

Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma

北村, 亮二
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21992>

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

II. OSCC の分化による CK17 の発現様式

II-1. OSCC における CK17 と ΔNp63 との発現様式の違い

CK17 の発現様式と OSCC の分化との関連を検索するため、上皮幹細胞のマーカである ΔNp63 を用いて免疫組織化学染色を行った。結果を図 9 に示す。

ΔNp63 は細胞核に限局して発現を認めた。ΔNp63 の発現頻度は 102/105 例 (97.1%) であった。ΔNp63 は、OSCC 組織において癌胞巣、浸潤先端部ともに最外層に発現を認めるが、癌胞巣の中心部では発現がみられなかった。ΔNp63 の発現と OSCC の臨床病理学的所見との間には有意な発現を認めなかった (表 7)。

CK17 と ΔNp63 の発現様式を比較すると、CK17 は癌胞巣の内側において発現しているのに対し、ΔNp63 は癌胞巣の最外層や浸潤先端部において発現していた。さらに、二重免疫組織化学染色を行ったところ、DAB で標識された CK17 は癌胞巣の内側に発現し、Perma Blue で標識された ΔNp63 は癌胞巣の最外層や浸潤先端部等に発現した。両者を比較すると、CK17 と ΔNp63 の共発現は、大部分の OSCC 細胞はにおいて認められなかった (図 10)。

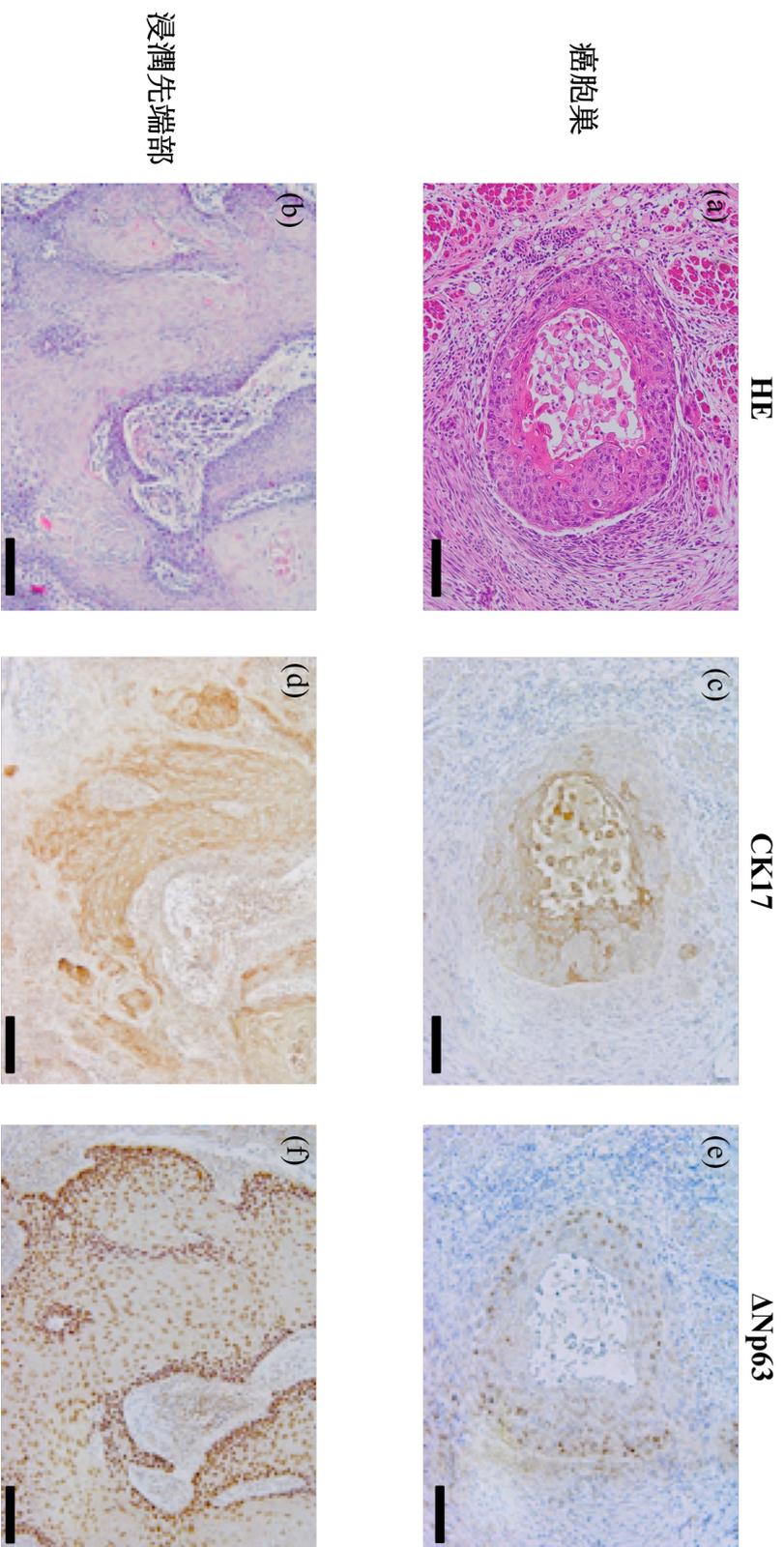


図9 OSCCにおけるCK17およびANP63の発現の比較
 ANP63は癌胞巣の最外層において発現を認め、さらに腫瘍の実質においても最外層に発現を認めた。癌胞巣や腫瘍実質の内側に発現を認めるCK17と比較すると、ANP63の発現はCK17の発現とは異なる局在を示した。(癌胞巣 scale bars: 50 μm、浸潤先端部 scale bars: 100 μm)

表 7 OSCC における Δ Np63 の発現と臨床病理組織学的所見との関連

項目	分類	症例数 ^b	OSCC における Δ Np63 の発現頻度 ^a				有意差 ^c
			-	+	++	+++	
性別	男	53	0	0	25	28	N.S.
	女	52	5	1	21	25	
年齢	65>	61	5	0	29	27	N.S.
	65<	44	0	1	17	26	
分化度 ^d	高分化	72	4	1	32	31	N.S.
	中分化 + 低分化	33	2	0	14	17	
T	1	41	1	1	14	25	N.S.
	2	47	4	0	19	24	
	3	3	0	0	2	1	
	4	14	0	0	11	3	
N	あり	20	0	0	11	9	N.S.
	なし	85	5	1	35	44	
腫瘍浸潤様式 ^e	1	9	0	1	4	4	N.S.
	2	21	1	0	8	12	
	3	48	3	0	22	24	
	4C	19	0	0	9	10	
	4D	7	1	0	3	3	
ステージ分類 ^f	I	42	1	1	15	25	N.S.
	II	33	4	0	13	16	
	III	8	0	0	5	3	
	IV	22	0	0	13	9	
部位	舌	63	4	1	24	34	N.S.
	歯肉	23	1	0	12	10	
	頬粘膜	8	0	0	6	2	
	口底	7	0	0	2	5	
	口蓋	4	0	0	2	2	

^a Δ Np63 を免疫組織化学的に検索した。発現頻度の評価方法は「材料と方法」に示している。

^b 症例数を示す。

^c χ^2 検定を行った。

^d 分化度は WHO 分類による。

^e 腫瘍浸潤様式は山本・小濱分類による。

^f ステージ分類は WHO 分類による。

N.S.: not significant

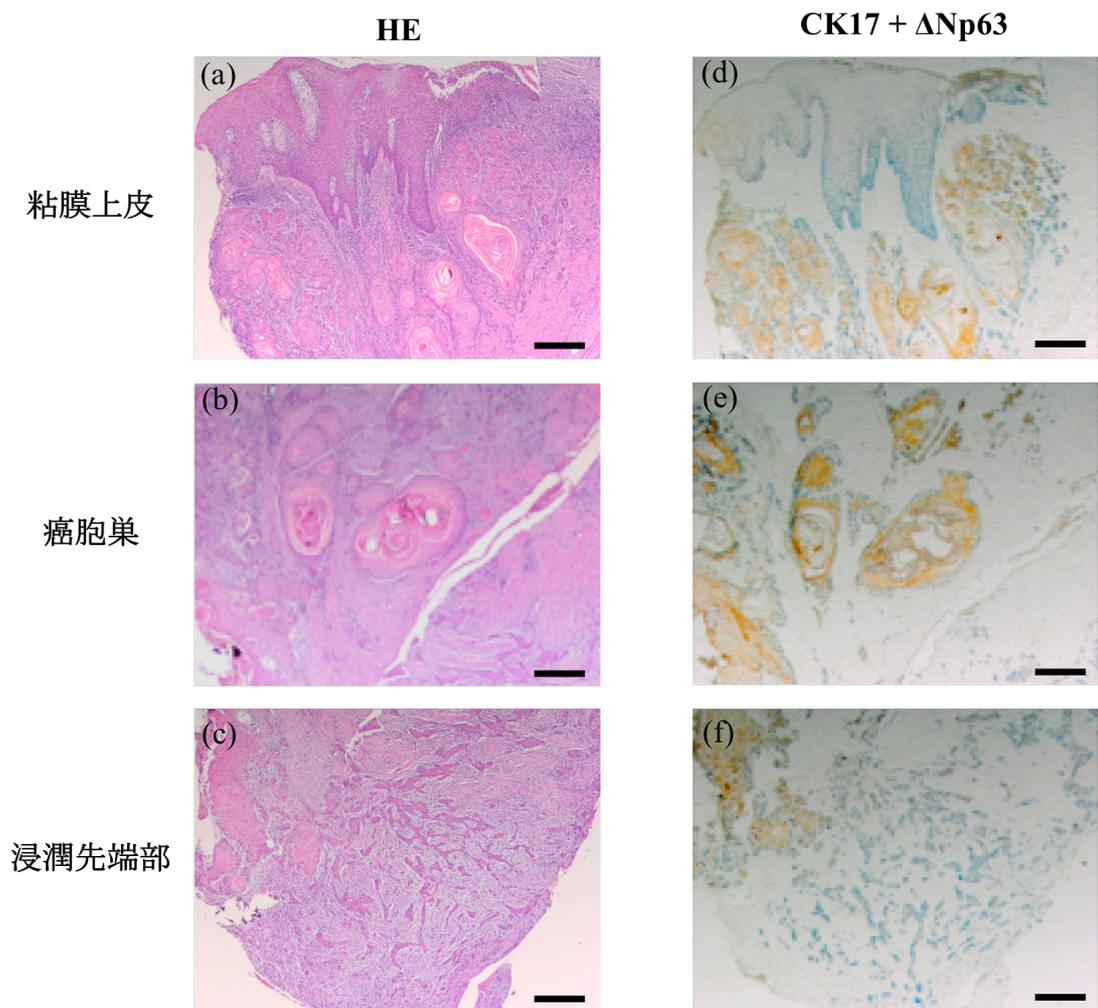


図 10 OSCC における Δ Np63 および CK17 発現の比較
 CK17 と Δ Np63 の二重免疫組織化学染色を示す。 Δ Np63 は Perma Blue で、CK17 は DAB で標識した (d-f)。 Δ Np63 は癌胞巣の最外層や浸潤先端部の細胞において発現を認めた。大部分の OSCC 細胞において Δ Np63 および CK17 を共発現する細胞はみられなかった。(scale bars: 200 μ m)

II-2. OSCC 細胞株における CK17 mRNA の発現

次に *in vitro* における CK17 と OSCC の分化との関連を検索した (図 11)。

高分化型 OSCC 由来である HSC-2 の CK17 mRNA 発現量 (RQ; 29.3 ± 4.4)は、低分化型 OSCC 由来である HSC-3 の CK17 mRNA 発現量 (RQ; 21.1 ± 5.7) および SAS の CK17 mRNA 発現量 (RQ; 14.7 ± 3.2) と比較して有意に多かった ($p < 0.05$ 、student の t 検定; 図 11)。また、同一症例由来の細胞株において、SQUU-A の CK17 mRNA 発現量 (RQ; 23.7 ± 3.9) は SQUU-B の CK17 mRNA 発現量 (RQ; 6.0 ± 0.8) と比較して有意に多かった ($p < 0.05$ 、student の t 検定; 図 11)。正常ヒトケラチノサイト由来細胞株である HaCaT は他の細胞株と比較し CK17 mRNA 発現量が有意に少なかった ($p < 0.01$ 、student の t 検定; 図 11)。

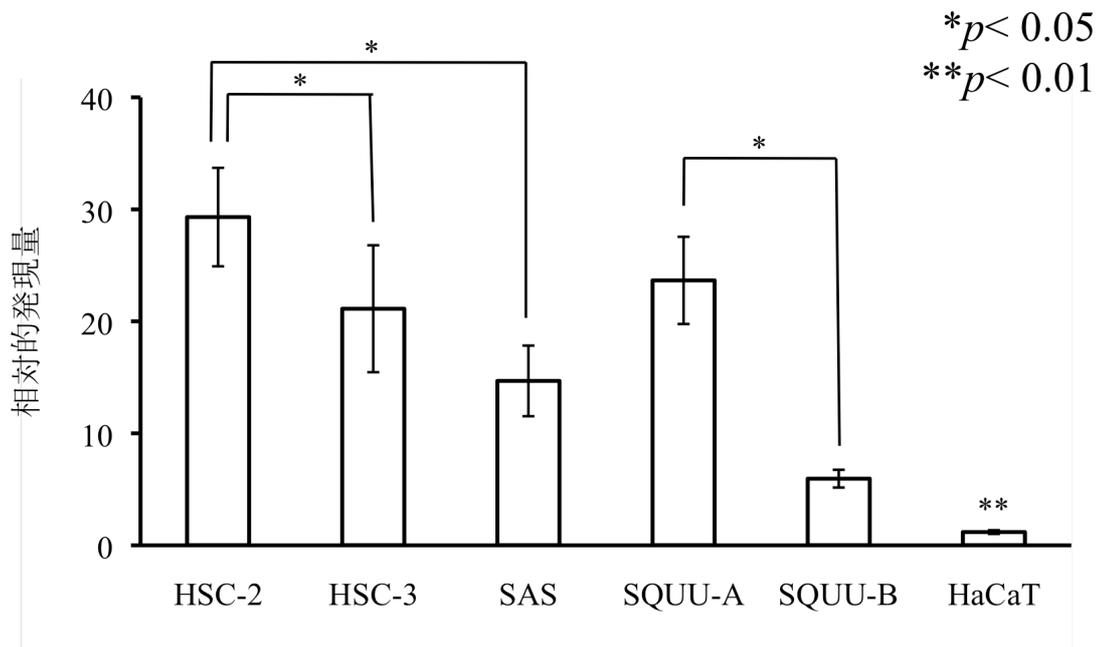


図 11 OSCC の細胞株における CK17 mRNA の発現

HSC-2 における CK17 mRNA の相対的発現量は HSC-3 および SAS と比較して有意に高く、SQUU-A における CK17 mRNA の相対的発現量は SQUU-B と比較して有意に高かった。また、HaCaT における CK17 mRNA の相対的発現量は他の全ての細胞株と比較して有意に低かった。グラフは独立して行った 5 回のデータの平均 ± 標準偏差を示している。統計学的検定は student の *t* 検定にて行った。

考察

OSCC に対する治療は外科的切除を基本としているが、腫瘍の大きさによっては放射線療法や化学療法を組み合わせた三者併用療法を行う場合もあり、当科では近年 5 年生存率が 80% を超え良好な成績を収めている。しかし、依然として予後不良となる症例が存在し、診断の遅れや放射線療法や化学療法に抵抗性を持つ OSCC 細胞の存在が原因の一つであると考えられる (27)。これらの症例は低分化型 OSCC が多く、悪性の有無だけでなく分化度の判断ができる新規マーカーの同定が望まれている。そこで、本研究では CK17 に着目し、OSCC における発現様式と分化との関連を検索した。

OSCC の生検材料における 7 種類の CK の発現を検索するため免疫組織化学的染色を行ったところ、CK17 は NOE ではほとんど発現がみられず、OSCC に特異的に発現することが示唆された。他部位では、肺 (7)、喉頭 (10)、食道の扁平上皮癌 (11、12、28) における CK17 の発現や、OSCC 組織においては CK17 mRNA の過剰発現が報告されており (29、30)、本研究の結果はこれらの報告と一致するものであった。また、CK13 は NOE の有棘層に発現を認めたが、OSCC においてはほとんど発現がみられなかった。CK13 は NOE において発現し *dysplasia* へ変化すると消失するという報告もあり (31)、癌化の過程でその発現が減弱することが示唆された。一方、他の CK の発現頻度は NOE と OSCC との間には CK17 や CK13 のような差を認めなかった。CK14 は肺癌のマーカーとして有用であり (32)、OSCC においても CK14 の発現頻度は、OSCC 細胞および隣接していた異型上皮にも高発現した。以上から OSCC のマーカーとして有用

である可能性が考えられたが、NOE の基底層にも高頻度に発現するため、OSCC に特異的ではなかった。CK19 は以前から OSCC に特異的に発現するといわれ (33) 、臨床において腫瘍マーカーとして使用されている (34) 。本研究では一部の OSCC に発現を認め、NOE でも一部の症例で基底層に発現していた。しかし、CK19 の発現頻度は 37.1% と他の CK と比較して低く、OSCC に特異的であることを示すことはできなかった。CK20 は OSCC の再発と関連しており (14) 、前立腺癌においては組織型の決定因子である (35) 。本研究では CK20 も CK17 と同様に OSCC において発現を認めたが、NOE と比較して有意ではなかったため、OSCC の診断因子とは成り得なかった。CK16、CK18 はともに OSCC に関する報告は少ないが、膀胱癌においては CK16 の発現を認め (36) 、CK18 は食道扁平上皮癌の再発と関連している (37) 。本研究では、CK16 は OSCC において腫瘍の中心部分に発現を認め、NOE の有棘層にも発現を認めたが、発現頻度に差がなく OSCC に特異的とは認められなかった。CK18 は OSCC および NOE において発現は認めるものの、全体的に発現が弱いため口腔の診断因子としての有用性は乏しいと考えられた。以上から、7 種類の CK の比較において CK17 が OSCC に特異的に高発現していることが分かった。

また、OSCC における CK17 の発現と臨床病理学的所見との比較をすると、中分化型や低分化型と比較して、高分化型 OSCC において有意に CK17 の発現を認めた。Wei らの報告では、OSCC において CK17 は臨床病理学的所見と関係なく OSCC 細胞に特異的に発現している (38) 。しかし、この報告は対象が 30 症例と少なく、統計学的解析が困難であった。本研究では、高分化型 OSCC の癌巣の内側において CK17 の強い発現を認め、一方、低分化型 OSCC に認める

散在した OSCC 細胞には発現がみられなかった。したがって、CK17 は高分化型 OSCC において特異的に高発現することが示唆された。

CK17 を発現していない OSCC 細胞は、癌巣の最外層や、浸潤先端部に認められる癌巣を形成しない散在したものであった。Mikami らの報告でも扁平上皮内癌における第一基底様細胞や、癌巣の最外層において CK17 を発現していない細胞が多数認められた (21)。癌巣の階層構造は正常の扁平上皮と類似しているため、最外層の特徴は基底層のものと同じと考えられる。そのため、CK17 が発現していない最外層の OSCC 細胞は低分化であると考えられる (19、39)。また、低分化型 OSCC では高分化な OSCC 細胞はほとんど認められず、浸潤先端部には低分化な OSCC 細胞が多数認められる (40)。さらに、OSCC の中でも成長が早く、放射線療法等に抵抗性を示すのが低分化型 OSCC といわれているため (27)、悪性度が高い OSCC 細胞では CK17 の発現がみられないことが示唆された。

白板症においては、CK17 は dysplasia 症例において発現頻度が高く、NOE においては発現がみられなかった。逆に CK13 は NOE において発現し dysplasia 症例においては発現頻度が低かった。すなわち、NOE が dysplasia となる過程において、CK17 の発現頻度が増加し CK13 の発現頻度が減少する可能性が示された。症例によっては、dysplasia と hyperplasia の境界において CK17 と CK13 の発現の局在が明確なものもあった。dysplasia 症例において CK17 の発現を認めないものもあるため CK17 のみでは診断因子としては不十分だが、dysplasia において発現頻度が減少する CK13 を組み合わせることで、悪性転化する可能性が高い dysplasia の診断がより正確になることが示唆された。

本研究では次に、CK17 と OSCC の分化との関連について検索した。ΔNp63 は自己複製する細胞に発現することから、近年上皮幹細胞のマーカーとして注目されている (22、41) 。ΔNp63 は上皮基底層や癌巣の最外層に発現することから、OSCC において ΔNp63 を発現する細胞は低分化 OSCC 細胞であると考えられている (22) 。また、OSCC における複数の CK の発現と ΔNp63 の発現との比較をした報告もあり (42) 、OSCC の分化度を検索する上で有用であると考えられる。ΔNp63 を発現している OSCC 細胞は CK17 を発現していないものが多く、両者は異なる発現様式を示した。以上から CK17 は低分化 OSCC 細胞には発現せず、分化の進んだ OSCC 細胞に発現することが示唆された。また、CK17 と ΔNp63 を共発現する細胞がごく一部に観察された。Martens らは、子宮頸部において CK17 と ΔNp63 を共発現する細胞は幹細胞の性質を持っており、癌組織では癌幹細胞の可能性があると報告している (8) 。さらに研究を重ねることで CK17 の OSCC 幹細胞マーカーとしての可能性を検討できるかも知れない。

さらに *in vitro* での解析では、高分化型 OSCC 由来である HSC-2 (43) における CK17 mRNA の発現量が、低分化型 OSCC 由来である HSC-3 および SAS (44) より有意に多かった。また、SQUU-A と -B は高分化型の同一組織から樹立されたにも関わらず、SQUU-A における CK17 mRNA 発現量が SQUU-B より有意に多かった。SQUU-A は *in vivo* において癌巣を形成しリンパ節転移を認めない一方で、SQUU-B は *in vivo* において筋層浸潤や、リンパ管浸潤、リンパ節転移を起こすことがあり (45) 、悪性度は SQUU-A より SQUU-B の方が高い。この SQUU-B の *in vivo* における特徴は HSC-3 と重複しており (46) 、ゆえに、SQUU-B の性質は低分化型 OSCC 由来の細胞株に類似していると考えられる。HSC-3 お

よび SAS の様に低分化型 OSCC 由来の細胞株、および SQUU-B の様に *in vivo* において低分化型 OSCC 様の組織を示し悪性度の高い細胞株における CK17 mRNA の発現量が少ないことから、CK17 は分化に関連しているだけでなく悪性度の低い OSCC 細胞に発現することが示唆された。

以上から、CK17 は高分化型 OSCC や異型上皮において特異的に発現するものの、癌胞巣を形成せず分化の進んでいない低分化 OSCC 細胞では発現が減弱することが分かった。しかし、CK の発現を制御している遺伝子は明らかにされていない (47-49) 。本研究では原発巣組織や細胞株における CK17 の発現を検討したが、*dysplasia* 症例における CK17 の発現や低分化 OSCC 細胞における発現の減弱、また *dysplasia* 症例における CK13 の発現の消失に関与している遺伝学的要因は検索していない。本研究の結果から CK17 の発現と癌化は関連していることが推察されるため、今後は CK17 の発現を制御する遺伝子の解明を行い、癌化との関連を検索する予定である。

現在、腫瘍マーカーとして CEA や CYFRA 等が臨床でも利用されているが偽陽性の割合が高いことが問題となっている (33) 。扁平上皮癌において CK17 が特異的に発現している報告は多数あり、CK17 は腫瘍マーカーとして注目されている (30、38、50) 。しかし、OSCC において CK17 に関する報告は非常に少ない。さらに、CK17 と OSCC の分化との関連に着目した報告はないため、本研究は今後の OSCC の診断に重要な役割を持つと考えられる。今回は OSCC の分化との関連が明らかになったが、さらに、OSCC における CK17 の発現と予後との関連を検索することは臨床上有用であると考えられる。CK17 が臨床で利用されるよう今後も研究を重ねていく所存である。

謝辞

稿を終えるにあたり、このような研究の機会を与えて頂きましたとともに終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野中村誠司教授に深甚なる謝意を表します。さらに、直接御指導、御校閲を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野豊嶋健史助教に謹んで感謝の意を表します。また、常に研究の協力ならびに励ましの言葉を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の教室員の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

1. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; **98**: 546-52.
2. Jan JC, Hsu WH, Liu SA, Wong YK, Poon CK, Jiang RS, Jan JS, Chen IF. Prognostic factors in patients with buccal squamous cell carcinoma: 10-year experience. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; **69**: 396-404.
3. Sasaki M, Aoki T, Karakida K, Otsuru M, Takahashi M, Akamatsu T, Sakamoto H, Ota Y. Postoperative follow-up strategy in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; **69**: e105-11.
4. Xu XC, Lee JS, Lippman SM, Ro JY, Hong WK, Lotan R. Increased expression of cytokeratins CK8 and CK19 is associated with head and neck carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; **4**: 871-6.
5. Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Maruoka Y, Toyoshima K, Yasumoto S. Overexpression of bcl-2 protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes in vitro. *J Oral Pathol Med* 1998; **27**: 11-7.
6. Romano RA, Ortt K, Birkaya B, Smalley K, Sinha S. An active role of the DeltaN isoform of p63 in regulating basal keratin genes K5 and K14 and directing epidermal cell fate. *PLoS One* 2009; **4**: e5623.
7. Wetzels RH, Schaafsma HE, Leigh IM, Lane EB, Troyanovsky SM, Wagenaar SS, Vooijs GP, Ramaekers FC. Laminin and type VII collagen distribution in different types of human lung carcinoma: correlation with expression of keratins 14, 16, 17 and 18. *Histopathology* 1992; **20**: 295-303.
8. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res* 2004; **24**: 771-5.
9. Carrilho C, Alberto M, Buane L, David L. Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Hum Pathol* 2004; **35**: 546-51.
10. Cohen-Kerem R, Madah W, Sabo E, Rahat MA, Greenberg E, Elmalah I. Cytokeratin-17 as a potential marker for squamous cell carcinoma of the larynx.

- Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; **113**: 821-7.
11. Takahashi H, Shikata N, Senzaki H, Shintaku M, Tsubura A. Immunohistochemical staining patterns of keratins in normal oesophageal epithelium and carcinoma of the oesophagus. *Histopathology* 1995; **26**: 45-50.
 12. Luo A, Kong J, Hu G, Liew CC, Xiong M, Wang X, Ji J, Wang T, Zhi H, Wu M, Liu Z. Discovery of Ca²⁺-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 2004; **23**: 1291-9.
 13. Zhong LP, Chen WT, Zhang CP, Zhang ZY. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; **104**: 377-84.
 14. Kawamata H, Uchida D, Nakashiro K, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M. Haematogenous cytokeratin 20 mRNA as a predictive marker for recurrence in oral cancer patients. *Br J Cancer* 1999; **80**: 448-52.
 15. Toyoshima T, Vairaktaris E, Nkenke E, Schlegel KA, Neukam FW, Ries J. Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; **134**: 515-21.
 16. Whipple ME, Mendez E, Farwell DG, Agoff SN, Chen C. A genomic predictor of oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2004; **114**: 1346-54.
 17. Ramirez-Miranda A, Nakatsu MN, Zarei-Ghanavati S, Nguyen CV, Deng SX. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis* 2011; **17**: 1652-61.
 18. Ohta K, Ogawa I, Ono S, Taki M, Mizuta K, Miyauchi M, Takechi M, Shigeishi H, Takata T, Kamata N. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. *Oncol Rep* 2010; **24**: 9-14.
 19. Bloor BK, Seddon SV, Morgan PR. Gene expression of differentiation-specific keratins (K4, K13, K1 and K10) in oral non-dysplastic keratoses and lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2000; **29**: 376-84.
 20. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; **46**: 518-39.

21. Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, Adeola HA, Wu L, Shingaki S, Saito C, Saku T. Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: Their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol* 2011.
22. Matsubara R, Kawano S, Kiyosue T, Goto Y, Hirano M, Jinno T, Toyoshima T, Kitamura R, Oobu K, Nakamura S. Increased DeltaNp63 expression is predictive of malignant transformation in oral epithelial dysplasia and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2011; **39**: 1391-9.
23. Wahi PN, Cohen B, Luthra UK, et al. Histological consideration. In Wahi PN, Cohen B, Luthra UK, et al. eds. *Histological typing of oral and oropharyngeal tumors*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1977; 15-19
24. Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 1984; **6**: 938-47.
25. Gale N, Pilch BZ, Sindramsky D, et al. Epithelium precursor lesions. In Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon: Iarc Press, 2005; 177-179.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-8.
27. Pekkola-Heino K, Kulmala J, Klemi P, Lakkala T, Aitasalo K, Joensuu H, Grenman R. Effects of radiation fractionation on four squamous cell carcinoma lines with dissimilar inherent radiation sensitivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; **117**: 597-602.
28. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, Torhorst J, Sauter G, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Seitz R, Ross D, Botstein D, Brown P. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002; **161**: 1991-6.
29. Toyoshima T, Koch F, Kaemmerer P, Vairaktaris E, Al-Nawas B, Wagner W. Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results. *J Oral Pathol Med* 2009; **38**:

- 530-4.
30. Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, Mao L, Wong DT, Zhou X. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* 2008; **9**: 69.
 31. Sakamoto K, Aragaki T, Morita K, Kawachi H, Kayamori K, Nakanishi S, Omura K, Miki Y, Okada N, Katsube K, Takizawa T, Yamaguchi A. Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. *Histopathology* 2011; **58**: 531-42.
 32. Chen Y, Cui T, Yang L, Mireskandari M, Knoesel T, Zhang Q, Pacyna-Gengelbach M, Petersen I. The diagnostic value of cytokeratin 5/6, 14, 17, and 18 expression in human non-small cell lung cancer. *Oncology* 2011; **80**: 333-40.
 33. Kurokawa H, Yamashita Y, Tokudome S, Kajiyama M. Combination assay for tumor markers in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; **55**: 964-6.
 34. Nagler RM, Barak M, Peled M, Ben-Aryeh H, Filatov M, Laufer D. Early diagnosis and treatment monitoring roles of tumor markers Cyfra 21-1 and TPS in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1999; **85**: 1018-25.
 35. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002; **38**: 758-63.
 36. Cao L, Zhou XD, Sens MA, Garrett SH, Zheng Y, Dunlevy JR, Sens DA, Somji S. Keratin 6 expression correlates to areas of squamous differentiation in multiple independent isolates of As(+3)-induced bladder cancer. *J Appl Toxicol* 2010; **30**: 416-30.
 37. Makino T, Yamasaki M, Takeno A, Shirakawa M, Miyata H, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Nishida T, Matsuura N, Mori M, Doki Y. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2009; **101**: 1298-306.
 38. Wei KJ, Zhang L, Yang X, Zhong LP, Zhou XJ, Pan HY, Li J, Chen WT, Zhang ZY. Overexpression of cytokeratin 17 protein in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oral Dis* 2009; **15**: 111-7.
 39. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B,

- Leigh I, Plantema F, Vooijs P. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 1992; **140**: 601-12.
40. Willen R, Nathanson A, Moberger G, Anneroth G. Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryngol* 1975; **79**: 146-54.
41. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 3156-61.
42. Yamauchi K, Fujioka Y, Kogashiwa Y, Kohno N. Quantitative expression study of four cytokeratins and p63 in squamous cell carcinoma of the tongue: suitability for sentinel node navigation surgery using one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* 2011; **64**: 875-9.
43. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; **106**: 761-71.
44. Takahashi K, Kanazawa H, Akiyama Y, Tazaki S, Takahara M, Muto T, Tanzawa H, Sato K. Establishment and characterization of a cell line (SAS) from poorly differentiated human squamous cell carcinoma of the tongue. *J Jpn Stomatol Soc* 1989; **38**: 20-8.
45. Morifuji M, Taniguchi S, Sakai H, Nakabeppu Y, Ohishi M. Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1317-26.
46. 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 他. 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. *日本口腔科学会雑誌* 1986; **35**: 485-96.
47. Debus E, Moll R, Franke WW, Weber K, Osborn M. Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1984; **114**: 121-30.
48. Morgan PR, Shirlaw PJ, Johnson NW, Leigh IM, Lane EB. Potential applications of anti-keratin antibodies in oral diagnosis. *J Oral Pathol* 1987; **16**: 212-22.
49. Vigneswaran N, Peters KP, Hornstein OP, Haneke E. Comparison of cytokeratin,

filaggrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; **18**: 377-90.

50. Lalli A, Tilakaratne WM, Ariyawardana A, Fitchett C, Leigh IM, Hagi-Pavli E, Cruchley AT, Parkinson EK, Teh MT, Fortune F, Waseem A. An altered keratinocyte phenotype in oral submucous fibrosis: correlation of keratin K17 expression with disease severity. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**: 211-20.