

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861726

研究課題名(和文)メタボローム解析による唾液中の新規口腔癌診断マーカーの探索

研究課題名(英文)Detection of salivary novel biomarkers for diagnosis of oral cancer by metabolomics analysis

研究代表者

岩本 和樹 (Iwamoto, Kazuki)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90723833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：唾液のメタボローム解析を用いて口腔扁平上皮癌(OSCC)患者に特異的な代謝産物の探索を試みた。唾液サンプルはOSCC患者70名、健常者28名より採取した。代謝産物の網羅的探索はキャピラリー電気泳動質量分析法で行った。その結果、OSCC患者と健常者の間でAUC0.5以上だった代謝産物は27種類であった。そのうちブタノエートのAUCが最も高く(0.6428)、OSCC患者において健常者に比べ統計学的有意に発現していた。さらに複数の代謝産物を組み合わせて解析することでOSCCの診断精度が向上した。以上の結果より唾液のメタボローム解析は、OSCC患者に有用な診断ツールになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have attempted to estimate the capability of metabolomics approach for detection of oral squamous cell carcinoma (OSCC) using saliva from patients. Saliva samples were obtained from 70 OSCC patients and 28 healthy adult volunteers. Capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry was employed for comprehensive analysis of metabolites. The area under the curve (AUC) more than 0.50 between OSCC patients and healthy volunteers were observed in 27 metabolites. Butanoate showed the highest AUC (0.6428) and statistically significant difference for the patients with OSCC compared with healthy volunteers. Moreover analysis for multiple metabolites improved diagnostic accuracy more than for a single metabolite. These results suggested that OSCC specific salivary metabolic profiles may be a useful diagnostic tool for the patients with OSCC.

研究分野：口腔癌の新規診断および治療法の開発

キーワード：口腔癌 メタボローム解析 唾液

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

癌における診断バイオマーカーによる研究は以前から盛んに行われており、現在臨床応用されている血中の腫瘍マーカーで単独で十分に信頼できるものは前立腺癌のスクリーニング検査に用いられている Prostate Specific Antigen (PSA) のみである。しかしながら、血液を用いた腫瘍マーカー測定で早期癌を発見および診断することは困難であるのが現状である。種々の癌において簡易な検査で早期診断できる新規バイオマーカーの同定が、癌の早期発見そして早期治療による治療成績向上に必要不可欠で、今後の最重要課題である。

唾液は、以前からう蝕活動性試験や歯周病検査といった歯科検査で検体として用いられてきた。唾液中にはタンパク質、核酸、代謝産物など多種多様な分子が含まれており、それらが全身的な病態や疾患の診断バイオマーカーとなる可能性を十分秘めている。さらに、唾液は患者から全く無侵襲かつ簡便に採取できる検体であり、疾患の究極の非侵襲診断材料である。また、口腔癌は常に唾液にさらされており、口腔癌由来のタンパク質、核酸、代謝産物などの様々な分子が唾液中に直接混入するため、口腔癌の新規バイオマーカー探索のための検体として唾液は最適であると考えられる。実際に、われわれはこれまでに唾液中に存在する口腔癌患者特有の microRNA を同定し、これらが口腔癌の早期発見や発癌および再発リスクの評価に有用となる可能性を示してきた。以上より、唾液を対象とした検査法の開発は口腔癌診療に極めて有用となり、しいては口腔癌の治療成績向上につながると期待するところである。

癌細胞では、正常細胞に比べて、タンパク質や酵素の発現異常による代謝機構の変動が起こっており、癌細胞特有の代謝パターンへと変化し、それが体液中にも反映されることから、唾液中に存在する全代謝産物(メタボローム)を調べることで、口腔癌の新規バイオマーカー候補が同定できるのではないかと考えている。本研究の研究協力者である慶応義塾大学先端生命科学研究所の杉本らのグループは、カリフォルニア大学ロサンゼルス校との共同研究で米国人の唾液をメタボローム解析し口腔癌、乳癌、膵臓癌の診断に有用な代謝物を 57 種類特定し、これら代謝物のプロファイルからどの病態も極めて高い精度で分離可能であると報告している (Sugimoto et al. *Metabolomics* 6: 78-95, 2010)。したがって、米国人のみならず日本人の口腔癌患者においても唾液から診断に有用な既知および新規の代謝産物が同定される可能性は極めて高い。このような唾液成分のメタボローム解析は、口腔癌の新規バイオマーカーの探索に極めて有用である。

## 2. 研究の目的

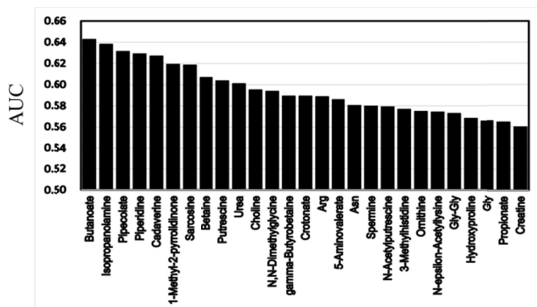
口腔癌は直視直達可能な部位に生じることが早期の場合は診断に苦慮する場合も少なくなく、確定診断を得るためには生検を必要とする。特に、紅板症、白板症、扁平苔癬などの前癌病変と早期扁平上皮癌の鑑別は重要であり、患者の生命予後を大きく左右する。そこで、われわれは健常者、前癌病変および口腔癌を有する患者の唾液を用いてメタボローム解析(網羅的全代謝産物解析)を行い、前癌病変および口腔癌患者の唾液において特異的に存在量が変動する代謝産物を同定し、口腔癌の鑑別および早期発見のための非侵襲的検査の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

口腔粘膜前癌病変を有する患者、口腔癌患者、健常者それぞれから採取した唾液を用いてメタボローム解析を行い、口腔癌を見分けることができる代謝産物の探索および同定を行う。得られた唾液検体を連結可能匿名化し、慶応義塾大学先端生命科学研究所に送付する。同所にて CE-TOFMS を用いてメタボローム解析を行う。解析結果と病態および臨床病理組織学的因子との関連性を検討し、口腔癌と前癌病変の鑑別、口腔癌の予後予測、口腔癌の発症リスク評価に有用となる唾液中の新規バイオマーカーを同定する。さらに、同定したバイオマーカーの診断精度および検出に要するコストを評価し、唾液検体を用いた口腔癌のスクリーニング検査の実用性について検討する。

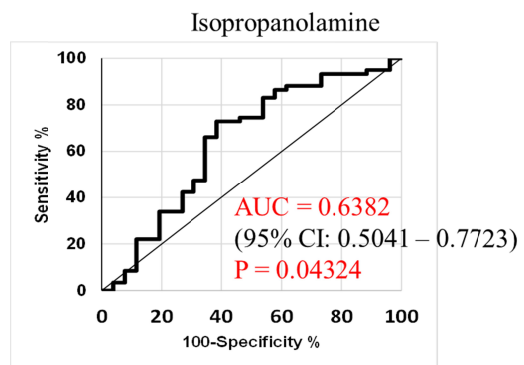
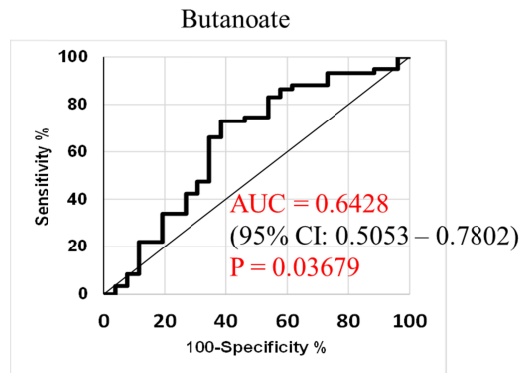
#### 4. 研究成果

唾液サンプルは OSCC 患者 70 名、健常者 28 名より採取した。唾液は前処理として 4、9100g で 3 時間かけて遠心ろ過を行い唾液中の夾雑物を除去した。続いてろ過した唾液 45  $\mu$ l に 2mM の内部標準を 5  $\mu$ l 加えて濃度勾配を調整した。代謝産物の網羅的探索はキャピラリー電気泳動質量分析法 (CE-TOFMS) で行った。健常者に比べ OSCC 患者の 30% 以上に発現していた代謝産物を 81 種類同定した。それらの代謝産物のうち OSCC 患者と健常者の間で AUC 0.5 以上だった代謝産物を 27 種類同定した (下図)。



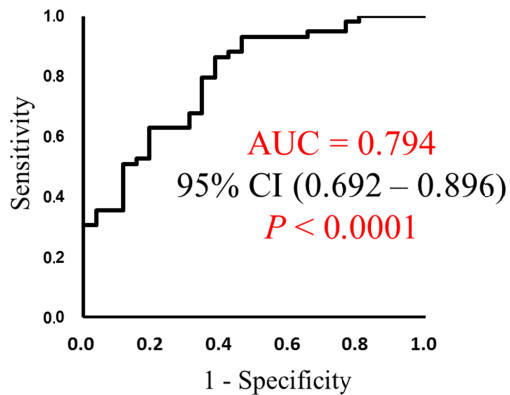
27 種類の代謝産物のうちブタノエートの AUC が最も高く (0.6428)、ついでイソプロパノ

ラミン (0.6382) であった。上記 2 種類の代謝産物は OSCC 患者において健常者に比べ統計学的有意に発現していた d (下図)。

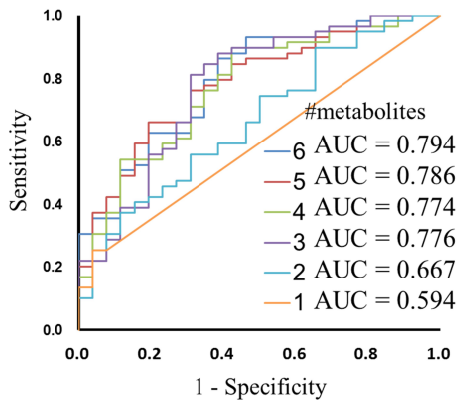


さらに診断精度を向上させるため複数の代謝産物を組み合わせて解析を行った。まず AUC が 0.6 以上の物質を 20 ピックアップし、次にステップワイズ変数選択にて P 値が 0.2 未満の代謝産物を追加していき、最終的に 6 つの代謝産物 (Trimethylamine N-oxide, Urea, Phosphorylcholine, N,N-Dimethylglycine, Pipecolate, Glu) でモデルを作製し、多重ロジスティック解析を行った。その結果、AUC = 0.794 と単独の代謝産物で行うより OSCC の診断精度が向上した (下表、下図)。

	Odds ratio	95 % CI		P-value
Trimethylamine N-oxide	12.10935	0.044036	1377.119	0.2678
Urea	0.00194	2.31E-06	0.354403	0.0369
Phosphorylcholine	19.15778	0.211468	1995.692	0.1987
N,N-Dimethylglycine	5.18E-07	1.83E-15	0.012951	0.0358
Pipecolate	0.003205	1.37E-05	0.205901	0.0181
Glu	2419.434	9.769522	2526177	0.012



最後に多重ロジスティックモデルの変数を減じた場合、AUC がどの程度の劣化するか解析を行った。6つの代謝産物のうちP値の高い代謝産物を順に減じていった。結果3つの代謝産物を減じてAUCがほとんど劣化しないことがわかり、上位3つの代謝産物の発現プロファイルを組み合わせて解析を行えば同等の診断精度であることがわかった(下図)。



以上の結果より CE-TOFMS を用いて唾液の代謝産物を網羅的に探索し解析することで OSCC 患者に特異的な代謝産物を同定し有用な診断マーカーになりうることを示唆された。今後、さらなる症例を蓄積し、解析結果と病態および臨床病理組織学的因子と統合解析を重ねることで、感度、特異度、正診率、陽性的中率、陰性的中率の向上を見込める。

さらにこの診断手法が確立されれば OSCC にとどまらずすべての疾患において唾液から安全かつ簡便に診断できる疾患マーカーを同定できる可能性がある。また唾液の代謝産物を網羅的に解析し代謝産物プロファイルを解明することで疾患の体系的な病態解明につながり、医学発展に多大な貢献となりうる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

1. 発表者: 岩本和樹

演題名(英語): Identification of salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma by metabolomics analysis

演題名(日本語): メタボローム解析による口腔扁平上皮癌診断のための唾液バイオマーカーの同定

学会名: 第74回日本癌学会学術総会

場所: 名古屋国際会議場・愛知県名古屋市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本 和樹 (Iwamoto, Kazuki)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90723833

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし