

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11897

研究課題名(和文) 唾液の多層オミックス解析による口腔癌・口腔前癌病変スクリーニング法の確立

研究課題名(英文) Establishment of screening methods for oral cancer/oral dysplasia with multi-omics based methods

研究代表者

石川 恵生 (Ishikawa, Shigeo)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00466640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌・口腔潜在的悪性疾患をそれらの類似病変患者からスクリーニングする唾液中の物質を探索することを目的とした。対象者は、口腔癌患者56名、口腔潜在的悪性疾患患者(白板症患者29名、口腔扁平苔癬患者26名)、そしてそれらの類似病変患者(重度歯周炎患者40名、中程度の歯周炎患者40名)を対象とした。キャピラリー電気泳動・質量分析装置と液体クロマトグラフィー・質量分析装置を用いて、唾液中の代謝物とタンパク質の網羅的測定を行った。オルニチン、スペルミン、スペルミジンは口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者と類似病変患者とで有意に異なっていた。そしてその組み合わせは、80%を超える判別能を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液は非侵襲に取得できるため、疾患検査が確立すれば医療機関以外でも採取・検査が可能となり、応用範囲が非常に広い。本研究では唾液中のオルニチン、スペルミン、スペルミジンなどが、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者とそれらの類似疾患患者とでは大きく異なることを明らかにし、また高い判別能を有することを明らかにした。これまで口腔癌や口腔潜在的悪性疾患をスクリーニングする方法は、視診と触診であり、それらの方法は歯科医師の経験によって大きく精度が異なっていた。唾液中の物質を用いて、口腔癌や口腔潜在的悪性疾患をスクリーニングできれば、非侵襲的で簡便そして客観的で高精度な検査になりうる。

研究成果の概要(英文)：Our aim is to identify salivary biomarkers to differentiate patients with oral cancer and oral potentially malignant disorders(OC/OPMD) from those with mimic benign oral mucosal lesions(MBOML) of OC/OPMD. Whole unstimulated saliva samples were collected from patients with OC (n=56), OPMD (leukoplakia:n=29, lichen:n=26) and MBOML (severe and moderate periodontitis:n=80). Metabolites and proteins in the saliva samples were comprehensively analyzed by capillary electrophoresis mass spectrometry and liquid chromatograph-mass spectrometry. To evaluate the discrimination ability of a combination of multiple markers, a multiple logistic regression (MLR) model was developed to differentiate OC/OPMD from MBOML of OC/OPMD. Ornithine and polyamines such as spermine and spermidine were significantly different between OC/OPMD and MBOML. The combination of these three metabolites showed a high area under the receiver operating characteristic curve over 80% for discriminating OC/OPMD from MBOML.

研究分野：歯科口腔外科学

キーワード：唾液 口腔癌 口腔潜在性悪性疾患 代謝物 タンパク質 類似病変 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は舌癌や歯肉癌など口腔に発生する癌の総称である。発生頻度は癌全体の5%程度でそれほど高くはないものの、口腔癌罹患数は年々増加傾向にある。またそれに伴い口腔癌死亡率も増加傾向にあるのが現状である。また白板症などといった口腔潜在的悪性疾患は、10年で約20%程度が癌化することが報告されており、癌を切除するよりも少ない安全域で切除することができるため、多くの施設で癌化する前に切除されている。また別の口腔潜在的悪性疾患の一つである扁平苔癬も悪性化の頻度は低いものの、一定数のがん化することが報告されており、早期発見後に厳密な経過観察が重要である。そのため口腔癌だけでなく口腔潜在的悪性疾患についても、早期発見は極めて重要である。しかし、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患の病態は極めて多様であり、専門医でも判断が困難な病態を呈することも少なくないため、これらの簡便かつ有効なスクリーニング法の確立は急務である。

近年生体材料としての唾液に注目が集まっている。唾液は非侵襲性に採取が可能であり、唾液中の成分は血液などを反映していることが多くの報告で明らかになっており、血液や尿などの研究に比べれば研究報告数は少ないが、増加傾向にある。唾液中の物質を測定することで様々な疾患をスクリーニングできる可能性も多く報告されるようになり、それに伴い口腔癌を唾液中の物質でスクリーニングするという報告が増加傾向にある。これまでわれわれも、唾液中の主に代謝物を測定し、口腔癌や口腔潜在的悪性疾患をスクリーニングできる可能性を報告してきた。

しかしながらその研究の多くは、比較対象者を健常者としていることがほとんどであり、良性病変と口腔癌を比較した研究報告は極めて少ない。実臨床においては、口腔癌や潜在的口腔悪性疾患と類似した病変は少なくない。具体的には、難治性口内炎、重度辺縁性歯周炎、咬傷など様々な疾患があげられる。開業歯科医院は、これまで口腔癌のほとんどを発見してきたという歴史的事実があるが、この開業歯科医院を受診する患者には、何らかの口腔内病変があることが多い。そのためその病変を、悪性かどうか判別することは実臨床においても非常に重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者と健常者および口腔癌・口腔潜在的悪性疾患類似病変患者の唾液を用いて、タンパク質を測定するプロテオミクス、そして代謝物を測定するメタボロミクスを同時かつ網羅的に行うことで(多層オミクス解析) 口腔癌・口腔潜在的悪性疾患をスクリーニングするバイオマーカーを探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

対象は、山形大学医学部歯科口腔外科を受診した、口腔癌患者56名、口腔潜在的悪性疾患として白板症患者29名と口腔扁平苔癬患者26名、また口腔癌・口腔潜在的悪性疾患類似患者として、重度歯周炎患者40名と中等度歯周病患者40名、そして口腔内に病変を伴わない健常者40名とした。事前に研究目的・内容を十分に説明し、書面で同意が得られた方々を調査対象者とした。

これらの調査対象者に対して安静時唾液を約3mlの採取を行い、唾液中の代謝物とタンパク質の測定は、それぞれキャピラリー電気泳動・質量分析装置、そして液体クロマトグラフィ・質量分析装置を用いて行った。

なお口腔癌患者と、口腔潜在的悪性疾患患者については全例において組織生検を行い、病理診断を得ている。

統計解析方法以下の通りである。

最初に、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者と対照者群の唾液中のタンパク質、代謝物を比較して、統計学的な有意差を認める物質を同定した。さらには、その有意差を認めた物質を用いて、ROC(Receiver Operating Characteristic)曲線を作成し、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者を、類似病変患者から判別するROC曲線下面積(AUC)を算出した。また単一の物質だけでなく、複数の物質を組み合わせたロジスティックモデルによるROC曲線も作成し、最も高いAUCをしめす物質の組合せを検討した。

また上記の解析は、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者を類似病変患者から判別するのみでなく、口腔癌と口腔潜在的悪性疾患患者を判別する物質など様々な観点からの検討も行った。

## 4. 研究成果

[口腔癌・口腔潜在的悪性疾患と類似病変との比較]

口腔癌・潜在性口腔悪性疾患患者と、それらの類似病変患者、そして健常者の唾液中のタンパク質、代謝物は大きく異なっていた。

その中でも、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者の唾液中のオルニチンは類似病変患者と比較して統計学的に有意に低値を示した。またスペルミジン、スペルミンといったポリアミン類は、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者において、類似病変患者よりも有意な高値を示していた。

これらの物質を用いてロジスティックモデルを作成したところ、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患を約 80%の精度 (AUC=0.81) でこれらの類似病変患者から判別できることが明らかになった。

[口腔癌と口腔潜在的悪性疾患との比較]

インドール-3-酢酸は、口腔癌患者において、口腔潜在的悪性疾患患者よりも有意な高値を示した。AUC は 0.72 であった。

[口腔癌・口腔潜在的悪性疾患と健常者との比較]

シトルリン、チロシン、ヒスチジンは、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患患者において、健常者よりも特に有意な高値を示した。また 3 つの物質を組み合わせることで、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患を健常者から判別する能力は比較的高値を示した (AUC = 0.82)。

唾液中の代謝物やタンパク質といった物質が、口腔癌、潜在的口腔悪性疾患、類似病変、健常者の各群で大きく変動し、それらを用いることで、口腔癌・口腔潜在的悪性疾患を類似疾患や健常者からスクリーニングできる可能性が明らかになった。

口腔癌・口腔潜在的悪性疾患を、それらの類似疾患からスクリーニングするという実臨床にそくした研究デザインは意外に少ない。

本研究は、疾患と健常者を比較しただけでなく、実臨床にそくした研究デザインでスクリーニングバイオマーカーを探索し、スクリーニングしうるバイオマーカーを同定したという点を鑑みれば非常に有意義であると考えられた。

またスペルミンやスペルミジンは口腔癌だけでなく、大腸癌などの消化器癌で高値を示すことがすでに報告されている。本研究でもスペルミン、スペルミジンが高値を示したことは、過去の報告と比べて妥当であると考えられる。しかし様々ながんが高値を示す可能性があるということは、部位特異性に問題があるということでもある。今回は、悪性疾患については口腔癌のみが対象であったが、将来的には様々ながん患者の唾液中の物質を比較することで、本研究で候補となった物質の部位特異性についても検討を行う必要があると考えられた。

今後はさらに検体数を増やしてより高精度なスクリーニングバイオマーカーを同定すべく研究を行っていききたい。また本研究は、スクリーニングバイオマーカーだけでなく、予後マーカーなどの研究に応用できる可能性があるため、様々な解析を行っていく予定である。

唾液による口腔癌・口腔潜在的悪性疾患が実用化されれば、非侵襲的かつ簡便に口腔癌・口腔潜在的悪性疾患のスクリーニングが可能になり、そしてそれは早期発見へとつながることが期待される。

欧米と比較し、口腔癌の死亡率が増加傾向である日本において、口腔癌の予後を改善するためにも今後もさらなる研究を行っていききたい。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa Shigeo, Wong David T. W., Sugimoto Masahiro, Gleber-Netto Frederico Omar, Li Feng, Tu Michael, Zhang Yong, Akin David, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of salivary metabolites for oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia screening from persistent suspicious oral mucosal lesions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 3557 ~ 3563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-018-2777-3	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 該当する
1. 著者名 Li Feng, Yoshizawa Janice M, Kim Kyoung-Mee, Kanjanapangka Julie, Grogan Tristan R, Wang Xiaoyan, Elashoff David E, Ishikawa Shigeo et al.	4. 巻 64
2. 論文標題 Discovery and Validation of Salivary Extracellular RNA Biomarkers for Noninvasive Detection of Gastric Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1513 ~ 1521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1373/clinchem.2018.290569	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa Shigeo, Sugimoto Masahiro, Kitabatake Kenichiro, Tu Micheal, Sugano Ayako, Yamamori Iku, Iba Asuka, Yusa Kazuyuki, Kaneko Miku, Ota Sana, Hiwatari Kana, Enomoto Ayame, Masaru Tomita, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effect of timing of collection of salivary metabolomic biomarkers on oral cancer detection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 761 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-017-2378-5	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa Shigeo, Sugimoto Masahiro, Edamatsu Kaoru, Sugano Ayako, Kitabatake Kenichiro, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Discrimination of oral squamous cell carcinoma from oral lichen planus by salivary metabolomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13209	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川恵生 北畠健一朗 菅野絢子 山森郁 遊佐和之 飯野光喜
2. 発表標題 唾液中代謝物による口腔がんスクリーニングに関する研究
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川恵生 北畠健一朗 菅野絢子 山森郁 井場明日香 遊佐和之 橘寛彦 飯野光喜
2. 発表標題 唾液中代謝物を測定する際の唾液採取条件に関する研究～口腔癌スクリーニングのために～
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 石川恵生 飯野光喜	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 別冊Bio Clinica: 慢性炎症と疾患	

1. 著者名 石川恵生 飯野光喜	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)全日本病院出版会	5. 総ページ数 8
3. 書名 ENTONI: 【口腔・舌病変をみる-初期病変も見逃さないポイント-】 歯周病	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 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	杉本 昌弘  (Sugimoto Masahiro)  (30458963)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任教授    (32612)	
研究 分 担 者	北畠 健一郎  (Kitabatake Kenichiro)  (60744456)	山形大学・医学部・医員    (11501)	