

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10367

研究課題名（和文）唾液検査に応用する口腔癌バイオマーカーをメタボローム解析と多重蛍光染色で検証する

研究課題名（英文）Validation of oral cancer biomarkers applied to saliva testing with metabolome analysis and multiplex fluorescence staining

研究代表者

片倉 朗（Katakura, Akira）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10233743

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）：近年、様々ながんにおいてコリンの代謝過多に伴うcholinetransporter-like protein1（以下：CTL1）と細胞増殖能の関連性が注目されている。本研究では、口腔扁平上皮癌組織におけるCTL1の局在を確認し、CTL1と細胞増殖能との関連を検証した。結果として、我々は口腔扁平上皮癌細胞ならびに口腔扁平上皮癌組織でCTL1の高発現を明らかにし、細胞増殖能を有する細胞ではCTL1の産生増加や細胞膜への輸送亢進に関連している可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コリンは細胞膜の合成に必須であり、コリントランスポーター（choline transporter-like protein1: CTL1）によって細胞内へ取り込まれることが知られている。癌細胞の活発な細胞増殖においてコリンの需要が高まることから、癌組織内でのCTL1が高発現していることが考えられる。本研究では、口腔扁平上皮癌においてCTL1の高発現を認めた。今後は口腔扁平上皮癌におけるバイオマーカーの候補の可能性はあるかについてさらなる研究を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：In recently, the association between cholinetransporter-like protein 1 (CTL1) and cell proliferative potential associated with hypermetabolism of choline in various types of cancer has attracted much attention. In this study, we confirmed the localization of CTL1 in oral squamous cell carcinoma tissues and examined the relationship between CTL1 and cell proliferative potential. As a result, we found high expression of CTL1 in oral squamous cell carcinoma cells as well as in oral squamous cell carcinoma tissue, suggesting that CTL1 may be associated with increased production and transport to the plasma membrane in cells with cell proliferative potential.

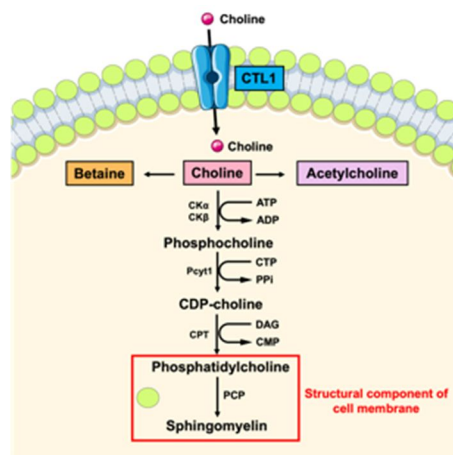
研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 バイオマーカー コリン コリントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は認知度が低く、初期段階では自覚症状がないため口内炎と認識してしまうケースが多々あり、早期発見率は未だ低いのが現状である。また、治療法は外科的切除が第一選択だが、進行癌では切除範囲が大きく侵襲が大きいため患者の身体的・社会的・精神的負担は計り知れない。したがって、口腔癌に対して早期発見や進展の予防のための新たな診断法の開発が社会的に早急に望まれており、大学病院などの専門施設のみならず、歯科診療所においても口腔癌のスクリーニングを恒常的に行うことができる検査法の実用化が急務である。

以前に、我々は健康者と比較して口腔扁平上皮癌患者の唾液中にコリンが有意に多く含まれることをメタボローム解析により明らかにし、コリンが口腔扁平上皮癌の早期発見・診断マーカーとなり得る可能性を見出した (Ohshima *et al.* Oncol. Rep., 2017)。コリンは細胞膜の合成に必須であり、コリントランスポーター (choline transporter-like protein1 : CTL1) によって細胞内へ取り込まれることが知られている (右図)。癌細胞の活発な細胞増殖においてコリンの需要が高まり、癌細胞にコリンが多く蓄積している現象に着目し、近年では、コリンを標的化合物として様々ながんの画像診断ツールとして臨床応用もされている。しかしながら、様々な癌研究分野でコリンの代謝異常および CTL1 と細胞増殖の関連性が注目されている一方で、口腔癌でのコリンや CTL1 の意義に関する解明はまだ発展段階である。



2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌における CTL1 の局在ならびに細胞増殖能との関連について検証および口腔扁平上皮癌におけるバイオマーカーの探索を目的とした。

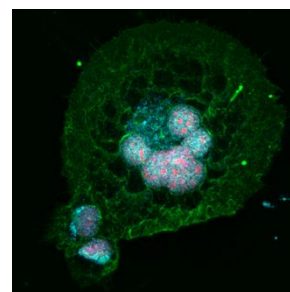
3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌における CTL1 の局在の確認および細胞増殖能との関連を *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* 的に評価した。まず、*in vitro* としてヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3, HSC-4, Ca9-22) を用いて、CTL1 の発現・局在を多重蛍光染色および Western blotting により確認した。また、CTL1 の発現が細胞増殖能と関連があるかどうかについて評価するために、細胞増殖マーカーである Ki67 等との多重蛍光染色を行なった。さらに、コリン阻害薬である Hemicolinium-3 を添加し、細胞増殖能に影響があるかを確認した。次に、*in vivo* として 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発舌癌モデルラットを作製し、口腔扁平上皮癌組織における CTL1 の発現を Ki67 等とのマーカーと多重蛍光染色により評価した。最後に、*ex vivo* として、口腔扁平上皮癌患者の手術検体を用いて多重蛍光染色による CTL1 の局在および発現を確認した。

また、口腔扁平上皮癌におけるバイオマーカーの探索として、口腔扁平上皮癌患者および健康者を対象に唾液と血液 (血清) を採取し、網羅的プロテオーム解析を行なった。

4. 研究成果

まず、*in vitro* の結果として、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株において細胞内、特に細胞小器官で CTL1 の発現を認めた。また、増殖能を有する Ki67 陽性細胞において核周囲で CTL1 が多く集積している傾向を示した。(右上図) さらに、Hemicolinium-3 を添加した群では有意に細胞数の減少を認め、コリンの細胞内への取り込みは細胞増殖に関連している可能性が示唆された。また、*in vivo* および *ex vivo* の結果として、口腔扁平上皮癌組織における CTL1 の高発現を認めた。以上より、本研究では、口腔扁平上皮癌細胞ならびに口腔扁平上皮癌組織で CTL1 の高発現を明らかにし、細胞増殖能を有する細胞では CTL1 の産生増加や細胞膜への輸送亢進に関連している可能性を示唆した。



さらに、網羅的プロテオーム解析では、口腔扁平上皮癌患者の血清において、合計 10 のタンパク質で up regulated または down regulated を認めた。(up regulated : 9, down regulated : 1) また、口腔癌患者の唾液中においても合計 10 のタンパク質で up regulated または down regulated を認めた。(up regulated : 7, down regulated : 3) 今後は、これらのタンパク質に関

しても口腔扁平上皮癌のバイオマーカーになりうるかどうかについてさらなる評価を行う予定である。

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 0件）

1. 著者名 Sugahara K, Koyama Y, Koyachi M, Matsunaga S, Odaka K, Kitamura K, Nakajima K, Matsuzaka K, Abe S, Katakura A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Relationship between the immunohistological examination and fluorescence visualization of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 2153-2160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11772.	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本菜央、山本圭、明石良彦、中條貴俊、中島啓、國分克寿、菅原圭亮、片倉朗、松坂賢一
2. 発表標題 舌癌におけるコリントランスポーターの局在および増殖細胞との関連
3. 学会等名 第313回東京歯科大学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本菜央、中島啓、明石良彦、國分克寿、菅原圭亮、片倉朗、松坂賢一
2. 発表標題 口腔癌におけるcholinetransporter like protein 1(CTL1)の局在および細胞増殖との関連
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本菜央、中島啓、明石良彦、國分克寿、菅原圭亮、松坂賢一、片倉朗
2. 発表標題 口腔癌細胞におけるcholinetransporter like protein 1(CTL1)の局在と細胞増殖能
3. 学会等名 3学会合同学会（第32回日本口腔内科学会・第33回日本臨床口腔病理学会・第35回日本口腔診断学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nao Hashimoto, Kei Nakajima, Yoshihiko Akashi, Katsutoshi Kokubun, Keisuke Sugahara, Akira Katakura, Kenichi Matsuzaka
2. 発表標題 Localization of choline transporter during the proliferation of oral cancers
3. 学会等名 2023AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本菜央、中島啓、明石良彦、國分克寿、菅原圭亮、片倉朗、松坂賢一
2. 発表標題 口腔癌細胞におけるcholinetransporter-like protein 1の局在と細胞増殖能との関連
3. 学会等名 第47回日本頭頸部癌学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 片倉 朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シエン社	5. 総ページ数 128
3. 書名 患者さんと家族のためのよくわかる口腔がん治療	

〔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	菅原 圭亮 (Sugahara Keisuke) (10506926)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

6. 研究組織（つづき）

	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	別所 央城 (Bessho Hiroki) (30433973)	東京歯科大学・歯学部・非常勤講師 (32650)	

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