となり得るのではないかと考えられる。

頭頸部癌では、S 期を開始させる cyclin D1 と、これに抑制的に働く RB/E2F 経路に属する p16 および、p53 経路に属する p21 のそれぞれのタンパク発現が予後を左右する因子として重要であるという報告がある^{2, 4, 5)}。しかしその反面で、それらすべてのタンパクが相関をしているわけではないといった報告もあり⁶⁾、一定の見解を得るには至っていない。

そこで、p16, p21, cyclin D1 の発現と予後の関連性を検討するため、東京歯科大学千葉病院口腔外科で治療を行った舌扁平上皮癌症例 52 例に対して、それらを免疫組織学

東京歯科大学口腔外科学講座

(主任：柴原孝彦教授)

Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Dental College (Chief:
Prof. SHIBAHARA Takahiko)

受付日：2005 年 7 月 13 日

採択日：2010 年 4 月 27 日

表1 臨床検体内訳

		症例数	5年生存率	p値
性別	男性	35	88.6	0.255
	女性	17	76.5	
年齢	<65	35	80.0	0.256
	65<	17	94.1	
病理組織学的分化度	高分化型	35	82.9	0.829
	中分化型	9	88.9	
	低分化型	8	87.5	
T	T1	10	87.5	0.894
	T2	23	83.0	
	T3	15	75.2	
	T4	4	66.7	
臨床的リンパ節 (cN)	N0	21	90.5	0.019
	N1	18	94.4	
	N2 (a, b, c)	13	61.5	
	N3	0		
病理学的リンパ節 (pN)	頸部郭清未施行	20	95.0	0.005
	転移無し	18	88.9	
	転移有り	14	57.1	
生存	死亡	8		
	生存	44		

的に観察し、その臨床病理学的指標との関連性を含めて検討を行った。

材料および方法

1. 対象

1996年2月から2003年3月までの間に東京歯科大学千葉病院口腔外科で舌扁平上皮癌と診断された症例のうち、本研究の主旨に同意が得られた患者で、さらに死亡例以外では経過観察期間が最低1年以上経過している症例を対象とした。生検時および手術時に採集した癌組織52検体を用いた(表1)。対象症例の性別は男性35名、女性17名であり、平均年齢は58.0歳(最高年齢90.8歳、最少年齢24.5歳)であった。観察期間は、手術日から本研究の調査を行った時点での最終来院日までとして、最短96日、最長4815日(平均2105日)であった。

組織学的分化度は高分化型35例、中分化型9例、低分化型8例であった。TNM分類はT分類ではT1; 10例、T2; 23例、T3; 15例、T4; 4例。N分類では、N0; 21例、N1; 18例、N2a; 5例、N2b; 6例、N2c; 2例であった。N3症例は存在しなかった。また、すべての症例がM0であった。stageでは、stage I; 6例、stage II; 11

例、stage III; 21例、stage IV; 14例であった。

頸部リンパ節郭清術を行った症例は52例中32例であった。そのうち、手術標本の病理組織学的検査で所属リンパ節に転移を認めた症例(pN(+))は、32例中14例であった。すべての症例において、後発リンパ節転移は認めなかった。

2. 免疫組織化学染色

検体は10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、パラフィン包埋された組織を用い、4 μ mのパラフィン薄切切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。すなわち、脱パラフィン、内因性ペルオキシダーゼ阻止の後に、p21, cyclin D1はmicrowaveで10分間抗原賦活化処理を行い、染色にはENVISIONキット/HRP(DAB)(Dako Cytomation)を用いた。一次抗体としてマウス抗ヒトp21モノクローナル抗体(クローン6B6, Becton Dickinson; 1:50希釈)、マウス抗ヒトcyclin D1モノクローナル抗体(クローンG124-326; 1:50希釈)(表2)を4℃で16時間反応させた後に、Envisionポリマー試薬を室温で30分間反応させた。DAB(3,3'-diaminobenzidine · 4HCL)で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色後、脱水、透徹、封入して検鏡した。またp16は、p16^{INK4a} Research Kit (Dako

表2 抗体・条件

抗 体	カタログNo.	クローン	希釈倍率	抗原賦活化
p16INK4a Research kit (DAKO)	OA315	E6H4	1 : 200	95-99°C 30min
Mouse anti-human p21 monoclonal antibody (BD Pharmingen)	554228	6B6	1 : 50	Microwave 10min 2回
Mouse anti-human cyclin D1 monoclonal antibody (BD Pharmingen)	554180	G124-326	1 : 50	Microwave 10min 2回

Cytomation) を用いた。抗原の賦活化処理には付属の Epitope Retrieval Solution を用い、95 °C 30 分間熱処理した。DAB 発色の後は、p21, cyclin D1 と同様の手順で行った。

それぞれの抗体における陰性コントロールとして、一次抗体の代わりに PBS を用いた。陽性コントロールは抗体使用の指示に従い、cyclin D1 は正常扁桃、p16 は正常脾臓、p21 は正常大腸の組織を用いた。

標本の判定は 1 名の検鏡者が以下の基準で行った。200 倍の倍率で、1 検体につき、5 視野以上で測定を行い、標本中に陽性所見を認めない症例を陰性、標本中の 1 視野以上で陽性所見を認めるものを陽性とした。陽性症例のうち、さらに、標本中の 1 視野以上で 1 から数個に散在性に陽性所見を呈する症例を (+)、1 胞巣単位以上で、標本の約 50 % 未満の細胞に陽性所見を呈する症例を (++)、標本中の 50 % 以上の細胞に陽性所見を呈する症例を (+++) と判定した。

3. 統計処理

統計処理は Dr. SPSS II 統計解析ソフトウェア (SPSS 株式会社, 東京) を用いた。臨床検体の Kaplan-Meier 法による生存率分析には log-rank 解析を用いた。また、各タンパクの発現、臨床的所見と転帰との関係の分析には Cox 比例ハザード解析を用いた。

結 果

1. 臨床病理学的検討

臨床病理学的指標と生存率との関係を検討したところ、log-rank 検定において性別、組織学的分化度、初診時の原発腫瘍の大きさ (T), stage に有意な差を認めなかった。

しかしながら、N 分類において N0 と N2 との間 ($P = 0.0402$)、N1 と N2 との間 ($P = 0.0180$) に有意差を認め、高い N 因子を示す症例は予後不良であった (図 1-1 左)。

頸部郭清術を行ったが pN (+) であった症例の群 (pN (+) 群) と、pN (-) であった症例 (pN (-) 群)、およ

び術前診断で N0 と診断し頸部郭清術を行わなかった症例 (非頸部郭清群) の 3 群間の比較では、pN (+) 群は他の 2 群に比較して、有意に予後不良であった (pN (+) 群対非頸部郭清群 $P = 0.0183$, pN (+) 群対 pN (-) 群 $P = 0.0099$) (図 1-1 右)。また、全 52 症例を pN (+) 群と、pN (-) 群および非頸部郭清群 (pN (-) + 非頸部郭清群) の 2 群に分類して生存率との関係を検討したところ、後者が有意に良好であった ($P = 0.0010$) (図 1-2)。このように、生存率とリンパ節の状態が最も強く関係していた。

2. 免疫染色による検討

2-1) cyclin D1

cyclin D1 は核および細胞質内に陽性所見が認められた。細胞質で陽性であった症例は 13 例 (25.0 %) であり、そのほとんどが (12 例 92.3 %) 核にも発現していた。

細胞質の発現強度では (+) が 11 例、(+++) が 2 例であり、強い発現を示す細胞の割合は少なかった。

細胞質における発現と生存率との関係については、log-rank 検定において発現の有無と生存率との比較を行ったが、有意な差は認めなかった ($P = 0.3607$)。同様に発現強度別に検討したが明らかな差は認めなかった。

核における cyclin D1 陽性は 40 例 (76.9 %) であり、強度による内訳は、(+) が 15 例、(+++) が 20 例、(++++) が 5 例であった。

核の cyclin D1 発現と生存率をみると、発現の有無では有意な差を認めなかったものの (図 2 右)、発現の強度別に分類したとき、(-) 症例の予後が (++++) 症例の予後よりも有意に良好だった ($P = 0.0415$) (図 2 左)。

2-2) p16

p16 では、核および細胞質内に陽性所見が認められた。

細胞質における p16 の陽性率は 52 例中 9 例 (17.3 %) であった。細胞質陽性の症例はすべて核にも発現が認められた。

発現の強度では陽性細胞 9 例全例が (+) であり、弱い発現にとどまった。

核では、陽性は 52 例中 17 例 (32.7 %) であった。強度

図 1-1 生存率

図 1-2 生存率

有意な差は認めず（細胞質 P = 0.6515, 核 P = 0.5831）, 強度別においても同様に差はなかった。

2-3) p21

p21 は, 細胞の核にのみ陽性所見が認められ, 細胞質には認められなかった。陽性は 47 例 (90.4 %) であり, そのうち (+) が 18 例, (++) が 25 例, (+++) が 4 例であった。

発現の有無と生存率との間に差は認めなかった (P = 0.3406)。発現の強度とも関連はなかった。

2-4) p16 と cyclin D1 の発現の組み合わせ

核における p16 と cyclin D1 の発現を組み合わせで判定することにより, 予後を予測することが可能であると報告されている³⁾。そこで我々も, 同様に検討を行った。発現強度別にみた時に, 核の p16 が陰性で cyclin D1 が陽性の症例は予後不良の傾向がみられたが, 有意な差は認められなかった (P = 0.0679)。また, 発現の有無でも有意な差は認められなかった。

2-5) 臨床病理学的指標と免疫組織学的発現

p16, p21, cyclin D1 の細胞核の強度別の発現および, 性別, 組織学的分化度, T 因子, N 因子のうち特に pN (+) 群, pN (-) 群 + 非頸部郭清群の 2 群と, 転帰との関係を Cox 比例ハザード解析で多変量解析を行ったところ pN 因子について有意差を認めた (P = 0.006) (表 3)。また組織学的分化度, cyclin D1 において有意差は認めなかったが関

による内訳は, (+) が 10 例, (++) が 3 例, (+++) が 4 例であった。

細胞質および核ともに, 発現の有無と生存率との間に,

図2 生存率

表3 Cox比例ハザード解析

	多変量解析		単変量解析	
	P	ハザード比 (95%信頼区間)	P	ハザード比 (95%信頼区間)
性別	0.261	0.423 (0.094-1.897)	0.267	0.456 (0.114-1.826)
組織学的分化度	0.059	0.259 (0.064-1.052)	0.592	0.754 (0.268-2.118)
T	0.114	3.881 (0.721-20.893)	0.426	1.372 (0.630-2.989)
pN (+) / p (-) および非頸部郭清群	0.006	22.917 (2.436-215.567)	0.007	9.094 (1.834-45.099)
p16核 (-) ~ (+++)	0.973	1.017 (0.376-2.752)	0.810	0.908 (0.412-1.999)
p21核 (-) ~ (+++)	0.999	0.999 (0.267-3.734)	0.738	1.162 (0.481-2.811)
cyclin D1核 (-) ~ (+++)	0.059	3.868 (0.951-15.723)	0.154	1.767 (0.809-3.862)

連する傾向がみられた (ともに $P = 0.059$). それぞれ Cox 比例ハザード解析で単変量解析を行ったところ, 組織学的分化度, cyclin D1 は有意差は認めなかったが, pN 因子で

は有意に pN (+) 症例が低い生存率を示した ($P = 0.007$).

写真1 p16 染色像

腫瘍細胞の核内および細胞質内に、発現を認める (×200).

写真3 cyclin D1 染色像

腫瘍細胞の核内および細胞質内に、発現を認める (×200).

写真2 p21 染色像

腫瘍細胞の核内にのみ発現を認める (×200).

考 察

1. 臨床病理学的因子について

臨床病理学的因子は、予後を左右する大きな因子である¹⁾. ドイツ、オーストリア、スイスの三国共同の口腔腫瘍調査 DÖSAK (German-Austrian-Swiss Cooperative Group on

tumours of the maxillofacial region) では、1000 例をこえる口腔癌の後ろ向き調査において、T 因子、浸潤度、分化度、原発腫瘍の部位、所属リンパ節の固着性、年齢、遠隔転移の 7 因子が予後と関係があり、中でも T、N 因子が特に重要であると報告されている^{7, 8)}. 今回の検討では、pN 因子において非常に強い生存率との関連性が認められ、N 因子の重要性を再度確認できた.

2. cyclin D1 の発現について

cyclin D1 は G₁ 期に核内に一時的に発現し、主に cyclin dependent kinase 4 や 6 (それぞれ CDK4 と CDK6) と結合する⁹⁾. cyclin D1 と CDK4 の複合体は、網膜芽腫遺伝因子産物 (pRB) をリン酸化し¹⁰⁾, pRB と E2F の解離を促し¹¹⁾, DNA の複製を開始する. cyclin D1 の発現や cyclin D1 遺伝子の増幅は頭頸部癌などで高頻度に認められており⁴⁾, 予後や生存率と相関していたという報告を認める^{2, 12)}.

今回の検討においても、細胞核における cyclin D1 が強発現している症例は発現を認めない症例と比較して有意な差を持って予後不良であった. 多変量解析、単変量解析では有意な差を認めなかったことから、強力な予後予測因子と断定することは難しいが、今後も症例数を増やして検討する必要があると考えられた.

正常な細胞では、G₁ 期に核内に蓄積された cyclin D1 は、S 期に glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) により threonine 286 のリン酸化修飾を受けて、細胞質へ移行

し^{13, 14)}, ユビキチン化により分解される。本研究では, cyclin D1 を細胞質には 25.9 % の症例で, 細胞核内には 77.8 % の症例で発現を認めた。また, 細胞質に発現を認めた症例のほとんどで (92.9 %) 核にも発現を認めた。腫瘍細胞での cyclin D1 の細胞内の局在について, Jin らはいくつかの肺癌細胞株で核膜に沿って cyclin D1 の発現を認めたと報告し, 過剰な cyclin D1 は細胞質内で蓄えられ, 核内で消費された分を細胞質内から輸送し補給するのではないかと論じている³⁾。しかし今回の検討では, 核膜に沿って集積しているような像は観察できなかった。細胞質に陽性の症例は写真 3 のように, 周囲の多くの細胞で同時に染色されており, これらの細胞がすべて S 期にあるとは考えにくく, 過剰に合成された cyclin D1 タンパクが核内へ移行せずにとどまっているものなのか, 細胞質へ分解のために移行したものなのか判定する必要があると思われる。細胞質内での発現と予後との関連性を認めなかったことから, 細胞質内の cyclin D1 の機能やその動態については, 細胞周期を含めて検討の余地がある。

3. p16 の発現について

p16 は, G₁/S 期進行を制御する大きな経路である RB/E2F 経路および p53 経路のうち, RB/E2F 経路に属している。RB/E2F 経路に何らかの異常を発現する頻度はヒトの癌の場合 80 % 以上にのぼると言われており^{15, 16)}, 特に肺癌や食道癌ではほぼ 100 % この経路に異常が見られると報告されている¹⁷⁾。RB/E2F 経路で p16 は, cyclin D1-CDK4 および cyclin D1-CDK6 の活性を抑制しており CDK4, CDK6 と結合し, cyclin を分離させることにより pRB のリン酸化を抑制し, 細胞周期の進行を阻止する^{18, 19)}。p16 の発現の減弱はやはり, 多くの癌において認められており, 予後予測因子の一つとしての可能性が示唆されている^{20, 21)}。しかし, 反対に乳癌においては, むしろ強発現が予後不良であったという報告もある²²⁾。p16 遺伝子は染色体 9p21 領域に存在し, 頭頸部扁平上皮癌で, 減弱・欠失と予後との関連⁴⁾ また, 喉頭癌で 9p21 領域のヘテロ接合性の消失と局所浸潤, リンパ節転移との関連性²³⁾ が報告されている。しかし, 今回の検討において p16 の細胞核における発現を観察したところ, 生存率との関係に有意な差は認めなかった。

また, 細胞質に p16 の発現を認めた症例は 18.0 % あり, そのすべての症例で核にも発現を認めた。本研究から, 細胞質に発現した p16 は舌扁平上皮癌の予後に関連する因子ではないと考えられた。

4. p21 の発現について

p53 経路は G₁/S チェックポイントにおいて抑制的な働

きを示し, p53 遺伝子の変異の頻度はヒト癌の 50 % に及ぶと言われている²⁴⁾。さらに, 口腔癌では p53 遺伝子の変異と予後の関連や²⁵⁾, 発現過程における p53 遺伝子の変異の増加^{26, 27)} など多数報告されている。p53 の下流に位置する p21 は CDK2, CDK4, CDK6 に結合することで, CDK の活性阻害を引き起こして G₁ 期停止が起こるといわれる²⁸⁾。また, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) にも結合して増殖を抑制する。口腔癌において p21 発現と予後との相関についての報告があるが⁵⁾, 今回の検討では, 関連性は見出せなかった。理由として, ほとんどの症例で (52 例中 47 例 90.4 %) 発現がみられたためと思われる。その発現強度からもクラス分けを試みたものの, 意義のある結果を導き出すことはできなかった。

p21 の機能の一つとして, GSK-3beta による cyclin D1 のリン酸化の抑制とそれによる cyclin D1 の核への集積がある²⁹⁾。しかし, 本研究においては p21 の発現と cyclin D1 の局在との間にも関連性は見出せなかった。本来, 細胞周期を抑制的に制御している p21 が, 細胞増殖に関与する cyclin D1 の核への集積を促進する働きを持っているということは非常に興味深く, これらのタンパクが他の働きを担っている可能性もあると考えられる。しかし, 本研究では p21 は舌扁平上皮癌の予後推定因子としてはそれ単独では, 未だ不十分と考えられる。

結 語

東京歯科大学口腔外科で 1996 年 2 月から 2003 年 3 月までの間に外科的切除術を行った舌扁平上皮癌 52 症例に対して p16, p21, cyclin D1 の発現を免疫組織学的に観察し, その予後とあわせて検討したところ以下の結論を得た。

- 1) N 因子は強い予後因子であった。
- 2) 核における p16, p21, cyclin D1 の陽性率は 52 例中 17 例 (32.7 %), 47 例 (90.4 %), 40 例 (76.9 %) であった。
- 3) Log-rank 検定で細胞核に cyclin D1 が強く発現している症例は低い生存率を示したが, 単変量解析では有意差は認めなかった。
- 4) 細胞質における p16, cyclin D1 陽性率は 52 例中 9 例 (17.3 %), 13 例 (25.0 %) であり, p21 は発現を認めなかった。また, いずれも予後との相関を認めなかった。
- 5) 細胞核における p16, p21 の発現は, 舌扁平上皮癌の予後と相関しなかった。
- 6) 細胞核における cyclin D1 発現は舌癌の予後と関連している可能性が示唆されたが, p16, p21 は関連性はないと思われる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究にご協力をいただいた（株）メディオス松本武夫氏、北海道大学大学院地球環境科学研究科生態環境科学専攻環境情報医学講座の皆様にご心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Spiro, R.H. and Strong, E.W.: Surgical treatment of cancer of the tongue. *Surg Clin North Am* 54: 759-765 1974.
- 2) Mathew, R., Arora, S., et al.: Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 38: 832-841 2002.
- 3) Jin, M., Inoue, S., et al.: Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer* 34: 207-218 2001.
- 4) Namazie, A., Alavi, S., et al.: Cyclin D1 amplification and p16 (MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 112: 472-481 2002.
- 5) Xie, X., Clausen, O.P., et al.: Prognostic significance of p21WAF1/CIP1 expression in tongue squamous cell carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128: 897-902 2002.
- 6) Shimada, Y., Imamura, M., et al.: Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 80: 1281-1288 1999.
- 7) Howaldt, H.P., Kainz, M., et al.: Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DÖSAK. J Craniomaxillofac Surg* 27: 275-288 1999.
- 8) Platz, H., Fries, R., et al.: The prognostic relevance of various factors at the time of the first admission of the patient. Retrospective DÖSAK study on carcinoma of the oral cavity. *J Maxillofac Surg* 11: 3-12 1983.
- 9) Pines, J.: Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Soc Trans* 21: 921-925 1993.
- 10) Sherr, C.J.: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059-1065 1993.
- 11) Sherr, C.J.: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551-555 1994.
- 12) Michalides, R., van Veelen, N., et al.: Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 55: 975-978 1995.
- 13) Diehl, J.A., Cheng, M., et al.: Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Pathol Int* 48: 850-856 1998.
- 14) Alt, J.R., Cleveland, J.L., et al.: Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 14: 3102-3114 2000.
- 15) Kamb, A.: Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 11: 136-140 1995.
- 16) Hall, M. and Peters, G.: Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68: 67-108 1996.
- 17) Sherr, C.J.: Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677 1996.
- 18) Serrano, M., Hannon, G.J., et al.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707 1993.
- 19) Kamb, A., Gruis, N.A., et al.: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440 1994.
- 20) Shintani, S., Mihara, M., et al.: Infrequent alterations of RB pathway (Rb-p16INK4A-cyclinD1) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Anticancer Res* 20: 2169-2175 2000.
- 21) Takeuchi, H., Ozawa, S., et al.: Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 3: 2229-2236 1997.
- 22) Dublin, E.A., Patel, N.K., et al.: Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. *Int J Cancer* 79: 71-75 1998.
- 23) Jares, P., Fernandez, P.L., et al.: p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* 15: 1445-1453 1997.
- 24) Hollstein, M., Sidransky, D., et al.: p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53 1991.
- 25) Yamazaki, Y., Chiba, I., et al.: Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39: 163-169 2003.
- 26) Kusama, K., Okutsu, S., et al.: p53 gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Pathol* 178: 415-421 1996.
- 27) Girod, S.C., Kramer, C., et al.: p53 expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. *J Cell Biochem* 56: 444-448 1994.
- 28) El-Deiry, W.S., Tokino, T., et al.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825 1993.
- 29) Alt, J.R., Gladden, A.B., et al.: p21 (Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem* 277: 8517-8523 2002.