
Review

口腔癌の発生と進展：増殖・浸潤の分子メカニズム

工藤 保誠

キーワード：口腔癌，増殖，浸潤，細胞周期，epithelial-to mesenchymal transition

Tumorigenesis and Development of Oral Cancer : Molecular Mechanism on Proliferation and Invasion

Yasusei KUDO

Abstract : In Japan, which has entered a super-aging society, the number of oral cancer patients is expected to increase. According to the 2019 statistics by the National Cancer Center in Japan, the number of patients diagnosed with oral cancer in one year is about 22,000, and the number of patients who died is about 8,000. Thus, the prognosis of oral cancer is not good. Although the incidence of oral cancer in Japan is about 3% of all cancers, oral cancer is one of the most common cancers in the world, because of higher incidence of oral cancer in West Asian countries. As oral cancer is a marked decrease in QOL, the development of novel diagnosis for early detection and prevention of progression and treatment for reducing aesthetic and functional loss is urgently desired. In oral cancer treatment, in addition to conventional surgical and radiotherapy, anticancer drugs such as cisplatin, 5-FU, and paclitaxel are used, but their strong side effects have become a problem. In general, early cancer rarely has severe sequelae after resection, but a wider range of resection in advanced cancer affects speech and feeding. In recent years, molecular-targeted therapies have achieved remarkable results. In oral cancer, only cetuximab targeting the EGF (epidermal growth factor) receptor and immune checkpoint inhibitor, anti-human PD-L1 monoclonal antibody (nivolumab) are approved for oral cancer. There are few effective molecular-targeted therapies compared to other cancers. Recently, in addition to immunotherapy, photoimmunotherapy, superselective arterial injection chemotherapy and differentiation/apoptosis induction therapy, there have been a lot of studies on the molecular and gene therapy. For achieving the development of novel treatment, it is necessary to elucidate the molecular mechanism on the development and progression of oral cancer. The cancer cells that occur on the surface of the oral mucosa invade deeply and metastasize to cervical lymph nodes and other organs. In the process of oral cancer progression, the presence of deep invasion and metastasis is the most important prognostic factor. In this review, I introduce the molecular mechanism of proliferation and invasion in the development and progression of oral cancer including our previous findings.

I. 緒 言

超高齢化社会を迎えた我が国では、今後、口腔がんの患者数が増加することが予想される。国立がんセンターによる2019年の統計では、1年間に口腔がんと診断された患者数は約2万2千人、死亡した患者数は約8千人で、決して口腔がんの予後は良好とはいえない。また、我が国における口腔癌の発生率は全癌の約3%であるが、西アジア諸国では全身に発生する癌の中で頻度が最も高いなど、世界的に頻度の高い癌の一つである。QOLの低下が著しい口腔癌に対して、早期発見や進展の予防のための新たな診断法や審美的・機能的損失を軽減する治療法の開発は社会的に早急に望まれている。口腔癌の治療では、癌の治療は従来の外科・放射線治療に加え、シスプラチン、5-FU、パクリタキセルなどの抗癌剤が用いられるが、その強い副作用が問題となっている。外科的切除において、早期癌では切除後に重い後遺症がでることはほとんどないが、進行癌では切除する範囲が広がると発語や摂食に影響が出る。近年、標的分子を狙い撃ちにした分子標的治療が著明な成果を上げており、口腔癌ではEGF (epidermal growth factor) 受容体を標的としたセツキシマブおよび免疫チェックポイント阻害剤であるヒト型抗ヒトPD-1モノクローナル抗体(ニボルマブ)が認可されているのみで、他の癌に比べて有効な分子標的治療薬が少ない。現在、外科的切除以外の治療法としてすでに応用されつつある免疫療法、光免疫療法、超選択的動注化学療法や分化・アポトーシス誘導療法に加え、分子・遺伝子治療の開発が進められている。新規治療法の開発は社会的に喫緊の課題である、そのためには口腔癌の発生や進展に関する分子メカニズムの解明が必要となる。通常、口腔粘膜表層に生じた癌細胞は深部へ浸潤し、頸部リンパ節や他臓器へと転移していく。その口腔癌の進展過程において、深部への浸潤や転移の有無は、患者の予後を左右する最も重要な因子である。本総説では、口腔癌の発生と進展における増殖・浸潤の分子メカニズムに関して、我々の知見も含めて紹介する。

II. 口腔癌の発生

口腔癌は、口腔粘膜上皮から発生するため、組織学的に扁平上皮癌の像を呈する。扁平上皮癌は、皮膚、食道、肺、子宮頸部などにも発生するが、同じ扁平上皮癌でも癌の発生や進展機構には臓器特異性があると考えられる。癌組織そのものがヘテロな細胞集団からなり、口腔扁平上皮癌においても浸潤・転移の病理像は極めて多彩である。一般的に、癌の発生には様々な因子が関与しており、癌細胞は正常な細胞に比べてユニークな性格を持っている。HanahanとWeinbergは、総説「The Hallmarks of Cancer: The next generation」において、癌細胞が獲得する特性として、①増殖抑制の回避、②持続的な増殖シグナル、③免疫逃避、④エネルギー代謝異常、

⑤無制限な複製能、⑥継続的な血管新生、⑦細胞死への抵抗性、⑧組織への浸潤・転移能をあげている¹⁾。正常な細胞が癌化するのに伴い、これらの特性の強弱により癌細胞の性質が決まる。口腔癌の治療法の選択や予後予測において、癌細胞の性格や進展の程度を把握することは極めて重要である。

癌細胞が獲得する特性で特記すべきは、増殖抑制の回避、持続的な増殖シグナル、無制限な複製能など、細胞増殖制御に関連する異常が癌の発生に関与することである。癌化において、細胞増殖制御メカニズムの異常は必須のイベントで、「細胞増殖速度の異常」と「チェックポイントの破綻」が重要であることは周知の事実である。細胞増殖はすべての生命にとって最も根源的な事象で、「DNA複製」と「細胞分裂」が交互に繰り返される。細胞分裂は、遺伝的に同一である細胞を確実に作り出すために、進化的に保存された精巧な細胞周期制御メカニズムによって厳密に制御されている。細胞周期チェックポイントは分裂中の遺伝的エラーの蓄積と伝播を防ぐ監視メカニズムとして機能し、①細胞周期の進行を遅らせる、②修復不可能なDNA損傷に反応して細胞周期を終了させる、あるいは③細胞死を誘導する。これらメカニズムの破綻が癌化に寄与すると考えられている。実際に、癌細胞における細胞周期制御の異常は、病理組織標本において、染色体数増加による核の大型化や細胞分裂異常の所見は日頃よく観察される。

細胞周期制御に異常をきたす突然変異が起きた細胞は、細胞周期を終了させる能力を失い、継続的に分裂できるようになる。通常、遺伝的異常を起こした細胞は、DNA損傷により生き残ることができないが、癌細胞は遺伝的異常の蓄積にもかかわらず、致死レベルのDNA損傷を防ぐとともに、重くのしかかる複製ストレスに耐え、致命的な染色体分配異常を防いでいる²⁾。このように、癌細胞は致命的な異常に対して、巧妙に細胞周期チェックポイントを制御することにより生き延びる戦略をとる。従って、癌における細胞周期制御メカニズムの理解は、発癌メカニズムの解明のみならず、新たな診断・治療の開発に重要である。従来、臨床で汎用されている抗がん剤は、DNA複製や細胞分裂を標的としているが、正常細胞にも効果を発揮するため、重篤な副作用が問題となる。放射線療法や化学療法により過剰なDNA損傷を誘導すると、健康な細胞よりも癌細胞で致命的レベルのゲノム不安定性や細胞死を引き起こす可能性が高くなる³⁾。このような治療法は最も効果的な方法であるが、DNA損傷を誘発することによって健康な細胞にも害を及ぼす可能性がある。癌細胞に特徴的な細胞周期制御ネットワークの様々な経路やプロセスが、副作用を軽減した効果の高い治療標的になると考えられる。新規分子標的治療薬の開発には、遺伝子変異とその細胞周期制御ネットワークを包括的に理解する必要がある。

Ⅲ. 口腔癌の進展

臨床的に癌の進行度の指標として、原発巣の大きさ、リンパ節転移ならびに遠隔転移を併せた TNM 分類が広く用いられている。口腔癌でも同様に進行度（ステージ分類）が決定されている⁴⁾。リンパ節転移はステージ分類に重要な指標となるが、口腔癌ではしばしば頸部リンパ節への転移が認められる。一般的に、癌細胞は細胞-細胞間の接着能の低下による原発巣からの離脱、癌周囲組織の破壊・浸潤、血管・リンパ管内への侵入、血管・リンパ管内での生存、原発巣から離れた部位での血管外への脱出とその部位での再増殖という過程を経て転移する。これら過程には様々な分子が関与し、それらを治療標的とした新規抗癌剤の開発が進んでいる。癌の原発巣における癌細胞の浸潤形態や深達度、脈管浸潤の有無は、病理診断においても予後を知る重要な所見となり、治療方針の決定に重要である。口腔癌の組織学的浸潤様式として、本邦では山本・小浜分類（YK 分類）がしばしば用いられている⁵⁾。YK 分類は、浸潤先端部の組織学特徴から、YK-1, -2, -3, -4C, -4D に分けている。特に、癌と正常部の境界が不明瞭で小さな癌巣が索状に浸潤する YK-4C や癌巣を作らずびまん性に浸潤する YK-4D は、リンパ節転移や予後と関連する⁶⁾。これは、癌の浸潤が口腔癌の悪性度を規定する重要な因子であることを示している。

癌の進展過程において、癌細胞は遺伝子変異を蓄積し、浸潤・転移能を獲得すると考えられており、臨床的に早期発見の段階でもすでに癌細胞が浸潤・転移可能な遺伝子変異を積み重ねている可能性がある。口腔癌の場合、顎下リンパ節や頸部リンパ節、肺への転移は認められるが、その他の臓器への転移は比較的稀である。1889年に英国の医師である Paget は、乳癌患者の臨床経過から転移巣形成パターンを体内におけるランダムな拡散や乳房からの全身循環を介する拡散では説明できないと結論づけて、「植物は種子を産生する。そしてその種子はあらゆる方向へ運ばれる。しかし、それらが生きて成長できるのは相性のよい土壤に落ちた時である」と記載し、癌の転移における「種と土壤理論（Seed and Soil theory）」を提唱した⁷⁾。一方、1928年に Ewing⁸⁾ が、1951年に Coman⁹⁾ が、癌転移の組織指向性が血行動態の特徴に基づくとする「血流依存説」を提唱した。1970年に Fidler らは、アイソトープ標識したメラノーマ細胞を静脈内に注射した際のマウス体内動態を調べ、肺以外の臓器では癌細胞の定着が認められなかったことから、「種と土壤理論」が裏付けられた¹⁰⁾。現在は、癌の転移における「種と土壤理論」が多くの研究者に支持されている。我々もヒト口腔癌細胞のヌードマウス舌への同所移植モデルにおいて、頸部リンパ節や肺への自然転移がみられたものの、その他の臓器への転移は認めていない¹¹⁾。転移における臓器特異性の理由は未だ明らかにされていないが、血行動態のみならず、臓器特異的な癌微

小環境における間質や局所での炎症反応などの相互作用の関与が推測される。癌転移における臓器特異性の解明には、今後のさらなる研究が必要である。

口腔癌では、上述のように YK 分類が転移予測において有用である。組織学的に YK-4D を示す口腔癌細胞を観察すると、YK-1, -2, -3 の癌細胞が敷石状に細胞-細胞間の接着能を保持しながら浸潤・増殖するのに比べて、孤在性に紡錘形を呈する細胞が浸潤している。紡錘形を呈する癌細胞は、上皮間葉移行（EMT：epithelial-mesenchymal transition）と呼ばれる現象を起こしていると考えられ、EMT は癌の進展に深く関わっている。EMT とは、上皮細胞が上皮としての特徴を喪失し、間葉系の形質を獲得する現象で、発生のみならず癌の浸潤過程において重要な役割を担っている¹²⁻¹⁴⁾。癌細胞における EMT 誘導は、細胞間接着性の低下や運動能及び浸潤能の亢進を介して、転移の促進や予後不良に関与する¹²⁾。EMT の過程において、細胞内の遺伝子発現はダイナミックに変化し、細胞間接着因子である E-cadherin やその他の上皮系マーカーである desmoplakin, claudin などの発現低下、間葉系マーカーである vimentin, N-cadherin, fibronectin などの発現上昇を認める¹³⁾。しかし、ごく最近、上皮性の性質を失い、EMT の性質を獲得する過程が、binary プロセスではなく、スペクトラムな過程であることが示され、EMT を誘導する途中の状態、すなわち部分的な EMT（partial-EMT）が存在することが提唱された^{15, 16)}。EMT 誘導過程の中間状態の細胞は、上皮マーカーと間葉マーカーの両方を発現し、上皮細胞と間葉細胞の間に中間の形態、転写、およびエピジェネティックな特徴を示す¹⁷⁻¹⁹⁾（図1）。実際に、上皮および間葉系マーカーの共発現は、乳癌²⁰⁻²³⁾、膵臓癌²⁴⁾、明細胞腎癌²⁵⁾、肺癌^{15, 26, 27)}、結腸直腸がん²⁸⁾、卵巣がん^{18, 29, 30)}を含めたさまざまな癌培養細胞株、患者由来の異種移植片および癌組織で認められる。In vivo lineage tracing 実験においても、partial-EMT の性格を示す癌細胞の存在が実証されている^{31, 32)}。重要なことに、partial-EMT 状態の癌細胞は、完全な EMT の性格を有する癌細胞に比べて悪性度が高い。

近年、次世代シーケンサーの開発により、測定出来る転写産物が飛躍的に増加し、さらに、1細胞レベルで遺伝子発現解析が可能になった。現在では、疾病における細胞間相互作用、特異的マーカー遺伝子の探索、薬物治療抵抗性の制御機構などの研究に個々の細胞集団、さらには組織微小環境全体の多様性を解析できる1細胞解析が盛んに行われている。Puram らは、頭頸部扁平上皮癌組織の1細胞 RNA シークエンスにより、癌細胞をその特徴によって5つのサブタイプに分類し、partial-EMT を示すサブタイプを定義し、partial-EMT に関わる遺伝子群を同定した³³⁾。同定された *PDPN*, *LAMB3*, *LAMC2* などの partial-EMT に関わる遺伝子は、免疫組織化学により頭頸部扁平上皮癌組織の浸潤先端でその発

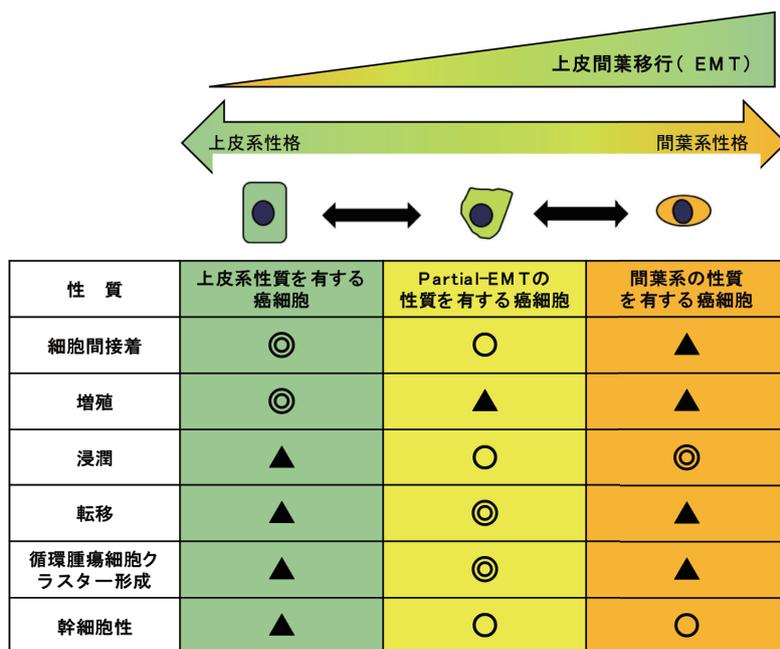


図1 癌細胞における EMT 誘導過程とその性質
 上皮系性質から間葉系性質に転換する EMT 誘導過程の中間に、部分的 EMT (partial-EMT) 状態があり、partial-EMT の性質を有する癌細胞は、循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell:CTC) クラスター形成や転移能が高い。

現が認められる。さらに、彼らは *Transforming Growth Factor Beta Induced (TGFB1)* を最も partial-EMT program を反映するマーカー因子として同定し、TGF- β シグナルの阻害が partial-EMT の性質を有する癌細胞の浸潤を抑制することを明らかにした。これは、partial-EMT が頭頸部扁平上皮癌の浸潤に深く関わることを示唆している。我々も The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録されている頭頸部扁平上皮癌組織の遺伝子発現情報を用いて、partial-EMT に関連する全ての遺伝子に対して、患者の予後との関連を検討した。その結果、partial-EMT 関連遺伝子のうち、*SERPINE1*, *ITGA5*, *TGFB1*, *P4HA2*, *CDH13*, *LAMC2* が予後を評価するためのバイオマーカーになる可能性があることを見出した³⁴⁾。6つの遺伝子は正常組織よりも HNSCC 組織でより高く発現していた。さらに、TCGA を含めた複数のデータベースから抽出した頭頸部扁平上皮癌組織の遺伝子発現データを使用して、partial-EMT 関連遺伝子に対して single sample gene set enrichment 解析を行い、患者の partial-EMT スコアを算出した。その結果、partial-EMT スコアが高い患者は、以前の報告³³⁾と一致して予後が不良であることを明らかにした (現在、投稿準備中)。さらに、partial-EMT スコアと相関する遺伝子を特定し、その発現値を使用して頭頸部扁平上皮癌患者の予後リスクを決定するための機械学習モデルを構築した。我々が確立した予後モデルにおいて、高リスク患者は極めて悪い予後、ECM 関連遺伝子の高発現および上皮関連遺伝子の

低発現を示した。これらの結果は、partial-EMT が頭頸部扁平上皮癌患者の予後に強い影響を与えることを示唆している (現在、投稿準備中)。partial-EMT の性質を有する癌細胞は、浸潤先端に局在しているが、癌細胞周囲の血管や炎症細胞、癌間質細胞などの微小環境の影響を受ける³³⁾。興味深いことに、我々は口腔内に存在する歯周病原菌である *Fusobacterium nucleatum* が上皮系の性質を有する癌細胞を partial-EMT の性質を有する癌細胞に性質を転換することを見出した³⁵⁾。*Fusobacterium nucleatum* は、大腸癌組織内で高頻度に検出され、大腸癌の進展に直接的に関与することで注目されている^{36,37)}。口腔癌組織においても健常者に比べて高頻度に検出され、特に深部で検出される³⁸⁾。図2に示すように、*Fusobacterium nucleatum* の感染を含めた癌周囲の微小環境の変化が partial-EMT の誘導に重要な役割を果たすことが示唆される。

癌の浸潤・転移過程では、癌細胞の細胞表面タンパクと細胞外マトリックスとの相互作用がおり、matrix metalloproteinase (MMP) に代表されるプロテアーゼの発現と分泌がおり、細胞外マトリックスの構成要素を分解し、基底膜を破壊して、浸潤する³⁹⁾。さらに、血管新生やマクロファージの浸潤など、様々な癌微小環境の変化や癌細胞との相互作用が、浸潤・転移に関与することが明らかになりつつある。口腔癌でもいくつかの MMP の高発現が知られており、MMP-2や MMP-9の高い活性を示す口腔癌患者が予後不良を示すことが報告されて

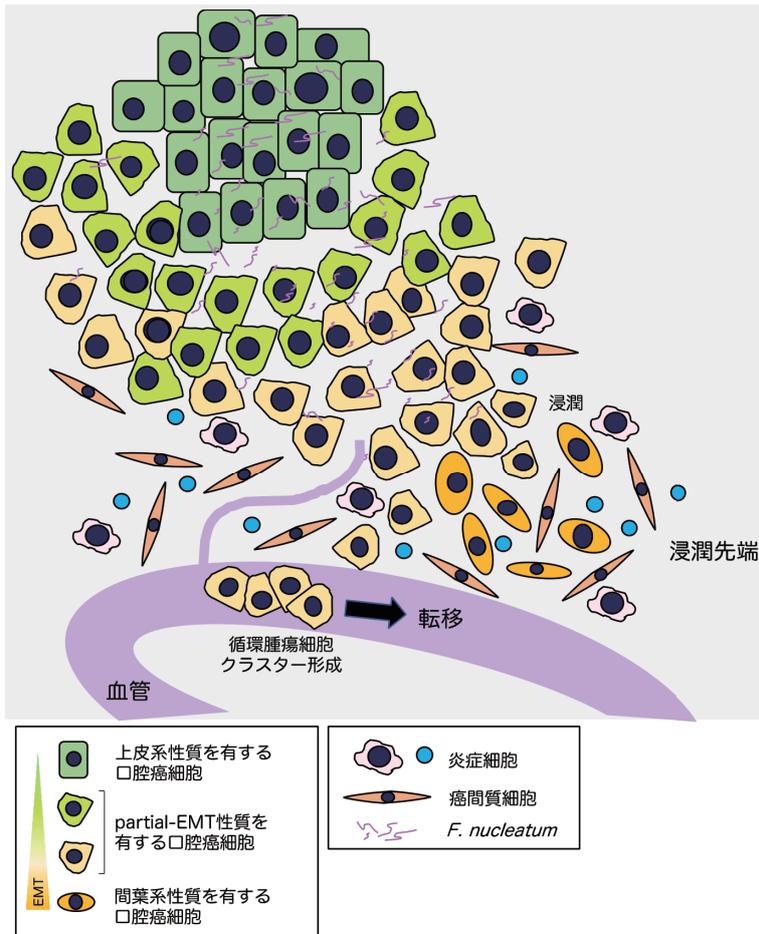


図2 癌微小環境による partial-EMT 誘導

上皮系性質から partial-EMT の誘導には、癌間質細胞、炎症細胞、*Fusobacterium nucleatum* の感染などが関与し、細胞接着能が低下した partial-EMT の性質を有する癌細胞は、深部に浸潤して、血管やリンパ管内へ侵入して循環腫瘍細胞 (CTC) クラスターを形成し、転移する。

いる³⁹⁾。我々は、以前に口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移巣から MSCC-1細胞を樹立し、*in vitro* invasion assay法を応用することで、さらに高い浸潤能を有する細胞株である MSCC-inv1細胞を分離した⁴⁰⁾。親株である MSCC-1細胞が敷石状の形態と E-cadherin の発現を示すのに対し、MSCC-inv1細胞は紡錘形の形態と E-cadherin の発現低下や間葉系マーカーの発現上昇を示しており、EMT 様の表現型を有すると考えられた。実は、この MSCC-inv1細胞は、完全な EMT を起こした細胞ではなく、partial-EMT の性格を有することが、最近、明らかになった³⁴⁾。これまでに、これら2つの細胞株の遺伝子発現プロファイルや miRNA 発現プロファイルを比較することにより、口腔癌の浸潤に関わるいくつかの新規遺伝子を同定している^{11, 41-44)}。興味深いことに、我々が同定した口腔癌の浸潤に関わる遺伝子には、Puram らが頭頸部扁平上皮癌組織の1細胞 RNA シークエンスにより同定した partial-EMT 関連遺伝子群とのオーバーラップ

がかなり認められた。今後は、口腔癌における partial-EMT の役割や臨床的意義を明らかにすることが重要で、新規分子標的治療の開発への応用が期待される。

IV. まとめ

最近、口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌におけるゲノム情報の網羅的解析から、ヒトパピローマウイルス (HPV) 陽性の癌は陰性のものより予後が良好であることがわかり、遺伝子変異が異なることが明らかとなった⁴⁵⁾。HPV 陰性の口腔癌では、細胞周期関連因子 (*CDKN2A*, *TP53*, *CCND1*)、細胞増殖シグナル関連因子 (*EGFR*)、細胞生存関連因子 (*PIK3CA*, *PTEN*)、WNT シグナル関連因子 (*FAT1*, *AJUBA*, *NOTCH1*)、エピジェネティック制御関連因子 (*KMT2D*, *NSD1*) に遺伝子変異が認められる。しかしながら、*TP53* 遺伝子を除いて遺伝子変異の頻度は低く、他の癌で見つまっているようなドライバー遺伝子は存在しない。

頭頸部は世界的に最も罹患者の多い癌の発生部位の一つであり、全世界で年間65万人が新規に罹患し、35万人が死亡している⁴⁶⁾。頭頸部癌の中で最も多いのが口腔扁平上皮癌であり、我が国においても人口の急速な高齢化とともに罹患者数や死亡率は年々増加している⁴⁷⁾。口腔癌の診断技術や治療法は、過去数十年に渡りほとんど大きな変化はなく、新たな分子標的治療の開発が進んでいるが⁴⁸⁾、その多くが臨床応用には至っておらず、現在も治療の第1選択は外科的切除である。外科的切除による口腔機能の喪失や、審美性の低下が患者のQOLを著しく損ねることから、予後予測因子の同定や新規治療法の確立が急務である。口腔癌の増殖・浸潤メカニズムの全貌が明らかになることで、悪性度診断への応用や新たな分子標的治療薬の開発が加速し、一人でも多くの患者が救われることを期待したい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、四国歯学会会長・馬場麻人教授に心より感謝申し上げます。また、本稿の執筆にあたり、徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野石丸直澄教授をはじめとする教室員の先生方、私が所属する口腔生命科学分野の先生方に、この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011)
- Matthews HK, Bertoli C and Bruin RAM: Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021 Sep 10. doi: 10.1038/s41580-021-00404-3. Online ahead of print.
- Kops GJPL, Foltz DR and Cleveland DW: Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8699-8704 (2004)
- 日本口腔腫瘍学会編集: 口腔癌取扱い規約. 第1版, 金原出版, 東京, 32-35 (2010)
- Yamamoto E, Miyakawa A and Kohama G: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 6, 938-947 (1984)
- 出雲俊之, 柳下寿郎, 八木原一博: 「シンポジウム: 「口腔癌の浸潤: マクロ・ミクロ・モレキュラー」臨床型分類としてのYK分類」. *日本口腔腫瘍学会誌* 24, 64-76 (2012)
- Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 133, 571-573 (1889)
- Ewing J: *Neoplastic diseases*. 6th ed. WB Saunders, Philadelphia, PA (1928)
- Coman DR, deLong RP and MccUtcheon M: Studies on the mechanisms of metastasis; the distribution of tumors in various organs in relation to the distribution of arterial emboli. *Cancer Res* 11, 648-651 (1951)
- Fidler IJ: Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45, 773-782 (1970)
- Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, Kitagawa M, Kawai H, Gaffney PM, Miyauchi M and Takata T: Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res* 66, 6928-6935 (2006)
- Nieto MA: Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 342, 1234850 (2013)
- Samatov TR, Tonevitsky AG and Schumacher U: Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol Cancer* 12, 107 (2013)
- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA and Thiery JP: EMT: 2016. *Cell* 166, 21-45 (2016)
- Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, Van Keymeulen A, Brown D, Moers V, Lemaire S, De Clercq S, Minguijón E, Balsat C, Sokolow Y, Dubois C, De Cock F, Scozzaro S, Sopena F, Lanas A, D'Haene N, Salmon I, Marine JC, Voet T, Sotiropoulou PA and Blanpain C: Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463-468 (2018)
- Pastushenko I and Blanpain C: EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* 29, 212-226 (2019)
- Hong T, Watanabe K, Ta CH, Villarreal-Ponce A, Nie Q and Dai X: An Ovol2-Zeb1 Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States. *PLoS Comput Biol* 11, e1004569 (2015)
- Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Ng AHC, Chung VY, Chu YS, Matsumura N, Lai HC, Lee YF, Sim WJ, Chai C, Pietschmann E, Mori S, Low JJ, Choolani M and Thiery JP: An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis* 4, e915 (2013)
- Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celiktas M, Hanash SM, Mani SA, Pienta KJ, Ben-Jacob E and Levine H: Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget* 7, 27067-27084 (2016)
- Zhang J, Tian XJ, Zhang H, Teng Y, Li R, Bai F, Elankumaran S and Xing J: TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. *Sci Signal* 7, ra91

- (2014)
- 21) Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE and Trevor KT: Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol* 150, 483-495 (1997)
 - 22) Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT and Perou CM: Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 19, 264-271 (2006)
 - 23) Yagasaki R, Noguchi M, Minami M and Earashi M: Clinical significance of E-cadherin and vimentin co-expression in breast cancer. *Int J Oncol* 9, 755-761 (1996)
 - 24) Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, Kayser G, Kohler I, Bausch D, Hoepfner J, Hopt UT, Keck T, Stickeler E, Passlick B, Schilling O, Reiss CP, Vashist Y, Brabletz T, Berger J, Lotz J, Olesch J, Werner M and Wellner UF: Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol* 234, 410-422 (2014)
 - 25) Sampson VB, David JM, Puig I, Patil PU, García de Herreros A, Thomas GV and Rajasekaran AK: Wilms' Tumor Protein Induces an Epithelial-Mesenchymal Hybrid Differentiation State in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One* 9, e102041 (2014)
 - 26) Schliekelman MJ, Taguchi A, Zhu J, Dai X, Rodriguez J, Celikbas M, Zhang Q, Chin A, Wong CH, Wang H, McFerrin L, Selamat SA, Yang C, Kroh EM, Garg KS, Behrens C, Gazdar AF, Laird-Offringa IA, Tewari M, Wistuba II, Thiery JP and Hanash SM: Molecular portraits of epithelial, mesenchymal, and hybrid States in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer Res* 75, 1789-1800 (2015)
 - 27) Zacharias M, Brcic L, Eidenhammer S and Popper H: Bulk tumour cell migration in lung carcinomas might be more common than epithelial-mesenchymal transition and be differently regulated. *BMC Cancer* 18, 717 (2018)
 - 28) Hiew MSY, Cheng HP, Huang C, Chong KY, Cheong SK, Choo KB and Kamarul T: Incomplete cellular reprogramming of colorectal cancer cells elicits an epithelial/mesenchymal hybrid phenotype. *J Biomed Sci* 25, 57 (2018)
 - 29) Strauss R, Sova P, Liu Y, Li Z, Tuve S, Pritchard D, Brinkkoetter P, Möller T, Wildner O, Pesonen S, Hemminki A, Urban N, Drescher C and Lieber A: The epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses. *Cancer Res* 69, 5115-5125 (2009)
 - 30) Strauss R, Li Z, Liu Y, Beyer I, Persson J, Sova P, Möller T, Pesonen S, Hemminki A, Hamerlik P, Drescher C, Urban N, Bartek J and Lieber A: Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 6, e16186 (2011)
 - 31) Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Nautra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD and Stanger BZ: EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349-361 (2012)
 - 32) Ruscelli M, Quach B, Dadashian EL, Mulholland DJ and Wu H: Tracking and Functional Characterization of Epithelial-Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells during Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res* 75, 2749-2759 (2015)
 - 33) Puram SV, Tirosh I, Parkhi AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, Rodman C, Luo CL, Mroz EA, Emerick KS, Deschler DG, Varvares MA, Mylvaganam R, Rozenblatt-Rosen O, Rocco JW, Faquin WC, Lin DT, Regev A and Bernstein BE: Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* 171, 1611-1624 (2017)
 - 34) Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N and Kudo Y: Prognostic value of partial EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. *Oral Dis* 26, 1149-1156 (2020)
 - 35) Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N and Kudo Y: Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fusobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep* 11, 14943 (2021)
 - 36) Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA and Holt RA: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 22, 299-306 (2012)
 - 37) Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Tabernero J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS and Meyerson M: Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 22, 292-298 (2012)
 - 38) Al-Hebshi NN, Nasher AT, Maryoud MY, Homeida HE, Chen T, Idris AM and Johnson NW: Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 7, 1834 (2017)
 - 39) Sorsa T, Tjäderhane L and Salo T: Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 10, 311-318 (2004)

- 40) Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Salgolzaei S, Keikhaee MR, Sato S, Miyauchi M and Takata T: Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous β -catenin. *Clin Cancer Res* 10, 5455-5463 (2004)
- 41) Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Kitagawa M, Kitajima S, Hatano H, Tilakaratne WM, Miyauchi M and Takata T: Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. *Br J Cancer* 95, 1396-1403 (2006)
- 42) Deraz EM, Kudo Y, Yoshida M, Obayashi M, Tsunematsu T, Tani H, Siriwardena SB, Kiekhoe MR, Qi G, Iizuka S, Ogawa I, Campisi G, Lo Muzio L, Abiko Y, Kikuchi A and Takata T: MMP-10/stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer. *PLoS ONE* 6, e25438 (2011)
- 43) Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Obayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T, Koizumi K, Maeda M, Ogawa I and Takata T: Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS ONE* 7, e44488 (2012)
- 44) Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Tsunematsu T, Kondo T, Subarnbhesaj A, Siriwardena SB, Tahara H, Ogawa I and Takata T: Matrix metalloproteinase-13 directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 287, 38716-38728 (2012)
- 45) Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576-582 (2015)
- 46) Parkin DM, Bray F and Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108 (2005)
- 47) 桐田忠明, 鄭嚙, 車谷典男, 下岡尚史, 上海道範昭, 岡本真澄, 大儀和彦, 山本一彦, 山中康嗣, 米増國雄, 杉村正仁: わが国の口腔癌の疫学的検討—その推移と将来予測—. *日口外誌* 43, 140-147 (1997)
- 48) Argiris A, Kasamouzis MV, Raben D and Ferris RL: Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695-1709 (2008)