

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20618

研究課題名(和文) 唾液から口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移予測分子マーカーを同定し臨床応用する

研究課題名(英文) Identification of cervical lymph node metastasis prediction molecular marker of oral squamous cell carcinoma from saliva

研究代表者

菅原 圭亮 (Sugahara, Keisuke)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10506926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：頸部リンパ節転移の有無は予後予測に重要である。診断精度の向上には、信頼性の高いマーカーが必要である。唾液を用いたメタボローム解析を口腔扁平上皮癌患者22症例、健常人21例に行った結果、499のイオン性代謝物のうち25代謝物が口腔扁平上皮癌患者と健常人の2群間において統計学的有意差を認められた。特にCholine, p-Hydroxyphenylacetic acid, 3-Hydroxybutyric acidが口腔扁平上皮癌患者で、Ureaは、健常人で高値であった。3-Hydroxybutyric acidは過去に口腔扁平上皮癌での報告はない代謝物であった。

研究成果の概要(英文)：The detection of cervical lymph node metastasis is important to a prognostic value. Improvement of the diagnosis precision requires a reliable marker. 25 metabolite showed a statistically significant difference between two groups of the oral patients with squamous cell carcinoma and healthy subject among 499 ionic metabolite as a result that oral patients with squamous cell carcinoma 22 case, healthy subject 21 received metabolic analysis using the saliva. Choline, p-Hydroxyphenylacetic acid, 3-Hydroxybutyric acid was a patient with oral squamous cell carcinoma, and Urea was in particular high level in healthy subjects. 3-Hydroxybutyric acid was the metabolite that a past did not have the report for oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 メタボローム 頸部リンパ節転移 唾液

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌において頸部リンパ節転移の有無は予後予測の重要な診断情報であり、治療方針に大きく影響する。制御可能と判断し外科療法が適応される症例でも、原発腫瘍の状況等から転移の可能性が高いと判断された場合、予防的な外科療法(頸部郭清術)後療法として放射線療法、化学療法が行われる。現在のところ様々な画像検査を行っても頸部リンパ節転移に関しては約70%の診断精度である。画像情報に加えて転移に関するより信頼性のある情報があれば確実な治療法の選択、また不要な治療を避ける事も可能となる。それらは患者QOLおよび生存率の向上にも寄与すると考えられる。

申請者らは簡易的で非侵襲的に採取可能な試料である唾液に着目し、正常健常人と口腔扁平上皮癌患者の唾液を用い2次元電気泳動法で口腔扁平上皮癌患者に特有なタンパク質enolase1を同定した(Katakura et al. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 2015)。近年では、糖やアミノ酸など体内にある代謝物メタボライトの数百種類の含有量を、網羅的に成分分析するメタボローム解析が開発され、血液や組織、唾液を用いてがんを含む多くの疾患の解析に用いられるようになってきている。血液の代用検体として唾液を用いて口腔扁平上皮癌の転移に関するメタボローム解析を用いて代謝物を網羅的に探索し、その発現状態を解析することで転移予測分子マーカーを同定できる可能性は十分にある。

### 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌患者の唾液を用いメタボローム解析で頸部リンパ節予測マーカーを探索し、そのマーカーの臨床応用および転移メカニズムの解明が目標である。血液の代用検体として唾液を用いて口腔扁平上皮癌の転移に関するメタボローム解析を用いて代謝物を網羅的に探索し、その発現状態を解析することで臨床応用可能な転移予測分子マーカーを同定できる可能性は十分にある。

関連する遺伝子のコピー数、発現状態を検討、さらに、正常組織、腫瘍組織における局在を検討する総合的な研究である。ターゲットとした代謝物の機能解析を行うことにより新たな口腔扁平上皮癌の転移メカニズム解明の一步となる可能性がある。口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移予測マーカーになりうる代謝物を検索するという試みが含まれ、臨床に有用な結果を期待できる。唾液で有用なマーカーが同定されれば術前の診断・手術方針の決定は勿論のこと、術後経過観察時の画像検査に加え、本マーカーを測定すれば早期に頸部リンパ節転移予測が可能となり、口腔扁平上皮癌患者の生存率および患者QOLの向上につながると考えている。

### 3. 研究の方法

本研究では、口腔扁平上皮癌患者の中でも予後不良症例を予測するために、術前の唾液を用い、網羅的解析が可能なCE-MSメタボローム解析を行い、頸部リンパ節転移有り群と転移なし群の2群間で有意差をもつ代謝物を同定する。唾液の解析を行うことで頸部リンパ節転移を予測するという画期的な診断マーカーの探索である。臨床応用可能になれば、術前の診断精度が高まり、患者QOLの向上につながり、術後経過観察時には、早期に後発転移を発見出来るようになる。そして頸部リンパ節転移予測マーカーおよび関連遺伝子をReal-time PCR法や免疫化学染色などを用い腫瘍組織、正常組織での発現状態を確認する。さらに機能解析を行うことでより詳細に口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移メカニズムを解明していく。

口腔扁平上皮癌患者の唾液、正常組織、腫瘍組織を用いて以下の事項を明らかにする。

1) 術前の唾液を用いてCE-MSメタボローム解析で網羅的に口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移予測代謝物をスクリーニングする。全症例とも朝8時に同一環境下で10分間の安静時の唾液を採取し、試料を遠心分離にかけ不純物を除去した後、CE-MSを用いてメタボローム解析を実施した。検出された代謝物について2群間で統計学的に比較検討を行った。統計解析にはWilcoxon Rank Sum Testを用いた。

2) 候補代謝物と関連遺伝子を正常組織、腫瘍組織を用いてReal-time PCR法、Western blotting法、免疫組織化学染色などでコピー数変動解析、発現解析を行い、代謝物の局在を確認する。

3) これらの代謝物および関連遺伝子のコピー数変動、発現状態と口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移の臨床指標との関連性を統計学的解析にて検討し、転移予測分子マーカーとして臨床応用可能か統計学的検討を行う。

4) 候補代謝物に対してin vitro invasion assay等の機能解析を行い転移メカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌患者の唾液の収集は30症例に対して実施した。唾液の前処理は全症例で行った。唾液を用いたCE-MSメタボローム解析は22症例で実施した。対照群として口腔内に炎症性疾患を有しない21例を対象とした。唾液から検出された499のイオン性代謝物のうち、25代謝物が口腔扁平上皮癌患者と健常人の2群間において統計学的有意差を認めた。Wilcoxon Rank Sum TestにおいてCholine, p-Hydroxyphenylacetic acid,

2-Hydroxy-4-methylvaleric acid, が  $P < 0.001$ 、Val, 3-Phenyllactic acid, Leu, Hexanoic acid, Octanoic acid, Terephthalic acid, -Butyrobetaine, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid が  $P < 0.01$ 、Ile, Trp, 3-Phenylpropionic acid, 2-Hydroxyvaleric acid, Butyric acid, Cadaverine, 2-Oxoisovaleric acid, N6,N6,N6-Trimethyllysine, Taurine, Glycolic acid, 3-Hydroxybutyric acid, Heptanoic acid, Ala が  $P < 0.05$  で、口腔扁平上皮癌患者が対照群より高値であった。Urea は  $P < 0.05$  で今回唯一、健常人が口腔扁平上皮癌患者より高値であった。過去の口腔扁平上皮癌組織を用いたメタボローム解析で報告ではエネルギー代謝が解糖系が優位となる Warburg 効果が認められているが、本研究では認められなかった。一方、有意差を認めた代謝物は TCA サイクルなど 1 つの代謝経路のみでなく、広範囲で様々な代謝経路に関与していた。最も有意差の高かった Choline は、癌細胞で過剰な増殖を表す強化膜合成と分解による影響と考えられた。また、3-Hydroxybutyric acid は口腔扁平上皮癌での報告はない。その結果を用いて日本人口腔扁平上皮癌の発がんに関与する可能性のある 25 の候補代謝物を同定し、国際学術誌 (Ohshima et al. Oncology Report, 2017) に投稿、掲載された。以上の結果に加え、顎部リンパ節転移あり群と転移無し群に分け、2 群間での検出された代謝物を抽出し、顎部リンパ節転移関連候補代謝物を探索した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Mitsuyoshi Ohshima, Keisuke Sugahara, Kiyohiro Kasahara, Akira Katakura, Metabolomic analysis of the saliva of Japanese oral squamous cell carcinoma patients, ONCOLOGY REPORTS, 2017, DOI:10.3892/or.2017.5561
2. Takano M, Kasahara K, Keisuke Sugahara, Watanabe A, Yoshida S, Shibahara T. Usefulness and capability of three dimensional, full high-definition movies for surgical education. Maxillofac Plast Reconstr Surg. 2017 Aug 16;39(1):28. doi: 10.1186/s40902-017-0124-2. eCollection 2017 Dec.
3. Yoshiharu Katsumi, Keisuke Sugahara, Satoru Matsunaga, Kento Odaka, Keisuke Mitomo, Shinichi Abe, Masahide Koyachi, Kazuhiro Ito, Masayuki Takano, Akira Katakura, Planning for orthognathic surgery at medical fabrication laboratory in Tokyo Dental College (Fab Lab TDC) Clinical Application of Full-Scale-Model made by 3-Dimensional Ink Jet Printer for Orthognathic Surgery, Oral Science in Japan 2016, 9-11
4. Keisuke Sugahara, Masahide Koyachi, Akihiro

Nishiyama, Teruhide Hoshino, Hiroki Bessho, Kiyohiro Kasahara, Akira Katakura, A Case of Foreign Body in the Right Cheek, Oral Science in Japan 2016, 43-46

5. Keisuke Sugahara, Kazuhiro Ito, Takeaki Shiga, Masahide Koyachi, Teruhide Hoshino, Akihiro Nishiyama, Hiroki Bessho, Kiyohiro Kasahara, Akira Katakura, A Case of Osseous Choristoma of the Tongue, Oral Science in Japan 2016, 53-54

6. Masahide Koyachi, Akihiro Nishiyama, Yumiko Ito, Sayoko Nagai, Keisuke Sugahara, Masayuki Takano, Chikara Saito, Akira Katakura, A Case of Kikuchi-Fujimoto Disease with Submandibular Lymphadenopathy, Oral Science in Japan 2016, 65-66

7. 伊藤和宏, 菅原圭亮, 太尾英子, 星野照秀, 山村哲生, 齊藤 力, 片倉 朗, 非水疱性先天性魚鱗癬様紅皮症患者に対し顎矯正手術を施行した 1 例, 日口内誌 第 22 巻 第 2 号: 73-78, 2016

8. 菅原圭亮, 伊藤和宏, 勝見吉晴, 高野正行, 齊藤 力, 片倉 朗, 腸骨 PCBM 移植術を併用し再手術を行った下顎骨変治骨折の 1 例, 日本口腔診断学会雑誌 第 30 巻 第 1 号 2017 年

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 菅原圭亮, 別所央城, 野村武史, 高野伸夫, 片倉 朗, 口腔扁平上皮癌患者の唾液を用いたメタボローム解析, 第 40 回日本頭頸部癌学会, 2016 年 6 月 9 日, 大宮
2. 小谷地雅秀, 菅原圭亮, 勝見吉晴, 片倉 朗, 転倒により頬部に木片が迷入した 1 例, 第 18 回 日本口腔顎顔面外傷学会・総会・学術大会, 2016 年 7 月 31 日, 東京
3. 西田紘子, 勝見吉晴, 菅原圭亮, 辻野啓一郎, 新谷誠康, 高野正行, 柴原孝彦, 片倉 朗, 過去 2 年間の当院における小児口腔顎顔面外傷症例の臨床的検討, 第 18 回 日本口腔顎顔面外傷学会・総会・学術大会, 2016 年 7 月 31 日, 東京
4. 菅原圭亮, 別所央城, 大野啓介, 大金 寛, 高野伸夫, 高野正行, 柴原孝彦, 片倉 朗, 企業における口腔がん集団検診, 第 26 回日本口腔内科学会第 29 回口腔診断学会合同学術大, 2016 年 9 月 23 日 24 日, 岡山
5. 伊藤和宏, 菅原圭亮, 志賀勇昭, 太尾英子, 松坂賢一, 片倉 朗, 舌背部に発生した骨性分離腫の 1 例, 第 26 回日本口腔内科学会第 29 回口腔診断学会合同学術大, 2016 年 9 月 23 日 24 日, 岡山
6. 太尾英子, 菅原圭亮, 別所央城, 松坂賢一, 片倉 朗, 口腔粘膜蛍光観察の病理組織学的検証, 第 26 回日本口腔内科学会第 29 回口腔診断学会合同学術大, 2016 年 9 月 23 日 24 日, 岡山
7. 小石沢理央, 吉田秀児, 関根理予, 大野啓介, 菅原圭亮, 別所央城, 渡邊 章, 笠原清弘, 高野正行, 齊藤 力, 片倉 朗, 柴原孝

彦、東京歯科大学水道橋病院口腔外科における入院手術症例の統計研究、第302回東京歯科大学学会総会 平成28年10月15日東京

8. 西田訓子、西田紘子、小山 侑、小谷地雅秀、小石沢理央、和田 朗、勝見吉晴、西山明宏、関根理予、大野啓介、吉田秀児、菅原圭亮、別所央城、渡邊 章、笠原清弘、高野正行、齊藤 力、片倉 朗、柴原孝彦、東京歯科大学水道橋病院口腔外科における平成27年度外来初診患者の臨床的統計、第302回東京歯科大学学会総会 平成28年10月15日 東京

9. 太尾英子、菅原圭亮、別所央城、松坂賢一、片倉 朗、口腔粘膜蛍光観察の病理組織学的検証、第61回 日本口腔外科学会学術大会・総会、2016年11月25日-27日、千葉

10. 小山 侑、菅原圭亮、伊藤和宏、勝見吉晴、石田結実香、高野正行、片倉 朗、術後性上顎嚢胞を伴う顎変形症患者に上下顎移動術を行った1例、第61回 日本口腔外科学会学術大会・総会、2016年11月25日-27日、千葉

11. 菅原圭亮、別所央城、大野啓介、大金 覚、高野伸夫、高野正行、柴原孝彦、片倉 朗、企業における口腔がん集団検診 -地域における集団検診との比較-、第61回 日本口腔外科学会学術大会・総会、2016年11月25日-27日、千葉

12. Yoshiharu Katsumi, Kazuhiro Ito, Keisuke Sugahara, Satoru Matsunaga, Kento Odaka, Keisuke Mitomo, Shinichi Abe, Masayuki Takano, Akira Katakura, Technical report of new condyle repositioning method in 3D Model, 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017年3月25日、San Francisco

13. 太尾英子、菅原圭亮、別所央城、松坂 賢一、片倉 朗、口腔粘膜蛍光観察装置の病理組織学的検証、第27回日本口腔内科学会第30回口腔診断学会合同学術大会、2017年9月23日、札幌

14. 小谷地雅秀、西山明宏、菅原圭亮、渡邊 章、笠原清弘、高野正行、柴原孝彦、片倉 朗、Skeletal Class II 不正咬合者における顎矯正手術後の下唇知覚障害について、第27回日本顎変形症学会、2017年6月15日、東京

15. 菅原圭亮、太尾英子、勝見吉晴、小山 侑、小谷地雅秀、別所央城、笠原清弘、渡邊 章、高野正行、齊藤 力、柴原孝彦、片倉 朗、下顎枝矢状分割術での異常骨折(Bad split)症例の検討、第27回日本顎変形症学会、2017年6月15日、東京

16. 菅原圭亮、太尾英子、別所央城、中島 啓、松坂賢一、片倉 朗、口腔粘膜蛍光観察の病理組織学的検証、第62回日本口腔外科学会学術大会・総会、2017年10月20日、京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：該当なし。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

菅原 圭亮 (Sugahara Keisuke)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：10506926

### (2)研究分担者

該当なし。

### (3)連携研究者

該当なし。

### (4)研究協力者

該当なし。