

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20807

研究課題名（和文）口腔細菌由来の酪酸による口腔癌の発生や進展に関する機序の解明と新規治療法の創出

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of development and progression of oral cancer by butyric acid derived from oral bacteria and creation of new treatment methods

研究代表者

永尾 優果（Nagao, Yuka）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：80908773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌患者の進行症例と初期症例間の口腔細菌叢において酪酸産生菌である歯周病菌については有意差はなかったものの、進行症例は初期症例に比較して唾液中の酪酸濃度が高くなる傾向があった。また*in vitro*研究において酪酸は口腔癌抑制的に作用する可能性が示唆され、その機序としては、酪酸処理によってヒストンのアセチル化が促進され、エピゲノムの変化が起こることで細胞増殖能や遊走能が抑制された可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の進行症例が初期症例に比較して酪酸濃度が高い傾向にある一方で、両者間の唾液中の酪酸産生菌叢について有意差がみられなかった。本来酪酸産生菌は口腔細菌中のごくわずかの割合を占めるにすぎないことが影響している可能性がある。しかし、酪酸産生菌は嫌気性菌であり、組織の中に侵入する性質もあるため、組織内の菌叢解析を行うと新たな結果が出る可能性もある。菌の特徴を踏まえた上での解析が必要である。また、酪酸は口腔癌抑制的に作用する可能性が確認できた。その詳細な機序についてはさらなる解析が必要であるが、口腔内の酪酸を歯科医療によってコントロールすることで、歯科医療の発展に貢献できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although there was no significant difference in periodontal bacteria, which are butyrate-producing bacteria, in the oral flora between advanced and early stage oral cancer patients, salivary butyric acid concentration tended to be higher in advanced cases than in early stage cases. In addition, *in vitro* studies have suggested that butyric acid may act to suppress oral cancer.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 口腔細菌 酪酸 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の主な治療法として、外科療法、放射線療法、化学療法があり、近年では免疫療法が新たな治療法として注目されている。しかし、これらの治療法が進歩しているにも関わらず、口腔癌の治療成績はほとんど向上していない。(Forastiere et al. *New Engl J Med*, 2003, Gupta et al. *Int J Cancer*, 2009)。その原因としては、口腔癌患者の5年累積生存率は stage , では80%以上と良好な一方、stage , では60%と不良であることが挙げられる。また近年新たに導入された免疫療法は副作用が少ない方法として期待されているが、重篤な副作用により治療の中断をせざるを得ない患者もおり、予後の大幅な改善には至っていない。これらのことより癌の発生や進展に関する機序の解明、それらに対するより侵襲が低い治療法の発見が求められている。近年、腸内細菌の代謝産物である酪酸が着目されており、腸内細菌により産生された酪酸はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害作用を有しておりエピジェネティックな変化を介して様々な病態に関わることが報告されている(Yukihiko Furusawa et al. *Nature*, 2013)。しかし、癌に関しては癌抑制・癌促進作用の両方が報告されており、癌細胞と正常細胞との代謝経路の違いや生体内での酪酸濃度等の点から様々な論議が進められている(Dallas R. Donohoe et al. *Molecular Cell*, 2012)。口腔内も腸内同様に多くの細菌に晒されている環境であり、酪酸産生菌の存在も報告されている。また口腔環境と全身疾患との関連についても報告され始めているが、その機序や口腔細菌由来の酪酸に着目した報告は少ない。口腔酪酸産生菌は歯周病原菌と呼ばれている菌と一致しており、実際に歯周病患者は健常者より唾液中の酪酸濃度が高く、さらにその濃度は唾液中や歯肉溝等、口腔内でも部位によって異なるとの報告から、口腔内の様々な酪酸濃度と全身疾患との関連については興味深い(Biswajit Das et al. *Virology*, 2016, Tonetti M, et al. *J. Periodont. Res*, 1987)。口腔細菌の代謝産物でもある酪酸の口腔癌に対する影響を解明できれば今後の口腔癌治療および歯科医療の発展に大きく貢献する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では口腔細菌由来の酪酸による口腔癌の発生や進展に関する機序を解明し、新規治療法の創出を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔細菌叢の比較

熊本大学病院歯科口腔外科を受診し精査を行った口腔癌患者より唾液を採取し病期分類を行った。病期分類は視診・触診に加え、CT検査、MRI検査、頸部リンパ節超音波検査およびPET-CT検査に基づいて診断し、AJCC第8版のTNM分類に基づいて分類を行った。採取した唾液からDNAを採取し、次世代シーケンス法によって、口腔細菌叢の構成を明らかにした。そして舌癌患者および歯肉癌患者に分類し、T2以下症例を初期癌症例、T3以上の症例を進行癌症例とし、比較検討を行った。

### (2) 口腔内酪酸濃度の比較

(1)の対象患者のうち、唾液を多く採取できた患者を抽出し、ガスクロマトグラフィーにて唾液中の酪酸を含む短鎖脂肪酸濃度を解析し、比較検討を行った。

### (3) 酪酸による癌細胞の特性の変化

口腔癌細胞株を様々な濃度の酪酸で処理し、酪酸による口腔癌細胞特性の変化を明らかにした。

(a) 増殖能についてはWST法を用いて解析を行った。酪酸の濃度に関しては、過去の腸内環境での報告(Dallas R. Donohoe et al. *cell*, 2012, 古澤ら. *腸内細菌学雑誌*, 2017)を参考に決

定した。

(b) (a)にて決定した酪酸濃度のうち、大きな特徴の違いを得た 0.2mM, 2.0mM の濃度の酪酸で細胞を処理して、Wound healing assay にて細胞遊走能への影響を調査した。

(c) (b)と同様の濃度で細胞浸潤能への影響も解析した。CytoSelect 24-well Cell Invasion Assay, Colorimetric(Cell Biolabs, CA, the USA)を使用して Matrigel chamber assay を行った。

#### (4) 酪酸処理によるヒストンアセチル化修飾の変化

酪酸は脱アセチル化阻害作用をもつことが知られている。酪酸処理によるヒストンのアセチル化修飾の変化を検討するために、H3K9ac および H3K27ac 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 口腔細菌叢の比較

各サンプルから検出された菌種数や菌種多様性の指標である Shannon index を 2 群間で比較した。全ての癌患者および舌癌患者、歯肉癌患者において有意な差は認められなかった。また Weighted UniFrac 距離を用いた主座標分析( PCoA: Principal Coordinate Analysis )を用いて、2 群の細菌構成の比較を行った。全患者、歯肉癌患者において有意差は認めず、舌癌患者にのみ有意差を認めた。有意差のあった舌癌患者について菌種レベルでの相対構成比率の比較を行った。複数の菌種間で構成比率に違いがあったものの、酪酸産生能のある菌種には有意な差は認めなかった。

#### (2) 口腔内酪酸濃度の比較

口腔癌患者について唾液中の短鎖脂肪酸濃度について比較検討を行った。その結果、有意差はついていないが、初期癌患者と比較し、進行癌患者の方が唾液中の短鎖脂肪酸濃度が高い傾向にあった。

#### (3) 酪酸による癌細胞の特性の変化

##### (a) 細胞増殖能

口腔癌細胞株を様々な酪酸濃度で処理をすると、1.0mM を超える高濃度の酪酸で処理された細胞は細胞増殖能が低下し、一方それ以下の濃度で処理された場合には細胞増殖能が促進されていた。

##### (b) 細胞遊走能

増殖能解析で酪酸処理により大きな違いを得た 0.2mM、2.0mM の酪酸で処理をした細胞で Wound healing assay を行った結果、2.0mM では遊走が抑制される傾向にあった。

##### (c) 細胞浸潤能

(b)で使用した濃度において Matrigel chamber assay を行った結果、細胞浸潤能については酪酸の処理により明らかな変化は認めなかった。

#### (4) 酪酸処理によるヒストンアセチル化修飾の変化

(3)で使用した 0.2mM、2.0mM の酪酸にて細胞を処理してタンパク質を抽出し H3K9ac および H3K27ac 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった。その結果、酪酸の濃度依存性に H3K9ac および H3K27ac のアセチル化タンパク質の発現は増加していた。

## 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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawaguchi S, Kawahara K, Fujiwara Y, Ohnishi K, Pan C, Yano H, Hirose A, Nagata M, Hirayama M, Sakata J, Nakashima H, Arita H, Yamana K, Gohara S, Nagao Y, Maeshiro M, Iwamoto A, Hirayama M, Yoshida R, Komohara Y, Nakayama H	4. 巻 71
2. 論文標題 Naringenin potentiates anti-tumor immunity against oral cancer by inducing lymph node CD169-positive macrophage activation and cytotoxic T cell infiltration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2127 ~ 2139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03149-w	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 -

1. 著者名 Yamana K, Inoue J, Yoshida R, Sakata J, Nakashima H, Arita H, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Takeshita H, Maeshiro M, Liu R, Matsuoka Y, Hirayama M, Kawahara K, Nagata M, Hirose A, Toya R, Murakami R, Kuwahara Y, Fukumoto M, Nakayama H	4. 巻 10
2. 論文標題 Extracellular vesicles derived from radioresistant oral squamous cell carcinoma cells contribute to the acquisition of radioresistance via the miR 503 3p BAK axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jev2.12169	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 -

1. 著者名 Gohara S, Yoshida R, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nakashima H, Kawaguchi S, Nagao Y, Yamana K, Nagata M, Hirose A, Hiraki A, Nakayama H	4. 巻 15
2. 論文標題 Re-evaluating the clinical significance of serum p53 antibody levels in patients with oral cancer in Japanese clinical practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2372	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 -

1. 著者名 Kawahara K, Nagata M, Yoshida R, Hirose A, Tanaka T, Matsuoka Y, Arita H, Nakashima H, Sakata J, Yamana K, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Hirayama M, Takahashi N, Hirayama M, Nakayama H	4. 巻 28
2. 論文標題 miR-30a attenuates drug sensitivity to 5-FU by modulating cell proliferation possibly by downregulating cyclin E2 in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101114 ~ 101114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101114	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永尾優果, 廣未晃之, 山本達郎, 平山真弓, 中元雅史, 川原健太, 永田将士, 吉田遼司 中山秀樹
2. 発表標題 酪酸によるエピゲノム変化を介した口腔癌の細胞制御機序の解明
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------