

令和 3 年 8 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17280

研究課題名(和文)唾液/血液中の腫瘍核酸(cfDNAとmiRNA)による数理腫瘍学的な口腔癌診断法

研究課題名(英文)Circulating microRNA Panel as a Potential Novel Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis

研究代表者

中村 康大(Nakamura, Kodai)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：90783506

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):口腔癌の有用な腫瘍マーカーは未だに報告されていない。また口腔癌の重要な予後因子である頸部リンパ節後発転移に対する予測マーカーも確立されていない。よって口腔癌領域では、診断および治療後のモニタリングに際して有用なバイオマーカーの開発が急務である。microRNAは多くの悪性腫瘍でその発現異常が報告され、血清中のmicroRNAを利用した診断の試みが報告されているが、口腔癌領域においては、microRNAを用いた診断システムは未だ確立されていない。本研究は口腔癌の検出と再発予測に対して精度の高い分子マーカーとなるmicroRNAの同定、およびそれらを用いた診断アルゴリズムの構築をした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の非侵襲的検査法は実用化されておらず、現状では、確定診断のためには組織を切除する「生検」しか方法がない(この方法は多くの合併症を有する)。また現状の口腔癌検診は専門家の診察によるものでコストパフォーマンスが低く、大規模検診には不向きである。口腔癌には、大腸癌の便潜血検査や胃癌のバリウム検査などのような、比較的良好な感度と特異度を有する1次検診法が存在しない。よって本研究結果は、口腔癌の新規診断法・新規検診法の技術基盤となる可能性がある。本技術研究開発を進めて行く目標として「臨床現場即時検査(POCT)タイプの装置の開発」および「口腔癌腫瘍マーカーとしての保険収載」を見据えている。

研究成果の概要(英文):A lack of reliable biomarkers for oral squamous cell carcinoma (OSCC) poses a major clinical issue. The sensitivity and specificity of classical serum tumor markers, such as the squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag), are quite poor, especially for early detection. This study aimed to identify specific serum miRNAs potentially serving as OSCC biomarkers. The expression levels of candidate miRNAs in serum samples from 40 OSCC patients and 40 healthy controls were quantitatively analyzed via microarray and reverse transcription PCR (RT-PCR) analyses. To enhance the accuracy of detection, we used Fisher's linear discriminant analysis to establish a diagnostic model that incorporated a combination of selected miRNAs.

研究分野：口腔外科

キーワード：microRNA 腫瘍マーカー 口腔癌 液体生検 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

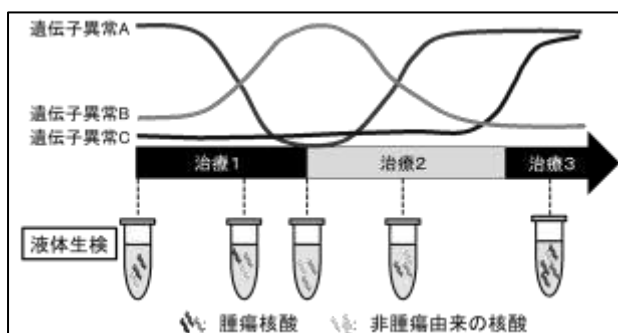
**背景(1)：癌治療におけるプレジジョンメディシン**

プレジジョンメディシン (精密医療・適確医療) とは、同一疾患の患者をグループ化し、各グループにその時点での最適な治療法を選択するという概念である。これまでの癌治療は、平均的な患者用にデザインされた「標準治療」が画一的に用いられてきた。しかし癌治療における「プレジジョンメディシン」は、遺伝情報・環境・ライフスタイルを含むビッグデータから数理腫瘍学的・統計学的なアルゴリズムを構築し、精緻に定義した患者群にグループ化したうえで、各グループに対して最適な時期に最適な治療法の選択を目指すものである。

**背景(2)：液体生検によるリアルタイムモニタリング**

癌の遺伝子異常は経時的に変化する。癌のゲノム構造は非常に不安定で、遺伝子異常は発癌後も、増大・浸潤・転移・薬剤耐性などの全ての段階で蓄積されていく。よって、最適な治療法の選択には、リアルタイムな腫瘍の遺伝子プロファイリングが必要である。

その評価には、非侵襲的に採取できる体液サンプルを使って診断を行う「液体生検(liquid biopsy)」が有用である。その概念図を右図に示す。液体生検を用いたリアルタイムモニタリングにより、腫瘍の形質変化のタイミングと原因の両方を予測でき、より適切な治療法への変更が可能となる。 口腔癌においても近年分子標的治療法が保険適応となり、今後は多様な新規治療法が導入されると考えられる。よって治療法選択や再発転移の発見に有用な、精度の高い分子マーカーによる液体生検、および診断アルゴリズムの開発が必要である。



**背景(3)：口腔癌のバイオマーカーとしてのマイクロRNA**

液体生検のカギを握るのは、診断試料とバイオマーカーである。なかでも比較的低侵襲かつ簡便に採取でき患者負担が軽減されることから、我々は試料として血液に注目した。

また我々は、分子マーカーとして腫瘍核酸、具体的にはマイクロRNA (miRNA) に注目した。miRNAは標的mRNAの分解促進と翻訳阻害することで遺伝子発現を調節し、その発現異常は多くの悪性腫瘍で報告されていることから、近年では液体生検から得たmiRNAの測定により腫瘍性状を解析し、診断へ応用する動きが広がっている。 しかしながら、口腔癌領域においては、microRNAを用いた診断システムは未だ確立されていない。

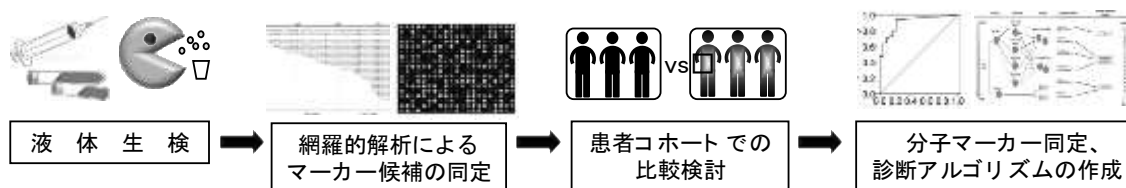
2. 研究の目的

「口腔癌のプレジジョンメディシン」を最終的な目標として見据え、本研究では、口腔癌の検出と再発予測に対して精度の高い分子マーカーとなるマイクロRNAの同定、およびそれらを用いた診断アルゴリズムの構築を目的とする。

3. 研究の方法

まず最初に、**1** プールサンプルからmiRNAの網羅的探索を行い、マーカー候補群の絞り込みを行う。次に、**2A** 患者コホート (癌症例vs健常者) においてPCRベースの核酸定量を行い、口腔癌検出マーカーを同定し、**2B** 口腔癌患者の治療前後に経時的に液体生検を実施し、後発リンパ節転移などの予後予測のマーカーを同定する。

最後に、**3** 同定されたマーカー群の有用性を統計学的に評価し、数理腫瘍学的な分析を行うことで、口腔癌のプレジジョンメディシンにおける診断アルゴリズムを構築する。



## (1) サンプル採取、およびmicroRNAの網羅的解析

《対象》鹿児島大学病院口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌40例および健常者40例。患者背景を下表に示す。

リアルタイムPCR法に用いた患者群、健常者群の臨床的背景

	平均年齢	性別		TNM分類				部位			
		男性	女性	I	II	III	IV	舌	歯肉	口腔底	頬粘膜
口腔癌群 (n=40)	67.3	21	19	3	14	8	15	21	14	4	1
健常者群 (n=40)	63.7	20	20								

《口腔癌患者からの血液の採取》倫理委員会の審査承認後、全症例でインフォームドコンセントを行い同意を取得し、口腔癌患者40例および健常者40例から血清サンプル(10ml)を採取した。口腔癌患者からは治療の前後にサンプル採取を行った。

《microRNAの網羅的解析》口腔癌群と健常者群の血清プール(各10例ずつ)から、3D-Gene RNA extraction reagent(東レ)を用いてtotal RNAを抽出し、3D-Gene miRNA labeling kit(東レ)を用いてラベル化後、3D-Gene Mouse miRNA Oligo chip(東レ)へハイブリダイゼーションした。シグナルは3D-Gene Scanner(東レ)を用いてスキャンし、3D-Gene Extraction software(東レ)を用いて数値化した。各スポットのシグナル値からブランクスポットの平均値を引くことによって補正を行なった。さらに、シグナル強度の平均値が25となるようにグローバルノーマライゼーションを用いて正規化を行った。

### (2) ① 口腔癌検出マーカーの同定

上記網羅的解析から絞り込まれた候補マーカーを標的としたリアルタイムRT-PCRによるmiRNA定量を行い、癌患者群と健常者群とを比較検討することで**口腔癌検出マーカー**を同定した。血清より miRNeasy serum/plasma kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) と MS2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて miRNA を含んだ total RNA を抽出し、TaqMan® MicroRNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて cDNA を合成した。miRNA の発現量は、TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム PCR システムで 3 回ずつ定量した。PCR 反応は、熱変性 95°C で 10 分間を 1 サイクル行い、2 サイクル目以降は熱変性 95°C で 15 秒、アニーリング/伸長反応は 60°C で 60 秒を 60 サイクル行った。リアルタイムPCR においては内因性コントロールにはmiR16を用いた。各microRNAの発現量はΔCT法にて相対的に定量した。

### (2) ② 治療前後のリアルタイムモニタリングと予後予測マーカーの同定

口腔癌患者の治療前後に経時的に液体生検し、候補マーカーと臨床病理学的事項との関連性を統計学的に検討し、リンパ節後発転移の予測マーカーを検討した。

### (3) 口腔癌のプレジクションメディシンにおける診断アルゴリズムの構築

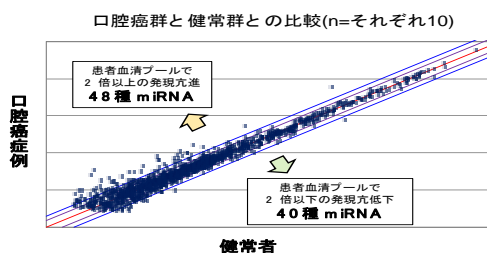
癌検出マーカーや予後予測マーカーとしては、それぞれに対して感度・特異度を計算し、ROC解析(受信者動作特性解析)にてAUC(ROC曲線下面積)を算出し、診断ツールとしての有用性を評価した。その後、より高精度な診断アルゴリズムの構築を目指し、ロジスティック回帰モデル、因子分析、正準判別分析など多変量による解析を行っていく。統計ソフトはJMP13およびRを用い、両側検定 $p < 0.05$ を有意差ありとみなした。

## 4. 研究成果

### (1) ① マイクロアレイによる網羅的解析

健常者群に対して癌患者群で2倍以上の発現レベルを示す48種、または1/2以下の発現を示す40種のmiRNAを候補マーカーとして同定した。(右図)

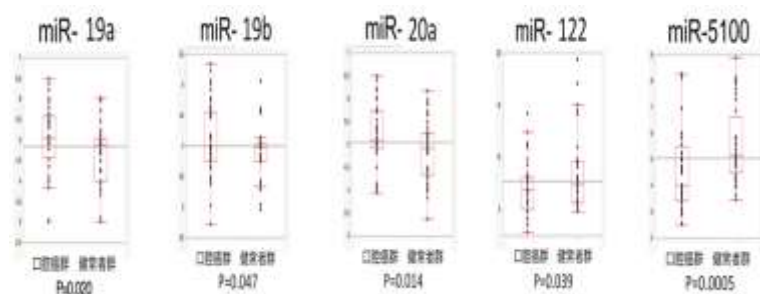
その中でも特に癌患者と健常者との間で差の大きく、リアルタイムPCRのプロンプが利用可能であった右表の14種のmicroRNAを診断の候補バイオマーカーとして選定した。



### (1) ② 両群間におけるmicroRNA発現の状況

結果①により同定された14種のmicroRNAを用い、口腔癌(n=40)と健常者群(n=40)の血清中の発現量をリアルタイムPCRにて定量した。

図に示すとおり、miR-19a、miR-19b、miR-20a、miR-122、miR-5100の5種において、口腔癌群と健常者群との間に発現量の有意差を認めた。口腔癌群において、miR-19a、miR-19b、miR-20aは発現上昇、miR-122、miR-5100では発現低下を認め、前者は担癌状態で発現が上昇するいわゆる「悪玉microRNA」、後者は発癌により発現が低下する「善玉microRNA」と思われた。



### (1) - ③ カットオフ値の設定と単一microRNAによる口腔癌の診断精度

次に、各microRNAについて「腫瘍の存在」をエンドポイントにしてROC解析を行い（スペースの都合上結果は省略）、口腔癌の存在診断に際しての最適なカットオフ値を設定した。それにより口腔癌群と健常者群を各microRNAの「低発現グループ」と「高発現グループ」の2グループに整理すると、両群間に統計学的有意差を認めるmicroRNAが8種存在した（下図）。8種のうち、miR-19a、miR-19b、miR-20a、miR-144では口腔癌群における有意な発現上昇を、miR-122、miR-183、miR-423、miR-5100は口腔癌群における有意な発現低下を認めた。統計学的有意差が認められた8種のmicroRNAにおける統計結果を下図に示す。

	miR-19a			miR-19b			miR-20a			miR-122		
	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p
口腔癌群 (n=40)	15	25	0.013	24	16	0.01	10	30	0.021	9	31	0.014
健常者群 (n=40)	27	13		35	5		21	19		1	39	

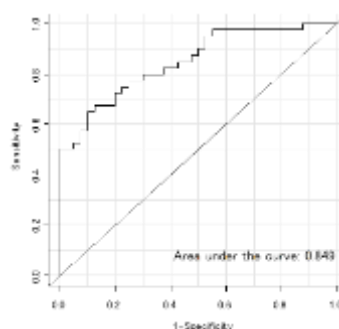
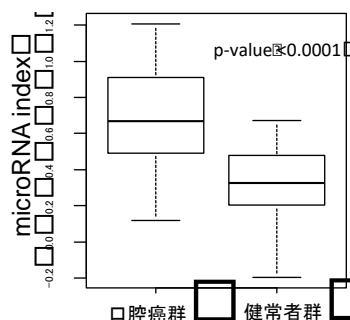
	miR-144			miR-183			miR-423			miR-5100		
	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p
口腔癌群 (n=40)	22	18	0.031	18	22	<0.0001	35	5	0.0188	20	20	0.0002
健常者群 (n=40)	32	8		2	38		25	15		4	36	

### (1) - ④ 独自式による口腔癌診断アルゴリズムの確立

microRNAを用いた口腔癌の診断アルゴリズムを構築するため線形分析を行ったところ、miR-24、miR-20a、miR-122、miR-150、miR-4419a、miR-5100が因子として選定され、口腔癌の診断システムとして下記の式（microRNA indexと定義）が得られた。

$$\begin{aligned} \text{microRNA index} = & -0.31567 + (0.09049 \times \text{miR-24}) + (0.21063 \times \text{miR-20a}) \\ & - (0.04705 \times \text{miR-122}) - (0.08418 \times \text{miR-150}) \\ & + (0.14492 \times \text{miR-4419a}) - (0.22962 \times \text{miR-5100}) \end{aligned}$$

この計算式を用いた場合、口腔癌と健常者群のmicroRNA indexは下図の通りであり、両群間には著明な差がみられた（下左図、p<0.0001）。本診断アルゴリズムのROC曲線を右下図に示す。microRNA indexのカットオフ値は0.517であり、その際のAUC=0.849、感度=67.5%、特異度=87.5%、PPV27.1%、NPV15.6%であり、検査ツールとして比較的良好な口腔癌の診断精度を得た。



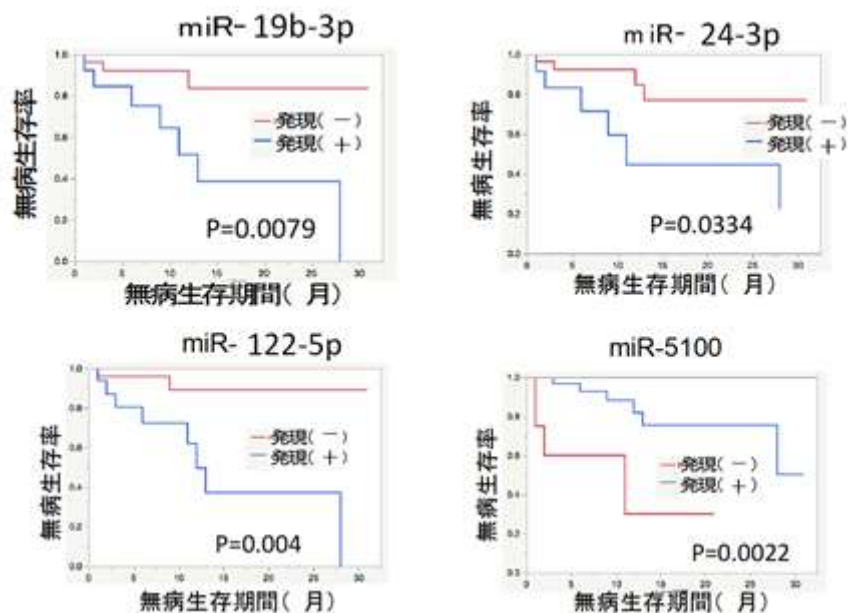
### (2) - ① 治療後のmicroRNA発現と後発リンパ節転移との関連性

口腔癌症例の予後を決定する最も大きな術後イベントは治療後の後発リンパ節転移である。そこで、各microRNAについて「後発リンパ節転移」をエンドポイントにしてROC解析を行い、最適

なカットオフ値を設定した（スペースの都合上結果は省略）。それにより口腔癌群と健常者群を各microRNAの「低発現グループ」と「高発現グループ」の2グループに整理すると、両群間に統計学的有意差を認めるmicroRNAが4種存在した（下図）。

	miR-19b(治療後)			miR-24(治療後)			miR-122(治療後)			miR-5100(治療後)		
	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p
後発転移なし (n=30)	24	6	0.0065	24	6	0.0411	22	8	0.0068	4	26	0.089
後発転移あり (n=10)	3	7		4	6		2	8		4	6	

上記4種のmicroRNAのうち、miR-19b、miR-24、miR-122では、高発現と後発リンパ節転移との正の有意な相関性を認め（悪玉の性質）、miR-5100は高発現と後発リンパ節転移との負の有意な相関性を認めた（善玉の性質）。下図に無病生存率における Kaplan-Meier 曲線を示す。各microRNAは全て統計学的有意差を示し、治療後の予後予測に有用であることが示された。

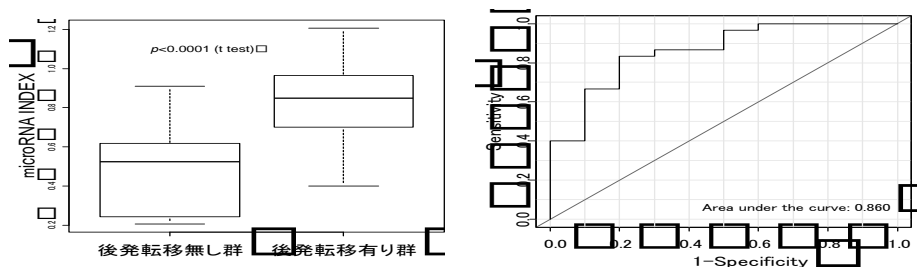


## (2) - ② 独自式による後発リンパ節転移予測アルゴリズムの確立

microRNAを用いた治療後の後発リンパ節転移の予測アルゴリズムを構築するため線形分析を行ったところ、miR-423、miR-150、miR-5100が因子として選定され、予測式として下記（microRNA indexと定義）が得られた。

$$\begin{aligned} \text{microRNA index} = & -1.36744 + (0.84173 \times \text{miR-423}) + (0.27273 \times \text{miR-150}) \\ & - (0.30080 \times \text{miR-5100}) - (0.13447 \times \text{miR-423/miR-150}) \\ & + (0.07004 \times \text{miR-150/miR-5100}) \end{aligned}$$

上記計算式を用いた場合、後発リンパ節転移有り群と無し群のmicroRNA indexは下図の通りであり、両群間には明らかな差がみられた（下左図、 $p < 0.0001$ ）。本診断アルゴリズムのROC曲線を右下図に示す。microRNA indexのカットオフ値は0.608であり、その際のAUCは0.860、感度83.3%、特異度80.0%、PPV38.5%、NPV7.4%であり、検査ツールとして良好な後発リンパ節転移の予測精度を得た。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakamura Kodai, Hiyake Naomi, Hamada Tomofumi, Yokoyama Seiya, Mori Kazuki, Yamashiro Kouta, Beppu Mahiro, Sagara Yasuaki, Sagara Yoshiaki, Sugiura Tsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Circulating microRNA Panel as a Potential Novel Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 449 ~ 449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13030449	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村康大
2. 発表標題 新規血清microRNAを用いた口腔扁平上皮癌診断アルゴリズムの構築
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Koudai Nakamura
2. 発表標題 Novel serum microRNAs specific for oral squamous cell carcinoma: its usefulness for early detection
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中村 康大
2. 発表標題 新規血清microRNAを用いた口腔扁平上皮癌診断アルゴリズムの構築
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中村 康大
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌に特異的な新規血清microRNA: 早期発見への有用性の検討
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 康大
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の検出に有用な血清microRNAの検討
3. 学会等名 南九州腫瘍研究会 第29回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 口腔癌判定装置、口腔癌判定方法、プログラム及び口腔癌判定キット	発明者 中村康大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-203289	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------