

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861719

研究課題名(和文) 質量分析計を用いた口腔がんスクリーニングの実用化

研究課題名(英文) Practical application of oral cancer screening by mass spectrometry

研究代表者

木本 明 (KIMOTO, AKIRA)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：30597167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会に伴い、悪性腫瘍である口腔がんの罹患率は増加傾向です。口腔は、咀嚼、嚥下、構音、審美性など機能的・形態的に大きな役割を担っており、口腔がんによる影響はQOL(生活の質)に直結します。そのため、早期発見・早期治療がQOLを保つために重要になってきます。

本研究では、生体に存在する低分子代謝物を包括的に捉えるメタボローム解析という手法を用いて、口腔がんの新たなスクリーニング法の開発を試みました。がん細胞は、その異常増殖のため、代謝活動が活発化しており、その変動をみることが出来るメタボローム解析が有用であると考えました。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer is one of the most common cancer. There are several types of oral cancers, but around 90% are squamous cell carcinoma. It is usually painless for a considerable length of time and can spread to the lymph nodes. It is important to detect oral cancer at an early stage. There are no serum or plasma biomarkers that are highly-sensitive and able to detect the early stage oral cancer. SCC-antigen, typical tumor marker of oral cancer, is low sensitivity and can't detect early stage cancer. In this study, I subjected oral cancer patients' serum samples to gas chromatography(GC/MS)-based metabolomic analysis. Their preoperative serum metabolite levels were compared with those of healthy volunteers. In addition, pre- and postoperative serum metabolite levels were also compared. As a result of the analysis, seven biomarker candidates were detected. GC/MS-based metabolomic analysis is a promising method for detecting early-stage oral cancer.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん メタボローム解析 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は現在日本人の死亡原因の第1位となっており、全体の1/3を占める。口腔がんは悪性腫瘍全体における比率こそ低いものの、日本の高齢化社会到来に伴い罹患率も増加している。欧米先進国では、口腔がんの罹患増加率は日本と同様の傾向にあるものの、国を挙げてのがん対策が功を奏してその死亡率は減少傾向を示している。日本でも「第3次対がん10カ年総合戦略」に代表されるように、がんの制圧は国の重要政策の一つであり、がんの早期発見に役立つ画期的な極めて早期の診断法開発が強く求められている。

口腔は消化器系の入り口として、喫煙、飲酒や食物などによる化学的・物理的刺激に暴露され、発がんに関わる特殊な環境と危険因子が複数存在することが特徴である。また、口腔がんは傷や口内炎などの症状と認識して放置され、病変が進行することも少なくない。さらには、口腔がんは頸部リンパ節に転移することが多く、転移リンパ節の有無がステージ分類や予後に大きく関わってくるため早期発見が重要になってくる。

近年、CT、MRI、PETなどの画像診断技術が急速に進歩したことにより、早期診断が可能な症例も一部には認められるが、これらを健康診断(スクリーニング検査)として全国民に実施することは、人材面・コスト面から考慮して非現実的である。現在、口腔がんのスクリーニング法としては、歯科医院やがん健診における視診や触診が中心であり、血中内の腫瘍マーカー検査においては感度が低く、スクリーニングには適していないのが現状である。これらの理由により、初診時にすでに進行がんである患者の割合も非常に高い。そこで、これらの問題点を克服した、簡便で低コストかつ効率よく、口腔がんをスクリーニングする手法の開発を目指す。

生体内には、糖、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、核酸など多くの低分子代謝物が数千種類存在する。がん細胞は、その異常増殖のため、代謝活動が活発化しており、この働きによって変動する代謝物を包括的に捉えるメタボローム解析が、口腔がんのスクリーニング手法への開発につながると考える。低分子代謝物総体を捉えるメタボローム解析は、酵素の変動が生じて初めて変動し、タンパク質の活性にも依存することから、生体の表現形に近い変動を示すこと、種差がないため小動物実験系の結果をヒト臨床研究に外挿しやすいなどの利点を持つ。実際に、ヒトの前立腺がんのバイオマーカー候補(Sreekumar A. et al., Nature 2009)が明らかにされた(Wang Z. et al., Nature 2011)。

これまでに研究代表者は、口腔がんの実用的スクリーニング手法の確立を目指し、GC/MS(ガスクロマトグラフィー質量分析)による血清メタボローム解析を実施した。現在、GC/MSを用いることで、ヒト血清検体

から糖・糖アルコール・有機酸・アミノ酸・脂肪酸など約100種類の水溶性代謝物の定性・定量を行うことが可能である。

2. 研究の目的

口腔がん血清のマルチターゲット代謝物プロファイリングを行い、口腔がんのバイオマーカー候補代謝物を明らかにする。まず、口腔がん担がんモデルマウスと口腔がんのヒト臨床検体を用いて、メタボローム解析を実施する。

また、口腔がん患者の血液をGC/MS(ガスクロマトグラフ質量分析計)にて測定し、信頼性の高いバイオマーカーの選定を試みる。さらにバイオマーカー候補物質の感度を検討し、口腔がんのスクリーニング手法を確立する。

3. 研究の方法

担がんマウスモデルを用いた血液に含まれる代謝物の相関解析

研究代表者の所属する歯科口腔外科研究室では既に、ヒト由来口腔がん細胞株(HSC-3、OSC-19細胞)などを保有している。ヌードマウスに口腔がん細胞を移植・定着させることで担がんマウスを作製し、血液中の代謝物の関連性を明確にする。がん細胞の代謝は大幅に変動し、血液中からも盛んにグルコースや脂肪酸やグルタミンなどの栄養素を取り込み、脂質、核酸、タンパク合成を行い、様々な中間産物が血液中に排出されることが予想される。あらかじめ血液中に含まれる代謝物の関連性を明確にしておくことは、次に計画するヒト臨床検体を用いた実験の際に非常に重要な情報となる。

具体的な実験操作は、ヌードマウス体内にHSC-3・OSC-19細胞を移植・定着させ、移植開始から1週間毎に腫瘍径を計測し、血漿を回収する。ヒト口腔がん由来細胞株を移植していないヌードマウスからも同様に血漿を回収する。移植1か月後には、非移植群と移植群の血漿データの比較検証を行う。測定にはGC/MSを用い、水溶性代謝物を分析対象とする。糖・糖アルコール・有機酸・アミノ酸・脂肪酸を対象とする。

臨床検体の代謝プロファイリング結果とマウスモデルで得られた知見の検証比較

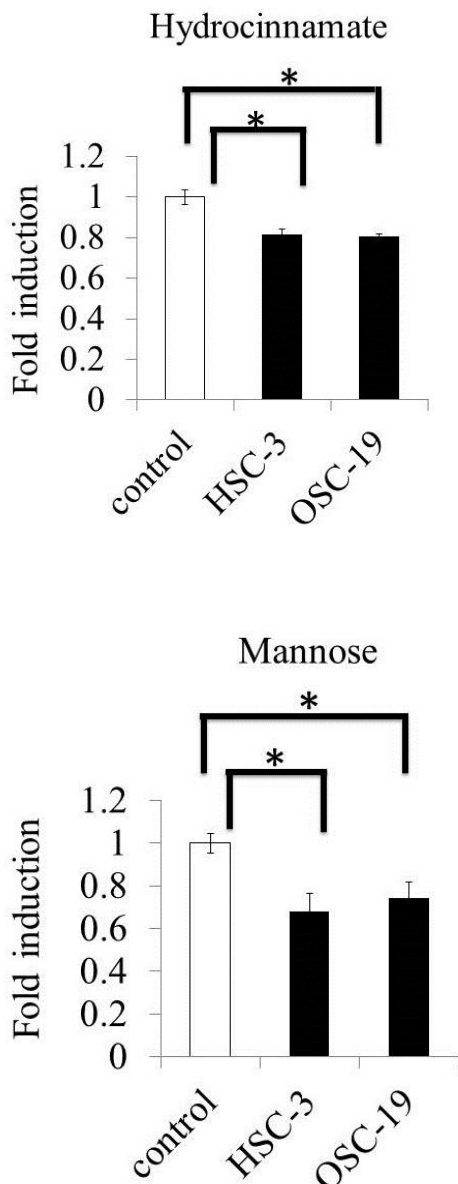
口腔がん患者の術前、術後の血液と、健常者の血液をGC/MSにて測定し比較する。また、それにより得られた結果を、担癌マウスの実験で得られた結果と比較した。

4. 研究成果

担がんマウスモデルを用いた血液に含まれる代謝物の相関解析

口腔がん由来細胞株(HSC-3、OSC-19)をヌードマウスに移植し、担がんマウスを作製。10×10mm以上の腫瘍が形成されるまで飼育し、その時点で採血を行った。その血液をGC/MSで測定し、移植していないコントロール群と

比較検討を行った。GC/MSにて約100種類の水溶性代謝物の同定が可能であり、コントロール群と比較した結果、HSC-19 担がんマウスでは、4種類(Asparagine, 1-Methyl Histidine, Ornithine, 1,5-Anhydro-D-glucitol)でコントロール群より有意に高い値を示した。また、6種類(Ketoisoleucine, Hydrocinnamate, Fructose, Allose, Mannose, a-Sorbopyranose)でコントロール群より有意に低い値を示した。OS C-19では2種類(Glycerol, Nonanoic acid)でコントロール群より有意に高い値を示した。また、8種類(Ketovaline, Hydrocinnamate, Xylose, O-Phosphoethanolamine, Mannose, Allose, Uric acid, Cysteine+Cystine)でコントロール群より有意に低い値を示した。それらに共通する代謝物は、HydrocinnamateとMannoseであった。



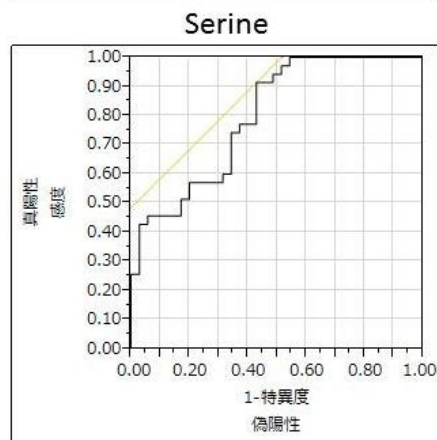
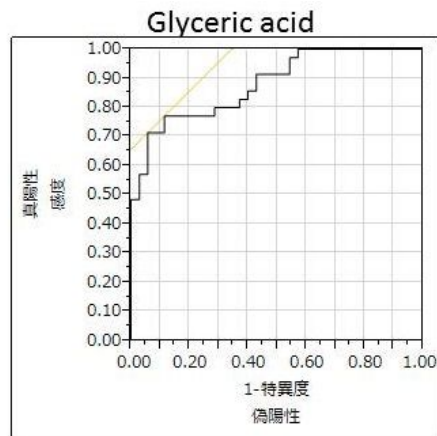
臨床検体の代謝プロファイリング結果とマウスモデルで得られた知見の検証比較

口腔がんの手術を行い、扁平上皮がんと診断された患者を対象とし、その術前術後の血清を用いた。コントロール群としては、年齢性別に有意差のない健常人の血清を用いた。その後、それぞれをトレーニングセットとバリデーションセットに分け、バイオマーカー候補の選定を行った後に、その検証を実施した。

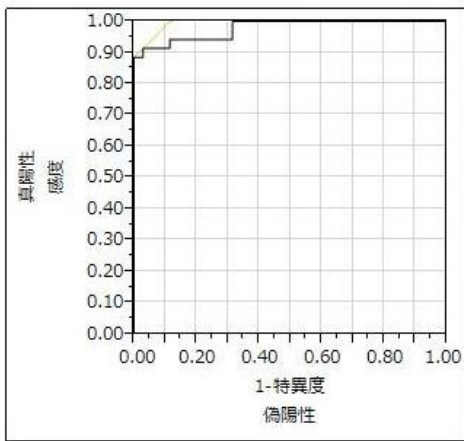
トレーニングセットにより、13種類の有意に変動する代謝物を選定した。次に、これらの13種類に関してバリデーションセットにて検証を行った。その結果、Glyceric acid, Serine, Lauric acid, N-Acetyl-L-Aspartic acid, Asparagine, Ornithine, Heptadecanoateの計7種類のバイオマーカー候補物質を選定することができた。これらは、担がんマウスモデルで得られた2種類(Hydrocinnamate, Mannose)の代謝物とは共通せず、ヒト臨床検体とマウス検体の相関は認められなかった。

次に、ヒト臨床検体で得られた7種類の代謝物に関して、ROC曲線を描き、それぞれの感度を比較した。

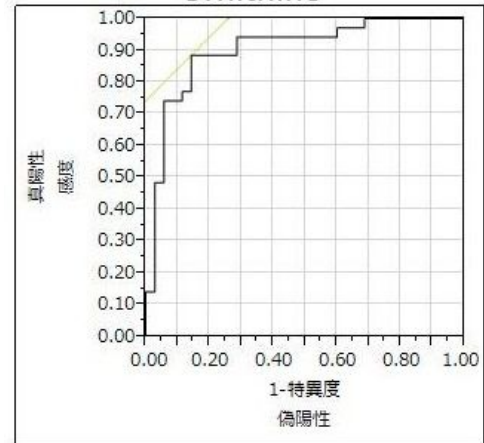
・7種類のバイオマーカー候補物質のROC曲線を下図に示す



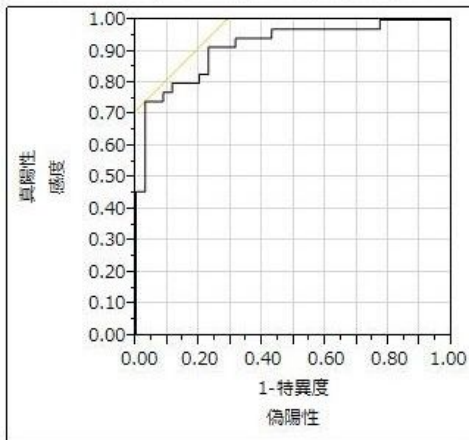
Lauric acid



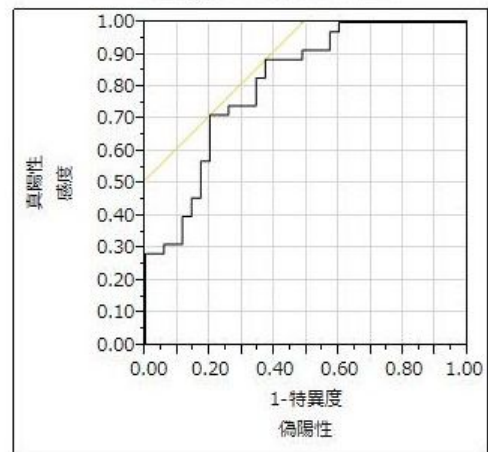
Ornithine



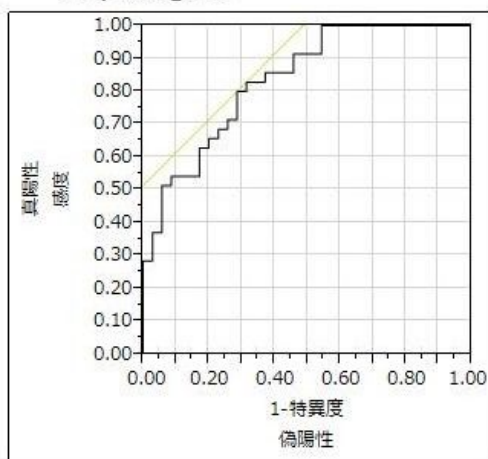
N-Acetyl-L-Aspartic acid_1



Heptadecanoate



Asparagine



その結果、それぞれの代謝物の感度は、71.4～91.4%と高い値を示した。また、口腔がんステージ ~ の早期がんに関り検討した結果を下表に示す。

Compounds	sensitivity
Glyceric acid	77.7
Serine (3TMS)	38.8
Lauric acid	83.3
N-acetyl-L-aspartic acid	66.6
Asparagine	50.0
Ornithine	88.8
Heptadecanoate	66.6

早期がんに限定すると、感度は下がるものの、従来のがん腫瘍マーカーである SCC 抗原より高い値を示した。

我々の研究成果は、血液を用いたメタボローム解析が口腔がんの新たなスクリーニング法としてなりうる可能性を示した。今後は、さらに実用化に向けて研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Kimoto A, Suzuki H, Yamashita J, Takeuchi J, Matsumoto K, Enomoto Y, Komori T. A Retrospective Evaluation of Partial Glossectomy for Early Tongue Cancer Using a Carbon Dioxide Laser. 査読有, Photomed Laser Surg. 2017 Mar 30. doi: 10.1089/pho.2016.4160.

〔学会発表〕(計1件)

榎本由依、木本明、鰐淵聡、鈴木泰明、古森孝英、Search for oral cancer related biomarker by metabolomics of plasma in tumor-bearing nude mice 日本口腔外科学会、2015.10.16～10.18、名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木本 明(Kimoto, Akira)
東京医科大学・医学部・助教

研究者番号： 30597167

研究者番号：

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()