

令和元年5月23日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11735

研究課題名(和文) 唾液のメタボローム解析により口腔粘膜の異形成のスクリーニング検査を開発する

研究課題名(英文) Screening examination of the dysplasia of the oral mucosa by the metabolic loam analysis of saliva

研究代表者

片倉 朗 (Katakura, Akira)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10233743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌患者の唾液をキャピラリー電気泳動-質量分析法(CE-MS)メタボローム解析により網羅的に検索して、唾液に含まれる口腔癌のバイオマーカーとなるタンパク、酵素を特定しその抗体の作製を目標とした研究を進め、アミノ酸代謝経路において口腔癌で特徴的に発現する25種類の代謝物を検出した。本研究の技法であるメタボロミクスでは口腔癌細胞の代謝途上で産生されるタンパクや酵素をはじめとする代謝物質の検出を本法によって解析することで、個々の検体で異なったアーチファクトとなる物質を含む可能性が高い全唾液を検体としても、共通した特徴的变化を一気に網羅的に検索することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は口腔癌の早期発見のために唾液が歯科臨床で簡便に反復して非侵襲的に採取でき、しかも腫瘍由来のタンパクを反映する絶好の試料であることに注目し、全唾液を試料とした口腔癌のスクリーニング検査の開発を行ってきた(頭頸部癌 Vol.32 45-50,2007)。そこで口腔癌患者の唾液をメタボローム解析によりアミノ酸代謝経路において口腔癌で特徴的に発現する16種類の代謝物を検出した。さらにこの代謝物が果たして口腔癌に特異的に発現するかを検討する。そこで得られた物質(特にタンパク)を一次スクリーニングに導入し、歯科診療所レベルで簡便に行なえる口腔癌等のスクリーニング検査として普及に努める。

研究成果の概要(英文)：We searched saliva of the oral cancer patient by capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS) metabolic analysis, and went ahead through the study that I identified protein, the enzyme which became the biomarker of oral cancer included in saliva, and aimed for the manufacture of the antibody and detected 25 kinds of metabolism thing to develop for oral cancer in an amino acid metabolic pathway characteristically. I became able to search the characteristic change that was common as a specimen with all saliva which were more likely to include the arch fact that was different in an individual specimen by analyzing the detection of the metabolite including protein and the enzyme which were produced of the oral cancer cell by a fundamental law in one of the meta rag mixture that was the technique of this study and the material.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 メタボローム解析 唾液 スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は口腔癌の早期発見のために唾液が歯科臨床で簡便に反復して非侵襲的に採取でき、しかも腫瘍由来のタンパクを反映する絶好の試料であることに注目し、全唾液を試料とした口腔癌のスクリーニング検査の開発を行ってきた(頭頸部癌 Vol.32 45-50,2007)。唾液中のタンパクを網羅的に検索するために二次元電気泳動法を用いて、口腔癌で特徴的に出現するタンパクを検出しそのひとつを質量解析からenolase 1と特定し、それが口腔癌組織に由来することを特定した(J. Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology,2015)。さらに、口腔癌患者の唾液をキャピラリー電気泳動-質量分析法(以下、CE-MS)メタボローム解析により網羅的に検索して、唾液に含まれる口腔癌のバイオマーカーとなるタンパク、酵素を特定しその抗体の作製を目標とした研究を進め、アミノ酸代謝経路において口腔癌で特徴的に発現する16種類の代謝物を検出した。さらにこの代謝物が果たして口腔癌の発生過程において特異的に発現する物質であるかを確認する必要がある。それを確認することができれば、得られた物質(特にタンパク)を一次スクリーニングに導入し、既に実用化されつつある糖尿病、膵癌等を対象とした唾液を試料とするプロテインチップに合わせて搭載し、歯科診療所レベルで簡便に行なえる口腔癌等のスクリーニング検査として普及に努める。

### 2. 研究の目的

口腔がんはWHOの統計によるとアメリカ・イギリス・フランス・イタリアの先進諸国では減少傾向にあるが、日本においては高齢化とともに男女ともに増加傾向を示し、2020年には人口10万人対220~250人に達することが予測されている。また、口腔癌は治療目的に高次医療施設を来院したときにはStage 以上の進行例が60%を占めその発見の遅れは否めない。その解決の一助として日常的に口腔内を診察している一般の歯科医師が口腔癌のスクリーニングを容易に行えるシステムの開発は必要である。本研究は簡便にかつ非侵襲的に反復して採取できる唾液を検体として口腔粘膜の異形成リスクファクターを判定する検査方法に適応するバイオマーカーをメタボロームによる網羅的解析で同定する研究の一貫である。既に先行研究において口腔癌の中の舌癌、歯肉癌患者の全唾液中に特徴的に発現する16種類の代謝物質を同定するに至っている。本研究ではそれらの物質についてその由来となっている代謝経路の究明、癌組織内での発現を免疫組織化学的、分子生物学的に検証して適切である物質を確定し唾液検査に適応できる口腔癌のバイオマーカーを確立することである。

### 3. 研究の方法

口腔癌(舌・下顎歯肉)患者20名から全唾液3mlを採取し直ちに-40℃で凍結処理を行う(頭頸部癌 Vol.32 45-50,2007 片倉らの方法に準ずる)。検体はMeOHCHCl<sub>3</sub>を加えて、代謝物質を極性代謝低分子(アミノ酸、ヌクレオチド、有機酸、補酵素など)と脂質・二次代謝分子(トリグリセリド・コレステロール・ポシフェノールなど)に分画してCE-MS解析に供し代謝物質の発現状況を網羅的に比較する。健常人と比較しバイオマーカーとして有用性の高い代謝物を含む pathway ならびに代謝物に対し、Real-time PCR 法、PCA(Principal Component Analysis)、HPLC(High Performance Liquid Chromatography)、HCA(Hierarchical Cluster Analysis)解析によりその同定を行い、さらに免疫組織化学染色により癌組織中での発現状況を検索した。

### 4. 研究成果

口腔癌患者由来全唾液(外科的切除術前)および健常者全唾液により、以下の実験を行う。本方法でタンパクの抽出が可能であることは我々が既に報告していた。

（片倉ら、唾液による口腔癌のスクリーニング検査-プロテオームによるバイオマーカーの解析-、頭頸部癌 34(4) :503-507,2008）

（2016-2018 年度）

1) 全唾液 3ml を採取し、遠心分離(12,000rpm×10min)により上清を分離した後、Lysis buffer を用いてタンパク質を抽出・精製。

2) MeOHCHCl<sub>3</sub> を加えて、ビーズショッカーでホモジナイズした後、5kDa 限外ろ紙フィルターに移し遠心分離。

代謝物質を極性代謝低分子（アミノ酸、ヌクレオチド、有機酸、補酵素など）、変性タンパク質画分、脂質・二次代謝分子（トリグリセリド・コレステロール・ポリフェノールなど）の3分画となるのでこれらをそれぞれ減圧乾燥したのちに CE-MS 解析に供した。

3) CE-MS 解析は内径 50 μm の泳動液で満たされたキャピラリーによる電気泳動を行う。電荷や分子の大きさによって検出時間に差が生じこれを直接キャピラリーに接続した質量分析計で解析することで感度が向上しイオン性代謝物質の網羅的測定を遂行することが出来た（図 1-3）。

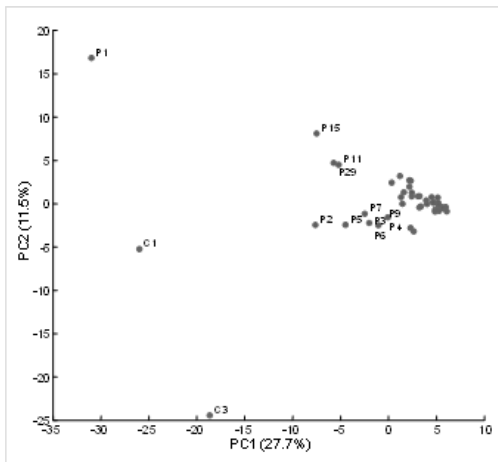


図 1 PCA 解析による物質の同定

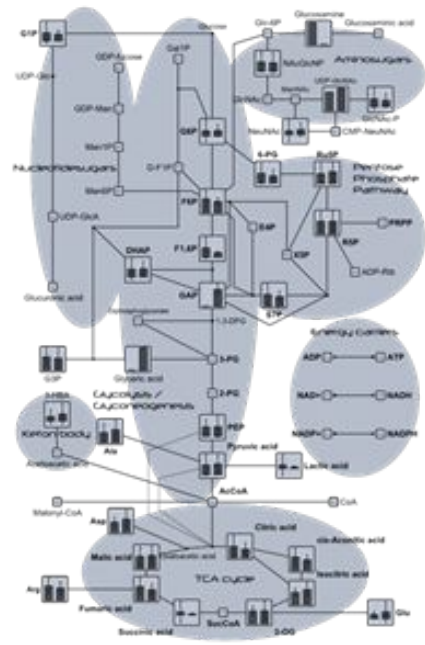


図 2 Pathway と代謝異常物の結果

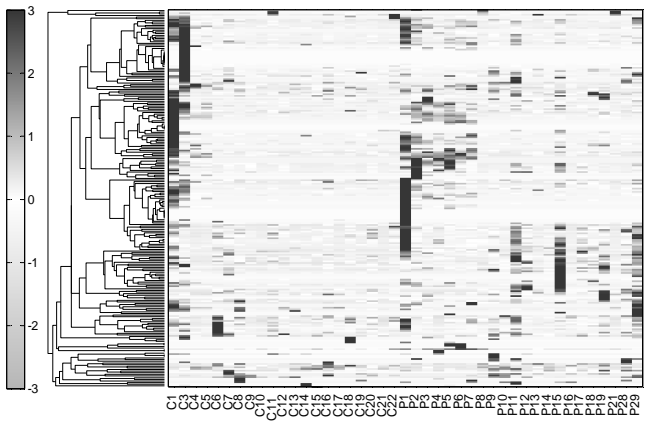


図 3 HCA 解析による検体ごと  
の発現分布の状況

<引用文献>

1) Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M: Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 6(1): 78-95, 2010.

Katakura A, Yamamoto N, Sakuma T, Sugahara K, Onda T, Noguchi S, Shibahara T: A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 27: 1-5, 2015,

2) Sugimoto M, Kikuchi S, Arita M, Soga T, Tomita M: Large-scale prediction of cationic metabolite identity and migration time in capillary electrophoresis mass spectrometry using artificial neural networks. *Analytical Chemistry*. 77:78-84, 2005.

Li Y, StJohn M, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan R.C, Eisele D, Elashoff D, Park NH, Wong DT: Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection *Clin Cancer Res* 10(24): 8442-8450, 2004

3) Plumb R, Granger J, Stumpf C, Wilson ID, Evans JA, Lenz EM: Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences. *Analyst* 128: 819-23, 2003

4) Zeng J, Yin P, Tan Y, Dong L, Hu C, Huang Q, Lu X, Wang H, Xu G: Metabolomics study of hepatocellular carcinoma: discovery and validation of serum potential biomarkers by using capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Proteome Res* 13: 3420-31, 2014

5 . 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計1件)

**M.Ohshima, A.Katakura, et.al. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 2017 DOI:10.3892**

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：菅原圭亮 (Sugahara Keisuke)

(東京歯科大学 口腔病態外科学講座 講師)

CE-MS の実施と管理、データ解析、免疫組織化学的検討

研究者番号 10506926

別所央城 (Bessho Hiroki)

(東京歯科大学 口腔病態外科学講座 助教)

データ管理

研究者番号 30433973

(2)研究協力者

研究協力者氏名:石川 玄( Ishikawa Gen )( ヒューマン・マタボローム・テクノロジーズ(株)、  
研究員 )

キャピラリー電気泳動-質量分析を委託する。

杉本昌弘 ( Sugimoto Masaki ) ( 慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授 )

CE-MS 解析の現場の第一人者で、結果の解析方法について協力して頂く。

David TW Wong ( Associate Dean of Research, School of Dentistry, University of  
California, Los Angeles ) :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。