

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10125

研究課題名（和文）唾液に含まれる癌細胞由来分泌小胞を用いた口腔がん診断法の確立

研究課題名（英文）Development of a Saliva-Based Diagnostic Method for Oral Cancer using Cancer Cell-Derived Secretory Vesicles

研究代表者

國分 克寿（Kokubun, Katsutoshi）

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90535808

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）：歯源性腫瘍の患者サンプルからDNAを抽出し、遺伝情報の解析を行った。エナメル上皮腫患者サンプルを用いてBRAF変異の解析を行った結果、83%にBRAF変異（V600E）が認められた。また、抗BRAF V600E抗体を用いて免疫組織化学的染色を行なった結果、変異の存在を検出することが可能であった。このBRAF変異と臨床病理学的特徴との関連性はみられなかった。同じ症例に関してSMO変異の検索も行なったが、SMOの変異に関しては検出できなかった。また、歯源性粘液腫の患者サンプルを用いて全エクソーム解析を進め、その原因遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本結果により、歯源性腫瘍、特にエナメル上皮腫や歯源性粘液腫の診断において遺伝子解析が有用であることがわかった。特にエナメル上皮腫においては、BRAF変異が高頻度で見られることから診断困難な症例において遺伝子解析がその一助となることがわかる。また、これまでに歯源性粘液腫の原因遺伝子に関する報告はなかったが、本研究により原因遺伝子が同定されたことにより、今後、診断への影響を検索していくことで、遺伝子診断へつながっていくことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：DNA was extracted from specimens obtained from patients with odontogenic tumors and analyzed for genetic information. BRAF mutation analysis was performed on ameloblastoma specimens, and BRAF mutation (V600E) was found in 83% of the samples. Immunohistochemical staining using an anti-BRAF V600E antibody was conducted, and the presence of the mutation was detectable. No correlation was observed between this BRAF mutation and clinicopathological features. In the same case, an investigation into SMO mutations was also conducted, but no SMO mutations could be detected. Exome sequencing of patient samples affected by odontogenic myxoma was also performed for the identification of the causative gene.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯源性腫瘍 口腔病理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの発生・進展はゲノム異常の蓄積であり、ゲノム不安定性によってその集団は均一な集団からより複雑で多様な細胞集団へ姿を変えていく。がんの多様性はこれまで病理学者によって深く検討され、不均一性を強調する heterogeneous という表現で語られてきた。このがんの多様性の理解は、がんの治療戦略においても非常に重要な鍵を握っている。口腔がんにおいては、唾液腺腫瘍の病理組織像は特に多彩であり、一つの腫瘍型の中にも多様な組織成分が混在するので、唾液腺腫瘍の病理組織学的診断は難しいことがある。このような多彩な病理組織像を示す疾患の診断においては組織像以外のアプローチが必要であり、昨今の次世代シーケンサーの導入により、がんゲノムの解析が重要であると考えられている。

エクソソームは細胞の放出する直径 100nm 程度の分泌小胞で、それが含むタンパク質や核酸 (DNA, mRNA, miRNA) が宿主細胞の性質を反映しているために、「液体生検」の切り札として大きな期待が集まっている。近年、唾液を用いた診断の非侵襲性に注目が集まっているが、特に唾液中のエクソソームは宿主細胞由来の遺伝情報を保持しているため、その解析から得られる情報量が多い。この唾液中のエクソソームの解析は口腔がんの診断につながる可能性が非常に高い診断法である。

2. 研究の目的

本研究は、エクソソームが宿主細胞の遺伝情報を含有することに着目し、唾液エクソソーム内の遺伝情報を用いた口腔腫瘍の診断を目的とする。具体的には口腔腫瘍患者の唾液エクソソームから dsDNA を抽出し、その情報を元に口腔腫瘍、特に扁平上皮癌や歯原性腫瘍の新たな診断法を開発する。

3. 研究の方法

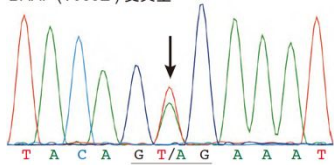
(1) 歯原性腫瘍の診断に有用な遺伝情報を検索するため、エナメル上皮腫の患者サンプル 24 例に関して *BRAF* と *SMO* の変異の有無をサンガーシーケンスならびに免疫組織化学染色を用いて検索した。

(2) 歯原性粘液腫の原因遺伝子を検索するため、歯原性粘液腫の患者サンプル 10 例を用いて全エクソーム解析を行った。

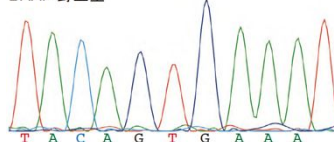
4. 研究成果

(1) エナメル上皮腫 24 例の *BRAF* 変異 (V600E) と *SMO* 変異 (L412F) を調べるためにサンガーシーケンスを実施した。その結果、*BRAF* において 1799T>A 変異が高い頻度 (24 例中 20 例、83%) で認められた (下図、下表)。 *SMO* 変異は、解析した 24 例のサンプルのいずれにもみられなかった (下表)。

BRAF (V600E) 変異型



BRAF 野生型



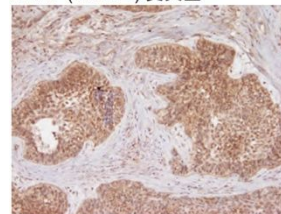
Case No.	Age	Sex	Location	Method	Recurrence	Subtype	<i>BRAF</i> V600E status		<i>SMO</i> L412F status
							Seq	IHC	
1	53	F	Mandible	Biopsy	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
2	18	F	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
3	32	F	Mandible	Biopsy	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
4	38	F	Mandible	Resection	No	Unicystic	Mutant	P	Wild type
5	31	F	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
6	77	M	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
7	12	M	Mandible	Resection	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
8	21	M	Mandible	Biopsy	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
9	17	F	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
10	12	F	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Wild type	P	Wild type
11	19	M	Mandible	Resection	No	Multicystic	Wild type	N	Wild type
12	18	F	Mandible	Resection	Recurred	Unicystic	Mutant	P	Wild type
13	32	F	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
14	12	M	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
15	66	M	Mandible	Resection	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
16	33	M	Mandible	Biopsy	No	Unicystic	Mutant	P	Wild type
17	65	M	Mandible	Resection	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
18	73	F	Mandible	Resection	Recurred	Multicystic	Mutant	P	Wild type
19	67	F	Mandible	Biopsy	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
20	9	M	Mandible	Biopsy	No	Unicystic	Wild type	P	Wild type
21	66	M	Mandible	Biopsy	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
22	37	M	Mandible	Resection	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
23	37	M	Mandible	Biopsy	No	Multicystic	Mutant	P	Wild type
24	79	F	Mandible	Biopsy	No	Multicystic	Wild type	N	Wild type

免疫組織化学染色を行い、BRAF 変異タンパク質の存在とゲノム DNA の状態が対応しているかどうかを検証した。その結果、24 例中 22 例 (91.7%) が BRAF V600E 陽性であることが判明した (図 2)。シーケンスによる結果と比較すると、免疫組織化学的検出の感度は 100% (20/20)、特異度は 50% (2/4) であった。

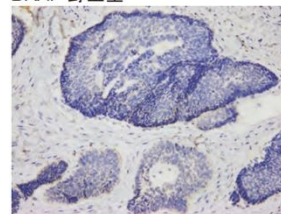
年齢、性別、部位、方法、再発などの臨床病理学的特徴は、BRAF V600E 変異の有無と関連しなかった ($P > 0.05$ 、表 2)。BRAF V600E 変異の有無と組織学的サブタイプ (多嚢胞性または単嚢胞性) の間には関連はなかった。

	Total	Mutant	Wild type	P-value
Total	24	20	4	
Age				0.699
<40	16	13	3	
≥40	8	7	1	
Sex				1
Male	12	10	2	
Female	12	10	2	
Location				1
Maxilla	0	0	0	
Mandible	24	20	4	
Method				0.615
Biopsy	9	7	2	
Resection	15	13	2	
Recurrence				0.596
No	13	10	3	
Recurred	11	10	1	
Subtype				0.544
Conventional	20	17	3	
Unicystic	4	3	1	

BRAF (V600E) 変異型



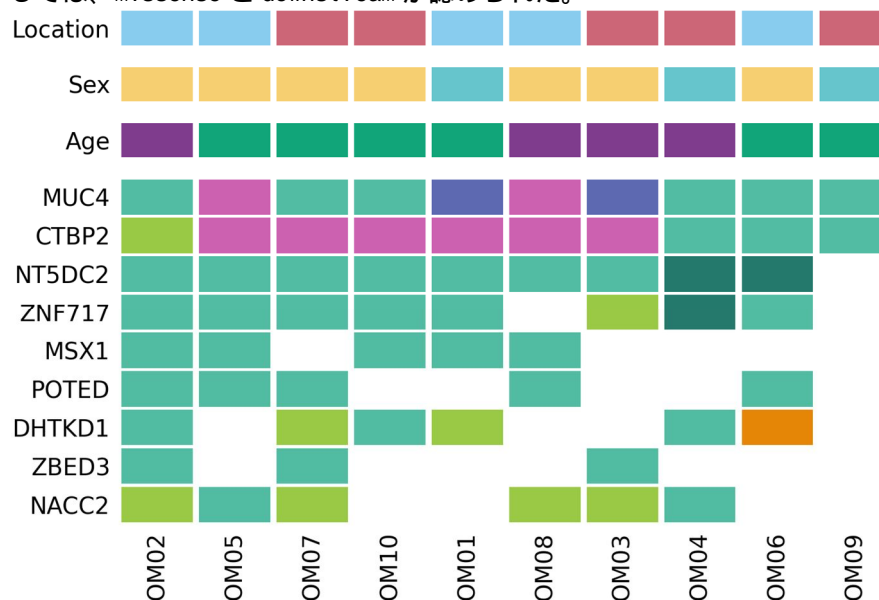
BRAF 野生型



(2) 歯原性粘液腫 10 例の全エクソーム解析後のアライメント情報を表に示す。

SampleID	OM01	OM02	OM03	OM04	OM05	OM06	OM07	OM08	OM09	OM10
Total_Reads	11,910,042	7,309,775	12,140,417	8,983,396	26,082,302	14,986,675	37,920,378	8,096,271	2,915,785	27,023,766
Duplicates	93.67%	95.58%	91.14%	95.41%	86.31%	83.11%	82.75%	96.45%	98.18%	94.32%
Mapped_Reads	11,760,263(98.74%)	6,862,079(93.88%)	11,186,598(92.14%)	8,883,322(98.89%)	25,935,929(99.44%)	14,940,065(99.69%)	37,794,221(99.67%)	7,965,240(98.38%)	2,822,719(96.81%)	26,712,597(98.85%)
Properly_Mapped	11,074,254(92.98%)	6,219,710(85.09%)	10,277,346(84.65%)	7,527,594(83.79%)	25,132,240(96.36%)	14,088,514(94.01%)	36,707,546(96.8%)	6,355,590(78.5%)	2,544,340(87.26%)	24,885,272(92.09%)
PE_mapped	11,423,652(95.92%)	6,542,418(89.5%)	10,776,838(88.77%)	8,077,568(89.92%)	25,609,762(98.19%)	14,583,902(97.31%)	37,444,316(98.74%)	6,806,968(84.08%)	2,674,534(91.73%)	25,727,638(95.2%)
SE_mapped	7,897(0.07%)	6,331(0.09%)	6,781(0.06%)	6,993(0.08%)	11,834(0.05%)	6,027(0.04%)	11,785(0.03%)	8,139(0.1%)	4,469(0.15%)	17,050(0.06%)
Mean_Target_Depth	16.7251	9.7289	14.9643	9.122	37.2663	20.6372	57.1166	8.6062	5.6465	33.0728
Target_Coverage	92.81%	83.10%	96.02%	89.04%	99.03%	98.62%	99.09%	76.80%	46.51%	98.86%

多くのサンプルで変異を示した遺伝子を以下に示す。その結果、2つの遺伝子が全サンプルで変異していることが判明した。第3染色体に位置する MUC4 遺伝子は、様々な変異を持ち、missense、frameshift、in-frame indel が認められた。また、第10染色体に位置する CTBP2 は synonymous、missense、frameshift がみられた。また、10 サンプル中 9 サンプルで変異を認めた NT5DC2 に関しては、missense と downstream が認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kokubun Katsutoshi, Nakajima Kei, Yamamoto Kei, Akashi Yoshihiko, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Evaluation of oral brush liquid-based cytology for oral squamous cell carcinoma: a comparative study of cytological and histological diagnoses at a single center	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-023-02839-w	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 -
1. 著者名 Kokubun Katsutoshi, Chujo Takatoshi, Yamamoto Kei, Akashi Yoshihiko, Nakajima Kei, Takano Masayuki, Katakura Akira, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Intraoral Minor Salivary Gland Tumors: A Retrospective, Clinicopathologic, Single-Center Study of 432 Cases in Japan and a Comparison with Epidemiological Data	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Head and Neck Pathology	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) 10.1007/s12105-023-01551-z	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 -
1. 著者名 國分克寿、松坂賢一	4. 巻 122
2. 論文標題 エナメル上皮腫の分子病理学	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 歯科学報	6. 最初と最後の頁 121 ~ 123
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 無
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 -
1. 著者名 Kokubun Katsutoshi, Yamamoto Kei, Akashi Yoshihiko, Chujo Takatoshi, Nakajima Kei, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 30
2. 論文標題 Genetic Study of BRAF V600E and SMO L412F Mutations in Japanese Patients with Ameloblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 378 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/10668969211064203	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 -

1. 著者名 Asahara Fumitaka, Yamazaki Masae, Kokubun Katsutoshi, Matsuzaka Kenichi, Kishikawa Hiroshi, Matsui Junichi, Nomura Takeshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Correlation between lifestyles of tobacco smoking and alcohol drinking, and expression of p53 and GLUT1 in synchronous oral squamous cell carcinoma with colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 817 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.05.003	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 -

1. 著者名 Kokubun Katsutoshi, Yamamoto Kei, Nakajima Kei, Akashi Yoshihiko, Chujo Takatoshi, Takano Masayuki, Katakura Akira, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Frequency of Odontogenic Tumors: A Single Center Study of 1089 Cases in Japan and Literature Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Head and Neck Pathology	6. 最初と最後の頁 494 ~ 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12105-021-01390-w	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 -

1. 著者名 Nemoto Atsushi, Akashi Yoshihiko, Nakajima Kei, Kokubun Katsutoshi, Sasaki Kenichi, Inoue Takashi, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 33
2. 論文標題 The effects of recombinant human basic fibroblast growth factor on nerve regeneration in a partial defect inferior alveolar nerve model in rabbits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 348 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2020.12.003	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 -

1. 著者名 Akashi Yoshihiko, Nemoto Atsushi, Nakajima Kei, Kokubun Katsutoshi, Murakami Satoshi, Inoue Takashi, Matsuzaka Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 The effect of fibroblast growth factor 7 on human dental pulp stem cells for differentiation to AQP5 positive and SMA positive cells in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research	6. 最初と最後の頁 344 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.423	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 -

1. 著者名 Masami Sumi, Yoshihiko Akashi, Kei Nakajima, Katsutoshi Kokubun, Satoshi Murakami, Kenichi Matsuzaka, Takashi Inoue	4. 巻 13
2. 論文標題 Immunohistochemical study of CK7 and CK17 on metaplastic cells of dentigerous cysts, and RNA expression in cultured odontogenic epithelial cells after centrifugal force	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 3~13
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中條貴俊, 明石良彦, 中島啓, 國分克寿, 小谷地雅秀, 菅原圭亮, 橋本和彦, 佐々木文, 片倉朗, 松坂賢一	4. 巻 13
2. 論文標題 上顎洞に発生したALK陽性未分化大細胞型リンパ腫の一例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 65~68
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本 菜央, 中島 啓, 明石 良彦, 國分 克寿, 菅原 圭亮, 片倉 朗, 松坂 賢一
2. 発表標題 口腔癌におけるcholinetransporter like protein 1(CTL1)の局在および細胞増殖との関連(Localization of choline transporter like protein 1(CTL1) as cell proliferation in oral cancer)
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 菜央, 山本 圭, 明石 良彦, 中條 貴俊, 中島 啓, 國分 克寿, 菅原 圭亮, 片倉 朗, 松坂 賢一
2. 発表標題 舌癌におけるコリントランスポーターの局在および増殖細胞との関連
3. 学会等名 第313回東京歯科大学学会・例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 菜央, 中島 啓, 明石 良彦, 國分 克寿, 菅原 圭亮, 松坂 賢一, 片倉 朗
2. 発表標題 口腔癌細胞における cholinetransporter like protein 1 (CTL1) の局在と細胞増殖能
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会・第33回日本臨床口腔病理学会・第35回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 圭, 市原有美, 明石良彦, 中島 啓, 國分克寿, 松坂賢一
2. 発表標題 口腔扁平苔癬と口腔上皮性異形成におけるリンパ球の局在の検索
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会・第33回日本臨床口腔病理学会・第35回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市原有美, 山本 圭, 明石良彦, 中島 啓, 國分克寿, 音成実佳, 高野正行, 松坂賢一
2. 発表標題 下顎右側前歯部に認められた Regional odontodysplasia 周囲組織の組織学的検討
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会・第33回日本臨床口腔病理学会・第35回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國分克寿
2. 発表標題 細胞外小胞に内包される遺伝情報の解析と診断への応用
3. 学会等名 第14回日本口腔検査学会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 圭, 山田玲菜, 明石良彦, 中條貴俊, 中島 啓, 國分克寿, 高野正行, 片倉 朗, 松坂賢一
2. 発表標題 過去45年間の東京歯科大学における血管系病変の統計
3. 学会等名 第311回東京歯科大学学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中條貴俊, 明石良彦, 山田玲奈, 山本 圭, 中島 啓, 國分克寿, 橋本和彦, 菅原圭亮, 片倉 朗, 松坂賢一
2. 発表標題 裏層上皮の増殖傾向を思わせるorthokeratinized odontogenic cystの一例
3. 学会等名 第32回日本臨床口腔病理学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中條貴俊, 明石良彦, 山田玲奈, 山本 圭, 中島 啓, 國分克寿, 松坂賢一
2. 発表標題 顎骨内に発生した角化を伴う歯原性嚢胞の統計学的検索
3. 学会等名 第14回日本口腔検査学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 啓, 明石 良彦, 中條 貴俊, 國分 克寿, 橋本 和彦, 橋本 貞充, 松坂 賢一
2. 発表標題 下顎骨内腫瘍の一例
3. 学会等名 第31回日本臨床口腔病理学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中條 貴俊, 明石 良彦, 山田 玲菜, 山本 圭, 中島 啓, 國分 克寿, 松坂 賢一
2. 発表標題 東京歯科大学における唾液腺腫瘍の臨床病理統計
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 圭, 山田 玲菜, 明石 良彦, 中條 貴俊, 中島 啓, 國分 克寿, 新行内 恵, 岩本 昌士, 高野 正行, 片倉 朗, 松坂 賢一
2. 発表標題 下唇に発生した乳頭状内皮過形成の一例
3. 学会等名 第310回東京歯科大学学会(総会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 玲菜, 山本 圭, 明石 良彦, 中條 貴俊, 中島 啓, 國分 克寿, 奥平 貴人, 岩本 昌士, 高野 正行, 片倉 朗, 松坂 賢一
2. 発表標題 口蓋部に発生したsecretory carcinoma の一例
3. 学会等名 第310回東京歯科大学学会(総会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 明石 良彦, 山田 玲菜, 山本 圭, 中條 貴俊, 中島 啓, 國分 克寿, 村松 賢太郎, 岡本 雄紀, 菅原 圭亮, 高野 正行, 片倉 朗, 松坂 賢一
2. 発表標題 下唇に生じた開口部形質細胞症の1例について
3. 学会等名 第13回日本口腔検査学会総会・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
---------	---------