

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593010

研究課題名(和文) 唾液中の口腔癌関連タンパクをメタボローム解析でプロファイルする

研究課題名(英文) A profiling for oral cancer using saliva samples: metabolome analysis of oral cancer-related protein in whole saliva

研究代表者

片倉 朗 (KATAKURA, AKIRA)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10233743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は東京歯科大学市川総合病院歯科・口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌患者22例、健康人21例を対象に全症例ともCE-MSを用いたメタボローム定量解析を実施した。唾液から検出された25代謝物質が口腔扁平上皮癌患者と健康人の2群間で統計学的有意差を認めた。さらにcholine、BCAA回路、urea、3-hydroxybutyric acid (3-HBA) が特徴的に検出され、cholineとBCAA回路の代謝物は口腔扁平上皮癌のメタボローム解析にて報告されている一方で、ureaと3-HBAは今までに報告はない。結果より口腔扁平上皮癌のバイオマーカーとして唾液が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to characterize metabolic systems in oral squamous cell carcinoma (OSCC) using Capillary Electrophoresis / Mass Spectrometry (CE-MS) metabolome analysis of saliva. Saliva were obtained from patients with OSCC patients (n=22) and from healthy controls (n=21), who visited the Department of Dentistry, Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Dental Collage Ichikawa General Hospital. We applied metabolome comprehensive and quantitative analysis in the saliva from 22 OSCC patients and 21 healthy controls using CE-MS. Furthermore, focused Choline, Urea, BACC cycle, and 3-Hydroxybutyric acid. Some groups reported Choline, BACC cycle in OSCC using metabolome analysis. These findings suggest the usefulness of metabolites as a salivary biomarker for OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：唾液 メタボローム解析 口腔癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

今まで口腔癌の早期発見のために唾液が歯科臨床で簡便に反復して非侵襲的に採取でき、しかも腫瘍由来のタンパクを反映する絶好の試料であることに注目し、全唾液を試料とした口腔癌のスクリーニング検査の開発を行ってきた(頭頸部癌 Vol.32 45-50,2007)。唾液中のタンパクを網羅的に検索するために二次元電気泳動法を用いて、口腔癌で特徴的に出現するタンパクを検出し、そのひとつを質量解析からenolase 1と特定し、それが口腔癌組織に由来することを特定した(J. Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology,2015)。さらに、口腔癌患者の唾液をキャピラリー電気泳動-質量分析法(以下、CE-MS)メタボローム解析により網羅的に検索して、唾液に含まれる口腔癌のバイオマーカーとなるタンパク、酵素を特定しその抗体の作製を目標とした研究を進め、アミノ酸代謝経路において口腔癌で特徴的に発現する代謝物を検出、さらにこの代謝物が果たして口腔癌の発生過程において特異的に発現する物質であるかを確認する必要がある。それを確認することができれば、得られた物質(特にタンパク)を一次スクリーニングに導入し、既に実用化されつつある糖尿病、膵癌等を対象とした唾液を試料とするプロテインチップに合わせて搭載し、歯科診療所レベルで簡便に行なえる口腔癌等のスクリーニング検査として普及に努める。

2. 研究の目的

口腔がんはWHOの統計によるとアメリカ・イギリス・フランス・イタリアの先進諸国では減少傾向にあり、2000年でその死亡者数は人口10万人台100~200人である。しかし、日本においてはその対策は遅れ男女ともに増加傾向を示し、2013年人口10万人230人に達することが予想されている。口腔癌は二次医療機関施設を治療目的に来院したときにはStage 以上の進行冷が60%を占めるのが実情でその発見の遅れにも問題がある。これらの解決には口腔癌の早期発見のために一般の歯科医師が口腔癌のスクリーニングを容易に行える巢システムの開発が急務である。本研究は幹敏にかつ非侵襲的に反復して採取できる唾液を検体として口腔前癌病変の癌化のリスクファクターを判定する検査方法を確立する研究である。

3. 研究の方法

口腔癌患者由来全唾液(外科的切除術前)および健常人全唾液により、以下の実験を行う。本方法でタンパクの抽出が可能であることは我々が報告している。

(片倉ら、唾液による口腔癌のスクリーニング検査-プロテオームによるバイオマーカーの解析-、頭頸部癌 34(4):503-507,2008)

- 1) 全唾液 3ml を採取し、遠心分離(12,000rpm × 10min)により上清を分離した後、Lysis buffer を用いてタンパク質を抽出・精製する。
- 2) MeOHCHCl₃ を加えて、ビーズショッカーでホモジナイズした後、5kDa 限外ろ紙フィルターに移し遠心分離を行う。代謝物質を極性代謝低分子(アミノ酸、ヌクレオチド、有機酸、補酵素など)、変性タンパク質画分、脂質・二次代謝分子(トリグリセリド・コレステロール・ポシフェノールなど)の3分画となるのでこれらをそれぞれ減圧乾燥したのちにCE-MS 解析に供する。
- 3) CE-MS 解析は内径 50 μm の泳動液で満たされたキャピラリーによる電気泳動を行う。電荷や分子の大きさによって検出時間に差が生じこれを直接キャピラリーに接続した質量分析計で解析することで感度が向上しイオン性代謝物質の網羅的測定が可能である。

4. 研究成果

- (1) 口腔癌患者の唾液を試料として二次元電気泳動法により網羅的にタンパクの検索を行なったところ、特徴的に増加・減少する 10 種のタンパクスポットが検出できた。さらに二次元電気泳動法を用いて、その中で口腔癌患者に特徴的に出現するタンパクの質量解析からその一つとして enolase 1 を特定した。
- (2) 本研究の目的は前述にも記載されている CE-MS を用いて唾液飼料の解析を行うことで本邦の口腔扁平上皮癌患者の特徴的な代謝産物を同定することである。過去の研究では CE-MS を用いた口腔扁平上皮癌患者の唾液の代謝物において民族や各腫瘍間での変化を報告している。
- (3) 本研究では、東京歯科大学市川総合病院歯科・口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌患者 22 例および健常人 21 例を対象として全症例とも CE-MS 用いたメタボローム定量解析を実施した。唾液から検出された 499 のイオン性代謝物のうち、25 代謝物質が口腔扁平上皮癌患者と健常人において 2 群間において統計学的有意差を認めた。Wilcoxon Rank Sum Test において Choline, *p*-Hydroxyphenylacetic acid and 2-Hydroxy-4-methylvaleric acid が $P < 0.001$ 、Val, 3-Phenyllactic acid, Leu, Hexanoic acid, Octanoic acid, Terephthalic acid, γ -Butyrobetaine

and 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid が $P < 0.01$, Ile, Trp, 3-Phenylpropionic acid, 2-Hydroxyvaleric acid, Butyric acid, Cadaverine, 2-Oxoisovaleric acid, N^6, N^6, N^6 -Trimethyllysine, Taurine, Glycolic acid, 3-Hydroxybutyric acid, Heptanoic acid, Ala, Urea が $P < 0.05$ で口腔扁平上皮癌患者が対照群と比較し有意差を認めた。過去の研究で探索された特異的な 24 代謝物質は、本研究においても taurine, valine, leucine, isoleucine, choline, cadaverine, and tryptophan と 7 物質同様の代謝物が検出された。さらに choline、BCAA 回路、urea, 3-hydroxybutyric acid が特徴的に検出された。choline と BCAA 回路の代謝物は以前の口腔扁平上皮癌のメタボローム解析にて報告されている (日本口腔科学会総会 優秀ポスター賞受賞, 2014)。口腔扁平上皮癌患者の代謝物として urea と 3-hydroxybutyric acid は今までに報告されていない。これらの結果より本邦の扁平上皮癌患者の唾液からのバイオマーカーとして簡便な方法である。今後は母集団増大し本研究の結果を検証する必要がある。(図 1-4)

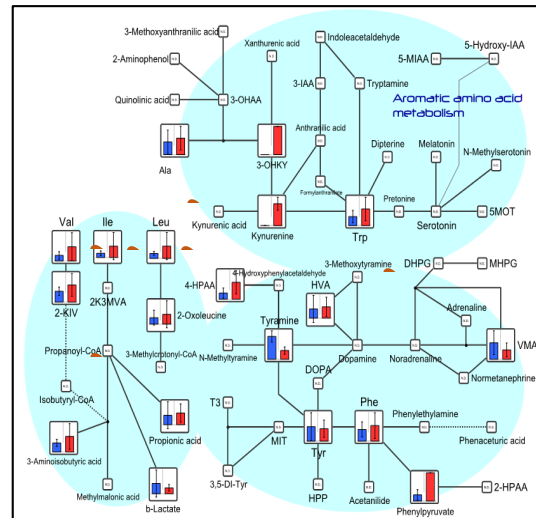


図 3 Branched-chain acid (BCAA) metabolism

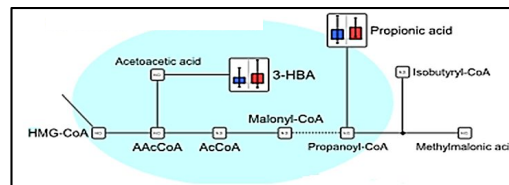


図 4 ketone body metabolism

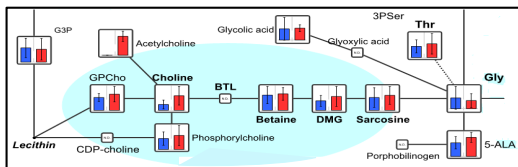


図 1 choline metabolism

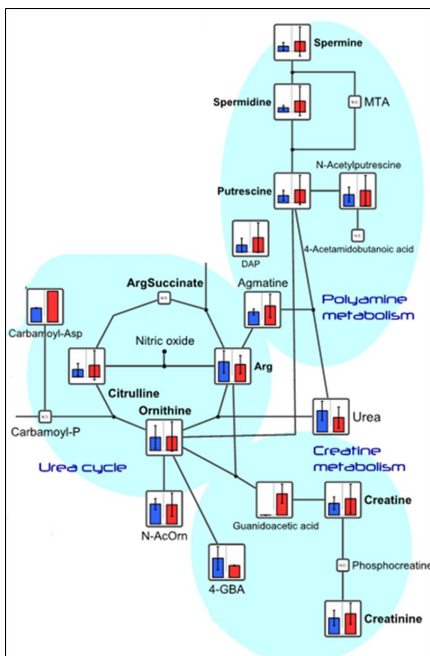


図 2 polyamine metabolism, urea cycle, creatine metabolism

<引用文献>

1. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M: Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 6(1): 78-95, 2010.
2. Katakura A, Yamamoto N, Sakuma T, Sugahara K, Onda T, Noguchi S, Shibahara T: A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 27: 1-5, 2015,
3. Sugimoto M, Kikuchi S, Arita M, Soga T, Tomita M: Large-scale prediction of cationic metabolite identity and migration time in capillary electrophoresis mass spectrometry using artificial neural networks. *Analytical Chemistry*. 77:78-84, 2005.
4. Li Y, StJohn M, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan R.C, Eisele D, Elashoff D, Park NH, Wong DT: Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection *Clin Cancer Res* 10(24): 8442 - 8450,

- 2004
5. Plumb R, Granger J, Stumpf C, Wilson ID, Evans JA, Lenz EM: Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences. *Analyst* 128: 819-23, 2003
 6. Zeng J, Yin P, Tan Y, Dong L, Hu C, Huang Q, Lu X, Wang H, Xu G: Metabolomics study of hepatocellular carcinoma: discovery and validation of serum potential biomarkers by using capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Proteome Res* 13: 3420-31, 2014

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1件)

1. Akira Katakura, Nobuharu Yamamoto, Takumi Sakuma, Keisuke Sugahara, Takeshi Onda, Sunaki Noguchi, Takahiko Shibahara
A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 27: 1-5, 2015

[学会発表](計2件)

大島光慶、野口沙希、片倉朗、他
口腔癌患者の唾液のメタボローム解析から腫瘍マーカーを探索する
第68回日本口腔科学会総会、2014年5月21、22、23日、東京

大島光慶、菅原圭亮、片倉朗、他
唾液および組織からメタボローム解析を実施し腫瘍マーカーを探索する。
第69回日本口腔科学会総会、5月13、14、15日、大阪市

6. 研究組織

(1)研究代表者

片倉朗 (AKIRA KATAKURA)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10233743

(2)研究協力者

石川 玄 (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(株)、研究員)

キャピラリー電気泳動-質量分析を委託する。

杉本昌弘 (MASAHIRO SUGIMOTO) (慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授)

David TW Wong (Associate Dean of Research, School of Dentistry, University of California, Los Angeles) :