ヒト口腔扁平上皮癌における第2番染色体長腕上のヘテロ接合性消失と マイクロサテライト不安定性について

柿本吉堂・沼澤秀之・山本信治
武田栄三・山内智博・柴原孝彦

Loss of heterozygosity and microsatellite instability on the long arm of chromosome 2 in human oral squamous cell carcinoma

KAKIMOTO Yoshidou · NUMASAWA Hideyuki · YAMAMOTO Nobuharu
TAKEDA Eizou · YAMAUCHI Tomohiro · SHIBAHARA Takahiko

Abstract: Frequent allelic imbalances, including loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI), have been found on the long arm of chromosome 2 (2q) in several types of human cancer. This study was designed to identify the tumor suppressor locus (or loci) associated with oral squamous cell carcinoma (SCC) on 2q. To better understand the details of genetic alterations on 2q, we performed polymerase chain reaction analysis of microsatellite polymorphisms corresponding to 10 loci on this chromosome. We identified a novel tumor suppressor locus in this region in primary oral SCCs. To further determine the role of 2q deletions in oral carcinogenesis, 19 oral SCCs (19 sets of primary and corresponding normal tissues) were examined for allelic imbalances (LOH or MSI) on 2q, using ten microsatellite markers. Among these 19 patients, 11 (57.9 %) showed LOH at one or more loci. Deletion mapping of these tumors revealed four discrete, commonly deleted regions on the chromosome arm. Furthermore, we detected MSI in 4 of the patients (21.1 %). We compared our results with clinicopathologic features. A number of sites with LOH on 2q were detected in early stage lesions, and the frequency of LOH was slightly but not significantly higher in later clinical stages. Our results suggest that allelic imbalances on 2q are involved in the development of oral SCC and that one or more putative tumor suppressor genes contributing to the pathogenesis of this disease are present on 2q.

Key words: chromosome 2 (第2番染色体), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), loss of heterozygosity (ヘテロ接合性消失), microsatellite instability (マイクロサテライト不安定性), tumor suppressor gene (癌抑制遺伝子)

緒 言

扁平上皮癌は口腔において最も多くみられる悪性腫瘍であるが、口腔扁平上皮癌の悪性度・予後判定に有用な遺伝子マーカーは特定されていないのが現状である。

現在、発癌の過程はDNAミスマッチ修復異常が起こることにより、癌遺伝子・癌抑制遺伝子に異常が蓄積し発癌にいたるものと考えられており、癌抑制遺伝子の活性化および

癌抑制遺伝子の不活性化が、ヒト多段階発癌において重要な役割を果たしている¹⁾。なかでも、ある特定の染色体上の対立遺伝子の欠損は癌抑制遺伝子の存在を示唆しており、ヘテロ接合性消失 (LOH: loss of heterozygosity) やマイクロサテライト不安定性 (MSI: microsatellite instability)^{2~3)}として検出され、未知の癌抑制遺伝子が存在する可能性のあるDNA領域のマッピングに有用であることが証明されている⁴⁾。

最近行われているアレロタイプ解析において、ヒト第2番染色体長腕上 (2q) におけるLOH解析が神経芽細胞腫⁵⁾・甲状腺癌⁶⁾・顆粒細胞腫⁷⁾・肺癌⁸⁾・胃癌⁹⁾および頭頸部癌¹⁰⁾など多くの悪性腫瘍において報告されており、2q上に特有の欠失領域が特定され、2q上に数種類のヒト

東京歯科大学口腔外科学講座
(主任: 柴原孝彦教授)

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

受付日: 2004年7月5日

採択日: 2005年5月24日

表1 対象症例

症例	性別	年齢	部位	T	N	Stage	分化度	浸潤様式	pN	転帰 (期間月)
1	男	47	舌	1	0	1	高分化型	3型	+	生存 (53か月)
2	男	61	舌	2	2a	4	高分化型	4C型	—	生存 (44か月)
3	男	77	口底	2	1	3	中分化型	4C型	+	生存 (30か月)
4	女	69	歯肉	4	2b	4	高分化型	3型	+	生存 (29か月)
5	男	66	口蓋	1	0	1	高分化型	2型	/	生存 (45か月)
6	男	74	舌	2	1	3	高分化型	3型	—	生存 (31か月)
7	男	61	舌	2	0	2	高分化型	3型	/	生存 (47か月)
8	男	36	歯肉	2	0	2	中分化型	4C型	/	生存 (48か月)
9	男	76	口蓋	1	0	1	中分化型	4C型	+	死亡 (39か月)
10	男	39	舌	1	0	1	高分化型	4C型	+	死亡 (28か月)
11	男	46	舌	1	0	1	低分化型	4C型	+	死亡 (11か月)
12	男	51	舌	2	1	3	中分化型	3型	—	生存 (43か月)
13	男	64	口底	4	2c	4	低分化型	3型	+	生存 (49か月)
14	男	59	歯肉	2	1	3	高分化型	3型	—	生存 (51か月)
15	男	60	舌	1	0	1	高分化型	3型	/	生存 (33か月)
16	男	79	舌	1	1	3	低分化型	3型	—	生存 (29か月)
17	女	80	歯肉	2	0	2	高分化型	4C型	+	死亡 (21か月)
18	女	68	歯肉	2	2b	4	中分化型	3型	+	死亡 (10か月)
19	女	55	歯肉	1	0	1	高分化型	3型	—	生存 (50か月)

癌に特有の癌抑制遺伝子が存在することが示唆されている。しかし、口腔癌において第2番染色体上の LOH 解析に関する報告はほとんどない。

そこで今回、本染色体上に口腔扁平上皮癌に特有の新規癌抑制遺伝子が存在すると仮定し、口腔扁平上皮癌に関連する未知癌抑制遺伝子を単離するための第一段階として、口腔扁平上皮癌患者 19 例から採取・抽出した腫瘍組織 DNA について検討を行った。これを同一患者の正常組織 DNA から得られた結果と比較して 2q の詳細な欠失地図を作成し、① LOH と MSI を評価し、口腔扁平上皮癌に特有の新規未知癌抑制遺伝子座位を同定し、②臨床病理学的特性との関連について検討した。

対象症例および研究方法

対象：1998 年から 2001 年の 4 年間に東京歯科大学千葉病院口腔外科を受診し、口腔扁平上皮癌と診断され、試料採取が可能であった 19 名の患者を対象とした (表 1)。全症例とも患者本人および患者家族に本研究の同意を得ている。また、本研究は本学の倫理委員会の承認を得たのち行った。検体は手術時 (全症例とも化学療法・放射線療法等の術前治療は加わっていない) または生検時に採取した原発腫瘍組織 19 検体、腫瘍組織と対応する正常組織 19 検体を用いた。切除組織を 2 つに分け、一方は腫瘍組織から正常組織を慎重に切り落とすに凍結し、DNA 抽出まで -80℃ に保存した。もう一方は、10%ホルマリンで固

定し、病理診断を行った。病理組織学的診断は、東京歯科大学病理学教室において国際腫瘍分類に従って実施した¹¹⁾。臨床病理学的 Stage 評価は、UICC TNM Stage 評価システムに従った¹²⁾。

DNA の抽出法：患者はすべて口腔扁平上皮癌であることが組織学的に確認され、DNA 抽出のための腫瘍検体は 80%以上腫瘍で構成されていることを確認した。それぞれ採取された腫瘍組織、正常組織を切除直後に液体窒素に保存しておき、新鮮凍結標本から加工・調整した。まず、組織を液体窒素下で粉碎した。次にゲノム DNA を TNES buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0)・150mM NaCl・10mM EDTA・0.1% SDS) 1000μl 中に proteinase K (100μg/ml) を 30μl 加え攪拌・分解し、50℃の温浴槽で一晩消化した。フェノール・クロロホルム抽出法により抽出・精製したのちエタノール沈殿法により洗浄・濃縮した。抽出した DNA の濃度を分光光度計 (spectrophotometer) によって測定し、-80℃で凍結保存した。各 DNA サンプルを 50ng/μl の濃度に調整し、これを鋳型とし PCR 法 (polymerase chain reaction) を用いて増幅した。

PCR およびマイクロサテライト解析法：今回、第2番染色体長腕上のマイクロサテライト領域のうち、他臓器癌等の文献を参照し高頻度に LOH が認められる 10 か所のマイクロサテライト・マーカー (D2S436・D2S1328・D2S111・D2S202・D2S1327・D2S116・D2S155・D2S164・D2S133・D2S206; Research Genetics 社) を用いた (表 2)。PCR 反応液には、250ng の DNA を鋳型とし、各 20pmol の

表2 使用したマイクロサテライト・マーカー

Markers	Locations	Size of PCR products (bp)	Sequence of primers
D2S436	2q11.1-14	192	5'-GATATGGGAGCAACATGAGC-3' 5'-GGAATCAACTTTCAGTATAAACCC-3'
D2S1328	2q14-21	157	5'-GTGGCTTTGGAGGAACACTA-3' 5'-TGGCACATGTACACCAGAAC-3'
D2S111	2q23-33	126-140	5'-TTTCTTTTTTGCAGTTTATCC-3' 5'-CACTTCAGTGCCCTTCTTGAGA-3'
D2S202	2q32	265	5'-AAGGCAGATCCAAGTACTCA-3' 5'-CATAAGCAACTGATTAGAACC-3'
D2S1327	2q32-35	162	5'-TGACCAGGGGAAGATACTGA-3' 5'-TGAATTGAATAATAACACTCTGTGC-3'
D2S116	2q33	134-150	5'-CAATCTCCACAAGTTGCTCA-3' 5'-GGGATAGATAATTTAGGAGTGCG-3'
D2S155	2q35	163-171	5'-ACAGAAAACATACGTGTGTG-3' 5'-CGGAACCTAGCAAACTAC-3'
D2S164	2q35	265-303	5'-GTCCTAACAGGCCACAGACC-3' 5'-GCTGGCAGTATCACATGACA-3'
D2S133	2q36	283-301	5'-CAGGAATCCAAGACAGACAG-3' 5'-CAGATAGTAACTGTATATCAAGGGG-3'
D2S206	2q36	123-151	5'-TTAAAAATTAAGTAGGCTTTTGGTT-3' 5'-GTCCTCATGTGTTTATGCTGT-3'

プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3)・50mM KCl・3.0mM MgCl₂・2.0mM dNTP・0.5unit Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer 社) が含まれた全量 20 μ l の反応液中で行った. PCR の条件は, プレヒートを 94 $^{\circ}$ C で 5 分間行いその後, 変性を 94 $^{\circ}$ C で 1 分間, アニーリングを 53 $^{\circ}$ C で 1 分間, 伸長を 72 $^{\circ}$ C で 1 分間とし, これを 1 サイクルとして, 35 サイクルを Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer 社) を用いて増幅し, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分間伸長反応を行った. PCR 産物は, ホルムアミド染料混合液 (95 % ホルムアミド・20mM EDTA・0.05 % プロムフェノール・ブルー・0.05 % キシレンシアノール) で希釈した後, 98 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性を行い, その後冷却し, 6 % 尿素 - ホルムアミド - ポリアクリルアミド・ゲル上で 3W で 2 ~ 3 時間電気泳動し, 銀染色 (DNA SilverStaining Kit: Amersham Pharmacia Biotech AB Sweden) によりバンドを染色した. LOH または MSI を認めた各症例の結果に再現性があることを確認するため, 再度 PCR マイクロサテライト分析を行った.

ヘテロ接合性消失 (LOH) およびマイクロサテライト不安定性 (MSI) の評価法: 得られたマイクロサテライトバンドをコンピューター上にスキャンし NIH image (ver-

sion 1.62) によって, その強度を数値化した. 腫瘍 DNA におけるシグナル強度を対応する正常 DNA と比較し, シグナル強度が 50 % 以下を LOH と判定した. 対応する正常サンプルにおいて観察されなかったバンドが腫瘍サンプルにおいて観察された場合, または, 対応する正常サンプルと比べて腫瘍サンプルのバンドがシフトした場合を MSI と判定した.

統計学的分析: Fisher の直接確率法を用いて LOH ならびに MSI の頻度と臨床病理学的特性 (発生部位・TNM 分類・分化度等) との関係について統計的有意差を分析した. 許容水準は $p < 0.05$ とした.

結 果

LOH および MSI の評価: 口腔扁平上皮癌患者 19 例から, 腫瘍と周囲正常組織 19 組, 合計 38 個の組織標本を採取し, 2q 上にマップされた 10 種類のマイクロサテライト・マーカーを用いて LOH および MSI の有無を検討した. 少なくとも 1 か所の遺伝子座位に 19 症例中 11 例 (57.9 %) において LOH が認められた. MSI は 19 症例中 4 例 (21.1 %) に認められた. MSI が最も高頻度に特定さ

図1 第2番染色体長腕上における欠失地図

れた領域は、D2S164 領域であった (12.5 %). 19 例の欠失地図を作成した結果、本染色体上に 1 か所共通欠失領域が同定された (図 1). すなわち LOH の発現頻度が高い遺伝子座位は、2q36 領域の D2S206 (33.3 %) であった (図 2). 今回同定された D2S206 の遺伝子座位は、顆粒細胞腫⁷⁾ に対する未知癌抑制遺伝子座位としてすでに報告されている. 他領域での LOH の発現頻度は、2q11.1-14 領域 (D2S436) で 7.1 %, 2q14-21 領域 (D2S1328) で 15.8 %, 2q23-33 領域 (D2S111) で 15.8 %, 2q32 領域 (D2S202) で 17.6 %, 2q32-35 領域 (D2S1327) で 11.1 %, 2q33 領域 (D2S116) で 0 %, 2q35 領域 (D2S155) で 5.6 %, 同じく 2q35 領域 (D2S164) で 12.5 %, 2q36 領域 (D2S133) で 5.9 % であった (図 2). 2q における LOH および MSI の代表例を図 3 に示す.

臨床病理学的分析 (表 3): 臨床病理学的因子と LOH および MSI の存在に関して検討した結果、性別では LOH は男性よりも女性に多く発現していたが MSI は男性にのみ認められた. 部位別では舌よりも歯肉の方が多く LOH が発現していたが MSI の発現は舌のみであった. T 分類では

LOH・MSI とともに T1・T2 にのみ認められた. また、Stage 分類で比較しても Stage I・II の方が Stage III・IV より多く LOH が発現していた. さらに、所属リンパ節転移に関しても、転移の有無に関係なく LOH が認められた. 分化度では LOH の発現頻度にほとんど差は認められなかったが、浸潤様式では 3 型より 4C 型の方が LOH の発現が多く認められた. しかし、今回症例数が 19 症例と少なかったため、今後は症例数を増やして、これらの点を明らかにしたい.

Fisher の直接確率法により、対立遺伝子不均衡 (LOH および MSI) と臨床病理学的相関について統計的有意差を検討した. その結果、統計的有意差は認められなかった.

考 察

発癌はさまざまな遺伝的变化が起こる多様な過程である. 多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子がこの複雑な過程に関与していると考えられている. 癌抑制遺伝子の機能の喪失は、ヒト悪性腫瘍の進行において重要である. 未知癌抑制遺伝子の位置を同定するための有用な方法のひとつが、

図2 第2番染色体長腕上のLOH・MSIの発現頻度

図3 LOHおよびMSIを認めた代表例

LOHの矢頭は正常(N)に対して消失あるいはシグナル強度が50%以上減弱した腫瘍(T)バンドを示す。MSIの矢頭は正常(N)と比べて観察されなかったバンドが腫瘍(T)バンドにおいて観察された場合、または、正常(N)と比べてシフトした腫瘍(T)バンドを示す。

表3 臨床病理学的因子のLOH・MSIの発現頻度 (%)

		LOH (+)	LOH (%)	MSI (+)	MSI (%)
性別	男性 (15例)	8/15	53.3%	4/15	26.7%
	女性 (4例)	3/4	75%	0/4	0%
部位	舌 (9例)	4/9	44.4%	4/9	44.4%
	歯肉 (6例)	5/6	83.3%	0/6	0%
	その他 (4例)	2/4	50%	0/4	0%
T分類	T1 (8例)	5/8	71.4%	2/8	25%
	T2 (9例)	6/9	66.7%	2/9	22.2%
	T4 (2例)	0/2	0%	0/2	0%
TNM stage	I (7例)	5/7	71.4%	1/7	14.3%
	II (3例)	2/3	66.7%	1/3	33.3%
	III (5例)	2/5	40%	2/5	40%
	IV (4例)	2/4	50%	0/4	0%
分化度	高分化型 (11例)	7/11	63.6%	2/11	18.2%
	中分化型 (5例)	4/5	80%	1/5	20%
	低分化型 (3例)	0/3	0%	1/3	33.3%
pN	(+) (9例)	5/9	55.6%	0/9	0%
	(-) (6例)	4/6	66.7%	2/6	33.3%
浸潤様式	2型 (1例)	1/1	100%	0/1	0%
	3型 (11例)	5/11	45.5%	4/11	36.4%
	4C型 (7例)	5/7	71.4%	0/7	0%
転帰	生存 (14例)	7/14	50%	4/14	28.6%
	死亡 (5例)	4/5	80%	0/5	0%

図4 第2番染色体長腕上における共通欠失領域の報告例

LOHの発現頻度の高い悪性腫瘍を検討することである。悪性腫瘍細胞におけるLOH解析によって、*RB*¹³⁾、*APC*¹⁴⁾、*FHT*¹⁵⁾などの癌抑制遺伝子がすでに検出・同定されている。

口腔扁平上皮癌においては、多くの染色体、たとえば3p, 4q, 5q, 7q, 8p, 9p, 11q, 13q, 18q, 20q, 21qおよび22qなどで高頻度のLOHが検出されており^{16~28)}、これらの染色体領域に未知癌抑制遺伝子が存在する可能性がある。このように、未だ特定されていない多数の未知癌抑制遺伝子が、ヒト口腔癌の発生に関連する可能性がある。また、ヒト第2番染色体長腕上(2q)におけるLOH解析が神経芽細胞腫⁵⁾・甲状腺癌⁶⁾・顆粒細胞腫⁷⁾・肺癌⁸⁾・胃癌⁹⁾および頭頸部癌¹⁰⁾など多くの悪性腫瘍において報告されている(図4)。しかし、口腔領域に関する第2番染色体長腕上のLOH解析の報告はほとんどなく、結論に達していない。

第2番染色体長腕上のLOH・MSIの発現頻度：口腔扁平上皮癌19症例のうち11例(57.9%)において少なくとも1か所以上の遺伝子座位にLOHが認められた。また、MSIは19症例中4例(21.1%)に認められた。MSIが最も高頻度に特定された領域は、2q35領域のD2S164であった(12.5%)。この領域はOtsukaら⁸⁾が肺癌において共通欠失領域を同定したと報告している。これらの結果は、2q上にヒト悪性腫瘍のいくつかのタイプに特異的な癌抑制遺伝子が存在していることを示唆するものである。

次に、19症例の欠失地図を作成した結果、2q上に共通欠失領域と思われるLOHの高頻度な領域が1か所同定され、2q36領域のD2S206であった。この領域では最近Watsonら⁷⁾が顆粒細胞腫において共通欠失領域を同定している。この所見より、口腔扁平上皮癌および顆粒細胞腫に関連する癌抑制遺伝子がこの領域に存在することが示唆される。また、2q36領域は未だ何の遺伝子もクローニングされていないことから、今回2q36領域に共通欠失領域と思われる領域が同定されたことは新規未知癌抑制遺伝子が存在している可能性が高く興味深い。

LOH・MSIと臨床病理学的特性との相関：2q上のLOH・MSIの発現頻度と臨床病理学的特性との関係についても解析を行った。部位別のLOHの頻度は舌が44.4%、歯肉が83.3%と歯肉に多く認められた。Stage分類では、StageⅠが71.4%、StageⅡが66.7%、StageⅢが40%、StageⅣが50%にLOHが認められた。これらの結果より、比較的早期癌で歯肉に多くLOHが発現することから、癌抑制遺伝子の不活化は初期段階での現象であることが示唆されると同時に、部位によってもその不活性化の頻度が異なる可能性があると考えられた。次に、分化度、浸潤様式、pNとLOH・MSIの発現頻度との間に有意な相関は認め

られず、MSIの発現頻度と臨床病理学的特性との間にも相関は認められなかった。今後、症例数を増やし広範に解析を行うことが重要であると思われた。

今後、これらの口腔癌患者を頻繁に注意深く経過観察しつつ、患者個々に合った最適な治療を実現するため大規模な遺伝子解析を行っていくことが重要である。

結 語

口腔扁平上皮癌19例を対象に第2番染色体長腕について10種類のマーカーを用いてLOHの検討を行い、高頻度の欠失を観察した。共通欠失領域と思われる領域が1か所同定され、2q上に未知癌抑制遺伝子が少なくとも1種類以上存在する可能性が示唆された。また、これらのLOHは癌化の早い段階から出現することも示唆された。

引 用 文 献

- 1) Fearon, E.R. and Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767 1990.
- 2) Ishwad, C.S., Ferrell, R.E., et al.: Microsatellite instability in oral cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 64: 332-335 1995.
- 3) Ogawara, K., Uzawa, K., et al.: Frequent microsatellite instability in oral cancer. *Oncol Rep* 4: 161-165 1997.
- 4) Weinberg, R.A.: Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146 1991.
- 5) Takita, J., Hayashi, Y., et al.: Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene* 11: 1829-1834 1995.
- 6) Tung, W.S., Shevlin, D.W., et al.: Allelotype of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. *Genes Chromosomes & Cancer* 19: 43-51 1997.
- 7) Watson, R.H., Roy, W.J.Jr., et al.: Loss of heterozygosity at the α -inhibin locus on chromosome 2q is not a feature of human granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol* 65: 387-390 1997.
- 8) Otsuka, T., Kohno, T., et al.: Deletion mapping of chromosome 2 in human lung carcinoma. *Genes Chromosomes & Cancer* 16: 113-119 1996.
- 9) Nishizuka, S., Tamura, G., et al.: Loss of heterozygosity during the development and progression of differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J Pathology* 185: 38-43 1998.
- 10) Ransom, D.T., Barnett, T.C., et al.: Loss of heterozygosity on chromosome 2q: possibly a poor prognostic factor in head and neck cancer. *Head and Neck* 20: 404-410 1998.
- 11) World Health Organization: International Histological Classification of Tumours; Histological Typing of Oral and Oropharyngeal Tumours. No. 4. WHO, Geneva, 1971, p9-28.

- 12) UICC: TNM Classification of Malignant Tumours. 4th Ed, Springer, Berlin, 1987, p16-18.
- 13) Friend, S.H., Bernards, R., et al.: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-646 1986.
- 14) Groden, J., Thliveris, A., et al.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589-600 1991.
- 15) Ohta, M., Inoue, H., et al.: The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3 ; 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84: 587-597 1996.
- 16) Partridge, M., Emilion, G., et al.: LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Br J cancer* 73: 366-371 1996.
- 17) 鶴澤成一, 赤沼大輔, 他: 口腔扁平上皮癌における第3染色体短腕上のヘテロ接合性消失について—3p25-pter領域の欠失と臨床的・病理組織学的特性との関連—. *日口外誌* 46: 455-461 2000.
- 18) Wang, X-L., Uzawa, K., et al.: Localization of a novel tumor suppressor gene associated with human oral cancer on chromosome 4q25. *Oncogene* 18: 823-825 1999.
- 19) Wang, X-L., Uzawa, K., et al.: Allelic imbalance on the long arm of chromosome 5 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 10: 535-538 1997.
- 20) Wang, X-L., Uzawa, K., et al.: Localization of a tumour-suppressor gene associated with human oral cancer on chromosome 7q31.1. *Int J Cancer* 75: 671-674 1998.
- 21) Ono, K., Miyakawa, A., et al.: Allelic loss on the short arm of chromosome 8 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 6: 785-789 1999.
- 22) Nakanishi, H., Wang, X-L., et al.: Localization of a novel tumor suppressor gene loci on chromosome 9p21-22 in oral cancer. *Anticancer Res* 19: 29-34 1999.
- 23) Uzawa, K., Suzuki, H., et al.: Evidence for two distinct tumor-suppressor gene loci on the long arm of chromosome 11 in human oral cancer. *Int J Cancer* 67: 510-514 1996.
- 24) Ogawara, K., Miyakawa, A., et al.: Allelic loss of chromosome 13q14.3 in human oral cancer: Correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 79: 312-317 1998.
- 25) Watanabe, T., Wang, X-L., et al.: Mutational state of tumor suppressor genes (DCC, DPC4) and alteration on chromosome 18q21 in human oral cancer. *Int J Oncol* 11: 1287-1290 1997.
- 26) Imai, F.L., Uzawa, K., et al.: A detailed deletion map of chromosome 20 in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Molecular Medicine* 7: 43-47 2001.
- 27) Yamamoto, N., Uzawa, K., et al.: Frequent allelic loss/imbalance on the long arm of chromosome 21 in oral cancer: Evidence for three distinct tumor suppressor gene loci. *Oncol Rep* 6: 1223-1227 1999.
- 28) Miyakawa, A., Wang, X-L., et al.: Allelic loss on chromosome 22 in oral cancer: Possibility of the existence of a tumor suppressor gene on 22q13. *Int J Oncol* 13: 705-709 1998.