高解像度融解曲線分析による口腔癌患者末梢血清中における 腫瘍由来ミトコンドリア DNA の解析

鶴澤 一弘・大和地正信・笠松厚志・坂本洋右
小河原克訓・椎葉正史・丹沢秀樹

Screening for circulating tumor-related mitochondrial DNA in the serum of patients with oral cancer by high-resolution melting curve analysis

UZAWA Katsuhiko · YAMATOJI Masanobu · KASAMATSU Atsushi
SAKAMOTO Yosuke · OGAWARA Katsunori
SHIIBA Masashi · TANZAWA Hideki

Abstract: Although the status of surgical margins and regional lymph node metastases are relevant prognostic factors in oral squamous cell carcinoma (OSCC), local recurrences, distant metastases (r/m), or both have occurred in a subset of OSCC patients with histologically negative margins/lymph nodes.

The principle objective of our study was to assess the possible monitoring of such OSCC cases by quantitative real-time PCR combined with high-resolution melting curve analysis (qPCR-HRMA) for circulating free mitochondrial DNA (mtDNA), which has copy numbers hundreds to thousands times higher than those of genomic DNA (gDNA) in each cell. mtDNA from normal and tumorous tissues and serum mtDNA obtained at two time points (pre-surgery, and 4 weeks post-surgery) from 43 patients (34 r/m-negative cases and 9 r/m-positive cases) were examined for the D-loop region at position 68 of human mtDNA genome. On qPCR-HRMA, we found that mutant mtDNA was identified in the samples from tumorous tissues at much higher concentrations than in samples from corresponding normal tissues. Furthermore, 67 % of r/m-positive cases showed higher amounts of mtDNA (> 50 %) in their tumor tissues as compared with the r/m-negative group. On blood tests, all serum mtDNA samples obtained 4 weeks after surgery in r/m-positive cases, except for one case, maintained high amounts of mutant mtDNA.

In conclusion, tumor-specific mitochondrial mutations in the sera of OSCC patients can be successfully identified using qPCR-HRMA, and this technique has potential application for the surveillance of patients after tumor resection.

Key words: circulating tumor-related DNA (末梢循環腫瘍由来 DNA), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), mitochondrial DNA (ミトコンドリア DNA), high-resolution melting curve analysis (高解像度融解曲線分析)

緒 言

原発巣切除断端の病理組織学的評価は、口腔扁平上皮癌患者の予後予測に重要である。しかし、断端陰性と診断されながら再発や転移をみる症例がわずかではあるが存在する。これについて 1953 年には Slaughter らが原発巣周囲に

‘変異領域’が存在し、それが原因となっていることを提唱している¹⁾。しかし、現行の腫瘍マーカー（たとえば血中 SCC 抗原）では、必ずしも早期にその兆候を把握することはできない。

近年、分子生物学的手法を用いて癌細胞が循環血液中に存在することを証明し、微小転移を予測し予後診断に役立てようという試みがなされてきた^{2~4)}。しかし、血清中の遊離核酸 (circulating nucleic acids: 以下 CNAs) はその検出効率に限界があるために、複数回の検査には不向きである。そこで本研究では、手術断端陰性と診断された症例について、末梢血中の癌由来遊離 DNA を検出するため、ミ

千葉大学医学部附属病院歯科・顎・口腔外科

(主任：丹沢秀樹教授)

Division of Dentistry and Oral-Maxillofacial Surgery, Chiba University Hospital (Chief: Prof. TANZAWA Hideki)

受付日：2010 年 6 月 14 日

採択日：2010 年 10 月 26 日

表1 対象症例の臨床諸指標

臨床指標	r/m (－)	r/m (＋)
対象症例数	34	9
手術時平均年齢 (年齢幅)	55.9 (27～83)	63.1 (53～84)
性別		
男	24	5
女	10	4
病期分類 (UICC, 2002)		
I	1	0
II	2	2
III	11	2
IVa	17	5
IVb	3	0
IVc	0	0
組織分化度		
高分化型	23	6
中等度分化型	11	3
低分化型	0	0
転帰 (死亡者数)	0	4
SCC抗原値* (1.5ng/ml以下)	1.09 (0～3.2)	0.84 (0～1.4)

* 術後4週間における平均値 (ng/ml, 最低値～最高値)

トコンドリア DNA (細胞内に核酸 DNA の数百～数千倍のコピー数がある, mitochondrial DNA: 以下 mtDNA) をターゲットとし, かつ, その検出感度および特異性を上げる目的で近年開発された高解像度融解曲線分析法 (high resolution melting curve analysis: 以下 HRMA) を用い分子生物学的に検討した.

方 法

1. 対象

研究対象は, 2003 年 1 月から 2007 年 3 月までに千葉大学医学部附属病院歯科・顎・口腔外科において外科的切除を受けた術前治療歴のない口腔扁平上皮癌一次症例で, 術前に遠隔転移を認めず, かつ既往歴に自己免疫疾患がない 43 症例であった. すべての対象は病理組織検査において, 原発巣手術切除断端が陰性で頸部リンパ節転移がないと判定された. このうち術後経過良好例 (recurrence/metastasis (－), 以下 r/m (－) と表記する) が 34 例, 術後 15 週間以内に再発・転移をみた症例 (recurrence/metastasis (＋), 以下 r/m (＋) と表記する) が 9 例であった (表 1). また, 術後 4 週間における血中 SCC 抗原値の平均値は両群とも 1.5ng/ml 以下であったが (表 1), r/m (－) 群の 5 症例は基準値を上回っていた.

本研究は千葉大学生命倫理委員会から承認を受け, 全患者ならびにその家族からインフォームドコンセントを得た.

手術試料において外科的切除に採取した癌部組織・非癌部組織 (正常口腔粘膜組織) をそれぞれ 2 つに分け, 一方は液体窒素下にて凍結保存し, 他方は本院病理部による病理組織診断のため 20 % フォルマリン液で固定した.

血清試料は, 術前および術後 4 週目で採取した末梢血約 5ml を 4 °C で静置後, 遠心分離し (8,000 × g, 15 分, 4 °C), 解析に使用するまで -80 °C で凍結保存した.

2. 培養細胞

対象のヒト口腔癌由来細胞株は, 和歌山県立医科大学歯科口腔外科学講座 (藤田茂之教授) より供与された Sa3 細胞株であった. コントロールには, 当科にて分離したヒト正常口腔粘膜上皮角化細胞 (以下: HNOKs) を用いた. HNOKs は手術時に採取した正常歯肉組織を Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS, SIGMA-ALDRICH 社製) で洗浄し細切した後, 0.25 % Trypsin-EDTA 溶液 (SIGMA-ALDRICH 社製) に浸し, 37 °C・5 % CO₂ インキュベーター (Thermo Fisher Scientific 社製) 中に 4 時間静置した. その後, 1,000 × g で 5 分間遠心分離し, 沈殿物に Oral Keratinocyte Medium (ScienCell 社製) を加え, スミロンセルタイト C-1 シャーレ (住友ベークライト社製) を用い, 上記インキュベーターで培養した.

3. DNA の抽出・調整

血清中ならびに培養細胞のゲノム DNA (以下, gDNA) は, QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて, また対象組織検体からは mtDNA Extracor CT Kit (Wako 社製) によって抽出・精製した. 血清 mtDNA は, QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出・精製した. 精製 DNA の定量は分光高度計 NanoDrop (Laboratory & Medical Supplies 社製) により測定し, 解析に使用するまで -80 °C で保存した.

4. ヒトミトコンドリア D ループ領域の塩基配列解析

HNOKs ならびに Sa3 細胞株におけるヒトミトコンドリアゲノムの全 D ループ領域の塩基配列を以下の条件のもとで決定した. PCR に用いたプライマーは, Forward; 5'-CTCCACCATTAGCACCCAAAG-3' (np 15,975-15,995), Reverse; 5'-GTGATGTGAGCCCGTCTAAAC-3' (np 637-617) であった. PCR 反応は HNOKs のミトコンドリア DNA 100ng を鋳型とし, プライマー 20pmol, 10mM Tris-HCL (pH8.4), 50mM KCl, 3.0mM MgCl₂, 2mM dNTP, TaKaRa Ex Taq (0.5 ユニット; タカラバイオ社製) を含み, 最終量 50 μl の反応液を調整した. PCR は, DNA サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社製) により 95 °C で 5 分間反応させた後, 95 °C で 10 秒変性, 55 °C で 30 秒アニーリン

図1 血清中 DNA 量の比較
血清中のミトコンドリア DNA (mtDNA) 量は、核酸 DNA (gDNA) 量にくらべて有意に多く検出された。

グ、72℃で1分伸長を1サイクルとしこれを30サイクル行った。PCR産物を1.5%アガロースゲル電気泳動にて確認し、目的バンドをMinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて精製・抽出した。精製されたPCR産物をTOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いてサブクローニングし、QIAprep Spin MiniPrep Kit (QIAGEN社製)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列は、ジデオキシヌクレオチドを蛍光標識したDye Terminator法によって決定された。得られたデータは、MITOMAP (www.mitomap.org/MITOMAP/HumanMitoSeq)と比較・照合した。

5. qPCR-HRMA

ヒトミトコンドリアゲノムDループ領域に対する最適なqPCR-HRMAを施すため、以下のプライマーを設計し、LightCycler 480 System (Roche Diagnostics社製)を用いてHNOKsおよびSa3細胞株における塩基配列の変異を解析した。プライマー配列は、Forward; 5'-GCTCTCCATGCA TTTGGT-3' (np 38-55), Reverse; 5'-ACACTTTAGTAAGTA TGTTCGCC-3' (np 206-184)であった。PCR反応溶液の組成は、テンプレートmtDNAを10ng用い、1×LightCycler 480 Probe Master Mix (Roche Diagnostics社製)、4μMのプライマー、3mMのMgCl₂とし、96ウェルのLightCycler 480プレート (Roche Diagnostics社製)で反応させた。すべての反応は2度行った。PCR条件は95℃5分、95℃10秒・60℃20秒・72℃10秒を40サイクル、HRMAのステップとして95℃1分、40℃1分、65℃5秒の後、95℃へ向かって1℃につき25回連続して蛍光を取得した。

qPCR-HRMAによって細胞株における塩基配列の変異が

示唆された部位を、上記と同様にPCRにて増幅し、精製・抽出し、PCR産物をpCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いたクローニングし、上記と同様にDye Terminator法によって塩基配列を決定した。

臨床検体における変異mtDNA量を解析するため、検量線を作成した。Sa3細胞株から得られたmtDNAを100%変異mtDNAとし、これをHNOKsのmtDNAで75%、50%、25%と段階希釈したものを調整し、HRMAにて融解曲線を描出した。術前・術後4週間の血清および癌部組織・非癌部組織 (正常口腔粘膜組織) から抽出したmtDNAの融解曲線を検量線と比較することで、検索対象のmtDNA中の変異mtDNA量 (それぞれ0~25%、25~50%、50~75%、75~100%) を計測した。

6. 統計解析

本研究における統計学的有意差検定は、Mann-WhitneyのU検定にて統計処理し、危険率5%未満 (以下、 $p < 0.05$) を有意差ありと判定した。

結 果

1. 血清遊離DNA量

全対象患者43例の術前の血液中に含まれる遊離gDNAおよびmtDNA量を分光光度計で測定した。mtDNA濃度は $3576.5 \pm 710.9 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった一方、gDNA濃度は $17.0 \pm 6.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であり有意差を認めた (図1)。このことは、血清からmtDNAは少なくともgDNAの約120倍量抽出でき、遺伝子解析に十分な量を容易に確保できることがわかった。

2. 細胞株におけるqPCR-HRMA

全Dループ領域塩基配列を決定した結果、Dループ領域の塩基68 (np 68) のシトシン (C) からチミン (T) への塩基置換がSa3細胞株において認められた (図2A)。この部位をターゲットとした最適なプライマーを用いたqPCR-HRMAの結果、HNOKsとSa3細胞株における融解曲線に明瞭な差異が検出され (図2A)、同部を以降の解析のターゲットとした。

3. 臨床検体におけるqPCR-HRMA

Sa3細胞株からクローニングされたDループ変異部位を含むプラスミドを、HNOKsのmtDNAに対してそれぞれ0%、25%、50%、75%、100%混合させた5サンプルの融解曲線は、それぞれ明瞭な差異を示した (図2B)。図2Bにr/m (+) 群の一例の結果を示す。qPCR-HRMAで得られた融解曲線をこの検量線に照らし、症例2の血清中には

図2 qPCR-HRMAによる変異 mtDNA 解析

- (A) Sa3 細胞株における D ループ領域塩基置換；融解曲線にて HNOKs (赤線) との差異を認めた (緑線). D ループ領域塩基 68 において, シトシン (C) からチミン (T) へ置換していた.
- (B) 変異 mtDNA に対する検量線上で, 症例 2 の血清中には 75 ~ 100 % の変異 mtDNA が存在することが認められた (赤線).

変異 mtDNA が 75 ~ 100 % の割合で認められると判定された.

変異 mtDNA 量と, 各種臨床指標 (ステージ分類, 組織学的分化度, 年齢, 性別, 飲酒・喫煙の有無など) に統計学的有意差は認められなかった ($p < 0.05$).

組織中変異 mtDNA 量において腫瘍組織中の変異 mtDNA 量 ($45.8 \pm 17.3 \%$) は正常組織 ($21.8 \pm 10.3 \%$) に比べ有意に多かった ($p < 0.05$, 図 3A). さらに腫瘍組織中の変異 mtDNA 量は, r/m (-) 群では 34 例中 29 例 (85 %) で 50 % 以下であったのに対し ($33.9 \pm 13.0 \%$), r/m (+) 群では 67 % (9 例中 6 例) が 50 % 以

上の変異 mtDNA を含んでいた ($70.6 \pm 19.5 \%$) ($p < 0.05$, 図 3B).

次に血清中の変異 mtDNA 量は, r/m (-) 群において術前に比べ ($37.5 \pm 15.5 \%$) 術後 4 週間で顕著に低下していることが明らかとなった ($21.3 \pm 13.4 \%$) ($p < 0.05$, 図 3C). 一方で, r/m (+) 群では術前に対して ($37.5 \pm 26.6 \%$), 術後の血清中変異 mtDNA 量に有意な変化は認められなかった ($62.5 \pm 34.1 \%$) (図 3C). また r/m (+) 群の 9 例のうち 8 例において術後血清中変異 mtDNA 量レベルに変化がみられなかったか, あるいは上昇していることが検出された.

図3 変異 mtDNA 量の比較解析

各グラフの縦軸は、図 2B の検量線より得られる変異 mtDNA の割合を示す。

- (A) 腫瘍組織中 (N = 43) には、正常組織 (N = 43) にくらべて有意に多くの変異 mtDNA が検出された。
- (B) 腫瘍組織において、r/m (+) 群 (N = 9) での変異 mtDNA 含有量は r/m (-) 群 (N = 34) のそれにくらべて有意に高かった。
- (C) 術後 4 週間 (post-surgery) における血清中変異 mtDNA 量は、r/m (-) 群 (N = 34) で術前 (pre-surgery) にくらべて有意に低下していたが、r/m (+) 群 (N = 9) では変化が認められなかった。ボックス中の横線は中央値を示す。

考 察

本研究は、手術時切除断端および頸部リンパ節転移がいずれも陰性と診断された口腔扁平上皮癌患者において、術前・術後の CNAs を分子生物学的に解析し、その有用性につき検討した。

CNAs の存在は、Mandel らによっではじめて報告された⁵⁾。以来、CNAs 研究は主にリウマチや全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患に焦点が当てられてきた^{6, 7)}。一方、Leon らは膵臓癌患者において化学療法後に血清中 CNAs 濃度が有意に低下していることを見出し、癌由来 CNAs の存在をはじめて示唆した⁸⁾。そして、Nawroz らによって頭頸部扁平上皮癌患者における末梢循環血液中癌由来 DNA (circulating tumor-related DNA: ctrDNA) の検出を分子生物学的手法 (マイクロサテライト解析) にもとづいて行った研究成果は、対象が 21 例と少数の検討ではあ

ったが²⁾、その有用性に注目が集まった。われわれは 64 症例の口腔扁平上皮癌患者の ctrDNA を 9 か所のマイクロサテライト領域を調べた結果、52% で術前に ctrDNA の存在を検出できたと同時に、術後 4 週間経過しても ctrDNA を認めた 4 症例はすべて予後不良であったことを報告した⁴⁾。一方最近では、血清中癌由来核酸の解析は特定遺伝子メチル化の同定⁹⁾や、マイクロアレイ解析を用いた mRNA 解析¹⁰⁾、さらにはマイクロ RNA の検出¹¹⁾などによっても試みられており、その特異性や精度が向上している。しかし、CNAs は微量であり、メチル化の同定過程には大量の試料 DNA が必要である。また RNA 解析は RNA の不安定さから抽出・取扱い過程で相当の注意を要する。CNAs 検査を汎用なものとしようとすれば、充分量で安定した CNAs を得る必要がある。そこで、まずわれわれは血清中の mtDNA 量を核酸 DNA 量と比較した。その結果、少なくとも 120 倍量を得ることができ (図 1)、血清中における

DNA 解析に有用である可能性が確認できた。He らも大腸癌患者において同様のことを指摘しており¹²⁾、mtDNA をターゲットとした一解析に必要な血清量は、核酸 DNA のそれに比べわずか 1/80 量ですんだと報告している。

mtDNA ゲノムは、16.6 キロベース長の二重鎖の環状 DNA で、2 種のリボソーム RNA、22 種の tRNA および 13 種の mRNA をコードしている 37 個の遺伝子を含む。また遺伝子をコードしない非コード領域は、D ループ領域と呼ばれ約 1Kbp の転写および複製調節領域と tRNA クラスター内に存在する軽鎖複製開始点を含む。mtDNA 変異率は、それぞれの領域で異なるが核 DNA に比べ少なくとも 10 倍以上あるとされている^{13, 14)}。近年、膵臓癌¹⁵⁾、胃癌¹⁶⁾、大腸癌¹⁷⁾、卵巣癌¹⁸⁾ などさまざまな悪性腫瘍において mtDNA 変異が相次いで報告されている。これらにおいて、もっとも変異が多く認められたのが D ループ領域であった。頭頸部扁平上皮癌における D ループ領域の変異は、21 ~ 51 % に認められており^{19 ~ 21)}、D ループ領域は口腔扁平上皮癌で高率に変異していることが考えられる。D ループ領域は、非コード領域ではあるが、前述の通り転写因子結合部位を含むため、癌細胞での同領域あるいは近傍の変異は、発癌抑制に必要とされる円滑な転写過程を阻害している可能性が推測される。また、mtDNA 変異は加齢によって蓄積され、その機能が低下していくと考えられている²²⁾が、本研究では、年齢との相関関係は認められなかった。

次に、口腔扁平上皮癌で手術検体切除断端が病理組織学的に陰性と診断された症例につき、血清中変異 mtDNA 量を術前と術後 4 週間で比較した。変異解析においては、従来の一本鎖高次構造多型分析法 (single-strand conformational polymorphism: SSCP) のように、PCR 産物を一定条件で分離・表示する方法が一般的であった。しかし、結果を得るのに長時間を要し、さらに一度に得られる結果に限りがある。また、再現性に乏しいなど問題点も多い。そこで、本研究では PCR 産物中の変異を DNA 融解曲線の形の差異から検出する qPCR-HRMA 法を用いた。これは、リアルタイム PCR → PCR 産物の融解 → 融解曲線の差異同定 → 解析といった全ステップを同一機器内で行えるため、多検体に対して高感度に再現性に富んだ結果が得られる。HRMA 法を用いた検索は、癌組織中の K-ras 変異や EGFR 変異の同定に応用した報告がある^{23, 24)}。また、メチル化 DNA の半定量を試みた報告が散見される^{25, 26)}。われわれは口腔扁平上皮癌由来細胞中の変異 mtDNA と正常口腔粘膜上皮角化細胞の野生型 mtDNA を用いて作成した検量線をもとに、変異 mtDNA を半定量的に解析することができた (図 2B)。腫瘍組織中の変異 mtDNA 量は正常組織にくらべ多く (図 3A)、また r/m (－) 群では大部分の症例が 50 % を超えることはなかった一方で、r/m (＋) 群では有

意に多くの変異 mtDNA を含んでいた (図 3B)。なかには 90 % 近い変異 mtDNA を検出した症例もあった。さらに興味深いことは、予後良好群ではすべての症例で循環変異 mtDNA 量が術前・後で 50 % を超えることはなかった一方で、不良群は 4 症例で術前から 60 % を超えていたことである。また r/m (＋) 群のほとんどが術後 4 週経過しても、術前変異 mtDNA 量の低下をみることなく (図 3C)、むしろ増加している症例が多く認められた。Partridge らの報告では、口腔扁平上皮癌患者における切除断端近傍の正常組織に p53 遺伝子異常が認められたとしている²⁷⁾。Martone らは、頭頸部扁平上皮癌患者における切除断端に関し 3 遺伝子 (MGMT, p16, DAP-K) のメチル化の状況を検討し、少なくともそれら遺伝子の 1 つにメチル化を認めた症例が 82 % に上ったとしている²⁸⁾。また、Bilde らは、p53 と p16 タンパク発現が断端領域に存在する細胞癌化の可能性を早期に検出できるかもしれないと報告している²⁹⁾。したがって、これらのことは r/m (＋) 群ではすでに術前に癌由来細胞が循環中にすでに相当量暴露されていたのに加え、手術によって完全に除去されたはずの腫瘍細胞が、術野外に微小に残存または転移していた可能性と、その形態が正常であるにもかかわらずすでに癌化の過程にあった細胞群が存在していた可能性が示唆される。しかし、乳癌においては、術後に取り残された細胞があった場合でも免疫システムによって認識され排除されるとの報告もある³⁰⁾。このことに関し、周囲残存癌細胞にせよ癌化中の細胞にせよ、どのくらいの数が残存した場合に術後再発・転移を発するかが重要なポイントとなる。いまだこの問題に対する結論的な研究成果はないが、本研究による循環 mtDNA によるモニタリングはその簡便性、特異性、迅速性等により、これまでの分子生物学的アプローチとあわせ口腔扁平上皮癌におけるひとつの有用な補助診断になり得ると考えられた。

今後は本研究を足掛かりに、大規模で長期的なデータにもとづいて、かつ検索領域がミトコンドリアゲノム全体にわたる検証により、口腔扁平上皮癌患者における ctrDNA をいかにして false positive/negative を除外し、効率的・特異的に検出できるかが重要な課題である。この点が解決できれば、qPCR-HRMA 法を用いた mtDNA 変異解析は、従来の検査では検出できないような微小口腔扁平上皮癌の存在を術前・後で迅速かつ正確に同定できる新たな診断ツールとなる可能性がある。

結 語

本研究により、口腔扁平上皮癌患者の循環 mtDNA の術前後の分子生物学的モニタリングは、予後不良例の早期判

別に有用であると推察された。

引用文献

- 1) Slaughter, D.P., Southwick, H.W., et al.: Cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-968 1953.
- 2) Nawroz, H., Koch, W., et al.: Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 2: 1035-1037 1996.
- 3) Nunes, D.N., Kowalski, L.P., et al.: Circulating tumor-derived DNA may permit the early diagnosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 92: 214-219 2001.
- 4) Hamana, K., Uzawa, K., et al.: Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 92: 2181-2184 2005.
- 5) Mandel, P. and Metais, P.: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 142: 241-243 1948.
- 6) Tan, E.M., Schur, P.H., et al.: Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 45: 1732-1740 1966.
- 7) Al-Balaghi, S., Ström, H., et al.: Spontaneous DNA synthesis in rheumatoid arthritis: evidence of enhanced circulating non-T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 17: 521-530 1983.
- 8) Leon, S.A., Shapiro, B., et al.: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37: 646-650 1977.
- 9) Wong, T.S., Kwong, D.L., et al.: Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 2401-2406 2004.
- 10) Li, Y., Elashoff, D., et al.: Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol* 24: 1754-1760 2006.
- 11) Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., et al.: Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 10: 42-46 2009.
- 12) He, Y., Wu, J., et al.: Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464: 610-614 2010.
- 13) Pesole, G., Gissi, C., et al.: Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 48: 427-434 1999.
- 14) Linnane, A.W., Marzuki, S., et al.: Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* 8639: 642-645 1989.
- 15) Jones, J.B., Song, J.J., et al.: Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "mass" -ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res* 61: 1299-1304 2001.
- 16) Burgart, L.J., Zheng, J., et al.: Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol* 147: 1105-1111 1995.
- 17) Tamura, G., Nishizuka, S., et al.: Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. *Eur J Cancer* 35: 316-319 1999.
- 18) Liu, V.W.S., Shi, H.H., et al.: High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 61: 5998-6001 2001.
- 19) Lievre, A., Blons, H., et al.: Clinicopathological significance of mitochondrial D-loop mutation in head and neck carcinoma. *Br J Cancer* 94: 692-697 2006.
- 20) Fliss, M.S., Usadel, H., et al.: facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 287: 2017-2019 2000.
- 21) Prior, S.L., Griffiths, A.P., et al.: Mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 27: 945-950 2006.
- 22) Wallace DC: Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 51: 440-450 2010.
- 23) Heideman, D.A., Thunnissen, F.B., et al.: A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes. *Cell Oncol* 31: 329-333 2009.
- 24) Takano, T., Fukui, T., et al.: EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan. *J Clin Oncol* 26: 5589-5595 2008.
- 25) Zhang, C., Shao, Y., et al.: High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 196: 38-44 2010.
- 26) Liu, W., Guan, M., et al.: Rapid determination of AKAP12 promoter methylation levels in peripheral blood using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) analysis: application in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 411: 940-946 2010.
- 27) Partridge, M., Li, S.R., et al.: Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 6: 2718-2725 2000.
- 28) Martone, T., Gillio-Tos, A., et al.: Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 13: 5089-5094 2007.
- 29) Bilde, A., von Buchwald, C., et al.: Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas. *J Oral Pathol Med* 38: 72-78 2009.
- 30) Brown, D.C., Purushotham, A.D., et al.: Detection of intraoperative tumour cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 117: 96-101 1995.