

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10350

研究課題名（和文）口腔がんの転移に関わる口腔常在菌の解析

研究課題名（英文）Association between oral bacteria and oral cancer metastasis

研究代表者

大廣 洋一（Ohiro, Yoichi）

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：40301915

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）：転移リンパ節に細菌由来の核酸が存在するか、病理組織学的に転移陽性ならびに陰性のリンパ節から核酸を回収し細菌由来の16S rDNAの発現を確認した。陰性5例中では1例のみ、陽性5例中4例で16S rDNAの発現を認めた。また、病理組織学的転移陽性または転移陰性の診断と、16S rDNAの発現の相関を検討したところ、正確度は69.2%、感度は57.1%、特異度は83.3%で、特異度が高い結果となった。また、原発巣からは細菌由来の16S rDNAは検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回検討した手法では、例数は少ないものの転移しなかった舌がん原発巣の深部で細菌由来の核酸は検出されなかったが、病理組織学的に転移陽性と診断されたリンパ節5個中80%で、また転移陰性と診断されたリンパ節5個中20%で細菌由来の核酸が検出された。さらに症例を増やして原発巣深部における細菌の存在と、転移リンパ節中の細菌の存在とを比較検討することで、口腔常在菌が口腔がんの悪性化に関与するか明らかになると、経過観察中の注意喚起を促し予後改善に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nucleic acids were collected from histopathologically positive and negative metastatic lymph nodes to determine whether bacterial 16S rDNA was present in metastatic lymph nodes. The expression of 16S rDNA was observed in only one of the five negative cases and in four of the five positive cases. The correlation between histopathological diagnosis of positive or negative metastasis and 16S rDNA expression was examined, and the accuracy, sensitivity, and specificity were 69.2%, 57.1%, and 83.3%, respectively. No 16S rDNA of bacterial origin was detected in the primary lesions.

研究分野：口腔顎顔面外科

キーワード：口腔がん 舌がん リンパ節転移 口腔常在菌 悪性化

1. 研究開始当初の背景

がんの発生には、慢性炎症が関与するといわれている。口腔では、口腔衛生状態の不良により慢性炎症が惹起されるため、歯周ポケットが深くなる (Tezal M., Arch Otolaryngol Head Neck Surg., 2007) と、また、喪失歯数が増加する (Tezal M., JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery, 2013) と口腔がんのリスクが増加すると報告されている。

近年、口腔常在菌が冠動脈疾患 (Haraszthy V., J Periodontol, 2000) やリウマチ (Hashimoto M, PLOS One, 2015) などの循環器疾患に関与するばかりでなく、膵がん (Ögrendik M, Gastrointest Tumors, 2016) など悪性新生物の発生にも関与しているという報告が散見される。また、口腔がんの発生にも口腔常在菌が関与するとの報告 (Galvão-Moreira LV, Oral Oncol., 2016) も出始めている。これらは疫学的研究が主体だが、*in vitro* ではある種の口腔常在菌が培養口腔がん細胞株に対して遊走能と浸潤能を増加させるという報告 (Gholizadeh P, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016) もある。以上より、原発腫瘍周囲の環境を構成する口腔常在菌が口腔がんの発症・局所における悪性化に関与するのみでなく転移促進に関与しているのではないかという仮説を立てた。

口腔がんの中でも、特に舌がんは術後後発転移が 30% 前後にみられ、そのリスク因子として腫瘍の厚さが検討されており、7mm 以上ではリンパ節転移が高率に発生し、10mm 以上では予後不良となることが示されている (Luongo de Matos L, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014)。現在、TNM 分類では原発腫瘍の厚みが 5mm 以上では 1 段階、10mm 以上では 2 段階増加させて記録することになっている。しかし、口腔内では補綴物や骨によるアーチファクトの影響で腫瘍の厚さを各種画像検査で正確に評価することはしばしば困難であり、さらに有効な画像検査が全ての施設で可能なわけではない。そのため、後発転移予測が困難となり、初診時にリンパ節転移がなければ原発巣のみ切除を行い、術後に転移が明らかになってから頸部郭清を施行する wait and see policy がとられているため、患者は頸部転移が明らかになるまで担がん状態にさらされる。しかし、予後改善のために、初診時に口腔内に原発巣のみを有する患者に対して予防的に頸部郭清術を行うことは、機能障害ならびに頸部の陥凹、瘢痕形成による醜形を来すため推奨されていない。以上より、口腔という器官に特徴的な補綴物ならびに骨などの影響を受けず、施設の設備に左右されない新しい転移予測バイオマーカーの確立が急務と考えるが、現在、臨床材料を用いて口腔常在菌と口腔がんの転移との関係について検討した研究はない。

2. 研究の目的

口腔常在菌が口腔がんの発生に関与することは、疫学的にまたは *in vitro* では検討されている。しかし転移と口腔常在菌に着目した臨床病理学検討はなく非常に独創的である。特定の口腔常在菌が口腔がんの転移など悪性形質の獲得に関与していることが明らかになれば、既存の因子と組み合わせ、より正確に頸部リンパ節転移を予測することが可能になると考えられる。高率に頸部転移を来す可能性がある症例に対して、初回治療時に頸部郭清を予防的に行うか否か判断し、さらに術後の入念な画像評価が可能になるなど適切な治療計画を立てることで患者の予後改善に役立つと考える。

口腔がんの予後不良因子の一つである、リンパ節転移に口腔常在菌が関与するか検討し、その機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

今回の研究では、以下の検討を予定した。

(1) 原発巣ならびに転移リンパ節の病理組織検体における口腔常在菌の存在を明らかにする。

病理診断科にホルマリン固定し保管されている手術残余標本を利用する。原発巣ならびに転移リンパ節の標本からマイクロダイセクション法により DNA を抽出し下記を検討する。細菌に特異的な 16S rDNA 領域を増幅した PCR 産物等を対象に、次世代シーケンサーを用いて大量に配列解析を行う。

(2) 口腔常在菌のなかで転移に関与する菌種を同定し、予後に対する影響を解析する。

上記で得られた菌種と臨床的評価項目 (後発頸部リンパ節転移出現率と出現時期、全生存期間、患者背景、病理組織診断、SCC 抗原) を検討し、転移に関与する菌種ならびに予後への影響を解析する。

(3) 腫瘍の微小環境における口腔常在菌の役割の検討。

抗体が存在する菌種は免疫染色により、その局在、感染している癌細胞ならびに周囲の免疫細胞の動員の程度などを解析する。

(4) *in vitro* における口腔がんに対する口腔常在菌の影響と機序解析。

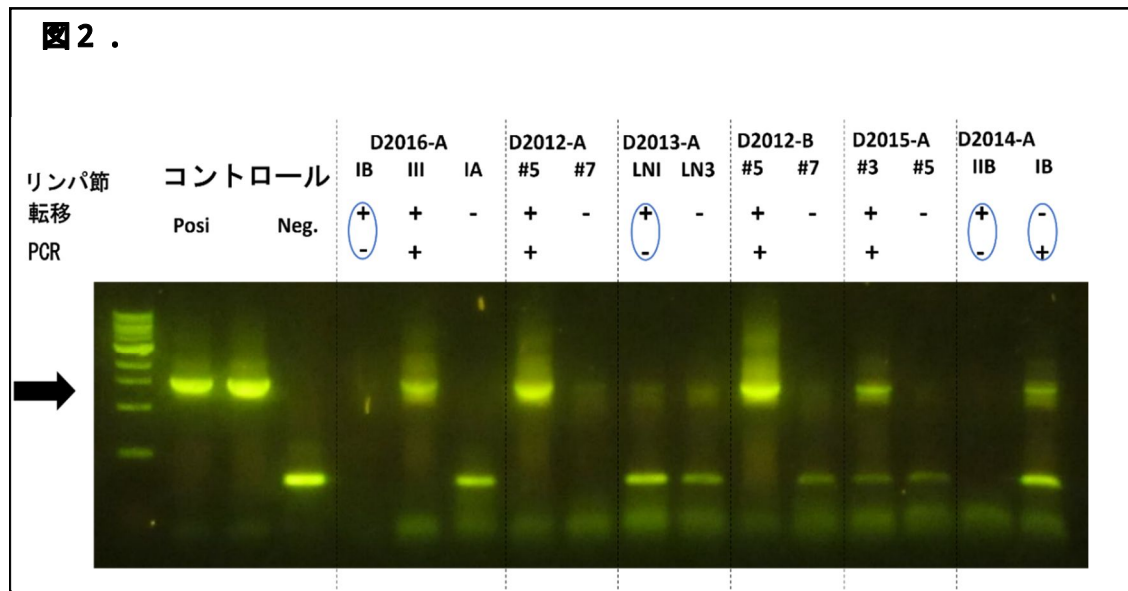
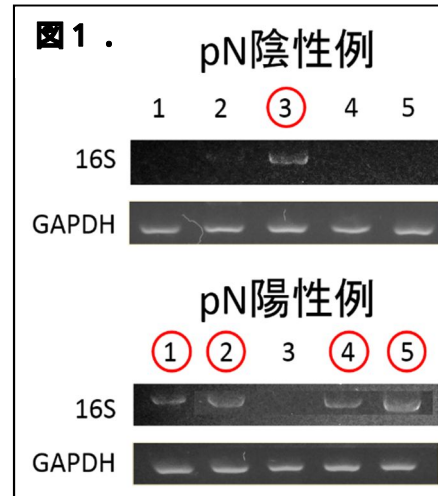
培養口腔がん細胞株と原因菌とを共培養し、ボイデンチャンパー法ならびにスクラッチアッセイにより運動能の変化を測定する。

4. 研究成果

< 予備実験 >

予備実験として、実際に転移リンパ節に細菌由来の核酸が存在するか確認した。病理組織学的に転移陽性ならびに陰性のリンパ節の薄切から核酸を回収し細菌由来の16S rDNAの発現を確認した。上段は病理組織学的転移(pN)陰性5例中では1例のみ、下段のpN陽性5例では4例で16S rDNAの発現を認めた(図1)。

さらに、検討対象とした症例の個体差を排除するために以下を行った。舌がん後発転移症例の同一の頸部郭清組織より得られたリンパ節のうち、病理組織学的に転移を認めたリンパ節と転移を認めなかったリンパ節の未染色のパラフィン包埋切片からDNAを回収し、各検体における細菌由来の16s rDNAを検出した。この検討により、舌がん後発転移6症例のうち、リンパ節における細菌由来の16s rDNAは5症例に認められ、1症例で検出されなかった。また、病理組織学的転移陽性または転移陰性の診断と、PCRにおける16s rDNAの診断における有用性を検討したが、正確度は69.2%、感度は57.1%、特異度は83.3%であったことから、特異度が高い結果となった。また、臨床における本研究の意義を高めるためには、原発腫瘍における細菌由来の16s rDNAの発現を検討し、後発転移に関係するか否かさらに検討することとした(図2)。



原発舌がん細菌由来の16s rDNAが存在するか検討した。舌がん表面は口腔環境に暴露しているため、HE染色したのち、口腔常在菌に汚染された表層部分を顕微鏡下で切除した。以上の操作を後発転移「有り」1例と「無し」2例の原発腫瘍に対して行った。それぞれ、腫瘍深部の腫瘍組織からDNAを回収した。ポジティブコントロールとして大腸菌由来のDNA、ネガティブコントロールとしてマウス肺組織由来のDNAを用いた。サイクル数30でポジティブコントロールで16s rDNAの発現は認められたが、後発転移の有無にかかわらず原発より抽出した試料において16s rDNAの発現は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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 | 北村 哲也 (Kitamura Tetsuya) (00451451) | 北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101) | |
| 研究分担者 | 樋田 京子 (Hida Kyoko) (40399952) | 北海道大学・歯学研究院・教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 長谷部 晃 (Hasebe Akira) (90281815) | 北海道大学・歯学研究院・教授 (10101) | |

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 |
|---------|---------|
| | |