

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：33902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15831

研究課題名(和文) オーダーメイド治療を目指した口腔癌の発生や進展に関わる新規分子の臨床応用の研究

研究課題名(英文) Identification of novel oral squamous cell carcinoma-related genes for order-made treatment.

研究代表者

下郷 和雄 (Shumozato, Kazuo)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00158966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(以下OSCC)は、特に進展例において拡大手術に加え放射線や化学療法などの補助治療も必要とし、重篤な障害をきたし患者のQOLを著しく低下させる。他の癌腫と同様に早期診断・治療が予後やQOLの改善において喫緊の課題であるが、精度の高いバイオマーカーが存在していないのが現状である。本研究の目的はOSCCの早期診断、予後予測因子、また抗腫瘍薬剤の感受性に影響を生じる分子をOSCC患者の組織検体や唾液から得られた核酸の解析・比較を行うことで抽出し、有用な臨床応用可能なマーカー分子を同定することである。その結果、OSCCに関連した口腔細菌が特定され、臨床応用の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌(OSCC)の大部分は肉眼的に発見可能であるが進行癌として診断されることも少なくない。そのことが予後不良の一因となっており、早期発見のための信頼性の高い簡便な診断マーカーの開発が課題である。本研究では、採取が簡便で臨床応用しやすい唾液検体の細菌叢解析を行い、口腔細菌の臨床的な意義を検討した。結果、OSCCでのFusobacteria門、Fusobacterium属の増加やFirmicutes門、Streptococcus属の減少がOSCC診断に応用できる可能性が示され、Fusobacteria門やFusobacterium属の割合増加が予後増悪因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, the possibility that oral microbiomes are associated with oral squamous cell carcinoma (OSCC) initiation and progression has attracted attention; however, this association is still unclear. Here, we comprehensively analyze the microbiome profiles of saliva and tissue samples using next-generation sequencing followed by determining the association between oral microbiome profiles and OSCC to detect a novel OSCC biomarker for diagnosis, prognosis and sensitivity of treatment. The results suggesting a strong association of these bacteria with OSCC. Especially, phylum Fusobacterium was significantly associated with early recurrence of OSCC. Thus, oral microbiome analysis may have a potential of novel OSCC detection and prognostic tool.

研究分野：口腔外科 腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 口腔白板症 口腔細菌叢 唾液検体 次世代シーケンサ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (OSCC) の大部分は肉眼的に発見可能であるが進行癌として診断されることも少なくない。そのため、診断の遅れが予後不良の一因となっており、早期発見のための信頼性の高い簡便な診断マーカーの開発が進められているが、これまでに口腔細菌叢の臨床応用の可能性についてはほとんど検討されていない。今回、採取が比較的簡便で臨床応用しやすい唾液検体の細菌叢を解析し、口腔細菌叢解析の OSCC 診断における有用性についての検討を行ったので報告する。

2. 研究の目的

近年、口腔細菌叢と OSCC の発生や進展との関連性が注目されつつある。しかしながら、その関係性を示す根拠は未だ明らかとされていないのが現状である。唾液検体を用いた口腔細菌叢の解析で、OSCC に関連した口腔細菌を見出し、臨床的な意義や有用性を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象: 愛知学院大学歯学部附属病院口腔外科第二診療部と名古屋第一赤十字病院歯科口腔外科を受診した OSCC 患者 41 例 (OSCC 群)、口腔白板症患者 25 例 (OLK 群)、OSCC 術後患者 20 例 (Post 群)、健常者 10 例 (HV 群) を対象として Oragene DNA kit にて唾液検体を採取した (表 1)。

(2) 方法:

DNA 抽出及び DNA ライブラリ作成

唾液検体から推奨プロトコールを用いて total DNA を抽出した。抽出した DNA から 2-step tailed ポリメラーゼ連鎖反応法によって DNA ライブラリを作成した。増幅させる領域は細菌の 16S rRNA V4 領域とした。

シーケンス解析

シーケンシングは MiSeq sequencing platform (Illumina) を用いて施行し、FASTX toolkit を用いて配列の読み始めが使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出した。抽出した配列のプライマー配列を除去したのち、sickle tools にてクオリティー値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。ペアエンドマーシクリプト FLASH を用いて、クオリティフィルタリングを通過した配列をマージした。フィルタリングを通過した配列を、USEARCH の Uchime アルゴリズムでキメラ配列をチェックした。データベースは QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) に付属する Greengene の 97%OTU とし、キメラと判断されなかった全配列を抽出した。OTU 作成と系統推定は、Human Oral Microbiome Database の配列をリファレンスとして行った。OTU 頻度の群間比較を、QIIME を用いて行った。解析対象は細菌の分類階級では属レベルまでとした。

表 1 各群の特徴

	OSCC (N=41)	Post* (N=20)	OLK (N=25)
Mean age, years (range)	67.7(28-92)	68.2 (29-85)	64.4 (29-91)
Sex			
Male	30	14	16
Female	11	6	9
Smoking			
Current	5	4	2
Past / never	36	16	23
Alcohol drinking			
Heavy	11	5	4
Moderate or mild / never	30	15	21
Mean number of tooth (range)	21.5(0-31)	21.9(5-29)	24.1(5-31)
OSCC / OLK / Post subsite			
Tongue	15	10	14
Gingiva	16	8	9
Buccal mucosa / floor of mouth	10	2	2
Dysplasia of OLK			
Absent	-	-	15
Present	-	-	10
Pathological stage of OSCC**			
I / II	23	17	-
III / IV	18	3	-

Abbreviations: OSCC: oral squamous cell carcinoma; OLK: oral leukoplakia; Post: post operative of OSCC.
* includes 1 reconstructive surgery, and no chemotherapy or radiotherapy patients.
** UICC TNM classification 7th edition

多様性解析と LEfSe (Linear discriminant analysis of effective size) 解析

4 群 (OSCC 群、OLK 群、Post 群、HV 群) において、各群の細菌叢の多様性を解析し比較検討するため、アルファ多様性とベータ多様性の解析を QIIME によって行った。各群で有意に増加している細菌を検出するために LEfSe による解析を行った。LEfSe 解析は Galaxy / Hutlab アルゴリズムを用いて行った。OSCC 群と OSCC なし (OLK+Post) 群、OLK 群、Post 群との比較によって OSCC 関連候補細菌を抽出した。HV 群は他の群と年齢層が異なるため解析から除外した。また、OSCC 群の中で初期癌 (early 群) と進行癌 (late 群) との間や、術後 1 年以内に早期再発を生じた症例 (rec 群) と非再発症例 (non-rec 群) との間でも LEfSe 解析を行った。

口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての検討

OSCC 候補細菌が占める割合によって OSCC 群と OSCC なし群を区別できる最適な診断カットオフ値を ROC 曲線の結果から決定した。それぞれの診断カットオフ値が適切であるかどうかについて単変量解析および年齢、性別、喫煙、飲酒、歯の本数を調整因子とした多変量解析を行い検討した。予後因子の検討では、術後 1 年以内の再発リスクとして検討を行った。統計学的検定は 4 群間の比較では Kruskal-Wallis 検定と多重比較検定 (Bonferroni 法)、各群に有意な細菌の検出では LEfSe 解析、細菌分布割合の最適カットオフ値の決定は ROC 曲線の作成、単変量解析では t 検定と Fisher's exact 検定、多変量解析ではロジスティック回帰分析を行い、予後因子の検討には Kaplan-Meier 法を用い、p 値 0.05 未満を統計的に有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) Relative abundance と 4 群間有意差

Relative abundanceでは、門レベルで*Bacteroidetes*門 (29.5%)、*Firmicutes*門 (28.9%)、*Proteobacteria*門 (23.7%)、*Fusobacteria*門 (10.5%)、*Actinobacteria*門 (5.1%) の順に多かった。4群間の細菌割合の比較では*Streptococcus*属と*Aggregatibacter*属、*Alloprevotella*属で有意差を認めた。

(2) 細菌多様性の比較

4群に対するアルファ多様性解析においてHV群の多様性が最も高く、他の群では特定の菌種が分布していることを示していた。ベータ多様性解析では、概ね各群が一定の範囲内に分布しており、細菌叢が各群で異なることが確認された。

(3) LefSe解析

LDAスコアが高値を示したのは、OSCC群では*Fusobacteria*門、*Fusobacterium*属、*Bacteroidetes*門で、OSCCなし群では*Firmicutes*門、*Streptococcus*属、*Veillonella*属であった (図1)。late群とearly群の比較では、late群で*Fusobacterium*属や*Alloprevotella*属、early群で*Streptococcus*属が高値を示していた。また、rec群で*Fusobacteria*門と*Fusobacterium*属、non-rec群で*Streptococcus*属のLDAスコアが高値であった。以上の結果から、*Fusobacteria*門、*Fusobacterium*属、*Bacteroidetes*門、*Firmicutes*門、*Streptococcus*属をOSCC関連候補細菌と決定した。

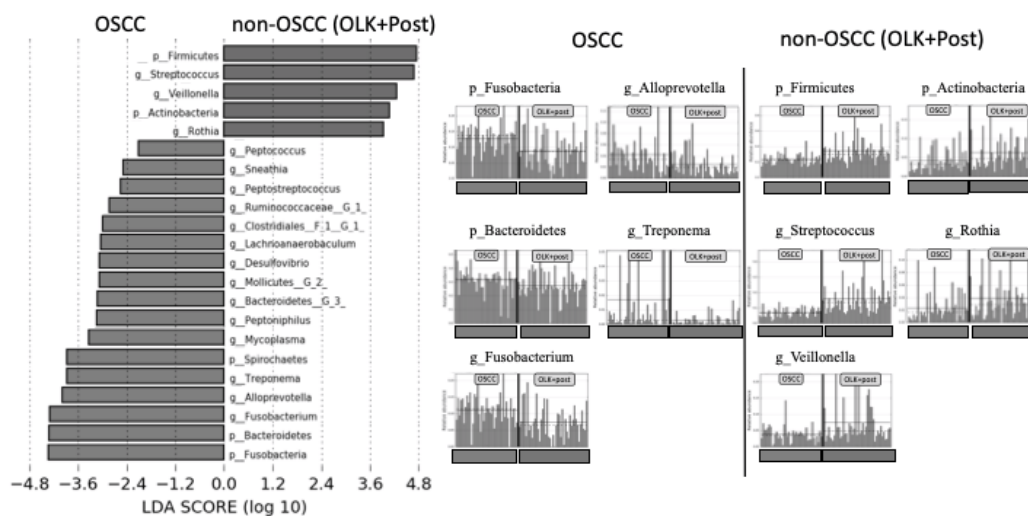


図1 LefSe解析結果

(4) 口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての検討

ROC 曲線から、それぞれの候補細菌の OSCC 診断カットオフ値を求め、AUC 面積が低かった *Bacteroidetes* 門はその後の解析から除外した。統計解析の結果、OSCC の有無が各 OSCC 関連候補細菌の診断カットオフ値と有意に関連していた (表2)。また、*Fusobacteria* 門の割合が 13.8% 以上を示した症例では術後 1 年以内の再発率が有意に高かった (図2)。

表 2 OSCC群と非OSCC群間におけるOSCC候補細菌に関する統計解析

Factor	Univariate analysis			Multivariate analysis*	
	OSCC (n=41)	Non-OSCC (OLK+Post) (n=45)	P-value	OR (95%CI)	P-value
Abundance of p <i>Fusobacteria</i>					
≥10.2%	30	15	0.0003	5.04 (1.80-14.20)	0.002
<10.2%	11	30		1[reference]	
Abundance of g <i>Fusobacterium</i>					
≥8.5%	30	15	0.0003	5.64 (2.00-015.90)	0.001
<8.5%	11	30		1[reference]	
Abundance of p <i>Firmicutes</i>					
<25%	27	11	0.0002	6.88 (2.40-19.70)	<0.001
≥25%	14	34		1[reference]	
Abundance of g <i>Streptococcus</i>					
<11.4%	38	19	<0.0001	24.5 (5.65-107.0)	<0.001
≥11.4%	3	26		1[reference]	

Abbreviations: OSCC: oral squamous cell carcinoma; OLK: oral leukoplakia; Post: post operative of OSCC; OR: odd's ratio; CI: confidence interval; p: phylum; g: genus.

*adjusted by age, sex, smoking status, drinking status, and number of teeth.

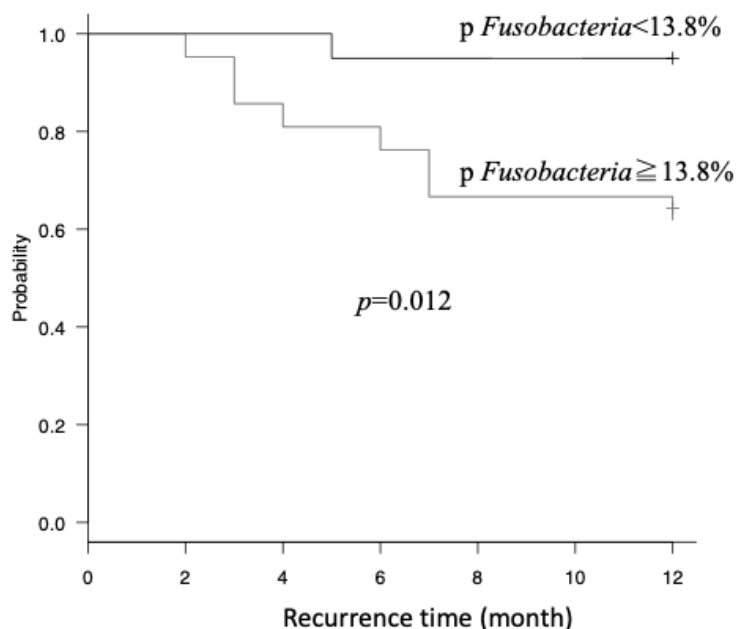


図 2 Fusobacteria門の割合による1年以内の再発率

(5) 考察

口腔細菌叢解析の意義、有用性

本研究は唾液検体を用いた口腔細菌叢の検討でOSCC群, OLK群, Post群, HV群間の細菌叢の相違、OSCC群に特徴的な細菌の割合の解析がOSCCの診断において有用である可能性を示した。採取が容易である唾液からの口腔細菌叢の解析がOSCC診断において臨床応用が可能であれば、早期診断のみならず予後予測に貢献すると考えられる。

口腔扁平上皮癌における細菌の多様性

OSCC や OLK などの疾患の存在や OSCC 術後などの宿主の状態によって口腔内環境が変化し生存可能な細菌が限定された結果、細菌叢の多様性が低下し各群に特徴的な細菌叢が形成されたものと考えられた。

新規の口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての可能性

本研究では、OSCCを検出できる最適な診断カットオフ値を決定し、その診断カットオフ値とOSCCの関連性をみることで、OSCC診断における口腔細菌叢解析の有用性が示された。さらに、*Fusobacteria*門の割合が高値を示した症例で有意に再発率が高かったことは、予後因子としての可能性を示唆していた。

口腔細菌と癌発生経路

口腔細菌が癌の発生や進展に関わる機序としては、慢性的な炎症を惹起することによる免疫抑制、細胞周期への直接的あるいは間接的な干渉、発癌物質の産生、細胞アポトーシスの阻害、細胞増殖の活性化や細胞性浸潤の促進などがこれまでに指摘されている。

唾液検体の特徴

唾液の採取は非侵襲的で簡便であることからOSCCを含めた疾患のスクリーニングに適していると考えられる。唾液の細菌叢は最も口腔内の状態を反映しており、その細菌叢は安定的で再現性が高いと報告されている。

今後の課題と展望

今回は OSCC 群の生命予後の検討ができなかったが、今後も継続的に対象症例の追跡調査を行うことによって明らかとしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Kengo, Shimizu Dai, Hirabayashi Sho, Ueda Sei, Miyabe Satoru, Oh iwa Ichiro, Nagao Toru, Shimozato Kazuo, Nomoto Shuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Changes in oral microbial profiles associated with oral squamous cell carcinoma vs leukoplakia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative and Clinical Dentistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1111/jicd.12445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kengo Hashimoto, Dai Shimizu, Sei Ueda, Satoru Miyabe, Ichiro Oh-iwa, Toru Nagao, Kazuo Shimozato, Shuji Nomoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Feasibility of Oral Microbiome Profiles Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kengo Hashimoto, Shuji Nomoto, Sho Hirabayashi, Sei Ueda, Oh-iwa Ichiro, Toru Nagao, Kazuo Shimozato
2. 発表標題 Changes of Oral Microbiome Profiles Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma.
3. 学会等名 American association of cancer research annual meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 橋本健吾、野本周嗣、上田 整、宮部 悟、大岩伊知郎、長尾 徹、下郷和雄
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌に関連した口腔細菌叢の 新規臨床的バイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

論文「Feasibility of Oral Microbiome Profiles Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma」に関しては、2020年4月23日にアクセプトされ、現在掲載に向け準備中である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	野本 周嗣 (Nomoto Shuji) (40300967)	愛知学院大学・歯学部・教授 (33902)	
研究 分担者	宮部 悟 (Miyabe Satoru) (40534582)	愛知学院大学・歯学部・講師 (33902)	
研究 協力者	橋本 健吾 (Hashimoto Kengo)	愛知学院大学・歯学部・大学院生 (33902)	