

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：97701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10362

研究課題名（和文）うがい液試料の統合的マルチオミクス解析に基づく口腔癌プレジジョン治療の実現

研究課題名（英文）Oral Cancer Precision Therapy Based on Integrated Multi-Omics Analysis of Gargle Samples

研究代表者

浜田 倫史（HAMADA, Tomofumi）

社会医療法人博愛会（臨床研究センター）・歯科口腔外科・部長

研究者番号：00444894

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）：本研究は口腔癌および正常粘膜の統合的遺伝情報データベースを構築したのち、遺伝情報に基づいた口腔癌の個別プレジジョン治療を実現することを目的とした。まず約1000名の口腔健常者からうがい液を採取し、健常日本人のエピゲノムプロファイリングを報告した。次に口腔癌、その前癌病変および口腔の炎症性疾患の症例のうがい液を用いて解析を行ったところ、炎症疾患や口腔前癌病変などを含む口腔癌疑い症例群から口腔癌症例を鑑別可能な異常DNAメチル化遺伝子群およびシェーグレン症候群に特異的に発現するmicroRNA群を同定し、それぞれ論文にて報告し、既存の診断法の欠点をカバーし得る新規診断法として知的財産化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がん治療においてプレジジョン治療の概念が急速に普及している。その中核は、常に変化する腫瘍の性状をリアルタイムに把握する体液を用いたリキッドバイオプシーである。口腔癌においても液体生検による最適化治療の確立は急務であるが、有用なマーカーは見出されておらず、その基盤となる統合的遺伝情報データベースも存在しない。このような背景のなか、本研究は健常日本人の大規模なエピゲノムプロファイリングを初めて報告し、今後の口腔癌研究の基礎となるデータベースの構築に寄与した。また新規バイオマーカーを同定し、既存の診断法の欠点をカバーし得る新規診断法を構築したことで、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish an integrated genetic information database for oral cancer and normal mucosa, and then to realize individualized prescribing treatment of oral cancer based on the genetic information. First, we collected gargle fluid from approximately 1000 healthy oral healthy subjects and reported epigenomic profiling of healthy Japanese. Next, we analyzed gargle fluid from patients with oral cancer, its precancerous lesions, and inflammatory diseases of the oral cavity, and identified (1) a group of abnormal DNA methylation genes that can differentiate oral cancer cases from a group of suspected oral cancer cases including inflammatory diseases and oral precancerous lesions and (2) a group of microRNAs that are specifically expressed in Sjogren's syndrome. The results were reported in a paper and intellectual property was obtained as a new diagnostic method that can cover the shortcomings of existing diagnostic methods.

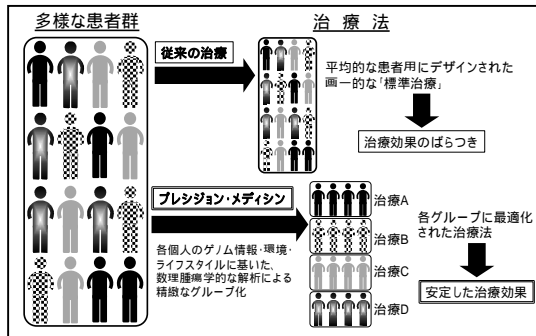
研究分野：口腔外科学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 口腔癌 うがい液 リキッドバイオプシー シェーグレン症候群

1. 研究開始当初の背景

【わが国における口腔癌プレジジョン治療の位置づけ】

癌は高度な多様性を有し、同種の癌でも遺伝子異常はお互いに異なる。これまでの癌治療は、平均的な患者用にデザインされた「標準治療」が画一的に用いられてきたが、がんプレジジョン治療(最適治療)では、同一疾患の患者群を遺伝情報・環境などに基づいてグループ化し、各グループにその時点での最適な治療法を選択する(下図)

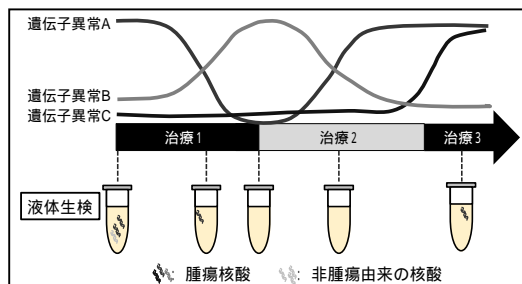


2018年3月に公表された第3期がん対策推進基本計画においても、ゲノム・エピゲノム情報を統合したデータベースの構築、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析に基づく癌ゲノム医療を推進し、個人に最適化されたがん医療を実現することが重点目標とされている。

口腔癌領域においては、遺伝情報に基づき個別化されるプレジジョン治療は実用化に至っていない。口腔癌は代表的な希少がんの一つでありそのエビデンスの蓄積は少なく、第3期がん対策推進基本計画においてもこれらの希少がんのゲノム医療やプレジジョン治療開発の必要性が強く指摘されている。

【非侵襲的な液体生検によるリアルタイムモニタリング】

癌は常に動的に変化しており、その遺伝子異常もあらゆる段階で動的に変化していく。よって最適な治療法を選択するには、非侵襲的に採取できる体液サンプルを使って腫瘍をリアルタイムに分子病理学的にプロファイリングすること(=液体生検)が必要である(下図)。



液体生検の鍵を握るのは、診断試料とバイオマーカーである。

診断試料としては、非侵襲的かつ簡便に採取でき患者負担が軽減されることから、唾液やうがい液が注目されている。われわれはこれまでの研究でうがい液からの口腔癌検査法を確立しており、検査試料としてのうがい液の有用性はすでに報告している。

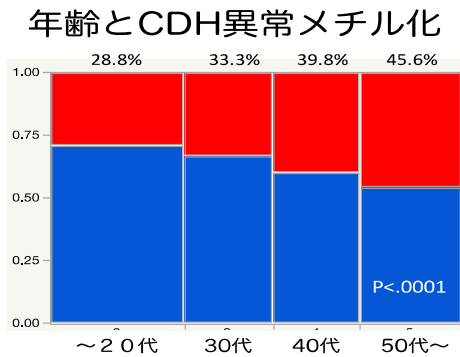
バイオマーカーとしては、DNAメチル化とマイクロRNA(miRNA)を研究の中心に据える。DNAメチル化の異常に代表されるエピゲノム異常は発癌過程の初期から細胞に蓄積され、癌抑制遺伝子をサイレンシングすることで細胞の癌化を促進する。また、miRNAの発現異常は多くの悪性腫瘍で報告されている。われわれはこれまでの研究において、口腔癌に特異的なエピゲノム異常やmiRNA群を同定しており、これらを中心として口腔癌の動的なモニタリングを行い、口腔癌プレジジョン治療の確立に寄与したい。

2. 研究の目的

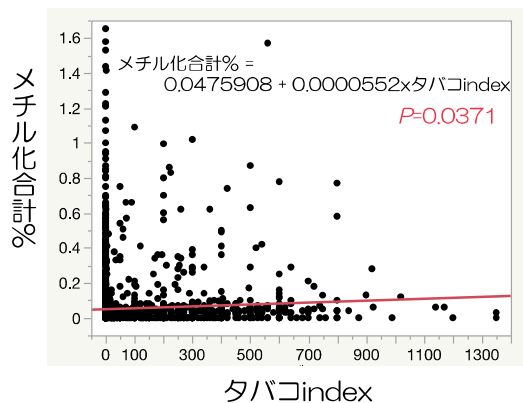
本研究は、口腔癌症例群および健常者から採取するうがい液検体を用いてゲノム・エピゲノム・マイクロRNAなどを統合的にマルチオミクス解析し、口腔癌および正常口腔組織の統合的ゲノム・エピゲノム情報をデータベース化し、臨床病理学的事項や予後との関連性を検討することでそれに基づいた口腔癌の個別プレジジョン治療を構築することを目的とする。

3. 研究成果

まずわれわれは 地域民間企業と共同研究契約を締結し、同意を得られた従業員に対し問診票で既往歴、口腔症状や生活習慣を調査するとともに、うがい液を採取した。うがい液から細胞ペレットを作成後に核酸を抽出し、MS-MLPA法にて26種の癌抑制遺伝子のDNAメチル化解析を行った。クオリティコントロール後、使用可能であった1134人のデータを研究の対象とした。その結果、被験者の約44%にはメチル化異常はみられなかったが、約56%に1種類以上のメチル化異常がみられた。加齢に伴いMLH1・CDKN2A・CDH・TIMP3のメチル化は有意に増加した。また、メチル化遺伝子の合計個数と合計メチル化%も増加し、加齢と異常メチル化の関連性が示された。また、喫煙に伴いAPC・CDKN2A・CDHのメチル化、およびメチル化遺伝子の合計個数と合計メチル化%も増加した。



また、タバコindexとメチル化合計%は正の相関関係にあった($p=0.037$)。以上により、口腔粘膜細胞の癌関連遺伝子の異常メチル化は、加齢・喫煙歴および喫煙量に伴い増加することが示唆された。また、加齢および喫煙はエピゲノム異常(DNAメチル化異常)を惹起・蓄積することで、口腔がんリスクの増大をきたすことが示唆された。



同時に口腔癌、その前癌病変および癌ではない口腔の炎症性疾患の症例のうがい液も収集を終了し、これらの試料を用いてDNAメチル化およびmicroRNAの解析を行ったところ、炎症疾患や口腔前癌病変などを含む口腔癌疑い症例群から口腔癌症例を鑑別しうる異常DNAメチル化遺伝子群、シェーグレン症候群に特異的に発現するmicroRNA群を同定し、それぞれ学会発表し論文にて報告した。またこれらをバイオマーカーとして用いた新規口腔癌検出システムとシェーグレン症候群診断システムを構築し、既存の診断法の欠点をカバーし得る新規診断法として知的財産化(国内特許2件)した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計5件)

Nakamura K, Hiyake N, Hamada T, Yokoyama S, Mori K, Yamashiro K, Beppu M, Sagara Y, Sagara Y and Tsuyoshi Sugiura. Circulating microRNA Panel as a Potential Novel Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis. *Cancers* 2021, 13, 449.

Nakamura M, Hamada T, Tanaka A, Nishi K, Kume K, Goto Y, Beppu M, Hijioka H, Higashi Y, Tabata H, Mori K, Mishima Y, Uchino Y, Yamashiro K, Matsumura Y, Makizako H, Kubozono T, Tabira T, Takenaka T, Ohishi M and Sugiura T. Association of Oral Hypofunction with Frailty, Sarcopenia, and Mild Cognitive Impairment: A Cross-Sectional Study of Community-Dwelling Japanese Older Adults *J. Clin. Med.* 2021, 10, 1626.

Keitaro Nishi, Hiroaki Kanouchi, Akihiko Tanaka, Maya Nakamura, Tomofumi Hamada, et.al. Relationship between Oral Hypofunction, and Protein Intake: A Cross-Sectional Study in Local Community-Dwelling Adults. *Nutrients* . 13.4377 2021

Mori Kazuki, Tomofumi Hamada, Mahiro Beppu, Hiroki Tsuchihashi, Yuichi Goto, Kenichi Kume, Hiroshi Hijioka, Keitaro Nishi, Yumiko Mishima, Tsuyoshi Sugiura Detecting Early-Stage Oral Cancer from Clinically Diagnosed Oral Potentially Malignant Disorders by DNA Methylation Profile *Cancers* 26.2646. 2022

Kouta Yamashiro, Tomofumi Hamada, Kazuki Mori, Keitaro Nishi, Maya Nakamura, Mahiro Beppu, Akihiko Tanaka, Hiroshi Hijioka, Yoshiaki Kamikawa, Tsuyoshi Sugiura. Exosome-Derived microRNAs from Mouthrinse Have the Potential to Be Novel Biomarkers for Sjögren Syndrome. *Journal of Personalized Medicine* 12.1483.(2022)

(学会発表)(計9件)

森和樹、瀧田倫史、杉浦剛. 新規血清microRNAを用いた口腔扁平上皮癌診断アルゴリズムの構築 第73回 日本口腔科学会学術集会. 2019年

Koudai Nakamura, Tomofumi Hamada, Kazuki Mori, Yumiko Mishima, Kouta Yamashiro, Tsuyoshi Sugiura. 口腔扁平上皮癌に特異的な新規血清microRNA: 早期発見への有用性の検討 第78回 日本癌学会. 2019年.

浜田倫史、森和樹、有村麻弥、山城康太、三島優美子、奥田瑛二、西慶太郎、田畑博章、中村康大、杉浦剛 うがい液を用いたDNAメチル化検出による 口腔粘膜のエピゲノムプロファイリング. 第73回 日本口腔科学会学術集会 (2019)

K森和樹、瀧田倫史、杉浦剛. 口腔前癌病変の臨床診断患者から早期癌を検出する非侵襲的検査法の検討. 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会. 2021.

山城康太、濱田倫史、田中昭彦、杉浦剛.うがい液中エクソソーム由来miRNAの検出によるシェーグレン症候群の非侵襲的な新規検査法 第75回 NPO法人日本口腔科学会学術集会. 2021年

森和樹、杉浦剛、濱田倫史、別府真広. 口腔潜在的悪性疾患(OPMD)の臨床診断患者から早期癌を検出する含嗽液を用いた非侵襲的検査法の検討. 第80回日本癌学会学術総会. (2021)

濱田倫史、下田平貴子、下園香菜、川畑麻優、小峰歩美、太良哲彦. 当院(特定領域がん診療連携拠点病院)における歯科口腔外科開設後の周術期口腔機能管理の現状. 第19回日本口腔ケア学会総会・学術大会 (2022)

大迫貴子、井手上華鈴、下園香菜、小林加奈、原山里穂、下田平貴子、濱田倫史. 乳がん化学療法中の口腔粘膜炎対策における液体包帯の有用性の検討. 日本がん口腔支持療法学会 8回学術大会 (2022)

下園香菜、下田平貴子、大迫貴子、井手上華鈴、小林加奈、原山里穂、濱田倫史 術後乳がん症例における上肢機能障害の出現と電動歯ブラシによる歯肉炎予防効果 日本がん口腔支持療法学会 8回学術大会 2022年

(産業財産権)

出願状況(計2件)

名称:口腔癌検出装置、情報取得方法、プログラム及び口腔癌検出キット

発明者:森和樹、濱田倫史、杉浦剛

権利者:鹿児島大学

番号:特願2021-029431

出願年月日:2021年

国内外の別:国内

名称:シェーグレン症候群検査装置、情報取得方法、プログラム及びシェーグレン症候群検査 キット

発明者:山城康太、濱田倫史、杉浦剛

権利者:鹿児島大学

番号:特願2021-024181

出願年月日:2021年9月1日

国内外の別:国内

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Keitaro Nishi, Hiroaki Kanouchi, Akihiko Tanaka, Maya Nakamura, Tomofumi Hamada, et.al | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Relationship between Oral Hypofunction, and Protein Intake: A Cross-Sectional Study in Local Community-Dwelling Adults | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients . | 6. 最初と最後の頁 4377 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13124377. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Maya Nakamura, Tomofumi Hamada, Akihiko Tanaka, et.al. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Association of Oral Hypofunction with Frailty, Sarcopenia, and Mild Cognitive Impairment: A Cross-Sectional Study of Community-Dwelling Japanese Older Adults | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine | 6. 最初と最後の頁 1626 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10081626. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Kodai Nakamura, Naomi Hiyake, Tomofumi Hamada, Seiya Yokoyama, Kazuki Mori, Kouta Yamashiro, Mahiro Beppu, Yasuaki Sagara, Yoshiaki Sagara, Tsuyoshi Sugiura | 4. 巻 13(3) |
| 2. 論文標題 Circulating microRNA Panel as a Potential Novel Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 449 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13030449 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 山城康太、濱田倫史、田中昭彦、杉浦剛 |
| 2. 発表標題 うがい液中エクソソーム由来miRNAの検出によるシェーグレン症候群の非侵襲的な新規検査法 |
| 3. 学会等名 第75回 NPO法人日本口腔科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森和樹、杉浦剛、瀧田倫史、別府真広 |
| 2. 発表標題 口腔潜在的悪性疾患（OPMD）の臨床診断患者から早期癌を検出する含嗽液を用いた非侵襲的検査法の検討 |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森和樹、瀧田倫史、杉浦剛 |
| 2. 発表標題 口腔前癌病変の臨床診断患者から早期癌を検出する非侵襲的検査法の検討 |
| 3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山城康太、瀧田倫史、田中昭彦、杉浦剛 |
| 2. 発表標題 うがい液中エクソソーム由来miRNAの検出によるシェーグレン症候群の非侵襲的な新規検査法 |
| 3. 学会等名 第13回鹿児島大学歯系研究発表会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 森和樹、瀧田倫史、杉浦剛 |
| 2. 発表標題 口腔癌発癌リスクを評価する非侵襲的検診システムの構築 |
| 3. 学会等名 第13回鹿児島大学歯系研究発表会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村康大、浜田倫史、三島優美子、森和樹、杉浦剛 |
| 2. 発表標題 新規血清microRNAを用いた口腔扁平上皮癌診断アルゴリズムの構築 |
| 3. 学会等名 第73回 日本口腔科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koudai Nakamura、 Tomofumi Hamada、 Kazuki Mori、 Yumiko Mishima、 Kouta Yamashiro、 Tsuyoshi Sugiura |
| 2. 発表標題 口腔扁平上皮癌に特異的な新規血清microRNA: 早期発見への有用性の検討 |
| 3. 学会等名 第78回 日本癌学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浜田倫史、森和樹、有村麻弥、山城康太、三島優美子、 奥田瑛二、西慶太郎、田畑博章、中村康大、杉浦剛 |
| 2. 発表標題 うがい液を用いたDNAメチル化検出による 口腔粘膜のエピゲノムプロファイリング |
| 3. 学会等名 第73回 日本口腔科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|--|---------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 口腔癌検出装置、情報取得方法、プログラム及び口腔癌検出キット | 発明者 森和樹、濱田倫史、杉浦剛 | 権利者 鹿児島大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-029431 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|--|----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 シェーグレン症候群検査装置、情報取得方法、プログラム及びシェーグレン症候群検査キット | 発明者 山城康太、濱田倫史、杉浦剛 | 権利者 鹿児島大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-024181 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 | 谷本 昭英 (TANIMOTO Akihide) (10217151) | 鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701) | |
| 研究分担者 | 横山 勢也 (YOKOYAMA Seiya) (20569941) | 鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701) | |
| 研究分担者 | 杉浦 剛 (SUGIURA Tsuyoshi) (40322292) | 鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701) | |
| 研究分担者 | 中村 利明 (NAKAMURA Toshiaki) (60381183) | 鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701) | |
| 研究分担者 | 山田 宗茂 (YAMADA Norishige) (60625242) | 京都大学・医学研究科・特定研究員 (14301) | |
| 研究分担者 | 中村 康大 (NAKAMURA Kodai) (90783506) | 鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701) | |

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