

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593028

研究課題名(和文)メタボローム解析による口腔がん早期発見スクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Development of the screening method for oral cancer by metabolomics

## 研究代表者

古森 孝英 (Komori, Takahide)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50251294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんは咀嚼、嚥下、構音、審美性など機能的・形態的側面に多大な影響を与え、患者自身のQOL(生活の質)を著しく低下させます。また、早期発見・早期治療が予後に大きく関わってきます。そのため、口腔がんの早期発見を簡便に実施する方法が必要とされています。本研究では、メタボローム解析という手法を用いて、口腔がん患者さんの血液に含まれる代謝物質を網羅的・包括的に解析しました。また、健康な人の血液と比較することで、口腔がんの人で有意に変動する代謝物質を見つけ出しました。このことは、口腔がんを超早期に発見することが可能性を秘めています。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the eleventh most common cancer in the world. The five-year survival rate of patients who are diagnosed with OSCC at an early stage is about 80-90%. On the other hand, at an advanced stage, the five-year survival rate is less than 30%. Therefore, it is important to detect OSCC at an early stage. In this study, we subjected OSCC patients' serum samples to gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)-based metabolomic analysis. Their preoperative serum metabolite levels were compared with those of healthy volunteers. In addition, the pre- and postoperative serum metabolite levels of these patients were also compared. The metabolites that displayed significant differences were subjected to multiple logistic regression analysis, and it was found that models based on candidate biomarker pairs possessed greater accuracy than single biomarker candidates. GC/MS-based metabolomic analysis is a promising method for detecting early-stage OSCC.

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

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は現在日本人の死亡原因の第1位となっており、口腔がんは悪性腫瘍全体における比率こそ低いものの日本の高齢化社会到来に伴い罹患率も増加する一方である。欧米先進国では、口腔がんの罹患増加率は日本と同様の傾向にあるものの、国を挙げてのがん対策が功を奏してその死亡率は減少傾向を示している。日本でも「第3次対がん10カ年総合戦略」に代表されるように、がんの制圧は国の重要政策の一つであり、がんの早期発見に役立つ画期的な極めて早期の診断法開発が強く求められている。

口腔は消化器系の入り口として、喫煙、飲酒や食物などによる化学的・物理的刺激に暴露され、発がんに関わる特殊な環境と危険因子が複数存在することが特徴である。また、口腔がん患者の自覚症状も少なく、傷や口内炎などの症状と認識して放置され、病変が進行したのち歯科医院などで指摘されることも多い。さらには、口腔がんは頸部リンパ節に転移することが多く、転移リンパ節の有無がステージ分類や予後に大きく関わってくるため早期発見が重要になってくる。

近年、CT、MRI、PETなどの画像診断技術が急速に進歩した。早期診断が可能な症例も一部には認められるが、これらを健康診断(スクリーニング検査)として全国民に実施することは、人材面・コスト面から考慮して非現実的である。現在スクリーニング法として、血中内の腫瘍マーカー検査が広く使用されている。しかし、一般的にがんにおいて腫瘍マーカーが陽性を示すものは約半数と報告されており、感度が低いという問題がある。これらの理由により、初診時にすでに進行がんである患者の割合も非常に高い。そこで、これらの問題点を克服した、簡便で低コストかつ効率よく、口腔がんをスクリーニングする方法の開発を目指す。

がんでは細胞の異常増殖のため、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な早期診断ツールに結びつくと考えている。生体内の代謝物には、糖、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、核酸など多くの低分子化合物が数千種類存在する。近年、生体分子の高感度な網羅的解析を得意とする質量分析計を用いて、これらの代謝物を網羅的に比較定量する方法が進歩してきた。我々は、これまでにガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用い、血液中の水溶性代謝物を網羅的に検出・定量可能なシステムを確立した。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず(基礎的検討として)口腔がん細胞株を移植したヌードマウスを担がんモデルマウスとして用い、このマウスの血液を用いて、血漿中の水溶性代謝物を網羅的に分析する。さらに、統計解析手法の一つである多変量解析を用いて、代謝物のプロファ

イル(代謝物定量データのパターン)に違いが認められるかを検討する。さらに、口腔がん患者と健常人の血清を用いて同様な解析を行い、マウスの結果がヒトに適用できるかを検討する。以上の研究結果をまとめることで、口腔がん特異的なバイオマーカーを探索し、その臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

口腔がん細胞株を用いたメタボローム解析

ヌードマウスにヒト口腔がん由来細胞株を移植することで担がんモデルマウスを複製し、その血漿を収集する。その血漿メタボローム解析を実施し、口腔がん特異的な代謝物プロファイリングを得る。具体的には、ヌードマウス体内にがん由来細胞株を移植し定着させる。移植開始から1週間毎に血漿を回収する。また、がん由来細胞株を移植していないヌードマウスからも同様に血漿を回収する。得られた血漿から水溶性代謝物を抽出し、続けてメタボローム解析を実施し、がんの移植により変動する水溶性代謝物を同定する。

口腔がん患者の血清を用いたメタボローム解析(メタボリックフィンガープリンティング)

具体的には、口腔がん患者と非がん患者から血清を提供して頂き、メタノールを用い血清から水溶性代謝物の抽出を行う。また、健常人の血清からも同様に行う。抽出液をGC/MSに供し測定を実施し、得られた測定データを用いて多変量解析を行うことで、口腔がん患者、非がん患者の血清の代謝物の存在パターンがそれぞれ異なるのか否かを統計学的に明らかにする。

また、口腔がん患者と非がん患者の手術後の血清を提供して頂き、同様にGC/MSによる測定を実施し、手術後の血清代謝物存在パターンが健常人に近づくのか否かなどを検討することで、治療効果予測への適応性に関しても明らかにする。採血は空腹時採血とし、また、手術の影響を考慮し、術後の検体は二週間以上経過した血清を用いる。以上より得られた測定結果を用いて、実際に変動している代謝物を我々が保有しているデータベースなどを用いることで同定し、口腔がん・非がん患者と健常人との間で変動するものや手術前後で変動する低分子代謝物などを明らかにしていき、早期診断や治療効果予測に採用できるバイオマーカー候補を決定する。

### 4. 研究成果

口腔がん細胞株を用いたメタボローム解析

口腔がん由来細胞株(HSC-3, OSC-19)をヌードマウスに移植し、担がんマウスを複製。10×10mm以上の腫瘍が形成されるまで飼育し、その時点で採血を行った。その血液をGC/MS

で測定し、移植していないコントロール群と比較検討を行った。GC/MSにて約100種類の水溶性代謝物の同定が可能であり、コントロール群と比較した結果、HSC-19 担がんマウスでは、11種類(Asparagine, 1-Methyl Histidine, Ornithine, 1,5-Anhydro-D-glucitol, Ketoisoleucine, Hydrocinnamate, Fructose, Fructose, Allose, Mannose, Allose)、OS C-19では10種類(Glycerol, Nonanoic acid, Ketovaline, Hydrocinnamate, Xylose, O-Phosphoethanolamine, Mannose, Allose, Uric acid, Cysteine+Cystine)の代謝物に有意な変動を認めた。それらに共通する代謝物は、HydrocinnamateとMannoseであった。

口腔がん患者の血清を用いたメタボローム解析

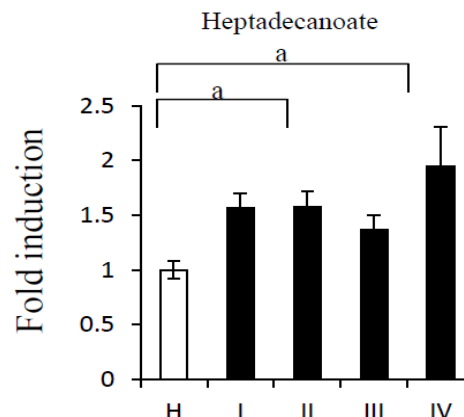
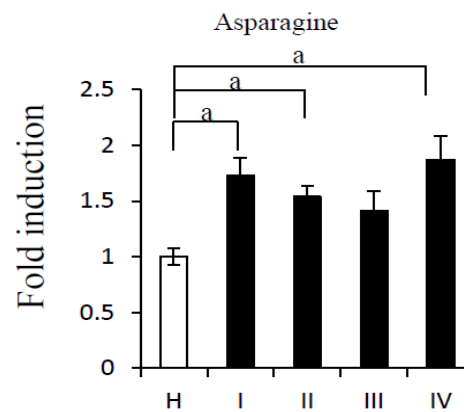
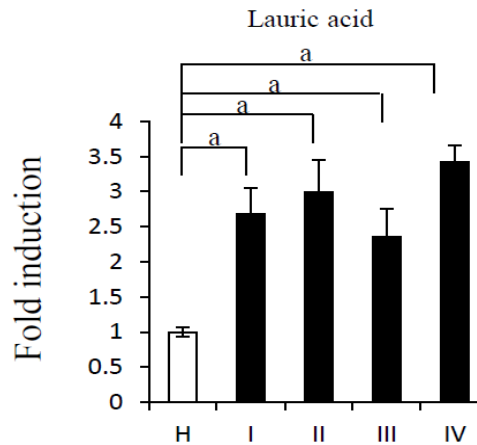
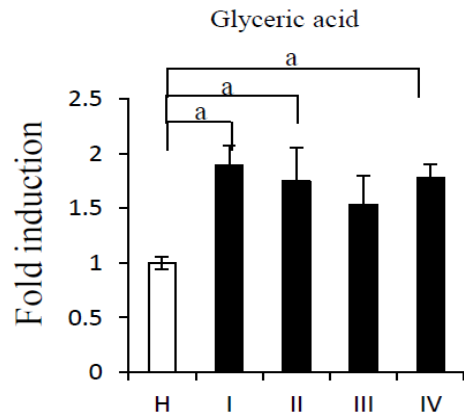
口腔がんの手術を行い、扁平上皮がんと診断された患者35名を対象とし、その術前術後の血清を用いた。コントロール群としては、年齢性別に有意差のない健常人の血清を用いた。その後、それぞれをトレーニングセットとバリデーションセットに分け、バイオマーカー候補の選定を行った後に、その検証を実施した。

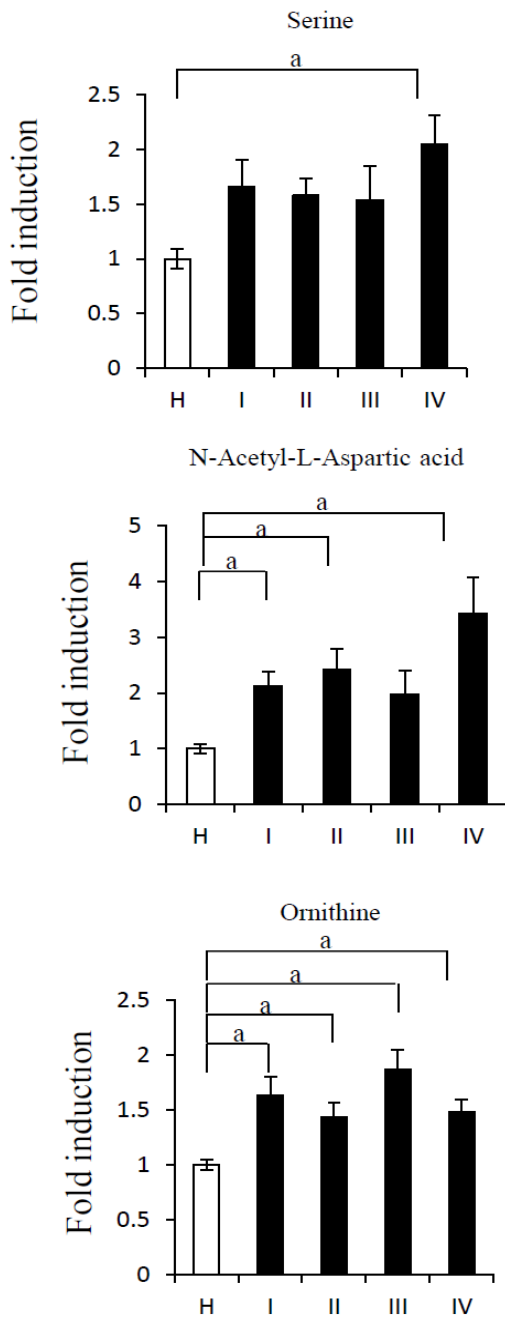
具体的な検証方法を示す。まず最初に、トレーニングセットとして、口腔がん患者の術前とコントロール群の比較と口腔がん患者の手術前後の比較を行った。それにより、それぞれ38種類、32種類の有意に変動する代謝物が判明した。その結果、共通して変動していた代謝物は13種類あった。次に、これらの13種類に関してバリデーションセットにて検証を行った。その結果、Glyceric acid, Serine, Lauric acid, N-Acetyl-L-Aspartic acid, Asparagine, Ornithine, Heptadecanoateの計7種類のバイオマーカー候補物質を選定することができた。また、口腔領域の手術による変動を考慮するため、口腔がん以外の疾患で手術した患者の術前術後の血清を測定し、これら7種類に影響を及ぼしていないことを確認した。これら7種類のバイオマーカー候補物質の感度を早期口腔がんに限りにみたところ、38.8~83.3%であった。これらは、従来の口腔がん腫瘍マーカー(SCC-antigen)等と比較すると高いものであった。さらに感度を高めるため、これらを組み合わせることで、多重ロジスティック回帰分析を行った。

その結果、ornithine+asparagine, ornithine+glyceric acid, ornithine+N-acetyl-L-aspartic acid, ornithine+serineの組み合わせで、スクリーニングに適した高い感度を示すことが判明した。

我々の研究成果は、血清メタボローム解析が口腔がんの新たなスクリーニング法としてなりうる可能性を示した。今後は、実用化に向けた研究を行う予定である。

・7種類のバイオマーカー候補物質のステージ別の値を下図に示す  
(H: 健常人, ~ はステージ)





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 6 件)

Akira Kimoto, Shin Nishiumi, Takashi Kobayashi, Yoshihiko Terashima, Hiroaki Suzuki, Junichiro Takeuchi, Takeshi Azuma, Takahide Komori, Masaru Yoshida. A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum screening method for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*. 査読有, 2013 Apr01;5(4):40.

<https://www.oapublishinglondon.com/article/456>

Shibuya Y, Ohtsuki Y, Hirai C, Hasegawa T, Akashi M, Shigeta T, Minamikawa T, Komori T. Oral squamous cell carcinoma with microscopic extracapsular spread in the cervical lymph nodes. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 査読有, 43, 4:387-92, 2014. doi: 10.1016/j.ijom.

Takeda D, Hasegawa T, Ueha T, Imai Y, Sakakibara A, Minoda M, Kawamoto T, Minamikawa T, Shibuya Y, Akisue T, Sakai Y, Kurosaka M, Komori T. Transcutaneous Carbon Dioxide Induces Mitochondrial Apoptosis and Suppresses Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma In Vivo. *PLOS ONE*. 査読有, 7, 9: e100530 1-8, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0100530.

Takahashi H, Yanamoto M, Yamada S, Umeda M, Shigeta T, Minamikawa T, Shibuya Y, Komori T, Shiraishi T, Asahina I, Yokoo S, Ri S. Effects of postoperative chemotherapy and radiotherapy on patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and multiple regional lymph node metastases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 査読有, 43, 6, 680-5, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0100530.

梅田正博, 柳本惣市, 山田慎一, 南川 勉, 渋谷恭之, 古森孝英. 口腔癌局所・頸部再発例に対する治療の現状と今後の展望. *日本口腔腫瘍学会雑誌*. 査読有, 26, 4: 140-148, 2014. doi:org/10.5843/jsot.26.140

柳本惣市, 上田倫弘, 山下徹朗, 太田嘉英, 大鶴光信, 栗太 浩, 鎌田孝広, 大倉正也, 相川友直, 古森孝英, 重田崇至, 桐田忠昭, 山川延宏, 梅田正博. 口腔扁平上皮癌 stage , における後発頸部リンパ節転移例の治療成績に関する多施設共同後ろ向き研究. *日本口腔腫瘍学会雑誌*. 査読有, 26, 3: 103-112, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

木本 明, 鈴木 泰明, 竹内 純一郎, 古森 孝英, 血清メタボローム解析から口腔がんの新規スクリーニング法の可能性を探る. *日本口腔外科学会*, 2013.10.11 ~ 10.13, 福岡国際会議場 (福岡県)

Akira Kimoto, Shin Nishiumi, Takashi Kobayashi, Yoshihiko Terashima, Hiroaki Suzuki, Junichiro Takeuchi, Takeshi Azuma, Takahide Komori, Masaru Yoshida. Metabolic approach to oral squamous cell carcinoma by gas chromatograph mass spectrometry. *International conference on oral and maxillofacial surgery*. 2013.10.21 ~ 10.24. Barcelona(Spain)

松井太輝, 重田崇至, 箕 康正, 高橋佑輔, 南川 勉, 李 進彰, 渋谷恭之, 梅田正博, 古森孝英. 舌扁平上皮癌のリンパ節転移に関わる因子について. 第 59 回日本口腔外科

学会総会・学術大会，2014年10月17日18日19日，千葉。

武田大介，長谷川巧実，今井佑輔，榊原晶子，明石昌也，南川 勉，渋谷恭之，古森孝英。局所的炭酸ガス投与による口腔癌新規治療法の開発。第59回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014年10月17日18日19日，千葉。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古森 孝英 (Komori, Takahide)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50251294

### (2) 研究分担者

鈴木 泰明 (Suzuki, Hiroaki)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10397812

### (2) 研究分担者

竹内 純一郎 (Takeuchi, Junichiro)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：30533757

### (2) 研究分担者

木本 明 (Kimoto, Akira)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：30597167

### (3) 連携研究者

吉田 優 (Yoshida, Masaru)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00419475