口腔癌における p16, EGFRv III 発現およびセツキシマブ併用療法の 治療効果との関連に関する検討

山 田 慎 一^{1,2)} 柳 本 惣 市²⁾ 鳴 瀬 智 史²⁾
松 下 祐 樹²⁾ 高 橋 英 哲²⁾ 近 藤 英 司¹⁾
鎌 田 孝 広¹⁾ 梅 田 正 博²⁾ 栗 田 浩¹⁾

要旨：上皮成長因子受容体に対する分子標的治療薬であるセツキシマブは著明な治療効果が期待できる反面、重篤な有害事象（Infusion reaction の発現の可能性や投与に関連する薬剤性肺障害の発症など）が報告されており、適切な症例選択と有害事象への対応が重要である。セツキシマブ療法における治療予測因子を検討する目的で口腔癌における EGFRv III と p16 の発現と治療効果との関連を検討した。セツキシマブを用いて治療を行った 14 例において EGFRv III の発現率は 50.0%，p16 は 14.3%であった。セツキシマブ療法の治療効果と EGFRv III の発現との間に有意な関連がみられたが、P16 との関連はみられなかった。本研究の結果から、EGFRv III の発現はセツキシマブ療法の治療効果予測因子となり得る可能性が示唆された。

キーワード：口腔癌、分子標的治療薬、p16、EGFRv III

緒 言

口腔癌の治療成績は近年著しく改善したが、いまだに予後不良となる症例も少なくない。特に切除不能の進行・再発口腔癌に対する治療法の選択肢は少なく、これに対する治療法の開発は重要である。上皮成長因子受容体（EGFR）に対する分子標的治療薬であるセツキシマブは本邦では 2008 年 7 月に治癒切除不可能な進行・再発大腸癌に対して承認され、その後、2012 年 12 月に頭頸部癌にも適用の承認がなされた。本薬剤は著明な治療効果が期待できる反面、モノクローナル抗体投与に伴う infusion reaction（IR）の発現の可能性やセツキシマブに起因する薬剤性間質性肺炎の発症が報告されており、その使用に際しては適切な対応（適応症例の選択、有害事象対策など）が重要である¹⁻⁷⁾。

高い治療効果が期待できるセツキシマブであるが、治療予測因子の検討は頭頸部癌領域ではみられるものの⁸⁻¹⁴⁾、口腔癌での報告はみられない。EGFR の deletion mutant である EGFRv III は頭頸部癌での発現率は 17-42%とされ、その発現は腫瘍細胞の増大やセツキシマブに対する抵抗性の誘導に関連するとされている^{8,13,15)}。また、ヒトパピローマウイルス（HPV）16 型の感染は中咽頭癌では病因、予後因子の一つとされている^{14,16-18)}。再発・進行頭頸部癌

平上皮癌において HPV 感染の有無はセツキシマブ療法の奏効率、無増殖生存率を向上させなかったとの報告もあるが¹²⁾、p16 陽性例での放射線療法、化学療法への上乗せ効果も報告されている^{10,11,14)}。

今回、われわれは当科においてセツキシマブ療法を施行した症例について EGFRv III および p16 の発現を検討し治療効果との関連を検討し、これらの因子が口腔癌におけるセツキシマブ療法の治療効果予測因子となり得るかを検討した。

対象および方法

1. 対象

2012 年 12 月から 2015 年 3 月までの間に長崎大学病院顎・口腔外科では計 18 例の治癒切除不能な再発・進行口腔癌に対してセツキシマブを用いた放射線療法ならびに化学療法を行った。そのうち、腫瘍組織標本が入手可能であった口腔扁平上皮癌症例 14 例を対象に検討を行った。

2. p16 ならびに EGFRv III の発現状況（免疫組織化学的検索）

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腫瘍組織を用い、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。脱パラフィン、内因性ペルオキシダーゼ阻止の後に、p16 は恒温槽にて 95℃で 30 分間、EGFRv III はオートクレーブにて 121℃で 5 分間抗原賦活化処理を行った。EGFRv III の染色には ENVISION キット /HRP（DAB）（Dako Cytomation）を用いた。一次抗体としてウサギ抗ヒト EGFRv III ポリクローナル抗

¹⁾ 信州大学医学部歯科口腔外科学教室（主任：栗田 浩教授）

²⁾ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔腫瘍治療学分野（主任：梅田正博教授）

〔受付：2015 年 4 月 23 日，受理：2015 年 8 月 5 日〕

体 (Bioss Inc., Woburn, Massachusetts, USA; 1 : 200 希釈) を 4℃ で 24 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 の染色には CINtec® Histology Kit (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, USA) を用いプロトコールに従い染色した。抗原の賦活化処理には付属の Epitope Retrieval Solution を用い, 95℃ 30 分間熱処理し, DAB 発色の後は, EGFRvIII と同様の手順で行った。

EGFRvIII の発現の評価は Tinhofer ら¹³⁾ の報告に従った。染色指数を染色強度 (不染 = 0, 弱 = 1, 中等度 = 2, 強 = 3) と染色細胞の割合 (0% = 0, 1-10% = 1, 11-50% = 2, 51-80% = 3, 81-100% = 4) の積とし, 7 以上を陽性とした。また, p16 の発現は Babiker ら¹⁸⁾ の報告に従い, 腫瘍細胞に占める陽性細胞の割合が 10% 以上のものを陽性と定義した。それぞれの発現の評価に際しては 2 人の口腔外科医が個別に評価し, 評価が異なる場合は発現度の低い評価を採用した。

3. 治療効果の判定

治療効果の判定は RECIST v1.1 日本語訳 JCOG 版に基づいて行った¹⁹⁾。また, セツキシマブ療法以後 4 ~ 8 週程度の間隔で定期的に CT あるいは MRI 検査を行い治療効果の判定を行った。

4. p16 ならびに EGFRvIII 発現状況と治療効果との関連

EGFRvIII および p16 の発現とセツキシマブ療法の治療効果との関連性を検討するために, Fisher の正確確率検定を用いて解析を行った。また, 疾患特異的生存率および無増悪生存率は Kaplan-Meier 法により算出した。有意差検定には Log-rank 検定を用いた。解析は StatMate IV (Atms Co., 日本) を使用し, 危険率 5% 未満を有意差ありとした。

なお, 本研究は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (医学系) 倫理委員会の承認 (承認番号: 14120449) を得て実施した。

結 果

1. 対象症例の内訳

対象症例の内訳を表 1 に示した。年齢は 50 歳から 81 歳, 平均 68.9 歳であった。治癒切除不可能な再発症例が 13 例, 進行癌症例が 1 例であった。組織学的診断は, 全例口腔扁平上皮癌であった。セツキシマブ併用療法の内訳は, Bonner 試験²⁰⁾ に準じたセツキシマブ + 放射線療法が 5 例, セツキシマブ + パクリタキセルの化学療法^{21, 22)} が 6 例, EXTREME 試験²³⁾ に準じたセツキシマブ + シスプラチン + 5-FU が 2 例, セツキシマブ単剤が 1 例であった。

治療内容について, セツキシマブ + 放射線療法はセツキシマブの初回投与量は 400mg/m² とし, 以降は 250mg/m²/週で投与し, 放射線療法は 1 日 1 回 2.0Gy/fr 照射し総線量 66Gy とした。セツキシマブ + パクリタキセルの化学療法ではセツキシマブの初回投与量は 400mg/m² とし, 以降は 250mg/m²/週で投与し, パクリタキセルを 80mg/m²/週を PD (progressive disease) となるまで投与した。セツキシマブ + シスプラチン + 5-FU ではセツキシマブの初回投与量は 400mg/m² とし, 以降は 250mg/m²/週で投与し, シスプラチン 100mg/m² を第 1 日, 5-FU 1,000mg/m²/日を第 1 日から 4 日目の間に 3 週ごとに投与し最大 6 サイクル行った。セツキシマブ単剤の場合はセツキシマブの初回投与量は 400mg/m² とし, 以降は 250mg/m²/週で PD となるまで投与を継続した。

治療効果判定は 14 例中 13 例で可能であり, CR 5 例, PR 5 例, SD 1 例, PD 2 例で, 奏効率は 76.9% であった。有害事象については, Grade 3 以上の IR は 2 例 (症例 4, 10) にみられ, セツキシマブ投与に起因すると思われる重篤な薬剤性間質性肺炎が 1 例 (症例 6) に認められた。重篤な血液毒性, 湿疹様皮疹等の有害事象は全例にみられなかった。

2. p16 ならびに EGFRvIII の発現状況

EGFRvIII の発現は主に腫瘍細胞の細胞質にみられ (図 1A), 14 例中 7 例が陽性であり陽性症例率は 50.0% であった。一方, p16 の発現は主に腫瘍細胞の核にみられ (図 1B), 14 例中 2 例が陽性であり陽性症例率は 14.3% であった。

3. p16 ならびに EGFRvIII の発現状況と治療効果との関連

治療効果判定が可能であった 13 症例について EGFRvIII, p16 との発現との関連性を検討したところ, p16 との間には治療効果との相関性は明らかではなかったが (表 2), EGFRvIII の発現と治療効果の間に有意な関連が認められた (P < 0.05) (表 3)。EGFRvIII 発現症例ではセツキシマブ療法の治療効果が低下する可能性が示唆された。

有意な相関が認められた EGFRvIII について, その発現と疾患特異的生存率と無増悪生存率について検討を行ったが有意な関連は認められなかった (図 2, 図 3)。

考 察

口腔扁平上皮癌の臨床経過は原発巣の特異的因子, 宿主の要因, 治療法に影響を受けるとされている²⁴⁾。特に原発巣再発, 頸部再発ならびに遠隔転移は予後に影響を与える因子であり, 生存率に与える影響は大きい。

セツキシマブの標的分子である EGFR の頭頸部扁平上皮癌での発現率は 90% 以上とされ^{25, 26)}, EGFR の発現強度は原発巣再発に対する救済手術での予後予測因子の一つに

表 1 対象症例の一覧

症例	年齢	性別	原発	初診時 TNM	投与時 TNM	初回治療	術後補助療法	再発部位	Regimen	IR	治療 効果	p16 発現	EGFRv III 発現
1	78	F	下顎歯肉	T2N2bM0	rN2bM1	下顎辺縁切除 + 頸部郭清	—	上縦隔LN	CET + RT	—	CR	—	—
2	51	M	舌	T3N2bM0	rT4bN0M1	舌可動部半側切除術 + 頸部郭清 + 前外側大腿皮弁再建	3-weekly CDDP 100mg/m ² + RT 66Gy	舌骨傍領域 →BNCT 肺遠隔	CET + TXL	—	PR	—	—
3	82	F	下顎歯肉	T4aN1M0	rT4bN0M0	下顎骨区域切除術 + 頸部郭清 + 腹直筋皮弁再建	CDDP 70mg/m ² + RT 60Gy	舌根部 中咽頭	CET + TXL	—	PR	—	—
4	61	M	口底	T3N2bM0	rT4bN0M0	口底半側切除, 舌可動部亜全摘 + 両側頸部郭清 + 腹直筋皮弁再建	TS-1 + RT 66Gy	舌骨 傍領域	CET + TXL Grade3	—	—	—	+
5	81	F	下顎歯肉	T4aN0M0	rt4bN0M0	下顎骨区域切除術 + プレート再建術	—	咀嚼筋隙	CET + RT	—	PR	—	—
6	60	M	舌	T2N0M0	rT4bN0M1	舌部分切除術	—	中咽頭 肺遠隔	CET + RT	—	SD	+	+
7	64	F	舌	T1N0M0	rN1M1	舌部分切除術	—	頸部LN 肺遠隔	CET + RT	—	PD	—	+
8	60	M	下顎歯肉	T4aN0M0	rN1M1	下顎骨区域切除術 + 頸部郭清 + 腓骨皮弁再建	CDDP 100mg/m ² + RT 60Gy	頸部 肺遠隔	CET + TXL	—	CR	—	+
9	50	M	舌	T2N0M0	rM1	舌部分切除術	CDDP 100mg/m ² + RT 60Gy	肺遠隔	CET + TXL	—	CR	—	—
10	74	M	不明	—	N2cM0	—	—	ルビエール LN	CET + CDDP + 5-FU	Grade3	PR	+	—
11	73	M	上下顎 歯肉	T4aN2cM0	rT4bN0M0	下顎骨区域切除術 + 上顎骨部分切除術 + 両側頸部郭清術 + 腸骨皮弁再建	CDDP 100mg/m ² + RT 60Gy	中咽頭	CET + TXL	—	PR	—	+
12	68	F	上顎歯肉	T2N0M0	rT4bN1M1	上顎骨部分切除術	—	原発 頸部LN 肺遠隔	CET + RT	—	PD	—	+
13	76	M	下顎歯肉	T4bN1M0	rT4bN1M0	下顎半側切除 + 頸部郭清 + 腓骨皮弁再建	RT 66Gy	原発・頸部	CET + TXL	—	CR	+	—
14	88	F	上顎歯肉	T2N0M0	rT3N0M0	上顎骨部分切除	—	原発	CET + RT	—	CR	—	+

IR : infusion reaction, LN : lymph node, CDDP : cisplatin, RT : radiation therapy, CET : cetuximab, TXL : Taxol, BNCT : Boron Neutron Capture Therapy, CR : complete response, PR : partial response, SD : stable disease, PD : progressive disease.

も挙げられており、EGFR が発現していない症例では救済手術後の疾患特異的 3 年生存率が 64.3%, EGFR 高発現例では 27.2%であったと報告されている^{27, 28)}。また、Radiation Therapy Oncology Group による第Ⅲ相試験においても、頭頸部扁平上皮癌患者における予後不良となる因子として EGFR 過剰発現と放射線抵抗性の関連が指摘されている²⁹⁾。このように頭頸部癌における治療成績の向上を図

る上で、EGFR の発現は重要な意義を有しており、EGFR を標的分子とするセツキシマブの導入は口腔癌患者における予後の改善に大変有用であると考えられる。今回の検討でも治療効果が判定可能であった治癒切除不可能な口腔癌症例の13 例中、CR 5 例、PR 5 例で奏効率が 76.9%とその有効性が確認された。しかしながら、セツキシマブ投与に際しては IR や薬剤性間質性肺炎の発症の可能性もあり、

図 1 病理組織写真

- A：抗 EGFRvIII 抗体の免疫組織学的染色（陽性例，×100）
EGFRvIII の発現は主に腫瘍細胞の細胞質に認められた（染色指数：8）。
B：抗 p16 抗体の免疫組織学的染色（陽性例，×400）
腫瘍細胞の核に p16 の発現は認められた（p16 陽性細胞率：47.1%）。

表 2 p16 の発現と治療効果との関連

	p16 の発現	
治療効果	(-)	(+)
CR/PR	8	2
SD/PD	2	1

Fisher's exact probability test : NS

CR : complete response,

PR : partial response,

SD : stable disease,

PD : progressive disease,

NS : not significant.

表 3 EGFRvIII の発現と治療効果との関連

	EGFRvIII の発現	
治療効果	(-)	(+)
CR/PR	7	3
SD/PD	0	3

Fisher's exact probability test : $p < 0.05$

CR : complete response,

PR : partial response,

SD : stable disease,

PD : progressive disease.

図 2 EGFRvIII の発現と疾患特異的生存率

EGFRvIII の発現と疾患特異的生存率との間に有意な相関性はみられなかった。

図 3 EGFRvIII の発現と無増悪生存率

EGFRvIII の発現と無増悪生存率との間に有意な相関性はみられなかった。

その投与には十分な注意が必要である¹⁻⁷⁾。ざ瘡様皮疹の発現と治療効果との間には有意な相関があり，Grade 2 以上のざ瘡様皮疹が生じた症例では治療効果が高いと報告されている³⁰⁾。本検討ではざ瘡様皮疹と治療効果との関連に

ついては検討を行っていないが，基本的にはざ瘡様皮疹が発症した症例では高い治療効果が得られており治療を継続していく上で，ざ瘡様皮疹に対する対応は重要である。ざ瘡様皮疹等の皮膚障害に対してはセツキシマブ投与開始日

よりミノサイクリン塩酸塩の内服開始と保湿剤の塗布等のスキンケアを行っているが、症状が増悪傾向を示す場合には速やかに皮膚科にて専門的な加療を依頼することで治療を継続することができていた⁷⁾。Kiyota ら³¹⁾の頭頸部扁平上皮癌における術後再発高リスク症例に対する高用量シスプラチンを用いた術後化学放射線療法の第Ⅱ相試験において、予後不良となる因子のひとつに口腔癌が挙げられており、その特殊性が述べられている。そのため口腔癌におけるセツキシマブ療法についての治療効果予測因子の検索は治療方針の決定に関して有意義であると考えられる。

EGFR の変異型の一つである EGFRvIII は正常組織には発現がみられず、肺非小細胞癌、乳癌、卵巣癌での発現が報告されている³²⁻³⁶⁾。頭頸部癌での EGFRvIII の発現率は 17-42% とされている^{8, 13, 15)}。EGFRvIII は細胞外のリガンド結合ドメインに相当するエクソン 2 からエクソン 7 の領域のインフレーム欠失変異を持つものである^{36, 37)}。これにより EGFRvIII はリガンドおよびリガンドと同等の親和性を有し、その活性を阻害する抗 EGFR 抗体と結合できず、恒常的にリガンド非依存性に活性化され EGFRvIII の発現は腫瘍の増殖、転移、生存率と関連すると報告されている^{38, 39)}。Sok ら⁸⁾は頭頸部扁平上皮癌において EGFRvIII は腫瘍細胞の増殖と EGFR の分子標的治療薬に対する抵抗性に関与するとしている。また、EGFRvIII は STAT3 経路を活性化と HIF1- α を誘導することにより腫瘍細胞の遊走能・浸潤能に関与しセツキシマブ抵抗性の獲得に関わると報告されている⁴⁰⁾。また、頭頸部癌でのセツキシマブとドセタキセルを併用した化学療法施行例において EGFRvIII 発現例では疾患制御率と無増悪生存率の低下がみられた¹³⁾。EGFRvIII と p16 との関連について、これら 2 つの分子の発現に関連性はないと報告されており⁴¹⁾、通常、p16 発現陰性例において EGFRvIII 発現陽性が認められるために p16 陽性例と比較して予後不良とされている³⁹⁾。本検討では EGFRvIII の発現は 50.0% と既報告と同等であった^{8, 13)}。また、EGFRvIII の発現は治療効果と有意な相関がみられた。症例数が少数であることもあり EGFRvIII の発現と疾患特異的生存率や無増悪生存率との関連は不明であるが、治療効果との有意な相関があることから EGFRvIII の発現はセツキシマブ療法の治療効果の予測因子になる可能性が示唆された。

再発・進行頭頸部扁平上皮癌において HPV 感染状態はセツキシマブ療法の奏効率、無増殖生存率を向上させないとの報告もあるが¹²⁾、p16 陽性例での放射線療法、化学療法への上乗せ効果も報告されている^{10, 11, 14)}。中咽頭癌でのセツキシマブ併用放射線療法の検討では 2 年全生存率が p16 陽性例では 80%、p16 陰性例では 33% であり有意に改善したと報告されている¹¹⁾。一方で HPV 感染状態は放射線療法へのセツキシマブの上乗せ効果に影響を与えない

との報告もあり一定しない¹⁴⁾。HPV16 の主要な感染レセプターは α_6 インテグリンとされている⁴²⁾。HPV16 感染は中咽頭癌では病因、予後因子とされているが、口腔と中咽頭が連続しているにも関わらず、粘膜のウィルス結合レセプターの違いにより口腔粘膜での HPV の感染頻度は低く、口腔癌発症との明確な関係が示されていない。今後、これらの解明が待たれる。本検討においても、p16 陽性症例は 2 例と少数であることから p16 発現とセツキシマブ療法の治療効果との関連は不明であった。今後、症例数を増やして更なる検討が必要と考えている。

結 語

今回われわれはこれまでに治癒切除不能な再発・進行口腔癌症例の 18 例に対してセツキシマブを投与した。奏効率は 76.9% であった。EGFRvIII の発現は 50.0% で、p16 の発現は 14.3% であった。治療効果判定が可能であった 13 症例について EGFRvIII、p16 との発現との関連性を検討したところ、EGFRvIII の発現と治療効果の間にのみ有意な相関が認められ、EGFRvIII 発現症例ではセツキシマブ療法の治療効果が低下する可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（平成 27 年 1 月、奈良市）にて発表した。

本論文について申告すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) 前田剛司, 立松三千子, 他: セツキシマブ投与による Infusion Reaction の発現時期の検討. 癌と化療 38: 963-966, 2011.
- 2) Ishiguro, M., Watanabe, T., et al.: A Japanese post-market surveillance of cetuximab (Erbix[®]) in patients with metastatic colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol 42: 287-294, 2012.
- 3) 柴原弘明, 久世真悟, 他: Cetuximab 療法中に狭心症と間質性肺炎がみられ癌性リンパ管症で死亡した再発大腸癌の 1 例. 癌と化療 37: 2193-2198, 2010.
- 4) 塩入誠信, 長谷川誠, 他: mFOLFOX6+Cetuximab 療法で発症したと思われた間質性肺炎症例の検討. 癌と化療 39: 2198-2200, 2012.
- 5) Chua, W., Peters, M., et al.: Cetuximab-associated pulmonary toxicity. Clin Colorectal Cancer 8: 118-120, 2009.
- 6) De Vos, F.Y., Driessen, C.M., et al.: Cetuximab-induced pneumonitis in head and neck cancer patient. Oral Oncol 48: 17-18, 2012.
- 7) 山田慎一, 柳本惣市, 他: 当科における再発・進行口腔癌に対するセツキシマブ療法の治療経験—特に重篤な有害事象を認めた症例の検討—. 口腔腫瘍 26: 177-186, 2014.
- 8) Sok, J.C., Coppelli, F.M., et al.: Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck can-

- cer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12 : 5064-5073, 2006.
- 9) Fountzilas, G., Kalogera-Fountzila, A., et al.: MMP9 but Not EGFR, MET, ERCC1, P16, and P-53 Is Associated with Response to Concomitant Radiotherapy, Cetuximab, and Weekly Cisplatin in Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer. *J Oncol* doi : 10.1155/2009/305908, 2009.
 - 10) Ang, K.K., Zhang, Q., et al.: Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *J Clin Oncol* 32 : 2940-2950, 2014.
 - 11) Heiduschka, G., Grah, A., et al.: Significance of p16 expression in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and cetuximab. *Strahlenther Onkol* 190 : 832-838, 2014.
 - 12) Pogorzelski, M., Ting, S., et al.: Impact of human papilloma virus infection on the response of head and neck cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy. *Cell Death Dis* doi : 10.1038/cddis.2014.62, 2014.
 - 13) Tinhofer, I., Klinghammer, K., et al.: Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res* 17 : 5197-5204, 2011.
 - 14) Vermorken, J.B., Psyrri, A., et al.: Impact of tumor HPV status on outcome in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck receiving chemotherapy with or without cetuximab: retrospective analysis of the phase III EXTREME trial. *Ann Oncol* 25 : 801-807, 2014.
 - 15) Chau, N.G., Perez-Ordóñez, B., et al.: The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol* 2011 Feb 27;3:11. doi : 10.1186/1758-3284-3-11.
 - 16) Sugiyama, M., Bhawal, U.K., et al.: Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. *Br J Oral Maxillofac Surg* 45 : 116-122, 2007.
 - 17) Ragin, C.C., Taioli, E.: Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121 : 1813-1820, 2007.
 - 18) Babiker, A.Y., Rahmani, A.H., et al.: Expressional analysis of p16 and cytokeratin19 protein in the genesis of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Clin Exp Med* 7 : 1524-1530, 2014.
 - 19) 固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン (RECIST ガイドライン) —改訂版 version 1.1—日本語訳 JCOG 版 ver.1.0
 - 20) Bonner, J.A., Harari, P.M., et al.: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 9 : 567-578, 2006.
 - 21) Péron, J., Ceruse, P., et al.: Paclitaxel and cetuximab combination efficiency after the failure of a platinum-based chemotherapy in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs* 23 : 996-1001, 2012.
 - 22) Hitt, R., Irigoyen, A., et al.: Phase II study of the combination of cetuximab and weekly paclitaxel in the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Ann Oncol* 23 : 1016-1022, 2012.
 - 23) Vermorken, J.B., Mesia, R., et al.: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 11 : 1116-1127, 2008.
 - 24) Huang, T.Y., Hsu, L.P., et al.: Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins. *Oral Oncol* 46 : 49-55, 2010.
 - 25) Egloff, A.M., Grandis, J.: Epidermal Growth factor receptor-targeted molecular therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 10 : 639-647, 2006.
 - 26) Chung, C.H., Zhang, Q., et al.: Integrating Epidermal Growth Factor Receptor assay With Clinical Parameters Improves Risk Classification for Relaps and Survival in Head-and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81 : 331-338, 2011.
 - 27) Liao, C.T., Chang, J.T., et al.: Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann Surg Oncol* 15 : 915-922, 2008.
 - 28) Agra, I.M., Carvalho, A.L., et al.: Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134 : 743-749, 2008.
 - 29) Ang, K.K., Berkey, B.A., et al.: Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62 : 7350-7356, 2002.
 - 30) Bonner, J.A., Harari, P.M., et al.: Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11 : 21-28, 2010.
 - 31) Kiyota, N., Tahara, M., et al.: Phase II feasibility trial of adjuvant chemoradiotherapy with 3-weekly cisplatin for Japanese patients with post-operative high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *Jpn J Clin Oncol* 42 : 927-933, 2012.
 - 32) Garcia, de, Palazzo, I.E., Adams, G.P., et al.: Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 53 : 3217-3220, 1993.
 - 33) Moscatello, D.K., Holgado-Madruga, M., et al.: Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55 : 5536-5539, 1995.
 - 34) Ge, H., Gong, X., et al.: Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. *Int J Cancer* 98 : 357-361, 2002.
 - 35) Okamoto, I., Kenyon, L.C., et al.: Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 94 : 50-56, 2003.
 - 36) Bigner, S.H., Humphrey, P.A., et al.: Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50 : 8017-8022, 1990.
 - 37) Sugawa, N., Ekstrand, A.J., et al.: Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 87 : 8602-8606, 1990.
- 38) Sato, J.D., Kawamoto, T., et al.: Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1 : 511-529, 1983.
- 39) Pedersen, M.W., Meltorn, M., et al.: The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 12 : 745-760, 2001.
- 40) Wheeler, S.E., Suzuki, S., et al.: Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* 29 : 5135-5145, 2010.
- 41) Wheeler, S.E., Egloff, A.M., et al.: Challenges in EGFRvIII detection in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0117781. doi : 10.1371/journal.pone.0117781, 2015.
- 42) Yoon, C.K., Kim, K.D., et al.: α_6 Integrin is the Main Receptor of Human Papillomavirus Type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 283 : 668-673, 2001.

Investigation of expression of p16 and EGFRvIII and its correlation with the effects of treatment with cetuximab in oral cancer

Shin-ichi Yamada^{1,2)}, Souichi Yanamoto²⁾, Tomofumi Naruse²⁾,
Yuki Matsushita²⁾, Hidenori Takahashi²⁾, Eiji Kondo¹⁾,
Takahiro Kamata¹⁾, Masahiro Umeda²⁾ and Hiroshi Kurita¹⁾

¹⁾ Department of Dentistry and Oral Surgery, Shinshu University School of Medicine
(Chief: Prof. Hiroshi Kurita),

²⁾ Department of Clinical Oral Oncology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
(Chief: Prof. Masahiro Umeda)

Abstract

Although cetuximab, as a molecular-targeted drug against epidermal growth factor receptors, is expected to have significant therapeutic efficiency in oral cancer patients, it is important to apply cetuximab therapy to suitable cases and to deal with adverse effects such as infusion reaction and interstitial pneumonia during cetuximab therapy. In this report, we examined the expression levels of p16 and EGFRvIII in oral cancer patients to elucidate the association between the expression and the efficacy of cetuximab treatment. EGFRvIII expression was detected in 50.0% of oral cancer patients and p16 in 14.3%. A significant relation was detected only between EGFRvIII expression and the treatment efficacy with cetuximab.

Key words : oral cancer, molecular target drug, p16, EGFRvIII

Requests for reprints to: Dr. Yamada S., Department of Dentistry and Oral Surgery, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi Matsumoto, 390-8621, Japan