

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16829

研究課題名（和文）エクソソーム糖鎖プロファイリングに基づく口腔癌新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration of novel biomarkers for oral cancer based on exosome glycan profiling

研究代表者

水田 匡信（Mizuta, Masanobu）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20777875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌は進行癌で発見されることが多く、早期癌は5割程度にとどまる。治療成績の向上には、病変の早期発見および診断方法の確立が求められるものの、口腔癌の腫瘍マーカーとして信頼性の高いものは存在しない。本研究では、唾液サンプルから抽出したエクソソームの網羅的糖鎖解析を行うことにより、口腔癌に対する新規バイオマーカーの探索を行った。舌癌および下顎歯肉癌患者の唾液からエクソソームを回収し、レクチンアレイによる糖鎖解析を行ったところ、癌患者と健常人で強度の異なる糖鎖が確認され、新たなバイオマーカー確立につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における頭頸部癌の中で、口腔癌が最も多い。舌をはじめとする口腔臓器は、嚥下や構音に直結するため、早期で発見することが、治療後の機能維持にも重要である。口腔癌に対する新たなバイオマーカーが確立されれば、機能的意義も含めた治療成績の向上につながる可能性があり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Oral cancer is often detected at advanced stages, and only about 50% of patients are at the early stages. Although early detection of lesions and establishment of diagnostic methods are required to improve treatment outcomes, there are no reliable biomarkers for oral cancer. In this study, we tried to establish a novel biomarkers for oral cancer by performing a comprehensive glycan analysis of exosomes extracted from saliva samples. Exosomes were collected from saliva samples of patients with tongue and gingival cancer, and glycan analysis using lectin arrays were performed. Glycans with different intensities were identified between cancer patients and healthy subjects, suggesting the possibility of establishing a new biomarker for oral cancer.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 舌癌 バイオマーカー 糖鎖解析

1. 研究開始当初の背景

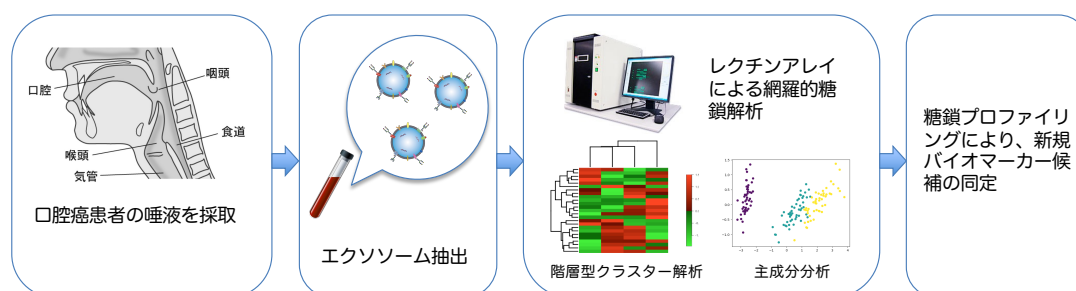
舌や歯肉、頬粘膜をはじめとした口腔は、味覚、構音、咀嚼、嚥下などヒトが社会生活を送る上で非常に重要な役割を担っている。そのため、これらの臓器に生じた悪性腫瘍の治療においては、根治性ととも如何にその機能を温存するかが課題となる。

2017年度の本邦における頭頸部悪性腫瘍全国登録によると口腔癌では早期癌は約5割にとどまり、その多くは進行癌である。早期癌での治療成績は悪くないが、進行癌における5年生存率は50%前後にとどまり、満足のいくものではない。更に病変の制御が得られたとしても、進行癌に対する治療ではその機能を犠牲にせざるを得ない場合が多いため、患者は長期にわたり治療後遺症に悩まされる。治療成績を向上させるとともに治療に伴う後遺症を減らすために、早期発見・診断方法の確立が求められている。

口腔癌の多くは扁平上皮癌であるため、これまで腫瘍マーカーとして血清中の squamous cell carcinoma (SCC) 抗原が用いられてきたが、その感度は28-88%と安定しておらず臨床的な信頼性は高くない。そのため、様々なアプローチから新規バイオマーカーの探索が試みられている。近年、細胞間コミュニケーションの担い手として細胞外小胞の一種であるエクソソームが注目されるようになってきた。がん細胞由来のエクソソームにはがん細胞固有のマイクロRNAや表面タンパク、DNAなどが含まれ、かつ癌発症の初期段階から放出されていることなどから、様々な臓器で新規バイオマーカー探索の対象となっている。実際、頭頸部癌でもタンパクや核酸に関する解析が行われてきたが、明確なバイオマーカーの同定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質や脂質と結合することにより機能調節に働き、核酸とタンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれる糖鎖に注目し、口腔癌患者の唾液サンプルから抽出したエクソソームの網羅的糖鎖解析を行うことにより、頭頸部癌に対する新規バイオマーカーの探索を行う。



3. 研究の方法

①唾液サンプルからエクソソーム抽出条件の検討

10歳代から60歳代の非担癌健常人8名から唾液を回収し、MagCaptureエクソソームアイソレーションキットPSを用いて遠心、濃縮、精製を行い、エクソソームを抽出した。

抽出したエクソソームは、ナノトラッキング粒子径測定装置を用いて径を測定し、さらに、ELISAやWestern BlottingによりCD63などの発現を確認するとともに、Micro BCA assayによりエクソソーム量を定量した。

続いて、サンプルをLecChipの各ウェルに加え、遮光化室温で一晩静置した後、GlycoStation Reader 2200にセットし、表層糖鎖プロファイリングを行い、相対蛍光度を比較した。

蛍光強度は平均信号強度で割算することでノーマライズした。

②口腔癌患者サンプルの解析

舌癌(扁平上皮癌)および下顎歯肉癌(扁平上皮癌)患者から唾液を採取し、健常人サンプルと同様の方法でエクソソームを抽出し、粒子径を測定した。

回収した唾液由来エクソソームの表層糖鎖パターンに違いがあるかをレクチンアレイで評価した。

4. 研究成果

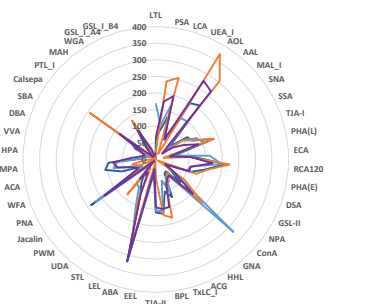
①唾液サンプルから測定者間誤差少なくエクソソームを抽出できることを確認

150 nm 程度の粒径であること、エクソソーム量は 0.5-2 μ g 程度のタンパク量であることを確認した。測定者間での糖鎖パターンの違いがなく、測定者間誤差は少ないことが確認できた。また、一部のレクチンにおいて年齢や性差により相対蛍光度が異なっていることが確認された。

男性間比較(A, C, D, G)

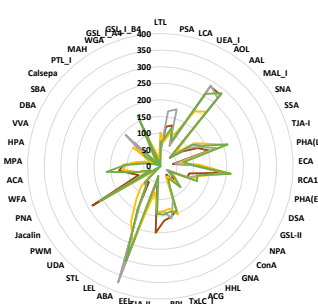
女性間比較(B, E, F, H)

A:M30, C:M60, D:M30, G:M10



エクソソーム回収までの保存状態が異なりn数が少ないが、年齢の違いで糖鎖パターンに差が見られた

B — E — F — H



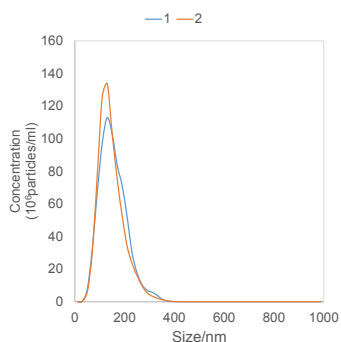
男性間にくらべると大きな差は見られないが、年齢の違いで糖鎖パターンが異なった

② 口腔癌患者唾液サンプルから抽出したエクソソーム表層糖鎖パターンの解析

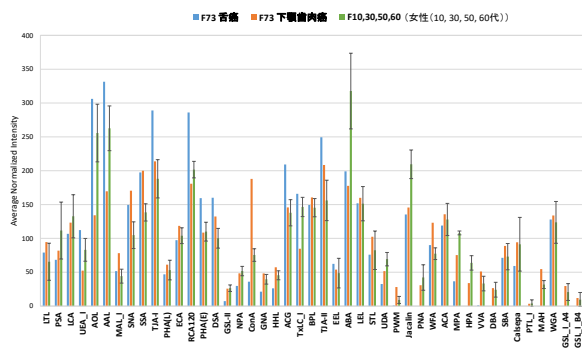
口腔癌患者サンプルにおいても①の条件でエクソソームが抽出可能であり、150 nm 程度の粒径であることを確認した。

粒径分布

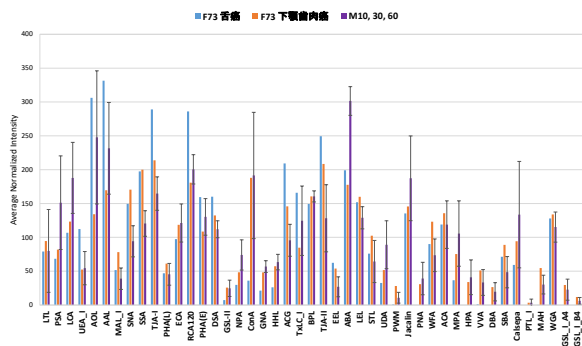
健常者と同様に150 nm程度の粒径であったことがわかった



① 健常者女性とがん患者女性



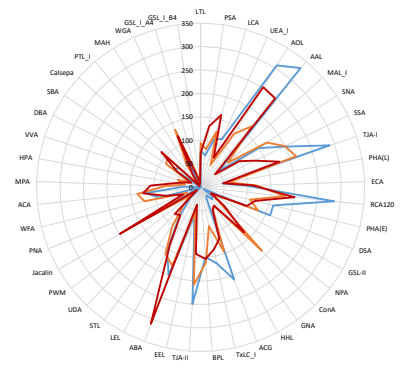
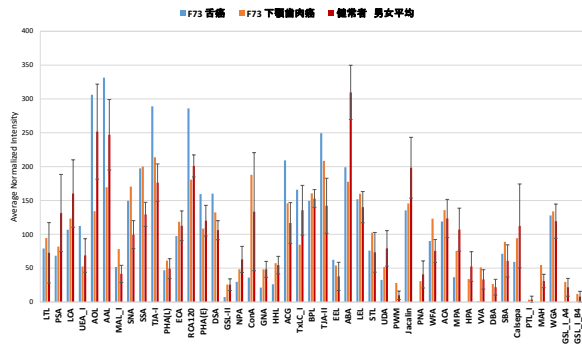
② 健常者男性とがん患者女性



レクチンアレイによる糖鎖解析を行ったところ、 α 2-6 シアル酸関連レクチンである SNA (Sambucus Nigra Lectin)、SSA (Sambucus sieboldiana agglutinin)、TJA-I (Trichosanthes japonica agglutinin I)、TJA-II (Trichosanthes japonica agglutinin II)、ACG (Agrocybe cylindracea galectin) などでは癌患者サンプルで強度が高く、ABA (Agaricus bisporus agglutinin) は健常人で強度が高いことが確認された。

(レクチンアレイの測定は、研究協力者である、工学研究科の秋吉一成先生と下田麻子先生により行われた。)

③ 男女健常者とがん患者女性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gao Li, Chen Ru, Sugimoto Masahiro, Mizuta Masanobu, Zhou Lei, Kishimoto Yo, Huang Xinsheng, Omori Koichi	4. 巻 9
2. 論文標題 The RNA Methylation Modification 5-Methylcytosine Impacts Immunity Characteristics, Prognosis and Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma by Bioinformatics Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	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） 10.3389/fbioe.2021.760724	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 Gao Li, Chen Ru, Sugimoto Masahiro, Mizuta Masanobu, Kishimoto Yo, Omori Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 The Impact of m1A Methylation Modification Patterns on Tumor Immune Microenvironment and Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10302 ~ 10302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910302	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0件

〔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
---------	---------