様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　６ 月 １２ 日現在

機関番号：１７７０１
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｋ１９２３８

研究課題名（和文）RCAS1を標的とした口腔癌に対する新規プレシジョンイムノセラピーの樹立

研究課題名（英文）The establishment of new precision immunotherapy to target RCAS1 in oral squamous cell carcinoma

研究代表者
田中　秀明（Tanaka, Hideaki）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：３０７３８４６４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌(OSCC)の臨床検体を用いて癌関連抗原である Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1)の発現について解析し、バイオマーカーとしての有用性を検討していたが、コロナ禍の影響により、患者の受診回数および接触時間が制限されて、検体数が不十分な状況となった。当初の計画から一部変更を行い、現研究と並行し、治療に入る前の検査の段階においてより簡便な検査法を確立させることにも着目し研究を進めてきた。我々はうがい液による簡便な検査法の確立に着手し、中でも遺伝子のメチル化を検出する手法での診断システムを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
含嗽液中のがん抑制遺伝子のメチル化を調査することにより口腔癌や口腔癌の前駆病変である口腔潜在的悪性疾患の診断を行える可能性を示した。これらの口腔粘膜病変は臨床所見と病理診断には乖離が生じやすく、診療方針を決定するため侵襲を伴う組織生検が必須である。現状、口腔癌のスクリーニング検査として細胞診が行われているが、診断精度において特異度が高いものの、感度が低い問題がある。本研究の手法である含嗽液中のがん抑制遺伝子のメチル化を調査することは低侵襲かつ簡便である。そのため、将来的には口腔外科専門医でなくとも誰もが同様にサンプルを採取することができ、理想的な口腔管スクリーニング検査となり得る。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the expression of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1), a cancer-associated antigen, using clinical specimens of oral squamous cell carcinoma (OSCC), and investigated its usefulness as a biomarker. Due to the impact of the pandemic, the number of patient consultations and contact times was limited, resulting in an insufficient number of specimens. We made some changes from the initial plan, and in parallel with the current research, we have also focused on establishing a simpler examination method at the examination stage before starting treatment. We set out to establish a simple test method using gargling fluid, and especially investigated a diagnostic system using a method to detect gene methylation.

研究分野：口腔外科

キーワード：RCAS1　プレシジョンイノムセラピー　うがい液　メチル化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

腫瘍関連抗原 RCAS1 は,近年注目されている PD-1/PD-L1 経路同様に腫瘍免疫の中心的役割を担っている免疫補助シグナル分子の一つである。本研究では未だ検討されていない口腔癌患者における RCAS1 発現の有無やアポトーシス誘導能について検討を行い,口腔癌におけるバイオマーカー及び新規腫瘍免疫療法の標的分子としての有用性について検討を行うことであった。しかし、コロナ禍の影響により、患者の受診回数および接触時間が制限されており、検体採取が不十分な状況となった。

当初の計画から一部変更を行い、治療前の診断方法としてより簡便な検査法を確立させることにも着目し研究を進めてきた。我々は含嗽液による簡便な検査方法の確立に着手し、中でも遺伝子のメチル化を検出する手法について検索を開始した。含嗽液は非侵襲的かつコロナ禍における感染を考慮するとより安全、簡便に採取できることから理想的な試料である。また、DNA メチル化は病変の早期や発症前にその異常を示すことから、口腔癌の早期検出および発癌リスクの評価のマーカーとして有用である。申請者の研究室ではこれまで口腔癌に特異的な異常メチル化を示す遺伝子群や前癌病変の臨床診断の中から悪性群を検出するための異常メチル化群を報告してきた。

２．研究の目的

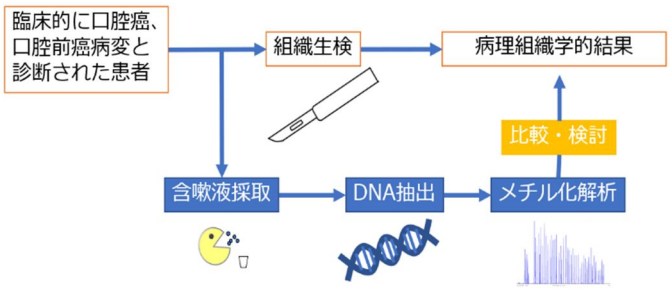
本研究ではコロナ禍での感染の問題を考慮し、より安全に試料を採取できる含嗽液にて口腔癌、口腔前癌病変のメチル化解析を行い診断や組織学的異常の進行度に関連する遺伝子を同定することとした。

３．研究の方法

【対象】

組織生検検査前に口腔癌、口腔前癌病変と臨床的に診断された患者。

【サンプル採取】



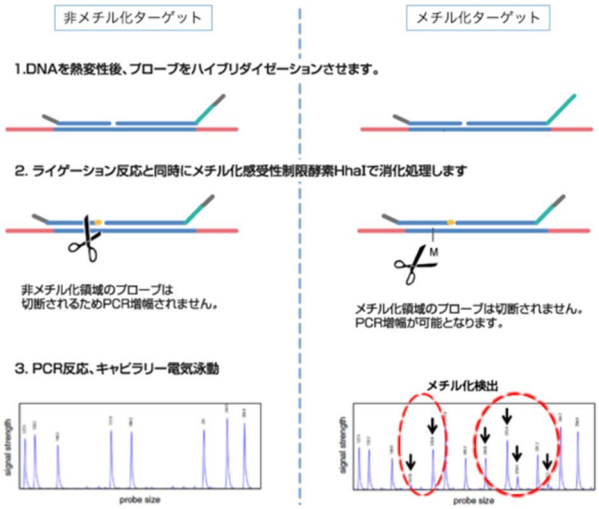
被験者に滅菌精製水 20ml を 30 秒含嗽させ、全量採取した。遠心分離を行いペレットにし、以後の使用まで-80℃にて保存した。

【メチル化解析（MS-MLPA 法)】

市販キットで DNA を抽出後、MS-MLPA キット(MRC-Holland 社)による Methylation Specific-Multiplex Ligation dependent Probe Amplification 法を用いた。

【標的遺伝子】

TP73　CASP8　VHL　RAR β　MLH1　RASSF1　FHIT　APC　ESR1　CDKN2A　CDKN2B　DAPK1　KLLN　PTEN　CD44　GSTP1　ATM　CADM1　CDKN1B　CHFR　BRCA2　CDH13　HIC1　BRCA1　TIMP3



上記 25 種類の癌抑制遺伝子のプローブが含まれるプローブミックスを用い、プローブをハイブリダイズさせたのちに、ライゲーション反応と同時に制限酵素 Hha1 で消化処理さ

せた。この際メチル化領域のプローブは切断されず、PCR 増幅が可能となり、PCR 産物はピークシグナルとして検出される。
制限酵素処理データと未処理データを比較して相対的なメチル化量を、メチル化%として算出した。

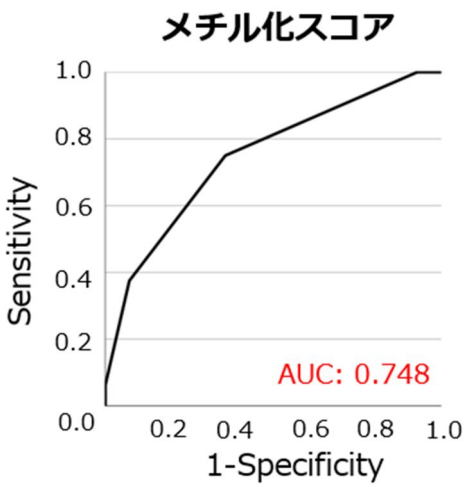
４．研究成果

組織生検前に口腔癌、OPMDs と臨床的に診断しうがい液を採取した 30 例を対象とした。対象症例の病理学的特徴は表に示す通り。

病理診断	症例数(%) N=30
扁平上皮癌	13(43.3)
上皮内癌	3(10)
上皮異型性	6(20)
上皮過形成	2(6.7)
扁平苔癬	6(20)

(1)悪性鑑別目的の診断ツール

申請者らは以前 OPMDs と診断された患者の含嗽液のメチル化を調査し、その中から悪性群を鑑別する本研究と同様のメチル化%を使用した診断システムを構築した。今回は、口腔癌、OPMDs を含めた対照群にそのシステムを適用したところ下図に示すように AUC=0.748 と良好な結果を示した。このことから、この診断システムは早期癌のみでなく、進行癌の診断にも応用可能である可能性が示された。



独自のメチル化スコア	悪性群	非悪性群	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %	*p*-value*	AUC
≥2 (陽性)	4	2	70.6	69.2	70.6	69.2	0.063	**0.748**
<2 (陰性)	2	8						

*Fischer`s exact test

(2)各段階における癌抑制遺伝子のメチル化

25 種類の癌抑制遺伝子のメチル化について病理組織学的異常のグループ（扁平上皮癌、上皮内癌、上皮異型性、上皮過形成、扁平苔癬）に分けて調査した。病理学的異常が進行するにつれてメチル化%が段階的に増加傾向を認めた遺伝子はなかった(下表)。これに関しては各段階におけるサンプル数が少なく、今後新たなサンプルを採取してメチル化解析を進めていく予定である。

各段階における癌抑制遺伝子のメチル化%の平均

癌抑制遺伝子	扁平上皮癌 N=13	上皮内癌 N=3	上皮異型性 N=6	上皮過形成 N=2	扁平苔癬 N=6
VHL	0.9	0	0	0	0.8
TP73	1.2	0.7	0.5	1.5	0.8
CASP8	0.9	2	1.3	0.5	1.3
RARB	1.2	0.3	0.2	0.5	0.3
MLH1	1.4	1.3	0.3	1	0.5
RASSF1	0.5	0	0	0	0
FHIT	0.2	0	0	0	0
APC	1	0.7	0.2	0.5	0.2
ESR1	1.5	2	0.5	2.5	1.2
CDKN2A	0.5	0	0	0.5	0.2
CDKN2B	1.4	0.7	0.8	2	0.7
DAPK1	0.7	0	0	0.5	0
KLLN	0.2	0.7	0	0	0
PTEN	0.1	0.3	0.7	0	0
CD44	1	2.3	0.3	0.5	1.2
GSTP1	1.4	1	0.3	1.5	1
ATM	0.6	0.7	0.5	0.5	0.3
CADM1	1.2	0	0.2	0.5	0.3
CDKN1B	2.2	3	1.2	2.5	2
CHFR	2.3	0.7	1.8	5.5	0
BRCA2	0.6	2.3	0.7	4.5	1.5
CDH13	4.9	6	3	5	3.7
HIC1	0.1	0	0	0.5	0.2
BRCA1	0.5	1	0	1	0.5
TIMP3	1.2	1	0.5	2	0.3

本検査方法の重要な点は非侵襲的、かつ簡便であることである。将来的には一般歯科医院で広く使用されるモニタリング検査として口腔癌の早期発見に役立つことが期待できる。

今後はサンプル数を蓄積し、①病理組織学的進行度ごとのメチル化プロファイルの解析を行い生検や手術の適応を判断する検査システムの構築、②口腔癌術前後のメチル化プロファイルを解析し再発リスクの評価、③治療後のモニタリングツールとして、うがい液のメチル化を調査し実臨床に応用させる予定である。

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

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