

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17291

研究課題名(和文) 血漿メタボローム解析による口腔がん術後再発・転移診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of diagnostic method for recurrence and metastasis of oral cancer by plasma metabolomics analysis

研究代表者

木本 明 (Kimoto, Akira)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30597167

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)：近年、新たなバイオマーカー検索法として、生体試料に含まれる代謝物を網羅的に定量するメタボローム解析が発展してきた。本研究では、早期がん、進行がん、再発・転移症例を含む口腔がん患者の経時的な血漿メタボローム解析を行い、口腔がんスクリーニングや再発・転移に関する代謝物を探索した。ガスクロマトグラフ質量分析計による測定の結果、検出された水溶性代謝物は、口腔がんの早期発見に寄与する可能性が示された。一方、再発・転移症例に関しては、症例数が少ないこともあり、口腔がんのスクリーニングに近い感度を示すには至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんの代表的な腫瘍マーカーにはSCC抗原があるが、これは正常な扁平上皮にも存在し、がん以外の疾患でも陽性となるなど、その感度は極めて低い。今回の研究において、口腔がんの血漿メタボローム解析を行うことで、SCC抗原と比較しより感度の高い代謝物を探索、発見することができた。これらの代謝物は、口腔がんの早期発見に寄与する可能性がある。これにより、早期発見・早期治療が可能になり、さらには生存率の向上、早期治療による合併症の軽減、生活の質の向上をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The findings from our plasma metabolomics analysis for patients with oral squamous cell carcinoma(OSCC) suggest four metabolites as biomarker candidates of OSCC for screening. In this study, plasma samples were collected regardless of early cancer patients, advanced cancer patients, and patients with recurrence and metastasis. While oral cancer is easy to diagnose by visual inspection at the advanced stage, it is difficult to diagnose early-stage cancer from an oral potentially malignant disorder. Hence, by conducting metabolomics analysis focusing on the early stage, there is a possibility that it can contribute to the discovery of early stage that is hard to diagnose by screening at visual inspection. Ultimately, it contributed to the early detection and early treatment of OSCC, leading to an increase in the survival rate of patients and an improvement in quality of life.

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 再発 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では、2014年度から「がん研究10カ年戦略」が開始され、がんの本態解明研究とこれに基づく革新的な予防、早期発見、診断、治療に係る技術の実用化をめざした臨床研究が強く求められている。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、再発・転移の早期の発見が可能になってきている。一方、切除後や放射線治療後の癒痕部や皮弁による再建部位における再発は、局所の状態や画像所見からは検出が困難なことが多く、発見時に進展していることも少なくない。口腔がんの代表的な腫瘍マーカーであるSCC抗原は、再発例では臨床症状の現れる数週間前に血中濃度が上昇することが多く、再発のモニタリングとしても使用されている。その一方で、正常な扁平上皮にも存在しているため、がん以外の疾患や長年の喫煙者でも陽性になるなど、検出感度は低く、あくまで術後評価の指標に過ぎないのが現状である。そのため、これらの問題点を克服した、口腔がんの特異的かつ、高感度の術後再発・転移診断法の確立を目指す。

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。これら低分子代謝物を網羅的に分析することをメタボローム解析と言い、食品中の成分の分析、薬物投与後の影響調査、体液を調べることで病気のバイオマーカーを発見するなど様々な分野で応用されている。特にがん細胞は、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有効である。また、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、生体の表現型に近い変動を示すことなど様々な利点を持つ。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とした。

2. 研究の目的

口腔がん術後の再発・転移を示唆する腫瘍マーカーにはSCC抗原があるが、これは正常な扁平上皮にも存在し、がん以外の疾患でも陽性となるなど、その感度は極めて低い。そこで、本研究ではSCC抗原に代わる口腔がんの高感度かつ正確な再発・転移診断法を確立することを目的とする。近年、新たなバイオマーカー検索法として、生体試料に含まれる代謝物を網羅的に定量するメタボローム解析が発展してきた。本研究では、口腔がん患者の術前～術後2年までの経時的な血漿メタボローム解析を行い、口腔がんスクリーニングや再発・転移に関する代謝物を探索する。

3. 研究の方法

口腔がん患者と健常者の血漿サンプルの代謝プロファイリングと検証比較

病理組織学的に口腔扁平上皮癌と診断され手術予定の患者とコントロール群である健常人の血漿をメタボローム解析し、血液中の代謝物の関連性と口腔がんでは有意に変動する代謝物を明確にする。

具体的な実験方法は、手術前1か月以内の担癌状態での血漿を回収し、非がん群である健常人と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(糖・糖アルコール・有機酸・アミノ酸・脂肪酸)を分析対象とする。

口腔がん術後に再発・転移を生じた血漿サンプルの経時的な比較検証

口腔がん患者の内、術後に再発もしくは転移を生じた血液を、経時的にGC/MSにて測定し比較する。

4. 研究成果

GC/MSによる分析の結果、検出された水溶性代謝物で口腔がん患者群とコントロール群間で有意差を認めたものを対象とし、ボルケーノプロット(それぞれの代謝物質について口腔がん患者-コントロール群間の比を \log_2 変換し横軸に、t-検定結果のp値を $-\log_{10}$ 変換し縦軸に示した散布図)を用いて、2群間比較で顕著にかつ統計学的有意に高値または低値の代謝物質の選定を行った(図1)。今回はt-検定で $p < 0.05$ 、平均値の強度の差がfold induction > 1.5 (差が1.5倍以上)を対象とした結果18種類の代謝物が選定された。18種類の代謝物

(oxalate, sarcosine, hydroxyisovaleric acid, benzoic acid, alanine, creatinine, hydroxyaspartic acid, phthalic acid, dehydroquinic acid, glucose, sebacic acid, galactose, galactosamine, glucarate, urea, nonanoic acid, hypoxanthine, cysteine + cystine)からより精度の高いバイオマーカー候補物質を選定するため、口腔がん患者群とコントロール群をランダムに振り分け交差検証を行った。その結果、training setとvalidation set間には、年齢性別において有意差を認めなかった。次に、training setを用いてバイオマーカー候補物質を選定するためROC曲線を用いて、各代謝物の感度と特異度を求め、5-fold cross validationを用いて検証した。それにより、4種類の代謝物(glucose, galactose, nonanoic acid, cysteine + cystine)が選定された(Table.1)。さらに、validation setでは、4種類の代謝物に対してROC曲線から感度・特異度を算定し、training setでの結果と比較検証を行った。その結果、galactose, nonanoic acid, cysteine + cystineで感度80%以上

であった(Table.2)。また、口腔がん患者群とコントロール群において、それぞれの術前・術後の血漿における、選定された4つのバイオマーカー候補物質の比較を行ったところ、口腔がん患者群では4種類すべての代謝物で術前と術後の血漿間にて有意差を認めた(Table.3)。コントロール群では glucose のみ有意差を認めた(Table.4)。口腔がん患者群とコントロール群ともに術後に glucose のレベルが上昇していたが、手術侵襲による高血糖の影響の可能性も考えられた。

次に、術後に再発もしくは転移をきたした症例における代謝物の変動を分析した。上記で選定された4種類の代謝物 (glucose、galactose、nonanoic acid、cysteine + cystine) に関して、術前から再発もしくは転移が診断された時点までの経時的な変化 (術後1、3、6、9、12、18、24か月) を分析したところ、有意差のある変動を示した代謝物はなかった。この原因として、再発・転移群の検体数が少ないことが考えられる。

今回の研究結果で、血漿を用いたメタボローム解析により、口腔がんに対する高感度代謝物を選定することができた。今後は、さらに実用化に向けて検体数を増やし分析を行う予定である。

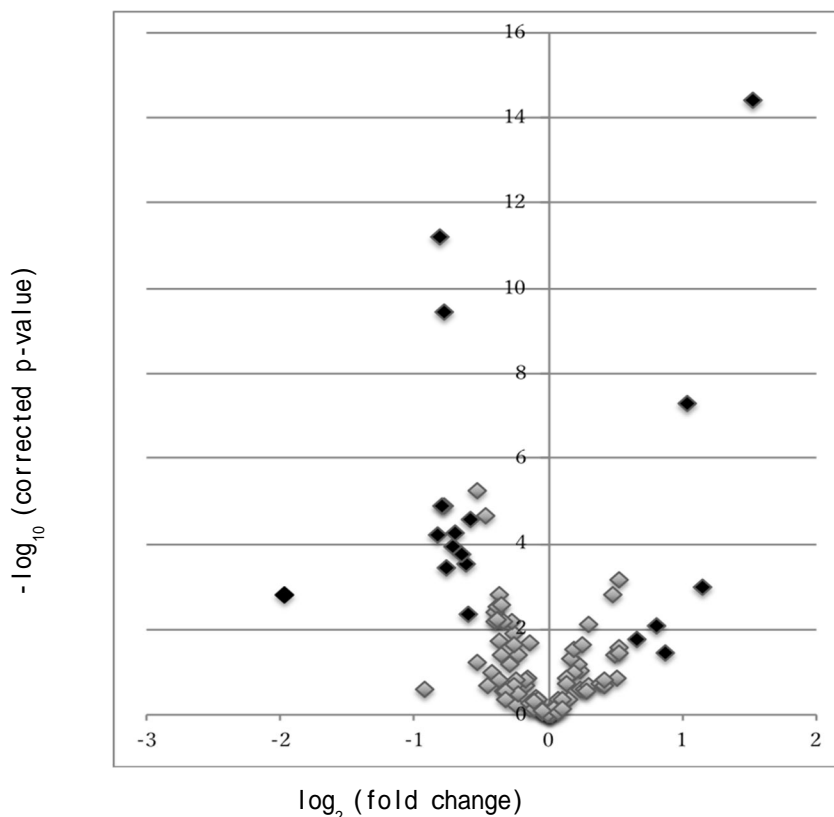


図 1

	Traing set			5-fold cross validation		
	AUC	感度	特異度	AUC	感度	特異度
Nonanoic acid	0.97778	0.9167	0.9333	0.976316	0.9138	0.93336
Glucos	0.925	0.9167	0.8667	0.921928	0.91578	0.84998
Galactose	0.91389	0.9167	0.8667	0.914034	0.92632	0.84998
Cysteine+Cystine	0.94722	0.9167	1	0.945612	0.91578	0.98334

Table.1

	Validation set		
	AUC	感度	特異度
Nonanoic acid	0.909	0.840	0.929
Glucos	0.889	0.640	1.000
Galactose	0.946	0.920	0.929
Cysteine+Cystine	0.774	0.840	0.714

Table.2

口腔がん患者群	術後/術前	p-value
Nonanoic acid	0.66	0.0008
Glucos	1.59	0.0008
Galactose	1.39	<0.0001
Cysteine+Cystine	0.61	<0.0001

Table.3

コントロール群	術後/術前	p-value
Nonanoic acid	0.84	0.2554
Glucos	1.46	<0.0001
Galactose	1.09	0.2179
Cysteine+Cystine	1.12	0.1000

Table.4

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

YUI ENOMOTO, AKIRA KIMOTO, HIROAKI SUZUKI, SHIN NISHIUMI, MASARU YOSHIDA, TAKAHIDE KOMORI. Exploring a novel screening method for patients with oral squamous cell carcinoma: A plasma metabolomics analysis. 査読有, Kobe J Med Sci. 2018 Sep 11; 64(1):E26-E35.

[学会発表] (計 1 件)

山下淳也, 木本 明, 八谷奈苗, 榎本由依, 明石昌也. 血漿メタボローム解析による担癌マウスモデルと口腔扁平上皮癌臨床検体の比較検討 . 第 65 回日本口腔外科学会学術大会 , 2020 年 11 月 13-15 日 , 愛知 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 YUI ENOMOTO, AKIRA KIMOTO, HIROAKI SUZUKI, SHIN NISHIUMI, MASARU YOSHIDA, TAKAHIDE KOMORI	4. 巻 64 (1)
2. 論文標題 Exploring a novel screening method for patients with oral squamous cell carcinoma: A plasma metabolomics analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci	6. 最初と最後の頁 E26-E35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 山下淳也, 木本 明, 八谷奈苗, 榎本由依, 明石昌也
2. 発表標題 血漿メタボローム解析による担癌マウスモデルと口腔扁平上皮癌臨床検体の比較検討
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------