

学位論文

「 TP53 positivity combined with high fibrinogen expression defines
a subtype of oral squamous cell carcinoma with an unfavorable
prognosis 」

(口腔扁平上皮癌における p53/Fibrinogen 陽性癌は予後不良である)

DM 20002 井上 明美

北里大学大学院 医療系研究科 医学専攻 博士課程
生体構造医科学群 細胞・組織病理学
指導教授 高橋 博之

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

【背景・目的】

口腔癌は、顎顔面口腔領域に発生する悪性腫瘍の総称であり、その 90%以上は扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma ; OSCC) である。国立がん研究センターがん統計によると本邦における口腔癌による死亡者数および罹患者数は、先進国の中で唯一増加傾向にあり、過去 30 年間で約 3 倍の増加を認めている。

口腔は、飲食物や喫煙による化学的刺激、補綴物や歯列不正による物理的刺激に慢性的に暴露され易い器官であるため、発癌に係る特殊な環境と危険因子が常在的に複数存在し得ることは他の器官と大きく異なる。口腔は直接観察できる唯一の消化器官であるため異常を早期発見することが可能であるにもかかわらず、口腔粘膜は炎症性上皮変化が常態的に存在しやすいという特有の組織学的特徴を有する理由から、OSCC の確定診断に困難を要することが多い。

フィブリノゲン(FIB)は肝臓で産生される血液凝固第I因子であり、トロンビン作用によりフィブリンに変換されフィブリン血栓を形成する第二次止血作用を担う血漿タンパクである。近年、さまざまな悪性腫瘍において術前血漿 FIB 値 (Plasma FIB level) は高値を示し、血液凝固亢進は腫瘍進行を反映することが報告されているが、OSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子および予後との関連性についての報告は極めて少ない。そこで、本研究では、細胞培養、病理組織検体、血液検査データを用いて、OSCC における FIB 発現検索と臨床応用に向けた病理学的検討を試みた。

【対象】

2014 年～2016 年に北里大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて施行された口腔領域手術症例 OSCC 88 例および非腫瘍性口腔疾患(non-T) 23 例、計 111 例。

【方法】

OSCC と non-T の Plasma FIB level の比較を行った。次に OSCC 病理組織検体を用いて、FIB、p53、p16、CK17、Ki-67 の免疫染色を行った。FIB、p53、p16、CK17 は IHC score (陽性範囲スコアと染色強度スコアの積) を算出し、Ki-67 は腫瘍細胞 100 個中の陽性腫瘍細胞数を Labeling Index (LIs) とし、OSCC と non-T の比較、予後との関連性、Plasma FIB level との相関性について検討を行った。Plasma FIB level と FIB IHC score は臨床病理学的因子との相関性について検討した。また腫瘍浸潤先進部の間質組織における炎症細胞数スコアと出血スコア、これらを合計した炎症スコア(I-score) を算出し、各スコアについて FIB IHC score Low/High との関連性を検討した。また腫瘍間質における CD31 陽性血管内皮の確認による微小血管密度(MVD)、RNAscope assay による血管内皮増殖因子 *VEGF-A* mRNA 発現、RT-PCR による腫瘍細胞における

FGG mRNA 発現を検索し、各データについて FIB IHC score Low/High との相関性を検討した。さらに FIB、p53、p16 の IHC score について階層型クラスター解析を行い、各種マーカー発現の予後的意義を検討した。

また、ヒト舌扁平上皮癌細胞 (Human squamous carcinoma ;HSC-4) を用いて、FIB と癌細胞の増殖能、移動能、薬剤耐性能、EMT との相関性について検討した。さらに FIB IHC score および Plasma FIB level と EMT 関連マーカー発現との相関性について検討した。

【結果】

1. OSCC における Plasma FIB level は高値を示す

多くの悪性腫瘍において Plasma FIB level は高値を示すという報告がある。そこで、OSCC 症例と non-T 症例における Plasma FIB level の差異について血液検査データを用いて検討した結果、Plasma FIB level は、OSCC 患者が non-T 患者よりも有意に高値を示し、他の悪性腫瘍の報告と一致する結果であった。さらに臨床病理学因子との相関性については、Plasma FIB level は有意に腫瘍最大径と深達度を表す pT の進行および静脈侵襲(V)の増加を示し、Plasma FIB level 高値症例は低値症例に比べて全生存期間 (Overall Survival ; OS) で有意に予後不良であることが示された。

2. FIB IHC high score 症例は OSCC 予後不良である

OSCC 82 症例に対して FIB IHC score の評価を行った結果、FIB IHC high score 症例は有意に臨床病期(stage)と pT の進行および V の増加を示し、FIB IHC low score 症例に比べて OS で有意に予後不良であった。また、FIB、p53、p16、CK17 の IHC score、Ki-67 の LIs の各評価と Plasma FIB level の相関性を評価した結果、FIB IHC score とのみ有意差があり、Plasma FIB level 高値症例で有意に FIB IHC high score を示した。このことから、腫瘍細胞における FIB IHC score は術前 Plasma FIB level を反映している可能性が考えられた。

3. FIB IHC score は炎症および血管新生と相関する

腫瘍細胞増殖に伴い炎症、血管新生が生じる。そこで腫瘍細胞における FIB IHC score と炎症、血管新生との相関性を検索した結果、FIB IHC high score 症例は、FIB IHC low score 症例に比べて炎症スコア（腫瘍浸潤端の炎症細胞数スコア＋出血スコア）および CD31 陽性 MVD が高値を示し、さらに *VEGF-A* mRNA が高発現であった。このことから腫瘍細胞における FIB IHC high score 症例は、腫瘍の増殖や浸潤による炎症および血管新生を反映していることが考えられた。

4. IHC 評価結果による階層型クラスター解析

5 種のマーカー (FIB, p53, p16, CK17, Ki-67) について階層型クラスターリング解析を

行ったところ、OSCC を IHC 評価結果から 4 群の免疫プロファイルサブタイプ (Immunoprofile subtypes ;[IPS I-IV]) に分類できた。

FIB IHC score は、[IPS-II]で高値を示したのに対し、p53 IHC score は、[IPS-I]および [IPS-II]で高値を示した。また p16 IHC score は、[IPS-III]で有意に高値であった。CK-17 IHC score、KI-67 LIs はクラスタリンググループ間で異なる結果であった。したがって clustering groups 間で有意差の見られた 3 種の IHC マーカー (p53、FIB、p16)を用いて、[IPS-I] ; p53 high / FIB low、[IPS-II] ; p53 high / FIB high、[IPS-III] ; p53 low / p16 high、[IPS-IV] ; p53 low / p16 low に分類することができた。

5. 階層型クラスタリングと OSCC 予後との相関性

clustering groups 間で有意差の見られた 3 種の IHC マーカー (p53、FIB、p16) における IPS と OS との関連を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。その結果、[IPS-II] p53 high / FIB high が stage に関係なく最も有意に予後不良であることが示された。さらに、多変量 Cox 比例ハザード回帰分析では、Stage が独立した予後因子としての相関性が認められたが、単変量解析では、Plasma FIB level および FIB IHC score が OSCC における有意な予後不良因子であった。

6. FIB と癌細胞の増殖能、移動能、薬剤耐性能、EMT との相関性

ヒト舌扁平上皮癌株細胞 (HSC-4) は、FIB 刺激濃度によって細胞増殖能に差異は観察されなかったが、細胞周期関連マーカーのタンパク発現については FIB 濃度依存的に p21、p53 発現亢進が認められた。また、FIB 刺激は CDDP 耐性能には影響を与えなかった。しかし、FIB 濃度依存的かつ経時的に敷石状の細胞増殖形態から細胞間接着能低下や紡錘形細胞形態への変化と移動能の亢進を認めた。さらに FIB 濃度依存的に E-cadherin 発現低下、Vimentin 発現亢進を認めた。このことから FIB 濃度が高いほど EMT が有意に誘導されている可能性が高いことが示された。病理組織検体を用いて IHC を行った結果では、FIB IHC high score 症例で E-cadherin 発現低下、Vimentin および SOX2 発現亢進を認めた。また、OSCC における Plasma FIB level 高値症例は、有意に E-cadherin 発現低下、ALDH1、Vimentin、Snail 発現亢進を認めた。これらの知見から培養細胞、病理組織検体、血液検査データにおいて、FIB は EMT 関連マーカーと有意な相関性を示しており、FIB は EMT 誘導を促進し OSCC 腫瘍進展および予後に関与する機能を有している可能性が示唆された。

【考察】

本研究では、IHC を用いた簡略化分類システムとして OSCC における予後不良サブタイプ分類を示すことができた。特に、OSCC [IPS-II] p53 high / FIB high 症例は、stage とは無関係に有意に予後不良であることが示された。p53 IHC high score 症例は OS にて有意に予後不良であったが、FIB との組み合わせでより予後不良のグループを選別

することが可能となった。また機能解析により、FIB は EMT 誘導を促進し OSCC 腫瘍進展および予後に関与する機能を有している可能性が考えられる。

OSCC 腫瘍細胞における FIB IHC score は、fibrinogen γ chains である *FGG* mRNA との相関関係を認めなかった。TCGA data analysis で *FGA* mRNA、*FGB* mRNA、*FGG* mRNA の各 FIB アイソフォーム間で相関が見られたことを勘案すると、OSCC 腫瘍細胞における FIB IHC score は、mRNA レベルとは無関係に両者は高値を示しているといえる。さらに OSCC における FIB IHC high score 症例は、腫瘍細胞増殖に伴い炎症反応および血管新生が誘導されることにより、肝臓で合成された FIB が血管を介して腫瘍細胞に辿り着きやすい微小環境となっている可能性が高いと考えられる。

高 FIB 血症および腫瘍関連全身性炎症反応は、腫瘍進行および予後と有意な関連性を有する報告が認められており、今回の結果と一致している。しかし現在までに IHC を用いて腫瘍組織における FIB 検索と悪性腫瘍の予後との相関性を検討した報告はほとんどない。今回の報告は、OSCC における FIB と臨床病理学的因子および予後との相関性について IHC を用いて検討した最初の報告である。

今回の結果から、FIB は OSCC において臨床病理学的悪性度評価を行うための重要な因子であると考えられる。しかし臨床的応用につなげるためには、さらなる機能解析を含めた詳細な検討および多施設による大規模な研究が必要である。

【結論】

OSCC を 3 種のマーカー(p53、FIB、p16)を用いて 4 群の免疫プロファイルサブタイプに分類することにより、OSCC の予後診断の精度向上につながった。この分類は OSCC における新たな診断法の確立に向けた分子基盤の構築となり得ると考えられる。また、FIB は EMT を誘導することにより腫瘍進展を促進する機能を有している可能性が示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 材料・方法	
2-1. Meta-Analysis	2
2-2. 臨床材料	2
2-3. 抗体	2
2-4. 免疫組織化学染色(IHC)	3
2-5. Hierarchical cluster analysis	3
2-6. TCGA data analysis	3
2-7. 炎症と血管新生の評価	4
2-8. RNA scope assay for <i>VEGFA</i> mRNA in situ hybridization	4
2-9. Reverse Transcription (RT)-PCR	4
2-10. Statistical Analysis	4
2-11. 細胞増殖能および細胞形態変化	5
2-12. シス-ジアンミンジクロロ白金製剤 cisplatin ; CDDP に対する薬剤耐性能	5
2-13. Wound Healing Assay	6
2-14. Migration Assay	6
2-15. Western Blotting	6
3. 結果	
3-1. Meta-Analysis	7
3-2. OSCC における Plasma FIB level の意義の検討	7
3-3. OSCC における FIB IHC score の意義の検討	8
3-4. FIB IHC score と炎症反応および血管新生との相関性	8
3-5. Cluster Analysis	
3-5-1. Hierarchical cluster analysis	9
3-5-2. Immunoprofile group における予後の検討	9
3-6. TCGA data analysis	9
3-7. FIB と癌細胞の増殖能、移動能、薬剤耐性能、EMT との相関性の検討	9
4. 考察	11
5. 総括	13
6. 今後の課題	14

7. 謝辞	15
8. 引用文献	16
9. 業績目録	20
10. 図表	
図 1. HNSCC における文献抽出のフローチャート図	22
図 2. HNSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子のメタアナリシス (Forest plots)	23
図 3. Plasma FIB level と臨床病理学的因子のメタアナリシス (Funnel plots)	24
図 4. OSCC/non-T 症例における Plasma FIB level および腫瘍マーカー(CEA,SCC)値の差異	25
図 5. OSCC/non-T 症例における 5 種の IHC マーカー発現の相関性	26
図 6. OSCC における Plasma FIB level と 5 種の IHC マーカー発現の相関性	27
図 7. OSCC における Plasma FIB level および 5 種の IHC マーカーと OS の関係	28
図 8. OSCC における炎症と血管新生との関連性	29
図 9. OSCC における <i>FGG</i> mRNA 発現量と FIB IHC score の相関性	31
図 10. OSCC における階層型クラスタリング解析	32
図 11. OSCC における免疫プロファイルグループ【IPS I - IV】と予後の関連性	34
図 12. OSCC における FIB をコードする mRNA 間の相関性	36
図 13. HNSCC における FIB をコードする <i>FGA</i> 、 <i>FGB</i> 、 <i>FGG</i> mRNA 発現と予後の関係	38
図 14. FIB が HSC-4 に与える影響(細胞増殖能の検討)	40
図 15. FIB が HSC-4 に与える影響(CDDP に対する耐性能の検討)	41
図 16. FIB が HSC-4 に与える影響(細胞形態変化の検討)	42
図 17. FIB が HSC-4 に与える影響(細胞移動能および EMT 関連マーカー発現の検討)	43
図 18. FIB IHC score と EMT 関連マーカーの相関性	45
表 1. HNSCC におけるメタアナリシス解析のための症例対照研究の evidence table	46
表 2. HNSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子とのメタアナリシス	47
表 3. OSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子との相関性	48
表 4. OSCC における FIB IHC score と臨床病理学的因子との相関性	49
表 5. OSCC における全生存期間の単変量解析および多変量解析	50

1. 序論

口腔癌は、顎顔面口腔領域に発生する悪性腫瘍の総称である[1] [2] [3]。UICC 分類では、口腔 6 部位（頬粘膜、上顎/下顎歯肉歯槽粘膜、硬口蓋、舌、口腔底）に発生した上皮性悪性腫瘍を総括して口腔癌と定義している[4]。組織型の 90%以上は口腔粘膜から発生する扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma; OSCC)であり、解剖学的好発部位としては舌側縁が約 60%を占め、最も多い[5] [6] [7] [8] [9]。

本邦は、高齢人口の増加に伴い口腔癌罹患患者数は増加傾向にあるが、欧米に比べて歯科医療従事者による口腔癌検診の啓発運動が極めて遅れていることもあり、先進国の中で唯一、口腔癌による死亡者数の顕著な増加が認められる[10]。

口腔は、呼吸器、消化器の入り口として、ウィルスや細菌の侵入門戸になっていると同時に、飲食物や喫煙による化学的刺激、歯列不正、歯科補綴物、義歯による機械的刺激に慢性的に暴露され易い。そのため発癌にかかわる特殊な環境と危険因子が常在的に複数存在し得ることは他の器官と大きく異なる。

口腔は直接観察することができるため比較的異変を発見しやすいにもかかわらず、炎症性上皮変化が常態的に存在し反応性異型を伴う上皮変化がしばしばみられることから腫瘍性病変の確定診断に苦慮することが多い[4] [11] [12]。現時点では OSCC の早期発見に役立つ腫瘍マーカーが発見されていないため[13] [14]、OSCC の簡便かつ迅速な確定診断および悪性度の鑑別を行い、かつ予後を予測できる補助診断システム構築が喫緊の課題であると考えられる。

フィブリノゲン(Fibrinogen; FIB)は、肝臓で生成される血液凝固第I因子であり、血液凝固の最終段階でトロンビンによってフィブリンに変換され、凝固血栓を作る止血機構の中心的な役割を担う血漿タンパクである[15] [16]。近年、食道扁平上皮癌、腎細胞癌等さまざまな悪性腫瘍において術前血漿 FIB 濃度 (Plasma FIB level) は臨床病理学的因子や予後との相関性があることが報告されており[17] [18] [19]、凝固系亢進は癌の進行を反映していることが知られている[20] [21] [22]。

しかし、現在までに OSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子や予後との関連性について検討した報告は極めて少ない。本研究は、OSCC における FIB 発現検索と臨床応用に向けた病理学的検討を試みた報告である。

2. 材料・方法

2-1. Meta-Analysis

OSCC は頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma ;HNSCC) に含まれるため[23]、FIB と HNSCC の臨床病理学的因子との相関性についてメタアナリシスを行った。メタアナリシスは 2020 Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement に準拠した[24]。まず PubMed、Web of Science および Embase データベースを用いて 2024 年 2 月 15 日までに報告された論文を検索した。検索キーワードは、”head and neck squamous cell carcinoma”、”fibrinogen”、”clinicopathological finding”とし、Review Manager 5.4 (Cochrane Collaboration, Oxford, UK) を用いて統計解析を行い、データと効果推定値を統合した。選択した研究間で母集団に差があると推定されたため、ランダム効果モデルを用いた。効果の推定値は 95%信頼区間 (CI) で提示し、介入効果はオッズ比 (OR) を用いて、研究間の異質性は、 I^2 値を用いた。出版バイアスは主要評価項目として funnel plot を用いて評価した。

2-2. 臨床材料

2014 年 1 月 1 日～2016 年 12 月 31 日に北里大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において施行された口腔領域手術検体として、OSCC 88 症例、non-T (非腫瘍性口腔疾患) 23 症例、計 111 症例を対象とした。対象症例の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋病理組織検体および術前 Plasma FIB level、carcinoembryonic antigen (CEA)および squamous cell carcinoma related antigen (SCC)を用いて検討を行った。患者の平均年齢は 61.15 歳 (42-92 歳)、stage I 40 症例、stage II- IV 42 症例で、術前化学療法や放射線療法を受けた患者は含まれてない。本研究は北里大学医学部倫理委員会 (B21-165)により承認された。

2-3. 抗体

抗 FIB 抗体、抗 β -actin 抗体、抗 Snail 抗体および抗 SOX2 抗体は Abcam (Cambridge, UK)を使用した。また、抗 p16 抗体、抗 p27 抗体、抗 ALDH1 抗体および抗 N-cadherin 抗体は BD Biosciences (San Jose, CA,USA)、抗 p53 抗体は Leica Biosystems (Buffalo Grove, IL, USA)、抗 Ki-67 抗体、抗 CK17 抗体、抗 CD31 抗体、抗 E-cadherin 抗体および抗 p21 抗体は Dako (Copenhagen, Denmark)、抗 Vimentin 抗体は Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)、抗 Cyclin A 抗体は NCL (cat: NCL-CYCLIN A)、Cyclin B1 抗体は Protein-tech (Rosemont, IL, USA)、抗 Cyclin E 抗体は BD Pharmingen (San Jose, CA,USA) を使用した。

2-4. 免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry; IHC)

3 μ m 厚の FFPE 材料切片を脱パラフィン処理後、0.3%過酸化水素水で 30 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。次にスライドガラスを 10 mM Citrate buffer (pH 6.0)または Tris-EDTA buffer (pH 9.0)に浸した状態で、電子レンジを用いて 15 分 (5 分 \times 3 回)加熱処理をし、抗原賦活を行った。最適希釈倍率に調整した一次抗体を 4°C で 24 時間インキュベートし、二次抗体ヒストファイン (NICHIREI BIOSCIENCES) を 30 分間室温にて反応させた後、Stable DAB(Invitrogen)にて発色反応を行った。核染色には Mayer's Hematoxylin を用いて行った。FIB、p53、p16、CK17 の IHC 評価は、核または細胞質の IHC スコアリングを行い評価した。染色強度は 4 段階 (0 :陰性、1 :弱陽性、2 :中等度陽性、3 :強陽性)、染色範囲は腫瘍細胞における陽性細胞数の割合(%)を 5 段階 (0 :0%、1 :<10%、2 :10-30%、3 :30-50%、4 :>50%) にて評価し、染色強度 \times 染色範囲 = IHC score として評価した。IHC score は、Low<6、High \geq 6 とした。また Ki-67 核陽性率の評価については、500 個以上腫瘍細胞がある 4 視野を無作為に選択し、Ki-67 核陽性細胞の 4 視野平均(%)を Labeling Index (LIs) として評価した[25] [26] [27] [28]。

2-5. Hierarchical cluster analysis

FIB、p53、p16 の IHC で得られた結果から、Ward 法と R software Version 4.11 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を用いて階層型クラスター解析を行った。IHC score level に基づいて色分けし、赤色は IHC high score (IHC score or LI >平均+SD)、橙色は IHC middle score (IHC score or LI 平均 \pm SD)、緑色は IHC low score (IHC score or LI <平均-SD)で表示した。さらに予後との関連とその意義を検討するため、各 IHC score または LI における平均値を cut off 値とし、IHC score Low/High における Kaplan-Meier 生存曲線を用いて検討した[29]。

2-6. TCGA data analysis

FIB アイソフォームである *FGA* mRNA、*FGB* mRNA、*FGG* mRNA (RNA Seq V2 PSEM)について、OSCC における各アイソフォーム間の発現量の相関性を検討した。OSCC における *FGA* mRNA、*FGB* mRNA、*FGG* mRNA 各発現量と全生存期間 (Overall survival; OS)および無増悪生存期間 (Progression Free Survival; PFS)については抽出できなかったため、OSCC は HNSCC に含まれることから[23]、HNSCC 448 症例における *FGA* mRNA、*FGB* mRNA、*FGG* mRNA 各発現量と OS、PFS の相関性について cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org>、2021/8/14 最終 access) からデータを抽出し Z score (cut-off 値 0.5)に基づき検討した。

2-7. 炎症と血管新生の評価

炎症は、FIB IHC score Low/High 各 21 症例の HE 染色標本を用いて評価した。(1)腫瘍浸潤端における炎症細胞数スコア、(2)出血スコアをそれぞれ評価し、各数値を加算した値を炎症スコア(I-score)とした。(1)炎症細胞数スコアは、腫瘍浸潤端における炎症細胞数を 1 症例につき 3 視野評価した平均値を 1. mild (<25 個)、2. moderate (25-125 個)、3. severe (>125 個)として評価した。(2)出血スコアは、腫瘍領域に対する出血領域の割合を 1 症例につき 3 視野評価した平均値を 0 (<10%)、1 (10-30%)、2 (30-50%)、3 (>50%)として評価した。ここから算出された I-score と FIB IHC score の相関性を検討した。

血管新生は、FIB IHC score Low/High 各 21 症例の CD31 染色標本を用いて評価した。強拡大 5 視野における CD31 陽性微小血管数の平均値を微小血管密度(MVD)として、FIB IHC score との相関性を検討した[30] [31] [32]。

2-8. RNAscope assay for *VEGFA* mRNA in situ hybridization

Vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*) mRNA 発現を RNAscope assay (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA) を用いてプロトコルに従い解析した。FFPE 切片を 98°Cにて 15 分間インキュベートした後、Proteinase Plus で 40°Cにて 30 分間処理した。Hybridization は、targeted probes:hs-*VEGFA* (#423161)、positive control probe (#2010684)、negative control probe (#310043) を用いて、40°Cにて 2 時間行った。Signal は 3,3'-diaminobenzidine にて可視化し、Mayer's Hematoxylin にて核の counter 染色を行った。

2-9. Reverse transcription (RT) - PCR

FIB IHC score Low/High 各 3 症例について、NucleoSpin total RNA FFPE kit (MACHEREY-NAGEL) を用いてプロトコルに従い、10μm 厚 FFPE 切片から total RNA を抽出し、total RNA 1μg から cDNA 合成を行い、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて real time RT-PCR を行った。蛍光シグナルは ABI 7500 Real-Time PCR System SDS Software version 1.4.0.25 (Applied Biosystems)を用いて検出した。用いた *FGG* mRNA の特異的 primer を以下に示す。5'-GACTGGAATGGCAGAACC-3' (forward) , 5'-GCCATCAAAGGCATCTCC-3' (reverse) .

2-10. Statistical Analysis

カイ二乗検定、Mann-Whitney U 検定、Spearman 相関係数を用いて比較データを解析した。全生存期間 (OS) は発症から死亡または最終追跡評価日までの期

間を算出し、Kaplan-Meier 法を用いて推定し、統計的比較は log-rank 検定を用いて行った。単変量解析および多変量解析は Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて行った。統計的有意性の cut-off 値は $p < 0.05$ とした。

2-11. 細胞増殖能および細胞形態変化

ヒト舌扁平上皮癌株化細胞 (Human squamous carcinoma; HSC-4 (JCRB Cell Bank, JCRB0624)) を用いて、FIB 刺激濃度差による細胞増殖能の差異を検討した。HSC-4 (1×10^5 cell/mL) を 3cm ディッシュに播種したものを 9 枚準備し、Minimum Essential Medium; MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) に 10% fetal bovine serum ;FBS 加えた培地を用いて、37°C、50%CO₂、24 時間インキュベートした。FBS を除いた MEM に培地交換し、FIB (Fibrinogen, Human Plasma ;Sigma Aldrich #341576) を各 0μg/mL、1.0μg/mL、2.0μg/mL 刺激した。37°C、50%CO₂ にてインキュベートし、刺激 2 日後、4 日後、6 日後において、各日 HSC-4 の細胞形態変化を慎重に観察し光学顕微鏡下にて写真を記録した後、Trypsin-EDTA (0.25%) phenol red (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて細胞を全て回収して cell count を行った。cell count は、Trypan Blue solution (0.4%) (Sigma-Aldrich Japan G.K.) を用いて光学顕微鏡下(×20)における生細胞数を 2 視野について行い、平均値 ($\times 10^5$ cells / mL) を算出して評価した。さらに、細胞周期関連のタンパク発現の変化を検討するため、FIB 0μg/mL、1.0μg/mL、2.0μg/mL で刺激した各々の細胞を全て回収しタンパク抽出を行い、抽出できたタンパク濃度により適量に調整した sample を用いて Western Blotting にて細胞周期関連マーカーのタンパク発現の検討を行った。

2-12. シス-ジアンミンジクロロ白金製剤 cisplatin ; CDDP に対する薬剤耐性能

口腔扁平上皮癌における抗腫瘍薬として使用されている白金製剤であるシスプラチン製剤(シス-ジアンミンジクロロ白金製剤 cisplatin ; CDDP)に対する薬剤耐性能について、FIB が影響を与えるか検討するために、HSC-4 (1×10^5 cell/mL) を 3cm ディッシュに播種したものを 12 枚準備し、37°C、50%CO₂、24 時間インキュベートした。細胞が全て 3cm ディッシュ底面に接着していることを確認した後、FIB を 0μg/mL、2.0μg/mL、4.0μg/mL 刺激し、続いて CDDP を 0μM、2μM、5μM、10μM 刺激して 37°C、50%CO₂、24 時間インキュベートした。FIB および CDDP 刺激直後を 0 時間として、6 時間後、12 時間後、24 時間後における HSC-4 細胞形態変化の様子を光学顕微鏡下にて慎重に観察した後、FIB および CDDP 刺激 24 時間後の細胞をセルスクレーパーにて全て回収し、タンパク抽出を行った。

2-13. Wound Healing Assay

FIB 刺激濃度差による HSC-4 細胞の移動能の差異を検討した。HSC-4 を MEM +10%FBS 培地 1mL を入れた直径 3cm ディッシュに播種し、insert well に HSC-4 (1×10^5 cell/mL) 懸濁液を 70 μ L 入れ、37°C、50%CO₂ 下にて 24 時間インキュベートした。insert well 内の細胞が単層 confluence であることを光学顕微鏡下にて確認した後、MEM (FBS -) 培地に静かに交換し、FIB を各々 0 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL にて刺激した。insert well を取り除き、0 時間、3 時間、6 時間、9 時間毎の創傷を埋める細胞移動能の様子を観察した。評価は Image J を用いて算出した。FIB 刺激 0 時間時点の創傷の面積を 100% として、経時的および各 FIB 濃度における創傷面積を % で算出しその差異を評価した[33] [34] [35] [36]。

2-14. Migration Assay

Migration assay kit を用いて行った。24 well plate に MEM(10% FBS+) を 750 μ L 入れ、ポリカーボネートメンブレンインサート(孔径 24 μ m) を置き、HSC-4 (2×10^4 cell/mL) に FIB 0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、4.0 μ g/mL 加えた MEM(10%FBS-) を 500 μ L 入れ、37°C、CO₂ 50%、24 時間インキュベートした後、HE 染色を行い光学顕微鏡下 ($\times 20$) にてポリカーボネート膜の細孔を通過した細胞数を各々カウントし、FIB 0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、4.0 μ g/mL における細胞の移動能の差異を定量化して評価した[29] [37]。

2-15. Western Blotting

FIB 刺激をした HSC-4 を全て回収し、RIPA- buffer [20mM Tris-HCl (pH7.2)], inhibitor、EDTA を用いてタンパクを抽出した。Total protein 10 μ g に調整したタンパクを 10%SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜 Immobilon-P (Merck) へ転写した。一次抗体を 4°C、24 時間、二次抗体 (抗 Mouse IgG HRP (DAKO, P0447) または抗 Rabbit IgG HRP (Cytiva Japan, NA934)) を常温、60 分反応させ、検出器(WSE-6200H Lumino GraphII (ATTO)) にて目的とするタンパクの検出を行った[25] [33] [34] [35]。

3. 結果

3-1. Meta-Analysis

PubMed、Web of Science、Embase のデータベースを用いたキーワード検索により、それぞれ 37 件、26 件、64 件の論文を検索し、重複した報告を除外した結果、86 件の報告が抽出できた (図 1)。最初のスクリーニングでは、症例報告、総説論文、抄録のみ、日本語と英語以外の言語、ヒト以外の研究、Plasma FIB level と HNSCC の臨床病理学的因子との関係が検討されていない論文のため除外し、残った 9 件の報告のうち 2 件の研究は、HNSCC 以外の腫瘍を含む研究、統計解析が利用不可との理由から除外した。

最終的に残った合計 1062 人の患者を含む 7 論文についてメタアナリシス解析を行った (表 1)。その結果、HNSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子は、pT (OR = 2.47、95%CI、1.46 – 4.16 ; $I^2 = 66.0\%$; $P = 0.0007$) および TMN stage (OR = 2.04、95%CI、1.13 – 3.67 ; $I^2 = 70.0\%$; $P = 0.02$) と有意な相関性を認めたが (表 2) (図 2)、pT、stage どちらも異質性が高い状態であった。また funnel plot を用いて検討した結果、pT、stage どちらも公表バイアスが見られ (図 3)、信頼性としては低い結果であった。

3-2. OSCC における Plasma FIB level の意義の検討

OSCC における潜在的バイオマーカーとしての FIB の有用性を明らかにするため、血液検査データを用いて OSCC 患者と non-T 患者の Plasma FIB level を検証した。血中 CEA および SCC について検討したところ、OSCC 患者と non-T 患者の間に差は認められなかった。しかし、Plasma FIB level は OSCC 患者が non-T 患者に比べて有意に高値であった (図 4A)。さらに OSCC 患者と non-T 患者の ROC 曲線を描いて比較検討したところ、Plasma FIB level 342mg/dL を cut-off 値とした時の ROC 曲線下面積(AUC)は 0.745 であった。よって本研究における Plasma FIB level の cut-off 値を 342mg/dL と定めた (図 4B)。

Plasma FIB level と臨床病理学的因子との関連を (表 3) に示す。Plasma FIB level は、腫瘍最大径と深達度 (pT) および静脈侵襲 (V) と有意に相関しており、Plasma FIB high level で pT3 以上と V positive を多く認めた。

OSCC 患者および non-T 患者 105 症例の病理組織検体を用いて、HE 染色による病理組織診断の補助として用いられることのある 4 種の分子マーカー p53、p16、CK17、Ki-67 について IHC を行った。OSCC は、non-T に比べていずれも IHC high score を示し、IHC score および LI はいずれも有意に高値を示した。同様に FIB IHC score についても OSCC は non-T と比べて IHC high score を示し有意に高値を示す結果であった (図 5)。

OSCC 患者における Plasma FIB level Low/High について FIB、p53、p16、CK17、Ki-67 の IHC score または LI の差異を検討したところ、Plasma FIB level 高値症例では、FIB IHC score が有意に high score を示すことが明らかとなった。しかし、Plasma FIB level と p53、p16、CK17 の IHC score および Ki-67 の LI との間には相関性が認められなかった (図 6)。また、Plasma FIB level 高値症例は OS が低く予後不良であった (図 7A)。

3-3. OSCC における FIB IHC score の意義の検討

FIB IHC score と臨床病理学因子との相関性について検討した。Plasma FIB level と有意な相関性を示した pT および V に加えて、臨床病期 (stage) およびリンパ管侵襲 (Ly) と有意な相関性を示す結果であり (表 4)、FIB IHC high score で pT2 以上、V、stageII 以上を多く認めた。しかし、FIB IHC high score で Ly negative を多く認め、リンパ節転移とは有意な相関性は認めなかった。

FIB IHC score および各種分子マーカーにおける IHC score と予後との関連性を Kaplan-Meier 生存曲線にて検討した (図 7B-F)。4 種の分子マーカー p53、p16、CK17、Ki-67 における IHC score および LI 高値症例は予後不良であることが示されたと共に FIB IHC high score 症例においても OS が低く予後不良を認め、FIB と予後との関連性が示された。

3-4. FIB IHC score と炎症反応および血管新生との相関性

OSCC 組織標本における 2 つの炎症パラメーターである(1)腫瘍浸潤端の炎症細胞数スコア、(2)出血スコアを足し合わせて算出した I-score と FIB IHC score との相関性を検討した結果、FIB IHC high score 症例では有意差が認められなかったものの出血スコアは高い傾向が示された。また腫瘍浸潤端における炎症細胞数スコアおよび I-score は、FIB IHC high score 症例で有意に高値を認めた (図 8A)。OSCC 組織標本における CD31 陽性微小血管密度(MVD)を検討したところ、FIB IHC high score 症例では CD31 陽性 MVD 増加が認められ、その差は統計学的に有意であった (図 8B)。また、FIB IHC high score 症例の OSCC 組織は、顕著な *VEGF-A* mRNA 陽性を認めた (図 8C)。これらの結果から FIB IHC high score 症例は、高い炎症反応および血管新生増加と有意な相関性を示すことが明らかとなった。

さらに、腫瘍細胞で FIB IHC が陽性となる誘因は、腫瘍細胞自身が FIB を発現しているのか、それとも肝由来 FIB が血管を介して腫瘍細胞に辿り着いて腫瘍細胞に接着しているのかを検証するため、OSCC 組織における FIB IHC score と *FGG* mRNA 発現との間の相関性の有無を調べた。その結果、両者には有意な相関性は認められなかった (図 9)。したがって、OSCC 腫瘍細胞が FIB IHC 陽

性となる誘因は、後者による可能性が高いと推察する。

3-5. Cluster Analysis

3-5-1. Hierarchical cluster analysis

OSCC における 5 種の分子マーカーの IHC 評価結果に基づいて階層型クラスタリング解析を行った (図 10A)。FIB IHC score は【IPS II】で有意に高値を示し、p53 IHC score は【IPS-I】および【IPS-II】で有意に高値を示した。さらに、p16 IHC score は【IPS-III】で有意に高値を示した。しかし、CK17 IHC score と Ki-67 LI は clustering groups 間で有意差は見られなかった (図 10B)。これらの結果から、clustering groups 間で有意差の見られた 3 種の IHC マーカーである p53、FIB、p16 を用いて、OSCC を p53 high/FIB low【IPS-I】、p53 high/FIB high【IPS-II】、p53 low/p16 high【IPS-III】、p53 low/p16 low【IPS-IV】という 4 つの免疫プロファイルサブタイプ【IPS】に分類することができた (図 11A)。

3-5-2. Immunoprofile group における予後の検討

Cluster analysis で得られた full-range clustering groups に予後予測能があるかを確認するため Kaplan–Meier 生存曲線により、OS を用いて検討した結果、p53 high/FIB high【IPS-II】は stageにかかわらず有意に OS が不良であることが示された (図 11B)。さらに、多変量 Cox 比例ハザード回帰分析では、Stage が独立した予後因子としての相関性が認められたが、単変量解析では、Plasma FIB level および FIB IHC score が OSCC における有意な予後不良因子であることが明らかとなった (表 5)。

3-6. TCGA data analysis

TCGA データから得られた 3 つの FIB コード遺伝子(*FGA*、*FGB*、*FGG*) mRNA について検討した結果、OSCC における各 FIB アイソフォーム間の mRNA 発現量には正の相関が認められた (図 12)。また、HNSCC における各 FIB アイソトープ mRNA 高発現症例は、低発現症例に比べて予後が不良であることが示された (図 13)。

3-7. FIB と癌細胞の増殖能、移動能、薬剤耐性能、EMT との相関性の検討

ヒト舌扁平上皮癌細胞 (Human squamous carcinoma; HSC-4) への FIB 刺激による細胞増殖能や細胞周期の影響を検討した結果、FIB 刺激濃度によって細胞増殖能に差異は観察されなかった (図 14A)。細胞周期関連マーカーのタンパク発現を確認した結果、FIB 濃度依存的に p21、p53 発現亢進が認められた (図 14B)。また、FIB 刺激は CDDP 耐性能には影響を与えなかった (図 15)。FIB 刺激によ

る細胞形態変化を光学顕微鏡で観察したところ、FIB 濃度依存的かつ経時的に敷石状の細胞増殖形態から細胞間接着能低下や紡錘形細胞形態へと変化する様子が観察された（図 16）。FIB 刺激と OSCC の移動能との関係性を評価する目的で施行した Wound Healing Assay と Migration Assay の結果、FIB 濃度依存的に OSCC 細胞は移動能の亢進を認めた（図 17A, B）。FIB 刺激濃度差による EMT 関連マーカー（E-cadherin、N-cadherin、ALDH1、Vimentin、SOX2、Snail）発現の差異を検討した結果、FIB 濃度依存的に E-cadherin 発現低下、Vimentin 発現亢進を認めた（図 17C）。このことから FIB 濃度が高いほど EMT が有意に誘導されている可能性が高いことが示された。

病理組織検体を用いて IHC を行い FIB IHC score Low/High における EMT 関連マーカー（E-cadherin、ALDH1、Vimentin、SOX2、Snail）発現の差異を検討した結果、FIB IHC high score 症例は統計学的有意に E-cadherin 発現低下、Vimentin および SOX2 発現亢進を認めた（図 18A,B）。

4. 考察

本研究では、OSCC 症例の Plasma FIB level は non-T 症例と比較して有意に高値で、臨床病理学的因子の pT および V と有意な相関性を示した。FIB IHC score は、pT および V に加えて Ly や Stage とも有意な相関性を示し、FIB が腫瘍進行にかかわっている可能性が示唆された。さらに、腫瘍細胞における FIB 陽性症例における OS については、血漿 FIB 高値症例における OS よりも統計学的有意差が大きく、明らかな予後不良を示す結果であった。

また、OSCC における FIB IHC score は fibrinogen γ chains である *FGG* mRNA 発現との相関性を認めず、TCGA data analysis で *FGA* mRNA、*FGB* mRNA、*FGG* mRNA の各 FIB アイソフォーム間で相関が見られたことも勘案すると、OSCC 腫瘍細胞における FIB IHC score は、mRNA とは無関係に high score を示していることが示唆された。さらに、FIB IHC high score 症例では、腫瘍浸潤端の炎症細胞数スコアと I-score が有意に高値となり、CD31 陽性 MVD および *VEGF* mRNA レベルも高値を示した。これらのことから OSCC における FIB IHC score は、腫瘍進展に伴って腫瘍周囲に炎症、血管新生が促進され、肝臓で合成された FIB が血管を介して腫瘍細胞に辿り着き、接着している微小環境を反映している可能性が考えられる。

FIB は、急性炎症や組織変性が生じると肝臓における合成が大幅に増加し、循環血液中のタンパク量が増加する急性期反応物質である[37]。多くの悪性腫瘍において術前 Plasma FIB level が高値であると予後不良であることが報告されており、肺癌患者においては術前 Plasma FIB level は、全生存期間（Overall Survival; OS）、無病生存期間（Disease-Free Survival; DFS）、無増悪生存期間（Progression Free Survival; PFS）で予後不良であったという報告[38]や、大腸癌においても術前 Plasma FIB level は、年齢、腫瘍分化度、腫瘍の占拠部位、pT および TNM Stage といった臨床病理学的因子と相関し、Plasma FIB level 高値症例は全生存期間（Overall Survival ; OS）および、がん特異的生存率（Cancer specific survival）で予後不良因子となるという報告がある[39]。また Plasma FIB level 高値症例および腫瘍関連全身性炎症反応は、腫瘍進展に関連し予後不良となるという報告があり[40]、今回の我々の結果と一致している。しかし現在までに病理組織検体を用いて FIB と悪性腫瘍との関連性を検討した報告は極めて少なく、特に FIB と OSCC 組織について検討した報告としては本研究が最初である[41]。

さらに本研究では、病理組織検体を用いた IHC の結果に基づいた階層型クラスティング解析を行い、OSCC 予後予測のための簡略化された分類を確立することができ、OSCC (p53 high/FIB high) 【IPS II】の症例は、他のグループ【IPS I, III, IV】の症例と比較して stageにかかわらず有意に予後不良であることが示された。

多変量 Cox 回帰解析の結果からは、OSCC (p53 high / FIB high) 【IPS II】 が独立した予後因子であることは示すことはできなかったが、臨床的に重要な OSCC グループを新たに提唱することができた。ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus; HPV) 陰性 OSCC 患者では TP53 が変異していると報告されているが[42]、今回の免疫プロファイルクラスターでは、p53 high / p16 low 15 症例、p53 low / p16 low 17 症例という結果となり上記報告とは一致しなかった。OSCC における p53 IHC high score と p53 mutation との関係性については今後検討の必要があると考ええる。今回の結果は、p53 IHC score の Low/High の間にて OS の有意差が認められ、免疫プロファイルシステムに p53 IHC score を組み込むことにより OSCC における予後予測が容易となり、さらに FIB を組み込み統合することで分類をより洗練させることができた。p53、FIB、p16 を用いた IHC による新規分子分類法によって、OSCC 患者の予後予測をより正確に行うことが可能となった。

次の段階として、FIB が OSCC の予後不良にどのような機能的役割をもつのかを検証するためにヒト舌扁平上皮癌細胞株 (Human squamous carcinoma; HSC-4) を用いて検討した。その結果、FIB 濃度依存的に細胞移動能の有意な亢進を認め、さらに癌細胞には敷石状増殖から紡錘形への形態変化が観察された。多くの腫瘍研究で、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transformation; EMT) は悪性腫瘍の進行過程において重要なイベントであることが示されており、アクチン細胞骨格のリモデリングによって、癌細胞の敷石状増殖から細胞間接着性の低下や紡錘形へと形態変化が生じ、それに伴って周辺組織への浸潤能力が増大することが知られている [43] [44] [45]。

今回の結果から、培養細胞を用いた検討では FIB 濃度依存的に、病理組織検体を用いた検討では FIB IHC high score 症例に、E-cadherin 発現低下および Vimentin 発現亢進を認めた。これらの知見から FIB は EMT 誘導を促進し、OSCC の腫瘍進展および予後に関与する機能を有している可能性があると考えられ、さらに、OSCC 腫瘍細胞における FIB IHC 陽性症例は、Plasma FIB level より腫瘍悪性化を表す重要な指標となる可能性が示唆された。

5. 総括

OSCC【IPS I-IV】分類において、OSCC【IPS II】 p53 high / FIB high は stageにかかわらず有意に予後不良であることが示された。OSCCにおいて、FIBはEMTを誘導し臨床病理学的悪性化および予後に関与する因子であり、FIBを組み合わせた新規分子分類法はOSCC 予後予測のための診断補助として有用である可能性が示唆された。

6. 今後の課題

本研究における結果から、OSCC において FIB は腫瘍進展を促進している可能性があり、FIB を用いた新規分子分類法は OSCC 予後予測のための補助的診断として有用である可能性が示された。今後、臨床応用に繋げるには、さらに機能解析を含めた詳細な検証および、より多施設や多数の検体を用いた大規模な検討が必要である。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、北里大学大学院医療系研究科細胞組織病理学研究室高橋博之教授には、本研究を遂行するにあたり終始ご指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。また実験に関しまして直接ご指導戴き、多大なる貴重なご助言を賜りました北里大学大学院医療系研究科細胞組織病理学研究室松本俊英講師に心より感謝申し上げます。並びに同研究室の皆様には終始ご助言ご協力を戴きました。心より感謝申し上げます。

8. 引用文献

- [1] Jain A, Kotimoole CN, Ghoshal S, Bakshi J, Chatterjee A, Prasad TSK, et al. Identification of potential salivary biomarker panels for oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2021 Feb 9;11(1):3365.
- [2] Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep 1;8(9):11884-94.
- [3] Ueda S, Goto M, Hashimoto K, Hasegawa S, Imazawa M, Takahashi M, et al. Salivary CCL20 Level as a Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2021 Mar-Apr;18(2):103-112.
- [4] 桐田忠昭：口腔癌取り扱い規約，第2版，日本口腔腫瘍学会編．金原出版．東京，2019．
- [5] Hirata RM, Jaques DA, Chambers RG, Tuttle JR, Mahoney WD. Carcinoma of the oral cavity. An analysis of 478 cases. *Ann Surg*. 1975 Aug;182(2):98-103.
- [6] Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996 Aug;54(8):949-54.
- [7] Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F, et al. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer*. 1989 Jun 15;63(12):2522-7.
- [8] Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1993 Nov;22(10):459-62.
- [9] Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Sep 1;13(9).
- [10] Bosetti C, Carioli G, Santucci C, Bertuccio P, Gallus S, Garavello W, et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2020 Aug 15;147(4):1040-1049.
- [11] Kujan O, Khatib A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol*. 2007 Mar;43(3):224-31.
- [12] Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007 Nov;36(10):575-80.
- [13] Travassos DC, Fernandes D, Massucato EMS, Navarro CM, Bufalino A. Squamous cell carcinoma antigen as a prognostic marker and its correlation with clinicopathological features in head and neck squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis.

J Oral Pathol Med. 2018 Jan;47(1):3-10.

[14] 渡邊昌彦、伊東文生：分子腫瘍マーカー診療ガイドライン，第2版，日本分子腫瘍マーカー研究会編 金原出版．東京，2021．

[15] Zhang X, Long Q. Elevated serum plasma fibrinogen is associated with advanced tumor stage and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr ;96(17):e6694.

[16] Levy JH, Welsby I, Goodnough LT. Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy. *Transfusion*. 2014 May;54(5):1389-405.

[17] Qiao Y, Ma M, Zhang H, Yu Z, Tang P. Prognostic Significance of the Combination of Fibrinogen and Tumor Marker Index in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients. *Onco Targets Ther*. 2021 Feb 17;14:1101-1111.

[18] He X, Huang T, Xue Y, Zhang M, Liu Q, Wang Y, et al. Association of Preoperative Plasma D-dimer and Fibrinogen and Renal Cell Carcinoma Outcome. *J Cancer*. 2019 Jul 10;10(17):4096-4105.

[19] Dai T, Peng L, Lin G, Li Y, Yao J, Deng Y, et al. Preoperative elevated plasma fibrinogen level predicts tumor recurrence and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2019 Dec;10(6):1049-1063.

[20] Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Moritz TE, Hur K, Edwards RL, Rickles FR. Prognostic significance of blood coagulation tests in carcinoma of the lung and colon. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1992 Aug;3(4).

[21] Zhang Y, Cao J, Deng Y, Huang Y, Li R, Lin G, et al. Pretreatment plasma fibrinogen level as a prognostic biomarker for patients with lung cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020 Feb 27;75:e993.

[22] Han Y, Ren Z, Liu Y, Liu Y. Diagnostic and Prognostic Value of Fibrinogen, Fibrinogen Degradation Products, and Lymphocyte/Monocyte Ratio in Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Ear Nose Throat J*. 2024 May;103(5).

[23] Homma A, Ando M, Hanai N, Harada H, Honma Y, Kanda T, et al. Summary of Japanese clinical practice guidelines for head and neck cancer - 2022 update edited by the Japan society for head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx*. 2024 Feb;51(1):174-188.

[24] Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021 Mar 29;372:n160.

[25] Nakagawa M, Matsumoto T, Yokoi A, Hashimura M, Oguri Y, Konno R, et al. Interaction between membranous EBP50 and myosin 9 as a favorable prognostic factor in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2023 Oct;17(10):2168-2182.

- [26] Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I. Crosstalk between NF-kappaB/p65 and beta-catenin/TCF4/p300 signalling pathways through alterations in GSK-3beta expression during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells. *J Pathol.* 2007 Sep;213(1):35-45.
- [27] Matsumoto T, Yamazaki M, Takahashi H, Kajita S, Suzuki E, Tsuruta T, et al. Distinct β -catenin and PIK3CA mutation profiles in endometriosis-associated ovarian endometrioid and clear cell carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2015 Sep;144(3):452-63.
- [28] Yokoi A, Matsumoto T, Oguri Y, Hasegawa Y, Tochimoto M, Nakagawa M, et al. Upregulation of fibronectin following loss of p53 function is a poor prognostic factor in ovarian carcinoma with a unique immunophenotype. *Cell Commun Signal.* 2020 Jul 7;18(1):103..
- [29] Yokoi A, Matsumoto T, Watanabe G, Tochimoto M, Saegusa M. Immunophenotypic profile as a predictor of prognosis in advanced ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2019 Mar;85:210-220.
- [30] Mashhadiabbas F, Fayazi-Boroujeni M. Correlation of Vascularization and Inflammation with Severity of Oral Leukoplakia. *Iran J Pathol.* 2017 Summer;12(3):225-230.
- [31] Jalayer Naderi N, Semyari H, Elahinia Z. The Impact of Smoking on Gingiva: a Histopathological Study. *Iran J Pathol.* 2015 Summer;10(3):214-20.
- [32] Inukai M, Yokoi A, Ishizuka Y, Hashimura M, Matsumoto T, Oguri Y, et al. A functional role of S100A4/non-muscle myosin IIA axis for pro-tumorigenic vascular functions in glioblastoma. *Cell Commun Signal.* 2022 Apr 7;20(1):46.
- [33] Matsumoto T, Oda Y, Hasegawa Y, Hashimura M, Oguri Y, Inoue H, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Overexpression Is Associated with Aggressive Phenotypic Characteristics of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Am J Pathol.* 2021 Oct;191(10):1837-1850.
- [34] Inoue H, Hashimura M, Akiya M, Chiba R, Saegusa M. Functional role of ALK-related signal cascades on modulation of epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in uterine carcinosarcoma. *Mol Cancer.* 2017 Feb 14;16(1):37.
- [35] Yokoi A, Nakamura Y, Hashimura M, Oguri Y, Matsumoto T, Nakagawa M, et al. Anaplastic lymphoma kinase overexpression enhances aggressive phenotypic characteristics of endometrial carcinoma. *BMC Cancer.* 2023 Aug 17;23(1):765.
- [36] Tochimoto M, Oguri Y, Hashimura M, Konno R, Matsumoto T, Yokoi A, et al. S100A4/non-muscle myosin II signaling regulates epithelial-mesenchymal transition and stemness in uterine carcinosarcoma. *Lab Invest.* 2020 May;100(5):682-695.
- [37] Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, et al.

Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989 Jan 2;242(2):237-9.

[38] Zhang Y, Cao J, Deng Y, Huang Y, Li R, Lin G, et al. Dong M, Huang Z. Pretreatment plasma fibrinogen level as a prognostic biomarker for patients with lung cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020 Feb 27;75:e993.

[39] Sun Y, Han W, Song Y, Gao P, Yang Y, Yu D, et al. Prognostic Value of Preoperative Fibrinogen for Predicting Clinical Outcome in Patients with Nonmetastatic Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res.* 2020 Dec 23;12:13301-13309.

[40] Wang PX, Wang HJ, Liu JH, Qiu GL, Lu J, Fan L, et al. A nomogram combining plasma fibrinogen and systemic immune-inflammation index predicts survival in patients with resectable gastric cancer. *Sci Rep.* 2021 May 13;11(1):10301.

[41] Inoue A, Matsumoto T, Ito Y, Saegusa M, Takahashi H. TP53 positivity combined with high fibrinogen expression defines a subtype of oral squamous cell carcinoma with an unfavorable prognosis. *Hum Pathol.* 2022 Dec;130:25-35.

[42] Lindemann A, Takahashi H, Patel AA, Osman AA, Myers JN. Targeting the DNA Damage Response in OSCC with TP53 Mutations. *J Dent Res.* 2018 Jun;97(6):635-644.

[43] Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, et al. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer.* 2010 Jul 20;9:194.

[44] Pan Z, Hu W, Huang J, Zheng Z, Lin E, Wang P, et al. Increased FGL1 Expression Predicts Poor Prognosis and Promotes EMT in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Biochem Genet.* 2024 Jun;62(3):2066-2081.

[45] Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* 2006 Apr;9(4):261-72.

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(20K07397)、北里大学大学院医学系研究科統合研究プログラム(2021-3357)、北里大学医療連携科学研究科(2021-1011)の助成を受けて行われた。

9. 業績目録

(I) 主学術論文（英文原著）

1. Inoue A, Matsumoto T, Ito Y, Saegusa M, Takahashi H. TP53 positivity combined with high fibrinogen expression defines a subtype of oral squamous cell carcinoma with an unfavorable prognosis. Hum Pathol. 2022; 130:25-35.

(II) 原著（主学術論文を除く）

1. Inoue A, Matsumoto T, Ito Y, Jiang Z, Takahashi H. Associations between preoperative fibrinogen levels and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. Laboratory Medicine International (LMI). (in press).
2. Inoue A, Matsumoto T, Ito Y, Takahashi H. Association between clinicopathological factors and C-reactive protein levels in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. Kitasato Med J 2024; 54: 1–4.
3. Inoue A, Matsumoto T, Ito Y, Takahashi H. Association between Clinicopathological factors and Insulin-like growth factorII mRNA-binding protein 3 expression in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. ACTR.2023; vol.4.
4. Inoue A, Moriya H, Katada N, Tanabe S, Kobayashi N, Watanabe M, Okayasu I, Ohbu M. Intratumoral lymphangiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and relationship with regulatory factors and prognosis. Pathol Int. 2008 Oct;58(10):611-9.

(III) 症例報告

1. Takahashi H, Kajita S, Katoh H, Matsumoto T, Inoue A, Sangai T, Saegusa M. Immunoglobulin G4-related thyroiditis associated with Graves' disease: A case report. Heliyon. 2024 Feb 7;10(4): e25843.

(IV) 学会発表（在学期間中、主発表者の発表のみ記載）

1. 井上明美、松本俊英、伊東由夏、三枝信、高橋博之. 「口腔扁平上皮癌における Fibrinogen 機能解析とその分子生物学的特性の解明」 The functional role of fibrinogen for oral squamous cell carcinoma. 第 113 回日本病理学会総会（名古屋）2024.03.28. 【ポスター発表】

2. 井上明美、松本俊英、伊東由夏、三枝信、高橋博之.「口腔扁平上皮癌における p53/フィブリノゲン陽性癌は予後不良である」TP53 positivity combined with high fibrinogen defines a subtype of OSCC with a poorer prognosis. 第 112 回日本病理学会総会（下関）2023.04.13.【ポスター発表】
3. 井上明美、松本俊英、伊東由夏、三枝信、高橋博之.「口腔扁平上皮癌におけるフィブリノゲン発現と臨床病理学的相関性」Fibrinogen expression is associated with clinicopathological factor of oral squamous carcinomas. 第 111 回日本病理学会総会（神戸）2022.04.14.【ポスター発表】

10. 図表

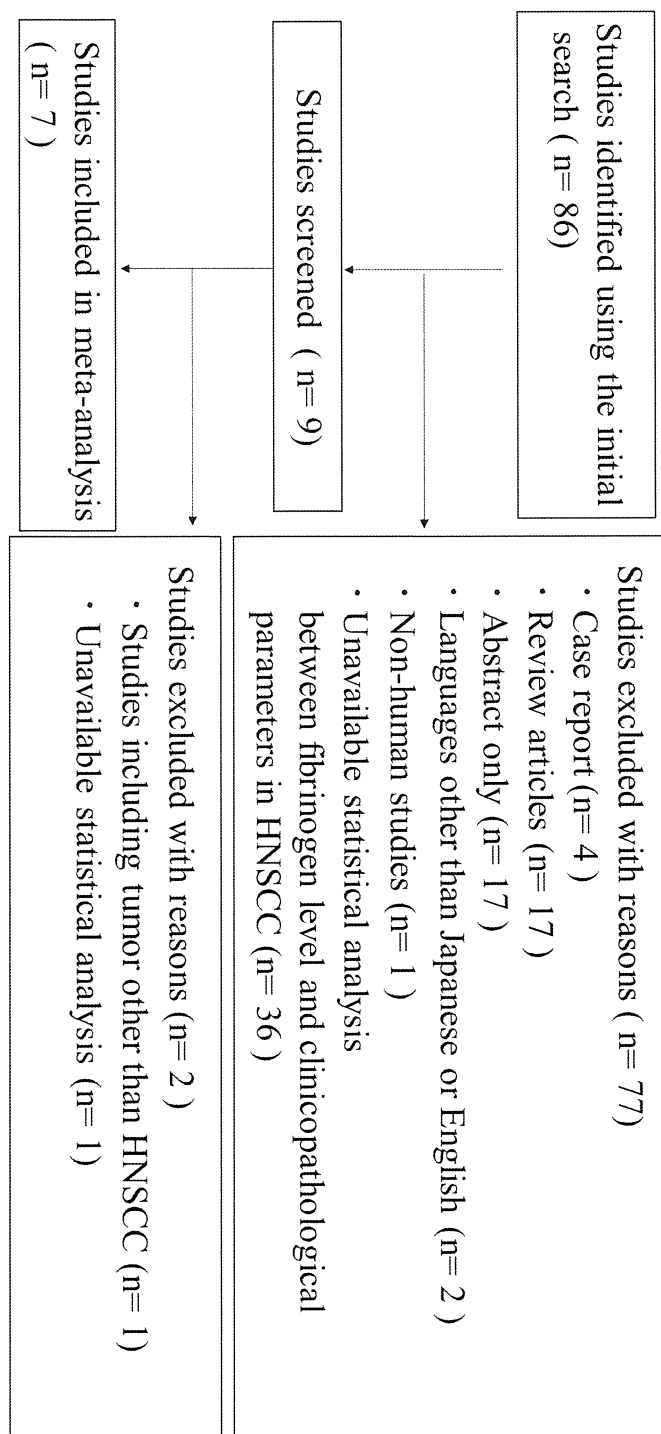


図 1. HNSCC における文献抽出のフローチャート図

HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma

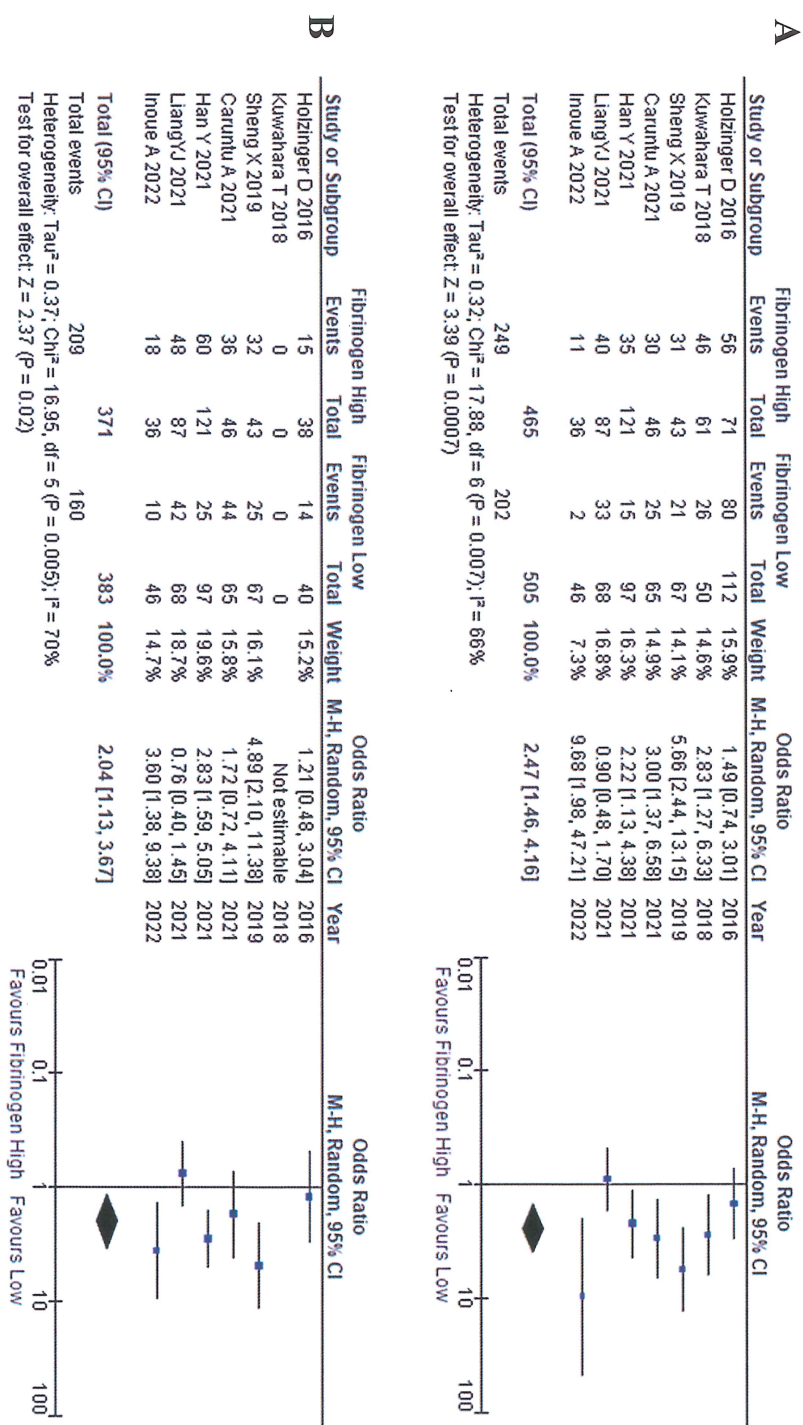


図 2. HNSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子のメタアナリシス(Forest plots)
 (A) Plasma FIB level と pathological T status, (B) Plasma FIB level と TNM stage

OR, odds ratio; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; T, Pathological tumor size and depth of invasion; TNM, tumor, node, metastasis.

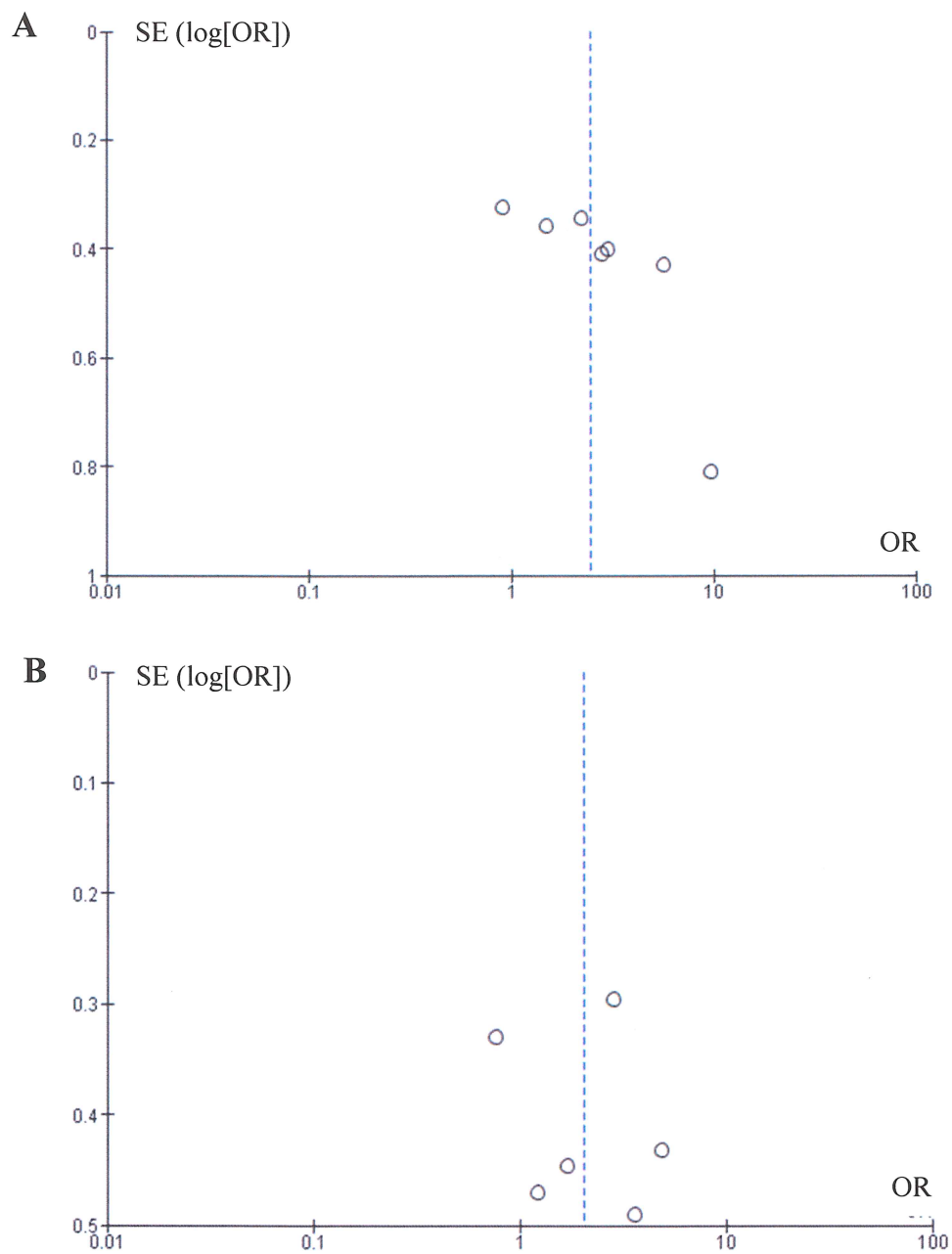


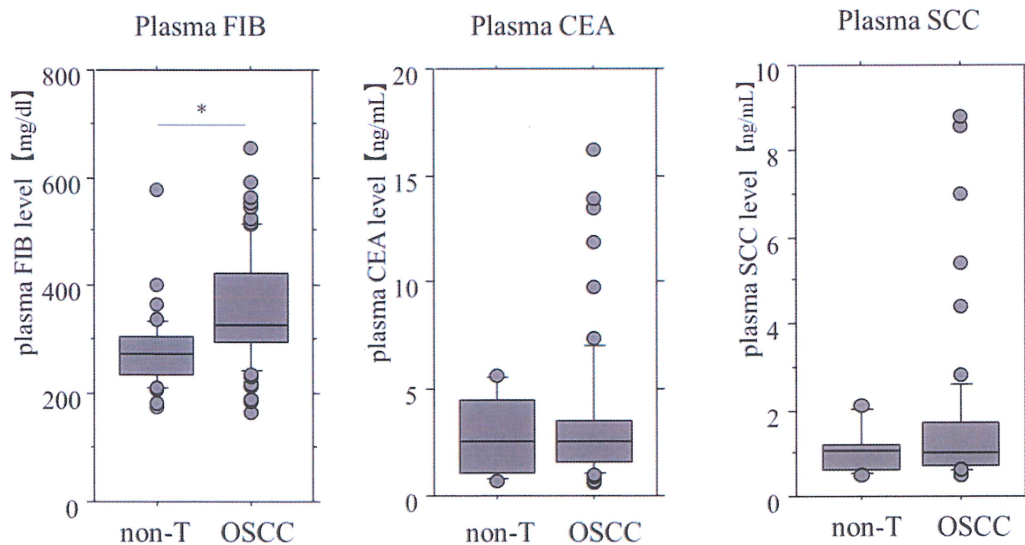
図 3. Plasma FIB level と臨床病理学的因子のメタアナリシス (Funnel plots)

(A) Plasma FIB level と pathological T status

(B) Plasma FIB level と TNM stage

SE, standard error; OR, odds ratio; T, tumor size and depth of invasion; TNM, tumor, node, metastasis; FIB, fibrinogen.

A.



* P < 0.001

B.

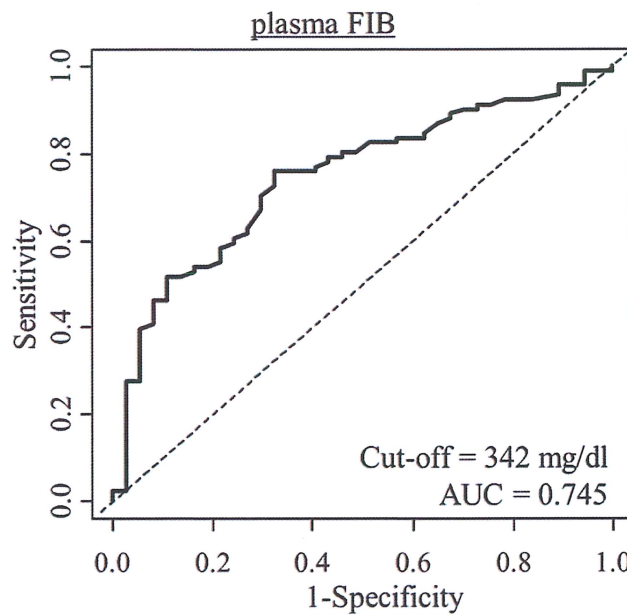


図 4. OSCC/non-T 症例における Plasma FIB level および腫瘍マーカー（CEA, SCC）値の差異

(A) non-T と OSCC における血漿中腫瘍マーカーおよび Plasma FIB level の差異

(B) OSCC における Plasma FIB level の ROC 曲線。Plasma FIB level 342mg/dL を cutoff 値とすると曲線下面積（AUC）は 0.745 である。

The means \pm SDs. * P < .001. FIB, fibrinogen; CEA, carcinoembryonic antigen; SCC, squamous cell carcinoma related antigen; non-T, non-tumor oral disease; OSCC, oral squamous cell carcinoma; ROC, receiver operating characteristic.

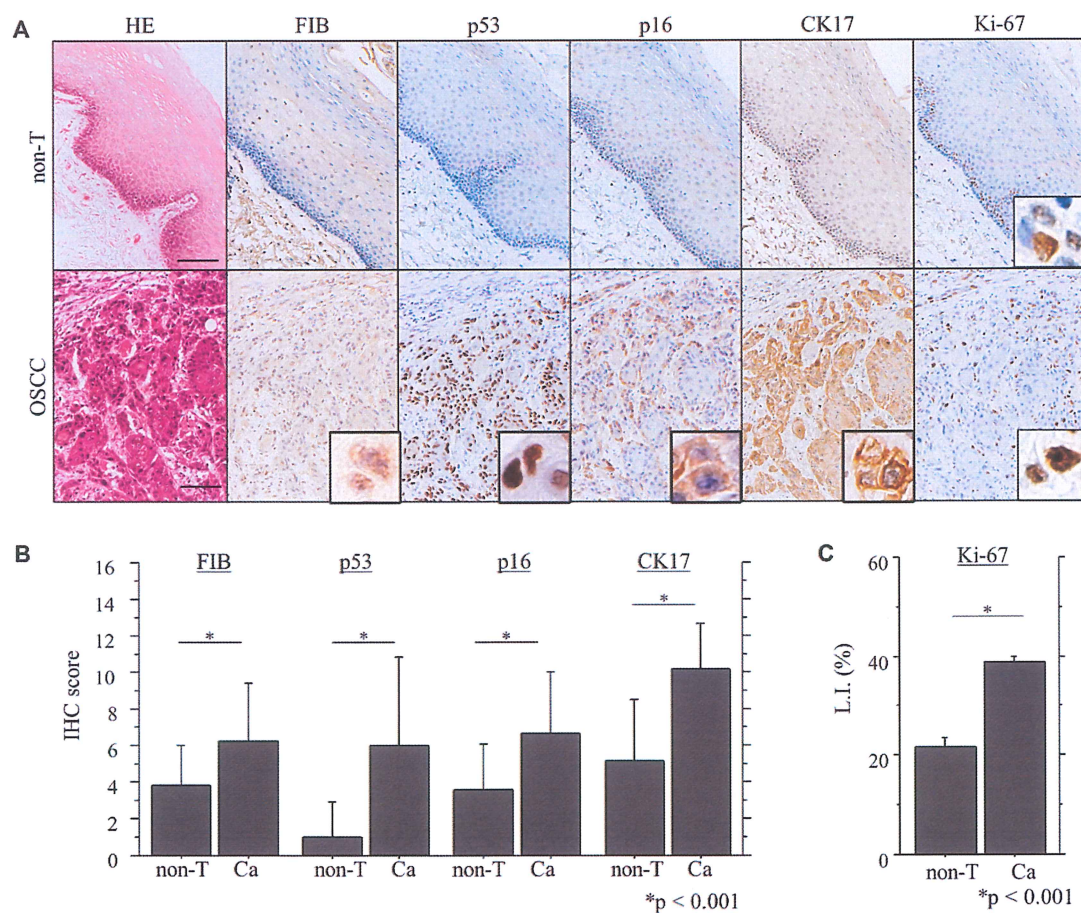


図 5. OSCC/non-T 症例における 5 種の IHC マーカー発現の相関性

(A) ヘマトキシリン・エオジン (HE) と FIB、p53、p16、CK17、Ki-67 免疫組織化学 (IHC) 染色。non-T(非腫瘍性口腔疾患)症例 (上段)、OSCC 症例 (下段)

(B) non-T と OSCC における FIB IHC score、p53 IHC score、p16 IHC score、CK17 IHC score

(C) non-T と OSCC における Ki-67 Labeling Index (LI)

* $P < .001$. Scale bar = 100 μm . Ca, cancer; FIB, fibrinogen; non-T, non-tumor oral disease; OSCC, oral squamous cell carcinoma.

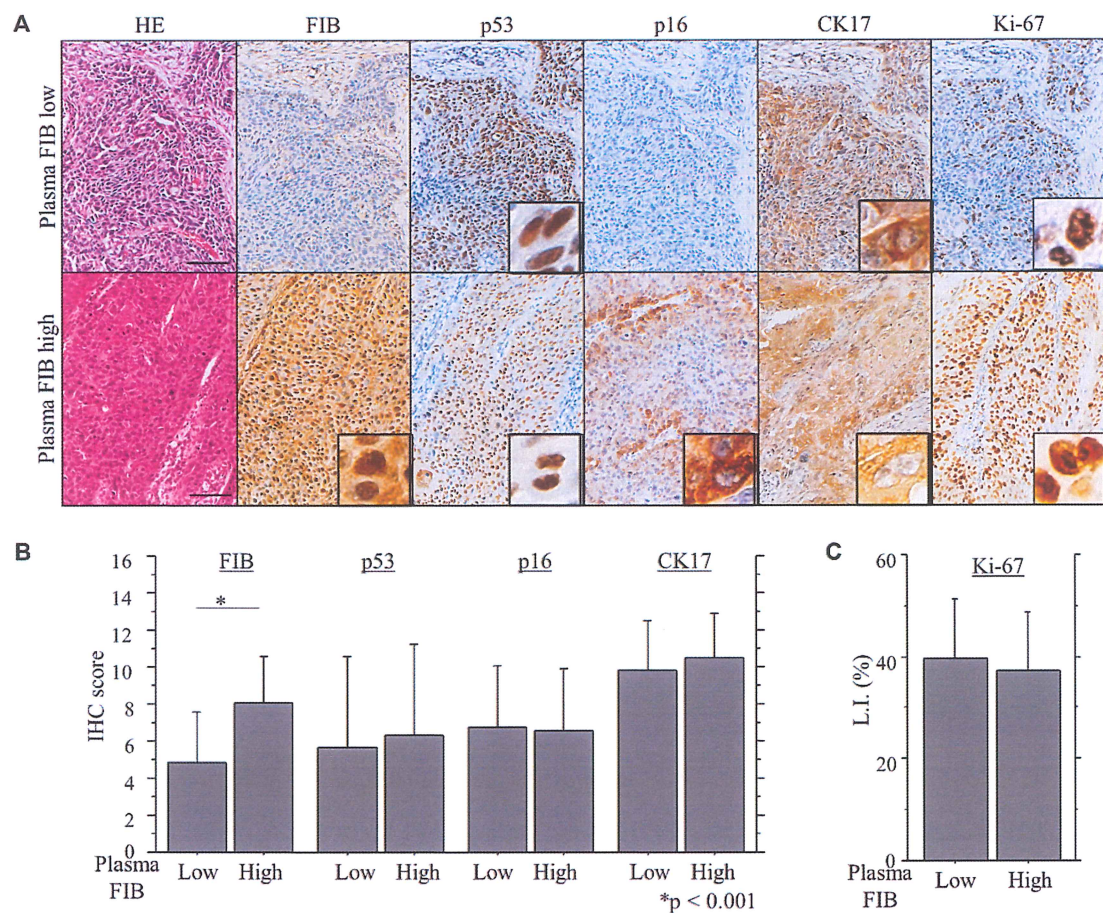


図 6. OSCC における Plasma FIB level と 5 種の IHC マーカー発現の相関性
 (A) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と FIB、p53、p16、CK17、Ki-67 免疫組織化学 (IHC) 染色。Plasma FIB level 高値症例 (上段)、低値症例 (下段)
 (B) OSCC 患者の Plasma FIB level と FIB、p53、p16、CK17 の IHC score の相関性
 (C) OSCC 患者の Plasma FIB level と Ki-67 の Labeling Index (LI) の相関性

* P < .001. Scale bar = 100 μ m. Ca, cancer; FIB, fibrinogen; non-T, non-tumor oral disease; OSCC, oral squamous cell carcinoma.

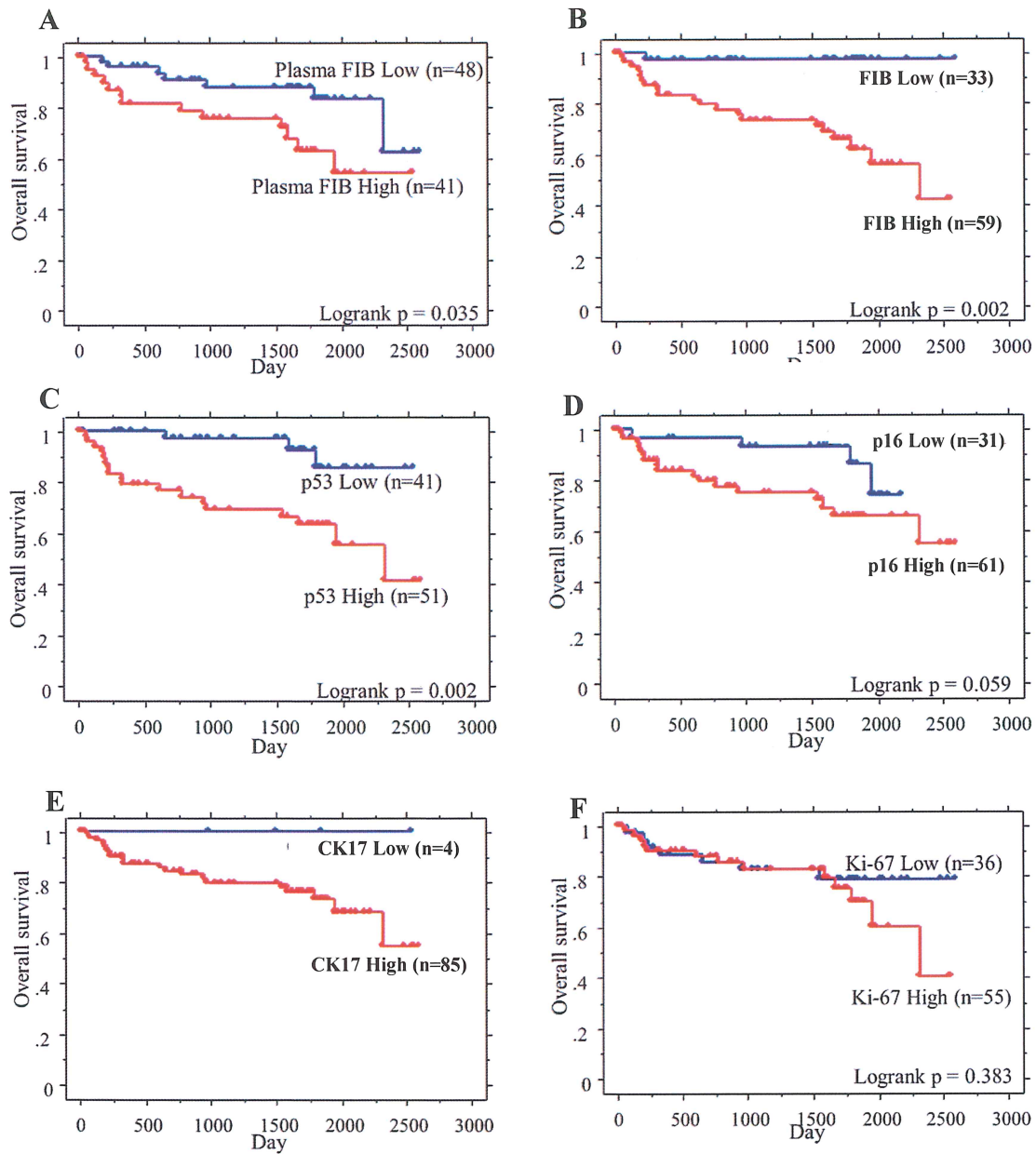
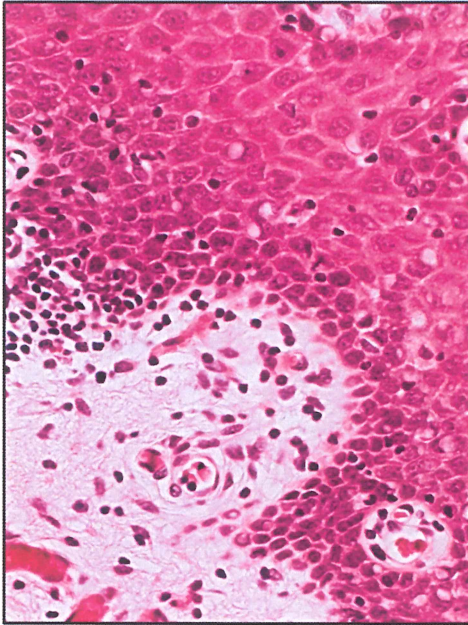


図 7. OSCC における Plasma FIB level および 5 種の IHC マーカーと OS の関係
 (A) Plasma FIB level [Low vs High]、(B) FIB IHC [Low vs High]、(C) p53 [Low vs High]、(D) p16 [Low vs High]、(E) CK17 [Low vs High]、(F) Ki-67 [Low vs High]

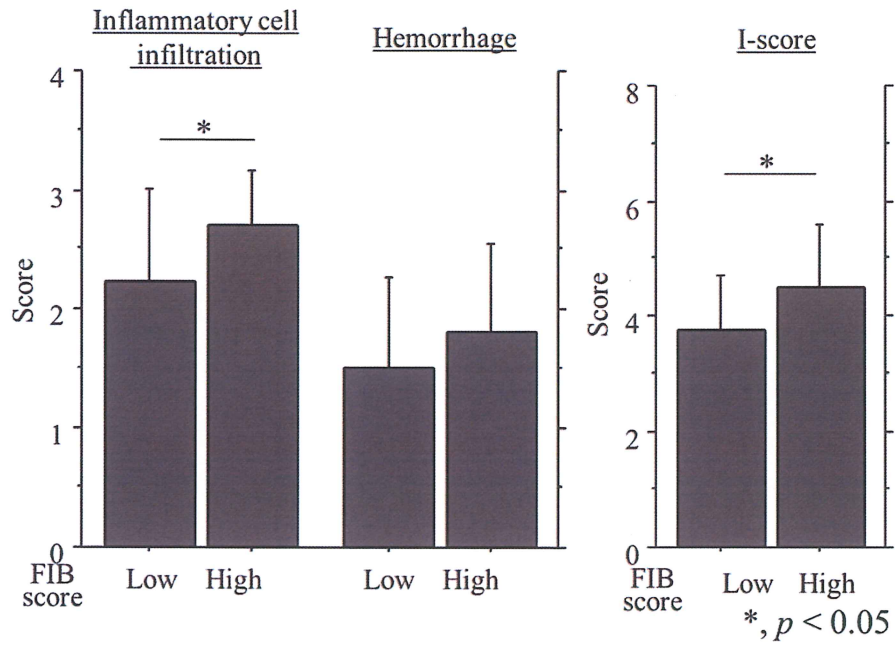
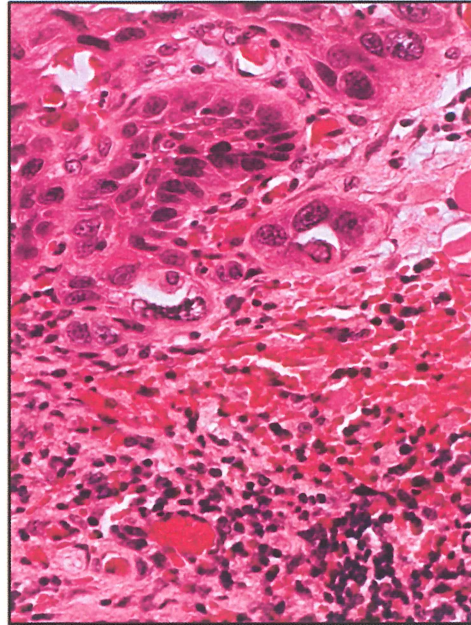
FIB, fibrinogen; OS, overall survival; OSCC, oral squamous cell carcinoma; IHC, immunohistochemistry.

A

OSCC #6
(FIB score low)



OSCC #73
(FIB score High)



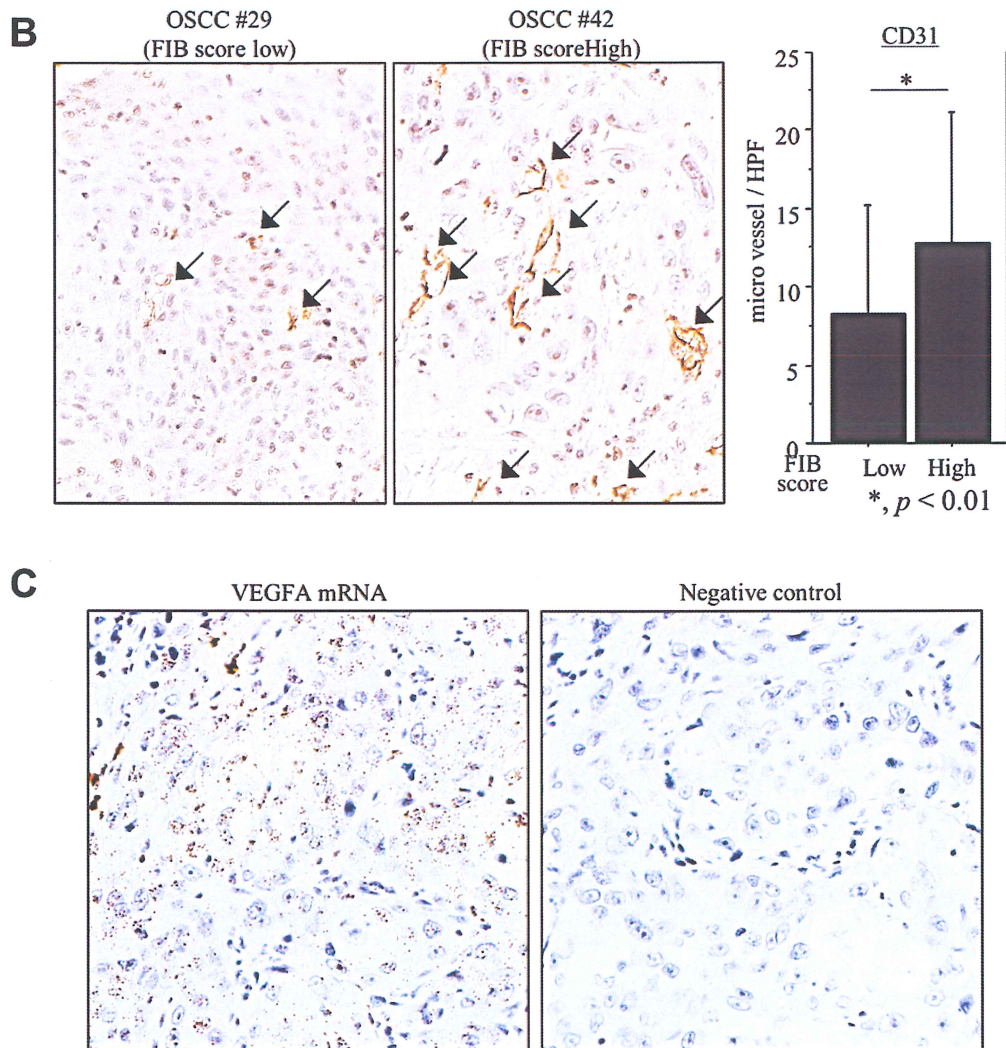


図 8. OSCC における炎症と血管新生との関連性

- (A) OSCC 組織 HE 染色標本の顕微鏡写真(上)と、OSCC における 2 つの炎症パラメータ(炎症細胞数、出血)の score と I-score (下)。
- (B) OSCC 組織 CD31 免疫組織化学染色の顕微鏡写真。矢印は CD31 陽性微小血管を示す(左)。FIB IHC score と CD31 陽性微小血管数の相関性(右)。
- (C) FIB IHC score high 症例 OSCC 組織における *VEGFA* mRNA (左) と陰性コントロール(右)の RNAscope。

* $P < .001$. FIB, fibrinogen; HPF, high power field; OSCC, oral squamous cell carcinoma; SD, standard deviation; VEGF, vascular endothelial cell growth factor A.

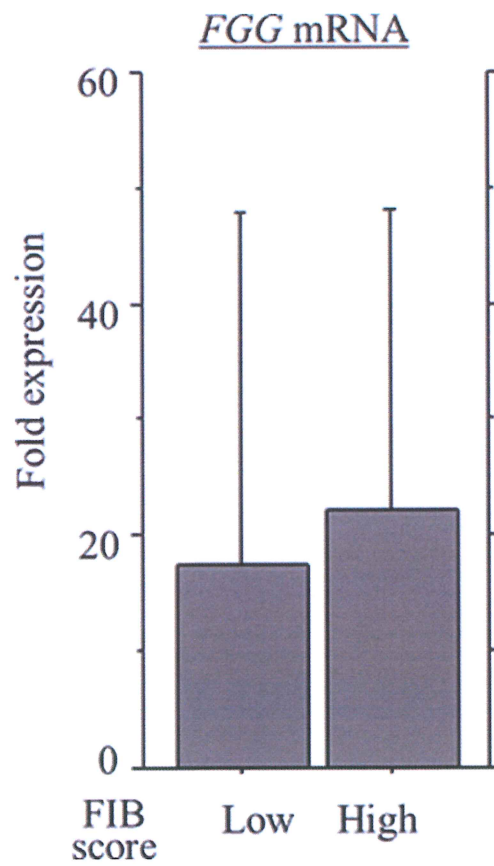
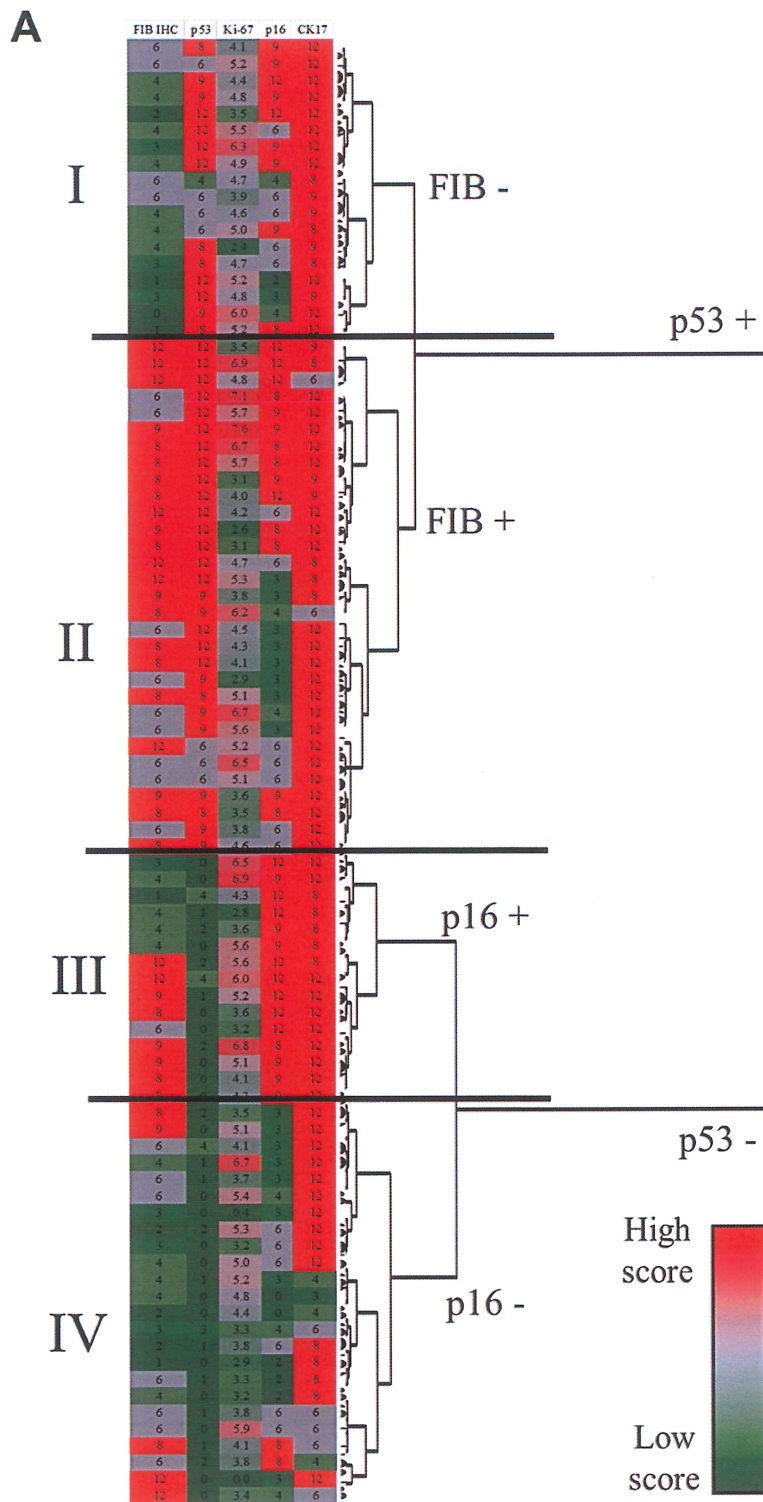


図 9. OSCC における *FGG* mRNA 発現量と FIB IHC score の相関性

FIB, fibrinogen; IHC, immunohistochemistry; OSCC, oral squamous cell carcinoma; FGG, fibrinogen gamma chain.



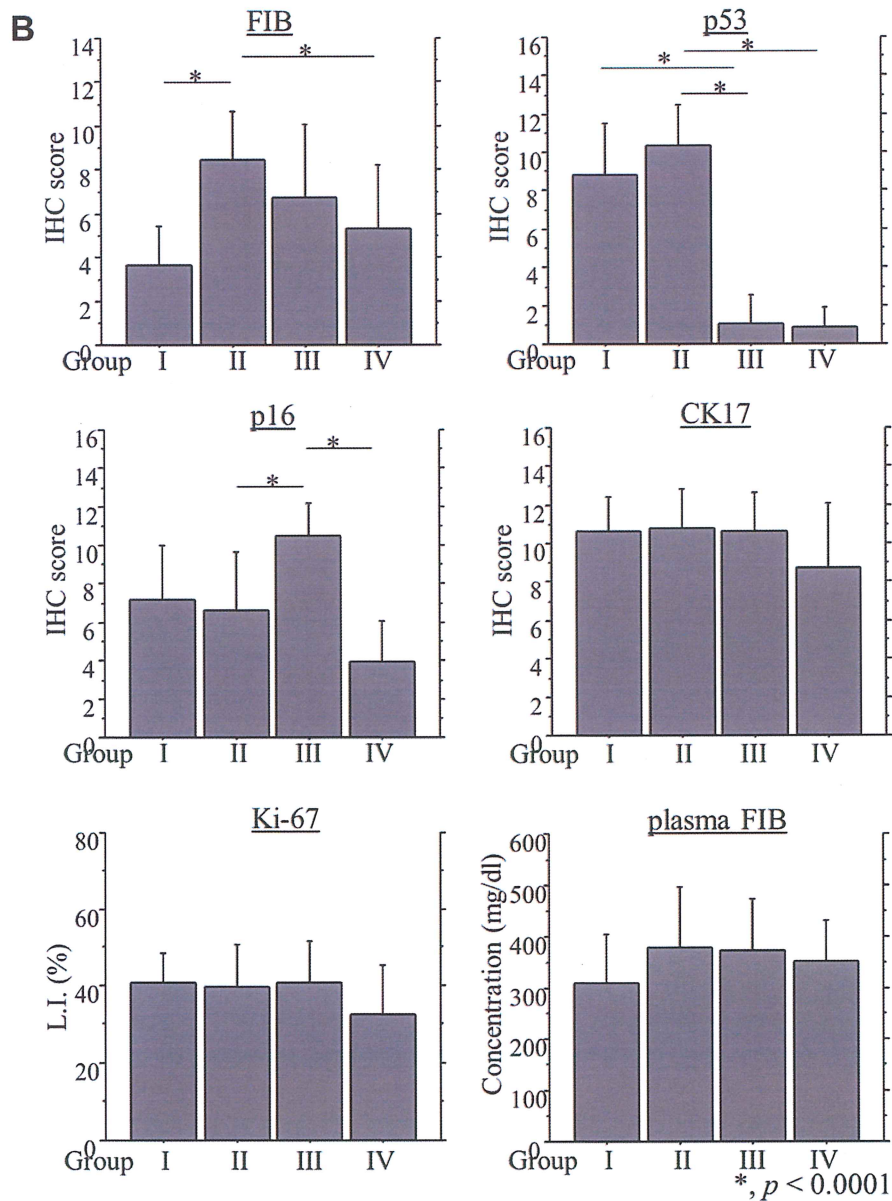


図 10. OSCC における階層型クラスタリング解析

- (A) IHC score level により色分けした図。赤色は IHC score 高値 (>5)、黒色は IHC score 中等度 (3-5)、緑色は IHC score 低値 (<2) を示す。免疫プロファイルグループを【I-IV】として示す。
- (B) 5 種のマーカーの IHC score および Plasma FIB level と免疫プロファイルグループの相関性

* $P < .001$. FIB, fibrinogen; IHC, immunohistochemistry; LI, labeling index, OSCC, oral squamous cell carcinoma; SD, standard deviation.

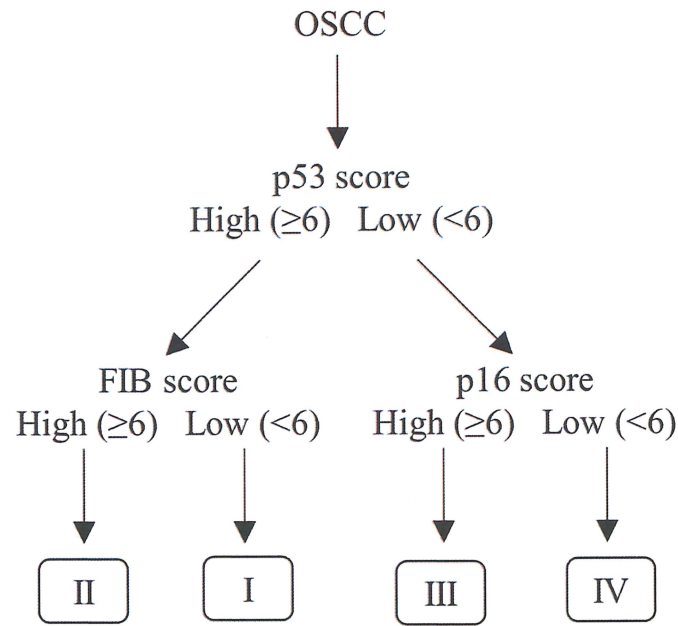
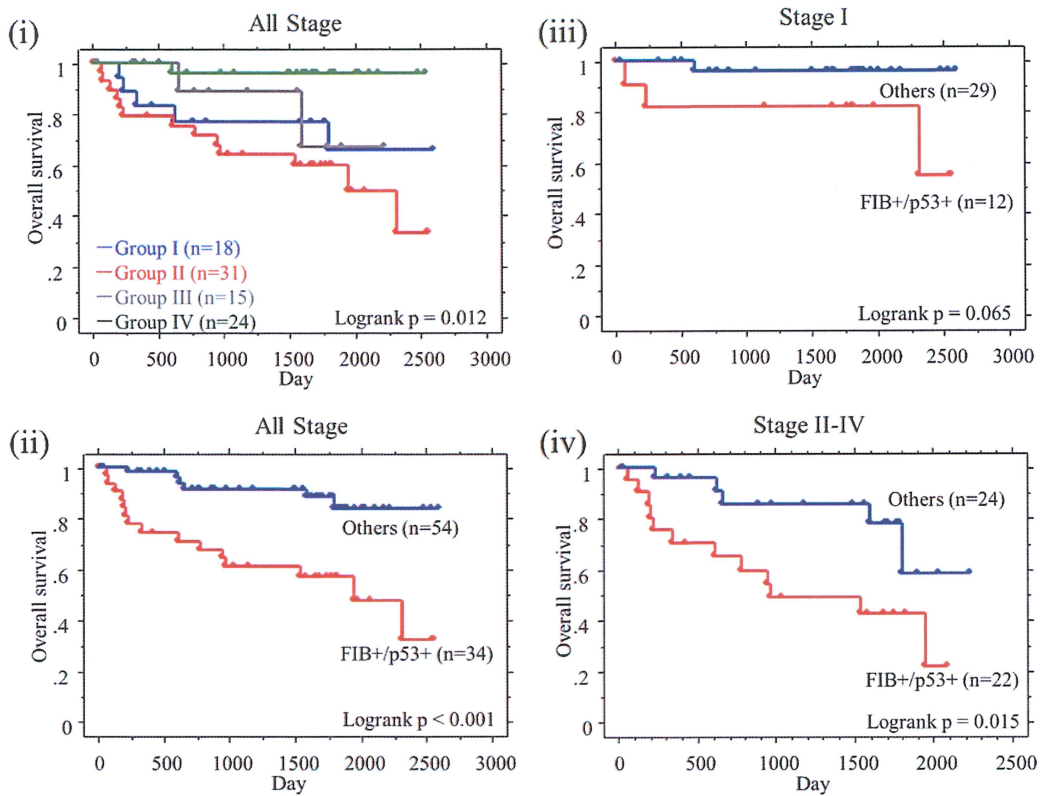
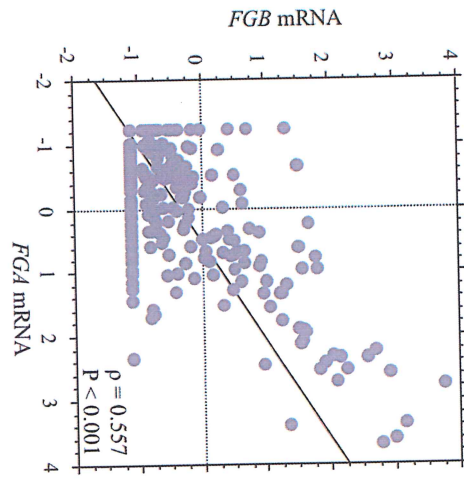
A**B**

図 11. OSCC における免疫プロファイルグループ【IPS I - IV】と予後の関連性

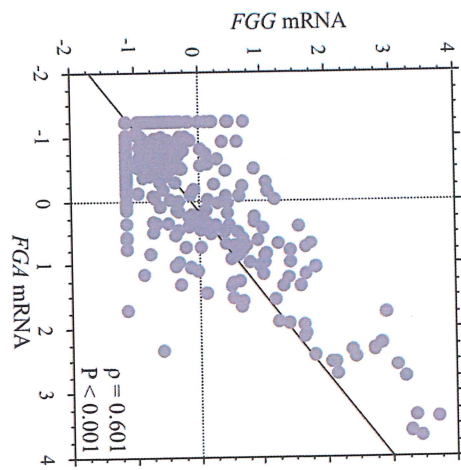
- (A) OSCC を FIB、p53、p16 を用いて 4 つの免疫プロファイルグループ【IPS I-IV】に分類したフローチャート
- (B) 【IPS II】 FIB+/p53+とその他のグループ【IPS I, III, IV】について、全 stage、stage I、stage II-IV における各 OS の比較
 - (i) 全 stage における免疫プロファイル 4 グループ【IPS I - IV】の OS
 - (ii) 全 stage における【IPS II】(p53 high/FIB high) vs 【IPS I, III, IV】の OS
 - (iii) stage I における【IPS II】(p53 high/FIB high) vs その他【IPS I, III, IV】の OS
 - (iv) stage II-IV における【IPS II】(p53 high/FIB high) vs その他【IPS I, III, IV】の OS

FIB, fibrinogen; IHC, immunohistochemistry; OS, overall survival; OSCC, oral squamous cell carcinoma; IPS, Immunoprofile subtypes.

A



B



C

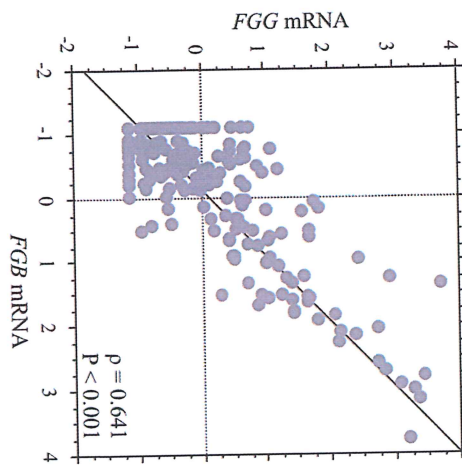


図 12. OSCC における FIB をコードする mRNA 間の相関性 (TCGA)

- (A) OSCC における *FGA* mRNA 発現と *FGB* mRNA 発現の相関性
- (B) OSCC における *FGA* mRNA 発現と *FGG* mRNA 発現の相関性
- (C) OSCC における *FGB* mRNA 発現と *FGG* mRNA 発現の相関性

FIB, fibrinogen; OSCC, oral squamous cell carcinoma; FGA, fibrinogen alfa chain; FGB, fibrinogen beta chain; FGG, fibrinogen gamma chain.; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

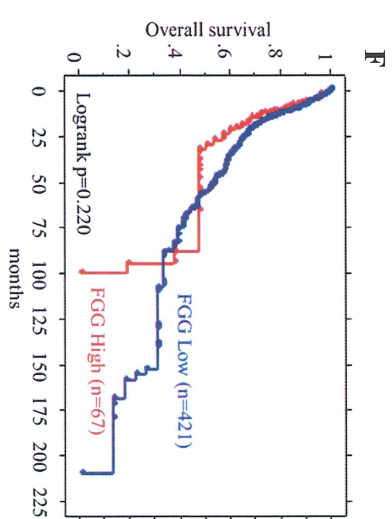
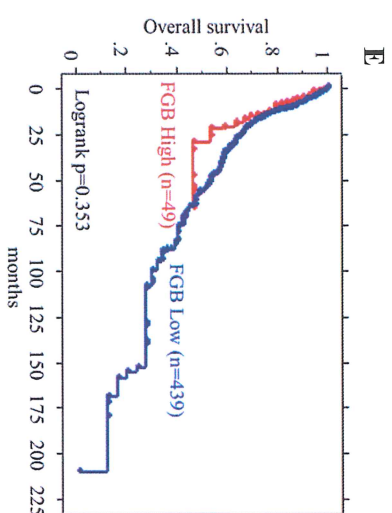
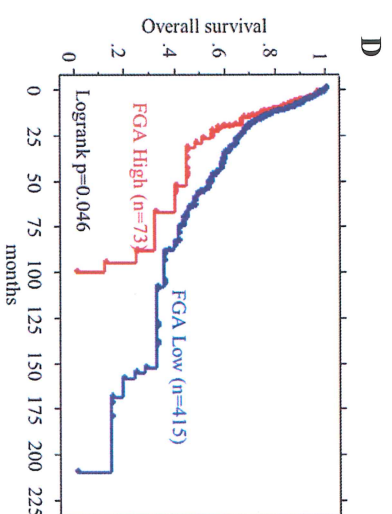
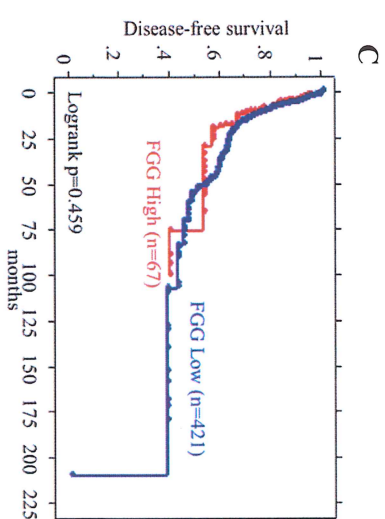
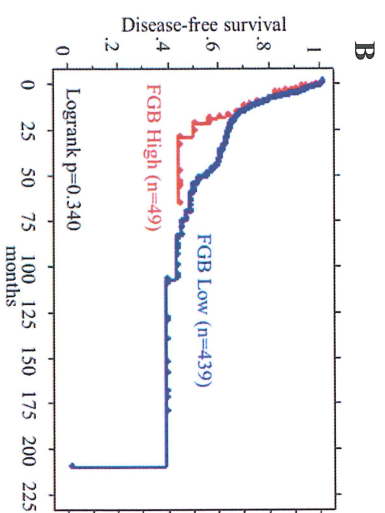
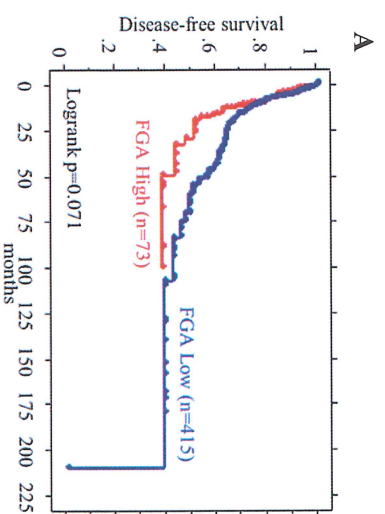


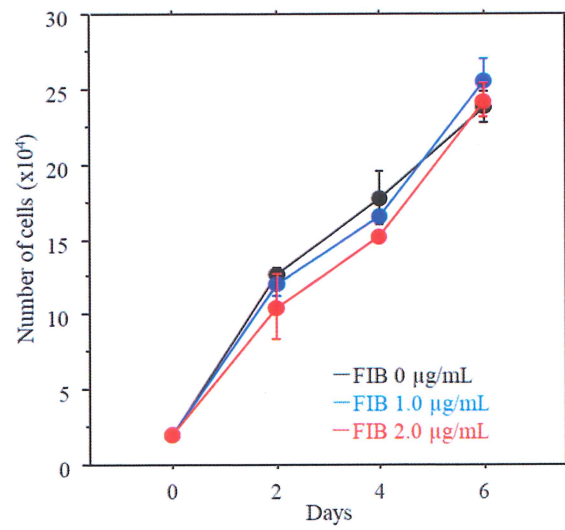
図 13. HNSCC における FIB をコードする *FGA*、*FGB*、*FGG* mRNA 発現と予後の関係
(TCGA)

- (A) HNSCC の *FGA* mRNA Low/High における DFS
- (B) HNSCC の *FGB* mRNA Low/High における DFS
- (C) HNSCC の *FGG* mRNA Low/High における DFS
- (D) HNSCC の *FGA* mRNA Low/High における OS
- (E) HNSCC の *FGB* mRNA Low/High における OS
- (F) HNSCC の *FGG* mRNA Low/High における OS

HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; FIB, fibrinogen; *FGA*, fibrinogen alfa chain; *FGB*, fibrinogen beta chain; *FGG*, fibrinogen gamma chain.; DFS, Disease-Free Survival; OS, Overall Survival; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

A.

HSC-4 cell proliferation



B.

HSC-4

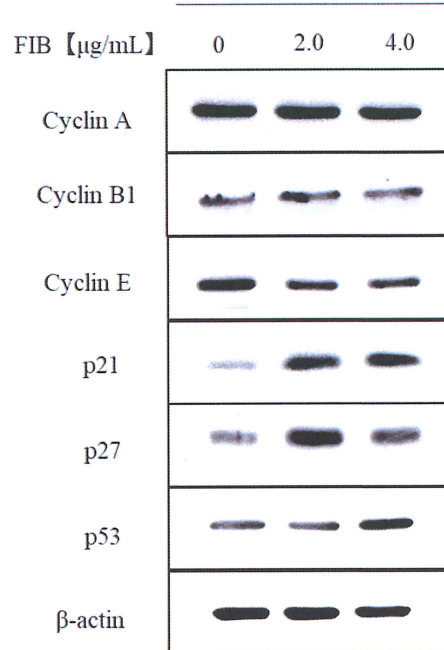


図 14. FIB が HSC-4 に与える影響 (細胞増殖能の検討)

(A) FIB 刺激による HSC-4 cell proliferation ($\times 10^5$ cell/mL)

(B) FIB 刺激による細胞周期関連マーカー発現検討

FIB, Human Plasma fibrinogen; OSCC, oral squamous cell carcinoma; HSC-4, Human squamous cell line from tongue.

C.

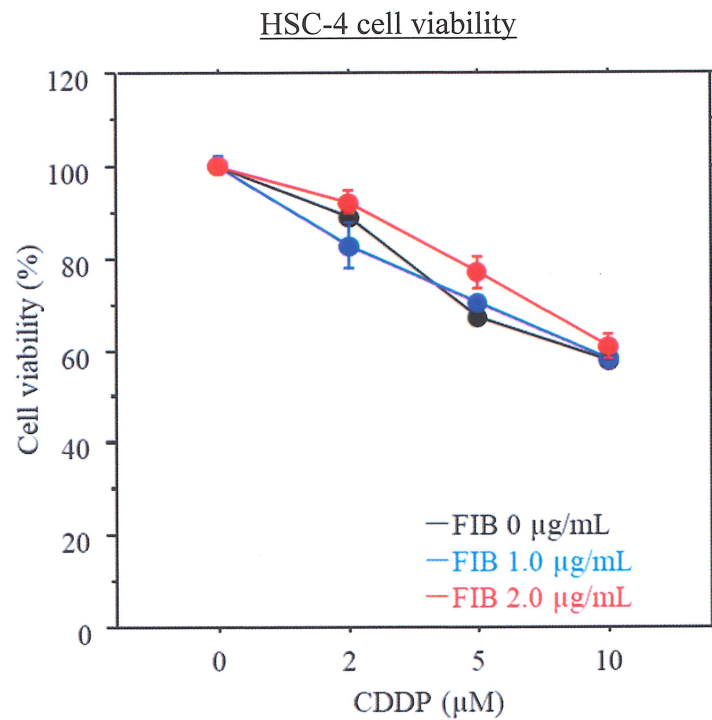


図 15. FIB が HSC-4 に与える影響 (CDDP に対する耐性能の検討)

FIB 刺激による細胞の CDDP 耐性能検討 ; HSC-4 Cell viability (%)

FIB, Human Plasma fibrinogen; OSCC, oral squamous cell carcinoma; HSC-4, Human squamous cell line from tongue; CDDP, cisplatin.

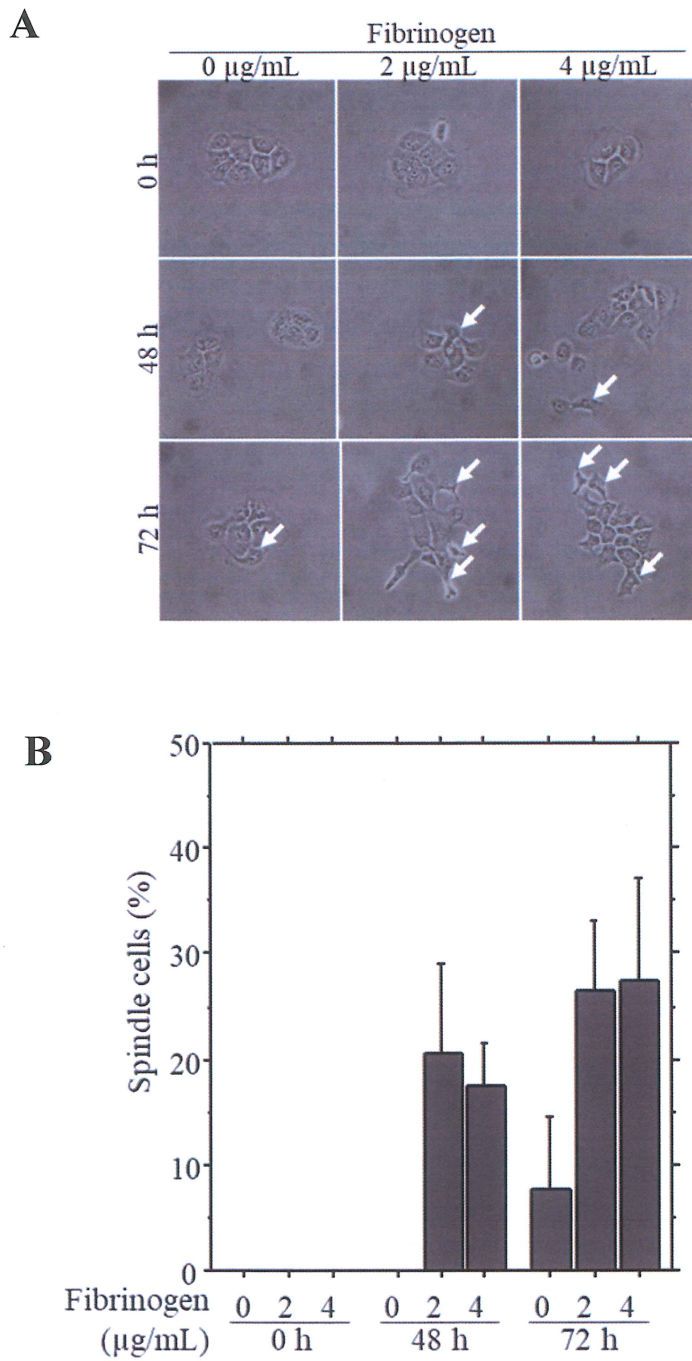
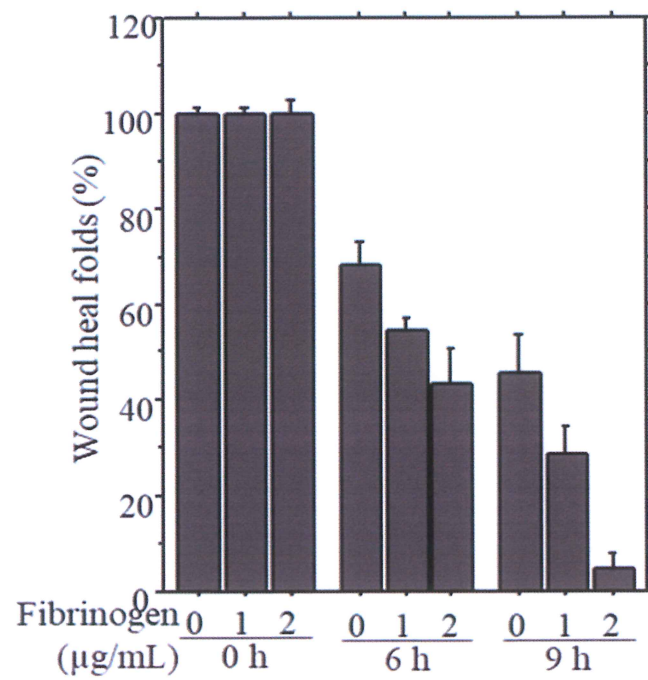
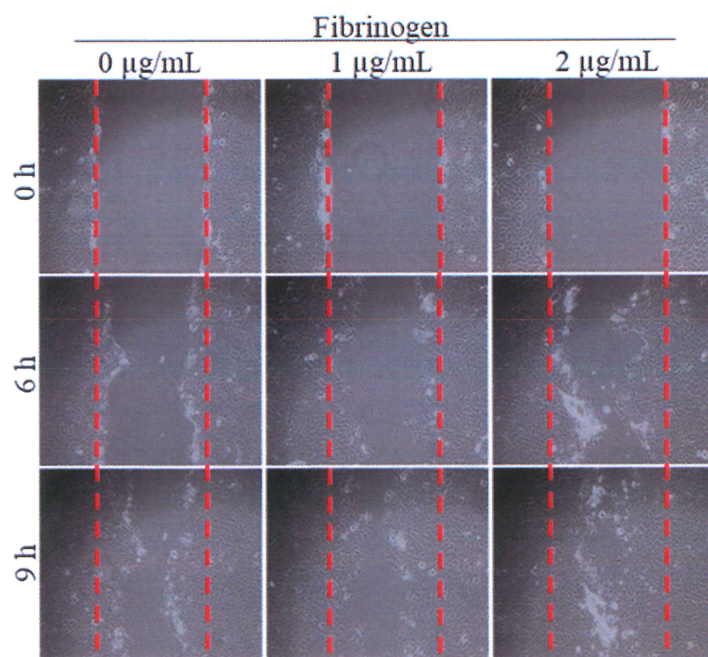


図 16. FIB が HSC-4 に与える影響 (細胞形態変化の検討)
 (A) FIB 刺激による細胞形態変化 ($\times 400$)
 (B) FIB 刺激による紡錘形細胞の割合 (%)

FIB, Human Plasma fibrinogen; HSC-4, Human squamous cell line from tongue;

A



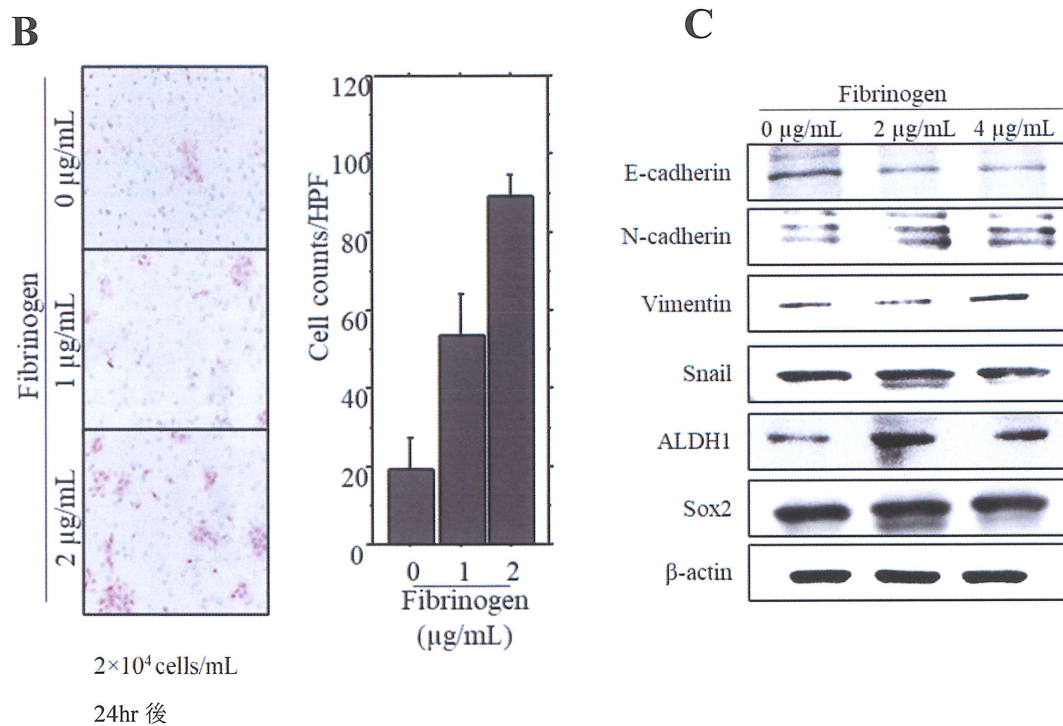


図 17. FIB が HSC-4 に与える影響（細胞移動能および EMT 関連マーカー発現の検討）

(A) Wound healing assay を用いた FIB 刺激による細胞移動能の検討

(B) Migration Assay を用いた FIB 刺激による細胞移動能の検討

(C) Western Blotting を用いた FIB 刺激による EMT 関連マーカー発現の検討

FIB, Human Plasma fibrinogen; HSC-4, Human squamous cell line from tongue;

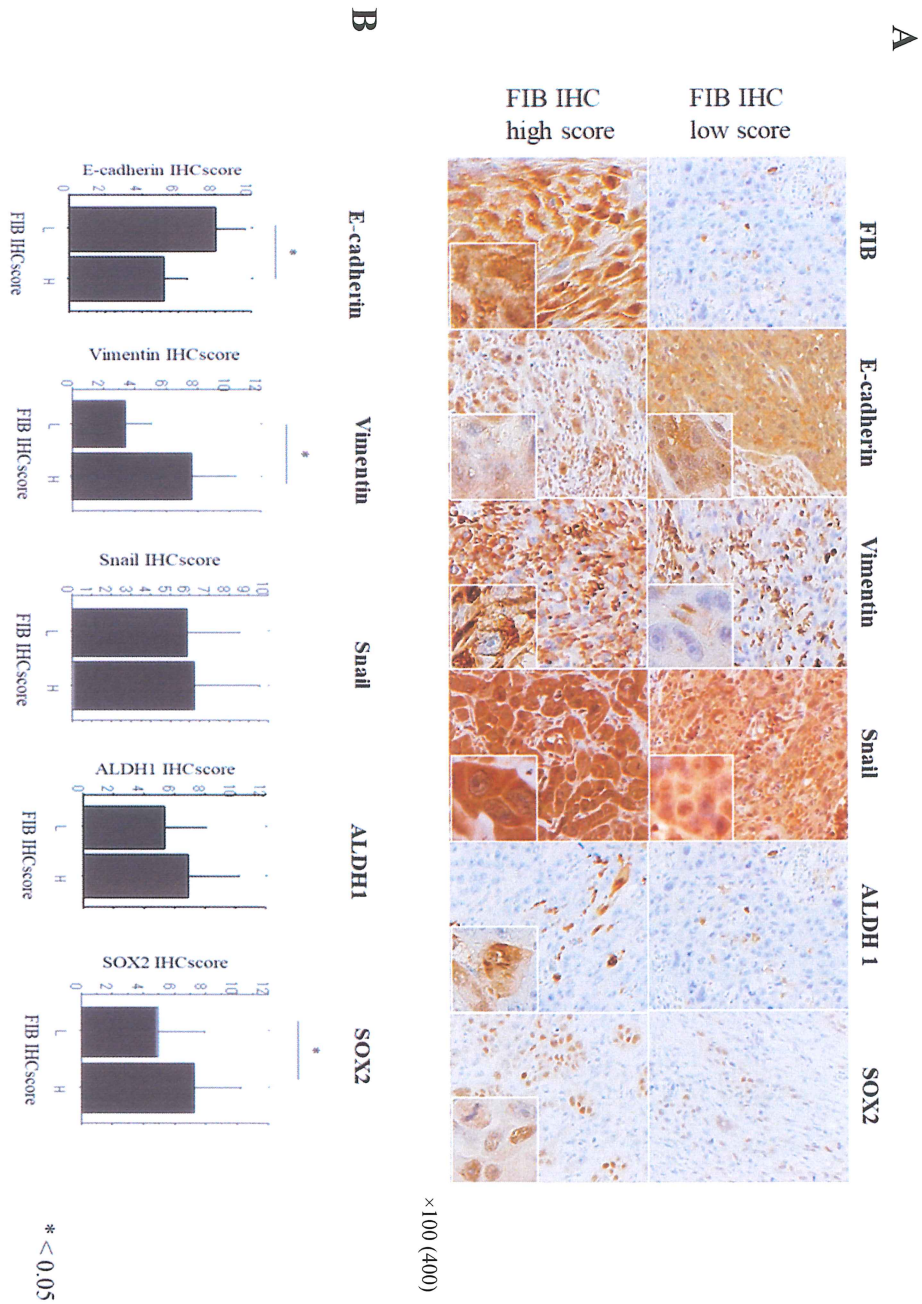


図 18. FIB IHC score と EMT 関連マーカーの相関性

- (A) FIB IHC score Low (上段)、FIB IHC score High (下段) と EMT 関連マーカー IHC
- (B) FIB IHC score と EMT 関連マーカー IHC score の相関性

FIB, fibrinogen; EMT, Epithelial-Mesenchymal Transformation; IHC, immunohistochemistry.

表 1. HNSCC におけるメタアナリシス解析のための症例対照研究の evidence table

No.	First author	Journal (year)	Population	Hospital facility	Period	No. of cases.	FIB cut-off
1	Holzinger D	PLoS One. (2016)	Austria	Medical University of Vienna	2000-2011	71	447 mg/dL
2	Kuwahara T	Anticancer Res. (2018)	Japan	Yokohama City University Hospital	December 2005-December 2015	154	341 mg/dL
3	Sheng X	Med Sci Monit. (2019)	China	Guangdong Provincial Peoples' Hospital	January 2008-June 2015	110	4.0 g/L
4	Liang YJ	BMC Cancer. (2021)	China	Guanghua Hospital of Stomatology	January 2015-December 2018	202	3.33 g/L
5	Caruntu A	Cancers (Basel). (2021)	Romania	Carol Davila Central Military Emergency Hospital	2016-2019	223	525 mg/dL
6	Han Y	Ear Nose Throat J. (2021)	China	First Affiliated Hospital of Anhui Medical University	April 2017-October 2020	218	3.26 g/L
7	Inoue A	Hum Pathol. (2022)	Japan	Kitasato University Hospital	January 2014-December 2016	84	342 mg/dL

FIB, fibrinogen; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma;

表 2. HNSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子との相関性のメタアナリシス

Clinical parameters	Number of studies (number of patients)	OR (95%CI)	<i>P</i> value
T stage (T3,4 vs. T1,2)	7 (970)	2.47(1.46-4.16)	0.0007
TNM stage (III,IV vs. I,II)	6 (754)	2.04(1.13-3.67)	0.02

FIB, fibrinogen; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; OR, odds ratio; T, tumor size and depth of tumor invasion; TNM, tumor, node, metastasis;

表 3. OSCC における Plasma FIB level と臨床病理学的因子との相関性

		plasma FIB level, n (%)		p-value
		Low (< 342 mg/dL)	High (≥342 mg/dL)	
Age (years)	<60	13 (61.9)	8 (38.1)	p = 0.6127
	≥60	33 (52.4)	30 (47.6)	
Gender	Male	31 (55.4)	25 (44.6)	p = 0.8768
	Female	15 (53.6)	13 (46.4)	
Stage	I	27 (67.5)	13 (32.5)	p = 0.0504
	II	9 (64.3)	5 (35.7)	
	III	6 (42.9)	8 (57.1)	
	IV	4 (28.6)	10 (71.4)	
pT	1	31 (67.4)	15 (32.6)	p = 0.0100
	2	13 (56.5)	10 (43.5)	
	3	1 (11.1)	8 (88.9)	
	4	1 (25.0)	3 (75.0)	
pN	Negative	30 (55.6)	24 (44.4)	p = 0.7156
	Positive	10 (47.6)	11 (52.4)	
Ly	Negative	24 (48.0)	26 (52.0)	p = 0.1150
	Positive	20 (69.0)	9 (31.0)	
v	Negative	29 (67.4)	14 (32.6)	p = 0.0288
	Positive	15 (40.5)	22 (59.5)	
YK	1	4 (80.0)	1 (20.0)	p = 0.5399
	2	12 (46.2)	14 (53.8)	
	3	16 (57.1)	12 (42.9)	
	4	8 (57.1)	6 (42.9)	

FIB, fibrinogen; pT, Pathological tumor size and depth of invasion; pN, Pathological nodal status; Ly, Lymphatic vessel invasion; V, Venous invasive; YK, Yamamoto-Kohama classification; * p<0.05

表 4. OSCC における FIB IHC score と臨床病理学的因子との相関性

		FIB IHC score, <i>n</i> (%)		p-value
		Low (< 6)	High (≥ 6)	
Age (years)	<60	6 (28.6)	15 (71.4)	p = 0.6019
	≥60	25 (37.9)	41 (62.1)	
Gender	Male	20 (33.9)	39 (66.1)	p = 0.8000
	Female	11 (39.3)	17 (60.7)	
Stage	I	22 (52.4)	20 (47.6)	p = 0.0078
	II	3 (21.4)	11 (78.6)	
	III	4 (26.7)	11 (73.3)	
	IV	1 (7.1)	13 (92.9)	
pT	1	24 (50.0)	24 (50.0)	p = 0.0073
	2	5 (21.7)	18 (78.3)	
	3	0 (0.0)	10 (100.0)	
	4	1 (25.0)	3 (75.0)	
pN	Negative	22 (38.6)	35 (61.4)	p = 0.3425
	Positive	5 (23.8)	16 (76.2)	
Ly	Negative	16 (28.6)	40 (71.4)	p = 0.0494
	Positive	14 (53.8)	12 (46.2)	
V	Negative	22 (48.9)	23 (51.1)	p = 0.0162
	Positive	8 (21.1)	30 (78.9)	
YK	1	3 (60.0)	2 (40.0)	p = 0.6106
	2	8 (30.8)	18 (69.2)	
	3	10 (33.3)	20 (66.7)	
	4	4 (28.6)	10 (71.4)	

FIB, fibrinogen; IHC, immunohistochemistry; pT, Pathological tumor size and depth of invasion; pN, Pathological nodal status; Ly, Lymphatic vessel invasion; V, Venous invasive; YK, Yamamoto-Kohama classification; OSCC, oral squamous cell carcinoma. * $p < 0.05$.

表 5. OSCC における全生存期間の単変量解析および多変量解析

Univariate				Multivariate			
Variable	Cutoff	Log-rank value	p value	factor	Hazard Ratio	95% CI	p value
Overall survival							
FIB immunoreactivity	5/6	9.275	<u>0.0165</u>	High score	7.285	0.423 - 125.493	0.1715
plasma FIB level	< 342/≥342	4.218	<u>0.0474</u>		0.984	0.113 - 8.593	0.9884
Age	< 60/≥60	3.067	0.0996				
Gender	Male/Female	0.284	0.5947				
Stage	I,II/III,IV	6.486	<u>0.0250</u>	III,IV	0.060	0.006 - 0.611	<u>0.0175</u>
pT	1,2/3,4	12.060	<u>0.0015</u>	3,4	2.614	0.320 - 21.366	0.3699
pN	0,1/2,3	2.988	0.0941	2,3			
Ly	negative/positive	0.199	0.6566	positive			
V	negative/positive	21.805	<u>0.0004</u>	positive	2.173	0.282 - 16.746	0.4563
YK	1,2/3,4	6.540	<u>0.0173</u>	3,4	0.339	0.037 - 3.114	0.3392

CI, confidence interval; FIB, fibrinogen; IHC, immunohistochemistry; pT, Pathological tumor size and depth of invasion; pN, Pathological nodal status; Ly, Lymphatic vessel invasion; V, Venous invasive; YK, Yamamoto-Kohama classification; OSCC, oral squamous cell carcinoma.